

UNIVERZA V NOVI GORICI  
FAKULTETA ZA ZNANOSTI O OKOLJU

**VSEBNOST ŽIVEGA SREBRA V KRVI, LASEH, URINU  
IN MATERINEM MLEKU PRI DOJEČIH MATERAH NA  
OBMOČJU LJUBLJANE**

DIPLOMSKO DELO

Petra PLANINŠEK

Mentorica: prof. dr. Milena Horvat

Nova Gorica, 2010



## **ZAHVALA**

Zahvaljujem se mentorici prof. dr. Mileni Horvat za usmerjanje in strokovno pomoč pri izdelavi diplomskega dela.

Zahvaljujem se tudi vsem sodelavcem na Institutu Jožef Stefan, še posebej Vesni Fajon, Ani Miklavčič, Darji Mazej in Janji Tratnik Snoj za pomoč v laboratoriju in strokovne pogovore ter vsem drugim, ki so kakor koli pripomogli pri nastanku tega diplomskega dela.

Zahvaljujem se tudi vsem svojim domačim in Dejanu Farkašu za vso podporo, še posebej pa staršem, ki so mi omogočili študij.



## POVZETEK

Cilj diplomske naloge je bil validirati in optimizirati analizno metodo za ugotavljanje nizkih koncentracij živega srebra (Hg) v vzorcih krvi, mleka in urina pri doječih materah. Z uporabo validirane metode pa izmeriti osnovne vrednosti Hg pri populaciji doječih mater na območju Ljubljane z okolico (N = 51) ter oceniti glavne načine izpostavljenosti. Za ugotavljanje vsebnosti živega srebra v bioloških vzorcih smo uporabili analizne metode, ki so bile prej vpeljane na Inštitutu Jožef Stefan ter temeljijo na predhodnem razkroju in merjenju z atomsko absorpcijsko spektrometrijo hladnih par. Eden od ključnih problemov pri analizi nizkih koncentracij Hg je obvladovanje kontaminacije vzorcev med pripravo ter možne izgube zaradi hlapnosti živega srebra. V okviru diplomskega dela smo primerjali različne kislinske razkroje v bučkah, epruveh, teflonskih posodicah, zataljenih ampulah ter mikrovalovni razkroj. Ugotovili smo, da je najprimernejši kislinski razkroj v epruveh, da je shranjevanje vzorcev pri -20 °C primerno ter da trikratno zamrzovanje in odmrzovanje ne vpliva na stabilnost živega srebra v preiskovanih vzorcih. Z uporabo validirane metode smo določili vsebnost Hg v vzorcih krvi, urina, mleka in las, ki so bili pridobljeni v okviru programa »Biomonitoring kemikalij v organizmih«, ki ga koordinira Odsek za znanosti o okolju na IJS. Ugotovili smo, da je aritmetična sredina za Hg v krvi 1,67 ng/mL v laseh 458 ng/g v mleku 0,28 ng/mL in v urinu 1,23 µg/g kreatinina. Koncentracije živega srebra pri preiskovani populaciji so nizke in podobne koncentracijam v drugih evropskih državah. Na podlagi vprašalnika o načinu življenja in zlasti prehranskih navad pa smo ugotovili, da sta glavna načina izpostavljenosti zaužitje (ribja prehrana) in vdihavanje (živosrebrove amalgamske zalivke). Lasje in kri so dobri pokazatelji izpostavljenosti živemu srebru z zaužitjem zlasti rib, medtem ko sta mleko in urin pokazatelja izpostavljenosti živemu srebru z vdihavanjem hlapov, sproščenih iz živosrebrovih amalgamskih zobnih zalivk.

**Ključne besede:** živo srebro, biomonitoring, spremljanje, izpostavljenost, Slovenija, doječe matere, validacija

## SUMMARY

The aim of this study was to validate and optimize the analytical method for low level mercury (Hg) determination in blood, hair, breast milk and urine samples of lactating mothers. In addition the main pathway of mercury exposure in lactating women from Ljubljana and surroundings (N=51) was estimated and total mercury concentrations were measured. Total mercury (THg) was determined by acid digestion and atomic absorption spectrometry. The analytical methods used were previously established at "Jožef Stefan" Institute. However at low level mercury exposure it is important to control the contamination during sample preparation and possible losses of volatile mercury. Different acid digestions in volumetric flasks, tubes, ampoules and microwave digestion were compared and acid digestion, using tubes, was found to be the most appropriate. Storage of fresh biological samples at minus 20 °C and threefold freezing/unfreezing of samples had no influence on the Hg content stability in analyzed samples. Using validated analytical method, Hg content in blood, hair, breast milk and urine samples, obtained within the program "Biomonitoring of chemicals in organisms", coordinated by department of the Environmental Sciences (JSI), was determined. Hg mean values in blood, hair, breast milk and urine were 1.67 ng/mL sample, 458 ng/g sample, 0.28 ng/mL sample and 1.23 µg/g creatinin, respectively. Hg concentrations in taken population are low and are similar to the values obtained in others European countries.

Based on questionnaire about participant life style and nutrition habits it was concluded that fish consumption and dental amalgam fillings are the main pathway of Hg exposure. Hair and blood samples are appropriate biomarkers for mercury exposure through fish diet, while urine and breast milk are good biomarkers for dental amalgam fillings exposure.

**Key words:** mercury, human biomonitoring, exposure, Slovenia, lactating mothers, validation

## SEZNAM OKRAJŠAV

Okrajšava	Pomen
CV AAS	Atomska absorpcijska spektrometrija hladnih par
CV AFS	Atomska fluorescenčna spektrometrija hladnih par
CŽS	Centralno živčni sistem
DMA	Direktni analizator živega srebra
FAO	Food and Agricultural organization – Organizacija za prehrano in kmetijstvo
HBM	Humani BioMonitoring
Hg	Živo srebro
ICP MS	Inductively coupled plasma mass spectroscopy – masna spektrometrija z induktivno sklopljeno plazmo
IJS	Institut Jožef Stefan
ISO	International Standardisation Organization, Mednarodna organizacija za standardizacijo
LOD	Limit of detection – meja zaznavnosti
LOQ	Limit of quantification – meja kvantifikacije
MeHg	(mono)metilživosrebrove spojine
Milli-Q	Deionizirana voda Milli-Q (> 18 MΩcm, Millipore)
RNAA	Radiokemična nevtronska aktivacijska analiza
RSD	Relativna standardna deviacija
SD	Standardna deviacija
SI enote	Système International d'Unités – mednarodni sistem enot
THg	Celokupno živo srebro
UNEP	United Nations Environmental Programme – program združenih narodov za okolje
US EPA	Environmental Protection Agency – Ameriška agencija za varovanje okolja
USA NRC	National Research Council – Ameriški nacionalni raziskovalni svet
WHO	World Health Organization – Svetovna zdravstvena organizacija





## KAZALO VSEBINE

<b>1</b>	<b>UVOD</b>	<b>1</b>
1.1	Opredelitev problema	1
1.2	Namen in cilji	2
<b>2</b>	<b>TEORETIČNE OSNOVE</b>	<b>3</b>
2.1	Oblike živega srebra in njegovo kroženje v naravi	3
2.2	Viri živega srebra	4
2.3	Absorpcija, distribucija, metabolizem, eliminacija in strupenost živega srebra pri človeku	5
2.4	Biološko spremljanje izpostavljenosti človeka živemu srebru	9
2.4.1	Biološki kazalci izpostavljenosti človeka živemu srebru	10
2.4.2	Kri	11
2.4.3	Lasje	12
2.4.4	Urin	12
2.4.5	Materino mleko	13
2.5	Priporočila in zakonsko predpisane vrednosti	14
2.6	Analitika živega srebra v bioloških vzorcih	14
<b>3</b>	<b>EKSPERIMENTALNI DEL</b>	<b>16</b>
3.1	Postopek pridobivanja vzorcev	16
3.2	Uporabljene metode in materiali	17
3.2.1	Priprava reagentov in standardne raztopine	17
3.2.2	Optimizacija kislinskega razkroja	18
3.2.3	Merilni sistemi	21
<b>4</b>	<b>REZULTATI IN RAZPRAVA</b>	<b>23</b>
4.1	Validacija analiznega postopka za določanje celokupnega živega srebra v bioloških vzorcih	23
4.1.1	Optimizacija kislinskega razkroja	23
4.1.2	Meja zaznavnosti in kvantifikacije	30
4.1.3	Zagotavljanje pravilnosti in merilna negotovost	31
4.1.4	Sledljivost in kalibracija	35
4.1.5	Stabilnost Hg pri zamrzovanju in odmrzovanju	35
4.2	Analiza rezultatov Hg v preiskovani populaciji	38
4.2.1	Podatki o preiskovankah iz vprašalnikov	38
4.2.2	Rezultati analiz vsebnosti celokupnega živega srebra	38
4.3	Povezanost Hg med biološkimi kazalci in viri izpostavitve	49
<b>5</b>	<b>ZAKLJUČKI</b>	<b>52</b>

<b>6</b>	<b>VIRI</b>	<b>53</b>
<b>7</b>	<b>SEZNAM PRILOG</b>	<b>61</b>

# 1 UVOD

## 1.1 Opredelitev problema

Živo srebro je zaradi svoje velike kemijske aktivnosti, globalnega razširjanja, biogeokemijskega kroženja, pretvorb v okolju, kopičenja v prehrabnih verigah ter svoje strupenosti še vedno aktualna tema v Evropi in tudi v svetu. S svojo dejavnostjo je človek vsebnost Hg v atmosferi potrojil. Hg zaradi hlapnosti in prenosa na dolge razdalje spada med globalna onesnažila. Na globalni ravni se zato s problematiko Hg ukvarja Program združenih narodov za okolje (UNEP), ki je leta 2002 pripravil poročilo »Global mercury assessment« (UNEP, 2002), to je bila osnova za sprejetje akcijskega načrta za zmanjševanje emisij Hg v zrak ter obvladovanje izpostavljenosti prebivalstva in drugih živih bitij. Trenutno pa potekajo pogajanja na globalnem nivoju, ta bodo obvladovanje problema tudi pravno oblikovala v okviru globalne konvencije, ki je v pripravi ([www.unepchemicals.org](http://www.unepchemicals.org)). Evropa se je na problematiko odzvala s pripravo Evropske strategije za živo srebro (<http://mercury.biois.com/files-3>) in v glavnem usklajujejo dejavnosti s programom UNEPa.

Živo srebro v telo vstopa na različne načine, t.j. predvsem z zaužitjem pa tudi skozi dihala in kožo. V organizmu vpliva na razvoj centralnega živčnega sistema, zato je pomembno ugotoviti, kolikšna je izpostavljenost v najzgodnejšem obdobju življenja. Med najbolj občutljivo populacijo spadajo predvsem nosečnice in novorojenčki, otroci in ženske v rodni dob (NRC 2000).

V Sloveniji, Evropski uniji in tudi v svetu se zakonodaja o emisijah Hg in njegovih spojin vedno bolj zaostruje. Nižajo se dovoljene vsebnosti v izpušnih, zaostrujejo pa se tudi predpisi o vsebnosti Hg v prehranskih proizvodih, še posebej ribah. Evropska strategija za okolje in zdravje (European Environment and Health Strategy, [http://europa.eu/legislation\\_summaries/environment/general\\_provisions/l28133\\_en.htm](http://europa.eu/legislation_summaries/environment/general_provisions/l28133_en.htm)) v okviru biološkega spremljanja izpostavljenosti človeka kemikalijam predvideva tudi spremljanje izpostavljenosti živemu srebru. V svetu pa na resnost problema kaže dejanje Svetovne zdravstvene organizacije (World Health Organization), ki je leta 2003 bistveno znižala priporočila o sprejemljivi izpostavljenosti metil živemu srebru (MeHg). Na tem področju se opravljajo tudi različne raziskave v okviru Evropskega okvirnega programa, med katerimi ima poseben pomen projekt PHIME (Public health impact of long-term, low-level mixed element exposure in susceptible population strata ([www.phime.org](http://www.phime.org))). V programu PHIME sodeluje tudi Slovenija. V Sloveniji so bile narejene študije povezane z rudnikom živega srebra v Idriji, ki velja za onesnaženo območje. Študije o izpostavljenosti splošnega prebivalstva živemu srebru pa so bile narejene le občasno in nesistematično (Horvat in sod., 1991). Šele v okviru programa »Biomonitoring kemikalij v organizmih 2007 – 2009« ter ga je financiralo Ministrstvo za zdravje RS in ga koordinira in izvaja Institut Jožef Stefan, je bila opravljena prva sistematična študija, v katero je bilo vključeno tudi živo srebro. Del te študije predstavlja ta diplomska naloga.

Pri splošni populaciji, ki živemu srebru ni poklicno izpostavljen, je pričakovati nizke koncentracije Hg. Za pravilno določanje teh koncentracij je treba uporabiti analize metode, ki so specifične, občutljive in točne. Le tako lahko zagotavljamo primerljivost rezultatov s preostalimi študijami. Ker je Hg navzoč v zraku, laboratorijskem priboru in kemikalijah, je treba zagotoviti primerno pripravo, pri kateri ne sme prihajati do kontaminacije. Zaradi hlapnosti Hg moramo zagotoviti, da pri pripravi vzorca ne prihaja

do izgub, zlasti pri razkrojih pri povišani temperaturi. Do izgub Hg lahko prihaja tudi pri hranjenju in ravnanju z vzorci. Ker tekoče biološke vzorce krvi, urina in mleka hranimo v zamrzovalniku, lahko pri zamrzovanju in odmrzovanju prihaja do izgub Hg zaradi hlapnosti. Da bi se izognili tem napakam, smo v prvi fazi diplomske naloge namenili veliko časa optimizaciji in validaciji analiznih metod za določanje Hg v tekočih vzorcih (mleko, urin, kri). S tem smo zagotovili pravilnost rezultatov, ki naj bi se uporabili za izračun osnovnih oziroma referenčnih vrednosti za slovensko populacijo. Za določanje Hg v laseh pa smo uporabili rezultate predhodno validirane metode.

## **1.2 Namen in cilji**

Cilj diplomskega dela je bil validirati in optimizirati analizno metodo za ugotavljanje nizkih koncentracij živega srebra v vzorcih krvi, mleka in urina pri občutljivi populaciji doječih mater. Cilj optimizacije je bil optimizirati kislinski razkroj in zamrzovanje/odmrzovanje vzorcev.

Z uporabo validirane metode pa je bil namen naloge izmeriti osnovne vrednosti živega srebra v vzorcih krvi, urina, las in materinega mleka pri populaciji doječih mater na območju Ljubljane ter oceniti glavne načine izpostavljenosti.

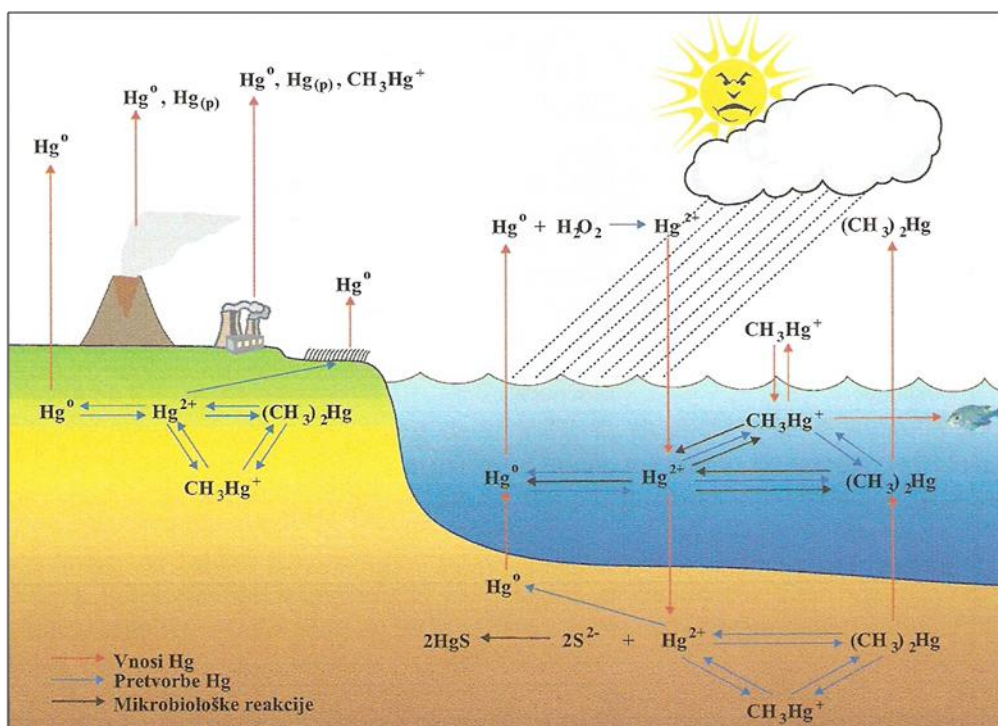
## 2 TEORETIČNE OSNOVE

### 2.1 Oblike živega srebra in njegovo kroženje v naravi

Živo srebro (Hg) je edina kovina, ki je pri sobni temperaturi v tekočem agregatnem stanju. V naravi se nahaja v različnih kemijskih oblikah:

- elementno živo srebro ( $\text{Hg}^0$ ): kot tekočina ali hlapi
- anorgansko živo srebro: anorganske živosrebrne soli, najpogostejša je dvovalentna oblika  $\text{Hg}^{2+}$ , manj pogosta pa enovalentna  $\text{Hg}_2^{2+}$
- organsko živo srebro: monometil živo srebrne spojine ( $\text{CH}_3\text{Hg-R}$ ), ki jih označimo kot MeHg in dimetil živo srebro.

Različne oblike živega srebra se v atmosferi, kopnem in vodnem okolju izmenjujejo in pretvarjajo v druge oblike ter se tako vključujejo v prehranske verige. Osnovne ravnotežne procese kroženja Hg v okolju prikazuje slika 1.



**Slika 1:** Osnovne poti biogeokemijskega kroženja Hg v naravi (Horvat in sod., 2009)

Pri kroženju živega srebra so pomembne tako kemijske, kot tudi biokemijske reakcije, ki povzročajo pretvorbe Hg spojin. Med temi so najpomembnejše :

- oksidacija:  $\text{Hg}^0$  v  $\text{Hg}^{2+}$
- redukcija:  $\text{Hg}^{2+}$  v  $\text{Hg}^0$
- metilacija: vezava živosrebrnega iona v MeHg spojine oziroma pretvorba Hg iz anorganske v organsko obliko
- demetilacija: razpad  $\text{CH}_3\text{Hg}^+$  in  $(\text{CH}_3)_2\text{Hg}$  do  $\text{Hg}^{2+}$  in  $\text{Hg}^0$

Ker je elementarno živo srebro hlapno, je atmosferska pot pomembna pri biogeokemijskem kroženju Hg. V zraku se večinoma nahajajo hlapi elementarnega živega srebra, ki so dolgo obstojni (po navedbah Clarksona (2002) je to približno eno

leto) ter se lahko prenašajo na dolge razdalje, kar je pomembno z globalnega vidika. Z oksidacijo se  $\text{Hg}^0$  pretvori v  $\text{Hg}^{2+}$ , ki se z mokrim ali suhim odlaganjem lahko odlaga na kopno ali v vodo.

V tleh je živo srebro izpostavljeno različnim kemijskim in biokemijskim pretvorbam, kot so oksidacija  $\text{Hg}^0$ , redukcija  $\text{Hg}^{2+}$  in metilacija. Kakšni procesi bodo potekali je odvisno od lastnosti tal, kot so pH, temperatura, vsebnost organske snovi (Remy in sod., 2006; Wang in sod., 2003). Proces metilacije in demetilacije so odvisni od delovanja  $\text{SO}_4^-$  reducirajočih bakterij, metanogenov, fotoredukcije in preostalih abiotičnih procesov v prsti (Barkay, 1992).

Najbolj topna oblika živega srebra v vodi je živosrebrov klorid, s topnostjo 69 g/L pri 25 °C, medtem ko je elementarno živo srebro ( $\text{Hg}^0$ ) topno le  $5,6 \times 10^{-5}$  g/L pri 25 °C (NRC, 2000). Elementarno živo srebro prehaja v atmosfero iz vodnega sedimenta in vode (slika 1). V vodnem okolju in zgornjih plasteh sedimentov prihaja do pretvorbe  $\text{Hg}^{2+}$  v MeHg. Le-ta se s pomočjo prehranjevalnih verig v visokih koncentracijah kopiči v tkivih vodnih organizmov. V vodnem okolju lahko potekajo procesi biokemične metilacije, kemične metilacije (ob navzočnosti primerne spojine, ki je donor metilne skupine), fotokemične metilacije (na vodni površini) in demetilacije (vodi do nastanka  $\text{Hg}^0$  in  $\text{Hg}^{2+}$ ) (Barkay in Wagner-Döbler, 2005).

## 2.2 Viri živega srebra

Zaradi hlapnosti in mobilnosti je živo srebro navzočo v vseh medijih okolja, njegovi viri pa so naravni in antropogeni. Med naravne štejemo delovanje vulkanov (Clarkson, 2002), izhlapevanje samorodnega živega srebra iz zemlje in vodne gladine, gozdne požare in razpadanje kamnin (UNEP, 2002).

Antropogeni viri živega srebra v okolju so posledica uporabe le-tega v industrijskih procesih, metalurgiji, kmetijstvu, medicini in znanosti. Glavno sproščanje živega srebra v atmosfero, kot posledica človekovega delovanja je izgorevanje fosilnih goriv (premog, nafta) in odpadkov ter topilnice rud (WHO-IPCS, 1991). Kloralkalna industrija je trenutno glavni uporabnik Hg v državah Evropske unije.ocene kažejo, da je kloralkalna industrija odgovorna za približno 17 % celotnih antropogenih emisij Hg (Pacyna in sod., 2006). V Evropi je letna antropogena emisija živega srebra v zrak ocenjena na približno 300 ton (Pacyna in sod., 2001).

V Sloveniji je bilo ocenjeno, da največ emisij živega srebra pride v zrak z izgorevanjem lignita (372 kg/leto) in rjavega premoga (236 kg/leto) iz točkovnih virov. V vodo največ emisij pride iz razpršenih virov, kot posledica uporabe zobnih amalgamov (82,43 kg/leto). Največ emisij kot odpadke pa pride z odlaganjem iz točkovnih virov (50,4 kg/leto). Podrobnejši pregled emisij v zrak, vodo in kot odpadke je prikazan v preglednici 1 (Svetina in sod., 2002; Kotnik in Horvat, 2000).

**Preglednica 1:** Ocenjene emisije Hg v Sloveniji (Svetina in sod. 2002, Kotnik in Horvat 2000)

Viri Hg		Emisije Hg v zrak (kg/leto)	Emisije Hg v vodo (kg/leto)	Emisije Hg - odpadki (kg/leto)
Razpršeni viri Hg	Uporaba zobnih amalgamov	4,57	82,43	
	Uporaba kemikalij		10,13	
	Izgorevanje fosilnih goriv			
	Bencin	0,998		
	Plinsko in kurilno olje	2,044		
	Lignit	<3,7		
	Rjavi premog	1,2		
	Skupaj	<12,51	92,56	
Točkovni viri	Cementna industrija	0,376		3,594
	Izgorevanje fosilnih goriv			
	Lignit	<372		
	Rjavi premog	236		
	Sežig in sosežig odpadkov	0,094	0,00096	0,8
	Upepelitev	10,63		
	Odlaganje odpadkov			50,4
	Skupaj	<619,1	0,00096	54,79

### 2.3 Absorpcija, distribucija, metabolizem, eliminacija in strupenost živega srebra pri človeku

Ljudje smo izpostavljeni različnim oblikam Hg, ki se glede na strupenost med seboj razlikujejo (preglednica 2). Zobni amalgam, iz katerega se sproščajo hlapi  $Hg^0$ , je glavni vir izpostavljenosti hlapom  $Hg^0$  pri splošni populaciji (WHO, 2003). Izpostavljenost organskemu živemu srebru (MeHg) poteka večinoma z zauživanjem morske hrane, predvsem na vrhu prehranskih verig, medtem ko preostala hrana v splošnem vsebuje nizke koncentracije tako MeHg kot anorganskega Hg (WHO-IPCS, 1990, 1991).

Absorpcija  $Hg^0$  v gastrointestinalnem traktu je zelo majhna in je prej odvisna od površine kot od količine (Boronmann in sod., 1970). Absorpcija skozi kožo predstavlja 2,2 % absorpcije skozi pljuča, s tem da v krvni obtok prehaja le polovica prejete doze. Približno 75 do 85 % vdihanega  $Hg^0$  se absorbira v pljuča, se deloma tam zadrži in nato prehaja v kri, kjer je na razpolago za prehajanje v druge dele telesa (Berlin in sod., 1969; WHO-IPCS, 1991; WHO 2003). Delno se raztopi v plazmi v nespremenjeni obliki, večinoma pa z difuzijo prehaja neposredno v tkiva ali v rdeče krvne celice, kjer se ga nekaj veže na hemoglobin v elementarni obliki. Večinoma pa se  $Hg^0$  s pomočjo katalaznega kompleksa peroksisomov in lizosomov oksidira v  $Hg^{2+}$ . Ta je lahko prost ali vezan na hemoglobin v rdečih krvnih celicah in na proteine ter aminokisliline (Halbach in Clarkson, 1978). Eksperimentalne študije so pokazale, da  $Hg^0$  lahko prehaja krvno-možgansko in placentarno pregrado, kar vodi do kopičenja Hg v možganih (Berlin in sod. 1969) in zarodku (Khayat in Dencker, 1982), metem ko je prehod  $Hg^{2+}$  otežen. Razpolovni čas v krvi po izpostavitvi  $Hg^0$  je 2 do 4 dni (hitra faza)

in 2 do 3 tedne (počasna faza). Razpolovni čas vdihanega  $\text{Hg}^0$  v celotnem telesu pa je približno 60 dni (Hursh in sod., 1976; Barregard in sod., 1992; Barregard, 1993).

Absorpcija živosrebrih soli iz prebavnega trakta je odvisna od njihove topnosti. Relativno netopne soli se absorbirajo slabo (0,2 %  $\text{HgS}$ ), medtem ko se dobro topne precej bolj (15 %  $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ ). V splošnem se absorbira v gastrointestinalnem traktu manj kot 10 % zaužitih anorganskih Hg-spojnin (Rahola in sod., 1973). Absorpcija anorganskih Hg-spojnin skozi kožo je 2 do 3 %.  $\text{Hg}^{2+}$  se akumulira v večini tkiv z večinskim deležem v ledvicah (ATSDR, 1999). Razpolovni čas  $\text{Hg}^{2+}$  v krvi je približno 28 dni in v celotnem telesu približno 40 dni (Rahola in sod., 1973). Pri visoki izpostavljenosti prevladuje izločanje z urinom (ATSDR, 1999).

Tarčni organ  $\text{Hg}^0$  so poleg pljuč in ledvic predvsem možgani, čeprav je strupenost posledica  $\text{Hg}^{2+}$  oblike, ki nastaja z oksidacijo. Glavni tarčni organ pri zastrupitvi s  $\text{Hg}^{2+}$  so ledvice in sicer ovira njihovo delovanje ter povzroča poškodbe (WHO-IPCS, 1991).

Glavni način izpostavljenosti MeHg je z zaužitjem s prehrane, zlasti rib, ki imajo v mišicah od 80 do 100 % Hg v obliki MeHg. Absorpcija MeHg v gastrointestinalnem traktu je zelo velika – najmanj 95 % (WHO-IPCS, 1990; Aberg in sod., 1969). Absorpcija MeHg je kar 17 do 35-krat hitrejša kot pri anorganskem Hg. Vzrok za to je v enostavnem prehajanju celičnih membran. Ob zaužitju koncentracija spojine v krvi začne naraščati po 15 minutah in doseže maksimum v 3 do 14 urah (pri enkratnem zaužitju MeHg<sup>+</sup> spojini oziroma rib). Absorbirani MeHg se v približno 10 % nahaja v možganih in približno 5 % v krvnem sistemu, pri čemer je koncentracija v rdečih krvnih celicah 20-krat višja kot v plazmi (WHO-IPCS, 1990; Aberg in sod., 1969). Absorpcija skozi pljuča in kožo je mogoča, vendar o tem ni natančnejših podatkov (ATSDR, 1999). Eksperimentalne študije kažejo, da MeHg zlahka prehaja krvno-možgansko pregrado (Clarkson, 2002) in placento (Nordenhall in sod., 1995). Razpolovni čas je odvisen od tkiva, kjer se spojina nahaja, toda v splošnem je v med 40 in 70 dnevi (Clarkson, 2002). Primarno se MeHg izloča z blatom in žolčem, kar predstavlja okrog 90 % eliminacije. Pomemben način izločanja MeHg so tudi lasje, saj so v laseh koncentracije 250-krat višje kot v krvi (WHO, 1991).

Distribucija Hg po telesu je zelo kompleksna in je odvisna od spojine, ki se vnese v telo, ter njenih lastnosti, kot sta topnost in permeabilnostni koeficient. Hg spojine v telesu lahko razpadajo ali reagirajo (na primer kot posledica demetilacije ali povezave s proteini), distribucija na novo nastalih spojnin pa je navadno različna od prvotne. Na splošno lahko povzamemo, da se anorganski Hg kopiči v ledvicah in jetrih, organski pa v možganih, srcu, vranici in laseh (ATSDR, 1999).

Kritični organ zastrupitve z MeHg so možgani. Prizadeti so tako možgani otrok, kot odraslih, s tem, da je razvijajoči živčni sistem bolj občutljiv. Pri odraslih so okvare možganov žariščne, medtem ko so pri otrocih prizadeta območja bolj razširjena (WHO-IPCS, 1990). Nevrotoksične<sup>1</sup> učinke prenatalno (v času pred rojstvom) izpostavljenih obolelih otrok so pokazale akutne zastrupitve z MeHg na Japonskem in v Iraku, kjer matere niso imele bolezenskih znakov ali pa so ti bili le rahlo izraženi (Huang in sod., 2004; Amin-Zaki in sod., 1974).

Na Japonskem je bilo v petdesetih in šestdesetih letih prejšnjega stoletja zaradi onesnaženih rib v zalivu Minamata in Niigata, ki so ga povzročila spuščanja odplak iz kemijskih tovarn, kjer je bil MeHg stranski proizvod pri katalizi sinteze acetaldehida,

---

<sup>1</sup> lastnost snovi, da okvarja živčevje



prizadetih približno 50 tisoč ljudi. Več kot 2000 jih je obolelo za Minamata boleznijo (WHO, 2002). Bolezen, ki je poimenovana po imenu največjega onesnaženega zaliva Minamata, je imela naslednje simptome: otrplost obraza, manjšo čutno zaznavnost, parastezijo, slabo koordinacijo in ravnotežje, šibkost, trzanje, mentalne motnje, težave z govorom, slabši sluh, zmanjšanje vidnega polja, pri hujših primerih pa tudi splošno paralizo, deformiranost udov (posebej prstov), krče in smrt. Mnogo otrok se je rodilo (tudi materam brez bolezenskih znakov) s cerebralno paralizo, epilepsijo, mentalnimi motnjami ali celo mrtvih (Huang in sod., 2004; Saito in sod., 2004 citat po Harada, 1975; Yorifuji in sod., 2009 citat po Kitamura, 1959).

V Iraku so leta 1971 zaradi uživanja kruha, pripravljenega iz žitnih semen, ki so bila obdelana z MeHg fungicidom, sprejeli v bolnišnico šest tisoč ljudi, 500 jih je umrlo. Simptomi so bili podobni Minamata bolezni (Amin-Zaki in sod., 1974).

Epidemiološki študiji na Ferskem otočju in Sejšelih sta obravnavali kronično izpostavljenost nizkim koncentracijam MeHg iz morske prehrane in nevrotoksičnost le-teh. V obeh primerih govorimo o populacijah, katerima je morska hrana pomemben del prehrane. To se kaže v povprečnih koncentracijah MeHg v laseh mater, ki so sodelovale v študiji, in znaša pri ferski študiji 4,3  $\mu\text{g/g}$  (Grandjean in sod., 1997) in pri sejšelski 6,9  $\mu\text{g/g}$  (Myers in sod., 2002). Študija na Ferskem otočju je potrdila, da so oslABLJENE kognitivne sposobnosti povezane s prenatalno izpostavljenostjo MeHg (Grandjean in sod., 2001a). Študija na Sejšelih tega ni potrdila (Davidson in sod., 1998, Cohen, 2004). Tudi poznejše obravnave navedenih ugotovitev niso spremenile (Davidson, 2001; Myers in sod., 2000; Murata in sod., 2004; Grandjean in sod., 2003; White in sod., 1994). Zakasnitve in motnje pri nevrofiziološkem razvoju zaradi kronične izpostavljenosti nizkim koncentracijam MeHg naj bi obsegale predvsem motnje koncentracije, spomina, načina izražanja, govora ter manj motoričnih spretnosti, vidnoprstorskih sposobnosti in izvrševanih funkcij (Pirrone in sod., 2002).

Razlog za različne ugotovitve študij s razlike obeh populacij. Na Sejšelih in Ferskem otočju je vir velikega vnosa MeHg dnevno uživanje rib, medtem ko je na Ferskem otočju občasna tudi izpostavljenost visokim vsebnostim MeHg iz kitovega mesa, ki v splošnem vsebujejo tudi poliklorirane bifenile (PCB). Ferski raziskovalci so potrdili, da bi nevrotoksičnost MeHg lahko bila potencirana tudi zaradi PCB, ki so znani nevrotoksini (Grandjean in sod., 2001b). V okviru sejšelske študije pa PCB v serumskih vzorcih niso bili dokazani. Treba je poudariti, da je bilo testiranih le nekaj vzorcev (Davidson in sod., 1998).

Narava zastrupitev s Hg je dobro znana in strupenost Hg je nesporna (WHO-IPCS, 1991), manj znani pa so učinki na človeka pri dolgotrajni izpostavljenosti nizkim koncentracijam. Potrebne bodo še nadaljnje študije, ki bodo pripomogle k razjasnitvi strupenosti pri nizkih izpostavljenostih Hg oziroma bolj strupenemu MeHg ter možnih povezavah le-teh z avtizmom in drugimi škodljivimi nevrorazvojnimi učinki. Ena izmed takšnih študij, ki trenutno poteka je projekt PHIME ([www.phime.org](http://www.phime.org)), v katerem sodeluje populacija na območju Sredozemskega morja (Slovenija, Italija, Grčija, Hrvaška).

**Preglednica 2:** Pregled najpomembnejših oblik Hg – viri, absorpcija, učinki, izločanje in biološki material za oceno izpostavljenosti (Clarkson in Magos, 2006; Horvat in Gibičar, 2005; Esteban and Castaño, 2009; Patrick, 2002)

		Oblika živega srebra		
		Hg <sup>0</sup>	Hg <sup>2+</sup>	MeHg
Viri	Splošna izpostavljenost	zobni amalgam, ob rudniško-topilniških kompleksih, fosilna goriva, termometri	razkužila, v kozmetičnih preparatih (belilne kreme), v prehrani na močno onesnaženih območjih, demetilacija MeHg z mikrofloro v črevesju	preko morske hrane in hrane, ki izvira iz močno onesnaženi območij (sladkovodni in kopenski organizmi)
	Poklicna izpostavljenost	rudarjenje, predelava Hg rud, klor-alkalna industrija, izdelava termometrov, termostatov, Hg žarnic, zobozdravstvo	izdelava baterij, uporaba fungicidov (proti glivam), industrija usnja	uporaba fungicidov in slimicidov <sup>2</sup>
Načini izpostavljenosti		vdihavanje: 75 – 85 % skozi pljuča	zaužitje: 7 – 15 % zaužite doze, 2 – 3 % doze skozi kožo	zaužitje, vdihavanje: 95 – 100 % v prebavnem traktu, 100 % vdihanih hlapov
Učinki	Blažji	lažja proteinurija <sup>3</sup> , nespečnost, izguba apetita, preobčutljivost	kronične motnje živčevja	motnje pri gibanju, pisanju, požiranju, govoru, sluhu, vidu
	Močnejši	tumor, vnetje dlesni, izguba spomina, omotičnost, depresija, izguba koordinacije, hujše okvare in odpoved ledvic	lahko pride do nepopravljivih okvar ledvic, zaradi močne akutne zastrupitve	Mentalne motnje, krči, slepota, koma, smrt
Izločanje		urin, blato, žolč, znoj, slina	urin, blato, žolč, znoj, slina	90 % z žolčem in blatom, 10 % z urinom
Biološki material za oceno izpostavljenosti		urin, kri, izdihan zrak	urin (več kot 98 % je anorganskega Hg)	lasje (več kot 80 % je organskega Hg), kri

<sup>2</sup> Pripravki za preprečevanje nastanka sluzi

<sup>3</sup> Beljakovine v urinu

## 2.4 Biološko spremljanje izpostavljenosti človeka živemu srebru

»Biomonitoring« ali biološki nadzor oz. spremljanje v ožjem smislu pomeni merjenje koncentracij kemikalij v krvi, urinu, semenski tekočini, izdihanem zraku, materinem mleku, laseh, nohtih ali v tkivih, npr. podkožnem maščevju (Urad RS za kemikalije).

V širšem pomenu besede pa biomonitoring pomeni tako merjenje enega ali več tipov bioloških kazalcev, kot tudi same snovi. (Bird, 2008)

Poznamo biološke kazalce:

- izpostavljenosti – z biološkimi kazalci izpostavljenosti odgovorimo na dva vprašanja: čemu je bil posameznik izpostavljen in v kolikšni količini. Uporabni so za hlapne in tudi nehlapne snovi.
- učinka – biokemične, fiziološke spremembe, spremembe v obnašanju ali katere druge spremembe, ki jih lahko merimo ali opazujemo. Glede na intenzivnost spremembe biološkega kazalca se lahko ugotovi poškodba ali bolezen.
- občutljivosti – organizem ima naravno ali pridobljeno zmožnost odziva specifični snovi. Občutljivost nam pokaže ta odziv.

(Bird, 2008)

Vsak od nas zaužije, vdihava in absorbira veliko število različnih kemikalij, ki so lahko naravnega izvora ali posledica človekove dejavnosti. Pri tem je treba poudariti, da navzočnost določene kemikalije v organizmu še ne pomeni tveganja. Le-to je odvisno od doze, načina izpostavljenosti ter občutljivosti posameznika (Paustenbach in Galbraith, 2006).

Pri biološkem spremljanju izpostavljenosti človeka gre za široko področje različnih disciplin in poddisciplin, ki so potrebne tako za pridobivanje podatkov, kot tudi za njihovo interpretacijo. Biomonitoring ni avtomatičen instrument, ki bi lahko deloval sam zase, ampak je treba upoštevati tudi okoljske, epidemiološke in toksikološke študije. Pridobljeni podatki dopolnjujejo znanstvena vedenja, usmerjali pa bodo tudi pravno politične odločitve in ukrepanja. (Bauer, 2008)

Izpostavljenost prebivalstva Hg lahko ocenimo na več načinov. Najpogosteje določamo vsebnost Hg v bioloških tekočinah in tkivih, to je z metodami biološkega spremljanja živega srebra v človeku. Tak pristop priporoča Evropska strategija za okolje in zdravje iz leta 2003 (European Environment and Health Strategy, 2003), ki je v akcijski načrt predlagala tudi razvoj in optimizacijo harmoniziranih metodologij na evropski ravni.

Glavni cilj biološkega spremljanja izpostavljenosti je torej določanje vsebnosti onesnažil v bioloških vzorcih, ki zagotavljajo pravilno oceno o izpostavljenosti prebivalstva na različnih območjih ter v različnih časovnih intervalih. Zato je pomembno tudi pravilno načrtovanje celotne študije, ki pri določanju števila oseb upošteva populacijske razlike (spremenljivost znotraj populacije) ter negotovosti analiznih postopkov. Uporaba validiranih in optimiziranih metod je za uspešno delo torej ključnega pomena in je osnova biološkega spremljanja izpostavljenosti. Le tako lahko zanesljivo opredelimo osnovne vrednosti ter zagotovimo dolgoročno primerljivost rezultatov (NRC, 2006).

Po podatkih biološkega spremljanja izpostavljenosti človeka živemu srebru, ki ga opravljajo v Nemčiji (Becker, 2008), so koncentracije Hg v bioloških kazalcih, kot so kri, urin in mleko, relativno nizke, zato so izjemno pomembni pravilno vzorčenje,

shranjevanje ter analiza teh vzorcev. Vrednosti živega srebra v posameznih bioloških kazalcih posameznih študij so za primerjavo navedene v rezultatih in diskusiji.

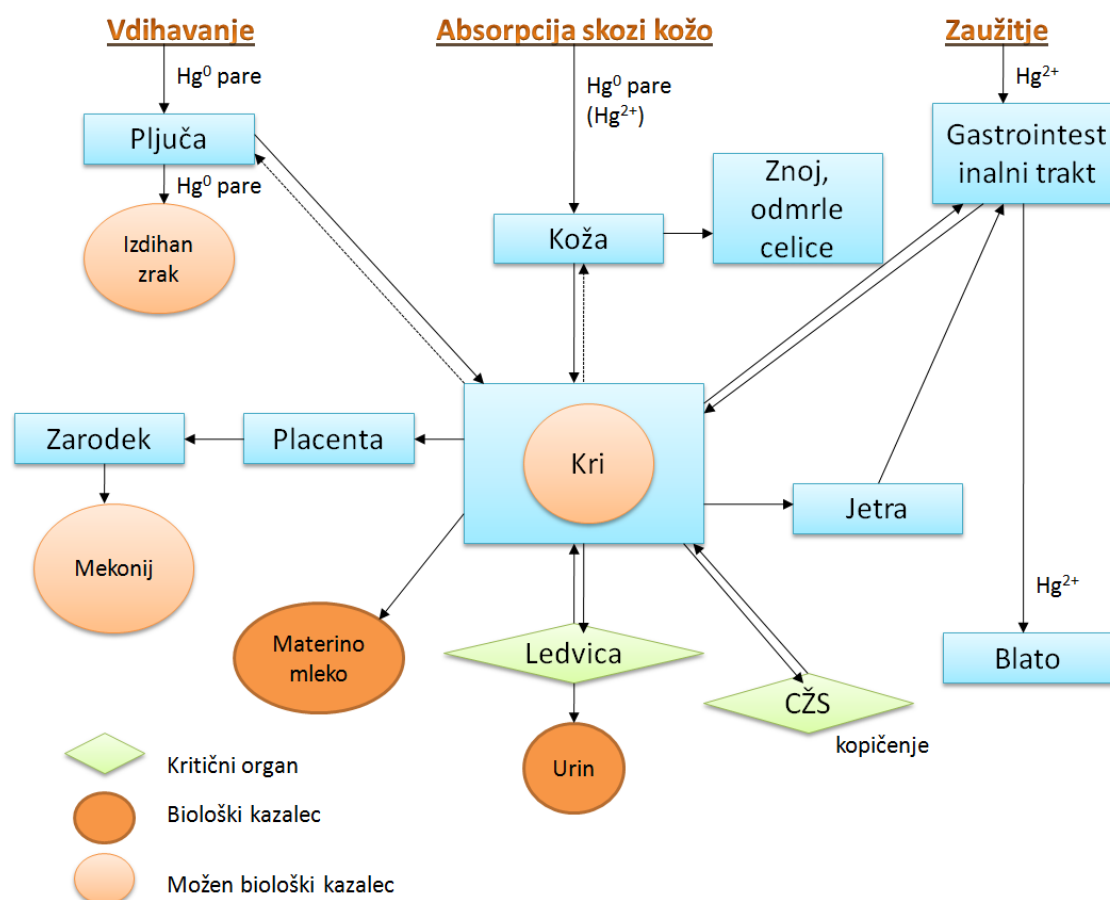
## 2.4.1 Biološki kazalci izpostavljenosti človeka živemu srebru

Biološki kazalec:

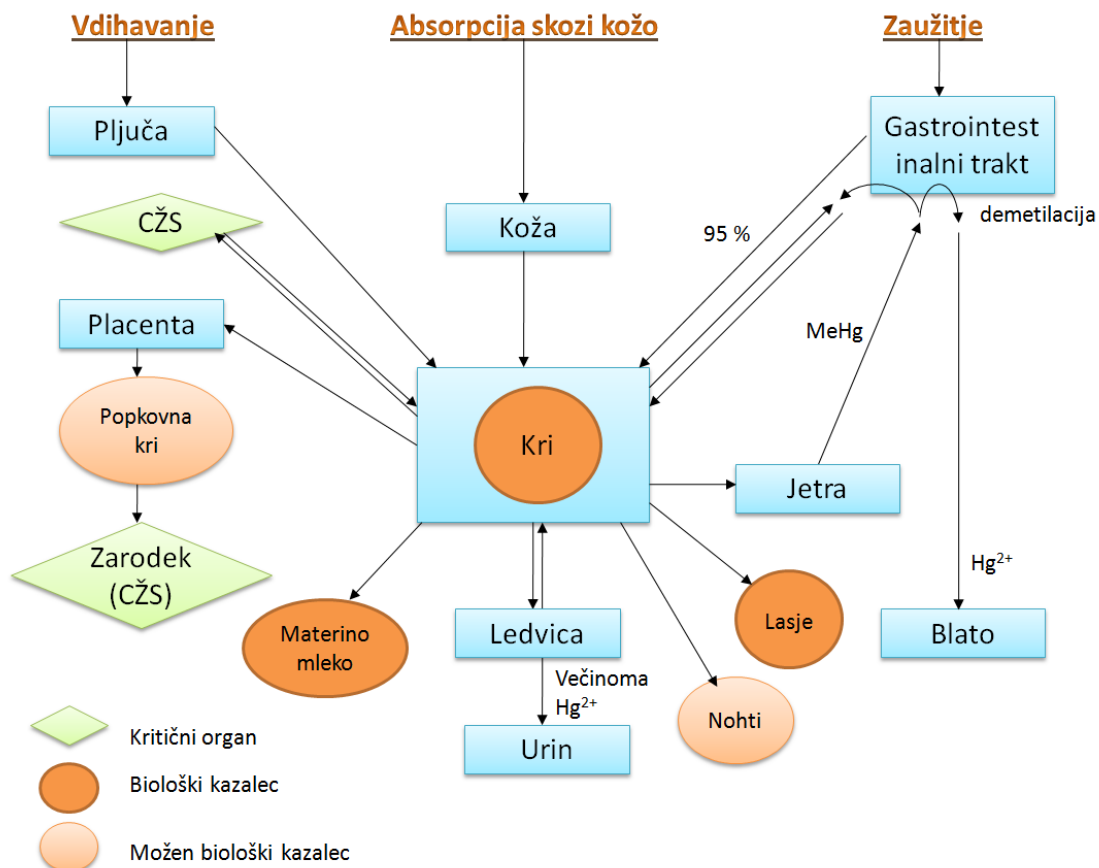
- mora biti enostaven za odvzem, analiza le-tega mora biti enostavna in zanesljiva
- mora biti specifičen ter mora imeti dobro povezavo s stopnjo izpostavljenosti,
- mora odražati le popravljive spremembe v organizmu,
- na podlagi rezultatov bioloških kazalcev se sme preventivno ukrepati,
- uporaba biološkega kazalca mora biti etično sprejemljiva

(Grandjean in sod., 2002).

Izbira biološkega kazalca za spremljanje izpostavljenosti Hg je odvisna od vrste Hg spojina, načina izpostavljenosti (kronična ali akutna) in časa vzorčenja glede na izpostavljenost (Lanphear in Bearer, 2005). V nadaljevanju je opisanih nekaj bioloških kazalcev izpostavljenosti, ki smo jih prav tako uporabili v tem diplomskem delu. Sliki 2 in 3 prikazujeta model porazdelitve in biološke kazalce za spremljanje anorganskega Hg in organskega Hg.



**Slika 2:** Model porazdelitve in biološki kazalci za spremljanje anorganskega Hg (predelano po: Pirrone in sod., 2002 po Elinder in sod., 1988)



**Slika 3:** Model porazdelitve in biološki kazalci za spremljanje organskega Hg (predelano po: Pirrone in sod., 2002 po Elinder in sod., 1988)

#### 2.4.2 Kri

V krvi se več kot 90 % MeHg veže na hemoglobin v rdečih krvnih celicah. Anorgansko živo srebro pa se enakomerno porazdeli med rdeče krvne celice in plazmo. Zato se lahko celokupno živo srebro v rdečih krvnih celicah uporablja kot merilo izpostavljenosti MeHg (Sakamoto in sod., 2002) in celokupno živo srebro v plazmi kot merilo izpostavljenosti anorganskemu Hg (WHO, 1991; Halbach in sod., 2008). Za bolj natančno in pravilno oceno izpostavljenosti pa je treba določiti anorgansko in MeHg v krvi, zlasti pri povišanih koncentracijah THg.

V krvi je direktna povezava med koncentracijo živega srebra in uživanjem rib, onesnaženih z MeHg. MeHg pride v telo po prebavnem traktu in se s pomočjo krvi porazdeli po vsem telesu. Maksimalna vrednost MeHg po zaužitju rib je po od 3 do 14 urah, v preostala tkiva pa iz krvi preide po 20 do 30 urah (WHO-IPCS, 1990). Razpolovni čas za MeHg pa je odvisen od tkiva v katerem se spojina nahaja in je od 40 do 70 dni (Clarkson, 2002). V krvi, kot biološkem kazalcu kratkotrajne izpostavljenosti Hg, je razpolovna doba Hg kratka. Če nas zanima pretekla (ali nekaj mesecev) izpostavljenost, je potrebna segmentna analiza las, sramnih dlak ali nohtov.

Za oceno izpostavljenosti otroka MeHg pred rojstvom se uporabljajo lasje matere, popkovna kri ob porodu in popkovno tkivo.

Zbiranje, hranjenje in transport krvi je zahtevno. Poleg tega je vzorčenje krvi invazivna metoda. Odvzete vzorce se takoj shrani v hladilnik (4 °C), pri daljšem shranjevanju pa v zamrzovalnik (< -20 °C) - (UNEP/WHO, 2008).

### 2.4.3 Lasje

V lasih je več kot 80 % živega srebra v MeHg obliki. Zato se koncentracija celokupnega Hg pogosto uporablja za merilo izpostavljenosti MeHg (Esteban in Căstano, 2009), saj se MeHg selektivno vgradi v strukturo las, medtem ko anorgansko Hg nima te lastnosti. Živo srebro v lasih odraža MeHg v krvi. Tako je pri odraslih razmerje med vsebnostjo živega srebra v lasih in v krvi ocenjeno na 250:1 (WHO, 1991). To razmerje se lahko razlikuje znotraj populacij in med njimi (od 140 do 370). Vzrok za to je različen zadrževalni čas Hg v krvi in različna hitrost vgradnje v lase (McDowell in sod., 2004).

Vsebnost celokupnega živega srebra v lasih je lahko odvisna od razlik v populaciji (starost, okolje bivanja), ki na vgradnjo Hg v lase vplivajo zaradi različne strukture las (UNEP/WHO, 2008). Vsebnost Hg v lasih je odvisna tudi od trajnega kodranja in barvanja las, ki zmanjšujeta vsebnost Hg do 30 % (Yasutake in sod., 2003). Pri oceni izpostavljenosti pa lahko pride do variabilnosti zaradi napačnega poročanja frekvence zaužite hrane in različne vsebnosti Hg v ribah (Grandjean in sod., 2002). Na koncentracijo THg v lasih lahko vplivajo tudi okoljski dejavniki, kot sta adsorpcija in absorpcija Hg, ki povečujeta vsebnost Hg (Yamaguchi in sod., 1975; Grandjean in sod., 2002) in homogenost vzorca. Analizne napake so tukaj zanemarljive.

Kljub vsem pomanjkljivostim pa so lasje še vedno zelo uporaben biološki kazalec izpostavljenosti živemu srebru, saj je vzorčenje in hranjenje las preprosto. Prav tako so enostavni za hranjenje in prenos (Esteban in Căstano, 2009), kar je primerno pri vzorčenju velikih populacij. Vzorčenje las je tudi neinvazivno in, ko je Hg enkrat vezan v lase, se ne sprošča več nazaj v kri, zaradi česar so dober biološki kazalec pretekle časovne izpostavljenosti (UNEP/WHO, 2008). Možna je tudi segmentna analiza, saj s stopnjo rasti 1 cm na mesec (Robbins, 2002) lahko ugotovimo izpostavljenost v preteklih tednih, mesecih, odvisno od dolžine las posameznika (Dolbec in sod., 2001).

Vzorčenje las poteka tako, da na zatilju odstrižemo približno 3 cm dolg šop las (premera 0,75 – 1 cm) tik ob skalpu. Tako zagotovimo reprezentativnost vzorca za oceno izpostavljenosti v preteklem mesecu. Hrani se jih v plastičnih vrečkah ali papirnatih ovojnica pri sobni temperaturi. (UNEP/WHO, 2008)

### 2.4.4 Urin

V urinu je več kot 98 % anorganskega živega srebra, preostalo pa je MeHg. Zato se kot merilo izpostavljenosti anorganskemu živemu srebru uporablja celokupno živo srebro v urinu (Esteban in Căstano, 2009). Poleg tega se anorgansko živo srebro v urinu zelo dobro povezuje s koncentracijo živega srebra v ledvičnih tkivih, s čimer se izognemo avtopsiji ledvic (Barregard in sod., 1999). Tako je vzorčenje urina neinvazivno, shranjevanje in analiza pa sta enostavna. Razpolovna doba izločanja anorganskega živega srebra z urinom je približno dva meseca, zato je primeren za ugotavljanje pretekle, tudi nekaj mesečne, izpostavljenosti.

Anorgansko živo srebro pri ljudeh, ki niso poklicno izpostavljeni, je predvsem posledica amalgamskih zalivk (Gibičar, 2008; Gibičar in sod., 2009), kjer se sprošča  $Hg^0$ . Do povečanega sproščanja iz amalgamskih zobnih zalivk pa pride s pogostim žvečenjem žvečilnih gumijev (Jarosinska in sod., 2008). Torej več kot ima oseba amalgamskih zalivk, več bo imela anorganskega Hg. Barregard in sod. (2010) pa so celo ugotovili, da vsaka amalgamska zalivka vsebnost živega srebra poveča za 6%. Prav tako vsebnost anorganskega Hg poveča pogosto prehranjevanje z onesnaženimi ribami (Jarosinska in sod., 2008; Gibičar, 2008), vendar pa to ni posledica nizke koncentracije anorganskega Hg v ribah, ampak demetilacije MeHg (Barregard in sod., 2006). Nekatere študije so pokazale, da na vsebnost vpliva tudi spol. Pokazale so, da imajo ženske večjo vsebnost Hg v urinu, zaradi manjše vsebnosti kreatinina (Hg v urinu se preračuna na kreatinin), kar pa je posledica manjše mišične mase (Halbach in sod., 2008; Jarosinska in sod., 2008).

Koncentracija odpadnih produktov v urinu niha glede na redčenje z vodo (odvisno koliko tekočine človek pije). Zato se onesnažila v urinu navadno izražajo v mikrogram onesnažila na gram kreatinina. Kreatinin je razpadni produkt kreatina<sup>4</sup>, ki je pomembna celična sestavina mišic vretenčarjev. Kreatinin je odpadni produkt in v mišici ni več uporaben. Dnevna produkcija kreatina ter posledično kreatinina je odvisna od mišične mase. Produkcija kreatina se s časom zelo malo spreminja. Kreatinin se iz telesa izloča preko ledvic. Pri normalnem delovanju ledvic je serumska (krvna) raven kreatinina konstantna in v normalnih koncentracijah. Tako izražanje vsebnosti živega srebra na gram kreatinina je uporabna mera za vsebnost živega srebra v urinu (UNEP/WHO, 2008).

Zaželeno je, da se odvzame od 50 do 100 mL jutranjega urina. Za odvzem se uporabljajo sterilne plastične posodice 100 ali 150 mL. Pomembno je, da si udeleženec pred uriniranjem umije roke, da se vzorčna posoda odpre tik pred odvzemom vzorca in takoj zapre. Vzorčno posodo se shrani v še eno. Le tako se zagotovi, da ne pride do onesnaženja z zunanjimi mikroorganizmi, ki bi lahko povzročili redukcijo anorganskega živega srebra do hlapnega ( $Hg^0$ ), zaradi česar bi prišlo do izgub in posledično do nerealnih rezultatov. Vzorec je treba v čim krajšem času zamrzniti. (UNEP/WHO, 2008)

#### 2.4.5 Materino mleko

Okoljske študije uporabljajo materino mleko za oceno izpostavljenosti matere različnim kemikalijam in za določitev potencialne izpostavitve doječih otrok. Materino mleko je glavna pot izločanja lipofilnih snovi. Vendar pa večina oblik živega srebra ni lipofilnih, razen na primer monometil in elementarno živo srebro (NRC, 2000). Koncentracija živega srebra v materinem mleku je odvisna od starosti, telesne teže, časa vzorčenja, prehranskih navad, časa dojenja in vsebnosti maščob v mleku. (UNEP/WHO, 2008). Sakamoto in sod. (2002) so odkrili, da je v materinem mleku 20 % živega srebra v primerjavi z materino krvno plazmo, poleg tega pa Sakamoto in sod. (2002, cit. po Bakir in sod. 1973) navajajo, da so po zastrupitvi žita in posledično kruha z MeHg v Iraku odkrili, da je v mleku 5 % živega srebra glede na krvno vrednost. Oskarsson in sod. (1996) pa so ugotovili, da je v mleku v primerjavi s krvjo 27 % celokupnega živega srebra. Prav tako so odkrili, da je v mleku približno 50 % anorganskega živega srebra

---

<sup>4</sup> Kreatin – metilguanidinocetna kislina, pomembna celična sestavina mišic vretenčarjev. Metabolit, ki se sintetizira predvsem v ledvicah, se po krvi prenaša do mišic, kjer se uporablja za sintezo fosfokreatina. V energijsko bogatem fosfokreatinu (kreatin fosforjeva kislina) se kopiči energija, potrebna za krčenje mišic. (Veliki splošni leksikon, 2006; Iz Leka: Slovenski medicinski e-slovar)

in 50 % organskega (populacija žensk s severa Švedske). Študija na območju severnega Jadrana pa je pri obalni populaciji ugotovila 26 % MeHg, pri populaciji iz notranjosti Italije pa 31 % MeHg (Barbone in Horvat, 2001).

## 2.5 Priporočila in zakonsko predpisane vrednosti

Zakonodaja predpisuje koncentracije živega srebra v zraku na delovnih mestih, kjer lahko prihaja do povišane izpostavljenosti (industrija za proizvodnjo klora in NaOH, zobozdravstvene ambulante ipd.) ter maksimalno dovoljene koncentracije Hg v hrani. Tako *Pravilnik o varovanju delavcev pred tveganji zaradi izpostavljenosti kemičnim snovem pri delu (Ur. l. RS št. 100/200, 39/2005 in 53/2007)* določa, da je lahko povprečna koncentracija živega srebra v zraku na delovnem mestu  $0,1 \text{ mg/m}^3$ , medtem ko je v Združenih državah Amerike ta vrednost  $0,025 \text{ mg/m}^3$ .

Za splošno prebivalstvo pa velja *Pravilnik o pitni vodi (RS št. 19/2004, 35/2004, 26/2006, 92/2006 in 25/2009)*, ki navaja, da je lahko koncentracija živega srebra v pitni vodi do  $1 \text{ } \mu\text{g/L}$ , in *Uredba komisije (ES) o določitvi mejnih vrednosti nekaterih onesnaževal v živilih (Ur. l. EU št. 1881/2006 in 629/2008)*, ki določa maksimalne vrednosti za živo srebro v tunah in ribah roparicah na  $1 \text{ mg/kg}$  ter za preostale ribe in ribje proizvode na  $0,5 \text{ mg/kg}$ . Ekološko sprejemljivo vrednost za vode pa določa *Uredba o emisiji živega srebra pri odvajanju odpadnih vod (Ur. l. RS, št. 84/1999)*, ki znaša  $0,05 \text{ } \mu\text{g/L}$ .

Resnost problema ob dolgotrajni izpostavljenosti živemu srebru se odraža v priporočilih o varni izpostavljenosti MeHg v ribah. Tako je leta 2001 ameriška agencija za okolje (US EPA, 2001) osnovala novo referenčno vrednost ali »varno« dnevni odmerek MeHg, ki znaša  $0,1 \text{ } \mu\text{g MeHg}$  na kilogram telesne teže na dan. Odmerek predstavlja količino MeHg, za katero EPA verjame, da se jo lahko dnevno zaužije ali kako drugače privzame, in nima nikakršnih škodljivih učinkov na zdravje. Od leta 2003 sta novo referenčno vrednost privzeli tudi FAO in WHO, ki sta jo z  $0,47 \text{ } \mu\text{g}$  na kg telesne teže na dan znižali na  $0,23 \text{ } \mu\text{g}$  na kg telesne teže na dan (EFSA, 2004). Sprejemljiv dnevni vnos za celokupno živo srebro pa ostaja  $0,71 \text{ } \mu\text{g}$  na kg telesne teže na dan (EFSA, 2004).

Ti predpisi seveda ne upoštevajo dejanske možne obremenitve ljudi ob rednem uživanju rib. Zato nekatere države, zlasti Švedska, opozarjajo ljudi (predvsem najbolj občutljiv del prebivalstva, kot so ženske v rodni dobi in nosečnice ter otroci) na varno uživanje različnih vrst rib, ki so na njihovem tržišču. Pri tem seveda opravljajo redni nadzor vsebnosti Hg v ribah.

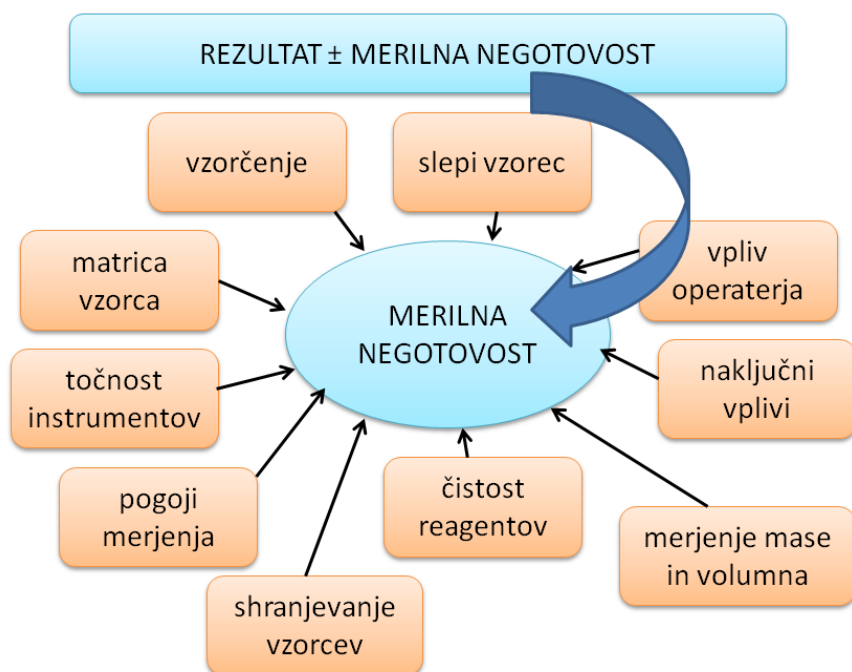
## 2.6 Analitika živega srebra v bioloških vzorcih

Metode za določanje celokupnega Hg in posameznih spojin delimo glede na izolacijski postopek in detekcijski sistem. Vrsto metode izberemo glede na lastnosti biološkega vzorca in koncentracijo Hg v njem. Težave pri analitiki nastanejo, ker so Hg spojine v bioloških vzorcih navzoče v sledovih (v območju ng/g). Kljub napredku analitike v zadnjih letih zaenkrat zaradi posebnosti posameznih bioloških vzorcev in potrebne točnosti, selektivnosti in visoke občutljivosti pri koncentracijah v bioloških vzorcih ne obstajajo ustrezno natančne univerzalne analizne tehnike. Najpogosteje uporabljene metode za določanje Hg v bioloških vzorcih obsegajo: atomsko absorpcijsko



spektrometrijo hladnih par (CV AAS), atomsko fluorescenčno spektrometrijo hladnih par (CV AFS), radiokemično nevtronsko aktivacijsko analizo (RNAA), X-žarkovno fluorescenco in plinsko kromatografijo (GC). Uvajajo se številne nove metode, kot sta na primer induktivno sklopljena plazma in masna spektrometrija (ICP MS) (Horvat, 2005; Horvat in Gibičar, 2005; ATSDR, 1999; US EPA, 2010; WHO-IPCS, 1991).

Izbrana metoda mora biti zadovoljivo občutljiva in validirana po navodilih, kot so EURACHEM 1998, EURACHEM/CITAC 2000, CITAC/EURACHEM 2002. Validacija lahko obsega naslednje tehnike: uporabo referenčnih materialov, medlaboratorijske primerjave, primerjave z drugo validirano metodo ter ovrednotenje parametrov preskusne metode, kot so na primer delovno območje, linearnost, občutljivost, meja zaznavnosti in kvantifikacije (EURACHEM, 1997). Pri izbrani analizni metodi moramo prav tako oceniti merilno negotovost, da ugotovimo raztros vrednosti, ki jo je mogoče pripisati merjencu (VIM, 2008). Na sliki 4 so predstavljeni viri merilne negotovosti, ki jih je pri oceni treba upoštevati.

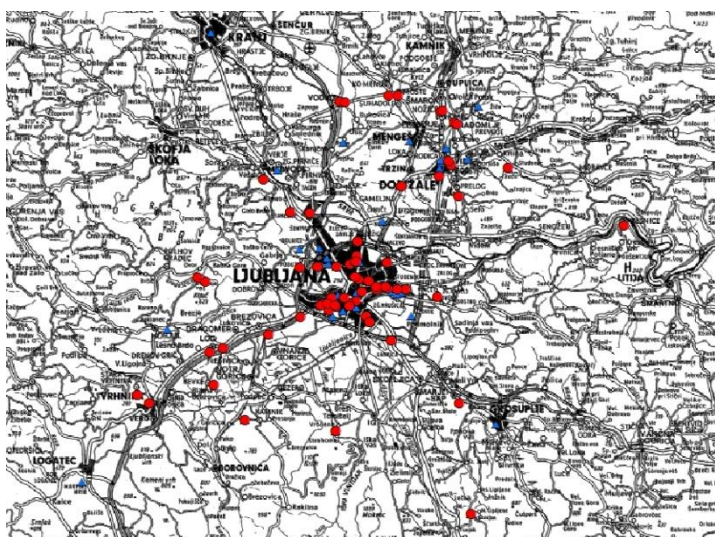


**Slika 4:** Viri merilne negotovosti

### 3 EKSPERIMENTALNI DEL

Diplomsko delo je bila izvedena v okviru študije »Monitoring kemikalij v organizmih 2007 – 2009« za njeno izvedbo je bil zadolžen Institut Jožef Stefan, Odsek za znanosti o okolju. Raziskava je bila opravljena v skladu z zahtevami Komisije za medicinsko etiko Republike Slovenije, soglasje 42/12/07.

Ciljna populacija za diplomsko nalogo so bile matere prvega otroka, ki dojijo, z otrokom, starim 2 do 8 tednov, stare od 20 do 35, let iz mestnega območja Ljubljane z okolico (slika 5). Sodelovalo 51 oseb. Vse sodelujoče osebe so podpisale tudi informativno privolitvev.



**Slika 5:** Lokacije prebivališč preiskovank na območju Ljubljane z okolice (rdeče pike), N = 51 (Horvat in sod., 2010)

#### 3.1 Postopek pridobivanja vzorcev

Z vprašalniki (priloga 1) za preiskovanke smo želeli pridobiti podatke o dejavnikih, ki lahko vplivajo na izpostavljenost kemikalijam v okolju. Osrednji vprašalnik je bil *Vprašalnik za nosečnice*, ki je vseboval splošni del, vprašanja o prebivališču, zaposlitvi, zdravstvenem stanju, življenjskih in prehranjevalnih navadah ter vprašanja o nosečnosti. Za lažjo predselekcijo oseb smo uvedli še *Kratek vprašalnik*, ki je vseboval 12 vprašanj, na katera se odgovori z da ali ne. Te vprašalnike so sodelujoče lahko izpolnile že pred porodom, po porodu pa samo še enostranski *Vprašalnik za ženske po porodu*, ki je vseboval vprašanja o otroku in načinu dojenja. Izpolnjene vprašalnike smo vnesli v bazo, ki je v arhivu IJS.

Na začetku raziskave je pridobivanje preiskovank potekalo s pomočjo ginekoloških ambulant. Ker pa je bil odziv slab, smo poskušali še po drugih poteh, in sicer s pomočjo porodnišnic in materinskih šol.

Vzorčevanje je potekalo:

- v ginekoloških ambulantah,
- na Polikliniki Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana,
- na domu sodelujočih.

Količina odvzetih vzorcev materinega mleka, urina, krvi in las je bila maksimalno 80 mL materinega mleka, 15 mL krvi, 50 mL urina in šopek las (1 g) las. Vse vzorčevalne posode so bile označene z individualno identifikacijsko kodo.

V laboratoriju Kliničnega inštituta za klinično kemijo in biokemijo v Univerzitetnem Kliničnem centru Ljubljana je potekala nadaljnja delitev vzorcev na alikvote. Alikvoti vzorcev, ki niso bili takoj analizirani, so bili shranjeni pri temperaturi nižji od -20 °C. Vzorci las so bili shranjeni pri sobni temperaturi.

## 3.2 Uporabljene metode in materiali

### 3.2.1 Priprava reagentov in standardne raztopine

#### 10 % kositrov klorid – SnCl<sub>2</sub> × 2 H<sub>2</sub>O

V 1 L steklenico smo odtehtali 100 g SnCl<sub>2</sub> × 2 H<sub>2</sub>O, dodali 107 mL klorovodikove kisline (HCl), dobro premešali ter pustili 30 min. Nato smo do oznake 1 L razredčili z Milli-Q vodo ter spet dobro premešali.

#### 10 % natrijev hidroksid – NaOH

V 0,5 L steklenico smo odtehtali 50 g NaOH in razredčili z Milli-Q do oznake 0,5 L ter dobro premešali.

#### 10 % kalijev permanganat – KmnO<sub>4</sub>

V 1 L steklenico smo odtehtali 100 g KMnO<sub>4</sub> in razredčili z Milli-Q vodo do oznake 1 L.

#### Standardna raztopina

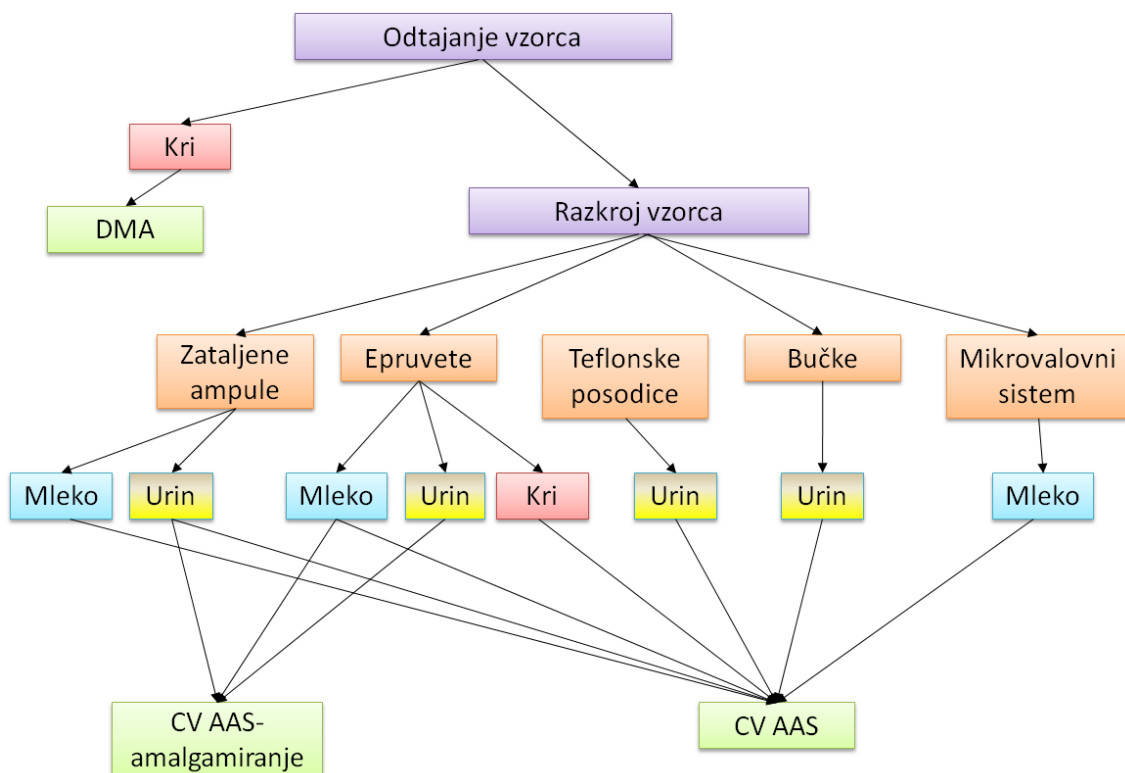
Najprej smo pripravili osnovno standardno raztopino Hg s koncentracijo 1 mg/mL in sicer tako, da smo odtehtali 0,25 g tekočega elementarnega Hg (Hg<sup>0</sup>) v 250 mL merilno bučko, živo srebro smo raztopili z dodatkom 2 mL HNO<sub>3</sub> in nato razredčili z Milli-Q vodo do oznake 250 mL. Iz osnovne standardne raztopine smo pripravili intermediatno standardno raztopino s koncentracijo 5 µg/mL. Pripravili smo jo tako, da smo v 125 mL teflonsko posodico odtehtali 94,5 g Milli-Q vode, s pipeto dodali 5 mL HNO<sub>3</sub> in 0,5 mL osnovne raztopine. Delovno oziroma merilno standardno raztopino s koncentracijo 10 ng/mL pa pripravimo tako, da v 125 mL teflonsko posodico odtehtamo 94,8 g Milli-Q vode ter s pipeto dodamo 5 mL HNO<sub>3</sub> in 0,2 mL intermediatne Hg raztopine. Izračun za pripravo delovne standardne raztopine prikazuje enačba 1 (priprava delovne standardne raztopine je tudi vir merilne negotovosti, kot je prikazano na sliki 4). Vse razredčitve smo opravljali pri sobni temperaturi (od 20 do 23 °C).

$$c_{std} = c_{int} \cdot \frac{V_{int}}{V_{R3}}, \quad c_{int} = c_{osn} \cdot \frac{V_{osn}}{V_{R2}}, \quad c_{osn} = c \cdot \frac{m_{Hg}}{m_{R1}} \cdot 1000 \quad (1)$$

$C_{std}$  – koncentracija delovne standardne raztopine  
 $C_{int}$  – koncentracija intermediatne standardne raztopine  
 $V_{int}$  – volumen intermediatne standardne raztopine  
 $V_{R3}$  – volumen intermediatne standardne raztopine za pripravo delovne standardne raztopine  
 $C_{osn}$  – koncentracija osnovne standardne raztopine  
 $V_{osn}$  – volumen osnovne standardne raztopine za pripravo intermediatne standardne raztopine  
 $V_{R2}$  – volumen intermediatne standardne raztopine  
 $m_{Hg}$  – masa Hg za pripravo osnovne standardne raztopine  
 $m_{R1}$  – masa osnovne standardne raztopine

### 3.2.2 Optimizacija kislinskega razkroja

Slika 6 prikazuje potek kislinskih razkrojev za posamezne biološke vzorce in analize le-teh z različnimi merilnimi sistemi. Vzorce mleka smo razkrojili s kislinskim razkrojem v zataljenih ampulah, epruveh in v mikrovalovnem sistemu. Mleko iz epruveh smo pomerili s CV AAS z amalgamiranjem, mleko iz zataljenih ampul, epruveh in mikrovalovnega sistema pa s CV AAS. Vzorce urina smo razkrojili v zataljenih ampulah, epruveh, teflonskih posodicah in bučkah. Urin iz zataljenih ampul in epruveh smo pomerili s CV AAS z amalgamiranjem ter urin iz zataljenih ampul, epruveh, teflonskih posodic in bučk s CV AAS. Kri smo razkrojili le v epruveh ter jo pomerili s CV AAS in direktno brez razkroja z DMA. Primerjava posameznih kislinskih razkrojev, kjer je bilo to smiselno, je bila narejena z Wilcoxonovim neparametričnim testom, sicer pa je bila primerjava narejena opisno.



**Slika 6:** Shema optimizacije kislinskega razkroja

V nadaljevanju so pri vsakem kislinskem razkroju našete uporabljene kemikalije, certificirani referenčni in preostali materiali, ki smo jih uporabili pri delu. Opisan je tudi potek posameznega razkroja in analizne metode.

### 3.2.2.1 Mikrovalovni razkroj za mleko

Kemikalije, ki smo jih uporabili: HNO<sub>3</sub> (suprapur), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (suprapur), Milli-Q voda, laboratorijski detergent, delovna standardna raztopina.

Certificirani referenčni materiali, ki smo jih uporabili: za mleko BCR 150 (Institute for Reference Materials and Measurements, Belgija) in NIST 1549 (National Institute of Environmental Sciences, Japonska).

Materiali, ki smo jih uporabili: polavtomatske pipete z nastavki, analitska tehtnica, kvarčne epruvete, 10 mL plastične centrifugirke, mikrovalovni sistem (ETHOS 1 proizvajalca MILESTONE SN 130471), stojalo za epruvete.

Približno 1 g vzorca smo odtehtali v kvarčno epruveto ter dodali 1 mL HNO<sub>3</sub> in 1 mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Razkroj vzorcev je potekal v mikrovalovnem sistemu (Mikrovalovni sistem ETHOS 1 proizvajalca MILESTONE SN 130471) pri 1300 W po tem programu: v prvih 10 minutah se je temperatura dvigovala do 130 °C, nato se je 10 minut dvigovala do 200 °C, na koncu pa je razkroj potekal še 10 minut na 200 °C. Po ohlajanju smo razkrojeni vzorec prelili v 10 mL plastično kiveto ter ga razredčili z Milli-Q vodo do oznake 10 mL. Vsak vzorec je bil pripravljen v dveh paralelkah.

Čiščenje kvarčnih epruвет je potekalo tako, da smo odpipetirali 1 mL Milli-Q vode in 1 mL HNO<sub>3</sub> v kvarčne epruvete ter nastavili program enako kot za razkroj vzorcev. Ko smo razkrajali referenčni material, smo kvarčne epruvete sprali z vodovodno vodo ter jih pustili čez noč v 2 % raztopini laboratorijskega detergenta pripravljenem z vodovodno vodo. Naslednji dan smo jih trikrat sprali z vodovodno vodo in nato trikrat z Milli-Q vodo ter še eno noč namakali v 50 % (v/v) raztopini HNO<sub>3</sub>. Nato pa smo jih spet sprali z Milli-Q vodo ter posušili na zraku.

### 3.2.2.2 Razkroj v teflonskih posodicah za urin

Kemikalije, ki smo jih uporabili: HNO<sub>3</sub> (suprapur), Milli-Q voda, laboratorijski detergent, HCl (suprapur), delovna standardna raztopina.

Certificirani referenčni materiali, ki smo jih uporabili: za urin Clin Chek 8847 (Recipe, Nemčija) in Seronorm trace elements urine – blank (Sero As, Norveška).

Materiali, ki smo jih uporabili: 25,8 mL teflonske posodice, polavtomatske pipete z nastavki, analitska tehtnica, grelna plošča.

V 25,8 mL teflonske posodice smo odpipetirali 2 mL vzorca ter 4 mL HNO<sub>3</sub>, jih zaprli in pustili stati 1 uro. Nato smo vzorce segrevali 6 ur na 100 °C na grelni plošči. Po končanem razkroju smo vzorce razredčili z Milli-Q vodo do oznake 25,8 mL. Vsak vzorec je bil pripravljen v dveh paralelkah.

Čiščenje teflonskih posodic je potekalo tako, da smo teflonske posodice sprali z vodovodno vodo ter jih nato čez noč pustili v 2 % raztopini laboratorijskega detergenta pripravljenega, z vodovodno vodo. Naslednji dan smo jih trikrat sprali z vodovodno vodo in trikrat z Milli-Q vodo. Sprano posodo smo segrevali v 50 % (v/v) raztopini HNO<sub>3</sub>, vsaj 24 ur pri 90 do 110 °C. Po ohladitvi smo posodo trikrat sprali z Milli-Q vodo ter jo 24 ur pustili stati v 10 % (v/v) raztopini HCl. Posodo smo spet trikrat sprali z Milli-Q vodo. Čisto posodo smo shranjevali tako, da smo jo napolnili z 1 % (v/v) raztopino HCl, dobro zaprli in dali v polietilensko vrečko. Pred uporabo smo posodo trikrat sprali z Milli-Q vodo.

### 3.2.2.3 Razkroj v zataljenih steklenih ampulah za mleko in urin

Kemikalije, ki smo jih uporabili: HNO<sub>3</sub> (suprapur), Milli-Q voda, laboratorijski detergent, tekoči dušik, delovna standardna raztopina.

Certificirani referenčni materiali, ki smo jih uporabili: za mleko in urin Clin Chek 8847 (Recipe, Nemčija).

Materiali, ki smo jih uporabili: steklene ampule, polavtomatske pipete z nastavki, Bunsenov gorilnik, pincete, gorilnik butan-propan-kisik, UV zaščitna očala, grelna plošča z blokom, pila in tulec za odpiranje ampul, epruvete ali bučke, stojalo za ampule.

V ampule smo odpipetirali 1 mL vzorca in 2 mL HNO<sub>3</sub>. Uro pozneje smo vzorce zatalili s pomočjo gorilnika butan-propan-kisik. Tako pripravljene vzorce smo segrevali čez noč na 90 °C. Naslednji dan smo ampule počasi zamrznili v tekočem dušiku ter odstranili zataljeni del. Vzorce smo prelili v epruvete ali bučke ter jih redčili z Milli-Q vodo do 30 mL ali 50 mL (Horvat in sod., 1986). Na serijo so bili narejeni trije vzorci v paralelkah, preostali le v eni.

Čiščenje ampul je potekalo tako, da smo jih najprej sprali z vodovodno vodo ter čez noč pustili stati v 2 % raztopini laboratorijskega detergenta, pripravljenega z vodovodno vodo. Naslednji dan smo ampule trikrat sprali z vodovodno vodo ter trikrat z Milli-Q vodo. Posušili smo jih v sušilniku in shranili v polietilenskih vrečkah. Pred uporabo smo čiste ampule prežarili na Bunsenovem gorilniku. Na enem mestu smo držali toliko časa, da se je pojavil oranžni plamen, tako smo vedeli, da je temperatura dovolj visoka za izhlapevanje Hg.

### 3.2.2.4 Razkroj v epruvetah in bučkah za urin, mleko in kri

Kemikalije, ki smo jih uporabili: Milli-Q voda, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Hg), HClO<sub>4</sub> (suprapur) HNO<sub>3</sub> (suprapur), KMnO<sub>4</sub>, delovna standardna raztopina.

Certificirani referenčni materiali, ki smo jih uporabili: za urin Clin Chek 8847 (Recipe, Nemčija) in Seronorm trace elements urine – blank (Sero As, Norveška), za mleko BCR 150 (Institute for Reference Materials and Measurements, Belgija) in NIST 1549 (National Institute of Environmental Sciences, Japonska), za kri PT – WB1 (Institut Jožef Stefan, Slovenija) in Seronorm trace elements whole blood (Sero As, Norveška).

Materiali, ki smo jih uporabili: bučke ali epruvete, polavtomatske pipete z nastavki, analitska tehtnica, grelna plošča ali grelna plošča z blokom, stojalo za epruvete.

Odpipetirali smo 2 mL urina v stekleno 50 mL bučko oz. 1 mL urina v stekleno 30 mL epruveto s pokrovčkom. Razkroj za mleko in kri pa je potekal le v epruvetah s pokrovčkom, v katere smo odpipetirali 1 mL ali 2 mL mleka ter od 0,1 do 0,5 g krvi (odvisno od pričakovane koncentracije). Vzorcem smo dodali 1 mL Milli-Q vode, 2 mL  $\text{HNO}_3\text{-HClO}_4$  (1:1) in 5 mL  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Bučke smo 20 minut segrevali na grelni plošči pri 220 °C, epruvete pa 20 min na grelni plošči v bloku na 220°C. Ohlajene vzorce smo nato z Milli-Q vodo razredčili do oznake 50 mL oz. 30 mL (Akagi, 1997). Vsak vzorec smo pripravili v dveh paralelkah.

Steklovino smo čistili s spiranjem z 10 % raztopino  $\text{KMnO}_4$ , zatem pa smo jo temeljito sprali z Milli-Q vodo. Hranili smo jo napolnjeno z 1 % raztopino HCl. Pred uporabo smo steklovino trikrat sprali z Milli-Q vodo in posušili v sušilniku (60 °C).

### 3.2.3 Merilni sistemi

#### 3.2.3.1 Atomska absorpcijska spektrometrija hladnih par – CV AAS

Kemikalije, ki smo jih uporabili: 10 %  $\text{SnCl}_2$ , 10 % NaOH, Milli-Q voda.

Materiali, ki smo jih uporabili: polavtomatske pipete z nastavki.

Alikvot vzorca smo prenesli v redukcijsko celico napolnjeno s kislom raztopino  $\text{SnCl}_2$ , ki reducira  $\text{Hg}^{2+}$  v  $\text{Hg}^0$ , ter ga prepihovali z zrakom, dokler ni bilo doseženo ravnotežno stanje živosrebrih par. Pare medtem potujejo skozi nevtralizacijsko celico, kjer je približno 5 mL 10 % NaOH, ter skozi kondenzacijsko celico. Po redukciji sledi faza merjenja skupnega živega srebra na detektorju (AAS HP- Automatic Mercury Analyzer Model Hg-201, Sanso Seisakusho Co., LTD) (Akagi, 1997). Merimo višino signala, količino Hg v vzorcu pa izračunamo na osnovi standardne raztopine. Meritev enega vzorca traja 1 min. Pomembno je, da imamo ves čas merjenja enak volumen v redukcijski celici, saj se vzpostavi ravnotežje Hg med vodno in zračno fazo. Prav tako naj bi bila ves čas enaka kislinska sestava. Če enakega volumna vzorca zaradi previsokih koncentracij od predvidenih ne moremo zagotoviti, moramo do želenega volumna v redukcijski celici dodati Milli-Q vodo. Vendar to doprinese del napake. Vsako paralelko smo izmerili dvakrat. Enkrat so bile izmerjene le paralelke mleka, ki so bile razkrojene z mikrovalovnim sistemom.

#### 3.2.3.2 Atomska absorpcijska spektrometrija hladnih par z amalgamacijo

Kemikalije, ki smo jih uporabili: 10 %  $\text{SnCl}_2$ , 10 % NaOH, Milli-Q voda, delovna standardna raztopina.

Materiali, ki smo jih uporabili: polavtomatske pipete z nastavki.

Alikvot vzorca smo prelili v redukcijsko celico, napolnjeno s kislom raztopino  $\text{SnCl}_2$ , ki reducira  $\text{Hg}^{2+}$  v  $\text{Hg}^0$ . Med dodajanjem vzorca v redukcijsko celico je tok dušika

usmerjen skozi rotameter in zlato past. Tripotni ventil je medtem naravnano tako, da tok dušika ne gre skozi merilno celico. Ko redukcijsko celico zapremo, tripotni ventil tok dušika usmeri skozi redukcijsko celico ter naprej skozi nevtralizacijsko celico, ki je sestavljena iz treh izparilk (10 % NaOH, 5 % NaOH, Milli-Q voda).  $Hg^0$  nato potuje skozi sušilno sredstvo (silikagel) ter zlato past, kjer poteče amalgamiranje  $Hg^0$ . Po redukciji in amalgamiranju sledi faza merjenja, pri čemer dvopotni ventil ponovno usmeri tok dušika skozi rotameter in adsorpcijsko past, tripotni ventil pa skozi merilno celico. Ko se pretok ustali, se vključi gretje. Z grelnim sistemom in kantalovo žičko se zlata past segreje, pri čemer se  $Hg^0$  iz pasti sprosti skozi merilno celico v izpust. Merimo višino signala, količino Hg v vzorcu pa izračunamo na osnovi umeritvene krivulje (Horvat, 1989). Meritev enega vzorca traja 5 min.

### 3.2.3.3 Določanje živega srebra s CV AAS s predhodnim oksidativnim sežigom vzorca.

Kemikalije, ki smo jih uporabili: standardna delovna raztopina.

Certificirani referenčni materiali, ki smo jih uporabili: za kri PT – WB1 (Institut Jožef Stefan, Slovenija) in Seronorm trace elements whole blood (Sero As, Norveška).

Materiali, ki smo jih uporabili: kvarčne ladjice, polavtomatske pipete z nastavki, stojalo za ladjice.

*Kri*: Približno 0,2 g vzorca smo odtehtali v kvarčne ladjice, ki smo jih nato vstavili v avtomatski vzorčevalnik. Merjenje celokupnega živega srebra smo opravili z inštrumentom Milstrone DMA-80 (Direct Mercury Analyzer). Vzorec gre v toku kisika najprej skozi fazo sušenja. Suši se 150 sekund pri temperaturi 200 °C. Nato se pri temperaturi 650 °C termično razgradi, kar traja 180 sekund. Produkti izgorevanja se nato v 60 sekundah razgradijo v katalitični pečki. Živosrebrovi hlapi se vežejo na zlato amalgamator, od koder se nato desorbirajo v merilno celico AAS (atomski absorpcijski spektrofotometer z enojnim žarkom, ki mu sledi pretok skozi dve merilni celici), kjer merimo absorpcijo pri 254 nm na silikonskem UV-fotodetektorju (EPA 7473).

*Lasje*: Približno 0,02 g vzorca smo odtehtali v kvarčne ladjice, ki smo jih nato vstavili v avtomatski vzorčevalnik. Merjenje celokupnega živega srebra smo opravili z inštrumentom Milstrone DMA-80 (Direct Mercury Analyzer). Vzorec gre v toku kisika najprej skozi fazo sušenja. Suši se 60 sekund pri temperaturi 200 °C. Nato se pri temperaturi 650 °C termično razgradi, kar traja 150 sekund. Produkti izgorevanja se nato v 60 sekundah razgradijo v katalitični pečki. Živosrebrovi hlapi se nato vežejo na zlato amalgamator, od koder se nato desorbirajo v merilno celico AAS (atomski absorpcijski spektrofotometer z enojnim žarkom, ki mu sledi pretok skozi dve merilni celici), kjer merimo absorpcijo pri 254 nm na silikonskem UV-fotodetektorju. (EPA 7473)



## 4 REZULTATI IN RAZPRAVA

Rezultati eksperimentalnega dela so predstavljeni v zaporedju dela. Najprej smo validirali analizo metodo za določanje celokupnega živega srebra v bioloških vzorcih. Postopek validacije je vseboval naslednje elemente:

- optimizacijo kislinskega razkroja (mikrovalovni razkroj, zataljene steklene ampule, razkroj v bučkah in epruveh),
- meje zaznavnosti za posamezne matrice,
- meje kvantifikacije za posamezne matrice,
- oceno negotovosti,
- oceno pravilnosti,
- sledljivost, kalibracijo,
- stabilnost Hg pri odmrzovanju in odtajanju vzorcev.

Po končanem procesu validacije analiznega postopka, smo izmerili vsebnost živega srebra v laseh, krvi, materinem mleku in urinu pri izbrani populaciji. V zadnji fazi pa smo dobljene rezultate povezali s podatki iz vprašalnikov ter tako pri preiskovani populaciji skušali ovrednotiti glavne načine izpostavljenosti.

### 4.1 Validacija analiznega postopka za določanje celokupnega živega srebra v bioloških vzorcih

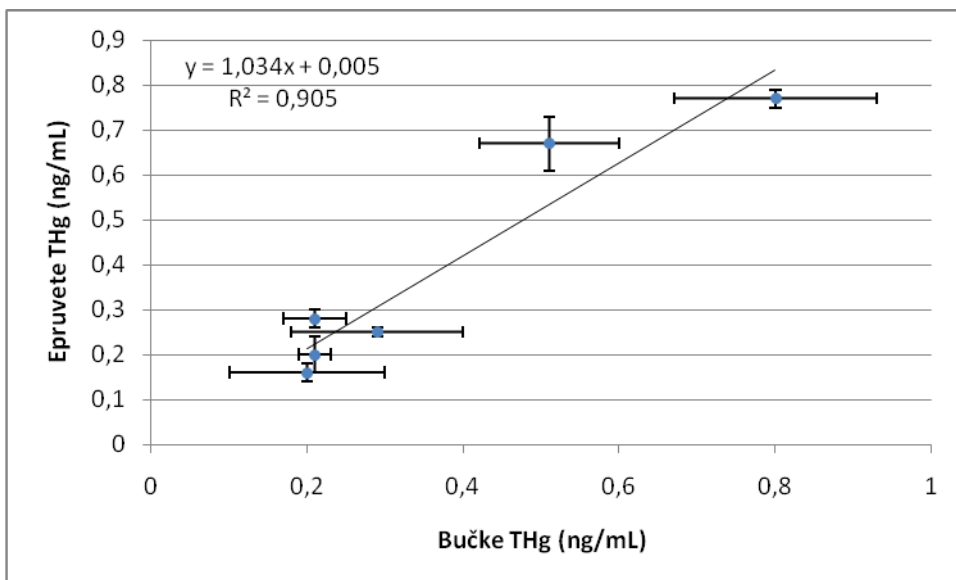
Že v uvodu smo omenili, da smo za delo uporabili že vpeljane metode na odseku za znanosti o okolju (Horvat in sod., 1986; Horvat, 1989). Edina sprememba je v uporabi merilnega sistema, ki za razliko od prej validiranih metod uporablja atomsko absorpcijo hladnih par (CV AAS) brez predhodne amalgamacije. Princip merjenja temelji na redukciji dvovalentnega Hg v elementarno obliko, ki je pri sobni temperaturi v obliki hlapov. Raztopino, v kateri se živo srebro reducira, prepihujemo z zrakom, ki elementarni Hg iz raztopine izpiha v zračno fazo v hermetično zaprt krožni sistem. Pri tem se vzpostavi ravnotežje med zračno in vodno fazo. Po 30 sekundah prepihanja štiripotni ventil usmeri pare Hg v detektor CV AAS (Akagi, 1997). Pomembna dejavnika, ki lahko bistveno vplivata na proces merjenja, sta predvsem sestava vodne faze ter razmerje vodnega in zračnega volumna.

#### 4.1.1 Optimizacija kislinskega razkroja

##### 4.1.1.1 Urin

*Primerjava razkrojev v bučkah in epruveh:* Akagi (1997) v svojem članku predvideva razkroj v 50 mL steklenih bučkah. Pri našem delu smo ocenili, da je uporaba bučk nepraktična, glavni problem pa je preveliko redčenje razkrojenega vzorca. Pri prelivanju vzorcev v manjše bučke lahko pride do kontaminacije vzorcev, prav tako pa je zato potrebno veliko časa, še zlasti pri pripravi večjega števila vzorcev. Zato smo poskusili razkroj v 30 mL epruveh s pokrovčki, ki imajo volumske oznake na vsak 0,5 mL. Tako je redčenje na manjše volumne lažje, kar je pomembno pri vzorcih z nizkimi koncentracijami. Razkroj vzorca v bučkah in epruveh (na novem termo bloku) poteka po enakem postopku, le da je steklovina drugačna. Na sliki 7 so prikazani rezultati

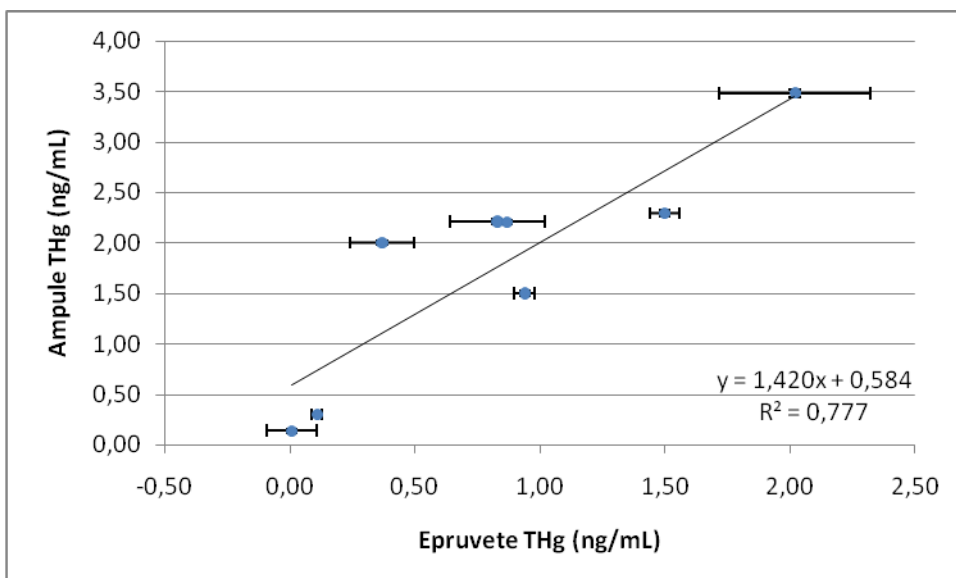
obeh razkrojov (merilni sistem CV AAS). Wilcoxonov test nam pri 95 % intervalu zaupanja pokaže, da med razkrojema ni statistično značilnih razlik ( $p = 0,612$ ,  $N = 7$ ). Sklepamo lahko, da ni pomembno s katerim postopkom oziroma v kateri steklovinii razkrojimo vzorce.



**Slika 7:** Primerjava razkroja v epruветah in bučkah

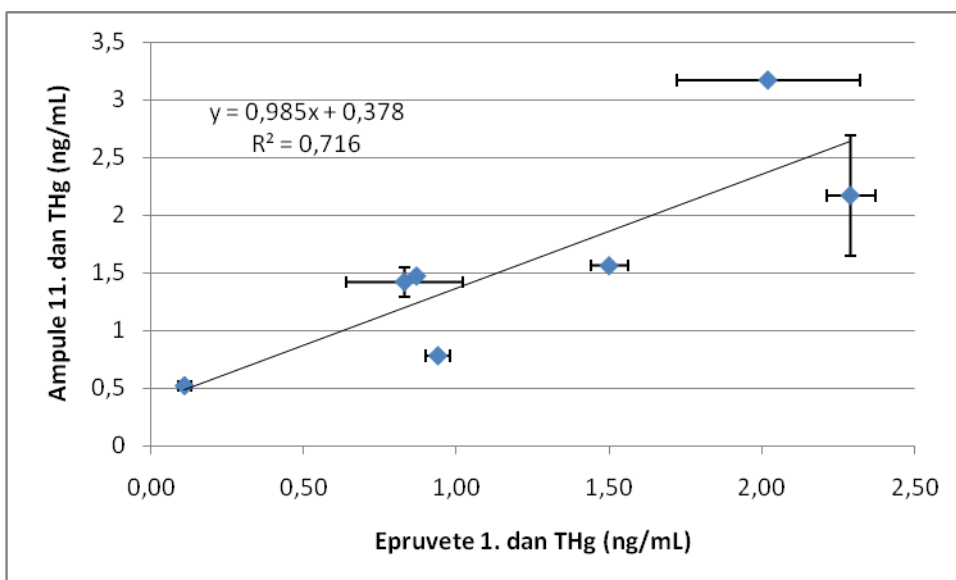
*Primerjava razkroja v zataljenih ampulah in epruветah:* Da bi preverili ali se Hg pri razkroju do izgublja zaradi povišane temperature smo vzorce primerjalno razkrojili v zataljenih ampulah. Razkrojna metoda v zataljenih ampulah je bila optimizirana že pred leti (Horvat in sod., 1986) in se je dolgo uspešno uporabljala, predvsem v povezavi z detekcijo CV AAS po predhodni amalgamaciji. Postopek priprave vzorcev v ampulah je v primerjavi z epruветami dolg, saj moramo ampule zataliti pri povišani temperaturi. Prednost ampul je predvsem v tem, da razkrojene vzorce lahko neomejeno dolgo hranimo. Primerjava rezultatov je prikazana na sliki 8. Rezultati v ampulah so bili v primerjavi z epruветami visoki, medtem ko so se rezultati referenčnih materialov ujemali z referenčnimi vrednostmi. Sklepali smo, da pri sistemu detekcije brez predhodne amalgamacije prihaja do sproščanja hlapnih spojin v zračno fazo, ki v absorpcijski celici povzroča nespecifično absorpcijo. Vzorce v zataljenih ampulah smo po 11 dnevih spet izmerili in dobili za približno 70 % nižje rezultate ki so bili primerljivi s tistimi, ki smo jih izmerili v vzorcih, razkrojenih v epruветah. Iz teh rezultatov smo ugotovili dvoje:

1. pri merjenju Hg v CV AAS brez predhodne amalgamacije je ključnega pomena, da so vzorci razkrojeni v odprtih posodah, da lahko hlapne snovi, ki povzročajo nespecifično absorpcijo odhlapijo. Pri tem je treba zato, da ne odhlapi tudi Hg, zagotoviti primerne pogoje (čas in primerno obliko razkrojne posodice).
2. Uporaba referenčnega materiala v našem primeru ni zagotavljala pravilnosti rezultatov, kljub temu, da je bil referenčni material podoben po matrici in koncentracijskem nivoju Hg v analiziranih vzorcih.



**Slika 8:** Primerjava razkroja vzorcev urina v zataljenih ampulah in epruvetah

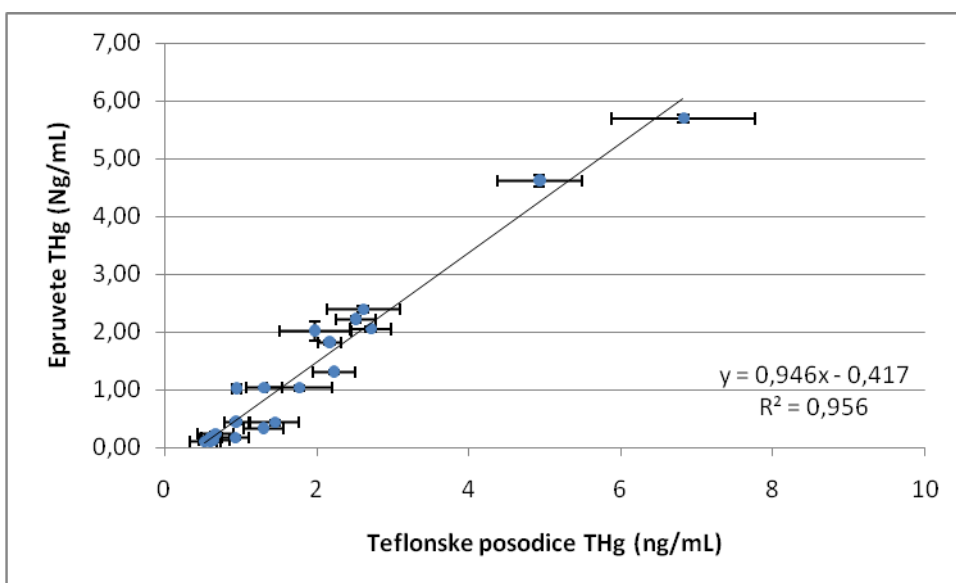
V potrditev zgornjih ugotovitev so na sliki 9 prikazani rezultati meritev razkroja v zataljenih ampulah (11. dan) in epruvetah (1. dan). Če primerjamo rezultate razkroja v epruvetah (prvi dan) in ampulah po 11 dneh (priloga 3.2), nam Wilcoxonov test pri 95 % intervalu zaupanja ( $N = 7$ ) ne pokaže statistično značilnih razlik ( $p = 0,128$ ). To nam spet dokazuje, da je pri merilnem sistemu CV AAS brez amalgamiranja prišlo do nespecifične absorpcije, temu pa se s pomočjo amalgamiranja izognemo, saj se živo srebro v času redukcije in prepilovanja selektivno veže na zlato past, medtem ko hlapne spojine, ki povzročajo nespecifično absorpcijo odhlapijo v zrak. V fazo deamalgamiranja pri povišani temperaturi v absorpcijsko celico vstopijo le hlapi Hg.



**Slika 9:** Primerjava razkroja vzorcev urina v zataljenih ampulah (11. dan) in epruvetah (1. dan)

Urin smo poskušali razkrajati tudi v 25 mL teflonskih posodah. Vendar je bila ponovljivost med paralelkami slaba (relativni standardni odmik: 6 do 35 %) (slika 10).

To pripisujemo predvsem nekontrolirani kontaminaciji, ki izvira iz teflonskih posodic. To je lahko posledica tega, da so se v preteklosti v teh teflonskih posodicah razkrajali vzorci z višjimi koncentracijami Hg. Med razkrojem pri povišani temperaturi je poroznost teflona povečana, zato se Hg lahko zadrži v porah in se v razkrojno raztopino spet sprošča pri poznejših razkrojih. To lahko močno vpliva na rezultate pri vzorcih z nizko vsebnostjo Hg. Teflonske posodice, ki smo jih uporabljali, niso bile nove, zato je možno, da pokrovčki niso popolnoma tesnili. Če primerjamo rezultate razkroja v epruvetah in teflonskih posodicah (slika 10), so bile vrednosti pri razkroju v teflonskih posodicah višje kot pa v epruvetah, tako da je možno, da je poleg kontaminacije prišlo tudi do nespecifične absorpcije, saj so teflonske posodice med razkrojem zaprte.

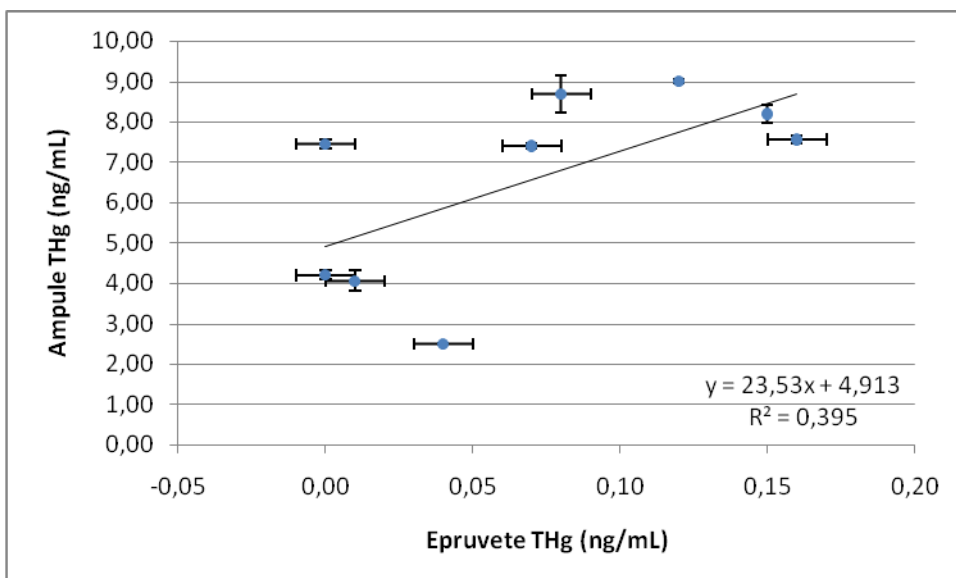


**Slika 10:** Primerjava razkroja vzorcev urina v epruvetah in teflonskih posodicah

Za nadaljnje razkroje urina smo se odločili za postopek razkroja v epruvetah.

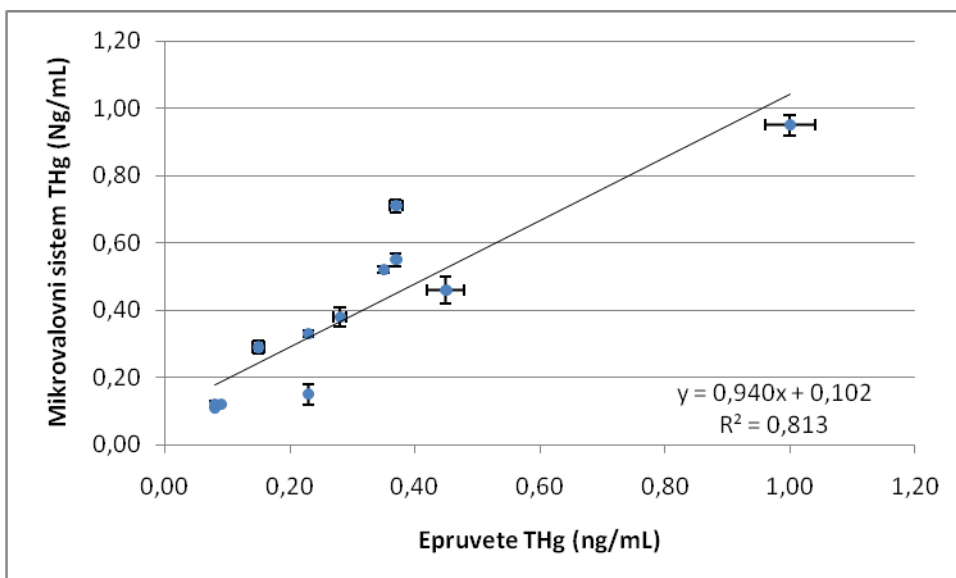
#### 4.1.1.2 Mleko

Prav tako kot urin smo želeli v epruvetah razkrajati tudi mleko, in sicer zaradi že prej omenjenih razlogov. Primerjava rezultatov kislinskega razkroja v epruvetah in ampulah je prikazana na sliki 11. Prednosti in slabosti razkroja v zataljenih ampulah so opisane že pri urinu (poglavje 4.1.1.1). Rezultati v ampulah v primerjavi z epruvetami so bili zelo visoki, kar spet pripisujemo nespecifični absorpciji. Tako kot urin je treba tudi mleko razkrajati v odprtih posodicah.

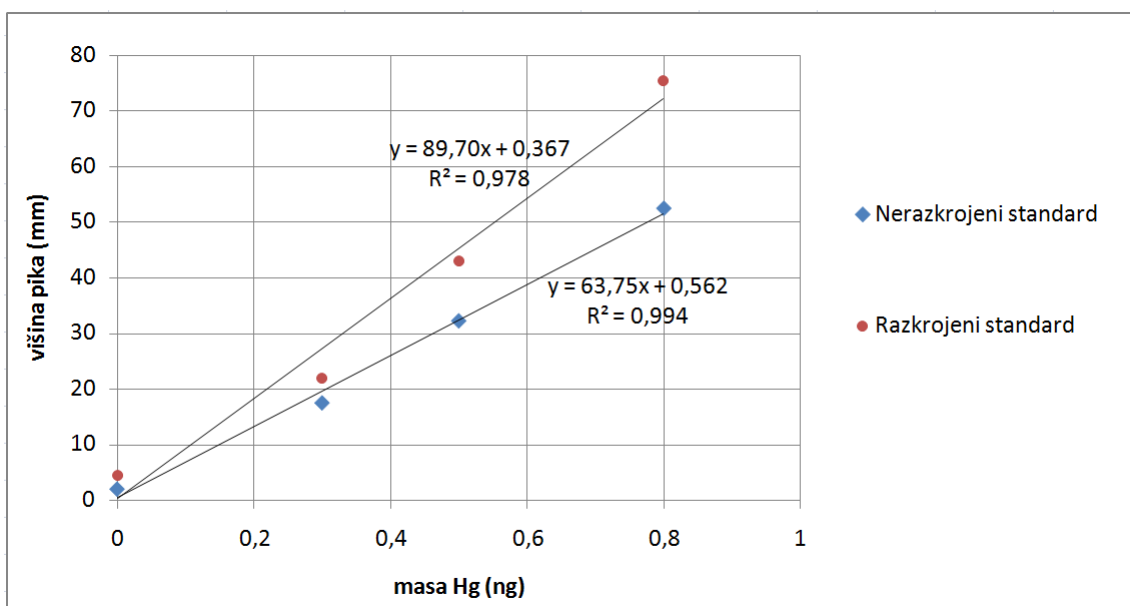


**Slika 11:** Primerjava razkroja vzorcev mleka v zataljenih ampulah in epruveh

Primerjali smo tudi kislinski razkroj v epruveh z razkrojem z mikrovalvnim sistemom. Razkroj smo namreč želeli optimizirati tako, da bi preostali razkrojeni vzorec uporabili za določanje preostalih elementov z metodo ICP MS. Razkroj z mikrovalvnim sistemom je zaprt razkroj, ki poteka pri povišanem pritisku. Postopek priprave je relativno dolg, kar je nezaželeno pri velikem številu vzorcev. Rezultati mikrovalvnega razkroja so bili naključno nižji ali višji od rezultatov razkroja v epruveh, kot prikazuje slika 12. Za razliko od razkrojev v epruveh in ampulah pri tem razkroju standard ni bil pripravljen po enakem postopku kot vzorci (delovna standardna raztopina se je merila direktno). Treba bi bilo narediti še meritve s standardom, pripravljenem po enakem postopku kot so bili vzorci, saj je metoda CVAAS brez predhodnega amalgamiranja relativna metoda, pri kateri merimo porazdelitev reducirane elementarne Hg med tekočo in plinsko fazo. Na to porazdelitev pa vplivajo zlasti sestava raztopine in volumni. To potrjujejo rezultati, prikazani na sliki 13, kjer je razvidno, da so pri razkrojenem standardu (pripravljen po enakem postopku kot vzorci – razkroj v epruveh) piki višji, kot če delovno standardno raztopino merimo direktno.



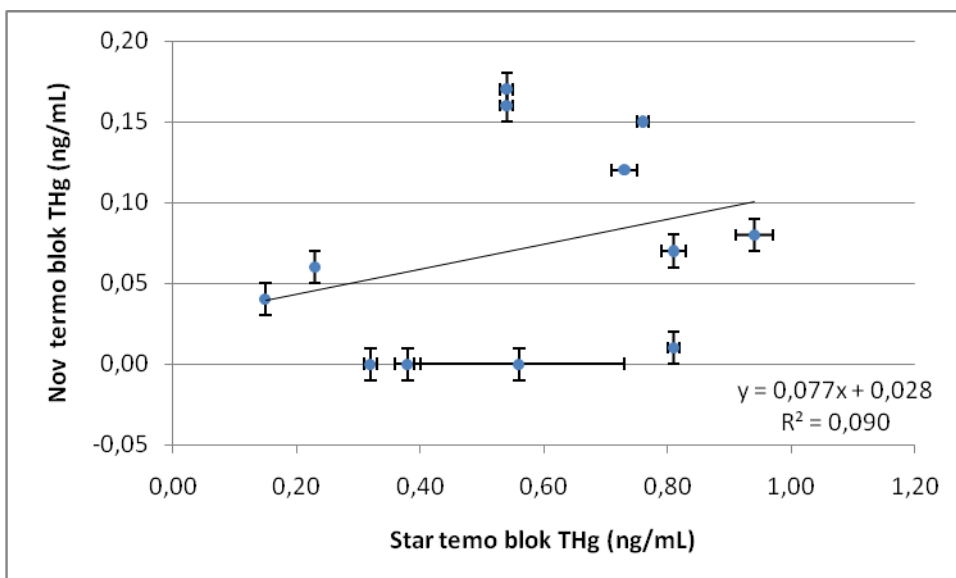
**Slika 12:** Primerjava razkroja vzorcev mleka v epruветah in mikrovalovnem sistemu



**Slika 13:** Primerjava višine pika standarda, pripravljenega po enakem postopku kot so vzorci in nerazkrojenega standarda

Pri nadaljnjem razkroju mleka smo se odločili za postopek razkroja v epruветah.

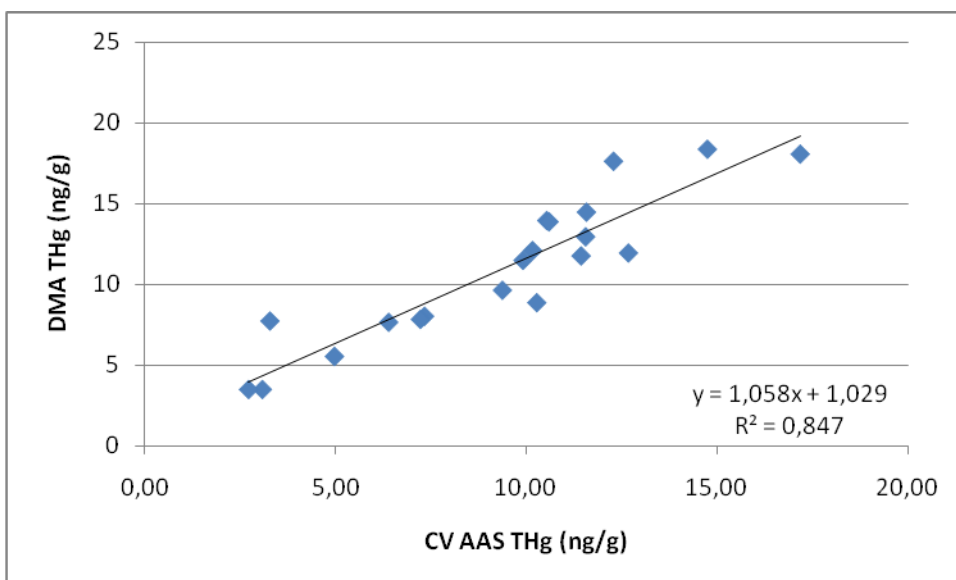
Na začetku optimizacije kislinskega razkroja smo mleko skušali razkrajati v epruветah v termo bloku, kjer se sistem ni tesno prilegal epruветam (odprtine v polmeru prevelike za približno 0,5 cm). Izkazalo se je, da se vzorec mleka ne razkroji popolnoma, saj je na gladini vzorca ostala nerazkrojena maščoba. V primerjavi z osnovnimi vrednostmi za mleko (opisane so v poglavju 4.2) pa smo opazili, da so dobljene vrednosti veliko previsoke, kar kaže na nespecifično absorpcijo, do katere lahko pride zaradi lastnosti merilnega sistema. Razlike med paralelkami so bile naključno prevelike, vrednosti referenčnih materialov pa so bile znotraj določenih mej. Pri nadaljnjih razkrojih smo se odločili za grelni sistem, kjer se odprtine tesno prilegajo epruветam. Rezultati meritev razkrojenih vzorcev na starem in novem termo bloku so prikazani na sliki 14.



**Slika 14:** Primerjava razkroja vzorcev mleka v epruvtah na starem in novem termo bloku

#### 4.1.1.3 Kri

Na podlagi rezultatov optimizacije kislinkega razkroja za mleko in urin, smo se pri krvi odločili za razkroj v epruvtah. Pravilnost smo primerjali z rezultati dobljenimi z neodvisno metodo, ki temelji na oksidativnem sežigu vzorca pri povišani T in detekciji s CV AAS s predhodno amalgamacijo. Prav tako smo pravilnost preverjali z uporabo referenčnih materialov. Rezultati so prikazani na sliki 15 in se zadovoljivo ujemajo.



**Slika 15:** Primerjava meritev vzorcev s CV AAS in DMA

Glede na izbrani razkroj v epruvtah na novem termo bloku smo ovrednotili validacijske parametre, ki so uporabni za vse tri vrste vzorca.

#### 4.1.2 Meja zaznavnosti in kvantifikacije

Mejo zaznavnosti postopka preskušanja (LOD – limit of detection) smo določili z merjenjem množine Hg v 10 paralelkah slepega vzorca razkrojenega v epruvetah (preglednica 3). Rezultati za slepe vzorce so podani na celotni volumen razkrojenega vzorca (30 mL). Pri izračunu koncentracije Hg v vzorcih namreč to množino v celoti odštejemo od množine Hg v razkrojenem vzorcu krvi, mleka ali urina.

**Preglednica 3:** Koncentracija THg v slepih vzorcih. Rezultati so podani kot ng/30 mL raztopine.

Slepi vzorec (n = 2)	THg	Povprečna vrednost	Standardni odmik ( $SD_{sl}$ )
1	0,16		
2	0,17		
3	0,15		
4	0,14		
5	0,13	0,14	0,025
6	0,10		
7	0,17		
8	0,11		
9	0,11		
10	0,12		

Mejo zaznavnosti postopka preizkušanja smo izračunali kot trikratni standardni odklik (SD) 10 meritev slepega vzorca (preglednica 3):

$$LOD = 3 \cdot SD_{sl} \quad (2)$$

LOD tako znaša 0,075 ng/30 mL raztopine. To pomeni, da moramo v razkrojeni raztopini zagotavljati množino Hg 0,075 ng, da lahko zanesljivo izmerimo višino absorpcijskega pika.

LOD za različne vrste vzorcev preračunamo glede na vrsto vzorca na gram ali mililiter vzorca v 30 mL raztopine po enačbi 3 (preglednica 4):

$$LOD = \frac{3 \cdot SD_{sl}}{V_{vz}(m_{vz})} \quad (3)$$

$V_{vz}(m_{vz})$  – odmera volumna (mase) vzorca

Od vzorcev krvi in mleka pri preučevani populaciji ni bil noben vzorec pod mejo zaznavnosti, le pri urinu so bili trije.

Mejo kvantifikacije postopka preskušanja (LOQ) smo izračunali kot desetkratni standardni odklik 10-ih meritev slepega vzorca (preglednica 3):

$$LOQ = 10 \cdot SD_{sl} \quad (4)$$

Kar znaša 0,25 ng/30mL razkrojnega vzorca. Izračunana LOQ za posamezno vrsto vzorcev je v preglednici 4.



$$LOQ = \frac{10 \cdot SD_{sl}}{V_{vz}(m_{vz})} \quad (5)$$

$V_{vz}(m_{vz})$  – odmera volumna (mase) vzorca

Iz preglednice 4 ter enačbe 3 in 5 je razvidno, da se LOD in LOQ spreminjata glede na maso/volumen vzorca ter na redčenje razkrojene raztopine.

**Preglednica 4:** Meja zaznavnosti in kvantifikacije za posamezno vrsto vzorca (preračunane na gram ali mililiter vzorca), rezultati so podani kot ng/30 mL raztopine

Vzorec	Skupni volumen (mL)	Volumen, masa vzorca	Meja zaznavnosti (ng/30mL)	Meja kvantifikacije (ng/30mL)
Kri	30	0,5 g	0,15	0,5
Mleko	30	2 mL	0,038	0,125
Urin	30	1 mL	0,075	0,25

Ocenjena LOQ je za določanje Hg v krvi, urinu in mleku relativno visoka. V praksi smo te vrednosti lahko izmerili, zato smo rezultate, ki so bili pod LOQ, upoštevali pri obdelavi podatkov. Iz rezultatov, podanih v prilogi 8, je razvidno, da so bili trije vzorci krvi, 15 vzorcev mleka in 24 vzorcev urina pod LOQ. Vse vzorce smo analizirali v dveh neodvisnih paralelkah in razlike med njimi so bile za kri od 9 do 16 %, za mleko od 1 do 13 % in za urin od 0 do 15 %. Kar se ujema z rezultati, ki so bili nad LOQ. Sklepamo, da so rezultati v območju med LOD in LOQ sprejemljivi za obdelavo. Da bi dobili realnejšo sliko o LOD in LOQ, bi bilo treba LOQ in LOD oceniti tudi na realnih vzorcih in ne samo na podlagi analize slepih vzorcev.

#### 4.1.3 Zagotavljanje pravilnosti in merilna negotovost

Pravilnost smo zagotavljali z referenčnimi materiali ter s primerjavo z drugimi metodami merjenja. Za vzorce krvi in mleka sta bila uporabljena po dva referenčna materiala, za urin le eden. Rezultate meritev referenčnih materialov smo vnašali v kontrolno karto (priloga 7). Pri urinu smo uporabili *Clin Chek 8847*. Pri mleku smo za nižje koncentracije uporabili *NIST 1549* in za visoke *BCR 150*. Pri nižjih koncentracijah v krvi smo uporabili kontrolni material *Seronorm trace elements whole blood L-1* ter za višje *PT WB1*, ki je bil pripravljen na Odseku za znanosti o okolju (preglednica 5).

**Preglednica 5:** Povprečna vrednost, standardni odmik, ponovljivost in obnovljivost uporabljenih referenčnih materialov

Vzorec	Referenčni material	Izmerjena vrednost			
		Povprečna vrednost	Standardni odmik	Ponovljivost (%)	Obnovljivost (%)
Kri	<i>Seronorm Trace elements whole blood L-1</i> ( $2,2 \pm 0,2 \text{ ng/g}^b$ )	1,92	0,17	3	9
	<i>PT WB1</i> ( $7,8 \pm 0,9 \text{ ng/g}^b$ )	6,42	0,47	3	7
Mleko	<i>NIST 1549</i> ( $0,3 \pm 0,2 \text{ ng/g}^a$ )	0,38	0,08	11	22
	<i>BCR 150</i> ( $9,4 \pm 1,7 \text{ ng/g}^a$ )	7,7	0,35	3	4,5
Urin	<i>Clin Chek 8847</i> ( $3,49 \pm 0,7 \text{ ng/mL}^b$ )	2,30	0,33	3	14

<sup>a</sup> – certificirana vrednost, <sup>b</sup> – referenčna vrednost

S pomočjo enačbe za izračun koncentracije celotnega živega srebra (enačba 6 in 7) in diagrama »ribja kost« (slika 16) smo prepoznali vire negotovosti. Iz diagrama je razvidno, da negotovost merilnega rezultata izhaja iz koncentracije delovne standardne raztopine, iz višine pika vzorca ter iz višine pika delovne standardne raztopine.

Enačba 6 prikazuje razširjen izračun koncentracije vzorca:

$$c_{vz} = \left( \frac{V_{std1} \cdot V_{mer.std1} \cdot h_{vz} \cdot V_{tot.vz}}{V_{tot.std1} \cdot h_{std1} \cdot V_{mer.vz}} - \frac{V_{std2} \cdot V_{mer.std2} \cdot h_{sl} \cdot V_{tot.sl}}{V_{tot.std2} \cdot h_{std2} \cdot V_{mer.sl}} \right) \cdot \frac{c_{std}}{m_{vz}} \quad (6)$$

$c_{vz}$  – koncentracija vzorca

$V_{std1}$  – volumen odpipetirane standardne delovne raztopine

$V_{mer.std1}$  – merjeni volumen razkrojenega standarda, ki smo ga odpipetirali v redukcijsko celico

$h_{vz}$  – višina pika vzorca

$V_{tot.vz}$  – končni volumen vzorca po razredčenju

$V_{tot.std1}$  – končni volumen standarda po razredčenju

$h_{std1}$  – višina pika standarda

$V_{mer.vz}$  – volumen razkrojenega vzorca, ki smo ga odpipetirali v redukcijsko celico

$V_{std2}$  – merjeni volumen odpipetirane standardne delovne raztopine

$V_{mer.std2}$  – merjeni volumen razkrojenega standarda, ki smo ga odpipetirali v redukcijsko celico

$h_{sl}$  – višina pika slepega vzorca

$V_{tot.sl}$  – končni volumen slepega vzorca po razredčenju

$V_{tot.std2}$  – končni volumen standarda po razredčenju

$h_{std2}$  – višina pika standarda

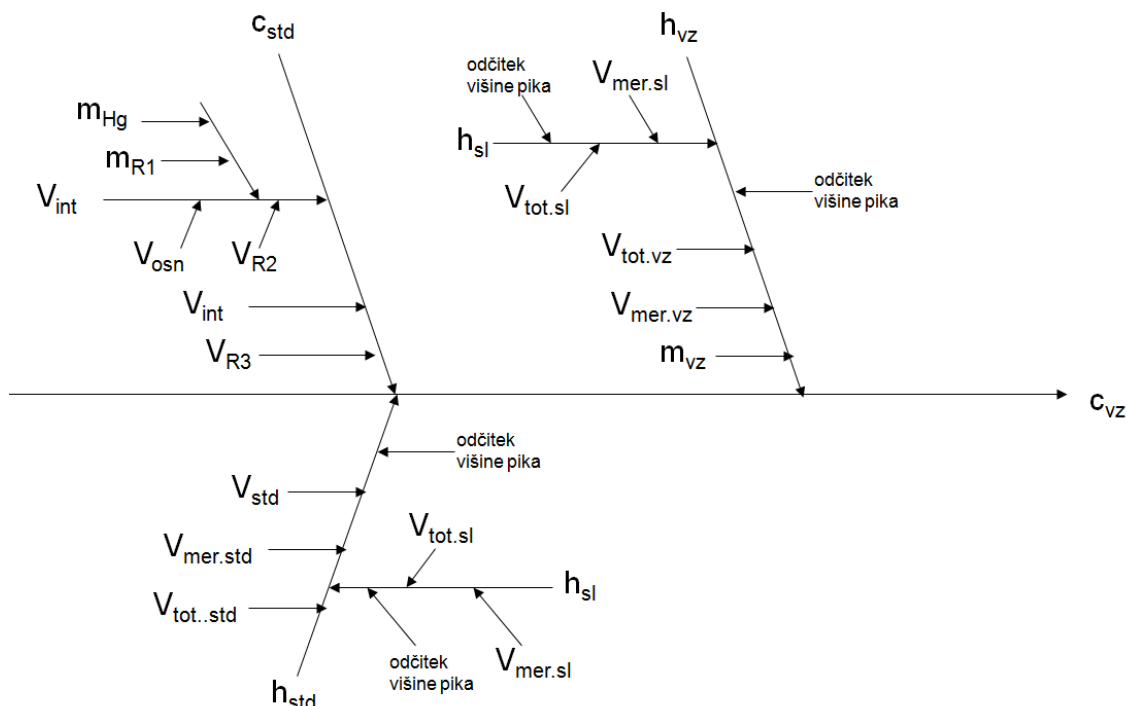
$V_{mer.sl}$  – volumen razkrojnega slepega vzorca, ki smo ga odpipetirali v redukcijsko celico

$c_{std}$  – koncentracija delovne standardne raztopine (10 ng/mL)

$m_{vz}$  – masa vzorca

Ker so volumni po razredčitvi povsod enaki, jih lahko črtamo. Prav tako so navadno enaki merjeni volumni, če pa tega pri vzorcu ne moremo zagotoviti (višja koncentracija, kot smo predvidevali), moramo v redukcijsko celico dodati še Milli-Q vodo, saj merjenje temelji na ravnotežju med tekočo in zračno fazo (Akagi, 1997). Za izračun koncentracije vzorca pa potem upoštevamo enačbo 7:

$$c_{vz} = \left( \frac{V_{std1} \cdot h_{vz}}{h_{std1}} - \frac{V_{std2} \cdot h_{sl}}{h_{std2}} \right) \cdot \frac{c_{std}}{m_{vz}} \quad (7)$$



**Slika 16:** Diagram »riba kost« za prepoznavanje virov negotovosti

Preglednica 6 prikazuje vrednosti nekaterih virov merilne negotovosti pri določanju celokupnega Hg ne glede na vrsto vzorca.

**Preglednica 6:** Viri merilne negotovosti pri določanju koncentracije celokupnega Hg ne glede na vrsto vzorca

Vhodna količina	Vrednost	SD	RSD(%)
$h$ (odčitek višine pika)	30 / 150 mm	0,5 mm	1,6 / 0,3
$C_{std}$	10 ng/mL	0,014 ng/mL	0,14
$m_{vz}$	0,1 / 1 g	$6,2 \cdot 10^{-6} / 0,013 \cdot 10^{-3} g$	0,0062 / 0,0013
$V_{std}$	70 $\mu$ L	$0,6 \cdot 10^{-3} \mu$ L	0,00086
$V_{mer}$	5 mL		0,6
$V_{tot}$	30 mL	0,2 mL	0,7

Oceno kombinirane merilne negotovosti ( $u_c$ ) smo izračunali po enačbi 8:

$$u_c = \sqrt{u_{V_{mer}}^2 + u_{V_{tot}}^2 + u_h^2 + u_{obn}^2} \quad (8)$$

$u_{V_{mer}}$  – negotovost pipete (5 mL) za pipetiranje razkrojenega vzorca

$u_{V_{tot}}$  – negotovost razredčenega volumna

$u_h$  – negotovost pri odčitku višine pika

$u_{obn}$  – obnovljivost referenčnega materiala

Pri izračunu kombinirane merilne negotovosti glede na vrsto vzorca smo upoštevali napako pri odčitku višine pika, napaki pri merjenem in razredčenem volumnu ter obnovljivost pripadajočega referenčnega materiala (preglednica 5). Kombinirano merilno negotovost smo izračunali po enačbi 8 (preglednica 7), razvidno je, da največji del merilne negotovosti doprinese obnovljivost referenčnega materiala. Primer izračuna

kombinirane merilne negotovosti za kri (upoštevani referenčni material: *Seronorm Trace elements whole blood L-1*):

$$u_c = \sqrt{0,006^2 + 0,007^2 + 0,016^2 + 0,003^2 + 0,09^2} = 0,092 \quad (9)$$

Po enačbi 10 smo izračunali še razširjeno merilno negotovost, s faktorjem pokritja  $k = 2$  (preglednica 7):

$$U = k \cdot u_c \quad (10)$$

Rezultati vseh razširjenih merilnih negotovosti so prikazani v preglednici 7.

**Preglednica 7:** Kombinirana in razširjena merilna negotovost za posamezno vrsto vzorca s pripadajočim referenčnim materialom

Vzorec	Referenčni material	Kombinirana merilna negotovost (%)	Razširjena merilna negotovost (%)
Kri	<i>Seronorm Trace elements whole blood L-1</i>	9	18
	<i>PT WB1</i>	7	14
Mleko	<i>NIST 1549</i>	22	44
	<i>BCR 150</i>	5	10
Urin	<i>Clin Chek 8847</i>	14	28

Razširjena merilna negotovost je relativno visoka za vse vrste vzorca. Glavni vir merilne negotovosti je obnovljivost referenčnega materiala, ki pri krvi predstavlja 95 do 99 %, pri mleku 85 do 99 % in pri urinu 98 %.

Negotovost referenčne vrednosti prav tako vpliva na merilno negotovost. Tak primer je referenčni material za mleko pri nizkih koncentracijah (*NIST 1549*), kjer negotovost referenčne vrednosti (preglednica 5) doprinese več kot 60 %. Iz tega sklepamo, da je uporaba tega referenčnega materiala pri biomonitoringu neprimerna.

Relativno veliko razširjeno merilno negotovost (preglednica 7) in nižjo izmerjeno povprečno vrednost od certificirane (preglednica 5) pri urinu za višje koncentracijsko območje (*Clin Chek 8847*) pripisujemo hrambi referenčnega materiala. Le-ta je bil po redčenju shranjen v plastičnih kivetah, kjer se je živo srebro vezalo na plastiko. To smo ugotovili kasneje, kar je razvidno tudi iz kontrolne karte (priloga 7). Primerna hramba je v steklenih posodicah. Iz kontrolne karte za ta referenčni material (priloga 7) je razvidno, da Hg v plastičnih kivetah pade na stabilno vrednost. Rezultat 17. 6. 2010 pa odstopa, saj je bil takrat izmerjen sveže pripravljen referenčni material.

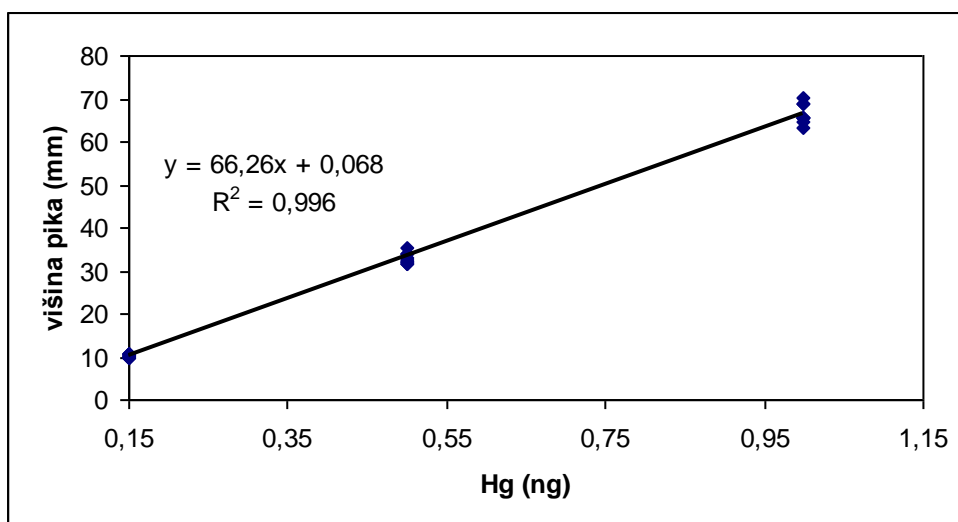
Problem referenčnih materialov je, da je treba liofilizirano obliko referenčnega materiala rekonstruirati. Prav tako je na tržišču težko dobiti referenčni material, ki bo imel primerno koncentracijsko območje za Hg ter sestavo, čim bolj podobno merjenim vzorcem. Zato referenčni material ne odraža nujno realnega stanja, kar se je izkazalo tudi s postopkom validacije. Kot je razvidno iz preglednice 7, je pri nekaterih večji problem velika merilna negotovost.

Neprimerna raba referenčnih materialov pa ima lahko za posledico tudi neprimerno obnovljivost, ki bistveno vpliva na oceno merilne negotovosti. Prav zato je izjemno pomembno, da se referenčni materiali uporabljajo pravilno.

#### 4.1.4 Sledljivost in kalibracija

Sledljivost rezultatov smo zagotovili gravimetrično z delovno standardno raztopino (enačba 1). Posredno smo sledljivost rezultatov zagotavljali tudi s certificiranimi referenčnimi materiali.

Z razkrojeno delovno standardno raztopino smo pred vsakim setom meritev naredili umeritveno krivuljo v območju od 0,1 ali 0,15 ng do 1 ng. Če smo pričakovali nižje koncentracije, smo vzeli manjše območje. Dnevno so bile vse količine pripravljene v dveh paralelkah ter dvakrat izmerjene. Na sliki 17 je predstavljena umeritvena krivulja devetih ponovitev z regresijsko enačbo in korelacijskim koeficientom, ki znaša 0,996.

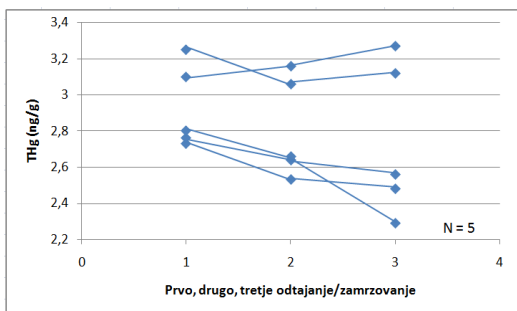


**Slika 17:** Umeritvena krivulja merilnega sistema CVAAS z regresijsko enačbo in korelacijskim koeficientom

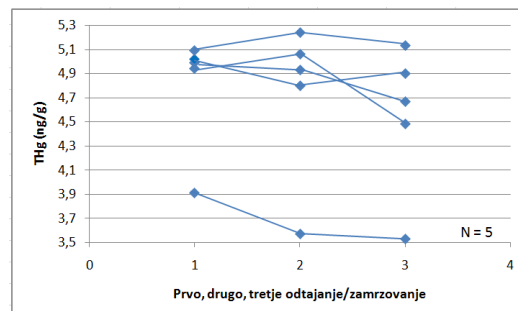
#### 4.1.5 Stabilnost Hg pri zamrzovanju in odmrzovanju

Stabilnost celokupnega Hg pri zamrzovanju in odmrzovanju posameznih vrst vzorcev smo ugotavljali tako, da smo najprej na podlagi koncentracije Hg v laseh izbrali tri koncentracijska območja, ki odražajo koncentracijo do 1100 ng/g za nizko območje, 1200 – 3000 ng/g za srednje območje ter več kot 3100 ng/g za visoko območje. Tako smo izbrali tudi osebe ter pripadajoče vzorce, to je venozne krvi, urina in mleka. Analiza je potekala tako, da smo vzorce odmrznili, odpipetirali v epruvete, zamrznili in s kislinskim razkrojem razkrojili ter izmerili s CV AAS. Postopek smo ponovili 3-krat. Vzorci so bili odmrznjeni in segreti na sobni temperaturi približno dve uri. Ko smo vzorce spet zamrznili, so do ponovnega odmrzovanja minili trije dnevi. Rezultati meritev posameznih bioloških vzorcev so prikazani na slikah 18 do 29, posamezni rezultati pa so prikazani v prilogi 6. V literaturi je sicer zelo malo podatkov o tem, kako tovrstno ravnanje z vzorci vpliva na celokupni Hg v vzorcih. Horvat in Byrne (1992) sta

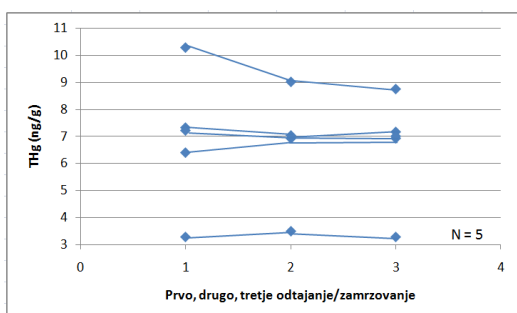
to raziskovala pri vzorcih rib in krvi ter ugotovila, da prihaja do padanja koncentracij MeHg. Prav zato smo pričakovali, da se bo koncentracija s ponovnim zamrzovanjem in odmrzovanjem zmanjševala tudi pri naših vzorcih. Po trikratnem ciklusu smo pri vzorcih krvi (venozne in popkovne) pri nizkem koncentracijskem območju opazili padanje vsebnosti THg. V obeh primerih se je to zgodilo pri treh od petih vzorcev. Pri preostalih vrstah vzorcev in koncentracijskih območjih je bilo padanje/naraščanje vsebnosti THg naključno, kar bi lahko bila posledica nehomogenosti vzorca ali kontaminacije laboratorijskega pribora. Iz dobljenih rezultatov lahko sklepamo, da je takšno shranjevanje vzorcev primerno, kljub njihovem večkratnemu zamrzovanju/odmrzovanju.



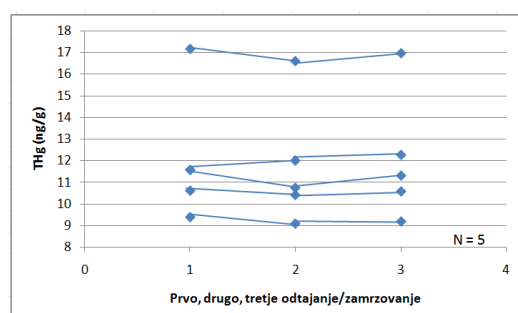
**Slika 18:** Venozna kri – nizko koncentracijsko območje



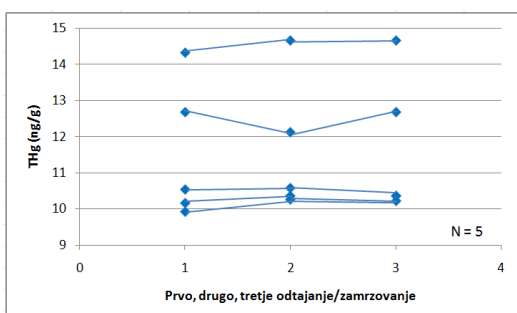
**Slika 21:** Popkovna kri – nizko koncentracijsko območje



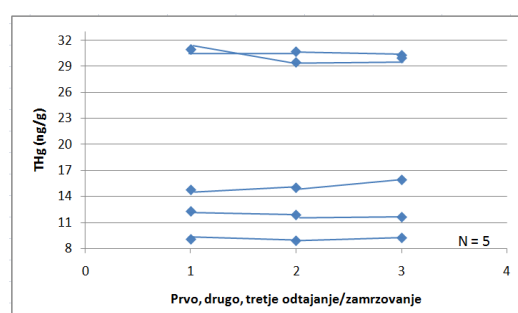
**Slika 19:** Venozna kri – srednje koncentracijsko območje



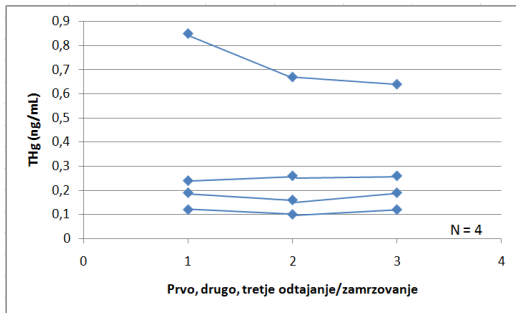
**Slika 22:** Popkovna kri – srednje koncentracijsko območje



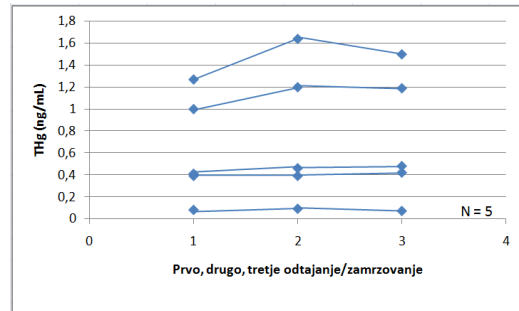
**Slika 20:** Venozna kri – visoko koncentracijsko območje



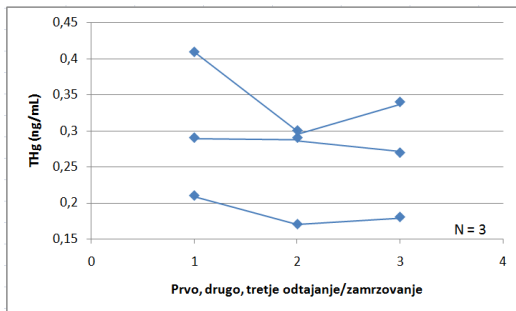
**Slika 23:** Popkovna kri – visoko koncentracijsko območje



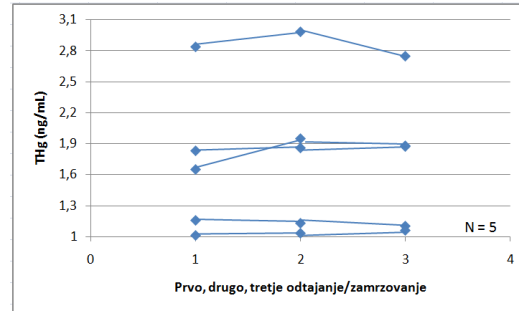
**Slika 24:** Mleko – nizko koncentracijsko območje



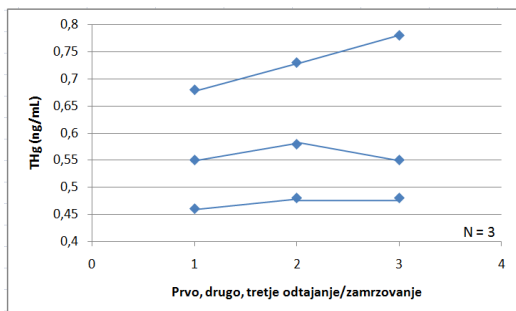
**Slika 27:** Urin – nizko koncentracijsko območje



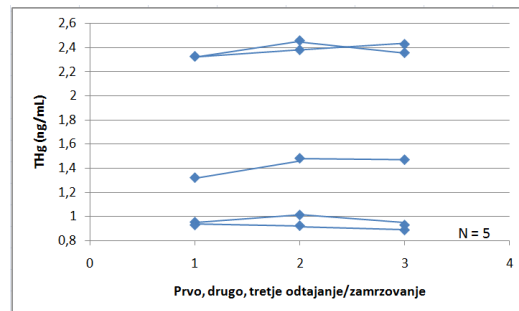
**Slika 25:** Mleko – srednje koncentracijsko območje



**Slika 28:** Urin – srednje koncentracijsko območje



**Slika 26:** Mleko – visoko koncentracijsko območje



**Slika 29:** Urin – visoko koncentracijsko območje

## 4.2 Analiza rezultatov Hg v preiskovani populaciji

### 4.2.1 Podatki o preiskovankah iz vprašalnikov

Iz vprašalnikov smo dobili nekaj značilnih podatkov o preiskovankah. Baza vprašalnikov se nahaja na Institutu Jožef Stefan. Nekateri značilni podatki o preiskovanka pa so naslednji (priloga 2):

Povprečna *starost* preiskovank je 30 let, v razponu od 24 do 35 let, povprečna *telesna višina* je 168 cm in *telesna teža* pred nosečnostjo 63 kg.

Pri preiskovankah prevladujeta *bivalna tipa* v centru mesta, kjer živi 42 % preiskovank, in predmestje, v katerem jih je 38 %, preostale živijo na podeželju (slika 5).

Največ sodelujočih poroča o 0 – 3 (44 %) in 3 – 9 (40 %) *amalgamskih zobnih zalivkah*, bistveno manj pa jih ima več kot 9.

*Prehranjevalne navade*: Sodelujoče redko uživajo sladkovodne ribe, saj prevladujeta odgovora nikoli (46 %) in manj kot enkrat mesečno (35 %), prevladujejo kupljene ribe. Morska hrana/ribe so bile v vprašalniku razdeljene v tri kategorije: sveža, zmrznjena in konzervirana. 37 % sodelujočih uživa svežo morsko hrano/ribe 1-krat do 3-krat mesečno, pri zmrznjeni morski hrani/ribe sta prevladovala odgovora nikoli (35 %) in manj kot enkrat mesečno (37 %), konzervirano morsko hrano/ribe pa 35 % vprašanih uživa 1-krat do 3-krat mesečno. Pri vseh kategorijah prevladuje kupljena morska hrana/ribe.

Delež otrok, ki so izključno dojeni je 80 %. Delež otrok, za katere je dojenje pri hranjenju samo dodatek pa je 12 %. 2 % mater pa je uporabljalo le nadomestke za mleko in pri njih seveda nismo mogli dobiti vzorcev mleka.

### 4.2.2 Rezultati analiz vsebnosti celokupnega živega srebra

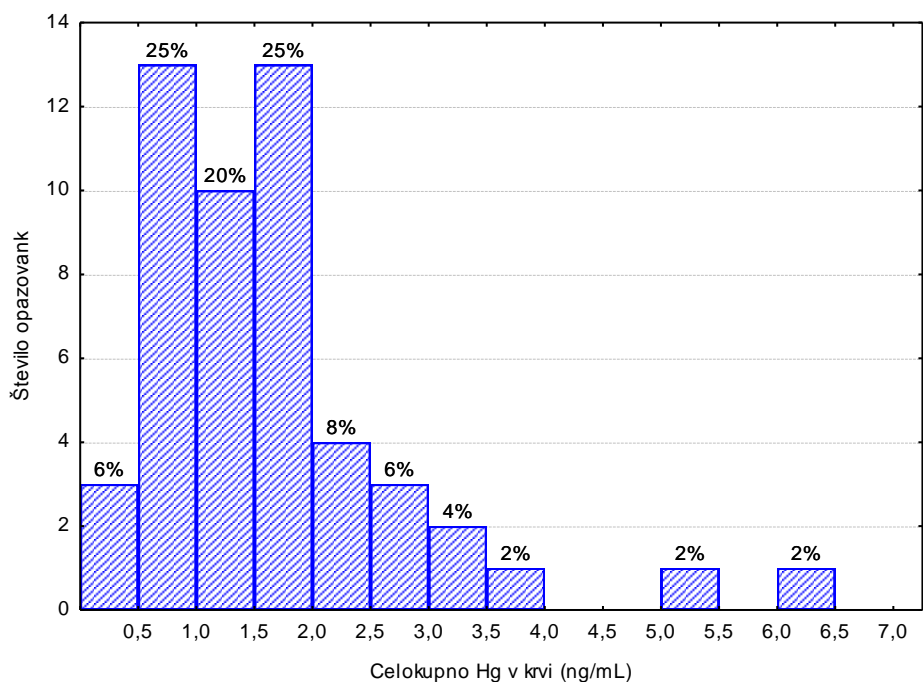
Vsi rezultati meritev so prikazani v prilogi 8.

#### 4.2.2.1 Kri

Pri vrednostih za živo srebro v krvi pri opazovani populaciji doječih mater na območju Ljubljane (N = 51) je bila aritmetična sredina 1,67 ng/mL, mediana 1,52 ng/mL in geometrična sredina 1,34 ng/mL, kar je tudi prikazano v preglednici 8. Slika 30 prikazuje porazdelitev opazovank glede na vsebnost Hg v krvi. Vrednosti so nekoliko višje, kot jih navajajo Horvat in sod. (1991), kjer je bila aritmetična sredina za kontrolno skupino 1,02 ng/mL (N = 17). V primerjavi s skupino, ki je uživala morsko hrano pa so vrednosti za skoraj polovico nižje – aritmetična sredina je bila 3,7 ng/mL (N = 34). Vrednosti so pomembno višje v primerjavi s študijo na Češkem (Batariova in sod., 2006), kjer je bila vrednost za ženske 0,94 ng/mL. Rezultati so višji tudi v primerjavi z ameriškim spremljanjem izpostavljenosti Hg v letih 2001 – 2002, kjer je sodelovalo 1928 žensk od 16 – 49 leta. Geometrična sredina Hg v krvi je bila 0,83 ng/mL, mediana pa 0,7 ng/mL (CDC, 2009). V poročilu nemškega spremljanja izpostavljenosti Hg iz leta

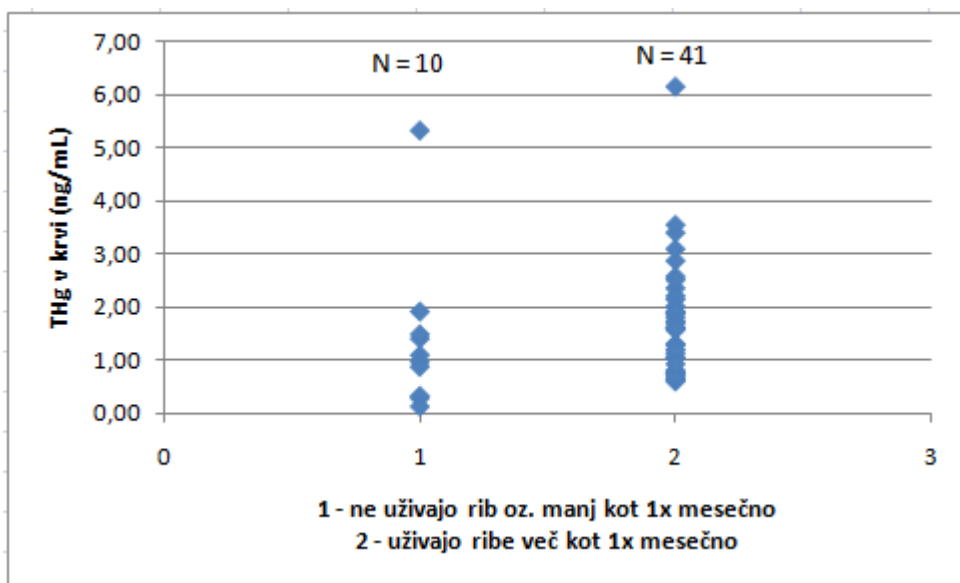


1998 (Becker, 2002) je za Hg v krvi pri ženskah (N = 2301) aritmetična sredina 0,83 ng/mL, geometrična sredina 0,56 ng/mL in mediana 0,60 na/mL, kar je pomembno nižje, kot pa pri opazovani populaciji na območju Ljubljane. Vendar pa le en rezultat (2 %) presega varno vrednost 5,8 ng/mL (slika 30), ki jo je določila EPA. Ta vrednost je 10-krat nižja od tiste, kjer so opazili učinke. Vsebnost živega srebra v krvi je statistično značilno višja pri ženskah, ki so uživale svežo morsko hrano večkrat mesečno, kot pa pri tistih, ki so jo manj kot 1-krat mesečno ( $p < 0,01$ ,  $r = 0,384$ , Spearmanov test). To nakazuje, da so glavni vir živega srebra v krvi ribe. Vendar pa je pomembno poudariti, da imajo ribe na slovenskem tržišču nizke vsebnosti Hg (Miklavčič in sod., 2010).



**Slika 30:** Porazdelitev opazovank glede na vsebnost celokupnega Hg v krvi

Horvat in sod. (1991) so pri slovenski populaciji ugotavljali vsebnost živega srebra v materini krvi pri kontrolni skupini, ki ni uživala morske hrane in skupini, ki jo je uživala. Kontrolna skupina, v kateri so sodelovale samo ženske, ki ne uživajo rib, je imela aritmetično sredino 1,02 ng/mL (N = 17), kar je nižje kot pri opazovani skupini (ni uživala rib oziroma manj kot 1-krat mesečno), pri kateri je bila aritmetična sredina 1,38 ng/mL (N = 10). Aritmetična sredina za skupino, ki je uživala morsko hrano, pa je bila 3,7 ng/mL (N = 34), kar je bistveno višje kot pri opazovani skupini (aritmetična sredina 1,70 ng/mL, N = 41), ki je uživala morsko hrano več kot 1-krat mesečno. Porazdelitev opazovank glede na pogostnost uživanja rib in koncentracijo Hg v krvi prikazuje slika 31.



**Slika 31:** Porazdelitev opazovank glede na pogostnost uživanja rib in koncentracijo Hg v krvi

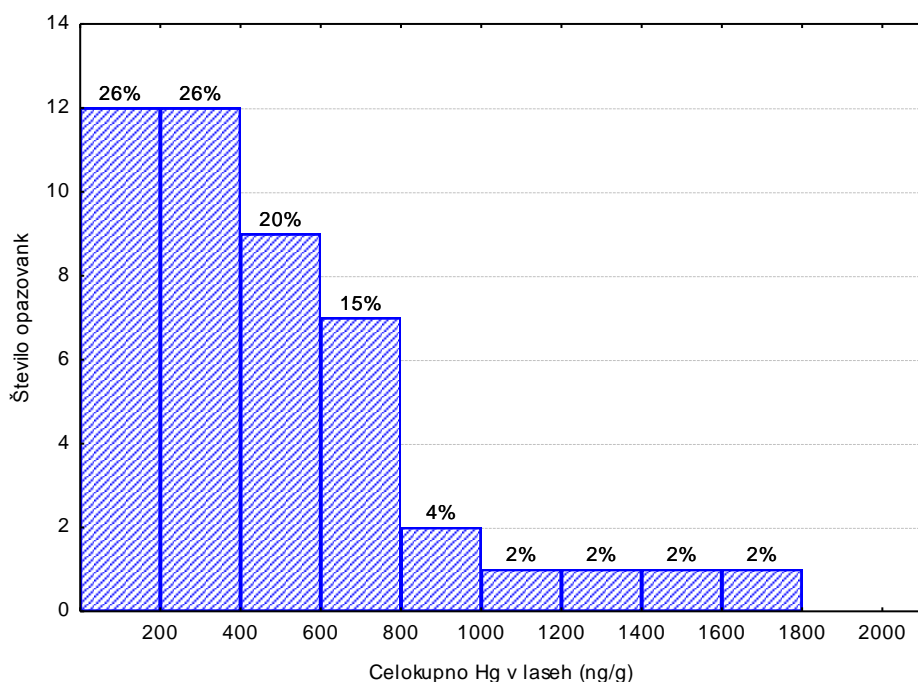
**Preglednica 8: Hg v krvi (ng/mL)**

Kri		N	N<LOD	AM	SD	GM	MED	MIN	MAX	P5	P95	
celotna opazovana populacija		51	0,00	1,67	1,18	1,34	1,52	0,12	6,30	0,33	3,63	
Dodatna razčlenitev	pogostost uživanja morske hrane	< 1-krat mesečno	24	1,31	1,06	1,00	1,01	0,12	5,32	0,28	2,51	
		1 - 3-krat mesečno	19	1,84	1,14	1,52	1,59	0,59	6,15	0,59	6,15	
		vsaj 1-krat tedensko	8	2,16	0,66	2,08	2,10	1,31	3,17	1,31	3,17	
	pogostost uživanja konzervirane morske hrane	< 1-krat mesečno	18	1,69	1,61	1,14	1,34	0,12	6,15	0,12	6,15	
		1 - 3-krat mesečno	18	1,49	0,80	1,30	1,32	0,63	3,54	0,63	3,54	
		vsaj 1-krat tedensko	15	1,74	0,87	1,54	1,60	0,59	3,40	0,59	3,40	
	pogostost uživanja zmrznjene morske hrane	< 1-krat mesečno	37	1,66	1,26	1,28	1,40	0,12	6,15	0,28	5,32	
		1 - 3 mesečno	7	1,19	0,54	1,08	1,05	0,59	1,89	0,59	1,89	
		vsaj 1-krat tedensko	7	1,94	0,95	1,72	1,87	0,63	3,40	0,63	3,40	
	pogostost uživanja sladkovodnih rib	< 1-krat mesečno	41	1,66	1,21	1,30	1,48	0,12	6,15	0,32	3,54	
		1 - 3-krat mesečno	10	1,52	0,89	1,31	1,42	0,63	3,40	0,63	3,40	
		vsaj 1-krat tedensko	0									
	število amalgamskih zalivk	0 - 3	22		1,63	1,26	1,22	1,16	0,12	5,32	0,59	3,54
		3 - 9	21		1,77	1,20	1,49	1,61	0,28	6,15	0,73	3,09
		> 9	8		1,25	0,53	1,12	1,31	0,32	1,91	0,32	1,92

N – število preiskovank; AM – aritmetična sredina; SD – standardni odklon; GM – geometrična sredina; MED – mediana oziroma 50. percentil; MIN – najmanjša vrednost; MAX – največja vrednost; P5 – 5. percentil; P95 – 95. percentil

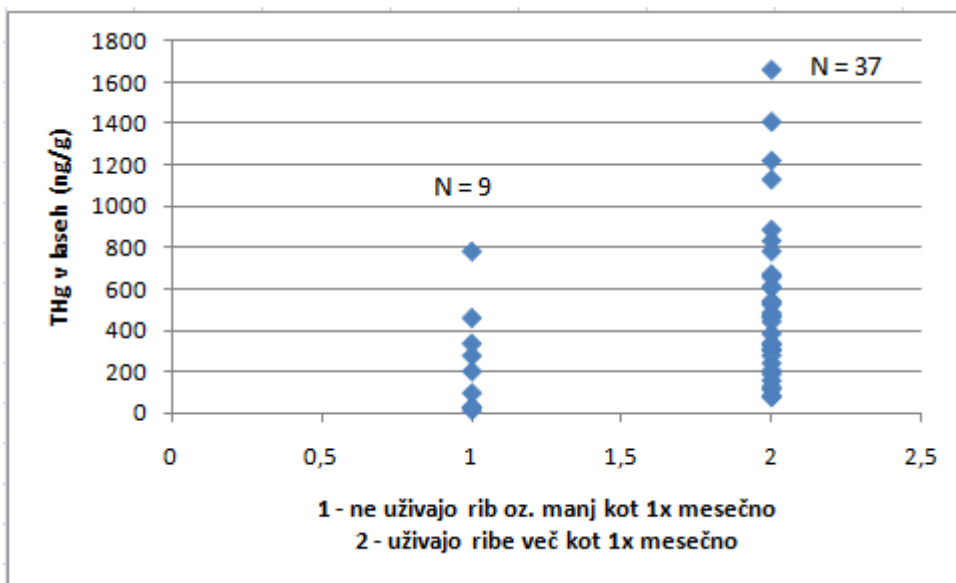
#### 4.2.2.2 Lasje

Aritmetična sredina za Hg v lasih pri preiskovankah (N = 46) je bila 458 ng/g, mediana 359 ng/mL in geometrična sredina 308 ng/g (preglednica 9). Slika 32 prikazuje porazdelitev opazovank glede na vsebnost Hg v lasih. Vrednosti živega srebra v lasih so pokazatelj izpostavljenosti živemu srebru s prehrano, ki vsebuje MeHg. Vsebnost živega srebra v lasih je statistično značilno višja pri ženskah, ki so uživale svežo morskoro hrano večkrat mesečno, kot pa pri tistih, ki so jo manj kot 1-krat mesečno ( $p < 0,01$ ,  $r = 0,5168$ , Spearmanov test). Med vsemi preiskovankami so le štiri osebe (6 %) presegle vrednost 1000 ng/g (slika 32), kar je pomembno, saj je okoljska agencija v Ameriki to vrednost priporočila kot opozorilno vrednost za nosečnice oziroma ženske v rodni dobi. To priporočilo se nanaša na MeHg, zato bi bilo pri teh osebah treba narediti še dodatno analizo zvrsti živega srebra. Ena izmed teh oseb presega tudi opozorilno vrednost za Hg v krvi. Dobljeni rezultati so nižji, kot pa sta jih dobila Barbone in Horvat (2001), ki sta preučevala obalno populacijo in populacijo na območju Gorice v Italiji. Obalna populacija je imela v povprečju 1223 ng/g (338 – 4100 ng/g, N = 33), populacija v notranjosti pa 775 ng/g (257 – 2140 ng/g, N = 28). Vendar pa so dobljeni rezultati primerljivi s Švedsko študijo (Bjornberg in sod., 2003), v kateri je bila mediana 350 ng/g (N = 127).



**Slika 32:** Porazdelitev opazovank glede na vsebnost celokupnega Hg v lasih

Horvat in sod. (1991) so pri slovenski populaciji ugotavljali tudi vsebnost živega srebra v laseh pri kontrolni skupini, ki ni uživala morske hrane (aritmetična sredina 170 ng/g, N = 17), in skupini, ki je uživala morskno hrano (aritmetična sredina 1480 ng/g, N = 34). Pri opazovani populaciji, ki ni uživala rib oziroma jih je manj kot 1-krat mesečno, smo dobili aritmetični sredino 245 ng/g (N = 9), pri osebah, ki pa so uživale ribe več kot 1-krat mesečno, je bila aritmetična sredina 510 ng/mL (N = 37). Rezultati skupine oseb, ki niso uživale rib oz. so jih manj kot 1-krat mesečno, so bili višji kot pa pri študiji Horvat in sod. (1991), vendar pa so bili pri osebah, ki so ribe pogosto uživale bistveno nižji kot pri študiji Horvat in sod. (1991). Slika 33 prikazuje porazdelitev opazovank glede na pogostnost uživanja rib in koncentracijo Hg v laseh.



**Slika 33:** Porazdelitev opazovank glede na pogostnost uživanja rib in koncentracijo Hg v laseh

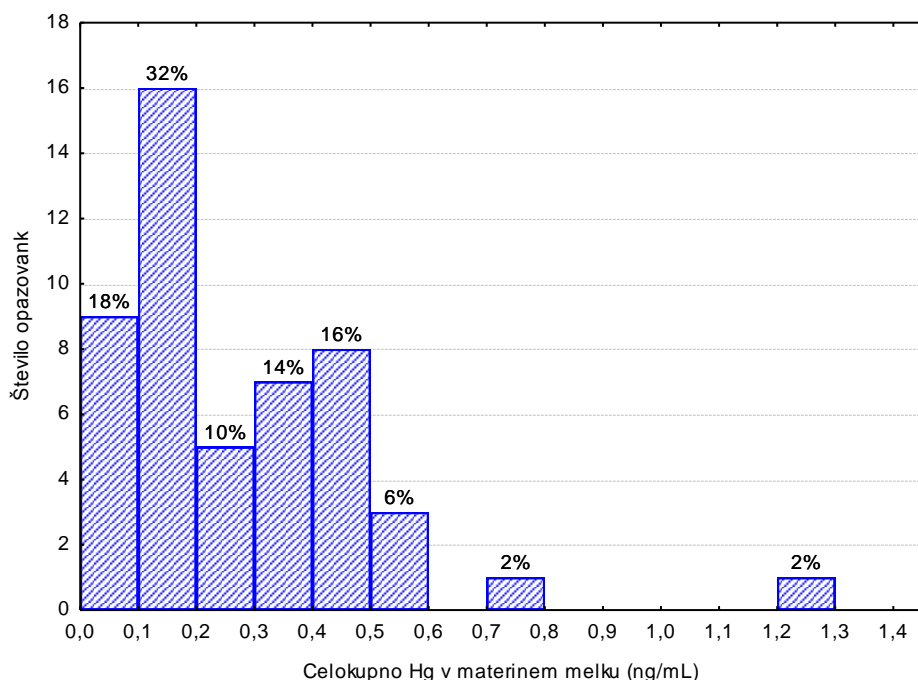
**Preglednica 9: Hg v lasih (ng/g)**

Lasje		N	N<LOD	AM	SD	GM	MED	MIN	MAX	P5	P95
celotna opazovana populacija		46		458	366	308	359	11	1660	27	1220
Dodatna razčlenitev	pogostost uživanja < 1-krat mesečno	23		282	231	182	239	11	831	25	780
	pogostost uživanja 1 - 3-krat mesečno	16		643	623	521	538	75	1660	75	1660
	sveže morske hrane vsaj 1-krat tedensko	7		611	351	523	524	187	1220	187	1220
	pogostost uživanja < 1-krat mesečno	16		410	342	230	328	11	1129	11	1129
	konzervirane morske hrane 1 - 3-krat mesečno	17		395	343	287	301	78	1408	78	1408
	vsaj 1-krat tedensko	13		598	411	484	483	75	1660	75	1660
	pogostost uživanja < 1-krat mesečno	32		445	334	293	359	11	1408	25	1129
	zmrznjene morske hrane 1 - 3-krat mesečno	7		338	194	278	301	75	540	75	540
	vsaj 1-krat tedensko	7		636	579	431	440	81	1660	81	1660
	pogostost uživanja < 1-krat mesečno	37		444	341	296	382	11	1408	25	1120
	sladkovodnih rib 1 - 3-krat mesečno	9		515	475	364	329	75	1660	75	1660
	vsaj 1-krat tedensko										
število amalgamskih zalivk	0 - 3	22		455	460	250	328	11	1660	25	1408
	3 - 9	17		436	274	340	382	27	1129	27	1129
	> 9	7		520	237	468	483	203	831	203	831

N – število preiskovank; AM – aritmetična sredina; SD – standardni odklon; GM – geometrična sredina; MED – mediana oziroma 50. percentil; MIN – najmanjša vrednost; MAX – največja vrednost; P5 – 5. percentil; P95 – 95. percentil

#### 4.2.2.3 Materino mleko

Aritmetična sredina za živo srebro v materinem mleku (N = 50) je bila 0,28 ng/mL, mediana 0,21 ng/mL in geometrična sredina 0,21 ng/mL (preglednica 10). Slika 34 prikazuje porazdelitev opazovank glede na vsebnost živega srebra v materinem mleku. Pri tem ena oseba izstopa (2 %), ki pa je imela v laseh vrednost nad 1000 ng/mL, izstopa tudi po koncentraciji v urinu. Preiskovanke, ki so imele večje število amalgamskih zalivk, imajo statistično značilno večjo vsebnost Hg v mleku ( $p < 0,01$ ,  $r = 0,4007$ , Spearmanov test) medtem ko uživanje morske hrane ni statistično značilno ( $p > 0,1$ ). V literaturi je podatkov za Hg v materinem mleku za splošno populacijo zelo malo. Večinoma so le študije za obremenjena območja Južne Afrike, Azije in Južne Amerike (Costa, 2004; Chien in sod., 2006; Bose-O'reilly in sod., 2008), kjer so koncentracije, zaradi direktne izpostavljenosti živosrebrom in uživanja kontaminiranih rib, zelo visoke. Za splošno prebivalstvo je bila narejena študija v Italiji na obalnem območju in Goriškem (Barbone in Horvat, 2001). Rezultati naše študije so v primerjavi z italijanskimi nižji, kjer je aritmetična sredina za obalno prebivalstvo znašala 0,51 ng/mL (0,16 – 1,05 ng/ mL, N = 16), za notranjost 0,54 ng/mL (0,22 – 1,36 ng/mL, N = 13). Narejenih je bilo še nekaj drugih študij, nekatere med njimi na Ferskih otokih, kjer je bila mediana 2,45 ng/mL (N = 88) (Grandjean in sod., 1995), na Švedskem, kjer je bila aritmetična sredina 0,60 ng/mL (N = 30) (Oskarsson in sod., 1996), v Nemčiji, kjer je bila mediana 0,37 ng/mL (N = 70) (Drash in sod., 1998), in v Avstriji, kjer je bila aritmetična sredina 1,59 ng/mL (N = 116) (Gundacker in sod., 2002). Tudi v primerjavi z vsemi temi študijami so vrednosti na območju Ljubljane nizke, kar je predvsem posledica nizkega uživanja rib pri slovenski populaciji.



**Slika 34:** Porazdelitev opazovank glede na vsebnost Hg v materinem mleku

**Preglednica 10: Hg v mleku (ng/mL)**

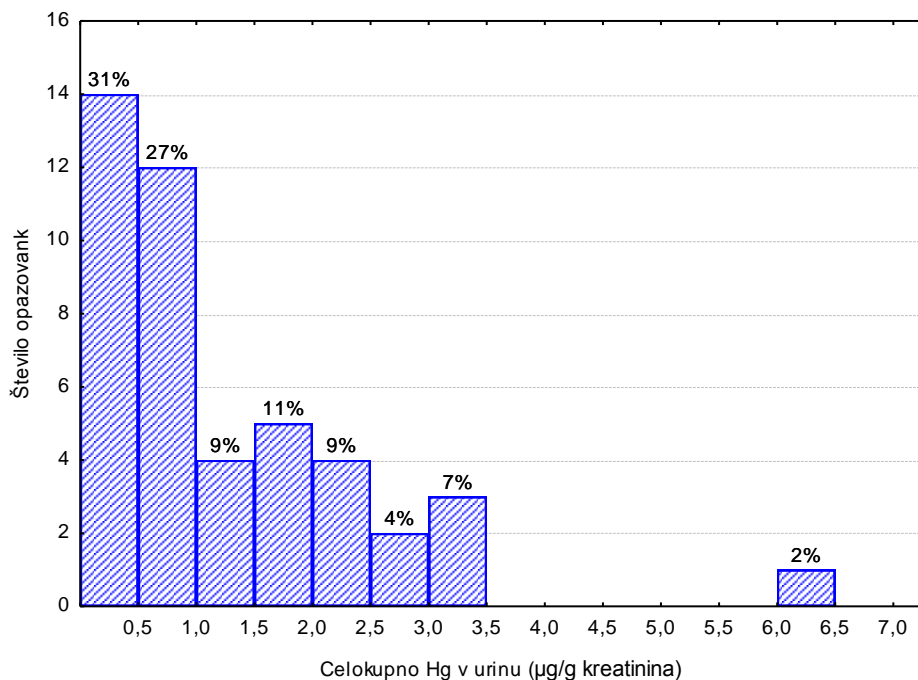
<b>Mleko</b>		<b>N</b>	<b>N&lt;LOD</b>	<b>AM</b>	<b>SD</b>	<b>GM</b>	<b>MED</b>	<b>MIN</b>	<b>MAX</b>	<b>P5</b>	<b>P95</b>
celotna opazovana populacija		50	0	0,28	0,22	0,21	0,21	0,02	1,27	0,05	0,55
<b>Dodatna razčlenitev</b>	pogostost uživanja sveže morske hrane	< 1-krat mesečno	23	0,23	0,17	0,16	0,19	0,02	0,52	0,03	0,50
		1 - 3-krat mesečno	19	0,35	0,28	0,27	0,33	0,07	1,27	0,07	1,27
		vsaj 1-krat tedensko	8	0,28	0,15	0,24	0,24	0,11	0,55	0,11	0,55
	pogostost uživanja konzervirane morske hrane	< 1-krat mesečno	18	0,28	0,20	0,20	0,22	0,03	0,71	0,03	0,71
		1 - 3-krat mesečno	18	0,22	0,14	0,17	0,21	0,02	0,46	0,02	0,46
		vsaj 1-krat tedensko	14	0,36	0,31	0,28	0,27	0,07	1,27	0,07	1,27
	pogostost uživanja zmrznjene morske hrane	< 1-krat mesečno	36	0,26	0,17	0,21	0,21	0,03	0,71	0,05	0,52
		1 - 3-krat mesečno	7	0,24	0,21	0,15	0,11	0,02	0,55	0,02	0,55
		vsaj 1-krat tedensko	7	0,41	0,41	0,27	0,34	0,06	1,27	0,06	1,27
	pogostost uživanja sladkovodnih rib	< 1-krat mesečno	40	0,27	0,16	0,21	0,24	0,02	0,55	0,04	0,52
		1 - 3-krat mesečno	10	0,33	0,38	0,20	0,17	0,06	1,27	0,06	1,27
		vsaj 1-krat tedensko	0								
število amalgamskih zalivk	0 - 3	22		0,20	0,26	0,14	0,17	0,02	1,27	0,03	0,43
	3 - 9	21		0,36	0,17	0,31	0,37	0,10	0,71	0,11	0,55
	> 9	7		0,27	0,18	0,21	0,19	0,05	0,50	0,05	0,50

*N – število preiskovank; AM – aritmetična sredina; SD – standardni odklon; GM – geometrična sredina; MED – mediana oziroma 50. percentil; MIN – najmanjša vrednost; MAX – največja vrednost; P5 – 5. percentil; P95 – 95. percentil*



#### 4.2.2.4 Urin

Živo srebro v urinu je bilo normalizirano na vrednost kreatinina v urinu. Aritmetična sredina v urinu (N = 48) je bila 1,23  $\mu\text{g/g}$  kreatinina, mediana 0,73  $\mu\text{g/g}$  kreatinina in geometrična sredina 0,75  $\mu\text{g/g}$  kreatinina (preglednica 11). Slika 35 prikazuje porazdelitev opazovank glede na vsebnost Hg v urinu, kjer ena oseba izstopa (2 %). Ta oseba je imela visoke vrednosti tudi v laseh in materinem mleku. Ljudje, ki niso poklicno izpostavljeni živemu srebru, le redko presegajo vrednost 5  $\mu\text{g/g}$  kreatinina (ATSDR, 2006). V primerjavi z italijansko študijo (Apostoli in sod., 2001), kjer je bila mediana 0,83  $\mu\text{g/g}$  kreatinina (N = 189), ameriškim spremljanjem izpostavljenosti Hg (CDC, 2009), kjer je bila geometrična sredina 0,62  $\mu\text{g/g}$  kreatinina (N = 1960) in nemško študijo (Becker, 2002), kjer je bila geometrična sredina 0,41  $\mu\text{g/g}$  kreatinina (N = 2346), so rezultati podobni. Preiskovanke, ki so imele večje število amalgamskih zalivk, so imele statistično značilno višjo vsebnost Hg v urinu ( $p < 0,01$ ,  $r = 0,4144$ , Spearmanov test).



**Slika 35:** Porazdelitev opazovank glede na vsebnost Hg v urinu

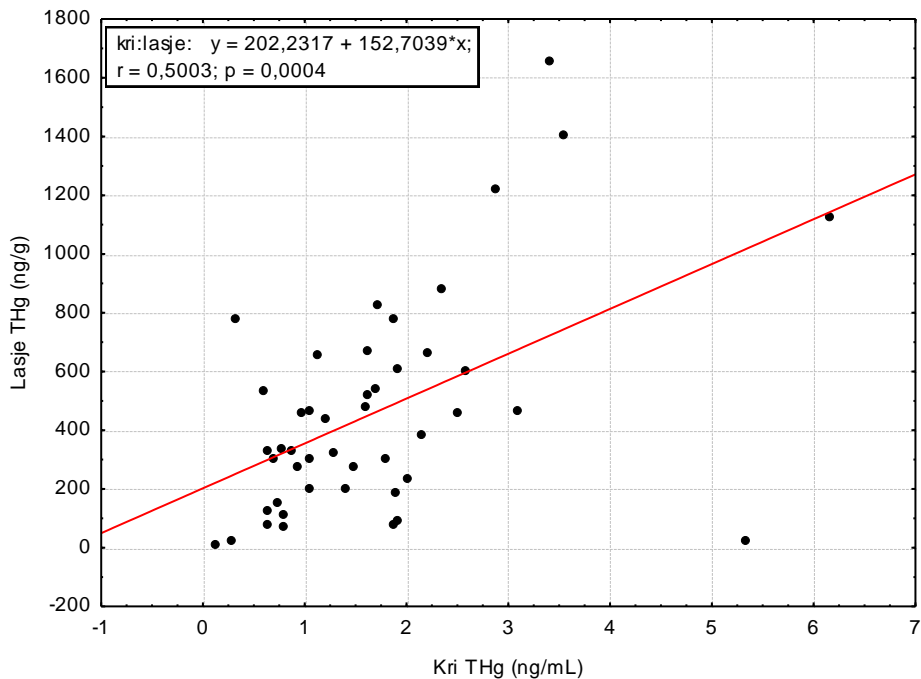
**Preglednica 11: Hg v urinu ( $\mu\text{g/g}$  kreatinina)**

<b>Urin</b>	<b>N</b>	<b>N&lt;LOD</b>	<b>AM</b>	<b>SD</b>	<b>GM</b>	<b>MED</b>	<b>MIN</b>	<b>MAX</b>	<b>P5</b>	<b>P95</b>
celotna opazovana populacija	48	3	1,23	1,23	0,75	0,73	0,08	6,23	0,10	3,38
0 - 3	19	2	0,94	1,50	0,43	0,36	0,08	6,23	0,08	6,23
število amalgamskih 3 - 9	21	1	1,31	0,92	1,01	0,96	0,13	3,44	0,22	3,08
zalivk > 9	8	0	1,66	1,23	1,18	1,45	0,26	3,38	0,26	3,38

*N – število preiskovank; AM – aritmetična sredina; SD – standardni odklon; GM – geometrična sredina; MED – mediana oziroma 50. percentil; MIN – najmanjša vrednost; MAX – največja vrednost; P5 – 5. percentil; P95 – 95. percentil*

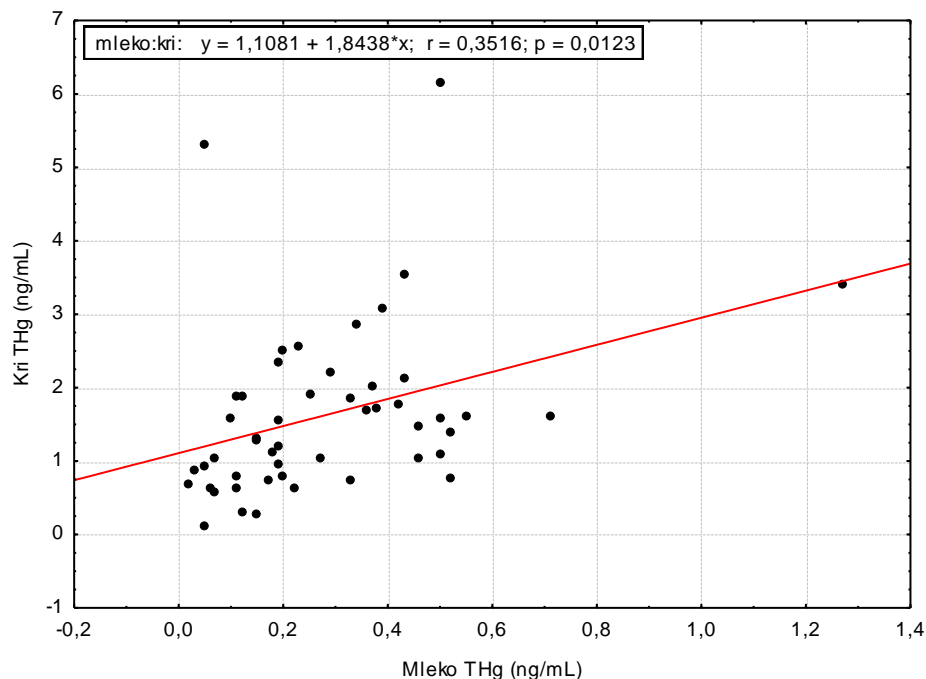
### 4.3 Povezanost Hg med biološkimi kazalci in viri izpostavitve

Slika 36 prikazuje vsebnost celokupnega Hg v krvi v odvisnosti od vsebnosti celokupnega Hg v laseh. Razmerje med lasmi in krvjo pri preiskovankah je 202:1, kar se sklada s podatki iz literature. V literaturi je ocenjeno razmerje med vsebnostjo živega srebra v laseh in krvjo na 250:1 (WHO, 1991), ki pa se lahko razlikuje od 140 do 370, zaradi različnega zadrževalnega časa Hg v krvi in različne hitrosti vgradnje v lase (McDowell in sod., 2004).



**Slika 36:** Vsebnost celokupnega Hg v krvi v odvisnosti od vsebnosti celokupnega Hg v laseh

Slika 37 prikazuje vsebnost celokupnega Hg v krvi v odvisnosti od vsebnosti celokupnega Hg v mleku. Korelacijski koeficient je bistveno nižji kot pri krvi in laseh. Razmerje med krvjo in mlekom pri preiskovankah je 1,8:1. Iz dobljenih podatkov smo ugotovili, da mleko dosega le 17 % celokupnega živega srebra v krvi. To je za 10 % nižje kot pa navajajo Oskarsson in sod. (1996), ki so ugotovili da je v mleku v primerjavi s krvjo 27 % celokupnega živega srebra, vendar pa so bile tudi vrednosti v mleku (0,6 ng/g) in krvi (2,3 ng/g) švedske študije višje. Primerjava rezultatov s študijo na Švedskem je le informativna, saj je uživanje rib na Švedskem večje kot pri slovenski populaciji.

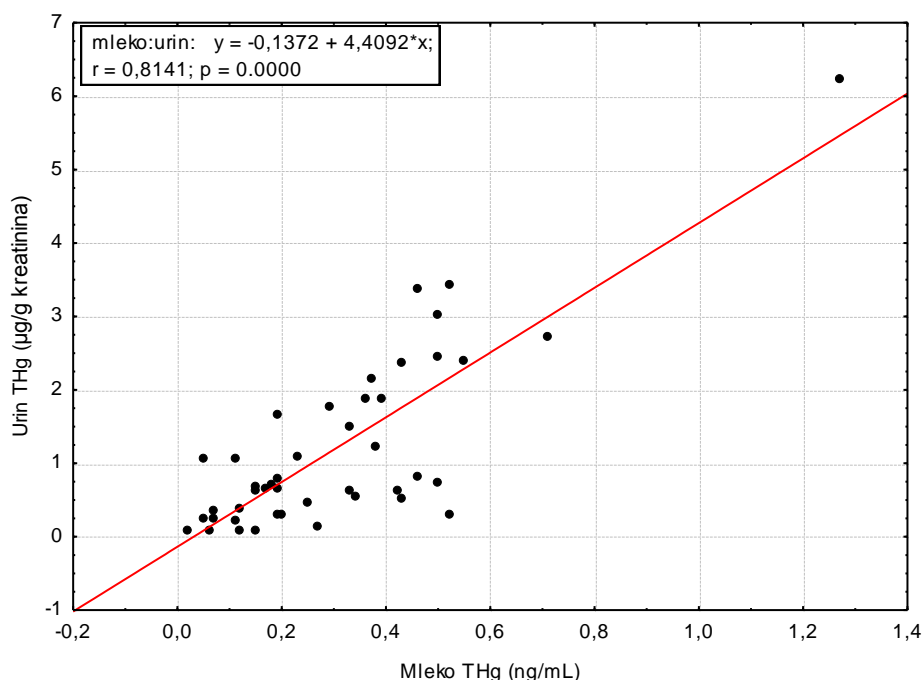


**Slika 37:** Vsebnost celokupnega Hg v krvi v odvisnosti od vsebnosti celokupnega Hg v mleku

Slika 38 prikazuje razmerje vsebnosti celokupnega Hg v mleku in urinu. Koncentracije Hg v urinu so v povprečju višje za faktor 4,4, kar nakazuje večje izločanje z urinom kot z mlekom. Da se živo srebro izloča z urinom in materinim mlekom, je razvidno tudi iz modela porazdelitve anorganskega (slika 2) in organskega (slika 3) živega srebra.

V študiji PHIME, ki se izvaja pri slovenski, hrvaški, grški in italijanski populaciji, delež Hg v obliki MeHg za Italijo variira med 3 % in 100 % (povprečje 60 %, N = 200) (IJS, 2010). V italijanski študiji Barbone in Horvat (2001) je bila vsebnost MeHg v mleku mater z obalnega območja 26 %, iz notranjosti pa 31 %. Oskarsson in sod. (1996) pa so dobili pri populaciji žensk s severa Švedske 50 % MeHg.

V pričujoči študiji o vsebnosti MeHg nimamo podatkov, zato je primerjava celokupnega Hg v mleku in urinu bolj informativna. Primerjati bi bilo treba le delež anorganskega Hg v mleku z urinom. Relativno visoka korelacija med urinom in mlekom ter odvisnost koncentracij od števila amalgamskih zalivk, kažeta na to, da sta urin in mleko dobra pokazatelja o izpostavljenosti ljudi anorganskemu Hg.



**Slika 38:** Razmerje vsebnosti celokupnega Hg v materinem mleku in urinu

## 5 ZAKLJUČKI

Z optimizacijo kislinskega razkroja smo ugotovili, da je najprimernejša metoda za razkroj bioloških vzorcev krvi, urina in materinega mleka v steklenih epruvetah na termo bloku, kjer se odprtine tesno prilegajo epruvetam, kar omogoča hiter prenos toplote in učinkovit razkroj vzorca v relativno kratkem času. S postopkom validacije smo ugotovili, da sta izbrani kislinski razkroj in analizna metoda (CV AAS) primerna in dovolj ponovljiva za obravnavane biološke vzorce. Meja zaznavnosti je znašala 0,075 ng/30mL, meja kvantifikacije pa 0,25 ng/30mL razkrojene raztopine. Izračunane meje zaznavnosti za posamezne vrste vzorcev so: za kri 0,15 ng/30mL, mleko 0,038 ng/30mL in urin 0,075 ng/30mL razkrojene raztopine.

Glavni vir merilne negotovosti pomeni obnovljivost meritev referenčnih materialov, ki je posledica negotovosti referenčne vrednosti in stabilnosti po rekonstruiranju liofiliziranih referenčnih materialov. Razširjena merilna negotovost za kri je znašala od 14 do 18 %, za mleko od 10 do 44 % in za urin 28 %. Da bi merilno negotovost pri nadaljnjem delu zmanjšali, je treba zagotoviti referenčne materiale, ki bodo podobni realnim vzorcem po koncentraciji in sestavi vzorca.

Po trikratnem zamrzovanju/odmrzovanju vzorcev ni prišlo do pomembnih izgub živega srebra v vzorcih (odstopanja so bila naključna), razen pri vzorcih krvi v nizkem koncentracijskem območju. Zaradi preventivnih razlogov priporočamo, da se vzorec odmrzne le enkrat.

Izmerjene vrednosti celokupnega živega srebra v laseh, krvi, materinem mleku in urinu pri opazovani populaciji so v primerjavi s preostalimi študijami nizke oziroma podobne. Po podatkih iz literature izmerjene koncentracije ne predstavljajo povečanega tveganja za zdravje ljudi.

Preiskovana populacija je organskemu živemu srebru izpostavljena z uživanjem rib, anorganskemu pa zaradi sproščanja hlapov iz zobnih amalgamskih zalivkih. Izvedena raziskava je potrdila, da je živo srebro v laseh in krvi dober pokazatelj izpostavljenosti preko prehrane (glavni vir so ribe). Urin in materino mleko pa nakazujeta na izpostavljenost anorganskemu živemu srebru, kot posledica števila amalgamskih zobnih zalivk.

Izmerjene vrednosti živega srebra v izbranih bioloških vzorcih predstavljajo dobro osnovo za načrtovanje dolgoročnega programa spremljanja izpostavljenosti. Kljub temu, da trenutna obremenitev ne predstavlja tveganja, je smiselno spremljati spremembe v času in oceniti učinkovitost ukrepov za zmanjšanje izpostavljenosti. Učinki živega srebra na človeka so namreč pri dolgotrajni izpostavljenosti nizkim koncentracijam živega srebra slabo poznani, zato je priporočljivo, da se meritve izvajajo v smiselnih časovnih intervalih. Dolgoročno zanesljivost in primerljivost rezultatov pa je možno doseči le ob zagotavljanju sledljivosti na nivoju celotne študije, ki vključujejo dobro definirane pogoje za nabor preiskovancev, vzorčenje in shranjevanje bioloških vzorcev, in predvsem striktno izvajanje analitike ob upoštevanju najnovejših principov meroslovnega sistema. Tako lahko pridobimo rezultate, ki zagotavljajo primerljivost časovnih in prostorskih trendov ter primerljivost s študijami v Evropi in v svetu.

## 6 VIRI

Aberg B., Ekman L., Falk R., Greitz U., Persson G., Snihs J.O. Metabolism of methylmercury (203-Hg) compounds in man. *Arch Environ Health* 19 (1969) 478 – 484

Akagi H. Analytical methods for evaluating human exposure to mercury due to gold mining. *Proceedings of the International workshop on health and environmental effects of mercury due mining operations, Manila* (1997) 131 – 141

Amin-Zaki M. D., Elhassani S., Majeed M. A., Clarkson T. W., Doherty R. A., Greenwood M. Intra-uterine methylmercury poisoning in Iraq. *Pediatrics* 54 (1974) 587 – 595

Apostoli P., Cortesi I., Mangili A., Elia G., Drago I., Gagliardi T., Soleo L., Valente T., Sciarra G.F., Aprea C., Ronchi A., Minoa C. Assessment of reference values for mercury in urine: the results of an Italian polycentric study. *The Science of Total Environment* 289 (2002) 13 – 24

ATSDR 1999. Toxicological profile for mercury. 1999. U.S. Department of health and human services, Public health service, Agency for toxic substances and disease registry (ATSDR). Atlanta, Georgia, USA 617 str.

ATSDR 2006. Health consultation. U.S. Department of health and human services, Public health service, Agency for toxic substances and disease registry (ATSDR). Atlanta, Georgia, USA 9 str.

Barkay T. 1992. The Mercury cycle. V: *Encyclopedia of Microbiology: M - R*, Lederberg J. (ed.). Vol. 3, Academic Press Inc. San Diego 65 – 74

Barakay T., Wagner-Döbler I. Microbial transformations of mercury: potentials, challenges and achievements in controlling mercury toxicity in the environment. *Advances in applied microbiology*, 57 (2005) 1 – 54

Barbone F., Horvat M. 2001. Še neobjavljeni podatki. Institut Jožef Stefan.

Barregård L., Sällsten G., Schütz A., Attewell R., Skerfving S., Järholm B. Kinetics of mercury in blood and urine after brief exposure. *Arch Environ Health* 47 (1992) 176 – 184

Barregård L. Biological monitoring of exposure to mercury vapor. *Scand, J. Work. Environ. Health* 19 (1993) 45 – 49

Barregård L., Sällsten G., Conradi N. Tissue levels of mercury determined in a deceased worker after occupational exposure. *International Archives of Occupational and Environmental Health* 72, 3 (1999) 169 – 173

Barregård L., Horvat M., Mazzolai B., Sällsten G., Gibicar D., Fajon V., Dibona S., Munthe J., Wängberg I., Haeger Eugensson M. Urinary mercury in people living near point sources of mercury. *Science of Total Environment* 368, 1 (2006) 326 – 334

Barregård L., Fabricius-Lagging E., Lundh T., Mölne J., Wallin M., Olausson M., Modigh C., Sällsten G. Cadmium, mercury, and lead in kidney cortex of living kidney

- donors: Impact of different exposure sources. *Environmental Research* 110, 1 (2010) 47 – 54
- Batárióvá A., Spevácková V., Benes B., Cejchanová M., Smíd J., Cerná M. Blood and urine levels of Pb, Cd and Hg in the general population of the Czech Republic and proposed reference values. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 209, 4 (2006) 359 – 366
- Bauer S. Societal and ethical issues in human biomonitoring – a view from science studies. *Environmental Health* 7, 1 (2008)
- Becker K., Kaus S., Krause C., Lepom P., Schulz C., Seiwert M., Seifert B. 2002. Umwelt-survey 1998, band III: Human – biomonitoring: Stoffgehalte in blut und urin der bevölkerung in Deutschland. Umweltbundesamt, Berlin 347 str.
- Becker K., Zufika M. M., Conrad A., Lüdecke A., Schulz C., Seiwert M., Gehring M. K. 2008 German environmental survey for children 2003/06. Human biomonitoring. Levels of selected substances in blood and urine of children in Germany. Federal Environment Agency, Berlin
- Berlin M., Fazackerley J., Nordberg G. The uptake of mercury in the brains of mammals exposed to mercury vapor and to mercuric salts. *Arch Environ Health* 18 (1969) 719 – 729
- Bird G. M. 2008. Biomonitoring. V: Toxicology and risk assessment: a comprehensive introduction. Greim H. and Snyder R. (eds.). West Sussex, England, WILEY: 418 – 426
- Bjornberg K. A. Methyl mercury and inorganic mercury in Swedish pregnant women and in cord blood: influence of fish consumption. *Environmental Medicine* 111, 4 (2003) 637 – 641
- Bornmann G., Henke G., Alfes H., Möllmann H. Intestinal absorption of metallic mercury (in German). *Arch Toxicol* 26 (1970) 203 – 209
- Bose-O'Reilly S., Lettmeier B., Roider G., Siebert U., Drasch G. Mercury in breast milk – A health hazard for infants in gold mining areas? *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 211, 5-6 (2008) 615-623
- CDC 2009. Fourth national report on human exposure to environmental chemicals. Department of health and human services centers for disease control and prevention, 519 str.
- Chien L. C., Han B. C., Hsu C. S., Jiang C. B., You H. J., Shieh M. J., Yeh C. Y. Analysis of health risk of exposure to breast milk mercury in infants in Taiwan. *Cemosphere* 64, 1 (2006) 79 – 85
- Clarkson W. T. The three modern faces of mercury. *Environmental Health Perspectives Supplements* 110, S1 (2002)
- Clarkson T. W. in Magos L. The toxicology of mercury and its chemical compounds. *Crit Rev Toxicol.* 36, 8 (2006) 609 – 62
- Cohen J. T. A summary of the major studies of prenatal mercury exposure and cognitive function, Harvard Center for Risk Analysis, Boston, 2004



da Costa S. L., Malm O., Dórea J. G. Breast-milk mercury concentrations and amalgam surface in mother from Brasília, Brazil. *Biological Trace Element Research* 106, 2 (2004) 145 – 151

Davidson P. W., Myers G. J., Cox C., Axtell C., Shamlaye C., Solane-Reeves J., Cernichiari E., Needham L., Choi A., Wang Y., Berlin M., Clarkson T. W. Effects of prenatal and postnatal methylmercury exposure from fish consumption on neurodevelopment: outcomes at 66 months of age in the Seychelles Child Development Study. *JAMA*, 208 (1998) 701 707

Davidson P. W., Kost J., Myers G. J., Cox C., Clarkson T. W., Shamlaye C. Methylmercury and neurodevelopment: reanalysis of the Seychelles Child Development Study outcomes at 66 months of age. *JAMA* 285 (2001) 1291 – 1293

Dolbec J., Mergler D., Larribe F., Roulet M., Lebel J., Lucotte M. Sequential analysis of hair mercury levels in relation to fish diet of an Amazonian population, Brazil. *The Science of the Total Environment* 271, 1-3 (2001) 87 – 97

Drash G., Aigner S., Roeder G., Staiger F., Lipowsky G. Mercury in human colostrums and early breast milk. Its dependence on dental amalgam and other factors. *J Trace Elem Med Biol* 12, 1 (1998) 23 – 27

EFSA 2004. Assessment of the dietary exposure to arsenic, cadmium, lead and mercury of the population of the EU Member States. Directorate-General Health and Consumer Protection: 125 str.

EPA Method 7473. Mercury in solids and solutions by thermal decomposition amalgamation and atomic absorption spectrophotometry. (1998)

Esteban M., Castaño A. Non-invasive matrices in human biomonitoring: A review. *Environment international* 35, 2 (2009) 438 – 449

European Environment and Health Strategy, 2003. COM/2003/0338 final  
[http://eurlex.europa.eu/smartapi/cgi/sga\\_doc?smartapi!celexplus!prod!DocNumber&lg=en&type\\_doc=COMfinal&an\\_doc=2003&nu\\_doc=338](http://eurlex.europa.eu/smartapi/cgi/sga_doc?smartapi!celexplus!prod!DocNumber&lg=en&type_doc=COMfinal&an_doc=2003&nu_doc=338) , (10. julij 2010)

EURACHEM Slovenija 1997. Validacija in merilna negotovost pri kemijski analizi. Seminar. Slovensko kemijsko društvo – EURACHEM Slovenija v sodelovanju s Kemijskim inštitutom. Ljubljana

EURACHEM 1998. The fitness for purpose of analytical methods. United Kingdom: 61 str.

EURACHEM/CITAC 2000. Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement. Second Edition. Ellison S. L. R., Rosslein M., Williams A. (eds.). 120 str.

EURACHEM/CITAC 2002. Guide to quality in analytical chemistry, an aid to accreditation. 57 str.

Gibičar D. 2008. Ocena bioloških kazalcev ledvičnih poškodb in oksidativnega stresa pri poklicni in splošni izpostavljenosti živemu srebru. Doktorska disertacija, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo 153 str.

Gibičar D., Horvat M., Logar M., Fajon V., Falnoga .I, Ferrara R., Lanzillotta E., Ceccarini C., Mazzolai B., Denby B., Pacyna J. Human exposure to mercury in the vicinity of chlor-alkali plant. *Environmental Research* 109, 4 (2009) 355 – 367

Grandjean P., Weihe P., Needham L., Burse V.W., Jr Patterson D.G., Sampson E. J., Jørgensen P. J., Vahter M. Relation of seafood diet to mercury, selenium, arsenic and polychlorinated biphenyl and other organochlorine concentrations in human milk. *Environmental research* 71 (1995) 29 – 38

Grandjean P., Weihe P., White R. F., Debes F., Araki S., Yokoyama K., Murata K., Sørensen N., Dahl R., Jørgensen P. J. Cognitive Deficit in 7-Year-Old Children with Prenatal Exposure to Methylmercury. *Neurotoxicology and Teratology* 19, 6 (1997) 417 – 428

Grandjean P., White R. F., Sullivan K., Debes F., Murata K., Otto D. A., Weihe P. Impact of contrast sensitivity performance on visually presented neurobehavioral tests in mercury exposed children. *Neurotoxicol Teratol* 23, 2 (2001a) 141 – 146

Grandjean P., Weihe P., Burse V.W., Needham L. L., Storr-Hansen E., Heinzow B., Debes F., Murata K., Simonsen H., Ellefsen P., Budtz-Jørgensen E., Keiding N., White R. F. Neurobehavioral deficits associated with PCB in 7-year-old children prenatally exposed to seafood neurotoxicants. *Neurotoxicol Teratol* 23, 4 (2001b) 305 – 317

Grandjean P., Jørgensen P. J., Weihe P. 2002. Validity of mercury exposure biomarkers. V: Biomarkers of environmental associated disease. Wilson S. H., Suk W.A. (eds.). Boca Ration, CRC Press/Lewis: 235 – 247

Grandjean .P, White R. F., Weihe P., Jørgensen P. J. Neurotoxic Risk Caused by Stable and Variable Exposure to Methylmercury From Seafood. *Ambulatory Pediatrics* 3, 1 (2003) 18 – 23

Gundacker C., Pietschnig B., Wittmann K. J., Lischaka A., Salzer H., Hohernauer L., Schuster E. Lead and mercury in breast milk. *Pediatrics* 110, 5 (2002) 873 – 878

Halbach S., Clarkson T. W. Enzymatic oxidation of mercury vapor by erythrocytes. *Biochim Biophys Acta* 523, 2 (1978) 522 - 531

Halbach S., Vogt S., Köhler W., Felgenhauer N., Welzl G., Kremers L., Zilker T., Melchart D. Blood and urine mercury levels in adult amalgam patients of a randomized controlled trial: Interaction of Hg species in erythrocytes. *Environmental Research* 107, 1 (2008) 69 – 78

Horvat M., Zvonartić T., Stegnar P. Optimization of a wet digestion method for the determination of mercury in blood by cold vapour atomic absorption spectrometry (CVAAS). *Vestn. Slov. kem. druš.*, (Documenta chemica Yugoslavica) 33 (1986) 475 – 487

Horvat M. 1989. Development and study of analytical methods for determination of low level mercury concentrations and its application in analysis of biological and other environmental samples. Ph.D. Thesis, University of Ljubljana, Slovenia.

Horvat M., Prosenc A., Smrke J., Konda D., Byrne A. R., Stegnar .P, Bergic I. 1991. Trace element levels in the hair, blood, cord blood and placenta of pregnant women from central Slovenia. V: Trace elements in health and disease. Aitio A., Aro A. Järvisalo J. and Vainio H. (eds.). Cambridge, United Kingdom, The royal society of chemistry: 83 – 91

Horvat M., Byrne A. R. Preliminary study of the effects of some physical parameters on the stability of methylmercury in biological samples. *Analyst (Lond.)* 117 (1992) 665 – 668

Horvat M. 2005. Determination of mercury and its compounds in water, sediment, soil and biological samples. V: Dynamics of mercury pollution on regional and global scales. Pirrone N. and Mahaffey R. K. (eds.). New York, USA, Springer: 153 – 190

Horvat M., Gibičar D. 2005. Speciation of mercury: environment, food, clinical, and occupational health. V: Handbook of elemental speciation II: species in the environment, food, medicine and occupational health. Cornelis R., Caruso J. Crews H., Heumann K. (eds.). West Sussex, England, John Wiley & Sons Ltd: 281 – 304

Horvat M., Kocman D., Heath E., Kosjek T., Kotnik J. 2009 Izdelava prve faze raziskave: ocena tveganja živega srebra (Hg) in naftnih derivatov v Tržaškem zalivu za zdravje ljudi. IJS DP – 10338, Odsek za znanosti o okolju, Ljubljana

Horvat M., Mazej D., Snoj Tratnik J., Osredkar J., Krsnik M., Lapanje S., Harlander D., Miljavec B., Kobal A.B. 2010. Monitoring kemikalij v organizmih 2007 – 2009. Zaključno poročilo. Delovno poročilo IJS DP - 10523. Institut Jožef Stefan 132 str.

Huang L. S., Cox .C, Myers G., Davidson P. W., Cernichiari E., Shamlaye C. F., Sloane-Reeves .J, Clarkson T. W. Exploring nonlinear association between prenatal methylmercury exposure from fish consumption and child development: evaluation of the Seychelles Child Development Study nine-year data using semiparametric additive models. *Environmental Research* 97 (2005) 100 – 108

Hursh J. B., Cherian M. G., Clarkson T.W., Vostal J. J., Mallie R. V. Clearance of mercury (Hg-197, Hg-203) vapor inhaled by human subjects. *Arch Environ Health* 31 (1976) 302 – 309

IJS 2010. Projekt PHIME. Še ne objavljeni podatki. (avgust 2010)

Iz Leka: Slovenski medicinski e-slovar. ASP32 – pregledovalnik podatkovnih zbirk, v. 1,40. 1993 – 2002 Amebis d.o.o.

Jarosińska D., Horvat M., Sällsten G., Mazzolai B., Dabkowska B., Prokopowicz A., Biesiada M., Barregård L. Urinary mercury and biomarkers of early renal dysfunction in environmentally and occupationally exposed adults: A three-country study. *Environmental research* 108, 2 (2008) 224-232

JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives). 2003. Sixty-first meeting 10-19 June 2003, Summary and Conclusions: 22 str.  
<ftp://ftp.fao.org/es/esn/jecfa/jecfa61sc.pdf> (12. marec 2010)

Khayat A., Dencker L. Fetal uptake and distribution of metallic mercury vapor in the mouse: influence of ethanol and aminotriazole. *Int J Biol Res Pregnancy* 3 (1982) 38 – 46

Kotnik J., Horvat M. 2000. Izhodišča za izdelavo analize onesnaženosti z živim srebrom in predlog ukrepov na podlagi direktiv Evropske Unije. IJS delovno poročilo ; 8290

Lanphear B. P., Bearer C. F. Biomarkers in pediatric research and practice. *Archives of Disease in Childhood* 90 (2005) 594 – 600

McDowell M. A., Dillon C. F., Osterloh J., Bolger P. M., Pellizzari E., Fernando R., Montes de Oca R., Schober S. E., Sinks T., Jones R.L., Mahaffey K. R. Hair mercury levels in U.S. children and women of childbearing age: reference range data from NHANES 1999 – 2000. *Environmental Health Perspectives* 112, 11 (2004) 1165-1171

Miklavčič A., Stibilj V., Heath .E, Polak T., Snoj Tratnik J., Klavž J., Mazej D., Horvat M. Mercury, selenium, PCBs and fatty acids in fresh and canned fish available on the Slovenian market. *Food Chemistry – Article in press* (2010)

Myers G., Davidson P., Palumbo C., Shamlaye C., Cox C., Chernichiari E., Clarkson T. Secondary analysis from the Seychelles Child Development Study: the behavior checklist. *Environ Res Section A* 84 (2000) 12 – 19

Myers G. J., Davidson P.W., Cox C., Shamlaye C. F., Palumbo D., Cernichiari E., Sloane-Reeves J., Wilding G. E., Kost J., Huang L. S., Clarkson T.W. Prenatal methylmercury exposure from ocean fish consumption in the Seychelles child development study. *The Lancet* 361, 17 (2002) 1686 – 1692

Murata K., Weihe P., Budtz-Jørgensen P., Jørgensen P. J., Grandjean P. Delayed brainstem auditory evoked potential latencies in 14-year-old children exposed to methylmercury. *The Journal of Pediatrics* 144, 2 (2004) 177 – 183

Nordenhäll K., Dock .L, Vahter M. Transplacental and lactational exposure to mercury in hamster pups after maternal administration of methyl mercury in late gestation. *Pharmacol Toxicol* 77 (1995) 130 – 135

NRC 2000. Toxicological effects of methylmercury. National Research Council (NRC). National academy press, Washington USA.

NRC 2006. Human biomonitoring for environmental chemical. National Academy Press (NRC), Washington. 291 str.

Oskarsson A., Schültz A., Skerfving .S, Hallén I. P., Ohlin B., Lagerkvist B. J. Total and inorganic mercury in breast milk in relation to fish consumption and amalgam in lactating women. *Archives of environmental health* 51, 3 (1996) 234 – 241

Pacyna E. G., Pacyna J. M., Pirrone N. European emissions of atmospheric mercury from anthropogenic sources in 1995. *Atmos Environ* 35 (2001) 2987 – 2996

Pacyna E. G., Pacyna J. M., Fudala J., Strzelecka-Jastrzab E., Hlawiczka S., Panasiuk D. Mercury emissions to the atmospheric from anthropogenic sources in Europe in 2000 and their scenarios until 2020. *Sci Tot Environ* 370 (2006) 147 – 156

Patrick L. Mercury toxicity and antioxidants: Part 1: role of glutathione and alpha-lipoic acid in the treatment of mercury toxicity. *Alternative medicine review* 7, 6 (2002) 456 – 471

Paustenbach D., Galbraith D. Biomonitoring and biomarkers: exposure assessment will never be the same. *Environmental Health Perspectives* 114, 8 (2006) 1143-1149

Pirrone N., Wichmann-Fiebig M., Ahrens R., Pacyna J.M., Borowiak A., Boffetta P., Hansen J.C., Grandjean P., Ehrlich H.C., Petersen G., Horvat M. 2002. Exposure to mercury in Europe. V: Ambient Air Pollution by Mercury (Hg). Position Paper. Luxembourg, Belgium 235 str.

Pravilnik o pitni vodi, Ur. l. RS št. 19/2004, 35/2004, 26/2006, 92/2006 in 25/2009

Pravilnik o varovanju delavcev pred tveganji zaradi izpostavljenosti kemičnim snovem pri delu, Ur. l. RS št. 100/2001, 39/2005 in 53/2007

Rahola T., Hattula T., Korolainen A., Miettinen J. T. Elimination of free and protein-bound ionic mercury (Hg<sup>2+</sup>) in man. *Ann Clin Res* 5 (1973) 214 – 219

Remy S., Prudent P., Probst J. L. Mercury speciation in soils of the industrialised Thur River catchment (Alsace, France). *Applied Geochemistry* 21, 11 (2006) 1855 – 1867

Robbins C. R. 2002. Chemical and physical behaviour of human hair, 4. Izdaja. New York, Springer-Verlag: 8 – 9

Sakamoto M., Kubota M., Matsumoto S., Nakano A., Akagi H. Declining risk of methylmercury exposure to infants during lactation. *Environmental Research* 90, 3 (2002) 185 – 189

Saito H. Congenital Minamata disease: a description of two cases in Niigata. *Seychelles medical and dental journal* 7, 1 (2004)

Svetina M., Justin B., Druks M., Gosar M. 2002. Raziskava virov živega srebra v Republiki Sloveniji in študija možnosti za zmanjšanje emisij živega srebra v okolje. ERICO, Velenje: 136 str.

UNEP 2002. Global mercury assessment. Geneva, Switzerland: 258 str. <http://www.unep.org/gc/gc22/Document/UNEP-GC22-INF3.pdf> , (12. april 2010)

UNEP/WHO 2008. Guidance for identifying populations at risk from mercury exposure. Geneva, Switzerland: 170 str.

Urad Republike Slovenije za kemikalije. Biomonitoring kemikalij. [http://www.uk.gov.si/si/delovna\\_podrocja/biomonitoring\\_kemikalij/](http://www.uk.gov.si/si/delovna_podrocja/biomonitoring_kemikalij/) (10. april 2010)

Uredba o emisiji živega srebra pri odvajanju odpadnih vod, Ur.l. RS, št. 84/1999

Uredba komisije (ES) o določitvi mejnih vrednosti nekaterih onesnaževal v živilih, Ur. l. EU št. 1881/2006 in 629/2008

US EPA 2001. Water Quality Criterion for the Protection of Human Health: Methylmercury. U.S. Environmental Protection Agency Washington, 303 str.

US EPA. Mercury, elemental (CASRN 7439-97-6)

<http://www.epa.gov/iris/subst/0370.htm> (20. julij 2010)

VIM 2008. International vocabulary of metrology – Basic and general concepts and associated terms (VIM). JCGM 200. 57 str.

Veliki splošni leksikon. Priročna izdaja v dvajsetih knjigah. Deveta knjiga. 2006. Ljubljana, DZS: 2005 - 2256.

Yamaguchi S., Matsumoto H., Kaku S., Tateishi M., Shiramizu M. Factors affecting the amount of mercury in human scalp hair. Am J Public Health 65, 5 (1975) 484-488

Yasutake A., Matsumoto M., Yamaguchi M., Hachiya N. Current hair mercury levels in Japanese: survey in five districts. Tohoku J. Exp. Med. 199 (2003) 161-169

Yorifuji T., Kashima S., Tsuda T., Harada M. What has methylmercury in umbilical cords told us? – Minamata disease. Science of total environment 408 (2009) 272 - 276

Wang D., Shi X., Wei S. Accumulation and transformation of atmospheric mercury in soil. The Science of the Total Environment 304, 1-3 (2003) 209 – 214

White R F., Debes F., Dahl .R, Grandjean P. Development and field testing of a neuropsychological test battery to assess the effect of methylmercury exposure in the Faore Islands. V: Proceeding of the International Symposium on Assessment of Environmental Pollution and health effects of methylmercury. Kumamoto, Japan, Kumamoto University 1994; 127 – 140

WHO-IPCS 1990: Environmental health criteria 101. Methylmercury, World Health Organization, Geneva

WHO-IPCS 1991: Environmental health criteria 118. Inorganic mercury, World Health Organization, Geneva

WHO 2002. World Water Day 2001: Pollution from industry, mining and agriculture. World Health Organization, Geneva 11 str.

WHO (World Health Organisation) 2003. Elemental mercury and inorganic mercury compounds: Human health aspects. In Concise international chemical assessment document (CICAD). Volume 50. Geneva 61 str.

## **7 SEZNAM PRILOG**

Priloga 1: Vprašalniki

Priloga 2: Prikaz podatkov iz vprašalnikov

Priloga 3: Rezultati analiz urina pri optimizaciji kislinskega razkroja

Priloga 3.1: Rezultati analiz urina, razkrojenega v bučkah in epruveh

Priloga 3.2: Rezultati analiz urina, razkrojenega v epruveh in zataljenih ampulah

Priloga 3.3: Rezultati analiz urina, razkrojenega v epruveh in teflonskih posodah

Priloga 4: Rezultati analiz mleka pri optimizaciji kislinskega razkroja

Priloga 4.1: Primerjava rezultatov analiz mleka, razkrojenega v epruveh na starem in novem bloku ter v ampulah

Priloga 4.2: Primerjava rezultatov analiz mleka, razkrojenega v epruveh in mikrovalovnem sistemu

Priloga 5: Rezultati analiz krvi z merilnim sistemom CV AAS in DMA za popkovno in venozno kri

Priloga 6: Rezultati analiz poskusa zamrzovanje/odmrzovanje vzorcev

Priloga 6.1: Rezultati analiz venozne krvi

Priloga 6.2: Rezultati analiz popkovne krvi

Priloga 6.3: Rezultati analiz materinega mleka

Priloga 6.4: Rezultati analiz urina

Priloga 7: Kontrolne karte za referenčne materiale

Priloga 8: Rezultati meritev Hg pri preiskovani populaciji

***Priloga 1:***

Vprašalniki





## Kratek vprašalnik za predselekcijo

Raziskava Opredelitev izpostavljenosti kemikalijam z ugotavljanjem virov in trendov po geografskih območjih ter opredelitev referenčnih vrednosti v letih 2007 do 2012 v Republiki Sloveniji

Ime in priimek: \_\_\_\_\_ Datum rojstva: \_\_\_\_\_

### Vprašanja 3-6 in 11 so namenjena samo ženskim preiskovankam.

1) Ali ste stari med 20-35 let? .....DA NE

2) Ali prebivate na tem območju Slovenije več kot 5 let?.....DA NE

3) Ali bo to vaš prvi otrok?.....DA NE

4) Ali pričakujete enega otroka (ne dvojčke)?.....DA NE

5) Ali ste imeli normalno nosečnost (brez težav)? .....DA NE

Če NE, kakšne težave? \_\_\_\_\_

6) Ali nameravate dojiti svojega otroka?.....DA NE

7) Ali je vaše prebivališče v neposredni bližini (100-200 m) industrijskih oz. obrtnih objektov, večje ceste ali železniške postaje, sežigalnice odpadkov, krematorija, toplarne, aktivne deponije odpadkov? ..... DA NE

Če DA, navedite od česa in koliko metrov je prebivališče oddaljeno?

\_\_\_\_\_

8) Ali ste na delovnem mestu izpostavljeni kemikalijam?.....DA NE

Če DA, katerim? \_\_\_\_\_

9) Ali se zdravite zaradi težje bolezni?.....DA NE

Če DA, katere bolezni? \_\_\_\_\_

10) Ali kadite (med nosečnostjo)?.....DA NE

11) Ali ste kadili pred nosečnostjo? .....DA NE

12) Ali redno uživata alkohol ali kakšne druge škodljive snovi?.....DA NE

Datum: \_\_\_\_\_ Ime ginekologa: \_\_\_\_\_

Navodila za ginekologa: Če je med odgovori na vprašanja od 1-6 kakšen NE ali če je med odgovori na vprašanja 7-12 kakšen DA, razen na onesnaženem območju je odgovor na 7 lahko DA, potem nosečnica ni primerna za vključitev v študijo in se ji za sodelovanje zahvaljujemo. V nasprotnem primeru pa je potrebno izpolniti daljši vprašalnik.



## Vprašalnik za nosečnice

Raziskava Opredelitev izpostavljenosti kemikalijam z ugotavljanjem virov in trendov po geografskih območjih ter opredelitev referenčnih vrednosti v letih 2007 do 2012 v Republiki Sloveniji

Identifikacijska številka |\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|

**Prosimo Vas, da odgovorite na vsa vprašanja. Osebni podatki se bodo varovali v skladu z Zakonom o varovanju podatkov. Za sodelovanje se Vam že vnaprej zahvaljujemo.**

### 1. Splošni podatki

Ime in priimek: \_\_\_\_\_

Točen naslov (ulica, kraj in poštna št.): \_\_\_\_\_

Telefonska številka: \_\_\_\_\_ Elektronski naslov: \_\_\_\_\_

Datum rojstva: \_\_\_\_\_ Kraj rojstva: \_\_\_\_\_

Višina (cm): \_\_\_\_\_ Teža pred nosečnostjo (kg): \_\_\_\_\_

### 2. Prebivališče

Od katerega leta prebivate na tem območju Slovenije? \_\_\_\_\_

V kakšnem okolju živite?      A) podeželje      B) center mesta      C) predmestje, okolica

Ali je vaše prebivališče v neposredni bližini (100-200 m):

- A. industrijskih oz. obrtnih objektov
- B. večje ceste ali železniške postaje
- C. sežigalnice odpadkov, krematorija, toplarne
- D. aktivne deponije odpadkov

Če ste obkrožili A) prosimo, da navedete kakšen obrat ((kemijski, kovinski, lesni, papirni, drugo) in koliko metrov je prebivališče oddaljeno? \_\_\_\_\_

Tip (stan. hiša, blok...) in leto izgradnje bivališča: \_\_\_\_\_

Tip kurjave : A) drva      B) premog      C) elektrika      D) olje E) plin

Ali ste v zadnjem letu za dom kupili katerega od naslednjih proizvodov:

A) preproga      B)zavese      C) oblazinjeno pohištvo      D) vzmetnica      E) avtomobil      F) elektronske naprave(TV, DVD, hišni kino, osebni računalnik, glasbeni stolp)

Ste bili v zadnjem letu več kot 1 mesec odsotni od doma? DA NE

Če DA, koliko časa in kje? \_\_\_\_\_

### 3. Zaposlitev

Poklic: \_\_\_\_\_

Stopnja izobrazbe: \_\_\_\_\_

Delovno mesto: \_\_\_\_\_

Vrsta dela, ki ga opravljate: \_\_\_\_\_

Delovna doba na tem delovnem mestu (let): \_\_\_\_\_

Izpostavljenost kemikalijam na delovnem mestu: DA NE

Če DA, katerim? \_\_\_\_\_

V primeru, da ste na tem del.mestu zaposleni manj kot 5 let, prosimo izpolnite podatke še za prejšnjo zaposlitev.

Delovno mesto: \_\_\_\_\_

Vrsta dela, ki ste ga opravljali: \_\_\_\_\_

Delovna doba na tem delovnem mestu (let) \_\_\_\_\_

Izpostavljenost kemikalijam na delovnem mestu: DA NE

Če DA, katerim? \_\_\_\_\_

### 4. Zdravstveno stanje

Ali ste se zdravili zaradi kakšne bolezni? DA NE

Če DA, katere bolezni? \_\_\_\_\_

Ali redno jemljete zdravila? DA NE

Če DA, katera? \_\_\_\_\_

Splošna anestezija v zadnjem mesecu? DA NE

Število zob z amalgamskimi zalivkami? \_\_\_\_\_

### 5. Življenjske navade

Ali ste pred nosečnostjo kadili? DA NE

Koliko cigaret ste pokadili na dan? \_\_\_\_\_

Ali kdo v vašem stanovanju kadi (pasivno kajenje)? DA NE

Koliko cigaret/cigar/pip pokadi na dan? \_\_\_\_\_

Koliko ur dnevno uporabljate računalnik? \_\_\_\_\_

S katerimi hobiji se redno ukvarjate? \_\_\_\_\_

## 6. Prehranjevalne navade

Kolikokrat uživate naslednje vrste hrane in pijače (obkrožite)?

HRANA in PIJAČA	FREKVENCA								Izvor hrane in pijače v večini primerov		
	Nikoli	Manj kot 1 x mesečno	1-3 x mesečno	1 x tedensko	2-4 x tedensko	5-6 x tedensko	1 x dnevno	Večkrat dnevno	kupljeno	Pridelano doma oz. ulovljeno	
Zelenjava* (1 porcija)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Sadje (1 porcija)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Oreščki	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Mleko/mlečni izdelki° (1 porcija)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Jajce (eno)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Meso (1 porcija, 150 g)	Perutnina	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	Divjačina	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	Drugo meso	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Sladkovodne ribe (1 porcija, 150g))	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Morske ribe/ morska hrana (1 porcija, 150g)	Sveža	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	Zmrznjena	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	Konzervirana	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Kava/pravi čaj (1 skodelica)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Alkoholne pijače^ (1 kozarec)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	

\*Za zelenjavo: katerakoli zelenjava razen krompirja

°Za mleko / mlečne izdelke: 1 porcija = 1 jogurt ali 1 kos sira ali skodelica/kozarec mleka (200g)

^Za alkoholne pijače: 1 kozarec vina (125ml) ali 1 kozarec piva ali 1 mali kozarec žgane pijače (30ml)

Koliko obrokov na dan pojedete ?

Vrsta obroka	Pogostnost				
	vsak dan	vsak drugi dan	2 x tedensko	1 x tedensko	nikoli
ZAJTRK	vsak dan	vsak drugi dan	2 x tedensko	1 x tedensko	nikoli
DOPOLDANSKA MALICA	vsak dan	vsak drugi dan	2 x tedensko	1 x tedensko	nikoli
KOSILO	vsak dan	vsak drugi dan	2 x tedensko	1 x tedensko	nikoli
POPOLDANSKA MALICA	vsak dan	vsak drugi dan	2 x tedensko	1 x tedensko	nikoli
VEČERJA	vsak dan	vsak drugi dan	2 x tedensko	1 x tedensko	nikoli

Katere vrste maščob ponavadi uporabljate ?

A) olivno olje B) sončnično olje C) maslo D) margarina E) drugo

Koliko vode pijete na dan (litri)? \_\_\_\_\_

Kateri je glavni tip oskrbe z vodo? A) javni vodovod B) ustekleničena voda C) drugo

Ali ste v zadnjem letu jemali vitamine, minerale ali druga prehranska dopolnila? DA NE

Če DA, katera, koliko časa in dnevna doza? \_\_\_\_\_

Ali uporabljate pri pripravi in serviranju hrane glazirano keramično posodo? DA NE

## 7. Vprašanja o nosečnosti

Ali bo to vaš prvi otrok? DA NE Ali pričakujete dvojčke? DA NE

Predviden datum poroda: \_\_\_\_\_

Ali ste imeli težave med nosečnostjo? DA NE

Če DA, kakšne težave? \_\_\_\_\_

Ali ste med nosečnostjo kadili? DA NE

Če DA, koliko cigaret na dan? \_\_\_\_\_

Ali ste med nosečnostjo uživali alkoholne pijače? DA NE

Če DA, kolikokrat na teden? \_\_\_\_\_

Ali nameravate dojiti svojega otroka? DA NE

Ali boste dosegljivi v drugem mesecu starosti otroka? DA NE

Ime ginekologa: \_\_\_\_\_

Datum in kraj izpolnjevanja: \_\_\_\_\_

## Vprašalnik za matere po porodu

Raziskava Opredelitev izpostavljenosti kemikalijam z ugotavljanjem virov in trendov po geografskih območjih ter opredelitev referenčnih vrednosti v letih 2007 do 2012 v Republiki Sloveniji

Identifikacijska številka |\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|

**Prosimo Vas, da odgovorite na vsa vprašanja. Strokovni sodelavec pa bo izpolnil zadnjo rubriko, ko bo vzel vzorce. Za sodelovanje se Vam že vnaprej zahvaljujemo.**

Ime in priimek matere: \_\_\_\_\_ Datum rojstva : \_\_\_\_\_

### 1. Vprašanja o otroku

Datum poroda: \_\_\_\_\_

Spol otroka: \_\_\_\_\_

Rojstna teža (kg): \_\_\_\_\_ Dolžina ob rojstvu (cm): \_\_\_\_\_

Teža danes (kg): \_\_\_\_\_

- Kako je hranjen vaš otrok?
- A) izključno samo dojenje
  - B) dojenje je prevladujoče
  - C) dojenje je samo dodatek
  - D) umetno hranjenje

Opombe (npr: uporaba mazil pri vnetjih, čajev za spiranje dojke...):

---

---

### 2. Odvzem vzorcev (izpolni pooblaščen oseba)

Vrsta vzorca (obkrožite vse vzorce, ki ste jih odvzeli oz. sprejeli):

A) kri      B) urin      C) lasje D) mleko

Datum in ura odvzema: \_\_\_\_\_

Kraj odvzema vzorcev: \_\_\_\_\_

Ime in priimek osebe, ki je vodila odvzem: \_\_\_\_\_





***Priloga 2:***

Prikaz podatkov iz vprašalnikov



*Preglednica 12: Splošne značilnosti preučevane populacije*

<i>N</i>	52
	<i>Povprečna vrednost (razpon)</i>
	30
<i>Starost (leta)</i>	(24 – 35)
	168
<i>Telesna višina (cm)</i>	(153 – 185)
	63
<i>Telesna masa (kg)</i>	(45 – 110)
	22,3
<i>Indeks telesne teže (kg/m<sup>2</sup>)</i>	(16,6 – 40,4)

*Preglednica 13: Značilnosti prebivališča preiskovancev*

	<i>Delež preiskovancev (%)</i>
<i>Bivalno okolje</i>	
A-podeželje	19
B- center mesta	42
C-predmestje, okolica	38
<i>Tip kurjave</i>	
A-drva	10
B-premog	6
C-elektrika	6
D-olje	23
E-plin	21
Toplovod	21
Biomasa	0
Drva in olje	6
Drva in elektrika	4
Olje in plin	2
Elektrika in olje	0
<i>Novo kupljen proizvod</i>	
A-preproga	25
B-zavese	25
C-oblazinjeno pohištvo	31
D-vzmetnica	48
E-avtomobil	42
F-elektronske naprave	62
<i>Tip vodne oskrbe</i>	
A-javni vodovod	85
B-ustekleničena voda	8
C-drug	0
Javni vodovod + ustekleničena voda	8

**Preglednica 14: Izobrazba preiskovancev**

<i>Stopnja izobrazbe</i>	<i>Delež preiskovancev (%)</i>
I	0
II	0
II	0
IV	0
V	17
VI	4
VII	77
VIII	2
IX	0
X	0

**Preglednica 15: Zdravstveno stanje in življenjske navade preiskovancev**

	<i>Delež preiskovancev (%)</i>
<i>Število amalgamskih zalivk</i>	
0 – 3	44
3 – 9	40
9 – 12	4
12 – 15	4
Več kot 15	8
<i>Kajenje</i>	
Da	4
Ne	96
<i>Pasivno kajenje</i>	
Da	4
Ne	96
<i>Dnevna uporaba računalnika</i>	
0 – 2 ur	33
2 – 6 ur	33
6 – 10 ur	33
Več kot 10 ur	2

**Preglednica 16: Prehranjevalne navade preiskovancev – zelenjava, sadje in oreški**

<i>Pogostost uživanja (1 obrok)</i>	<i>Delež preiskovancev (%)</i>
<b>ZELENJAVA</b>	
1-nikoli	2
2-manj kot 1-krat mesečno	0
3-1-3-krat mesečno	0
4-1-krat tedensko	0
5-2-4-krat tedensko	25
6-5-6-krat tedensko	17
7-1-krat dnevno	31
8-večkrat dnevno	25
Kupljeno	46
Pridelano doma	24
Oboje	30
<b>SADJE</b>	
1-nikoli	0
2-manj kot 1-krat mesečno	0
3-1-3-krat mesečno	0
4-1-krat tedensko	0
5-2-4-krat tedensko	8
6-5-6-krat tedensko	15
7-1-krat dnevno	29
8-večkrat dnevno	48
Kupljeno	67
Pridelano doma	10
Oboje	24
<b>OREŠČKI</b>	
1-nikoli	2
2-manj kot 1-krat mesečno	17
3-1-3-krat mesečno	37
4-1-krat tedensko	17
5-2-4-krat tedensko	17
6-5-6-krat tedensko	4
7-1-krat dnevno	6
8-večkrat dnevno	0
Kupljeno	88
Pridelano doma	6
Oboje	6

**Preglednica 17: Prehranjevalne navade preiskovancev – mleko, mlečni izdelki in jajca**

<i>Pogostost uživanja (1 obrok)</i>	<i>Delež preiskovancev (%)</i>
<b>MLEKO IN MLEČNI IZDELKI</b>	
1-nikoli	0
2-manj kot 1-krat mesečno	0
3-1-3-krat mesečno	0
4-1-krat tedensko	0
5-2-4-krat tedensko	6
6-5-6-krat tedensko	15
7-1-krat dnevno	21
8-večkrat dnevno	58
Kupljeno	88
Pridelano doma	8
Oboje	4
<b>JAJCA</b>	
1-nikoli	0
2-manj kot 1-krat mesečno	4
3-1-3-krat mesečno	17
4-1-krat tedensko	38
5-2-4-krat tedensko	35
6-5-6-krat tedensko	4
7-1-krat dnevno	2
8-večkrat dnevno	0
Kupljeno	63
Pridelano doma	27
Oboje	10



**Preglednica 18:** Prehranjevalne navade preiskovancev – meso

<i>Pogostost uživanja (1 obrok)</i>	<i>Delež preiskovancev (%)</i>
<i>MESO - PERUTNINA</i>	
1-nikoli	8
2-manj kot 1-krat mesečno	4
3-1-3-krat mesečno	8
4-1-krat tedensko	33
5-2-4-krat tedensko	46
6-5-6-krat tedensko	2
7-1-krat dnevno	0
8-večkrat dnevno	0
Kupljeno	87
Pridelano doma	11
Oboje	2
<i>MESO - DIVJAČINA</i>	
1-nikoli	71
2-manj kot 1-krat mesečno	23
3-1-3-krat mesečno	4
4-1-krat tedensko	2
5-2-4-krat tedensko	0
6-5-6-krat tedensko	0
7-1-krat dnevno	0
8-večkrat dnevno	0
Kupljeno	73
Pridelano doma	20
Oboje	7
<i>MESO - DRUGO</i>	
1-nikoli	10
2-manj kot 1-krat mesečno	12
3-1-3-krat mesečno	10
4-1-krat tedensko	29
5-2-4-krat tedensko	39
6-5-6-krat tedensko	0
7-1-krat dnevno	0
8-večkrat dnevno	0

**Preglednica 19: Prehranjevalne navade preiskovancev – ribe in morska hrana**

<i>Pogostost uživanja (1 obrok)</i>	<i>Delež preiskovancev (%)</i>
<i>SLADKOVODNE RIBE</i>	
1-nikoli	46
2-manj kot 1-krat mesečno	35
3-1-3-krat mesečno	19
4-1-krat tedensko	0
5-2-4-krat tedensko	0
6-5-6-krat tedensko	0
7-1-krat dnevno	0
8-večkrat dnevno	0
Kupljeno	79
Pridelano doma (ulovljeno)	21
Oboje	0
<i>MORSKA HRANA - SVEŽA</i>	
1-nikoli	25
2-manj kot 1-krat mesečno	21
3-1-3-krat mesečno	37
4-1-krat tedensko	17
5-2-4-krat tedensko	0
6-5-6-krat tedensko	0
7-1-krat dnevno	0
8-večkrat dnevno	0
Kupljeno	95
Pridelano doma (ulovljeno)	5
Oboje	0

Se nadaljuje

## Nadaljevanje

Pogostost uživanja (1 obrok)	Delež preiskovancev (%)
<i>MORSKA HRANA - ZMRZNJENA</i>	
1-nikoli	35
2-manj kot 1-krat mesečno	37
3-1-3-krat mesečno	15
4-1-krat tedensko	12
5-2-4-krat tedensko	2
6-5-6-krat tedensko	0
7-1-krat dnevno	0
8-večkrat dnevno	0
Kupljeno	100
Pridelano doma (ulovljeno)	0
Oboje	0
<i>MORSKA HRANA - KONZERVIRANA</i>	
1-nikoli	17
2-manj kot 1-krat mesečno	19
3-1-3-krat mesečno	35
4-1-krat tedensko	19
5-2-4-krat tedensko	8
6-5-6-krat tedensko	2
7-1-krat dnevno	0
8-večkrat dnevno	0
Kupljeno	100
Pridelano doma (ulovljeno)	0
Oboje	0

**Preglednica 20: Prehranjevalne navade preiskovancev – pijača**

<i>Pogostost uživanja (1 obrok)</i>	<i>Delež preiskovancev (%)</i>
<i>KAVA, ČAJ (1 skodelica)</i>	
1-nikoli	25
2-manj kot 1-krat mesečno	12
3-1-3-krat mesečno	4
4-1-krat tedensko	4
5-2-4-krat tedensko	15
6-5-6-krat tedensko	2
7-1-krat dnevno	31
8-večkrat dnevno	8
Kupljeno	100
Pridelano doma	0
Oboje	0
<i>ALKOHOL (1 kozarec)</i>	
1-nikoli	33
2-manj kot 1-krat mesečno	35
3-1-3-krat mesečno	8
4-1-krat tedensko	15
5-2-4-krat tedensko	6
6-5-6-krat tedensko	2
7-1-krat dnevno	2
8-večkrat dnevno	0
Kupljeno	82
Pridelano doma	6
Oboje	12

**Preglednica 21: Pogostost uživanja dnevnih obrokov preiskovancev**

	<i>Delež preiskovancev (%)</i>
<i>ZAJTRK</i>	
1-vsak dan	92
2-vsak drugi dan	4
3-2 x tedensko	2
4-1 x tedensko	0
5-nikoli	2
<i>DOPOLDANSKA MALICA</i>	
1-vsak dan	44
2-vsak drugi dan	18
3-2 x tedensko	22
4-1 x tedensko	6
5-nikoli	10
<i>KOSILO</i>	
1-vsak dan	92
2-vsak drugi dan	6
3-2 x tedensko	2
4-1 x tedensko	0
5-nikoli	0
<i>POPOLDANSKA MALICA</i>	
1-vsak dan	37
2-vsak drugi dan	21
3-2 x tedensko	25
4-1 x tedensko	4
5-nikoli	13
<i>VEČERJA</i>	
1-vsak dan	63
2-vsak drugi dan	18
3-2 x tedensko	14
4-1 x tedensko	4
5-nikoli	2

**Preglednica 22: Prehranjevalne navade preiskovancev – drugo**

	<i>Delež preiskovancev (%)</i>
<i>VRSTA MAŠČOBE V PREHRANI</i>	
A-olivno olje	81
B-sončnično olje	40
C-maslo	38
D-margarina	12
E-drugo	15
<i>DNEVNI VNOS VODE</i>	
Do 1 L	0
1 - 2 L	65
2 - 3 L	35
Več kot 3 L	0
<i>JEMANJE PREHRANSKIH DOPOLNIL</i>	
Da	84
Ne	16
<i>UPORABA GLAZIRANE POSODE</i>	
Da	39
Ne	61

**Preglednica 23: Vprašanja o nosečnosti in po porodu**

<i>N</i>	<i>Delež preiskovank (%)</i>
<i>KAJENJE MED NOSEČNOSTJO</i>	
Da	0
Ne	100
<i>DOJENJE</i>	
A-izključno dojenje	80
B-dojenje je prevladujoče	6
C-dojenje je samo dodatek	12
D-umetno hranjenje	2
<i>SPOL OTROKA</i>	
Moški	51
Ženski	49



***Priloga 3:***

Rezultati analiz urina pri optimizaciji kislinskega razkroja





***Priloga 3.1:***

Rezultati analiz urina razkrojenega v bučkah in epruveh



**Preglednica 24: Rezultati meritev urina, razkrojenega v 50 mL bučkah (CV AAS)**

Vzorec	paralelka	bučke 50 ml (ng/ml)				
		koncentracija (ng/mL)	koncentracija (ng/mL)	odklon (ng/mL)	koncentracija (ng/mL)	standardna deviacija (ng/mL)
seronorm urine 40,7 ± 2,3 ng/ml	1., n=2	38,08	37,59	0,49	37,55	0,45
		37,10				
	2., n=2	37,27	37,38	0,25		
		37,76				
C2M022	1., n=2	0,19	0,20	0,01	0,29	0,11
		0,20				
	2., n=2	0,38	0,38	0,00		
		0,38				
C2M024	1., n=2	0,23	0,23	0,00	0,21	0,02
		0,23				
	2., n=2	0,19	0,19	0,00		
		0,19				
C2F024	1., n=2	0,17	0,17	0,00	0,21	0,04
		0,17				
	2., n=2	0,24	0,24	0,01		
		0,25				
C2M009	1., n=2	0,54	0,58	0,04	0,51	0,09
		0,62				
	2., n=2	0,45	0,43	0,01		
		0,42				
B1F012	1., n=2	0,68	0,69	0,01	0,80	0,13
		0,70				
	2., n=2	0,90	0,91	0,01		
		0,92				
C2M010	1., n=2	0,29	0,29	0,00	0,20	0,10
		0,29				
	2., n=2	0,10	0,12	0,01		
		0,13				

**Preglednica 25: Rezultati meritev urina, razkrojenega v epruveh (CV AAS)**

Vzorec	paralelka	epruvete (ng/ml)				
		koncentracija (ng/mL)	koncentracija (ng/mL)	odklon (ng/mL)	koncentracija (ng/mL)	standardna deviacija (ng/mL)
seronorm urine 40,7 ± 2,3 ng/ml	1., n=2	36,02	35,55	0,46	35,64	0,68
		35,09				
	2., n=2	35,04	35,73	0,69		
		36,42				
C2M022	1., n=2	0,25	0,25	0,01	0,25	0,01
		0,26				
	2., n=2	0,24	0,24	0,01		
		0,23				
C2M024	1., n=2	0,17	0,16	0,01	0,20	0,04
		0,15				
	2., n=2	0,23	0,23	0,00		
		0,23				
C2F024	1., n=2	0,26	0,27	0,01	0,28	0,02
		0,28				
	2., n=2	0,31				
C2M009	1., n=2	0,62	0,61	0,01	0,67	0,06
		0,61				
	2., n=2	0,72	0,73	0,01		
		0,73				
B1F012	1., n=2	0,76	0,77	0,02	0,77	0,02
		0,79				
	2., n=2	0,75				
C2M010	1., n=2	0,18	0,17	0,00	0,16	0,02
		0,17				
	2., n=2	0,16	0,15	0,01		
		0,13				



***Priloga 3.2:***

Rezultati analiz urina, razkrojenega v epruveh in zataljenih ampulah



**Preglednica 26:** Rezultati analiz urina, razkrojenega v epruветah (CV AAS) – 1. meritev

Vzorec	paralelka	Epruvete (ng/mL) - 1. meritev				
		koncentracija (ng/mL)	koncentracija (ng/mL)	odklon (ng/mL)	koncentracija (ng/mL)	standardna deviacija (ng/mL)
Clin Chek 8847 3,49 ± 0,7 ng/mL	1., n=2	2,27	2,34	0,07	2,29	0,08
		2,41				
	2., n=2	2,24	2,24	0,00		
		2,24				
B1M108	1., n=2	0,38	0,39	0,01	0,37	0,02
		0,39				
	2., n=2	0,36	0,35	0,01		
		0,35				
A2M031	1., n=2	0,81	0,81	0,00	0,83	0,03
		0,81				
	2., n=2	0,83	0,85	0,01		
		0,86				
A2M032	1., n=2	0,03	0,02	0,01	0,01	0,02
		0,01				
	2., n=2	-0,01	-0,01	0,01		
		0,00				
A2M033	1., n=2	1,46	1,49	0,04	1,50	0,03
		1,53				
	2., n=2	1,52	1,52	0,00		
		1,52				
A2M034	1., n=2	0,93	0,93	0,01	0,94	0,02
		0,92				
	2., n=2	0,93	0,96	0,02		
		0,98				
A2M035	1., n=2	0,89	0,87	0,02	0,87	0,02
		0,85				
	2., n=2	0,89	0,88	0,01		
		0,86				
A2M036	1., n=2	0,13	0,13	0,01	0,11	0,02
		0,14				
	2., n=2	0,10	0,09	0,01		
		0,09				
A2M037	1., n=2	2,01	2,04	0,03	2,02	0,04
		2,07				
	2., n=2	2,01	2,00	0,01		
		1,98				

**Preglednica 27:** Rezultati analiz urina, razkrojenega v epruветah (CV AAS) – 2. meritev (po 12 dneh)

Vzorec	paralelka	Epruvete (ng/ml) - 2. meritev - po 12 dneh
		koncentracija (ng/ml)
Clin Chek 8847 3,49 ± 0,7	n=1	2,09
A2M031	n=1	0,75
A2M033	n=1	1,47
A2M034	n=1	0,83
A2M035	n=1	0,75
A2M036	n=1	0,27
A2M037	n=1	2,02

**Preglednica 28:** Rezultati analiz urina, razkrojenega v epruветah (CV AAS-amalgamiranje) – meritev po 12 dneh

Vzorec	paralelka	Epruvete (ng/ml) - 2. meritev - po 12 dneh - CVAAS-amalgam
		koncentracija (ng/ml)
Clin Chek 8847 3,49 ± 0,7	n=1	2,63
A2M031	n=1	0,79
A2M033	n=1	1,69
A2M034	n=1	1,06
A2M035	n=1	0,90
A2M036	n=1	0,23
A2M037	n=1	2,38



**Preglednica 29: Rezultati analiz urina, razkrojenega v zataljenih ampulah (CV AAS) – 1. meritev**

Vzorec	paralelka	Ampule (ng/ml) - 1. meritev				
		koncentracija (ng/mL)	koncentracija (ng/mL)	odklon (ng/mL)	koncentracija (ng/mL)	standardna deviacija (ng/mL)
Clin Chek 8847 3,49 ± 0,7 ng/mL	1., n=2	2,88	2,84	0,04	3,45	0,70
		2,80				
	2., n=2	4,07	4,05	0,02		
		4,03				
B1M108	1., n=2	1,92	1,90	0,03	2,00	0,13
		1,87				
	2., n=2	2,15	2,11	0,04		
		2,07				
A2M031	1., n=2	2,43	2,37	0,06	2,21	0,19
		2,31				
	2., n=2	2,03	2,05	0,02		
		2,07				
A2M032	1., n=2	0,25	0,22	0,03	0,14	0,10
		0,19				
	2., n=2	0,07	0,06	0,01		
		0,05				
A2M033	1., n=2	2,35	2,29	0,06		
		2,23				
A2M034	1., n=2	1,53	1,50	0,04		
		1,46				
A2M035	1., n=2	2,20	2,20	0,00		
		2,20				
A2M036	1., n=2	0,31	0,30	0,02		
		0,28				
A2M037	1., n=2	3,45	3,48	0,30		
		3,51				

**Preglednica 30: Rezultati analiz urina, razkrojenega v zataljenih ampulah (CV AAS) – 2. meritev (po 11 dneh)**

Vzorec	paralelka	Ampule (ng/ml) - 2. meritev - po 11 dneh		
		koncentracija (ng/mL)	koncentracija (ng/mL)	odklon (ng/mL)
Clin Chek 8847 3,49 ± 0,7	1., n=1	1,65	2,17	0,52
	2., n=1	2,69		
A2M031	1., n=1	1,55	1,42	0,13
	2., n=1	1,29		
A2M033	n=1	1,56		
A2M034	n=1	0,78		
A2M035	n=1	1,47		
A2M036	n=1	0,52		
A2M037	n=1	3,17		

**Preglednica 31: Rezultati analiz urina, razkrojenega v ampulah (CV AAS-amalgamiranje) – meritev po 11 dneh**

Vzorec	paralelka	Ampule (ng/ml) - 2. meritev - po 11 dneh-CVAAS amalgam		
		koncentracija (ng/mL)	koncentracija (ng/mL)	odklon (ng/mL)
Clin Chek 8847 3,49 ± 0,7	2., n=1	2,39	3,13	0,73
	2., n=1	3,86		
A2M031	2., n=1	1,47	1,33	0,15
	2., n=1	1,18		
A2M033	n=1	1,61		
A2M034	n=1	1,25		
A2M035	n=1	0,95		
A2M036	n=1	0,34		
A2M037	n=1	2,32		

***Priloga 3.3:***

Rezultati analiz urina, razkrojenega v epruveh in teflonskih posodah



**Preglednica 32: Rezultati analiz urina, razkrojenega v epruветah (CV AAS)**

Vzorec	paralelka	CVAAS (ng/ml) - epruветe				
		koncentracija (ng/mL)	koncentracija (ng/mL)	odklon (ng/mL)	koncentracija (ng/mL)	standardna deviacija (ng/mL)
Clin Chek 8847 3,49 ± 0,7 ng/ml	1., n=2	2,31	2,33	0,02	2,30	0,05
		2,35				
	2., n=2	2,24	2,27	0,04		
		2,31				
NIST 2672a 0,2 ng/ml	1., n=2	0,21	0,21	0,00	0,22	0,00
		0,21				
	2., n=2	0,22	0,22	0,00		
		0,21				
B1F006	1., n=2	0,41	0,41	0,01	0,44	0,03
		0,42				
	2., n=2	0,46	0,46	0,00		
		0,46				
B1F010	1., n=2	4,54	4,58	0,04	4,62	0,10
		4,62				
	2., n=2	4,56	4,67	0,10		
		4,77				
B1F011	1., n=2	2,45	2,45	0,00	2,39	0,06
		2,45				
	2., n=2	2,31	2,34	0,03		
		2,37				
B1F013	1., n=2	2,12	2,16	0,04	2,02	0,17
		2,20				
	2., n=2	1,93	1,89	0,05		
		1,84				
B1F015	1., n=2	0,11	0,11	0,00	0,11	0,01
		0,11				
	2., n=2	0,10	0,10	0,01		
		0,11				
B1F034	1., n=2	2,01	2,01	0,00	2,05	0,05
		2,01				
	2., n=2	2,05	2,09	0,04		
		2,12				
B1F041	1., n=2	2,29	2,24	0,06	2,22	0,06
		2,18				
	2., n=2	2,16	2,21	0,05		
		2,26				
B1F050	1., n=2	1,00	1,01	0,01	1,02	0,06
		1,02				
	2., n=2	0,97	1,03	0,07		
		1,10				
B1F058	1., n=2	1,02	1,02	0,00	1,03	0,01
		1,02				
	2., n=2	1,04	1,04	0,00		
		1,04				
B1M004	1., n=2	5,64	5,69	0,05	5,69	0,06
		5,74				
	2., n=2	5,64	5,69	0,05		
		5,74				
B1M007	1., n=2	1,86	1,85	0,01	1,82	0,03
		1,84				
	2., n=2	1,78	1,80	0,02		
		1,82				
C2F005	1., n=2	0,46	0,47	0,01	0,43	0,04
		0,48				
	2., n=2	0,40	0,40	0,00		
		0,40				
C2F008	1., n=2	0,33	0,34	0,01	0,33	0,01
		0,35				
	2., n=2	0,33	0,32	0,01		
		0,31				
C2F026	1., n=2	0,12	0,14	0,02	0,17	0,04
		0,15				
	2., n=2	0,22	0,19	0,03		
		0,17				
C2M004	1., n=2	1,33	1,30	0,03	1,31	0,03
		1,27				
	2., n=2	1,31	1,32	0,01		
		1,33				

Se nadaljuje

## Nadaljevanje

Vzorec	paralelka	CVAAS (ng/ml) - epruvete				
		koncentracija (ng/mL)	koncentracija (ng/mL)	odklon (ng/mL)	koncentracija (ng/mL)	standardna deviacija (ng/mL)
C2M008	1., n=2	0,10	0,09	0,01	0,10	0,01
		0,09				
	2., n=2	0,11	0,10	0,01		
		0,10				
C2M017	1., n=2	0,21	0,21	0,01	0,23	0,04
		0,20				
	2., n=2	0,22	0,25	0,03		
		0,28				
C2M018	1., n=2	0,17	0,19	0,02	0,17	0,03
		0,21				
	2., n=2	0,13	0,14	0,01		
		0,15				
A2M006	1., n=2	0,13	0,13	0,01	0,13	0,01
		0,12				
	2., n=2	0,12	0,13	0,01		
		0,13				
A2M007	1., n=2	0,98	0,98	0,00	1,03	0,05
		0,98				
	2., n=2	1,08	1,07	0,01		
		1,06				

### **Preglednica 33:** Rezultati analiz urina, razkrojenega v epruvetah (CV AAS – amalgamiranje)

Vzorec	paralela	CVAAS-amalgam (ng/mL)		
		koncentracija (ng/mL)	koncentracija (ng/mL)	odklon (ng/mL)
Clin Chek 8847 3,49 ± 0,7 ng/ml	1., n=2	1,82	2,09	0,27
		2,36		
NIST 2672a 0,2 ng/ml	1., n=2	0,41		
		0,86		
B1M004	1., n=2	5,48	5,81	0,33
		6,14		
B1M007	2., n=1	1,89		
A2M007	1., n=2	1,13		
A2M006		0,26		
C2F005	1. paralela, n=1	0,89		
B1F011	1. paralela, n=1	2,57		
B1F034	1. paralela, n=1	2,39		
B1F058	1. paralela, n=1	1,09		
C2F008	1. paralela, n=1	0,69		

**Preglednica 34: Rezultati analiz urina, razkrojenega v teflonskih posodah (CV AAS)**

Vzorec	paralelka	CVAAS (ng/ml) - teflonke				
		koncentracija (ng/mL)	koncentracija (ng/mL)	odklon (ng/mL)	koncentracija (ng/mL)	standardna deviacija (ng/mL)
Clin Chek 8847 3,49 ± 0,7 ng/ml	1., n=2					
	2., n=2					
NIST 2672a 0,2 ng/ml	1., n=2					
	2., n=2					
B1F006	1., n=2	1,08	1,08	0,00	0,94	0,16
		1,08				
	2., n=2	0,79	0,79	0,00		
		0,79				
B1F010	1., n=2	4,52	4,45	0,07	4,93	0,56
		4,39				
	2., n=2	5,42	5,42	0,00		
		5,42				
B1F011	1., n=2	2,98	3,02	0,04	2,61	0,48
		3,07				
	2., n=2	2,19	2,19	0,00		
		2,19				
B1F013	1., n=2	2,36	2,38	0,03	1,98	0,47
		2,41				
	2., n=2	1,56	1,57	0,01		
		1,58				
B1F015	1., n=2	0,34	0,37	0,03	0,30	0,08
		0,40				
	2., n=2	0,22	0,23	0,01		
		0,25				
B1F034	1., n=2	3,00	2,94	0,06	2,71	0,27
		2,88				
	2., n=2	2,47	2,47	0,00		
		2,47				
B1F041	1., n=2	2,69	2,73	0,04	2,51	0,26
		2,77				
	2., n=2	2,28	2,28	0,00		
		2,28				
B1F050	1., n=2	0,99	1,00	0,01	0,95	0,06
		1,00				
	2., n=2	0,89	0,89	0,01		
		0,90				
B1F058	1., n=2	1,44	1,50	0,06	1,31	0,23
		1,56				
	2., n=2	1,10	1,11	0,01		
		1,12				
B1M004	1., n=2	6,06	6,00	0,06	6,82	0,94
		5,94				
	2., n=2	7,69	7,63	0,06		
		7,57				
B1M007	1., n=2	2,19	2,27	0,09	2,17	0,15
		2,36				
	2., n=2	2,02	2,06	0,04		
		2,10				
C2F005	1., n=2	1,16	1,17	0,01	1,45	0,32
		1,18				
	2., n=2	1,72	1,72	0,00		
		1,72				
C2F008	1., n=2	1,08	1,08	0,00	1,30	0,26
		1,08				
	2., n=2	1,52	1,52	0,01		
		1,53				
C2F026	1., n=2	1,11	1,08	0,04	0,93	0,17
		1,04				
	2., n=2	0,79	0,79	0,00		
		0,79				
C2M004	1., n=2	2,49	2,47	0,02	2,23	0,28
		2,45				
	2., n=2	1,96	2,00	0,04		
		2,03				

Se nadaljuje

## Nadaljevanje

Vzorec	paralelka	CVAAS (ng/ml) - teflonke				
		koncentracija (ng/mL)	koncentracija (ng/mL)	odklon (ng/mL)	koncentracija (ng/mL)	standardna deviacija (ng/mL)
C2M008	1., n=2	0,71	0,70	0,01	0,53	0,20
		0,69				
	2., n=2	0,37	0,36	0,01		
		0,35				
C2M017	1., n=2	0,87	0,88	0,01	0,67	0,24
		0,89				
	2., n=2	0,46	0,47	0,01		
		0,47				
C2M018	1., n=2	0,50	0,50	0,00	0,60	0,11
		0,50				
	2., n=2	0,70	0,69	0,01		
		0,68				
A2M006	1., n=2	0,49	0,48	0,01	0,65	0,20
		0,48				
	2., n=2	0,82	0,82	0,00		
		0,82				
A2M007	1., n=2	1,40	1,40	0,00	1,77	0,43
		1,40				
	2., n=2	2,14	2,14	0,00		
		2,14				

***Priloga 4:***

Rezultati analiz mleka pri optimizaciji kislinskega razkroja





***Priloga 4.1:***

Primerjava rezultatov analiz mleka, razkrojenega v epruveh na starem in novem bloku ter v ampulah

**Preglednica 35: Rezultati analiz mleka, razkrojenega v epruveh na starem bloku (CV AAS)**

Vzorec	CVAAS (ng/mL) - star blok epruvete					
	paralelka	koncentracija (ng/L)	koncentracija (ng/mL)	odklon (ng/mL)	koncentracija (ng/mL)	standardna deviacija (ng/mL)
alpsko mleko	1., n=2	0,80	0,81	0,01		
		0,81				
vzorec NM	1., n=2	0,70	0,70	0,00	0,56	0,17
		0,70				
	2., n=2	0,43	0,41	0,02		
		0,39				
400451	1., n=2	0,53	0,54	0,01		
		0,55				
400563	1., n=2	0,32	0,32	0,01		
		0,31				
400570	1., n=2	0,74	0,75	0,01		
		0,76				
400578	1., n=2	0,91	0,94	0,03		
		0,97				
400614	1., n=2	0,71	0,73	0,02		
		0,74				
400616	1., n=2	0,79	0,81	0,02		
		0,82				
400636	1., n=2	0,36	0,38	0,02		
		0,39				
400640	1., n=2	0,23	0,23	0,00		
		0,23				
400644	1., n=2	0,14	0,15	0,00		
		0,15				
400650	1., n=2	0,53	0,54	0,01		
		0,54				

**Preglednica 36: Rezultati analiz mleka, razkrojenega v epruveh na novem bloku (CV AAS)**

Vzorec	CVAAS (ng/mL) - nov blok epruvete					
	paralelka	koncentracija (ng/L)	koncentracija (ng/mL)	odklon (ng/mL)	koncentracija (ng/mL)	standardna deviacija (ng/mL)
alpsko mleko	1., n=2	0,02	0,01	0,01	0,01	0,01
		0,00				
	2., n=2	0,02	0,02	0,01		
		0,01				
	3., n=2	0,00	0,01	0,01		
		0,01				
vzorec NM	1., n=2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01
		0,00				
	2., n=2	0,01	0,01	0,01		
		0,00				
	3., n=2	-0,01	0,00	0,01		
		0,01				
400451	1., n=2	0,18	0,17	0,01	0,17	0,01
		0,16				
	2., n=2	0,17	0,17	0,00		
		0,17				
400563	1., n=2	-0,01	-0,01	0,01	0,00	0,01
		0,00				
	2., n=2	0,00	0,01	0,01		
		0,01				
400570	1., n=2	0,15	0,15	0,00	0,15	0,00
		0,15				
	2., n=2	0,15	0,15	0,00		
		0,15				
400578	1., n=2	0,08	0,08	0,01		
		0,07				
400614	1., n=2	0,12	0,12	0,00		
		0,12				
400616	1., n=2	0,07	0,07	0,01		
		0,06				
400636	1., n=2	0,00	-0,01	0,01		
		-0,01				
400640	1., n=2	0,06	0,06	0,01		
		0,05				
400644	1., n=2	0,03	0,04	0,01		
		0,04				
400650	1., n=2	0,15	0,16	0,01		
		0,16				

**Preglednica 37: Rezultati analiz mleka, razkrojenega v ampulah (CV AAS)**

Vzorec	CVAAS (ng/mL) - ampule					
	paralelka	koncentracija (ng/L)	koncentracija (ng/mL)	odklon (ng/mL)	koncentracija (ng/mL)	standardna deviacija (ng/mL)
alpsko mleko	1., n=2	4,32	4,06	0,26		
		3,80				
400563	1., n=2	4,26	4,15	0,12	4,20	0,11
		4,03				
	2., n=2	4,23	4,25	0,01		
		4,26				
400570	1., n=2	8,30	8,25	0,05	8,20	0,23
		8,20				
	2., n=2	8,41	8,14	0,27		
		7,87				
400578	1., n=2	9,05	9,05	0,00	8,68	0,46
		9,05				
	2., n=2	8,09	8,31	0,22		
		8,52				
400614	1., n=2	8,95	9,00	0,05		
		9,05				
400616	1., n=2	7,34	7,40	0,06		
		7,45				
400636	1., n=2	7,55	7,45	0,11		
		7,34				
400644	1., n=2	2,47	2,50	0,02		
		2,52				
400650	1., n=2	7,45	7,56	0,11		
		7,66				



***Priloga 4.2:***

Primerjava rezultatov analiz mleka, razkrojenega v epruveh in mikrovalovnem sistemu



**Preglednica 38: Rezultati analiz mleka, razkrojenega v epruveh (CV AAS)**

Vzorec	paralelka	CVAAS (ng/mL) - epruvete				
		koncentracija (ng/mL)	koncentracija (ng/mL)	odklon (ng/mL)	koncentracija (ng/mL)	standardna deviacija (ng/mL)
BCR 150 9,4 ± 1,7 ng/g	1., n=2	6,88	7,12	0,24	7,14	0,24
		7,36				
	2., n=2	6,98	7,16	0,17		
		7,33				
B1F021	1., n=2	0,09	0,08	0,01	0,08	0,01
		0,07				
	2., n=2	0,07	0,07	0,00		
		0,07				
B1F032	1., n=2	0,08	0,08	0,00	0,08	0,01
		0,09				
	2., n=2	0,07	0,08	0,01		
		0,09				
B1F042	1., n=2	0,09	0,09	0,01	0,09	0,01
		0,10				
	2., n=2	0,07	0,08	0,01		
		0,09				
B1F002	1., n=2	0,23	0,22	0,00	0,23	0,01
		0,22				
	2., n=2	0,24	0,23	0,01		
		0,23				
B1F044	1., n=2	0,15	0,15	0,00	0,15	0,00
		0,15				
	2., n=2	0,15	0,15	0,00		
		0,15				
B1F058	1., n=2	0,22	0,22	0,00	0,23	0,01
		0,23				
	2., n=2	0,23	0,23	0,00		
		0,23				
B1F037	1., n=2	0,26	0,26	0,01	0,28	0,02
		0,27				
	2., n=2	0,29	0,30	0,01		
		0,30				
B1F003	1., n=2	0,43	0,43	0,00	0,45	0,03
		0,42				
	2., n=2	0,48	0,47	0,01		
		0,46				
B1F014	1., n=2	0,33	0,34	0,01	0,35	0,02
		0,35				
	2., n=2	0,36	0,36	0,00		
		0,37				
B1F034	1., n=2	0,35	0,35	0,00	0,37	0,02
		0,35				
	2., n=2	0,37	0,38	0,01		
		0,39				
B1F013	1., n=2	0,37	0,37	0,01	0,37	0,01
		0,38				
	2., n=2	0,36	0,36	0,00		
		0,37				
B1F010	1., n=2	1,05	1,05	0,00	1,00	0,07
		1,06				
	2., n=2	0,92	0,94	0,02		
		0,97				



**Preglednica 39:** Rezultati analiz mleka, razkrojenega v epruveh (CV AAS-amalgamiranje)

Vzorec	CVAAS (ng/mL) - epruvete			
	paralelka	koncentracija (ng/mL)	koncentracija (ng/mL)	odklon (ng/mL)
BCR 150 9,4 ± 1,7 ng/g	1., n=1	8,20	8,68	0,48
	2., n=1	9,16		
B1F021	1., n=1	0,07	0,07	0,00
	2., n=1	0,06		
B1F032	1., n=1	0,10	0,09	0,01
	2., n=1	0,08		
B1F042	1., n=1	0,06	0,07	0,00
	2., n=1	0,07		
B1F002	1., n=1	0,32	0,29	0,03
	2., n=1	0,26		
B1F044	1., n=1	0,21	0,19	0,02
	2., n=1	0,17		
B1F058	1., n=1	0,36	0,36	0,01
	2., n=1	0,37		
B1F037	1., n=1	0,43	0,40	0,03
	2., n=1	0,36		
B1F003	1., n=1	0,58	0,61	0,04
	2., n=1	0,65		
B1F014	1., n=1	0,52	0,51	0,01
	2., n=1	0,51		
B1F034	1., n=1	0,65	0,66	0,02
	2., n=1	0,68		
B1F013	1., n=1	0,47	0,49	0,02
	2., n=1	0,51		
B1F010	1., n=1	1,32	1,28	0,03
	2., n=1	1,25		

**Preglednica 40:** Rezultati analiz mleka, razkrojenega v mikrovalovnem sistemu (CV AAS)

Vzorec	paralelka	CVAAS (ng/mL) - mikrovalovna				standardna deviacija (ng/mL)
		koncentracija (ng/mL)	koncentracija (ng/mL)	odklon (ng/mL)	koncentracija (ng/mL)	
BCR 150 9,4 ± 1,7 ng/g	1., n=2	8,03	8,11	0,08	8,29	0,23
		8,18				
	2., n=2	8,39	8,47	0,08		
		8,55				
B1F021	1., n=1	0,11	0,11	0,00		
	2., n=1	0,12				
B1F032	1., n=1	0,12	0,12	0,00		
	2., n=1	0,12				
B1F042	1., n=1	0,12	0,12	0,00		
	2., n=1	0,12				
B1F002	1., n=1	0,15	0,15	0,00		
	2., n=1	0,15				
B1F044	1., n=1	0,28	0,29	0,01		
	2., n=1	0,31				
B1F058	1., n=1	0,33	0,33	0,00		
	2., n=1	0,34				
B1F037	1., n=1	0,38	0,38	0,01		
	2., n=1	0,39				
B1F003	1., n=1	0,49	0,46	0,03		
	2., n=1	0,44				
B1F014	1., n=1	0,52	0,52	0,00		
	2., n=1	0,52				
B1F034	1., n=1	0,55	0,55	0,00		
	2., n=1	0,55				
B1F013	1., n=1	0,72	0,71	0,01		
	2., n=1	0,71				
B1F010	1., n=1	0,99	0,95	0,04		
	2., n=1	0,91				

***Priloga 5:***

Rezultati analiz krvi z merilnim sistemom CV AAS in DMA za popkovno in venozno kri



**Preglednica 41:** Primerjava rezultatov analiz s CV AAS in DMA za popkovno kri

ID	CVAAS (ng/g)	DMA (ng/ml)
IB0056	4,98	5,52
IB0023	17,18	18,10
IB0051	9,38	9,63
IB0440	11,58	14,49
IB0443	11,56	12,96
IB0870	10,60	13,89
IB0026	14,75	18,40
IB0557	11,44	11,77
IB0577	12,29	17,65

**Preglednica 42:** Primerjava rezultatov analiz s CV AAS in DMA za venozno kri

ID	CVAAS (ng/g)	DMA (ng/g)
IB0056	3,09	3,46
IB0127	2,73	3,46
IB0023	10,28	8,86
IB0051	6,40	7,64
IB0440	7,34	8,02
IB0443	7,23	7,82
IB0870	3,29	7,72
IB0026	9,92	11,49
IB0557	12,68	11,95
IB0577	10,54	13,97
IB0578	10,17	12,10



***Priloga 6:***

Rezultati meritev poskusa zamrzovanje/odmrzovanje vzorcev



***Priloga 6.1:***

Rezultati analiz venozne krvi





**Preglednica 43: Rezultati analiz odtajanje/zamrzovanje za venozno kri – 1. meritev**

vzorec		paralelka	1. meritev				standardna deviacija (ng/g)
			koncentracija (ng/g)	koncentracija (ng/g)	odklon (ng/g)	koncentracija (ng/g)	
referenčni material	Seronorm WB1 2,2 ± 0,2 ng/g	1. paralelka, n=2	1,93	1,88	0,05	1,93	0,08
			1,83				
		2. paralelka, n=2	2,02				
	PT-WB1 7,8 ± 0,9 ng/g	1. paralelka, n=2	1,92	1,97	0,05	6,54	0,19
			6,49				
		2. paralelka, n=2	6,39				
		6,82					
		6,44					
	ClinChek 8847 3,49 ± 0,7 ng/ml	1. paralelka, n=2	2,05	2,04	0,01	2,07	0,04
2,02							
2. paralelka, n=2		2,11					
nizko koncentracijsko območje	IB0056	1. paralelka, n=2	2,08	2,10	0,01	3,10	0,07
			3,19				
		2. paralelka, n=2	3,11				
		3,04					
	IB0127	1. paralelka, n=2	3,04	3,04	0,00	2,73	0,12
			2,76				
		2. paralelka, n=2	2,55				
		2,76					
	IB0349	1. paralelka, n=2	2,83	2,75	0,03	2,76	0,03
			2,77				
		2. paralelka, n=2	2,71				
		2,78					
	IB0429	1. paralelka, n=2	3,20	3,09	0,11	3,25	0,22
			2,98				
		2. paralelka, n=2	3,51				
	IB0486	1. paralelka, n=2	3,30	3,41	0,11	2,80	0,05
			2,80				
		2. paralelka, n=2	2,87				
2,77							
srednje koncentracijsko območje	IB0023	1. paralelka, n=2	2,77	2,77	0,00	10,28	0,30
			10,07				
		2. paralelka, n=2	10,07				
		10,71					
	IB0051	1. paralelka, n=2	10,28	10,50	0,22	6,40	0,12
			6,51				
		2. paralelka, n=2	6,42				
		6,23					
	IB0440	1. paralelka, n=2	6,42	6,33	0,09	7,34	0,26
			7,30				
		2. paralelka, n=2	7,00				
		7,62					
	IB0443	1. paralelka, n=2	7,44	7,15	0,15	7,23	0,13
			7,19				
		2. paralelka, n=2	7,10				
		7,40					
	IB0870	1. paralelka, n=2	7,21	7,31	0,10	3,29	0,09
			3,24				
2. paralelka, n=2		3,33					
3,19							
visoko koncentracijsko območje	IB0026	1. paralelka, n=2	3,39	3,29	0,10	9,92	0,10
			9,77				
		2. paralelka, n=2	9,97				
		9,96					
	IB0557	1. paralelka, n=2	9,96	9,96	0,00	10,54	0,19
			10,61				
		2. paralelka, n=2	10,61				
		10,25					
	IB0577	1. paralelka, n=2	10,67	10,46	0,21	12,68	0,38
			13,03				
		2. paralelka, n=2	12,99				
		12,40					
	IB0578	1. paralelka, n=2	12,30	12,35	0,05	10,17	0,23
			10,48				
		2. paralelka, n=2	10,17				
		9,92					
	IB0866	1. paralelka, n=2	10,12	10,33	0,16	14,32	0,52
			14,11				
2. paralelka, n=2		14,42					
13,77							
			14,99	14,38	0,61		

**Preglednica 44: Rezultati analiz odtajanje/zamrzovanje za venozno kri – 2. meritev**

vzorec		paralelka	2. meritev				standardna deviacija (ng/g)	
			koncentracija (ng/g)	koncentracija (ng/g)	odklon (ng/g)	koncentracija (ng/g)		
referenčni material	Seronorm WB1 2,2 ± 0,2 ng/g	1. paralelka, n=2	1,99	1,99	0,00	2,06	0,08	
			1,99					
		2. paralelka, n=2	2,10	2,13	0,03			
			2,16					
	PT-WB1 7,8 ± 0,9 ng/g	1. paralelka, n=2	6,71	6,71	0,00	6,56	0,22	
			6,71					
		2. paralelka, n=2	6,59	6,42	0,18			
			6,24					
	ClinChek 8847 3,49 ± 0,7 ng/ml	1. paralelka, n=2	2,32	2,23	0,10	2,20	0,09	
			2,13					
		2. paralelka, n=2	2,18	2,17	0,02			
			2,15					
nizko koncentracijsko območje	IB0056	1. paralelka, n=2	3,32	3,19	0,14	3,16	0,12	
			3,05					
		2. paralelka, n=2	3,16	3,13	0,04			
			3,09					
	IB0127	1. paralelka, n=2	2,64	2,54	0,11	2,53	0,12	
			2,43					
		2. paralelka, n=2	2,61	2,52	0,10			
			2,42					
	IB0349	1. paralelka, n=2	2,78	2,66	0,12	2,64	0,11	
			2,54					
		2. paralelka, n=2	2,57	2,61	0,04			
			2,65					
	IB0429	1. paralelka, n=2	3,00	3,04	0,04	3,06	0,04	
			3,08					
		2. paralelka, n=2	3,07	3,07	0,00			
			3,07					
	IB0486	1. paralelka, n=2	2,60	2,64	0,03	2,66	0,09	
			2,67					
		2. paralelka, n=2	2,78	2,68	0,11			
			2,57					
	srednje koncentracijsko območje	IB0023	1. paralelka, n=2	9,18	9,09	0,09	9,03	0,11
				8,99				
			2. paralelka, n=2	8,92	8,97	0,04		
				9,01				
IB0051		1. paralelka, n=2	6,86	6,91	0,05	6,94	0,10	
			6,96					
		2. paralelka, n=2	7,07	6,98	0,10			
			6,88					
IB0440		1. paralelka, n=2	6,99	6,90	0,09	6,94	0,09	
			6,81					
		2. paralelka, n=2	7,02	6,97	0,05			
			6,92					
IB0443		1. paralelka, n=2	6,92	6,98	0,06	7,03	0,11	
			7,03					
		2. paralelka, n=2	6,98	7,08	0,10			
			7,18					
IB0870		1. paralelka, n=2	3,70	3,60	0,10	3,49	0,16	
			3,50					
		2. paralelka, n=2	3,33	3,39	0,05			
			3,44					
visoko koncentracijsko območje		IB0026	1. paralelka, n=2	10,33	10,18	0,16	10,26	0,22
				10,02				
			2. paralelka, n=2	10,53	10,35	0,19		
				10,16				
	IB0557	1. paralelka, n=2	10,40	10,54	0,14	10,58	0,19	
			10,68					
		2. paralelka, n=2	10,44	10,62	0,18			
			10,80					
	IB0577	1. paralelka, n=2	12,76	12,37	0,40	12,13	0,45	
			11,97					
		2. paralelka, n=2	11,70	11,89	0,19			
			12,08					
	IB0578	1. paralelka, n=2	10,19	10,25	0,06	10,37	0,17	
			10,30					
		2. paralelka, n=2	10,60	10,49	0,12			
			10,37					
	IB0866	1. paralelka, n=2	14,62	14,67	0,05	14,67	0,06	
			14,71					
		2. paralelka, n=2	14,73	14,68	0,05			
			14,63					

**Preglednica 45: Rezultati meritev odtajanje/zamrzovanje za venozno kri – 3. meritev**

vzorec		paralelka	3. meritev				
			koncentracija (ng/g)	koncentracija (ng/g)	odklon (ng/g)	koncentracija (ng/g)	standardna deviacija (ng/g)
referenčni material	Seronorm WB1 2,2 ± 0,2 ng/g	1. paralelka, n=2	1,92	1,92	0,00	1,97	0,06
			1,92				
		2. paralelka, n=2	2,01	2,03	0,02		
			2,04				
	PT-WB1 7,8 ± 0,9 ng/g	1. paralelka, n=2	6,28	6,33	0,05	6,39	0,24
			6,38				
		2. paralelka, n=2	6,72	6,45	0,28		
			6,17				
	ClinChek 8847 3,49 ± 0,7 ng/ml	1. paralelka, n=2	2,16	2,11	0,06	2,12	0,05
			2,05				
		2. paralelka, n=2	2,16	2,13	0,03		
			2,10				
nizko koncentracijsko območje	IB0056	1. paralelka, n=2	3,27	3,27	0,00		
			3,27				
	2. paralelka, n=2						
	IB0127	1. paralelka, n=2	2,55	2,52	0,03	2,48	0,05
			2,48				
		2. paralelka, n=2	2,45	2,45	0,00		
			2,45				
	IB0349	1. paralelka, n=2	2,57	2,53	0,04	2,56	0,06
			2,49				
		2. paralelka, n=2	2,63	2,59	0,04		
			2,55				
	IB0429	1. paralelka, n=2	2,86	2,94	0,08	3,12	0,31
			3,02				
		2. paralelka, n=2	3,57	3,29	0,28		
			3,01				
	IB0486	1. paralelka, n=2	2,40	2,29	0,12		
			2,17				
2. paralelka, n=2							
srednje koncentracijsko območje	IB0023	1. paralelka, n=2	8,82	8,73	0,09	8,76	0,18
			8,63				
		2. paralelka, n=2	8,99	8,80	0,19		
			8,61				
	IB0051	1. paralelka, n=2	6,94	7,05	0,11	6,94	0,17
			7,16				
		2. paralelka, n=2	6,77	6,82	0,05		
			6,87				
	IB0440	1. paralelka, n=2	6,92	6,97	0,04	7,18	0,26
			7,01				
		2. paralelka, n=2	7,48	7,39	0,09		
			7,30				
	IB0443	1. paralelka, n=2	7,23	7,10	0,13	7,00	0,16
			6,97				
		2. paralelka, n=2	6,90	6,90	0,00		
			6,90				
	IB0870	1. paralelka, n=2	3,55	3,55	0,00	3,29	0,30
			3,55				
2. paralelka, n=2		3,08	3,03	0,05			
		2,98					
visoko koncentracijsko območje	IB0026	1. paralelka, n=2	10,04	10,37	0,33		
			10,69				
	2. paralelka, n=2						
	IB0557	1. paralelka, n=2	10,17	10,36	0,19	10,37	0,21
			10,55				
		2. paralelka, n=2	10,20	10,38	0,18		
			10,56				
	IB0577	1. paralelka, n=2	12,75	12,75	0,00	12,68	0,09
			12,75				
		2. paralelka, n=2	12,56	12,61	0,05		
			12,66				
	IB0578	1. paralelka, n=2	10,30	10,24	0,06	10,22	0,23
			10,18				
		2. paralelka, n=2	9,93	10,20	0,27		
			10,47				
	IB0866	1. paralelka, n=2	14,71	14,62	0,10	14,67	0,10
			14,52				
2. paralelka, n=2		14,73	14,73	0,00			
		14,73					



***Priloga 6.2:***

Rezultati analiz popkovne krvi



**Preglednica 46: Rezultati meritev odtajanje/zamrzovanje za popkovno kri – 1. meritev**

	Vzorec	paralelka	1. meritev				
			koncentracija (ng/g)	koncentracija (ng/g)	odklon (ng/g)	koncentracija (ng/g)	standardna deviacija (ng/g)
referenčni material	Seronorm WB1 2,2 ± 0,2 ng/g	1. paralelka, n=2	1,90	1,90	0,00	1,92	0,02
			1,90				
		2. paralelka, n=2	1,91	1,93	0,02		
			1,95				
	PT-WB1 7,8 ± 0,9 ng/g	1. paralelka, n=2	6,67	6,53	0,14	6,41	0,20
			6,39				
		2. paralelka, n=2	6,41	6,29	0,12		
			6,17				
	ClinChek 8847 3,49 ± 0,7 ng/ml	1. paralelka, n=2	2,09	2,06	0,03	2,09	0,04
2,03							
2. paralelka, n=2		2,11	2,11	0,00			
		2,11					
nizko koncentracijsko območje	IB0056	1. paralelka, n=2	5,33	5,00	0,33	4,99	0,27
			4,67				
		2. paralelka, n=2	4,97	4,97	0,00		
			4,97				
	IB0127	1. paralelka, n=2	4,95	5,01	0,05	5,02	0,07
			5,06				
		2. paralelka, n=2	5,09	5,04	0,05		
			4,98				
	IB0349	1. paralelka, n=2	5,34	5,10	0,24	5,09	0,20
			4,86				
		2. paralelka, n=2	5,07	5,07	0,00		
			5,07				
	IB0429	1. paralelka, n=2	5,07	4,92	0,16	4,94	0,13
			4,76				
		2. paralelka, n=2	4,97	4,97	0,00		
			4,97				
	IB0486	1. paralelka, n=2	3,96	3,96	0,00	3,91	0,11
			3,96				
2. paralelka, n=2		3,75	3,86	0,11			
		3,75					
srednje koncentracijsko območje	IB0023	1. paralelka, n=2	17,15	17,15	0,00	17,18	0,05
			17,15				
		2. paralelka, n=2	17,25	17,21	0,04		
			17,16				
	IB0051	1. paralelka, n=2	9,55	9,50	0,06	9,38	0,14
			9,44				
		2. paralelka, n=2	9,27	9,27	0,00		
			9,27				
	IB0440	1. paralelka, n=2	11,64	11,59	0,06	11,58	0,06
			11,53				
		2. paralelka, n=2	11,52	11,58	0,06		
			11,63				
	IB0443	1. paralelka, n=2	11,33	11,43	0,10	11,56	0,21
			11,53				
		2. paralelka, n=2	11,55	11,70	0,15		
			11,84				
	IB0870	1. paralelka, n=2	10,67	10,41	0,26	10,60	0,33
			10,15				
2. paralelka, n=2		10,63	10,79	0,15			
		10,94					
visoko koncentracijsko območje	IB0026	1. paralelka, n=2	14,76	14,83	0,07	14,75	0,23
			14,89				
		2. paralelka, n=2	14,42	14,68	0,26		
			14,93				
	IB0557	1. paralelka, n=2	9,07	9,13	0,05	9,02	0,18
			9,18				
		2. paralelka, n=2	8,76	8,91	0,15		
			9,06				
	IB0577	1. paralelka, n=2	11,95	12,25	0,30	12,29	0,25
			12,55				
		2. paralelka, n=2	12,32	12,32	0,00		
			12,32				
	IB0578	1. paralelka, n=2	31,25	31,02	0,23	30,94	0,24
			30,78				
		2. paralelka, n=2	30,72	30,87	0,15		
			31,01				
	IB0866	1. paralelka, n=2	31,63	31,27	0,37	30,97	0,49
			30,90				
2. paralelka, n=2		30,44	30,68	0,24			
		30,92					



**Preglednica 47: Rezultati meritev odtajanje/zamrzovanje za popkovno kri – 2. meritev**

Vzorec	paralelka	2. meritev					standardna deviacija (ng/g)	
		koncentracija (ng/g)	koncentracija (ng/g)	odklon (ng/g)	koncentracija (ng/g)			
referenčni material	Seronorm WB1 2,2 ± 0,2 ng/g	1. paralelka, n=2	1,88	1,87	0,01	1,90	0,05	
			1,85					
		2. paralelka, n=2	1,94	1,94	0,00			
			1,94					
	PT-WB1 7,8 ± 0,9 ng/g	1. paralelka, n=2	6,19	6,05	0,14	6,24	0,32	
			5,91					
		2. paralelka, n=2	6,18	6,43	0,25			
			6,67					
	ClinChek 8847 3,49 ± 0,7 ng/ml	1. paralelka, n=2	2,12	2,11	0,02	2,10	0,02	
			2,09					
		2. paralelka, n=2	2,12	2,10	0,03			
			2,07					
nizko koncentracijsko območje	IB0056	1. paralelka, n=2	4,79	4,71	0,09	4,93	0,28	
			4,62					
		2. paralelka, n=2	5,26	5,16	0,10			
			5,06					
	IB0127	1. paralelka, n=2	4,91	4,81	0,10	4,80	0,13	
			4,71					
		2. paralelka, n=2	4,67	4,80	0,13			
			4,92					
	IB0349	1. paralelka, n=2	5,29	5,24	0,05	5,24	0,04	
			5,19					
		2. paralelka, n=2	5,24	5,24	0,00			
			5,24					
	IB0429	1. paralelka, n=2	4,94	5,04	0,09	5,06	0,13	
			5,13					
		2. paralelka, n=2	4,95	5,08	0,13			
			5,21					
	IB0486	1. paralelka, n=2	3,62	3,62	0,00	3,57	0,07	
			3,62					
		2. paralelka, n=2	3,48	3,53	0,04			
			3,57					
	srednje koncentracijsko območje	IB0023	1. paralelka, n=2	16,55	16,32	0,24	16,60	0,38
				16,08				
			2. paralelka, n=2	16,88	16,88	0,00		
				16,88				
IB0051		1. paralelka, n=2	8,87	8,99	0,12	9,11	0,18	
			9,11					
		2. paralelka, n=2	9,30	9,24	0,07			
			9,17					
IB0440		1. paralelka, n=2	11,92	11,87	0,05	12,01	0,20	
			11,81					
		2. paralelka, n=2	12,02	12,15	0,13			
			12,27					
IB0443		1. paralelka, n=2	11,07	11,20	0,13	10,76	0,86	
			11,32					
		2. paralelka, n=2	9,48	10,32	0,84			
			11,15					
IB0870		1. paralelka, n=2	10,33	10,45	0,12	10,43	0,23	
			10,57					
		2. paralelka, n=2	10,15	10,40	0,25			
			10,65					
visoko koncentracijsko območje		IB0026	1. paralelka, n=2	14,42	14,68	0,26	14,97	0,40
				14,94				
			2. paralelka, n=2	15,28	15,27	0,01		
				15,25				
	IB0557	1. paralelka, n=2	8,87	9,11	0,24	8,88	0,48	
			9,35					
		2. paralelka, n=2	8,23	8,65	0,42			
			9,07					
	IB0577	1. paralelka, n=2	11,77	11,77	0,00	11,83	0,18	
			11,77					
		2. paralelka, n=2	11,68	11,88	0,20			
			12,08					
	IB0578	1. paralelka, n=2	31,46	30,67	0,79	30,70	0,74	
			29,88					
		2. paralelka, n=2	31,17	30,73	0,44			
			30,29					
	IB0866	1. paralelka, n=2	29,23	29,68	0,45	29,44	0,74	
			30,12					
		2. paralelka, n=2	28,49	29,20	0,71			
			29,91					

**Preglednica 48: Rezultati meritev odtajanje/zamrzovanje za popkovno kri – 3. meritev**

	Vzorec	paralelka	3. meritev					
			koncentracija (ng/g)	koncentracija (ng/g)	odklon (ng/g)	koncentracija (ng/g)	standardna deviacija (ng/g)	
referenčni material	Seronorm WB1 2,2 ± 0,2 ng/g	1. paralelka, n=2	1,78	1,77	0,02	1,83	0,08	
			1,75					
		2. paralelka, n=2	1,90	1,90	0,00			
			1,90					
	PT-WB1 7,8 ± 0,9 ng/g	1. paralelka, n=2	6,31	6,26	0,05	6,32	0,15	
			6,20					
		2. paralelka, n=2	6,53	6,38	0,16			
			6,22					
	ClinChek 8847 3,49 ± 0,7 ng/ml	1. paralelka, n=2	3,29	3,30	0,01	3,20	0,20	
			3,31					
		2. paralelka, n=2	3,29	3,09	0,20			
			2,89					
nizko koncentracijsko območje	IB0056	1. paralelka, n=2	4,76	4,72	0,04	4,67	0,12	
			4,67					
		2. paralelka, n=2	4,75	4,62	0,13			
			4,49					
	IB0127	1. paralelka, n=2	4,90	4,95	0,04	4,90	0,10	
			4,99					
		2. paralelka, n=2	4,94	4,85	0,09			
			4,76					
	IB0349	1. paralelka, n=2	4,95	4,95	0,00	5,13	0,25	
			4,95					
		2. paralelka, n=2	5,49	5,32	0,18			
			5,14					
	IB0429	1. paralelka, n=2	3,74	4,15	0,41	4,48	0,52	
			4,56					
		2. paralelka, n=2	4,72	4,82	0,10			
			4,91					
	IB0486	1. paralelka, n=2	3,47	3,61	0,14	3,53	0,44	
			3,75					
		2. paralelka, n=2	3,96	3,46	0,51			
			2,95					
	srednje koncentracijsko območje	IB0023	1. paralelka, n=2	16,76	16,83	0,06	16,98	0,18
				16,89				
			2. paralelka, n=2	17,13	17,13	0,00		
				17,13				
IB0051		1. paralelka, n=2	8,89	8,89	0,00	9,20	0,36	
			8,89					
		2. paralelka, n=2	9,58	9,51	0,07			
			9,44					
IB0440		1. paralelka, n=2	11,98	12,19	0,21	12,26	0,26	
			12,40					
		2. paralelka, n=2	12,55	12,34	0,22			
			12,12					
IB0443		1. paralelka, n=2	10,90	11,04	0,14	11,30	0,65	
			11,17					
		2. paralelka, n=2	12,25	11,57	0,69			
			10,88					
IB0870		1. paralelka, n=2	11,06	10,71	0,35	10,58	0,35	
			10,36					
		2. paralelka, n=2	10,30	10,46	0,15			
			10,61					
visoko koncentracijsko območje		IB0026	1. paralelka, n=2	15,90	16,08	0,18	15,90	0,28
				16,26				
			2. paralelka, n=2	15,58	15,71	0,13		
				15,84				
	IB0557	1. paralelka, n=2	9,08	9,28	0,20	9,22	0,29	
			9,48					
		2. paralelka, n=2	9,44	9,16	0,28			
			8,88					
	IB0577	1. paralelka, n=2	11,83	11,77	0,07	11,60	0,29	
			11,70					
		2. paralelka, n=2	11,67	11,43	0,25			
			11,18					
	IB0578	1. paralelka, n=2	29,48	29,84	0,36	30,29	0,65	
			30,19					
		2. paralelka, n=2	30,43	30,74	0,31			
			31,04					
	IB0866	1. paralelka, n=2	29,76	29,87	0,11	29,99	0,50	
			29,98					
		2. paralelka, n=2	29,52	30,10	0,58			
			30,68					



***Priloga 6.3:***

Rezultati analiz materinega mleka



**Preglednica 49: Rezultati meritev odtajanje/zamrzovanje za mleko – 1. meritev**

Vzorec		paralelka	1. meritev				standardna deviacija (ng/mL)
			koncentracija (ng/mL)	koncentracija (ng/mL)	odklon (ng/mL)	koncentracija (ng/mL)	
referenčni material	NIST 1549 $0,3 \pm 0,2$ ng/g	1. paralelka, n=2	0,55	0,51	0,05	0,41	0,12
			0,46				
		2. paralelka, n=2	0,31	0,31	0,00		
			0,31				
	BCR 150 $9,4 \pm 1,17$ ng/g	1. paralelka, n=2	7,12	7,12	0,00	7,27	0,22
			7,12				
		2. paralelka, n=2	7,59	7,42	0,18		
			7,24				
	ClinChek 8847 $3,49 \pm 0,7$ ng/mL	1. paralelka, n=2	2,08	2,03	0,05	2,03	0,05
			1,98				
		2. paralelka, n=2	2,00	2,03	0,02		
			2,05				
nizko koncentracijsko območje	IB0056	1. paralelka, n=2	0,24	0,24	0,00	0,24	0,00
			0,24				
		2. paralelka, n=2	0,24	0,24	0,00		
			0,24				
	IB0127	1. paralelka, n=2	0,11	0,12	0,01	0,12	0,01
			0,12				
		2. paralelka, n=2	0,11	0,12	0,01		
			0,13				
	IB0349	1. paralelka, n=2	0,19	0,19	0,00	0,19	0,01
			0,19				
		2. paralelka, n=2	0,19	0,18	0,01		
			0,17				
	IB0429	1. paralelka, n=2	1,03	1,04	0,01	0,85	0,22
			1,04				
		2. paralelka, n=2	0,66	0,66	0,01		
			0,65				
srednje koncentracijsko območje	IB0023	1. paralelka, n=2	0,44	0,42	0,03	0,41	0,02
			0,39				
		2. paralelka, n=2	0,41	0,41	0,00		
			0,41				
	IB0443	1. paralelka, n=2	0,22			0,21	0,01
		2. paralelka, n=2	0,20	0,20	0,00		
			0,20				
IB0870	1. paralelka, n=2	0,28	0,29	0,01	0,29	0,01	
		0,30					
	2. paralelka, n=2	0,27	0,28	0,01			
		0,29					
visoko koncentracijsko območje	IB0026	1. paralelka, n=2	0,65	0,65	0,00	0,68	0,04
			0,65				
		2. paralelka, n=2	0,73	0,72	0,02		
			0,70				
	IB0578	1. paralelka, n=2	0,55	0,55	0,00	0,55	0,01
			0,55				
		2. paralelka, n=2	0,54	0,55	0,01		
			0,55				
	IB0866	1. paralelka, n=2	0,45	0,45	0,00	0,46	0,02
			0,45				
		2. paralelka, n=2	0,46	0,48	0,02		
			0,49				

**Preglednica 50: Rezultati meritev odtajanje/zamrzovanje za mleko – 2. meritev**

Vzorec		paralelka	2. meritev				standardna deviacija (ng/mL)
			koncentracija (ng/mL)	koncentracija (ng/mL)	odklon (ng/mL)	koncentracija (ng/mL)	
referenčni material	NIST 1549 0,3 ± 0,2 ng/g	1. paralelka, n=2	0,30	0,30	0,00	0,37	0,08
			0,30				
		2. paralelka, n=2	0,43	0,44	0,01		
			0,45				
	BCR 150 9,4 ± 1,17 ng/g	1. paralelka, n=2	7,66	7,66	0,00	7,72	0,08
			7,66				
		2. paralelka, n=2	7,74	7,78	0,04		
			7,82				
	ClinChek 8847 3,49 ± 0,7 ng/mL	1. paralelka, n=2	2,20	2,16	0,04	2,16	0,03
			2,12				
		2. paralelka, n=2	2,15	2,15	0,00		
			2,15				
nizko koncentracijsko območje	IB0056	1. paralelka, n=2	0,24	0,23	0,01	0,26	0,03
			0,22				
		2. paralelka, n=2	0,30	0,28	0,02		
			0,26				
	IB0127	1. paralelka, n=2	0,11	0,11	0,00	0,10	0,01
			0,11				
		2. paralelka, n=2	0,09	0,09	0,00		
			0,09				
	IB0349	1. paralelka, n=2	0,14	0,15	0,00	0,16	0,01
			0,15				
		2. paralelka, n=2	0,17	0,17	0,00		
			0,17				
	IB0429	1. paralelka, n=2	0,66	0,65	0,01	0,67	0,03
			0,64				
		2. paralelka, n=2	0,70	0,69	0,02		
			0,67				
srednje koncentracijsko območje	IB0023	1. paralelka, n=2	0,30	0,30	0,01	0,29	0,01
			0,29				
		2. paralelka, n=2	0,29	0,29	0,00		
			0,28				
	IB0443	1. paralelka, n=2	0,20	0,19	0,02	0,17	0,03
			0,17				
		2. paralelka, n=2	0,14	0,15	0,01		
			0,16				
	IB0870	1. paralelka, n=2	0,31	0,31	0,00	0,30	0,01
			0,31				
		2. paralelka, n=2	0,30	0,29	0,01		
			0,28				
visoko koncentracijsko območje	IB0026	1. paralelka, n=2	0,73	0,72	0,01	0,73	0,01
			0,71				
		2. paralelka, n=2	0,73	0,74	0,01		
			0,74				
	IB0578	1. paralelka, n=2	0,59	0,60	0,01	0,58	0,03
			0,61				
		2. paralelka, n=2	0,53	0,56	0,03		
			0,59				
	IB0866	1. paralelka, n=2	0,49	0,49	0,01	0,48	0,01
			0,48				
		2. paralelka, n=2	0,48	0,48	0,00		
			0,48				

**Preglednica 51: Rezultati meritev odtajanje/zamrzovanje za mleko – 3. meritev**

Vzorec		paralelka	3. meritev							
			koncentracija (ng/mL)	koncentracija (ng/mL)	odklon (ng/mL)	koncentracija (ng/mL)	standardna deviacija (ng/mL)			
referenčni material	NIST 1549 0,3 ± 0,2 ng/g	1. paralelka, n=2	0,49	0,51	0,02	0,51	0,02			
			0,53							
		2. paralelka, n=2	0,51							
			0,51							
		BCR 150 9,4 ± 1,17 ng/g	1. paralelka, n=2	6,82	6,99			0,17	7,06	0,31
				7,15						
	2. paralelka, n=2		6,80	7,13	0,33					
			7,45							
	ClinChek 8847 3,49 ± 0,7 ng/mL		1. paralelka, n=2	2,07	2,05	0,02	2,07	0,06		
				2,02						
		2. paralelka, n=2	2,15	2,10	0,05					
			2,05							
nizko koncentracijsko območje		IB0056	1. paralelka, n=2	0,27	0,26	0,01			0,26	0,01
				0,25						
	2. paralelka, n=2		0,27	0,27	0,01					
			0,26							
	IB0127	1. paralelka, n=2	0,13	0,13	0,00	0,12	0,02			
			0,13							
		2. paralelka, n=2	0,13	0,12	0,02					
			0,10							
	IB0349	1. paralelka, n=2	0,19	0,19	0,00	0,19	0,01			
			0,19							
		2. paralelka, n=2	0,19	0,19	0,01					
			0,18							
	IB0429	1. paralelka, n=2	0,62	0,64	0,02	0,64	0,01			
			0,65							
		2. paralelka, n=2	0,64	0,65	0,01					
			0,65							
	srednje koncentracijsko območje	IB0023	1. paralelka, n=2	0,34	0,34	0,00	0,34	0,00		
				0,34						
2. paralelka, n=2			0,34	0,34	0,00					
			0,34							
IB0443		1. paralelka, n=2	0,17	0,19	0,02	0,18	0,03			
			0,20							
		2. paralelka, n=2	0,20	0,17	0,04					
			0,13							
IB0870		1. paralelka, n=2	0,21	0,25	0,04	0,27	0,04			
			0,28							
		2. paralelka, n=2	0,30	0,30	0,00					
			0,30							
visoko koncentracijsko območje	IB0026	1. paralelka, n=2	0,76	0,77	0,01	0,78	0,01			
			0,78							
		2. paralelka, n=2	0,78	0,78	0,00					
			0,78							
	IB0578	1. paralelka, n=2	0,52	0,54	0,02	0,55	0,02			
			0,56							
		2. paralelka, n=2	0,54	0,55	0,01					
			0,56							
	IB0866	1. paralelka, n=2	0,47	0,48	0,01	0,48	0,01			
			0,48							
		2. paralelka, n=2	0,49	0,49	0,01					
			0,48							





***Priloga 6.4:***

Rezultati analiz urina



**Preglednica 52: Rezultati meritev odtajanje/zamrzovanje za urin – 1. meritev**

Vzorec		paralelka	1. meritev				standardna deviacija (ng/mL)
			koncentracija (ng/mL)	koncentracija (ng/mL)	odklon (ng/mL)	koncentracija (ng/mL)	
referenčni material	Seronorm urine blank 0,22 ± 0,2 ng/g	1. paralelka, n=2	0,10	0,11	0,01	0,11	0,01
			0,11				
		2. paralelka, n=2	0,11				
			0,10				
	ClinChek 8847 3,49 ± 0,7 ng/mL	1. paralelka, n=2	2,37	2,37	0,00	2,35	
			2,37				
2. paralelka, n=2		2,37					
		2,30					
nizko območje	IB0056	1. paralelka, n=2	1,17	1,15	0,02	1,27	
			1,13				
		2. paralelka, n=2	1,39				
			1,37				
	IB0127	1. paralelka, n=2	0,97	1,00	0,03	1,00	
			1,02				
		2. paralelka, n=2	1,01				
			0,99				
	IB0349	1. paralelka, n=2	0,38	0,38	0,00	0,39	
			0,38				
		2. paralelka, n=2	0,38				
			0,43				
	IB0429	1. paralelka, n=2	0,41	0,42	0,01	0,41	
			0,42				
		2. paralelka, n=2	0,41				
			0,41				
	IB0486	1. paralelka, n=2	0,08	0,08	0,00	0,08	
			0,08				
		2. paralelka, n=2	0,06				
			0,08				
	srednje območje	IB0023	1. paralelka, n=2	2,80	2,78	0,02	2,84
				2,76			
			2. paralelka, n=2	2,89			
				2,91			
IB0051		1. paralelka, n=2	1,64	1,63	0,01	1,65	
			1,62				
		2. paralelka, n=2	1,66				
			1,69				
IB0440		1. paralelka, n=2	1,79	1,80	0,01	1,83	
			1,81				
		2. paralelka, n=2	1,81				
			1,89				
IB0443	1. paralelka, n=2	1,19	1,19	0,00	1,16		
		1,19					
	2. paralelka, n=2	1,15					
		1,11					
IB0870	1. paralelka, n=2	1,01	1,01	0,00	1,01		
		1,01					
	2. paralelka, n=2	0,99					
		1,01					
visoko območje	IB0026	1. paralelka, n=2	1,24	1,29	0,05	1,32	
			1,33				
		2. paralelka, n=2	1,30				
			1,39				
	IB0557	1. paralelka, n=2	0,92	0,94	0,02	0,95	
			0,95				
		2. paralelka, n=2	0,95				
			0,97				
	IB0577	1. paralelka, n=2	0,88	0,92	0,04	0,93	
			0,95				
		2. paralelka, n=2	0,92				
			0,95				
	IB0578	1. paralelka, n=2	2,34	2,33	0,01	2,33	
			2,32				
		2. paralelka, n=2	2,32				
			2,32				
IB0866	1. paralelka, n=2	2,32	2,33	0,01	2,33		
		2,34					
	2. paralelka, n=2	2,32					
		2,34					

**Preglednica 53: Rezultati meritev odtajanje/zamrzovanje za mleko – 2. meritev**

Vzorec		paralelka	2. meritev				standardna deviacija (ng/mL)
			koncentracija (ng/mL)	koncentracija (ng/mL)	odklon (ng/mL)	koncentracija (ng/mL)	
referenčni material	Seronorm urine blank 0,22 ± 0,2 ng/g	1. paralelka, n=2	0,11	0,12	0,01	0,13	0,02
			0,13				
		2. paralelka, n=2	0,14				
			0,15				
	ClinChek 8847 3,49 ± 0,7 ng/mL	1. paralelka, n=2	2,51	2,38	0,13	2,32	
			2,25				
		2. paralelka, n=2	2,25	2,25	0,00		
			2,25				
nizko območje	IB0056	1. paralelka, n=2	1,66	1,66	0,00	1,64	
			1,66				
		2. paralelka, n=2	1,63	1,61	0,02		
			1,59				
	IB0127	1. paralelka, n=2	1,17	1,20	0,03	1,20	
			1,23				
		2. paralelka, n=2	1,19	1,19	0,00		
			1,19				
	IB0349	1. paralelka, n=2	0,41	0,41	0,00	0,39	
			0,41				
		2. paralelka, n=2	0,36	0,37	0,01		
			0,37				
	IB0429	1. paralelka, n=2	0,46	0,45	0,01	0,46	
			0,44				
		2. paralelka, n=2	0,49	0,48	0,02		
			0,46				
	IB0486	1. paralelka, n=2	0,07	0,08	0,01	0,09	
			0,08				
		2. paralelka, n=2	0,11	0,11	0,01		
			0,10				
srednje območje	IB0023	1. paralelka, n=2	2,99	3,02	0,03	2,98	
			3,05				
		2. paralelka, n=2	2,94	2,93	0,01		
			2,92				
	IB0051	1. paralelka, n=2	1,89	1,91	0,02	1,95	
			1,93				
		2. paralelka, n=2	1,95	2,00	0,05		
			2,04				
	IB0440	1. paralelka, n=2	1,78	1,79	0,01	1,86	
			1,80				
		2. paralelka, n=2	1,95	1,92	0,03		
			1,89				
	IB0443	1. paralelka, n=2	1,11	1,12	0,01	1,13	
			1,13				
		2. paralelka, n=2	1,15	1,14	0,01		
			1,13				
	IB0870	1. paralelka, n=2	1,04	1,01	0,03	1,03	
			0,98				
		2. paralelka, n=2	1,11	1,06	0,06		
			1,00				
visoko območje	IB0026	1. paralelka, n=2	1,51	1,52	0,01	1,48	
			1,53				
		2. paralelka, n=2	1,42	1,43	0,01		
			1,44				
	IB0557	1. paralelka, n=2	1,02	1,01	0,01	1,01	
			1,00				
		2. paralelka, n=2	0,98	1,00	0,02		
			1,02				
	IB0577	1. paralelka, n=2	0,94	0,92	0,02	0,92	
			0,90				
		2. paralelka, n=2	0,94	0,92	0,02		
			0,90				
	IB0578	1. paralelka, n=2	2,36	2,39	0,03	2,38	
			2,42				
		2. paralelka, n=2	2,33	2,38	0,04		
			2,42				
	IB0866	1. paralelka, n=2	2,49	2,49	0,00	2,46	
			2,49				
		2. paralelka, n=2	2,40	2,42	0,02		
			2,44				

**Preglednica 54: Rezultati meritev odtajanje/zamrzovanje za mleko – 3. meritev**

Vzorec		paralelka	3. meritev				standardna deviacija (ng/mL)	
			koncentracija (ng/mL)	koncentracija (ng/mL)	odklon (ng/mL)	koncentracija (ng/mL)		
referenčni material	Seronorm urine blank 0,22 ± 0,2 ng/g	1. paralelka, n=2	0,14	0,14	0,00	0,14	0,01	
			0,14					
		2. paralelka, n=2	0,14	0,13	0,01			
			0,12					
	ClinChek 8847 3,49 ± 0,7 ng/mL	1. paralelka, n=2	2,25	2,23	0,02	2,20	0,08	
			2,21					
		2. paralelka, n=2	2,09	2,17	0,08			
			2,25					
nizko območje	IB0056	1. paralelka, n=2	1,51	1,53	0,02	1,50	0,04	
			1,55					
		2. paralelka, n=2	1,47	1,46	0,01			
			1,45					
	IB0127	1. paralelka, n=2	1,15	1,17	0,02	1,19	0,03	
			1,19					
		2. paralelka, n=2	1,19	1,20	0,01			
			1,21					
	IB0349	1. paralelka, n=2	0,44	0,44	0,00	0,42	0,03	
			0,44					
		2. paralelka, n=2	0,42	0,40	0,02			
			0,38					
	IB0429	1. paralelka, n=2	0,51	0,49	0,02	0,48	0,03	
			0,47					
		2. paralelka, n=2	0,45	0,46	0,01			
			0,47					
	IB0486	1. paralelka, n=2	0,10	0,09	0,02	0,07	0,03	
			0,07					
		2. paralelka, n=2	0,04	0,05	0,01			
			0,06					
	srednje območje	IB0023	1. paralelka, n=2	2,71	2,68	0,03	2,75	0,09
				2,65				
			2. paralelka, n=2	2,78	2,82	0,04		
				2,86				
IB0051		1. paralelka, n=2	1,91	1,91	0,00	1,88	0,05	
			1,91					
		2. paralelka, n=2	1,87	1,84	0,03			
			1,81					
IB0440		1. paralelka, n=2	1,85	1,89	0,04	1,87	0,04	
			1,93					
		2. paralelka, n=2	1,83	1,84	0,01			
			1,85					
IB0443		1. paralelka, n=2	1,07	1,08	0,01	1,10	0,02	
			1,09					
		2. paralelka, n=2	1,11	1,11	0,00			
			1,11					
IB0870		1. paralelka, n=2	1,09	1,06	0,03	1,06	0,03	
			1,03					
		2. paralelka, n=2	1,05	1,06	0,01			
			1,07					
visoko območje		IB0026	1. paralelka, n=2	1,49	1,47	0,02	1,47	0,02
				1,45				
			2. paralelka, n=2	1,45	1,46	0,01		
				1,47				
	IB0557	1. paralelka, n=2	0,97	0,96	0,01	0,93	0,04	
			0,95					
		2. paralelka, n=2	0,89	0,90	0,01			
			0,91					
	IB0577	1. paralelka, n=2	0,89	0,87	0,02	0,89	0,03	
			0,85					
		2. paralelka, n=2	0,91	0,90	0,01			
			0,89					
	IB0578	1. paralelka, n=2	2,38	2,39	0,01	2,43	0,05	
			2,40					
		2. paralelka, n=2	2,47	2,47	0,00			
			2,47					
	IB0866	1. paralelka, n=2	2,38	2,35	0,03	2,36	0,03	
			2,32					
		2. paralelka, n=2	2,36	2,37	0,01			
			2,38					

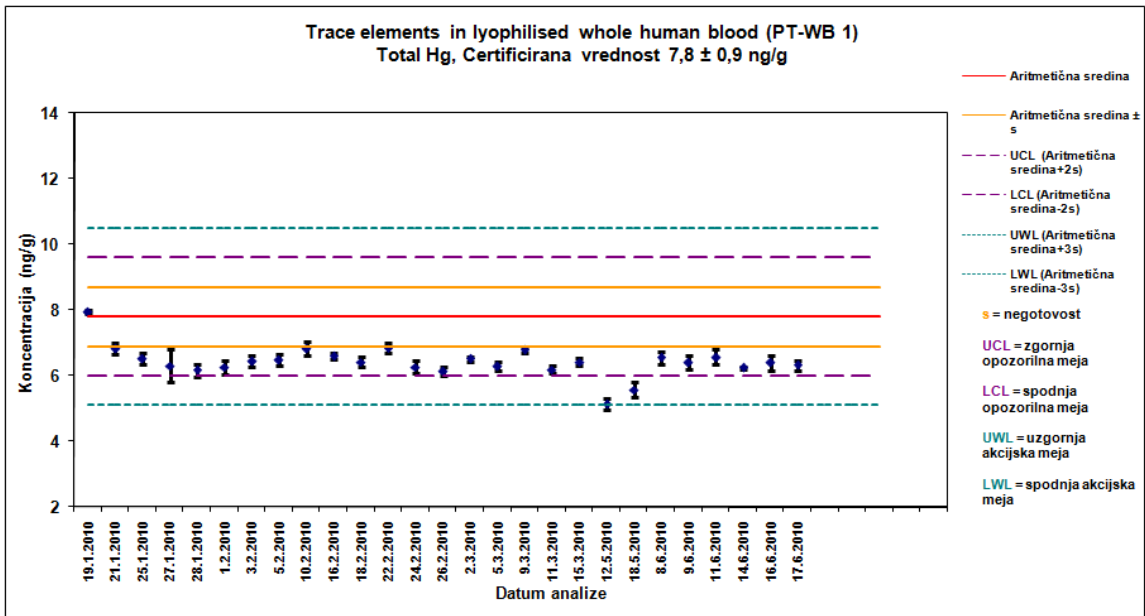


***Priloga 7:***

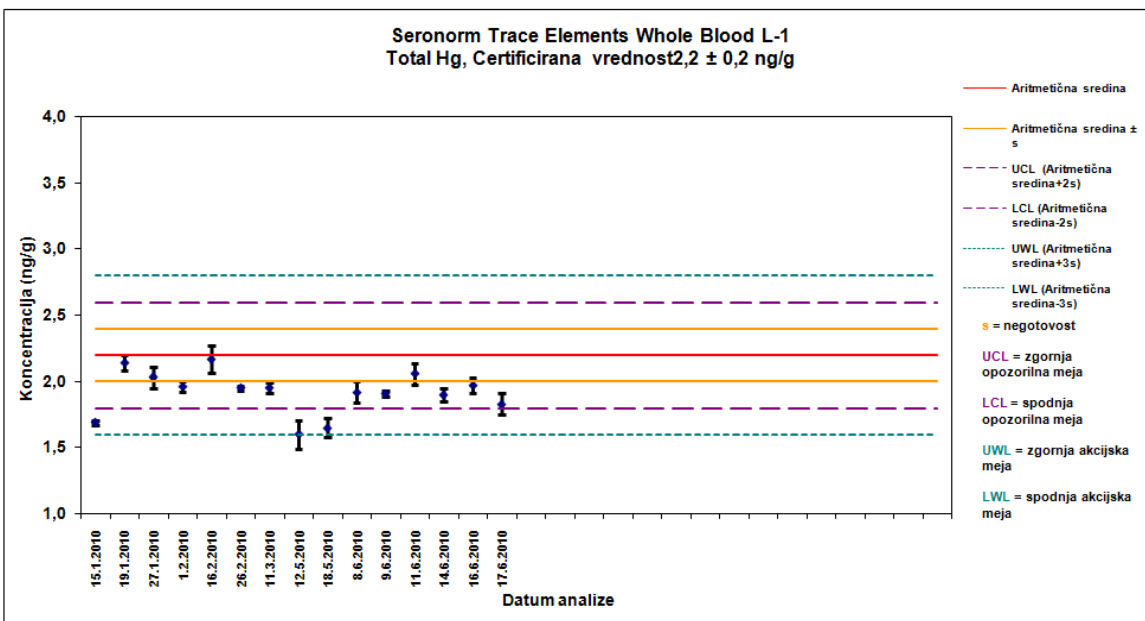
Kontrolne karte za referenčne materiale



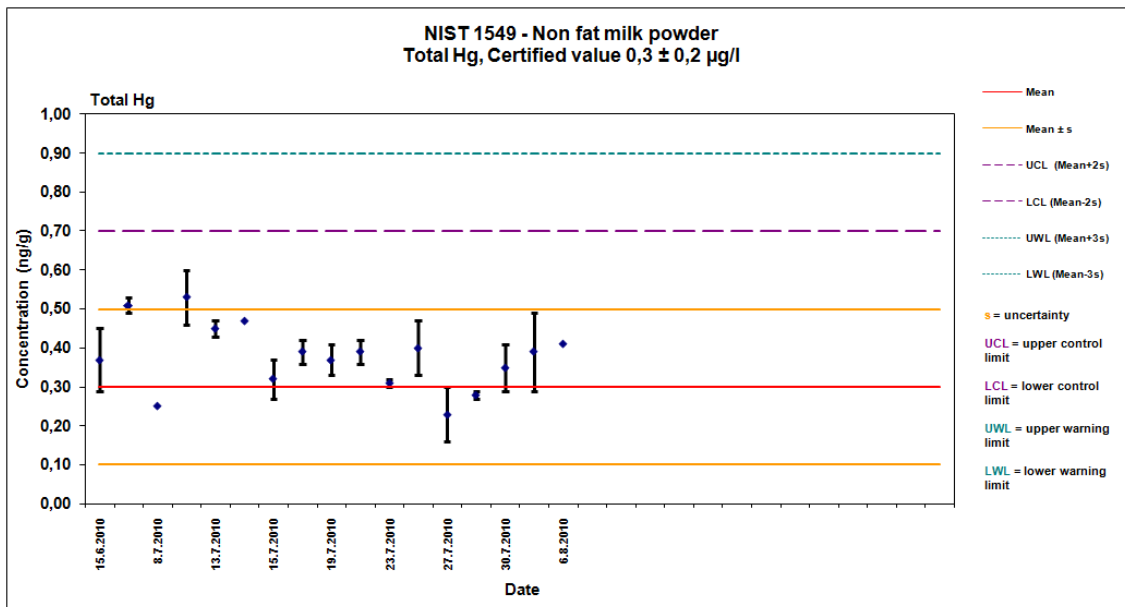




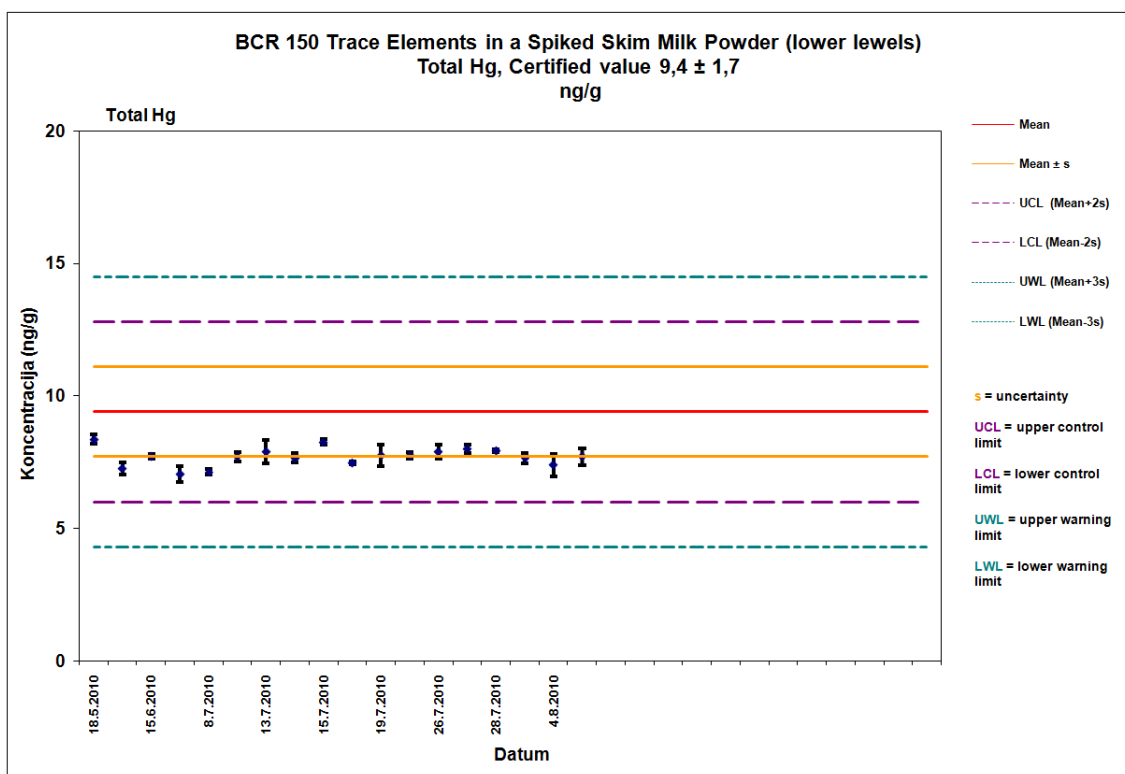
**Slika 39:** Kontrolna karta za referenčni material za kri



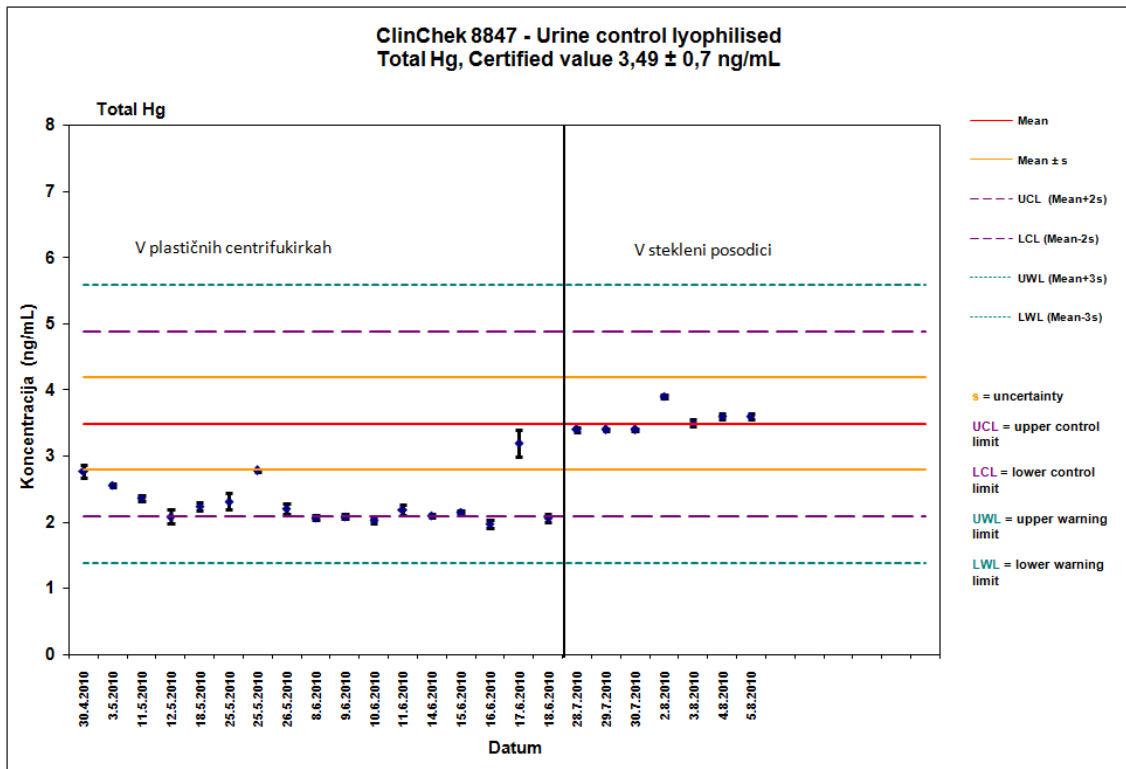
**Slika 40:** Kontrolna karta za referenčni material za kri



**Slika 41:** Kontrolna karta za referenčni material za mleko



**Slika 42:** Kontrolna karta za referenčni material za mleko



**Slika 43:** Kontrolna karta za referenčni material za urin



***Priloga 8:***

Rezultati meritev Hg pri preiskovani populaciji



**Preglednica 55: Rezultati meritev Hg pri preiskovani populaciji**

Matere	KRI		LASJE	MLEKO	URIN		
ID	Hg [ng/g]	Hg [ng/mL]	Hg [ng/g]	Hg [ng/g]	THg [ng/g]	kreatinin mmol/L	THg [µg/g kreatinina]
B1F001	2,66	2,81	/	/	/	/	/
B1F002	0,26	0,28	27,2	0,15	0,21	2,96	0,63
B1F003	0,99	1,05	203	0,46	3,48	9,1	3,38
B1F004	0,69	0,73	155	0,17	0,19	2,55	0,66
B1F005	1,07	1,13	656	0,18	0,16	1,95	0,73
B1F006	2,71	2,87	1220	0,34	0,44	6,93	0,56
B1F007 (400135)	2,92	3,09	468	0,39	1,05	4,95	1,88
B1F008	/	/	/	/	/	/	/
B1F009	/	/	/	/	/	/	/
B1F010 (400419)	3,21	3,40	1660	1,27	4,62	6,56	6,23
B1F011	1,03	1,09		0,50	2,39	8,61	2,45
B1F012 (400487)	2,43	2,57	604	0,23	0,77	6,28	1,08
B1F013 (400486)	1,52	1,61	669	0,71	2,02	6,56	2,72
B1F014 (400506)	1,32	1,40	200	0,52	2,67	6,86	3,44
B1F015 (400511)	0,98	1,04	304	0,07	0,11	3,97	0,24
B1F016	/	/	/	/	/	/	/
B1F017 (400532)	2,22	2,35	885	0,19	0,37	4,10	0,80
B1F018	/	/	/	/	/	/	/
B1F019	/	/	/	/	/	/	/
B1F020	/	/	/	/	/	/	/
B1F021	0,75	0,79	75	0,11	0,01	1,4	0,06
B1F022	/	/	/	/	/	/	/
B1F023	/	/	/	/	/	/	/
B1F024	/	/	/	/	/	/	/
B1F025	/	/	/	/	/	/	/
B1F026	1,81		94	0,25	0,17	3,16	0,48
B1F027	/	/	/	/	/	/	/
B1F028	0,60	0,63	329	0,06	0,10	10,11	0,09
B1F029	/	/	/	/	/	/	/
B1F030	/	/	/	/	/	/	/
B1F031	/	/	/	/	/	/	/
B1F032	0,30	0,32	780	0,12	0,14	3,24	0,38
B1F033	1,23	1,30		0,15	0,27	3,46	0,69
B1F034	1,53	1,62	524	0,55	2,05	7,52	2,41
B1F035	/	/	/	/	/	/	/
B1F036	/	/	/	/	/	/	/
B1F037	1,62	1,71	831	0,38	0,32	2,29	1,24
B1F038	/	/	/	/	/	/	/
B1F039	/	/	/	/	/	/	/
B1F040	0,91	0,96	458	0,19	0,19	2,52	0,67
B1F041	1,51	1,60	483	0,50	2,22	6,5	3,02
B1F042	1,77	1,87	81	0,12	0,13	13,92	0,08
B1F043	1,21	1,28	327	0,15	0,11	9,6	0,10
B1F044	2,08	2,20	665	0,29	0,44	2,20	1,77
B1F045	0,75	0,79	112	0,20	0,28		

Se nadaljuje



## Nadaljevanje

Matere	KRI		LASJE	MLEKO	URIN		
	Hg [ng/g]	Hg [ng/mL]	Hg [ng/g]	Hg [ng/g]	THg [ng/g]	kreatinin mmol/L	THg [ $\mu$ g/g kretinina]
B1F047	/	/	/	/	/	/	/
B1F048	/	/	/	/	/	/	/
B1F049	0,60	0,63	125	0,11	0,17	7,05	0,21
B1F050	1,79	1,89	187	0,11	1,02	8,39	1,07
B1F051	2,37	2,51	461	0,20	0,16	4,54	0,31
B1F052	0,99	1,05	466	0,27	0,08	5,26	0,13
B1F053	5,81	6,15	1129	0,50	0,14	1,69	0,73
B1F054	2,02	2,14	382	0,43	0,06	1,0	0,53
B1F055	/	/	/	/	/	/	/
B1F056	1,13	1,20	440	0,19	0,27	7,46	0,32
B1F057	/	/	/	/	/	/	/
B1F058	1,76	1,86	781	0,33	1,03	6,05	1,51
B1F059	/	/	/	/	/	/	/
B1F060	1,69	1,79	306	0,42	0,15	2,09	0,63
B1F061	1,90	2,01	239	0,37	3,60	14,75	2,16
B1F062	0,72	0,76	336	0,52	0,22	6,21	0,31
B1F063	0,56	0,59	535	0,07	0,06	1,48	0,36
B1F064	/	/	/	/	/	/	/
B1F065	1,4	1,48	275	0,46	0,32	3,38	0,84
B1F066	0,11	0,12	11	0,05	0,02		
B1F067	1,81	1,91	611		0,91	3,05	2,64
B1F068	1,48	1,57		0,19	6,40	33,99	1,66
B1F069	0,69	0,73		0,33	0,44	6,09	0,64
B1F070	/	/	/	/	/	/	/
B1F071	3,35	3,54	1408	0,43	3,97	14,86	2,36
B1F072	1,61	1,70	540	0,36	3,63	16,94	1,89
B1F073	0,65	0,69	301	0,02	0,06	5,38	0,10
B1F074	1,50	1,59		0,10	0,03	4,2	0,06
B1F075	/	/	/	/	/	/	/
B1F076	/	/	/	/	/	/	/
B1F077	/	/	/	/	/	/	/
B1F078	/	/	/	/	/	/	/
B1F079	/	/	/	/	/	/	/
B1F080	/	/	/	/	/	/	/
B1F081	/	/	/	/	/	/	/
B1F082	/	/	/	/	/	/	/
B1F083	/	/	/	/	/	/	/
B1F084	/	/	/	/	/	/	/
B1F085	/	/	/	/	/	/	/
B1F086	/	/	/	/	/	/	/
B1F087	/	/	/	/	/	/	/
B1F088	/	/	/	/	/	/	/
B1F089	/	/	/	/	/	/	/
B1F090	/	/	/	/	/	/	/
B1F091	/	/	/	/	/	/	/

## Nadaljevanje

Matere	KRI		LASJE	MLEKO	URIN		
ID	Hg [ng/g]	Hg [ng/mL]	Hg [ng/g]	Hg [ng/g]	THg [ng/g]	kreatinin mmol/L	THg [ $\mu$ g/g kretinina]
B1F092	/	/	/	/	/	/	/
B1F093	/	/	/	/	/	/	/
B1F094	/	/	/	/	/	/	/
B1F095	/	/	/	/	/	/	/
B1F096	/	/	/	/	/	/	/
B1F097	/	/	/	/	/	/	/
B1F098	5,03	5,32	25	0,05	0,11	0,91	1,07
B1F099	/	/	/	/	/	/	/
B1F100	/	/	/	/	/	/	/
B1F101	/	/	/	/	/	/	/
B1F102	/	/	/	/	/	/	/
B1F103	0,822	0,87	334	0,03			
B1F104	/	/	/	/	/	/	/
B1F105	0,87	0,92	276	0,05	0,21	7,10	0,26
B1F106	/	/	/	/	/	/	/
B1F107	/	/	/	/	/	/	/
B1F108	/	/	/	/	/	/	/
B1F109	/	/	/	/	/	/	/