



## **DETERMINATION OF TRACE AMOUNTS OF MERCURY BY TDA AAS IN URINE OF PERSONS SUSPECTED TO BE EXPOSED TO MERCURY FROM AMALGAM FILLINGS**

Jadwiga POLICHT-GĄSSOWSKA, Teresa LECH, Wojciech LECHOWICZ, Piotr ADAMOWICZ, Dominik BAKALARZ, Joanna GIEROŃ, Dominika GIL, Anna MIKOŁAJCZYK, Bogdan TOKARCZYK

*Institute of Forensic Research, Kraków, Poland*

### **Abstract**

The correct interpretation of analysis results in assessments of exposure to toxic metals requires knowledge about their levels in biological material in different human populations. In the case of mercury, some additional information is required, e.g. on whether tested persons consume a diet rich in fish or have amalgam fillings. The thermal decomposition, amalgamation, and atomic absorption spectrometry method (TDA AAS) is one of the latest methods used to determine trace amounts of mercury in different biological materials. The aim of the study was to evaluate mercury levels in the urine of adult people in two groups: a control group – people not occupationally exposed to mercury vapour and without amalgam fillings ( $n = 15$ ) and a studied group – people suspected of being exposed to mercury vapours from amalgam fillings in the oral cavity ( $n = 10$ ), by means of TDA AAS. Urinary mercury concentrations in both examined groups were in the range from 0.14 to 1.30  $\mu\text{g/l}$  (mean: 0.24 and 0.63  $\mu\text{g/l}$  respectively, median: 0.18 and 0.70  $\mu\text{g/l}$  respectively) and the differences between groups were statistically significant ( $p < 0.05$ ). The mercury levels in urine in all the examined samples were within the range of reference values for people not exposed to the action of mercury compounds.

### **Keywords**

Mercury; Urine; TDA AAS; Amalgam filling.

*Received 28 May 2019; accepted 9 July 2019*

### **1. Introduction**

Mercury (Hg) is considered to be one of the most harmful metals, apart from lead and cadmium, for humans and the natural environment. Until now, no biological function has been identified that this heavy metal performs in living organisms. It occurs in the form of metallic mercury and mercury compounds, both inorganic and organic. Its inorganic forms include metallic mercury in the form of liquid and its vapours, as well as Hg(I) and Hg(II) compounds, while its organic forms include mainly methyl and ethyl mercury.

Mercury has been used for centuries in various branches of industry (in non-ferrous metal works, in the production of steel, batteries and discharge lamps, in electrochemistry, in the production of chlorine from sodium chloride, etc.) and in the last decades it has also been used for medical purposes (in thermometers and pressure gauges, in the form of disinfectants and dewormers, now phased out; Clarkson, Magos, 2006; Kobylecka, Lech, 1997). The numerous applications of mercury and its compounds have caused an increase in occupational exposure and accidental poisoning. There have also been cases of deliberate, chronic

or acute poisonings with mercury or its compounds (Lech, Sadlik, Kobylecka, 1998; Lech, Goszcz, 2012; Lech, 2014, 2015).

In nature, the highest concentrations of this element are found in coal and bituminous shales and in alkaline crystalline rocks. Also natural emissions, mainly volcanic and underwater emissions, increase the pool of mercury circulating in the environment. The circulation of mercury of natural origin in the form of vapour has a significant impact on its content in soil and water. Accumulation of mercury in food from the sea and land is a source of alkylmercury compounds, mainly methylmercury, taken up by living organisms. Predatory fish species at the top of the food chain are characterized by a much higher accumulation of methylmercury than other species. However, accumulation of mercury is linked not only to the position of fish in the food chain, but also to their age, mobility and where they live. Methylmercury can also change from less to more bioavailable forms of mercury under these conditions, mainly due to the possibility of eliminating the xenobiotic from the organism. In humans, the efficiency of absorption of alkylmercury through the gut is about 95%, while that of inorganic mercury compounds – about 7% (Mania, Wojciechowska-Mazurek, Starska, Rebeniak, Postupolski, 2012; Chmielnicka, 2009).

Particular attention is currently paid to those forms of mercury that affect public health. An example is exposure to metallic mercury vapours, which, although already known about back in ancient times, is now also relevant, especially in the working environment of various occupational groups, including dentists. Exposure to mercury from amalgams used in dentistry (exposure to vapours) and from ingested fish containing elevated levels of mercury, methyl mercury and ethyl mercury have been issues for many decades (Clarkson, Magos, 2006). There is another potential exposure risk from the organic form of mercury – ethylmercury added in the form of thimerosal (thiomersal) to some vaccines (Pichichero et al., 2008). This procedure also has its contribution in public health assessment. Thimerosal is also used as a preservative and bactericide in eye drops, contact lens fluids and desensitisers.

Amalgam has been used in dentistry since 1890. It is a metallic material constituting a prosthetic filling used for direct filling of cavities or structural defects in teeth. It is a combination of mercury (in liquid form), the content of which is estimated at approximately 50%, and amalgam alloy (powder) containing mainly silver, tin and copper (Koral, 2009), and sometimes zinc. Dental amalgam releases mercury vapours, which may be absorbed and probably have toxic ac-

tion, similarly to mercury vapours inhaled from external sources, e.g. from occupational exposure (mercury in the form of vapours absorbed by the respiratory tract is 80% retained in the body). However, there is no convincing evidence so far that dental amalgam can cause harmful side effects (Clarkson, Magos, 2006). The use of dental amalgams and their substitutes is regulated by European Council Directive 93/42/EEC concerning medical devices, in accordance with which they must meet certain requirements, in particular with regard to the health and safety of patients (SCENIHR, 2015).

The assessment of mercury exposure in living subjects is most often carried out on the basis of the results of analysis of blood, urine and hair samples. Correct interpretation of the results requires knowledge of the levels occurring in different populations (national, foreign, adult, child, staff employed in various posts), as well as information on possible excessive consumption of fish or having amalgam fillings, in the people undergoing exposure assessment. This is particularly important where one type of material, such as urine or blood, has been made available for testing. For exposure to mercury vapours (e.g. from amalgam) and low concentrations of inorganic mercury, urine appears to be the better material to assess, as the biological half-life of this metal in the blood is relatively short – from a few to 40 days (Morton, Mason, Ritchie, White, 2004), but it accumulates mainly in the kidneys and is excreted over a longer period of time in the urine. The study of serum mercury levels is not recommended for use in biological monitoring (Zimmer et al., 2002).

Among the methods for the determination of total mercury in biological material, the following are currently mainly used: the cold vapour atomic absorption spectrometry technique (CV AAS) (Bettinelli, Spezia, Rouchi, Minoia, 2002; Gochfeld, 2003; Kobylecka, Lech, 1997; Lech, Sadlik, 2004) and inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS; Bettinelli et al, 2002; Gochfeld, 2003; Goullé et al., 2005; Mc Kelvey et al., 2007). X-ray fluorescence (XRF) enables non-destructive mercury analysis in solid tissues (e.g. hair segmentation analysis; Gochfeld, 2003). In cases of acute poisonings (when Hg concentrations are higher), inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP OES) can be used (Lech, 2014).

All of the above mentioned techniques (except XRF) require the pre-treatment of a sample of biological material, usually hot digestion (usually under increased pressure) with concentrated acids, with the addition of an oxidizing agent (e.g. hydrogen peroxide) in a separate apparatus, so-called mineralization, for which different sample sizes are collected depending

on the method of mercury determination. For example, the currently applied CV AAS technique using the Thermo MQZe atomic absorption spectrometer requires the mineralization of samples in a microwave system or in closed apparatus, e.g. Bethge type, with collection of 1–10 ml of blood, 10–50 ml of urine, or 0.2–0.5 g of hair.

Standard CV AAS techniques provide reliable results in the  $\mu\text{g/l}$  concentration range, but require – as mentioned above – a laborious material preparation step for analysis in separate instruments, and relatively large samples. Some of the latest techniques enable the thermal decomposition of liquid and/or solid samples and the measurement of the atomic absorption of mercury within a single apparatus. Determination of mercury in very small concentrations (trace or ultra-trace amounts, at the level of ppb or even ppt) takes place after the introduction of small samples into the apparatus: 0.1–0.2 ml liquid or 10–20 mg solid samples. Such possibilities are offered, for example, by the method of thermal decomposition, amalgamation, and atomic absorption spectrometry (TDA AAS), used so far mainly to study fish and seafood (Torres, Martins-Teixeira, Silva, Queiroz, 2012), and quite recently – to analyze samples of biological material, such as blood and hair in environmental studies (Kuras, Janasik, Stanisławska, Kozłowska, Wąsowicz, 2017) and blood, urine, hair, bile and vitreous body (humour) in post-mortem examinations (Lech, Turek, 2019).

The introduction into toxicological analysis of very sensitive and accurate methods for the determination of a metal with strong toxic properties, such as mercury, has great significance, especially when the results of the analysis are used for forensic purposes to interpret concentrations and correctly assess exposure (when alive) or to determine the cause of death. Levels that were considered until recently as reference levels are changing and there is a constant need for them to be updated (Ewers, Krause, Schultz, Wilhelm. 1999; Nuttall, 2004; Ozuah, 2000; Risher, Nickle, Amler, 2003). Therefore, an attempt was made to determine the levels of mercury in urine by the TDA AAS method in the control group – in persons who have not been occupationally exposed to mercury vapours and do not have amalgam fillings, and in the studied group – in persons potentially exposed due to amalgam fillings, in order to possibly make use of the results when issuing expert opinions in cases of suspicion of poisoning by mercury and its compounds.

## 2. Materials and methods

Urine samples for analysis were collected from two groups of adults:

- control group (total  $n = 15$ ; number of men  $n = 6$ , number of women  $n = 9$ ), aged 24–67,
- studied group (total  $n = 10$ ; number of men  $n = 1$ , number of women  $n = 9$ ), aged 19–53, encompassing persons with many years of amalgam fillings in their dentition (number of fillings: 1 to 7).

A certified standard of mercury (1000 mg/l) and concentrated (65%) nitric acid (Suprapur) from Merck (Warsaw, Polska) were used in the study.

The accuracy of the method was checked using certified urine reference materials: Seronorm Trace Elements Urine L-1 and Seronorm Trace Elements Urine L-2 by Sero (AS, Norway), as well as by participating in international proficiency tests under the German External Quality Assessment Scheme (G-EQUAS, Erlangen, Germany).

The ultrapure water (18.2 m $\Omega$ ) used to prepare a 100 ng/ml standard mercury solution and certified reference materials in urine was obtained from the Direct-Q system by Millipore (USA).

Milestone (Italy) quartz boats were used to analyze urine samples and standard mercury solutions.

Urine samples were analysed for mercury content by TDA AAS using Milestone's Direct Mercury Analyzer DMA-80 Dual Cell (Italy-Switzerland-Germany co-production) applying the operating parameters given in Table 1. Before each series of determinations, a control was carried out using a standard mercury curve prepared by the manufacturer, and a mercury standard at a concentration of 100 ng/ml (prepared just before the analysis).

Table 1  
*Direct Mercury Analyzer DMA-80 Dual Cell measurement parameters in urine*

Parameter	Value	
Oxygen flow	200 ml/min	
Oxygen inlet pressure	5 bar	
	temperature	time
Drying	200°C	60 s
Mineralization	650°C	120 s
Catalysis		60 s
Purge time	–	60 s
Amalgam heater time	650°C	12s
Purge time	–	60 s

Two urine samples ( $2 \times 0.1$  ml) were collected for analysis from each of the subjects, which were deposited directly onto the quartz boats.

### 3. Validation parameters of the method

In the validation process for this analytical procedure, the limits of detection and quantification, LOD = 0.12  $\mu\text{g/l}$  and LOQ = 1.0  $\mu\text{g/l}$ , respectively, were determined. In the concentration range of 1–25  $\mu\text{g/l}$ , Mandel's test showed that the relationship between the signal and the mercury concentration was linear, whereas in the range of 5–200  $\mu\text{g/l}$ , a second degree polynomial equation was used to describe the calibration curve.

Precision and accuracy for the CRM Urine L-2 reference material at a concentration of 40.1  $\mu\text{g/l}$ , and CRM Urine at a concentration of 40.6  $\mu\text{g/l}$  were 0.82% and 1.47%, and 0.75% and 0.27%, respectively. Moreover, the repeatability and reproducibility of laboratory urine samples were checked at control concentrations within the range of the calibration curve (Table 2). The expanded uncertainty ( $k = 2$ , confidence level 95%) of the measurements was estimated based on the uncertainty budget. In the performed validation, the expanded uncertainty was 12%.

Table 2  
*Precision and reproducibility of the method for selected control levels of mercury in urine*

Concentration of Hg ( $\mu\text{g/l}$ )	Precision (%)	Reproducibility (%)
1.0	1.83	7.71
18.8	1.91	5.29
64.1	1.50	3.35

### 4. Results and discussion

The TDA AAS method described above enables a relatively simple and reliable determination of total mercury (elemental, inorganic and organic). The results of analysis of biological material including urine samples can be applied to assess human exposure to, e.g. metallic mercury vapours and low concentrations of inorganic mercury, especially in cases where there is no clear source of exposure to other forms of mercury (Kuras et al., 2017; Morton et al., 2004).

The modern method of assessing exposure to this metal using direct urine sample analysis in the Direct

Mercury Analyzer DMA-80 is a specific and relatively fast method. The high specificity of the method is influenced by the selective binding of trace amounts of mercury by gold, being a component of the amalgamator (3%), followed by its thermal desorption and selection of the analytical line  $\lambda = 253.65$  nm of mercury in the spectrophotometer (the interference filter placed in front of the detector allows separation of the spectral line  $\lambda = 253.65$  nm, the most characteristic for mercury; Torres et al., 2012).

The great advantage of this method is the ability to perform a full course of analysis with the decomposition of the biological matrix of the sample in one apparatus without the need to transfer the material from the sample mineralization device to the spectrophotometer. This ensures analysis of the material without loss of mercury, including due to volatility (mercury is the most volatile heavy metal), with good precision (for urine RSD < 5%) and a good detection limit (LOD = 0.12  $\mu\text{g/l}$ ), comparable to the limit established by other authors in studies on the determination of mercury in blood and urine samples by inductively coupled plasma mass spectrometry ICP-MS: 0.13  $\mu\text{g/l}$  (for standard solutions of the analyte in water), 0.17  $\mu\text{g/l}$  (for urine) and 0.26  $\mu\text{g/l}$  (for blood; Fong, Siu, Lee, Tam, 2007).

Using the TDA AAS method, the levels of mercury in adult urine were determined in two groups: control subjects not exposed to mercury, and persons possibly (potentially) exposed to mercury from dental amalgam located in the oral cavity as dentition filling. The mean urinary mercury concentration in the non-exposed (control) group was 0.24  $\mu\text{g/l}$  (median 0.18  $\mu\text{g/l}$ ) and in the concentration range of 0.14–0.43  $\mu\text{g/l}$  (Table 3). In the group of people with amalgam fillings (numbering from 1 to 7 fillings, for at least several years), the mercury concentration was higher: mean 0.63  $\mu\text{g/l}$  (median 0.70  $\mu\text{g/l}$ ) in the range 0.15–1.30  $\mu\text{g/l}$  (Table 4). The Mann-Whitney U test showed that the differences between the groups were statistically significant ( $p = 0.007$ ). Similar levels of mercury in urine to those shown in the present study were also observed in a studied group of Poznań residents. The Poznań study showed that the concentration of mercury in urine in persons from the control group (without amalgam fillings,  $n = 16$ ) ranged from 0.13 to 0.95  $\mu\text{g/l}$  (median 0.20  $\mu\text{g/l}$ ), and in the studied group ( $n = 22$ ) from 0.12 to 1.97  $\mu\text{g/l}$  (median 0.48  $\mu\text{g/l}$ ; Boszke, Kowalski, Surdacka, Czajka-Jakubowska, 2007).

The levels of mercury in urine shown in the present study in all tested samples are therefore within the range of reference values (in Poland and other coun-

tries) for people not exposed to the action of mercury compounds.

Until around 2000, urinary mercury concentrations considered “normal” (today – reference) for adults not exposed to mercury compounds – according to Ewers et al. (1999), Nuttall (2004) and Risher et al. (2003) – were 10–20 µg/l (in blood: 10–15 µg/l), but they have currently been replaced by lower ones. They are in the range of 1–8 µg/L in blood and 4–5 µg/L in urine for the general non-exposed population (WHO, 1990). Furthermore, the International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) and the International Commission on Occupational Health (ICOH) decided that the average blood mercury concentration of people who do not consume fish should not exceed 2 µg/L (Ye et al., 2016).

New methods (e.g. CV AAS, ICP-MS) introduced into toxicological analysis certainly have a huge impact on the levels detected. The reduction in the amount of mercury affecting human health is also linked to the increasing awareness of the types and magnitudes of sources of exposure. Risher et al. in 2003 noted that the levels of mercury in urine are not as high as previously reported in the literature and should be significantly lower, but they did not publish these levels.

Table 3

*Urinary mercury concentration in the control group*

No.	Sex	Number of amalgam fillings	Hg (µg/l)*	Median	Mean	SD
1	F	–	0.14	0.18	0.24	0.10
2	F	–	0.18			
3	M	–	0.43			
4	M	–	0.30			
5	F	–	0.15			
6	F	–	0.41			
7	F	–	0.19			
8	M	–	0.17			
9	F	–	0.15			
10	F	–	0.18			
11	M	–	0.17			
12	F	–	0.35			
13	M	–	0.17			
14	M	–	0.20			
15	F	–	0.37			

– without fillings

\* < LOQ, but lower mercury concentrations were quantitated with acceptable uncertainty, confirmed by reference material (Seronom Trace Elements Urine L-1)

It is known from our own research that the reference levels in urine collected from post-mortem (autopsy) material of the Polish population of people not exposed to mercury either occupationally or as a result of poisoning do not exceed 2.6 µg Hg/l (CV AAS; Lech, Sadlik, 2004). For this studied adult population, blood concentrations were  $1.6 \pm 1.2$  µg Hg/l (mean) and 1.4 µg Hg/l (median), respectively. However, in a group of living persons who were studied because of a suspicion of exposure to mercury vapour, the average urinary concentration of mercury determined using the same method (CV AAS) was  $1.7 \pm 1.6$  µg Hg/l in the range 0.4–6.2 µg Hg/l (Lech et al., 1998).

Mean concentrations of mercury in deceased people's urine (n = 11), established for the Polish population using the modern direct TDA AAS method, were  $0.85 \pm 0.63$  µg/l (median 0.81 µg/l) in the range of 0.16–2.19 µg/l (Lech, Turek, 2019).

For populations in other countries (e.g. Germany), the established reference levels for mercury in urine (recommended by the Commission on Human Biological Monitoring, January 1999) were also low: in urine in children aged 6–12 years, they were on average 1.4 µg/l; in urine in adults (who had no amalgam fillings) 1.0 µg/g creatinine; and in blood (in children and adults), 1.5–2.0 µg/l, depending on fish consumption. In March 1999, these values were slightly modified – the maximum acceptable values in children and adults were increased to 5 µg/g creatinine in urine, and 5 µg/l in blood (without specifying the method of analysis),

Table 4

*Urinary mercury concentration in the studied group*

No.	Sex	Number of amalgam fillings	Hg (µg/l)*	Median (n=9)	Mean (n=9)	SD (n=9)
1	F	1	1.07	0.70	0.63	0.40
2	F	1	0.80			
3	F	3	1.30			
4	F	1	0.81			
5	F	1	0.33			
6	M	1	0.36			
7	F	4	0.70			
8	F	7	0.20			
9	F	3	0.15			
10	F	3	nd			

F – woman; M – man

nd – not detected (< LOD)

\* see Table 3.



at which no negative health effects were observed in individual patients in the whole studied population (Ewers et al., 1999). The reference urine mercury concentrations for the French population determined by the ICP-MS method by Goullé et al. (2005) were also within this range and were 0.14–2.21  $\mu\text{g/l}$  (median 0.59  $\mu\text{g/l}$ ). As indicated by Nicolae, Ames and Quiñonez (2013), currently no adverse effects have been confirmed when mercury concentration in urine is below 7  $\mu\text{g/l}$  or 5  $\mu\text{g Hg/g}$  creatinine. The overall mean urinary concentration in the Canadian population was low: 0.22  $\mu\text{g/l}$  or 0.26  $\mu\text{g Hg/g}$  of creatinine.

In the present study, the levels of mercury in urine found in both groups (with dental fillings and the control group) are within the range of concentrations published for the Polish, German, French and Canadian populations. They are usually low, not exceeding 1.30  $\mu\text{g/l}$ , but are more than three times higher in the studied group (with from 1 to 7 dental amalgam fillings) than in the control group (encompassing persons without amalgam fillings in the oral cavity). It can therefore be concluded that several years after the installation of amalgam with mercury in the oral cavity, the concentrations of mercury in the urine only slightly increases compared to the control group. A similar conclusion was reached by Morton and colleagues (2004), who assessed the occupational exposure of UK dentists using the AFS method on the basis of analysis of their urine, hair and nails. Urine turned out to be a sensitive and practical biological material for use in the study of exposure to mercury vapour from amalgam. The geometric mean of the urinary mercury concentration in a group of dentists was 1.7  $\mu\text{mol Hg/mol}$  creatinine (2.38  $\mu\text{g Hg/l}$ ). As shown in other studies (Rathore, Sigh, Pant, 2012), amalgam fillings may slightly increase mercury levels in both blood and urine, but this is not clinically relevant. The greatest exposure to mercury from amalgam occurs during the insertion and removal of tooth fillings.

Therefore, in the context of issuing forensic toxicology opinions, the condition of the dentition of a patient or a deceased person under assessment for possible exposure to heavy metal compounds, including mercury, does not have great significance. Earlier works by American authors (Kingman, Albertini, Brown, 1998) have shown that, for example, 10 amalgam fillings can cause an increase of 1  $\mu\text{g/l}$  in urine mercury concentration.

In chronic and acute poisonings by mercury vapours (by inhalation) and by inorganic mercury compounds (oral) or by metallic mercury injection, the levels of mercury in body fluids, including urine and blood, and also internal organs, are much higher. For

example, in people exposed to mercury vapours in the air, the average concentration of this metal in urine was  $30.3 \pm 35.1 \mu\text{g/l}$  in the range 4.17–95.0  $\mu\text{g/l}$  (in blood:  $146 \pm 105 \mu\text{g/l}$ , maximum 330  $\mu\text{g/l}$ ; Lech et al., 1998). In cases of injection of metallic mercury into the elbow vein by young people aged 17–29 years for suicidal purposes, the urinary concentrations were high, even a long time after injection, e.g. 74.0  $\mu\text{g/l}$  (after 2.5 years); in another case: 543  $\mu\text{g/l}$  (after 5.5 years), in another: 844  $\mu\text{g/l}$  (after 7 years); in blood, the concentrations were lower: 27.7  $\mu\text{g/l}$ , 22.8  $\mu\text{g/l}$  and 79.5  $\mu\text{g/l}$  respectively (Lech, Goszcz, 2012). On the other hand, in the blood and internal organs of a deceased 14-year-old girl who had suffered from Münchhausen syndrome and had been deliberately poisoning herself with mercury vapours for more than a year, 80  $\mu\text{g/l}$  (ng/ml) was determined in the blood, 2,680 ng/l in the liver, and 56,070 ng/g in the kidneys. The urine was not tested in this case, because the girl had damaged kidneys and a urine sample was not collected for analysis (Lech, 2014). Another example of poisoning as a result of chronic mercury vapour exposure is the case of a 29-year-old male working in a mercury lamp factory (Yang, Huang, Shih, Yang, 1994). In urine collected within 24 hours, the determined mercury concentration was 610  $\mu\text{g/l}$ . A case of acute occupational metallic mercury vapour poisoning in a 40-year-old welder due to the dismantling of mercury-coated pipes was also noted (Złotkowska, Zając-Nędza, 2002). In the company's medical clinic, the level of mercury in urine was determined to be very high. The man was hospitalized and during 21 days' stay in hospital, 3 measurements of mercury concentration in urine were performed. The following results were obtained: on admission to hospital – 830  $\mu\text{g/l}$ , on day 12 – 560  $\mu\text{g/l}$  and on discharge day – 38  $\mu\text{g/l}$ . Control tests were also performed 21 days after discharge from the hospital – the concentration of mercury in urine was 46  $\mu\text{g/l}$ , and after 18 months – 2.7  $\mu\text{g/l}$ .

## 5. Conclusions

As a result of the performed tests, It was ascertained that the direct method of mercury determination using amalgamation and thermal desorption combined with atomic absorption spectrometry allows determination of trace amounts of mercury in urine (0.14–1.30  $\mu\text{g/l}$ ).

Using the TDA AAS method, it was established that in the urine of adults with 1–7 dental amalgam fillings, the median concentrations of mercury were more than three times higher than in the urine of control subjects (without such fillings). However, both

values were within the range of concentrations currently considered as reference values, i.e. found in persons not exposed to the action of mercury compounds. The results obtained may be useful in the context of issuing expert opinions for clinical and forensic toxicology purposes. It should be added that in chronic and acute poisonings, the observed concentrations of mercury in urine are generally much higher.

## References

1. Bettinelli, M., Spezia, S., Rouchi, A., Minoia, C. (2002). Determination of total urinary mercury by on-line sample microwave digestion followed by flow injection cold vapour inductively coupled plasma mass spectrometry or atomic absorption spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 16(15), 1432–1439.
2. Boszke, L., Kowalski, A., Surdacka, A., Czajka-Jakubowska, A. (2007). Urine mercury concentration in Poznań city residents Poland. *Oceanological and Hydrobiological Studies International Journal of Oceanography and Hydrobiology*, 36(3), 197–207.
3. Chmielnicka, J. (2009) Toksyczność metali (i półmetali). (In) W. Seńczuk (Ed.), *Toksykologia współczesna* (pp. 427–435). Warszawa: Wydawnictwo PZW.
4. Clarkson, T. W., Magos, L. (2006). The toxicity of mercury and its chemical compounds. *Critical Reviews in Toxicology*, 36, 609–662.
5. Ewers, U., Krause, C., Schultz, C., Wilhelm, M. (1999). Reference values and human biological monitoring values for environmental toxins. *International Archives of Occupational and Environmental Health*, 72, 255–260.
6. Fong, B. M., Siu, T. S., Lee, J. S., Tam, S. (2007). Determination of mercury in whole blood and urine by inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Analytical Toxicology*, 31, 281–287.
7. Gochfeld, M. (2009). Cases of mercury exposure, bioavailability, and absorption. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 56, 174–179.
8. Goullé, J.-P., Mahieu, L., Castermant, J., Neveu, N., Bonneau, L., Laine, G., Bouige, D., Lacroix, Ch. (2005). Metal and metalloid multi-elementary ICP-MS validation in whole blood, plasma, urine and hair. Reference values. *Forensic Science International*, 153, 39–44.
9. Kingman, A., Albertini, T., Brown, L. J. (1998). Mercury concentrations in urine and whole blood associated with amalgam exposure in a US military population. *Journal of Dental Research*, 77, 461–471.
10. Kobylecka, K., Lech, T. (1997). Determination of trace amounts of mercury in blood by the cold vapour atomic absorption method. *Problems of Forensic Sciences*, 36, 44–55.
11. Koral, S. M. (2009). Final Rule For Dental Amalgam, *US EDA*, updated 04.03.2019 <http://www.fda.gov/MedicalDevices/ProductsandMedicalProcedures/DentalProducts/DentalAmalgam/ucm171115.htm>.
12. Kuras, R., Janasik, B., Stanisławska, M., Kozłowska, L., Wąsowicz, W. (2017). Assessment of mercury intake from fish meals based on intervention research in the Polish subpopulation. *Biological Trace Element Research*, 179(1), 23–31.
13. Lech, T. (2014). ICP OES and CV AAS determination of mercury in an unusual fatal case of long-term exposure to elemental mercury in a teenager. *Forensic Science International*, 237, e1–e5.
14. Lech, T. (2015). Detection of mercury in human organs and hair in a case of a homicidal poisoning of a woman autopsied 6 years after death. *American Journal of Forensic Medicine and Pathology*, 36(3), 227–231.
15. Lech, T., Goszcz, H. (2012). Chronic, long-term presence of mercury due to a single injection of elemental mercury in human. *International Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 1, 19–23.
16. Lech, T., Sadlik, J. K., Kobylecka, K. (1998). Acute and chronic poisonings with mercury and its compounds. *Problems of Forensic Sciences*, 38, 55–78.
17. Lech, T., Turek, W. (2019). Application of TDA AAS to direct mercury determination in postmortem material in forensic toxicology examinations. *Journal of Analytical Toxicology*, 43(5), 385–391.
18. Lech, T., Sadlik, J. K. (2004). Total mercury levels in human autopsy materials from a nonexposed Polish population. *Archives of Environmental Health* 59(1), 50–54.
19. Mania, M., Wojciechowska-Mazurek, M., Starska K., Rebeniak, M., Postupolski, J. (2012). Ryby i owoce morza jako źródło narażenia człowieka na metylortęć. *Roczniki Państwowego Zakładu Higieny*, 63(3), 257–264.
20. Mc Kelvey, W., Gwynn, R. C., Jeffery, N., Kass, D., Thorpe, L. E., Garg, R. K., Palmer, C. D., Parsons, P. J. (2007). A biomonitoring study of lead, cadmium, and mercury in the blood of New York city adults. *Environmental Health Perspectives*, 115, 1435–1441.
21. Morton, J., Mason, H. J., Ritchie, K. A., White, M. (2004). Comparison of hair, nails and urine for biological monitoring of low level inorganic mercury exposure in dental workers. *Biomarkers*, 9, 47–55.
22. Nicolae, A., Ames, H., Quiñonez, C. (2013). Dental amalgam and urinary mercury concentrations: a descriptive study. *BMC Oral Health*, 13–44.
23. Nuttall, K. L. (2004). Interpreting mercury in blood and urine of individual patients. *Annals of Clinical & Laboratory Science*, 34(3), 235–250.
24. Ozuah, P. O. (2000). Mercury poisoning. *Current Problems in Pediatrics*, 30, 91–99.

25. Pichichero, M., Gentile, A., Giglio, N., Umido, V., Clarkson, T., Cernichiari, E., Zareba, G., Gotelli, C., Gotelli, M., Yan, L., Treanor, J. (2008). Mercury levels in newborn and infants after receipt of thimerosal-containing vaccines. *Pediatrics*, 121, e208.
26. Rathore, M., Sigh, A., Pant, V. A. (2012). The dental amalgam toxicity fears: a myth and actuality. *Toxicology International*, 19, 81–88.
27. Risher, J. F., Nickle, N. A., Amler, S. N. (2003). Elemental mercury poisoning in occupational and residential settings. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 206, 371–379.
28. Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks, SCENIHR (2015), updated 04.03.2019. [https://ec.europa.eu/health/scientific\\_committees/consultations/public\\_consultations/scenih\\_r\\_consultation\\_24\\_en](https://ec.europa.eu/health/scientific_committees/consultations/public_consultations/scenih_r_consultation_24_en).
29. Torres, D. P., Martins-Teixeira, M. B., Silva, E. F., Queiroz, H. M. (2012). Method development for the control determination of mercury in seafood by solid-sampling thermal decomposition amalgamation atomic absorption spectrometry (TDA AAS). *Food Additives and Contaminants. Part A. Chemistry, Analysis, Control, Exposure, Risk Assessment*, 29(4), 625–632.
30. World Health Organization, WHO (1990). Methylmercury. Environmental Health Criteria 101, Geneva: International Programme on Chemical Safety.
31. Yang, Y., Huang, C., Shih, T., Yang, S. (1994). Chronic elemental mercury intoxication: clinical and field studies in lampsocket manufacturers. *Occupational Environmental Medicine*, 51, 267–270.
32. Ye, B. J., Kim, B. G., Jeon, M. J., Kim, S. Y., Kim, H. C., Jang, T. W., Chae, H. J., Choi, W. J., Ha, M. N., Hong, Y. S. (2016). Evaluation of mercury exposure level, clinical diagnosis and treatment for mercury intoxication. *Annals of Occupational and Environmental Medicine*, 28(1), article 5.
33. Zimmer, H., Ludwig, H., Bader, M., Bailer, J., Eickholtz, P., Staehle, H. J., Triebig, G. (2002). Determination of mercury in blood, urine and saliva for the biological monitoring of an exposure from amalgam fillings in a group with self-reported adverse health effects. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 205, 205–211.
34. Złotkowska, R., Zajac-Nędza, M. (2002). Ostre zatrucie rtęcią – opis przypadku. *Medycyna Pracy*, 53, 315–317.

---

**Corresponding author**

Jadwiga Policht-Gąssowska  
Institute of Forensic Research  
Westerplatte 9  
PL 31-033 Kraków  
e-mail: jpolicht@ies.gov.pl

---



# OZNACZANIE ŚLADOWYCH ILOŚCI RTĘCI ZA POMOCĄ TDA AAS W MOCZU U OSÓB POTENCJALNIE NARAŻONYCH NA RTĘĆ Z WYPEŁNIEŃ AMALGAMATOWYCH UŻĘBIENIA

## 1. Wprowadzenie

Rtęć (Hg) uważana jest za jeden z najbardziej szkodliwych metali, oprócz ołowiu i kadmu, dla człowieka i środowiska naturalnego. Do tej pory nie poznano żadnej funkcji biologicznej, którą pełniłby ten metal ciężki w organizmach żywych. Występuje on w formie rtęci metalicznej i związków rtęci zarówno nieorganicznych, jak i organicznych. Do jego nieorganicznych form można zaliczyć rtęć metaliczną w postaci cieczy i jej par oraz związki Hg(I) i Hg(II), natomiast do organicznych – głównie metylo- i etylortęć.

Od stuleci wykorzystywano rtęć w różnych gałęziach przemysłu (w hutnictwie metali nieżelaznych, do produkcji stali, baterii i lamp wyładowczych, w elektrochemii, do produkcji chloru z chlorku sodu itp.), a w ostatnich dziesiątkach lat była ona wykorzystywana także do celów medycznych (w termometrach i ciśnieniomierzach, w postaci płynów dezynfekcyjnych i preparatów odrobaczających, obecnie wycofywanych z użycia; Clarkson, Magos, 2006; Kobylecka, Lech, 1997). Liczne zastosowania rtęci i jej związków powodują wzrost narażenia zawodowego i zatruc przypadkowych. Zdarzają się również zatrucia rtęcią lub jej związkami rozmyślnie, chroniczne lub ostre (Lech, Sadlik, Kobylecka, 1998; Lech, Goszcz, 2012; Lech, 2014, 2015).

W przyrodzie największe stężenia tego pierwiastka występują w łupkach węglowych i bitumicznych oraz w zasadowych skałach krystalicznych. Również emisja naturalna, głównie z wyziewów wulkanicznych i podwodnych, powiększa pulę rtęci krążącą w środowisku. Obieg rtęci pochodzenia naturalnego w postaci pary ma istotny wpływ na jej zawartość w glebie i w wodzie. Nagromadzenie rtęci w żywności pochodzenia morskiego i lądowego jest źródłem pobierania przez organizmy żywe związków alkilortęciowych, głównie metylortęci. Gatunki drapieżne ryb znajdujące się na szczycie łańcucha pokarmowego charakteryzują się znacznie większą kumulacją metylortęci w porównaniu z ich pozostałymi gatunkami. Jest to związane nie tylko z miejscem w łańcuchu pokarmowym, ale również z wiekiem, ruchliwością i miejscem bytowania. Metylortęć może również w takich warunkach ulegać przemianom z mniej do bardziej biodostępnych form rtęci, głównie z uwagi na możliwość eliminowania ksenobiotyku z organizmu. U ludzi wydajność wchłaniania alkilortęci drogą pokarmową wynosi około 95%, natomiast nieorganicznych połączeń

rtęci – około 7% (Mania, Wojciechowska-Mazurek, Star-ska, Rebeniak, Postupolski, 2012; Chmielnicka, 2009).

Szczególną uwagę przywiązuje się obecnie do tych form rtęci, które wpływają na zdrowie publiczne. Przykładem może być narażenie na pary rtęci metalicznej, które znane było już w czasach antycznych, ale dzisiaj jest również aktualne, zwłaszcza w środowisku pracy różnych grup zawodowych, w tym dentystów. Narażenie na rtęć z amalgamatów stosowanych w stomatologii (narażenie na pary) oraz ze spożywanych ryb zawierających podwyższone ilości rtęci, metylo- i etylortęci dotyczy dziesiątków minionych lat (Clarkson, Magos, 2006). Istnieje jeszcze inne ryzyko potencjalnego narażenia związane z organiczną formą rtęci – etylortęcią dodawaną pod postacią tzw. tiomersalu do niektórych szczepionek (Pichichero i in., 2008). Procedura ta ma również swój udział w ocenie zdrowia publicznego. Tiomersal jest także używany jako środek konserwujący i bakteriobójczy w kroplach do oczu, płynach do soczewek kontaktowych i płynach odczulających.

Amalgamat stosowany jest w dentystyce od 1890 roku. Jest to metaliczny materiał stanowiący uzupełnienie protetyczne używane do bezpośredniego wypełnienia zmian lub strukturalnych defektów w zębach. Jest on połączeniem rtęci (w postaci cieczy), której zawartość ocenia się na około 50%, i stopu amalgamatowego (proszku) zawierającego głównie srebro, cynę i miedź (Koral, 2009) oraz niekiedy cynk. Amalgamat dentystyczny uwalnia pary rtęci, które mogą być wchłaniane i prawdopodobnie mają działanie toksyczne, podobnie jak pary rtęci wdychane z zewnętrznych źródeł, np. przy narażeniu zawodowym (rtęć w postaci par wchłonięta drogą oddechową w 80% zatrzymywana jest w organizmie). Jednakże dotychczas nie ma przekonujących dowodów, że amalgamat dentystyczny może powodować szkodliwe działanie uboczne (Clarkson, Magos, 2006). Stosowanie amalgamatów dentystycznych i ich substytutów zostało uregulowane Dyrektywą Rady Europejskiej 93/42/EWG dotyczącą urządzeń medycznych, zgodnie z którą muszą one spełniać określone wymogi, w szczególności w odniesieniu do zdrowia i bezpieczeństwa pacjentów (SCE-NIHR, 2015).

Ocena narażenia na rtęć u osób żyjących dokonywana jest najczęściej na podstawie wyników analizy próbek krwi, moczu i włosów. Prawidłowa interpretacja wyników wymaga znajomości danych na temat poziomów występujących u różnego rodzaju populacji (krajowych, zagranicznych, dorosłych, dzieci, pracowników zatrud-

nionych na różnych stanowiskach), a także informacji o ewentualnym nadmiernym spożyciu ryb czy posiadaniu wypełnień amalgamatowych u osób poddawanych ocenie narażenia. Ma to szczególne znaczenie zwłaszcza w tych przypadkach, gdy do badań udostępniono jeden rodzaj materiału, np. mocz lub krew. Wydaje się, że w przypadku narażenia na pary rtęci (np. z amalgamatu) i małe stężenia rtęci nieorganicznej lepszym materiałem do oceny jest mocz, ponieważ okres biologicznego półtrwania tego metalu we krwi jest stosunkowo krótki – od kilku do 40 dni (Morton, Mason, Ritchie, White, 2004), a kuluje się on głównie w nerkach i wydalą przez dłuższy czas z moczem. Badanie poziomów stężeń rtęci w surowicy nie jest zalecane do wykorzystania w monitoringu biologicznym (Zimmer i in., 2002).

Spośród metod oznaczania rtęci całkowitej w materiale biologicznym obecnie wykorzystuje się głównie atomową spektrometrię absorpcyjną z techniką zimnych par (CV AAS; Bettinelli, Spezia, Rouchi, Minoia, 2002; Gochfeld, 2003; Kobylecka, Lech, 1997; Lech, Sadlik, 2004) i spektrometrię mas z plazmą sprzężoną indukcyjnie (ICP-MS; Bettinelli i in., 2002; Gochfeld, 2003; Goullé i in., 2005; Mc Kelvey i in., 2007). Fluorescencja rentgenowska (*X-ray fluorescence*, XRF) pozwala na nieniszczącą analizę rtęci w tkankach stałych (np. analizę segmentacyjną włosów; Gochfeld, 2003). W przypadkach ostrych zatruc (gdzie stężenia Hg są większe) może być zastosowana optyczna spektrometria emisyjna z plazmą sprzężoną indukcyjnie (ICP OES; Lech, 2014).

Wszystkie wymienione wyżej techniki (poza XRF) wymagają wstępnego przygotowania próbki materiału biologicznego, zwykle trawienia na gorąco (najczęściej pod zwiększonym ciśnieniem) za pomocą stężonych kwasów, z dodatkiem czynnika utleniającego (np. nadtlenu wodoru) w oddzielnym aparacie, tzw. mineralizacji, do przeprowadzenia której pobiera się różnej wielkości próbki w zależności od metody oznaczania rtęci. Na przykład w stosowanej obecnie technice CV AAS z wykorzystaniem spektrometru do absorpcji atomowej MQZe firmy Thermo wymagana jest mineralizacja próbek w systemie mikrofalowym lub w aparatach zamkniętych, np. typu Bethge, z pobraniem 1–10 ml krwi, 10–50 ml moczu, czy 0,2–0,5 g włosów.

Standardowe techniki CV AAS umożliwiają otrzymywanie rzetelnych wyników w zakresie stężeń  $\mu\text{g/l}$ , ale wymagają – jak wspomniano – pracochłonnego etapu przygotowania materiału do analizy w oddzielnych urządzeniach i stosunkowo dużych próbek. Niektóre najnowsze techniki umożliwiają rozkład termiczny próbek ciekłych i/lub stałych oraz pomiar absorpcji atomowej rtęci wewnątrz jednego aparatu. Oznaczanie rtęci w bardzo małych stężeniach (w ilościach śladowych lub ultraśladowych, na poziomie *ppb*, a nawet *ppt*) odbywa się po wprowadzeniu do aparatu niewielkich próbek: 0,1–0,2 ml cieczy lub 10–20 mg próbek stałych. Takie

możliwości oferuje na przykład metoda atomowej spektrometrii absorpcyjnej z rozkładem termicznym i amalgamacją (*thermal decomposition – amalgamation atomic absorption*, TDA AAS) wykorzystywana dotychczas głównie do badania ryb i owoców morza (Torres, Martins-Teixeira, Silva, Queiroz, 2012), a całkiem niedawno – do analizy próbek materiału biologicznego, takiego jak krew i włosy w badaniach środowiskowych (Kuras, Janasik, Stanisławska, Kozłowska, Wąsowicz, 2017) oraz krew, mocz, włosy, żółć i ciało szkliste oka w badaniach pośmiertnych (Lech, Turek, 2019).

Wprowadzanie do analizy toksykologicznej bardzo czułych i dokładnych metod oznaczania metalu o silnych właściwościach toksycznych, jakim jest rtęć, ma duże znaczenie szczególnie wtedy, gdy wyniki analizy wykorzystywane są w celach sądowych do interpretacji stężeń i prawidłowej oceny narażenia (za życia) lub ustalenia przyczyny śmierci. Poziomy uznawane jeszcze do niedawna za referencyjne ulegają zmianie i wciąż istnieje potrzeba ich uaktualniania (Ewers, Krause, Schultz, Wilhelm, 1999; Nuttall, 2004; Ozuah, 2000; Risher, Nickle, Amler, 2003). W związku z tym podjęto próbę wyznaczenia poziomów rtęci w moczu metodą TDA AAS w grupie kontrolnej – u osób zawodowo nienarażonych na pary rtęci i nieposiadających wypełnień amalgamatowych oraz w grupie badanej – u osób potencjalnie narażonych z powodu wypełnień amalgamatowych celem ewentualnego wykorzystania uzyskanych wyników dla opiniowania w przypadkach podejrzenia zatrucia rtęcią i jej związkami.

## 2. Materiały i metoda

Próbki moczu do analizy zostały pobrane od dwóch grup osób dorosłych:

- grupa kontrolna (ogółem  $n = 15$ ; liczba mężczyzn  $n = 6$ , liczba kobiet  $n = 9$ ), w wieku 24–67 lat),
- grupa badana (ogółem  $n = 10$ ; liczba mężczyzn  $n = 1$ , liczba kobiet  $n = 9$ ), w wieku 19–53 lat, obejmująca osoby posiadające wieloletnie wypełnienia amalgamatowe w uzębieniu w liczbie od 1 do 7.

W badaniach wykorzystano certyfikowany wzorzec rtęci (1000 mg/l) oraz stężony (65%) kwas azotowy (Suprapur) firmy Merck (Warszawa, Polska).

Dokładność metody kontrolowano za pomocą certyfikowanych materiałów referencyjnych moczu: Sero-norm Trace Elements Urine L-1 oraz Sero-norm Trace Elements Urine L-2 firmy Sero (AS, Norwegia), a także uczestnicząc w międzynarodowych testach biegłości German External Quality Assessment Scheme (G-EQU-AS, Erlangen, Germany).

Woda ultraczysta (18,2 m $\Omega$ ) stosowana do sporządzenia roztworu wzorcowego rtęci o stężeniu 100 ng/ml

i certyfikowanych materiałów odniesienia w moczu była uzyskana z systemu Direct-Q firmy Millipore (USA).

Do analizy próbek moczu i roztworów wzorcowych rtęci wykorzystano łożeczki kwarcowe firmy Milestone (Włochy).

Analizę próbek moczu na zawartość rtęci wykonano metodą TDA AAS przy użyciu analizatora rtęci Direct Mercury Analyzer DMA-80 Dual Cell firmy Milestone (koprodukcja Włochy-Szwajcaria-Niemcy), stosując parametry pracy podane w tabeli 1. Przed każdą serią oznaczeń kontrolowano krzywą wzorcową rtęci przygotowaną przez producenta za pomocą wzorca rtęci o stężeniu 100 ng/ml (sporządzanego tuż przed analizą).

Do analizy pobierano po dwie próbki moczu ( $2 \times 0,1$  ml) pochodzące od każdej z badanych osób, które nanoszono bezpośrednio na łożeczki kwarcowe.

### 3. Parametry walidacyjne metody

W procesie walidacji dla niniejszej procedury badawczej wyznaczono granice wykrywalności i oznaczalności odpowiednio  $LOD = 0,12 \mu\text{g/l}$  i  $LOQ = 1,0 \mu\text{g/l}$ . W zakresie stężeń 1–25  $\mu\text{g/l}$  wykazano w teście Mandela, że zależność między sygnałem a stężeniem rtęci miała charakter liniowy, natomiast w zakresie stężeń 5–200  $\mu\text{g/l}$  do opisu krzywej kalibracyjnej wykorzystano równanie wielomianowe drugiego stopnia.

Precyzja i dokładność dla materiału referencyjnego CRM Urine L-2 o stężeniu rtęci 40,1  $\mu\text{g/l}$  i CRM Urine o stężeniu 40,6  $\mu\text{g/l}$  wynosiły odpowiednio 0,82% i 1,47% oraz 0,75% i 0,27%. Ponadto wykonano kontrolę powtarzalności i odtwarzalności dla próbek moczu laboratoryjnego dla stężeń kontrolnych w zakresie krzywej kalibracyjnej (Tabela 2). Niepewność rozszerzona ( $k = 2$ , poziom ufności 95%) pomiarów została oszacowana na podstawie budżetu niepewności. W przeprowadzonej walidacji niepewność rozszerzona wyniosła 12%.

### 4. Wyniki i omówienie

Opisana metoda TDA AAS umożliwia stosunkowo proste i wiarygodne oznaczenie rtęci całkowitej (pierwiastkowej, nieorganicznej i organicznej). Wyniki analizy materiału biologicznego obejmującego próbki moczu mogą być stosowane do oceny narażenia ludzi np. na pary rtęci metalicznej i niskie stężenia nieorganicznej rtęci, zwłaszcza w przypadkach, gdy brak jest ewidentnego źródła narażenia na inne jej formy (Kuras i in., 2017; Morton i in., 2004).

Nowoczesna metoda oceny ekspozycji narażenia na ten metal za pomocą bezpośredniej analizy próbki moczu w aparacie Direct Mercury Analyzer DMA-80 jest metodą specyficzną i stosunkowo szybką. Na wysoką

specyficzność metody ma wpływ selektywne wiązanie śladowych ilości rtęci przez złoto będące składnikiem amalgamatora (3%), a następnie jej termiczna desorpcja oraz wybór linii analitycznej rtęci w spektrofotometrze  $\lambda = 253,65$  nm (umieszczony przed detektorem filtr interferencyjny pozwala na wyodrębnienie linii widmowej  $\lambda = 253,65$  nm, najbardziej charakterystycznej dla rtęci; Torres i in., 2012).

Jej wielką zaletą jest możliwość przeprowadzenia pełnego toku analizy z rozkładem matrycy biologicznej próbki w jednym aparacie bez konieczności przenoszenia materiału z urządzenia do mineralizacji próbek do spektrofotometru, co zapewnia analizę materiału bez strat rtęci, m.in. z powodu lotności (rtęć jest najlotniejszym metalem ciężkim), z dobrą precyzją (dla moczu  $RSD < 5\%$ ) i granicą wykrywalności ( $LOD = 0,12 \mu\text{g/l}$ ) porównywalną z granicą ustaloną przez innych autorów w badaniach nad oznaczaniem rtęci w próbkach krwi i moczu za pomocą spektrometrii mas z plazmą sprzężoną indukcyjnie ICP-MS: 0,13  $\mu\text{g/l}$  (dla roztworów wzorcowych analitu w wodzie), 0,17  $\mu\text{g/l}$  (dla moczu) i 0,26  $\mu\text{g/l}$  (dla krwi; Fong, Siu, Lee, Tam, 2007).

Stosując metodę TDA AAS, wyznaczono poziomy rtęci w moczu osób dorosłych w dwóch grupach: osób nienarażonych na rtęć stanowiących grupę kontrolną i ewentualnie (potencjalnie) narażonych na rtęć z amalgamatu stomatologicznego umieszczonego w jamie ustnej w charakterze wypełnienia uzębienia. Średnie stężenie rtęci w moczu u osób z grupy nienarażonych (kontrolnej) wynosiło 0,24  $\mu\text{g/l}$  (mediana 0,18  $\mu\text{g/l}$ ) w zakresie stężeń 0,14–0,43  $\mu\text{g/l}$  (Tabela 3.). W grupie osób posiadających wypełnienia amalgamatowe (w liczbie od 1 do 7, od co najmniej kilku lat) stężenie rtęci było większe: średnia 0,63  $\mu\text{g/l}$  (mediana 0,70  $\mu\text{g/l}$ ) w zakresie stężeń 0,15–1,30  $\mu\text{g/l}$  (Tabela 4). Za pomocą testu U Manna-Whitneya stwierdzono, że różnice pomiędzy badanymi grupami były statystycznie istotne ( $p = 0,007$ ). Podobne do wykazanych w niniejszej pracy poziomy rtęci w moczu obserwowano również w badanej grupie mieszkańców Poznania. Z badań wynikało, że stężenie rtęci w moczu u osób z grupy kontrolnej (nieposiadających wypełnień amalgamatowych,  $n = 16$ ) mieściło się w zakresie 0,13–0,95  $\mu\text{g/l}$  (mediana 0,20  $\mu\text{g/l}$ ), a w grupie badanej ( $n = 22$ ) było w przedziale 0,12–1,97  $\mu\text{g/l}$  (mediana 0,48  $\mu\text{g/l}$ ) (Boszke, Kowalski, Surdacka, Czajka-Jakubowska, 2007).

Poziomy rtęci w moczu wykazane w niniejszej pracy we wszystkich badanych próbkach mieszczą się zatem w przedziale wartości referencyjnych (w Polsce i w innych krajach) dla osób nienarażonych na działanie związków rtęci.

Do około 2000 r. wartości stężeń rtęci w moczu przyjmowane za „normalne” (dzisiaj – referencyjne) u osób dorosłych nienarażonych na działanie związków rtęci – według Ewersa i in. (1999), Nuttalla (2004) oraz



Rishera i in. (2003) – wynosiły 10–20  $\mu\text{g/l}$  (we krwi: 10–15  $\mu\text{g/l}$ ), obecnie zastępowane są niższymi. Dla ogółu populacji osób nienarażonych mieszczą się one w zakresie 1–8  $\mu\text{g/l}$  we krwi i 4–5  $\mu\text{g/l}$  w moczu (WHO, 1990). Ponadto decyzją Międzynarodowej Unii Chemii Czystej i Stosowanej (International Union of Pure and Applied Chemistry, IUPAC) i Międzynarodowej Komisji Zdrowia Zawodowego (The International Commission on Occupational Health, ICOH) ustalono, że średnie stężenie rtęci we krwi u osób, które nie spożywają ryb, nie powinno przekraczać 2  $\mu\text{g/l}$  (Ye i in., 2016).

Ogromny wpływ na wykrywane poziomy mają z pewnością nowe metody (m.in. CV AAS, ICP-MS) wprowadzane do analizy toksykologicznej. Zmniejszenie ilości rtęci oddziałującej na zdrowie człowieka ma również związek z coraz większą świadomością rodzajów i wielkości źródeł narażenia. Risher i in. w 2003 r. zauważyli, że poziomy rtęci w moczu nie są takie duże, jak podawano wcześniej w piśmiennictwie i powinny być znacznie niższe, poziomów tych jednak nie opublikowali.

Z badań własnych wiadomo, że poziomy referencyjne w moczu zabezpieczonym z materiału sekcyjnego populacji polskiej osób nieekspozowanych na rtęć zawodowo ani w wyniku zatrucia nie przekraczały wartości 2,6  $\mu\text{g Hg/l}$  (CV AAS; Lech, Sadlik, 2004). Dla tej badanej populacji osób dorosłych stężenia we krwi wynosiły odpowiednio  $1,6 \pm 1,2 \mu\text{g Hg/l}$  (średnia), 1,4  $\mu\text{g Hg/l}$  (mediana). Natomiast w grupie osób żyjących badanych z powodu podejrzenia o narażenie na działanie par rtęci średnie jej stężenie w moczu wyznaczone przy zastosowaniu tej samej metody (CV AAS) wynosiło  $1,7 \pm 1,6 \mu\text{g Hg/l}$  w przedziale stężeń 0,4–6,2  $\mu\text{g Hg/l}$  (Lech i in., 1998).

Stężenia rtęci w moczu osób zmarłych ( $n = 11$ ), ustalone dla populacji polskiej za pomocą nowoczesnej bezpośredniej metody TDA AAS, wynosiły średnio  $0,85 \pm 0,63 \mu\text{g/l}$  (mediana 0,81  $\mu\text{g/l}$ ) w zakresie 0,16–2,19  $\mu\text{g/l}$  (Lech, Turek, 2019).

Dla populacji z innych krajów (np. z Niemiec) ustalone poziomy referencyjne dla stężenia rtęci w moczu (zalecane przez Komisję Biologicznego Monitoringu u Ludzi, Commission on Human Biological Monitoring, styczeń 1999) były również niskie: w moczu u dzieci w wieku 6–12 lat średnio 1,4  $\mu\text{g/l}$ , w moczu u dorosłych (którzy nie mieli wypełnienia amalgamatowego) 1,0  $\mu\text{g Hg/g}$  kreatyniny, a we krwi (u dzieci i dorosłych) w zależności od konsumpcji ryb 1,5–2,0  $\mu\text{g/l}$ . W marcu 1999 r. wartości te uległy nieco modyfikacji – podniesiono maksymalne dopuszczalne wartości w grupie dzieci i dorosłych, w moczu do 5  $\mu\text{g Hg/g}$  kreatyniny, we krwi do 5  $\mu\text{g/l}$  (nie podając metody analizy), przy których nie obserwowano ujemnych efektów zdrowotnych u poszczególnych osób w całej badanej populacji (Ewers i in., 1999). Wyznaczone przez Goullégo i in. (2005) referencyjne stężenia rtęci w moczu metodą ICP-MS dla

populacji francuskiej mieściły się również w tym zakresie i wynosiły 0,14–2,21  $\mu\text{g/l}$  (mediana 0,59  $\mu\text{g/l}$ ). Jak wskazują Nicolae, Ames i Quiñonez (2013), nie potwierdzono obecnie niekorzystnych skutków jej działania, gdy jej stężenie w moczu nie przekracza 7  $\mu\text{g/l}$  lub 5  $\mu\text{g Hg/g}$  kreatyniny. Średnie stężenie rtęci dla populacji kanadyjskiej było niewielkie i wynosiło 0,22  $\mu\text{g/l}$  lub 0,26  $\mu\text{g Hg/g}$  kreatyniny.

W niniejszej pracy wykazane u osób w obu badanych grupach (z wypełnieniami stomatologicznymi i kontrolnej) poziomy rtęci w moczu mieszczą się zarówno w zakresie stężeń publikowanych dla populacji polskiej, jak i niemieckiej, francuskiej czy kanadyjskiej. Są one na ogół małe, nieprzekraczające wartości 1,30  $\mu\text{g/l}$ , ponad trzykrotnie większe w grupie badanej (z wypełnieniami w postaci amalgamatu stomatologicznego w liczbie od 1 do 7) niż w grupie kontrolnej (obejmującej osoby nieposiadające wypełnień amalgamatowych w jamie ustnej). Można więc wyciągnąć wniosek, że po upływie kilku lat od zainstalowania amalgamatu z rtęcią w jamie ustnej stężenia rtęci w moczu tylko nieznacznie ulegają zwiększeniu w stosunku do grupy kontrolnej. Podobny wniosek wysunęli Morton i współpracownicy (2004), oceniając narażenie zawodowe dentystów z Wielkiej Brytanii za pomocą metody AFS na podstawie analizy ich moczu, włosów i paznokci. Mocz okazał się czułym i praktycznym materiałem biologicznym w zastosowaniu do badania narażenia na pary rtęci z amalgamatu. Średnia geometryczna stężenia rtęci w moczu w grupie dentystów wynosiła 1,7  $\mu\text{mol Hg/mol}$  kreatyniny (2,38  $\mu\text{g/l}$ ). Jak wykazano w innych badaniach (Rathore, Sigh, Pant, 2012), wypełnienia amalgamatowe mogą nieznacznie zwiększać poziomy rtęci zarówno we krwi, jak i w moczu, nie ma to jednak klinicznego znaczenia. Największe narażenie na rtęć z amalgamatu występuje w czasie zakładania i usuwania wypełnienia w zębie.

W kontekście opiniowania dla celów toksykologii sądowej nie ma więc większego znaczenia, w jakim stanie było uzębienie pacjenta lub denata poddawanego ocenie ewentualnego narażenia na związki metali ciężkich, w tym rtęci. Z wcześniejszych prac autorów amerykańskich wynikało (Kingman, Albertini, Brown, 1998), że na przykład 10 wypełnień amalgamatowych może spowodować wzrost stężenia rtęci w moczu o 1  $\mu\text{g/l}$ .

W zatruciach chronicznych i ostrych parami rtęci (drogą oddechową) oraz nieorganicznymi związkami rtęci (drogą doustną) lub przez iniekcję rtęci metalicznej poziomy rtęci w płynach ustrojowych, w tym w moczu, a także we krwi i w narządach wewnętrznych, są dużo większe. Na przykład u osób narażonych na pary rtęci w powietrzu średnie stężenie tego metalu w moczu wynosiło  $30,3 \pm 35,1 \mu\text{g/l}$  w przedziale 4,17–95,0  $\mu\text{g/l}$  (we krwi:  $146 \pm 105 \mu\text{g/l}$ , maksymalnie 330  $\mu\text{g/l}$ ; Lech i in., 1998). W przypadkach iniekcji rtęci metalicznej do żyły dołu łokciowego przez młodych ludzi w wieku 17–29 lat

w celach samobójczych, stężenia rtęci w moczu osiągały duże wartości, nawet po upływie długiego czasu od iniekcji, np. 74,0 µg/l (po 2,5 latach), w innym przypadku: 543 µg/l (po 5,5 latach), w kolejnym: 844 µg/l (po 7 latach), we krwi stężenia były odpowiednio mniejsze: 27,7 µg/l, 22,8 µg/l oraz 79,5 µg/l (Lech, Goszcz, 2012). Natomiast we krwi i narządach wewnętrznych zmarłej 14-letniej dziewczynki, cierpiącej na zespół Münchhausena, która przez ponad rok podtruwała się celowo parami rtęci, wykazano we krwi 80 µg/l (ng/ml), w wątrobie: 2680 ng/g, w nerkach: 56 070 ng/g. Mocz w tym przypadku nie badano, ponieważ dziewczynka miała uszkodzone nerki i nie zabezpieczono próbki moczu do analizy (Lech, 2014). Jako kolejny przykład zatrucia w wyniku narażenia chronicznego na działanie par rtęci może posłużyć przypadek 29-letniego mężczyzny pracującego w fabryce lamp rtęciowych (Yang, Huang, Shih, Yang, 1994). W moczu zebrany w ciągu 24 godzin wyznaczone stężenie rtęci wynosiło 610 µg/l. Odnotowano również przypadek ostrego zatrucia zawodowego parami rtęci metalicznej u 40-letniego spawacza na skutek demontażu rurek oblanych rtęcią (Złotkowska, Zając-Nędzka, 2002). W poradni przyzakładowej wykonano oznaczenia poziomu rtęci w moczu, którego wynik określono jako bardzo wysoki. Mężczyzna został hospitalizowany i w ciągu 21 dni pobytu w szpitalu wykonano 3 oznaczenia stężenia rtęci w moczu. Uzyskano następujące wyniki: w momencie przyjęcia do szpitala – 830 µg/l, w 12. dobie leczenia – 560 µg/l, a w dniu wypisu – 38 µg/l. Wykonano również badania kontrolne 21 dni po wypisie ze szpitala – w moczu stężenie rtęci wynosiło 46 µg/l, natomiast po 18 miesiącach – 2,7 µg/l.

## 5. Wnioski

W wyniku przeprowadzonych badań stwierdzono, że bezpośrednia metoda oznaczania rtęci z zastosowaniem amalgamacji i termicznej desorpcji połączona z atomową spektrometrią absorpcyjną pozwala oznaczyć śladowe ilości rtęci w moczu (0,14–1,30 µg/l).

Za pomocą metody TDA AAS ustalono, że w moczu osób dorosłych z wypełnieniami w postaci amalgamatu stomatologicznego w liczbie od 1 do 7, mediany stężeń rtęci były ponadtrzykrotnie większe niż w moczu osób z grupy kontrolnej (nieposiadających takich wypełnień), przy czym obie wartości mieściły się w przedziale stężeń uznawanych obecnie za referencyjne, czyli spotykane u osób nienarażonych na działanie związków rtęci. Uzyskane wyniki mogą być przydatne w kontekście opiniowania dla celów toksykologii klinicznej i sądowej. Należy dodać, że w zatruciach chronicznych i ostrych obserwowane stężenia rtęci w moczu są na ogół znacznie wyższe.