

Oral biotillgänglighet av arsenik, antimon och ett urval av metaller i askor

Christel Carlsson, David Bendz, Celia Jones

**Oral biotillgänglighet av arsenik, antimon och ett
urval av metaller i askor**

**Oral bioavailability of arsenic, antimony and a
selection of metals in ashes**

Christel Carlsson, David Bendz, Celia Jones

Q6-634

Abstract

I denna rapport sammanställs kunskaper om oral biotillgänglighet av metaller och de *in vitro* metoder som finns för dess analys. Vidare rapporteras resultat från en experimentell studie av den gastrointestinalt (magtarmkanal) biolösliga fraktionen av arsenik, antimon och ett antal metaller i ett urval flyg- och bottenaskor som lagrats mellan 1-13 år. Den biolösliga fraktionen av metallerna har bestämts experimentellt med RIVMs *in vitro* test och kan användas för att konservativt uppskatta oral biotillgänglig fraktion. Genom att ta hänsyn till den oralt biotillgängliga fraktionen av en förorening vid beräkningar av hälsorisker vid intag av aska kan precisionen i riskbedömningar ökas.

Sammanfattning

I Värmeforsksprojektet *Q4-238 Miljöriktlinjer för askanvändning i anläggningskonstruktioner* var halten arsenik och bly kritiska för möjligheten att återanvända vissa askor i konstruktioner [4]. I den beräkningsmodell som användes där användes totalhalten av metallerna som jämförelsegrund vid bedömning av hälsorisk vid intag, vilket kan resultera i att onödigt konservativa bedömningar görs. Genom att utgå ifrån den oralt biotillgängliga andelen av arsenik och bly i beräkningsmodellen kan en bättre precision i riskbedömningen göras och eventuellt resultera i att fler askor kan visa sig vara miljömässigt acceptabla för användning i anläggningsbyggande.

Syftet med studien var (i) att sammanställa kunskap om den oralt biotillgängliga fraktionen av arsenik, antimon och ett urval av metaller i askor och andra liknande material samt om *in vitro* metoder för bestämning av oral biotillgänglighet och (ii) att experimentellt uppskatta oral biotillgänglighet av arsenik, antimon och ett urval av metaller för ett antal förbränningsaskor genom att bestämma den gastrointestinalt biolösliga fraktionen av elementen (d.v.s. de element som kan lösas ut i mage och tunntarm). De element som undersöktes i studien var antimon, arsenik, bly, kadmium, koppar, krom, nickel och zink.

I den litteraturstudie som utfördes inom projektet sammanställdes bl.a. ett antal statiska och dynamiska *in vitro* metoder som simulerar människans gastrointestinala upptag av föroreningar. Metoderna innehåller en eller flera segment, dvs. munhåla, magsäck och tunntarm. Av de sammanställda *in vitro* metoderna valdes RIVMs (Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu, Nederländerna) metod ut för att användas i den experimentella delen av studien. Fördelarna med denna metod var

- att metoden i hög grad liknade människans gastrointestinala processer (inkluderade munhåle-, mag- och tarmdel)
- att metoden var relativt enkel att utföra jämfört med en dynamisk metod
- att metoden kunde inkludera ett anaerobt steg om behov fanns
- att metoden kunde inkludera föda
- att kunskap om metodens utförande fanns i Sverige
- att metoden utvärderats i en vetenskapligt publicerad jämförande studie.

I den laborativa delen av studien undersöktes den gastrointestinala biolösligheten av antimon, arsenik, bly, kadmium, krom, koppar, nickel och zink i sju utvalda förbränningsaskor vid två olika partikelstorleksfraktioner (<63 μm och <2 mm) med RIVMs *in vitro* metod för biolöslighet. De två olika partikelstorleksfraktionerna valdes för att representera avsiktligt (<2 mm) och oavsiktligt (<63 μm) intag av aska. De undersökta förbränningsaskorna kom från olika anläggningar och representerade olika kategorier av askor m.a.p. typ av aska (flyg- eller bottenaska), panna, bränsle samt lagringstid. I den experimentella delen undersöktes också inverkan av elementens totalhalt och typen av aska (flygaska eller bottenaska) för storleken på den biolösliga fraktionen, samt betydelsen av partikelstorleksfraktion och asktyp för totalhalten av de olika elementen i askorna.

Resultaten visade på en stor variation hos den biolösliga fraktionen som var större mellan de olika elementen än mellan de olika askorna. Den gastrointestinalt biolösliga halten var väsentligt lägre än den totala halten för alla undersökta metaller i samtliga askor, med undantag för arsenik i två av de studerade askorna. Den biolösliga fraktionen av arsenik var hög både i flygaskor (>85%) och i bottenaskor (40-85%). Den biolösliga fraktionen av bly var också förhållandevis hög och varierade mellan 14 och 60% i de olika askorna. Kadmium hade också en hög biolöslig fraktion som varierade mellan 50-75% i de studerade askorna. Den biolösliga fraktionen av krom var mycket lägre än den biolösliga fraktionen av övriga metaller och låg med ett par undantag under 12%. Den biolösliga fraktionen av koppar var relativt hög och varierade mellan 20-70% i askorna.

Partikelstorleksfördelningen hade endast en inverkan på den biolösliga fraktionen av arsenik, krom och koppar i denna studie, sådan att den biolösliga fraktionen av dessa element var större vid den mindre partikelstorleksfraktionen, som representerar ofrivilligt intag. Partikelstorleksfördelningen hade även en inverkan på totalhalten av kadmium, nickel, antimon och zink, med en högre totalhalt i den mindre partikelstorleksfraktionen som representerar ofrivilligt intag. Det var därmed olika element som uppvisade en inverkan av partikelstorleksfördelning m.a.p. biolöslig fraktion respektive totalhalt.

Totalhalten hade en inverkan på storleken av den biolösliga fraktionen av arsenik, koppar och bly, med en högre biolöslig fraktion vid lägre totalhalt.

Typen av aska hade betydelse för den biolösliga fraktionen av arsenik, kadmium, krom och antimon. Av dessa element var den biolösliga fraktionen av kadmium högre i bottenaska jämfört med i flygaska, medan den biolösliga fraktionen av arsenik, krom och antimon var högre i flygaskorna jämfört med i bottenaskorna. Asktypen hade också en inverkan på totalhalten av arsenik, krom, koppar, nickel och zink. Totalhalten av arsenik, krom och zink var högre i flygaskor än i bottenaskor, medan totalhalten koppar och nickel var högre i bottenaskorna än i flygaskorna.

I denna studie beror därmed den biolösliga fraktionen av arsenik på både partikelstorleksfördelningen, totalhalten av arsenik samt typen av aska.

Litteraturstudien visade att ytterst lite är känt om oral biotillgänglighet av metaller i förbränningsaskor. De resultat som genererats i den experimentella delen av studien får därför anses ha stor betydelse för de kunskaper som idag finns på området. Samtidigt bör påpekas att studien omfattar ett litet antal askor och att RIVMs (Rijksinstituut voor volksgesundheid en milieu) *in vitro* metod som använts för att simulera den gastrointestinala biolösligheten, för flera av de undersökta metallerna inte är validerad med *in vivo* studier, varför tolkning av resultaten bör göras med försiktighet.

Nyckelord: oral biotillgänglighet, *in vitro* test, gastrointestinal biolöslighet, arsenik, metaller, partikelstorleksfördelning

Summary

In an earlier study, financed by Värmeforsk, *Q4-238 Environmental guidelines for reuse of ash in civil engineering applications*, the total content of arsenic and lead was shown to determine whether or not reuse of some of the ashes in construction work is feasible [4]. The model used to calculate the guidelines uses the total concentration of metals to evaluate the health risks resulting from exposure to the ashes. The use of total concentration can lead to overly conservative risk assessments if a significant fraction of the total metal content is not bioavailable. Better precision in the risk assessment can be given by the use of the bioavailable fraction of arsenic and lead in the model. As a result, ashes which are rejected on the basis of total metal concentration may be acceptable for use in engineering construction when the assessment is based on the bioavailable fraction.

The purpose of the study was to (i) compile information on the oral bioavailability of arsenic, antimony and a selection of metals in ashes and similar materials, and on *in vitro* methods for determination of oral bioavailability, and (ii) experimentally estimate oral bioavailability of arsenic, antimony and some metals in a selection of ashes by analysis of the gastrointestinal bioaccessibility of these elements. The investigated elements were antimony, arsenic, lead, cadmium, copper, chromium, nickel and zinc.

In the literature study performed within the project a number of static and dynamic *in vitro* methods simulating gastrointestinal processes of contaminants were compiled. The methods include one or several segments, i.e. mouth, stomach and intestine. Among the compiled methods, the RIVM (Rijksinstituut voor volksgesundheid en milieu) *in vitro* method was used in the experimental part of the project. The advantages with the method was that

- the method to a high degree mimicked the human gastrointestinal processes (the method included three segments mouth, stomach, and intestine)
- the method was relatively simple
- the method could include an anaerobic step if needed
- the method could include food
- knowledge of the method existed in Sweden
- the method had been compared and evaluated in a scientific publication

In the experimental part of the study the bioaccessibility of antimony, arsenic, lead, cadmium, chromium, copper, nickel and zinc in seven different ashes at two different particle size fractions (<63 μm and <2 mm) was investigated. These fractions were chosen to represent voluntary (<2 mm) and involuntary (<63 μm) ingestion of ash. The investigated ashes were produced in different incineration plants and represented different categories, i.e. type of ash (fly ash or bottom ash), fuel and incinerator. In the experimental part the influence of total concentration of the elements on their bioaccessibility was also investigated, as well as the influence of particle size fraction on total content of the elements. The influence of type of ash on both bioaccessibility and total concentration of the specific elements was also investigated.

The bioaccessible fraction of antimony, arsenic, cadmium, chromium, copper, lead, nickel and zinc in a selection of ashes showed a higher variation between the different elements than between the different ashes. With the exception of arsenic in two of the investigated ashes, the bioaccessible concentration was substantially less than the total concentration of all elements in all ashes. The bioaccessible fraction of arsenic was high both in fly ashes (>85%) and in bottom ashes (40-85%). The bioaccessible fraction of lead was also relatively high and varied between 14 and 60% in the different ashes. Cadmium also had a high bioaccessible fraction which varied between 50-75% in the investigated ashes. The bioaccessible fraction of chromium was much smaller compared to the bioaccessible fraction of the other elements, and was with two exceptions less than 12%. The bioaccessible fraction of copper was relatively high and varied between 20 and 70% in the different ashes.

In this study, particle size fraction only had an effect on the bioaccessible fraction of arsenic, chromium, and copper. For these elements, bioaccessibility was higher in the smaller particle size fraction representing involuntary ingestion. Particle size fraction also had an effect on the total concentration of cadmium, nickel, antimony and zinc, with higher total concentrations in the smaller particle size fraction.

Total concentration only had an effect on the bioaccessible fraction of arsenic, copper and lead, with higher bioaccessible fractions at lower total concentrations.

The type of ash had an influence on the bioaccessible fraction of arsenic, cadmium, chromium and antimony, with a higher bioaccessible fraction of arsenic, chromium and antimony in fly ashes compared to in bottom ashes, and a higher bioaccessible fraction of cadmium in bottom ashes compared to in fly ashes. Type of ash also had an influence on the total concentration of arsenic, chromium, copper, nickel and zinc. Whereas the total concentration of arsenic, chromium and zinc was higher in fly ashes than in bottom ashes, the total concentration of copper and nickel was higher in the bottom ashes compared to in the fly ashes.

Thus, the bioaccessible fraction of arsenic in this study depended on particle size fraction, total arsenic concentration and type of ash.

The literature study performed within the project revealed that very little is known about oral bioavailability of metals in ashes. The results generated in the experimental part of the project therefore contribute important information to this area of research. However, caution should be used when interpreting the experimental results as the study only included a small number of ashes. In addition, the *in vitro* model used for analysis of the bioaccessible fraction is not validated with *in vivo* data for several of the metals investigated.

Keywords: oral bioavailability, bioaccessibility, *in vitro* test, arsenic, metals, particle size fraction

Innehållsförteckning

1	BAKGRUND OCH SYFTE	1
2	LITTERATURSAMMANSTÄLLNING-ORAL BIOTILLGÄNGLIGHET AV ARSENIK, ANTIMON OCH ETT URVAL AV METALLER	2
2.1	BIOTILLGÄNGLIGHET - DEFINITION OCH TILLÄMPNING	2
2.2	FÖREKOMST OCH BIOTILLGÄNGLIGHET AV METALLER I JORD OCH AVFALL	5
2.3	<i>IN VITRO</i> METODER FÖR BESTÄMNING AV BIOLÖSLIG FRAKTION.....	9
2.4	VAL AV <i>IN VITRO</i> METOD	15
3	BESTÄMNING AV BIOLÖSLIG FRAKTION AV ARSENIK, ANTIMON OCH ETT URVAL AV METALLER I ETT ANTAL FÖRBRÄNNINGSASKOR MED RIVMS <i>IN VITRO</i> METOD	17
3.1	METODBESKRIVNING	17
3.2	RESULTAT	20
3.3	RESULTATANALYS.....	30
3.4	SLUTSATSER	35
4	FORTSATT FOU.....	37
5	LITTERATUREREFERENSER.....	38

1 Bakgrund och syfte

I Värmeforskprojektet *Q4-238 Miljöriktlinjer för askanvändning i anläggningskonstruktioner* [4] utvecklades ett system för beräkning av generella riktlinjer med avseende på hälso- och miljöeffekter vid användning av askor i konstruktioner. Bedömningssystemet inkluderade hälso- och miljörisker vid spridning av fasta partiklar, hälsorisk vid intag av grundvatten, miljöeffekter i ytvatten samt hälso- och miljöeffekter efter avslutad drift av vägen. De beräkningar för hälsoriskeffekten vid partikelspridning som genomfördes visade att intag av grönsaker, frukt och bär som förorenats med damm utgjorde en viktig exponeringsväg. Totalhalten av arsenik och bly visade sig vara kritiska och kan därmed vara begränsande för möjligheten att återanvända vissa askor i vissa anläggningar. Enligt vad som framkom i projektet behövdes kraftiga förbättringar göras av en del komponenter i modellbeskrivningen för att riskbedömningen skulle bli säkrare. En sådan komponent är bedömning av hälsorisk vid oralt intag av aska. I bedömningssystemet är analys av totalhalten den jämförelsegrund som används för att avgöra hälsoriskerna vid intag av askpartiklar, vilket i de flesta fall är ett mycket konservativt mått. Andra testmetoder finns tillgängliga som ger ett mått på den biotillgängliga fraktionen vid exponering via inandning eller oralt intag.

Syftet med föreliggande studie är att

- (i) göra en sammanställning av kunskap om den oralt biotillgängliga fraktionen av arsenik, antimon och ett urval av metaller i askor och andra liknande material samt om *in vitro* metoder (provrörsmetoder) för bestämning av gastrointestinalt biolöslig fraktion.
- (ii) experimentellt uppskatta oral biotillgänglighet av arsenik, antimon och ett antal metaller för ett urval av förbränningsaskor genom att bestämma den gastrointestinalt biolösliga fraktionen av elementen med en utvald *in vitro* metod baserat på steg (i).

Den litteraturstudie som utfördes inom projektet visade att ytterst lite är känt om oral biotillgänglighet av metaller i förbränningsaskor. I denna rapport sammanställs därför kunskaper om oral biotillgänglighet av metaller i jord, samt *in vitro* metoder för bestämning av biolöslighet av metaller i jord.

2 Litteratursammanställning - Oral biotillgänglighet av arsenik, antimon och ett urval av metaller

I litteratursammanställningen representerar samlingsnamnet ”metaller” både metaller och halvmetaller.

2.1 Biotillgänglighet - definition och tillämpning

Med ett biotillgängligt ämne menas ett ämne som kan tas upp i vävnaderna hos en levande organism. Hur biotillgängligt ett ämne är beror på ett flertal olika faktorer som t.ex. ämnets kemiska och fysikaliska egenskaper, det omgivande mediets sammansättning och individens fysiologi. Ett ämne kan tas upp i människan genom oralt intag, inhalering och dermalt upptag. Den vanligaste exponeringsvägen för upptag av metaller är genom oralt intag av förorenad jord, förorenat vatten, via växter på vilka askpartiklar deponerats p.g.a damning, eller annan föda. Vid hälsoriskbedömningar förutsätts oftast att 100% av mängden av det intagna ämnet är biotillgängligt. Detta antagande är ofta onödigt konservativt och kan ge missvisande information om den verkliga hälsoriskrisken [25]. Föreliggande rapport fokuserar på oralt intag och oral biotillgänglighet hos människan. Processen för upptag av metallföreningar vid oralt intag sker på samma sätt som för näringsupptaget i stort. I nästföljande avsnitt beskrivs mekanismen för upptag av näringsämnen (inklusive metallföreningar) i kroppen och en rad begrepp som rör oral biotillgänglighet förklaras.

2.1.1 Kort om människans näringsupptag

Matsmältningen sker i mag-tarmkanalen och innefattar nedbrytning och absorption av födan. Processen börjar redan i munnen där födan söndertuggas och enzymer i saliven börjar bryta ned stärkelsen i födan. Efter att maten passerat matstrupen når den magsäcken, där den sura miljön (pH:1,5-2,0) hjälper till att sönderdela födan. Hur lång tid födan stannar kvar i magsäcken beror på om den intagits under fastande förhållanden eller inte. Halveringstiden för tömning under fasta är 8-15 minuter [18][6] och i övriga fall är den 0.5-3 timmar [24] [25].

Från magsäcken transporteras födan långsamt vidare till tunntarmen där nedbrytningen fortsätter med hjälp av enzymer. Här sker det mesta upptaget av näringsämnen. I tarmarna och i matstrupen är pH-värdet för det mesta neutralt eller svagt basiskt, d.v.s. $\text{pH} \geq 7$. Till tunntarmen kommer galla från levern och bukspott från bukspottskörteln, vars roll är att finfördela fetter respektive neutralisera miljön och fortsätta spjälkningen av makromolekyler.

I tunntarmen tas näringsämnena upp då de absorberas genom tarmväggen till blodet. Väggytan är klädd med små utskott, s.k. mikrovilli, som ökar absorptionsytan ca 5 gånger och på så sätt förbättrar näringsupptaget i stor grad. För att ett ämne ska kunna absorberas krävs att det är upplöst, d.v.s. i sin fria form eller bundet till en transportör,

t.ex. löst i galla. Opolära organiska ämnen passerar cellmembranen i tarmen genom diffusion, medan metaller oftast transporteras mellan celler via s.k. intercellulär transport. Molekylerna diffunderar med eller pumpas mot en koncentrationsgradient genom slemhinnan i tarmväggen och vidare in i blod- eller lymfkärlen. Härifrån transporteras de till levern, vars roll bl.a. är att omvandla och bryta ned främmande ämnen samt lagra blod, järn samt ett flertal vitaminer. Från levern kan molekylerna sedan spridas med blodet till diverse organ och vävnader i kroppen.

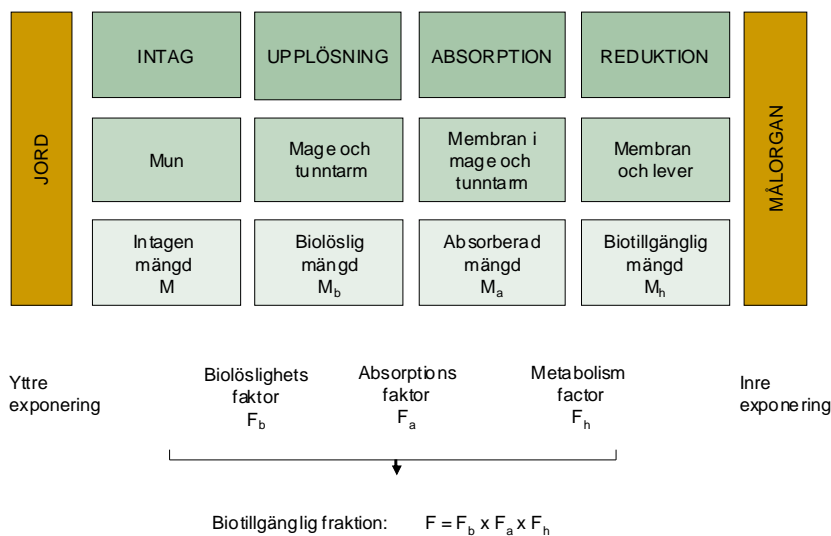
Till skillnad från organiska föreningar som kan metaboliseras i kroppen och därmed brytas ned, elimineras metaller endast ur kroppen via utsöndring med t.ex. urin, bröstmjölk eller med galla till avföringen. Olika metaller har olika utsöndringsmekanismer och olika halveringstider som kan variera mellan någon vecka och flera år.

2.1.2 Oral biotillgänglighet

Absolut, oral biotillgänglighet definieras som den fraktion av en oralt intagen dos som når stora kretsloppet (dvs den blodcirkulation som når ut i hela kroppen förutom lungorna) och kan konceptuellt delas in i tre olika huvudprocesser: 1) utlakning i tunntarmsvätskan, 2) transport över tunntarmen, 3) metabolism/reduktion vid en första passage över levern. Figur 1 beskriver dessa processer för jordföreningar. Matematiskt kan absolut oral biotillgänglighet uttryckas som en biotillgänglighetsfaktor, F , enligt

$$F = F_b \cdot F_a \cdot F_h$$

Efter oralt intag av jord kan föreningarna frigöras delvis eller helt från jorden under matsmältningen. Den fraktion av föreningen som frigörs från jorden till matsmältningsvätskan kallas på engelska för "the bioaccessible fraction", F_b . Eftersom ingen riktigt bra svensk översättning finns, benämns denna fraktion "den biolösliga fraktionen" i föreliggande rapport. Denna fraktion anses vara den maximala mängd av föreningen som kan transporteras över tunntarmen och kan uppskattas experimentellt med hjälp av en *in vitro* metod som simulerar de gastrointestinala förhållandena. Den experimentellt bestämda fraktionen F_b kan användas för att (konservativt) approximera den absoluta orala biotillgängligheten, F . I Figur 1 representerar F_a den andel av den i tunntarmsvätskan utlakade (biolösliga) mängden förening som transporteras över tunntarmen in i portalådern eller lymfan. En del föreningar kan metaboliseras i tunntarmen eller levern och F_h är den fraktion av mängden förening som passerat över tunntarmen och levern utan att ha metaboliserats, och som transporteras ut i kroppen av stora kretsloppet och som därmed kan ha en toxisk effekt på vävnader och organ.



Figur 1. Konceptuell illustration av de ingående processerna i oralt upptag. Från Grøn [16].

2.1.3 Faktorer som styr biotillgänglighet

Metallers biotillgänglighet är en funktion av de processer som påverkar deras löslighet och rörlighet i det omgivande mediet. Vid oral exponering finns det inte alltid en korrelation mellan en metalls mobilitet i jord (eller aska) och biotillgänglighet. Istället är det primärt de fysiologiska och kemiska förhållandena i kroppen som kontrollerar metallens biotillgänglighet. När jord (eller aska) kommer ner i den sura miljön i magen frigörs metaller och organiska föreningar som varit associerade med olika oxider, sulfider och karbonater [16]. Hur biotillgänglig en metallförening är bestäms av hur mycket av metallföreningen som löses upp i magen och tunntarmen, och tunntarmens förmåga att absorbera metallen, vilket beror av de kemiska egenskaperna hos metallen, jordmatrisens egenskaper och sammansättningen hos mag- och tarmvätskorna.

För de flesta metaller är **pH** den viktigaste tillståndsparametern som styr dess utlakning, (och därmed biotillgänglighet) från askor. Detta har visats i flera termodynamiska studier [23] och i studier baserade på empiriska data. Oxyanjoner och katjoner uppvisar olika pH-beroende utlakningsmönster. Den maximala utlakningen av oxyanjoner från aska sker vid pH 8-11 [8]. Katjoner uppvisar ett motsatt pH-beroende i aska sådant att utlakningen är minimal vid pH 8-11 och ökar vid lägre pH-värden. För vissa katjoner kan utlakningen också öka vid högre pH genom att de bildar lösliga anjoniska hydroxylkomplex. Det finns också andra faktorer som påverkar utlakningen, t.ex. närvaro av kloridjoner och löst organisk kol [38].

En metalls löslighet kan också bero på **redox-potentialen** i det omgivande mediet [38]. Effekten av redox-potential för utlakningen av metaller i askor är sällan kvantifierad

eller kontrollerad i samma omfattning som t.ex. effekten av pH. De studier som finns visar dock på en stor skillnad i lakbarhet av flera metaller mellan oxiderade och reducerade miljöer. Arsenik, krom och antimon är exempel på redox-känsliga ämnen.

Andelen **organiskt material** i det omgivande mediet kan också ha betydelse för hur löslig en metall är. Många metaller kan bilda komplex med organiskt material [38] och därigenom bli mindre tillgängliga för upptag över tarmen.

Partikelstorleken hos en jord eller askmatris kan också ha betydelse för hur biotillgänglig en metall är. Eftersom små partiklar har större specifik yta och därmed högre adsorptionskapacitet kan man förvänta sig att små partiklar av en metallförorenad jord har högre metallinnehåll än stora. Detta har också visats i flera studier [44] [34]. Små askpartiklar har också visat sig vara mer reaktiva än stora, eftersom den tillgängliga ytan är styrande vid utlakning och upplösning [5][3]. Det kunde därför förväntas att den biolösliga halten av metaller även i denna studie skulle vara negativt korrelerad med partikelstorleken. Ljung et al. [22] visade dock i sin undersökning av sandiga jordar att även om totalhalten av metallerna var högre i mindre partiklar så var inte den biolösliga fraktionen högre vid den mindre partikelstorleksfraktionen.

Utlakning av metaller kan öka med stigande **temperatur** och därmed också påverka biotillgängligheten.

Metallföreningar från **antropogena** källor är oftast mer lösliga än de från naturliga källor. Studier har visat att metallföreningar som befunnit sig i jord länge (åldrade föreningar) ofta är mindre tillgängliga [11]. **Åldring** kan också påverka sorptionskapaciteten hos järn oxider/hydroxider. Med tiden rekristalliseras järnoxiderna till en mera ordnad struktur och dess ytor minskar. Denna ombildning och minskning av sorptionsplatsdensitet kan leda till ökad mobilitet av arsenik. Men åldring kan också leda till att sorberade metalljoner inkorporeras i strukturen vid återkristallisering. Ainsworth et al. [2] fann indikationer på att åldrandet av järnoxid/hydroxider kan leda till långsam desorption för Co, Cd och Pb beroende på den ändrade kristalliseringsstrukturen.

2.2 Biolöslighet i jord

En metalls biolöslighet beror delvis av i vilken kemisk form den föreligger, och en rad olika faktorer styr detta, bl.a. jordens egenskaper. I Tabell 1 finns en sammanställning av litteraturuppgifter på biolöslighet i jord för de metaller som undersöktes experimentellt i föreliggande arbete. I underkapitlet ges också en kortare beskrivningar av de olika metallernas egenskaper i jord.

 Tabell 1. Gastrointestinal biolöslighet av metaller i jord.

Metall	Biolöslig fraktion (%)
Antimon	Inga granskade publikationer kunde hittas
Arsenik	3-50% (jord, sammanställning i [21]) 10-29% (sandiga jordar, [22]) 12% (jord från gruvområde, [7]) 66% (standard ref jord, [10]) 1-95% (olika jordar, olika <i>in vitro</i> metoder, [28])
Bly	1-91% (olika jordar, olika <i>in vitro</i> metoder, [28]) 10% (standard ref jord, [10]) 0,18% (jord från gruvområde, [7]) 1-25% ((sandiga jordar, [22]) 1-73% (jord, sammanställning i [21])
Kadmium	5 -99% (olika jordar, olika <i>in vitro</i> metoder, [28]) 15-50% (sandiga jordar, [22]) 38-68% (Cd-förorenad jord, [33])
Koppar	Inga granskade publikationer kunde hittas.
Krom	5-70% (olika Cr-förorenade jordar, [36, 37])
Nickel	<=10% (sandiga jordar, [22])
Zink	Inga granskade publikationer kunde hittas.

2.2.1 Antimon

Dagens kunskaper om förekomstformer och biotillgänglighet av antimon i jord är bristfällig. Enligt Adriano [1] är $Sb^{III}O_x$ den mest troliga formen som uppträder i jord. Antimon uppträder geokemiskt som arsenik.

Inga av oss idag kända granskade vetenskapliga publikationer behandlar *in vitro* studier av gastrointestinal biolöslighet av antimon.

2.2.2 Arsenik

De vanligaste förekomstformerna av arsenik är oorganiska oxyanjoner av As(III) och As(V) [1]. Lösligheten är hög vid neutrala förhållanden och minskar med sjunkande pH. Dessa löslighetsegenskaper är de omvända jämfört med vad som generellt gäller för många joner av metaller och metallknande ämnen. De oorganiska formerna är generellt sett mer rörliga i marken än de organiska och utgör därmed större risk för att transporteras till yt- och grundvatten. Den femvärda formen av arsenik, dvs arsenat, dominerar vid aeroba förhållanden medan den trevärda och mera mobila formen, arsenit, dominerar vid sjunkande redox och $pH < 9,2$ [43]. Oorganisk arsenik är carcinogent både vid inhalering och oralt upptag. Arsenit har högre akut toxicitet än arsenat, men den kroniska toxiciteten är densamma för all oorganisk arsenik oavsett valenstal.

Enligt den sammanställning som gjorts av Ljung [21] visar resultat från *in vitro* tester av jord en stor variation i gastrointestinal biolöslighet beroende på typ av jord och föroreningsituation (t.ex. halter, ålder och speciering av element). Den biolösliga fraktionen av arsenik i denna sammanställning varierar mellan 2,7-50 %. Biolöslighet av arsenik analyserad med RIVMs *in vitro* metod har i jord från lekplatser i urban miljö tidigare funnits variera mellan 9,7 och 28,7% beroende på partikelstorlek och mängd jord som använts i testet [22]. Med andra *in vitro* metoder har biolöslig fraktion i jord uppmätts till 12% [7] och 66% [10]. Storleken på den biolösliga fraktionen beror på jordens egenskaper, i vilken mineralform arsenik föreligger, jordens föroreningsgrad m.m. Arsenik från antropogena källor är vanligen mer biolösliga än från naturliga källor [15]. Arsenik ses ofta ha högre biolöslighet och mobilitet jämfört med andra ämnen, vilket kan förklaras av att arsenik förekommer som oxyanjoner och är mobilt över ett brett redoxintervall och vid vanligt förekommande pH-värden i grundvatten (pH 6.5-8.5). Detta faktum gör arsenik till en av de mest problematiska föroreningarna i miljön [35]. Den biolösliga fraktionen arsenik kan också variera beroende på vilken *in vitro* metod som används. Vid en jämförelse av den biolösliga fraktionen av arsenik i tre olika jordar med fem olika *in vitro* metoder [28] varierade den mellan 6-95%, 1-19% och 10-59% i de tre olika jordarna beroende på vilken *in vitro* metod som användes. De olika metoderna skildes åt med avseende på ingående segment i modellen (magdel, termdel etc.), pH i mag/tarm-vätskor, L/S-värde, närvaro av enzymer och proteiner i vätskorna, omrörningshastighet, inkubationstid, närvaro av föda m.m. Det är för närvarande inte utrett i vilken omfattning dessa olika faktorer påverkar den biolösliga fraktionen av arsenik.

2.2.3 Bly

Bly förekommer i miljön i över 200 olika mineraler med stor variation av löslighet, men endast ett fåtal föreningar är vanliga [1]. Sådana som bildas vid lågt pH, t.ex. blyulfat (PbSO_4) och järnblyulfat (FePbSO_4), är mer stabila i den sura miljön i magsäcken och därmed mindre biolösliga än de som bildats under basiska förhållanden, t.ex. blyoxid (PbO) och blykarbonat (PbCO_3) [31]. Organiska former av bly förekommer sällan i miljön, eftersom de har en benägenhet att bilda oorganiska komplex genom åldring [27]. Den mest toxiska formen som förekommer i avfall är Pb(II) [1].

Oral biotillgänglighet av bly i jord har studerats med både *in vivo* och *in vitro* metoder i större omfattning än andra metaller. Ett flertal faktorer avgör hur biolöst bly är. Det rådande pH-värdet i magsaften har visats ha stor betydelse för utlakningen av bly, vilken minskade med 65% när pH i magen ökade från pH 1,3 till 2,5 i en studie av Ruby et al. [30]. Vid en jämförelse av den biotillgängliga fraktionen av bly i tre olika jordar med fem olika *in vitro* metoder [28] varierade den mellan 4-91%, 1-56% och 3-90% i de tre olika jordarna beroende på vilken *in vitro* metod som användes. De olika metoderna skildes åt med avseende på ingående segment i modellen (magdel, tarmdel etc.), pH i mag-tarmvätskor, L/S-värde, närvaro av enzymer och proteiner i vätskorna, omrörningshastighet, inkubationstid, närvaro av föda m.m. Även i denna studie tillskrevs den stora variationen i biolöslighet främst bero på skillnader i pH mellan de olika metodernas lakvätskor. Barn har oftare lägre pH i magen än vuxna och kan

absorbera mer bly än vuxna [1]. Människans ålder har alltså betydelse för upptag av bly. Högre absorption kan också förekomma vid brist av järn och kalcium [19].

2.2.4 Kadmium

Den vanligaste och mest toxiska formen av kadmium som förekommer i jord är Cd(II) [1]. Kadmium föreligger i jorden som Cd(II) och förekommer i flera kemiska former i miljön från mindre lösliga sulfider (CdS) till mer lösliga karbonater (CdCO₃) men också bundet genom kanjonbyte till jorden i jonisk form.

Ytterst få *in vivo* studier av biotillgänglighet har genomförts för kadmium, vilket försvårar jämförelse och värdering av *in vitro* resultat. Oral absorption (upptag över tarmen) av kadmium har visats mycket låg i vissa studier, ca 1-8 % [19] men det finns studier som visar att absorptionen kan öka vid underskott av järn och kalcium [33]. I en studie av Ljung et al. [22] varierade den biolösliga fraktionen av kadmium, analyserad med RIVMs *in vitro* test, i 25 icke-förorenade sandiga jordar mellan 15-50%. I en annan studie [33] varierade den biolösliga fraktionen av kadmium mellan 38 och 63% beroende på om mat fanns närvarande eller ej i mag-tarmvätskan. Vid en jämförelse av den biolösliga fraktionen av kadmium i tre olika jordar med fem olika *in vitro* metoder [28] varierade den biolösliga fraktionen av kadmium mellan 7-92%, 5-92% och 6-99% i de tre olika jordarna beroende på vilken *in vitro* metod som användes. De olika metoderna skilde sig åt m. a. p. ett antal faktorer (se kapitel 3.3) varav pH tillskrevs ha störst betydelse för skillnaderna i biolöslig fraktion kadmium (dvs som för bly i samma studie).

2.2.5 Koppär

I vatten förekommer koppär vanligen som katjon, Cu²⁺, men också som hydroxider eller karbonater [1]. Koppär komplexbinder också till organiskt material. Den vanligaste förekomstformen av koppär i jord är som koppärsulfid i blandning med järn (CuFeS₂). Koppär är ett essentiellt element men toxiskt vid högre doser. I dag finns det inga för oss kända *in vitro* studier av biolöslig fraktion av koppär i granskade vetenskapliga publikationer.

2.2.6 Krom

Krom existerar i jord som trivalent krom, Cr(III), och som hexavalent krom, Cr(VI), där hexavalent krom är mer mobilt än trivalent krom [19]. Under oxiderande förhållanden existerar Cr(VI) främst som oxyanjonerna bikromat (HCrO₄⁻) och kromat (CrO₄²⁻) vilka är mobila i de flesta jordar under lätt sura till alkaliska förhållanden. Under reducerande förhållanden är krom däremot relativt immobilt vid neutralt pH eftersom Cr(III) lätt faller som svårlöslig oxid. Kroms mobilitet kontrolleras också av den organiska halten, fosfat och sulfat som konkurrerar med krom om sorptionsplatser. Cr(III) betraktas som ett essentiellt spårämne medan Cr(IV) är toxiskt redan vid låga koncentrationer [20].

Cr(VI) har hög mobilitet vid höga pH-värden. Cr(VI) är mer biotillgängligt än Cr(III). Trots detta pekar mycket på att Cr(VI) kan reduceras till Cr(III) i den sura och aneroba miljön i magsäcken hos människan, vilket på så sätt kan minska dess biotillgänglighet [27]. I en *in vitro* studie av den biolösliga fraktionen av krom i två olika förorenade jordar varierade den mellan 5-70% för både Cr(III) och Cr(VI). Variationen kunde förklaras av skillnader i jordtyp, oxidationstal och totalkoncentration krom [36]. Ju högre total kromhalt i jorden desto lägre var den biolösliga fraktionen. Samma studie visade också att krom som fått åldra i jorden har lägre biolöslig fraktion än krom som funnits i jorden endast kort tid. I samma *in vitro* studie som ovan [22] var den biolösliga fraktionen av krom i 25 icke-förorenade sandiga jordar betydligt lägre och under 5%.

2.2.7 Nickel

Nickel förekommer oftast som Ni(II), vilken också är den mest toxiska formen [1]. Metallen kan existera i mindre lösliga former, t.ex. som sulfider (NiS) och fosfater (Ni(PO₄)₂) men även i mer lösliga varianter, t.ex. karbonater (NiCO₃). I jord är nickel oftast bundet genom katjonbyte till organiskt material, järnhydroxider och lermineral.

I en studie av Ljung et al. [22] var den biotillgängliga fraktionen mindre än 10% i samtliga 25 undersökta sandiga jordar.

2.2.8 Zink

Zink förekommer huvudsakligen i naturliga vatten som katjon (Zn²⁺), men bildar komplex med karbonater och hydroxider [1]. Den vanligaste förekomstformen i jord är som zinksulfid (ZnS), men kan också föreligga som zinkfosfat, zinkhydroxid och zinkkarbonat vars löslighet ökar med minskande pH. Zink är ett essentiellt ämne och har relativt låg toxicitet jämfört med andra metaller.

Idag finns det inga av oss kända *in vitro* studier av biolöslighet av zink i granskade vetenskapliga publikationer.

2.3 *In vitro* metoder för bestämning av biolöslig fraktion

Eftersom bestämning av biotillgänglighet i djurstudier s.k. *in vivo* metoder är både dyra och tidsödande har olika *in vitro* metoder utvecklats för att bestämma biolöslig fraktion av metaller. Gemensamt för dessa *in vitro* metoder är att de simulerar förhållandena i matsmältningsorganen hos människor, d.v.s. *in vivo* biotillgänglig fraktion.

2.3.1 Krav på en *in vitro* metod

För att en *in vitro* metod ska vara tillämplig bör den baseras på människans fysiologi och helst på den hos ett barn, eftersom risken för direkt kontakt via hand till mun är störst för den här gruppen. Dessutom bör den av säkerhetsskäl simulera värsta tänkbara scenario, d.v.s. högsta möjliga biolöslighet av ämnet [28]. Enligt Grøn och Andersen [15] finns det en rad generella övergripande krav som en *in vitro* metod bör uppfylla för

att kunna användas vid bestämning av biolöslighet. Den bör t.ex. vara: 1) reproducerbar (d.v.s. analys av ett prov ska ge samma resultat i olika laboratorium) 2) repeterbarhet (samma resultat ska kunna uppnås flera gånger för samma prov i samma laboratorium) 3) enkel (proceduren ska innehålla så få steg som möjligt) 4) tolkningsbar (d.v.s. resultaten måste kunna korreleras väl med resultat från *in vivo* försök) 5) heltäckande (d.v.s. tillåta analys av ett så brett spektra som möjligt av föroreningar, jordar etc) 6) konsekvent (d.v.s. testresultaten ska överensstämma med processer som förutspått utifrån kunskaper om jordkemi och speciering av föroreningen).

2.3.2 Tillgängliga metoder

Existerande metoder som bygger på människans fysiologi kan delas upp i två typer; (i) statiska metoder som utförs i bägare eller (ii) dynamiska metoder som genomförs i genomflödes-reaktorer [39]. Den senare varianten tar hänsyn till den gradvisa tömningen av intagna födoämnen i mag-tarmkanalen. Endast ett fåtal dynamiska tekniker har utvecklats, varav en sådan är TIM (se nedan). En *in vitro* metod som simulerar människans upptag av föroreningar, kan innehålla mellan 1-3 segment, dessa är munhåla, magsäck och tunntarm. De flesta metoder är statiska mag-tarmmodeller, som simulerar föroreningens väg från munnen till tunntarmen [28].

Den kemiska sammansättningen i mag-tarmkanalen är komplicerad och svårt att efterlikna, eftersom den varierar med individens ålder, hälsa m.m. Förekomst av föda i mag-tarmkanalen, d.v.s. om personen har ätit eller är fastande påverkar också de kemiska förhållandena. Grøn [16] har identifierat några förhållanden som anses särskilt viktiga att efterlikna i en *in vitro* metod:

- Buffrad sur miljö i den simulerade magsäcken ($\text{pH} < 2$)
- Buffrad svagt basisk miljö i den simulerade tarmdelen ($\text{pH} > 7$)
- Aeroba förhållanden följt av anaeroba förhållanden för att simulera mag- respektive tarmdel.
- Tillsatser av enzymer, proteiner och galla.
- Närvaro av mat (t.ex. mjölkpulver) för att simulera föda.
- Lämplig verkningsstid i varje delmoment, förslagsvis 3 timmar i magdelen, 10 h i tarmdelen.
- $L/S > 100$ för stabilitet, d.v.s. andel vätskevolym i förhållande till massa fast material i försöket > 100 .

Förhållandet mellan vätska och fast fas i tillgängliga metoder varierar från 2,5:1 till 5000:1. För att spegla den i mag-tarmsystemet hos ett 2-3 år gammalt barn, bör L/S-förhållandet vara ca 100:1 [39].

Det finns i dagsläget ingen *in vitro* metod som omfattar samtliga ovan nämnda punkter. Vanligtvis inkluderas inte heller mikrobiell aktivitet i mag-tarmsystemet eller aktiv transport av föroreningar i en *in vitro* studie. Även dessa faktorer kan vara viktiga för upptag av föroreningar och innefattas i *in vivo* data. Då ingen metod kan efterlikna den mänskliga matsmältningsfysiologin i sin helhet blir valet av testmetod en kompromiss mellan ämnets kemiska egenskaper, matsmältningsfysiologin, praktiska begränsningar

och resultatens tilltänkta användningsområde. Tabell 2 visar en sammanställning av några befintliga *in vitro* metoder. Metodernas konstruktion och tillämpningsområde beskrivs mer detaljerat längre fram. För att en *in vitro* metod ska vara relevant att använda för att simulera *in vivo* resultat måste det finnas ett signifikant samband mellan *in vitro* data och *in vivo* data. De olika *in vitro* metoderna som nämns nedan har oftast endast validerats för enstaka metaller.

2.3.2.1 DIN

DIN (Deutsches Institut für Normung) är en tysk metod som används för att mäta biolöslighet av både organiska och oorganiska ämnen. I metoden ingår simulering av magsäck och tunntarm. I vissa fall inkluderas även saliv för att simulera ett första steg i munhålan. Proceduren kan utföras både med och utan tillsats av föda (mjölkpulver).

DIN har främst använts för analys av biolöslighet i jord, men en rad andra medier har också undersökts med metoden, bl.a. flygaska, blästringssand och avloppsslam [9] Metoden rekommenderas vid bestämning av biolöslighet av bly, kadmium, nickel och arsenik [16].

2.3.2.2 IVG

IVG (*In vitro* gastrointestinal method) har utvecklats av Rodriguez et al. [32] för bestämning av biolöslig fraktion av arsenik i jord och avfall [39]. Metoden är en tvåstegsextraktion med mag- och tarmdel som kan utföras både med och utan tillsats av föda. IVG har hittills validerats mot *in vivo* data för bly, arsenik och kadmium.

För att kunna mäta biolöslighet av arsenik i jord och annat fast material har en variant av IVG utvecklats som kallas IVG-AB. Den skiljer sig från den ursprungliga metoden i det att lakvätskan i IVG-AB även innehåller en järnhydroxidgel för att simulera upptag över tunntarmen av arsenik.

2.3.2.3 MB

MB (massbalans) är en trestegsextraktion som innefattar simulering av munhåla, magsäck och tunntarm [17]. Det som främst skiljer metoden från andra, är att koncentrationen av metallen som testas dels mäts i varje extraktionssteg, men även i den jord som finns kvar efter extraktionerna, vilket gör att en massbalans kan beräknas för de element som undersöks.

MB har använts för bestämning av biolöslig fraktion av arsenik, bly, kadmium och krom. Vid en jämförande studie av tillgängligt bly i människor efter intag av jord (*in vivo*) visade sig extraktion av samma jord med MB-metoden ge något högre värden [17]. Detta kan tolkas som att MB överlag ger något högre löslighet av metaller, troligtvis p.g.a. den sura miljön i magdelen [39].

2.3.2.4 PBET

PBET (Physically Based Extraction Test) är en tvåstegsextraktion som simulerar förhållandena i mag-tarmkanalen hos ett litet barn. Ingående delar är mage och tunntarm. PBET har visat på en god korrelation till *in vivo* data för bly och arsenik [16].

En möjlig nackdel med PBET är att den inte tar hänsyn till eventuell förekomst av föda. En annan begränsning är att metoden har visat sig svår att tillämpa på ett stort antal prov. Olika försök till vidareutvecklingar har gjorts i syfte att ta fram en mer reproducerbar och förenklad version som kan användas för större antal prov, se avsnitt 4.2.6.

2.3.2.5 RIVM

RIVMs *in vitro* metod för biolöslighet har utvecklats vid National Institute of Public Health and the Environment i Nederländerna. Metoden är en trestegsextraktion som simulerar matens väg genom munhålan, magsäcken och tunntarmen. RIVMs *in vitro* metod existerar i två varianter, en utan tillsats av föda för oorganiska ämnen samt en med föda för organiska ämnen. Metoden har använts för att bestämma biolöslighet av bly, men har visat på dålig korrelation till *in vivo* studier [16].

Enligt Grøn [16] kan den variant av RIVM som simulerar intag under fasta, ge dålig korrelation med *in vivo* data p.g.a. det höga pH-värdet i tunntarmsdelen. Om tunntarmssimuleringen i RIVMs metod exkluderades visade *in vitro* och *in vivo* data god linjär korrelation [16]. RIVMs ursprungliga metod beskrivs dock ge ett realistiskt värde på värsta tänkbara biolöslighet.

Tabell 2. In vitro metoder för bestämning av biolöslig fraktion (Modifierad från Wragg & Cave, 2003 [39])

Metod	Typ	Segment	L/S kvot	Tid	Överskott av syre	pH	Tillsats av föda	Temperatur
PBET ¹	Batch	Magsäck	100	1 h	Nej, argon	2,5	Nej	37 °C
		Tunntarm		4 h		7		37 °C
SBRC ²	Batch	Magsäck Tunntarm*	1,5	1 h	Nej	1,5	Nej	37 °C
MB ³	Batch	Munhåla,	160	5 s	Ja		Nej	omgivningens
		Magsäck	2000	2 h				37 °C
		Tunntarm	4400	2 h				37 °C
DIN ⁴	Batch	Munhåla*	15	30 min	Ja	6,4	Valfritt	37 °C
		Magsäck	50	2 h		2		37 °C
		Tunntarm	100	6 h		7,5		37 °C
RIVM ⁵	Batch	Munhåla	15	5 min	Ja	6,5	Båda varianter finns	37 °C
		Magsäck	37,5	2 h		1,1		37 °C
		Tunntarm	97,5	2 h		5,5		37 °C
IVG ⁶	Batch	Magsäck	150	1 h	Nej, argon	1,8	Valfritt	37 °C
		Tunntarm*	150	1 h		5,5		37 °C
SHIME ⁷	Batch	Magsäck	2,5	3 h	Ja	5,2	Ja	37 °C
		Tunntarm	4	5 h		6,5		37 °C
		Tjocktarm*						
TIM ⁸	Column	Munhåla	5	5 min	Ja	5	Ja	37 °C
		Magsäck	30	1,5 h		2		37 °C
		Tunntarm	51	6 h		7,5		37 °C

1 Physiologically Based Extraction Test method

2 Solubility/Bioavailability Research Consortium method developed from PBET

3 Mass balance [38]

4 Deutsches Institute für Normung (DIN 19738)

5 National Institute of Public Health and the Environment, The Netherlands

6 *In vitro* gastrointestinal method [32]

7 Simulator of Human Intestinal Microbial Ecosystems of Infants

8 TNO gastrointestinal model

* Valfritt segment som kan inkluderas i metoden

2.3.2.6 SBRC

SBRC står för Solubility/Bioavailability Research Consortium. Gruppen har tagit fram en metod för bestämning av biolöslighet av metaller i jord. SBRC-metoden är en förenklad variant av PBET och kallas även Drexler-metoden [16]. Det finns två varianter av SBRC. I den ena ingår simulering av fysiologin av mag- och tarmdelen, medan den andra varianten endast inkluderar magdelen hos människan. Ingen föda tillsätts i någon av modellerna. Den senare modellen benämns SBET (Simple Bioaccessibility Extraction Test) och innehåller endast ett extraktionstest vilket gör den relativt enkel och passar för studier med ett stort antal prover.

Utmärkande för SBRC är att tyngdpunkten lagts på god korrelation mellan *in vivo* biotillgänglighet och *in vitro* biolöslighet. Studier har också visat att resultat från den här metoden haft bra korrelation med värden från *in vivo* undersökningar med grisar [31]. SBET används utbrett i USA för kadmium, bly och arsenik och rekommenderas för nickel, medan SBRC med både mag- och tarmdel rekommenderas vid bestämning av biotillgänglighet av krom och kvicksilver [16]. Metoden ger värden för värsta tänkbara scenario (dvs maximal biotillgänglighet).

2.3.2.7 SHIME

SHIME (Simulator of Human Intestinal Microbial Ecosystems of Infants) är en metod som används vid Vitoinstitutet i Belgien för studier av förorenad mark. Modellen innefattar simulering av magsäck och tunntarm, i vissa fall inkluderas även tjocktarm i modellen genom att mikroflora tillsätts [28]. Metoden går att använda både med och utan tillägg av föda. I det senare fallet tillsätts grädde för att imitera näringsupptag hos små barn.

Proceduren utförs vanligtvis i en reaktor, men den kan också utökas till flera vilket ger en dynamisk metod. Metoden har främst använts för bly, men även arsenik och kadmium har testats med SHIME.

2.3.2.8 TIM

TIM (TNO gastrointestinal model) är en datorstyrd, dynamisk *in vitro* modell med simulering av magsäck och tunntarm. Födans väg genom mag-tarmkanalen simuleras över tid vid förhållanden som råder efter intag av en halvflytande måltid [28]. Reglering av pH-nivå sker genom att syra pumpas in i magsäckssektionen och lut i tunntarmssektionen.

TIM skiljer sig från de flesta metoder genom att magdelen successivt töms på provet under det att pH-värdet sjunker från 5 till 2. Detta för att simulera hur pH-nivån höjs vid intag av föda för att sedan återgå till normalt pH. Ett flertal extraktionsfraktioner mäts under hela proceduren som totalt tar ca 7,5 timmar.

2.3.3 Jämförelse av *in vitro* metoder

Vid en jämförelse av fem kända *in vitro* metoder utförd av BARGE (the Bioavailability Research Group Europe) visades de metoder som endast omfattar simulering av magsäcken ge högre biolöslighet än de som även inkluderar en tarmdel [28]. Orsaken är sannolikt det låga pH-värdet i magsäcken. En statisk magmodell (SBET), tre statiska mag-tarmmodeller (DIN, RIVM och SHIME) samt en dynamisk mag-tarmmodell (TIM) användes för att testa biolöslighet i tre jordar förorenade av bly, arsenik och kadmium. Teknikerna valdes eftersom de i stor utsträckning används av BARGE, vars mål är att etablera tillvägagångssätt för att bestämma biotillgänglighet vid platsspecifika riskbedömningar. Studien visade att SHIME genomgående gav lägst biolöslighet, medan SBET resulterade i högst värden. Förklaringen är sannolikt att förekomsten av föda i SHIME höjer pH-värdet, vilket i sin tur leder till lägre löslighet och därför högre

biolöslighet. SBET å andra sidan innehåller ingen tarmdel med högre pH i förhållande till magdelen, vilket ger ett lägre pH överlag än för övriga metoder och således högre löslighet av metaller [28].

En av de punkter som skiljer metoderna åt är att MB, PBET och SBRC inte tar någon hänsyn till förekomst av föda i magsaften. Studier har visat att föda både kan reducera och öka upptaget av vissa ämnen. Exempelvis har lösligheten av bly visat sig kunna öka vid närvaro av föda [39]. Huruvida föda ska inkluderas eller ej i en *in vitro* metod bör avgöras från fall till fall beroende på vilken förorening som ska testas och vilken målgruppen är.

På grund av variationer i utförande och ingående parametrar ger olika metoder olika resultat och olika korrelation till *in vivo* data. Den variabel som visat sig ha störst betydelse är pH-värdet i de ingående segmenten. En viktig förutsättning för att kunna värdera resultatet från *in vitro* tester, är att de kan jämföras med *in vivo* data. Det här är möjligt för samtliga metoder som nämns i föreliggande rapport. Olika metoder för att bestämma biolöslighet kan vara lika bra även om de inte ger samma resultat. Varje metod har för- och nackdelar.

2.4 Val av *in vitro* metod

Några av de parametrar som låg till grund för valet av den *in vitro* metod som användes i detta projekt var:

- Vilka ämnen som skulle testas
- Tidsaspekt
- Budget

Upptaget i kroppen skiljer sig för olika ämnen, vissa är t.ex. mer lösliga vid närvaro av föda, varför en metod som simulerar lämpliga förhållanden för föroreningen bör väljas. Dessutom bör valet av ingående segment, t.ex. mun, matstrupe, magsäck, tunntarm och kolon, samt den kemiska sammansättningen i varje del, baseras på den målgrupp studien är avsedd för, eftersom fysiologin och därmed mekanismen för upptag hos individen beror på ålder, om personen är fastande o.s.v. Typen av exponering som förväntas är också viktig att ha i beaktande. När det gäller metaller anses oralt upptag vara den viktigaste exponeringsvägen.

Vissa metoder är mer tidskrävande och kräver fler analytiska tester än andra. Om en enkel eller väldigt komplicerad teknik väljs, beror på hur snabbt resultat som förväntas och hur stor budgeten är, men även på hur viktigt det är att metoden är precis. TIM exempelvis är väldigt komplicerad, men det är också den teknik som bäst avspeglar det mänskliga näringsupptaget.

En annan viktig aspekt som bör ligga till grund för vilken metod som används, är huruvida ett mer realistiskt resultat eller högsta möjliga biolöslighet förväntas. Fastande

förhållanden med lågt pH ger troligtvis maximal biolöslighet för metaller, medan närvaro av föda och höga pH ger mer realistiska värden [28].

Ytterligare en faktor att ta hänsyn till vid val av *in vitro* metod är vilket L/S-förhållande (kvoten mellan vätskefas och aska) som råder i *in vitro* testet. Om det är relevant att simulera intag av aska med s.k. pica-beteende, dvs ett överdrivet intag av aska, bör ett lågt L/S-förhållande väljas. Man bör dock vara medveten om att alltför låga L/S-förhållanden kan leda till att vattenfasen blir mättad m.a.p. den specifika föroreningen, vilket påverkar storleken på den biotillgängliga fraktionen. I studier där en icke-pica situation simuleras kan ett L/S-förhållande över 100 vara en bra uppskattning av förhållandet i ett barns mage och för en pica-situation L/S 30 [21].

Den sammantagna bedömningen av lämplig metod att använda i detta projekt för att bestämma biolöslig halt av arsenik och ett urval av metaller föll på RIVMs *in vitro* metod. Fördelarna med denna var:

- att metoden i hög grad liknade människans mag-tarmprocesser (inkluderade munhåle-, mag- och tarmdel).
- att den är relativt enkel att utföra jämfört med t.ex. kolonnförsök.
- att det var praktiskt möjligt att inkludera ett anaerobt steg om behov fanns, vilket kunde vara av betydelse för att maximera biolösligheten av arsenik som har högre löslighet vid anaeroba förhållanden än aeroba.
- att kunskap om metoden fanns i Sverige, SLU, Uppsala.
- att metoden har varit en av dem som ingått i BARGE-studien [28]
- att möjligheten att använda föda fanns

I projektet skulle biolöslighet av arsenik och ett urval av metaller bestämmas under ett "worst case scenario". Av det skälet valdes att använda den variant av metoden som inte inkluderade föda.

3 Bestämning av biolöslig fraktion av arsenik, antimon och ett urval av metaller i ett antal förbränningsaskor med RIVMs *in vitro* metod

Syftet med experimentet var att bestämma den biolösliga fraktionen av antimon, arsenik, bly, kadmium, koppar, krom, nickel och zink i sju utvalda förbränningsaskor vid två olika partikelstorleksfraktioner (<63 μm och <2 mm). De undersökta förbränningsaskorna kommer från olika anläggningar och representerar olika kategorier av askor m.a.p. typ av aska (flyg- eller bottenaska), panna, bränsle samt lagringstid och beskrivs mer utförligt i Tabell 4. Strategin vid val av aska var att använda ett brett urval av askor för att få en uppfattning om variationen i biolöslighet mellan olika slags askor.

De två olika undersökta partikelstorleksfraktionerna är valda för att representera avsiktligt (<2 mm) och oavsiktligt (<63 μm) intag av aska. Vid riskbedömningar utgår man ifrån den exponering som ett barn kan utsättas för. Barn kan förväntas inta aska/jord genom att avsiktligt stoppa den i munnen. Aska kan också intas oavsiktligt då ett barn stoppar nedsmutsade fingrar eller föremål i munnen. Studier har visat att den mest troliga partikelstorleksfraktionen vid ofrivilligt intag av jord är 0-50 μm [33]. I denna studie representerar storleksfraktionen 0-63 μm ofrivilligt intag (63 μm är en vanligt förekommande standardsikt), medan storleksfraktionen 0-2 mm representerar frivilligt intag. I partikelstorleksfraktionen 0-2 mm ingår därmed storleksfraktion 0-63 μm .

Studien inkluderar också aska från en lysimeter på SGI:s lysimeterfält. Lysimeterfältet anlades 1991 i syfte att möjliggöra långvariga fältmässiga studier av vattenbalans, deponeringsteknik, utlakning och fastläggning i restprodukter och naturliga material. En av lysimetrarna som startades 1993 innehöll 14 ton bottenaska från förbränning av avfall i rosterugn vid Tekniska Verken Linköping [13]. Lysimetern grävdes ut 2005 och prover togs på olika nivåer för analys i laboratoriet. Prov från utgrävningen sparades och material från två olika djup i marken, 20 cm och 90 cm utnyttjades i denna studie. Askan representerar en aska som åldrats under naturliga förhållanden och som karbonatiserats i kontakt med atmosfäriskt koldioxid.

3.1 Metodbeskrivning

RIVMs *in vitro* metod för bestämning av biolöslighet simulerar nedbrytningsprocesserna i saliv, magsaft, tunntarmsvätska och galla hos barn och finns utförligt beskriven i Oomen et al. [28]. Kortfattat, så vägdes ungefär 0,06 g aska (siktad till antingen <2mm eller <63 μm) in i provrör och lakades i tre steg med 1) syntetisk saliv (37 °C, pH 6,5, 5 min på skak) 2) syntetisk magsaft (37 °C, pH 1,5, 2 tim på skak) och 3) syntetisk galla och tunntarmsvätska (37 °C, pH 6,0, 2 tim på skak). Innehållet i de olika vätskorna anges i Tabell 3. Volymen vid sista steget var 60 ml vilket gav ett L/S-förhållande på 1000 och simulerade en non-pica situation, dvs normalt (ofrivilligt eller frivilligt) intag. Metallhalten i vätskefasen efter tredje steget, dvs i tarmvätskan, centrifugerades 5 minuter vid 2750 g och analyserades därefter i duplikat med ICP-AES

(Induktivt kopplad plasma-atomemissions spektroskopi) och relaterades till invägd mängd prov. Den biolösliga fraktionen, F_b (%), i askorna beräknades som kvoten mellan biolöslig halt ($\mu\text{g g}^{-1}$) och totalhalt ($\mu\text{g g}^{-1}$). Totalhalten av Cr, Cu, Ni och Zn i askorna analyserades i ett replikat med ICP-AES och totalhalten av As, Cd, Pb och Sb med högupplösande ICP-MS (Induktivt kopplad plasma-masspektrometri) efter aqua regia extraktion (extraktion med blandning av konc. saltsyra och salpetersyra) enligt modifierad ASTM D3683. Förutom de element som ingick i studien analyserades ytterligare metaller (se bilaga A). Vissa metalloxider, däribland aluminiumoxid, järnoxid och manganoxid, samt summan av alla metalloxider i askorna analyserades också med ICP-AES (bilaga A). Glödningsförlust (LOI, Loss on ignition) analyserades också i de olika askorna och är den viktminskning hos ett prov efter glödning vid 1000°C . LOI speglar halten organiskt material i provet. Samtliga analyser utfördes av Analytica som är ett ackrediterade laboratorium.

Tabell 3. Sammanställning av innehåll i de olika lakvätskorna som inkluderas i RIVMs in vitro metod för bestämning av biolöslig fraktion.

Saliv	Magsaft	Galla och tunntarmsvätska
Mucin	Saltsyra	Saltsyra
Amylas	Fosfatbuffert	Kaliumklorid
Urea	Kalciumklorid	Natriumklorid
Urinsyra	Ammoniumklorid	Kalciumklorid
Fosfatbuffert	Natriumklorid	Magnesiumklorid
Natriumhydroxid	Kaliumklorid	Fosfatbuffert
Kalium	Glukos,	Bikarbonatbuffert
Natriumklorid	Glukuronsyra	Serumalbumin
Natriumsulfat	Serumalbumin	Lipas
Natriumtiocyanat	Pepsin	Pankreatin
	Mucin	Galla
pH 6,5		Urea
	pH 1,07 (pH 1,5 med saliv)	pH 8 (pH 5,5 med saliv och magsaft)

3.1.1 Statistisk analys

Mixed Model ANOVA (Analysis of variance) användes som statistisk metod för att undersöka effekten av i) partikelstorleksfördelning, ($<63 \mu\text{m}$ eller $<2 \text{mm}$), ii) totalhalt av specifikt element i askan, samt iii) asktyp (flygaska, bottenaska eller blandning av dessa) på den biotillgängliga fraktionen av de olika elementen. Mixed model ANOVA användes också för att undersöka effekten av i) partikelstorleksfördelning och ii) asktyp på totalhalten av de olika elementen. Vid dessa analyser behandlades partikelstorleksfördelning och asktyp som "fixed factors" och totalhalt som en "covariate factor".

Tabell 4. Beskrivning av de undersökta förbränningsaskorna

Benämning	Askproducent	Typ av aska	Lagrings-tid	Panna/ Eldningssätt	Bränsle	Övrigt
Vattenfall flygaska	Uppsala kraftvärmeverk Vattenfall	Flygaska	Drygt 1 år	Pulverpanna 1200 °C	Trä, torv	Hög molybdenhalt
Mälarenergi Flygaska	Kraftvärmeverket i Västerås, Mälarenergi	Flygaska	Drygt 1 år	Fluidiserad bädd 850 °C	Kol, torv	
Fortum Flygaska	Nynäshamns kraftvärmeverk i Norvik	Flygaska	Drygt 1 mån	Fluidiserad bädd 850 °C	Returträ	
Fortum Ecoaska	Nynäshamns kraftvärmeverk i Norvik	Grövre fraktion av flygaska som avskiljs innan "Economizern"	Drygt 1 mån	Fluidiserad bädd 850 °C	Returträ	
SYSAV Bottenaska	Malmös Kraftvärmeverk SYSAV	Bottenaska	1 år	Rosterpanna 1050 °C	Avfall	
Norrtälje vägaska	Norrtälje Energi AB värmeverk	Blandning av bottenaska (ca 70%) och flygaska (ca 30%) som släckts i vattenbad innan utläggning på väg.	Askvägbeläggningen har legat 7 år och därefter grävts upp och lagrats i påsar ett år innan analys.	Rosterpanna	Stamved, spån, grot	Askan har lagts ut i Tranbol för att studera dess potential som vägbeläggning.
Lysimeteraska	Gärstadsverken, Linköping	Bottenaska som varit nedgrävd i en lysimeteranläggning (1993-2005) utanför SGI i Linköping. Askan är tagen från 20 cm djup och 90 cm djup.	Askan har legat i lysimeteranläggning i 13 år och därefter grävts upp och lagrats i påsar i kylrum i drygt ett år innan analys.	Rosterpanna	Avfall	Lysimeteraskan finns utförligt beskriven i Fällman, 1997 [13]

3.2 Resultat

I Tabell 5 redovisas siktningresultaten för de olika askorna. Den biolösliga fraktionen av de olika metallerna i de undersökta förbränningsaskorna redovisas i figur 1—8. Den biolösliga halten, totalhalten och den biolösliga fraktionen av de olika metallerna i respektive aska redovisas i Tabell 6. I Tabell 7 redovisas de signifikansnivåer för den variansanalys som användes för att undersöka effekten av partikelstorlek, asktyp och totalhalt på den biolösliga fraktionen av de olika elementen, samt effekten av partikelstorleksfraktion och asktyp på totalhalten av de olika elementen.

Generellt kan sägas att variationen i biolöslig fraktion, F_b , var större mellan de olika elementen än mellan de olika askorna (Figur 1-8, Tabell 6). De olika elementens biolösliga fraktion uppmättes i duplikat i askorna och variationen mellan duplikaten var med ett fåtal undantag relativt små (oftast mindre än 10 %). Analys av biolöslig fraktion av de olika elementen i den referensjord som användes som intern kontroll hade god repeterbarhet.

3.2.1 Siktanalys

I samtliga flygaskor siktades närmre 100% av askan till <2 mm (Tabell 5). Med undantag av Vattenfalls flygaska siktades ungefär en tredjedel till <63 μm i samtliga flygaskor. Förutom i Norrtälje vägaska (som ju också innehöll 30% flygaska) siktades 70-75% av askan till >2 mm i de övriga bottenaskorna. I dessa tre askor hade <6% av askan en partikelstorlek <63 μm .

Tabell 5. Siktresultat för de olika askorna

Aska	>2mm (%)	<2mm (%)	<63 μm (%)
Vattenfall flygaska	1,2	98,8	71,4
Mälarenergi flygaska	0	100	30,8
Fortum flygaska	0	100	41,2
Fortum Ecoaska	0	100	29,8
SYSÄV bottenaska	73,1	26,9	0
Norrtälje vägaska	11,1	89,0	20,3
Lysimeteraska 20 cm djup	75,9	23,6	4,3
Lysimeteraska 90 cm djup	68,6	31,2	5,9

Tabell 6. Biolöslig halt, totalhalt samt biolöslig fraktion av ett antal metaller i olika förbränningsaskor. (FA = flygaska, BA = bottenaska)

	Vattenfall	Mälar-energi	Fortum	Fortum Econ.	SYSAV	Norr-tälje	Lysi-meter 20 cm djup	Lysi-meter 90 cm djup	Fortum	Fortum Econ.	SYSAV	Norr-tälje	Lysi-meter 20 cm djup	Lysi-meter 90 cm djup	
	FA <2mm	FA <2mm	FA <2mm	FA <2mm	BA <2mm	<2mm	BA <2mm	BA <2mm	FA <63µm	FA <63µm	BA <63µm	<63µm	BA <63µm	BA <63µm	
As	Biolöslig halt (µg/g)	17	33,0	605,8	190,5	9,7	4,8	10,8	15,9	929,5	909,9	16,6	14,4	36,6	34,3
	Totalhalt(µg/g)	16,0	38,9	664,0	192,0	22,5	<5	26,2	29,6	974	988	23,4	13,9	52,5	40,7
	Biolöslig fraktion (%)	104,0	84,8	91,2	99,2	42,9	n.d.	41,3	53,6	95,4	92,1	70,9	103,8	69,7	84,3
Cd	Biolöslig halt (µg/g)	1,3	0,5	8,9	3,2	2,6	2,6	5,4	7,4	6,4	11,4	3,7	8,7	14,0	13,4
	Totalhalt(µg/g)	2,3	0,9	13,7	5,8	4,9	3,77	9,21	10,8	20,7	20,6	6,1	11,8	21,9	20,2
	Biolöslig fraktion (%)	56,6	54,4	64,8	55,2	52,7	67,8	74,0	59,1	31,0	55,2	60,4	64,1	68,6	66,4
Cr	Biolöslig halt (µg/g)	15,2	18,3	82,8	38,0	23,8	4,5	11,7	16,3	98,2	106,0	34,7	48,7	22,6	45,1
	Totalhalt(µg/g)	57	152	821	547	689	40,2	367	371	923	1050	593	59,6	603	601
	Biolöslig fraktion (%)	26,7	12,0	10,1	7,0	3,5	11,2	4,4	6,5	10,6	10,1	5,8	19,6	8,1	7,5
Cu	Biolöslig halt (µg/g)	10,8	16,0	486,9	295,9	2170,6	15,8	1376,5	2753,3	619,4	621,1	3329,5	40,3	3043,5	3603,6
	Totalhalt(µg/g)	38,6	75,0	1370	1200	6260	79,4	5400	5920	1990	2010	5700	117	4770	5030
	Biolöslig fraktion (%)	27,9	21,3	35,5	24,7	34,7	19,9	25,5	46,5	31,1	30,9	58,4	34,4	63,8	71,6
Ni	Biolöslig halt (µg/g)	n.d	33,5	19,1	22,5	42,9	5,9	45,3	80,5	13,2	13,0	80,9	16,9	148,7	162,2
	Totalhalt(µg/g)	31,4	92,1	86,2	90,8	259	21,4	257	256	111	116	275	36,8	320	308
	Biolöslig fraktion (%)	n.d	36,4	22,1	24,8	16,6	27,6	17,6	31,4	11,8	11,2	29,4	45,9	46,5	52,7
Pb	Biolöslig halt (µg/g)	23,8	12,7	898,9	490,2	373,9	25,2	540,5	580,9	1172,4	1283,1	487,5	83,2	1644,1	1154,9
	Totalhalt(µg/g)	73,1	64,7	1560	887	725	51,7	3740	3170	2470	2460	1130	138	3250	2190
	Biolöslig fraktion (%)	32,6	19,6	57,6	55,3	51,6	48,7	14,5	18,3	47,5	52,2	43,1	60,3	50,6	52,7
Sb	Biolöslig halt (µg/g)	1,6	2,2	23,3	8,2	17,4	0,0	19,9	23,3	31,4	31,9	26,0	0,1	45,0	46,0
	Totalhalt(µg/g)	<50	<50	79,4	<50	80,5	1,03	120	176	134	136	136	2,02	231	214
	Biolöslig fraktion (%)	n.d.	n.d.	29,3	n.d.	21,6	0,0	16,5	13,2	23,4	23,5	19,1	3,6	19,5	21,5
Zn	Biolöslig halt (µg/g)	39,5	1,0	3470,0	6386,4	2002,7	538,5	2563,2	3331,3	3754,4	3986,6	3284,4	2275,1	6027,6	5596,7
	Totalhalt(µg/g)	239	141	8540	10300	4410	994	5100	6300	12100	12700	8070	3630	11200	9650
	Biolöslig fraktion (%)	16,5	0,7	40,6	62,0	45,4	54,2	50,3	52,9	31,0	31,4	40,7	62,7	53,8	58,0

Tabell 7. Signifikansnivåer för analys med mixed model ANOVA avseende effekten av (i) partikelstorlek (<2 mm och <63 µm), (ii) totalhalt samt (iii) asktyp (flygaska, bottenaska eller blandning av dessa) på storleken av den biolösliga fraktionen (F_b), samt effekten av (i) partikelstorlek och (ii) asktyp på totalhalten, av de undersökta elementen.

Element	Signifikansnivå för effekt av partikelstorlek på F_b	Signifikansnivå för effekt av totalhalt på F_b	Signifikansnivå för effekt av asktyp på F_b	Signifikansnivå för effekt av partikelstorlek på totalhalt	Signifikansnivå för effekt av asktyp på totalhalt
As	0,003 (**)	0,009 (**)	0,002 (**)	0,110	0,003 (**)
Cd	0,400	0,170	0,036 (*)	0,006 (**)	0,500
Cr	0,032 (*)	0,500	0,005 (**)	0,066	0,001 (**)
Cu	0,012 (*)	0,023 (*)	0,060	0,700	0,002 (**)
Ni	0,500	0,110	0,057	0,003(**)	<0,0005 (***)
Pb	0,056	0,021 (*)	0,210	0,500	0,300
Sb	0,400	0,300	0,002 (**)	0,014 (*)	0,760
Zn	0,053	0,710	0,072	0,001 (***)	0,013 (*)

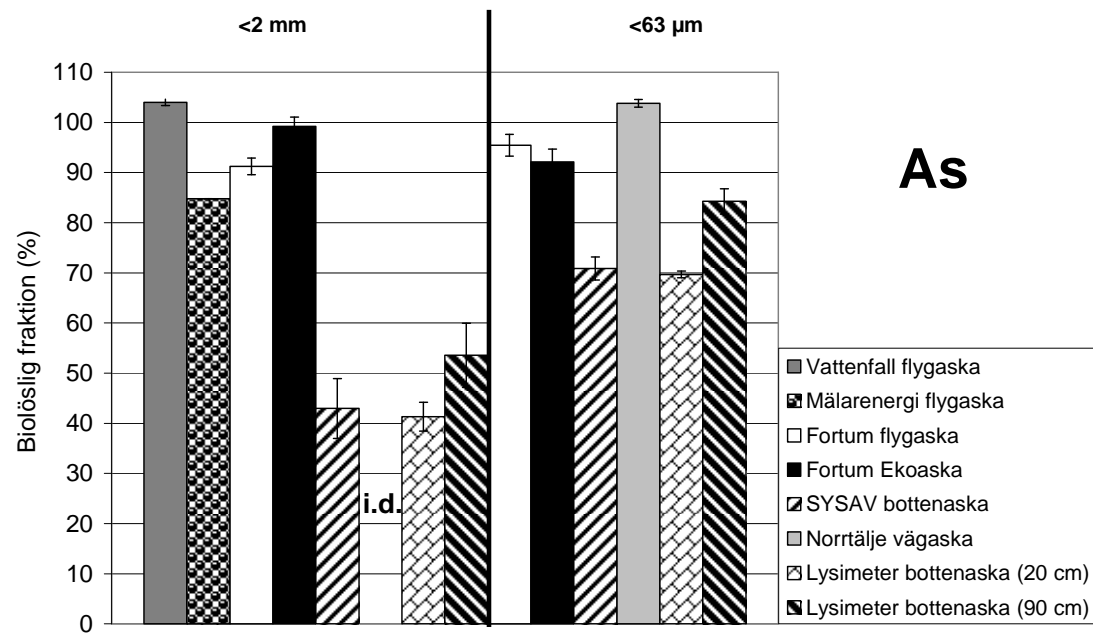
* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, - $p > 0.05$

3.2.2 Arsenik

Den biolösliga fraktionen av arsenik var generellt sett mycket högre än den biolösliga fraktionen av övriga metaller i förbränningsaskorna (Figur 1-8, Tabell 6). I samtliga flygaskor var den biolösliga fraktionen av arsenik mellan 85-104% och i bottenaskorna var den mellan 41-84% (Figur 1). I två fall beräknades den biolösliga fraktionen av arsenik till 104% vilket visar på en osäkerhet i bestämningen av den biolösliga fraktionen. Osäkerheten i metoden är inte utredd, men tyder inte på en variation mellan duplikaten (Figur 1). Eftersom totalhalten arsenik i Norrtälje vägaska (<2mm) låg under detektionsgränsen kunde ingen biolöslig fraktion beräknas för detta material. Fortums flygaskor som producerats vid förbränning av returträ innehöll betydligt högre halt arsenik än övriga askor och hade också höga biolösliga fraktioner av arsenik (>90%). Den biolösliga fraktionen av arsenik var högre vid den mindre partikelstorleksfraktionen som representerar ofrivilligt intag (<63 µm, ANOVA, $p=0,003$). Den biolösliga fraktionen av arsenik var också högre vid lägre totalhalter av arsenik (ANOVA, $p=0,009$) och i flygaskor jämfört med bottenaskor (ANOVA, $p=0,002$).

Däremot fanns ingen skillnad i totalhalten arsenik i de olika askorna som berodde på skillnader i partikelstorleksfördelningen (ANOVA, $p=0,110$), medan asktypen hade en inverkan på totalhalten av arsenik, med högre totalhalt i flygaskorna jämfört med bottenaskorna.

Lysimeteraska från 90 cm djup innehöll högre totalhalt och biolöslig fraktion av arsenik för båda partikelfraktionerna än lysimeteraska från 20 cm djup (Tabell 6).



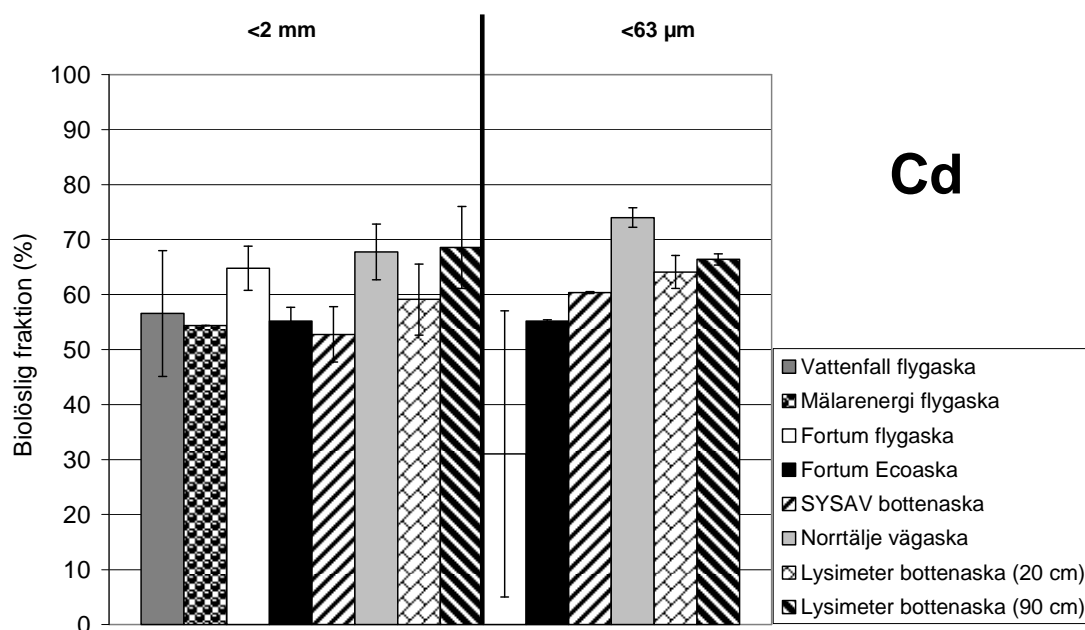
Figur 1. Biolöslig fraktion av arsenik i förbränningsaskor vid olika partikelstorleksfraktioner. Staplarna visar medelvärdet av två replikat och felstaplarna visar max/min-värdet av dessa. i.d.=icke detekterad.

Figure 1. Bioaccessible fraction of arsenic in ashes of different particle size fractions. The bars represent the mean values of two replicates and error bars the max/min value of these. i.d.= not detected

3.2.3 Kadmium

Med undantag för Fortums flygaska <63 μm beräknades den biolösliga fraktionen av kadmium till mellan 50-75% i samtliga askor (Figur 2, Tabell 6). Det fanns ingen skillnad i biolöslig fraktion av kadmium mellan de båda partikelstorleksfraktionerna (<63 μm och <2 mm, ANOVA; $p=0,400$). Däremot var totalhalten kadmium högre vid den mindre partikelstorleksfraktionen (<63 μm , ofrivilligt intag) jämfört med den större (<2 mm, frivilligt intag, ANOVA; $p=0,000$). Totalhalten kadmium hade dock ingen inverkan på storleken hos den biolösliga fraktionen av kadmium (ANOVA, $p=0,170$). Den biolösliga fraktionen av kadmium var högre i bottenaskorna jämfört med i flygaskorna (ANOVA, $p=0,036$), däremot fanns det ingen skillnad i totalhalten kadmium mellan flygaskor och bottenaskor (ANOVA, $p=0,500$).

I lysimeteraskan från 20 cm djup var den biolösliga fraktionen av kadmium något högre (74% vid <2 mm och 69% vid <63 μm) än vid 90 cm djup (59% vid <2 mm och 66% vid <63 μm , Tabell 6). Skillnaden i biolöslig fraktion mellan de båda djupen var störst för askor siktade till <2 mm. Totalhalten kadmium var högre vid den mindre partikelstorleksfraktionen (20-22%, <63 μm) jämfört med den större partikelstorleksfraktionen (9-11%, <2 mm) även för lysimeteraskorna och lika på de olika djupen (Tabell 6).



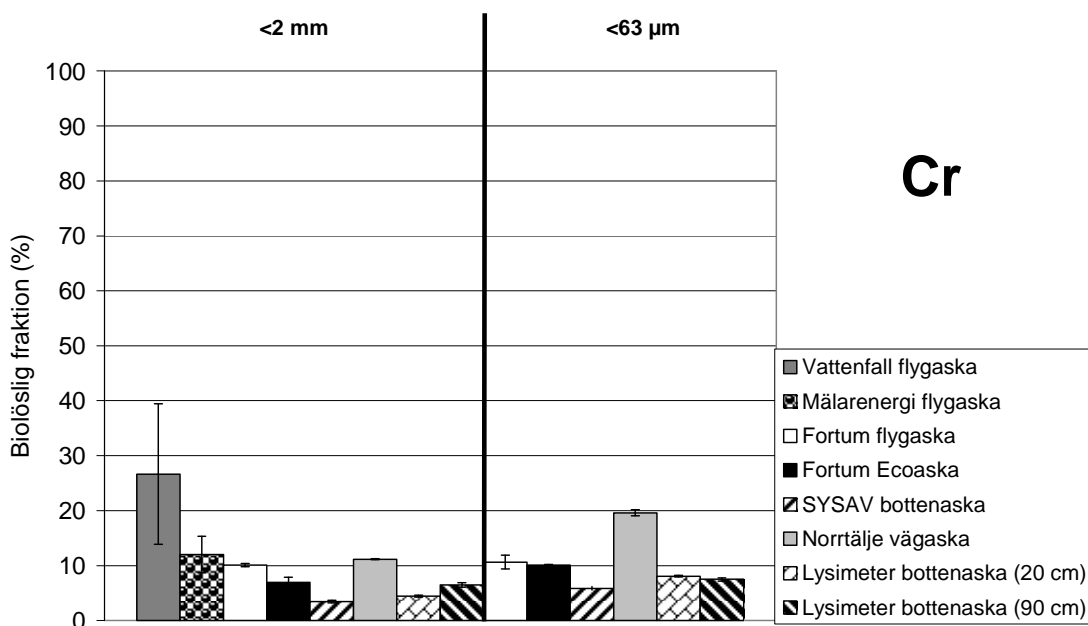
Figur 2. Biolöslig fraktion av kadmium i förbränningsaskor vid olika partikelstorleksfraktioner. Staplarna visar medelvärdet av två replikat och felstaplarna visar max/min-värdet av dessa.

Figure 2. Bioaccessible fraction of cadmium in ashes of different particle size fractions. The bars represent the mean values of two replicates and error bars the max/min value of these.

3.2.4 Krom

Med undantag för Vattenfalls flygaska och Norrtälje vägaska <63 μm var den biolösliga fraktionen av krom $\leq 12\%$ och betydligt lägre än den biolösliga fraktionen av övriga element i förbränningsaskorna (Figur 1-8, Tabell 6). Den biolösliga fraktionen av krom var högre i askor siktade till den mindre partikelstorleksfraktionen som representerade ofrivilligt intag (<63 μm) jämfört med den större partikelstorleksfraktionen som representerar frivilligt intag (<2mm, ANOVA, $p=0,032$). Den biolösliga fraktionen av krom var också större i flygaskor jämfört med i bottenaskor (ANOVA, $p=0,005$). Även totalhalten krom var högre i flygaskor jämfört med i bottenaskor (ANOVA, $p=0,001$). Däremot hade totalhalten krom ingen inverkan på den biolösliga fraktionen av krom (ANOVA, $p=0,500$). Partikelstorleksfraktionen hade ingen inverkan på totalhalten av krom (ANOVA, $p=0,066$).

I lysimeteraskan var den biolösliga fraktionen av krom ungefär densamma (4-8%) vid de båda djupen och något mindre hos den större partikelstorleksfraktionen (>2mm). Totalhalten krom var betydligt högre i lysimeteraska siktad till <63 μm (600 $\mu\text{g/g}$) jämfört med då dessa siktats till <2 mm (370 $\mu\text{g/g}$) vid båda djupen.



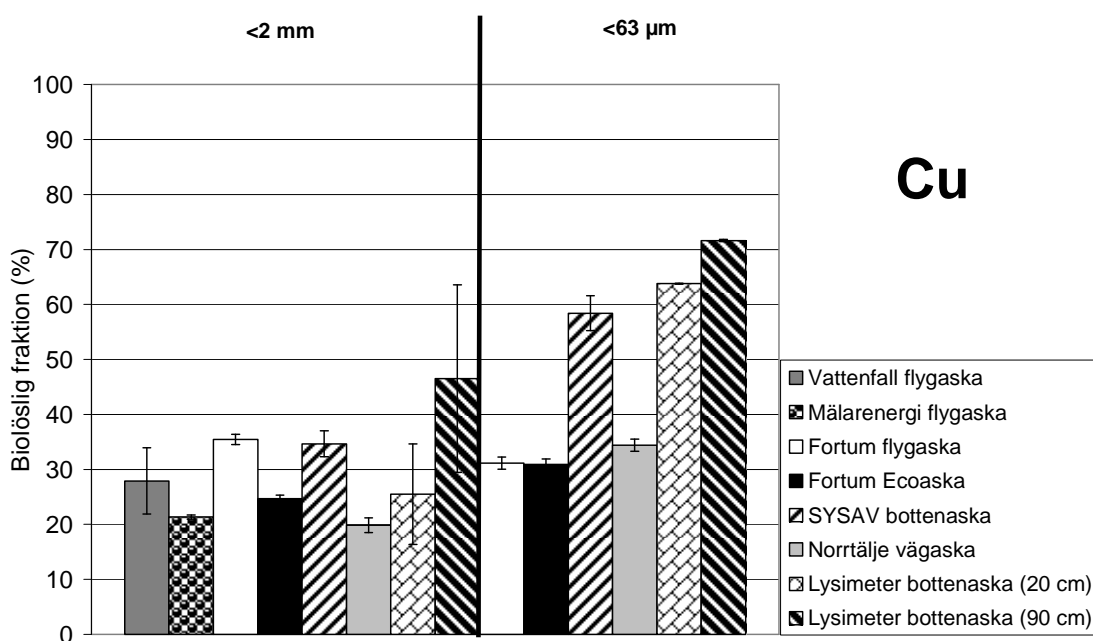
Figur 3. Biolöslig fraktion av krom i förbränningsaskor vid olika partikelstorleksfraktioner. Staplarna visar medelvärdet av två replikat och felstaplarna visar max/min-värdet av dessa.

Figure 3. Bioaccessible fraction of chromium in ashes of different particle size fractions. The bars represent the mean values of two replicates and error bars the max/min value of these.

3.2.5 Koppar

Den biolösliga fraktionen av koppar var relativt hög och låg mellan 20 och 70% i de olika förbränningsaskorna och var generellt sett högre vid partikelfraktion <63 μm (ofrivilligt intag) jämfört med partikelfraktion <2 mm (ofrivilligt intag, Figur 4, Tabell 6, ANOVA, $p=0,012$). Totalhalten koppar hade också en inverkan på den biolösliga fraktionen av koppar, som var högre vid lägre totalhalt (ANOVA, 0,023). Däremot sågs ingen skillnad i biolöslig fraktion mellan flygaskor och bottenaskor (ANOVA, $p=0,060$). Partikelstorleksfraktionen hade ingen inverkan på totalhalten koppar (ANOVA, $p=0,700$). Totalhalten var dock högre i bottenaskor jämfört med i flygaskor (ANOVA, $p=0,002$).

I lysimeteraskan var den biolösliga fraktionen av koppar mindre och totalhalten koppar lägre på 20 cm djup jämfört med den på 90 cm djup vid båda partikelstorleksfraktionerna (Tabell 6). Den biolösliga fraktionen för lysimeteraska siktad till <2 mm, var 25% vid 20 cm djup och 47% vid 90 cm djup. Vid partikelstorleksfraktion <63 μm var motsvarande siffror 64% resp 72% för 20 resp 90 cm djup. Totalhalterna koppar i lysimeteraskorna låg mellan 4800 och 5900 $\mu\text{g/g}$.



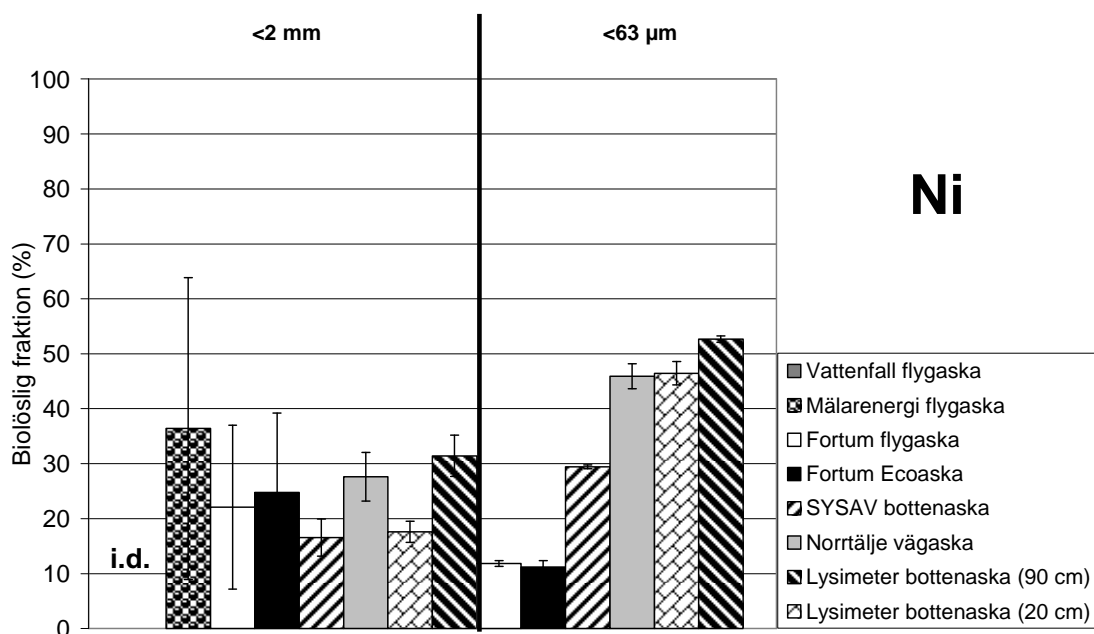
Figur 4. Biolöslig fraktion av koppar i förbränningsaskor vid olika partikelstorleksfraktioner. Staplarna visar medelvärdet av två replikat och felstaplarna visar max/min-värdet av dessa.

Figure 4. Bioaccessible fraction of copper in ashes of different particle size fractions. The bars represent the mean values of two replicates and error bars the max/min value of these.

3.2.6 Nickel

Den biolösliga fraktionen av nickel låg mellan 12 och 52% i de olika förbränningsaskorna (Figur 5, Tabell 6). Den biolösliga fraktionen av nickel i flygaskan från Vattenfall kunde inte beräknas då den biolösliga halten inte kunde detekteras. Det fanns ingen skillnad i biolöslig fraktion av nickel som berodde på partikelstorleksfraktion (ANOVA, $p=0,500$), totalhalten av nickel (ANOVA, $p=0,110$), eller asktyp (ANOVA, $p=0,057$). Däremot hade både partikelstorleksfraktion och asktyp en inverkan på totalhalten nickel, sådan att totalhalten var högre vid den lägre partikelstorleksfraktionen som representerar ofrivilligt intag (ANOVA, $p=0,003$) och totalhalten högre i bottenaskor jämfört med i flygaskor (ANOVA, $p<0,0005$).

I lysimeteraskan var den biolösliga fraktionen av nickel lägre på 20 cm djup jämfört med på 90 cm djup, för båda partikelstorleksfraktionerna (Tabell 6). Både biolöslig fraktion och totalhalt av nickel var lägre vid den större partikelstorleksfraktionen jämfört med den lägre (Tabell 6).



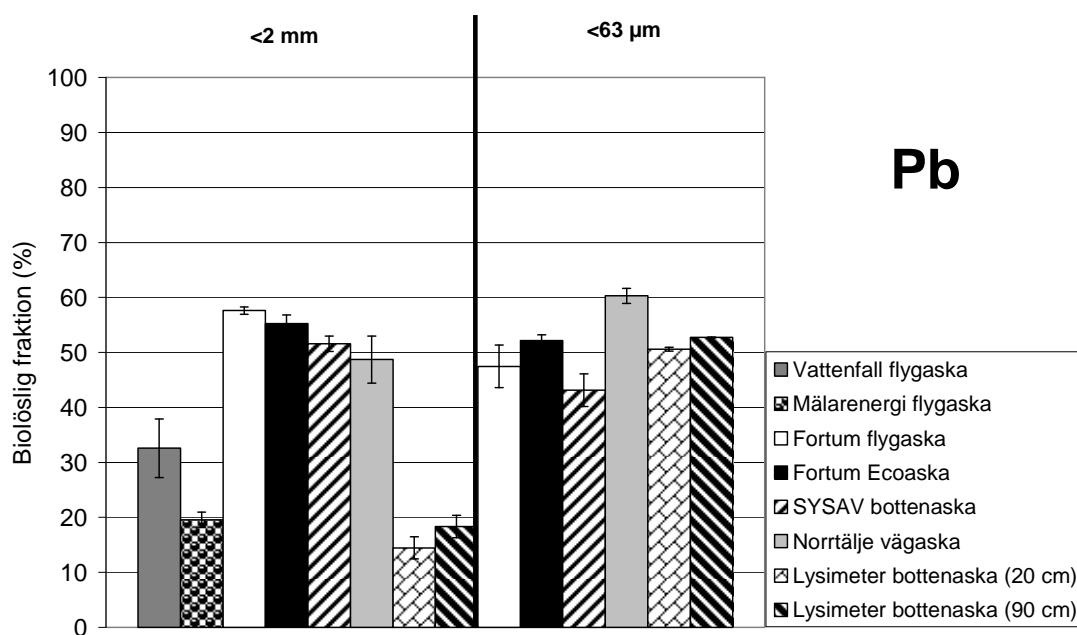
Figur 5. Biolöslig fraktion av nickel i förbränningsaskor vid olika partikelstorleksfraktioner. Staplarna visar medelvärdet av två replikat och felstaplarna visar max/min-värdet av dessa. i.d.=icke detekterad.

Figure 5. Bioaccessible fraction of nickel in ashes of different particle size fractions. The bars represent the mean values of two replicates and error bars the max/min value of these. i.d. =not detected

3.2.7 Bly

Den biolösliga fraktionen av bly var relativt hög (aldrig under 10%) och varierade mellan 14 och 60%. Den biolösliga fraktionen av bly berodde inte på partikelstorleksfraktion (ANOVA, $p=0,056$) eller asktyp (ANOVA, $p=0,210$). Däremot var den biolösliga fraktionen av bly högre vid lägre totalhalt av bly i askorna (ANOVA, $p=0,021$). Varken partikelstorleksfraktion eller asktyp hade någon inverkan på den totala halten av bly (ANOVA, $p=0,500$ respektive $p=0,300$).

I lysimeteraska från båda djupen (20 resp 90 cm) var den biolösliga fraktionen av bly betydligt högre vid partikelstorleksfraktion $<63 \mu\text{m}$ (ofrivilligt intag) jämfört med vid $<2 \text{ mm}$ (frivilligt intag, Tabell 6). Totalhalten bly var högre i askan från 20 cm djup ($3250 \mu\text{g/g}$, $<63 \mu\text{m}$ och $3740 \mu\text{g/g}$, $<2 \text{ mm}$) jämfört med den från 90 cm djup ($2190 \mu\text{g/g}$, $<63 \mu\text{m}$, $3170 \mu\text{g/g}$, $<2 \text{ mm}$, Tabell 6).



Figur 6. Biolöslig fraktion av bly i förbränningsaskor vid olika partikelstorleksfraktioner. Staplarna visar medelvärdet av två replikat och felstaplarna visar max/min-värdet av dessa.

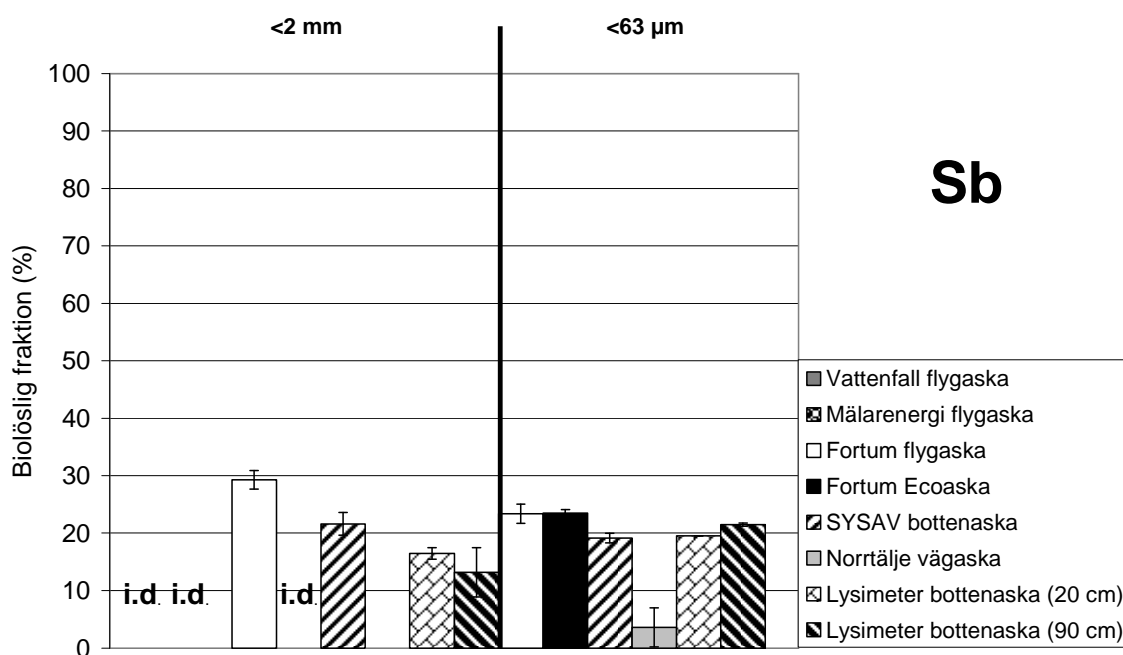
Figure 6. Bioaccessible fraction of lead in ashes of different particle size fractions. The bars represent the mean values of two replicates and error bars the max/min value of these.

3.2.8 Antimon

Den biolösliga fraktionen av antimon var <30% i samtliga askor där denna kunde bestämmas. I tre fall var totalhalten antimon under detektionsgränsen och den biolösliga fraktionen kunde inte beräknas. Det fanns ingen skillnad i biolöslig fraktion av antimon mellan de båda partikelstorleksfraktionerna (ANOVA, $p=0,400$). Inte heller totalhalten antimon hade någon betydelse för den biolösliga fraktionen av antimon (ANOVA, $p=0,300$). Däremot hade asktypen en inverkan på den biolösliga fraktionen, som var större i flygaska än i bottenaska (ANOVA, $p=0,002$).

Det fanns dock ingen skillnad i totalhalten antimon som berodde på skillnader i asktyp (ANOVA, $p=0,076$), men den biolösliga fraktionen av antimon var högre vid den mindre partikelstorleksfraktionen (<63 μm , ofrivilligt intag) jämfört med den större (<2 mm, frivilligt intag, ANOVA, $p=0,014$).

I lysimeteraskan låg den biolösliga fraktionen antimon mellan 13-22% och var större i partikelstorleksfraktion <63 μm jämfört med <2 mm. Totalhalten antimon låg mellan 120-231 $\mu\text{g/g}$ och var också högre i den mindre partikelstorleksfraktionen.



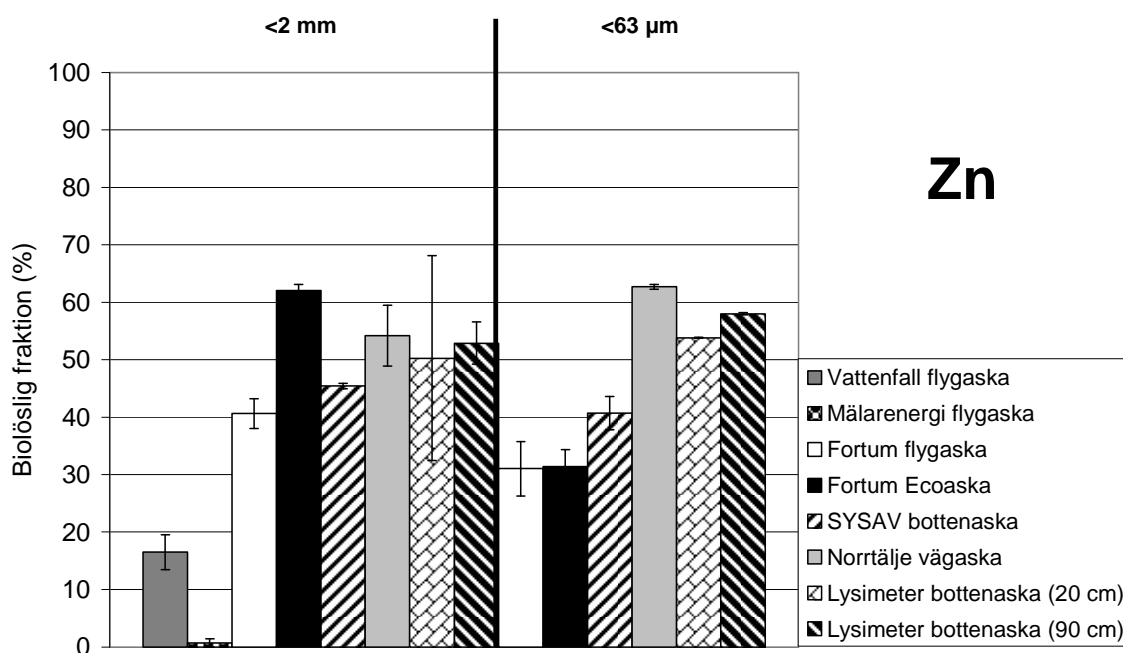
Figur 7. Biolöslig fraktion av antimon i förbränningsaskor vid olika partikelstorleksfraktioner. Staplarna visar medelvärdet av två replikat och felstaplarna visar max/min-värdet av dessa. i.d.=icke detekterade.

Figure 7. Bioaccessible fraction of antimony in ashes of different particle size fractions. The bars represent the mean values of two replicates and error bars the max/min value of these. i.d. = not detected

3.2.9 Zink

Den biolösliga fraktionen av zink varierade mellan 0,7 och 63% i de olika askorna. Det fanns ingen skillnad i biolöslig fraktion av zink som berodde på partikelstorleksfraktion (ANOVA, $p=0,053$), totalhalt (ANOVA, $p=0,071$) eller asktyp (ANOVA, $p=0,072$). Däremot hade både partikelstorleksfraktion (ANOVA, $p=0,001$) och asktyp (ANOVA, $p=0,013$) en inverkan på totalhalten zink i förbränningsaskorna, så att totalhalten var högre vid den mindre partikelstorleksfraktionen ($<63 \mu\text{m}$, ofrivilligt intag) jämfört med den större ($<2 \text{ mm}$, frivilligt intag) och högre i flygaskorna jämfört med i bottenaskorna.

I lysimeteraskorna låg den biolösliga fraktionen av zink mellan 50-58% och var något högre vid 90 cm djup än vid 20 cm djup (Tabell 6). Totalhalten zink var betydligt högre i partikelstorleksfraktion $<63 \mu\text{m}$ jämfört med $<2 \text{ mm}$ i lysimeteraskorna (Tabell 6).



Figur 8. Biolöslig fraktion av zink i förbränningsaskor vid olika partikelstorleksfraktioner. Staplarna visar medelvärdet av två replikat och felstaplarna visar max/min-värdet av dessa.

Figure 8. Bioaccessible fraction of zinc in ashes of different particle size fractions. The bars represent the mean values of two replicates and error bars the max/min value of these.

3.3 Resultatanalys

I denna studie undersöktes inte i vilken kemisk form de olika metallerna förelåg i askorna, men det är troligt att de observerade skillnaderna i biolöslig fraktion mellan de olika metallerna berodde på i vilken kemisk form de var bundna till askan. Studier har visat att metaller fördelar sig heterogent mellan olika fasta faser (oxider, sulfider eller karbonater) snarare än homogent över alla partikelslag i askor [14], och olika metaller olika heterogent.

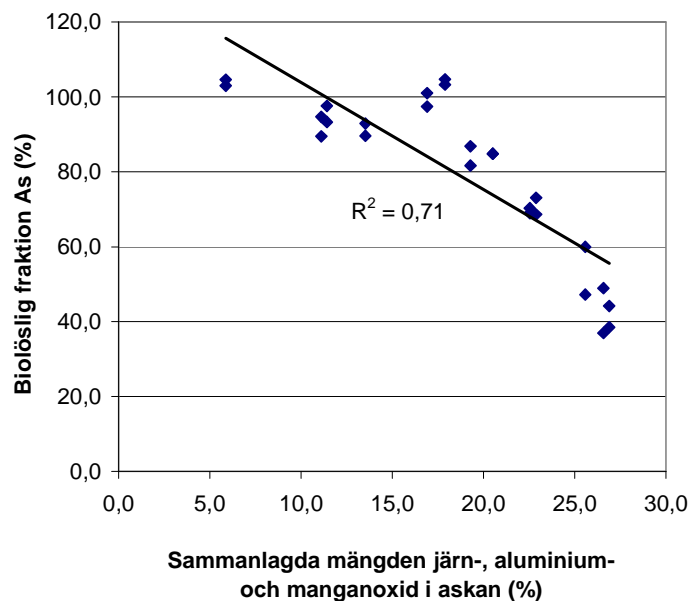
3.3.1 Arsenik

Den biolösliga fraktionen av arsenik i askorna var generellt sett mycket högre än den biolösliga fraktionen av övriga analyserade element. Arsenik ses ofta ha högre biolöslighet och mobilitet jämfört med andra ämnen, vilket kan förklaras av att arsenik förekommer som oxyanjoner och är mobilt över ett brett redox-intervall och vid vanligt förekommande pH-värden i grundvatten (pH 6,5-8,5). Om man studerar specieringen av arsenik i Eh-pH diagram [35] kan man utläsa att arsenik vid pH 6,5 under oxiska förhållanden (som i *in vitro* testets sista segment) föreligger som As(V), men att den troligaste formen av arsenik i en verklig reducerad miljö i tarmen vid pH 6,5 är As(III). Man kan därför inte utesluta att den biolösliga fraktionen av arsenik kan bli ännu högre *in vivo* jämfört med vad som bestämdes i denna studie. Som tidigare påpekats är det viktigt att kunna påvisa ett linjärt samband mellan *in vitro* data och *in vivo* data. För arsenik finns studier gjorda där *in vitro* data som genererats med andra *in vitro* metoder än RIVMs, både de som endast simulerar matsmältningsprocessen i magen och de som också inkluderar processen i tarmen, funnits korrelera väl med *in vivo* biotillgänglighet (för referenser hänvisas till [15]). Med RIVMs metod har *in vitro* biolöslighet av t.ex. kadmium visat på god korrelation med *in vivo* data, medan ingen linjär korrelation mellan *in vitro* och *in vivo* biotillgänglighet av bly funnits [16]. Det saknas ännu studier av korrelation mellan *in vitro* och *in vivo* data för arsenik med RIVMs metod. Tolkning av data från RIVMs *in vitro* test av biolöslig fraktion av arsenik i denna studie bör därför göras med försiktighet tills validering med *in vivo* studier finns tillgängliga.

Möjligheten att utföra RIVMs *in vitro* test med det sista steget under anaeroba förhållanden övervägdes eftersom arsenik är mer lösligt vid anaeroba jämfört med aeroba förhållanden och att reducerade förhållanden råder i tarmen. Denna förändring av metoden för att mera likna ett worst-case scenario ansågs dock ej meningsfull eftersom den biolösliga fraktionen av arsenik, speciellt i flygaskorna, redan var väldigt hög.

Det kan finnas olika förklaringar till varför arsenik var olika biolösligt i de olika askorna. En trolig förklaring kan vara att arsenik i olika grad var associerad till oxider, sulfider och karbonater i de olika askorna och därmed hade olika benägenhet att lakas ur dessa. Arseniks löslighet i aeroba, pH-neutrala eller svagt sura miljöer verkar till stor del kontrolleras av sorption till framförallt järnoxider men även aluminium- och manganoxider. I studier av Yang et al. [40][42] har betydelsen av olika jordparametrar undersökts för biolöslighet av As(III) och As(V) i 36 olika jordar. Studierna visade med hjälp av multivariat regression att de parametrar som kontrollerade biolösligheten av As(V) framförallt var pH och järnoxidinhåll. För As(III) kunde 80% av variationen i biolöslig halt förklaras med fem olika jordparametrar; järnoxidhalt, manganoxidhalt, pH, katjonbyteskapacitet (CEC) och siltinnehåll.

I denna studie visades den biolösliga fraktionen av arsenik minska linjärt ($R^2=0,71$) med den sammanlagda halten av järn-, aluminium- och mangan i askorna (Figur 9), vilka antas föreligga som oxider. Däremot fanns ingen linjär korrelation mellan organisk halt ($R^2= 0,01$), totala metalloxidhalten ($R^2= 0,01$) eller totalhalten arsenik ($R^2=0,14$) i askorna med den biolösliga halten av arsenik.



Figur 9. Den biolösliga fraktionen av arsenik plottad mot den sammanlagda mängden järn, aluminium och mangan (vilka antogs föreligga som oxider) i de olika förbränningsaskorna. I diagrammet anges den anpassade linjens R^2 -värde.

Figure 9. The bioaccessible fraction of arsenic plotted against the sum of iron, aluminium and manganese (presumably present as oxides) in the different ashes. The R^2 -value of the linearized model is shown in the diagram.

3.3.2 Krom

Den biolösliga fraktionen av krom var mycket lägre än den biolösliga fraktionen av övriga metaller (Tabell 6). Detta har också visats gälla i andra studier. Biolöslighet av krom analyserad med RIVMs *in vitro* metod har i jord från lekplatser i urban miljö tidigare funnits variera mellan 1,9 och 4,5% beroende på partikelstorlek och mängd jord som använts i testet [22]. Med andra *in vitro* metoder har biolöslig fraktion av krom i förorenad jord uppmätts till mellan 5 och 70% beroende på kroms oxidationstal och koncentration [36].

Under oxiska förhållanden vid pH 6,5 och måttliga eller låga redox-potentialer föreligger krom i trevärdform och bildar kromhydroxid [12] som har relativt låg

löslighet. Detta skulle eventuellt kunna förklara den låga biolösliga fraktionen av krom i askorna.

I en studie av biolöslighet av Cr(III) och Cr(IV) i jord [37] fann man att koncentrationen av krom hade marginell betydelse för den biolösliga fraktionen, medan jordar med höga halter organiskt kol innehöll lägre halter biolösligt krom än jordar med lågt innehåll av kol. Detta har förklarats med att organiskt material kan fungera som elektrondonatorer och reducera Cr(VI) till Cr(III) som har relativt låg löslighet [20]. Eftersom den biolösliga fraktionen av krom i föreliggande studie var väldigt låg, fanns en misstanke om att närvaron av organiskt kol i förbränningsaskorna kunde vara orsaken. I denna studie fanns dock ingen linjär korrelation mellan biolöslig fraktion av krom och organisk halt (analyserad med LOI) som kunde förklara skillnader mellan biolöslig fraktion av krom i de undersökta förbränningsaskorna. Det fanns heller ingen korrelation mellan biolöslig fraktion av krom och totalhalten krom i denna studie.

3.3.3 Bly

Den biolösliga fraktionen av bly var relativt hög och varierade mellan 14 och 60% i denna studie. Tidigare studier har visat att den biolösliga fraktionen av bly är starkt korrelerad till pH i mag-tarmvätskan [41][30]. I denna studie justerades pH inför varje nytt lakningssteg, men vid kontroll efter inkuberingarna i de olika lakvätskorna kunde ibland ett något förhöjt pH-värde uppvisas eftersom vissa askor var starkt buffrande. De askor som var svårast att buffra i denna studie var Vattenfalls flygaska, Fortums flygaska och Fortums Ecoaska. Vid analys observerades dock ingen korrelation mellan pH i tunntarmsvätskan och biolöslig fraktion i denna studie ($R^2=0,10$). Eftersom vi inte känner till specieringen av bly i askorna är det oklart hur stor betydelse denna haft för storleken på den biolösliga fraktionen.

3.3.4 Kadmium

Den biolösliga fraktionen av kadmium var relativt hög i de olika askorna och varierade mellan 50 och 75%. Inga *in vitro* studier har återfunnits i litteraturen som utrett orsaker till variation i biolöslighet av kadmium.

3.3.5 Antimon

Eftersom antimon liksom arsenik är ett redox-känsligt element förväntades det att de biolösliga fraktionerna för dessa ämnen skulle vara lika. Till skillnad från arsenik var dock storleken på den biolösliga fraktionen av antimon relativt låg <30%. Eftersom vi inte känner till specieringen av antimon och kunskaper om förekomstformer och tillgänglighet i jord är bristfällig, är orsaken till detta inte känd.

3.3.6 Koppar

Den biolösliga fraktionen av koppar var relativt hög och varierade mellan 20-70% i de olika askorna och var generellt sett högre vid partikelstorleksfraktion <63 μm jämfört

med partikelstorleksfraktion <2 mm. Inga kända *in vitro* studier har återfunnits i litteraturen som utrett orsaker till variationer i biolöslighet av koppar.

3.3.7 Betydelse av partikelstorlek, totalhalt och asktyp

Med undantag av arsenik, krom och koppar hade partikelstorleksfördelningen ingen betydelse för storleken på den biolösliga fraktionen i de undersökta metallerna i denna studie. Det kan kanske delvis förklaras av att ungefär 1/3 av mängden aska som var siktad till <2 mm i flygaskorna utgjordes av partiklar som var <63 µm (Tabell 5). I föreliggande studie var den biolösliga fraktionen av arsenik, krom och koppar något högre vid den mindre partikelstorleksfraktionen, som representerar ofrivilligt intag, än vid den större som representerar frivilligt intag. Partikelstorleksfraktionen hade även en inverkan för totalhalten av kadmium, nickel, antimon och zink i förbränningsaskorna denna studie. För dessa element var totalhalten högre vid den mindre partikelstorleksfraktionen. Resultaten indikerar att i de fall oralt ofrivilligt intag av aska bedöms vara en viktig exponeringsväg kan precisionen i en riskbedömning ökas genom att sikta askorna till den partikelstorleksfraktion som representerar ofrivilligt intag.

Totalhalten hade endast en inverkan på den biolösliga fraktionen av arsenik, koppar och bly (Tabell 6). I samtliga dessa fall var den biolösliga fraktionen högre vid lägre totalhalt. I andra studier har man sett att lösligheten av metaller vid låga totalhalter generellt ökar upp till en viss totalhaltsnivå, därefter uppnås en mättnad av lösningen. Eftersom den biolösliga fraktionen av ett ämne är kvoten mellan biolöslig halt och totalhalt skulle höga totalhalter i kombination av en mättad vattenfas eventuellt vara en orsak till denna observation.

Typen av aska hade betydelse för den biolösliga fraktionen av arsenik, kadmium, krom och antimon. Av dessa element var den biolösliga fraktionen av kadmium högre i bottenaska jämfört med i flygaska, medan den biolösliga fraktionen av arsenik, krom och antimon var högre i flygaskorna jämfört med i bottenaskorna. Typen av aska hade också en inverkan på totalhalten av arsenik, krom, koppar, nickel och zink. Totalhalter av arsenik, krom och zink var högre i flygaskor än i bottenaskor, medan totalhalten koppar och nickel var högre i bottenaskorna än i flygaskorna.

3.3.8 Lysimeteraska

Föreliggande studie visade inte på någon generell trend vad gäller betydelsen av hur ytligt lysimeteraskan legat för storleken på den biolösliga fraktionen av de olika metallerna. För As, Cu, Ni, Pb och Zn var den biolösliga fraktionen större i lysimeteraska från 90 cm djup jämfört med på 20 cm djup, medan den biolösliga fraktionen för kadmium var högre vid den ytliga nivån. För två av elementen (krom och antimon) visade askorna olika trender beroende på vilken partikelstorleksfraktion som analyserats. I ett separat projekt vid SGI pågår ett arbete om att utreda vilka mineralfaser som är styrande för lösligheten för arsenik, antimon och metaller i lysimeteraskan som provtagits vid olika nivåer.

3.4 Slutsatser

Den litteraturstudie som utfördes inom projektet visade att ytterst lite är känt om oral biotillgänglighet av metaller i förbränningsaskor. De resultat som genererats i den experimentella delen av studien får därför anses ha stor betydelse för de kunskaper som idag finns på området. Samtidigt bör påpekas att studien omfattar ett litet antal askor och att den *in vitro* metod som använts för analys av biolöslighet för flera av de undersökta metallerna inte är validerad med *in vivo* studier, varför tolkning av resultaten bör göras med försiktighet. Den statistiska analysen av inverkan av partikelstorleksfraktion, totalhalt och asktyp på biolöslig fraktion är baserad på ett litet statistiskt underlag vilket också ska beaktas.

Den karakterisering m. a. p. biolöslig fraktion som gjordes av förbränningsaskorna i denna studie visade att:

- Den biolösliga fraktionen av arsenik i flygaskorna (bioaskor) var relativt hög (>85%), medan den var något lägre i bottenaskorna från avfallsförbränning (40-85%).
- Den biolösliga fraktionen av bly varierade mellan 14 och 60%.
- Kadmium hade en hög biolöslig fraktion som varierade mellan 50-75%.
- Den biolösliga fraktionen av krom var mycket lägre än den biolösliga fraktionen av övriga analyserade element och låg med ett par undantag under 12%.
- Den biolösliga fraktionen av koppar varierade mellan 20-70%.
- Partikelstorleksfördelningen hade endast en inverkan på den biolösliga fraktionen av arsenik, krom och koppar. Den biolösliga fraktionen var större i den mindre partikelstorleksfraktionen som representerar ofrivilligt intag. Det innebär att i de fall oralt ofrivilligt intag av aska bedöms vara en viktig exponeringsväg kan precisionen i en riskbedömning ökas genom att sikta askorna till den partikelstorleksfraktion som representerar ofrivilligt intag innan analys av biolöslig fraktion görs.
- Totalhalten hade en effekt på storleken av den biolösliga fraktionen endast för arsenik, koppar och bly. I dessa fall var den biolösliga fraktionen högre vid lägre totalhalt av elementen.
- Typen av aska hade betydelse för den biolösliga fraktionen av arsenik, kadmium, krom och antimon. Den biolösliga fraktionen av kadmium var högre i bottenaskorna, medan den biolösliga fraktionen av arsenik, krom och antimon var högre i flygaskorna.
- Ingen generell trend kunde ses vad gäller betydelsen av hur ytligt lysimeteraskan legat för storleken på den biolösliga fraktionen av de olika elementen.
- Partikelstorleksfraktionen hade betydelse för totalhalten av kadmium, nickel, antimon och zink med en högre halt vid den mindre partikelstorleksfraktionen, som representerar ofrivilligt intag. Det innebär att i de fall oralt ofrivilligt intag av aska bedöms vara en viktig exponeringsväg kan precisionen i en riskbedömning ökas genom att sikta askorna till den partikelstorleksfraktion som representerar ofrivilligt intag.

- Typen av aska hade betydelse för totalhalten av arsenik, krom, koppar, nickel och zink. Totalhalten av arsenik, krom och zink var högre i flygaskorna, medan totalhalten koppar och nickel var högre i bottenaskorna.

4 Fortsatt FoU

Med undantag av föreliggande studie finns vid denna tidpunkt inga kända vetenskapliga publikationer om oral biotillgänglighet av metaller i förbränningsaskor, varken i svenska eller internationella tidskrifter. Det återstår därför mycket arbete för att skaffa kunskaper om

- de mekanismer som kontrollerar biolösligheten i askor
- vilken betydelse specieringen av metaller i förbränningsaskor har för storleken på den biolösliga fraktionen av olika metaller
- betydelsen av närvaro av föda för storleken på den biolösliga fraktionen av metaller i askor vid användning av RIVMs *in vitro* metod
- huruvida det sista steget i RIVMs *in vitro* metod (tunntarmsdelen) skulle kunna utföras vid anaeroba förhållanden för att bättre efterlikna förhållandena i tarmen. I föreliggande studie var ju den biolösliga fraktionen av arsenik redan så hög att en sådan modifiering av metoden inte ansågs nödvändig. Däremot hade det varit intressant att undersöka hur mycket den biolösliga fraktionen av övriga metaller påverkats av ett sista anaerobt steg.
- hur stor betydelse det sista steget (tarmdelen) i RIVMs *in vitro* metod har för storleken på den biolösliga fraktionen. Hade det räckt att mäta halten utlakad metall i magsaften för att spara kostnader med det sista steget?
- hur väl korrelerad *in vitro* testet i denna studie är med andra tillgänglighetstest

5 Litteraturreferenser

- [1] Adriano, D., *Trace Elements in Terrestrial Environments*, 2 uppl. Springer, 2001.
- [2] Ainsworth C.C., Pilon J.L., Gassman P.L., Van Der Sluys W.G. (1994). *Cobalt, cadmium, and lead sorption to hydrous iron oxide: residence time effect*, *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 58, 1615-1623.
- [3] Bendz D., Tüchsen P.L., Christensen T.H., *The Dissolution Kinetics of Major Elements in Municipal Solid Waste Incineration Bottom Ash Particles*, *Journal of Contaminant Hydrology*, 94, 178-194, 2007.
- [4] Bendz D., Wik, O., Elert, M., Håkansson, K. *Miljöriktlinjer för askanvändning i anläggningsbyggande*, Värmeforsk Q4-238. 2006.
- [5] Berner, R.A. Kinetics of weathering and diagenesis, In: *Kinetics of geochemical processes* (Ed: A.C. Lasaga and R.J. Kirkpatrick), Mineralogical Society of America, Washington DC, 1981.
- [6] Brener, W., Hendrix, T.R., McHugh, P.R. *Regulation of the gastric emptying of glucose*. *Gastroenterology*. 85:76-82. 1983.
- [7] Davis, A., Ruby, M.J. and Bergstrom, P.D. 1992. *Bioavailability of arsenic and lead in soils from the Butte, Montana, mining district*. *Environmental Science and Technology* 26:461-468. 1992.
- [8] Dijkstra, J.J., van der Sloot, H.A., Comans, R.N.J. *The leaching of major and trace elements from MSWI bottom ash as a function of pH and time*. *Applied Geochemistry* 21:335-351. 2006.
- [9] DIN, Deutsches Institut für Normung. *Soil Quality- Absorption availability of organic and inorganic pollutants from contaminated soil material*. DIN E 19738. 2000.
- [10] Ellickson, K.M., Meeker, R.J., Gallo, M.A., Buckley, B.T. and Lioy, P.J., *Oral bioavailability of lead and arsenic from a NIST standard reference soil material*. *Environmental Contamination and Toxicology* 40:128-135. 2001.
- [11] Fendorf, S. La Force, M.J., Li, G. *Temporal Changes in Soil Partitioning and Bioaccessibility of Arsenic, Chromium, and Lead*. *J. Environ. Qual.* 33:2049-2055. 2004.
- [12] Fendorf, S. *Surface reactions of Chromium in Soils and Waters*. *Geoderma*. 67:55-71.1995.
- [13] Fällman, A-M., *Characterisation of residues- Release of contaminants from slags and ashes*, Doktorsavhandling No 486, Linköpings Universitet, ISBN 91-7871-940-2. 1997.
- [14] Giere, R., Carleton, L.E., Lumpkin, G.R. *Micro- and nanochemistry of fly ash from a coal-fired power plant*. *American Mineralogist* 88:1853-1865. 2003.
- [15] Grøn, C., Andersen, L. *Human Bioaccessibility of Heavy Metals and PAH from Soil*. Danish Environmental Protection Agency. Project no 840. 2003.
- [16] Grøn, C, L. *Laktester för riskbedömning av förorenade områden, underlagsrapport 2b*. Naturvårdsverket rapport 5557. 2006.

-
- [17] Hamel., S., Ellickson, K.M., Lioy, P.L. The estimation of the bioaccessibility of heavy metals in soils using artificial biofluids by two novel methods: mass balance and soil recapture. *The science of the Total Environment* (243/244):273-283. 1999.
- [18] Hunt, J.N. *Some properties of an alimentary osmoreceptor mechanism*. *Journal of physiology* (London), 132:267-288. 1956.
- [19] Kelley, M., Brauning, S., Schoof, R., Ruby, M. *Assessing Oral Bioavailability of Metals in Soil*. Batelle Press, Columbus, Ohio. 2002.
- [20] Kotas, J. Stasicka, Z. *Chromium Occurrence in the Environment and Methods of its Speciation*. *Environmental Pollution* 107:263-283. 2000.
- [21] Ljung, K., *Metals in Urban Playground Soils- Distribution and Bioaccessibility*. Doktorsavhandling, SLU, Uppsala, ISBN 91-576-7130-3. 2006.
- [22] Ljung, K., Oomen, A., Duits, M., Selinus, O., Berglund, M. *Metal Bioaccessibility of Urban Playground Soil*. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*. Accepted. 2006.
- [23] Mattigod, S.V., Dhanpat, R., Eary, L.E., Ainsworth, C.C. *Geochemical Factors Controlling the Mobilization of Inorganic Constituents from Fossil Fuel Combustion Residues:II. Review of the Major Elements*. *J. Environ. Qual.*, 19:188-201. 1990.
- [24] Meyer, J.H., MacGregor, M.B., Gueller, R., Martin, P., Cavalieri, R. *^{99m}Tc-tagged chicken liver as a marker of solid food in the human stomach*. *American Journal of Digestive Diseases*. 21:296-304. 1976.
- [25] Moore, J.G., Christian, P.E., Brown, J.A., Brophy, C. Datz, F., Taylor, A. Alazraki, N. *Influence of meal weight and caloric content on gastric emptying of metals in man*. *Digestive Diseases and Sciences*. 29:513-519. 1984.
- [26] National Research Council. *Bioavailability of Contaminants in Soils and Sediments*. National Academy of Sciences, Washington DC. 2003.
- [27] NEPI. National Environmental Policy Institute. *Assessing the bioavailability of metals in soil for use in human health risk assessment*. 2000. National Environmental Policy Institute.
- [28] Oomen, A.G., Hack, A., Minekus, M., Zeijdner, E., Cornelis, C., Schoeters, G., Verstraete, W., Van der Wiele, T., Wragg, J., Rompelberg, C.J.M., Sips, A.J.A.M., van Wijnen, J.H. *Comparison of Five In Vitro Digestion Models To Study the Bioaccessibility of Soil Contaminants*. *Environmental Science and Technology*, 36:3326-3334. 2002.
- [29] Oomen, A.G., Rompelberg, C.J.M., Bruil, M.A., Dobbe, C.J.G., Pereboom, D.P.K.H., Sips, A.J.A.M. *Development of an In Vitro Digestion Model for Estimating the Bioaccessibility of Soil Contaminants*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 44:281-287. 2003.
- [30] Ruby, M.V., Davis, A., Schoof, R., Eberel, S., Sellstone, C.M. *Estimation of Lead and Arsenic Bioavailability using a Physiologically Based Extraction Test*. *Environmental Science and Technology* 30:422-430. 1996.
- [31] Ruby, M.V., Schoof, R., Brattin, W., Goldade, M., Post, G., Harnois, M., Mosby, D.E., Casteel, S.W., Berti, W., Carpenter, M., Edwards, D., Cragin, D., Chapell,

- W. *Advances in Evaluating the Oral Bioavailability of Inorganic in Soil for Use in Human Health Risk Assessment*. Environmental Science and Technology, 21:3697-3705. 1999.
- [32] Rodriguez, R.R., Basta, N.T. *An In Vitro Gastrointestinal Method to Estimate Bioavailable Arsenic in Contaminated Soils and Solid Media*. Environmental Science and Technology 33: 642-649. 1999.
- [33] Schroder, J.L., Basta, N.T., Si, J., Casteel, S.W., Evans, T., Payton, M. *In Vitro Gastrointestinal Method To Estimate Relative Bioavailable Cadmium in Contaminated Soil*. Environmental Science and Technology, 37:1365-1370. 2003.
- [34] Sheppard, S.C., Evenden, W.G. *Contaminants Enrichment and Properties of Soil Adhering to Skin*. J. Environ. Qual. 23:604-613. 1994.
- [35] Smedley, P.L., Kinniburgh, D.G. *A Review of the Source, Behaviour and Distribution of Arsenic in Natural Waters*. Applied Geochemistry 17:517-568. 2002.
- [36] Stewart, M.A., Jardine, P.M., Brandt, C.C., Barnett, M.O., Fendorf, S.E., McKay, L.D., Mehlhorn, T.L., Paul, K. *Effects of Contaminant Concentration, Aging, and Soil Properties on the Bioaccessibility of Cr(III) and Cr(IV) in Soil*. Soil and Sediment Contamination 12(1):1-21. 2003a.
- [37] Stewart, M.A., Jardine, P.M., Barnett, M.O., Melhorn, T.L., Hyder, L.K., McKay, L.D. *Influence of Soil Geochemical and Physical Properties on the Sorption and Bioaccessibility of Chromium(III)*. J. Environ. Qual 32:129-137. 2003b.
- [38] Van der Sloot, H.A., Comans, R.N.J., Hjelmar, O. *Similarities in the leaching behaviour of trace contaminants from waste, stabilised waste, construction materials and soils*. Sci. Total Environ. 178:111-126. 1996.
- [39] Wragg, J., Cave M.R. *In vitro Methods for the Measurement of the Oral Bioaccessibility of Selected Metals and Metalloids in soil: A Critical Review*. RD Technical Report P5-062/TR/01. Nottingham, British Geological Survey. 2003.
- [40] Yang, J-K., Barnett, M.O., Zhuang, J, Fendorf, S.E., Jardine, P. *Adsorption, oxidation, and bioaccessibility of As(III) in soils*. Environmental Science and Technology. 39:7102-7110. 2005.
- [41] Yang, J-K., Barnett, M.O., Jardine, P.M., Brooks, S.C. *Factors Controlling the Bioaccessibility of Arsenic(V) and Lead(II) in Soil*. Soil and Sediment Contamination. 12(2):165-179. 2003.
- [42] Yang, J-K., Barnett, M.O., Jardine, P., Baste, N., Casteel, S.W. *Adsorption, sequestration, and bioaccessibility of As(V) in soils*. Environmental Science and Technology 36:4562-4569. 2002.
- [43] Zagury, G.J., Samson, R., Deschênes, L., *Occurrence of metals in soil and groundwater near chromated copper arsenate-treated utility poles*. J. Environ. Qual. 32(2):507-514. 2003.
- [44] Zhang, M.K., He, Z.L., Calvert, D.V., Stofella, P.J., Yang, X.E., Li, Y.C. *Phosphorous and Heavy Metal Attachment and Release in Sandy Soil Aggregate Fractions*. Soil. Sci. Soc. Am. J. 67:1158-1167. 2003.

Värmeforsk är ett organ för industrisamarbeten inom värmeteknisk forskning och utveckling. Forskningsprogrammet är tillämpningsinriktat och fokuseras på energi- och processindustriernas behov och problem.

Bakom Värmeforsk står

följande huvudmän:

- Elforsk
- Svenska Fjärrvärmeföreningen
- Skogsindustrin
- Övrig industri

VÄRMEFORSK SAMARBETAR MED
STATENS ENERGIVYNDIGHET



VÄRMEFORSK SERVICE AB

101 53 Stockholm

Tel 08-677 25 80

Fax 08-677 25 35

www.varmeforsk.se

Beställning av trycksaker

Fax 08-677 25 35