

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

SLAVICA FERKOLJ

**VSEBNOST ŽIVEGA SREBRA V LASEH IN URINU PRI OSNOVNOŠOLSKIH  
OTROCIH V SLOVENIJI**

**DETECTION OF BLOOD AND URINE MERCURY IN SLOVENIAN PRIMARY  
SCHOOL CHILDREN**

**DIPLOMSKA NALOGA**

Ljubljana, 2009

Ferkolj, S.: Vsebnost živega srebra v lasih in urinu pri osnovnošolskih otrocih v Sloveniji  
Diplomska naloga. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo

Praktično delo za diplomsko nalogo sem opravljala na Inštitutu Jožef Štefan, Reaktorski center Podgorica, odsek za okolje, pod mentorstvom prof. dr. Joška Osredkarja, mag. farm. spec. med. biokem., in somentorstvom prof. dr. Milene Horvat.

### **Zahvala**

Zahvaljujem se vsem delavcem v laboratoriju Inštituta Jožef Štefan, Reaktorskemu centru Podgorica, odsek za okolje, ki so mi pomagali pri praktičnem delu v laboratoriju ter me spodbujali med pisanjem diplomske naloge. Naj omenim Janjo Tratnik, Nino Degenek, Vesno Fajon, Nežo Koron in Ano Miklavčič. Posebna zahvala gre prof. dr. Jošku Osredkarju in prof. dr. Mileni Horvat, ki sta mi omogočila izvedbo diplomske naloge in me odlično usmerjala skozi njeno nastajanje.

Zahvaljujem se tudi vsem svojim bližnjim in prijateljem, za njihovo podporo in razumevanje. Predvsem pa hvala staremu očetu in stari mami, ki sta me ljubeče vzgajala in spodbujala ter mamici, Tomažu, Nini, Tjaši, Mateju, Tilnu in ne nazadnje Maji.

### **Izjava**

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom dr. Joška Osredkarja in somentorstvom prof. dr. Milene Horvat.

## KAZALO VSEBINE

POVZETEK .....	IV
ABSTRACT .....	V
SEZNAM OKRAJŠAV .....	VI
1 UVOD .....	1
1.1 KROŽENJE ŽIVEGA SREBRA V OKOLJU .....	4
1.2 ZGODOVINA IZPOSTAVLJENOSTI .....	5
1.3 VIRI IZPOSTAVLJENOSTI ŽIVEMU SREBRU .....	8
1.3.1 Splošna izpostavljenost .....	8
1.3.2 Poklicna izpostavljenost .....	9
1.3.3 Ostale poti izpostavljenosti .....	11
1.4 ABSORPCIJA IN PORAZDELITEV PO TELESU .....	13
1.4.1 Metil živo srebro .....	13
1.4.2 Dimetil živo srebro .....	14
1.4.3 Elementarno živo srebro .....	14
1.4.4 Anorgansko živo srebro .....	15
1.5 STRUPENOST IN VPLIV NA ZDRAVJE MeHg .....	16
1.5.1 Omejene referenčne doze .....	20
1.6 DOLOČANJE VSEBNOSTI ŽIVEGA SREBRA IN NJEGOVIH SPOJIN .....	21
1.7 BIOLOŠKI MARKERJI .....	22
1.7.1 Kri .....	22
1.7.2 Urin .....	24
1.7.3 Lasje .....	26
2 NAMEN DELA .....	28
3 MATERIALI IN METODE .....	29
3.1 POPULACIJA IN VZORČENJE .....	29
3.2 ANALIZA KONTROLE .....	29
3.2.1 PRIPRAVA STEKLOVINE .....	29
3.2.1.1 Standardni postopek čiščenja steklovine za pripravo vzorcev urina .....	29
3.2.1.2 Standardni operativni postopek čiščenja laboratorijske steklovine in teflonskih posodic za pripravo vzorcev las .....	30
3.2.2 CELOKUPNO Hg V URINU .....	31
3.2.2.1 Kemikalije .....	31
3.2.2.2 Certificiran referenčni material (CRM) .....	32
3.2.2.3 Priprava reagentov in standardnih raztopin .....	32
3.2.2.4 Priprava vzorcev .....	33
3.2.2.5 Analiza celokupnega Hg z atomsko absorpcijsko spektrometrijo hladnih par (CV-AAS) .....	34
3.2.2.6 Izračun rezultatov .....	36
3.2.2.7 Preverjanje pravilnosti rezultatov .....	37
3.2.3 METIL ŽIVO SREBRO V LASEH .....	38
3.2.3.1 Kemikalije .....	38
3.2.3.2 Laboratorijska oprema .....	38
3.2.3.3 Certificiran referenčni material .....	39
3.2.3.4 Priprava reagentov .....	39
3.2.3.5 Priprava vzorcev .....	39
3.2.3.6 Postopek metode ekstrakcije in določanja MeHg .....	40

3.2.3.7	Plinski kromatograf z detektorjem na zajetje elektronov (GC-ECD) .....	41
3.2.3.8	Pogoji plinskega kromatografa.....	42
3.2.3.9	Izračun rezultatov .....	44
3.2.3.10	Preverjanje pravilnosti meritev .....	45
3.3	OBDELAVA PODATKOV .....	45
4	REZULTATI.....	46
4.1	POSTAVITEV METODE.....	46
4.2	VZORCI.....	47
4.3	VSEBNOSTI CELOKUPNEGA Hg IN MeHg V LASEH .....	48
4.4	VSEBNOSTI CELOKUPNEGA Hg V URINU .....	52
4.5	KORELACIJE.....	56
5	RAZPRAVA .....	58
6	SKLEPI .....	63
7	LITERATURA.....	64
8	PRILOGE .....	69

## POVZETEK

Živo srebro (Hg) je vztrajna snov v okolju ter se v njem porazdeli zaradi naravnih in človeških (antropogenih) procesov. Vstopa v naša jezera, oceane, reke. Vodni biotop omogoči pretvorbo Hg v metil živo srebro (MeHg) in bioakumulacijo v vodne prehranjevalne verige vključno v ribe in lupinarje. Ljudje so metil živemu srebru primarno izpostavljeni preko prehranjevanja z okuženimi ribami, predvsem velikimi roparskimi ribami, kot so veliki tun, mečarica, morski pes in kit. MeHg je lipofilna snov. Zaradi teh lastnosti prehaja v krvno-možgansko pregrado in placento. V možganih se vgradi v mielinske ovojnice, kar vpliva na razvoj nevronov zarodka. Če je zarodek v času nosečnosti izpostavljen MeHg, se lahko v kasnejšem obdobju pokažejo različne fizične in/ali psihične prizadetosti otroka, odvisno od koncentracije, ki ji je bil zarodek izpostavljen.

Z diplomsko nalogo smo želeli ugotoviti vsebnost živega srebra v laseh in urinu pri osnovnošolskih otrocih v Sloveniji.

Uporabili smo metodo atomske absorpcijske spektrometrije hladnih par in plinsko kromatografijo z detektorjem na zajetje elektronov.

Osredotočili smo se na tri območja v Sloveniji. V industrijskem območju (Idrija) je bila srednja vrednost celokupnega Hg v laseh 294 ng/g. 6,35 % otrok je imelo vrednosti celokupnega Hg v laseh višje od 600 ng/g. Srednja vrednost MeHg v laseh je bila 309 ng/g. 6,25 % otrok je imelo vrednosti MeHg v laseh višje od 600 ng/g. Srednja vrednost celokupnega Hg v urinu je bila 1,90 µg/g crea. 9,23 % otrok je imelo vsebnost celokupnega Hg v urinu več kot 5 µg/g crea.

V podeželskem okolju (Žužemberk) je bila srednja vrednost celokupnega Hg v laseh 181 ng/g. 3 % otrok je imelo vrednosti celokupnega Hg v laseh višje od 600 ng/g. Srednja vrednost MeHg v laseh je bila 125 ng/g. 2,86 % otrok je imelo vrednosti MeHg v laseh višje od 600 ng/g. Srednja vrednost celokupnega Hg v urinu je bila 0,90 µg/g crea. 1,79 % otrok je imelo vsebnost celokupnega Hg v urinu več kot 5 µg/g crea.

V mestnem okolju (Ljubljana Brod) je bila srednja vrednost celokupnega Hg v urinu 1,11 µg/g crea. 2,33 % otrok je imelo vsebnost celokupnega Hg v urinu več kot 4 µg/g crea.

Industrijsko območje ima statistično značilne večje vrednosti.

## ABSTRACT

Mercury (with the chemical symbol of Hg) is persistent in the environment and it is distributed throughout the environment by natural and human (anthropogenic) processes. Hg that enters in our lakes, oceans and rivers is converted to methylmercury (MeHg) by aquatic biota and bioaccumulates in aquatic food webs including fish and shellfish. Humans are exposed to MeHg primarily through the consumption of contaminated fish, particularly large predatory fish species such as large tuna, swordfish, shark and whale. MeHg is lipid soluble and it enters blood-brain barrier and placenta. In brain it is built in myelin coat and that effects on a development of fetus neurons. If fetus was exposed to MeHg during pregnancy, in later period it might come to a different physical and/or psychological affects on child, depends of the dose that fetus was exposed to.

This thesis paper aims to establish the content of Hg in hair and urine in primary school children. The method employed was to use cold vapour atomic absorption spectrometry and gas chromatography electron capture.

We focused on three Slovenian areas. Mean total Hg levels in hair in industrial area (Idrija) were 294 ng/g. 6,35 % of children had levels higher than 600 ng/g. Mean MeHg levels in hair were 309 ng/g. 6,25 % of children had MeHg levels higher than 600 ng/g. Mean total Hg levels in urine were 1,90  $\mu\text{g/g}$  crea. 9,23 % of children had levels higher than 5  $\mu\text{g/g}$  crea.

In rural area (Žužemberk) mean total Hg levels in hair were 181 ng/g. 3 % of children had levels higher than 600 ng/g. Mean MeHg levels in hair were 125 ng/g. 2,86 % of children had levels higher than 600 ng/g. Mean total Hg levels in urine were 0,90  $\mu\text{g/g}$  crea. 1,79 % of children had levels higher than 5  $\mu\text{g/g}$  crea.

In urban area (Ljubljana Brod) total Hg levels in urine were 11  $\mu\text{g/g}$  crea. 2,33 % of children had levels higher than 4  $\mu\text{g/g}$  crea.

Industrial area has statistical significant higher levels.

## SEZNAM OKRAJŠAV

CRM - certificirani referenčni material  
CV-AAS - atomska absorpcijska spektrometrija hladnih par  
CV-AFS - atomska fluorescenčna spektrometrija hladnih par  
GC-ECD - plinska kromatografija z detektorjem na zajetje elektronov  
Hg - živo srebro  
Hg<sup>0</sup> - elementarno živo srebro  
Hg<sup>2+</sup> - dvovalentni živosrebrov kation  
MeHg - /metil živo srebro/ - (mono) metilživosrebrove spojine  
EtHg - (mono) etilživosrebrne spojine  
DMHg - dimetil živo srebro  
Milli-Q - Milli-Q deionizirana voda (<18 MΩ cm, Millipore)  
PCB - poliklorirani bifenili  
PE - vrečka - polietilenska vrečka  
PP epruveta - polipropilenska epruveta  
RNAA - radiokemična nevtronska aktivacijska analiza  
THg - celokupno (total) živo srebro  
U-THg - celokupno živo srebro v urinu  
H-THg - celokupno živo srebro v laseh  
H-MeHg - metil živo srebro v laseh  
US EPA - ameriška agencija za zaščito okolja (US Environmental Protection Agency)  
WHO - svetovna zdravstvena organizacija (World Health Organization)  
ATSDR - Agency for Toxic Substances and Disease Registry  
NRC – National Research Council  
NECAT - New England Children`s Amalgam Trial  
ICP-MS - inductively coupled plasma-mass spectrometry

## 1 UVOD

V današnjem času živo srebro (Hg) predstavlja enega izmed tveganih dejavnikov, ki globalno vpliva na okolico in s tem tudi na človeka. Zato mu je potrebno posvetiti veliko pozornosti, da bi zmanjšali njegov vpliv na zdravje.

Hg je naravni kemijski element, ki ga uvrščamo med kovine. Je edina kovina, ki je pri sobni temperaturi v tekoči obliki. Je svetlikajoče srebrno bele barve, velik prevodnik elektrike in slab prevodnik toplote (1). Glavne lastnosti Hg so podane v preglednici I (1). V periodnem sistemu ga najdemo med prehodnimi elementi v šesti periodi. Njegovo vrstno število je 80, njegova molska masa pa znaša 200,59 g/mol. Vrelišče živega srebra je pri 357,3 °C, zmrzišče pa pri -39,8 °C (2).

Evropska unija je Hg uvrstila na tako imenovani črni seznam snovi z liste nevarnih snovi že pred četrto stoletje, s sprejetjem smernice o izpustih nevarnih snovi v vodno okolje.

Republika Slovenija je leta 1998 podpisala pomemben evropski dokument »Protokol o težkih kovinah«. Ta protokol od podpisnic zahteva zmanjšanje emisij Hg glede na obdobje 1985–1995. Nanaša se predvsem na emisije Hg v zrak in od podpisnic zahteva uvedbo strogih emisijskih mejnih vrednosti in uporabo najboljše razpoložljive tehnologije oziroma tehnoloških procesov brez uporabe Hg (3).

### **Preglednica I:** Lastnosti živega srebra (1)

atomsko število	atomska masa	vrelišče	tališče	specifična teža	pritisk pare pri 20 °C	topnost v vodi pri 25 °C
80	200,59 g/mol	356,6 °C	38,9 °C	13,55 g/ml	$1,22 \times 10^{-3}$ Pa	$6 \times 10^{-6}$ / 100 mL



Hg se pojavlja v več različnih kemičnih in fizikalnih oblikah (4, 5):

- elementarno živo srebro ( $\text{Hg}^0$ ),
- anorgansko živo srebro ( $\text{Hg}^{2+}$ ),
- monometil živo srebro – MeHg ( $\text{CH}_3\text{Hg}^+$ ),
- dimetil živo srebro (DMHg,  $\text{CH}_3\text{HgCH}_3$ ),
- etil živo srebro ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{Hg}^+$ ),
- živosrebrov (II) sulfid ( $\text{HgS}$ ) ali cinabarit – v svetu najpomembnejša naravna oblika živega srebra.

Struktura, kemična formula, fizikalne in kemične lastnosti nekaterih spojin z živosrebrnimi komponentami so prikazane v preglednici II.

Topnost v vodi različnih oblik Hg lahko igra ključno vlogo v njihovih strupenih učinkih. Pri 25 °C je topnost elementarnega Hg topnost v vodi pri  $5,6 \times 10^{-5}$  g/L. Živosrebrov klorid je bolj topen, saj je njegova topnost v vodi pri 69 g/L pri temperaturi 20 °C. Dimetil, ki je stranski produkt pri sintezi metil živega srebra (MeHg), je slabo topen v vodi (1,0 g/L pri 20 °C). MeHg je topen v vodi v še manjši meri kot dimetil Hg (DMHg). Njegova vodotopnost je 0,100 g/L pri 20 °C. Zaradi slabe vodne topnosti MeHg in DMHg se ju obravnava kot relativno lipofilni spojini, kar jima omogoča prehajanje preko celičnih membran preko nevtralnih aminokislinskih prenašalcev. S tem je povečano njuno strupeno delovanje na ljudi (6).

**Preglednica II:** Fizikalne in kemične lastnosti nekaterih toksično pomembnih živosrebrnih komponent (6)

kemično ime	elementarno živo srebro	živosrebrov klorid	živosrebrov(I) klorid <sup>a</sup>	metil živosrebrov klorid <sup>b</sup>	dimetil živo srebro
molekularna formula	Hg <sup>0</sup>	HgCl <sub>2</sub>	Hg <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub> HgCl	CH <sub>3</sub> HgCl
molekularna struktura		Cl - Hg - Cl	Cl - Hg - Hg - Cl	CH <sub>3</sub> - Hg - Cl	CH <sub>3</sub> - Hg - CH <sub>3</sub>
molekularna teža	200,59	271,52	472,09	251,1	230,6
topnost	5,6 x 10 <sup>-5</sup> g/L pri 25 °C	69 g/L pri 20 °C	2,0 x 10 <sup>-3</sup> g/L pri 25 °C	0,100 g/L pri 21 °C	1 g/L pri 21 °C
gostota	13,53 g/cm <sup>3</sup> pri 25 °C	5,4 g/cm <sup>3</sup> pri 25 °C	7,15 g/cm <sup>3</sup> pri 19 °C	4,6 g/cm <sup>3</sup> pri 20 °C	3,19 g/cm <sup>3</sup> pri 20 °C
oksidacijsko stanje	+1, +2	+2	+1	+2	+2

<sup>a</sup> Znan kot kalomel

<sup>b</sup> Metil živosrebrov klorid se uporablja za preiskavo učinkov MeHg

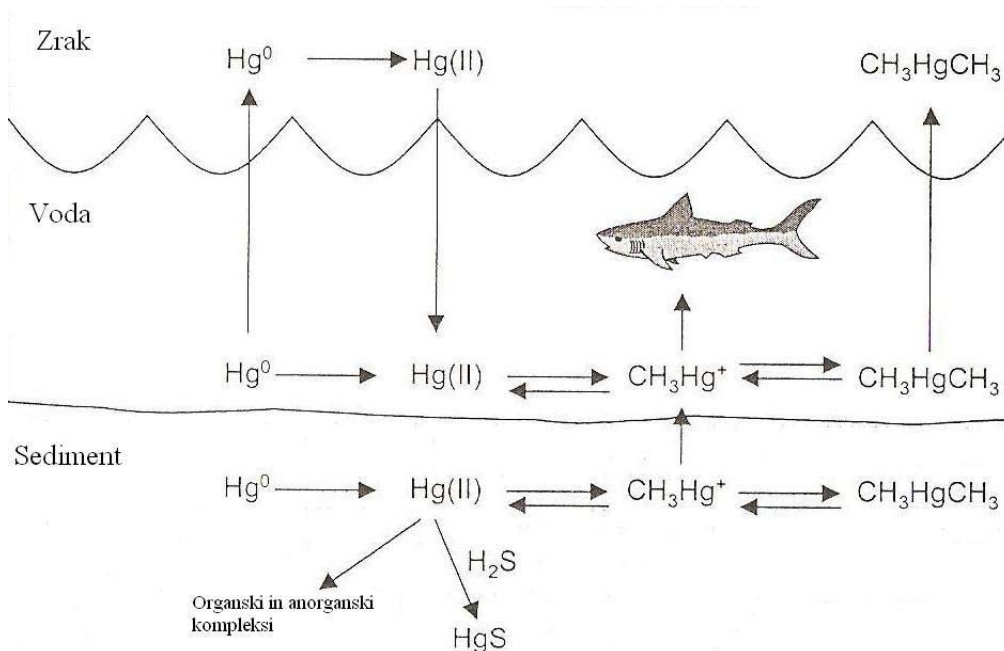
## 1.1 KROŽENJE ŽIVEGA SREBRA V OKOLJU

Zaradi velike hlapnosti Hg in njegovih spojin je atmosferska pot zelo pomemben del biokemijskega kroženja (1). Hg v okolju kroži po naravnih in človeških (antropogenih) poteh (6). Večina ga je v atmosferi prisotnega v obliki elementnih hlapov ( $\text{Hg}^0$ ). Ta v atmosferi kroži več let in se lahko kot vir okužbe prenaša več tisoč kilometrov naokoli (7).

Večino Hg je prisotnega v vodi, zemlji, sedimentih, rastlinah in živalih v obliki anorganskega Hg ( $\text{Hg}^{2+}$ ) (kot je na primer živosrebrov (II) sulfid ( $\text{HgS}$ )) ali pa v obliki organskega Hg ( $\text{MeHg}$ ).  $\text{Hg}^{2+}$  se lahko poveže s kapljičastimi delci, lahko je tudi v plinasti obliki, ter tako kroži v atmosferi, zemlji, vodi, medtem pa spreminja svoje kemične in fizikalne komplekse, po poteh, ki niso povsem razumljive (7).

Hg z zemeljske in vodne površine izhlapi v atmosfero iz različnih izvirov, običajno v elementarni ali divalentni obliki. Hlapi Hg so kemično stabilni monoatomni plini. V atmosferi je prisoten približno eno leto. Odstranitev  $\text{Hg}^0$  iz atmosfere poteka predvsem z oksidacijo v  $\text{Hg}^{2+}$ , ki se z mokrim in suhim usedanjem odlaga v oceane in na zemeljsko površino. Abiotski in biotski mehanizmi na zemeljski površini in v zgornjih plasteh oceana lahko reducirajo  $\text{Hg}^{2+}$  nazaj v  $\text{Hg}^0$  in se s tem Hg s plinsko izmenjavo ponovno vrača nazaj v atmosfero. Prav tako pride do ponovne izmenjave  $\text{Hg}^0$  z atmosfero na zemeljski površini iz tal, vegetacije in iz površine rek in jezer (8).

Iz sedimentov na dnu morja ali iz zemlje se  $\text{Hg}^{2+}$  večinoma zaradi metabolizma mikroorganizmov metilira v najbolj strupeno obliko Hg -  $\text{MeHg}$ . Ta se kopiči v morskih in rečnih ribah ter morskih sesalcih po prehranjevalni verigi navzgor (biomagnifikacija) (slika 1). Znano je, da starejša in večja kot je riba, večje koncentracije  $\text{MeHg}$  vsebuje. Večje količine  $\text{MeHg}$  vsebujejo ribe, ki so na vrhu prehranjevalne verige (7). To so večinoma roparske ribe, kot so morski pes, mečarica, ščuka in veliki tun ter v sesalcih, ki se prehranjujejo z ribami (tjulnji, zobati kiti) (9). Zaradi onesnaženega okolja pa je  $\text{MeHg}$  prisoten tudi v ribah na dnu prehranjevalne lestvice (7).



**Slika 1:** Prikaz biokemijskega kroženja živega srebra (6)

## 1.2 ZGODOVINA IZPOSTAVLJENOSTI

V zgodnjem dvajsetem stoletju so se živosrebrne komponente uporabljale kot močna antifungalna sredstva, ki so dobro varovala žitna zrna. Njihova uporaba se je zaradi dobrih zaščitnih lastnosti zelo razširila. S tem pa so se začele pojavljati različne zastrupitve (10).

Nedavno največji izbruh zastrupitve z MeHg se je zgodil na podeželju Iraka, pozimi med letoma 1971 in 1972. Več kot 6000 ljudi se je resno zastrupilo in bilo je prijavljenih več kot 600 smrti (9).

Izbruh se je pojavil zaradi prehranjevanja z domačim kruhom, ki so ga pripravljali iz žitnih semen, ki so bila zaščitena z živosrebrnimi antifungalnimi sredstvi. K tej množični katastrofi je prispevalo več dejavnikov. Opozorilne etikete na zaščitnih sredstvih niso bile prevedene v lokalni jezik. Tudi simboli za zastrupitev niso imeli pomena pri ljudeh s podeželja, saj jih niso poznali. Ponavadi je bilo v antifungalno sredstvo dodano rdeče barvilo, ki je označevalo prisotnost fungicida, vendar so ljudje sprali barvo, misleč, da so odstranili tudi strup.

Sama lastnost MeHg je prav tako pripomogla svoje, saj je obdobje med zaužitjem in pojavom prvih znakov zastrupitve dolgo (10).

Na Japonskem v Minimati so zdravstvene organizacije opazile, da nekateri ribiči ter njihove družine kažejo znake zmanjšane vidnega polja, pomanjkanje orientacije, živčne bolezni ter mnogo drugih znakov. Kmalu so ugotovili, da industrija, ki proizvaja acetaldehid, kjer so se sestavine Hg uporabljale kot katalizatorji, izliva sestavine v bližnji morski zaliv Minimate. MeHg se je v velikem obsegu bioakumuliral v ribah, s katerimi so se prehranjevali lokalni ribiči ter njihove družine. Od leta 1953 do 1971 je bilo zapisanih 134 primerov obolenj, od tega 78 odraslih ter 56 otrok. V času tega obdobja se je 25 otrok rodilo z resno možgansko okvaro. Od leta 1953 do 1959 je okoli šest otrok razvilo cerebralno paralizo. Matere, ki so se prehranjevale z ribami, niso imele tipičnih znakov. Imele pa so blago parestezijo (11).

Kljub potencialnemu tveganju pa se Hg danes še vedno uporablja v nekaterih industrijskih produktih. Hg<sup>0</sup> se uporablja pri kloralkalni produkciji, za manometre za meritve in kontrolo, termometrih, fluorescentnih svetilnih žarnicah za ozadje računalnika ter za amalgamske zobne zalivke in drugo. Živosrebrove sestavine se uporabljajo še za baterije, prisotne so v farmacevtskih pripravkih, barvah, škropivih za semenska zrna ter za laboratorijske reagente in industrijske katalizatorje (12). Hg se med industrijsko proizvodnjo spusti v zrak, vodo, zemljo ali pa v za to pripravljene odpadke.

Odpadki Hg, ki so nastali z industrijskimi procesi (farmacevtska in avtomobilska proizvodnja, opuščena kloralkalna industrija, zaprti rudniki zlata) ali z domačimi odpadki, so lahko odvrženi neprimerno, kar lahko povzroči nastanek živosrebrnih odlagališč. Ljudje, ki živijo blizu teh mest, so izpostavljeni višjim koncentracijam Hg zaradi izpusta v zemljo, zrak ter vodna mesta.

Hg je prisotno tudi v nekaterih surovih materialih, kot so premog, olje, les, in v različnih rudarskih ostankih. Medtem ko sežigamo te materiale, jih drugače preoblikujemo ali pa zavržemo, se del Hg izpusti v okolje. Izgorevanje fosilnih kuriv, posebno premoga ter upepelitev komunalnih odpadkov, so veliki človeški onesnaževalci atmosfere. Kot naraven vir Hg prištevamo tudi aktivnost vulkanov, ki v zrak spustijo veliko kovinskih delcev (10).

Danes največja globalna onesnaženost vodnih sedimentov je prisotna zaradi intenzivnega rudarjenja zlata, kot na primer v Amazonski kotlini. Velike količine tekočega Hg se uporablja za ekstrakcijo zlatih sedimentov, ki so jih našli v rečnih strugah. Zlato se namreč pridobi s segrevanjem amalgama, iz katerega Hg nato izhlapi. Ocenjeno je, da se vsako leto izpusti več kot 130 ton Hg v Amazonsko kotlino (10).

Sredozemlje je glede Hg eno naravno najbolj obremenjenih področij na svetu, saj se tu na 1 % zemeljskega površja nahaja 65 % svetovnih zalog Hg. Vsi ti viri so zgoščeni na šestih področjih: Almanden v Španiji, Monte Amiata v Italiji, Idrija v Sloveniji, Izmir in Konya v Turčiji ter del Ismailia v Tuniziji (13).

Globalno kroženje Hg se odraža tudi z distribucijo Hg v najbolj oddaljene predele sveta. Hg se lahko porazdeljuje skozi dolge razdalje v atmosferi in oceanih, zato so lahko nekatera območja, z minimalnimi živosrebrnimi emisijami, onesnažena. Kot na primer na Arktiki, kjer so našli visoke koncentracije Hg, kljub temu, da tam ni znakov živosrebrovih virov ali človeškega vpliva na onesnaženje z Hg (7).

### 1.3 VIRI IZPOSTAVLJENOSTI ŽIVEMU SREBRU

Večina ljudi je tekom vsakodnevnih aktivnosti izpostavljena elementarnemu, anorganskemu in organskemu Hg. Pri skoraj vsakomur je v tkivih prisoten majhen delež MeHg, kateri lahko vodi do kronične izpostavitve Hg.

Poznamo tri vzorce izpostavljenosti živemu srebru (7):

- populacija in skupine ljudi, ki živijo v območju, kjer je človek izpustil Hg v vodno okolje, so lahko izpostavljeni povečani koncentraciji Hg preko prehranjevanja z ribami.
- Delavci v onesnaženem delovnem okolju so poklicno izpostavljeni Hg preko neposrednega stika ali preko vdihavanja živosrebrnih par.
- Splošna izpostavljenost: 1) MeHg: uživanje morske hrane, 2) amalgamske plombe.

#### 1.3.1 Splošna izpostavljenost

Ribe so splošno glavni vir izpostavljenosti MeHg. Poleg tega pa so tudi pomemben vir proteinov in drugih hranljivih snovi, kot so omega-3 maščobe ter različnih vitaminov in mineralov. Pomembne so za primeren razvoj ter funkcijo centralnega živčnega sistema. Z redno prehrano lahko preprečimo kardiovaskularne bolezni, osteoporozo in raka. Ker so to glavne kronične bolezni v ZDA, je dolgoročni cilj zmanjšanje koncentracije MeHg v ribah in ne nadomeščanje le-teh z drugimi hranili, ki so bogati s proteini, kot je na primer rdeče meso. Zato je mogoče najboljša rešitev, da se prehranjujemo z določeno vrsto majhnih rib, za katere se ve, da vsebujejo malo Hg. Vemo namreč, da je vsebnost MeHg odvisna od velikosti rib, saj imajo večje ribe daljšo življenjsko dobo in s tem več časa za odlaganje MeHg (6).

Količina zaužitega Hg ni odvisna samo od količine Hg v ribah, temveč tudi od števila zaužitih rib ter pogostosti prehranjevanja. Če jemo v zmernih količinah, še ne pomeni, da smo rizično izpostavljeni.

Kar nekaj študij v zadnjih tridesetih letih je pokazalo, da se iz amalgamskih zobnih zalivk spuščajo hlapi Hg v ustno votlino. Del Hg izhlapi še preden prodre v respiratorni trakt. Nekaj pa se ga vdihne v pljuča, kjer se hlapi absorbirajo in po krvi porazdelijo v tkiva (10).

Koncentracija Hg v avtopsiji tkivnega vzorca je sorazmerna s številom amalgamskih zobnih zalivk (10).

### **1.3.2 Poklicna izpostavljenost**

Vdihavanje je primarna pot izpostavitve  $\text{Hg}^0$ .

Hg (večinoma  $\text{Hg}^0$  ali  $\text{Hg}^{2+}$ ) smo lahko izpostavljeni tudi na delovnem mestu, predvsem tam, kjer se Hg ali Hg kompleksi uporabljajo v samem procesu ali pa ga vključijo v neko spojino. Poklicno izpostavljeni so delavci v kloralkalni industriji, živosrebrnih rudnikih, v rudnikih zlata in srebra, rafinerijah, v tovarni termometrov, zobnih ambulantah ter v obratih, kjer proizvajajo živosrebrne spojine (7).

Delavci so primarno žarišče poklicne izpostavitve. S svojimi oblekami in čevlji lahko prenesejo Hg v domače okolje, zato so lahko izpostavljene tudi njihove družine in sosedge. Pomembno je, da se na delovnem mestu oceni splošna prisotnost Hg (general screening workplace assessment). Ta lahko vključuje preiskavo o možnem izviru izpostavljenosti na delovnem mestu (kot je prisotnost  $\text{Hg}^0$  ali zmes živega srebra, uravnavanje z živim srebrom, odprti kontejnerji z Hg). Pomemben pa je tudi monitoring zraka s prenosnimi napravami ter zdravstvena ocena in iskanje prisotnosti akutnih in kroničnih simptomov (14).



- **Rudarjenje**

Veliko ljudi se je ukvarjalo z rudarjenjem zlata. Pri tem so amalgam, ki je zlitina Hg s kovino, predvsem z zlatom in srebrom, segrevali, da so odstranili Hg. Tako so bili delavci direktno izpostavljeni nevarnemu vdihavanju živosrebrnih hlapov. Izpostavljeni so bili tudi ljudje, ki so živeli blizu območja rudnika ter preprodajalci zlata, ki so pogosto kupili amalgam pri rudarjih ter ga segrevali v notranjih prostorih brez primerne ventilacije.

Okolju najbolj škodljivo bi bilo izlitje tekočega Hg med samim postopkom rudarjenja v okolje. S tem lahko preidejo živosrebrne pare v atmosfero ali pa v reke in jezera. To predstavlja resen okoljski problem v razvitih državah, kjer se ukvarjajo z neformalnim rudarjenjem zlata (7).

Ni nujno, da se ves Hg, ki vstopi v okolje z rudarjenjem zlata, vključi v prehranjevalno verigo vodnega ekosistema. Kovinsko Hg je stabilno in skoraj netopno v vodi ter se ne akumulira v vodni biotop, razen v primeru, če se metilira v živih organizmih.

Meritev Hg v ribjih tkivih, posebno pri roparskih ribah na vrhu prehranjevalne verige, ostaja najboljša, najenostavnejša in prilagodljiva pot za ocenitev resničnega lokalnega vpliva živosrebrove kontaminacije biotopa ter za ugotovitev potencialne višje izpostavljenosti populacije ljudi, ki živijo v bližini rudarskih območjih (7).

V Sloveniji je kot rudarsko območje Hg najbolj poznana Idrija.

Idrija leži v kotlu ob sotočju Idrijce in Nikave. Je najstarejše slovensko rudarsko mesto.

Začetki pridobivanja Hg iz pretežno skrilave rude so bili sila preprosti. Rudo s samorodnim Hg so preprosto izpirali pod tekočo vodo skozi vedno gostejša sita. Kasneje so Hg pridobivali z žganjem bogate cinabaritne rude v kopah najprej v okolici rudnika, nato pa tudi v bližnjih gozdovih, kjer se še danes najdejo ostanki starih žgalnic. Tehnologija je v razvoju topilništva napredovala in postavili so sodobne rotacijske peči (15).

Od leta 1965 do 1977 so obratovale tri rotacijske peči. Po obnovitvi proizvodnje leta 1984 je z obratovanjem nadaljevala le ena peč, ki je bila za vedno ugasnjena po več kot 500 letih proizvodnje septembra leta 1995, ko je bilo pridobljenih še zadnjih osem ton Hg (3, 15).

Izračunali so (16, 17), da so v celotni zgodovini rudnika izkopali približno 12.760.700 ton rude, ki je vsebovala nekaj manj kot 145.000 ton Hg. Iz rude so pridobili približno 107.500

ton Hg. Torej lahko ocenimo, da se je razlika (37.500 ton Hg) med pridobivalnim procesom izgubila v okolju.

Drugi vzrok obremenitve okolja z Hg so odvali rude in predvsem odvali žgalniških ostankov, ki vsebujejo še precej Hg. Žgalniški ostanki so v Idriji zelo razširjeni. Večino žgalniških ostankov so od sredine 19. stoletja pa vse do leta 1977 neposredno vsipali v Idrijco. V spodnjem toku Idrijce so nastali obsežni rečni nanosi z visokimi vsebnostmi Hg, ki so in bodo vir z Hg obremenjenega sedimenta tudi v prihodnosti. Idrijca je ob visokih vodah material odnašala po dolini Idrije in Soče v Jadransko morje (Tržaški zaliv) (3).

Vsebnosti Hg v zraku so se do danes močno zmanjšale v primerjavi s stanjem v 70-ih letih 20. stoletja, ko je bila proizvodnja Hg v Idriji na višku. Pomembno pa je, da so segmenti okolja, kot so tla in rečni sedimenti, zaradi 500-letnega rudarjenja in proizvodnje Hg v Idriji močno obremenjeni z Hg in predstavljajo vir onesnaženja okolja z Hg še danes in bodo tudi v prihodnje (3).

- **Zobozdravstvena dejavnost**

Zobozdravstveni delavci so lahko preko proizvodnje ali uporabe amalgamskih zalivk izpostavljeni Hg. Bilo je raziskano, da imajo zobozdravniki v urinu približno štirikrat večjo koncentracijo Hg kot kontrolna skupina (7).

### **1.3.3 Ostale poti izpostavljenosti**

Doma smo lahko izpostavljeni živosrebrnim param, če se nam razbije živosrebrni termometer, del Hg pa nato izhlapi pri sobni temperaturi v prostor.

Uporaba fungicidov in barve, ki razkužijo zrnato seme, je ena izmed mnogih poti izpostavljenosti Hg<sup>2+</sup>.

Druge poti izpostavljenosti so lahko preko kože, na primer z različnimi sončnimi kremami ali mili. Plod je MeHg izpostavljen v maternici preko popkovine, novorojenček pa preko materinega mleka.

Ferkolj, S.: Vsebnost živega srebra v lasih in urinu pri osnovnošolskih otrocih v Sloveniji  
Diplomska naloga. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo

Organskemu Hg smo izpostavljeni preko tiomersala. Tiomersal se uporablja v cepivih kot konzervans (DiTerPer, Hepatitis B) v večini razvitih držav. Zaščitno sredstvo vsebuje približno 50 % etil živega srebra ( $\text{CH}_3\text{CH}_2 - \text{Hg}^+$ ). V telesu se tiomersal presnovi v etil živo srebro (EtHg) ter tiosalicilat. Razpolovna doba EtHg je samo šest dni. Aktivno prehaja v intestinalni trakt ter se ne akumulira v telo. Hitro se pretvori v  $\text{Hg}^{2+}$ , ki je manj škodljiv za možgane kot EtHg ali MeHg (7). Združene države Amerike ter druge države so zmanjšale ali prepovedale uporabo tiomersala v mnogih cepivih.

## 1.4 ABSORPCIJA IN PORAZDELITEV PO TELESU

### 1.4.1 Metil živo srebro

V študiji iz leta 2000 so ugotovili, da se okoli 95 % MeHg v ribah, ki so ga zaužili ljudje, ali okoli 95 % metil živosrebrnega nitrata, ki so ga peroralno zaužili prostovoljci, absorbira iz gastrointestinalnega (GIT) trakta (10). Prav tako se Hg v telo absorbira preko pljuč ter kože.

Ko se MeHg enkrat absorbira v krvni pretok, vstopa v rdeče krvne celice. Več kot 90 % MeHg, ki se nahaja v rdečih krvnih celicah, je vezanega na hemoglobin (6).

Raziskava distribucije živosrebrnih komponent v treh zdravih moških prostovoljcih, ki so peroralno vzeli živosrebrni nitrat, je pokazala, da se je Hg v krvi pojavil po petnajstih minutah, njegova najvišja koncentracija, pa po treh do šestih urah (18).

MeHg se veže na cisteinske molekule, nekaj pa se ga veže na proteine v plazmi.

Pri ljudeh, ki so dnevno oralno izpostavljeni velikim količinam Hg, je celokupno živo srebro (THg) sestavljeno iz 7 %  $\text{Hg}^{2+}$  v celi krvi, 22 % v plazmi, 39 % v materinem mleku, 16–40 % v jetrih ter 73 % v urinu.

Okoli 10 % MeHg se nahaja v možganih, kjer se počasi metilira v  $\text{Hg}^{2+}$ , kateri ostaja v živčnem sistemu za daljše obdobje (6).

MeHg hitro prehaja v plod ter njegove možgane. Prehaja skozi krvno-možgansko pregrado preko MeHg–L–cisteinskega kompleksa, ki se najverjetneje prenaša z nevtralnimi aminokislinskimi prenašalci. MeHg–cistein se in vitro sprostí iz MeHg–glutation kompleksa preko  $\gamma$  – glutamil transferaze in dipeptidaz. To nam kaže, da glutation mogoče igra direktno vlogo pri prenosu metil živega srebra v endotelne celice (6). Poleg tega, da je MeHg lipidotopen, pa je pomembna tudi njegova vodotopnost kompleksa z L-cisteinom in L-glutationom (10). Kompleks z L-cisteinom je strukturno zelo podoben veliki nevtralni aminokislini L-metioninu (19). Ker MeHg prehaja skozi krvno-placentarno in krvno-možgansko pregrado, predstavlja največjo skrb v času nosečnosti, saj se zarodkovi možgani razvijajo in so za poškodbe najbolj dovzetni (10).

MeHg lahko vstopa tudi v možgane, kjer se oksidira in skladišči ter sčasoma povzroča kronično izpostavitve, odvisno od koncentracij. To lahko vodi do različnih škodljivih učinkov na človeka (7).

MeHg prehaja v enterohepatično kroženje. Izloča se v žolč, nato se deloma ponovno absorbira ter se s tem vrača v jetra. Del žolčnega Hg se pod vplivom mikroflore pretvori v  $\text{Hg}^{2+}$ . Tako se večino Hg iz telesa izloča z dimetilacijo ter z izločanjem  $\text{Hg}^{2+}$  z blatom.

Izločanje MeHg poteka tudi preko žolča, las, manj kot tretjino celotnega izločanja preko urina, v manjših količinah pa se izloča preko materinega mleka.

Razpolovna doba MeHg v telesu je 45 do 70 dni (10). Tako imajo lahko posamezniki, ki so redno izpostavljeni MeHg, enako telesno obremenitev tudi eno leto. Dnevno se iz človeškega telesa izloča 1 % MeHg. Razpolovna doba celokupnega MeHg v krvi je 50 dni (6).

#### **1.4.2 Dimetil živo srebro**

DMHg je zelo strupena oblika Hg, ki je usodna po njegovi izpostavitvi. V Združenih državah Amerike je profesorica na univerzi po samo nekaj kapljicah DMHg umrla 298 dni po izpostavitvi. Zaščitne rokavice niso zagotavljale ustrezne zaščite, tako se je komponenta hitro absorbirala preko kože. Šest do sedem mesecev po njeni izpostavitvi je bila koncentracija živega srebra v krvi 1.000  $\mu\text{g/L}$ . Značilna koncentracija Hg v krvi je v meji med 1 do 8  $\mu\text{g/L}$  (6).

#### **1.4.3 Elementarno živo srebro**

Absorpcija Hg preko pljuč je hitra. Pri ljudeh se absorbira 75 do 85 % vdihane doze (6).  $\text{Hg}^0$  se v tekoči obliki ali v obliki hlapov v gastrointestinalnem traktu ne absorbira dobro. Ker je  $\text{Hg}^0$  zelo topljiv v maščobah, hitro prehaja skozi pljuča ter se raztopi v maščobnih delih v krvi. Prek krvi se porazdeli po telesu ter hitro prehaja skozi placento ter krvno-možgansko pregrado.  $\text{Hg}^0$  se pod vplivom katalaze in hidrogen peroksidaze oksidira v  $\text{Hg}^{2+}$ . Ta se izloča preko blata in urina. Majhen delež  $\text{Hg}^0$  pa se izloča v izdihanem zraku, potu in slini.

Sčasoma je razmerje Hg v rdečih krvnih celicah in plazmi 1 : 1 (6). Razpolovni čas v krvi po izpostavitvi  $\text{Hg}^0$  je dva do štiri (hitra faza) ter dva do tri tedne (počasna faza). Razpolovni čas vdihanega  $\text{Hg}^0$  v celotnem telesu pa je okoli 60 dni (20).

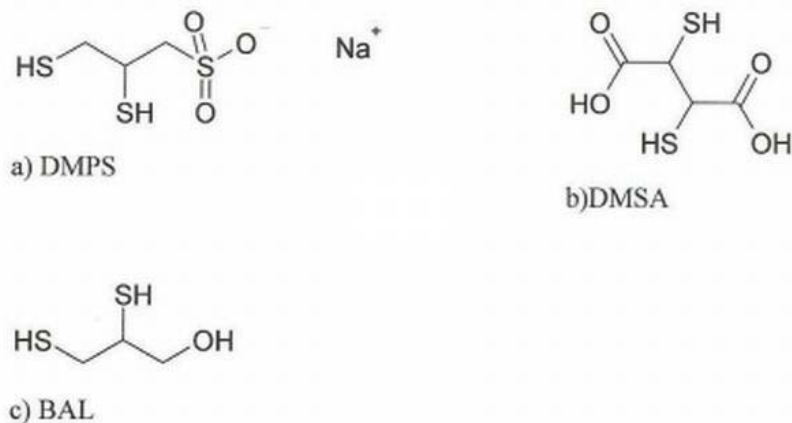
#### 1.4.4 Anorgansko živo srebro

Približno 7 do 15 % zaužite količine živosrebrovega klorida se absorbira skozi gastrointestinalni trakt (6). Absorpcija je sorazmerna s topnostjo živosrebrnih soli v vodi.  $\text{Hg}^{2+}$  ima visoko afiniteto do sulfhidrilnih skupin v rdečih krvnih celicah.  $\text{Hg}^{2+}$  se vgrajuje v ledvice. Zaradi svoje ionske zgradbe počasi prehaja preko krvno-možganske pregrade ter placente. Izloča se večinoma z blatom in urinom, pa tudi preko potu, pljuč in materinega mleka. Njegova razpolovna doba v telesu je 30 do 60 dni.

Izpostavitvev  $\text{Hg}^{2+}$  škoduje ledvicam. Lahko pride do avtoimunskega glomerulonefritisa. Pri otrocih lahko zaužitje živosrebrnega klorida vpliva na kardiološke efekte, kot so povečan srčni utrip in krvni pritisk (7). Nenamerno pitje ali vnos  $\text{Hg}^{2+}$  lahko povzroči znatne poškodbe prebavnega trakta in ledvic, kljub omejeni absorpciji. Če smo  $\text{Hg}^{2+}$  izpostavljeni preko kože, lahko povzroči škodljive učinke na kožo (kot je dermatitis) (7).

Pri zdravljenju zastrupitev z živosrebrovimi spojinami se uporabljajo učinkovine, ki povečajo izločanje Hg iz telesa. V svoji strukturi vsebujejo tiolne skupine. Te spojine kelirajo ali kompleksirajo Hg in na ta način tekmujejo z endogenimi snovmi za anorgansko ali organsko Hg. V terapiji se največ uporabljata dve spojini, 2,3–dimerkapto–1–propan sulfonat (DMPS) in mezo 2,3–dimerkapto sukcininska kislina (DMSA). Spojini vsebujeta žveplo, na katero se veže  $\text{Hg}^{2+}$ . Ker sta spojini topni, se ju aplicira peroralno.

V preteklosti se je uporabljala tudi precej lipofilna spojina 2,3–dimerkapto–1–propanol (BAL). Zaradi nepolarnosti je bila aplikacija intramuskularna. BAL prerazporedi Hg v telesu na ta način, da se poveča koncentracija Hg v možganih. Zato je terapevtska uporabnost BAL vprašljiva in se danes ne uporablja več. V nasprotju z BAL DMPS in DMSA ne prehajata preko krvno-možganske pregrade ter zato ne povišujeta koncentracije Hg v možganih (6, 20).



**Slika 2:** Strukturne formule DMPS, DMSA in BAL (Papuga T.)

### 1.5 STRUPENOST IN VPLIV NA ZDRAVJE MeHg

Faktorji, ki napovejo možnost pojava nezaželenih učinkov in resnosti bolezni (7):

- kemična oblika živega srebra,
- doza,
- starost,
- telesna teža,
- čas izpostavljenosti,
- pot izpostavljenosti (vdihavanje, zaužitje, kožni kontakt),
- prehrabene navade z ribami in morskimi jedmi.

Primarna tarča Hg in njegovih sestavin so centralni živčni sistem, ledvica in kardiovaskularni sistem (7). S tem povzroča nevrološke, nefrološke ter kardiološke motnje, poleg njih pa še imunološke, motorične, reproduktivne ter celo genetske motnje (21).

Razvijajoči se organi so najbolj občutljivi na strupene učinke Hg in predstavljajo največjo skrb. Koncentracija MeHg v možganih ploda je višja kot v materini krvi (7). Živčni sistem se razvija preko adolescence.

Pri odraslih je obdobje od izpostavitve do pojavov prvih znakov obolenja zelo dolgo. Traja lahko več tednov ali celo mesecev (22). To je odvisno od doze ter časa izpostavitve. Mogoče

najbolj dramatičen primer dolgega obdobja do pojavov prvih znakov hude bolezni je smrtna okužba profesorice kemije, ki je bila izpostavljena DMHg.

Pri najmanjši dozi se najprej pojavi parestezija (22). S povečanjem doze se poveča tudi resnost bolezni. Pojavi se lahko cerebralna ataksija, disartrija, zmanjšanje vidnega polja, izguba sluha, paraliza in smrt (10, 22, 23). Ti znaki se pojavijo zaradi izgube določenih živčnih celic v določenih možganskih predelih. MeHg se v možganih pretvori v  $Hg^{2+}$ , kar lahko vodi do možganske okvare.

Prvi pokazatelji predporodne občutljivosti na MeHg so se pokazali že v Minimati. Tu so matere, ki niso kazale znakov zastrupitve, rodile otroke z resno možgansko okvaro. Izbruh v Iraku je potrdil, da se resna možganska okvara lahko pojavi ob povišani izpostavitvi ploda pred rojstvom. Otroci so imeli zamudni razvoj ter nevrološke nenormalnosti. Povečan krvni pritisk, ki kolerira s predporodno izpostavitvijo, je lahko vzrok za posledične srčne težave. To je zdravstveni problem, ki ga je potrebno še raziskati (7).

Akutna izpostavitve hlapom Hg lahko povzroči kašljanje, dispneo, bolečine v prsih in tremor. Pri kronični izpostavitvi se pojavijo komaj opazni znaki, kot so šibkost, utrujenost, anoreksija, izguba teže, ter gastrointestinalne težave (11).

$Hg^{2+}$  pri akutni izpostavitvi povzroča znake žeje, kovinski okus v ustih, slabost ter bolečine v trebuhu. Tem znakom sledijo še krvava driska, stomatitis, gastritis, kolitis, renalna tubolna degeneracija ter smrt. Če smo anorganskemu Hg izpostavljeni kronično, se pojavi povečano izločanje sline, izguba zob in gingivitis. Prisotni so tudi znaki bolezni na živcih, kot so nervoza, razdražljivost, tremorji in motnje govora (11).

Novorojenčki, ki so bili izpostavljeni MeHg med nosečnostjo, so pokazali različne nevrološke nenormalnosti, podobne cerebralni paralizii. Pojavil se je tudi kasnejši razvoj hoje, govora, oslabelelost mišičja ter zmanjšana sposobnost na nevroloških testih (6, 7).

Za ocenitev potencialne toksičnosti MeHg na ljudi je bilo opravljenih veliko preizkusov. Raziskave so potekale predvsem na področju Japonske in v Iraku, kjer je prišlo do največjih zastrupitev z MeHg v zgodovini.

Posebno pozornost v današnjem času se posveča raziskavam na Ferskih otokih, Sejšelih ter Novi Zelandiji.



Iz raziskav zastrupitve z MeHg na Japonskem in v Iraku je razvidno, da MeHg resno škoduje razvijajočim se možganom in živčnemu sistemu pri nerojenem otroku (plodu), prav tako pa so bile resne poškodbe opažene tudi pri odraslih. Pogosti značilni znaki so bili parestezija, motnje čuta, napadi, oslabelost sluha ter motnje v hoji. Poškodovana sta bila tako centralni živčni sistem kot periferni živčni sistem.

Pri Minimata boleznii je bilo opaženo zmanjšanje dnevne aktivnosti pri odraslih. Prav tako je nevrološka duševna stiska morda posledica izpostavljenosti MeHg (23).

Zelo malo je podatkov, ki bi pokazali zvezo med vsebnostjo Hg v telesu ter zdravstvenim stanjem pri otrocih. V raziskavi otrok iz Amazonije, starih med sedem in dvanajst let, z visokimi (povprečje 11  $\mu\text{g/g}$ ; 80 % > 10  $\mu\text{g/g}$ ) vsebnostmi THg, so dokazali obratno zvezo med THg v laseh in rezultati na nevrofizioloških testih (24).

Nekaj epidemioloških raziskav, predvsem na Ferskih otokih in Novi Zelandiji, je pokazalo, da MeHg, ki so ga zaužile noseče matere, četudi v nižjih koncentracijah, povzroča komaj opazne, vendar vztrajne posledice na razvoj otrokove mentalne sposobnosti (otroci so bili stari med štiri do sedem let) (6).

Prebivalci Ferskih otokov so bili večinoma izpostavljeni Hg, ko so zaužili kitovo meso, ki je vsebovalo visok delež MeHg, skoraj 2  $\mu\text{g}$  (6). Vendar so ravno tako zaužili velik delež rib, katerih meso je vsebovalo tudi druge možne nevrotoksične onesnaževalce, kot je poliklorirani bifeniil (PCB) (25). Raziskava, ki je obsegala 900 otrok s Ferskih otokov, je pokazala, da predporodna izpostavljenost Hg povzroči zmanjšano nevrofiziološko sposobnost pri starosti sedem let. Razvojne zamude so bile značilno povezane z MeHg tudi pri otrocih, katerih matere so imele visok delež MeHg v laseh (4,9  $\mu\text{g/g}$ ) (6, 20).

Podobne raziskave so potekale tudi na Sejšelih, kjer je bila izpostavitve MeHg podobna kot na Ferskih otokih. Pogostost zaužitja rib pri nosečih materah na Sejšelih je visoka, približno deset do petnajst obrokov na teden, medtem ko je sama koncentracija Hg v ribah (povprečno 0,3  $\mu\text{g Hg/g}$ ) manjša kot pri mesu kita, ki so ga zaužili na Ferskih otokih. Najdaljša študija je potekala med letoma 1989 in 1990, ko so primerjali okoli 700 otrok, katerih matere so imele v laseh 6,9  $\mu\text{g/g}$  MeHg (24, 25). Otroke so pregledali pri 6., 19., 29. in 66. mesecu starosti. Med zmanjšanjem živčnega razvoja ter predporodne izpostavljenosti MeHg ni bilo prikazane

nobene povezave. Pri devetem letu starosti pa se je pokazala zmanjšana koordinacija in hiperaktivnost pri fantih, kar bi lahko povezali s predporodno izpostavljenostjo MeHg (6, 25).

Ljudje so dovzetni na učinke Hg na dva načina. Prva skupina ljudi je bolj občutljiva na škodljive učinke Hg, druga skupina pa je izpostavljena večji koncentraciji Hg. Občutljiva populacija je tista populacija, ki ima hujše škodljive učinke ob enaki koncentraciji izpostavitve, ali v primeru, ko se škodljivi učinki pojavijo ob nižjih koncentracijah kot pri splošni populaciji ljudi (7).

Študije so pokazale, da lahko MeHg pri nosečnici vpliva na komaj opazne, a vztrajne škodljive učinke na razvoj otroka tudi pri koncentracijah, katere ne pokažejo škodljivih učinkov pri materah.

V veliko vladnih organizacijah držav, kjer ljudje zaužijejo veliko rib in morske hrane (kot so Japonska, Kanada, ZDA in druge), so postavili priporočila za zmanjšanje zaužitja rib in lupinarjev za ženske, ki načrtujejo nosečnost, nosečnice, doječe matere ter majhne otroke. Raziskave kažejo, da so starejši otroci in mladostniki ravno tako občutljivi na škodljive učinke, ki vplivajo na živčni sistem po rojstvu ter v adolescenci (26).

Posamezniki z boleznijo ledvic, jeter in pljuč, imajo večje tveganje, da bodo izpostavljeni škodljivim učinkom Hg. Posamezniki s pomanjkanjem cinka, glutationa, antioksidantov ali selena v prehrani, so lahko bolj dovzetni na strupene učinke Hg zaradi pomanjkljive sposobnosti teh snovi, da varujejo pred škodljivimi učinki Hg (6, 7).

Interakcije Hg s posameznimi snovmi, kot so selen, omega-3 maščobe, vitamin E ter maščobne kisline, lahko potencialno zmanjšajo škodljive učinke Hg. Za selen je znano, da organska in anorganska oblika selena vplivata na odlaganje MeHg v telesu ter varujeta pred njegovimi škodljivimi učinki (6).

Antagonistično delovanje ima tudi česen. Mnogo sestavin v česnu, med katerimi sta tudi selen in tiolne skupine, kelirajo Hg ter tako povečajo njegovo izločanje iz telesa.

Stanji, kot sta pomanjkanje železa in folata, ki motita živčni razvoj, lahko povečata vpliv MeHg na živčni razvoj in obratno.

### 1.5.1 Omejene referenčne doze

Referenčna doza je količina substance, ki se jo lahko zaužije tedensko tekom celega življenja, ne da bi vplivala na zdravje. Njena vrednost predstavlja dovoljene tedenske izpostavitve ljudi ter varuje najbolj občutljivejšo populacijo. V primeru MeHg je najbolj občutljiva in dovzetna populacija na nevrotoksičnost zarodek ter razvijajoči se plod.

Izraža se jo v mikrogramih MeHg na kilogram telesne teže ( $\mu\text{g}/\text{kg MeHg}/\text{dan}$ ) (7).

Ker prevladuje vnos Hg preko rib, so mnoge države zakonsko predpisale najvišje dovoljene koncentracije MeHg v ribah za prehrano ljudi. Prehrambena komisija (The Codex Alimentarius Commission) je sprejela priporočila doz in sicer 0,5 mg MeHg/kg v ribah, ki niso roparske, ter 1 mg MeHg/kg v roparskih ribah. US FDA je določila mejo 1 mg MeHg/kg v ribah in lupinarjih. Evropska skupnost dovoli do 0,5 mg total Hg/kg v ribjih pridelkih. Japonska dovoli do 0,4 mg celokupnega Hg/kg (ali 0,3 mg MeHg/kg) v ribah (7).

US EPA (US Environmental Protection agency) nadzoruje koncentracije Hg v okolju ter uravnava tovarniške izpuste v zrak ter v vodne površine. Referenčna vrednost EPA je 0,1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  na dan, kar ustreza Hg koncentraciji v laseh 1,2  $\mu\text{g}/\text{g}$  (27). Ta je kar 4,7 krat nižja kot po priporočilih WHO (2  $\mu\text{g}/\text{g}$ ) (28). Ob predpostavki, da je povprečna koncentracija MeHg v ribah 0,2 mg/kg, bi lahko 60 kg težak človek dnevno zaužil le 30 g rib ali 200 g tedensko. ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry) ocenjuje potencialne izpostavitve MeHg na ljudi ter raziskuje škodljive učinke. Njihova referenčna vrednost je 0,3  $\mu\text{g}/\text{g}$  na dan (6, 20).

NRC (National Research Council) je leta 2000 sprejela tudi kriterije, s pomočjo katerih prepoznavamo populacije, katerih zdravje je zaradi MeHg posebej ogroženo. Ena izmed teh populacij so nosečnice. Zanje je določena meja vsebnosti MeHg v laseh, katera še ne povzroča tveganja za zarodek. To je 1,2  $\mu\text{g MeHg}/\text{g las}$  (6). Običajne vrednosti pri ljudeh, ki se prehranjujejo z ribami z nekontaminiranih področij, so odvisne od števila ribjih obrokov tedensko. 0,5  $\mu\text{g MeHg}/\text{g las}$  vsebujejo ljudje, ki se prehranjujejo z ribami enkrat na teden. Pri ljudeh, ki se z ribami prehranjujejo dvakrat na teden, je koncentracija MeHg okoli 1  $\mu\text{g}/\text{g las}$ . Ljudje, ki se velikokrat prehranjujejo z morsko hrano, pa imajo koncentracijo MeHg v laseh okoli 2–3  $\mu\text{g}/\text{g}$  (6).

## 1.6 DOLOČANJE VSEBNOSTI ŽIVEGA SREBRA IN NJEGOVIH SPOJIN

Razvitih je več analiznih metod, s katerimi določamo koncentracije Hg v vzorcih. Metode se uporabljajo tako za vzorce iz okolja kot za biološke vzorce (kri, popkovna kri, lasje, urin, materino mleko). Največkrat določamo celokupno Hg. Vrsto metode za merjenje koncentracije Hg izberemo na podlagi lastnosti bioloških markerjev ter same vsebnosti Hg v njih. Pri analitiki se pojavljajo težave, saj so koncentracije Hg v vzorcih ponavadi v sledovih (ng/g).

Za detekcijo Hg v vzorcu so bile razvite različne metode. Večino Hg v vzorcu detektiramo z atomsko absorpcijsko spektrometrijo (AAS), atomsko emisijsko spektrometrijo (AES), atomsko fluorescenčno spektrometrijo hladnih par (CV-AFS), radiokemično nevtronsko aktivacijsko analizo (RNAA), masno spektrometrijo (MS). Precej široko uporabljena je tudi separacija Hg spojin s plinsko kromatografijo, tej pa sledi detekcija z različnimi detektorji. Najpogosteje se uporablja detektor z zajetjem elektronov (GC-ECD). Na ta način lahko določimo posamezne Hg spojine. Največ se uporablja za določanje MeHg. Največkrat uporabljena metoda pa je atomska absorpcijska spektrometrija hladnih par (CV-AAS) (6).

Razvite so bile tudi nove metode za analizo Hg v bioloških vzorcih, kot je masna spektrometrija z induktivno sklopljeno maso (ICP-MS), vendar so te metode večinoma predrage ter nedosegljive večini laboratorijem (6).

## 1.7 BIOLOŠKI MARKERJI

Z biomonitoringom merimo koncentracije Hg v človeških tkivih kot so lasje, popkovna kri ali popkovno tkivo, urin, mleko ter nohti. Pravimo jim biološki markerji ali biomarkerji. Z njimi dobro nadzorujemo izpostavljenost Hg posameznika ter populacije. Pomagajo nam pri ugotovitvi nezaželenih učinkov in izboljšajo klinično diagnozo.

Večino biomarkerjev se zbere neinvazivno (razen krvi) in se jih preprosto shrani. Vzorce se prenese v lokalne ali oddaljene laboratorije, kjer so opravljene analize (7).

Za pravilno izbiro biomarkerja je potrebno upoštevati naslednje faktorje (6, 7):

- kako dobro biomarker kolerira z zaužito dozo različnih oblik Hg,
- kako dobro biomarker kolerira s koncentracijo Hg v tarčnem tkivu,
- kako dobro sčasoma spremenljivost v biomarkerjih kolerira s spremembami v efektivni koncentraciji na tarčno tkivo,
- ugotoviti je potrebno, kateri tip biomarkerja bi bil primeren glede na kulturno karakteristiko populacije,
- katera tehnologija nam je na voljo.

### 1.7.1 Kri

Prisotnost Hg v krvi kaže na trenutno izpostavljenost Hg. Koncentracija Hg v krvi je sorazmerna s količino zaužitih rib, okuženih z MeHg. MeHg se s krvjo porazdeli po celotnem telesu. Ponavadi MeHg v krvi doseže svoj višek po štirih ali štirinajstih urah. Iz krvi v ostala tkiva pa prehaja po dvajsetih ali tridesetih urah. WHO smatra za normalno povprečno koncentracijo THg v krvi med 5–10 µg/L pri posameznikih, ki se ne prehranjujejo z okuženimi ribami. NRC (2000) predpostavlja, da je 2 µg/L normalna povprečna koncentracija za ljudi, ki se malo ali nikoli ne prehranjujejo z okuženimi ribami v ZDA (7).

Povprečna koncentracija THg v ZDA, kjer ni bila specifično izbrana populacija, ki se prehranjuje z ribami, je 1–5 µg/L. Koncentracije Hg v krvi pri ljudeh, ki se malo ali skoraj nič ne prehranjujejo z ribami, odražajo izpostavitve Hg<sup>2+</sup>. Povprečna krvna koncentracija Hg pri teh ljudeh je 2 µg/L. Koncentracije Hg v krvi pri populaciji, katera se pogosto prehranjuje z

ribami, so višje od te vrednosti, tako je na primer na Ferskih otokih, kjer je njihovo povprečje koncentracije v popkovni krvi 24  $\mu\text{g/g}$  (6).

Po podatkih iz literature je razmerje MeHg v popkovni krvi in materni krvi 1,7. To razmerje nam kaže, da ne pride do povišanja koncentracije pri prehodu čez placento le zaradi povečanega hematokrita v popkovni krvi, vendar je povišana koncentracija MeHg v popkovni kot tudi v materini krvi deloma tudi posledica dobrega prehajanja MeHg preko placentarne pregrade (20).

Koncentracije MeHg v plodu 5 do 7 krat višje kot v materi zaradi aktivnega transporta Hg preko placente. Razmerje v možganih ter krvi pri odraslih je približno na isti ravni (29).

V popkovni krvi matere so zaradi večje količine hemoglobina ugotovili povečane koncentracije Hg v primerjavi s plodom.

Zdravnik poskrbi, da se vzorec krvi vzame varno, skrbno ter s sterilno opremo. Vzorce je potrebno takoj po odvzemu shraniti v hladilnik. Za daljše shranjevanje jih je potrebno zamrzniti.

Količina odvzete krvi je odvisna od starosti ter fizičnega stanja udeleženca preiskave (7).

Koncentracijo Hg lahko določimo z različnimi analiznimi tehnikami. Priprava vzorca ima pomembno vlogo pred samo analizo, saj lahko matrica vzorca vodi do nepravilnega rezultata. Zato vzorce predhodno razklopimo s čistimi mineralnimi kislinami in oksidanti.

Atomska absorpcijska spektrometrija hladnih par (CV AAS) je najpogosteje uporabljena metoda za detekcijo Hg v krvi, saj ima ustrezno občutljivost za meritev THg v krvi ter je preprosta za uporabo tudi v manjših laboratorijih (7).

V okviru Nemške raziskave okolja (The German Environmental Survey – GerES) je potekala raziskava, kjer so želeli pridobiti informativne ocene za prikaz vpliva okolja na otroško populacijo. Otroci so bili stari od tri do štirinajst let. Rezultati vsebnosti Hg v krvi so prikazani v tabeli 1 (30). Rezultati vsebnosti Hg v urinu pa so prikazani v tabeli 2 (30).

**Tabela 1:** Vsebnost Hg (ng/mL) v krvi v nemški populaciji otrok v okviru GerES

N	P95	max	aritmetična sredina	geometrična sredina
1552	1,0	6,3	0,33	0,23

P95 – 95. percentil

## 1.7.2 Urin

Prisotnost Hg v urinu običajno predstavlja izpostavljenost  $\text{Hg}^{2+}$  ali  $\text{Hg}^0$ . Zbiranje vzorca je neinvazivno (7). Meritev vsebnosti Hg v urinu se smatra za najboljšega pokazatelja trenutne izpostavljenosti  $\text{Hg}^{2+}$  ali hlapom  $\text{Hg}^0$ , saj najbližje predstavi dejansko vsebnost Hg v ledvicah (7).  $\text{Hg}^{2+}$  se kopiči v ledvicah in se počasi izloča iz telesa. Zato lahko vrednosti Hg v urinu prav tako predstavljajo izpostavitve  $\text{Hg}^{2+}$  in  $\text{Hg}^0$ , ki se je zgodila v preteklosti (7).

Ker lahko koncentracija odpadnih sestavin v urinu niha zaradi razredčitve z vodo, so testi za prikaz okužbe v urinu podani z enoto v  $\mu\text{g}$  kužnega delca na g kreatinina ( $\mu\text{g}/\text{g}$  crea).

Kreatinin je snov, ki nastaja kot rezultat mišičnega delovanja in razgradnje hrane. Nastaja iz kreatina, ki je pomemben del mišic. Dnevni proizvod kreatina in posledično kreatinina je odvisen od mišične mase. Mišična masa se pri ljudeh sčasoma spreminja. Kreatinin se izloča iz telesa tako, da v ledvicah prehaja iz krvi v urin. Z normalno ledvično funkcijo, naj bi nivo kreatinina v serumu ostal relativno konstanten in v normalnem območju (32). Okvirne normalne vrednosti serumskega kreatinina za odrasle so pod  $100 \mu\text{mol}/\text{L}$  (33).

S slabšanjem ledvičnega delovanja je količina izločenega kreatinina manjša, njegova količina v krvi pa se poveča (33).

Zato je uporabno, če Hg v urinu merimo v enoti  $\mu\text{g}/\text{g}$  crea.

Potrebno je zbrati 50–100 ml jutranjega vzorca, vendar tudi naključni vzorec samih rezultatov bistveno ne spremeni. Udeležencu so podana pisna navodila za samostojni odvzem vzorca. Potrebno je, da si udeleženec, pred odvzemom vzorca v čiste sterilne plastične posodice, umije roke. Posodico naj odpre v času tik pred odvzemom, ter jo po odvzemu takoj zapre. Pri tem naj se ne dotika notranjosti posodice ali pokrovička. Posodico se vstavi v vrečko, ki se lahko zapečati, da se izognemo potencialni okužbi ter preprečimo vstop mikroorganizmom, ki bi  $\text{Hg}^{2+}$  pretvorili v hlapno  $\text{Hg}^0$  (34).

Vzorec se takoj zamrzne. Tudi med samim transportom v laboratorij mora biti le-ta zamrznjen (35).

Ko vzorec prispe v laboratorij, je potrebno njegov alikvot shraniti v čisto zapečateni stekleno posodico, kot v previdnost pred potencialno okužbo Hg (14).

Med količino  $\text{Hg}^{2+}$  v vdihanem zraku in vsebnostjo  $\text{Hg}^{2+}$  v urinu je prisotna močna korelacija. Maksimalna vsebnost Hg v urinu, ki jo je postavila WHO, je  $50 \mu\text{g/g}$  crea. Vrednosti Hg v urinu redko presežejo  $5 \mu\text{g/crea}$  pri ljudeh, ki niso poklicno izpostavljeni Hg (7).

Dnevno naj bi se pri ljudeh z amalgamskimi zobnimi zalivkami izpustilo 3 do  $17 \mu\text{g}$  Hg/dan (7). Vendar so novejša raziskava pokazale, da se zaradi farmakokinetičnih parametrov vzpostavitve ravnotežja količin v plazmi dnevno vnese 5 do  $9 \mu\text{g}$  Hg/dan (10).

Individualne razlike ter navade pri ljudeh, kot sta žvečenje ter škrtanje z zobmi med spanjem, prispevajo k nihanju vnosa  $\text{Hg}^0$  z amalgama. To lahko zviša raven Hg v urinu tudi do  $20 \mu\text{g}$  Hg/g crea, s čimer se vrednost približuje poklicni varnostni zdravstveni meji (10).

Ocenjeno je, da bi deset amalgamskih zalivk povišalo koncentracijo v urinu za  $1 \mu\text{g}$  Hg/L (10).

Obstajajo različne analitične metode za določanje Hg v urinu. Najpogosteje uporabljena metoda je CV AAS. Pred analizo je potrebno vzorce pripraviti z mineralnimi kislinami ter oksidanti, saj s tem pretvorimo vse oblike Hg v  $\text{Hg}^{2+}$  (7).

**Tabela 2:** Vsebnost Hg (ng/mL) v urinu v nemški populaciji otrok v okviru GerES

<b>N</b>	<b>P95</b>	<b>Max</b>	<b>aritmetična sredina</b>	<b>geometrična sredina</b>
1734	0,5	52,0	0,19	pod mejo detekcije

P95 – 95. percentil



### 1.7.3 Lasje

Lasje predstavljajo preprost in v primerjavi s krvjo neinvaziven vzorec. Zdravniški nadzor pri odvzemu tako ni potreben. Shranjevanje ter transport vzorca sta enostavna. Obstaja neposredna povezava med koncentracijo Hg v lasih in Hg v krvi. V nekaterih študijah so so koncentracije Hg v lasih in krvi merjeni za medsebojno primerjavo.

THg v lasih je 250- do 300-krat večje od koncentracije Hg v krvi. Normalna koncentracija Hg v lasih je 1–2 µg/g, vendar imajo ljudje, ki se pogosto prehranjujejo z ribami in morskimi jedmi, lahko tudi več kot 10 µg Hg/g (7).

MeHg ponavadi predstavlja 80 % THg, zato so lasje zelo dober biološki marker za prikaz izpostavljenosti MeHg (7).

Meritev koncentracije Hg v lasih je v primerjavi z meritvijo Hg v popkovni krvi manj natančna, saj na analizo vplivajo številne lastnosti vzorca, kar vpliva na sam rezultat. Popkovna kri je zato boljši napovedovalec nevrotoksičnosti (31).

Sam rezultat v krvi ne daje jasnih informacij o dolžini in času izpostavljenosti. Daje le vednost trenutne izpostavitve. Lasje pa imajo to prednost, da se MeHg v času izpostavitve postopoma vgradi v strukturo las ter se ne vrača nazaj v kri in tako ostane njegova koncentracija v lasih stalna, vendar bo MeHg v vzorcu las zaznavno šele čez en mesec (31). Koncentracija v lasnem foliklu je sorazmerna s koncentracijo MeHg v krvi (9). Razmerje lasje–kri je 250 : 1. Lasje zrastejo en centimeter na mesec (7). Glede na dolžino vzorca las nam je omogočen prikaz izpostavitve v daljšem obdobju, tudi v sezonski prehrani z morskimi jedmi.

Vzorec las dobimo tako, da odrežemo šop las čim bližje skalpu, kar nam daje večjo sorazmernost času trenutne izpostavljenosti. Pri tem je potrebno paziti, da ne pride do okuženja vzorca, zato so najbolj primerne čiste jeklene škarje, ki jih čistimo s 70-odstotnim izopropil alkoholom. Šop las zavežemo s primerno vrvico ter ga shranimo v plastično vrečko, katero dobro zapremo. Vzorec moramo ustrezno označiti.

Na koncentracijo Hg v lasih lahko vplivajo faktorji, kot so barvanje, kemično kodranje in ravnanje las. Ti postopki spremenijo disulfidne vezi v lasih ter s tem posledično zmanjšajo

koncentracijo Hg. Zgradba las je odvisna tudi od let in etičnosti, kar lahko vpliva na vgrajevanje Hg (7).

Atomska fluorescentna spektrometrija hladnih par (CV AFS) ter CV AAS so največkrat uporabljene metode za določevanje THg v laseh.

Pri ameriški populaciji, pri kateri ni bistveno povečanega prehranjevanja z ribami, je srednja vrednost koncentracije Hg v laseh v območju 0,3–1,0 µg/g. Pri ljudeh, ki ne jedo rib ali jih jedo v malih količinah, je koncentracija Hg v laseh v območju med 0,2–0,8 µg/g (6).

Populacije, ki so bile izbrane za doze – response analizo, se večinoma prehranjujejo z večjimi količinami rib, zato imajo posledično povečane koncentracije Hg v laseh. Na Sejšelih je bila srednja vrednost koncentracije Hg v materinih laseh 6,8 µg/g, na Ferskih otokih pa 4,8 µg/g (6).

V ameriški raziskavi NECAT so sodelovali otroci stari od 6–10 let. Izbrali otroci so živeli na podeželju ter v mestih. Z raziskavo so želeli oceniti vpliv različnih faktorjev na vsebnost THg v laseh in urinu (27). Rezultati so prikazani v tabeli 3.

**Tabela 3:** Prikaz vsebnosti Hg v laseh in urinu v ameriški raziskavi NECAT

	P95	srednja vrednost
H-THg (ng/g)	1000,0	300–400
U-THg (µg/g crea)	2,3	0,7–0,9

P95 – 95. percentil

Število otrok: 534

## 2 NAMEN DELA

Vemo, da je Hg prisotno v okolju in da smo ljudje izpostavljeni določenim koncentracijam. Vendar pa na slovenskem področju ni povsem znano, koliko so ljudje dejansko izpostavljeni Hg, predvsem občutljivejša mlajša populacija otrok. V pričujoči diplomski nalogi se bomo osredotočili predvsem na populacijo otrok iz treh območij Slovenije, s podeželskega območja (Žužemberk), mestnega območja (Ljubljana Brod) ter obremenjenega industrijskega območja (Idrija). Za slednjega velja, da je potencialno ogroženo območje za tamkajšnje prebivalstvo.

Diplomska naloga je del projekta PHIME (Public health impact of long-term, low-level mixed element exposure in susceptible population strata).

Biološki markerji, ki so bili določeni za prikaz izpostavljenosti Hg v Sloveniji so lasje (T-Hg, MeHg), urin (T-Hg) ter kri (THg).

V diplomski nalogi se bomo osredotočili predvsem na meritev MeHg v laseh ter celokupnega Hg v urinu. Celokupno Hg bomo določali z novo vpeljano metodo, atomsko spektrometrijo hladnih par (CV-AAS), MeHg pa bomo določali z že vpeljano metodo plinske kromatografije z detektorjem na zajetje elektronov. Rezultati za celokupno Hg v laseh so nam bili že podani.

S prikazanimi rezultati bomo ugotavljali, kakšne so razlike glede na kraj bivanja. Preverili bomo, če bo morda potrjena hipoteza, da imajo otroci iz Idrije, kljub prenehanju delovanja Idrijskega rudnika, največje koncentracije Hg, potem otroci iz Ljubljane ter nazadnje otroci iz Žužemberka. Preverili bomo, če morda pri posameznikih pride do morebitnih odstopanj Hg od priporočene vrednosti, ki jih priporoča Svetovna zdravstvena organizacija, ki bi lahko vplivala na njihovo zdravje. Preverili bomo tudi, kako med seboj korelirajo posamezne oblike Hg v različnih vzorcih.

Rezultate bomo primerjali s članki s podobnimi raziskavami.

### **3 MATERIALI IN METODE**

#### **3.1 POPULACIJA IN VZORČENJE**

V naši raziskavi so s starševskim dovoljenjem sodelovali otroci iz treh različnih predelov Slovenije: podeželje (Žužemberk), mesto (Ljubljana Brod) ter obremenjeno industrijsko območje (Idrija).

Zbranih je bilo 164 vzorcev urina: 56 s podeželskega področja Slovenije, 43 z mestnega področja Slovenije ter 65 izbranih vzorcev z obremenjenega industrijskega območja Slovenije.

Urin so zbrali v plastične epruvete. Do analize so bili zamrznjeni pri  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Zbranih je bilo 130 vzorcev las. Šopi las debeline svinčnika so bili odstriženi v zatilju, blizu skalpa. Povezani so bili z zobno nitko ter do uporabe shranjeni v zaprti polietilenski vrečki. V naši preiskavi (za MeHg) je bilo zaradi predhodne uporabe istih vzorcev las za analizo celokupnega Hg v lasih, za meritev MeHg uporabljenih 120 vzorcev.

#### **3.2 ANALIZA KONTROLE**

##### **3.2.1 PRIPRAVA STEKLOVINE**

###### **3.2.1.1 Standardni postopek čiščenja steklovine za pripravo vzorcev urina**

- Laboratorijske bučke 50 ml najprej večkrat speremo z navadno vodovodno vodo. Nato vsaj šestkrat dobro pretresemo s kalijevo permanganantno raztopino in nato dokončno speremo z Milli-Q vodo.
- Oprane bučke je potrebno osušiti, zato jih postavimo v pečico na  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Sušimo vsaj tri ure oziroma dokler niso popolnoma suhe. Najbolje pa jih je pustiti, da se sušijo preko noči, da so drugi dan pripravljene za analizo.

### **3.2.1.2 Standardni operativni postopek čiščenja laboratorijske steklovine in teflonskih posodic za pripravo vzorcev las**

Laboratorijsko steklovino ter teflonske posodice je potrebno čistiti zato, da odstranimo maščobe, prah in Hg s površine posodice. Na ta način zagotovimo, da ne pride do kontaminacije analiznih vzorcev z živim srebrom in živosrebrnimi spojinami zaradi nečiste laboratorijske posode.

- Laboratorijsko posodo čez noč potopimo v 2-odstotno raztopino detergenta Micro 90.
- Posodo vzamemo iz detergenta in jo nato speremo z vodovodno vodo, nato pa z Milli-Q vodo.
- Posodo potopimo v 50 % (v/v)  $\text{HNO}_3$ , kjer jo pustimo segrevati 2 dni na 98 °C.
- Po dveh dneh posodo vzamemo iz ohlajene  $\text{HNO}_3$  in jo dobro (vsaj štirikrat) speremo z Milli-Q vodo.
- Posodo potopimo v 10 % (v/v) HCl za (najmanj) en dan pri sobni temperaturi.
- Naslednji dan dobro speremo (vsaj štirikrat) z Milli-Q vodo. Nato jo damo sušiti v čisti sušilnik.
- Suho steklovino shranjujemo v čistih polietilenskih vrečkah. Teflonske posodice napolnimo z 1 % (v/v) HCl in jih shranimo v polietilenske vrečke.

### 3.2.2 CELOKUPNO Hg V URINU

#### 3.2.2.1 Kemikalije

**Preglednica III:** Seznam uporabljenih kemikalij

<b>kemikalija</b>	<b>proizvajalec</b>
HNO <sub>3</sub> 65 %, pro analysi	Merck, Darmstadt, Nemčija
HClO <sub>4</sub> 70 %, suprapur	Merck, Darmstadt, Nemčija
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 96 %, suprapur	Merck, Darmstadt, Nemčija
KMnO <sub>4</sub> pro analysi	Merck, Darmstadt, Nemčija
SnCl <sub>2</sub> pro analysi	Merck, Darmstadt, Nemčija
deionizirana Milli-Q voda 18,2 mΩ	

**Preglednica IV:** Seznam laboratorijske opreme

<b>laboratorijska oprema in material</b>	<b>proizvajalec</b>
analitska tehtnica AE 240	Mettler – Toledo, Inc., OH, ZDA
pipete:	
– Transferpette <sup>®</sup> 0,5–5 ml	BRAND GmbH&Co. KG, Wertheim, Nemčija
– Transferpette <sup>®</sup> 1000 µl	BRAND GmbH&Co. KG, Wertheim, Nemčija
– FinnPipette 50–20 µl	Thermo Electron Corporation, ZDA
– FinnPipette 5–40 µl	Thermo Electron Corporation, ZDA
nastavki za pipete:	
– Plastibrand <sup>®</sup> 0,5–5 ml	BRAND GmbH&Co. KG, Wertheim, Nemčija
– 1000 µl (modri)	Hirschmann <sup>®</sup> Laborgeräte GmbH&Co. KG, Eberstadt, Nemčija
– 50–200 µl (rumeni)	Hirschmann <sup>®</sup> Laborgeräte GmbH&Co. KG, Eberstadt, Nemčija
5 ml steklena graduirana pipeta	Ashai Glass Co., Ltd., Japonska
hladilnik	Gorenje, Velenje, Slovenija
sušilnik BTE - S	Termo-medicinski aparati Bodalec – Havoic, Dugo selo, Zagreb, Hrvaška
grelni blok	Termoproc (TBGE), Slovenija
avtomatski analizator živega srebra HG - 201	Sanso Seisakusho Co., LTD, Japonska
steklene volumetrične bučke 50 ml	WITEG Labortechnik GmbH, Nemčija
rekorder Sekonic SS – 250 F	Tokio, Japonska

### **3.2.2.2 Certificiran referenčni material (CRM)**

Pri delu smo uporabili Seronorm<sup>TM</sup> Trace Elements Urine, katerega proizvajalec je Serosep Limited, Ireland ter Urine Control, level I, katerega proizvajalec je ClinChek<sup>®</sup>-Control (tabela 5).

### **3.2.2.3 Priprava reagentov in standardnih raztopin**

#### **Priprava kalijevega permanganata za čiščenje steklovine**

- Najprej si pripravimo kalijevo permanganatno raztopino. 50 g  $\text{KMnO}_4$  odtehtamo v prej sprano in čisto stekleno posodo ter razredčimo do enega litra.

#### **Priprava delovne standardne raztopine za umeritveno krivuljo**

- Za umerjanje instrumenta pripravimo standardno raztopino 10 ng/g v volumnu 100 mililitrov. 94,8 g Milli-Q vode s pipeto dodamo 5 ml  $\text{HNO}_3$ . Nato dodamo 0,2 ml založne raztopine  $\text{Hg}^{2+}$  5000 ng/g Hg. S tehtanjem preverimo pipetiranje.

Standardno raztopino pred uporabo hranimo v hladilniku ter jo sveže pripravimo vsak teden.

#### **Priprava $\text{SnCl}_2$ raztopine za redukcijo**

- V čisto litrsko steklenico odtehtamo 750 ml vode in z merilnim valjem zelo previdno dodamo 250 ml  $\text{H}_2\text{SO}_4$  v prezračevanem prostoru ob sočasnem hlajenju steklenice. Po ohladitvi dodamo 50 g  $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ . Pripravljeno raztopino pred uporabo tri ure prepihujemo v digestoriju s pomočjo vodne črpalke. Novo raztopino pripravljamo po potrebi oziroma najmanj enkrat mesečno.

### 3.2.2.4 Priprava vzorcev

Zamrznjene vzorce urina in CRM pustimo stati na sobni temperaturi, da se odtalijo.

Odtaljene vzorce in CRM s pipeto odtehtamo v očiščene in posušene steklene bučke, po tabeli 4.

**Tabela 4:** Prikaz količine odmerjenega vzorca

	volumen
CRM	1000 $\mu$ l
Vzorec	3000 $\mu$ L

Certificiran referenčni material je bil shranjen v hladilniku, v obliki liofiliziranega urina, shranjenega v teflonski ampuli.

Pred analizo ampulo vzamemo iz hladilnika, jo odpremo ter vanjo natančno odmerimo 10 mililitrov deionizirane vode Milli-Q. S tehtanjem preverimo pipetiranje.

Pustimo stati na sobni temperaturi vsaj eno uro. Občasno pretresemo, da spodbudimo boljše raztapljanje in s tem večjo homogenost CRM. CRM nato razdelimo na dva dela v centrifugalne epice. S tem preprečimo kontaminacijo celega certificiranega referenčnega materiala. Po uporabi jih shranjujemo v zamrzovalniku.

Za preverjanje postopka priprave vzorca pripravimo dve bučki slepega vzorca. To pomeni, da v bučko nismo dodali vzorca urina ter CRM, vse ostale reagente pa kot je opisano spodaj.

Dobljeno višino kromatografskega vrha za slepi poskus upoštevamo pri izračunu vsebnosti T-Hg v analiznem vzorcu (enačba 1).

Za preverjanje umeritvene premice si kot vzorec pripravimo standardno raztopino. Standard 0,5 ng/g Hg ter 1 ng/g Hg smo pripravili tako, da smo v steklene volumetrične bučke (50 mL) odtehtali za prvega 5 mg, za drugega pa 10 mg založne raztopine Hg 5000 ng/g Hg. Ostale reagente dodamo po spodaj opisanem postopku.

Odmerjenemu materialu dodamo 1,0 mL HNO<sub>3</sub>, 1,0 mL HClO<sub>4</sub> ter 5,0 mL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Vse skupaj pustimo stati na sobni temperaturi eno uro. Odprte volumetrične bučke z vzorci in



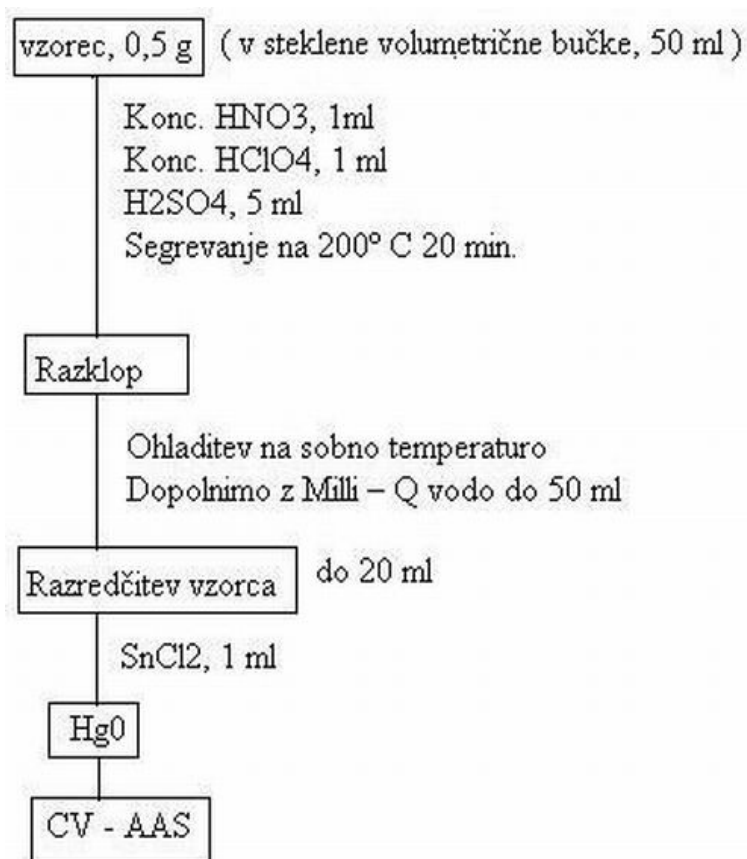
dodanimi kislinami nato segrevamo 20 minut na 200 °C. Po segrevanju hladimo do sobne T. Ohlajene vzorce razredčimo z Milli-Q vodo do oznake 50 mL.

Pri ravnanju s kislinami moramo biti pazljivi, zato vse postopke opravljamo v digestoriju, potrebna so tudi očala in laboratorijska halja.

Za pravilno in natančno meritev THg je potreben dober kislinski razklop. To nam omogočijo kisline, ki smo jih dodali.

Te nam vzorec mineralizirajo v  $\text{Hg}^{2+}$ . Problem, ki se pojavi pri pripravi vzorca, je izguba živega srebra med kislinskim razklopom. Izgubo preprečimo z dodatkom perklorove kisline, ki deluje kot oksidant in prepreči izgubo živega srebra tudi pri ekstremnem segrevanju vzorca. Dolgi vrat bučke prav tako prispeva k preprečitvi izgube Hg med samim razklopom vzorca.

### 3.2.2.5 Analiza celokupnega Hg z atomsko absorpcijsko spektrometrijo hladnih par (CV-AAS)



Slika 3: Shema postopka določanja T-Hg v urinu

Atomska absorpcijska spektrometrija hladnih par je najbolj uporabljeni polavtomatski sistem za detekcijo celokupnega živega srebra. Princip metode sta oblikovala Hatch in Ott leta 1968 (36).

Aparatura vsebuje redukcijsko celico, kamor damo 5 ml vzorca. K vzorcu dodamo še raztopino  $\text{SnCl}_2$ , ki reducira  $\text{Hg}^{2+}$  v  $\text{Hg}^0$ . Na redukcijsko celico priključimo zračno črpalko, katera prepihuje raztopino ter s tem omogočimo, da  $\text{Hg}^0$  izhlapi iz raztopine.  $\text{Hg}^0$  potuje naprej v nevtralizacijsko celico, kjer se nevtralizirajo kislinske pare. Nato gredo pare v kondenzacijsko past, kjer se vodni hlapi kondenzirajo ter jim s tem preprečimo vstop v detektor.

Hlapi krožijo v zaprtem sistemu, ki ga sestavlja zračna črpalka, redukcijska celica, kondenzacijska past ter fotocelica. Ko je doseženo ravnotežje  $\text{Hg}^0$  med plinskim in tekočim stanjem, se štiripotni ventil obrne in s tem preidejo hlapi v absorpcijsko celico. Tu se nato izmeri absorbanca, ki se jo zapiše na rekorderju. Hg se na izhodu veže na  $\text{KMnNO}_4$ , da ne izhajajo v prostor. Postopek je končan v minuti.

Signali se zapisujejo na zapisovalnik v obliki vrhov. Količino Hg v vzorcu določimo glede na višino signala (mm) standardne raztopine iz umeritvene krivulje. Poleg signalov vzorcev beležimo tudi signale merilnega sistema (slepa meritve – v redukcijski celici je samo  $\text{SnCl}_2$ ). Višino signala slepe meritve odštejemo od višine signala izmerjenega vzorca. Opravimo tudi meritve slepega vzorca, s katerim preverjamo količino Hg v postopku priprave vzorca. To vključuje preverjanje priprave vzorca (pipetiranje, tehtanje ...) ter hkrati slepo vrednost merilnega sistema.

Zaznavna meja za T-Hg v krvi je v rangu od 0,1 do 0,3  $\mu\text{g/L}$ , v laseh je v območju med 0,01 in 0,04  $\mu\text{g/L}$ , v urinu pa 0,1  $\mu\text{g/L}$  (6).



**Slika 4:** Aparatura za atomsko absorpcijsko spektrometrijo hladnih par z redukcijsko celico, steklenico z raztopino  $\text{SnCl}_2$ , kondenzacijsko pastjo in zapisovalnikom

### 3.2.2.6 Izračun rezultatov

**Enačba 1:** Izračun koncentracije T-Hg v vzorcih urina

$$C_V = \frac{(h_{VZ} - h_{BB}) \times C_{STD} \times V_{STD}}{(h_{STD} - h_{BB})} \times \frac{V_R}{V_{VZ}}$$

$C_V$  - koncentracija  $\text{Hg}^{2+}$  v vzorcu (ng/g)

$h_{VZ}$  - višina izmerjenega vrha za vzorec (mm)

$h_{BB}$  - višina izmerjenega vrha za slepi vzorec (mm)

$h_{STD}$  - višina izmerjenega vrha za standard (mm)

$C_{STD}$  - koncentracija standarda (ng/g)

$V_{STD}$  - volumen standarda (ml)

$V_R$  - volumen raztopine v bučki (ml)

$V_{VZ}$  - volumen odmerjenega vzorca (ml)

### 3.2.2.7 Preverjanje pravilnosti rezultatov

Pravilnost meritve smo pri vsaki seriji preverjali z uporabo CRM-ja. Izmerjene koncentracije so ustrezale certificiranim koncentracijam (tabela 6).

**Tabela 5:** Prikaz certificirane vrednosti ClinChek<sup>®</sup>-Control, level 1

<b>vsebnost</b>	<b>enota</b>	<b>srednja vrednost</b>	<b>kontrolni interval</b>
živo srebro, level 1	µg/L	3,9	2,6–5,2

**Tabela 6:** Prikaz izmerjenih vrednosti certificiranega referenčnega materiala

<b>dan</b>	<b>CRM</b>	<b>izmerjena vrednost CRM-ja</b>
1.	Clin Check	3,2
2.	Clin Check	3,9
3.	Clin Check	3,6
4.	Clin Check	2,6
5.	Clin Check	2,9
6.	Clin Check	3,2
7.	Clin Check	3,0
8.	Clin Check	3,2
9.	Clin Check	2,9

### 3.2.3 METIL ŽIVO SREBRO V LASEH

#### 3.2.3.1 Kemikalije

**Preglednica V:** Seznam uporabljenih kemikalij

<b>kemikalija</b>	<b>proizvajalec</b>
Deionizirana Milli-Q voda, 18,2 mΩ	
Toluen, p. a.	Merck, Darmstadt, Nemčija
HCl 30 %, suprapur	Merck, Darmstadt, Nemčija
HNO <sub>3</sub> 65 %, suprapur	Merck, Darmstadt, Nemčija
Detergent Micro* - 90	Cole – Palmer Instrument Company, IL, ZDA

#### 3.2.3.2 Laboratorijska oprema

**Preglednica VI:** Seznam laboratorijske opreme

<b>laboratorijska oprema in material</b>	<b>proizvajalec</b>
tehtnici: - analitska tehtnica AE 240 - tehtnica	Mettler – Toledo, Inc., OH, ZDA Tehtnica, Železniki, Slovenija
pipete: - Transferpette® 0,5–5 ml - Transferpette® 1000 µl - FinnPipette 50–20 µl - FinnPipette 5–40 µl	BRAND GmbH&Co. KG, Wertheim, Nemčija BRAND GmbH&Co. KG, Wertheim, Nemčija Thermo Electron Corporation, ZDA Thermo Electron Corporation, ZDA
nastavki za pipete: - Plastibrand® 0,5–5 ml - 1000 µl (modri) - 50–200 µl (rumeni)	BRAND GmbH&Co. KG, Wertheim, Nemčija Hirschmann® Laborgaräte GmbH&Co. KG, Eberstadt, Nemčija Hirschmann® Laborgaräte GmbH&Co. KG, Eberstadt, Nemčija
1 ml steklena graduirana pipeta	Hirschmann® Laborgaräte GmbH&Co. KG, Eberstadt, Nemčija
hladilnik	Gorenje, Velenje, Slovenija
sušilnik BTE - S	Termo-medicinski aparati Bodalec – Havoic, Dugo selo, Zagreb, Hrvaška
avtomatski stresalnik	Edmund Bühler, GmbH, Tübingen, Nemčija

<b>laboratorijska oprema in material</b>	<b>proizvajalec</b>
centrifuga CENTRIC 322A	Tehtnica, Železniki, Slovenija
GC 5890A	Hewlett Packard, ZDA
zapisovalnik	Cole Parmer, Illinois, ZDA
Pasteurjeve steklene pipete	Hirschmann® Laborgaräte GmbH&Co. KG, Eberstadt, Nemčija
teflonski lij ločnik	Nalg Nunc International Corporation, ZDA
teflonske ekstrakcijske posodice Nalgene – 8 ml	Nalg Nunc International Corporation, ZDA
3 ml koničaste epruvete z brušenim zamaškom	po naročilu izdelane pri steklopihaču na IJS
10 µl Microliter™ brizga	Hamilton, Bonaduz, Švica
polipropilenske epruvete	

### 3.2.3.3 Certificiran referenčni material

Pri našem delu smo uporabili CRM las NIES No. 13, katerega proizvajalec je National Institute of Environmental Sciences (NIES) (tabela7).

### 3.2.3.4 Priprava reagentov

- **Priprava 6 M HCl**

Za ekstrakcijo vzorca pripravimo 6 M HCl. Pripravimo si jo na zalogo v količini enega litra. 488 ml prečiščene vode dodamo 512 ml koncentrirane 30-odstotne HCl, suprapur.

### 3.2.3.5 Priprava vzorcev

Vzorci las je potrebno pred analizo s kovinskimi škarjami razrezati na nekaj milimetrov velike delce. Škarje pred vsakim homogeniziranjem vzorca očistimo z alkoholom. Nato sledi tehtanje vzorca na analitski tehtnici. Za čim večji izkoristek MeHg je potrebno v polipropilenske epruvete odtehtati vsaj 100 mg vzorca .

Kot vzorec si pripravimo standardne raztopine 10 ng Hg, 20 ng Hg, 30 ng Hg ter 50 ng Hg. Napravimo jih tako, da v polipropilenske epruvete odmerimo 10  $\mu\text{L}$ , 20  $\mu\text{L}$ , 30  $\mu\text{L}$  ter 50  $\mu\text{L}$  založne raztopine standarda MeHg kot Hg 1 ng/ $\mu\text{L}$ .

Standard nam služil za preverjanje umeritvene krivulje ter preračunavanje koncentracije MeHg v vzorcih.

V posamezni analizni seriji pripravimo tudi CRM in dva slepa vzorca. Slep vzorec pomeni, da v polipropilenske epruvete ne dodamo vzorca las, vse ostale reagentne pa kot je zgoraj opisano.

### **3.2.3.6 Postopek metode ekstrakcije in določanja MeHg**

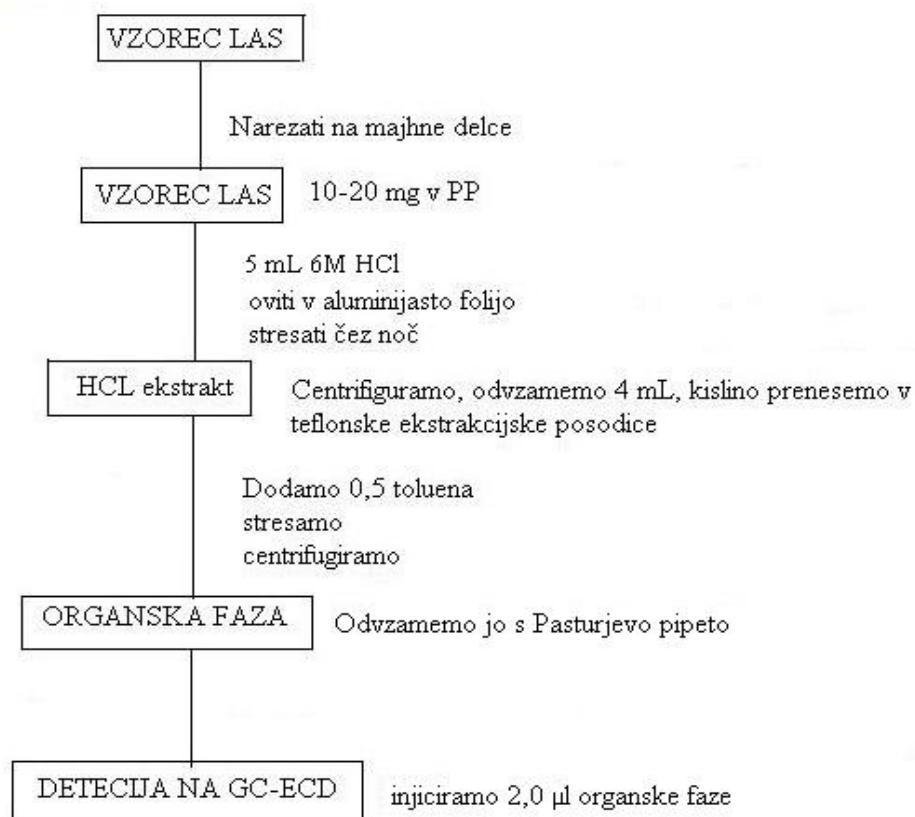
Postopek za predanalizo MeHg v vzorcih las je predstavljen na sliki 5.

Prvi dan analize je pred začetkom ekstrakcije vzorca potrebno očistiti HCl z ekstrakcijo s toluenom, saj je HCl morebitno kontaminiran z anorganskim Hg. Sledi pipetiranje. Vsakemu vzorcu odpipetiramo 5 ml 6 M HCl. Epruvete dobro zapremo ter jih zavijemo v aluminijasto folijo. S tem vzorec zaščitimo pred razpadom MeHg, saj je občutljiv na svetlobo. Vzorce stresamo čez noč na avtomatskem stresalniku pri 300 stresljajih/min.

Naslednji dan vzorce centrifugiramo enajst minut pri 3200 obratih/min. Nato odpipetiramo 4,0 ml kisline, ki jo prestavimo v teflonske ekstrakcijske posodice. Kislini dodamo 0,5 ml toluena. Posodico zapremo ter stresamo na avtomatskem stresalniku deset minut pri 3200 obratih/min. Nato sledi centrifugiranje.

Po centrifugiranju s Pasteurjevimi steklenimi pipetami odvezamo zgornjo organsko fazo, ki jo prenesemo v steklene epruvete (3mL) z brušenim zamaškom. Nato v GC – ECD injiciramo 2,0  $\mu\text{L}$  ekstrakta.

### 3.2.3.7 Plinski kromatograf z detektorjem na zajetje elektronov (GC-ECD)



**Slika 5:** Shema postopka določanja MeHg v vzorcu las z GC-ECD

Plinski kromatograf se uporablja za ločevanje hlapne organske spojine. Sestavljen je iz injektorskega dela, plinske mobilne faze, steklene kolone, v kateri se nahaja stacionarna faza in pečice. Kromatograf je povezan z detektorjem in zapisovalnikom. Organske spojine se na koloni ločujejo glede na porazdelitev med mobilno in stacionarno fazo. Pri našem delu smo kot mobilno fazo uporabili inertni plin dušik. Porazdelitev spojin med stacionarno in mobilno fazo je odvisna od temperature, zato je pomembna konstantna temperatura pečice.

Na plinski kromatograf lahko vežemo različne detektorje. Pri našem delu smo uporabili detektor ECD, ki zaznava elektronegativne funkcionalne skupine. Odziv ECD je osnovan na nastanku negativnega iona eluirane spojine zaradi obsevanja z beta delci. Ob konstantnem pretoku skozi detektor radioaktivni izvor ( $^{63}\text{Ni}$ ) ionizira molekule nosilnega plina. Tako



nastanejo elektroni in negativni ioni. Napetost med elektrodama povzroči tok ionov. Ko se iz kolone eluira elektronegativna skupina, ta vstopi v detektor. Pri tem nastane negativni ion, kar zmanjša tok elektronov med elektrodama in pojavi se padec konstantnega toka. Padec toka predstavlja ECD signal (37).

### **3.2.3.8 Pogoji plinskega kromatografa**

Steklena kolona:

- notranji premer 2 mm,
- dolžina 1,6 m,
- napolnjena s Colum Packing for Gas Chromatography (Hg-20A, Uniport HP) 60/80 mesh.

Kromatografski pogoji:

- T injektorja: 180 °C,
- T kolone: 160 °C,
- T detektorja: 300 °C.

Mobilna faza: dušik, pretok 60 ml/min.

Atenuacija: 2, 3, 4, 6.

Zapisovalnik: U=1mV, hitrost papirja: 30 cm/h.



**Slika 6:** GC-ECD z dovodom plina, standardnimi raztopinami in zapisovalnikom

### 3.2.3.9 Izračun rezultatov

Zaradi morebitne kontaminacije pripravljenega standarda smo za izračun koncentracije v vzorcu kot standard uporabili CRM. Nanj smo se zanesli zaradi vedenja, da CRM zagotovo vsebuje 3800 ng/g Hg.

Lasje predstavljajo precej higroskopen material, zato je bilo pri uporabi potrebno upoštevati rezidualno vlago. Proizvajalci CRM podajajo certificirano vrednost kot količino MeHg in celokupnega Hg (Hg–T) na količino suhe mase. Sami pa podamo vsebnost rezidualne vlage v času priprave CRM. V našem primeru je vrednost rezidualne vlage 8 %, ki jo nato upoštevamo pri izračunu koncentracije MeHg v vzorcu las na suho maso.

**Enačba 2:** Izračun koncentracije MeHg v vzorcu las

$$C_{VZCRM} = (h_{STDCRM} - h_{SL}) \times C_{CRM} \times \frac{F_R}{m_{CRM}}$$

$$C_{VZ} = \frac{h_{VZ} - h_{SL}}{m_{VZ}} \times C_{VZCRM}$$

$C_{VZ}$  - vsebnost MeHg v vzorcu (ng/g)

$h_{VZ}$  - višina kromatografskega vrha za vzorec (mm)

$h_{STDCRM}$  - višina kromatografskega vrha za standard (CRM) (mm)

$h_{SL}$  - povprečje višin kromatografskih vrhov za slepi vzorec (mm)

$C_{VZCRM}$  - koncentracija MeHg v CRM kot vzorec (ng)

$m_{VZ}$  - odtehta vzorca (g)

$F_R$  - faktor redčenja

$C_{CRM}$  - certificirana vrednost za CRM

### 3.2.3.10 Preverjanje pravilnosti meritev

Za optimizacijo metode za določanje vsebnosti MeHg v lasih smo uporabljali CRM. Izmerjene vrednosti naj bi ustrezale vrednostim, prikazanim v tabeli 7.

**Tabela 7:** Certificirane vrednosti uporabljenega CRM

proizvajalec	CRM	osnova	certificirana vrednost (mg/kg)	
			MeHg	Hg - T
NIES	NIES No. 13	lasje	3,8 ± 0,4	4,42 ± 0,20

– rezultati so podani kot certificirana vrednost in 95 % interval zaupanja

NIES (National Institute of Environmental Science, Japan)

## 3.3 OBDELAVA PODATKOV

Za ugotovitev, ali se srednje vrednosti statistično razlikujejo, smo uporabili t-test za neodvisne spremenljivke.

Korelacije smo izračunali po Spearmanovi korelacijski spremenljivki v programu SPSS. 14.0 for Windows.

Za obdelavo podatkov ter grafično predstavitev rezultatov smo uporabili še programe Statistica in Microsoft Office Excel.

## 4 REZULTATI

### 4.1 POSTAVITEV METODE

Pri našem delu smo uporabili plinski kromatograf z detektorjem na zajetje elektronov, ki se uporablja za ločevanje hlapne organske spojine. V našem primeru MeHg.

V naši raziskavi smo želeli ugotoviti, zakaj so bili nekateri rezultati meritev povečani. V pomoč so nam bili izmerjeni rezultati THg.

Rezultati so zelo odvisni od razpoložljivega materiala - predvsem pri fantih, kateri imajo kratke lase. S tem lahko vplivajo na samo težo vzorca las, kar lahko bistveno spremeni realno sliko rezultatov. Manjša teža lažno poviša vsebnost Hg v vzorcu (27). Vzorcev las z manjšo težo nismo vključili v obdelavo podatkov.

Želeli smo ugotoviti, ali morda organsko topilo toluen slabše ekstrahira Hg iz vzorca las. Zato smo opravili poskuse z merjenjem vzorca Nies 13 raztopljenega v toluenu ter benzenu, ter preverjali, če se rezultati bistveno spreminjajo. Ugotovili smo, da se rezultati vzorca las, raztopljenega v toluenu in benzenu, ne razlikujejo bistveno. Zato smo opustili uporabo kancerogenega benzena in nadaljevali ekstrakcijo vzorca v toluenu.

Med analizo smo sčasoma opazili, da se pri slepem poskusu pojavlja kromatografski vrh z retencijskim časom, zelo podobnim tistemu za MeHg. Višina pika je bila ponovljiva. Da bi preverili, če je v slepem vzorcu resnično prisoten MeHg ali pa so prisotne druge, nam nepoznane spojine s podobnim retencijskim časom, smo opravili slepe poskuse z novimi serijami toluena. Ti so pokazali enake pike, zato smo sklepali, da so v topilu prisotne druge spojine in ne MeHg, kateri bi vplival na analizo.

Serijo vzorcev las smo ekstrahirali v steklenih epruvetah namesto v PP epruvetah. PP epruvete lahko namreč vsebujejo pore, kjer se Hg lahko sčasoma nalaga in kljub čiščenju ostaja v njih. S tem se lahko pri naslednji ekstrakciji počasi izloča in lahko lažno poveča rezultat vzorca. Vendar so bili rezultati analize vzorcev las ravno tako visoki. Primerjalne paralelke med sabo so bile enako visoke.

Opazili smo, da se je morebitno onesnažil standard, s katerim smo preračunavali vsebnost MeHg v vzorcu, in da je bil morda to vzrok za povišanje rezultatov. S tem razlogom smo se oprli na referenčni material Nies 13, katerega smo uporabili namesto standarda, saj vemo, da CRM vsebuje 100 % 3800 ng Hg/g.

Zamenjali smo tudi kolono na plinskem kromatografu. Kajti možno je, da se pri prehajanju vzorca skozi kolono del Hg zadrži v koloni, kar lahko vpliva na sam rezultat. Z zamenjavo kolone smo dosegli daljše zadrževanje vzorca v koloni in boljšo ločitev vrhov.

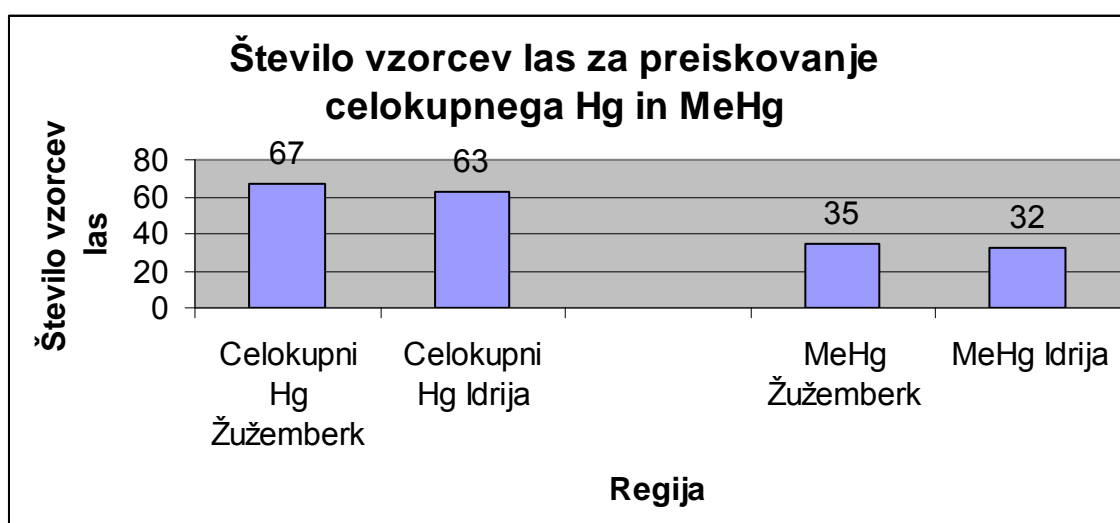
Nadaljnje serije smo merili skupaj z referenčnim materialom Nies 13 ter vse rezultate vzorcev preračunali na CRM.

Tako smo dobili smiselne rezultate, ki nam dajejo dober vpogled za primerjavo vsebnosti Hg na slovenskem področju.

## 4.2 VZORCI

Iste vzorce las, katere smo potrebovali za analizo MeHg, so predhodno uporabili za analizo celokupnega Hg v lasih. Zato smo od skupno 130 vzorcev las, zaradi pomanjkanja za analizo MeHg, uporabili le 120 vzorcev.

Za končno obdelavo podatkov pa smo uporabili skupno le 67 vzorcev. Od tega 35 (52,24 %) iz Žužemberka in 32 (47,76 %) iz Idrije (grafikon 1).



**Grafikon 1:** Primerjava števila vzorcev las med Idrijo in Žužemberkom

#### 4.3 VSEBNOSTI CELOKUPNEGA Hg IN MeHg V LASEH

- **Primerjava rezultatov med Idrijo in Žužemberkom**

Tabela 7 nam prikazuje osnovne statistične podatke. Statistično smo ugotovili, da obstaja razlika med H-THg v Idriji in H-THg v Žužemberku ( $p < 0,001$ ).

Prav tako smo statistično ugotovili razliko med H-MeHg v Idriji in H-MeHg v Žužemberku ( $p < 0,001$ ).

**Tabela 7:** Prikaz rezultatov za celokupni Hg (ng/g) v laseh ter prikaz rezultatov za MeHg (ng/g) v laseh

	IDRIJA		ŽUŽEMBERK	
	H-THg	H-MeHg	H-THg	H-MeHg
N	63	32	67	35
min	53,0	122	15,0	6,53
max	1114	653	840	668
mediana	252	277	135	69,1
povprečje ± SD	294 ± 192	309 ± 130	181 ± 159	125 ± 138
P95	599	551	510	363

N - število vzorcev

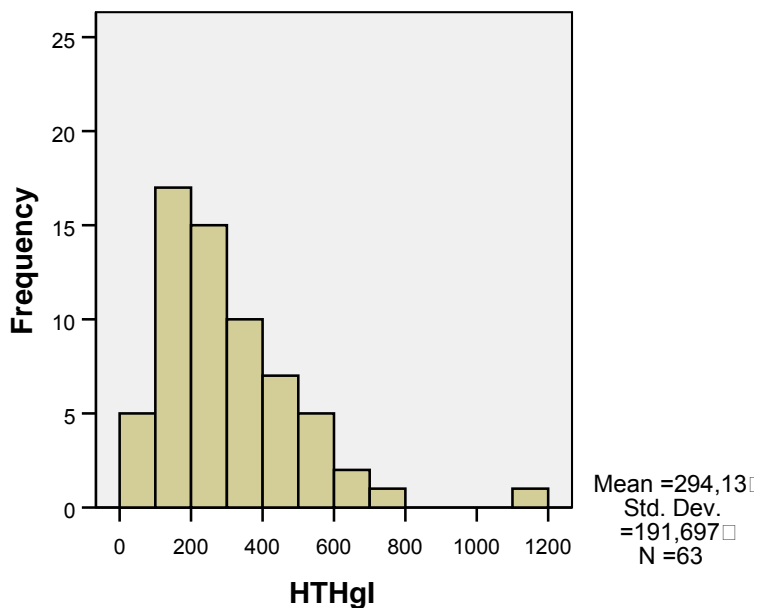
min – minimalna vsebnost Hg v vzorcu

max – maksimalna vsebnost Hg v vzorcu

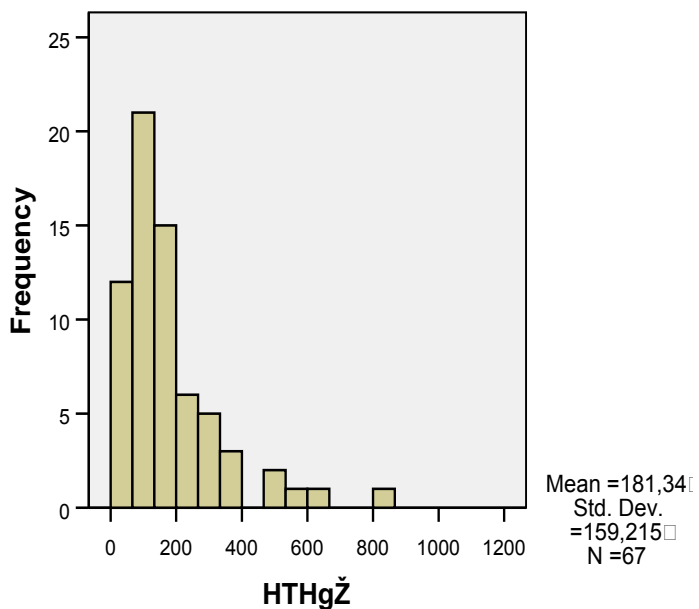
SD – standardna deviacija

P95 – 95. percentil

- **Primerjava celokupnega Hg (ng/g) v laseh med Idrijo in Žužemberkom**



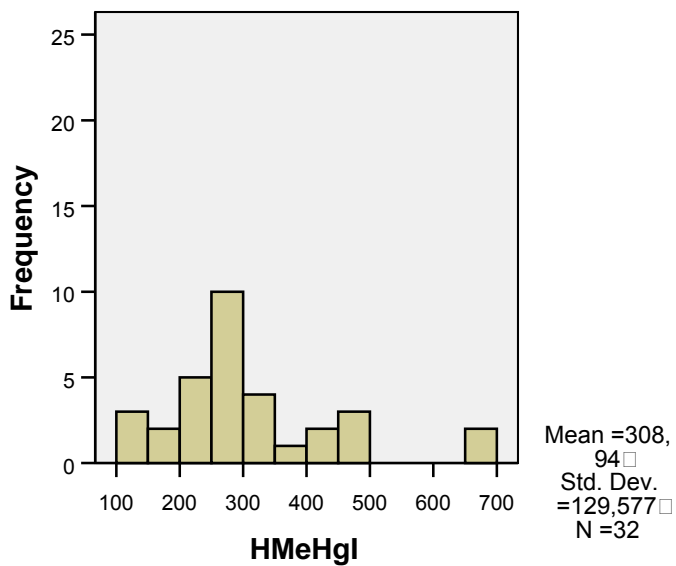
Slika 7: Histogram za celokupni Hg (ng/g) v laseh – Idrija



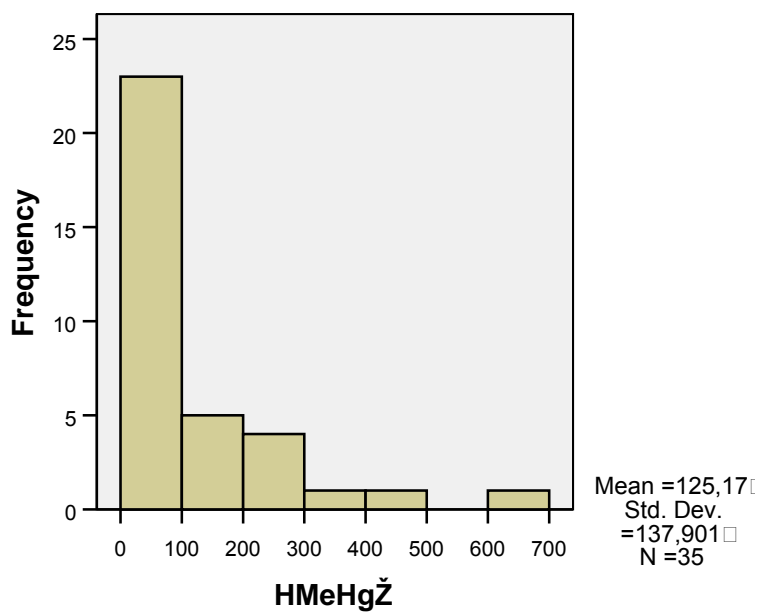
Slika 8: Histogram za celokupni Hg (ng/g) v laseh – Žužemberk



- **Primerjava MeHg (ng/g) v laseh med Idrijo in Žužemberkom**

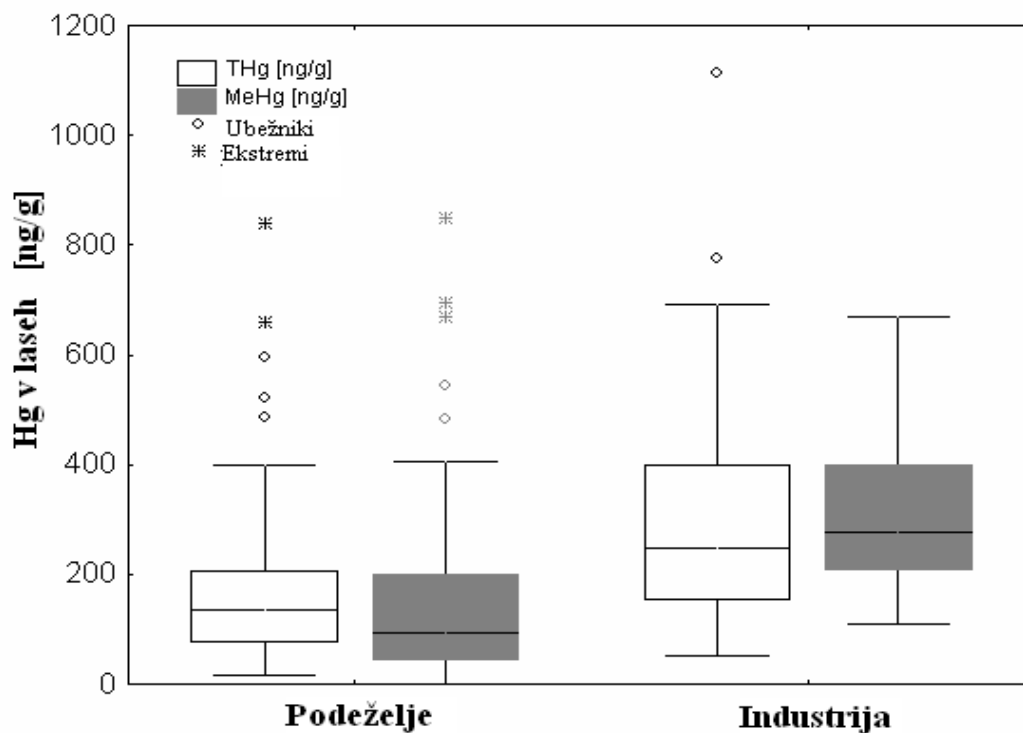


Slika 9: Histogram za MeHg (ng/g) v laseh – Idrija



Slika 10: Histogram za MeHg (ng/g) v laseh – Žužemberk

- **Primerjava okvirjev z ročaji celokupnega Hg in MeHg v laseh med Idrijo in Žužemberkom**



**Slika 11:** Okvirji z ročaji, ki prikazujejo primerjavo vsebnosti Hg (ng/g) v laseh med Idrijo in Žužemberkom

#### 4.4 VSEBNOSTI CELOKUPNEGA Hg V URINU

- **Primerjava rezultatov med Idrijo, Žužemberkom in Ljubljano Brodom**

Tabela 8 nam prikazuje osnovne statistične podatke. Izračunana t-vrednost med U-THg v Idriji in U-THg v Žužemberku je statistično značilna ( $p < 0,001$ ).

Izračunana t-vrednost med U-THg v Žužemberku in Ljubljani Brodu je statistično značilna ( $p = 0,014$ ). Izračunana t-vrednost med U-THg Idrija in U-THg Ljubljana Brod ni statistično značilna ( $p = 0,207$ ).

**Tabela 8:** Prikaz rezultatov celokupnega Hg ( $\mu\text{g/g}$  crea) v urinu

	<b>IDRIJA</b>	<b>ŽUŽEMBERK</b>	<b>LJ. BROD</b>
	<b>U-THg</b>	<b>U-THg</b>	<b>U-THg</b>
N	65,0	56,0	43,0
min	0,15	0,02	0,20
max	14,80	5,43	4,15
mediana	0,92	0,47	0,78
povprečje $\pm$ SD	1,90 $\pm$ 2,54	0,90 $\pm$ 1,14	1,11 $\pm$ 0,99
P95	6,80	3,94	3,77

N - število vzorcev

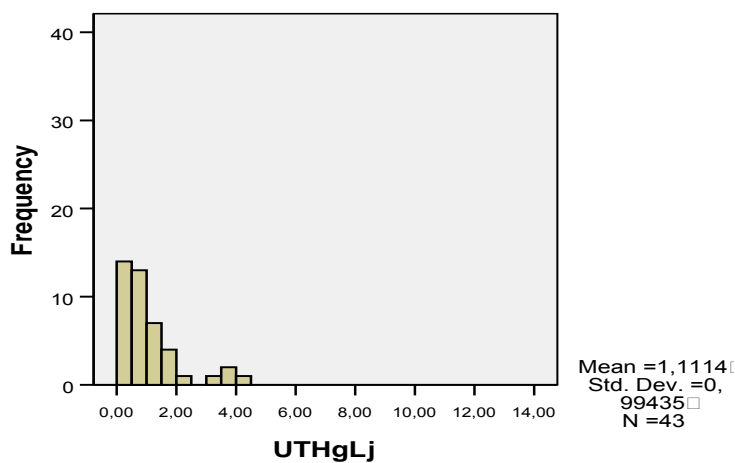
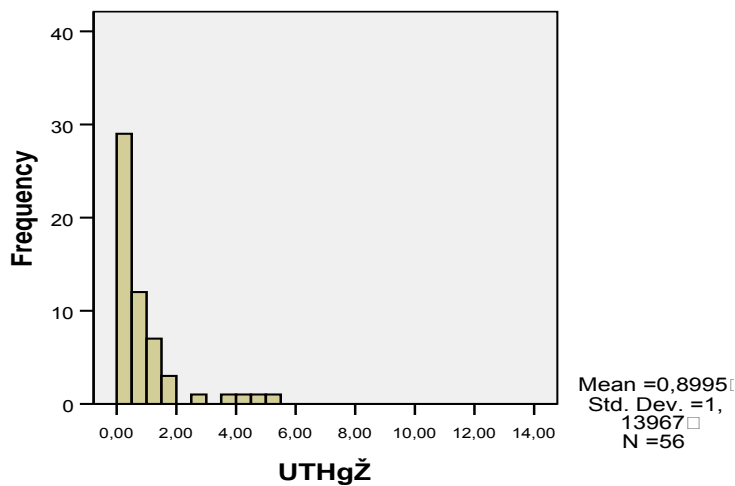
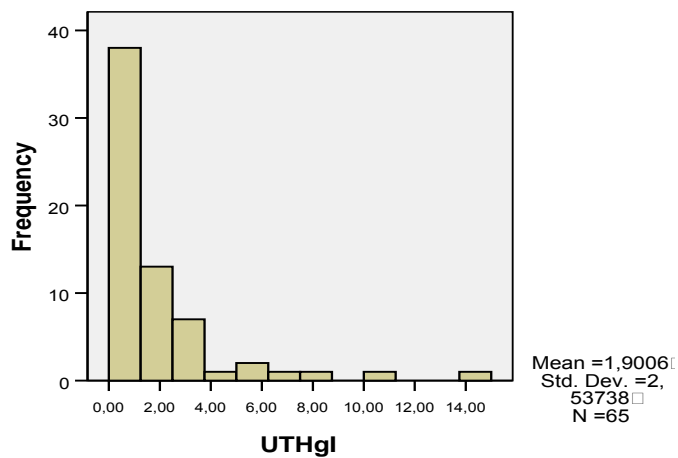
min – minimalna vsebnost Hg v vzorcu

max – maksimalna vsebnost Hg v vzorcu

SD – standardna deviacija

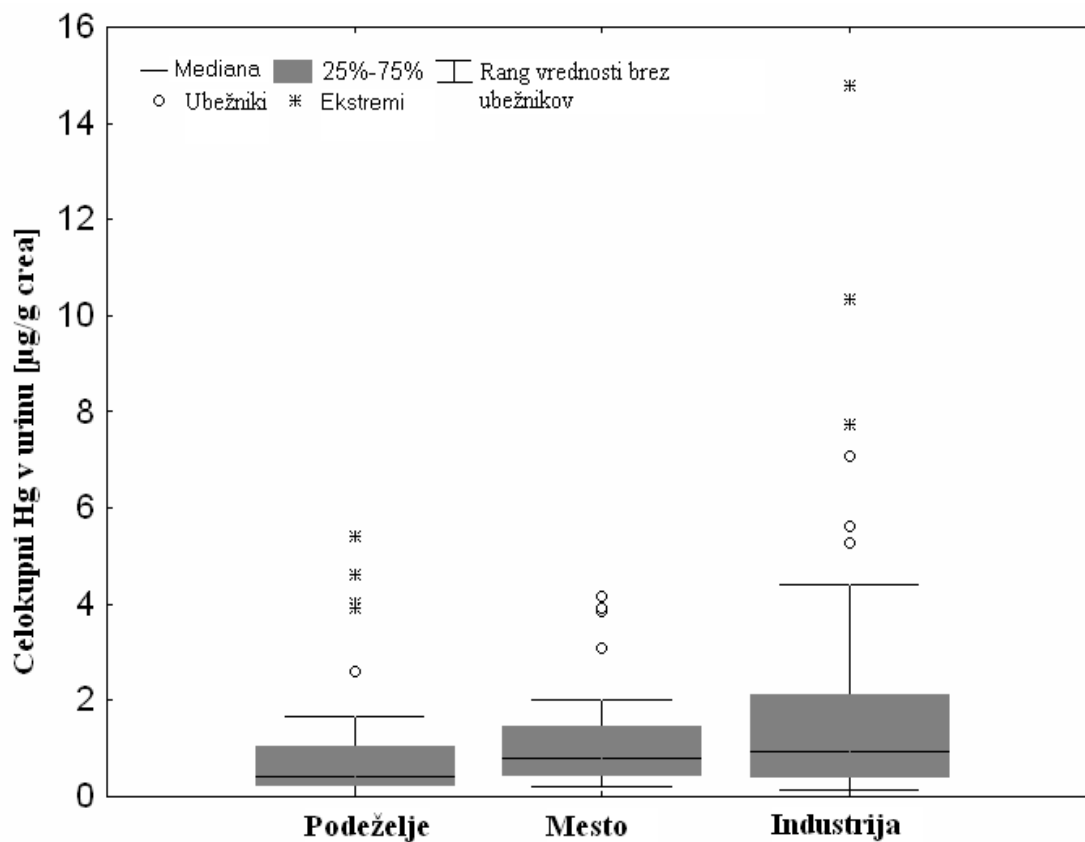
P95 – 95. percentil

- **Primerjava histogramov celokupnega Hg ( $\mu\text{g/g}$ ) v urinu med Idrijo, Žužemberkom in Ljubljano Brodom**



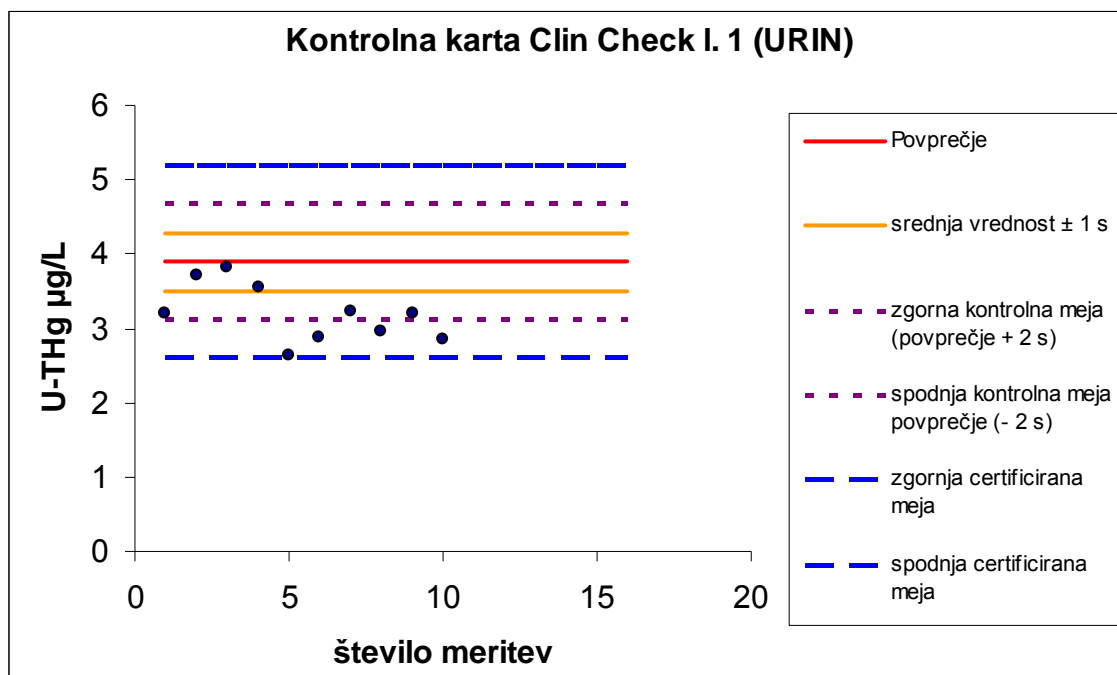
Slike 12, 13, 14: Histogrami za prikaz celokupnega Hg v urinu v Idriji, Žužemberku in Ljubljani

- **Primerjava okvirjev z ročaji celokupnega Hg v urinu med Idrijo, Žužemberkom in Ljubljano Brodom**



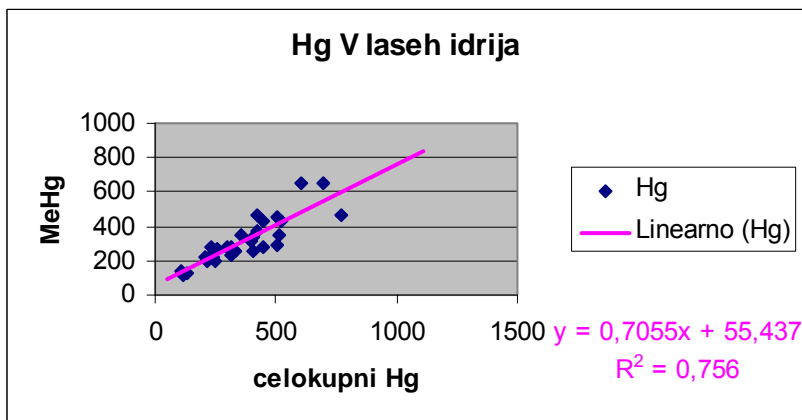
Slika 12: Okvirji z ročaji, ki prikazujejo primerjavo vsebnosti Hg (ng/g) v urinu med Idrijo, Žužemberkom in Ljubljano Brodom

- **Kontrolna karta CRM Clin Check Level 1 (certificirana vrednost 3800 ng ± 0,4)**

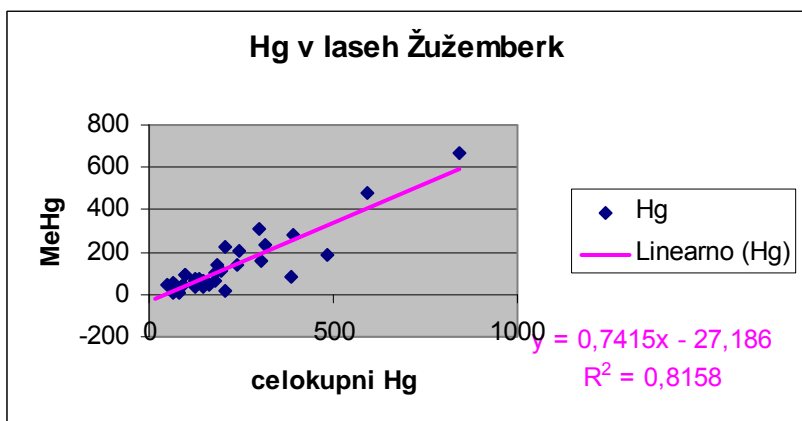


**Grafikon 2:** Prikaz kontrolne karte CRM Clin Check Level 1

#### 4.5 KORELACIJE



**Grafikon 3:** Linearna regresija med celokupnim Hg v laseh ter MeHg v laseh – Idrija



**Grafikon 4:** Linearna regresija med MeHg v laseh ter celokupnim Hg v laseh – Žužemberk

**Preglednica VII in VIII:** Spearmanov korelacijski koeficient med vsebnostjo U-THg, H-THg in MeHg v Idriji in Žužemberku

Preglednica VII: Idrija

	H-THg	H-MeHg	U-THg
H-THg		0,900**	0,360**
H-MeHg	0,900**		0,339**
U-THg	0,360**	0,339**	

\*\* – korelacija je signifikantna pri stopnji tveganja 0,01

Preglednica VIII: Žužemberk

	H-THg	H-MeHg	U-THg
H-THg		0,782**	0,121
H-MeHg	0,782**		0,213
U-THg	0,121	0,213	

\*\* – korelacija je signifikantna pri stopnji tveganja 0,01



## 5 RAZPRAVA

Vsebnost Hg v ribah in človeških laseh je dober indikator izpostavitve okolja in človeka anorganskemu Hg ali MeHg. Urin se smatra za dobrega pokazatelja izpostavitve  $\text{Hg}^{2+}$  (28). V splošni populaciji, kjer v prehrani prevladujejo ribe, so ribe glavni vir izpostavitve MeHg. Anorganskemu Hg so večinoma izpostavljeni zobozdravniki, delavci v klor alkanih tovarnah, v industrijah za izdelavo baterij in termometrov (28). Rudarjenje s segrevanjem amalgama ravno tako poveča izpostavitve ljudi Hg (7).

Pred našo raziskavo smo predpostavili, da bodo koncentracije v Idriji večje kot v mestu in na podeželju. Tako smo sklepali predvsem zaradi živosrebrnega rudnika, ki je kljub zaprtju še vedno glavni razlog, da so ljudje dolgoročno izpostavljeni večjim koncentracijam Hg. Za mestno območje (Ljubljana Brod) bi lahko bila koncentracija Hg v urinu manjša kot na industrijskem območju ter večja kot na podeželskem. Razlog je predvsem na predpostavki, da so mestni ljudje mnogo manj izpostavljeni Hg iz okolja kot v Idriji. Njihova glavna pot izpostavljenosti pa naj bi bilo predvsem prehranjevanje z ribami in ribjimi izdelki, kar morebitno vpliva na povečanje vsebnosti U-THg (27). Ravno tako je na podeželju (Žužemberk) predpostavljeno, da je glavni razlog za vsebnost Hg v telesu predvsem prehrana z ribami in morskimi sadeži, vendar najbrž v manjših količinah, saj na podeželju morda prevladuje prehrana z drugimi vrstami mesa.

Atomska absorpcijska spektrometrija hladnih par je enostavna in zanesljiva metoda. Njene prednosti so, da je postopek avtomatiziran, kar zmanjšuje verjetnost napak in postopek je končan v zelo kratkem času.

V naši raziskavi se meritve naključno sipajo, trend padanja pa je opazen pri treh vzorcih. Vrednosti so nižje od srednje vrednosti, a so še vedno znotraj kontrolne meje. Točnost je slabša, vendar se izmerjene vrednosti ne razlikujejo bistveno od certificirane.

Metoda GC-ECD je enostavna, uporabna ter zanesljiva metoda za merjenje H-MeHg. Vendar so se lasje izkazali kot težaven vzorec za meritev MeHg. Ker je Hg vztrajno in je v okolju skoraj povsod prisotno (predvsem v laboratorijskih prostorih in pripomočkih za določanje Hg), lahko pri majhnih koncentracijah Hg, kot je ng/g, pri samem postopku predanalize in merjenju pride do določenih dejavnikov, ki lahko posledično vplivajo na rezultate.

Rezultati, ki smo jih dobili, so potrdili našo hipotezo. V Idriji so opazno večje koncentracije Hg v bioloških vzorcih. Predvsem je velika razlika med industrijskim in podeželskim območjem.

Na slikah 7 in 8 opazimo, da je razporeditev vrednosti vzorcev las v Idriji pogostejša pri večjih koncentracijah Hg v lasih kot pri razporeditvi vzorcev v Žužemberku. Največ vrednosti v Idriji (27 %) se giblje v območju od 100 do 200 ng Hg/g v lasih, medtem ko se v Žužemberku največ vrednosti (29,85 %) nahaja v območju med 70 in 135 ng Hg/g v lasih. Na slikah 7 in 8 sta vidna posamezna rezultata, katera vsebujeta najvišjo koncentracijo Hg in odstopata od ostalih rezultatov.

Na sliki 9 opazimo, da je razporeditev vrednosti vzorcev las v Idriji v večji meri bolj razpršena po različnih koncentracijah v primerjavi z Žužemberkom. Največ vrednosti v Idriji (31,25 %) se nahaja v območju od 250 do 300 ng Hg/g v lasih. Medtem ko je pri Žužemberku jasno vidna razlika, saj se največ vrednosti (65,71 %) nahaja v območju do 100 ng Hg/g. Tudi tu na obeh slikah (slika 9 in 10) opazimo rezultate z največjo vsebnostjo Hg v lasih, kateri odstopajo od ostalih.

Vzorec iz Žužemberka z največjo vsebnostjo H-THg ima prav tako največjo vsebnost H-MeHg, kar potrjuje soodvisnost naraščanja THg in MeHg v lasih iz grafikona 4 in preglednice VII.

Za vzorec z največjo vsebnostjo H-THg pri Idriji žal nismo mogli izmeriti MeHg zaradi pomanjkanja vzorca, vendar lahko iz grafikona 3 ter preglednice VIII ravno tako opazimo soodvisnost THg in MeHg, kar pomeni, da se ob povišanju koncentracije H-THg, poviša tudi koncentracija MeHg. Soodvisnost smo dosegli kljub razliki v številu vzorcev, ki smo jih uporabili za obdelavo podatkov (grafikon 1). Sklepamo, da so lasje dober biomarker za THg in MeHg.

Iz slike 11 odčitamo, da sta si mediani in pogojna maksimuma za H-THg in H-MeHg v Idriji med seboj približno podobni, medtem ko sta v Žužemberku pogojna maksimuma enaka, mediani pa različni. Vendar opazimo bistveno razliko, če primerjamo mediane obeh krajev med seboj. V Idriji se mediana nahaja v višjem koncentracijskem območju.

Pri podeželju pa opazimo nekaj ekstremov ter osamelcev, medtem ko pri Idriji le dva ali nič osamelcev. Tu se pojavi vprašanje, zakaj so ekstremi prisotni v Žužemberku in zakaj so tako izraziti.

Sklepamo lahko, da so ti ekstremi predvsem odraz razlik v prehrabnih navadah posameznikov. Takšnih ekstremov v Idriji verjetno ni, ker je večina rezultatov visokih in ne pride do večjih razlik kot v Žužemberku. Osamelci so morda prav tako prisotni zaradi razlik pri posameznikih v prehranjevanju z ribami. Žal nismo imeli vprašalnikov, kjer bi potrdili teorijo. Zato jih v nadaljnjih preiskavah priporočamo.

Iz slike 11 lahko sklenemo, da življenje v okolici nekdanjih obratujočih rudnikov poveča koncentracije Hg v telesu.

Referenčna vrednost za H-THg, ki jo priporoča WHO, je 2000 ng/g (28). Naše vrednosti so mnogo manjše (srednja vrednost: 236 ng/g). Na splošno lahko rečemo, da so otroci v Sloveniji izpostavljeni Hg v manjši meri kot v drugih državah in imajo s tem manjšo možnost razvoja bolezni, predvsem v primerjavi z otroki s Sejšelov (srednja vrednost: 6000 ng/g) in z otroki s Ferskih otokov (srednja vrednost: 3000 ng/g), kjer so njihova glavna prehrana ribe, ki vsebujejo višje koncentracije Hg (6, 27).

V Idriji smo pri enem fantu izmerili vsebnost H-THg več kot 1000 ng/g. Kljub temu, da se z leti količina H-THg lahko zmanjša, obstaja možnost, da bo morda imel tudi v odrasli dobi vrednosti večje, kot jih priporoča US EPA (27).

Na slikah 11, 12 in 13 opazimo, da so koncentracije U-THg najvišje v Idriji, kjer se največ (57 %) vzorcev nahaja približno do 1,2 µg/g crea. V mestu je največ vzorcev (32,56 %) v območju do 0,5 µg/g crea, medtem ko se v Žužemberku največ vzorcev (52 %) prav tako nahaja v območju do 0,5 µg/g crea.

Iz slike 15 vidimo, da sta si mediana mesta in industrije podobni, medtem ko se pri podeželju nahaja pri nizkih koncentracijah. Lepo opazimo, da so tako na podeželju kot v industrijskem območju prisotni ekstremni rezultati, kateri odstopajo iz okvirjev. V industrijskem območju se ekstremi nahajajo v bistveno večjem koncentracijskem območju kot na podeželju.

Iz te slike lahko sklepamo in potrdimo hipotezo, da je porazdelitev vsebnosti U-THg odvisna od življenjskega okolja. Če živiš bližje kontaminiranemu okolju, je mera izpostavljenosti višja.

S pogostim prehranjevanjem z ribami in morskimi sadeži obstaja možnost, da ribe povečujejo vrednosti U-THg (27). Nekaj MeHg se lahko demetilira v  $Hg^{2+}$  in ta se izloča v urin (38), kar lahko poveča vrednosti T-Hg v predelih, kjer se ljudje prehranjujejo z ribami (39). V literaturi tudi zasledimo, da veliko amalgamskih zobnih zalivk prispeva k povečanju T-Hg v urinu zaradi stalnega izločanja  $Hg^0$  s površin zalivk. Tako smo  $Hg^0$  izpostavljeni preko vdihavanja in slin (10). Iz tega lahko sklepamo, zakaj je mediana v naši raziskavi v mestnem območju približno enaka kot v industrijskem območju. Na žalost nimamo vprašalnikov, s katerimi bi preverili korelacijo med številom ribjih obrokov in številom amalgamskih zalivk z vsebnostjo Hg v urinu.

Izračuni korelacijskih koeficientov med posameznimi parametri (H-MeHg : U-THg; H-THg : U-THg) v Idriji in Žužemberku v razpredelnici 7 in 8 so pod 0,4, kar pove, da rezultati med seboj niso odvisni, in da torej lahko tako Hg v laseh kot Hg v urinu samostojno služita kot neodvisna parametra za prikaz Hg v telesu. To opazimo pri rezultatih, ki imajo najvišje vsebnosti THg v laseh, a nimajo visokih koncentracij U-THg ali obratno.

Vrednosti Hg v urinu redko presežejo  $5 \mu\text{g}/\text{crea}$  pri ljudeh, ki niso poklicno izpostavljeni Hg (7). V naši raziskavi je bilo skupno sedem vzorcev nad  $5 \mu\text{g}/\text{crea}$ . Od tega je bilo šest vzorcev iz Idrije in eden iz Žužemberka. To nam pove, da so ti posamezniki, ne glede na to, da niso poklicno izpostavljeni, vseeno izpostavljeni visokim koncentracijam iz okolja. K temu lahko prispevajo še dodatni faktorji, kot je prehrana z ribami, veliko število amalgamskih zobnih zalivk ter kajenje v njihovi bližnji okolici. Ti posamezniki so lahko potencialno kronično ogroženi za razvoj določenih ledvičnih bolezni.

Malo je razpoložljivih podobnih raziskav, ki prikazujejo razliko vsebnosti Hg pri mlajši populaciji otrok v različnih predelih države. Tako je težko pridobiti podatke, s katerimi bi primerjali rezultate naše raziskave, predvsem tiste, kjer bi bili rezultati podani v enakih enotah, kot so naši. Nekaterе države že uvajajo postopke, s katerimi bi pridobili vpogled vsebnosti Hg pri otrocih.

V primerjavi THg v urinu (srednja vrednost:  $0,19 \text{ ng}/\text{mL}$ ) z Nemško raziskavo GerES (30) so rezultati THg v urinu (srednja vrednost:  $1,40 \text{ ng}/\text{mL}$ ) naše raziskave precej višji. To kaže, da se morda nemška populacija manj prehranjuje z ribami, kar bi lahko sklepali tudi iz

rezultatov, da so vsebnosti THg v krvi Nemške raziskave (srednja vrednost: 0,33 ng/mL) v primerjavi z našimi rezultati (srednja vrednost: 0,99 ng/mL) prav tako manjše. Vendar bi se podrobnejše povezave lahko preiskovalo še v prihodnosti. Predvsem zaradi enot, ki jih podaja Nemška raziskava, saj niso upoštevali, da lahko koncentracija odpadnih sestavin v urinu niha zaradi razredčitve z vodo, prav tako rezultatov v urinu niso podali z enoto v  $\mu\text{g/g}$  crea (7).

V primerjavi vrednosti U-THg (srednja vrednost 2,6 ng/mL) s populacijo ljudi, ki živi na območju še delujočega rudnika zlata v Tanzaniji (28), je vrednost U-THg (srednja vrednost 2,04 ng/mL) pri idrijskih otrocih podobna. Vendar tudi v tej raziskavi podajajo rezultate v drugih enotah, zato bi bilo potrebno preučiti podobnost le-teh.

Ameriška raziskava NECAT (27) je izmerila vrednosti H-THg in U-THg. Srednja vrednost H-THg je med 300–400 ng/g, kar je višje od srednje vrednosti vseh naših rezultatov H-THg (236 ng/g), medtem ko je srednja vrednost U-THg v Sloveniji višja (1,35  $\mu\text{g/g}$  crea) kot v Ameriki (0,7–0,9  $\mu\text{g/g}$  crea). Razlogi za povišanje MeHg bi lahko bil morebitno prehranjevanje Slovencev z ribami, ki so uvožene iz drugih držav in vsebujejo manjše koncentracije Hg kot ameriške. Omeniti je potrebno tudi, da se v mestnem območju Amerike nahajajo ljudje različnih narodnosti, kar lahko vpliva na prehranske navade posameznikov. Na povišane vrednosti U-Hg v Sloveniji pa lahko prispeva življenje v okolici živosrebrovega rudnika.

Otroci v Sloveniji v primerjavi z drugimi državami, predvsem tistimi, kjer se prehranjujejo z večjimi količinami rib, niso izpostavljeni večjim količinam Hg iz okolja. Opazno pa je, da so, kljub zaprtju živosrebrovega rudnika v Idriji, idrijski otroci mnogo bolj izpostavljeni Hg kot otroci na ostalih področjih Slovenije, zato bi bilo dobro povečati število različnih projektov, s katerimi bi redno spremljali koncentracije Hg pri otrocih in odraslih na tem področju. V tej preiskavi je bilo število udeleženih otrok in materiala majhno, zaradi česar rezultat morda ne predstavlja večjega dela celotne populacije v državi. Zato bi bilo dobro, da se tudi na splošno poveča informiranost javnosti glede izpostavljenosti Hg v okolju in s tem povečati število projektov ter pridobiti večje število prostovoljcev, ki bi želeli sodelovati v tovrstnih raziskavah.

## 6 SKLEPI

- Metoda CV-AAS je avtomatizirana in končana v hitrem času. V naši raziskavi se je izkazala kot enostavna in zanesljiva metoda.
- Metoda GC-ECD se je v naši raziskavi izkazala kot enostavna, uporabna in zanesljiva metoda za določanje MeHg.
- Pri vzorcih las z majhno vsebnostjo MeHg (v sledovih ng/g) je potrebno biti previden predvsem v predanalizni in analizni fazi.
- Namesto kancerogenega benzena priporočamo ekstrakcijo v manj škodljivem toluenu.
- Priporočamo, da se nadaljnje ekstrakcije vzorca izvršijo v steklenih epruvetah in ne v PP epruvetah.
- Otroci z območja Idrije imajo najvišje koncentracije THg, MeHg v laseh ter THg v urinu v primerjavi z ljubljanskim območjem in Žužemberkom.
- Otroci v Sloveniji v primerjavi z drugimi državami, predvsem s tistimi, kjer se prehranjujejo z večjimi količinami rib, niso izpostavljeni večjim količinam Hg iz okolja.
- Življenje blizu zaprtih rudnikov poveča koncentracije Hg v telesu.
- Hg v laseh in Hg v urinu samostojno služita kot neodvisna parametra za prikaz Hg v telesu.
- Lasje so dober biomarker za prikaz vsebnosti THg in MeHg.
- Vprašalniki o prehrabnih navadah otrok ter o številu zobnih zalivk bi bili pri dobrodošli pri nadaljnjih tovrstnih raziskavah.

## 7 LITERATURA

1. Adriano D. C.: Trace Elements in the Terrestrial Environment, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, 1986: 533.
2. Papuga T.: Optimizacija izolacije in določanja monometil živega srebra v laseh z metodo plinske kromatografije, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, 2007.
3. Svetina M., Justin B., Drks P., Gosar M.: Raziskava virov živega srebra v Republiki Sloveniji in študija možnosti za zmanjševanje emisij živega srebra v okolje, Strokovne podlage, Velenje, april 2002.
4. Harris R.: A mechanistic model to examine mercury in aquatic systems, M. Sc. Thesis, McMaster, University, Hamilton, Ontario, 1991.
5. Gibičar D., Logar M., Horvat N., Marn-Pernat A., Ponikvar R., Horvat M.: Simultaneous determination of trace levels of ethylmercury and methylmercury in biological samples and vaccines using sodium tetra(n-propyl)borate as derivatizing agent, Analytical and Bioanalytical Chemistry, May 2007; number 2: 388.
6. NRC (National research Council): Toxicological Effects of Methylmercury, NRC on the Toxicological Effects of Methylmercury, National Academy Press, Washington, D. C., 2000.
7. WHO/UNEP: Guidance for identifying populations at risk from mercury exposure, WHO Department of Food Safety, Zoonoses and Foodborne Diseases, UNEP DTIE Chemicals Branch, Geneva, Switzerland, August 2008.
8. Fitzgerald, W. F., Mason R. P.: Biogeochemical cycling of mercury in the marine environment. V: Metal ions in biological systems. A Sigel in H. Sigel (ured.) Marcel Dekker, Inc., 1997; 34: 53–102.

9. Clarkson T. W.: Major Issues in Environmental Health, *Environmental Health Perspectives*, 1992; 100: 31–38.
10. Clarkson, T. W.: The Three Modern Faces of Mercury. *Environmental Health Perspectives*, 2002; 110: 11–23.
11. Koos B. J., Longo L. D.: Mercury toxicity in the pregnant woman, fetus, and newborn infant. *American journal of Obstetrics and Gynecology*, 1976: 390–409.
12. Agency for Toxic Substances and disease Registry (ATSDR): Toxicological Profile for Mercury. US Department of Health and Human Services, Public Health Service, ATSDR, Atlanta, GA., 1999. Available at:  
<http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp.html>.
13. Bernhard M., Buffoni G.: Mercury in the Mediterranean, An overview. In *Proceedings of the International Conference on the Environmental Pollution*, Thessaloniki, Greece, 1981: 21–25.
14. Veiga M. M., Baker R.: *Protocols for Environmental and Health Assessment of Mercury Released by Artisanal and Small-scale Gold Miners*. Published by GEF/UNDP/UNIDO Global Mercury Project. Vienna, ISBN 92-1-106429-5: 294.
15. [http://www.rzs-idrija.si/zgodovina\\_vec.htm](http://www.rzs-idrija.si/zgodovina_vec.htm).
16. Mlakar I.: Osnovni parametri proizvodnje rudnika Idrija skozi stoletja do danes. *Idrijski razgledi*, XIX/3–4, 1974: 1–40.
17. Cigale M.: Proizvodnja rude in metala od 1490 do 1995. *Idrijski razgledi*, 1/1997: 9–18.
18. Aberg B., Ekman L., Falk R., Greitz U., Persson G., Snihs J. O.: Metabolism of methyl mercury ( $^{203}\text{Hg}$ ) compounds in man. *Arch. Environ Health*, 1969; 19 (4): 478–484.



19. Kerper L. E., Ballatori N., Clarkson T. W.: Methylmercury transport across the blood-brain barrier by an amino acid carrier, *The American Journal of Physiology*, 1992; 267: R761-R765.
20. Rupnik I.: Ugotavljanje vsebnosti celokupnega in metil živega srebra v laseh in popkovni krvi, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, 2007.
21. Zahir F., Rizwi J. S., Haq K. S., Khan H. R.: Low dose mercury toxicity and human health, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2005; 20: 351–360.
22. Bakir F., Damluji S. F., Amin-Zaki L., Murtadha M., Khalidi A., Al-Rawi N. Y., Tikriti S., Dhahir H. I., Clarkson T. W., Smith J. C., Doherty R. A.: Methylmercury Poisoning in Iraq, *Science*, 1973; 181: 230–241.
23. World Health Organization (WHO), WHO Food Additive Series 52: Safety evaluation of certain food additives and contaminants, International Programme on Chemical Safety, 2004. Available at:  
<http://whqlibdoc.who.int/publications/2004/924166052X.pdf>.
24. Myers J. G., Davidson P. W., Cox C., Shamlaye F. L., Palumbo D., Cernichiari E., Sloane-Reeves J., Wilding E. G., Kost J., Huang L. S., Clarkson T. W.: Prenatal methylmercury exposure from ocean fish consumption in the Seychelles child development study, *The Lancet*, 2003; 361: 1686–1692.
25. Gibičar D., Horvat M., Nakou S., Sarafidou J., Yager J.: Pilot study of intrauterine exposure to methylmercury in Eastern Aegean islands, Greece, *Science of the Total Environment*, 2006; 367: 586–595.
26. Grandjean P., Murata K., Budtz-Jorgensen E., Weihe P.: Cardiac autonomic activity in methylmercury neurotoxicity: 14-year follow-up of a Faroese birth cohort, *The Journal of Pediatrics*, 1997; 144 (2): 169–176.

27. Dunn J. E., Trachtenberg F. L., Barregard L., Bellinger D., Mckinlay S.: Scalp hair and urine mercury content of children in the Northeast United States: The New England Children`s Amalgam Trial, *Environmental Research*, 2008; 107, 79–88.
28. Ikingura J. R., Akagi H.: Monitoring of fish and human exposure to mercury due to gold mining in the Lake Victoria goldfields, Tanzania, *The Science of the Total Environment*, 1996; 191: 59–68.
29. Cernichiari E., Brewer R., Myers G. J., Mars D. O., Lapham L. W., Cox C., Shamlaye C. F., Berlin M., Davidson P. W., Clarkson T. W.: Monitoring methylmercury during pregnancy: maternal hair predicts fetal brain exposure, *Neurotoxicology*. 1994, 16 (4): 705–710.
30. Becker K., Müssig-Zufika M., Conrad A., Lüdecke A, Schultz C., Seiwert M., Kolossa Gehring M.: German Environmental Survey for Children 2003/06, *Human Biomonitoring, Levels of selected substances in blood and urin of children in Germany*, 2008, available at: <http://www.umweltbundesamt.de>.
31. Butz-Jorgensen E., Grandjean P., Jorgensen J. P., Weihe P., Keiding N.: Association between mercury concentrations in blood and hair in methylmercury-exposed subjects at different ages, *Environmental Research* 95, 2004: 385–393.
32. MedlinePlus online, *Medical Encyclopedia*, 2005.
33. <http://www.roche.si/default-90940.html>.
34. *Mercury analysis manual*, Ministry of the Environment, Japan, 2004.

35. Pelizzari E. D., Liroy P., Quackenboss J., Witmore R., Clayton A., Freeman N., Waldman J., Thomas K., Rodes C., Wilcosky T.: Population-based exposure measurements in EPA Region 5: a phase I field study in support of the National Human Exposure Assessment Survey, *Journal of Exposure Analysis and Environmental Epidemiology*, 1995, 5 (3): 327–358.
36. Akagi H.: Analytical methods for evaluating human exposure to mercury due to gold mining. *Proceedings of the International Workshop on the Fate of Mercury in Gold Mining and Measures to Control Environmental Pollution in Various Countries*, NIMD/Indonesia, 1996.
37. <http://www.chem.unl.edu/uic/gc-eed.html>.
38. Johansson C., Schutz A., Sallsten G.: Impact of consumption of freshwater fish on mercury levels in hair, blood, urine and alveolar air, *Journal of Toxicology and Environmental Health A*, 2005; 68 (2): 129–140.
39. Barregard L., Horvat M., Mazzolai B., Sallsten G., Gibičar D., Fajon V., diBona S., Manthe J., Wängberg I., Haeger Eugensson M.: Urinary mercury in people living near point sources of mercury emissions, *Science of the Total Environment*, 2005; 368 (1): 326–334.

## 8 PRILOGE

### Priloga A: Seznam izmerjenih rezultatov Hg na slovenskem področju

ID	območje	B-THg [ng/mL]	H-THg [ng/g]	H-MeHg [ng/g]	U-THg [ng/mL]	U-THg [μg/g crea]
1	podeželje	0,42	132		0,34	0,21
2	podeželje	1,06	330		0,38	0,28
3	podeželje	2,24	659		0,93	1,55
4	podeželje		243	201	0,75	0,38
5	podeželje	0,69	142		0,86	5,43
6	podeželje	0,43	56		0,61	0,72
7	podeželje	0,62	95			
8	podeželje	0,52	92	46		
9	podeželje	0,89	118		0,42	0,25
10	podeželje	0,55	306	160	0,29	0,33
11	podeželje	0,57	145	37	0,38	0,67
12	podeželje	0,67	196	110	0,72	1,25
13	podeželje	0,55	147	66	0,14	0,19
14	podeželje	1,46	65		5,09	4,02
15	podeželje	0,53	205	18	0,01	0,02
16	podeželje	0,69	79	11	0,67	0,75
17	podeželje	0,73	239	143	0,24	0,48
18	podeželje	0,70	42		0,25	0,22
19	podeželje	0,97	149		1,66	1,44
20	podeželje	0,57	226		1,20	0,39
21	podeželje	1,34	316	235	1,92	2,61
22	podeželje	0,87	399		0,63	0,62
23	podeželje	1,61	178	98		
24	podeželje	0,64	127	62	0,52	0,73
25	podeželje		138	78		
26	podeželje	1,18	330		0,90	0,86
27	podeželje	0,44	96	95	0,08	0,12
28	podeželje	0,49	40			
29	podeželje	1,71	187	141	0,87	0,52
30	podeželje	0,54			0,13	0,38
31	podeželje	0,50	71	45	0,18	0,19
32	podeželje	0,47	48	49	0,99	4,61
33	podeželje	0,55	85	41		
34	podeželje	0,49	80		1,58	1,52
35	podeželje	0,49	61			
36	podeželje	2,66	520		2,50	1,24
37	podeželje	0,63	184		0,58	0,30
38	podeželje	0,56	119		0,11	0,33
39	podeželje	0,50	48		0,48	0,63
40	podeželje	0,54	81		0,33	0,70
41	podeželje	1,51	127	65		
42	podeželje	0,61	138		0,98	1,43
43	podeželje	0,83	388	84	0,17	0,24
44	podeželje	0,56	111			
45	podeželje	0,38				
46	podeželje	0,41	67	7	0,15	0,20
47	podeželje	0,60	52		0,09	0,38
48	podeželje	0,50	15		0,16	0,17

Ferkolj, S.: Vsebnost živega srebra v laseh in urinu pri osnovnošolskih otrocih v Sloveniji  
Diplomska naloga. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo

ID	območje	B-THg [ng/mL]	H-THg [ng/g]	H-MeHg [ng/g]	U-THg [ng/mL]	U-THg [μg/g crea]
49	podeželje	0,65	177	61	1,45	1,03
50	podeželje	0,52	206		1,02	3,92
51	podeželje	0,63	206	225	0,52	0,32
52	podeželje	0,35	17		0,25	0,26
53	podeželje	0,51	123	33	0,10	0,12
54	podeželje	3,76	840	668		
55	podeželje	1,82	486	188	0,58	0,39
56	podeželje	0,68	76		0,04	0,03
57	podeželje	1,61	595	483	0,84	0,88
58	podeželje	0,57	67	55	0,90	1,37
59	podeželje	0,55	125	69		
60	podeželje	0,65	66	43	0,24	0,26
61	podeželje	0,63	151		0,37	0,46
62	podeželje	0,87	73	35	0,86	0,74
63	podeželje	0,67	161	45	0,11	0,13
64	podeželje	0,76	38			
65	podeželje		146		1,03	1,32
66	podeželje	0,85	389	279	0,62	0,51
67	podeželje	1,15	301	312	0,14	0,24
68	podeželje	0,65	135		0,60	0,38
69	podeželje	0,87	100	93	1,44	1,65
70	mesto	1,01			0,74	0,48
71	mesto	0,91			0,66	0,49
72	mesto	1,00			0,45	0,31
73	mesto	1,05			0,66	0,70
74	mesto	0,63			0,07	0,88
75	mesto	0,77			0,34	1,11
76	mesto	0,60			0,23	0,81
77	mesto	0,82			0,14	0,83
78	mesto	2,19			1,02	0,59
79	mesto	1,04			1,28	0,75
80	mesto	0,84			1,01	0,84
81	mesto	1,10			0,42	0,35
82	mesto	1,32			0,63	0,78
83	mesto	1,20			2,09	2,01
84	mesto	0,55				
85	mesto	0,40			0,81	0,62
86	mesto	1,53			1,35	1,46
87	mesto	1,14				
88	mesto	1,19			1,36	1,08
89	mesto				4,27	4,15
90	mesto	1,14			0,47	0,20
91	mesto	1,17			2,24	1,27
92	mesto	0,78			1,04	0,59
93	mesto	0,99			0,70	0,48
94	mesto	0,77			0,42	0,41
95	mesto	0,83			4,57	1,76
96	mesto	1,56			4,36	1,83
97	mesto				0,40	
98	mesto	1,46			0,45	0,39
99	mesto	0,56			0,84	0,52
100	mesto	1,67			1,93	1,69
101	mesto	0,36			0,29	0,29
102	mesto	1,33			1,94	1,45
103	mesto	0,84			2,15	1,86
104	mesto	0,84			4,35	3,85

Ferkolj, S.: Vsebnost živega srebra v laseh in urinu pri osnovnošolskih otrocih v Sloveniji  
Diplomska naloga. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo

ID	območje	B-THg [ng/mL]	H-THg [ng/g]	H-MeHg [ng/g]	U-THg [ng/mL]	U-THg [μg/g crea]
105	mesto	0,58				
106	mesto	0,51			0,19	0,30
107	mesto	0,98			1,32	1,28
108	mesto	0,86			0,55	0,44
109	mesto	0,79			5,29	3,93
110	mesto	2,07			1,55	0,91
111	mesto	1,06			0,34	0,23
112	mesto	2,44			0,20	0,36
113	mesto	0,46			0,58	0,46
114	mesto	3,11			2,76	3,09
115	mesto	0,93			0,37	0,60
116	mesto	0,76			1,91	1,36
117	industrija	1,53	397	317	1,38	1,82
118	industrija	0,58	195		6,01	3,54
119	industrija	0,76	219		0,26	0,34
120	industrija		693	653	11,2	14,8
121	industrija	0,37	520	425	0,11	0,88
122	industrija	1,11	448	429	1,10	0,64
123	industrija	1,12	206	218	0,50	0,45
124	industrija	0,85	279		2,16	1,70
125	industrija	2,08	444	281	4,64	3,33
126	industrija	0,80	302	277	0,64	0,27
127	industrija	0,79	258		1,16	1,86
128	industrija	0,61	107	139	0,51	0,27
129	industrija	0,63	253	267	1,23	0,76
130	industrija	0,78	114		1,41	1,03
131	industrija	0,93	217	211	0,85	0,84
132	industrija	0,91	236		0,47	0,42
133	industrija	4,47	156		0,22	0,37
134	industrija	2,01	508	291	1,89	0,92
135	industrija	2,13	479		1,32	0,93
136	industrija	0,70	185		1,61	1,62
137	industrija	0,78	112	122	3,77	5,29
138	industrija	1,00	169		1,57	3,15
139	industrija	0,97	317	232	1,14	0,92
140	industrija	0,42	79		0,38	0,31
141	industrija	2,09	774	467	0,85	1,88
142	industrija	0,70	403	256	9,30	5,63
143	industrija	0,56	136	123	0,46	0,39
144	industrija	0,67	317	280	0,49	0,38
145	industrija	2,51	536		3,22	3,56
146	industrija	0,45	127		0,23	0,25
147	industrija	0,50	134		0,27	0,35
148	industrija	0,94	425	373	0,73	0,69
149	industrija	0,57	183		0,76	1,24
150	industrija	1,34	359	345	10,1	7,09
151	industrija	0,57	53		0,51	0,85
152	industrija	0,77			2,86	2,94
153	industrija	0,87	261	267	2,06	3,57
154	industrija	0,46	54		0,62	0,29
155	industrija	0,75	106		2,00	1,29
156	industrija	2,14	317		12,4	10,3
157	industrija	0,81	93		3,47	2,12
158	industrija	1,23	375		0,49	1,31
159	industrija	0,77	252	195	0,33	0,34
160	industrija	0,79	231		1,54	2,31

Ferkolj, S.: Vsebnost živega srebra v laseh in urinu pri osnovnošolskih otrocih v Sloveniji  
Diplomska naloga. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo

ID	območje	B-THg [ng/mL]	H-THg [ng/g]	H-MeHg [ng/g]	U-THg [ng/mL]	U-THg [μg/g crea]
161	industrija	1,12	333	259	1,23	0,72
162	industrija	2,05	606	653	11,3	7,74
163	industrija	0,55	161		0,48	0,42
164	industrija	0,78	425	468	1,57	0,72
165	industrija	1,02	256		0,90	0,66
166	industrija	0,51	117		0,24	0,29
167	industrija	0,76	243	216	0,63	0,43
168	industrija	1,29	516	347	0,91	0,67
169	industrija	0,87	131		3,10	2,30
170	industrija	1,74	504	457	0,95	1,33
171	industrija	1,10	216	197	1,64	4,39
172	industrija	0,99	231	276	1,86	1,17
173	industrija	0,57	151		0,12	0,15
174	industrija	1,03			1,03	1,54
175	industrija	0,48	60		1,33	1,05
176	industrija	1,51	404	341	1,65	1,42
177	industrija	4,11	1114		2,46	2,75
178	industrija	0,71	330	256	0,96	0,80
179	industrija	1,09	240	248	0,51	0,40
180	industrija	0,53	154		0,73	0,68
181	industrija	0,81	309		0,59	0,67