

# Metodeutvikling for opparbeiding av marine prøver for bestemmelse av nanopartikler ved sp-ICP-MS



Thea Tøien Bakken

Masteroppgave i kjemi

Kjemisk institutt, Universitetet i Bergen

Havforskningsinstituttet

Februar 2023

## Forord

Denne masteroppgaven i kjemi er skrevet i samarbeid med Havforskningsinstituttet (HI) og kjemisk institutt ved Universitetet i Bergen (UiB). Det eksperimentelle arbeidet ble utført ved Havforskningsinstituttet.

Masterprosjektet har tidvis vært en utfordrende prosess, der sykdom og hjernerystelse førte til utsettelse og utfordringer med å ferdigstille oppgaven. Det har likevel vært en utrolig lærerik prosess, og en veldig spennende periode som jeg er glad for at jeg har gjennomført. Det er mange jeg ønsker å takke i forbindelse med dette prosjektet.

Jeg vil først og fremst takke mine veiledere Stig Valdersnes (HI/UiB) og Are Sæle Bruvold (HI) for god veiledning, oppfølging, og motivasjon gjennom hele prosjektet. Jeg har satt stor pris på at dere alltid har vært tilgjengelige om jeg måtte lure på noe, om det så var på teams, mail eller kontoret. Jeg vil takke Berit, Vivian og Rebeca, i tillegg til resten av de ansatte ved laboratoriet og prøvemottaket, som har hjulpet til med opparbeiding av prøvemateriale, oppsett av analyseinstrument og svart på spørsmål jeg måtte ha underveis. Jeg vil også takke for alle kjemimøtene på HI for gode innspill og forslag til oppgaven, og mine medstudenter for gode diskusjoner og for selskap på studentloftet på HI.

Til slutt vil jeg takke familie, venner, medstudenter og min samboer for all støtte og oppmuntring gjennom hele prosjektet.

Tusen takk!

- Thea Tøien Bakken

Februar 2023

## Sammendrag

De siste årene har produksjon og bruk av nanomaterialer økt kraftig. Det finnes lite forskning på hvilken risiko disse nanomaterialene utgjør for miljø og mennesker, og det er derfor behov for å utvikle metodikk for å bestemme nanomaterialer i miljøprøver og biologiske prøver. Utgangspunktet for dette masterprosjektet var undersøkelser av prøveopparbeiding med fokus på blåskjellprøver, for videreutvikling av metodikk for bestemmelse av nanopartikler (NPer) av gull (Au) og titan (TiO<sub>2</sub>). Metoden i dette prosjektet er en videreutvikling av tidligere validert metode ved Havforskningsinstituttet, for bestemmelse av Au NPer i blåskjellprøver. Bestemmelse av NPer utføres ved å benytte enkeltpartikkel induktivt koblet plasma massespektrometri (sp-ICP-MS).

Blåskjellprøver har blitt tillaget med ulike homogeniseringsmetoder, og deretter ble det sammenliknet oppløsning med ulike enzymer. Det har også blitt testet variasjon i inkubasjonstid under enzymatisk oppløsning. Blåskjellprøvene ble undersøkt ved bruk av mikroskop, der størrelse og antall mikropartikler (MP) av blåskjellmatriks ble funnet ved bruk av databehandling av mikroskopbildene. Paralleller ble deretter videre opparbeidet for analyse på sp-ICP-MS, der det ble bestemt gjenvinning av NPer. Det ble gjort sammenlikninger av homogeniseringsmetoder ved bruk av kryomølle og kjøkkenblender, i tillegg til en kombinasjon av de to metodene. Kryomølle viste seg å gi en bedre oppløsning av blåskjellmatriksen enn ved bruk av kjøkkenblender. Enzymene Protamex og Proteinase K ble også sammenliknet, her ble det funnet mindre variasjoner enn ved de ulike homogeniseringene.

Resultatene ble til slutt vurdert etter kvalitetsparametere som selektivitet, robusthet, riktighet og måleusikkerhet, der resultatene ble vurdert etter akseptable grenser satt i Codex Alimentarius.

## Forkortelser

AN – Analytt

CM – Homogenisert med kryomølle

CPS – Telling per sekund (Counts per second)

Hom – Homogenisert med kjøkkenblender

HomCM – Homogenisert med kjøkkenblender og kryomølle

ICP-MS – Induktivt koblet plasma massespektrometri

LOD – Deteksjonsgrense

LOQ – Kvantifiseringsgrense

$m/z$  – Masse/ladningsforhold

MP – mikropartikkel/mikropartikler

MQ - MilliQ

NE – Nebuliseringseffektivitet

NP – Nanopartikkel/nanopartikler

NM – Nanomateriale/nanomaterialer

NOM – Naturlig organisk materiale

RM - Referansemateriale

RSD – Relativt standardavvik

SD – Standardavvik

sp-ICP-MS – Enkeltpartikkel induktivt koblet plasma massespektrometri

TE – Transporteffektivitet

## Innholdsfortegnelse

Forord .....	II
Sammendrag .....	III
Forkortelser .....	IV
1. Introduksjon .....	1
1.1. Bakgrunn .....	1
1.2. Målsetting .....	2
2. Teoretisk bakgrunn .....	3
2.1. Nanomaterialer .....	3
2.1.1. Nanomaterialer definisjon .....	3
2.1.2. Fysiske og kjemiske egenskaper .....	3
2.1.3. Bestemmelse, forekomst, overvåkning og kontroll.....	4
2.1.4. Giftighet .....	5
2.1.5. Nanopartikler i det marine miljø .....	7
2.2. Biologiske prøver .....	9
2.2.1. Blåskjell.....	9
2.2.2. Dyptvannsreke.....	11
2.2.3. Påvirkning fra nanopartikler.....	12
2.3. Prøveopparbeiding .....	14
2.3.1. Homogenisering .....	14
2.3.2. Enzymer .....	15
2.4. Analyseteknikker .....	17
2.4.1. Mikroskop .....	17
2.4.2. ICP-MS.....	19
2.4.3. sp-ICP-MS.....	21
2.5. Analysekvalitet .....	24
3. Eksperimentelt arbeid og metode.....	27
3.1. Utstyr og kjemikalier .....	27
3.2. Tillaging av standarder .....	29
3.2.1. Fortynning av nanopartikelstandarder.....	29
3.2.2. Fortynning av ioniske standarder .....	30
3.3. Innledende undersøkelser .....	31
3.4. Metode for blåskjell med ulik homogenisering.....	33

3.4.1.	Homogenisering av blåskjell .....	33
3.4.2.	Tillaging av blåskjellprøver .....	35
3.5.	Metode for blåskjell tilsatt ulike enzym .....	37
3.5.1.	Anvendelse av Protamex og Proteinase K .....	37
3.5.2.	Tillaging av blåskjellprøver .....	38
3.6.	Metode for reker med ulik opparbeiding .....	40
3.6.1.	Homogenisering av reker .....	40
3.6.2.	Opparbeiding av rekeprøver .....	41
3.7.	Mikroskopanalyser av mikropartikler fra blåskjell .....	42
3.7.1.	Undersøkelse av mikropartikler med mikroskop .....	42
3.7.2.	Databehandling av mikroskopbilder i FIJI ImageJ .....	42
3.8.	sp-ICP-MS bestemmelse av nanopartikler .....	44
3.8.1.	Oppsett av sp-ICP-MS .....	44
3.8.2.	Bestemmelse av Au 60 nm nanopartikler .....	45
3.8.3.	Bestemmelse av TiO <sub>2</sub> nanopartikler .....	45
3.8.4.	Behandling av rådata i MassHunter .....	46
3.8.5.	Formler .....	48
3.9.	Statistikk .....	51
3.9.1.	Bakgrunn .....	51
3.9.2.	Formler .....	52
3.10.	Analysekvalitet .....	54
3.10.1.	Parametere .....	54
3.10.2.	Formler .....	56
4.	Resultater og diskusjon .....	57
4.1.	Innledende forsøk for opparbeiding av blåskjellprøver .....	57
4.2.	Blåskjell opparbeidet med ulik homogenisering .....	58
4.2.1.	Visuell undersøkelse ved bruk av mikroskop .....	58
4.2.2.	Bestemmelse av Au 60 nm nanopartikler .....	66
4.2.3.	Bestemmelse av TiO <sub>2</sub> nanopartikler .....	70
4.2.4.	Oppsummering .....	74
4.3.	Blåskjell opparbeidet med ulike enzymer .....	75
4.3.1.	Kvantitativ undersøkelse ved bruk av filter .....	75
4.3.2.	Visuell undersøkelse ved bruk av mikroskop .....	77

4.3.3.	Bestemmelse av Au 60 nm nanopartikler .....	83
4.3.4.	Bestemmelse av TiO <sub>2</sub> nanopartikler .....	86
4.3.5.	Oppsummering .....	89
4.4.	Sammenlikning med resultater fra valideringsrapport .....	91
4.5.	Rekeprøver.....	93
4.6.	Analysekvalitet .....	95
4.6.1.	Transporteffektivitet.....	95
4.6.2.	Selektivitet.....	96
4.6.3.	Deteksjonsgrense og kvantifiseringsgrense .....	97
4.6.4.	Måleområde.....	98
4.6.5.	Presisjon .....	98
4.6.6.	Riktighet .....	101
4.6.7.	Robusthet.....	104
4.6.8.	Måleusikkerhet .....	105
5.	Konklusjon.....	107
6.	Videre arbeid.....	109
7.	Bibliografi .....	110
	Bibliografi .....	110
8.	Vedlegg .....	121

# 1. Introduksjon

## 1.1. Bakgrunn

Begrepet nanomaterialer (NM) har blitt mer utbredt de siste årene, selv om NM har eksistert rundt oss og i naturen til alle tider. Nanomaterialer defineres som materialer der minst en dimensjon befinner seg i nanoskalaen mellom 1-100 nm. Det finnes et stort antall ulike former for nanomaterialer, blant annet plater, tuber, fibre og partikler (Maan, Sharma, Nath, Vo, & Minh, 2020). Selv om man gjerne tenker på NM som tilvirkede materialer, kan man finne NM naturlig blant annet i vulkan-asje, sand, støv og røyk (Lespes, Faucher, & Slaveykova, 2020). Eksempler på naturlige NM inkluderer mineraler som sølv og gull, men også proteinbaserte materialer som silke og kollagen (Lo & Fauzi, 2021). Mennesker har produsert og benyttet NM i mange århundrer, uten å nødvendigvis være klar over at det var NM, og i Romerriket ble det produsert gull og sølv NM helt tilbake til år 400 (Tantra, 2016). I middelalderen økte produksjonen av NM fra glitrende metaller, som ble benyttet til å dekorere keramikk og andre skinnende overflater. Disse metodene benyttes fortsatt i dag (Lungu, Neculae, Bunoiu, & Biris, 2015).

Over 70% av tilvirkede NM benyttes i dag innen elektronikk, energi og biomedisin, hvor elektronikk står for den største andelen. De siste tiårene har nanoteknologien hatt en voldsom vekst, og det er forventet at industrien vil passere en verdi på 125 milliarder dollar innen 2024 (Xia & Liu, 2020).

Nanopartikler (NP) er en form for NM som kan defineres som uorganiske, organiske eller metallorganiske partikler som endrer sine fysiske eller kjemiske egenskaper som en funksjon av størrelse og form (Hochella, et al., 2019). NPer kan klassifiseres i ulike grupper, basert på blant annet form, størrelse, opphav og kjemisk sammensetning (Lungu, Neculae, Bunoiu, & Biris, 2015). I disse gruppene inngår eksempelvis metall, keramiske og polymere NPer (Khan, Saeed, & Khan, 2019). Opphavet til NPer kan være naturlig eller tilvirket, og deres fysiske og kjemiske egenskaper kan skille seg signifikant fra egenskapene til makroskopiske partikler (De Mello Donega, 2014). NPer er i dag utbredt, og deres påvirkning på mennesker, dyr og miljø er ikke fullt dokumentert. Undersøkelser har vist at NPer kan entre organismer og celler, og skape oksidativt stress i levende organismer (Limbach, et al., 2007).

Havforskningsinstituttet har utviklet en validert metode for bestemmelse av Au (gull) NPer i blåskjell ved bruk av sp-ICP-MS (Valdersnes, Bienfart, Solli, & Bruvold, 2020). Arbeidet i denne oppgaven var i stor grad gjort med utgangspunkt i denne metoden. Ulike variabler som



prøveopparbeiding, inkubasjonstid og enzymatisk oppslutning ble justert i ulike trinn for å finne en forbedret metode, som senere kan benyttes til opparbeiding av blåskjell- og rekeprøver.

## 1.2. Målsetting

Hovedmålet med dette prosjektet har vært å videreutvikle metodikk for homogenisering og enzymatisk oppløsning av marine prøver, med utgangspunkt i Havforskningsinstituttets validerte metode for ekstraksjon av Au NPer i blåskjell (Valdersnes, Bienfart, Solli, & Bruvold, 2020). Det første steget i prosjektet var å undersøke lengden på inkubasjonstid under prøveopparbeidingen, deretter ulike former for homogenisering av marine prøver, og til slutt ulike enzymer for oppløsning av prøvene. Prøveopparbeiding ved ulik tid, homogenisering og enzym ble undersøkt ved bruk av mikroskop. Bestemmelse av Au og  $\text{TiO}_2$  NPer ble gjort ved bruk av sp-ICP-MS. Det ble i hovedsak benyttet blåskjell til metodeutviklingen, før metoden ble forsøkt testet på rekeprøver.

## 2. Teoretisk bakgrunn

### 2.1. Nanomaterialer

#### 2.1.1. Nanomaterialer definisjon

EU-kommisjonen definerer NM som en fellesbetegnelse på materialer med en størrelse innenfor nanoskalaen, som strekker seg fra 1-100 nm. Denne definisjonen av NM tar ikke hensyn til materialets potensielt skadelige egenskaper, og omhandler materialer med naturlig opphav, i tillegg til menneskeskapt NM dannet med og uten hensikt (European Commission, 2022). NM kan forekomme som aggregater, hvor partiklene er sterkt bundet til hverandre, eller som agglomerater der partiklene er svakt bundet til hverandre. Målinger av størrelse og størrelsesfordeling av NM kan være krevende, og ulike metoder kan gi resultater som ikke lar seg sammenligne. Det jobbes i dag for å utvikle metoder som gir samsvar i resultatene på tvers av ulike metoder og instrumenteringer. Da det kan være vanskelig å definere om et NM består utelukkende av partikler innenfor nanoskalaen, er det satt en grense der minst 50% av partiklene må være mindre enn 100 nm (European Commission, 2022).

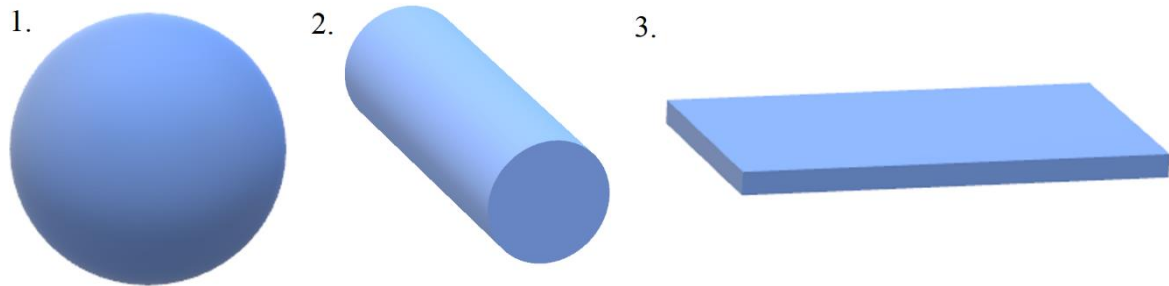
Fra 90-tallet har bruken av NM økt kraftig, og det ble forventet at produksjonen av NM ville øke 25 ganger fra 2010 til 2020 (González-Muñoz, et al., 2014). NM benyttes i mange kommersielle produkter, i alt fra elektronikk, kosmetikk, farge-tilsetninger i mat, implantater til biologiske prober. I tillegg til de NM som produseres med hensikt, dannes store mengder NM som bi-produkt fra ulike industrielle prosesser (Hochella, et al., 2019)

#### 2.1.2. Fysiske og kjemiske egenskaper

Når et materiales størrelse beveger seg ned i nanoskalaen øker både overflateenergien og overflate/volum forholdet. Atomene i overflaten av et NM har færre naboatomer enn atomene inne i materialet. Færre naboatomer i overflaten gir et høyere antall ytre orbitaler som ikke har fullt ytterste skall (De Mello Donega, 2014). Disse orbitalene gir økt overflateenergi (Cademartiri & Ozin, 2009). Den høyere energien gjør at partiklene befinner seg i en mer reaktiv tilstand i romtemperatur, sammenlignet med større materialer (Phan & Haes, 2019).

En annen faktor som gir NM deres unike egenskaper, er kvanteeffekter (Kumar & Kumbhat, 2016). NM har ofte optiske egenskaper som påvirkes av kvanteeffektene. NM av gull vil ha en rød-rosa farge, og NM av silikon er svart i stedet for grå-aktige. NM av gull har også et vesentlig lavere smeltepunkt enn større gullmaterialer (Lungu, Neculae, Bunoiu, & Biris, 2015). NM kan

opptre i ulike former og dimensjoner, og et utvalg av disse dimensjonene er vist i Figur 1. Ulike former har ulike overflate/volum forhold, og er dermed med på å bestemme NMs egenskaper.



*Figur 1 - illustrasjon av ulike dimensjoner av nanomaterialer. 1. null-dimensjonal sfære, 2. en-dimensjonal tube, 3. to-dimensjonal plate*

Nanopartikler (NP) av samme forbindelse med ulik form og størrelse kan ha ulike kjemiske egenskaper, eksempelvis ulik reaktivitet og hardhet (Khan, Saeed, & Khan, 2019). NPer er den formen for NM som benyttes i dette prosjektet, der det antas at disse har en sfærisk form.

### 2.1.3. Bestemmelse, forekomst, overvåkning og kontroll

Mennesker har blitt eksponert for naturlige NM gjennom luften gjennom hele vår eksistens, men grunnet den økende bruken av tilvirkede NM i industri, forbrukerprodukter og mat, er det forventet en økt mengde utslipp til miljøet fremover. Dette vil igjen føre til en økt eksponering for mennesker.

Opphavet til NM kan skilles mellom naturlig og tilvirket, hvor tilvirkede NM kan skilles mellom industrielt fremstilte NM og tilfeldig fremstilte biprodukter (Oberdörster, 2007). Industrielt fremstilte NM inkluderer blant annet nanotråder, nanotuber og nanoskjell med bestemte størrelser og egenskaper for deres spesifikke bruksområde (Remedios, Rosario, & Bastos, 2012). NPer er en form for NM som finnes med både naturlig og tilvirket opphav. Eksempler på kilder til naturlige NPer kan være skogbrann og vulkanutbrudd, men også bakterier, virus og partikler fra andre levende organismer. Tilfeldig fremstilte tilvirkede NPer kan dannes fra forbrenningsmotorer, røyk fra blant annet polymer, oppvarming av overflater, koking, grilling og forbrenning av olje og gass. Industrielt fremstilte NPer dannes med hensikt til å brukes i produkter innenfor blant annet kosmetikk, medisin og elektronikk.

For å kunne sikre tryggheten til ulike tilvirkede NPer, i tillegg til å overvåke og redusere de økologiske og potensielt giftige effektene, må det utarbeides et regelverk for kontroll av forbrukerprodukter, miljø og matvarer. For at dette skal kunne gjøres på en sikker og effektiv måte, trengs det et omfattende antall vitenskapelige studier, om både farer, forekomst og risiko, sammen med validerte og egnede analytiske metoder for både overvåkning og kontroll (Fabricius, Duester, Meermann, & Ternes, 2014).

Det danske forbrukerrådet har i et samarbeid med DTU og det danske økologiske råd dannet en database hvor alle kjente produkter som inneholder nanomaterialer registreres (Forbrukerrådet, Det økologiske Råd og DTU Miljø, u.d.). Nettsiden NanoDatabase er finansiert av det Europeiske forskningsrådet, og per dags dato er det 5356 registrerte produkter på deres nettside (NanoDatabase, 2023). Her er det listet TiO<sub>2</sub> NPer i kosmetiske produkter som solkrem og neglelakk, men også spiselige produkter som M&Ms, marshmallows og tyggegummi.

I dette masterprosjektet benyttes Au NPer til å undersøke gjenvinning ved sp-ICP-MS. Effekten Au NPer kan ha på cellene i kroppen er ikke fullt dokumentert. Det er et begrenset antall kilder til Au NPer som kan tas opp i menneskekroppen, men eksponering for disse NPene kan stamme fra bruk av gullsmykker, eller fra mat som inneholder eller er dekorert med gull. Det finnes et stort antall hudpleieprodukter som inneholder Au partikler, det er per dags dato listet 76 produkter hos NanoDatabase som inneholder Au NPer (NanoDatabase, 2023). Noen av de mest utbredte NPene inkluderer Ag, TiO<sub>2</sub> CeO<sub>2</sub>, ZnO og karbonforbindelser.

#### 2.1.4. Giftighet

NPer har nærmest uendelige anvendelser, og bruken av disse vil bare øke i årene som kommer. Deres påvirkning på miljøet er ikke dokumentert i stor grad (Liaqat, et al., 2021). Det er en økt bekymring knyttet til helsemessige og miljømessige utfordringer knyttet til den økende bruken av NPer. Studier har vist at NPer enkelt kan entre menneskekroppen, da de er på størrelse med cellulære komponenter. Disse kan entre kroppen gjennom mat, lunger eller gjennom huden (Kumar & Kumbhat, 2016). NPer kan i enkelte tilfeller også binde seg til proteiner, og på denne måten bli tatt opp i celler (González-Muñoz, et al., 2014). NPer evne til å entre kroppen blir utnyttet innen kreftmedisin, hvor de benyttes som bærere av medikamenter i kroppen. Et eksempel på en type NP som benyttes til dette er chitosan, et polysakkarid fra skallene til enkelte krepsdyr. Chitosan har en positiv ladning som kan danne NPer i kompleks med negativt ladde legemidler (Bhatia, 2016).

Det er dokumentert at NPer kan akkumulere i gjellene til skalldyr, som potensielt kan føre til at NPer overføres oppover i trofiske nivå. Dette kan føre til at mennesker får i seg høyere konsentrasjoner av NPer gjennom sjømat i fremtiden. NPer som entrer kroppen gjennom næringsopptak eller gjennom pusting kan gå over i blodet, hvor det videre kan transporteres til lymfer og organer.

En potensielt alvorlig problemstilling med NPer i kroppen er at de kan danne reaktive oksygenforbindelser (ROS) (Yan, Zhou, & Gardea-Torresdey, 2017). ROS dannes i eukaryote celler, og i overskudd kan disse reagere med lipider, proteiner og DNA (Griendling, et al., 2016). Dette kan endre egenskapene til molekylene, og dermed føre til skade på DNA eller gi uønsket cellevekst. Dette kan igjen føre til misdannelser, celledød og kreft (Valko, Rhodes, Moncol, Izakovic, & Mazur, 2006).

Titandioksid ( $\text{TiO}_2$ ) er en naturlig oksidert form av titan, som har stor utbredelse (Bhattacharya, et al., 2009).  $\text{TiO}_2$  NPer er et av de mest utbredte tilvirkede nanomaterialene, og benyttes i et stort antall produkter innen kosmetikk, solkrem, maling og i overflatebelegg. I Australia er det registrert over 300 solkremer som inneholder nanoformer av  $\text{TiO}_2$  og/eller ZnO NPer (Ward & Kach, 2009). Studier har vist ulike påvirkninger av  $\text{TiO}_2$  NPer mellom akvatiske arter, hvor tid og konsentrasjon av eksponeringen har vært en signifikant faktor når det kommer til toksisiteten for eksponeringen. Økotoksitet har i hovedsak blitt testet i ferskvannssystemer, og effekten av  $\text{TiO}_2$  på marine organismer er i mindre grad dokumentert. Eksponering for  $\text{TiO}_2$  hos den marine sneglearten abalone resulterte ikke i økt dødelighet, men eksponeringen økte artens oksidative stress (Kaegi, et al., 2008).

Franske myndigheter sendte i 2016 et forslag om å klassifisere  $\text{TiO}_2$ -NPer som kreftfremkallende til Det europeiske kjemikaliebyrået (ECHA). Dette ble behandlet av ECHA, hvor ble det besluttet at innånding av disse NPene kan ha en kreftfremkallende effekt (Miljødirektoratet, 2022). I slutten av 2022 kom det likevel i en dom som besluttet å oppheve klassifiseringen av  $\text{TiO}_2$  som kreftfremkallende (InfoCuria, 2022). Denne dommen ble opphevet da domstolen mente at disse kreftfremkallende egenskapene kun var knyttet til et fåtall inhalerbare  $\text{TiO}_2$  partikler, som befant seg i en bestemt form, fysisk tilstand, partikkelstørrelse og konsentrasjon (Miljødirektoratet, 2022). Det kunne derfor ikke konkluderes med at  $\text{TiO}_2$  partiklene var kreftfremkallende, men at det kunne skyldes partikkeltoksitet knyttet til partiklenes form og konsentrasjon.

NPer av Au anses som relativt trygge, da de har en ikke-giftig inert kjerne (Bahadar, Maqbool, Niaz, & Abdollahi, 2016). De er utbredt innen biomedisin, grunnet deres unike kjemiske egenskaper. De kan binde til aminer og tioler, har høy stabilitet og kan brukes som bærere av medisin innen kreftbehandling (Yang, et al., 2014). Det finnes likevel noen rapporter som indikerer en viss cytotoxicitet knyttet til Au NPer, blant annet celledød ved store doser (Patra, Banerjee, Chaudhuri, Lahiri, & Dasgupta, 2007).

På cellulært nivå har giftigheten av karbonbaserte NPer blitt observert som en størrelsesavhengig faktor (Magrez, et al., 2006). NPer av andre elementer, som eksempelvis sølv (Ag) benyttes med stor effekt mot flere miljømessige problemstillinger, blant annet til rensing av avløpsvann. Det er likevel knyttet utfordringer til disse Ag-NPer, de tas blant annet opp i lever, gjeller og muskler hos regnbueørret (Ali, et al., 2021). Dette ble undersøkt etter eksponering over en 25 dagers periode, hvor det ble oppdaget økt oksidativt stress, men det kunne ikke dokumenteres økt dødelighet. Disse resultatene ble også dokumentert hos karpefisk og marine alger, hvor det i tillegg var tegn til skade på lever og organer (Liaqat, et al., 2021).

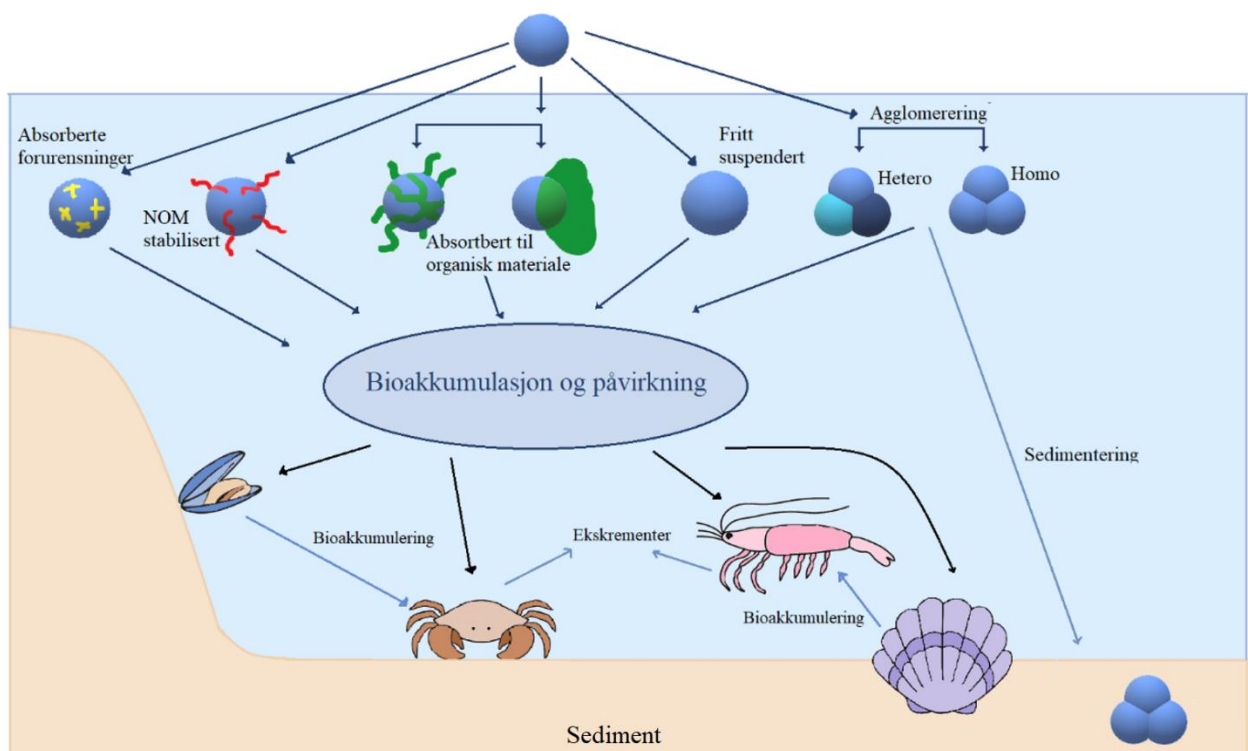
#### 2.1.5. Nanopartikler i det marine miljø

Mengden tilvirkede NPer i kommersielle produkter har økt med utviklingen innen nanoteknologi, som har ført til bekymring for miljømessige påvirkninger og helserisiko (Zhu, Zhou, & Cai, 2011). Det har blitt funnet høye konsentrasjoner av TiO<sub>2</sub> NPer i avrenningsvann som har vært i kontakt med malte overflater (Kaegi, et al., 2008). Dette kan bety at konsentrasjonene av TiO<sub>2</sub> vil øke i akvatiske miljø, hovedsakelig i ferskvann og kystnære miljø. En undersøkelse fra 2008 fant TiO<sub>2</sub> NP-konsentrasjoner i akvatiske miljø fra 0,7 til 16 µg/L, avhengig av lokasjon og forurensningsgrad (Mueller & Nowack, 2008).

NPer kan også entre marine miljø gjennom avfall og luftforurensninger. Når bruken av NPer blir mer og mer utbredt, vil også forekomsten i det marine miljø øke. Det finnes likevel lite data og ingen risikovurdering av marine NPer, og det er liten kunnskap om påvirkningen NPer har på marine organismer (Galocchio, et al., 2020). I tillegg til lite kunnskap om hvordan NPer påvirker marine organismer, er det mangel på forskning som omhandler hvordan akvatiske organismer tar opp eller fordøyer NPer. I marine miljø vil NPer kunne danne aggregater, som i bløtdyr kan absorberes raskere enn mindre, frie partikler (Ward & Kach, 2009).

Dette kan bety at blåskjell kan ha en sentral rolle i bioakkumulering av NPer i marine næringskjeder, og dermed eksponere mennesker for NPer i et kosthold med mye sjømat (Baker, Tyler, & Galloway, 2014).

En stor andel av disse NPene vil sedimenteres, eller hetero-aggregeres med naturlig organisk materiale (NOM) (Baker, Tyler, & Galloway, 2014). Høyere konsentrasjoner av NOM gir økt stabilisering av NPene. Figur 2 viser hvordan NPer som entrer det marine miljøet kan forekomme som, eller omdannes til, ulike former av NPer. Marine organismer kan deretter på ulike måter interagere med disse NPene, og bentiske organismer som flerbørstemark kan ta opp NPer gjennom mat (Wang, Yin, Zhao, & Xing, 2016), mens muslinger kan ta opp NPer gjennom filtrering. Dette kan føre til at NPer akkumuleres oppover i trofiske nivå. Det har blitt observert en økt akkumulering av  $\text{TiO}_2$  NPer i sebramuslinger når NPene ble blandet med mikroalger (Larios, Pulicharla, Brar, & Cledón, 2018). Her ble det observert en hundre ganger høyere akkumulering av  $\text{TiO}_2$  NPer i sedimentene ved sebramuslinger til stede, som tyder på at muslingers filtrerende egenskaper øker tilførselen av NPer til miljøet.



Figur 2 – Ulike former for nanopartikler i det marine miljø

## 2.2. Biologiske prøver

### 2.2.1. Blåskjell

Blåskjell (*Mytilus* spp.) er en utbredt art som lever i alle tempererte hav. De er en kjent matvare og en populær organisme for overvåkning av antropogen forurensning langs kysten (Beyer, et al., 2017). I voksenstadiet er blåskjell stasjonære, festet med kraftige byssustråder til treverk, stein eller liknende overflater (Bayne, 1976). Blåskjell har en kraftig bakre lukkemuskel, og en svakere lukkemuskel i front. Skjellene blir rundt 10 cm lange, med et ytre skall kledd i blå/svart periostakum, og et indre perlemorslag. Selv om blåskjellene er stasjonære, har de en kraftig muskel som kalles fot. Denne kan de benytte til å rive seg løs og forflytte seg ved behov (Christensen & Christiansen, 1978). Blåskjellene lever i og under tidevannssonen, 0-10 m, og tåler store endringer i miljøforhold. Dette inkluderer endringer i temperatur, saltnivå og tørke (Havforskningsinstituttet, 2021).



Figur 3 - Oversiktsbilde over innmat, blåskjell. Bilde hentet fra eget laboratoriearbeid



Innmaten består hovedsakelig av vann og proteiner, i tillegg til en liten andel fett og mineraler. Relevant næringsinnhold i rå blåskjell er vist i Tabell 1.

*Tabell 1 - Næringsstoff i rå blåskjell per 100g, hentet fra (Matvaretabellen, 2023)*

<b>Næringsstoff</b>	<b>Mengde</b>
Vann	88 g
Fett	1,4 g
Protein	10,4 g
Kalsium	30 mg

Blåskjell er særkjønnede, og gyter om våren. En hunn kan legge opp til ti millioner egg i løpet av en gyting. Larvene er pelagiske, og fester seg etter hvert til underlaget hvor de vokser til en musling. Blåskjell når voksen størrelse etter ca 3 år, og har en levetid på opp til 20 år (Christensen & Christiansen, 1978). Blåskjell er filterspisende muslinger, og lever av å filtrere vannmasser for mikroorganismer. Blåskjell har en effektiv filtrering, og kan filtrere over 100 liter vann i løpet av et døgn (Moen & Svensen, 2000). Partikler fanges opp i gjellene, hvor de plukkes opp av små hår og føres til munnen (Havforskningsinstituttet, 2021). Når blåskjell fanger opp partikler uten næringsverdi, kan de kvitte seg med suspenderte partikler gjennom pseudoekskremer. Disse partiklene blir fanget i slim, og blir spyttet ut uten å gå gjennom fordøyelsessystemet (Lin & Zhang, 2015). Pseudoekskremer er også benyttet til å kontrollere næringen skjellet tar opp. Under algeoppblomstring om våren er det mer næring i vannet enn skjellene har behov for, og det kan dermed være fordelaktig å kvitte seg med partikler før de fordøyes (Gosling, 2015).

På grunn av blåskjellenes gode filtreringsevne og stasjonære levevis, har de blitt benyttet i prosjekter for overvåkning av antropogene forurensninger. Det er også viktig å kartlegge blåskjellenes oppsamling av miljøgifter og forurensninger, da de er en populær matvare. Disse faktorene gjorde blåskjell ideelle for overvåkning, og var bakgrunn for det amerikanske «mussel watch» programmet (Goldberg, 1986). Her benyttes blåskjell til kontroll av vannkvalitet ved å undersøke kontaminering. «Mussel watch» har blitt svært utbredt, og det finnes i dag data fra over 50 nasjoner (Beyer, et al., 2017).

### 2.2.2. Dyptvannsreke

Dyptvannsreke, eller *Pandalus borealis*, er et bentisk krepsdyr i ordenen tifotkreps, som lever i eller nært sedimentene ned til 1200 meters dyp. Arten har stor utbredelse, og finnes i Atlanterhavet opp til Arktis, og langs hele norskekysten. Arten lever også langs kysten av Grønland, Island og Canada. De lever på leire eller mudderbunn, og trives best under 70 meters dyp der temperaturen holder seg konstant lav (Moen & Svensen, 2000).

Dyptvannsreken har en smal, lang kropp, og voksne individer kan vokse til en maksimal kroppslengde på 15 cm. De har et grårosa ytre skjelett som dekker kroppen. Dette skjelettet har flere funksjoner, og fungerer som en smittebarriere, forsvar mot rovdyr og som muskelfeste. Arten har også et hodeskjold som dekker hode og fremre del av kroppen. De har fem par gangbein, hvor det fremre paret er modifisert til gripeklør, og en vifteformet leddelt hale som benyttes til svømming (van der Meeren, Woll, & Søvik, 2008). Et eksemplar av dyptvannsreke er vist i Figur 4.



*Figur 4 - Oversiktsbilde dyptvannsreke*

Reker består i hovedsak av vann og protein, men også et lavt innhold av fett og mineraler. Relevant næringsinnhold i kokt reke er vist i Tabell 2.

Tabell 2 - Næringsstoff i kokt reke, per 100g, hentet fra (Matvaretabellen, 2023)

Næringsstoff	Mengde
Vann	68 g
Fett	0,8 g
Protein	23,3 g
Kalsium	61 mg

Arten er en protandrisk hermafroditt, som vil si at de skifter kjønn. Dette er den eneste arten av tiftokreps som er hermafroditt. Opp til individene når en kroppslengde på ca 12 cm lever de som hann, før de bytter til hunnkjønn. Dette skjer vanligvis når rekene når en alder på 2,5 år. Rekene gyter om høsten, hvor små hannreker fester en spermpakke til hunnens forkropp. Her blir rognen befruktet før den fester seg som en klynge mellom hunnens svømmeben. Dette kalles utrogn, og eggene klekkes etter mellom 5 og 9 måneder, avhengig av levested. Fra eggene klekkes larver som lever et frittsvømmende pelagisk liv i 3 måneder, før de trekker mot bunnen.

På solfylte dager svømmer rekene opp mot overflaten for å spise, før de synker mot bunnen igjen etter solnedgang. Det drives utbredt fiske av dyptvannsreke, og dette gjøres hovedsakelig i tidsrommet der rekene beveger seg opp eller ned i vannmassene. Fisket er best rundt midnatt, eller tidlig om morgenen mens rekene er på vei oppover. De kan også vandre horisontalt, hvor de trekker mot grunnere vann om vinteren. Rekene kan tilpasse seg kulde ved å regulere magnesiumbalansen i blodet, som hindrer blodet fra å fryse om det er under 0 °C (van der Meeren, Woll, & Søvnik, 2008).

### 2.2.3. Påvirkning fra nanopartikler

Enkelte NPer blir fanget i gjellene eller fordøyelsessystemet hos blåskjell, mens de fleste blir fjernet gjennom pseudoekskremer (Baker, Tyler & Galloway, 2014). Som nevnt i kapittel 2.1.5 kan NPer aggregeres og tas opp i bløtdyr, og dermed kan blåskjell operere som en oppsamler av NPer i den marine næringskjeden. Ved eksponering for TiO<sub>2</sub>-NPer ble det observert at blåskjell kunne kvitte seg med 70% av NPene etter tre dager uten eksponering (Gallocchio, et al., 2020).

Det er dermed en viss fare for at mennesker kan eksponeres for TiO<sub>2</sub>-NPer ved konsumering av blåskjell. En løsning på denne utfordringen kan være en renseprosess kalt depurasjon. Her

plasseres sjømat i tanker med rent sjøvann, som holdes under gunstige forhold for filtrering i organismen (FNs organisasjon for ernæring og landbruk, 2008). Dette er i dag hovedsakelig benyttet for å fjerne biologiske produkter som *E. coli*, eller sandpartikler, men kan på sikt være et nødvendig steg også for NPer (Galocchio, et al., 2020).

Det har blitt påvist at  $\text{TiO}_2$  kan påvirke giftigheten til polysykliske aromatiske hydrokarboner (PAH) når blåskjell utsettes for en kombinasjon av disse forbindelsene. Det ble dokumentert økt oksidativt stress i tillegg til skader på kromosomer i blåskjell i nærvær av PAH og  $\text{TiO}_2$  (Farkas, et al., 2015). Hos andre muslinger har det blitt påvist en økt dødelighet i populasjonen ved en konsentrasjon av  $\text{TiO}_2$  NPer på 0,7 ppm over tid (Larios, Pulicharla, Brar, & Cledón, 2018).

Det er lite tilgjengelig forskning på hvordan reker påvirkes av NPer. Deres naturlige habitat i dypere hav gjør de mindre utsatt enn arter som lever nærmere kysten og i ferskvann. Kyst, ferskvann og elvemunninger er områder hvor det kan samles store mengder NPer, og saltinnholdet i vann kan spille en rolle for NPer's egenskaper. *M. mongolica* er et kystnært krepsdyr som i eksperiment har blitt utsatt for vann med ulikt saltinnhold og konsentrasjoner av  $\text{TiO}_2$  og Ag NPer. Her ble det funnet toksistiske egenskaper fra begge forbindelsene, men Ag viste størst påvirkning på artens reproduksjon, i tillegg til å påføre fysiske skader på skall (Haug, Li, & Lin, 2022).

Analyser har også vist at krepsdyret *Gammarus roeseli* får en redusert produksjon av organisk materiale ved eksponering for Ag NPer, i et eksperiment med lave konsentrasjoner av Ag NPer for å etterligne konsentrasjoner som kan oppnås i artens naturlige habitat (Andrei, et al., 2016). Begge disse krepsdyrene er beslektet reker, og det er dermed mulig å anta at disse NPene vil kunne gi liknende skader ved eksponering for dyptvannsreker.

## 2.3. Prøveopparbeiding

### 2.3.1. Homogenisering

Det ble benyttet to metoder for homogenisering av blåskjell og rekeprøver i dette prosjektet, «vanlig» homogenisering med kjøkkenblender, og kryomølling. For å redusere faren for kontaminering ble beholdere holdt lukket så mye som det lot seg gjøre, og alt utstyr ble nøye skylt med MilliQ-vann (MQ-vann) mellom hver samleprøve som ble opparbeidet. Som nevnt i kapittel 2.1.4 og 2.1.3 forekommer NPer i et stort antall produkter, inkludert overflatebehandlinger og maling, dermed kunne kontaminering være en risiko ved prøveopparbeidingen.

Vanlig homogenisering av blåskjell og reker ved HI blir gjort med kjøkkenblender. Her benyttes samleprøver bestående av 25 blåskjell, mens samleprøver av reker skal splittes i pillede reker og reker med skall. For reker følges instruks fra EU 1881/2006 hvor rekene skal opparbeides i kokt tilstand (European union, 2006). Ved fangst i Norge kokes rekene vanligvis om bord på fiskefartøy, før de leveres. Reker blir ikke fryst før opparbeiding med homogenisator, men oppbevares i kjøleskap.

Kryomølling er en metode som benyttes for å kverne prøver ved lave temperaturer, slik at prøven blir homogenisert til små, jevne partikler. Dette gjøres ved temperatur langt under frysepunktet, og det er ofte tilkoblet flytende nitrogen som har en temperatur på  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Kumar, Biswas, & Gupta, 2016). Metoden består av en nedkjølingssekvens, etterfulgt av flere intervaller med kverning. Nedkjølingssekvensen varer i  $\pm 15$  minutter avhengig av prøvetype, for å sørge for at prøven har tilstrekkelig lav temperatur før den pulveriseres. Nedkjølingen har flere fordeler, blant annet reduserer det termiske spenninger som kan føre til at prøven ødelegges, og for reaktive prøver senkes reaktiviteten ved opparbeiding. Kryomølling gir også en finere fordeling av bestanddelene, da hele prøven blir malt til et fint pulver (Aikin & Juhas, 1997).

Metoden er utbredt innen farmasøytisk og materialvitenskapelig forskning, og kan benyttes til et bredt spekter av prøver. Kryomølle gjør om prøven til et jevnt fordelt «pulver», som kan bidra til bedre kvalitet på prøven, i tillegg til at det kan gi bedre homogenitet enn ved tradisjonell homogenisering. Kryomølling er likevel en kostbar form for homogenisering, så en sammenlikning mellom kryomølling og homogenisering med kjøkkenblender ble utført for blåskjell- og rekeprøver. Kryomølling har tidligere blitt benyttet for å opparbeide NPer av aluminium (Al) og sølv (Ag), og har vist seg å være en effektiv metode for opparbeiding av

prøver med suspensjoner av NPer (Kumar & Biswas, 2019), (Katiyar, Biswas, Tiwary, Machado, & Gupta, 2019).

### 2.3.2. Enzymer

Enzymer er proteiner som fungerer som katalysatorer i biologiske og kjemiske reaksjoner, der de bidrar til å øke reaksjonshastigheten og senke aktiveringsenergien. For prøver bestående av proteiner blir det ofte benyttet protease enzymer, som kan bryte ned proteiner til mindre peptider og aminosyrer (Russell & McDougall, 2011). Disse er derfor godt egnet til å bryte ned prøver av blåskjell og reke, da disse i stor grad består av proteiner. Proteaser klassifiseres i ulike grupper, basert på hvordan de katalyserer nedbrytningsprosessen av proteiner. Serinproteaser bryter ned bindinger mellom proteinets aminosyrer, og er en av de mest anvendte proteasene for nedbrytning av proteiner.

For oppløsning av biologiske matriser av reke og blåskjell benyttes protease enzymer fra *Bacillus sp.* ved HI. Disse enzymene selges under navnet Protamex, og enzymene som ble benyttet leveres av Sigma Aldrich.

For å sammenligne Protamex med en annen protease ble det benyttet Proteinase K. Proteinase K er en stabil serinprotease som er effektiv mot et bredt spekter av substrater. Fremstilling av Proteinase K gjøres ved ekstraksjon fra soppen *Engyodontium album*, som vokser på kreatin. Dette gir enzymet evnen til å fordøye naturlig kreatin, derav navnet Proteinase K (Sigma Aldrich). Proteinase K har økt aktivitet i nærvær av natrium dodekyl sulfat (SDS) og ved en temperatur mellom 50-60 °C. Optimal pH er 8, men enzymet er stabilt mellom pH 4-12. SDS har denaturerende egenskaper, og bidrar til å bryte ned proteiner. Tilsetning av SDS bidrar derfor til å øke reaksjonshastigheten til Proteinase K. Proteinase K er et kraftigere enzym, og benyttes i lavere konsentrasjoner enn Protamex. En oversikt over egenskapene til Proteinase K og Protamex er listet i Tabell 3.

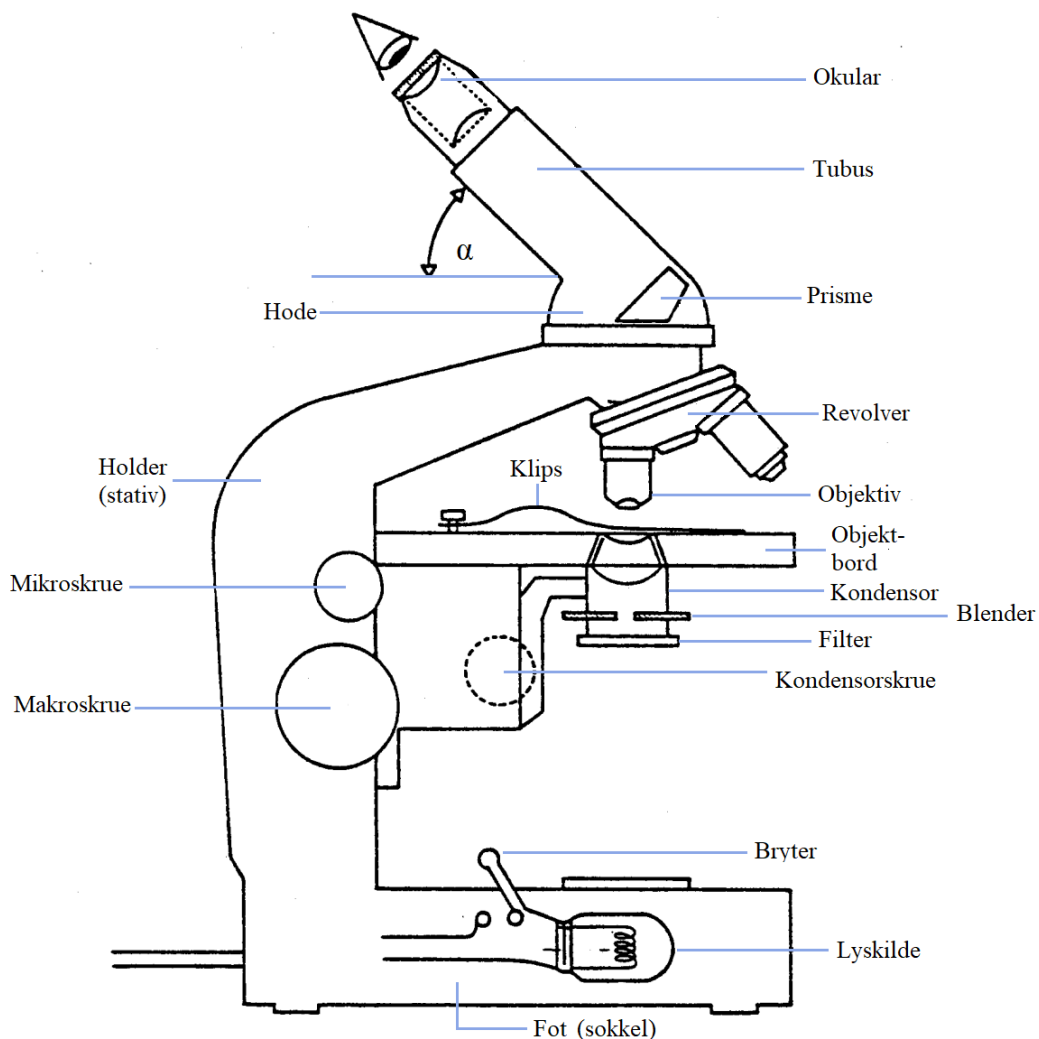
Tabell 3 - Liste over egenskaper for Protamex og Proteinase K, inkludert optimale verdier for aktivitet

	<b>Protamex</b>	<b>Proteinase K</b>
<b>Leverandør og produksjonsnummer</b>	Sigma Aldrich P0029	Sigma Aldrich P6556
<b>Opprinnelse</b>	<i>Bacillus sp.</i>	<i>Engyodontium album</i>
<b>Aktivt pH område</b>	5-11	4-12
<b>Optimal pH</b>	7	8
<b>Optimal temperatur</b>	60 °C	37 °C alene 60 °C i løsning med SDS
<b>Pris per gram</b>	22 NOK	11.760 NOK

## 2.4. Analyseteknikker

### 2.4.1. Mikroskop

For å undersøke oppløsning av blåskjellprøver visuelt ble det benyttet et Leica DM2500 LED microsystem (Leica Microsystems, 2008). Dette er et optisk binokulært mikroskop med to okularer, der man kan observere prøven med begge øynene. I grove trekk består et optisk mikroskop av en objektivlinse, en okular linse og en lyskilde. En generell figur av et optisk mikroskop er vist i Figur 5.



Figur 5 - Generell oppbygning av et optisk mikroskop, bilde er hentet fra (Krogness & Tandberg)

Prøven som skal observeres plasseres på et objektbord, hvor høyden kan justeres ved å vri på et hjul på siden av mikroskopet. Høydejusteringen benyttes for å treffe objektivets brennvidde, som er den avstanden mellom linsen og objektet som gir et skarpt bilde. En åpning på



undersiden av objektbordet slipper inn lys fra lyskilden, som treffer prøven som skal undersøkes. Objektivt fanger opp lyset som går gjennom prøven, og forstørrer bildet som sendes gjennom okularet. Forstørrelsen i okularet beregnes for lupen, hvor brennvidden divideres med 250 mm (Koudounas, et al., 2022).

Optisk tubus holder okularet i korrekt posisjon, og gjør det mulig å justere avstand mellom okular og objektiv. Ved hjelp av et hjul på siden av okularet kan høyden justeres, slik at man kan finjustere skarpheten. Optisk tubus defineres som avstanden fra brennplanet til mikroskopets mellombilde (Hayes & Gammon, 2010). Denne avstanden er normalt mellom 160-180 mm, og dersom denne avstanden er 160 mm og objektivets brennvidde er 16 mm gir dette en forstørrelse på 10x.

Forstørrelsen av mikroskopprøven kan enkelt justeres mellom flere linser med ulik zoom, hvor 10x og 20x ble benyttet i dette eksperimentet. Et optisk mikroskop har i dag har flere objektiver med ulike forstørrelser, ofte opp til 100x. Okular og objektiv forstørrelse er to separate størrelser, og den totale forstørrelsen finnes ved å multiplisere disse. Den totale forstørrelsen til et optisk mikroskop har gjerne en total oppløsning på 1000x (Krogness & Tandberg).

Oppløsningsevnen til mikroskopet er avhengig av lyskilden, og kan være en begrensende faktor for forstørrelsevnen. Oppløsningen angir den minste avstanden mellom to punkter, som kan registreres som avskilte objekter (Hayes & Gammon, 2010). Oppløsningsevnen  $d$  er gitt ved formel 1:

$$d = \frac{\lambda}{2n \sin \theta} \quad (\text{Formel 1})$$

Der  $\lambda$  er lysets bølgelengde i vakuum,  $n$  er brytningsindeks mellom objekt og objektiv og  $\theta$  er vinkelen mellom akse og randstråle fra lyskilden.

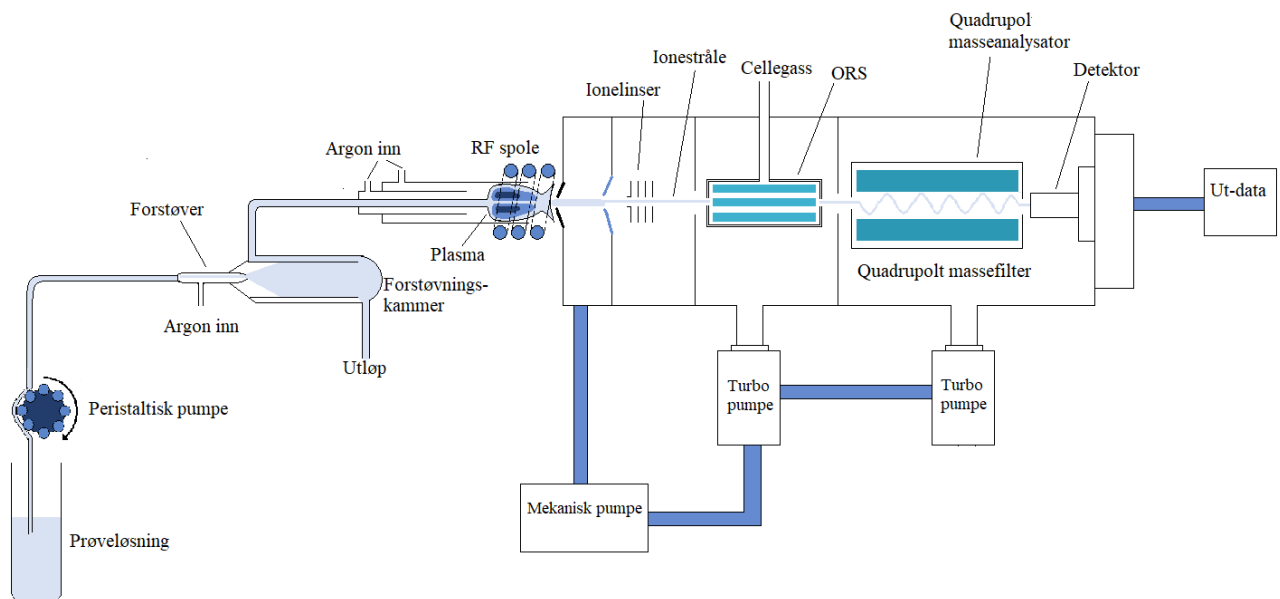
Den minste partikkelstørrelsen som kan observeres i et moderne optisk mikroskop er avhengig av bølgelengden til lyskilden og størrelsen på objektivet. Den teoretiske oppløsningsevnen er begrenset av Abbe's lov, der oppløsningsevnen er proporsjonal med bølgelengden til lyskilden som benyttes (Jakob & Nilius, 2020). I praksis begrenses oppløsningsevnen av flere faktorer, blant annet lysstyrke, kontraster og støy. Det er i teorien mulig å observere partikler ned til 200 nm ved bruk av optisk mikroskop, men dette krever spesialiserte metoder (Taniguchi & Kanemitsu, 2005). For mikroskopet benyttet i dette prosjektet kan det antas at det er mulig å se partikler ned til rundt 400 nm, avhengig av bølgelengden til lyskilden og kontrastene i prøven.

Mikroskopet benyttet i dette prosjektet hadde et tilkoblet DMC 6200 mikroskopkamera, som kan fotografere prøven som undersøkes. Mikroskopbilder kan direkte overføres til Leicas tilhørende programvare LAS X, der prøven kan observeres via PC i stedet for gjennom okularene. Ved fotografering av paralleller kan disse enkelt sammenliknes i ettertid.

#### 2.4.2. ICP-MS

Induktivt koblet plasma massespektrometri (ICP-MS) er en form for atomspektrometri der prøver atomiseres ved bruk av flammer, eller i dette tilfellet, induktivt koblet plasma. ICP-MS er en utbredt analyseteknikk for spormetaller, grunnet de ekstremt lave deteksjonsgrensene som er mulig å oppnå med denne teknikken. ICP-MS har høy sensitivitet og presisjon, og benyttes innenfor ulike felt som blant annet miljøanalyse, materialvitenskap, farmasi og rettsmedisin. ICP-MS kan benyttes til å analysere prøver både i væske- og gassform.

ICP-MS i enkeltpartikkelmodus kan benyttes for å bestemme partikler nede i ng/L-området, og kan kvantifisere helt opp i mg/L området (Thomas, 2013). Som nevnt i kapittel 2.1.3 kan det være krevende å skaffe samsvarende resultater mellom ulike analyseteknikker og metoder. ICP-MS er den raskest voksende teknikken for å detektere spormetaller i dag, og ICP-MS er også en attraktiv teknikk for å bestemme metallholdige partikler i nanoskalaen. En generell illustrasjon av et ICP-MS instrument er vist i Figur 6.



Figur 6 - Illustrasjon av ICP-MS instrument. Figur inspirert av (Linge & Jarvis, 2009)

I dette prosjektet ble ICP-MS benyttet til å analysere prøver i væskeform. En peristaltisk pumpe brukes da for å suge opp væske fra prøven i en jevn strøm. Væsken føres deretter til en forstøver der argongass bidrar til å danne aerosoler, som beveger seg videre gjennom et spraykammer hvor partikler større enn 10  $\mu\text{m}$  fjernes (Agilent Technologies, 2020a). Deretter føres den fine gassen videre inn i en plasmafakkell. Argon har høy ioniseringsenergi, som gjør den til en gunstig gass for bruk i plasma. I enden av fakkelen befinner det seg en RF-spole som produserer et elektromagnetisk felt som går gjennom RF-spolen. Det elektromagnetiske feltet akselererer elektroner, som stammer fra en reaksjon mellom argongass og gnister. De akselererte elektronene fortsetter ioniseringen av gassen, ved at de kolliderer med argon og løsriver flere elektroner. Dette fortsetter i en kjedereaksjon som til slutt danner et plasma bestående av elektroner, argonioner og frie argonatomer. Temperaturen i argonplasma kan komme helt opp i 10.000 K, men holdes stabil i en temperatur mellom 5000 K og 10 000 K (Thomas, 2013).

I plasma går prøven fra aerosol til tørt stoff, før den fordamper til gass som blir atomisert og videre ionisert til positivt ladde ioner. Ionene blir deretter overført til et grenseflateområde, som transporterer ioner fra plasma til massespektrometeret. Massespektrometeret befinner seg i vakuum, og grenseflateområdet blir holdt under vakuum av en tilkoblet mekanisk pumpe. Her befinner det seg også to til tre åpne kjegler som ionene i plasma føres gjennom. Instrumentet i denne oppgaven har to kjegler, hvor den første har en åpning på ca 1 mm, mens den andre har en mindre åpning på 0,45 mm. Fra kjeglene føres ionene videre til massespekterets ionelinser.

Ionelinsene holdes i et vakuum med trykk på 150-300 Pa, hvor ikke-ioniske partikler og fotoner hindres fra å nå massespekteret. Disse partiklene kan dannes i argongassen, fra prøvematriks eller fra løsemiddelet. I Agilent-instrumentet benyttet i denne oppgaven blir fotoner stoppet ved bruk av en omega linse, som skaper en liten endring i ionestråleens retning. Ved å fjerne fotoner og andre ikke-ioniske partikler reduseres bakgrunnsstøy, og sensitiviteten økes (Agilent Technologies, 2020a). Når ionene har beveget seg gjennom ionelinsen føres de videre til massespekteret. De fleste instrumentene benytter en kvadrupol masseanalysator.

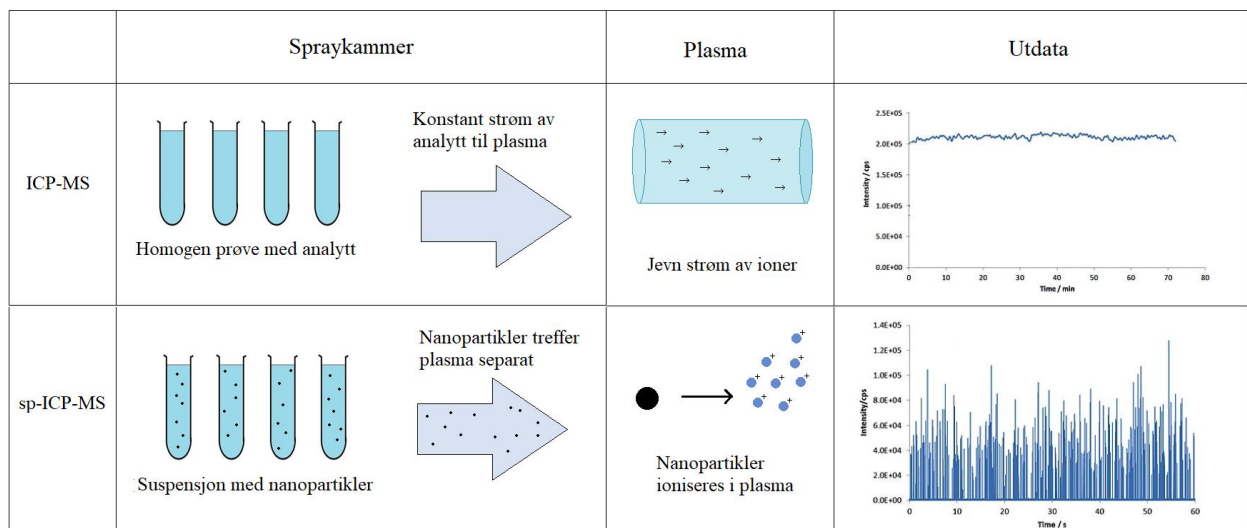
Den kvadrupole masseanalysatoren består av fire parallelle sylindre på ca 15 cm, hvor de to og to er koblet sammen elektrisk, og  $m/z$  kan bestemmes ved å variere veksel-og likestrømpotensialet i masseanalysatoren slik at de ønskede analytt-ionene blir ledet til detektoren, mens andre analytter vil falle fra. Detektoren som benyttes er en elektronmultiplikator, hvor ionene treffer en elektrode i et vakuum-rør, en dynode, som frigjør elektroner. Disse elektronene treffer igjen flere dynoder, og antallet elektroner økes for hver gang. Elektronene blir deretter detektert som et elektrisk signal. Ved høye konsentrasjoner av

elektroner brukes det vanligvis en analog modus for deteksjon, men ved lavere konsentrasjoner av elektroner blir de detektert i pulser.

### 2.4.3. sp-ICP-MS

De fleste ICP-MS instrumenter kan benyttes til enkeltpartikkel induktivt koblet plasma (sp-ICP-MS) analyser. Prøvene måles i kortere intervaller enn ved tradisjonell ICP-MS, og dataene behandles i programvare egnet for enkeltpartikkel-modus. I dette prosjektet er Agilent ICP-MS Instrument Control benyttet på laboratoriet, mens dataene i ettertid prosesseres i Agilent Offline Data Analysis (Agilent Technologies, 2020b).

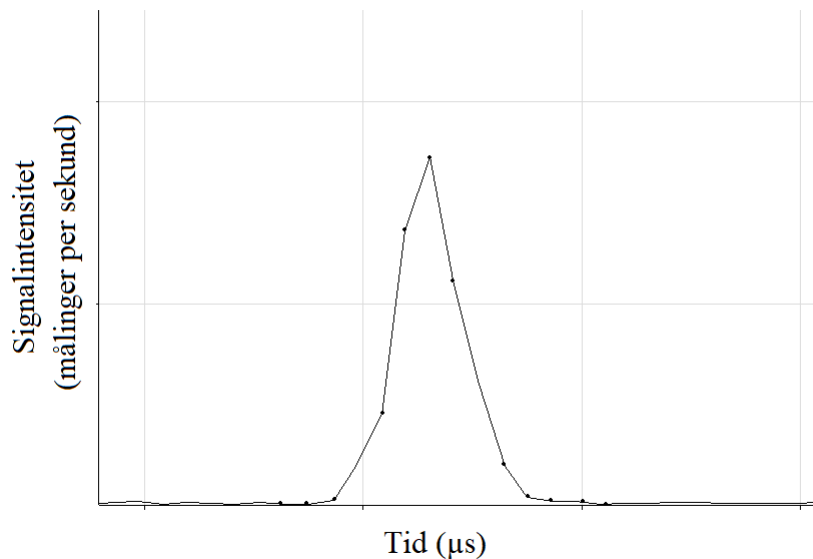
Sp-ICP-MS analyse gir kvalitativ informasjon i form av partikler eller oppløste elementer, men også kvantitativ informasjon om partikkelantall og masse, som kan benyttes til å beregne blant annet konsentrasjon. Fra den målte partikkelmassen kan det beregnes gjennomsnittlig partikkelstørrelse. De viktigste forskjellene mellom tradisjonell ICP-MS og sp-ICP-MS er vist i Figur 7.



Figur 7 - Hovedforskjeller mellom tradisjonell ICP-MS og sp-ICP-MS

I en homogen prøvematriks vil utdata fra ICP-MS vises som et kontinuerlig signal fra den konstante strømmen av ioner gjennom analysatoren. For NPer i suspensjon vil ioniseringen danne klynger av ioner. Disse klyngene treffer masseanalysatoren separat, og vil gi signal i form av separate topper. Målingene av NPer detekteres over flere hundre mikrosekunder, og

signalene kommer som pulser over bakgrunnssignalet. I sp-ICP-MS antas det at hvert signal tilhører en enkelt NP. Fra denne antakelsen dannes grunnlaget for at intensiteten til NP-signalet er proporsjonal med partikkelens masse. Dersom man kan bestemme eller anta NPens form, kan denne sammen med tetthet og grunnstoffsammensetning benyttes til å beregne NPens størrelse. I programvaren som benyttes i dette prosjektet antas det generelt at NPene er sfæriske. Signalet for en enkelt partikkel er vist i Figur 8.

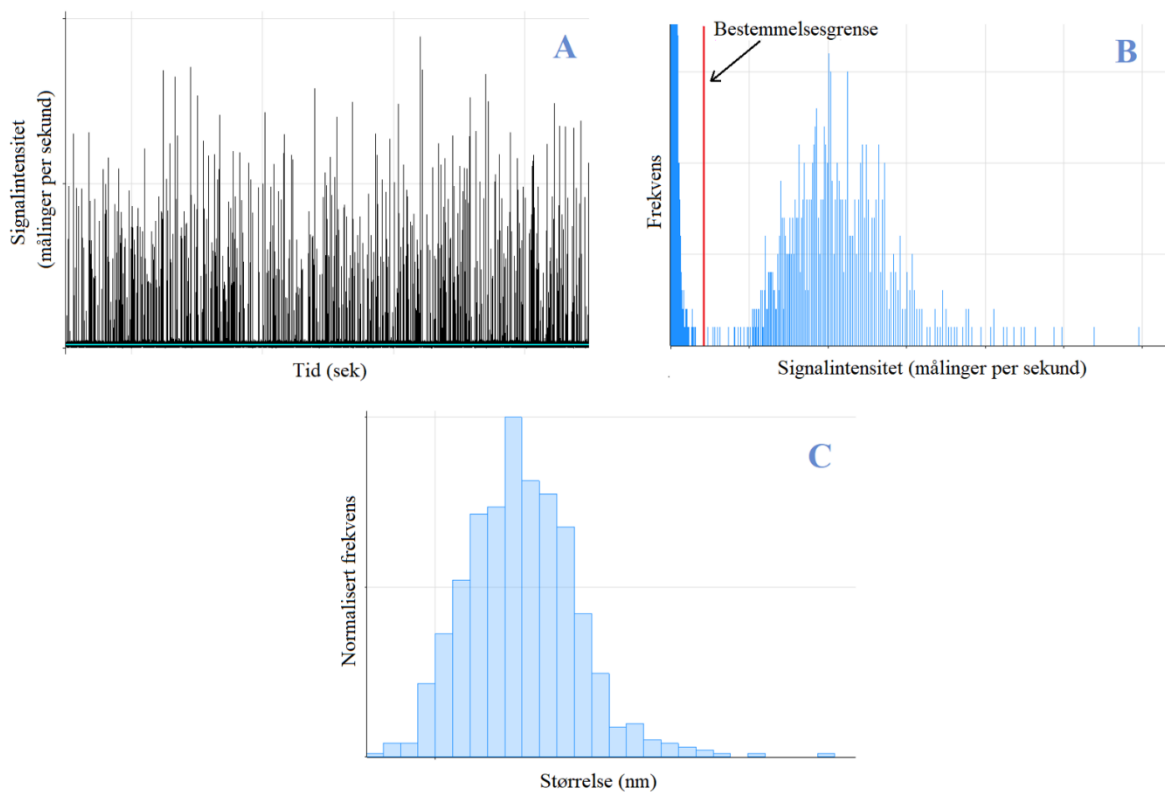


*Figur 8 - Signal for en enkelt NP. Hvert punkt er viser en måling per 100 mikrosekund*

For sp-ICP-MS analyser er det spesielt viktig med korrekte konsentrasjoner, og fortynningsprosessen består ofte av flere trinn med pipettering av lave volum. Nøyaktig fortynning er et kritisk punkt, da for høye konsentrasjoner kan føre til at signalene overlapper og gir utdata som store partikler i databehandlingsprogrammet, mens for lave konsentrasjoner vil gi for få topper til å få tydelige resultater.

sp-ICP-MS instrumentet gir et råsignalplott med tid langs x-aksen, og gir en distribusjon av NP-signaler. Råsignalplottene prosesseres ved å plote signalintensitet mot antall målinger (Figur 9A). For gullpartikler får man en oversiktlig distribusjon av signalintensitetene, hvor den første distribusjonen stammer fra bakgrunnsstøy og den andre stammer fra gullpartikler (Figur 9B). Bestemmelsesgrensen settes ved skillet mellom bakgrunnsstøy og partikler, dette kan gjøres enten manuelt ved å visuelt vurdere intensitetene, men programvaren gir også et automatisk forslag til bestemmelsesgrense. Ved manuelt valg av bestemmelsesgrense kan denne settes til å gjelde for alle målinger, men den kan også bestemmes manuelt. I dette

prosjektet er bestemmelsesgrensen satt manuelt for alle målinger, med utgangspunkt fra en av parallellene med høyt antall partikler. Gullpartikler gir en tydelig visuell forskjell mellom bakgrunnsstøy og partikkelsignal, men fra naturlige prøver kan dette skillet være vanskelig å observere, da partikler og bakgrunn kan overlappes hverandre. Om bestemmelsesgrensen settes for høyt vil dette føre til tap av partikler, men om den settes for lavt vil bakgrunnsstøy telle med i beregningen av partikler. Begge disse alternativene kan gi upresise resultater. I slike tilfeller kan det være nyttig å bruke dataprogrammet til å sette bestemmelsesgrense, i stedet for manuell bestemmelse. Figur 9C viser størrelsesfordelingen av målte partikler i en prøve.



Figur 9 - Ulike sp-ICP-MS plott fra Agilent Offline Data Analysis. A) Råsignalplott. B) Signalintensitet. C) Størrelsesfordeling for NPer

## 2.5. Analysekvalitet

En analysemetodes kvalitet kan vurderes på ulike måter, der det overordnede målet på kvalitet vanligvis er om metoden er egnet for sitt tiltenkte formål. Det er mange kvalitetsparametere som kan undersøkes for analytiske metoder, blant annet nøyaktighet og følsomhet. Nøyaktigheten angir samsvar mellom målte og «sanne» verdier, der en nøyaktig metode vil gi stort samsvar, mens metodens følsomhet refererer til metodens evne til å skille små endringer i analyttens konsentrasjon. Metodens kvalitetsparametere kan etableres i en valideringsstudie, som kan foregå innad i et laboratorium over kortere eller lengre tid. Hvis metodens kvalitet skal undersøkes enda mer inngående kan metoden valideres i ulike laboratorier i en kollaborativ avprøving. Når metoden er validert, eller en standardmetode er verifisert innad i et laboratorium, etableres kvalitetskontroll av metoden. Ved kvalitetskontroll kan man eksempelvis benytte blankprøver, blindprøver eller parallelle analyser for å undersøke repeterbarheten, og analyser av slike kontrollprøver vil ofte registreres i et kontrollkort. Kvalitetskontroll utføres for å kartlegge om variasjon i resultater er innenfor aksepterte og forventede grenser, som nevnt ofte i et kontrollkort. Ringtester benyttes for å undersøke reproduserbarhet mellom flere laboratorier, og riktighet til hvert enkelt laboratorium, samt at de gir sporbarhet til metoden som benyttes på laboratoriet.

Viktige metodeparametere for validering og vurdering av numerisk metodekvalitet inkluderer selektivitet, deteksjonsgrense, kvantifiseringsgrense, lineært område, måleområde, presisjon, riktighet og robusthet som er beskrevet nedenfor. Verdens helseorganisasjon (WHO) og FNs organisasjon for ernæring og landbruk (FAO) har etablert Codex Alimentarius, som er et sett med internasjonale standarder og veiledninger, der det er knyttet numeriske krav til ulike metodeparametere innen kjemiske analyser for matområdet (FAO&WHO, 2019). Disse numeriske kriteriene er satt for blant annet riktighet, gjenvinning og presisjon og vil bli brukt til vurdering av metodekvalitet i denne oppgaven. Kriterienes definisjon er satt etter Joint Committee of Vocabulary in Metrology (JCGM).

JCGM er en komité bestående av representanter fra ulike internasjonale organisasjoner som arbeider med måling og kalibrering, blant annet ISO (Internasjonal organisasjon for standardisering), BIPM (Internasjonalt byrå for mål og vekt) og IFCC (International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine) (JCGM, 2008). Deres formål er utvikling og vedlikehold av standardiserte definisjoner og terminologi innen måling og kalibrering, for å fremme et felles analytisk språk som er gjengitt under. JCGM gir ut felles dokumenter og

veiledninger for måleteknikker og kalibrering, som benyttes som kan benyttes som standard og referanse for andre laboratorier.

Selektivitet er et mål på metodens evne til å skille mellom ønskede analytter og andre forbindelser som kan være til stede i prøven (JCGM, 2023). En analysemetode med god selektivitet kan kvantifisere ønskede forbindelser, uten påvirkning fra interferenser. For å undersøke selektiviteten kan man for eksempel måle analyttens respons i løsninger med ulike konsentrasjoner av interfererende forbindelser.

Deteksjonsgrense (LOD) er den laveste mengden analytt som kan detekteres i en prøve, der prøven ved en gitt sannsynlighet kan skilles fra en blankprøve. For beregninger av LOD kan det f.eks benyttes flere blankprøver med ulike konsentrasjoner, der antallet prøver som benyttes er avhengig av type analyse. Det benyttes ofte 10 blankprøver med ulik konsentrasjon for å beregne LOD. Kvantifiseringsgrensen (LOQ) er den laveste mengden analytt som kan bestemmes kvantitativt ved en gitt sannsynlighet, og settes som  $3 \cdot \text{LOD}$  i denne oppgaven.

Måleområde (MO) er intervallet mellom laveste signal som kan skilles fra bakgrunnsstøy, og høyeste konsentrasjon av ionisk standard benyttet. Dette området definerer området av konsentrasjoner der man kan forvente nøyaktige resultater (JCGM, 2008).

Presisjon defineres av graden av samsvar mellom resultater for gjentatte målinger, og angir metodens evne til å gi samme resultater over flere analyser. Presisjon kan blant annet undersøkes ved intern reproduserbarhet over tid eller repeterbarhet mellom paralleller i en analyse (JCGM, 2023). Presisjon i denne oppgaven er i hvilken grad resultatene kan reproduseres ved repeterbarhet, det vil si at analysen gir samme resultat dersom man gjentar eksperimentet flere ganger. Presisjon kan avdekkes ved å se på variasjon mellom paralleller av samme prøve. Presisjon kan avdekke tilfeldige feil, og ved god presisjon er det lite tilfeldige feil.

Riktighet kan bestemmes ved å sammenlikne gjennomsnittet av en serie prøver med et referansemateriale med en kjent «sann» verdi (JCGM, 2023). «Sann» verdi vil i dette prosjektet bli omtalt som teoretisk verdi. Metodens riktighet er en viktig kvalitetsparameter, da lav riktighet kan avdekke systematiske feil.

Robusthet vil si metodens evne til å gi samme resultat ved små endringer i metodeparameterne og utstyr, og gir en indikasjon på påliteligheten til metoden.



Måleusikkerheten definerer området der det er forventet at den teoretiske verdien til en måling ligger (JCGM, 2023). Det er vanskelig å bestemme den teoretiske verdien med 100% sannsynlighet, og måleusikkerheten gir et tall på intervallet der den teoretiske verdien befinner seg, vanligvis med 95% konfidens.

### 3. Eksperimentelt arbeid og metode

#### 3.1. Utstyr og kjemikalier

I Tabell 4 er det listet hvilke kjemikalier som ble benyttet i oppgaven. Tabell 5 inneholder en oversikt over instrumenter og utstyr som ble benyttet til eksperimentelt arbeid.

Tabell 4 - Liste over kjemikalier benyttet i prosjektet

<b>Kjemikalie</b>	<b>Leverandør</b>	<b>Produktnummer</b>
Au NPer, 60 nm 50 mg/L	NanoComposix	AUCN60
Au ionisk standard 1001 $\mu\text{g/mL}$ i 2% $\text{HNO}_3$	Spectascan	SS-1118N
Ionisk standard Ti, 1000 mg/L i 2% $\text{HNO}_3$	Sigma-Aldrich	12237
Protease fra <i>Bacillus sp.</i>	Sigma-Aldrich	P0029
Proteinase K fra <i>Tritirachium album</i>	Sigma-Aldrich	P6556
Natrium dodekyl sulfat (SDS)	Sigma-Aldrich	L3771
$\text{HNO}_3$ 5%	-	-
Tuning-løsning ICP-MS 1 $\mu\text{g/L}$ Ce, Co, Li, Mg, Ti og Y i 2% $\text{HNO}_3$	Agilent Technologies	5185-5959

Tabell 5 - Liste over utstyr benyttet i prosjektet

<b>Instrumenter og utstyr</b>
Agilent 8900 ICP-MS
Autosampler SPS4
Millipore Milli-Q vannrensesystem 18.2 M $\Omega$ .cm
Heidolph platform shaker med varmerist
Analysevekt
Leica DM2500 LED Mikrosystem
DMC 6200 mikroskopkamera
Mikroskop-preparat
Dekkglass til mikroskop-preparat
6875D Fryser/Mølle dobbeltkammer kryogenisk kvern
Impactor I rustfritt stål
Plastbeholder og hetteglass til kryomølle
Philips HR 1371 kjøkkenblender
120 mL polypropen beholdere
13 mL polypropen sentrifugerør
15 mL polypropen sentrifugerør
50 mL polypropen sentrifugerør
Veieskip
Pasteurpipetter
Finnpipette 0,5-5 mL
Finnpipette fixed 10 $\mu$ L
Finnpipette fixed 100 $\mu$ L
Finnpipette fixed 200 $\mu$ L
Målesylinder
10 mL målekolbe
50 mL målekolbe
100 mL målekolbe
Filterpapir

## 3.2. Tillaging av standarder

Det ble laget NP standarder til spiking av biologiske prøver, og ioniske standarder for kalibrering av sp-ICP-MS instrumentet. Au 60 nm NPer ble tillaget etter samme metode som i Havforskningsinstituttets validerte metode for ekstraksjon av Au-NPer fra blåskjell (Valdersnes, Bienfart, Solli, & Bruvold, 2020). De samme stegene i fortynning ble benyttet for sonikerte TiO<sub>2</sub>-NPer fra et tidligere masterprosjekt. Ioniske standarder ble også fortynnet etter den validerte metoden. Fremgangsmåten er beskrevet i kapittel 3.2.1 og 3.2.2.

### 3.2.1. Fortynning av nanopartikkelstandarder

#### **Gullpartikler Au NP 60 nm**

Au 60 NP referansematerialet ble fortynnet fra en stamsuspensjon med en utgangskonsentrasjon på 50 mg/L. Dette referansematerialet ble fortynnet til 100 ng/L gjennom tre trinn hvor det ble benyttet MQ-vann og 15 mL plastrør. Mellom hvert trinn ble prøvene blandet godt ved risting. Fra stamsuspensjonen ble 100 µL fortynnet med 9,9 mL MQ-vann til 10 mL med finnpipette. Dette ga en konsentrasjon på 500 µg/L. Prøven ble ristet godt før 100 µL fra den fortynnede løsningen ble pipettert ut og fortynnet til 10 mL med 9,9 mL MQ-vann. Dette ga løsningen en konsentrasjon på 5 µg/L. Løsningen ble ristet, og 200 µL ble pipettert ut og fortynnet med 9,8 mL MQ-vann til 10 mL. Dette ga en konsentrasjon på 100 ng/L. Denne løsningen ble laget for hver analysedag, da den har kort holdbarhet i fortynnet form.

#### **Titanpartikler TiO<sub>2</sub> NP 80 nm**

Det ble benyttet en NP-standard av sonikerte TiO<sub>2</sub>-NPer, som stammet fra et tidligere masterprosjekt ved Havforskningsinstituttet. Utgangsstandardene hadde vært oppbevart noen måneder i kjøleskap, og det var usikkert hvordan holdbarheten var for disse partiklene. I det opprinnelige prosjektet ble median NP-størrelse målt til mellom 75 og 80 nm, etter seks runder med sonikering (Simonsen, 2022). Før sonikering hadde NPene en gjennomsnittlig størrelse på 42 nm.

Da holdbarhet og konsentrasjon av partiklene ikke kunne slås fast med sikkerhet før analyse, ble disse fortynnet med samme steg som Au 60 nm partiklene beskrevet over. 100 µL Ti løsning ble fortynnet med 9,9 mL MQ-vann til 10 mL. Fra denne ble 100 µL pipettert ut og fortynnet med 9,9 mL MQ-vann til 10 ml før løsningen ble blandet.

### 3.2.2. Fortynning av ioniske standarder

#### **Ionisk standard Au 10 µg/L:**

Ioniske analyttstandarder og referansematerialer ble fortynnet gjennom to trinn fra 1000 mg/L til 10 µg/L ved fortynning med MQ-vann. Et volum på 100 µL av Au elementstandarden (1000 mg/L) ble pipettert med finpipette til et 15 mL plastrør og fortynnet med 9,9 mL MQ-vann til 10 mL. Løsningen ble blandet, og fra denne ble det pipettert ut 10 µL som ble videre fortynnet med 9,9 mL MQ-vann til 10 mL. Dette gir en sluttkonsentrasjon på 10 µg/L. Fortynnede løsninger ble laget til hver analysedag, grunnet kort holdbarhet.

#### **Ionisk standard Ti 10 µg/L:**

Ioniske Ti-løsninger ble fortynnet over to trinn med 0,1% HNO<sub>3</sub> da Ti partiklene har bedre stabilitet i HNO<sub>3</sub> enn MQ-vann. Fra elementstandarden for Ti ble 100 µL ble fortynnet til 10 mL med 9,9 mL 0,1% HNO<sub>3</sub> før løsningen ble blandet. Dette gir en konsentrasjon på 10 mg/L. Fra denne løsningen ble 10 µL pipettert ut, som ble fortynnet til 10 mL med 9,9 mL 0,1% HNO<sub>3</sub>. Dette ga en sluttkonsentrasjon på 10 µg/L. For disse prøvene ble 0,1% HNO<sub>3</sub> benyttet som blank. Fortynnede løsninger ble laget til hver analysedag grunnet kort holdbarhet.

### 3.3. Innledende undersøkelser

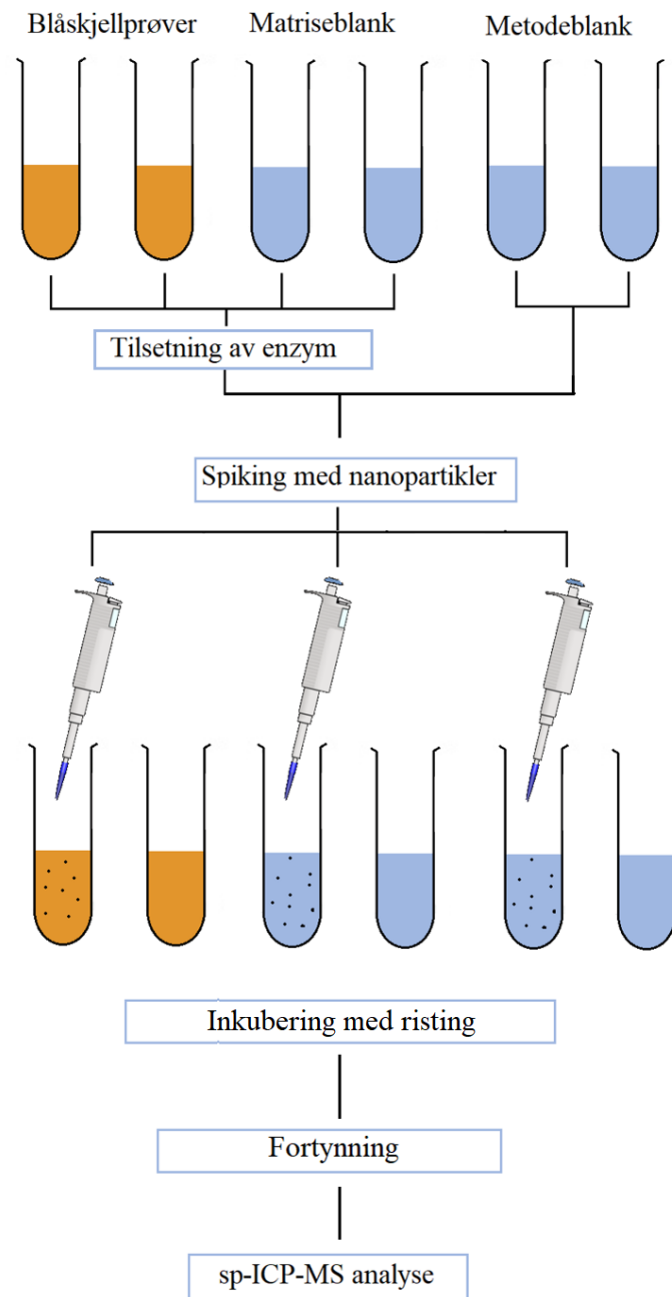
Analysene i dette prosjektet bygger på HIs validerte metode for ekstraksjon av Au-NPer fra blåskjell (Valdersnes, Bienfart, Solli, & Bruvold, 2020). I innledende analyser ble gjenvinning av Au partikler undersøkt for å kunne vurdere egne evner til å anvende metoden, spesielt med tanke på fortynning med finpipette, da det benyttes veldig små volum til spike, standarder og fortynninger.

I innledende forsøk ble det benyttet blåskjellprøver opparbeidet av Are Sæle Bruvold, som er en stipendiat ved Havforskningsinstituttet. Disse blåskjellene ble homogenisert med kjøkkenblender, som beskrevet i kapittel 3.4. Disse blåskjellene var en samleprøve fra flere ulike lokasjoner. For å lage referansematerialer med NPer, ble blåskjellprøvene spiket med Au-NPer etter valideringsmetoden. Dette er beskrevet i kapittel 3.2.1. Spiking ble gjort under enzymopparbeiding gjeldende analysedag.

For enzymatisk oppløsning av blåskjell ble det benyttet en 20% vekt/volum løsning av Protamex, som lages ved å veie inn 20 g Protamex i en 100 mL målekolbe, og tilsette MQ vann for å løse opp enzymene. Deretter fortynnes løsningen til merket med MQ vann. Her ble Protamex-løsningen tilsatt alle blåskjellprøver, i tillegg til metodeblankprøver. Dette ble gjort for å undersøke mulig kontaminering, og om Protamex kunne påvirke gjenvinning av NPer.

Det ble veid inn 1 g våte blåskjellprøver i 13 mL prøverør. Det ble benyttet prøverør med rund bunn, da disse er bedre egnet når prøvene senere skal ristes. For metodeblank-prøver ble det tilsatt 1 mL MQ vann til 13 mL prøverør, i stedet for blåskjell. Deretter ble det tilsatt 3 mL 20% Protamex-løsning til hver prøve. Prøver som skulle spikes ble tilsatt 100  $\mu$ L 500  $\mu$ g/L NP løsning av Au 60 nm NPer, dette ble også gjort for paralleller av blankprøver. Deretter ble prøvene teipet fast til et prøvestativ, slik at de kunne legges horisontalt på ristebordet med varmeinkubator. Prøvene ble deretter ristet i inkubator ved 50 °C i 60 minutter på 290 rpm.

Etter inkubering ble prøvene tilsatt 4 mL MQ vann, og mikset med wirlmixer i 15 sekunder på maksimal hastighet. Fra denne løsningen ble det pipettert ut 2 mL, som ble fortynnet med 8 mL MQ-vann til 10 mL. Disse ble igjen mikset med wirlmixer i 15 sekunder, før 1 mL ble pipettert ut og fortynnet med 11,5 mL MQ-vann til 12,5 mL. Dette gir en total fortynning på 500 ganger og en NP-konsentrasjon på 100 ng/L i de spikede blåskjellprøvene. En generell oversikt over prøveopparbeidingen er vist i Figur 10.



Figur 10 - Standard oppsett for prøver til sp-ICP-MS analyse for dette prosjektet. Prøvene ble fortynnet 500 ganger med MQ vann

For å undersøke tid på varmerist som faktor for oppløsning av blåskjellprøver, ble det benyttet mikroskop til visuell bestemmelse. Paralleller av blåskjellprøver ble inkubert på varmerist i 0, 10, 30 og 60 minutter.

### 3.4. Metode for blåskjell med ulik homogenisering

#### 3.4.1. Homogenisering av blåskjell

Det ble benyttet ulike batcher blåskjell i det eksperimentelle arbeidet med masteroppgaven. Blåskjellene som ble benyttet til å undersøke ulik opparbeiding, ble opparbeidet av undertegnede med hjelp fra Rebeca Garcia Perez fra prøvemottaket. Det ble mottatt blåskjell fra tre ulike lokasjoner, og disse ble holdt separat. Blåskjellene ble vasket og rensset etter havforskningsinstituttets metode for opparbeiding av blåskjell som er beskrevet i det følgende avsnittet (Havforskningsinstituttet, 2019).

Blåskjell ble tint i kjøleskap over natten, og fra hver lokasjon ble det rensset 25 blåskjell til en samleprøve. For å få riktig vekt ved veing av skjellene, ble rur, alger og skitt skrapet vekk fra skjellenes overflate. Skjellene ble holdt lukket og rensset under springen, slik at springvannet ikke skulle komme inn i skjellene. Deretter ble det benyttet en kniv til å kutte blåskjellenes lukkemuskel, slik at de enkelt kunne åpnes. Innsiden av skjellene ble sjekket for sand og andre fremmedlegemer, hvor de ble spylt med destillert vann ved behov. Skjellene ble så satt på høykant på kjøkkenpapir, slik at overflødig vann kunne renne av. Skjell med innmat ble deretter veid, og vekt ble ført inn i laboratoriets informasjonsstyringssystem (LIMS). Etter at de hele skjellene ble veid, ble innmaten skrapet ut og overført til en sil for videre avrenning i 5 minutter. Deretter ble innmat og tomme skjell veid separat, og dataen ble igjen overført til LIMS.

Innmaten for hver lokasjon ble fordelt i tre ulike beholdere, totalt 9 beholdere. Disse ble merket med lokasjon og hvilken videre opparbeiding som skulle benyttes. To av tre beholdere fra hver lokasjon ble separat mikset med kjøkkenblender for bruk til test av vanlig homogenisering og vanlig homogenisering + kryomølle. Se Tabell 6 for oversikt over prøver. Miksebeholder og tilhørende utstyr ble vasket mellom hvert sett med blåskjellprøver. Deretter ble alle prøvebeholderne plassert i fryser med en temperatur på -20 °C over natten.

*Tabell 6 - Oversikt over blåskjell-lokasjoner*

Lokasjon	Vanlig homogenisering (Hom)	Kryomølle (CM)	Homogenisering + Kryomølle (HomCM)
Rogøysund	Ja	Ja	Ja
Askerholmen	Ja	Ja	Ja
Ukjent	Ja	Ja	Ja



Dag to ble blåskjellene som skulle opparbeides med kryomølle hentet fra fryser. Fra hver lokasjon ble én beholder med homogeniserte blåskjellprøver og beholderen med hel innmat benyttet til kryomølle. For kryomølling ble blåskjellprøvene separat overført til egnede beholdere. Disse beholderne består av hard plast, med et metallokk i hver ende, vist i Figur 11. Sammen med prøven blir det også plassert en *impactor* i beholderen, dette er en avlang magnet som bidrar til å knuse de frosne blåskjellprøvene til et fint pulver. For å få prøvene helt pulverisert, ble det kjørt to runder per parallell. Prøvene ble kjørt med program beregnet for muskelvev, som var det best egnede programmet. Se Tabell 7 for oversikt over parametere for kryomølling. Prøvene i beholdere ble plassert i fryser med en temperatur rundt -80 °C før kryomølling, for å sikre at prøvene holdt lav nok temperatur.



Figur 11 - Beholder og impactor for kryomølle

Tabell 7 - Oversikt over parametere for kryomølling

Prøvetype	Prøvevekt	Prøvestørrelse	Program	Syklus
			For-kjøling	15 min
Muskel	5 g	10 mm	Kvernesyklus	3 runder (2 min)
			Hvile mellom syklus	1 min

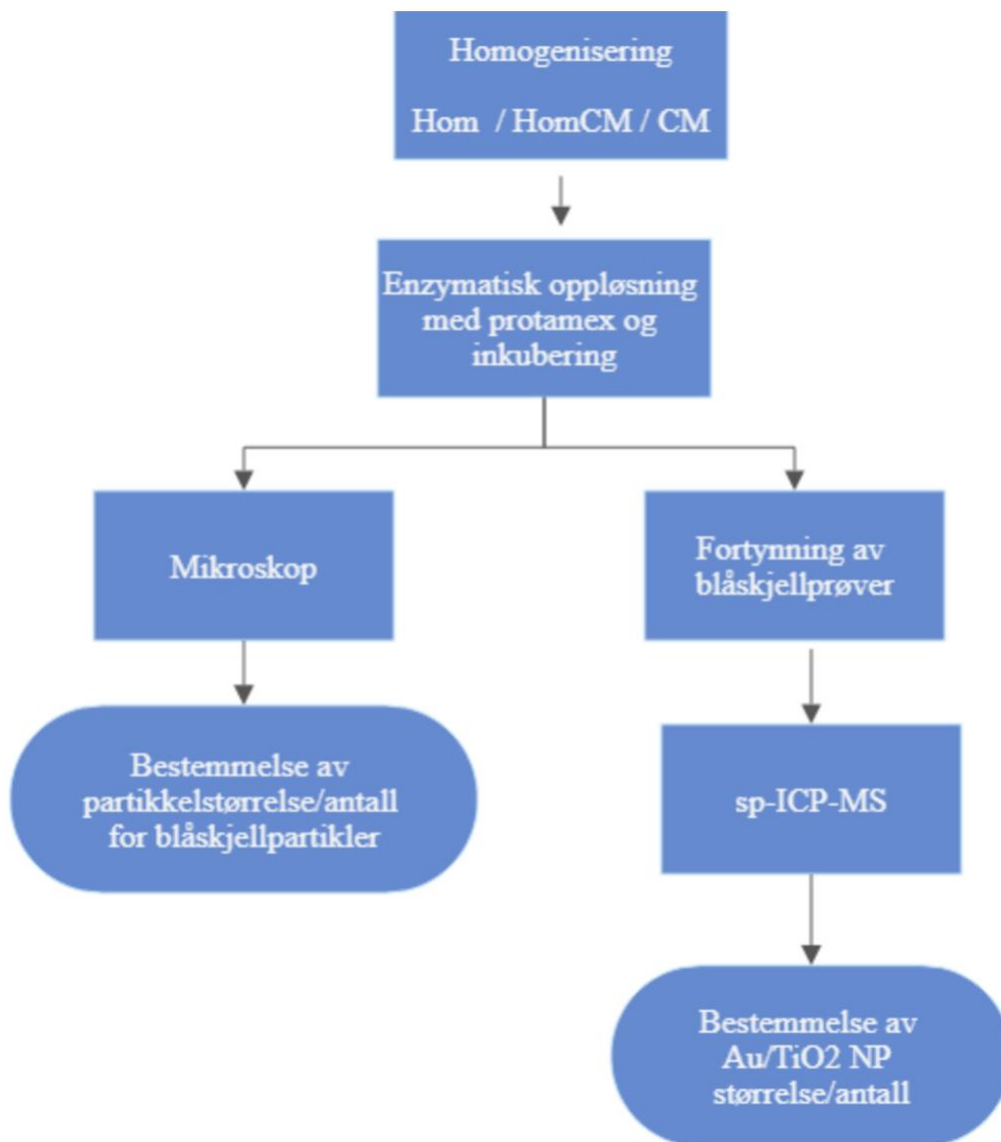
Etter opparbeiding ble prøvene merket etter hvilken homogenisering de hadde gjennomgått: Hom (homogenisering med kjøkkenblender), CM (Hele blåskjell i kryomølle) og HomCM (homogenisering med kjøkkenblender + kryomølle).

### 3.4.2. Tillaging av blåskjellprøver

Paralleller av hver homogenisering ble videre opparbeidet etter metode 600 for kvalitativ og kvantitativ analyse. Dette ble gjort på samme måte som i kapittel 3.3. Det ble laget tre paralleller for hver opparbeiding, og disse prøvene ble undersøkt med mikroskop og sp-ICP-MS for å bestemme kvalitet på oppløsning og gjenvinning av spikede NPer. Det ble veid inn 1 g blåskjell til hver parallell, for blankprøver ble det benyttet 1 mL MQ-vann.

Blåskjellprøver og blankprøver ble tilsatt 3 mL 20% Protamex-løsning, og spiket med 100  $\mu$ L 500  $\mu$ g/L Au 60 nm NPer og TiO<sub>2</sub> NPer. Deretter ble prøvene teipet fast til et prøvestativ, slik at de kunne legges horisontalt på ristebordet med varmeinkubator. Det ble benyttet 60 minutters inkubering på varmerist for alle parallellene. Dersom prøvene skulle analyseres med mikroskop ble parallellene plassert i isbad for å stoppe videre enzymatisk oppløsning. Prøvene ble analysert med mikroskop etter metode beskrevet i kapittel 3.7.1.

Etter inkubering og eventuelt mikroskopanalyse ble prøvene tilsatt 4 mL MQ vann, og mikset med wirlmixer i 15 sekunder på maksimal hastighet. Fra denne løsningen ble det pipetert ut 2 mL, som ble fortynnet med 8 mL MQ-vann til 10 mL. Disse ble igjen mikset med wirlmixer i 15 sekunder, før 1 mL ble pipetert ut og fortynnet med 11,5 mL MQ-vann til 12,5 mL. Dette gir en total fortynning på 500 ganger og en NP-konsentrasjon på 100 ng/L i de spikede blåskjellprøvene. Prøvene ble deretter analysert med sp-ICP-MS. Figur 12 viser flytskjema for metoden for sammenlikning av ulike homogeniseringer.



Figur 12 - Flytskjema av prosessen for analyse av ulike homogeniseringer av blåskjellprøver

### 3.5. Metode for blåskjell tilsatt ulike enzym

#### 3.5.1. Anvendelse av Protamex og Proteinase K

Det ble benyttet blåskjellprøver homogenisert med kjøkkenblender og kryomølle (HomCM) i sammenlikningen av enzymatisk opparbeiding med ulike enzym. Det ble benyttet proteinaser fra *Bacillus sp.* (Protamex) og *Engyodontium album* (Proteinase K). Proteinaser er en mer skånsom metode for oppløsning av prøver enn eksempelvis bruk av konsentrert syre, som kan løse opp NPene. Som standard benyttes enzymet Protamex ved Havforskningsinstituttet, og dette ble sammenlignet opp mot det dyrere enzymet Proteinase K.

For sammenlikning mellom Protamex og Proteinase K ble det bestemt at det skulle benyttes lavere enzymkonsentrasjoner over lengre tid. Ved å forlenge inkubasjonstiden kan lavere enzymkonsentrasjon gi god oppløsning. Størrelsen på blåskjellprøvene ble også halvert fra 1 g til 0,5 g, for å benytte mindre mengder enzym. Det ble benyttet mindre enzym for å redusere kostnaden av Proteinase K, da denne har en pris på nesten 12.000 kr per gram som nevnt i kapittel 2.3.2.

Metoden som benyttes for Proteinase K er hentet fra et prosjekt fra Danmarks tekniske universitet (DTU), der analyseresultater ble sammenliknet mellom metoder som benytter Protamex og Proteinase K (Haessmann, 2019). Hensikten var å opparbeide blåskjell etter metoden beskrevet i kapittel 3.4, og sammenlikne med blåskjellprøver opparbeidet etter metode inspirert fra DTU. Grunnet den høye prisen for Proteinase K, ble blåskjellprøvene halvert i forhold til analysene med Protamex, og Proteinase K-konsentrasjonen ble redusert i forhold til konsentrasjonen som ble benyttet ved DTU.

Det ble veid inn 0,5 g blåskjell til hver parallell. Ved de sammenliknende analysene ble inkubasjonstiden forlenget til å vare over natten ved 50°C og 290 RPM. Konsentrasjonen av Protamex ble redusert til 5% (vekt/volum), ved å veie inn 5 g Protamex som ble fortynnet til 100 mL med MQ-vann.

Nøyaktig 0,05 g Proteinase K ble veid inn på analysevekt. Dette ble overført til en 5 mL målekolbe før fortynning med MQ vann til 5 mL. Det ble veid inn 0,15 g SDS på analysevekt som ble fortynnet til 10 mL med MQ vann.

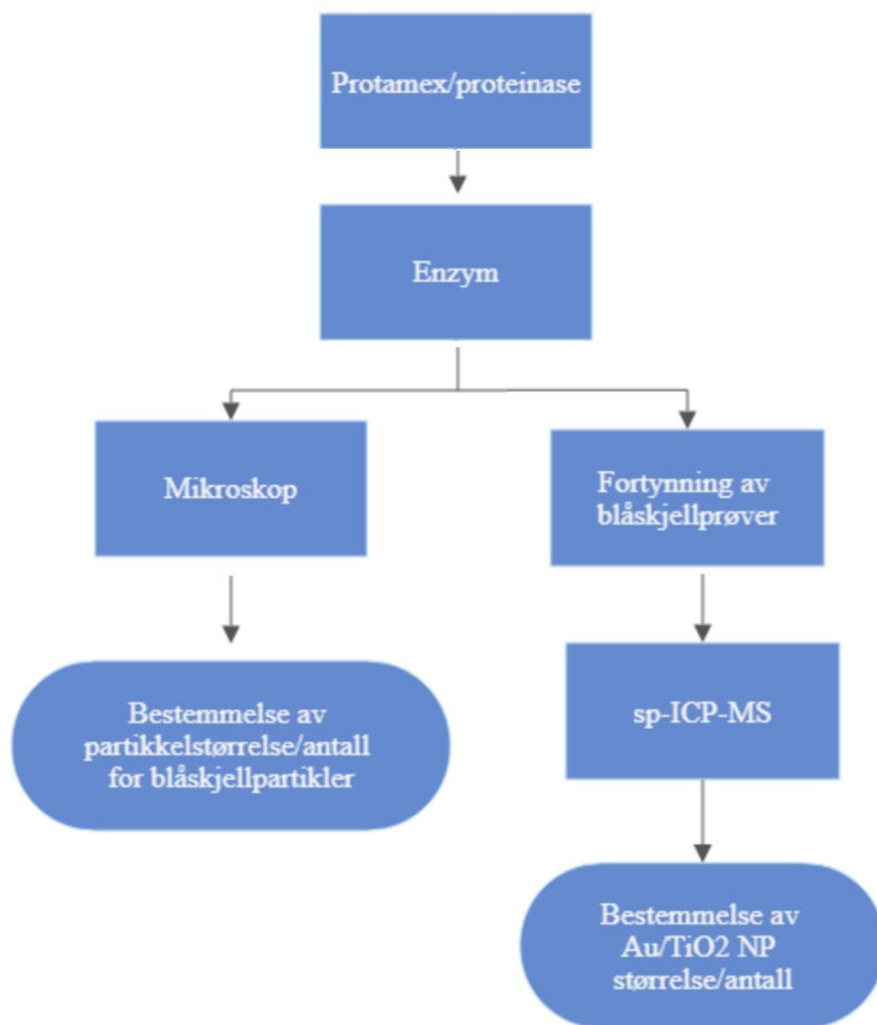
### 3.5.2. Tillaging av blåskjellprøver

For tillaging av blåskjellprøvene ble det veid inn 0,5 g våte blåskjellprøver til hvert prøverør. Det ble benyttet prøverør med rund bunn og gul kork. Det ble veid inn blåskjell til seks paralleller som skulle tilsettes Proteinase K, og seks paralleller som skulle tilsettes Protamex. Tre av parallellene for hvert enzym ble spiket med Au 60 nm NPer og TiO<sub>2</sub> NPer.

Blåskjellprøvene som skulle oppløses med Proteinase K ble tilsatt 300 µL Proteinase K og 1.15 mL SDS, tillaget etter beskrivelse i kapittel 3.5.1. Prøver og blanker som skulle spikeres ble tilsatt spike med kjent konsentrasjon. Blåskjellprøvene som skulle oppsluttes med Protamex ble tilsatt 1,5 mL 5% Protamex-løsning til hvert prøverør.

Prøvene ble korket godt og plassert i et prøvestativ. Her ble prøvene teipet fast, slik at de kunne legges horisontalt på ristebordet i inkubator. Prøvene ble deretter ristet over natten ved 50 °C og 290 rpm.

Dag 2 ble prøvene hentet fra inkubator og plassert i isbad for å forhindre videre enzymatisk nedbrytning, før analyse med mikroskop. Metode for mikroskopanalyse er beskrevet i kapittel 3.7.1. Etter eventuell mikroskopanalyse ble prøvene tilsatt 4 mL MQ vann, deretter ble prøvene mikset med wirlmixer i 15 sekunder på maksimal hastighet. Fra denne løsningen ble det pipettert ut 2 mL, som ble fortynnet til 10 mL med MQ vann. Disse ble igjen mikset med wirlmixer i 15 sekunder, før 1 mL ble pipettert ut og fortynnet til 12,5 mL med MQ vann. Dette gir en total fortynning på 500 ganger. Dette gir en NP-konsentrasjon på 100 ng/L i de spikede blåskjellprøvene.



*Figur 13 - Flytskjema for prosessen av opparbeiding og metode for blåskjellprøver tilsatt ulike enzym, for analyse med mikroskop og sp-ICP-MS*

### 3.6. Metode for reker med ulik opparbeiding

#### 3.6.1. Homogenisering av reker

Rekeprøver ble opparbeidet etter Havforskningsinstituttets metode for opparbeiding av reke (Havforskningsinstituttet, 2019). Rekene ble opparbeidet ved hjelp fra Rebeca Garcia Perez, samme dag som blåskjellprøvene. Rekene som ble opparbeidet var kokt, da reker som standard kokes på båt ved innsamling. Dette er i henhold til metoden som benyttes ved HI. Halvparten av rekene ble rensed for skall. Her knekkes hodet av, før skallet vris av fra undersiden. For den andre halvdel av rekene ble skallet beholdt intakt.

De rensede og hele rekene ble fordelt i tre beholdere hver, totalt seks beholdere som vist i Tabell 8.

*Tabell 8 - Oversikt over ulike opparbeidinger av rekeprøver*

<b>Hel/pillet reke</b>	<b>Vanlig homogenisering (Hom)</b>	<b>Kryomølle (CM)</b>	<b>Homogenisering + Kryomølle (HomCM)</b>
<b>Hel</b>	Ja	Ja	Ja
<b>Pillet</b>	Ja	Ja	Ja

Én beholder hele, og en beholder pillede reker ble satt direkte i fryser. De fire gjenværende partiene med reker ble homogenisert med kjøkkenblender, til hvert sitt separate homogenat. Kjøkkenblenderen ble vasket mellom hvert parti rekeprøve. De hele rekene måtte homogeniseres i flere omganger for å få en tilstrekkelig homogen masse. Disse prøvene ble også plassert i fryser ved -20 °C over natten.

Dag to ble to homogeniserte og de to hele rekeprøvene hentet ut fra fryser og overført til kammer for kryomølling. Innholdet i de fire prøvebeholderne ble kryomøllet separat, i rene kammer. Rekeprøvene med skall måtte kryomølles i flere omganger for å danne en homogen masse. Rekeprøvene ble deretter plassert tilbake i fryser ved -20 °C til senere analyser.

### 3.6.2. Opparbeiding av rekeprøver

Ulik opparbeiding ble undersøkt for opparbeidede prøver av reke. Det ble benyttet samme metode som for blåskjell for undersøkelse av ulik opparbeiding. Det ble veid inn 1 g reke til hver parallell, blankprøver bestod av 1 mL MQ-vann. Den enzymatiske oppløsningen ble gjort med 5% Protamex og det ble tilsatt 3 mL Protamex til hvert rør. Paralleller ble spiket med TiO<sub>2</sub> og Au 60 nm før inkubering med resting over natten ved 50°C og 290 RPM.

For å se om rekeskall ville løse seg opp i en enzymløsning med proteinaser ble Protamex tilsatt paralleller av opparbeidede rekeprøver med skall. Disse prøvene ble ikke analysert på sp-ICP-MS, men filtrert og sammenliknet med paralleller uten skall. Disse prøvene ble inkubert over natten sammen med prøvene som skulle analyseres ved sp-ICP-MS.

Dag to ble prøvene hentet fra inkubator. Prøvene til filtrering ble satt til side.

De resterende prøvene ble tilsatt 4 mL MQ vann og blandes med wirlmixer i 15 sek på maksimal hastighet. Fra disse prøvene ble 0,5 mL pipettert ut umiddelbart og fortynnet til 10 mL med MQ-vann. Disse ble deretter mikset på nytt i 15 sek på wirlmixer. 1 mL fra disse prøvene ble pipettert ut og fortynnet til 12,5 mL med MQ-vann. Dette ga en total fortynning på 2000x.



### 3.7. Mikroskopanalyser av mikropartikler fra blåskjell

#### 3.7.1. Undersøkelse av mikropartikler med mikroskop

Etter inkubasjon ble rørene med prøvene lagt i isvann for å bremse videre oppløsning, da Protamex har økt aktivitet ved 60 °C. Det ble pipettert ut én dråpe fra hver parallell til mikroskopglass, som ble dekket med dekkglass før mikroskopanalyse. Det ble benyttet et Leica DM2500 LED mikrosystem, med et tilhørende DMC 6200 mikroskopkamera som direkte overførte bilder til PC. Det ble tatt fem bilder per parallell, som ble benyttet til å bestemme størrelse og antall av mikropartikler (MP) for ulike homogeniseringer beskrevet i kapittel 3.4, og for de to ulike enzymatiske oppløsningene i kapittel 3.5.

#### 3.7.2. Databehandling av mikroskopbilder i FIJI ImageJ

Antall MPer per mikroskopbilde er såpass høyt at det ikke er hensiktsmessig å telle disse manuelt. Programvaren FIJI ImageJ ble derfor benyttet til telling av MPer. Utvidelsen NanoDefine ble installert i programvaren, som inneholder scriptet ParticleSizer utviklet for å automatisk måle størrelse og antall av partikler (Wagner, 2016). Dette scriptet kunne tilpasses ved å justere parameterne vist i Figur 14. Figuren viser parametere som ble benyttet i dette prosjektet.

Mode Selection	
Minimal long axis length [px]	3 <input type="checkbox"/> Use Default
Minimal short axis length [px]	3 <input type="checkbox"/> Use Default
Maximal aspect ratio	100 <input checked="" type="checkbox"/> Use Default

Misc	
Smoothing factor	1 <input checked="" type="checkbox"/> Use Default
Use inverted images	<input checked="" type="checkbox"/>
Show binary result	<input type="checkbox"/>
Ask me to select a region	<input type="checkbox"/>
Do not plot size distributions	<input type="checkbox"/>
Do not apply denoising	<input checked="" type="checkbox"/>
Record process	<input checked="" type="checkbox"/>
Set R install directory	... <input type="button" value="Set"/>

Segmentation	
Use watershed for irregular structures	<input checked="" type="checkbox"/>
Irregular watershed convexity threshold	0.35 <input type="checkbox"/> Use Default
Use single particle mode	<input type="checkbox"/>
Use ellipse fitting mode	<input checked="" type="checkbox"/>

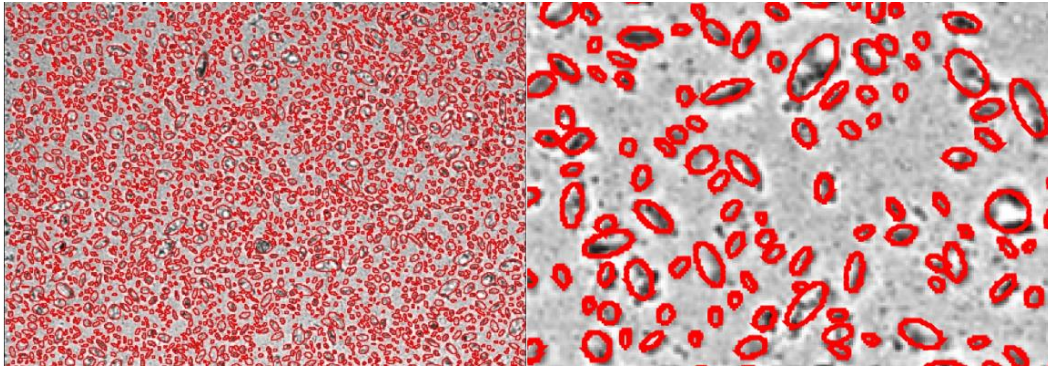
Shape constraints	
Circular window radius [px]	4 <input type="checkbox"/> Use Default
Rolling ball radius [px]	2 <input type="checkbox"/> Use Default
Min. OTB intensity difference (8 bit)	3 <input type="checkbox"/> Use Default

Shape constraints	
Minimal area [px^2]	2 <input type="checkbox"/> Use Default
Minimal feret min. [px]	3 <input type="checkbox"/> Use Default
Minimal convexity	0 <input checked="" type="checkbox"/> Use Default
Minimal solidity	0 <input checked="" type="checkbox"/> Use Default

Figur 14 - Skjerm bilde av innstillings-menyen for bestemmelse av partikkelantall i ImageJ

Programvaren definerer størrelsen til MPer basert på piksler, det ble derfor benyttet bilder med samme forstørrelse på mikroskopet for å skaffe sammenlignbare resultater. Figur 15 viser

hvordan programvaren teller partikler, slik at dette kan kontrolleres før dataene eksporteres til Excel.



*Figur 15 - Skjermbilde fra ImageJ. Ulike forstørrelser av hvordan programmet teller partikler fra mikroskopbilde. De røde ringene markerer observerte partikler*

For sammenlikning av de ulike homogeniseringene ble det benyttet 15 bilder til dataprosessering for hver opparbeiding, da det ble tatt fem bilder av hver av de tre paralleller for Hom, CM og HomCM. Bildene ble behandlet med ImageJ og disse dataene ble benyttet til beregninger av MP antall- og størrelse i blåskjellprøvene, som videre benyttes til grafiske og statistiske resultater.

Det ble tatt fem bilder av hver parallell blåskjell ved bruk av mikroskop, som ble benyttet til å beregne gjennomsnitt, standardavvik og relativt standardavvik (RSD).

## 3.8. sp-ICP-MS bestemmelse av nanopartikler

### 3.8.1. Oppsett av sp-ICP-MS

Alle instrumentbestemmelsene i dette prosjektet ble utført med et Agilent Technologies 8900 Triple Quadrupole ICP-MS instrument. I hovedsak ble NPer bestemt med sp-ICP-MS i enkeltelementmodus. I enkeltelementmodus blir kun en analytt med en spesifikk  $m/z$  analysert. Det ble også gjort forsøk med mulitelementmodus. I mulitelementmodus blir flere analytter målt i samme prøve. Hvert element har sin spesifikke  $m/z$ , som tilmåles. Dette øker den totale opptakstiden, da hver analytt analyseres individuelt i prøven.

For hver analyseserie ble det bestemt et NP-referansemateriale (RM), som i dette prosjektet var sfæriske 60 nm Au NPer, en ionisk blank, bestående av MQ-vann, en ionisk analyttstandard (AN) og en ionisk standard for referansematerialet, og de opparbeidede analyseprøvene. Det ble også benyttet en tuning løsning bestående av Ce, Co, Li, Mg, Ti og Y i 2% HNO<sub>3</sub>. Hver prøve ble analysert i 120 sekunder, hvor det kjøres en vaskeløsning av HNO<sub>3</sub> i 60 sekunder og MQ-vann mellom hver prøve. Det ble intervallvis lagt inn blankprøver av MQ-vann blant prøvene som skulle analyseres, gjerne mellom hver 2-3 prøve. Prøvene som skulle analyseres ble plassert i tilfeldig rekkefølge, og blankprøvene ble benyttet til å undersøke potensiell overføringseffekt (carry over). Tabell 9 viser et generelt oppsett for analyse på sp-ICP-MS med Au som referansemateriale.

*Tabell 9 - Eksempel på prøvesekvens for analyse på Agilent 8900 i single particle modus*

<b>Prøvetype</b>	<b>Prøvenavn</b>	<b>Beskrivelse</b>
IonicStd (RM)	0 Au <sup>+</sup>	Ionisk standard Au
IonicBlk	MQ-blank	MQ-vann
RM	Au RM	200 ng/L Au RM 60 nm
Ionic Std (RM)	1 Au <sup>+</sup>	1 µg/L ionisk RM, gull
Ionic Std (AN/RM)	10 Au <sup>+</sup>	10 µg/L ionisk RM, gull
Ionic Std (AN)*	1 X <sup>+</sup>	1 µg/L ionisk RM, f.eks Ti
Ionic Std (AN)*	10 X <sup>+</sup>	10 µg/L ionisk RM, f.eks Ti
Sample	Tilfeldig prøve	Blåskjell/metodeblank
Sample	Tilfeldig prøve	Blåskjell/metodeblank
Sample	Blank	MQ-vann
Sample	Tilfeldig prøve	Blåskjell/metodeblank

Parameterne som ble benyttet for instrumentet er listet i Tabell 10.

Tabell 10 - Parametere for Agilent 8900 i single particle modus

Parameter	Verdi
Radiofrekvenskraft	1550 W
Forstøvergass	1,05 L/min
Forstøver	Micromist
Isotop Au	197 Au
Måleintervaller	0,0001 sekund (100 $\mu$ s)
Analysetid (per måling)	2 min (120 sekunder)
Pneumatiskpumpe	0,1 rps (runder per sekund)
Målte isotoper	Ti, Au, multielement
Vaskeløsning 1	90 sek Milli-Q vann
Vaskeløsning 2	60 sek 5% HNO <sub>3</sub>
Tube indre diameter	1,02 mm
Referansemateriale	Au 60 nm

### 3.8.2. Bestemmelse av Au 60 nm nanopartikler

Au 60 nm NPer ble analysert i enkeltelementmodus, ved  $m/z$ -verdi 197. Partiklene har kjent konsentrasjon og størrelse, og benyttes til å bestemme transporteffektiviteten (TE). Au NPene ble også analysert som enkeltelement-analytt i blåskjell. Prøvene som ble spiket ble fortynnet til en NP-konsentrasjon på 100 ng/L. Denne konsentrasjonen ble også benyttet i spikede blankprøver for sammenlikning og beregning av gjenvinning.

### 3.8.3. Bestemmelse av TiO<sub>2</sub> nanopartikler

TiO<sub>2</sub> partiklene ble fortynnet i tre trinn som beskrevet i kapittel 3.2.1. Titanpartiklene fortynnes i en løsning 0,1% HNO<sub>3</sub> i stedet for MQ-vann, det ble derfor analysert blankprøver av 0,1% HNO<sub>3</sub>. TiO<sub>2</sub> ble analysert ved 48 og 64  $m/z$ . Dette gjøres ved å benytte masseskift-metoden, der den første kvadrupolen i instrumentet kun slipper gjennom <sup>48</sup>Ti<sup>+</sup> ioner, hvor disse deretter vil kolliderer med O<sub>2</sub> og danne <sup>48</sup>Ti<sup>16</sup>O<sup>+</sup> med en  $m/z$  på 64 som går gjennom den siste kvadrupolen. Ved 48  $m/z$  kan det oppstå ulike interferenser som <sup>48</sup>Ca<sup>+</sup>. Masseskift reduserer sjansen for at interfererende forbindelser kommer gjennom den siste kvadrupolen.

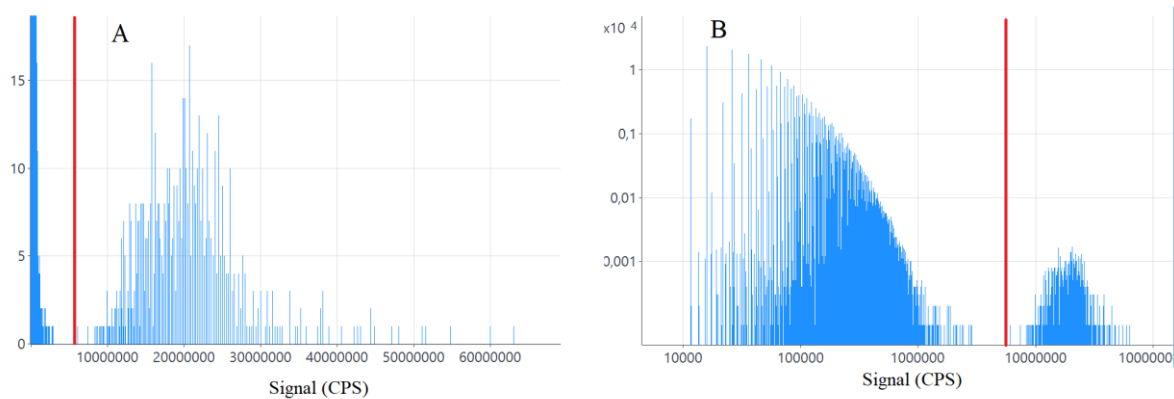
### 3.8.4. Behandling av rådata i MassHunter

Rådata fra sp-ICP-MS instrumentet ble eksportert til Agilent Technologies MassHunter versjon 5.1. For å behandle rådataene er det to steg i MassHunter som er spesielt viktige. Dette er Particle Detection Threshold (PDT) og Particle Baseline (Grunnlinje). PDT er størrelsesbestemmelsesgrensen og er beskrevet i kapittel 2.4.3. Denne settes i overgangen mellom bakgrunnsstøy og partikler, her vist for en måling på Au 60 nm NPer i Figur 16A. I noen tilfeller er det hensiktsmessig og enklere å bruke programvarens logaritmiske skala til å sette størrelsesbestemmelsesgrensen, dette er vist i Figur 16B. Det er mulig å sette en nedre og øvre størrelsesbestemmelsesgrense, men i denne oppgaven ble det kun benyttet en nedre grense.

I MassHunter kan Transporteffektiviteten bestemmes fra referansematerialets (RM) størrelse eller konsentrasjon. I denne oppgaven er RM størrelse benyttet til beregning av TE. Her blir gullpartikler benyttet som RM. Ved analyse av Au 60 nm NPer er det forventet at hovedfordelingen av NPer har en størrelse rundt 60 nm. Størrelsesbestemmelsesgrensen eliminerer partikler under forventet område, så ved å ekskludere dette som bakgrunnsstøy vil disse partiklene ikke inngå i beregning for TE.

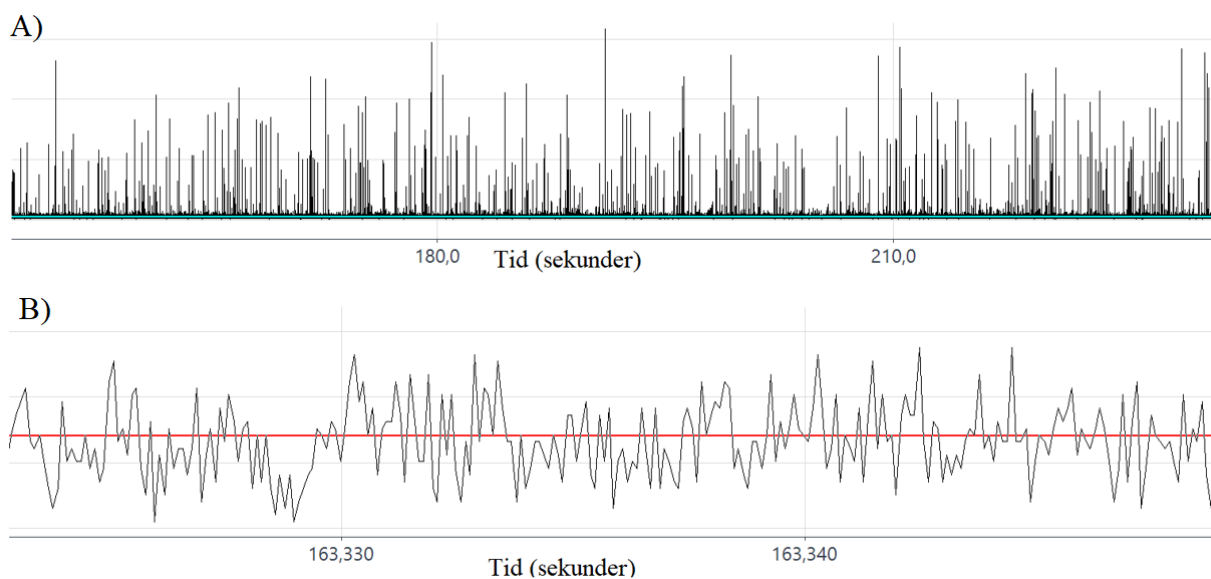
TE kan også bestemmes manuelt ved å benytte formel 2.

$$TE = \frac{\left(\frac{\text{Signal fra ionisk standard}}{\text{Massen til ionisk standard}}\right)}{\left(\frac{\text{Nanopartikkel signal}}{\text{Nanopartikkel masse}}\right)} \quad (\text{Formel 2})$$



Figur 16 - Størrelsesbestemmelsesgrense, eller particle detection threshold (PDT), illustrert ved rød vertikal strek. Bestemmelsesgrensen skiller partikler fra bakgrunnsstøy. Ubehandlet plott er vist til venstre, mens høyre side har et plott med logaritmisk x og y akse

Figur 17A viser fullstendig råsignalplott av partikler over tid for en prøve. Figur 17B viser et utsnitt av råsignalplottet, der den røde streken viser grunnlinjen til prøven. Signalene over grunnlinjen blir synlige i signalintensitetshistogrammet.



Figur 17 - Råsignalplott av målinger over tid, fra MassHunter 5.1. Øvre linje viser et større utsnitt av signal over tid, mens nedre linje viser toppene i større detalj sammen med grunnlinjen

Rådata fra sp-ICP-MS analysene ble prosessert i MassHunter versjon 5.1, som er den tilhørende programvaren fra Agilent Technologies. Dataene ble videre prosessert i Microsoft Excel og RStudio.

### 3.8.5. Formler

MassHunter dataprogrammet bruker formlene gitt i dette avsnittet for å kalkulere sp-ICP-MS resultater (Agilent Technologies, 2020b)

Responsfaktor,  $s$  (CPS/ppb):

$$S = \frac{I_{ion} - I_{blk}}{C_{ion}} \quad (\text{Formel 3})$$

$I_{ion}$ : Gjennomsnittlig signal fra ionisk standard (CPS)

$I_{blk}$ : Gjennomsnittlig signal fra ionisk blank (CPS)

$C_{ion}$ : Konsentrasjon av ionisk standard (ppb)

Referansematerialets standard partikkelmasse,  $m_{std}$  (fg)

$$m_{std} = \frac{4}{3} \pi * \left( \frac{d_{std}}{2 * 10^7} \right)^3 * \rho_{std} * 10^{15} \quad (\text{Formel 4})$$

$\rho_{std}$ : Referansematerialets tetthet (g/cm<sup>3</sup>)

$d_{std}$ : Referansematerialets diameter (nm)<sub>min</sub>

Transporteffektivitet,  $\eta_n$ , for partikkelantall:

$$\eta_n = \frac{N_p}{\frac{C_{std} * X * 10^3}{m_{std}} * V * T} \quad (\text{Formel 5})$$

$N_p$ : Antall detekterte nanopartikler

$V$ : Opptatt prøvevolum (mL/min)

$T$ : Total analysetid (min)

$C_{std}$ : Referansematerialets konsentrasjon (ng/L)

$m_{std}$ : Standard partikkelmasse

Transporteffektivitet,  $\eta_n$ , for partikkelstørrelse:

$$\eta_n = \frac{\frac{4}{3}\pi * \left(\frac{d_{std}}{2}\right)^3 * \rho_{std} * s * 60}{I_p * t_d * V * f_d * 10^{12}} \quad (\text{Formel 6})$$

$I_p$ : Toppintensiteten til referansematerialet (CPS)  
 $f_d$ : Forholdet mellom NPens og analyttens molare masse  
 $s$ : Responsfaktor (CPS/ppb)  
 $t_d$ : Måleintervall (sek)

Transporteffektivitet,  $\eta_n$ , manuell metode:

$$\eta_n = \frac{\text{opptak av prøve} \left(\frac{ml}{min}\right) - \text{mengde tapt prøve} \left(\frac{ml}{min}\right)}{\text{opptak av prøve} \left(\frac{ml}{min}\right)} \quad (\text{Formel 7})$$

Massen til en NP i referanseprøven,  $m_{p_n}$  (fg):

$$m_{p_n} = \frac{I_{rm_n}}{I_{rm}} * m_{std} \quad (\text{Formel 8})$$

$I_{rm}$ : Enkelt partikkelsignal fra referansematerialet (CPS)  
 $I_{rm}$ : Gjennomsnittlig partikkelsignal fra referansematerialet (CPS)

Partikkelkonsentrasjon i NP-prøve og referansemateriale,  $C_p$  (partikler/L):

$$C_p = N_p * \frac{1}{\eta_n} * \frac{1}{V} * \frac{1}{T} * 10^3 \quad (\text{Formel 9})$$

$\eta_n$ : Transporteffektivitet  
 $N_p$ : Antall detekterte nanopartikler

Massen til en enkelt NP,  $m_{p_n}$  (fg):



$$m_{p_n} = I_{p_n} * \frac{1}{s} * t_d * V * \eta_n * 10^3 * f_d * \frac{1}{60} \quad (\text{Formel 10})$$

$I_{p_n}$ : Enkelt partikkelsignal (CPS)

$t_d$ : Måleintervall (sek)

$f_d$ : Forholdet mellom NPens og analyttens molare masse

Massekonsentrasjon til NPene i en NP-prøve og referansematerialeprøve,  $C_m$  (ng/L):

$$C_m = \frac{\sum m_p}{10^3} * \frac{1}{\eta_n} * \frac{1}{V} * \frac{1}{T} \quad (\text{Formel 11})$$

$m_p$ : massen til en enkelt NP

Størrelse av en enkelt NP i NP-prøve og referansemateriale,  $d_{p_n}$  (nm):

$$d_{p_n} = \sqrt[3]{\frac{6}{\pi} * \frac{m_{p_n}}{10^{15} * \rho_p} * 10^7} \quad (\text{Formel 12})$$

$\rho_p$ : Analyttens tetthet (g/cm<sup>3</sup>)

## 3.9. Statistikk

### 3.9.1. Bakgrunn

Variansanalyse (ANOVA) benyttes for å undersøke om det er signifikante forskjeller mellom grupper. Dette er en statistisk metode der gjennomsnittet til tre eller flere grupper sammenliknes. Metodens nullhypotese sier at alle gjennomsnittsverdiene er identiske.

I dette prosjektet ble det benyttet enveis ANOVA, hvor gjennomsnittene sammenliknes for grupper med én faktor som skiller gruppene fra hverandre. Her brukes ANOVA eksempelvis til å sammenlikne gjennomsnittene for blåskjellprøver med ulik homogenisering. Nullhypotesen forkastes dersom F-verdien i ANOVA er større enn F-kritisk verdien. Dersom nullhypotesen forkastes vil det si at minst én gruppes gjennomsnitt skiller seg signifikant fra de andre gjennomsnittsverdiene. ANOVA avdekker ikke hvilken gruppe/grupper som skiller seg signifikant ut.

Når det er flere enn to grupper kan ikke disse sammenlignes direkte mot hverandre, da dette adderer til det signifikante nivået. Dette kalles falsk deteksjonsandel og er vist i formel 15. Dersom man har 5 grupper vil dette øke grensen fra signifikant nivå på 5% til 26%. Dersom man har et større antall grupper vil man derfor etter hvert nå et nivå hvor man er garantert å få en falsk positiv. For å forhindre påvirkning fra den falske deteksjonsandelen kan det benyttes en post hoc test for å sammenlikne flere gruppers p-verdi.

Når nullhypotesen i ANOVA forkastes benyttes det ofte en post hoc test for å avdekke hvilke(n) gruppe som skiller seg signifikant ut. I denne oppgaven ble det benyttet Tukey post hoc test i tilfellene der ANOVA fant signifikante forskjeller. Tukey post hoc test sammenligner alle grupper parvis mot hverandre, der en kritisk verdi avgjør om det er signifikante forskjeller mellom gruppene som sammenliknes. Den kritiske verdien beregnes på bakgrunn av feilmargin, antall grupper som sammenliknes og det totale antallet observasjoner. Dersom to gruppers gjennomsnittsverdi overstiger den kritiske verdien vil dette gi utslag som en signifikant forskjell.

For sammenlikning av to grupper ble det benyttet t-test til å undersøke signifikante forskjeller. Her benyttes utvalgs t-test, der nullhypotesen sier at det ikke er signifikante forskjeller mellom gruppene. Det ble benyttet et 95% konfidensintervall, som gir et  $\alpha$ -nivå på 0,05. SD antas å være tilnærmet likt for de to gruppene, og felles SD kan finnes ved å benytte formel 16.

### 3.9.2. Formler

Standardavvik (SD):

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (xi - \bar{x})^2}{n - 1}} \quad (\text{Formel 13})$$

$x_i$ : Enkeltmålinger

$\bar{x}$ : Gjennomsnitt av alle målinger

$n$  = Antall målinger

Formel for relativt standardavvik:

$$RSD\% = \frac{SD}{\bar{x}} * 100 \quad (\text{Formel 14})$$

SD: Standardavvik

Falsk deteksjonsandel (Family-wise error rate):

$$FWER = 1 - (1 - \alpha)^n \quad (\text{Formel 15})$$

$\alpha$ : Signifikant nivå for en enkelt hypotese

$n$ : Totalt antall tester

Formel for felles standardavvik for t-test:

$$SD_{felles} = \sqrt{\frac{(n_1 - 1) * s_1^2 + (n_2 - 1) * s_2^2}{n_1 + n_2 - 2}} \quad (\text{Formel 16})$$

$\alpha$ : Signifikant nivå for en enkelt hypotese

$n$ : Totalt antall tester

Sentralgrenseteoremet:

$$Z = \frac{\bar{X} - \mu}{\sqrt{\frac{\sigma}{n}}} \quad (\text{Formel 17.1})$$

der

$$\bar{X} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n X_i \quad (\text{Formel 17.2})$$

X: Uavhengige variabler ( $X_1, X_2, \dots, X_n$ )

$\mu$ : Forventningsverdi

$n \rightarrow \infty$

$\sigma$  = varians

### 3.10. Analysekvalitet

I dette prosjektet benyttes paralleller av alle prøver, sammen med metodeblank og matriseblank. Blankprøver kan benyttes til å avdekke uønsket bidrag til analytt i prøvene, mens paralleller benyttes for å undersøke om det er variasjon mellom disse. Det har også blitt benyttet Au 60 nm NPer, som vurderes mot resultatet fra tidligere validering, for å undersøke om det er samsvar mellom resultatene.

Måleusikkerhet kan beregnes ved utgangspunkt i valideringsdata fra presisjon og riktighet. I dette prosjektet er det ikke utført fullvalidering, men et innledende estimat av parameterne kan beregnes fra eksperimentelle data oppnådd under repeterbarhetsbetingelser i forsøkene.

#### 3.10.1. Parametere

Bakgrunn for parametere er gitt i kapittel 2.5. Anvendelse av disse parameterne for dette prosjektet er forklart i dette kapittelet.

##### **Selektivitet**

Ved analyser av  $^{197}\text{Au}$  NPer er det ytterst få polyatomiske interfererende forbindelser, og det antas ikke at interfererende forbindelser vil påvirke resultater for Au NPer. Kvadrupolene i sp-ICP-MS instrumentet gjør at uønskede forbindelser kan elimineres, som beskrevet for  $\text{TiO}_2$  i kapittel 3.8.3. Det blir derfor antatt at selektiviteten er god for analyse av NPene i dette prosjektet.

##### **Deteksjonsgrense**

Deteksjonsgrense (LOD) er den laveste mengden analytt som kan detekteres i en prøve, der prøven ved en gitt sannsynlighet kan skiller fra en blankprøve. LOD ble bestemt fra metodeblankprøver. LOD beregnes ved å benytte formel 18.

##### **Kvantifiseringsgrense**

Kvantifiseringsgrensen (LOQ) er den laveste mengden analytt som kan bestemmes kvantitativt ved en gitt sannsynlighet, og settes som  $3 \cdot \text{LOD}$  i dette prosjektet, vist i formel 19.

##### **Måleområde**

I dette prosjektet vil MO være avgrenset nedover av ionisk blank av MQ-vann og oppover av ionisk standard med en konsentrasjon på  $10 \mu\text{g/L}$ . Det ble kun benyttet MQ-vann og én ionisk standard, som gir to punkter. For å bestemme måleområde er det nødvendig med tre eller flere punkt. I valideringsrapporten ble lineært område funnet til å være  $0\text{-}10 \mu\text{g/L}$  (Valdersnes, Bienfart, Solli, & Bruvold, 2020).

**Presisjon**

Presisjon angis som RSD, formel for RSD er gitt i formel 14, og oppgis som prosent. Codex Alimentarius har satt grensen for akseptabel RSD til 44% ved intern reproduserbarhet, men ved repeterbarhet settes vanligvis denne grensen til 2/3 av dette. I dette prosjektet ble grensen satt til 22% ved repeterbarhet, der avvikene undersøkes mellom paralleller.

**Riktighet**

Riktighet bestemmes av samsvar mellom gjennomsnittet for målinger mot teoretisk verdi, som i dette prosjektet er gitt av Au 60 nm NPer. Riktighet kan undersøkes ved eksempelvis spiking, analyser av referansematerialer og ringtester, og kan uttrykkes som bias, gjenvinning eller z-score. I dette prosjektet benyttes gjenvinning for undersøkelse av riktighet, der gjenvinning beregnes fra formel 20. Codex Alimentarius har satt kriteriet for godkjent gjenvinning til 40-120% (FAO&WHO, 2019).

**Robusthet**

Robusthet vil si metodens evne til å gi samme resultat ved små endringer i metodeparameterne og utstyr, og gir en indikasjon på påliteligheten til metoden. I dette prosjektet er analysene utført over en lengre tidsperiode med tillaging av nye standarder til hver analysedag. NPer har begrenset stabilitet i fortynnede løsninger, og bør benyttes innen kort tid. Sammenlikning av ulike homogeniseringer og ulike enzymer benyttes til å undersøke metodens robusthet.

**Måleusikkerhet**

Måleusikkerheten definerer området der det er forventet at den sanne verdien til en måling ligger. Det er vanskelig å bestemme den sanne verdien med 100% sannsynlighet, og måleusikkerheten gir et tall på intervallet der den sanne verdien befinner seg, vanligvis med 95% konfidens. Måleusikkerheten kan bestemmes ved formel 21.

### 3.10.2. Formler

Formler for måleusikkerhet, gjenvinning, LOD og LOQ

Deteksjonsgrense, LOD:

$$LOD = \bar{X}_b + (3 * SD) \quad (\text{Formel 18})$$

$\bar{X}_b$ : Gjennomsnittsmålinger av blankprøve

Kvantifiseringsgrense, LOQ:

$$LOQ = 3 * LOD \quad (\text{Formel 19})$$

Formel for gjenvinning (%):

$$Gjenvinning(\%) = \frac{\text{Målt verdi}}{\text{Teoretisk verdi}} * 100 \quad (\text{Formel 20})$$

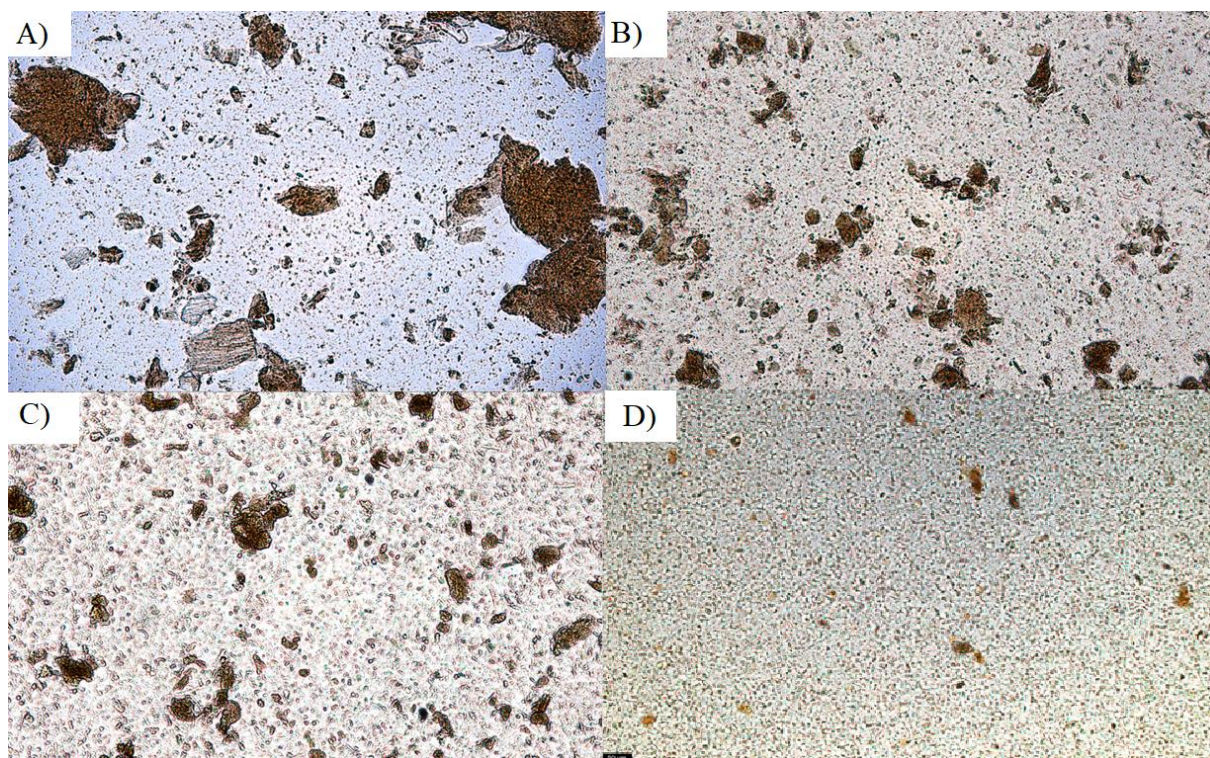
Måleusikkerhet (%) ved 95% sikkerhet

$$MU(95\%) = (RSD\% * 2) + 5\% \quad (\text{Formel 21})$$

## 4. Resultater og diskusjon

### 4.1. Innledende forsøk for opparbeiding av blåskjellprøver

Innledningsvis i prosjektet ble det gjort undersøkelser med variasjon i inkubasjonstid på varmerist, med kortere inkubasjon enn det som benyttes i metode 600. For kvalitativ bestemmelse av oppløsningen ble prøvene undersøkt med mikroskop, der det visuelt kunne observeres dårligere homogenisering for blåskjellprøvene med kortere eller ingen inkubasjonstid på varmerist. En sammenlikning av blåskjellprøver med A) 0, B) 10, C) 30 og D) 60 minutter inkubering på varmerist er vist i Figur 18. Når prøven består av større bestanddeler av blåskjell er prøven mindre homogen, som kan gi variasjon mellom parallellene. Det kan observeres at blåskjellene med kortere inkubasjonstid er dårlig oppløst og dermed ikke egnet til videre fortynning til sp-ICP-MS analyser. Det ble derfor besluttet at videre analyser skulle benytte minimum 60 minutter inkubasjonstid ved opparbeiding av blåskjellprøver.



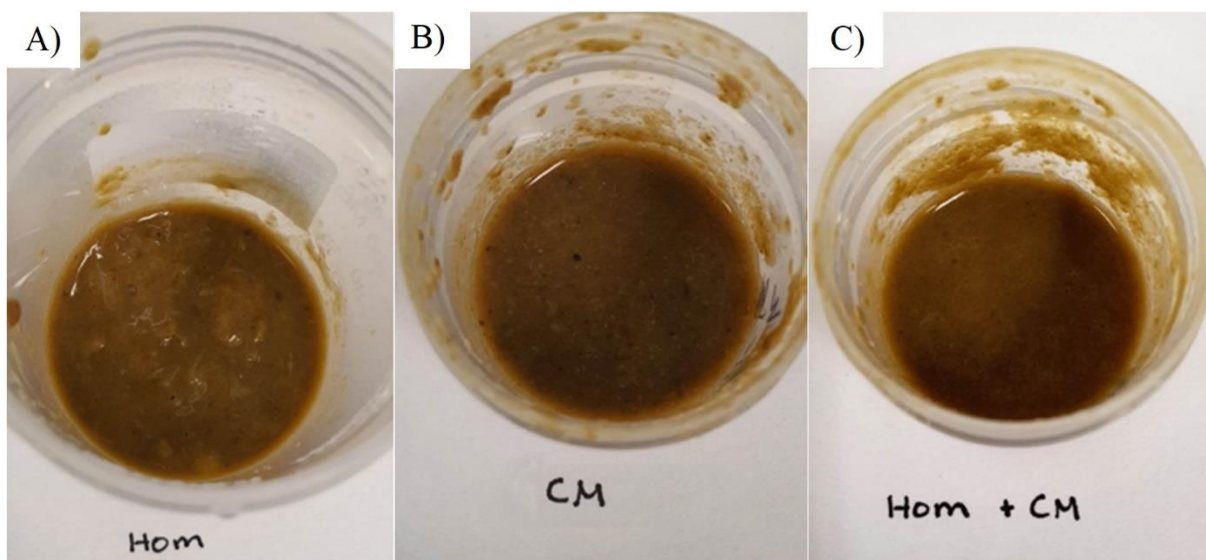
*Figur 18 - Resultater fra innledende forsøk med variasjon i inkubasjonstid. A) Blåskjell tilsatt Protamex uten inkubering på varmerist. B) Blåskjell tilsatt Protamex inkubert i 10 minutter på varmerist, C) Blåskjell tilsatt Protamex inkubert i 30 minutter på varmerist, D) Blåskjell tilsatt Protamex inkubert i 60 minutter på varmerist*



## 4.2. Blåskjell opparbeidet med ulik homogenisering

### 4.2.1. Visuell undersøkelse ved bruk av mikroskop

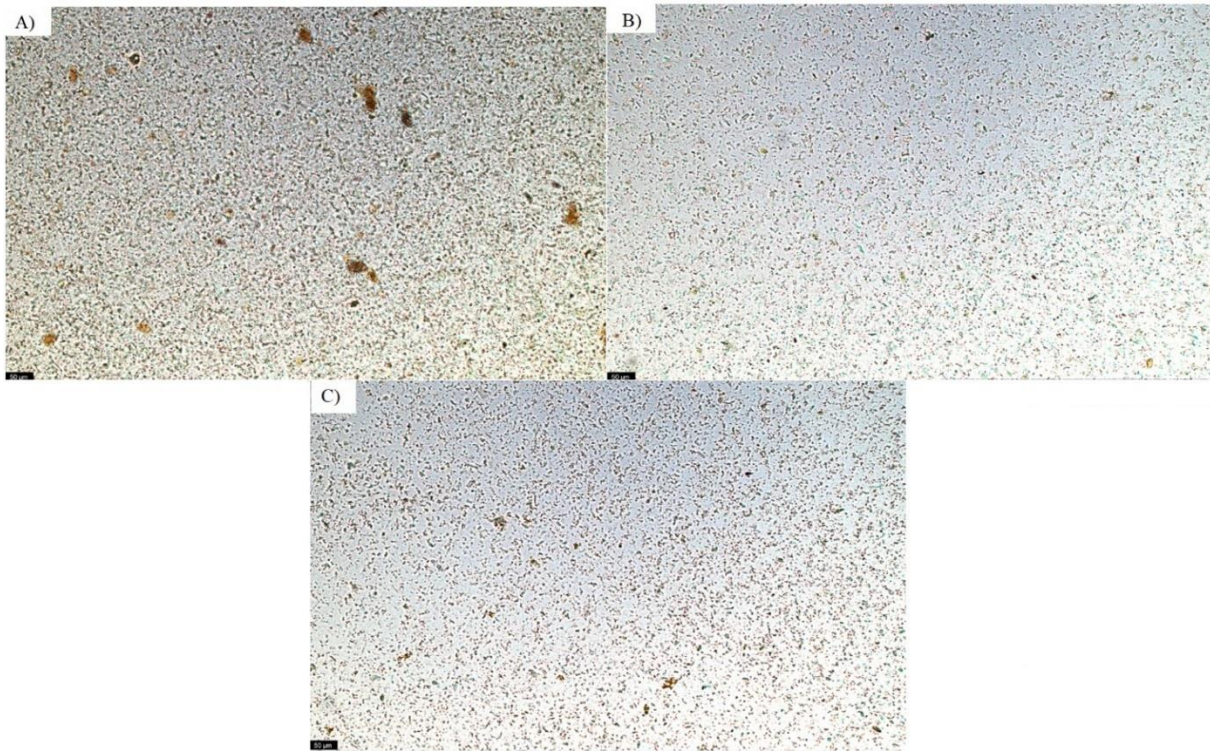
Ved innveiling av blåskjellprøvene var det merkbart forskjell på homogeniteten til de ulike opparbeidingene. Innveiling av blåskjellprøver ble gjort ved pipettering av homogeniserte blåskjell fra prøveglass over til reagensrør på analysevekt. Her var CM og HomCM prøvene merkbart enklere å pipettere som en homogen masse, mens Hom prøvene bestod av en blanding av små klumper og væske. Dette kan gi utslag som avvik mellom parallellene, da de kan ha ulikt væskeinnhold. For å redusere denne faktoren ble prøvene rørt med en pasteurpipette før pipettering av blåskjellprøve, slik at løsningen skulle være best mulig blandet. Dette var i mindre grad nødvendig for CM og HomCM prøvene. Prøvebegre for alle tre homogeniseringene ble fotografert og kan observeres i Figur 19.



*Figur 19 - Blåskjell opparbeidet ved ulik homogenisering, A) homogenisering (Hom), B) kryomølle (CM) og C) Homogenisering + kryomølle (HomCM) før tilsetning av enzym. Det kan observeres at Hom har større klumper/bestanddele enn beholderne med kryomøllede prøver*

For å sammenligne ulike homogeniseringer ble blåskjellprøver opparbeidet som beskrevet i kapittel 3.4. Fra hver av de tre homogeniseringene ble det opparbeidet tre paralleller, totalt 9 prøver, som ble spiket med Au 60 nm NPer og TiO<sub>2</sub> NPer til en sluttkonsentrasjon på 100 ng/L. For å undersøke selve homogeniseringen ble det tatt mikroskopbilder av hver opparbeiding, som beskrevet i kapittel 3.4.2.

Figur 20 viser eksempler på en parallell fra mikroskop for A) Hom, B) CM og C) HomCM ved 10x zoom. Denne forstørrelsen ble benyttet videre til prosessering av data i ImageJ og Excel.



*Figur 20 - Mikroskopbilde av blåskjellprøve opparbeidet med A) homogenisering med kjøkkenblender (Hom), B) Kryomølle (CM) og C) Kjøkkenblender + kryomølle (HomCM), ved 10x forstørrelse*

Visuelt ser MPene ut til å ha mindre størrelse for CM og HomCM parallellene, da Hom er noe mørkere og har en større andel store MPer. Det kan ikke trekkes noen sikker konklusjon bare fra å se på mikroskopbildene, men mikroskopbildene forsterker hypotesen om at kryomølling gir en bedre oppløsning av blåskjell enn homogenisering med kjøkkenblender. Resultatene fra behandling av mikroskopbilder i ImageJ er vist i Tabell 11. MP-størrelsene mangler SI-benevning, da programvaren beregnet størrelse ut ifra et pikselforhold. MP-størrelsene behandles derfor i forhold til hverandre, men uten enhet. Standardavvik er beregnet for hver opparbeiding ved å benytte formel 13, mens RSD er beregnet ved å benytte formel 14.

Tabell 11 - Gjennomsnitt, standardavvik og RSD (%) for blåskjellprøver med ulik opparbeiding

	<b>Hom</b>		<b>CM</b>		<b>HomCM</b>	
	MP- størrelse	MP-antall	MP- størrelse	MP- antall	MP- størrelse	MP- antall
<b>Gjennomsnitt</b>	1174	11941	915	12994	978	15132
<b>SD</b>	61	1435	100	1218	81	949
<b>RSD (%)</b>	4,9	12	11	9,4	8,3	6,3

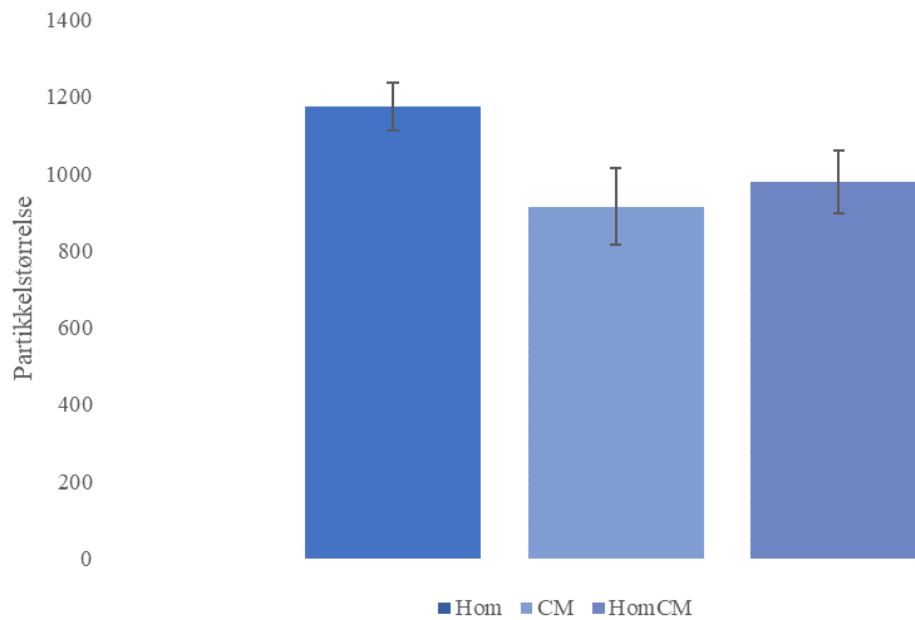
Tabell 11 viser at Hom hadde de største MPene med en gjennomsnittlig størrelse på 1174. CM og HomCM hadde gjennomsnittlige MP-størrelser på henholdsvis 915 og 978. HomCM hadde høyest MP-antall, der det ble bestemt 15132 MPer for HomCM, mot 12994 for CM og 11941 for Hom. Hom-prøvene hadde dermed både færrest og størst MPer. Dette tyder på at disse prøvene ble dårligere oppløst enn prøvene som ble kryomøllet. HomCM hadde flest MPer, i tillegg til lav MP-størrelse. Kryomølle gjør om prøvene til et fint pulver ved opparbeiding, så resultatene viser at dette kan gi en bedre oppløsning av blåskjellprøvene enn vanlig homogenisering med kjøkkenblender.

RSD for MP-størrelse ble beregnet til 4,9% for Hom, 11% for CM og 8,3% for HomCM. For MP-antall ble RSD beregnet til 12% for Hom, 9,4% for CM og 6,3% for HomCM. Det ble beregnet høyest spredning av MP-størrelse for CM med 11%, mens Hom hadde høyest spredning for MP-størrelse med 12%. Lavest RSD for MP-størrelse og antall ble beregnet til henholdsvis 4,9% for Hom og 6,3% for HomCM. Det var dermed relativt liten spredning av MP-størrelse og antall for parallellene for hver homogenisering, dette tyder på at MPene var jevnt fordelt.

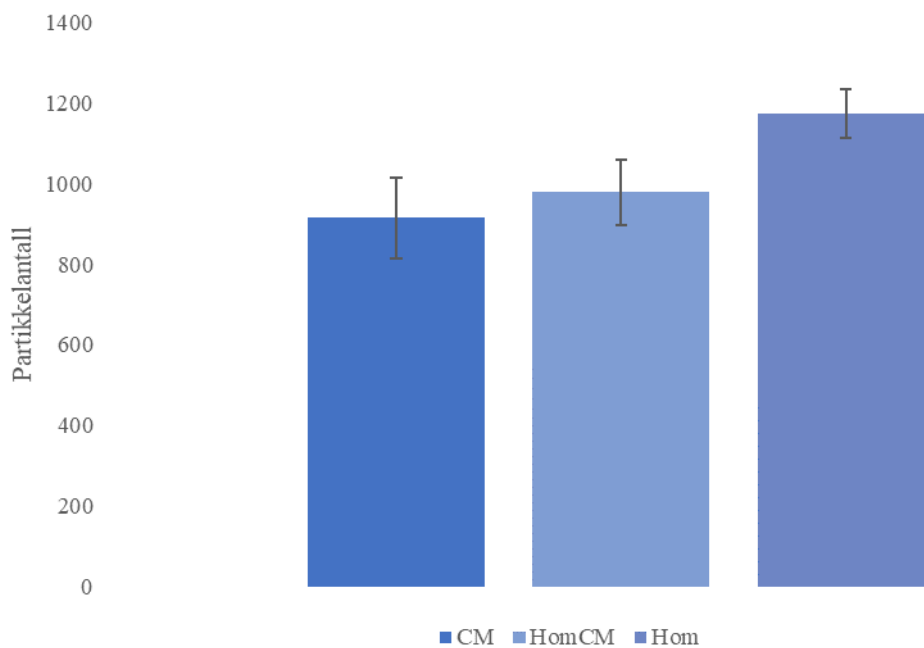
Resultater for gjennomsnittlig MP-størrelse og MP-antall for hver av opparbeidingene er vist grafisk i Figur 21 og Figur 22. Figur 21 viser gjennomsnittlig MP-størrelse for hver opparbeiding, med feilfelt. Hom har de største MPene, mens CM har de minste MPene. Feilfelt er gitt ved standardavvik for hver opparbeiding, og variasjonen mellom feilfeltene er relativt liten.

Figur 22 viser fordeling av totalt antall MPer for parallellene av hver opparbeiding. Her kan det observeres at HomCM har høyest antall MPer, etterfulgt av CM og til slutt Hom parallellene.

Dette stemmer overens med antakelsen fra den visuelle undersøkelsen av mikroskopbildene, der kryomølling så ut til å gi en bedre oppløsning av prøvene.



Figur 21 - Gjennomsnittlig MP-størrelse for Hom, CM og HomCM. Feilfelt er gitt ved standardavvik for hver opparbeiding



Figur 22 - Fordeling av totalt antall MPer for Hom, CM og HomCM. Feilfelt gitt ved standardavvik

### Statistiske beregninger

Variansanalyse (ANOVA) ble benyttet for å undersøke om det var signifikant variasjon mellom de ulike homogeniseringene. Som beskrevet i kapittel 3.9 ble det benyttet enveis variansanalyse, som kan avdekke om det er forskjeller mellom gruppene som sammenlignes. ANOVA antar at gruppene er relativt normalfordelte og har tilnærmet lik varians. Sentralgrenseteoremet sier at for analyser med et stort antall målinger vil sannsynlighetsfordelingen konvergere mot en standard normalfordeling. Sentralgrenseteoremet er vist i formel 17.1 og 17.2. For denne analysen er antallet målinger så stort at gjennomsnittverdiene kan antas å være normalfordelte, og ANOVA kan dermed benyttes. Ensidig ANOVA ble utført med Excels ANOVA-verktøy. Hom, CM og HomCM vil da være tre normalfordelte variabler. Antall paralleller, sum, gjennomsnitt og varians er gitt i Tabell 12.

Tabell 12 – Oppsummering av grupper, MP-størrelse ved ulik opparbeiding

<b>Gruppe oppsummering</b>				
<b>Grupper</b>	<b>N</b>	<b>Sum</b>	<b>Gj.snitt</b>	<b>Varians</b>
<b>Hom</b>	3	3522,975	1174,325	1114,204
<b>CM</b>	3	2743,623	913,5409	6274,607
<b>HomCM</b>	3	3023,662	1007,887	110,4287

Resultatene for ANOVA av homogeniseringenes MP-størrelse er vist i Tabell 13.

Tabell 13 - Ensidig ANOVA for variasjon innad og mellom grupper, MP-størrelse fra mikroskop, der SS er summen av gruppenes kvadrater, df er antall frihetsgrader, MS er summen av kvadrater og F er den statistiske F-verdien

<b>ANOVA</b>						
<b>Kilde til variasjon</b>	<b>SS</b>	<b>df</b>	<b>MS</b>	<b>F</b>	<b>P-verdi</b>	<b>F kritisk</b>
<b>Mellom grupper</b>	103902,7	2	51951,36	20,78265	0,002007	5,143253
<b>Innad i grupper</b>	14998,48	6	2499,747			
<b>Total</b>	118901,2	8				

Den lave p-verdien på 0,002 indikerer at minst én gruppe skiller seg signifikant ut. Antall frihetsgrader mellom grupper er 2, da det er tre grupper (m) og frihetsgrader mellom grupper beregnes som m-1. Det er totalt 9 paralleller (n) fra de tre gruppene, og frihetsgrader innad i grupper oppgis som n-m. Dette gir 6 frihetsgrader innad i gruppene og totalt 8 frihetsgrader.

ANOVA oppgir en F-verdi som benyttes til å bestemme om en gruppe skiller seg signifikant ut. Om F-verdien er større enn F-kritisk kan nullhypotesen forkastes, og det er signifikant forskjell mellom minst to av gruppene. P-verdien er også lavere enn det signifikante nivået på 0,05 (95% konfidensintervall), som også støtter opp at nullhypotesen skal forkastes.

Det kan observeres at det var stor varians for CM, der denne var omtrent 6 ganger høyere enn variansen for Hom. Da ANOVA forutsetter at variansen mellom gruppene er relativt lik, kan dette påvirke resultatene. Blant annet kan ANOVA gi en falsk positiv konklusjon om at det er signifikant forskjell mellom gruppene. Variansen mellom gruppene i denne analysen antas ikke å være så stor at den ga en falsk konklusjon. Det kan benyttes t-tester for to og to grupper for å sammenlikne disse mot hverandre, dersom man har upålitelige resultater fra ANOVA.

I Tabell 13 kan det observeres at F-verdien er langt større enn F-kritisk verdien, og nullhypotesen blir dermed forkastet. Dette sier ikke hvilken gruppe som skiller seg signifikant ut. Når det er flere enn to grupper som skal sammenliknes vil de ikke kunne sammenliknes direkte mot hverandre, da dette vil addere til det signifikante nivået. Dette kalles falsk deteksjonsandel og er vist i formel 15. Dersom man har et større antall grupper vil man etter hvert nå et nivå hvor sannsynligheten er stor for å få en falsk positiv.

For å forhindre påvirkning fra den falske deteksjonsandelen kan det benyttes en Post hoc test for å sammenlikne flere grupper mot hverandre. Det ble benyttet en Tukey Post hoc test for MP-størrelse, p-verdiene for hver sammenlikning er gitt i Tabell 14.

*Tabell 14 – p-verdier for Tukey post hoc test for MP-størrelse*

<b>Tukey Post-Hoc Test – MP-størrelse</b>		
	<b>HomCM</b>	<b>Hom</b>
<b>CM</b>	0,1340257	0,017173
<b>HomCM</b>	-	0,0153671

Post hoc testen ga en p-verdi på 0,134 i Tabell 14 for sammenlikning av CM og HomCM, som ikke er en signifikant verdi. Det er derfor ingen signifikant forskjell mellom disse to opparbeidingene. Mellom Hom og HomCM, og mellom Hom og CM er p-verdien lavere enn den signifikante verdien på 0,05, det kan dermed konkluderes med at Hom metoden skiller seg fra de to andre metodene for MP-størrelse.

ANOVA ble også benyttet for å avdekke eventuelle forskjeller i MP-antall mellom homogeniseringene. Prinsippet for ANOVA ble beskrevet ved analysen utført for MP-størrelse. Oppsummering av gruppene er gitt i Tabell 15, mens resultatene for ANOVA er gitt i Tabell 16.

*Tabell 15 - Oppsummering av grupper, MP-størrelse ved ulik opparbeiding*

<b>Gruppe oppsummering</b>				
Grupper	N	Sum	Gj.snitt	Varians
<b>Hom</b>	3	35823,8	11941,3	1548516
<b>CM</b>	3	38982,6	12994,2	1743510
<b>HomCM</b>	3	45398,8	15132,9	508608

*Tabell 16 - Ensidig ANOVA for variasjon innad og mellom grupper, for MP-antall fra mikroskop, der SS er summen av gruppenes kvadrater, df er antall frihetsgrader, MS er summen av kvadrater og F er den statistiske F-verdien*

<b>ANOVA</b>						
Kilde til variasjon	SS	df	MS	F	P-verdi	F kritisk
<b>Mellom grupper</b>	15869585	2	7934792	6,263263	0,033968	5,143253
<b>Innad i grupper</b>	14998,48	6	1266878			
<b>Total</b>	118901,2	8				

Det kan observeres at F verdien også her er større enn F kritisk. Nullhypotesen ble dermed forkastet, og det ble benyttet en Tukey post hoc test for å avdekke hvilken eller hvilke grupper som skiller seg signifikant ut. Resultat for post hoc test er vist i Tabell 17.

Tabell 17 - p-verdier for Tukey post hoc test for MP-antall

<b>Tukey Post-Hoc Test – MP-antall</b>		
	<b>HomCM</b>	<b>Hom</b>
<b>CM</b>	0,1272583	0,5238084
<b>HomCM</b>	-	0,0306667

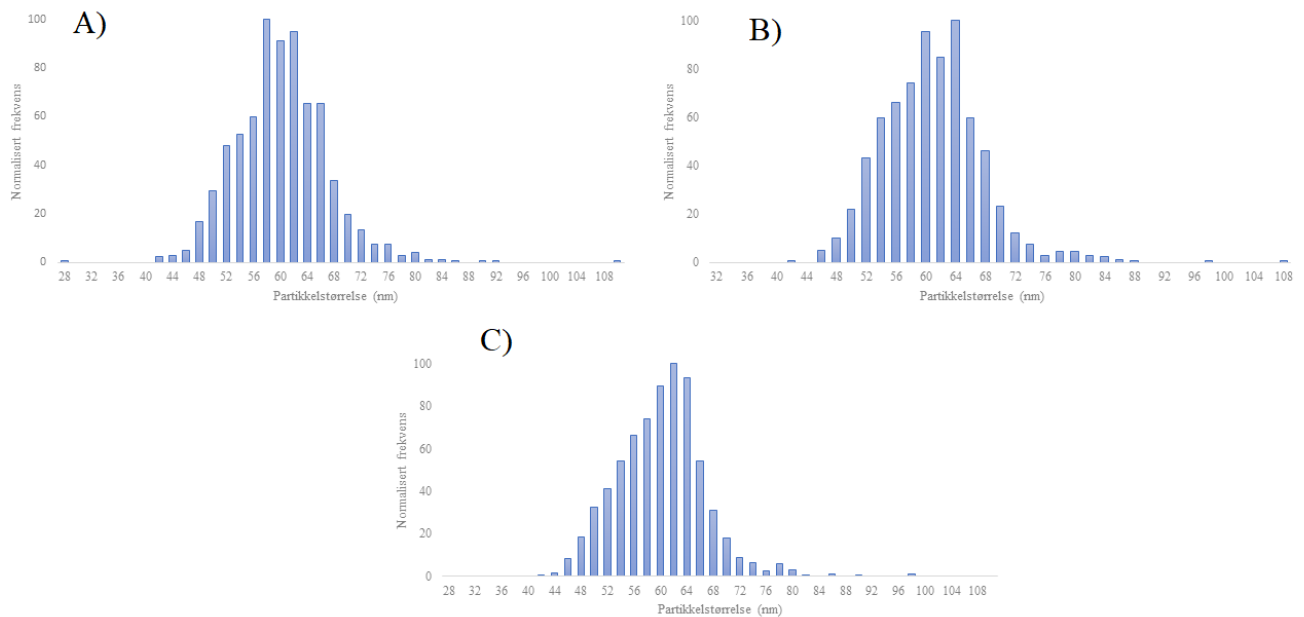
Sammenligning av Hom og HomCM ga en p-verdi på 0,03, som er lavere enn den signifikante grensen på 0,05. Det kan dermed antas at disse skiller seg signifikant fra hverandre. I tillegg til å avvike fra CM og HomCM opparbeidingene viste Figur 21 og Figur 22 at Hom hadde både størst og færrest MPer. For å få en mest mulig homogen prøveløsning kan det dermed konkluderes med at kryomølle gir en bedre oppløsning av blåskjellprøver enn kun homogenisering med kjøkkenblender.

HomCM og CM skiller seg ikke fra hverandre i en betydelig grad, og for fremtidige opparbeidinger kan det lønne seg å kun bruke CM. Ved bruk av to homogeniseringsmetoder krever opparbeidingen mer tid, i tillegg til at faren for kontaminering øker.



#### 4.2.2. Bestemmelse av Au 60 nm nanopartikler

Spike med Au 60 nm NPer ble tilsatt blåskjellprøver med ulik homogenisering, og Figur 23 viser fordelingen av Au 60 nm NPer for blåskjell opparbeidet etter metode Hom, CM og HomCM. Visuelt ser det ut som HomCM har de mest normalfordelte Au-NPene, mens Hom og CM har noe større spredning rundt 60 nm. Alle tre metodene har høy frekvens av NPer rundt 60 nm, som stemmer overens med oppgitt størrelse på NPene i referansematerialet fra NanoComposix.



Figur 23 - Normalisert frekvens for NP-størrelse av Au 60 nm NPer i blåskjellprøver opparbeidet med A) Homogenisering (Hom), B) kryomølle (CM) og C) Homogenisering + kryomølle (HomCM)

RMSize ble benyttet til kalibrering i MassHunter programvaren. Som vist i Figur 23 var størrelsesfordelingen av Au 60 nm NPene innenfor det forventede intervallet med hoveddelen av NPene rundt 60 nm. Tabell 18 viser resultatene for gjennomsnitt, største og minste verdi og RSD for NP-antall og medianstørrelse for de ulike opparbeidingene Hom, CM og HomCM. Det ble analysert tre paralleller av hver opparbeiding. Prøvene ble inkubert i 60 minutter på varmerist før videre fortynning og analyse på sp-ICP-MS.

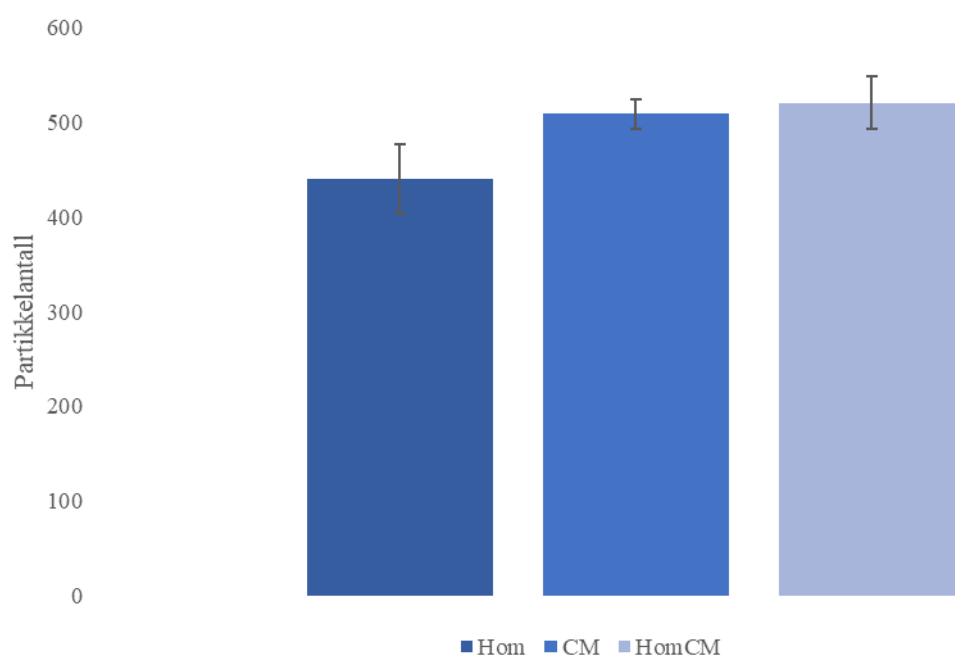
Tabell 18 - Gjennomsnitt, største-minste verdi og RSD (%) for NP-antall og medianstørrelse, Au 60 nm NPer for Hom, CM og HomCM opparbeidingene

	Paralleller	Parameter	Antall NPer	Median størrelse (nm)
<b>Hom</b>	3	Snitt	440	59
		Minst-størst	404-490	59-60
		RSD (%)	8,3	0,78
<b>CM</b>	3	Snitt	503	59
		Minst-størst	493-524	59-60
		RSD (%)	3,0	0,78
<b>HomCM</b>	3	Snitt	521	59
		Minst-størst	488-555	59-59
		RSD (%)	5,3	0*

\* Gjennomsnittlig NP størrelse for alle tre HomCM parallellene var 59 nm, og RSD blir dermed 0.

Det ble funnet høyest antall Au NPer for HomCM, og lavest antall for Hom. Gjennomsnittlig størrelse for Au NP var mellom 59 til 60 for alle opparbeidingene. Hom har størst RSD på 8,32%, men dette er fremdeles et relativt lavt nivå av variasjon. Dette tyder på at alle verdiene er fordelt nært gjennomsnittsverdiene, og det er dermed liten spredning mellom parallellene.

Figur 24 viser antall NPer for hver opparbeiding, med feilfelt gitt ved standardavvik. Antallet NPer er relativt likt mellom de to kryomøllede opparbeidingene CM og HomCM, og noe lavere for Hom. I kapittel 4.2.1 ble det konkludert med at Hom blåskjellprøvene var dårligere oppløst enn CM og HomCM. Det lavere antallet Au NPer i Hom-parallellene kan skyldes lavere homogenitet i prøveløsningen, hvor NPer kan feste seg til MP-partikler av blåskjell med for stor størrelse til å kunne passere gjennom sp-ICP-MS instrumentet, og dermed ikke bli detektert. Om NPer fester seg til større blåskjellpartikler kan disse også synke mot bunnen av beholderen, og dermed ikke bli analysert. Variasjon mellom homogeniseringene kan også skyldes unøyaktigheter i spiking, drift i instrumentet eller valg av størrelsesbestemmelsesgrense. Unøyaktigheter i spiking og fortykning er en sannsynlig feilkilde, da det benyttes lave konsentrasjoner og små volum som pipetteres.



Figur 24 - Antall Au 60 nm NPer for Hom, CM og HomCM opparbeidinger av blåskjell. Feilfelt angitt ved standardavvik for hver opparbeiding

For å undersøke eventuelle signifikante forskjeller for antall Au NPer i de ulike homogeniseringsmetodene ble det benyttet ANOVA for å sammenlikne resultatene. ANOVA ble utført ved bruk av Excels ANOVA funksjon. Tabell 19 viser en oppsummering av gruppens sum, gjennomsnitt og varians for Au NPer.

Tabell 19 - Gruppeoppsummering av ulike homogeniseringsmetoder. Gjennomsnitt, sum og varians for Au NP-antall

<b>Gruppe oppsummering</b>				
Grupper	N	Sum	Gj.snitt	Varians
<b>Hom</b>	3	1319	439,67	2010,33
<b>CM</b>	3	1510	503,33	320,33
<b>HomCM</b>	3	1562	520,67	1124,33

Tabell 20 viser den ensidige ANOVA variansanalysen for Au NPer.

Tabell 20 - Ensidig ANOVA for variasjon innad og mellom grupper for antall TiO<sub>2</sub> NPer

ANOVA						
Kilde til variasjon	SS	df	MS	F	P-verdi	F kritisk
Mellom grupper	10914,89	2	5457,4	4,74	0,058258	5,143253
Innad i grupper	6910	6	1151,7			
Total	17824,89	8				

I dette tilfellet er F kritisk større enn F-verdien, og nullhypotesen er gjeldende. Det er likevel liten forskjell mellom F kritisk og F-verdien, og p-verdien er så vidt over det signifikante nivået på 0,05. Visuelt i Figur 24 kan det se ut til at antallet NPer i Hom er lavere enn for CM og HomCM, og det antakeligvis disse prøvene som gir en lav p-verdi selv om det ikke kan konkluderes med en signifikant forskjell.

### 4.2.3. Bestemmelse av TiO<sub>2</sub> nanopartikler

Tabell 21 viser resultatene for TiO<sub>2</sub> NPer i blåskjellprøver med ulik homogenisering. NPene er hentet fra Mathias Simonsens masterprosjekt, hvor NPene ble raffinert i to omganger i ultralydbad. Disse NPene ble bestemt til en gjennomsnittsstørrelse på 75-80 nm et par måneder før de ble benyttet i dette prosjektet (Simonsen, 2022).

*Tabell 21 - Resultat for titan-NPer (TiO<sub>2</sub>) i blåskjellprøver med ulik homogenisering. Tabell inneholder NP antall, størrelse, konsentrasjon, standardavvik og RSD (%) for hver enkelt opparbeidingsmetode*

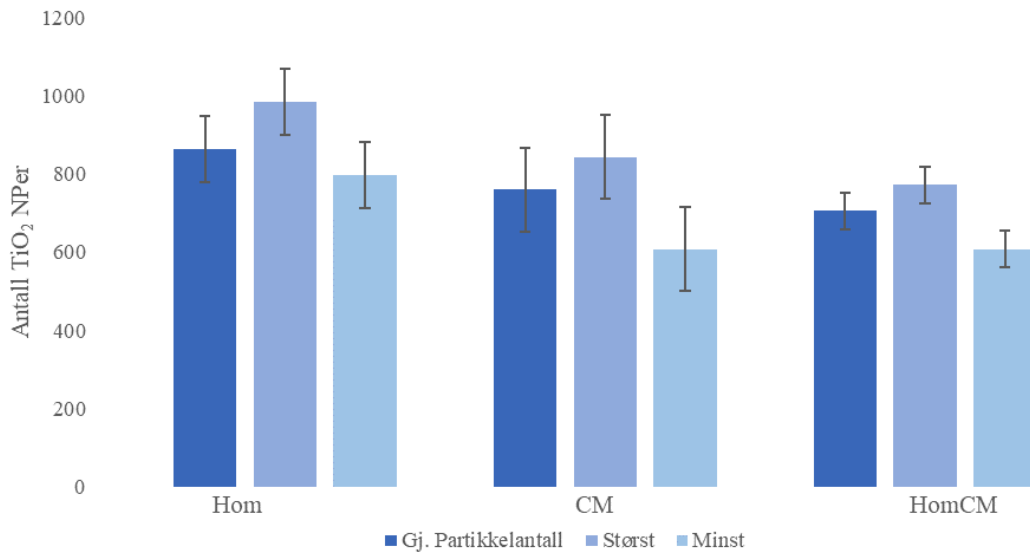
	Paralleller	Parameter	Antall NPer	Median størrelse (nm)	Partikkelkonsentrasjon (Partikler/L)
<b>Hom</b>	3	Snitt	864	61	2,47*10 <sup>7</sup>
		Minst-størst	796-983	61-63	(2,80-2,30) *10 <sup>7</sup>
		Standardavvik	84,2	0,94	
		RSD (%)	9,75	1,54	-
<b>CM</b>	3	Snitt	760	61	2,20*10 <sup>7</sup>
		Minst-størst	608-843	61-62	(2,40-1,80) *10 <sup>7</sup>
		Standardavvik	107,6	0,47	
		RSD (%)	14,16	0,76	-
<b>HomCM</b>	3	Snitt	705	60	2,00*10 <sup>7</sup>
		Størst-minst	671-772	60-61	(2,20-1,90) *10 <sup>7</sup>
		Standardavvik	47,4	0,47	
		RSD (%)	6,72	0,78	-

I Tabell 21 ble gjennomsnittsstørrelsen beregnet til mellom 60-64 nm for de ulike opparbeidingene. Sammen med TiO<sub>2</sub> NPene i Mathias Simonsens prosjekt ble det også sonikert NPer av CeO<sub>2</sub>, som ble analysert over tid for å undersøke variasjon i NP-størrelse. Det ble dokumentert at disse NPenes gjennomsnitt og medianstørrelse ble redusert etter 45 dager, og dette kan observeres i Vedlegg 24 og Vedlegg 25. Det er dermed ikke usannsynlig at gjennomsnittsstørrelsen til TiO<sub>2</sub> NPene har blitt redusert i den tiden de har blitt oppbevart i kjøleskap. Det ble observert tilnærmet like gjennomsnittsstørrelser for TiO<sub>2</sub> NPer for alle opparbeidingsmetodene.

For TiO<sub>2</sub> ble det funnet en større variasjon mellom opparbeidingene for antall NPer. Det ble funnet flest TiO<sub>2</sub> NPer i Hom parallellene, med et gjennomsnitt på 864. CM hadde et gjennomsnittlig antall på 760 NPer, mens HomCM hadde færrest med 705. For HomCM var det liten spredning mellom parallellene, med lavest RSD på 6,72%.

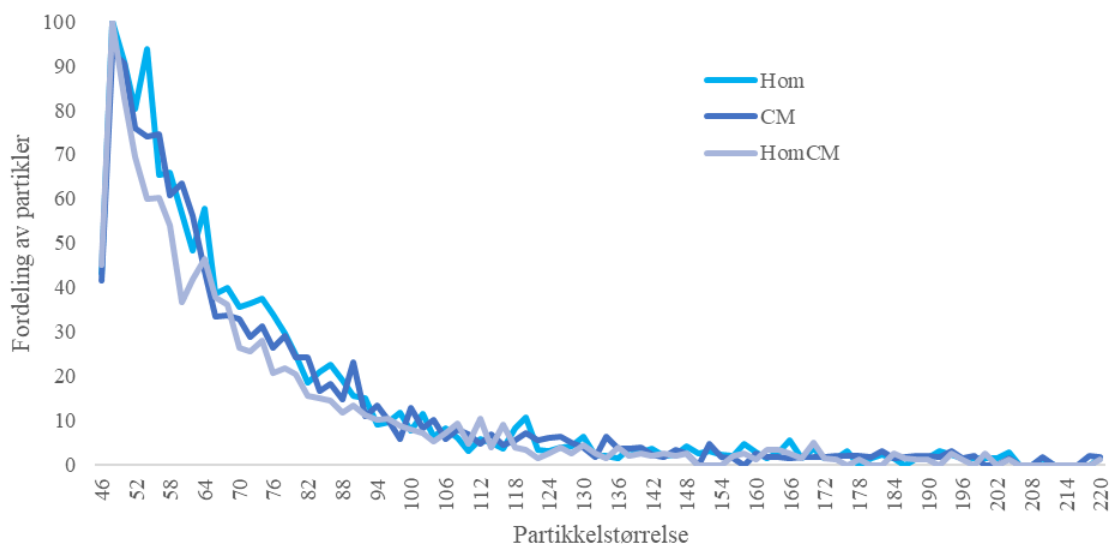
Hom hadde færrest Au NPer, men for TiO<sub>2</sub> NPer har de tydelig høyest gjennomsnitt av homogeniseringsmetodene. Dette kan skyldes flere faktorer, som unøyaktig spiking eller ujevn dispersjon av NPer i prøven, men det kan heller ikke utelukkes at homogeniseringsmetoden kan være en påvirkende faktor. Blåskjell kan ha et naturlig innhold av TiO<sub>2</sub> NPer, og disse kan potensielt bli ødelagt i kryomølle-prosessen. Om dette er tilfellet for TiO<sub>2</sub> NPer er usikkert, men det kan ikke utelukkes at de lave temperaturene og de sterke kreftene i kryomøllen kan ha en effekt på NPene. Det har blitt vist at kryomølle har ødelagt andre nanomaterialer, blant annet av aluminium (Zhu, Zhao, Wu, Wang, & Jiang, 2016). Det kan dermed potensielt føre til et lavere innhold av TiO<sub>2</sub> NPer i prøvene som er kryomølllet. Dette kunne ha blitt undersøkt ved å undersøke blåskjellprøver for hver homogenisering uten tilsetning av spike. Dette ble forsøkt gjort i en analyse, men grunnet feil i spikede prøver med referansemateriale måtte disse resultatene forkastes. Det kan dermed ikke konkluderes med om blåskjellprøvene hadde et ulikt naturlig innhold av TiO<sub>2</sub> NPer i dette prosjektet.

Figur 25 viser at HomCM har jevnest antall NPer, med lite variasjon mellom største og minste parallell. HomCM har også de minste feilfeltene, som betyr at verdiene er nærmere fordelt langs gjennomsnittet. Det var større avvik mellom største og minste parallell for Hom og CM prøvene.



Figur 25 - Største og minste parallell for NP-antall, samt gjennomsnittsantall for TiO<sub>2</sub> NPer for blåskjellprøver med ulik homogenisering. Feilfelt gitt ved standardavvik

Figur 26 viser fordelingen av TiO<sub>2</sub> NPer for alle homogeniserings-metodene. Hoveddelen av NPene befinner seg mellom 56-64 nm, som er lavere enn i figurene vist i Vedlegg 24 og Vedlegg 25, men dette er som nevnt forventet da NP-løsningen var oppbevart i kjøleskap over lengre tid.



Figur 26 - Sammenlikning av NP-størrelser for TiO<sub>2</sub> NPer opparbeidet med Hom, CM og HomCM

Figur 26 viser at det er vanskelig å skille størrelsesfordelingen for TiO<sub>2</sub> NPer mellom de ulike homogeniseringene. For å undersøke eventuelle signifikante forskjeller for NP-antall mellom de ulike opparbeidingene ble det benyttet ANOVA. ANOVA ble utført ved bruk av Excels ANOVA funksjon. Tabell 22 viser en oppsummering av gruppenes sum, gjennomsnitt og varians for TiO<sub>2</sub> NPer.

*Tabell 22 - Gruppeoppsummering av ulike homogeniseringsmetoder. Gjennomsnitt, sum og varians for TiO<sub>2</sub> NP-antall*

<b>Gruppe oppsummering</b>				
Grupper	N	Sum	Gj.snitt	Varians
<b>Hom</b>	3	2593	760	17377
<b>CM</b>	3	2280	864	10624,33
<b>HomCM</b>	3	2115	705	3367

Tabell 23 viser den ensidige ANOVA variansanalysen for TiO<sub>2</sub> NPer.

*Tabell 23 - Ensidig ANOVA for variasjon innad og mellom grupper, for antall av TiO<sub>2</sub> NPer*

<b>ANOVA</b>						
Kilde til variasjon	SS	df	MS	F	P-verdi	F kritisk
<b>Mellom grupper</b>	39297,56	2	19648,78	1,878089	0,232603	5,143253
<b>Innad I grupper</b>	62772,67	6	10462,11			
<b>Total</b>	102070,2	8				

I dette tilfellet er F kritisk større enn F-verdien, og nullhypotesen er gjeldende. Det er dermed ingen signifikante forskjeller mellom gruppene for TiO<sub>2</sub> NPer.



#### 4.2.4. Oppsummering

En faktor som kan ha gitt ulike resultater for opparbeidingene er den varierende homogeniteten til blåskjellprøvene, som vist i Figur 19. Hom blåskjellprøvene kan gi et annet forhold i mengde blåskjell/væske enn for de kryomøllede parallellene CM og HomCM. Det ble funnet et lavere innhold av Au NPer og et høyere antall TiO<sub>2</sub> NPer i Hom prøvene. Det er flere faktorer som kan påvirke deteksjonen av NPer, dette kan være tilfeldige feil som drift i instrumentet eller feil i fortynning og pipettering, men også overføring av NPer fra en overføringseffekt. For å undersøke overføring av NPer ble det kjørt prøver med MQ-vann eller vaskeløsning mellom hver tredje blåskjell- eller blankprøve. Disse ble undersøkt for innhold av NPer, for å kontrollere at det ikke var overføring av NPer mellom prøvene. Det forventes at en prøve med MQ-vann ikke inneholder Au etter TiO<sub>2</sub> NPer, og et innhold av dette kunne tydet på en overføringseffekt. Det ble funnet mellom 0 og 23 NPer i parallellene av MQ-vann, som ikke vil gi betydelige utslag for resultatene. Det kan dermed med relativt stor sikkerhet utelukkes at overføring av NPer har påvirket sluttresultatene.

For å redusere påvirkningen fra drift i instrumentet ble det alltid passet på at de ioniske standardene ga et stabilt signal under oppstart av sp-ICP-MS analysen. Et stabilt signal kan observeres som en rett linje, som vist i Vedlegg 26. Dersom dette signalet hadde bøyd seg oppover eller nedover kunne dette ha skyldes drift, og det ville vært nødvendig å re-analysere de ioniske standardene inntil de ga et stabilt signal. Drift i instrumentet er ikke uvanlig, og det er vanskelig å avdekke eventuell drift for målinger av NPer. Signalene for NPer er ikke like tydelige som for ioniske standarder, og det er flere faktorer som kan gi variasjon i NP signaler. Det kan antas drift dersom paralleller av samme prøve gir stor variasjon i verdiene, men dette krever at man vet hva som er den sanne verdien for prøven.

I analyse av ukjente prøver vil det være vanskelig å påpeke drift, da man ikke nødvendigvis kjenner den forventede verdien. I dette prosjektet er det sammenlignet ulike opparbeidingstrinn ved ulik homogenisering og ulike enzym, og for forskjeller i NP deteksjon mellom disse opparbeidingstrinnene kan ikke drift utelukkes. En metode som kan benyttes for å undersøke drift er å kjøre mange paralleller av samme prøve for å undersøke samsvar for NP-innhold. I dette prosjektet så det ut til at målingene var innenfor forventede verdier for Au NPene, som har kjent størrelse og konsentrasjon i prøvene. Der NP-antallet var lavere enn forventet var dette gjennomgående for alle prøvene i analysen, som heller tyder på fortynningsfeil. Drift antas derfor ikke å være en betydelig feilkilde i dette prosjektet.

I tillegg til drift, overføring og forfynningsfeil er det flere feilkilder som kan påvirke resultatene fra analysene. En faktor kan være at NPene agglomererer og synker i prøven (Weigel, Peters, Loeschner, Grombe, & Linsinger, 2017), og NPer kan også i noen tilfeller absorberes til overflater (Bustos, Petersen, Possolo, & Winchester, 2015). Det kan tenkes at prøveløsninger med dårligere oppløste NPer av biologiske matriser kan øke risikoen for at NPer fester seg, og dermed ikke blir bestemt.

### 4.3. Blåskjell opparbeidet med ulike enzymer

Blåskjellprøvene i denne analysen ble opparbeidet ved inkubering på varmerist over natten, ved en temperatur på 50 °C og 290 rpm. Det ble benyttet proteinase enzymer fra Protamex og Proteinase K for sammenlikning.

#### 4.3.1. Kvantitativ undersøkelse ved bruk av filter

Det ble utført en sammenlikning av Protamex og Proteinase K for å undersøke om de ga ulik oppløsning av blåskjellprøver. Prøvene ble inkubert på varmerist over natten, og Protamex-prøvene ble tilsatt en 5% vekt/volum løsning i stedet for 20% som ble benyttet for 60 minutter inkubering av ulike opparbeidinger i kapittel 4.2. For alle parallellene ble det benyttet blåskjellprøver fra HomCM opparbeidningen, da denne opparbeidningen hadde gitt gode indikasjoner for god oppløsning ved undersøkelser på mikroskop, i tillegg til at kryomølle gjorde det lettere å veie inn våte blåskjellprøver. Som beskrevet i kapittel 4.2 var det høyere grad av homogenitet for de kryomøllede blåskjellene sammenliknet med blåskjellene opparbeidet med kjøkkenblender.

Tre paralleller av Protamex og Proteinase K ble filtrert gjennom filterpapir med en porestørrelse på 45 µm. Dette ble gjort for å undersøke oppløsning av blåskjellprøver for de to ulike enzymene, ved en mer kvantitativ metode enn mikroskop. Filterpapiret ble veid før blåskjellprøvene ble filtrert. Etter filtrering ble papirene satt til tørk i to dager, før de ble veid på nytt. Resultat for vekt før og etter filtrering samt innveid mengde blåskjell er gitt i Vedlegg 20 for alle paralleller. Forholdet mellom vekt før og etter filtrering angir hvor mye blåskjell som var igjen i filteret.

Tabell 24 viser gjennomsnittsverdiene for Protamex og Proteinase K, for vekt av opprinnelig mengde blåskjell og ufiltrert blåskjell, sammen med vekt av filterpapir før og etter filtrering.

*Tabell 24 – Gjennomsnittsverdier av filtrerte blåskjellprøver med Protamex og Proteinase K*

	<b>Protamex</b>	<b>Proteinase K</b>
<b>Vekt filter</b>	1,4784	1,4513
<b>Vekt etter filtrering</b>	1,5803	1,5102
<b>Blåskjell i opprinnelig prøve (g)</b>	0,5005	0,5004
<b>Ufiltrert blåskjell (g):</b>	0,1019	0,0589

Tabell 24 viser at det var et gjennomsnitt på 0,1019 g ufiltrert blåskjell i Protamex-prøvene, mens det var 0,0589 g ufiltrert blåskjell i Proteinase K prøvene.

Den høyere vekten i Protamex-parallellene kan tyde på at en større mengde MPer ikke ble filtrert, som indikerer at en større andel av MPene var større enn 45 µm. For å undersøke om dette kunne skyldes rester av enzym i filteret, ble det filtrert blankprøver av enzym tilsatt MQ-vann i stedet for blåskjell. Disse blankprøvene ble inkubert sammen med blåskjellprøvene, for å gi en lik opparbeiding før filtrering. Det ble filtrert to paralleller av hvert enzym, der resultatene er vist i tabell i Vedlegg 21. Gjennomsnittsverdiene for filtreringen er vist i Tabell 25.

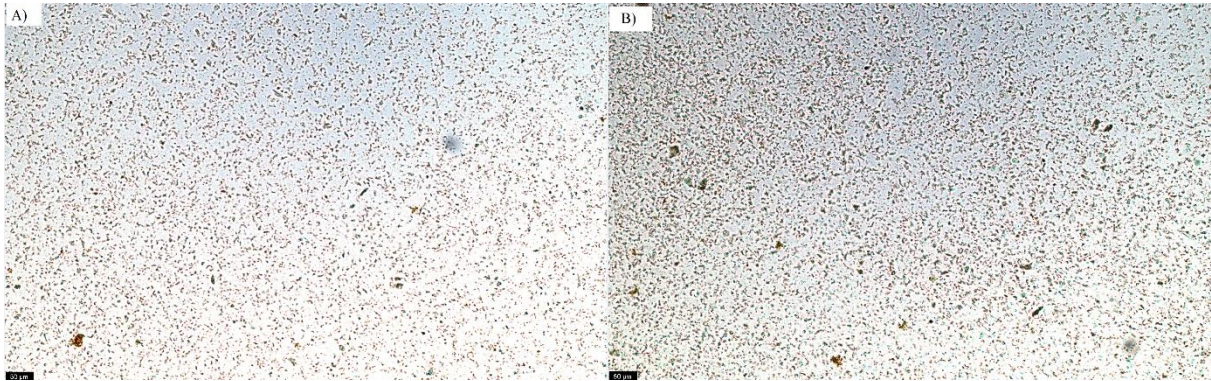
*Tabell 25 - Filtrering av blankprøver tilsatt Protamex og Proteinase K*

<b>Parallell</b>	<b>Vekt filter</b>	<b>Vekt etter filtrering</b>	<b>Ufiltrert enzym i filter</b>
Protamex	1,4656	1,535	0,0696
Proteinase K	1,4962	1,506	0,0097

Tabell 25 viser at det ble funnet en større mengde ufiltrert enzym i Protamex-prøvene, der det var 0,0696 g ufiltrert enzym, mens det kun var 0,0097 g for Proteinase K parallellene. Det så dermed ut som at rester av enzym ga det største utslaget for variasjon i prøvemengde i filteret. Størrelsen for blåskjellbestanddelene kan dermed antas å ha vært relativt lik for de to opparbeidingene.

#### 4.3.2. Visuell undersøkelse ved bruk av mikroskop

Blåskjellprøvene ble undersøkt med mikroskop, etter samme beskrivelse som for blåskjellene med ulik homogenisering. Figur 27 viser en parallell av blåskjell opparbeidet med A) Protamex, og B) Proteinase K.



*Figur 27 - Mikroskopbilde av blåskjellprøver opparbeidet med ulikt enzym. A) Protamex og B) Proteinase K*

Det er vanskelig å kunne si med sikkerhet om det er forskjell på de to opparbeidingene kun ved å se på bildene i mikroskop. Dette kapittelet tar for seg størrelsesfordeling og MP-antall for blåskjell undersøkt visuelt, på samme måte som for blåskjellprøvene med ulik opparbeiding i kapittel 4.2.1. Det ble tatt tre bilder av tre paralleller for hvert enzym, som ble undersøkt i mikroskop. Dataene fra disse mikroskopbildene ble benyttet i dette kapittelet for å avgjøre om de to enzymene skiller seg fra hverandre. I Tabell 26 er MP-antall og medianstørrelse listet for blåskjellmatriks undersøkt i mikroskop, med tilhørende standardavvik og RSD.

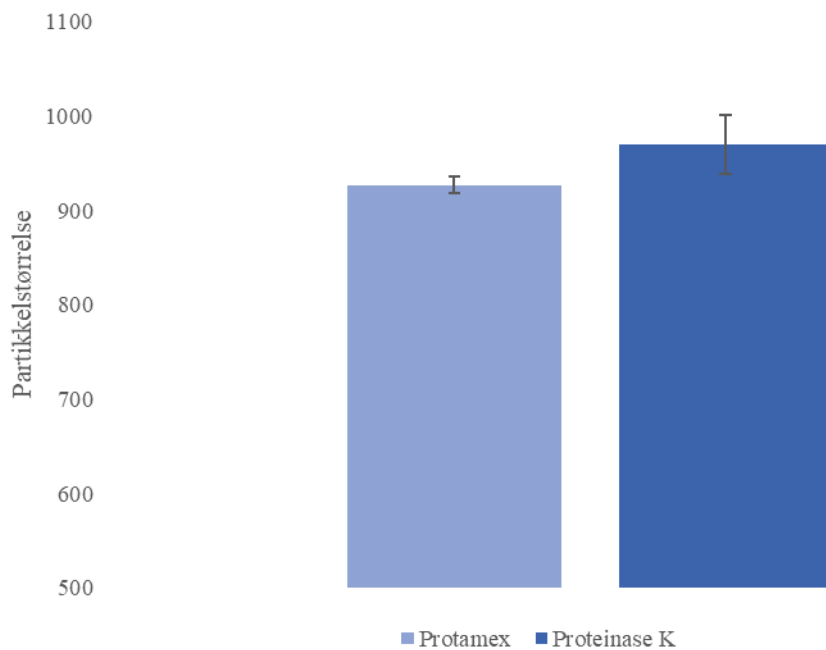
Tabell 26 - Medianstørrelse og partikkelantall med SD og RSD (%) for paralleller av mikroskopbilder av Protamex og Proteinase K

	Protamex		Proteinase K	
	Gjennomsnitt- størrelse	MP-antall	Gjennomsnitt- størrelse	MP-antall
<b>Gjennomsnitt</b>	927	36769	970	56163
<b>SD</b>	9,0	7170	31,4	12165
<b>RSD (%)</b>	0,97	19,5	3,2	21,7

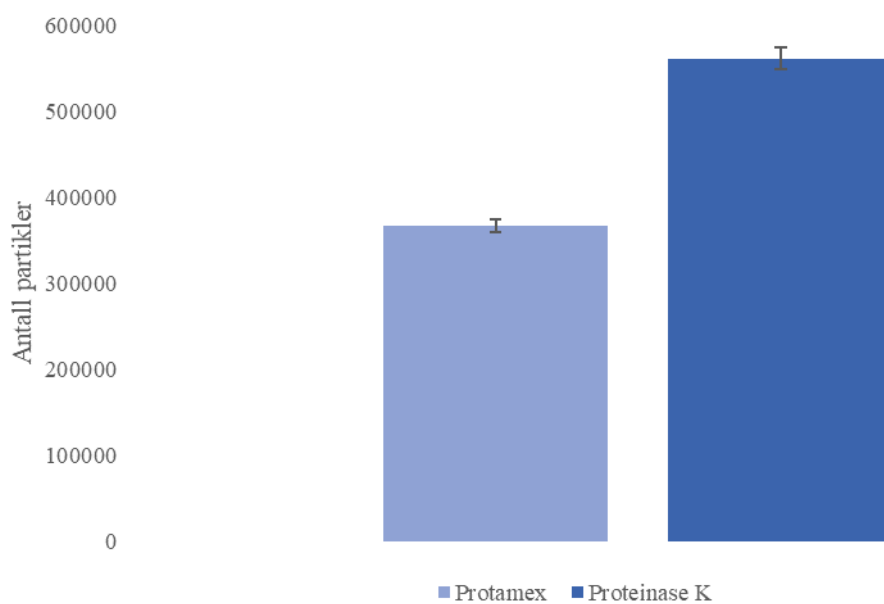
Tabell 26 viser medianstørrelse og MP-antall for de to opparbeidingene. Det ble funnet et langt høyere antall MPer for Proteinase K, hvor MPene også var noe større enn for Protamex. Forskjellen i partikkelstørrelse er liten, og RSD er lav for MP-antall for begge enzymene, med 0,97% for Protamex og 3,2% for Proteinase K.

RSD for MP-antall er høyt for begge enzymene, med 19,5% for Protamex og 21,7% for Proteinase K. Det er dermed ganske stor variasjon mellom parallellene for hver opparbeiding. Det er flere faktorer som kan gi variasjon i MP-antall, blant annet lysforhold i mikroskopet, forholdet mellom MPer og vann i dråpen på mikroskopglasset, og tetthet av blåskjell-MPer på området som ble fotografert.

Figur 28 viser gjennomsnittlig partikkelstørrelse med standardavvik gitt som feilfelt for hver opparbeiding, mens Figur 29 viser totalt antall MPer for Protamex og Proteinase K. Feilfelt er gitt ved standardavvik for hvert enzym.



*Figur 28 - Gjennomsnittlig MP-størrelse for Protamex og Proteinase K, med feilfelt gitt ved standardavvik for hver opparbeiding*

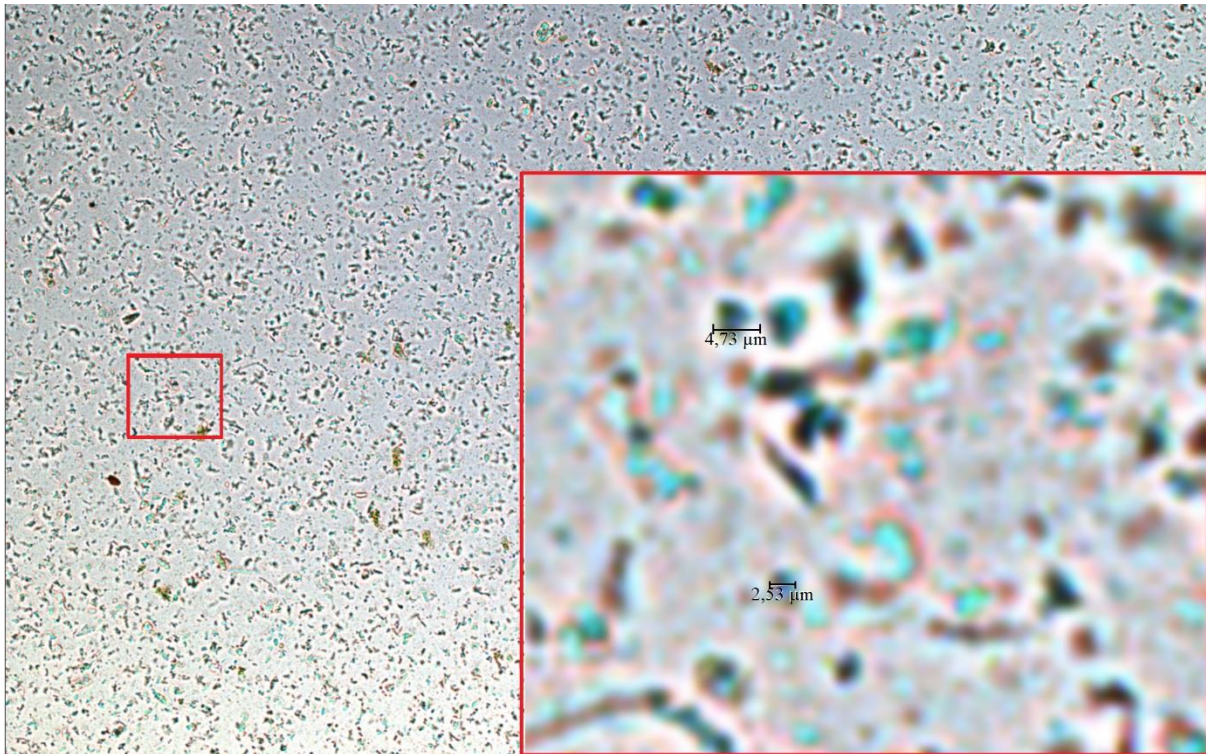


*Figur 29 - Fordeling av totalt antall MPer for Proteinase K og protamex. Feilfelt gitt ved standardavvik*

For størrelse og antall av bestanddeler av blåskjell er feilfeltene langt mindre enn for de ulike homogeniseringene. Dette kan skyldes at den økte inkubasjonstiden over natten i stedet for 60 minutter gir en enda bedre oppløsning av blåskjellene, og at forskjellene dermed minker. Antallet bestanddeler for både Protamex og Proteinase K er langt høyere enn for de ulike opparbeidingene i kapittel 4.2, der HomCM hadde høyest gjennomsnitt på 15.232. HomCM ble også benyttet i dette kapittelet for alle prøver, og det kan tyde på at den beste oppløsningen av blåskjell er gjort ved å benytte Proteinase K og HomCM, der prøvene inkuberes på varmerist over natten.

En sammenlikning mellom Tabell 11 for ulik homogenisering og Tabell 26 for ulikt enzym viser at det var små forskjeller mellom gjennomsnittlig MP-størrelse for CM og HomCM og prøvene som ble inkubert over natten. Det ble funnet en gjennomsnittlig størrelse på 915 for CM og 978 for HomCM, sammenliknet med 927 for Protamex og 970 for Proteinase K. En mulig årsak til dette er begrensninger i enten mikroskop eller ImageJ, der det kan være partikler med en størrelse mindre enn det som kan detekteres med metoden som benyttes i dette prosjektet.

For å undersøke faktisk partikkelstørrelse av MPene i mikroskop ble programvaren Leica LAS X benyttet til å måle størrelser. Det kunne observeres tydelige partikler ned til 2,5  $\mu\text{m}$ , mens partikler mindre enn dette kan oppfattes som støy. Partikler på 4,73  $\mu\text{m}$  og 2,53  $\mu\text{m}$  er vist i Figur 30. Det kan dermed være små MPer som ikke blir bestemt ved telling av partikler i ImageJ.



Figur 30 - Observerte størrelser av blåskjellpartikler i mikroskop

### Statistiske beregninger

Det ble utført en t-test for å undersøke om det var signifikante forskjeller mellom MP-størrelsene. En høy t-verdi vil bety at det er liten sannsynlighet for at det er tilfeldige forskjeller mellom prøvene. Testen gir også en p-verdi, og dersom sammenlikningen gir en p-verdi lavere enn den signifikante  $\alpha$ -verdien på 0,05 forkastes nullhypotesen. Resultater for t-test er gitt i Tabell 27.

Tabell 27 - Tosidig t-test for MP-størrelse av Protamex vs Proteinase K

<b>Protamex vs proteinase K</b>	
<b>t-verdi</b>	5,7657
<b>p-verdi</b>	0,01731

T-verdien på 5,7657 tyder på at det er forskjeller mellom enzymene, og at disse forskjellene ikke skyldes tilfeldige feil. P-verdien er også lavere enn den signifikante  $\alpha$ -verdien på 0,05, som betyr at det er signifikante forskjeller mellom MP-størrelsene. Denne forskjellen er større enn



hva som ble antatt fra Figur 28, der det var små standardavvik og visuelt liten forskjell mellom størrelsen på bestanddelene.

Det ble også utført en t-test for å undersøke om det var signifikante forskjeller for MP-antall mellom de to enzymene. Tabell 28 vider tosidig t-test for MP-antall for parallellene av Protamex og Proteinase K.

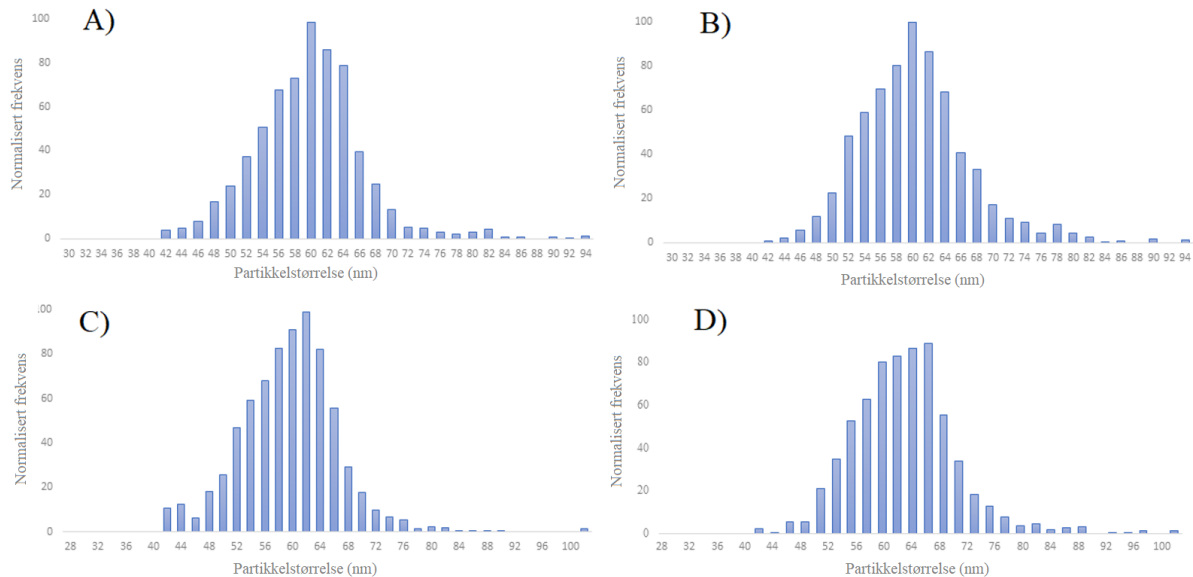
*Tabell 28 - Tosidig t-test for MP-antall for Protamex og Proteinase K*

<b>Protamex vs proteinase K</b>	
<b>t-verdi</b>	4,0945
<b>p-verdi</b>	0,03387

T-verdien ble beregnet til 4,0945, og p-verdien 0,03387. Begge disse resultatene indikerer at det er signifikante forskjeller mellom enzymene for MP-antall. Dette stemmer overens med observasjonene fra Figur 29.

### 4.3.3. Bestemmelse av Au 60 nm nanopartikler

Figur 31 viser fordelingen av Au 60 NPer fra referansematerialet, for Protamex og Proteinase K, samt deres respektive blankprøver med MQ-vann i stedet for blåskjell.



Figur 31 - Normalisert frekvens for NP-størrelse av Au 60 nm NPer i A) blåskjellprøve oppløst med Protamex-enzym, B) metodeblankprøve (MQ-vann) tilsatt Protamex-enzym, C) blåskjellprøver oppløst med Proteinase K enzym, D) blankprøve (MQ-vann) tilsatt Proteinase K enzym

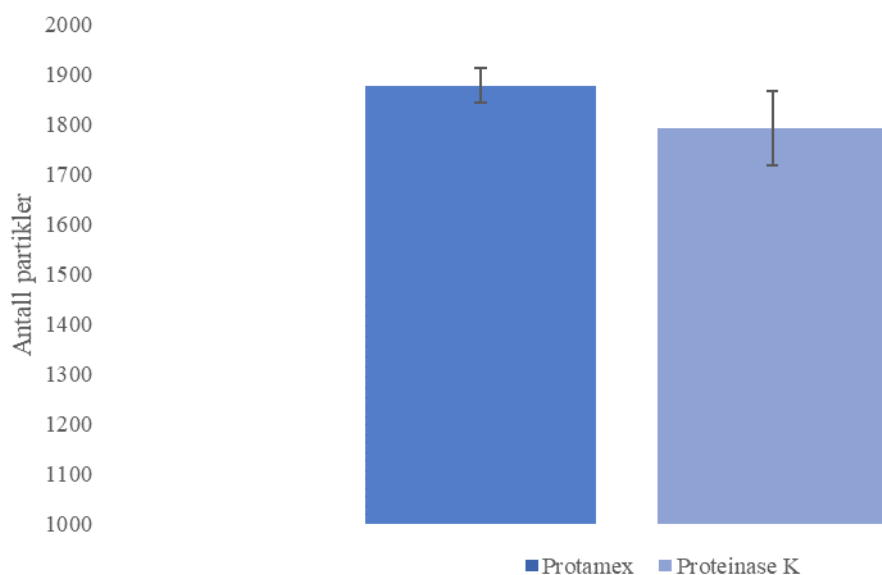
Figurene viser relativt normalfordelte Au NPer, hvor 60 nm er den mest frekventerte størrelsen for alle opparbeidingene med unntak av blankprøven for Proteinase K, der den NP-størrelsen med høyest frekvens var 66 nm. Det ble funnet NPer opp til ca 100 nm for alle parallellene over. Som tidligere nevnt ble størrelsesbestemmelsesgrensen i programvaren satt som en nedre grense i stedet for et intervall. Ved å sette et intervall for størrelsesbestemmelsesgrensen kunne NPer langt over forventet grense blitt eliminert. Dersom det hadde blitt benyttet et intervall hadde det vært aktuelt å sette grensen rundt 80 nm, der antallet NPer er veldig lavt. Hovedfordelingen av NPer er innenfor forventet intervall, og antallet NPer over 70 nm er lavt. Dersom det detekteres enkeltpartikler med stor størrelse eller masse kan dette påvirke bestemmelsen av NPer i prøvene.

Resultater for NP-antall, medianstørrelse og partikkelkonsentrasjon (partikler/L) for Au 60 NPer i blåskjellprøver med ulikt enzym er vist i Tabell 29.

*Tabell 29 – NP-antall, medianstørrelse (nm) og partikkelkonsentrasjon (partikler/L) for 60 nm Au NPer opparbeidet i blåskjellprøver med Protamex og Proteinase K. Tabell inneholder gjennomsnitt, intervall mellom størst-minst parallell og RSD (%)*

	Paralleller	Parameter	Antall NPer	Median størrelse (nm)	Partikkelkonsentrasjon (Partikler/L)
<b>Protamex</b>	3	Snitt	626	59	$2,07 \cdot 10^7$
		Minst-størst	577-654	59-59	$(1,9-2,2) \cdot 10^7$
		RSD (%)	5,5	0	6,03
<b>Proteinase K</b>	3	Snitt	597	59	$1,97 \cdot 10^7$
		Minst-størst	543-704	58-60	$(1,8-2,3) \cdot 10^7$
		RSD (%)	12,6	1,38	12

Ut ifra Tabell 29 ser det ut til at det er liten forskjell mellom de to opparbeidingene. Det er noe større spredning i NP-antall for Proteinase K, hvor antallet NPer varierte mellom 543 og 704, med RSD på 12,7. Resultatene for Protamex er jevnere med 577 til 654 NPer og RSD 5,52. Antallet NPer er høyere enn for de ulike homogeniseringene i kapittel 4.2.2. NP-størrelsene er innenfor forventet område, med en medianstørrelse på mellom 58-60 nm. Figur 32 viser det totale antallet Au NPer for hvert enzym, der feilfelt er gitt ved standardavvik. Differansen mellom enzymene er lite, og det er sannsynlig at forskjellen i NPer kan skyldes tilfeldige feil.



*Figur 32 - Totalt antall Au NPer blåskjellprøver opparbeidet med Protamex og Proteinase K. Feilfelt er gitt ved standardavvik for hvert enzym.*

Det ble utført en t-test for å undersøke om det var signifikante forskjeller i antall Au NPer i prøvene opparbeidet med ulike enzymer. Resultater for t-test er gitt i Tabell 30.

*Tabell 30 - Tosidig t-test for antall Au NPer for Protamex vs Proteinase K*

<b>Protamex vs proteinase K</b>	
<b>t-verdi</b>	0,48292
<b>p-verdi</b>	0,6643

Her ble det funnet en t-verdi på 0,48292 og en p-verdi på 0,66. P-verdien sier at det er omtrent 66% sjans for variasjonen mellom parallellene kan skyldes tilfeldige forskjeller, dersom nullhypotesen er sann. Det er dermed en stor sannsynlighet for at det kan være tilfeldige forskjeller mellom antallet NPer i prøver opparbeidet med de ulike enzymene.

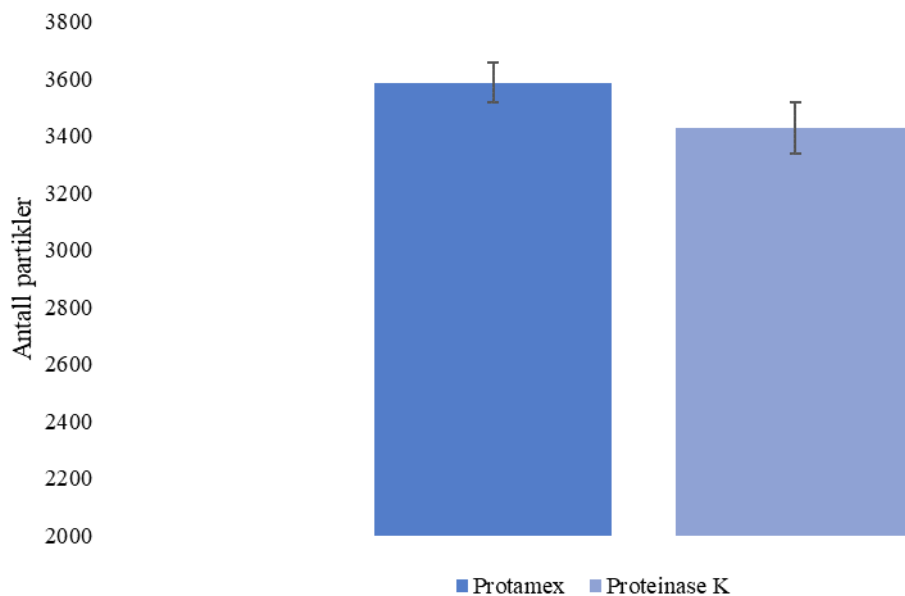
#### 4.3.4. Bestemmelse av TiO<sub>2</sub> nanopartikler

Tabell 31 viser resultatene for TiO<sub>2</sub> NPer i blåskjell oppløst med ulike enzym. Som for blåskjellene med ulik homogenisering i kapittel 4.2.2 er NPene hentet fra Mathias Simonsens masterprosjekt, hvor NPene ble raffinert i to omganger i ultralydbad.

*Tabell 31 – NP-antall, medianstørrelse (nm) og partikkelkonsentrasjon (partikler/L) for TiO<sub>2</sub> NPer opparbeidet i blåskjellprøver med Protamex og Proteinase K. Tabell inneholder gjennomsnitt, intervall mellom størst-minst parallell og RSD (%)*

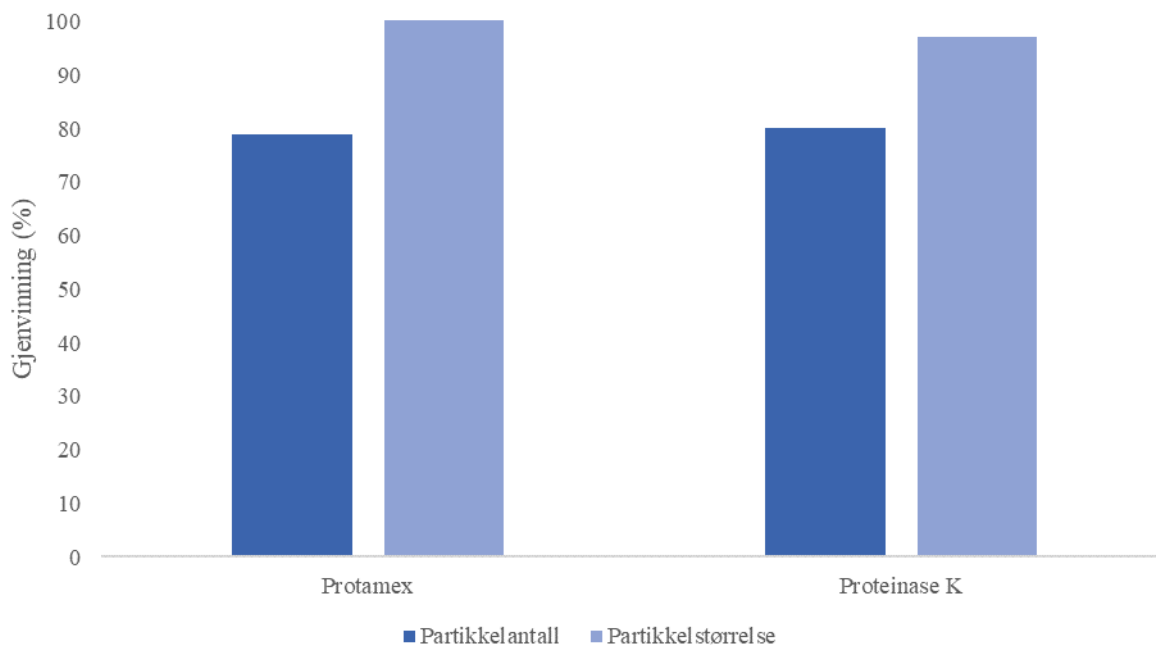
	<b>Paralleller</b>	<b>Parameter</b>	<b>Antall NPer</b>	<b>Median størrelse (nm)</b>	<b>Partikkelkonsentrasjon (Partikler/L)</b>
<b>Protamex</b>	3	Snitt	1142	62	3,77*10 <sup>7</sup>
		Minst-størst	1030-1246	62-64	(4,1-3,4)*10 <sup>7</sup>
		RSD (%)	7,7	2,63	7,6
		Gjenvinning (%)	78,6	101,6	-
<b>Proteinase K</b>	3	Snitt	1195	62	3,50*10 <sup>7</sup>
		Minst-størst	1101-1271	61-64	(4-3,2)*10 <sup>7</sup>
		RSD (%)	5,9	2,3	10,2
		Gjenvinning (%)	79,5	96,9	-

Figur 33 viser at det ble funnet et noe høyere totalantall TiO<sub>2</sub> NPer i Proteinase K prøvene. Dette kan eksempelvis være unøyaktighet i spiking av prøvene, eller ujevn fordeling av NPer i prøveløsningen. Her ble NPene bestemt til en median størrelse på 61-64 nm, og er lite variasjon mellom de to enzymene.



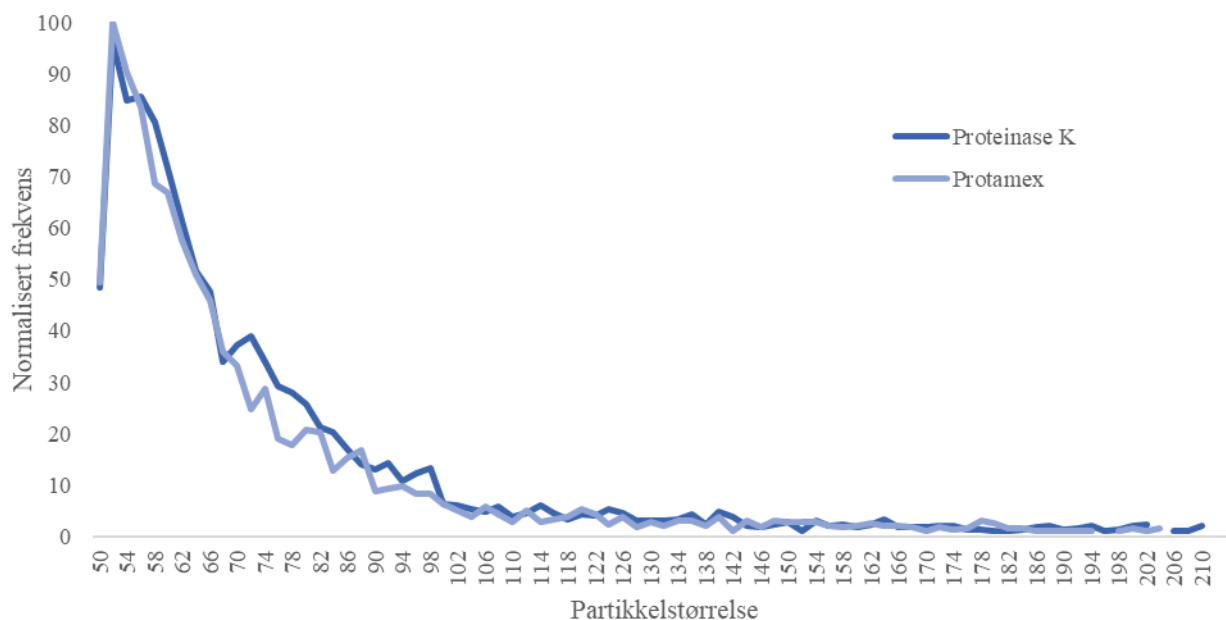
Figur 33 - Totalt antall TiO<sub>2</sub> NPer blåskjellprøver opparbeidet med Protamex og Proteinase K. Feilfelt gitt ved standardavvik

Det er stor likhet i gjenvinning for de to enzymene, dette kan observeres i Figur 34, der gjenvinning av NP-antall og størrelse er sammenliknet for Protamex og Proteinase K.



Figur 34 - Gjenvinning av NP-størrelse og antall for TiO<sub>2</sub> NPer i blåskjellprøver oppløst med Protamex og Proteinase K

Figur 35 viser at NP-størrelsene for de to enzymene følger hverandre, og det er liten variasjon også her mellom opparbeidingene.



Figur 35 - Normalisert frekvens for NP-størrelse, TiO<sub>2</sub> NPer i blåskjellprøver oppløst med Protamex og Proteinase K

Det ble utført en t-test for å undersøke eventuelle signifikante forskjeller mellom de to enzymene. Resultater er vist i Tabell 32.

Tabell 32 - t-test for antall TiO<sub>2</sub> NPer i blåskjellprøver opparbeidet med Protamex og Proteinase K

<b>Protamex vs proteinase K</b>	
<b>t-verdi</b>	0,66239
<b>p-verdi</b>	0,5456

P-verdien viser at det er 55% sannsynlighet for at forskjellen mellom enzymene skyldes tilfeldige feil, dersom nullhypotesen er sann. Det kan dermed ikke konkluderes med om variasjonen mellom enzymene skyldes tilfeldige feil.

#### 4.3.5. Oppsummering

Enzymatisk opparbeiding med proteinaser er mer skånsomt enn ved bruk av syre, som kan løse opp NPene. For ekstrahering av NPer det hensiktsmessig å benytte en metode som gir høy gjenvinning. Hensikten er detektare NPene i deres opprinnelige form, der masse og størrelse til NPene ikke endres i opparbeidingen. Protamex og Proteinase K ble sammenliknet for å undersøke om disse ville gi ulik oppløsning av blåskjellmatriksen.

Som beskrevet i kapittel 4.3.1 ble det benyttet blåskjell opparbeidet etter HomCM metoden for sammenlikninger av enzymer. Det ble i tillegg benyttet en lengre inkubasjonstid, da denne ble økt fra 60 minutter til over natten. Fra mikroskopbildene ble størrelsen til MP partiklene beregnet til 927 for Protamex-prøvene og 970 for Proteinase K. For HomCM parallellene i kapittel 4.2 ble MP-størrelsen beregnet til 978. Det ser dermed ikke ut til at økt inkubasjonstid ytterligere reduserte gjennomsnittsstørrelsen til MPene.

Selv om den gjennomsnittlige størrelsen for MPene var relativt lik uavhengig av inkubasjonstid, ble det funnet et langt høyere antall MPer i prøvene inkubert over natten. For Protamex-prøvene ble funnet et gjennomsnitt på 36769 MPer, og for Proteinase K ble det funnet et gjennomsnitt på 56163 MPer. Sammenliknet med prøvene inkubert i 60 minutter ble det funnet 15132 MPer for HomCM. Det kan ha vært flere store partikler i prøvene homogenisert i 60 minutter, da det kun pipetteres en dråpe fra hver prøvebeholder til hvert mikroskopglass kan det være vanskelig å danne et fullstendig bilde av homogeniteten i prøven. Dette kan tyde på at det er en jevnere oppløsning i prøvene med flere partikler, men det er mange faktorer som kan påvirke antall målte MPer. Det kan være variasjoner i lysforhold, eller i forholdet mellom væske og MPer i dråpen som pipetteres. MP-størrelse er derfor å anse som en mer stabil faktor enn antall, da det er 10 bilder som danner grunnlag for MP-antall, men mange tusen målinger som danner grunnlag for gjennomsnittlig MP-størrelse fra disse bildene.

Filtreringen viste også at det var liten forskjell i MP-størrelsene for Protamex og Proteinase K, da gjenværende vekt i filteret med vekten av enzym trukket fra var tilnærmet lik. Det ser dermed ut til å være liten forskjell for oppløsningen basert på hvilket enzym man velger, og at homogeniseringsmetode spiller en større rolle for prøveoppbeidingen. En liten utfordring med Proteinase K opparbeidingen var tilsetningen av SDS. Som nevnt i kapittel 2.3.2 gir SDS en økt enzymatisk aktivitet til Proteinase K. Tilsetningen av dette stoffet gir et såpe-skum liknende lag øverst i prøvene, som gjorde det vanskelig å pipettere ut prøveløsning under



fortynningen. Et bilde av dette såpelaget er vist for blåskjellprøve i Vedlegg 10 og for en blankprøve i Vedlegg 11.

Vedlegg 9 viser paralleller av blåskjellprøver opparbeidet med Protamex og Proteinase K. Begge opparbeidingene gir en løsning som er noe grumsete i fargen. Dette kan være ufordøyde fettpartikler som ikke løser seg opp ved kun tilsetning av proteinaser. Blåskjell inneholder små mengder fett, og om NPer festes til disse fettcellene kan de gå tapt i analysen. Som tidligere nevnt har det blitt funnet at NPer kan feste seg til overflater (Bustos, Petersen, Possolo, & Winchester, 2015). Her kunne det blitt undersøkt om tilsetning av lipase ville hatt en innvirkning på ekstraksjonen av NPer.

For Au NPer var det liten forskjell mellom de to enzymene, der det ble funnet et gjennomsnitt på 625 NPer i Protamex-prøvene og 597 NPer i Proteinase K-prøvene. For TiO<sub>2</sub> ble det funnet 1142 NPer i Protamex og 1195 i Proteinase K. Selv om det statistisk sett ble funnet en signifikant forskjell for antall NPer for de to enzymene, er denne forskjellen relativt liten. Det kan tenkes at dersom MPene har en mindre størrelse vil dette gi en mer stabil prøveløsning, som gir en bedre gjenvinning av NPer.

Det finnes mange studier der det har blitt ekstrahert NPer fra biologiske prøver, og det har blitt benyttet liknende enzymatiske metoder for prøver av kylling (Weigel, Peters, Loeschner, Grombe, & Linsinger, 2017) og for blåskjell, tunfisk og kveite ved tidligere masterprosjekt ved Havforskningsinstituttet. Det har blitt funnet varierende grad av gjenvinning av NPer, mens størrelsen har vist seg å ikke bli betydelig påvirket av enzymbehandling. Enkelte analyser er utført med andre metoder, og resultatene kan derfor ikke direkte sammenlignes mot hverandre. De gir likevel en indikasjon på at enzymer er en anvendelig metode for opparbeiding av prøver for ekstraksjon av NPer fra biologiske prøver.

#### 4.4. Sammenlikning med resultater fra valideringsrapport

For å sammenlikne resultatene fra analysene med ulik homogenisering og analysen med ulikt enzym ble resultatene sammenliknet med resultatene for den validerte metoden som lå til grunn for forsøkene. Resultatene for analyse av 100 ng/L Au NP-referansemateriale på 60 nm i prøver oppløst ulikt enzym og ulik homogenisering er vist i Tabell 33. For valideringsrapporten ble det benyttet en 100 ng/L løsning av Au 60 nm NPer fra PerkinElmer, mens det i dette prosjektet ble benyttet Au 60 nm NPer fra NanoComposix. Resultatene sammenlignes med resultatene fra metodevalidering av ekstraksjon av Au NPer fra blåskjell oppløst med Protamex, utført av andre analytikere i valideringsarbeidet. Som nevnt i kapittel 3.8.1 kan man ved analyse av NPer sette størrelsesbestemmelsesgrensen som en nedre grense eller et intervall. I dette prosjektet og valideringsrapporten er størrelsesbestemmelsesgrensen satt som en nedre grense. For referansematerialet benyttes denne grensen for beregning av TE.

*Tabell 33 – Gjennomsnittlig NP-antall, median størrelse, massekonsentrasjon og partikkelkonsentrasjon med tilhørende RSD (%) for prøver opparbeidet med henholdsvis Protamex og Proteinase K. Tabellen inneholder også data fra valideringsrapporten til Metode 600 (Valdersnes, Bienfart, Solli, & Bruvold, 2020)*

	Parameter	Antall NPer	Median størrelse (nm)	Masse-kons. (ng/L)	Partikkel kons. (partikkel/L)
<b>Au 60 nm NP, 100 ng/L spiket i blåskjell, Protamex</b>	Gj.snitt	625	59	41.9	$1.97 \cdot 10^7$
	RSD (%)	5,5	0.8	6.3	12
	Teoretisk verdi	707	60	46	-
<b>Au 60 nm NP, 100 ng/L spiket i blåskjell, Proteinase K</b>	Gj.snitt	597	59	31.9	$1.43 \cdot 10^7$
	RSD (%)	12,6	0	2.7	8.7
	Teoretisk verdi	570	60	41	-
<b>Au 60 nm NP, 100 ng/L spiket i blåskjell, validerings-rapport</b>	Gj.snitt	839	54	37	$2.2 \cdot 10^7$
	RSD (%)	9,5	0,4	10	10
	Teoretisk verdi	813	59	46	-

Resultat fra Au 60 NPer i Proteinase K ga et NP-antall på 597 med en median størrelse på 59 nm, en massekonsentrasjon på 31,9 ng/L og en partikkelkonsentrasjon på  $1.43 \cdot 10^7$ . For Protamex ble det funnet 625 NPer med en median størrelse på 59 nm, og en massekonsentrasjon på 41,9 ng/L. Partikkelkonsentrasjonen for Protamex var  $1.97 \cdot 10^7$ . Sammenlignet med resultatene for valideringsresultatene ble det funnet 813 partikler, med en median størrelse på 59 nm, en massekonsentrasjon på 46 ng/L og en partikkelkonsentrasjon på  $2.1 \cdot 10^7$ . Resultatene avviker hovedsakelig i antall NPer, da det ble generelt funnet et lavere antall NPer i dette prosjektet enn i valideringsarbeidet.

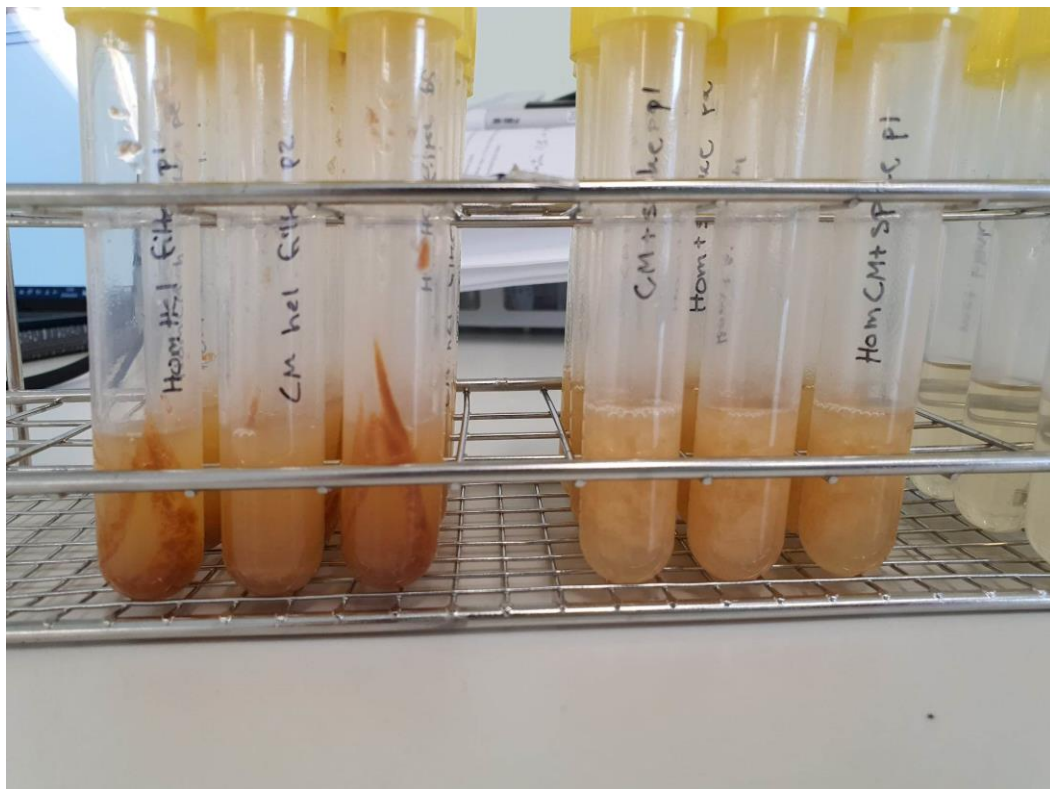
Det mest sannsynlige er at det lavere antallet NPer skyldes forfynningsfeil eller ulik pipetteringsteknikk, men det kan også skyldes forskjeller mellom NP-standardene fra de ulike leverandørene. Det var i tillegg lite referansemateriale igjen i beholderen for NanoComposix NPer, som hadde blitt oppbevart i kjøleskap over lengre tid. Det kan dermed også være en mulighet for at holdbarheten til referansematerialet var utgått. Det samme referansematerialet fra NanoComposix ble benyttet i et annet masterprosjekt, der det ble funnet 569 Au NPer i blåskjell, der det var tatt utgangspunkt i den samme metoden (Simonsen, 2022). Det kan dermed ikke utelukkes at det skyldes forskjeller mellom referansematerialene.

For alle tre analysene ble det funnet relativt samsvarende resultater for median NP-størrelse. Størrelsesfordeling mellom Protamex og Proteinase K inkludert deres metodeblanker ble illustrert i Figur 31 i kapittel 4.3.3. Teoretisk verdi er målte verdier for blankprøver av MQ-vann, spiket med samme mengde og konsentrasjon Au 60 nm NPer som blåskjellprøvene.

#### 4.5. Rekeprøver

Etter analysene av blåskjell ble det konkludert med at lang inkubasjonstid var en viktig faktor for oppløsning av blåskjellprøver, og at homogenisering og kryomølling kombinert ga den beste homogeniseringen av blåskjellene. For å undersøke om dette kunne gjenskapes for rekeprøver ble rekeprøver opparbeidet etter metodene Hom, CM og HomCM. Dette ble gjort for paralleller av rekeprøver både med og uten skall, for å undersøke om rekeskall kunne oppløses med proteinase eller om det kreves en tilsetning av kitinase. Vedlegg 27 viser rekeprøver med og uten skall i kryomølle-prosessen.

Rekeprøvene ble opparbeidet som beskrevet i kapittel 3.6.2. Prøvene ble inkubert over natten, ved 50 °C og 290 RPM. Etter inkubering ble rekeprøvene hentet, og det ble observert at rekeskallet ikke lot seg oppløse ved bruk av kun proteinase. Dette kan observeres i Figur 36, der rekeprøvene uten skall står til høyre, og med skall til venstre. Prøvene med skall har en mørkere farge, samt striper av store, uoppløste bestanddeler. Dette ble også observert ved et forsøk på filtrering, der det lå igjen store skall-biter i filteret. Disse ble dermed forkastet, og kun rekeprøvene uten skal ble benyttet til videre fortykning før analyse på sp-ICP-MS.



Figur 36 - Rekeprøver oppløst med Proteinase K, rekeprøver med skall til venstre, og uten skall til høyre

En annen faktor som ble observert for rekeprøvene, var at prøvene skilte seg i to lag, mellom bestanddeler av reke og en klar væske. Dette ble ikke observert for blåskjellprøvene, som etter inkubering kommer ut som en mer homogen løsning. En parallell av rekeprøve uten skall er vist i Figur 37. I teorien burde rekeprøver uten skall løses godt opp med proteinaser, da de i hovedsak består av protein og vann, som vist i Tabell 3 i kapittel 2.2.2. Per 100 g er det likevel over dobbelt så mye protein som i blåskjell, så det kan være nødvendig å benytte høyere konsentrasjoner av proteaser for å fullstendig løse opp rekeprøvene.



*Figur 37 - HomCM rekeprøve uten skall, rekebestanddelene og væsken skiller seg*

Rekeprøvene uten skall ble videre fortynnet etter metoden beskrevet i kapittel 3.6.2, før analyse på sp-ICP-MS. Resultatene fra sp-ICP-MS viste at det ble funnet tilnærmet ingen NPer fra Au-referansematerialet, og et lavt innhold av  $\text{TiO}_2$  i de spikede prøvene. Når det ikke er Au NPer til stede fra referansematerialet er det utfordrende å justere parameterne i programvaren. Mengden  $\text{TiO}_2$  i prøvene kan derfor ikke bestemmes. Det ble også funnet lik mengde  $\text{TiO}_2$  i både de spikede og uspikede rekeprøvene, som kan tyde på at det kun er et naturlig innhold av NPer som er funnet. Da det ikke ble funnet noen tegn til spike i prøvene, er den mest sannsynlige forklaringen at det skyldes en fortynningsfeil på lab. Det er også en mulighet at reke ikke fungerer som en like stabil matrise for NPer som blåskjell gjør, og at inhomogeniteten vist i Figur 37 kan ha gjort gjenvinning av NPer mer utfordrende.

## 4.6. Analysekvalitet

### 4.6.1. Transporteffektivitet

For å bestemme TE for analysen kan det benyttes to metoder, enten partikkelantallmetoden (RMcons), eller partikkelstørrelsesmetoden (RMSize). Partikkelantallmetoden bestemmer TE fra forholdet mellom antallet målte partikler og det teoretiske antallet partikler i NP-standard (Pace, et al., 2012). Partikkelstørrelsesmetoden ble benyttet i dette prosjektet, og benytter sensitivetsforholdet mellom en NP-standard og den ioniske standarden. Her ble det benyttet Au 60 nm som NP-standard, sammen med en ionisk Au standard. Partikkelstørrelsesmetoden har vist seg å gi høyere TE enn partikkelantallmetoden, og partikkelstørrelsesmetoden anbefales i de fleste tilfeller over partikkelantallmetoden (Geiss, et al., 2022). Valideringsrapporten for metode 600 fant også at partikkelstørrelsesmetoden var mer robust enn ved partikkelantall. En fordel med partikkelantallmetoden er at denne tar bedre hensyn til eventuelle partikkeltap i instrumentet, men TE er en viktig parameter for bestemmelse av NPer ved sp-ICP-MS, og det er dermed ikke hensiktsmessig å velge partikkelantallmetoden.

I dette prosjektet ble TE bestemt noe lavere enn den forventede verdien på 6%. I dette prosjektet ble TE funnet til mellom 5,2% på det laveste og opp til 5,5% som er noe lavere enn forventet, men innenfor akseptabelt nivå. TE har i tidligere masterprosjekt blitt bestemt til  $(6,0 \pm 0,4)\%$  (Grødem, 2020) og til mellom 5,1% til 6,9% (Kjærvik, 2021). I dette prosjektet ble størrelsesbestemmelsesgrensen satt som en nedre grense. I et tidligere masterprosjekt ved HI ble det funnet at TE ble høyere ved å sette størrelsesbestemmelsesgrensen som et intervall (Kjærvik, 2021). TE er en viktig faktor for bestemmelse av partikkelkonsentrasjon og masse for NPene, og er involvert i en rekke av formlene listet i kapittel 3.8.5. Feil i TE kan dermed gi store utslag for resultatene.

#### 4.6.2. Selektivitet

$^{197}\text{Au}$  NPer gir god selektivitet, da de har få eller ingen interfererende forbindelser, med  $^{181}\text{Ta}^{16}\text{O}$  som eneste potensielle polyatomiske interferens (May & Wiedmeyer, 1998).

Kvadrupolene i sp-ICP-MS gjør at uønskede forbindelser kan elimineres, som beskrevet for  $\text{TiO}_2$  i kapittel 3.8.3. Masseskiftene i kvadrupolene tilpasses etter analytt, som gjør at sp-ICP-MS til en metode med god selektivitet for ulike NPer. For  $^{48}\text{Ti}^+$  ioner vil kun analytter med samme masse komme gjennom den første kvadrupolen, som isotopen  $^{48}\text{Ca}^+$ . Ved kollisjon med oksygenatomer vil Ca kunne danne  $^{48}\text{Ca}^{16}\text{O}$ , som er en potensiell polyatomisk interferens.  $^{48}\text{Ca}^+$  ansees ikke som en sannsynlig interferens, da kun 0,187% av naturlig kalsium befinner seg i denne formen (Coursey, Schwab, & Dragsoset, 2006). 96,9% av kalsium finnes som isotopen  $^{40}\text{Ca}$ , som ikke vil interferere med  $^{48}\text{Ti}^+$ . I cellen befinner det seg i tillegg hydrogengass, og i nærvær av  $\text{H}_2$  kan  $^{48}\text{Ca}^{16}\text{O}$  reagere og danne  $\text{CaOH}^+$ , som vil forhindre at  $^{48}\text{Ca}^{16}\text{O}$  blir detektert.

Både blåskjell og reker har et naturlig innhold av Ca, med henholdsvis 30 og 61 mg per 100 g. Dersom dette kalsiumet befinner seg i prøvene som isotopen  $^{48}\text{Ca}^+$  kan dette interferere og gi unøyaktige resultater dersom det benyttes prøver med et høyt innhold av blåskjell eller reke. Det benyttes små mengder biologisk materiale i dette prosjektet, der prøver med 1 g innveid blåskjell eller reke fortynnes mellom 500 og 2000 ganger. Naturlig innhold av kalsium vil dermed sannsynligvis ikke være en sannsynlig feilkilde.

$^{64}\text{Ni}$  vil heller ikke kunne interferere, da denne forbindelsen ikke vil komme gjennom den første kvadrupolen med 48  $m/z$ . Masseskift utelukker dermed de fleste polyatomiske interferensene, som gir metoden god selektivitet.

#### 4.6.3. Deteksjonsgrense og kvantifiseringsgrense

Ved analyse parallellt av metodeblankprøver ble det funnet et NP innhold på mellom 0 til 23 Au NPer. Gjennomsnittlig antall Au NPer i metodeblankprøvene ble målt til 12 partikler, med et standardavvik på 6,98. LOD ble beregnet til 32 for blankprøvene ved å benytte formel 18, og dette benyttes videre til å bestemme LOQ ved bruk av formel 19. LOQ ble beregnet til 96. LOD og LOQ er vist i Tabell 34.

I valideringsrapporten ble det funnet et gjennomsnittlig antall på 13 Au NPer i blankprøver, der LOD ble beregnet til 30, og LOQ ble beregnet til 90 (Valdersnes, Bienfart, Solli, & Bruvold, 2020). Disse partiklene stammer sannsynligvis fra overføringseffekt, der NPer fra spikede prøver kan bli overført til neste prøve.

For bestemmelse av NP-størrelse er det nødvendig med et stort antall partikler, da det kreves flere hundre NPer for å danne en representativ størrelsesfordeling for sikker bestemmelse av størrelse. For de spikede prøvene ble det funnet fra 440 til 625 NPer, som er godt over LOQ.

*Tabell 34 - Verdier for LOD og LOQ av metodeblankprøver. Au partikler ble benyttet for bestemmelse av LOD og LOQ*

<b>Metodeblank</b>	<b>Gjennomsnitt</b>	<b>SD</b>	<b>LOD</b>	<b>LOQ</b>
Antall partikler	12	6,98	32	96



#### 4.6.4. Måleområde

Instrumentet og MassHunter-programvaren beregner lineært område fra blankprøve av MQ-vann som nedre grense, og ionisk Au standard med en konsentrasjon på 10 µg/L som øvre grense. For å undersøke lineært område kan det benyttes flere ioniske standarder med ulike konsentrasjoner, eksempelvis 0,5, 1 og 5 µg/L for å beregne en kalibreringskurve med flere punkter. Ved for høye konsentrasjoner kan det bli overlapp mellom signaler, men dette vil bare påvirke prøver med flere tusen NPer (Abad-Álvaro, et al., 2016). Høyeste antall NPer bestemt i dette prosjektet var 1503 for TiO<sub>2</sub>, og dette er innenfor metodens måleområde.

#### 4.6.5. Presisjon

Presisjon ble undersøkt ved repeterbarhet, der resultater mellom paralleller av samme prøve sammenliknes. Dersom samme analyse utføres over lengre tid kan presisjonen undersøkes ved intern reproducerbarhet. En metode med god presisjon vil gi samme resultat dersom man gjentar eksperimentet flere ganger. Metodens presisjon angis som RSD, som benyttes som et mål på repeterbarhet.

Ved intern reproducerbarhet, der analyser utføres over lengre tid, er Codex-kravet for RSD satt til  $\leq 44\%$ . Ved repeterbarhet settes denne grensen lavere, og i dette prosjektet med grensen for RSD satt til  $\leq 22\%$ . Alle prøver ble spiket til en sluttkonsentrasjon 100 ng/L NP-standarder av Au og TiO<sub>2</sub>. Det er benyttet tre paralleller for SD og RSD for hver prøvetype. Tabell 35 viser repeterbarhet for NP-størrelse av Au og TiO<sub>2</sub> NPer opparbeidet med ulik homogenisering og ulike enzym, mens Tabell 36 viser repeterbarhet for NP-antall.

Tabell 35 - Resultater for repeterbarhet for spikede blåskjellprøver med ulik homogenisering og ulike enzym. Tabell viser SD og RSD (%) for NP-størrelse for Au og TiO<sub>2</sub> NPer. Prøver ble spiket til en sluttkonsentrasjon på 100 ng/L fra fortynnede NP-standarder

NP	Metode					SD	RSD (%)	Kriterie RSD (%)
	Hom	CM	HomCM	Protamex	Proteinase K			
Au	X					0,47	0,8	≤ 22
		X				0	0*	
			X			0,47	0,8	
				X		0	0*	
					X	0,8	1,4	
TiO <sub>2</sub>	X					0,9	1,5	≤ 22
		X				0,5	0,8	
			X			0,5	0,8	
				X		1,6	2,6	
					X	1,4	2,3	

\* Gjennomsnittlig NP størrelse for alle tre parallellene av Protamex og CM ble bestemt til 59 nm, og SD og RSD ble dermed satt til 0.

For NP-størrelse av TiO<sub>2</sub> og Au ble største RSD beregnet til henholdsvis 1,5% og 0,8%. Dette er godt innenfor kravet på ≤ 22%. Det ble funnet noe større RSD for TiO<sub>2</sub> ved analysene med ulike enzym enn for ulik homogenisering. RSD er fremdeles godt innenfor kravet på 22%.

Tabell 36 - Resultater for repeterbarhet for spikede blåskjellprøver opparbeidet med ulike homogeniseringer og enzym. Tabell viser SD og RSD (%) for NP-antall for Au og TiO<sub>2</sub> NPer. Prøver ble spiket til en sluttkonsentrasjon på 100 ng/L

NP	Metode					SD	RSD (%)	Kriterie
	Hom	CM	HomCM	Protamex	Proteinase K			
Au	X					36,6	8,3	≤ 22
		X				15,5	3,1	
			X			27,4	5,3	
				X		34,6	5,6	
					X	75,4	12,6	
TiO <sub>2</sub>	X					84,2	9,8	≤ 22
		X				47,4	14,2	
			X			107,6	6,7	
				X		88,4	7,7	
					X	70,6	5,9	

Største RSD ble beregnet til 14,2%, som er innenfor kravet på ≤ 22%.

RSD ble funnet til å være godt innenfor grensen på 22% for alle målinger av partikkelantall og størrelse, for både Au og TiO<sub>2</sub> NPer. Spesielt for NP-størrelse har det blitt funnet lite variasjon mellom paralleller, uavhengig av homogeniseringsmetode og enzym. Presisjonen for metoden er innenfor de bestemte grensene for RSD. Det kan dermed antas at mengden tilfeldige feil i analysene var lav. For Au NPer ble RSD beregnet fra 0 til 1,4% for de ulike prøvetypene, der Proteinase K ga størst utslag. Ved sammenlikning med valideringsrapporten for NP-størrelse av Au 60 nm NPer ble RSD beregnet fra 0,8 til 1% (Valdersnes, Bienfart, Solli, & Bruvold, 2020).

For NP-antall ble RSD beregnet fra 3,1 til 8,3% for ulik homogenisering, og 5,6 til 12,6% for ulikt enzym. Det ble dermed funnet høyest RSD for både Au antall og størrelse i Proteinase K prøvene. For TiO<sub>2</sub> NPer ble RSD beregnet fra 6,7 til 14,2% ved ulik homogenisering, og 5,9 til 7,7% for ulike enzym. Her ble det funnet høyest avvik mellom parallellene av CM prøvene.

#### 4.6.6. Riktighet

Riktigheten ble undersøkt ved beregning av gjenvinning, i tillegg til sammenlikning med tidligere resultater fra valideringsrapporten i Tabell 33 og en sammenlikning med teoretiske verdier. Gjenvinning beregnes etter formel 20, og som nevnt i kapittel 3.10.1 er akseptert gjenvinning satt til 40-120%. Alle prøver ble spiket med Au 60 nm med en sluttkonsentrasjon på 100 ng/L. Det er benyttet tre paralleller for beregning av gjennomsnitt, og teoretisk verdi er basert på referansematerialets oppgitte størrelse, og blankprøvers innhold av antall NPer. Tabell 37 viser gjenvinning for størrelse av Au 60 nm NPer i prøver med ulik homogenisering og ulikt enzym.

*Tabell 37 - Gjenvinning (%) som et mål på riktighet for NP-størrelse av Au 60 nm NPer fra referansemateriale, i blåskjellprøver opparbeidet med ulik homogenisering og ulike enzym*

Metode					Nanopartikkel		Gjenvinning	Kriterie
Hom	CM	HomCM	Protamex	Proteinase K	Teoretisk verdi (nm)	Målt verdi (nm)	(%)	Gjenvinning (%)
<b>X</b>						59-60	99	
	<b>X</b>					59-60	99	
		<b>X</b>			60	59-59	98	40-120
			<b>X</b>			59-59	98	
				<b>X</b>		58-60	98	

Tabell 37 viser at gjenvinningen, og dermed riktigheten for Au NP-størrelsen var godt innenfor kravet på 40-120% for alle opparbeidingene. Det kan observeres at gjenvinningen av størrelse for Au NPer var god for blåskjellprøver opparbeidet med ulik homogenisering og ulike enzym. Gjenvinningen var tilsvarende for alle parallellene, og svært nær teoretisk verdi på 60 nm. Det ble generelt observert minimale avvik i størrelse av Au partiklene i alle analyser i dette eksperimentet, som igjen tyder på at Au NPene er et stabilt referansemateriale. Tidligere masterprosjekt der Au 60 nm har blitt benyttet har funnet gjennomsnittlig Au NP størrelse 57 nm (Kjærøvik, 2021) og 59 nm (Simonsen, 2022). Tabell 38 viser gjenvinning for Au NP-antall.

Tabell 38 - Gjenvinning (%) som et mål på riktighet for NP-antall av Au 60 nm NPer fra referansemateriale, i blåskjellprøver opparbeidet med ulik homogenisering og ulike enzym

Metode				Nanopartikkel		Gjenvinning	Kriterie
Hom	CM	HomCM	Protamex	Proteinase K	Teoretisk verdi (nm)	Målt verdi (nm)	(%) Gjenvinning (%)
<b>X</b>						440	89,7
	<b>X</b>				490 <sup>1</sup>	508	103,8
		<b>X</b>				520	106,3
			<b>X</b>		707 <sup>2</sup>	625	88,4
				<b>X</b>	570 <sup>3</sup>	597	105,4

<sup>1</sup>Antall Au NPer bestemt i blankprøver av MQ-vann fra analyse ved ulik homogenisering

<sup>2</sup>Antal Au NPer bestemt i blankprøver av MQ-vann tilsatt protamex

<sup>3</sup>Antall Au NPer bestemt i blankprøver av MQ-vann tilsatt proteinase K

Her ble gjenvinningen er beregnet ut ifra målinger av spikede blankprøver av MQ-vann, som ga et partikkelantall på 490 NPer. Det ble funnet lavest gjenvinning for Hom og Protamex-parallellene, mens CM, HomCM og Proteinase K hadde gjenvinning over 100%. Dette kan skyldes bedre stabilitet av Au NPer i blåskjellprøvene enn i MQ-vann, men det kan ikke utelukkes at det skyldes feil i spiking eller fortynning av prøver. I valideringsrapporten for metode 600 ble gjenvinningen av antall Au NPer bestemt til 102% (Valdersnes, Bienfart, Solli, & Bruvold, 2020). I et tidligere masterprosjekt har denne gjenvinningen blitt bestemt til 115% (Kjærvik, 2021).

Tabell 39 viser gjenvinning av størrelse for TiO<sub>2</sub> NPer. Her ble teoretisk verdi satt til 80 nm, etter målt størrelse i tidligere masterprosjekt der NPene ble sonikert (Simonsen, 2022). NPene ble funnet til å ha noe mindre størrelse i dette prosjektet, som kan skyldes oppbevaringstiden, da det har blitt observert at størrelsen til sonikerte NPer har blitt redusert over tid.

Tabell 39 - Gjenvinning (%) som et mål på riktighet for NP-størrelse av TiO<sub>2</sub> NPer fra referansemateriale, i blåskjellprøver opparbeidet med ulik homogenisering og ulike enzym

Metode					Nanopartikkel		Gjenvinning	Kriterie
Hom	CM	HomCM	Protamex	Proteinase K	Teoretisk verdi (nm)	Målt verdi (nm)	(%)	Gjenvinning (%)
<b>X</b>						62	77	
	<b>X</b>					61	75,4	
		<b>X</b>			80	60	76,7	40-120
			<b>X</b>			62	77,5	
				<b>X</b>		62	77,5	

Tabell 39 viser en gjenvinning for NP-størrelse mellom 75,4% til 77,5%. Det kan observeres at det er liten variasjon mellom de ulike opparbeidingene. Den lavere gjenvinningen skyldes at den teoretiske verdien er hentet fra tidligere målt størrelse, og i dette prosjektet har det blitt observert redusert størrelse for disse partiklene. Gjenvinningen er likevel godt over den kritiske grensen på 40%.

Tabell 40 - Gjenvinning (%) som et mål på riktighet for NP-størrelse av TiO<sub>2</sub> NPer fra referansemateriale, i blåskjellprøver opparbeidet med ulik homogenisering og ulike enzym

Metode					Nanopartikkel		Gjenvinning	Kriterie
Hom	CM	HomCM	Protamex	Proteinase K	Teoretisk verdi (nm)	Målt verdi (nm)	(%)	Gjenvinning (%)
<b>X</b>							89,1	
	<b>X</b>				970 <sup>1</sup>		72,6	
		<b>X</b>					78,4	40-120
			<b>X</b>		1454 <sup>2</sup>		78,6	
				<b>X</b>	1503 <sup>3</sup>		79,5	

<sup>1</sup>Antall TiO<sub>2</sub> NPer bestemt i blankprøver av MQ-vann fra analyse ved ulik homogenisering

<sup>2</sup>Antal TiO<sub>2</sub> NPer bestemt i blankprøver av MQ-vann tilsatt protamex

<sup>3</sup>Antall TiO<sub>2</sub> NPer bestemt i blankprøver av MQ-vann tilsatt proteinase K

Tabell 40 viser høyest gjenvinning for Hom-oppbeidingen, der gjenvinningen ble beregnet til 89,1%. Gjenvinningen var lavest for CM parallellene med 72,6%, mens de resterende tre oppbeidingene hadde tilsvarende gjenvinning mellom 78,4% til 79,5%. Som diskutert i kapittel 4.2.3 ble det observert et høyere antall TiO<sub>2</sub> NPer i Hom prøvene, som kunne skyldes tilfeldige feil, men også redusert gjenvinning i kryomøllede prøver. Antallet er likevel godt innenfor den kritiske verdien.

Det ble dermed funnet tilsvarende resultater for størrelse for både Au og TiO<sub>2</sub> NPer mellom alle oppbeidingene. Gjenvinning av TiO<sub>2</sub> ble beregnet fra tidligere observert NP-størrelse, som ga lavere gjenvinning enn for Au NPene. Resultatene er likevel godt innenfor kravene for gjenvinning, og riktigheten kan dermed sies å være god for både ulik homogenisering og ulike enzym. Ved sammenlikning med valideringsrapporten ble det funnet et lavt antall partikler i dette prosjektet, men som tidligere diskutert kan dette skyldes feil ved fortynning av standarder, spike eller andre feil i prøveoppbeidingene, men også holdbarheten på NP-standarder.

For en undersøke av gjenvinning i forhold til valideringsrapporten ble gjennomsnittlig NP-antall fra valideringsrapporten på 839 benyttet som teoretisk verdi, for å beregne en ny gjenvinning for Protamex og Proteinase K. Dette ga en gjenvinning på 74% for Protamex og 71% for Proteinase K, som fremdeles er godt innenfor det aksepterte nivået på 40-120%.

#### 4.6.7. Robusthet

For deteksjon av Au NPer ble NPene funnet til å være samme størrelse for prøver oppbeidet med ulike homogeniseringer og ulike enzymer. Au NPene har få interferenser og gir lite bakgrunnsstøy på sp-ICP-MS. Variasjon i homogenisering og enzym med tilsvarende resultater viser at metoden er robust for justeringer. Som referansemateriale er Au NPene relativt robust. Ved å benytte partikkelstørrelsesmetoden for TE, som har vist seg å være mer robust enn partikkelantallmetoden, kan man ytterligere sørge for en robust metode.

#### 4.6.8. Måleusikkerhet

Måleusikkerheten (MU) definerer området der det er forventet at den sanne verdien til en måling ligger. Det ble ikke benyttet sertifisert referansemateriale i dette prosjektet, og MU ble dermed bestemt til å være  $2 \cdot \text{RSD}$ , der det legges til +5% grunnet manglende sertifisert referansemateriale. Dette gjøres for å ta hensyn til manglende sporbarhet. MU rundes til slutt opp til nærmeste 5%. (Valdersnes, Bienfart, Solli, & Bruvold, 2020). Det ble beregnet MU for størrelse og antall av Au og TiO<sub>2</sub> NPer, i prøver med ulik homogenisering og for ulike enzym.

Tabell 41 – MU for NP-størrelse av Au og TiO<sub>2</sub> NPer i blåskjellprøver opparbeidet med ulik homogenisering og ulike enzym

NP	Metode					RSD (%)	2 RSD (%) + 5%	MU (%)
	Hom	CM	HomCM	Protamex	Proteinase K			
Au	X					0,8	6,6	10
		X				0*	5	5
			X			0,8	6,6	10
				X		0*	5	5
					X	1,4	7,8	10
TiO <sub>2</sub>	X					1,5	8	10
		X				0,8	6,6	10
			X			0,8	6,6	10
				X		2,6	10,2	15
					X	2,3	9,6	10

\* Gjennomsnittlig NP størrelse for alle tre parallellene for CM ble bestemt til 59 nm, og RSD ble dermed satt til 0.

Tabell 41 viser MU for Au og TiO<sub>2</sub> NP-størrelse for paralleller av blåskjellprøver opparbeidet med ulik homogenisering og ulikt enzym. MU for partikkelstørrelse ble beregnet til 5-15%. Det har blitt vist at riktigheten var god for gjenvinning av partikkelstørrelse, og det er dermed ikke overraskende at det ble funnet en lav MU. Valideringsrapporten fant liknende måleusikkerhet, der MU ble bestemt til 10 + 5% (Valdersnes, Bienfart, Solli, & Bruvold, 2020). I et tidligere masterprosjekt ble MU undersøkt for gjenvinning av Ag og Au NPer, der MU for partikkelstørrelse ble funnet til å være 15% (Grødem, 2020).



Tabell 42 – MU for NP-antall av Au og TiO<sub>2</sub> NPer i blåskjellprøver opparbeidet med ulike homogenisering

NP	Metode					RSD (%)	2 RSD (%) + 5%	MU (%)
	Hom	CM	HomCM	Protamex	Proteinase K			
Au	X					8,3	21,6	25
		X				3,1	11,2	15
			X			5,3	15,6	20
				X		5,6	16,2	20
					X	12,6	30,2	35
TiO <sub>2</sub>	X					9,8	24,6	25
		X				14,2	33,4	35
			X			6,7	18,4	20
				X		7,7	20,4	25
					X	5,9	16,8	20

Tabell 42 viser MU for Au og TiO<sub>2</sub> NP-antall i blåskjellprøver opparbeidet med ulike homogenisering og ulike enzym. For ulike homogenisering ble MU beregnet til 15-35%, mens den ble beregnet til 20-35% for ulikt enzym. Det er dermed liten forskjell i MU mellom prøvene opparbeidet med ulike enzym og ulike homogeniseringer.

## 5. Konklusjon

Resultatene for opparbeiding av blåskjellprøver med ulik homogenisering viste betydelige forskjeller i MP-størrelse og antall for de ulike metodene, hvor HomCM så ut til å gi den beste oppløsningen av blåskjellprøvene, med lav MP-størrelse og høyest antall MPer. I motsatt ende så Hom ut til å gi dårligst oppløsning med størst og færrest MPer. Det ble ikke funnet signifikante forskjeller mellom CM og HomCM, selv om antallet CM partikler var noe lavere enn for HomCM.

Analyser ved bruk av sp-ICP-MS viste liten variasjon mellom CM og HomCM, der det ble funnet høyest gjenvinning av Au NPer med henholdsvis 508 og 520 NPer. For Hom ble det funnet færre Au NPer med et gjennomsnitt på 440. For TiO<sub>2</sub> NPer ble det funnet et høyest antall NPer i Hom parallellene med et gjennomsnitt på 864 NPer, mens det i CM ble funnet 760 og i HomCM 705 NPer. På grunn av manglende uspikede prøver kan det ikke konkluderes med om dette avviket skyldes opparbeidingsmetoden eller tilfeldige feil. En mer sannsynlig feilkilde er unøyaktig tilsetning av spike.

Antallet NPer i CM og HomCM prøvene var relativt likt for både Au og TiO<sub>2</sub>, i tillegg til å ikke gi signifikante forskjeller i MP-størrelse eller antall. Dette tyder på at kryomølle løser opp prøvene i stor grad både med og uten homogenisering på forhånd. Med tanke på den ekstra tiden det tar med to ulike homogeniseringer, i tillegg til økt risiko for kontaminering, vil CM være den anbefalte opparbeidingen å benytte videre.

For undersøkelsene av ulike enzym ble det funnet mindre forskjeller mellom metodene enn for ulik homogenisering. Det kan tyde på at inkubering over natten gir god oppløsning av blåskjellprøver, uavhengig av valg av proteinase. Det ble funnet et høyere MP-antall på mikroskop for Proteinase K enn Protamex parallellene, men resultatene på sp-ICP-MS ikke viste store variasjoner. Det ser dermed ut til at hvilket enzym man velger har liten eller ingen påvirkning for gjenvinning av TiO<sub>2</sub> NPer. Det ble funnet at inkubering over natten ga en bedre oppløsning av blåskjellprøvene, med mindre MP-størrelse og flere MPer. Det kan tenkes at de mindre MPene gir en mer stabil prøveløsning, som gir en bedre gjenvinning av NPer.

Forsøkene med rekeprøver ga ikke forventede resultater, da det så ut til at rekeprøvene ikke lot seg løses opp i tilstrekkelig grad ved tilsetning av proteinase. Det ble antatt at reke ville løses opp på samme måte som blåskjell da begge matriksene i hovedsak består av protein. Her kan det være nødvendig å bruke andre enzymer, eller eventuelt syre for å løse opp prøvene av reke. Det er da viktig å ikke bruke syrer eller andre løsninger som kan løse opp eller endre NPene i

prøven. Et annet alternativ er å undersøke høyere konsentrasjoner av proteinaser over lengre tid.

For analysekvalitet ble det antatt at metoden har god selektivitet, da det er få interfererende forbindelser. LOD og LOQ ble bestemt til 32 og 96 for Au partikler, som er tilsvarende grensene som ble satt i valideringsrapporten. Alle beregninger for presisjon, repeterbarhet og riktighet var innenfor grenseverdiene satt i Codex Alimentarius. Da det ble funnet lite avvik i resultater ved variasjon av homogeniseringsmetode og enzym, og det kan dermed antas at metoden har god robusthet.

## 6. Videre arbeid

Videre arbeid fra dette prosjektet:

- Videre undersøkelser av ulike homogeniseringsmetoder bør utføres for prøver uten spike, for å sjekke eventuelle variasjoner i naturlig innhold av NPer fra enten kontaminering eller ødeleggelse av NPer ved kryomølling.
- Det bør finnes en bedre metode for enzymatisk oppløsning av rekeprøver, der det bør testes enten andre enzymer eller høyere konsentrasjoner. For rekeprøver med skall bør det i tillegg gjøres undersøkelser med kitinase som kan løse opp skall, og eventuelt lipase for å løse opp de små mengdene fett i reke.
- Det bør gjøres flere sammenlikninger av standardene for Au 60 nm NPer, for å undersøke holdbarheten til NPene som ble benyttet.
- Det kunne også vært interessant å videreføre metoden til andre biologiske prøver, som eksempelvis krabbe, mager fisk som torsk eller fetere fisk som for eksempel laks.
- Ved å gjenta samme analyse ved flere dager kan dette benyttes til å beregne intern reproduserbarhet.

## 7. Bibliografi

### Bibliografi

- Abad-Álvaro, I., Peña-Vázquez, E., Bolea, E., Bermejo-Barrera, P., Castillo, J. R., & Laborda, F. (2016). *Evaluation of number concentration quantification by single-particle inductively coupled plasma mass spectrometry: microsecond vs millisecond dwell times*. Analytical and Bioanalytical Chemistry. doi:10.1007/s00216-016-9515-y
- Agilent Technologies. (2020a). *Agilent 8900 Triple Quadrupole ICP-MS Hardware Maintenance Manual*. USA.
- Agilent Technologies. (2020b). *Agilent ICP-MS MassHunter Workstation Single Nanoparticle Application*. USA.
- Aikin, B. J., & Juhas, J. J. (1997). *Improvements in cryomill processing*. USA: NASA Lewis Research Centre. doi:10.1016/S0026-0657(97)88785-1
- Ali, I., Khan, S., Shah, K., Haroon, Kalimullah, & Bian, L. (2021). *Microscopic analysis of plant-mediated silver nanoparticle toxicity in rainbow trout fish (*Oncorhynchus mykiss*)*. Microscopy Research & Technique. doi:10.1002/jemt.23785
- Andrei, J., Pain-Devin, S., Felten, V., Devin, S., Biamberini, L., Mehennaoui, K., . . . Guerold, F. (2016). *Silver nanoparticles impact the functional role of *Gammarus roeseli* (Crustacea Amphipoda)*. Aix en Procence: Environmental Pollution. doi:10.1016/j.envpol.2015.10.036
- Bahadar, H., Maqbool, F., Niaz, K., & Abdollahi, M. (2016). *Toxicity of Nanoparticles and an Overview of Current Experimental Models*. Iranian Biomedical Journal. doi:10.7508/ibj.2016.01.001
- Baker, T. J., Tyler, C. R., & Galloway, T. S. (2014). Devon: Environmental Pollution. doi:10.1016/j.envpol.2013.11.014
- Baker, T. J., Tyler, C. R., & Galloway, T. S. (2014). *Impacts of metal and metal oxide nanoparticles on marine organisms*. Elsevier. doi:10.1016/j.envpol.2013.11.014
- Bayne, B. L. (1976). *Marine Mussels: Their Ecology and Physiology* (Vol. 10). New York: Cambridge university press.

- Beyer, J. G., Brooks, S., Allan, I. J., Ruus, A., Gomes, T., Bråte, I. L., & Schøyen, M. (2017). *Blue mussels (Mytilus edulis spp.) as sentinel organisms in costal pollution monitoring: A review*. Oslo: Marine Environmental Research.  
doi:10.1016/j.marenvres.2017.07.024
- Bhatia, S. (2016). Nanoparticle Types, Classification, Characterization, Fabrication Methods and Drug Delivery Applications. In S. Bhatia, *Natural Polymer Drug Delivery Systems* (pp. 3-96). Springer Cham. doi:10.1007/978-3-319-41129-3
- Bhattacharya, K., Davoren, M., Boertz, J., Schins, R. P., Hoffmann, E., & Dopp, E. (2009). *Titanium dioxide nanoparticles induce oxidative stress and DNA-adduct formation but not DNA-breakage in human lung cells*. National library of Medicine.  
doi:10.1186/1743-8977-6-17
- Bustos, A. R., Petersen, E. J., Possolo, A., & Winchester, M. R. (2015). *Post hoc Interlaboratory Comparison of single particle ICP-MS Size Measurements of NIST Gold Nanoparticle Reference Materials*. Analytical Chemistry.  
doi:10.1021/asc.analchem.5b01741
- Cademartiri, L., & Ozin, G. A. (2009). *Concepts of nanochemistry* (Vol. I). Weinheim: Wiley-VCH.
- Christensen, J. M., & Christiansen, M. E. (1978). Blåskjell, Oskjell og Stripeskjell, Familie Mytilidae. In J. M. Christensen, & M. E. Christiansen, *Muslinger* (pp. 43-49). Oslo: J. W. Cappelens forlag AS.
- Coursey, J. S., Schwab, D. J., & Dragsoset, R. A. (2006). *Atomic Weights and Isotopic Compsitions*. NIST Physical Reference Data.
- De Mello Donega, C. (2014). *Nanoparticles: Workhorses of Nanoscience* (1 ed.). Berlin: Springer Berlin Heidelberg.
- European Commission. (2022). Commission recommendation of 10.6.2022 on the definition of nanomaterial. C\_2022\_3689\_1\_EN. Retrieved Februar 2023
- European union. (2006). *COMMISSION REGILATION (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants inn foodstuffs*. European Union.

- Fabricius, A. L., Duester, L., Meermann, B., & Ternes, T. A. (2014). *ICP-MS-based characterization of inorganic nanoparticles - sample preparation and off-line fraction strategies*. Analytical and Bioanalytical Chemistry. doi:10.1007/s00216-013-7480-2
- FAO&WHO. (2019). *Codex Alimentarius Commission procedural manual 21st edition*. Roma: FAO og WHO.
- Farkas, J., Bergum, S. N., Olsen, A. J., Salaberria, I., Ciesielski, T. M., Baczek, T., . . . Jenssen, B. M. (2015). *The impact of TiO<sub>2</sub> nanoparticles on uptake and toxicity of benzo(a)pyrene in the blue mussel (Mytilus edulis)*. Trondheim: Science of the Total Environment. doi:10.1016/j.scitotenv.2014.12.084
- FNs organisasjon for ernæring og landbruk. (2008). *Bivalve depuration: Fundamental and Practical aspects*. Rome: Food and agriculture organization of the united nations.
- Forbrukerrådet, Det økologiske Råd og DTU Miljø. (n.d.). *The Nanodatabase*. Retrieved from <http://www.danodb.dk>
- Gallocchio, F., Biancotto, G., Moressa, A., Pascoli, F., Pretto, T., Toffan, A., . . . Ricci, A. (2020). *Bioaccumulation and in vivo formation of titanium dioxide nanoparticles in edible mussels*. Padova: Food Chemistry. doi:10.1016/j.foodchem.2020.126841
- Geiss, O., Bianchi, I., Bucher, G., Verleysen, E., Brassinne, F., Mast, J., . . . Bustos, A. R. (2022). *Determination of the Transport Efficiency in spICP-;S Analysis Using Conventional Sample Introductions Systems: An Interlaboratory Comparison Study*. Nanomaterials. doi:10.3390/nano12040725
- Goldberg, E. (1986). *The Mussel Watch Concept*. Environmental Monitoring and Assessment. doi:10.1007/BF00398031
- Gonzales de Vega, R., Lockwood, T. E., Xu, X., Gonzalez de Vega, C., Scholz, J., Horstmann, M., . . . Clases, D. (2022). *Analysis of Ti- and Pb-based particles in the aqueous environment of Melbourne (Australia) via single particle ICP-MS*. Graz: Analytical and Bioanalytical Chemistry. doi:10.1007.s00216-022-04052-0
- González-Muñoz, M., Díez, P., González-González, M., Dégano, R., Ibarrola, N., Orfao, A., & Fuentes, M. (2014). *Nanomaterials - Toxicity and Risk Assessment*. S. Solone ski & M. L. Larramendy (Eds.): Intech Open. doi:https://doi.org/10.5772/60733
- Gosling, E. (2015). *Marine bivalve molluscs* (2 ed.). Oxford: John Wiley & Sons, Inc.

- Griendling, K. K., Touyz, R. M., Zweier, J. L., Dikalov, S., Chilian, W., Chen, Y.-R., . . . Bhatnagar, A. (2016). *Measurement of Reactive Oxygen Species, Reactive Nitrogen Species, and Redox-Dependent Signaling in the Cardiovascular System*. American Heart Association. doi:10.1161/RES000000000000110
- Grødem, A. (2020). *Utvikling av metodikk for screening og bestemmelse av sølvnanopartikler i blåskjell ved bruk av DLS, sp-ICP-MS og EM*. Bergen: Universitetet i Bergen.
- Haessmann, L. (2019). *Enzymatic digestion of mussels using Proteinase K versus Protamex*. København: DTU.
- Haug, J., Li, S., & Lin, Y. (2022). *Effects and Mechanism of Two Nanoparticles (Titanium Dioxide and Silver) to Moina mongolica Daday (Crustacea, Cladocera)*. Marine Pollution. doi:10.3389/fmars.2022.909701
- Havforskningsinstituttet. (2019). *Instruks for opparbeiding av prøver ved prøvemottak, Nordnesboder 3*. Bergen.
- Havforskningsinstituttet. (2021, Juni). *Tema: Blåskjell*. Retrieved Februar 2023, from Havforskningsinstituttet: <http://www.hi.no/hi/temasider/arter/blåskjell>
- Hayes, S. B., & Gammon, L. M. (2010). Sample Preparation and Mounting. In S. B. Hayes, & L. M. Gammon, *Optical microscopy of fiber-reinforced composites* (1 ed., pp. 16-25). Material Park, Ohio: ASM International.
- Hochella, M. F., Mogk, D. W., Ranville, J., Allen, I. C., Luther, G. W., Marr, L. C., . . . Yang, Y. (2019). *Natural, incidental, and engineered nanomaterials and their impacts on the Earth system*. Science. doi:10.1126/science.aau8299
- InfoCuria. (2022). *Judgment of the General Court (Ninth Chamber, Extended Composition), 23 November 2022*. InfoCuria.
- Jakob, R., & Nilus, N. (2020). *A fiber scanning tunneling microscope for optical analysis at the nanoscale*. Melville: Review of Scientific Instruments. doi:10.1063/5.0009182
- JCGM. (2008). *International vocabulary of metrology - Basic and general concepts and associated terms (VIM)*. The Joint Committee for Guides in Metrology.
- JCGM. (2023, Februar). *2.14 measurement trueness*. Retrieved from <https://jcgm.bipm.org/vim/en/2.14.html>



- JCGM. (2023, Februar). *2.15 measurement precision*. Retrieved from Precision: <https://jcgm.bipm.org/vim/en/2.15.html>
- JCGM. (2023, Februar). *2.26 Measurement uncertainty*. Retrieved from uncertainty of measurement: <https://jcgm.bipm.org/vim/en/2.26.html>
- JCGM. (2023, Februar). *4.13 selectivity of a measuring system*. Retrieved from JCGM: <https://jcgm.bipm.org/vim/en/4.13.html>
- Kaegi, R., Ulrich, A., Sinnet, B., Vonbank, R., Wichser, A., Zuleeg, S., . . . Boller, M. (2008). *Synthetic TiO<sub>2</sub> nanoparticle emission from exterior facades into the aquatic environment*. Oxford: Environmental Pollution. doi:10.1016/j.envpol.2008.08.004
- Katiyar, N. K., Biswas, K., Tiwary, C. S., Machado, L. D., & Gupta, R. K. (2019). *Stabilization of a Highly Concentrated Colloidal Suspension of Pristine Metallic Nanoparticles*. Kharagpur: Langmuir. doi:10.1021/acs.langmuir.8b03401
- Khan, I., Saeed, K., & Khan, I. (2019). *Nanoparticles: Properties, applications and toxicities*. Riyadh, Saudi Arabia: Arabian Journal of Chemistry. doi:10.1016/j.arabjc.2017.05.011
- Kjærøvik, A. (2021). *Metodeutvikling for bestemmelse av metall- og metalloksid-nanopartikler i det marine miljø med sp-ICP-MS*. Bergem: Universitetet i Bergen.
- Koudounas, P., Koniaris, E., Manoli, I., Avestas, P., Kostopoulos, S., Cavouras, D., & Glotsos, D. (2022). *Three-dimensional tissue volume generation in conventional brightfield microscopy*. Wiley. doi:10.1002/jemt.24141
- Krogness, M. L., & Tandberg, C. (n.d.). *Mikroskop og Stereolupe*. Oslo: UiO.
- Kumar, N., & Biswas, K. (2019). *Cryomilling: An environment friendly approach of preparation large quantity ultra refined pure aluminum nanoparticles*. Journal of Materials Research and Technology. doi:10.1016/j.jmrt.2017.05.017
- Kumar, N., & Kumbhat, S. (2016). *Essentials in Nanoscience and Nanotechnology* (I ed.). Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.
- Kumar, N., Biswas, K., & Gupta, R. K. (2016). Royal society of Chemistry. doi:10.1039/c6ra23120a

- Kumar, N., Biswas, K., & Gupta, R. K. (2016). *Green synthesis of Ag nanoparticles in large quantity by cryomilling*. Royal society of Chemistry. doi:10.10339/c6ra23120a
- Laborda, F., Bolea, E., & Jiménez-Lamana, J. (2016). *Single particle inductively coupled plasma mass spectrometry for the analysis of inorganic engineered nanoparticles in environmental samples*. Elsevier. doi:10.1016/j.teac.2016.02.001
- Larios, A. D., Pulicharla, R., Brar, S. K., & Cledón, M. (2018). *Filter Feeders Increase Sedimentation of Titanium Dioxide: The case of zebra mussels*. Quebec: Science of The Total Environment. doi:10.1016/j.scitotenv.2017.08.150
- Leica Microsystems. (2008). *Optical Microscopes - Leica DM2500 & DM2500 LED*. Wetzlar.
- Leica Microsystems. (2017). *Leica MICROSYSTEMS Microscope Cameras for Life Science Research*. Wetzlar.
- Lespes, G., Faucher, S., & Slaveykova, V. I. (2020). *Naturale Nanoparticles, Antropogenic Nanoparticles, Where is the Frontier?* Froniter Environmental Scientific. doi:10.3389/fenvs.2020.00071
- Liaqat, F., Hanif, U., Bahadur, S., Faheem, M., Rasool, S., Gulzar, S., . . . Munir, M. (2021). *Comparative evaluation of the toxicological effect of silver salt (AgNO<sub>3</sub>) and silver nanoparticles on Cyprinus carpio synthesized by chemicals and marine algae using scanning electron microscopy*. Microscopy research & technique. doi:10.1002/jemt.23710
- Limbach, L. K., Wick, P., Manser, P., Grass, R. N., Bruinik, A., & Stark, W. J. (2007). *Exposure of Engineered Nanoparticles to Human Lung Epithel Cells: Influence of Chemical Composition and Catalytic Activity on Oxidative Stress*. Zurich: American Chemical Society. doi:10.1021/es062629t
- Lin, C., & Zhang, L. (2015). *Habitat Enhancement and Rehabilitation*. Shandong: Developments in Aquaculture and Fisheries Science. doi:10.1016/B978-0-12-799953-1.00018-0
- Linge, K. L., & Jarvis, K. E. (2009). *Quadrupole ICP-MS: Introduction to Instrumentation, Measurement Techniques and Analytical Capabilites*. Perth: International Association of Geoanalytics. doi:10.1111/j.1751-908X.2009.00039.x

- Lo, S., & Fauzi, M. B. (2021). *Current Update of Collagen Nanomaterials - Fabrication, Characterisation and Its Applications: A Review*. Pharmaceutics. doi:10.3390/pharmaceutics13030316
- Lungu, M., Neculae, A., Bunoiu, M., & Biris, C. (2015). *Nanoparticles' Promises and Risks*. Switzerland: Springer Cham. doi:10.007/978-3-3-319-11728-7
- Maan, K. S., Sharma, A., Nath, P., Vo, H. H., & Minh, T. D. (2020). *Application of carbon-based smart nanocomposites for hydrogen production: current progress, challenges and prospects*. Gau Giay, Vietnam: ScienceDirect. doi:10.1016/B978-0-12-819553-6.00013-1
- Magrez, A., Kasas, S., Salicio, V., Pasquier, N., Seo, J. W., Celio, M., . . . Forró, L. (2006). *Cellular toxicity of carbon-based nanomaterials*. National Library of Medicine. doi:10.1021/nl060162e
- Matvaretabellen. (2023, Februar 24). *Blåskjell, rå*. Retrieved from Matvaretabellen: <https://www.matvaretabellen.no/blaaskjell-raa-04.053>
- Matvaretabellen. (2023, Februar 24). *Reke, kokt*. Retrieved from Matvaretabellen: <https://www.matvaretabellen.no/reker-kokt-04.057>
- May, T. W., & Wiedmeyer, R. H. (1998). *A Table of Polyatomic Interferences in ICP-MS*. Retrieved Februar 2023, from PerkinElmer: [https://resources.perkinelmer.com/corporate/cmsresources/images/44-74379atl\\_tableofpolyatomicinterferences.pdf](https://resources.perkinelmer.com/corporate/cmsresources/images/44-74379atl_tableofpolyatomicinterferences.pdf)
- Mech, A., Wohlleben, W., Ghanem, A., Hodoroaba, V. D., Weigel, S., F., B., . . . Rauscher, H. (2020). *Nano or not Nano? A structured approach for identifying Nanomaterials according to the European Commission's definition*. Berlin, Tyskland: Wiley-VCH GmbH. doi:10.1002/sml.202002228
- Meermann, B. (2015). *Field-flow fractionation coupled to ICP-MS: separation at the nanoscale, previous and recent application trends*. Berlin: Analytical and Bioanalytical Chemistry. doi:10.1007/s00216-014-8416-1
- Miljødirektoratet. (2022, Desember 09). *EUs underrett opphever titandioksid-klassifisering*. Retrieved Februar 2023, from Miljødirektoratet:

[https://www.miljodirektoratet.no/aktuelt/fagmeldinger/2022/desember-2022/eus-  
underrett-opphever-titandioksid-klassifisering/](https://www.miljodirektoratet.no/aktuelt/fagmeldinger/2022/desember-2022/eus-<br/>underrett-opphever-titandioksid-klassifisering/)

Moen, F. E., & Svensen, E. (2000). *Dyreliv i havet: håndbok i norsk marin fauna*.  
Kristiansund: KOM forlag.

Mueller, N. C., & Nowack, B. (2008). *Exposure Modeling of Engineered Nanoparticles in the  
Environment*. Environmental Scientific Technology.  
doi:<https://doi.org/10.1021/es7029637>

NanoDatabase. (2023, Februar 25). *Front page*. Retrieved from NanoDatabase:  
<http://www.nanodb.dk/en/>

NanoDatabase. (2023, Februar 25). *Gold nanoparticles*. Retrieved from NanoDatabase:  
[https://nanodb.dk/en/search-  
database/#pageno=&keyword=&kst=0&fn.lp\\_m=2923&fn.d\\_cd\\_f=&fn.d\\_cd\\_t=](https://nanodb.dk/en/search-<br/>database/#pageno=&keyword=&kst=0&fn.lp_m=2923&fn.d_cd_f=&fn.d_cd_t=)

Oberdörster, G. (2007). Biokinetics and Effects of Nanoparticles. In *Nanotechnology -  
Toxicological Issues and Environmental Safety*. New York: Springer.  
doi:10.1007/978-1-4020-6076-2\_2

Pace, H. E., Rogers, N. J., Jarolimek, C., Coleman, V. A., Gray, E. P., Higgins, C. P., &  
Ranville, J. F. (2012). *Single Particle Inductively Coupled Plasma - Mass  
Spectrometry: A Performance Evaluation and Method Comparison in the  
Determination of Nanoparticle Size*. Golden, Colorado: Environmental Science and  
Technology. doi:10.1021/es301787d

Patra, H. K., Banerjee, S., Chaudhuri, U., Lahiri, P., & Dasgupta, A. K. (2007). *Cell selective  
response to gold nanoparticles*. Nanomedicine. doi:10.1016/j.nano.2007.03.005

Peters, R., Herrera-Rivera, Z., Undas, A., van der Lee, M., Marvin, H., Bouwmeester, H., &  
Weigel, S. (2015). *Single particle ICP-MS combined with a data evaluation tool as a  
routine technique for the analysis of nanoparticles in complex matrices*. Royal society  
of Chemistry. doi:10.1093/c4ja00357h

Phan, H. T., & Haes, A. J. (2019). What Does Nanoparticle Stability Mean? *The Journal of  
Physical Chemistry*. doi:10.1021/acs.jpcc.9b00913

- Qamar, W., Khan, M. R., & Arafah, A. (2016). *Optimization of conditions to extract high quality DNA for PCR analysis from whole blood using SDS-Proteinase K Method*. Riyadh, Saudi Arabia: King Saud University. doi:10.1016/j.sjbs.2016.09.016
- Remedios, C., Rosario, F., & Bastos, V. (2012). *Environmental Nanoparticles Interactions with Plants: Morphological, Physiological and Genotoxic Aspects*. Journal of botany. doi:10.1155/2012/751686
- Rocha, T. L., Gomes, T., Sousa, V. S., Mestre, N. C., & Bebianno, M. J. (2015). *Ecotoxicological impact of engineered nanomaterials in bivalve molluscs: An overview*. Faro: COMA, Faculty of Science and Technology. doi:https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2015.06.013
- Russell, F. A., & McDougall, J. J. (2011). Proteinase-Activated Receptors and Arthritis. In N. Vergnolle, *Proteases and Their Receptors in Inflammation* (pp. 217-242). Basel: Springer Basel.
- Sigma Aldrich. (n.d.). *Product Information Proteinase K*. Saint Louis: Sigma Aldrich.
- Simonsen, M. (2022). *Method development in analysis of cerium dioxide and titanium dioxide nanoparticles with sp-ICP-MS*. Bergen: Universitetet i Bergen.
- Taniguchi, K., & Kanemitsu, Y. (2005). *Development of an Apertureless Near-Field Optical Microscope for Nanoscale Optical Imaging at Low Temperatures*. The Japanese Journal of Applied Physics. doi:10.1143/JJAP.44.575
- Tantra, R. (2016). *Nanomaterial Characterization: An introduction* (1 ed.). Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons.
- Thomas, R. (2013). *Practical guide to ICP-MS: a tutorial for beginners*. CRS Press.
- Valdersnes, S., Bienfart, A. M., Solli, B., & Bruvold, A. S. (2020). *600 - Kalibrering av instrument for nanopartikkelbestemmelse og bestemmelse av gullnanopartikler i blåskjell med ICP-MS*. Bergen: Havforskningsinstituttet.
- Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M., & Mazur, M. (2006). *Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer*. Bratislava: Chemico-Biological Interactions. doi:10.1016/j.cbi.2005.12.009

- van der Meeren, G. I., Woll, A. K., & Søvik, G. (2008). *En utredning for Mattilsynet for kunnskapsstøtte om anatomi og fysiologi hos tiftokreps med vekt på nervesystemet og velferd*. Ålesund: Havforskningsinstituttet.
- Wagner, T. (2016). *ParticeSizer 1.0.1*. Zendo. Retrieved from <https://zenodo.org/badge/latestdoi/18649/thorstenwagner/ij-particlesizer>
- Wang, Z., Yin, L., Zhao, J., & Xing, B. (2016). *Trophic transfer and accumulation of TiO<sub>2</sub> nanoparticles from clamworm (*Perinereis aibuhitensis*) to juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*) along a marine benthic food chain*. *Water res.* doi:doi:10.1016/j.watres.2016.03.027
- Ward, J. E., & Kach, D. J. (2009). *Marine aggregates facilitate ingestion of nanoparticles by suspension-feeding bivalves*. Groton: Marine environmental reserch. doi:10.1016/j.marenvres.2009.05.002
- Weigel, S., Peters, R., Loeschner, K., Grombe, R., & Linsinger, T. P. (2017). *Results of an Interlaboratory Method Performance Study for the Size Determination and Quantification of Silver Nanoparticles in Chicken meat by single-particle Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (sp-ICP-MS)*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. doi:10.1007/s00216-017-0427-2
- Xia, T., & Liu, S. (2020). *Continued Efforts on Nanomaterial-Environmental Health and Safety Is Critical to Maintain Sustainable Growth of Nanoindustry*. Weinheim an der Bergstrasse: AutoHoldings Journals. doi:<https://doi.org/10.1002/sml.202000603>
- Yan, B., Zhou, H., & Gardea-Torresdey, J. L. (2017). *Bioactivity of Engineered Nanoparticles*. Singapore. doi:10.1007/981-10-5864-4
- Yang, H., Du, L., Tian, X., Fan, Z., Sun, C., Liu, Y., . . . Nie, G. (2014). *Effects of nanoparticle size and gestational age on maternal biodistribution and toxicity of gold nanoparticles in pregnant mice*. *ScienceDirect*. doi:10.1016/j.toxlet.2014.07.030
- Zhu, X., Zhao, Y. G., Wu, M., Wang, H. Y., & Jiang, Q. C. (2016). *Effect of Initial Aluminium Alloy Particle Size on the Damage of Carbon Nanotubes during Ball Milling*. *PubMed Central*. doi:10.3390/ma9030173

Zhu, X., Zhou, J., & Cai, Z. (2011). *The toxicity and oxidative stress of TiO<sub>2</sub> nanoparticles in marine abalone (Haliotis diversicolor supertexta)*. Marine Pollution Bulletin.  
doi:10.1016/j.marpolbul.2011.03.006

## 8. Vedlegg

Et oppsett av prøver for sammenlikning av protamex og Proteinase K er vist i Vedlegg 1

*Vedlegg 1 - Fullstendig oppsett av prøver for sammenlikning av enzymer i blåskjell med sp-ICP-MS. BM = Blåskjell. Listen inneholder blankprøver og standarder til kalibrering av instrument*

<b>Prøvenavn</b>	<b>Paralleller</b>	<b>Kommentar</b>
0,1% HNO <sub>3</sub> blank	1	0 Ti <sup>+</sup>
Ti ionisk standard	1	10 Ti <sup>+</sup>
MQ vann	1	0 Au <sup>+</sup>
Au ionisk standard	1	10 Au <sup>+</sup>
Au 60 nm NP standard	3	RM
Matriseblank protamex	3	Spiket med Au
Matriseblank proteinase K	3	Spiket med Au
Metodeblank MQ	1	MQ vann
0,1% HNO <sub>3</sub>	1	0,1% HNO <sub>3</sub>
BM	3	Protamex
BM spiket med Au + Ti	3	Protamex
BM	3	Proteinase K
BM spiket med Au + Ti	3	Proteinase K
SDS inkubert blank	1	Sjekkes for bakgrunn
SDS analysedag blank	1	Sjekkes for bakgrunn

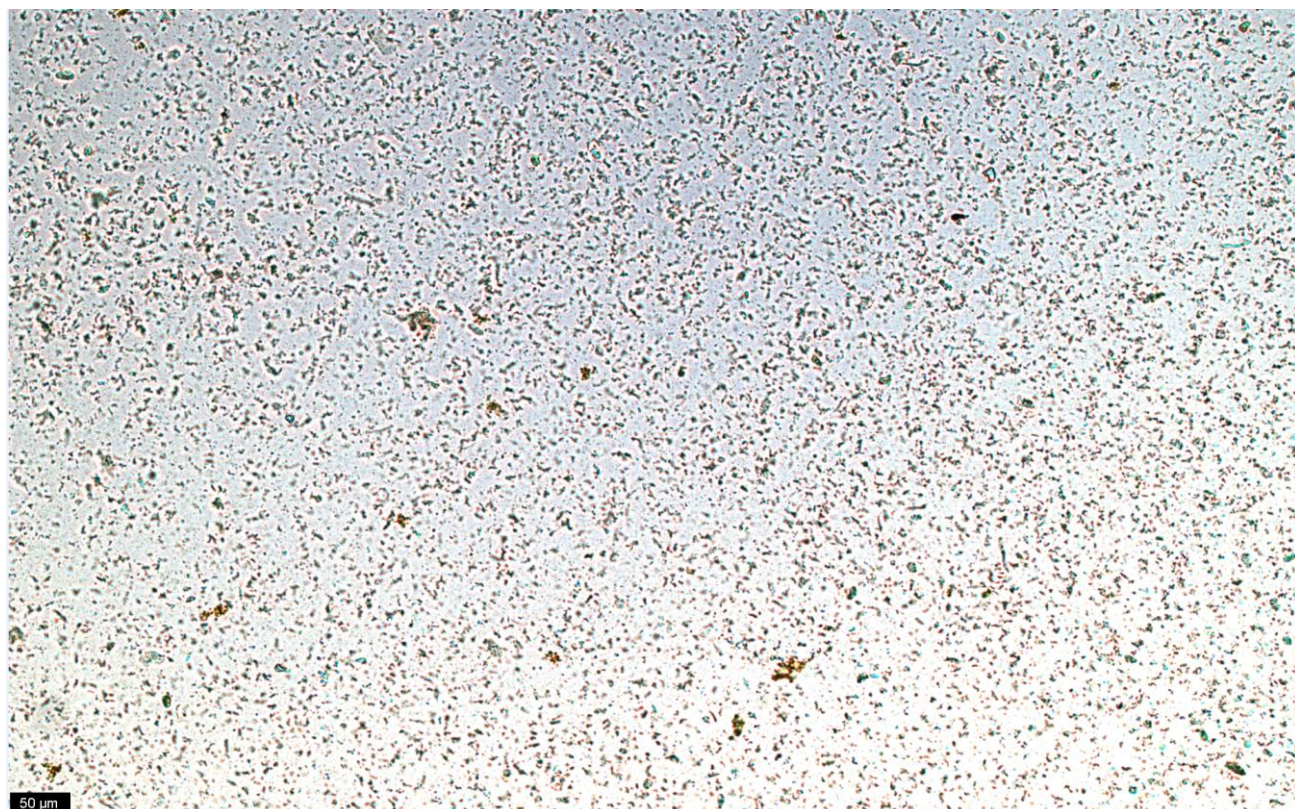
Standarder for kalibrering av instrument og bestemmelse av transporteffektivitet (TE)/nebuliseringseffektivitet (NE) gjøres med 100 ng/L løsning med Au-NPer, 10 µg/L Au ionisk standard og blank.



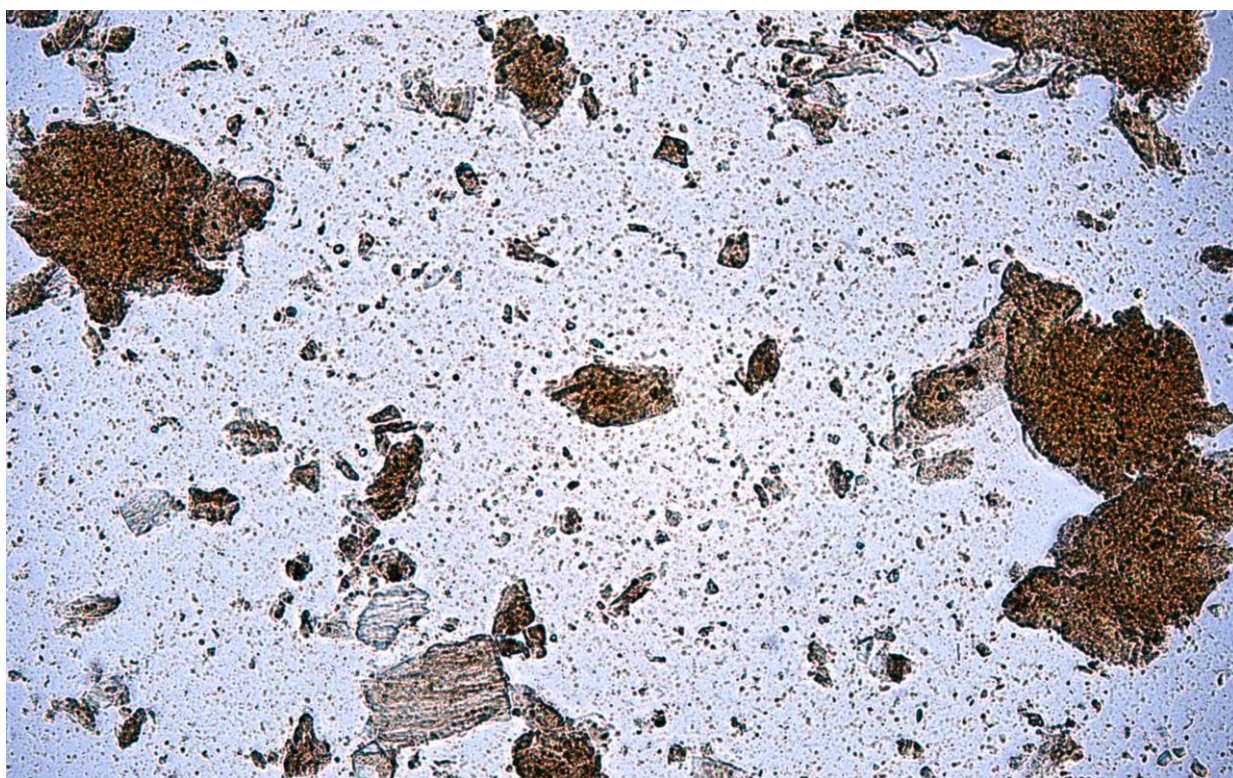
Vedlegg 2 - Fullstendig liste over analyserte prøver for sammenlikning av ulike prøveopparbeidinger. Inkluderer blankprøver, i tillegg til standarder for kalibrering av instrument. Hom = Homogenisert, CM = kryomøllet, HomCM = Homogenisert + kryomøllet

Prøve	Kommentar	Paralleller
0,1% HNO <sub>3</sub> blank	0 Ti <sup>+</sup>	1
Ti ionisk standard	10 Ti <sup>+</sup>	1
MQ vann	0 Au <sup>+</sup>	1
Au ionisk standard	10 Au <sup>+</sup>	1
Au 60 nm NP standard		1
Matriseblank protamex		3
Metodeblank	MQ	1
0,1% HNO <sub>3</sub>		1
Reke hom	Protamex	3
Reke hom spiket	Protamex	3
Reke CM	Protamex	3
Reke CM spiket	Protamex	3
Reke homCM	Protamex	3
Reke homCM spiket	Protamex	3

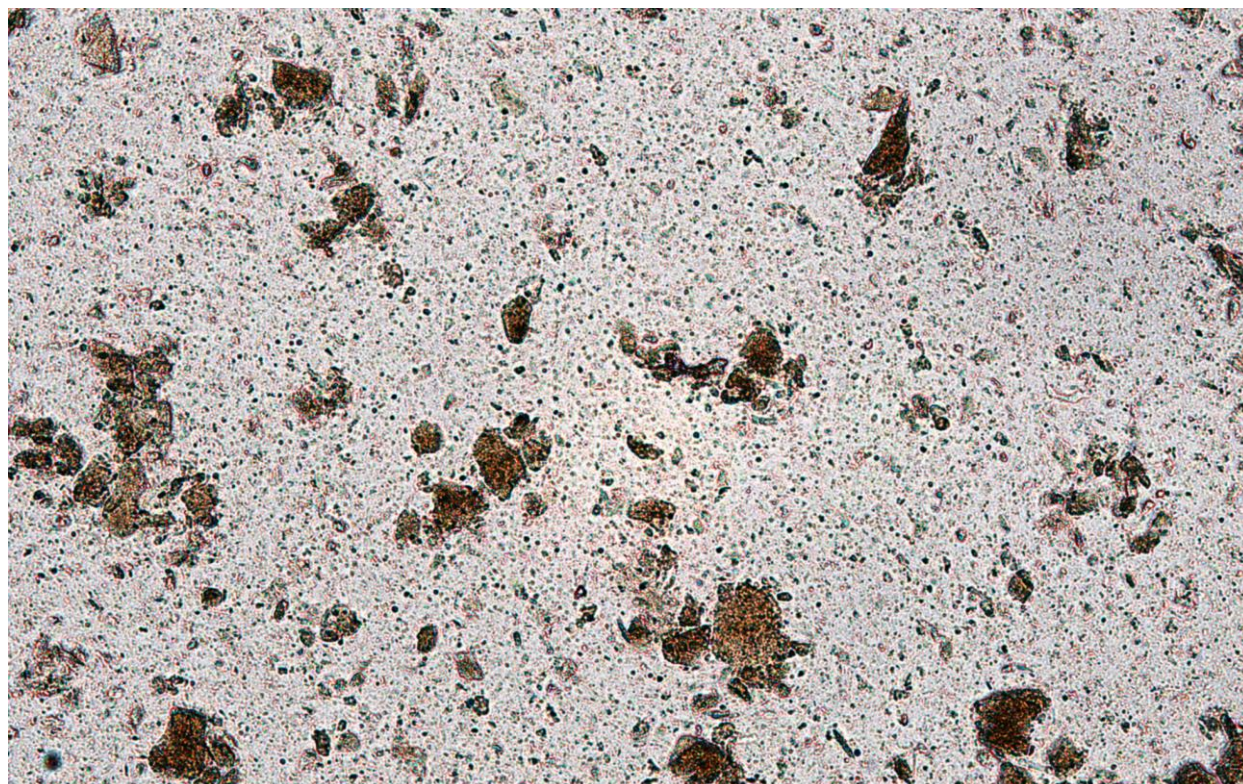
*Vedlegg 3 - Eksempel på mikroskopbilde av homogenisert blåskjell ved 10x forstørrelse, inkubert over natten*



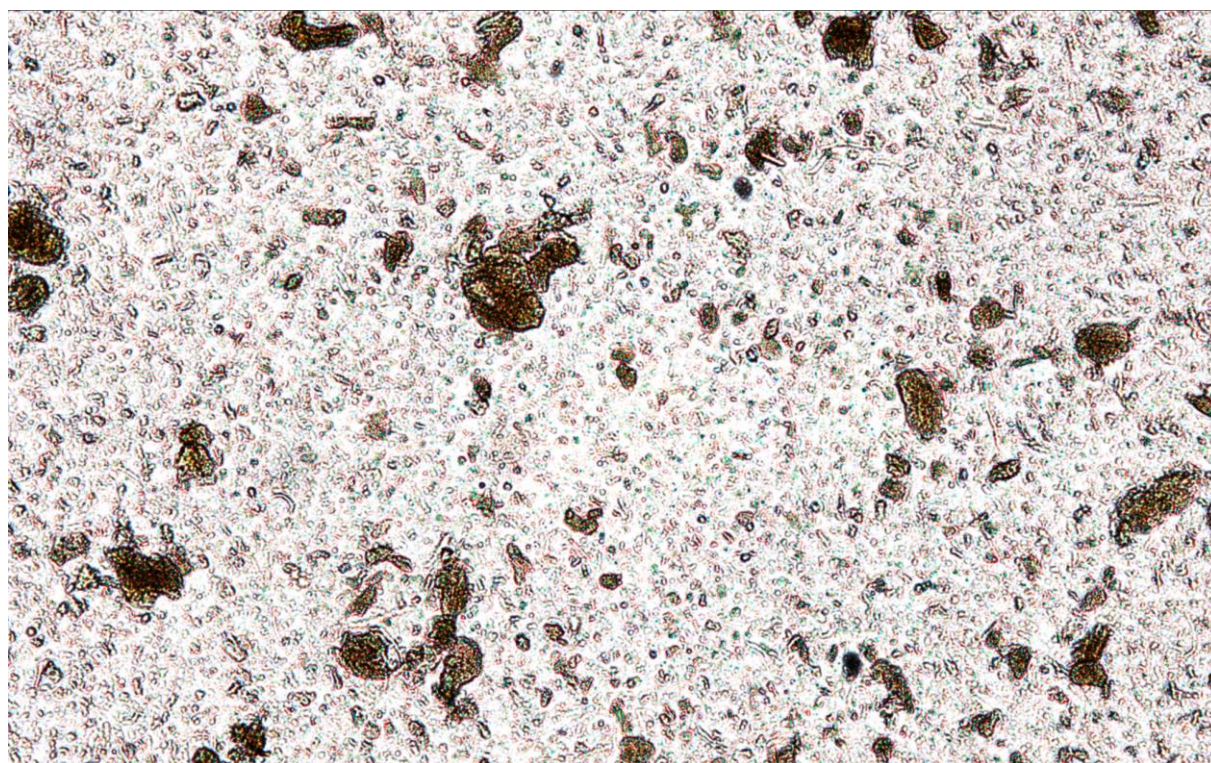
*Vedlegg 4 - Homogenisert blåskjell uten inkubering på varmerist, 10x forstørrelse*



*Vedlegg 5 - Homogeniserte blåskjell etter 10 minutter inkubering på varmerist, 10x forstørrelse*



*Vedlegg 6 - Homogenisert blåskjell etter 30 minutter inkubering på varmerist, 10x forstørrelse*



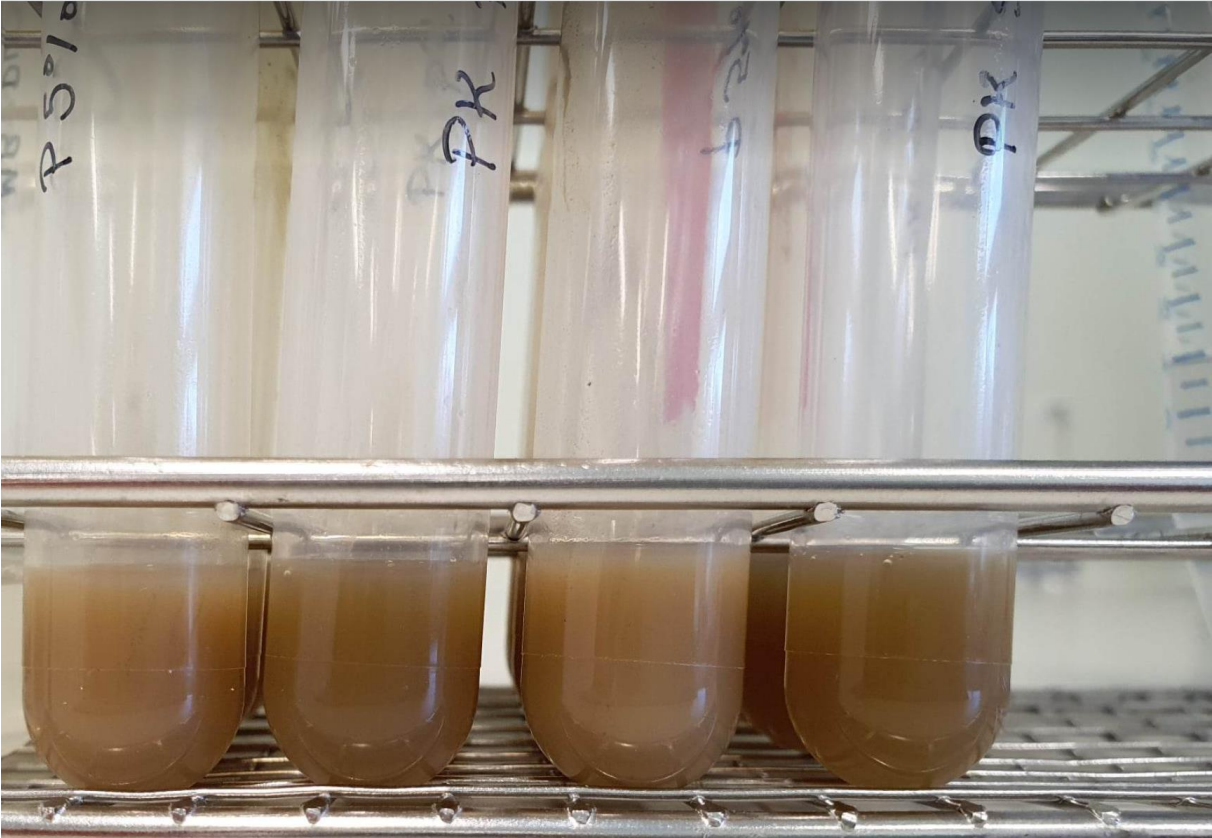
Vedlegg 7 - Liste over tillagde prøver og paralleller av blåskjell med ulik opparbeiding, med og uten spike. Hom = Homogenisert, CM = kryomøllet, HomCM = Homogenisert + kryomøllet

<b>Blåskjellprøve</b>	<b>Parallell</b>	<b>Merking prøve</b>
Hom	3	Hom (p1, p2, p3)
Hom + spike	3	Hom spike (p1, p2, p3)
CM	3	CM (p1, p2, p3)
CM + spike	3	CM spike (p1, p2, p3)
HomCM	3	HomCM (p1, p2, p3)
HomCM + spike	3	HomCM spike (p1, p2, p3)
Metodeblank MQ spike	3	Met.blk (p1, p2, p3)
Metodeblank MQ	3	Met.blk p1

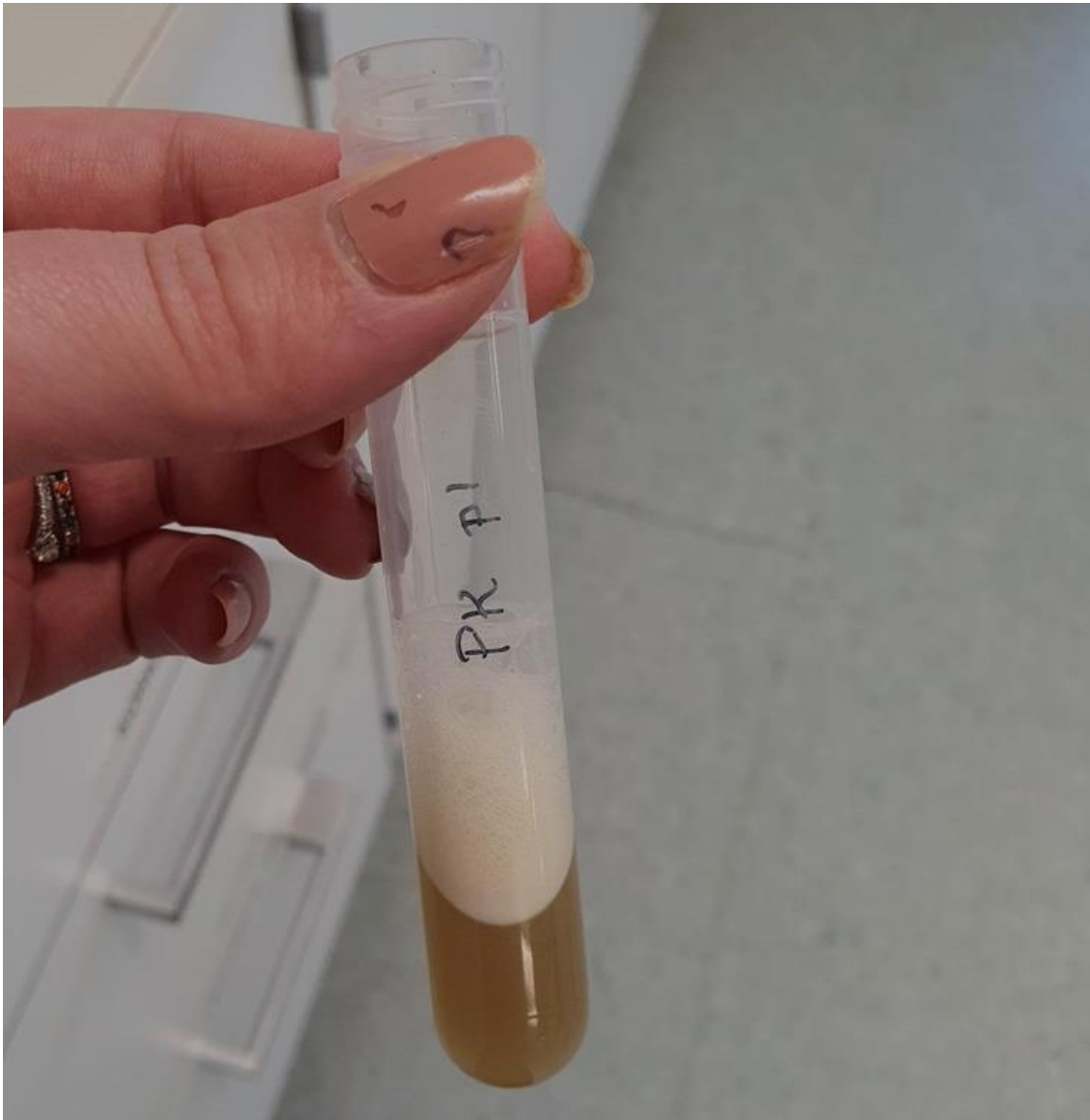
Vedlegg 8 - Liste over tillagde prøver og paralleller av reke med ulik opparbeiding, med og uten spike. Hom = Homogenisert, CM = kryomøllet, HomCM = Homogenisert + kryomøllet

<b>Rekeprøve</b>	<b>Parallell</b>	<b>Merking prøve</b>
Hom	3	Hom (p1, p2, p3)
Hom + spike	3	Hom spike (p1, p2, p3)
CM	3	CM (p1, p2, p3)
CM + spike	3	CM spike (p1, p2, p3)
HomCM	3	HomCM (p1, p2, p3)
HomCM + spike	3	HomCM spike (p1, p2, p3)
Metodeblank MQ spike	3	Met.blk (p1, p2, p3)
Metodeblank MQ	3	Met.blk p1

Vedlegg 9 - Blåskjellprøver opparbeidet med ulikt enzym, etter inkubering på varmerist



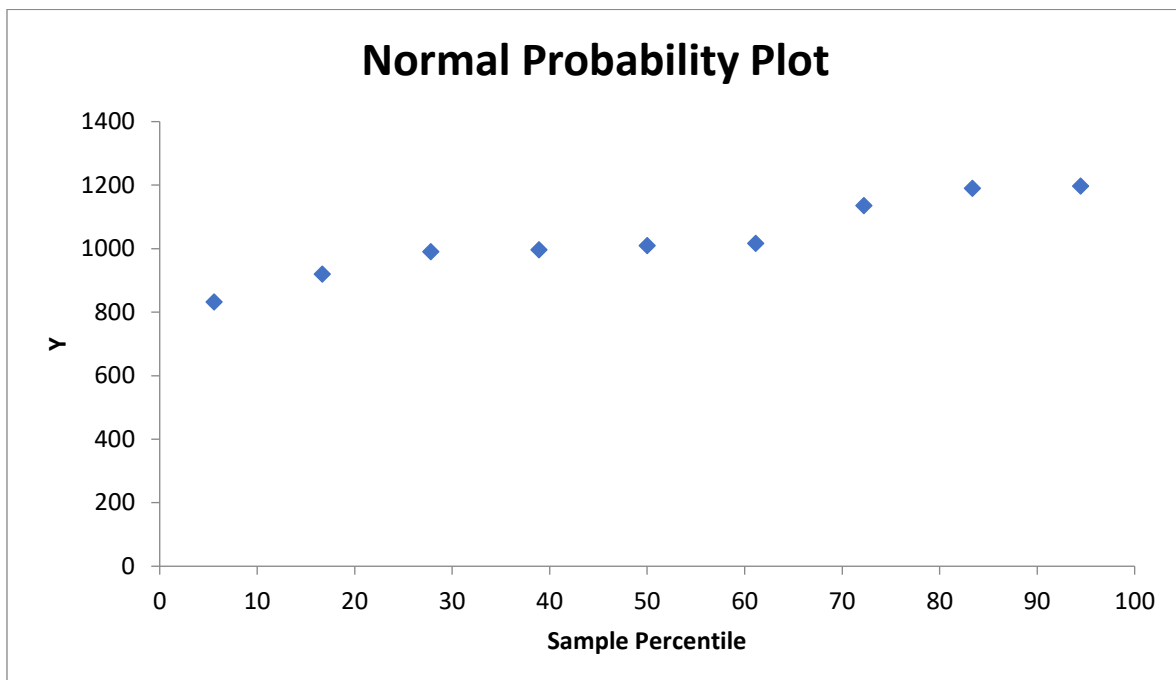
*Vedlegg 10 - Parallell av blåskjell tilsatt proteinase K og SDS. Det kan observeres et skumlag fra SDS*



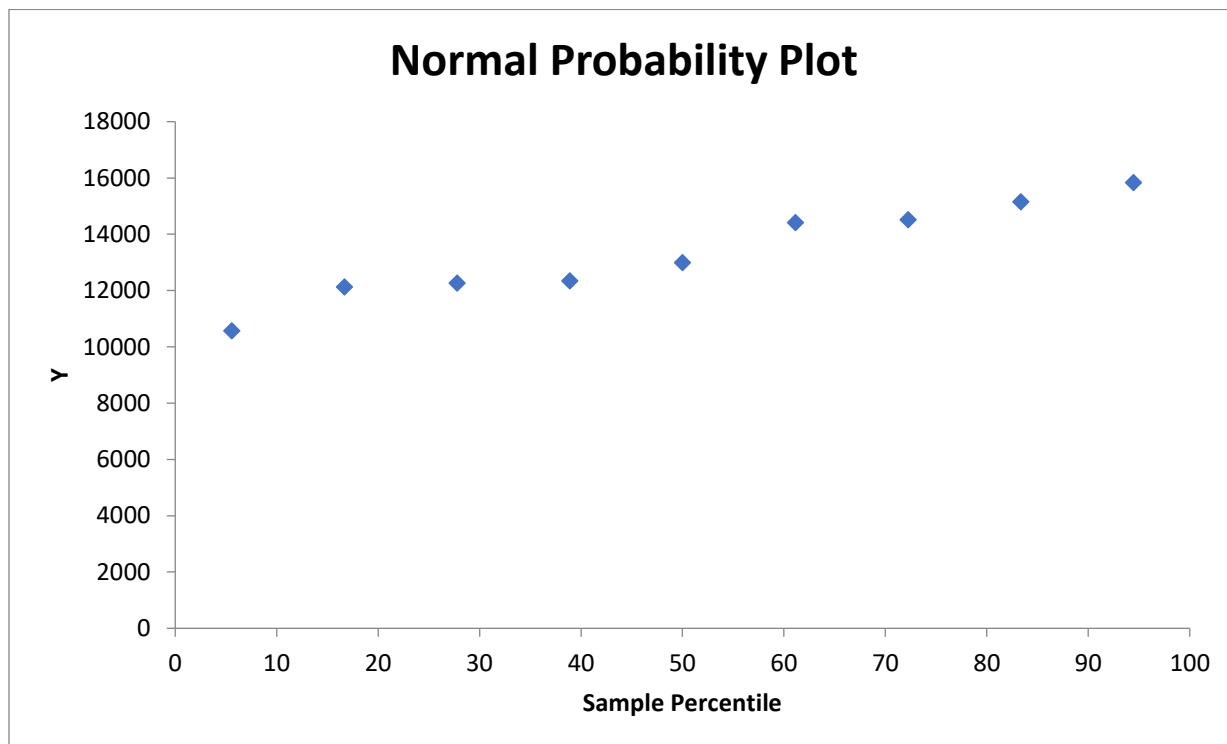
Vedlegg 11 - Blankprøve med proteinase K og SDS, det kan observeres et skum-lag fra SDS



Vedlegg 12 - Normal sannsynlighetsplott for MP-størrelse for blåskjellprøver med ulike homogenisering. Målingene er basert på mikroskopbilder for de ulike opparbeidingene



Vedlegg 13 - Normal sannsynlighetsplott for MP-antall for blåskjellprøver med ulik homogenisering. Målingene er basert på mikroskopbilder for de ulike opparbeidingene



Vedlegg 14 - Fordeling av MP-størrelse for mikroskopbilder av CM paralleller

Parallell	Gjennomsnitt	Median	Størst	Minst
1.1	886,144	800,778	6753,735	365,244
1.2	838,209	753,255	7750,17	365,244
1.3	774,064	700,185	3529,381	359,559
2.1	771,064	702,336	7651,982	365,535
2.2	1055,731	873,5205	6664,9	363,207
2.3	932,464	809,21	7621,45	362,503
3.1	899,044	792,404	5254,493	362,503
3.2	1035,882	867,716	6506,051	360,256
3.3	1037,963	869,41	6518,684	360,995



*Vedlegg 15 - Fordeling av MP-størrelse for mikroskopbilder av HomCM paralleller*

<b>Parallell</b>	<b>Gjennomsnitt</b>	<b>Median</b>	<b>Størst</b>	<b>Minst</b>
1.1	1051,407	869,431	7629,954	359,559
1.2	1006,242	860,679	6163,032	362,503
1.3	972,928	833,376	6502,706	366,437
2.1	993,026	840,7045	5332,385	365,027
2.2	993,815	848,712	5196,831	360,256
2.3	1002,412	860,275	4903,305	365,704
3.1	829,604	749,06	4638,326	370,308
3.2	1143,982	926,268	6107,585	367,148
3.3	1077,57	878,025	6501,887	360,78

*Vedlegg 16 - Fordeling av MP-størrelse for mikroskopbilder av CM paralleller*

<b>Parallell</b>	<b>Gjennomsnitt</b>	<b>Median</b>	<b>Størst</b>	<b>Minst</b>
1.1	1216,111	984,231	6683,764	367,682
1.2	1104,117	929,9075	7449,861	360,955
1.3	1087,722	920,0235	5525,431	367,148
2.1	1179,468	960,912	6973,619	363,207
2.2	1276,164	1015,514	8619,952	362,503
2.3	1114,62	917,871	10944,51	367,148
3.1	1203,112	960,1745	7823,39	373,8
3.2	1151,912	937,936	7430,533	367,148
3.3	1235,699	979,196	7739,806	349,244

*Vedlegg 17 - Fordeling av MP-størrelse for mikroskopbilder av paralleller opparbeidet med proteinase K og protamex*

<b>Proteinase K</b>			<b>Protamex</b>		
<b>Parallell</b>	<b>Medianstørrelse</b>	<b>Antall MPer</b>	<b>Parallell</b>	<b>Medianstørrelse</b>	<b>Antall MPer</b>
1.1	949,9535	67848	p1	924,8985	38434
1.2	900,5695	33537	p2	942,742	37461
1.3	964,4365	63946	p3	927,0795	43342
2.1	969,8125	67746	p4	930,334	46517
2.2	950,4485	70554	p5	912,481	21247
2.3	967,355	58122	p6	933,035	32569
<b>3.1</b>	1003,575	44405	p7	922,5	42028
<b>3.2</b>	996,6295	43556	p8	911	28585
<b>3.3</b>	974,206	63971	p9	929,873	41155

Vedlegg 18 - Rådata for sp-ICP-MS, Au NP-er med ulik opparbeiding

		TE	Antall partikler	Partikkelkons (partikler/L)	Massekons (ng/L)	Medianstr (nm)	Fullkantsignal (Cps)	Partikkel baseline (Cps)	PTD (Cps)
IonicBlk	Vann	3101					108.68		
IonicStd (RM)	0Au+	3102					1582438.38		0
IonicStd (RM)	10Au+	3103						1591442	
Sample	AuRM_p1	3106	1300				13115.42	5864	6095181
RM	AuRM_p2	3107	1349	4.90E+07	80.8		59 13017.88	5883	100000
Sample	MBProtaremex_p1	3110	5	5.70E+04	0.8		47 1639.89	4678	6095181
Sample	Hom_p1	3111	490	1.60E+07	35.5		59 228484.09	264762	6095181
Sample	HomCM_p1	3112	555	2.50E+07	48.1		59 204258.63	218114	6095181
Sample	CM_p1	3201	524	1.90E+07	41.9		60 246420.8	240891	6095181
Sample	MBProtaremex_p2	3203	3	1.80E+05	0.2		51 3507.60	0	6095181
Sample	Hom_p2	3204	404	1.30E+07	29.2		59 226128.66	2076493	6095181
Sample	HomCM_p2	3205	488	2.10E+07	32.2		59 223525.66	2006234	6095181
Sample	CM_p2	3206	493	2.30E+07	52.8		60 219174.73	2024121	6095181
Sample	Hom_p3	3209	425	1.40E+07	30.9		59 1226601.0	2261025	6095181
Sample	HomCM_p3	3211	519	2.30E+07	42.6		60 223528.01	2003523	6095181
Sample	CM_p3	3310	493	2.30E+07	52.7		60 223525.41	2274	6095181

Au

Vedlegg 19 - Rådata for sp-ICP-MS for TiO<sub>2</sub> NP-er med ulik opparbeiding

Prøvetype	Prøvenavn	Beholder	TE	Antall partikler	Titan		Fullkvaltsignal (CPS)	Partikkel b: PTD (CPS)
					Partikkel/L (ng/L)	Medianstr (nm)		
IonicBlk	Vann	3101						
Sample	Vann	3101	0.52	0 0.0E+0	0.0	622.70	0	14748297
Sample	Vann	3101	0.52	2 5.8E+4	0.0	646.25	7	14748297
Sample	Vann	3101	0.52	1 2.9E+4	0.0	53 798.40	0	14748297
Sample	Vann	3101	0.52	3 8.6E+4	0.4	59 1337.16	3456	14748297
IonicStd (RM)	0Au+	3102						
IonicStd (RM)	10Au+	3103						
IonicStd (AN)	OTI+	3104				359504.78	362993	
IonicStd (AN)	10TI+	3105				3253933.50	3264384	
Sample	AuRM_p1	3106						
RM	AuRM_p2	3107						
RM	AuRM_p3	3108						
Sample	MBPproteinassek_p1	3109	0.52	2 5.8E+4	0.0	507.23	1768	14748297
Sample	MBProtamex_p1	3110	0.52	0 0.0E+0	0.0	115063.75	105409	14748297
Sample	Hom_p1	3111	0.52	796 2.3E+7	43.3	260242.42	163636	14748297
Sample	HomCM_p1	3112	0.52	772 2.2E+7	40.9	254924.53	163904	14748297
Sample	CM_p1	3201	0.52	608 1.8E+7	29.2	61 224193.19	142141	14748297
Sample	MBPproteinassek_p2	3202	0.52	2 5.8E+4	0.2	118 1146.68	3030	14748297
Sample	MBProtamex_p2	3203	0.52	0 0.0E+0	0.0	133111.63	122413	14748297
Sample	Hom_p2	3204	0.52	814 2.3E+7	51.0	61 282344.13	167325	14748297
Sample	HomCM_p2	3205	0.52	672 1.9E+7	34.3	60 230627.48	146866	14748297
Sample	CM_p2	3206	0.52	843 2.4E+7	42.7	61 269552.44	164008	14748297
Sample	MBPproteinassek_p3	3207	0.52	4 1.2E+5	0.8	104 2070.56	3774	14748297
Sample	Hom_p3	3209	0.52	983 2.8E+7	86.8	63 370745.75	201324	14748297
Sample	CM_p3	3211	0.52	829 2.4E+7	41.4	62 267458.06	170646	14748297
Sample	HomCM_p3	3310	0.52	671 1.9E+7	34.1	60 230626.41	146860	14748297
Sample	SDS	3212	0.52	1 2.9E+4	0.0	64 415.57	0	14748297
Sample	MBProtamex_p3	3308	0.52	0 0.0E+0	0.0	59.40	0	14748297

*Vedlegg 20 - Vekt (g) av filtrerte blåskjellprøver opparbeidet med Proteinase K og protamex, tabell inneholder vekt av filterpapir, opprinnelig blåskjellvekt, vekt av filter etter filtrering og mengde ufiltrert blåskjell*

	<b>Vekt filter (g)</b>	<b>Vekt etter filtrering</b>	<b>Blåskjell i opprinnelig prøve (g):</b>	<b>Ufiltrert blåskjell (g):</b>
Protamex p1	1,4576	1,5394	0,5069	0,0818
Protamex p2	1,4940	1,5739	0,5014	0,0799
Protamex p3	1,4537	1,5170	0,5030	0,0633
Proteinase K p1	1,4342	1,4507	0,5011	0,0165
Proteinase K p2	1,4691	1,4890	0,5051	0,0199
Proteinase K p3	1,4382	1,4566	0,4960	0,0184

*Vedlegg 21 - Paralleller av blankprøver med proteinase K og protamex fra filtrering*

<b>Parallell</b>	<b>Vekt filter</b>	<b>Vekt etter filtrering</b>	<b>Ufiltrert enzym i filter</b>
P5% blank p1	1,4796	1,5562	0,077
P5% blank p2	1,4516	1,5138	0,0622
PK blank p1	1,5102	1,5196	0,0094
PK blank p2	1,4821	1,4921	0,0100

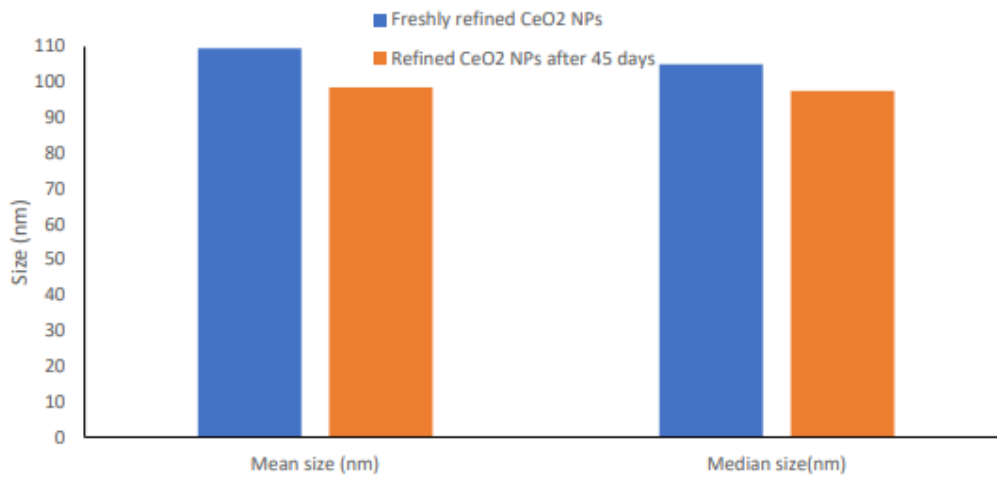
Vedlegg 22 - Rådata for sp-ICP-MS analyse for Au NPer i prøver med ulikt enzym

Prøvetype	Prøvenavn	Beholder	TE	Au		Medianstr (nm)	Fullkvalitetsignal (CPS)	Partikkel baseline (CPS)	PTD (CPS)
				Antall partikler (partikler/L)	Massekons (ng/L)				
Blank	Vann	3101					514.50	0	6095181
Sample	OAU+	3102		15				0	6095181
Sample	(A10)Au+	3103					2336563.00	2352211	6095181
Sample	OTI+	3104		4				7009	6095181
Sample	(A10)TI+	3105						5650	6095181
RM	Au RM	3106	0,54	1492	4,9E+7	108.0	59 27777.46	4290	210000
Sample	Vann	2	0,54	0	0,0E+0	0.0	1139.08	0	6095181
Sample	PK sp. p1	3107	0,54	704	2,3E+7	50.9	60 271051.25	264762	6095181
Sample	MB PK sp. p1	3108	0,54	273	9,0E+6	20.6	60 219171.73	218114	6095181
Sample	Vaskeløsning	5	0,54	87	2,9E+6	97.0	59 178384.73	176252	6095181
Sample	PK p1	3109	0,54	3	9,9E+4	0.2	48 3171.90	4679	6095181
Sample	Pmex 5% sp. p1	3110	0,54	577	1,9E+7	38.2	58 246420.80	240891	6095181
Sample	Vaskeløsning	5	0,54	72	2,4E+6	7.1	59 125785.61	127405	6095181
Sample	Pmex 5% p1	3111	0,54	0	0,0E+0	0.0	3352.94	0	6095181
Sample	MB Pmex 5% sp p1	3112	0,54	490	1,6E+7	35.5	59 226601.00	223965	6095181
Sample	Vaskeløsning	5	0,54	57	1,9E+6	7.9	59 125750.68	129194	6095181
Sample	Pmex 5% p2	3201	0,54	0	0,0E+0	0.0	2665.05	0	6095181
Sample	Pmex 5% sp. p2	3202	0,54	654	2,2E+7	47.2	59 262098.27	256931	6095181
Sample	Vaskeløsning	5	0,54	40	1,3E+6	3.4	51 117648.25	117792	6095181
Sample	MB PK sp p2	3203	0,54	574	1,9E+7	41.9	60 204258.63	201661	6095181
Sample	PK sp p2	3204	0,54	545	1,8E+7	38.3	59 247766.73	242081	6095181
Sample	Vaskeløsning	5	0,54	33	1,1E+6	2.1	54 120002.41	116252	6095181
Sample	MB Pmex 5% sp p2	3205	0,54	404	1,3E+7	29.2	59 228484.09	226972	6095181
Sample	PK p2	3206	0,54	0	0,0E+0	0.0	1173.77	0	6095181
Sample	Vaskeløsning	5	0,54	27	8,9E+5	1.7	52 118708.80	115385	6095181
Sample	PK p3	3207	0,54	0	0,0E+0	0.0	1131.60	0	6095181
Sample	Pmex 5% sp p3	3208	0,54	646	2,1E+7	46.4	59 265542.06	260384	6095181
Sample	Vaskeløsning	5	0,54	32	1,1E+6	12.2	51 116432.33	119978	6095181
Sample	MB PK sp p3	3209	0,54	707	2,3E+7	52.8	60 223525.66	218280	6095181
Sample	Pmex 5% p3	3210	0,54	0	0,0E+0	0.0	1651.05	0	6095181
Sample	Vaskeløsning	5	0,54	28	9,3E+5	1.4	46 115985.55	111038	6095181
Sample	PK sp p3	3211	0,54	543	1,8E+7	36.6	58 245119.98	240464	6095181
Sample	MB Pmex 5% sp p3	3212	0,54	425	1,4E+7	30.9	59 226128.66	224422	6095181
Sample	Vaskeløsning	5	0,54	33	1,1E+6	2.7	56 118460.32	119789	6095181
Sample	Vann	3101	0,54	0	0,0E+0	0.0	297.95	0	6095181

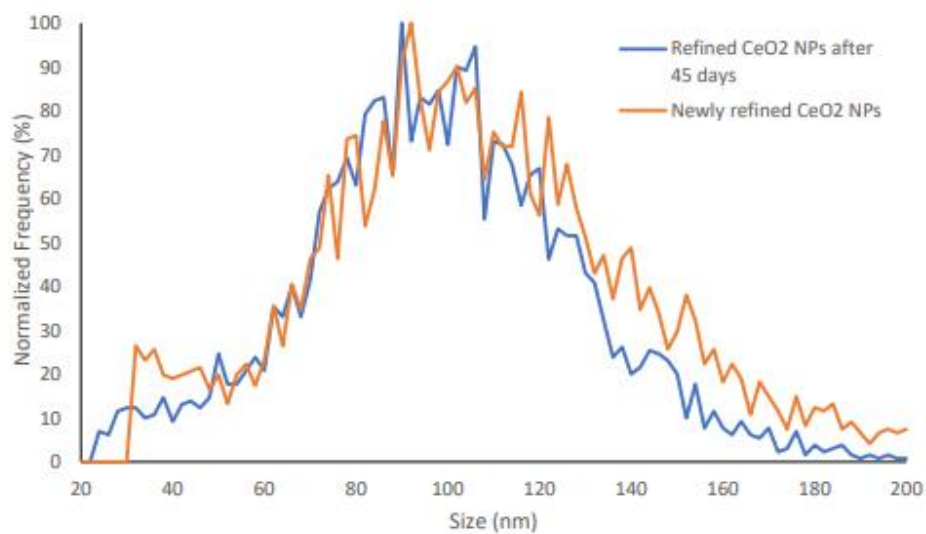
Vedlegg 23 - Rådata fra sp-ICP-MS for TiO<sub>2</sub> NP-er i prøver med ulikt enzym

Titan										
Prøvetype	Prøvenavn	Beholder	TE	Antall partikler	Partikkelkons (partikler/L)	Massekons (ng/L)	Medianstr (nm)	Fullkantsignal (CPS)	Partikkel baseline (CPS)	PTD (CPS)
IonicBlk	Vann	3101						786.64		0
Sample	0Au+	3102								1988796
IonicStd (A10Au+		3103								
Sample	0Ti+	3104		104					8692	1988796
IonicStd (A10Ti+		3105							2978470	4410000
RM	Au RM	3106								
Sample	Vann	2	0,54	0	0.0E+0	0.0		319.58		0
Sample	PK sp. p1	3107	0,54	1214	4.0E+7	115.3	64	35973.36	17185	1988796
Sample	MB PK sp. p1	3108	0,54	20	6.6E+5	14.6	149	3521.86	4227	1988796
Sample	Vaskeløsning	5	0,54	97	3.2E+6	4.2	60	8639.68	6328	1988796
Sample	Pmex 5% sp. p1	3110	0,54	1030	3.4E+7	44.1	60	20739.27	7143	1988796
Sample	Vaskeløsning	5	0,54	43	1.4E+6	3.3	61	8400.98	6351	1988796
Sample	Pmex 5% p1	3111	0,54	1454	4.8E+7	62.6	61	24429.88	7153	1988796
Sample	MB Pmex 5% sp p1	3112	0,54	10	3.3E+5	3.8	150	9102.26	6530	1988796
Sample	Vaskeløsning	5	0,54	23	7.6E+5	3.1	85	8459.12	6375	1988796
Sample	Pmex 5% sp. p2	3202	0,54	1246	4.1E+7	96.6	62	33302.84	15402	1988796
Sample	Vaskeløsning	5	0,54	31	1.0E+6	1.9	65	8226.00	6373	1988796
Sample	MB PK sp p2	3203	0,54	15	5.0E+5	12.6	140	2958.32	3591	1988796
Sample	Vaskeløsning	5	0,54	23	7.6E+5	1.8	60	8266.29	6398	1988796
Sample	MB Pmex 5% sp p2	3205	0,54	10	3.3E+5	4.6	159	9223.17	6519	1988796
Sample	PK sp p2	3206	0,54	1101	3.6E+7	283.8	65	66454.85	24652	1988796
Sample	Vaskeløsning	5	0,54	29	9.6E+5	3.4	62	8397.84	6360	1988796
Sample	PK sp p3	3207	0,54	1271	4.2E+7	98.9	63	33557.98	15342	1988796
Sample	Pmex 5% sp p3	3208	0,54	1151	3.8E+7	93.5	64	31876.82	16946	1988796
Sample	Vaskeløsning	5	0,54	16	5.3E+5	0.6	58	7838.96	9500	1988796
Sample	MB PK sp p3	3209	0,54	22	7.3E+5	3.6	67	1342.77	2988	1988796
Sample	Vaskeløsning	5	0,54	21	7.0E+5	2.0	57	8205.74	6369	1988796
Sample	MB Pmex 5% sp p3	3212	0,54	6	2.0E+5	14.9	215	10585.85	6415	1988796
Sample	Vaskeløsning	5	0,54	11	3.6E+5	2.0	102	8339.93	6420	1988796
Sample	Vann	3101	0,54	0	0.0E+0	0.0		906.90	0	1988796

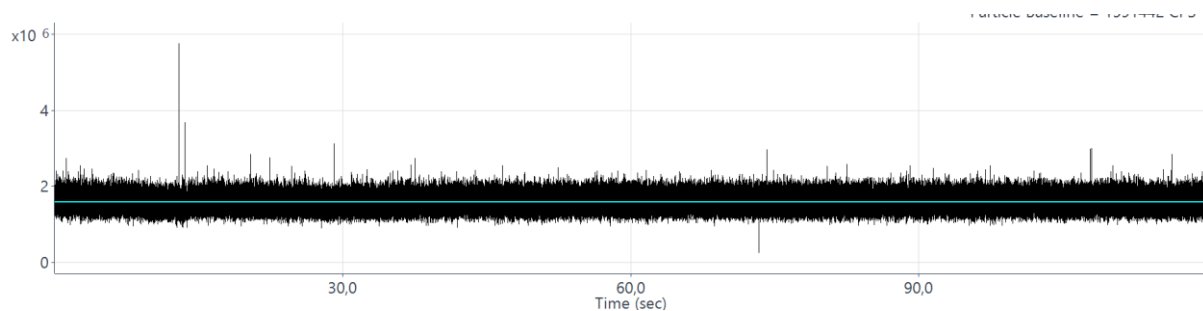
Vedlegg 24 – CeO<sub>2</sub> partikler over tid, lånt fra Mathias Simonsens masterprosjekt (Simonsen, 2022)



Vedlegg 25 - CeO<sub>2</sub> partikler over tid, lånt fra Mathias Simonsens masterprosjekt (Simonsen, 2022)



Vedlegg 26 - Ionisk standard med stabilt signal





Vedlegg 27 - Rekeprøver med og uten skall til kryomølle

