

**Umweltforschungsplan des Bundesministers für
Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit**

Umweltchemikalien/Schadstoffwirkungen

Forschungsbericht FKZ 200 22 230

**Ausarbeitung und Validierung einer Methode zur Bestimmung
von Monomethylquecksilber und anorganischem Quecksilber in
Fischgewebe und Zooplankton**

von

Dr. Uwe Harms
und
Markus Bunke^{*)}

Bundesforschungsanstalt für Fischerei,
Institut für Fischereiökologie,
Palmaille 9, D-22767 Hamburg

Institutsleiter
Dr. Hans-Stephan Jenke

IM AUFTRAG DES UMWELTBUNDESAMTES

Dezember 2002

^{*)} Diplom in Lebensmittelchemie, 1. Staatsexamen in Lebensmittelchemie

Berichts-Kennblatt

1. Berichtsnummer UBA-FB 200 22 230	2.	3.
4. Titel des Berichts Ausarbeitung und Validierung einer Methode zur Bestimmung von Monomethylquecksilber und anorganischem Quecksilber in Fischgewebe und Zooplankton		
5. Autor(en), Name(n), Vorname(n) Dr. Uwe Harms Markus Bunke	8. Abschlußdatum 31.12.2002	
6. Durchführende Institution (Name, Anschrift) Bundesforschungsanstalt für Fischerei, Institut für Fischereiökologie, Palmaille 9, D-22767 Hamburg	9. Veröffentlichungsdatum	
	10. UFOPLAN-Nr. 200 22 230	
	11. Seitenzahl 85	
	12. Literaturangaben 142	
7. Fördernde Institution (Name, Anschrift) Umweltbundesamt, Postfach 33 00 22, D-14191 Berlin	13. Tabellen und Diagramme 18	
	14. Abbildungen 13	
	15. Zusätzliche Angaben	
16. Kurzfassung Es wurde eine gaschromatographische Kopplungstechnik, mit Natriumtetraethylborat-Derivatisierung, purge-and trap Anreicherung, gaschromatographischer Trennung und Atom-Fluoreszenzdetektion (CV-AFS) als empfindliche und zuverlässige Methode für die simultane Speziationsanalytik von Monomethylquecksilber und anorganischem Quecksilber in Meeresbiota (Fisch und Zooplankton) entwickelt. Die ermittelten Nachweis- und Bestimmungsgrenzen betragen für Monomethylquecksilber 0,95 beziehungsweise 2,85 µg/kg, für anorganisches Quecksilber 1,94 beziehungsweise 5,82 µg/kg. Im Rahmen der Validierung wurden zur Richtigkeitsüberprüfung der ausgearbeiteten Analytik die zertifizierten Referenzmaterialien NRCC-Tort-2 (Hummer Mitteldarmdrüse), NIST-2976 (Miesmuschelgewebe) und BCR 414 (Plankton) analysiert. Weiterhin wurden Wiederfindungs-Experimente mit Kabeljauleber als Testmaterial durchgeführt. Auf Grundlage der erhaltenen Daten konnte für die entwickelte Methode mit einer Wahrscheinlichkeit von 95% kein systematischer Fehler nachgewiesen werden. Die Ergebnisse der Varianzanalyse zeigten, dass sowohl für Monomethylquecksilber als auch für anorganisches Quecksilber, die dem analytischen Fehler zugeordnete Varianz klein genug ist, um heterogene Verteilung der Quecksilberspezies innerhalb und zwischen einer endlichen Anzahl von einzelnen Fischen zu erkennen.		
17. Schlagwörter Monomethylquecksilber, Methylquecksilber, anorganisches Quecksilber, marine Biota, Kopplungstechnik, in-situ Derivatisierung, Natriumtetraethylborat, Methoden Validierung		
18. Preis	19.	20.

Report Cover Sheet

1. Report No. UBA-FB 200 22 230	2.	3.
4. Report Title Elaboration and Validation of a Method for the Determination of Methylmercury and Inorganic Mercury in Fish Tissue and Zooplankton		
5. Autor(s), Family Name(s), First Name(s) Uwe Harms Markus Bunke	8. Report Date 31 Dec. 2002	
6. Performing Organisation (Name, Address) Federal Research Centre for Fisheries Institute for Fishery Ecology Palmaille 9, D-22767 Hamburg Germany	9. Publication Date	
	10. UFOPLAN-Ref. No. 200 22 230	
	11. No. of Pages 85	
	12. No. of Reference 142	
7. Sponsoring Agency (Name, Address) Umweltbundesamt, Postfach 33 00 22, D-14191 Berlin	13. No. of Tables, Diagrams 18	
	14. No. of Figures 13	
	15. Supplementary Notes	
16. Abstract A hyphenated instrumental technique, consisting of purge-and-trap injection-gas chromatography-atomic fluorescence detection after in-situ derivatisation (alkylation) with sodium tetraethylborate was elaborated as a sensitive and reliable method for the simultaneous speciation analysis of methylmercury and inorganic mercury in marine biota (fish and zooplankton). The detection limit and the quantification limit estimated for methylmercury was 0.95 and 2.85 µg/kg respectively, and for inorganic mercury 1.94 and 5.82 µg/kg respectively. For the purpose of estimating trueness (expressed in terms of bias) as part of method validation certified reference materials NRCC-TORT-2 (lobster hepatopancreas reference material for trace metals), NIST -2976 (Mussel tissue) and BCR 414 (Plankton) were analysed. In addition, recovery experiments using cod liver as test material were carried out. Based on the data obtained bias could not be detected for the analytical method tested (P=0.95). Results of analysis of variance demonstrated that the analytical variance for both methylmercury and inorganic mercury respectively was sufficiently small to permit detection of the heterogeneous distribution of the two mercury species within and between a finite number of individual fish specimens.		
17. Keywords Methylmercury, inorganic mercury, marine biota, hyphenated instrumental technique, in-situ derivatisation, sodium tetraethylborate, method validation		
18. Price	19.	20.

1. Einleitung.....	10
1.1 Aufgabenstellung.....	10
1.2 Planung und Ablauf des Forschungsvorhabens.....	11
1.3 Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den bei dem Forschungsvorhaben angeknüpft wurde	12
1.3.1 Globaler Quecksilberkreislauf	12
1.3.2 Biotransformation des Quecksilbers	14
1.3.3 Bioakkumulation/-magnifikation des Quecksilbers	15
1.3.4 Speziierungsanalyse des Quecksilbers.....	17
1.3.4.1 Solvent-Extraktions-Gaschromatographie-Methode (SE/GC-Methode) zur spezifischen Bestimmung von Monomethylquecksilber	17
1.3.4.2 Methode der selektiven Reduktion.....	18
1.3.4.3 Hydrid-Methode (Derivatisierung mit Natrium-Tetrahydroborat)	19
1.3.4.4 Derivatisierung mit Hilfe der Grignardreaktion	19
1.3.4.5 Derivatisierung mit Natrium-Tetraethylborat (Alkylierungs-Methode)...	20
1.3.5 Methoden der Probenvorbereitung	20
1.4 Zusammenarbeit mit anderen Stellen	21
2. Eigene Untersuchungen.....	21
2.1 Kurzbeschreibung der ausgearbeiteten Methode.....	21
2.2 Herstellung und Überprüfung einer geeigneten Trennsäule für die isotherme Gaschromatographie von Alkylquecksilberderivaten.....	22
2.3 Auswahl und Überprüfung eines geeigneten Adsorbens und Optimierung der Arbeitsbedingungen für die Vor-Säulen-Sorption und -Desorption von Alkylquecksilberderivaten	23
2.4 Überprüfung und Optimierung der technischen Merkmale eines beheizbaren Interface für die Pyrolyse der Alkylquecksilberderivate	25
2.5 Untersuchung und Optimierung des alkalischen Aufschlusses von verschiedenen Probenmatrices	27
2.6 Untersuchung und Optimierung der Ausbeute an Alkylquecksilberderivaten in Abhängigkeit von pH-Wert, Reaktionstemperatur und -zeit sowie Reagenzmenge	29
3. Validierung der Methode	32
3.1 Ermittlung der Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze nach der modifizierten Leerwertmethode	32
3.1.1 Theoretischer Hintergrund	32

3.1.2 Praktische Durchführung	33
3.2 Überprüfung der Richtigkeit von Untersuchungsergebnissen (Nachweis systematischer Fehler)	35
3.2.1 Theoretischer Hintergrund	35
3.2.2 Praktische Durchführung	38
3.3 Durchführung von Wiederfindungsexperimenten zur Überprüfung der Richtigkeit der Analyse von Monomethylquecksilber	42
3.4 Überprüfung der Leistungsfähigkeit der Methode	44
3.4.1 Theoretischer Hintergrund	44
3.4.2 Praktische Durchführung	45
3.5 Zusammenfassung/Schlussfolgerungen	48
4. SOP: Arbeitsanleitung, Zusammenbau der Apparatur	50
4.1 Zweck und Anwendungsbereich	50
Kurzbeschreibung des Verfahrens	51
4.2 Chemikalien	51
4.3 Lösungen	53
4.4 Geräte und Hilfsmittel	54
4.5 Anleitungen und Betriebsanweisung zum Zusammenbau der Komponenten	56
4.6 Herstellung und Anschluss der Tenax-TA [®] Adsorptions-/Desorptionseinheit	58
4.7 Herstellung und Installation der Gaschromatographiesäule	59
4.8 Herstellung und Installation der Pyrolyseeinheit	60
4.9 Anschluss des Detektors an einen PC oder einen Integrator	61
4.10 Durchführung von Messungen	63
4.10.1 Warnhinweise	63
4.10.2 Probenvorbereitung und Aufschluss	63
4.10.3 Kalibrierung/Analyse von Proben	64
4.10.4 Auswertung	66
5. Literatur	68
6. Anhang	84

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Abhängigkeit der Signalintensität von Methyl-Hg und anorg. Hg von der Pyrolyse-Temperatur.....	26
Abbildung 2: Einfluss des pH-Wertes auf die Alkylierungsreaktion von Methyl- und anorganischem Quecksilber mit Natriumtetraethylborat	29
Abbildung 3: Einfluss unterschiedlicher Temperaturen bei der Derivatisierungsreaktion mit Natriumtetraethylborat auf die Ausbeute an Methylethylquecksilber und Diethylquecksilber.	30
Abbildung 4: Einfluss der "Purge and trap"-Dauer auf die detektierten Signalhöhen der Quecksilberspezies.....	31
Abbildung 5: Schematischer Aufbau der Apparatur zur simultanen gaschromatographischen Bestimmung von Hg^{2+} und Methylquecksilber	56
Abbildung 6: Aufbau Tenax-TA [®] -Adsorptionsröhrchen	58
Abbildung 7: Aufbau der Adsorptions-/Desorptionseinheit mit Zeitschaltuhr	59
Abbildung 8: Gaschromatographische Trennsäule – Schematische Darstellung	60
Abbildung 9: Pyrolyseeinheit	61
Abbildung 10: Kalibriergerade für Methylquecksilber (Peakhöhe)	84
Abbildung 11: Kalibriergerade für anorganisches Quecksilber (Peakhöhe)	84
Abbildung 12: Kalibriergerade für Methylquecksilber (Peakfläche)	85
Abbildung 13: Kalibriergerade für anorganisches Quecksilber (Peakfläche)	85

Verzeichnis der Tabellen

Tabelle 1: Geschätzte durchschnittliche Einträge (wet depositional flux) von Quecksilber in die Ozeane und auf das Land für verschiedene Regionen der Erde (auszugsweise entnommen aus Mason et al., 1994a).....	13
Tabelle 2: Literaturzusammenstellung über geschätzte, aus dem Meer in die Atmosphäre austretende Quecksilbermengen (evasional flux)	13
Tabelle 3 : Quecksilber in pflanzlichen und tierischen Organismen verschiedener Regionen des Atlantischen Ozeans, sowie der Nord- und Ostsee (Gesamtquecksilbergehalte bezogen auf Trockensubstanz)	16
Tabelle 4: Ergebnisse der Wiederholmessungen (8 Wiederholanalysen desselben Probenaufschlusses) zur Bestimmung von x_{NG} , x_{EG} , x_{BG} für MetHg und anorg. Hg nach dem modifizierten Leerwertverfahren; Untersuchungsmaterial: Kabeljauleber.....	34
Tabelle 5: Ermittelte Standardabweichung s_x , Nachweisgrenze x_{NG} , Erfassungsgrenze x_{EG} und Bestimmungsgrenze x_{BG} der Methode.	34
Tabelle 6: Zusammenstellung der Ergebnisse zur Richtigkeitsüberprüfung der Analytik von Monomethylquecksilber und Gesamt-Quecksilber (gemessen als anorganisches Quecksilber); Untersuchung des zertifizierten Referenzmaterials <i>NRCC-CRM TORT-2 (Lobster Hepatopancreas Reference Material for Trace Metals)</i>	39
Tabelle 7: Zusammenstellung der Ergebnisse zur Richtigkeitsüberprüfung der Analytik von anorganischem Quecksilber; Untersuchung des zertifizierten Referenzmaterials <i>NRCC-CRM TORT-2 (Lobster Hepatopancreas Reference Material for Trace Metals)</i>	40
Tabelle 8: Zusammenstellung der Ergebnisse zur Richtigkeitsüberprüfung der Analytik von Monomethylquecksilber und Gesamt-Quecksilber (gemessen als anorganisches Quecksilber); Untersuchung des zertifizierten Referenzmaterials <i>NIST-2976 (Mussel tissue)</i>	41
Tabelle 9: Zusammenstellung der Ergebnisse zur Richtigkeitsüberprüfung der Analytik von Gesamt-Quecksilber (gemessen als anorganisches Quecksilber); Untersuchung des zertifizierten Referenzmaterials <i>BCR CRM 414 (Plankton)</i>	42
Tabelle 10: Probenschema zum durchgeführten Wiederfindungsexperiment mit zugehörigem Gewicht der Teilproben, gemessenem Analytgehalt $x_{obs,i}$, und der zugehörigen Ergebnisunsicherheit $u(x_{obs,i})$	43
Tabelle 11: Zusammenstellung der Ergebnisse zur Richtigkeitsüberprüfung der Analytik von Monomethylquecksilber durch Wiederfindungs-Experimente.	43
Tabelle 12: Schema der durchgeführten zweifachen Varianzanalyse mit Wiederholmessungen	45
Tabelle 13: Monomethylquecksilbergehalte (jeweils ausgedrückt als $\times 10^{-6} \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ Hg}$ pro Leberfrischgewicht) von 12 Kabeljaulebern, die in zwei Teile A und B geteilt wurden. ...	46
Tabelle 14: Gehalte für anorganisches Quecksilber (jeweils ausgedrückt als $\times 10^{-6} \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ Hg}$ pro Leberfrischgewicht) von 12 Kabeljaulebern, die in zwei Teile A und B geteilt wurden.....	47
Tabelle 15: Ergebnisse der robusten Varianzanalyse.....	48
Tabelle 16: Verwendete Chemikalien	52
Tabelle 17: Magnetventil-Stellungen zur Steuerung der „Purge-and-Trap- und Gaschromatographie-Position“	62
Tabelle 18: Pipettierschema	65

Erläuterungen der Abkürzungen, Maßeinheiten und Symbole

A	Ampere
AD	Außendurchmesser
AAS	Atomabsorptionsspektrometer
AED	Atomemissionsdetektor
AFS	Atomfluoreszenzspektrometrie bzw. Atomfluoreszenzspektrometer
BFAFi	Bundesforschungsanstalt für Fischerei
°C	Grad Celsius
CRM	Zertifiziertes Referenzmaterial
Et	Ethyl-
EtOH	Ethanol
FE	Flächeneinheiten
FIMS	Flow Injection Mercury System
g	Erdbeschleunigung
GC	Gaschromatographie bzw. Gaschromatograph
min	Minute
H ₂ O bidest.	Wasser, doppelt gereinigt
Hg	Quecksilber
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
ICP	Induktiv gekoppeltes Plasma
ID	Innendurchmesser
IFÖ	Institut für Fischereiökologie
k.A.	keine Angabe
Met	Methyl-
MetOH	Methanol
MS	Massenspektrometrie bzw. Massenspektrometer
mV	Millivolt
n.n.	nicht nachweisbar
SOP	Standard Operating Procedure oder Arbeitsanleitung
Std.	Standard
STEB	Natriumtetraethylborat
THF	Tetrahydrofuran
TMAH	Tetramethylammoniumhydroxid
TS	Trockensubstanz

T	Temperatur[°C]
z.A. oder p.A.	zur Analyse
x_{CRM}	= Analytgehalt des zertifizierten Referenzmaterials
$u(x_{CRM})$	= Ergebnis-/Messunsicherheit von x_{CRM}
$\bar{x}_{q,pred}$	= Mittelwert des Analytgehaltes aus der Bestimmung von n Wiederholanalysen des CRM
$u_{c,prec}(\bar{x}_{q,pred})$	= kombinierte Ergebnisunsicherheit von $\bar{x}_{q,pred}$
f_r	= Wiederfindungs-/Recovery-Faktor
$u(f_r)$	= Ergebnisunsicherheit von f_r
T	= <i>Prüfgröße</i>
$x_{obs,i}$	= gemessener Analytgehalt
$u(x_{obs,i})$	= Ergebnisunsicherheit des gemessenen Analytgehaltes
\bar{x}_{obs}	= Mittelwert des gemessenen Analytgehaltes
x_{spike}	= Menge an zugesetztem Analyt
\hat{x}_{native}	= Mittelwert des nativen Analytgehaltes
$u(\hat{x}_{native})$	= Ergebnisunsicherheit des Mittelwertes des nativen Analytgehaltes
n	= Anzahl

1. Einleitung

1.1 Aufgabenstellung

Die generelle Einschätzung der Metallverbindungen als für den marinen Lebensraum gefährliche Stoffe findet ihren Ausdruck in dem Übereinkommen zum Schutz der Meeresumwelt des Ostseegebiets (HELSINKI KONVENTION, 1992) und dem Übereinkommen über den Schutz der Meeresumwelt des Nordostatlantiks (OSLO und PARIS KONVENTION, 1992). Beide Übereinkommen zählen Schwermetalle **und ihre Verbindungen** zu den “Priority groups of harmful substances”, deren Verwendung vermieden oder zumindest erheblich eingeschränkt und deren Vorkommen regelmäßig überwacht werden soll. Gleiches gilt entsprechend für das „Bund/Länder Messprogramm für die Meeresumwelt von Nord- und Ostsee“ (BLMP Nord- und Ostsee).

Die im Rahmen des BLMP Nord- und Ostsee und der Monitoringprogramme der Meeresschutzübereinkommen von Oslo, Paris und Helsinki durchgeführten spurenanalytischen Untersuchungen beschränkten sich bisher auf die Bestimmung der Gesamt-Quecksilbergehalte von Meerestieren ohne Unterscheidung des Anteils einzelner definierter Quecksilberverbindungen (Quecksilberspezies) am Gesamt-Quecksilbergehalt. Speziierungsanalyse ist gemäß einer von der IUPAC erarbeiteten Definition „*die analytische Aktivität zur Identifizierung und Bestimmung der Mengen einer oder mehrerer individueller chemischer Spezies*“, wobei letztere eine spezifische Form eines Elementes mit definierter molekularer, komplexer oder nuklearer Struktur oder einer Wertigkeitsstufe darstellen (Templeton et al. 2000).

Ziel des vom Umweltbundesamt geförderten Forschungsvorhabens war es daher, ein einfaches und kostengünstiges analytisches Verfahren zur Bestimmung der Quecksilberspezies Monomethylquecksilber in Fischen (Gewebe- und Organproben) und Zooplankton auszuarbeiten und zu validieren, so dass die Forderungen nach einer geeigneten Methode, die im Rahmen der oben genannten Überwachungsprogramme eingesetzt werden kann, erfüllt werden. Ferner ist wichtig, dass weitergehende Erkenntnisse über die Mechanismen, welche die Bio-Transformation des Quecksilbers im Meer und den Kreislauf des Quecksilbers zwischen Meer und Atmosphäre steuern, sich nur gewinnen lassen, wenn die dazu notwendige Speziierungsanalyse des Quecksilbers zuverlässig beherrscht wird. Hierzu soll das Forschungsvorhaben ebenfalls beitragen. Da nach gegenwärtigem Kenntnisstand in Fischen und Zooplankton nur die beiden Quecksilberspezies Monomethylquecksilber und anorganisches Quecksilber vorkommen, wurde die Aufgabenstellung dahingehend erweitert, eine Methode auszuarbeiten, die es erlaubt, beide Spezies in einem Arbeitsgang zu bestimmen.

Diese Arbeit wurde vom 1.10.2000 bis zum 30.12.2002 in der Bundesforschungsanstalt für Fischerei im Institut für Fischereiökologie (IFÖ) angefertigt. Dieses Institut befand bzw. befindet sich in einer Phase großer Veränderungen. Dazu gehörten zwei Standortwechsel und mehrere Raumwechsel an den jeweiligen Standorten. Dies bedeutete, dass unvorhersehbare zeitliche Verzögerungen bei der Durchführung der projektbezogenen Arbeiten auftraten und teilweise unter Bedingungen gearbeitet werden musste, die spurenanalytische Arbeiten enorm erschwerten. Trotz dieser Widrigkeiten ist es gelungen, die gestellte Aufgabe zu lösen und eine Methode zu entwickeln, die für den vorgesehenen Untersuchungszweck geeignet ist.

1.2 Planung und Ablauf des Forschungsvorhabens

Die ursprüngliche Planung des Forschungsvorhabens sah vor:

- Installation einer Messanordnung durch Kopplung eines Fließinjektions-Kaltdampf-Atomabsorptionsspektrometers (Flow Injection Mercury System – FIMS) mit einem Gaschromatographen.
- Herstellung und Überprüfung einer geeigneten Trennsäule für die isotherme Gaschromatographie von Alkylquecksilberderivaten.
- Auswahl und Überprüfung eines geeigneten Adsorbens zur Anreicherung von Alkylquecksilberderivaten und Optimierung der Arbeitsbedingungen für die Vor-Säulen-Sorption und -Desorption .
- Überprüfung und Optimierung der technischen Merkmale eines beheizbaren Interface für die Pyrolyse der Alkylquecksilberderivate.
- Untersuchung und Optimierung des alkalischen Aufschlusses von verschiedenen biologischen Probenmatrices wie Fischproben und Zooplankton.
- Untersuchung und Optimierung der Ausbeute an Alkylquecksilberderivaten in Abhängigkeit von Probenmatrix, pH-Wert, Reaktionszeit und -temperatur sowie Reagenzmenge.

- Ermittlung der Merkmalswerte des Analysenverfahrens gemäß „Leitlinie zur Methodenvvalidierung“ (Wellnitz et al., 1999).

Der Ablauf des Vorhabens erfolgte entsprechend der Planung.

Lediglich der Versuch, die Fließinjektion mit der Gaschromatographie zu koppeln misslang. Vermutlich sind die Materialien der Mischkammer und die Schläuche der FIMS durchlässig für die Alkylquecksilberderivate oder adsorbieren diese. Dafür spricht, dass intensives Spülen des Fließinjektionssystems mit organischen Lösungsmitteln eine kurzzeitige Verbesserung brachte, so dass ca. zwei Analysen durchgeführt werden konnten, bevor wieder unkontrollierbare Verluste auftraten. Da diese Maßnahmen allerdings sehr zeit- und kostenintensiv waren und zudem große Mengen an organischen Lösungsmitteln verbrauchten, wurde von dem Vorhaben der FIMS-Kopplung Abstand genommen.

1.3 Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den bei dem Forschungsvorhaben angeknüpft wurde

1.3.1 Globaler Quecksilberkreislauf

Quecksilber gelangt aus natürlichen und aus anthropogenen Quellen in die Umwelt und wird aufgrund seiner Flüchtigkeit weiträumig und weltweit über die Erdatmosphäre transportiert. Nach einer von der Oslo- und Paris- Kommission veröffentlichten Studie wird jährlich etwa 2500 t Quecksilber aus natürlichen Quellen und etwa 3600 t aus anthropogenen Quellen in die Erdatmosphäre emittiert (OSPAR/SIME 2000). Daraus resultiert ein geschätzter durchschnittlicher Quecksilbergehalt der Erdatmosphäre von etwa $1,9 \times 10^{-9} \text{ g m}^{-3}$. Dies stimmt gut überein mit Messwerten von $1\text{-}2 \times 10^{-9} \text{ g m}^{-3}$, die von Slemr und Langer (1992), Mason et al. (1994a, 1994b) und Pierrone et al. (1996) im letzten Jahrzehnt des 20. Jahrhunderts in verschiedenen Regionen der Erde ermittelt wurden. Daten über atmosphärische Quecksilbereinträge für verschiedene Regionen der Erde sind in Tabelle 1 zusammengestellt.

Tabelle 1: Geschätzte durchschnittliche Einträge (wet depositional flux) von Quecksilber in die Ozeane und auf das Land für verschiedene Regionen der Erde (auszugsweise entnommen aus Mason et al., 1994a).

Region (geographische Breite)	Atmosphärische Quecksilbereinträge ($\times 10^{-9} \text{ g m}^{-2} \text{ h}^{-1}$)	
	Ozean	Land
70-90 ⁰ N	0,077	0,0114
30-70 ⁰ N	0,88	1,80
10-30 ⁰ N	1,08	2,26
10 ⁰ N-10 ⁰ S	0,54	1,44
10-30 ⁰ S	0,47	1,1
30-70 ⁰ S	0,43	0,97
70-90 ⁰ S	0,015	0,037

Die geschätzten Einträge von Quecksilber in die Atmosphäre durch Verflüchtigung (evasional flux) aus verschiedenen Meeresgebieten gibt Tabelle 2 wieder.

Tabelle 2: Literaturzusammenstellung über geschätzte, aus dem Meer in die Atmosphäre austretende Quecksilbermengen (evasional flux)

Gebiet	Verflüchtigung (Evasional Flux) ($\times 10^{-9} \text{ g m}^{-2} \text{ h}^{-1}$)	Literaturstelle
North Atlantic Ocean	15,8 \pm 10,8	Mason et al., 1998
Equatorial Pacific Ocean	1,33 - 12	Mason und Fitzgerald, 1993
N. Pacific Ocean	0,25	Mason und Fitzgerald, 1996
North Sea (entire)	0,92 - 1,83	Coquery and Cossa, 1995
North Sea (Central)	1,23	Leermakers et al., 1997
North Sea (Southern Bight)	0,88 - 2,17	Baeyens und Leermakers, 1998
Baltic Sea (average summer)	1,58	Wängberg et al., 2001
Baltic Sea (average winter)	0,83	Wängberg et al., 2001

Zwischen der Erdatmosphäre (dem unteren Bereich der Erdatmosphäre, der sog. Troposphäre) und den Ozeanen wird Quecksilber ständig ausgetauscht (Kreislauf des Quecksilbers zwischen Ozeanen und Atmosphäre). Mason et al. (1994a) schätzten, dass sich infolge dieses Austausches und der vermehrten anthropogenen Quecksilberemissionen der Quecksilbergehalt der Meere in den zurückliegenden 150 Jahren von 3611 t (entspricht $0,1 \times 10^{-9} \text{ g l}^{-1}$) auf etwa 10.832 t (entspricht $0,3 \times 10^{-9} \text{ g l}^{-1}$) erhöhte. Die von verschiedenen Gruppen im Wasser der Ozeane gemessenen Quecksilbergehalte lagen zwischen 0,1 und $1 \times 10^{-9} \text{ g l}^{-1}$ (Mason und Fitzgerald 1993, 1996; Mason et al. 1995b, 1998; Baeyens und Leermakers 1998).

1.3.2 Biotransformation des Quecksilbers

An den Austauschprozessen zwischen Erdatmosphäre und Ozeanen sind verschiedene chemische Formen (Spezies) des Quecksilbers beteiligt, namentlich elementares Quecksilber (Hg^0), anorganisches Quecksilber (Hg^{2+} -Salze) und die ausgesprochen neurotoxischen Verbindungen Monomethylquecksilber (CH_3Hg^+) und Dimethylquecksilber (CH_3HgCH_3). Mit der Nahrung aufgenommene organische Quecksilberverbindungen werden über den Gastrointestinaltrakt resorbiert und besitzen die Eigenschaft die Blut-Hirnschranke und die Plazenta durchdringen zu können. Im Gehirn werden sie angereichert und langsam zum anorganischen Quecksilber umgewandelt. Dieses wiederum bindet kovalent an Sulfhydryl-Gruppen und inhibiert so zahlreiche wichtige neuronale Enzymsysteme. Diese Eigenschaft erklärt die große Neurotoxizität der organischen Quecksilberverbindungen. Besonders stark von diesen toxischen Wirkungen sind Föten und Kinder betroffen, deren Gehirn sich noch in der Entwicklungsphase befindet. Zusätzlich wird auch eine mutagene Wirkung diskutiert.

Ergebnisse von Untersuchungen zur Aufklärung von Mechanismen, nach denen Quecksilber in einem natürlichen Prozess in seine verschiedenen Spezies umgewandelt (biotransformiert) wird, sind mehrfach in der Fachliteratur mitgeteilt worden (Wood et al. 1968, 1975, Jensen und Jernelöv 1969a, 1969b, Kim und Fitzgerald, 1986, Mason und Fitzgerald, 1990, Baeyens et al., 1991, Mason und Fitzgerald, 1993, 1996, 1995b, Cossa et al. 1994, Mason et al. 1993, 1994a, 1994b, 1995a, 1995c, 1998, 1999, Fitzgerald, 1995, Fitzgerald und Mason, 1996, Horvat, 1996, Coquery et al., 1997, Leermakers et al., 1993, 1995, 1997, 2001, Benoit et al., 1998, Bloom et al. 1999, Lamborg et al., 1999, Mason und Sullivan 1999, EMEP, 2001, Wängberg et al., 2001). Pongratz und Heumann (1998) fanden hohe Gehalte an Organoquecksilberverbindungen in abgelegenen Regionen der

Ozeane mit hoher biologischer Aktivität (Süd-Atlantik, Arktis, Süd-Pazifik). Weiterhin konnten sie in Modellexperimenten die Bildung von Methylquecksilber durch polare Makroalgen belegen.

Es sind im wesentlichen zwei von Mikroorganismen gesteuerte Mechanismen, die bei der Biotransformation im Wasser bzw. in Sedimenten wirksam werden: Beim ersten wird Hg^{2+} aus HgS durch Oxidation des Sulfids über Sulfid zu Sulfat löslich gemacht. Anschließend wird Hg^{2+} durch Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (NADH) zu Hg^0 reduziert, dessen Dampfdruck so hoch ist, dass es in die Gasphase (d.h. in die Atmosphäre) übergehen kann. Beim zweiten Mechanismus wird Hg^{2+} zu Monomethyl- und Dimethylquecksilber methyliert. Dabei wirken Methylcorrinoiden (Methyl-Vitamin- B_{12}) als Überträger der CH_3^- -Gruppe auf Hg^{2+} . Dimethylquecksilber ist flüchtig, gelangt in die Atmosphäre und wird dort durch die UV-Strahlung zu Hg^0 , Methan und Ethan photolysiert.

Monomethylquecksilber hingegen verbleibt zum großen Teil in der Wasserphase bzw. im Sediment und wird von den im Wasser lebenden Tieren und Pflanzen in unterschiedlichem Maße akkumuliert.

Boening (2000) stuft die ökotoxikologische Gefährlichkeit von Methylquecksilber höher als die von anorganischem Quecksilber ein.

1.3.3 Bioakkumulation/-magnifikation des Quecksilbers

Im Meerwasser liegt der Gehalt an Alkylquecksilberspezies (Mono- und Dimethylquecksilber) mit Konzentrationen um $1 \times 10^{-12} \text{ g l}^{-1}$ im extremen Spurenbereich, das sind etwa 0,1% des Gesamtquecksilbergehaltes (Mason und Fitzgerald, 1993; Cossa et al., 1994, 1997). Mason et al. (1995a, 1995c, 1996) zeigten, dass auf der unteren Ebene des marinen Nahrungsnetzes anorganisches Quecksilber und Monomethylquecksilber gleichermaßen durch das Phytoplankton aufgenommen und etwa um den Faktor 10^5 bis 10^6 gegenüber dem Wasser angereichert (biokonzentriert) werden. Dimethylquecksilber wird nach bisherigem Kenntnisstand nicht bioakkumuliert, da es, wie bereits erwähnt, relativ schnell aus dem Wasserkörper in die Atmosphäre entweicht.

Innerhalb des marinen Nahrungsnetzes wird Quecksilber schrittweise weiter angereichert, wobei sich der Anteil des Monomethylquecksilbers am aufgenommenen Gesamtquecksilber von < 1% bis zu etwa 10% auf der Ebene des Phytoplanktons, auf annähernd 100% auf der Ebene der Fische und marinen Säugetiere erhöht (von Burg und Greenwood 1991; Bloom 1992; Suedel et al. 1994; Hill et al. 1996). Überzeugende Erklärungen für die selektive Bioakkumulation des Monomethylquecksilbers, wie Tabelle 3 veranschaulicht, fehlen bisher noch.

Tabelle 3 : Quecksilber in pflanzlichen und tierischen Organismen verschiedener Regionen des Atlantischen Ozeans, sowie der Nord- und Ostsee (Gesamtquecksilbergehalte bezogen auf Trockensubstanz)

Bezeichnung des Untersuchungsmaterials	Gesamt-Hg ($10^{-6} \text{ g} \cdot \text{kg}$)	Durchschnittlicher Anteil des Monomethyl-Hg am Gesamt-Hg (%)
Phytoplankton	10-100	10
Makrophyten	20-120	15
Mollusca (Weichtiere)	20-2.600	30
Crustacea (Krebstiere)	60-1.700	40
Annelida (Ringelwürmer)	10-400	40
Fische (Hering, Kabeljau, Schellfisch, Scholle)	30-4.300	95
Thunfisch	150-7.500	98
Muskelgewebe	30-6.100	98
Meeressäuger $\left\{ \begin{array}{l} \text{Leber} \end{array} \right.$	500>10.000	98<10*)

*)Bei alten Tieren Abbau des Monomethyl-Hg zu anorganischem Hg (Demethylierung in der Leber).

Alle bisher an Meerestieren durchgeführten Untersuchungen zeigten, dass Monomethylquecksilber nicht im Fettgewebe, sondern im Eiweiß des Muskelgewebes und der inneren Organe akkumuliert wird. Hier findet das CH_3Hg^+ -Kation aufgrund seiner Neigung, mit nukleophilen Liganden stabile Komplexe zu bilden, ausreichend Bindungspartner.

Nach Rabenstein (1978) kann CH_3Hg^+ mit solchen Stoffen auch veränderliche Bindungen eingehen, die mehrere reaktive Gruppen enthalten. So verbindet sich CH_3Hg^+ beispielsweise bei niedrigem pH-Wert mit der Aminosäure Glycin bevorzugt zu $\text{H}_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CO}_2\text{HgCH}_3$ (Assoziation mit der Carboxylgruppe), bei hohem pH-Wert dagegen zu $\text{CH}_3\text{HgNH}_2^+\text{CH}_2\text{CO}_2^-$ (Assoziation mit der Aminogruppe).

Die Mutagenität von CH_3Hg^+ wird mit seiner Affinität zu den in 1- und 3-Stellung befindlichen Stickstoffatomen der Purin- bzw. Pyrimidin-Nukleoside und-Nukleotide zurückgeführt. Die stärksten Komplexe werden mit den Pyrimidinbasen Uracil und Thymin gebildet (Mansy et al., 1974).

1.3.4 Speziierungsanalyse des Quecksilbers

Zahlreiche Arbeiten der vergangenen Jahre geben eine Übersicht über das wachsende wissenschaftliche Interesse an der Speziierungsanalyse von Organometall- und Organoquecksilberverbindungen (Puk und Weber, 1994a, Szpunar-Lobinska et al., 1995, Horvat, 1996, Uria und Sanz-Medel, 1998, Craig et al., 1999, Quevauviller, 2000, Quevauviller et al., 2000, Adams et al., 2001).

Nachfolgend werden verschiedene Möglichkeiten der Bestimmung von Monomethylquecksilber kurz vorgestellt:

1.3.4.1 Solvent-Extraktions-Gaschromatographie-Methode (SE/GC-Methode) zur spezifischen Bestimmung von Monomethylquecksilber

Grundlagen zur chemischen Charakterisierung von Organoquecksilberverbindungen der allgemeinen Struktur $RHgX$, mit R = Alkyl- oder Arylrest, X = nukleophiler Ligand) sind von Simpson (1961) gelegt worden. Aufgrund der von ihm ermittelten Komplexbildungskonstanten für eine Reihe von nukleophilen Liganden entwickelte Westöö (1966, 1967, 1968) eine geeignete Analysenmethode, in der Monomethylquecksilber zunächst aus seiner Bindung an Matrixbestandteile durch Behandlung mit HCl , HBr oder HJ freigesetzt und als Monomethylquecksilberhalogenid (Halogenkomplex) mit einem organischen Lösungsmittel extrahiert wurde. In einem Reinigungsschritt wurde das Organoquecksilber als Cystein-Komplex in die wässrige Phase überführt, aus der es wiederum nach Umsetzung mit Halogenwasserstoff freigesetzt und erneut als Monomethylquecksilberhalogenid mit einem organischen Lösungsmittel re-extrahiert wurde. Die Bestimmung des Monomethylquecksilberhalogenids erfolgte durch Gaschromatographie unter Verwendung eines Elektroneneinfangdetektors (ECD). Im Verlaufe des gaschromatographischen Trennprozesses können unkontrollierte Verluste des Monomethylquecksilbers durch thermische Zersetzung auftreten. O'Reilly (1982) sowie Hight und Corcoran (1987) schlugen vor, dieser thermischen Zersetzung durch eine Passivierung der Trennsäule (z.B. durch mehrmalige Injektion einer Hg^{2+} -chloridlösung) entgegenzuwirken.

Modifikationen des von Westöö entwickelten Verfahrens beinhalten einen Austausch der Cysteinlösung durch Cystein-imprägniertes Papier (Horvat et al., 1990) oder die Verwendung eines Anionenaustauschers an Stelle des Reinigungsschrittes mit einer Sulfhydrylverbindung (Stoeppler et al., 1992). Eine Verbesserung der Spezifität des Verfahrens wurde dadurch erreicht, dass man den Ausgang der GC-Säule über ein Interface

mit einem elementspezifischen Detektor koppelte (Harrison und Rapsomanikis, 1989 , Lansens et al., 1991 , Harms, 1992 , Carro-Diaz et al., 1994).

Ein Nachteil der SE/GC Methode besteht darin, dass nur Monomethylquecksilber bestimmt werden kann. Der Anteil an anorganischem Quecksilber (Hg^{2+}) wird indirekt ermittelt, indem der Monomethylquecksilbergehalt von dem Gesamtquecksilbergehalt abgezogen wird. Gemäß Fehlerfortpflanzungsgesetz ist die Ergebnisunsicherheit des indirekt bestimmten Gehaltes an anorganischem Quecksilber relativ hoch.

1.3.4.2 Methode der selektiven Reduktion

Die Reduktion des Quecksilber(II)-Kations zu metallischem (elementarem) Quecksilber stellt die zentrale Reaktion für die atomspektrometrische Quecksilberbestimmung nach der sog. Kaltdampftechnik dar. Bei der Formulierung von Redoxsystemen zur differenzierten Bestimmung der Hg-Bindungsformen ging man davon aus, dass mit bestimmten Reduktionsmitteln nur anorganisches Quecksilber umgesetzt wird, während organisch gebundenes Quecksilber aufgrund seiner geringeren Reaktivität innerhalb einer vorgegebenen Reaktionszeit nicht reduziert wird. Erst unter der katalytischen Wirkung von bestimmten Schwermetallionen und Verwendung eines Reduktionsmittels mit einem Normalredoxpotential E^0 von mindestens $-0,5$ Volt gelingt dann die Freisetzung von elementarem Hg aus der organischen Bindung (Harms und Luckas, 1984 und andere dort zitierte Autoren).

Bei der von Magos (1971) benutzten Methode wurde SnCl_2 als Reduktionsmittel benutzt, um anorganisches Quecksilber zu reduzieren, während das Gesamtquecksilber (bestehend aus anorganisch plus organisch gebundenem Quecksilber) durch Reduktion mit einem Gemisch aus SnCl_2 und CdCl_2 , letzteres als Katalysator, um die Reduktion von organischem Hg zu beschleunigen, bestimmt wurde. Die Differenz aus Gesamtquecksilber und anorganischem Quecksilber bildete den Gehalt an organischem (=Monomethyl-) Quecksilber. Andere Autoren haben diese Methode, insbesondere die Bedingungen der Extraktion der Quecksilberverbindungen aus der Probematrix, weiterentwickelt (Oda und Ingle, 1981, Filippelli, 1987, Harms und Luckas, 1984, Gutierrez et al. 1993 und Limaverde und de Campos 1999, Ubillus et al., 2000). Die Methode der selektiven Reduktion hat den Vorteil der besonderen Eignung für Routineuntersuchungen, aber den Nachteil, dass eine speziesspezifische Identifizierung des organisch gebundenen Quecksilbers unterbleibt.

1.3.4.3 Hydrid-Methode (Derivatisierung mit Natrium-Tetrahydroborat)

Filippelli et al. (1992) verwendeten erstmals Natrium-Tetrahydroborat (NaBH_4) als Reagenz zur Erzeugung des flüchtigen Monomethylquecksilberhydrids (CH_3HgH):



Monomethylquecksilberhydrid wurde dann mittels Headspace-GC und Fourier Transformations-Infrarot-Spektrometrie (FTIR) bestimmt. Wegen der hohen Nachweisgrenze von absolut 200 ng CH_3HgH erwies sich die von Filippelli et al. (1992) beschriebene Hydrid-Methode für die Analyse von Umweltproben als ungeeignet. Puk und Weber (1994b) entwickelten die Hydrid-Methode weiter und erzielten eine erheblich niedrigere Nachweisgrenze von absolut 50 pg CH_3HgH . Sie zeigten, dass nur bei Einhaltung spezieller Reaktionsbedingungen (Ausschluss von Sauerstoff und oxidierenden Reagenzien) eine vollständige Umsetzung des Monomethylquecksilbers zum Hydrid erfolgt. Andernfalls kann das NaBH_4 freie Radikale bilden, welche die Kohlenstoff-Quecksilber-Bindung spalten, so dass das CH_3Hg^+ zu elementarem Quecksilber (Hg^0) reduziert wird. Es lässt sich dann nicht mehr von dem gleichfalls zu elementarem Quecksilber reduzierten Hg^{2+} unterscheiden. Zahlreiche Autoren verwendeten diese Technik (Craig et al., 1992, Ritsema und Donard, 1994, Martin und Donard, 1995, Gerbersmann et al., 1997, Tseng et al., 1997, und 1998, Bin et al., 1998, Reuther et al., 1999).

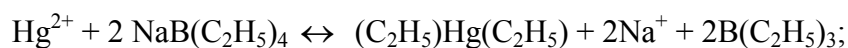
1.3.4.4 Derivatisierung mit Hilfe der Grignardreaktion

Eine weitere Derivatisierung der Methylquecksilberverbindungen ist mit Hilfe der Grignardreaktion möglich (Bulska et al., 1991, Frech et al., 1998). Dabei werden die Organometallverbindungen alkyliert und so in flüchtige Verbindungen umgesetzt. Emteborg et al. (1999) berichtet von Problemen mit Spektralinterferenzen und Störungen bei der Alkylierung von Quecksilberspezies mit Grignardreagenzien. Die Störungen, die sich durch veränderte Hintergrundwerte des Detektors bemerkbar machten, wurden auf gebildete flüchtige Nebenprodukte der Grignardreaktion zurückgeführt. Diese entstehen während der Butylierung mit Butylmagnesiumchlorid in THF.

Ein Vorteil der Grignardreaktion liegt in der variablen Wahl der Alkylierungs-Gruppen, da die Alkylgruppe durch entsprechende, relativ leicht herzustellende Grignardreagenzien gewählt werden kann.

1.3.4.5 Derivatisierung mit Natrium-Tetraethylborat (Alkylierungs-Methode)

Bei der Derivatisierung mit Natrium-Tetraethylborat (STEB, Alkylierungs-Methode) werden im Untersuchungssubstrat sowohl anorganisches Quecksilber als auch Monomethylquecksilber simultan zunächst in leicht flüchtige Ethylderivate überführt:



Details der Reaktion sind bei Rapsomanikis und Craig (1991) und Rapsomanikis (1994) beschrieben. Nach Freisetzung und anschließender Zwischenanreicherung (purge and trap) der Ethylderivate in einer Kühlfalle, an geeigneten Adsorbermaterialien oder in einem organischen Lösungsmittel, werden diese gaschromatographisch getrennt (Bloom, 1989, Rapsomanikis und Craig, 1991, Yong und Bayona, 1995). Die quantitative Bestimmung erfolgt durch Kopplung mit einem nachweisstarken elementspezifischen Detektor, z.B. Atom-Absorptionsspektrometer (Rapsomanikis und Craig, 1991, Fisher et al., 1992), Atom-Emissionsspektrometer (Bulska et al., 1991, Carro-Diaz et al., 1994, Donais et al., 1996 Ceulemans und Adams, 1996, Gerbersmann et al., 1997, Cai et al., 2000), Atom-Fluoreszenzspektrometer oder Massenspektrometer bzw. ICP-MS (Armstrong et al., 1999, Bloom, 1989, Bloom und Fitzgerald, 1988, Lansens et al., 1991, Horvat et al., 1993, Hintelmann und Wilken, 1993, Liang et al., 1994, Slaets et al., 1999, Cai et al., 2000).

1.3.5 Methoden der Probenvorbereitung

Biologisches Untersuchungsmaterial muss zunächst vorbehandelt werden, um die Quecksilberverbindungen für die Derivatisierung verfügbar zu machen. Dieses kann durch einen schonenden alkalischen Aufschluss mit oder ohne Mikrowellenbestrahlung (Bloom, 1989, Fischer et al., 1993, Harms, 1994, Lee et al., 1994, Liang et al., 1996, Gerbersmann et al., 1997, Tseng et al., 1997 und 1998, Jimenez and Sturgeon, 1997, Cai et al., 1998, Vazquez et al., 1999, Tu et al., 2000, Slaets und Adams, 2000, Dietz et al., 2000, 2001, Logar et al., 2000, Ramalhosa et al., 2001, Välimäki und Perämäki, 2001), durch einen vorgeschalteten Extraktionsprozess (Rapsomanikis und Craig, 1991) oder durch Wasserdampfdestillation (Horvat et al., 1993) erfolgen.

1.4 Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Es wurde mit folgenden Institutionen zusammengearbeitet:

- Bundesamt für Seeschifffahrt und Hydrographie, Hamburg.
- Universität Hamburg, Lebensmittelchemie, Institut für anorgan. Chemie
- Glasbläserei Universität Hamburg Institut für anorg.Chemie, Hamburg

2. Eigene Untersuchungen

2.1 Kurzbeschreibung der ausgearbeiteten Methode

Zur Untersuchung der biologischen Matrices (Fischgewebe und Zooplankton) war es erforderlich, 1. eine geeignete Methode der (chemischen) Probenvorbereitung zu entwickeln und 2. mehrere Analysetechniken zu kombinieren (zu koppeln). Dies dient einerseits dazu, die Probenkomponenten zu trennen und andererseits, die getrennten Analyten zu identifizieren und quantitativ zu bestimmen. Unter dem Begriff „Kopplungstechnik“ versteht man üblicherweise die direkte (online) Kombination einer Trennmethode (hier der Gaschromatographie) mit einer spektrometrischen Detektionsmethode (hier der Atomfluoreszenzspektrometrie).

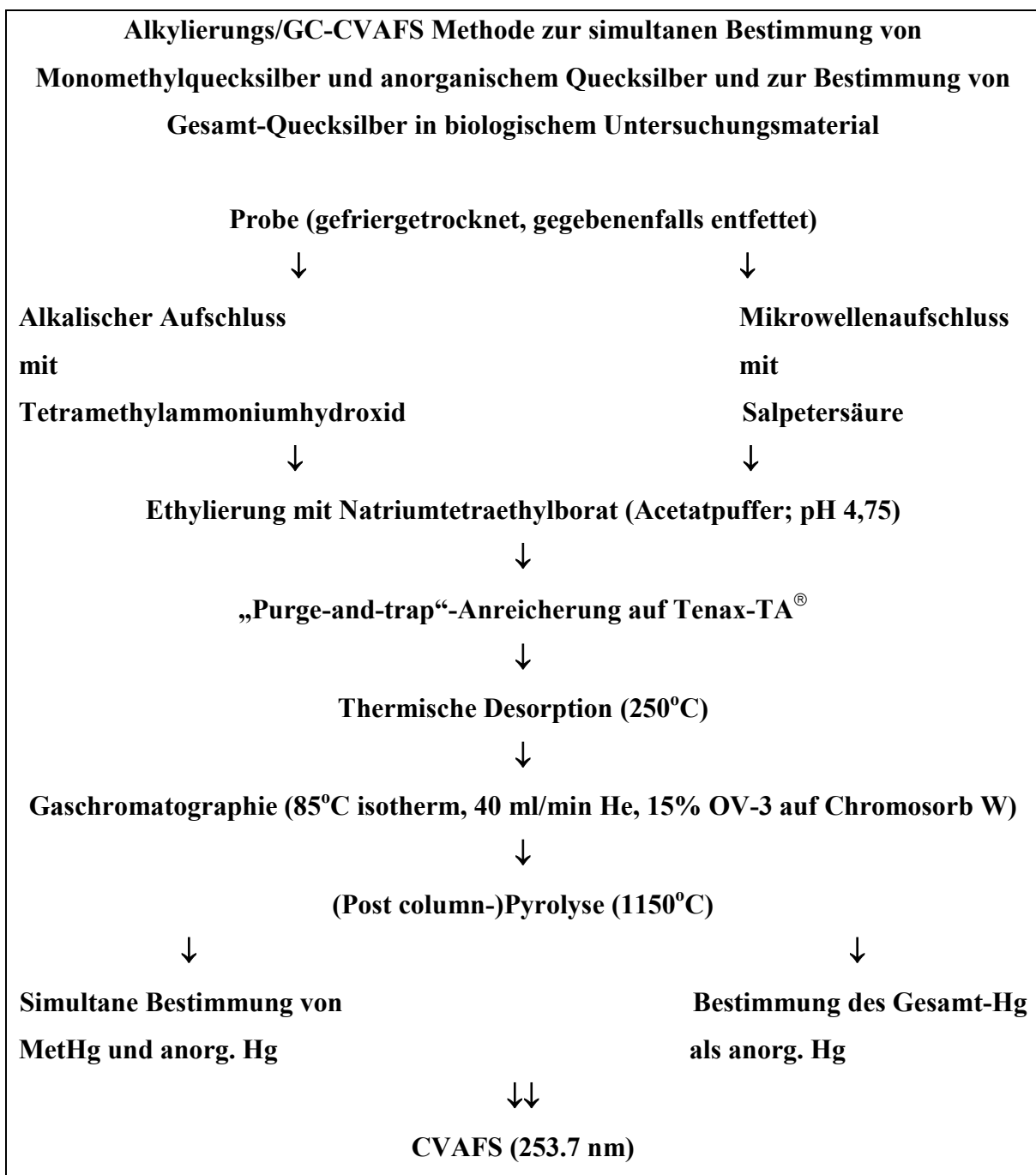
Bei den eigenen Untersuchungen wurde wie folgt verfahren:

Das gefriergetrocknete und (bei einem Fettgehalt von >10% zuvor entfettete) Untersuchungsmaterial wird mit einem Mörser fein zerstossen und in 25%iger Tetramethylammoniumhydroxidlösung (TMAH) bei Zimmertemperatur vollständig aufgelöst. Ein definierter Teil dieser Aufschlusslösung wird in einer Gaswaschflasche mit Natriumacetatpuffer und Wasser (bidest.) versetzt.

Anschließend werden die enthaltenen Quecksilberverbindungen (CH_3Hg^+ und Hg^{2+}) mit Natriumtetraethylborat (STEB) zu gasförmigen Ethylderivaten ($((\text{CH}_3)\text{Hg}(\text{C}_2\text{H}_5))$ und $(\text{C}_2\text{H}_5)\text{Hg}(\text{C}_2\text{H}_5)$) umgesetzt.

Mit Hilfe eines Argon-Gasstroms werden die gasförmigen Quecksilberverbindungen aus der Lösung ausgetrieben und auf einem Adsorptionsröhrchen mit Tenax-TA[®] gesammelt. Durch Aufheizen des Adsorptionsröhrchens werden die gesammelten Verbindungen desorbiert und anschließend gaschromatographisch getrennt. Die Detektion erfolgt mittels Kaltdampf-Atomfluoreszenzspektrometrie (CVAFS) nach vorheriger (post-column-) Pyrolyse der Hg-Derivate zu Hg^0 . Bei der CVAFS dient das Fluoreszenzsignal der Quecksilberlinie bei 253,7 nm als Maß der Quecksilberkonzentration in der Küvette.

Die Vorgehensweise ist in folgendem Fließdiagramm schematisch dargestellt.



2.2 Herstellung und Überprüfung einer geeigneten Trennsäule für die isotherme Gaschromatographie von Alkylquecksilberderivaten

Prinzipiell stehen für die Gaschromatographie zwei unterschiedliche Typen von Trennsäulen zur Verfügung, Kapillarsäulen und gepackte Säulen.

Kapillarsäulen kommen dann verstärkt zum Einsatz, wenn die zu trennenden Substanzgemische eine große Trennschärfe erfordern. Bei der Verwendung von

Kapillarsäulen muss mit einer längeren Chromatographiedauer gerechnet werden. Bailey und Brooks (1992) und Cai et al. (1997) verwendeten Kapillarsäule zur Bestimmung von Methylquecksilber.

Gepackte Säulen haben den Vorteil, dass sie relativ einfach zu handhaben und preisgünstig herzustellen sind. Je nach Dimension und Geräteparametern lassen sich in der Regel kurze Analysenzeiten erzielen. Lansens et al. (1991) fand bei einem Vergleich von Kapillar- und gepackten Säulen nur sehr geringfügig bessere Nachweisgrenzen für (FSOT)-Kapillarsäulen im Vergleich zu gepackten Säulen.

Hight, S. und Corcoran, M. (1987) , Horvat et al. (1990) , Rapsomanikis S. und Craig P.J.(1991) Fischer et al. (1993), Kannan et al. (1998) verwendeten gepackte Säulen mit verschiedenen Trägermaterialien und Trennphasen. Während in älteren Arbeiten häufiger mit 10% OV-101 auf Chromosorb WAW-DMCS gearbeitet wurde, kommt in der jüngeren Literatur häufiger 15% OV-3 auf Chromosorb WAW-DMCS zur Anwendung.

Als Säulenmaterial wurde Glas gewählt, das zuvor silanisiert wurde, um so katalytische Umsetzungen weitestgehend auszuschließen. Als stationäre Phase wurden unterschiedliche Materialien getestet. Es stellte sich heraus, dass 15% OV-3 auf Chromosorb WAW-DMCS das günstigste Verhältnis von Trennleistung und benötigter Analysenzeit lieferte.

Die Säulenlänge wurde ebenfalls variiert. Dabei zeigte sich, dass eine Füllungslänge von 75 cm bei einem Innendurchmesser von 4 mm ausreicht, um die Trennung der alkylierten Quecksilberspezies zu bewerkstelligen.

2.3 Auswahl und Überprüfung eines geeigneten Adsorbens und Optimierung der Arbeitsbedingungen für die Vor-Säulen-Sorption und -Desorption von Alkylquecksilberderivaten

In der Literatur werden unterschiedliche Möglichkeiten beschrieben, Alkylquecksilberderivate vor der eigentlichen Gaschromatographischen Trennung anzureichern.

Bloom (1989) und Back R.C. et al. (1995) verwendeten Carbotrap, ein graphitierter Kohlenstoff, der eine sehr große Oberfläche besitzt (10 bis 200 m²/g.). Eigene Versuche mit Carbotrap B und Carbotrap C zeigten jedoch, dass verhältnismäßig große Mengen an

Carbotrap B oder C verwendet werden müssen, um eine vollständige Sorption der Hg-Derivate zu gewährleisten.

Puk R. und Weber (1994b), Ceulemans M. und F.C.Adams (1996), Fischer et al. (1993) verwendeten eine Kühlfalle zum Anreichern der alkylierten Quecksilberspezies. Diese Methode hat den Nachteil, dass mit flüssigem Stickstoff gearbeitet werden muss. Zum Desorbieren der Verbindungen muss das Kühlgefäß entfernt werden und der Desorptionvorgang durch Aufheizen dauert entsprechend lange. Außerdem kondensiert bei Temperaturen von $<-190^{\circ}\text{C}$ auch das zum Austreiben der Verbindungen aus der wässrigen Lösung nötige Argongas. So gewinnt man eine Lösung aus Argon, die die alkylierten Quecksilberverbindungen enthält. Erwärmt man diese Lösung, werden die gesammelten Verbindungen schlagartig bei der Siedetemperatur des Argons frei. Dieser Vorgang hat einen unkontrollierbaren Druckanstieg im System zur Folge. Dieses Problem kann man durch die Verwendung von Helium anstelle von Argon verhindern, doch hat sich in Vorversuchen gezeigt, dass Argon besser geeignet ist, die alkylierten Quecksilberverbindungen aus der wässrigen Lösung zu treiben. Die Verwendung einer Kühlfalle erwies sich deshalb als nicht praktikabel für die gewählte Methode.

Baeyens W. et al. 1999 und Filippelli et al. (1992) wandten die Headspace-Technik an, um die umgesetzten Quecksilberverbindungen freizusetzen. Dabei ist zu beachten, dass diese Methode nur für Kapillarsäulen geeignet ist. Die Anreicherung der Alkylquecksilberverbindungen ist bei dieser Methode sehr gering. Die erreichbaren Nachweisgrenzen sind erwartungsgemäß hoch. Diese Methode kam deshalb nicht zur Anwendung.

Mason und Sullivan K.A (1999) und Kannan et al. (1998) benutzten Tenax-TA[®] als Vor-Säulen Sorptionsmaterial.

Bei Tenax-TA[®] handelt es sich um ein polymeres Adsorbens, welches auf 2,6-Diphenyl-p-phenylenoxid basiert. Es ist bis zu 350°C thermisch stabil und daher zur Trennung von hochsiedenden Substanzen wie z.B. Alkoholen, Polyethylenglykolbestandteilen, Diolen, Amiden, Mono- und Diaminen, Aldehyden, Ketonen und Phenolen geeignet. Das „Bluten“ des Materials ist sehr gering, so dass polare Substanzen mit wenig Tailing eluieren. Tenax-TA[®] hat außerdem eine sehr geringe Affinität zu Wasser. Diese Eigenschaft ist besonders vorteilhaft, da bei der beschriebenen Methode die derivatisierten Quecksilberspezies aus einer wässrigen Lösung ausgetrieben werden.

Diese Eigenschaften machen es zu dem geeignetsten Material für die Vorsäulenanreicherung von Hg-Derivaten. Verschiedene Versuche mit diesem Material zeigten, dass Tenax-TA[®] sehr gut geeignet ist, um die alkylierten Quecksilberspezies quantitativ anzureichern und anschließend durch Aufheizen wieder freizusetzen. Zur Herstellung der Adsorptionsröhrchen werden 50 mg Tenax-TA[®] in ein silanisiertes Duranglasrohr gefüllt und dieses beidseitig mit Glaswolle verschlossen. Die so hergestellten Adsorptionsrohre sind mehrere hundert Male wiederverwendbar. Beim Aufheizen auf 250°C desorbieren die alkylierten Quecksilberverbindungen vollständig. Deshalb ist es nicht notwendig, die Rohre nach dem Gebrauch von Rückständen zu reinigen. Vorteilhaft ist auch die hohe Temperaturbeständigkeit dieses Materials. Kommerziell erhältliche fertig gepackte Tenax-TA[®] Röhrchen erwiesen sich als problematisch in der Anwendung. Es traten massive Blindwerte auf. Vermutlich kommt das Material während des Produktionsprozesses der fertigen Röhrchen mit quecksilberhaltiger (Ab-)Luft in Kontakt. Deshalb wurden die Röhrchen selbst angefertigt. (siehe SOP Kapitel 4.6)

2.4 Überprüfung und Optimierung der technischen Merkmale eines beheizbaren Interface für die Pyrolyse der Alkylquecksilberderivate

Die alkylierten und dann gaschromatographisch getrennten Quecksilberspezies müssen vor der Detektion mit einem CVAAS oder CVAFS, zu Hg⁰ reduziert werden, damit diese Art Detektor diese erfassen kann. Um dieses zu erreichen, gibt es unterschiedliche Lösungsansätze.

Theoretisch ist die Reduktion mit Hilfe eines Lasers oder starkem UV-Licht denkbar. Da jedoch eine einfache und praktikable Lösung gesucht wurde, wurden Versuche mit einem beheizbaren Interface angestellt. Dabei zeigte sich schnell, dass die thermische Zersetzung der alkylierten Quecksilberverbindungen eine einfache und zuverlässige Methode ist. Um Temperaturen von ca. 700-1500°C zu erreichen muss mit Materialien gearbeitet werden, die bei diesen Temperaturen thermisch dauerhaft stabil sind. Dafür kommt häufig hochreines Quarz zum Einsatz, da dieses erst bei höheren Temperaturen schmilzt. Als Heizquelle bietet sich Nickel-/Chromwiderstandsdraht an. Wesentlicher Bestandteil einer solchen Pyrolyseeinheit ist eine ausreichend starke Stromversorgung. Die Verwendung eines Labornetzteils mit einer maximalen Dauerbelastbarkeit von 16A bei 32V erwies sich als gerade ausreichend für den gewünschten Zweck. Im Betrieb erwärmte sich das Netzteil trotz Kühler so stark, dass es gelegentlich Ausfälle durch einen eingebauten Schutzschalter

gab. Abhilfe schaffte ein kleiner Ventilator, der dem Kühler zusätzlich kalte Luft zuführte.

Deshalb wird ein stärkeres Netzteil für den Dauerbetrieb empfohlen.

Ab einer Temperatur von ca. 700°C findet eine nahezu vollständige Umsetzung der alkylierten Quecksilberverbindungen statt. Bloom (1989) und Horvat et al. (1993) verwendeten eine Pyrolysetemperatur von 900°C, Fischer et al. 830°C.

Eigene Versuche zeigten, dass eine Temperatur von ca. 1150°C optimal ist, um eine vollständige Reduktion von Methyl- und Diethylquecksilber zu elementarem Quecksilber zu erreichen. Durch den Einsatz eines Gold/Platinnetzes in die Quarzröhre konnte die Signalhöhe des Detektors bei gleichbleibender Standardkonzentration leicht gesteigert werden. Dieses wiederum bedeutet eine erhöhte Empfindlichkeit der Methode. Abbildung 1 zeigt die Ergebnisse eines Versuchs zur Untersuchung der Abhängigkeit der Signalhöhen eines Standards von der Pyrolysetemperatur.

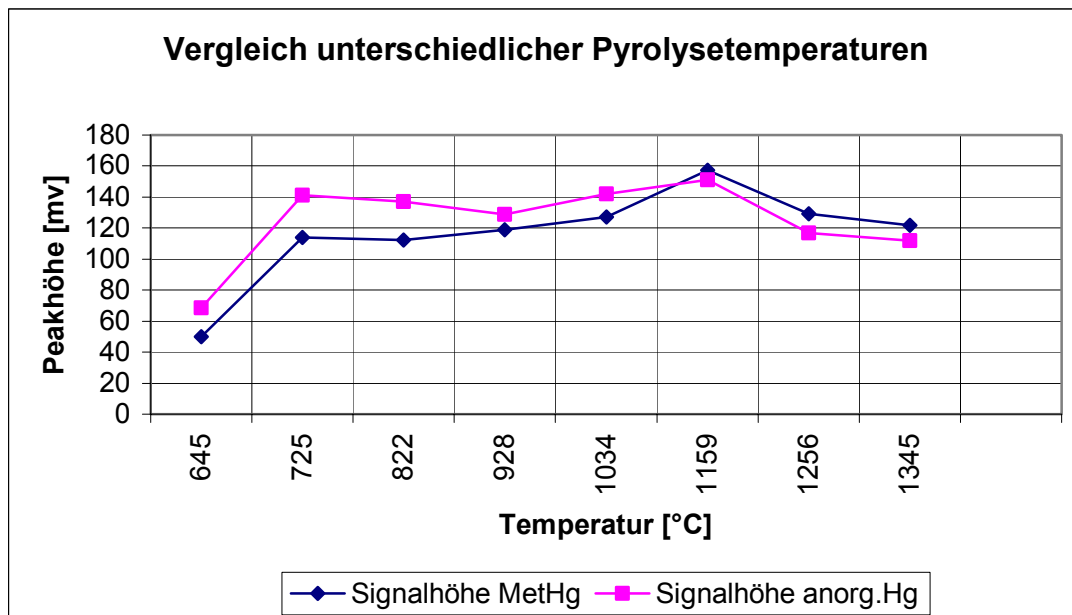


Abbildung 1: Abhängigkeit der Signalintensität von Methyl-Hg und anorg. Hg von der Pyrolyse-Temperatur.

GC-AFS (HP-5890-Brooks Rand AFS-2), Ethylierung mit Natriumtetraethylborat, Purge and Trap auf Tenax-TA[®], 15% OV3 auf DMCS WAW 60/80, GC-Gas Helium 5.0, Flussgeschwindigkeit 40 ml/min.

2.5 Untersuchung und Optimierung des alkalischen Aufschlusses von verschiedenen Probenmatrices

Um biologische Proben vor der sich anschließenden Schwermetallbestimmung aufzuschließen, wurden häufig Natronlauge, Trichloressigsäure und Perchlorsäure eingesetzt (Elbinghaus et al. 1994).

Für dieses Forschungsvorhaben kamen nur die Methoden in Frage, die eine schonende Extraktion der Analyte aus dem Untersuchungsmaterial garantieren und in der Lage sind Methylquecksilber und anorganisches Quecksilber ohne Veränderung ihrer Spezies zu extrahieren. Die Lyse von Zellen ist deutlich erleichtert, wenn das Untersuchungsmaterial gefriergetrocknet vorliegt. Nach der Gefriertrocknung ist eine Mikrohomogenisierung möglich, die dazu beiträgt, die Analyten anschließend leichter zu extrahieren. Die untersuchten Proben lagen alle gefriergetrocknet vor bzw. wurden vor dem Aufschluss gefriergetrocknet.

Hintelmann (1999) stellte durch den Einsatz von Quecksilberisotopen und anschließender GC-MS Analyse fest, dass bei der bis dahin weit verbreiteten Wasserdampfdestillation (Falter und Illgen, 1997) deutliche Artefakte auftreten können. Während und besonders am Ende der Destillation bildet sich demzufolge Methylquecksilber, so dass anschließend zu hohe Gehalte an Methylquecksilber detektiert werden. Bloom (1997) entdeckte ebenfalls deutliche Methylquecksilberzunahmen bei der Wasserdampfdestillationsmethode mit Flusswasserproben.

Da Methylquecksilber gegenüber oxidativen und stark sauren Bedingungen empfindlich ist und Zersetzungen ausgeschlossen werden sollten, konzentrierten sich die Untersuchungen besonders auf alkalische Aufschlüsse bei niedriger Temperatur.

Beichert et al. (2000) berichtet von einer Extraktionstechnik mit überkritischem Wasser ohne Einsatz von Säuren oder alkalischen Reagenzien. Simon et al. (1997) verwendeten überkritisches Kohlendioxid zur Extraktion von Organoquecksilberverbindungen.

Horvat et al. (1994) fand heraus, dass selbst eine Behandlung von Sediment mit Salzsäure (6 mol/l^{-1}) nicht ausreicht um Methylquecksilber vollständig freizusetzen. Fischer (1993) stellte fest, dass MetOH/KOH gut geeignet ist, um unterschiedliche biologische Matrices (Hummer Hepatopankreas (= Mitteldarmdrüse), Fischleber und Fischfilet) aufzuschliessen. Back R.C. et al. (1995) verwendete ebenfalls MetOH/KOH um Zooplankton aufzuschliessen. Ikingura et al. (1999) verwendeten EtOH/KOH. Horvat (1994) berichtet ebenfalls von guten Ergebnissen mit MetOH/KOH.

Eigene Versuche zeigten jedoch, dass weder mit Methanol noch mit Ethanol in Kombination mit Natrium- oder Kaliumhydroxid eine ausreichende Extraktion der Analyte möglich war. Die Extraktionsversuche wurden mit Filet und Leber von der Kliesche (*Limanda limanda*) durchgeführt, jedoch wiesen alle Extraktionslösungen einen groben, unvollständig aufgeschlossenen Bodensatz auf.

Deshalb wurde mit Hilfe einer Mikrowelle versucht den Aufschluss zu vervollständigen und zu beschleunigen.

Da diese Methode nicht das gewünschte Ergebnis lieferte, wurden Versuche mit Tetramethylammoniumhydroxid (TMAH) durchgeführt. TMAH ist ein nicht oxidierendes, sehr stark gewebeauflösendes Reagenz, das die Spezies des zu untersuchenden Metalls nicht verändert. Elbinghaus (1991) erzielte gute Ergebnisse bei der Extraktion von Adeninnukleotiden aus Bakterien mit TMAH. Weiterhin wurden von Elbinghaus et al. (1994) Stabilitätsuntersuchungen von Methylquecksilberchlorid in 20% TMAH-Lösung durchgeführt, die zeigten, dass Methylquecksilber in TMAH-Lösung mindestens 10 Tage lang stabil ist.

Jaylene Chytyk (2001) verwendete TMAH für die Arsenspeziationsanalytik und folgerte ebenfalls, dass TMAH ein geeignetes Reagenz ist um biologische Matrices aufzuschließen. Aufschlussversuche mit TMAH wurden an folgenden biologischen Materialien durchgeführt,

- Wasserflöhe
- Krill
- Fischleber
- Fischfilet
- Hummer
- Seewasserschnecken

und belegten die Leistungsfähigkeit der Aufschlussmethode. Allerdings zeigte sich, dass fettreiche Proben (vor allem Fischleber) einer miniaturisierten Entfettung nach der von Smedes (1999) entwickelten Fettbestimmungsmethode bedürfen. Enthalten die Proben mehr als ca. 10 % Fett, so tritt durch Verseifung der Fette während des Aufschlusses eine starke Schaumbildung beim „Purge and trap“-Schritt auf. Diese Schaumbildung behindert die Analyse, weil die notwendige konstante Flussgeschwindigkeit nicht mehr eingehalten werden kann.

2.6 Untersuchung und Optimierung der Ausbeute an Alkylquecksilberderivaten in Abhängigkeit von pH-Wert, Reaktionstemperatur und -zeit sowie Reagenzmenge

Um die optimalen Parameter für die Derivatisierung mit Natriumtetraethylborat (STEB) zu ermitteln, wurde zuerst der pH-Wert der Derivatisierungsreaktion variiert.

Die Ausbeute an Alkylquecksilberderivaten in Abhängigkeit vom pH-Wert zeigt Abbildung 2:

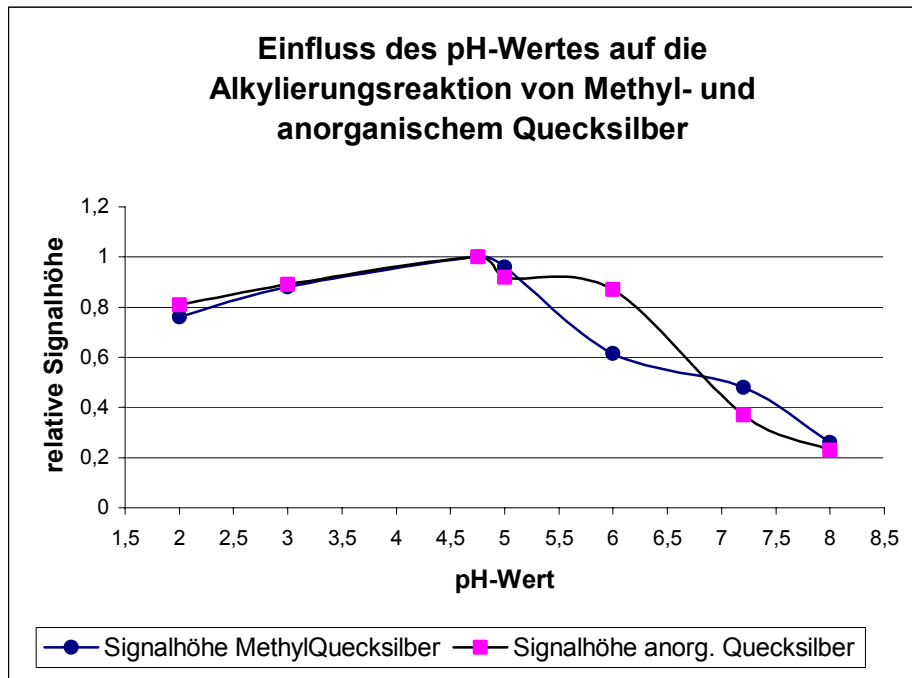


Abbildung 2: Einfluss des pH-Wertes auf die Alkylierungsreaktion von Methyl- und anorganischem Quecksilber mit Natriumtetraethylborat.

GC-AFS (HP-5890-Brooks Rand AFS-2), Ethylierung mit Natriumtetraethylborat, Purge and Trap auf Tenax-TA[®] (600ml/min Argon), 15% OV3 auf DMCS WAW 60/80, GC-Gas Helium 5.0, Flussgeschwindigkeit 40 ml/min GC.

Es ist deutlich zu erkennen, dass der optimale pH-Wert für die Alkylierungsreaktion bei pH $\approx 4,75$ liegt. Daher wurde die Alkylierung in 50 ml bidest. Wasser mit 3 ml Essigsäure/Acetat-Puffer ($c = 2 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) durchgeführt.

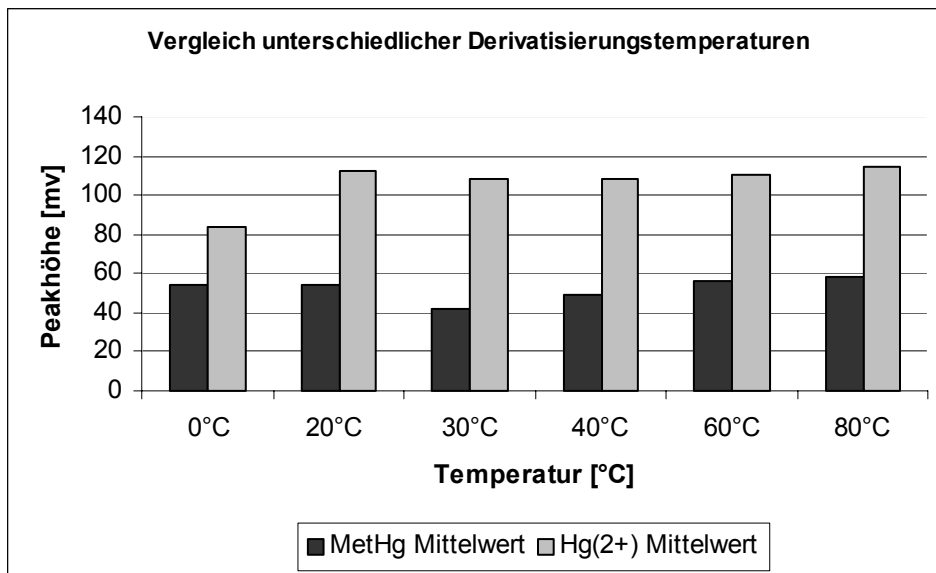


Abbildung 3: Einfluss unterschiedlicher Temperaturen bei der Derivatisierungsreaktion mit Natriumtetraethylborat auf die Ausbeute an Methylethylquecksilber und Diethylquecksilber.

GC-AFS (HP-5890-Brooks Rand AFS-2), Ethylierung mit Natriumtetraethylborat, Purge and Trap auf Tenax-TA[®], 15% OV3 auf DMCS WAW 60/80, GC-Gas Helium 5.0, Flussgeschwindigkeit 40 ml/min.

Abbildung 3 zeigt einen Vergleich der Peakhöhen in Abhängigkeit von unterschiedlichen Derivatisierungstemperaturen. Die geringen Unterschiede der Peakhöhen zeigen, dass bei der Derivatisierung auf eine Temperierung des Reaktionsgemisches verzichtet werden kann.

Da für Standards in bidest. Wasser 10 µl, bei aufgeschlossenen Proben jedoch bis zu 350 µl einer 3%igen STEB-Lösung nötig waren, um eine vollständige Derivatisierung der Quecksilberspezies zu erreichen, wurden alle Derivatisierungen durchgehend mit 500 µl STEB durchgeführt.

Die Reaktionszeit des STEB mit den Quecksilberspezies ist sehr kurz. Bei Versuchen mit unterschiedlichen Reaktionszeiten des STEB mit Standards oder Probenaufschlüssen konnten keine Unterschiede in der Signalthöhe festgestellt werden, wenn die Reaktionsdauer zwischen 10 und 600 Sekunden variiert wurde.

Der entscheidende Parameter ist hierbei vielmehr die Dauer des Ausblasens („Purge and trap“) bzw. die Flussrate während des Ausblas-Schritts. Werden die verwendeten Parameter nicht konstant gehalten, ergibt sich eine signifikante Veränderung in der detektierten Signalthöhe.

Als optimal erwies sich bei einer apparaturbedingten, maximalen Flussrate von 600 ml/min eine Ausblas-Zeit von exakt 300 Sekunden.

Abbildung 4 zeigt die Abhängigkeit der Signalthöhe der einzelnen Spezies von der Ausblas-Zeit (purge time). Der Parameter Flussgeschwindigkeit wurde bei den Untersuchungen konstant bei 600 ml/min gehalten.

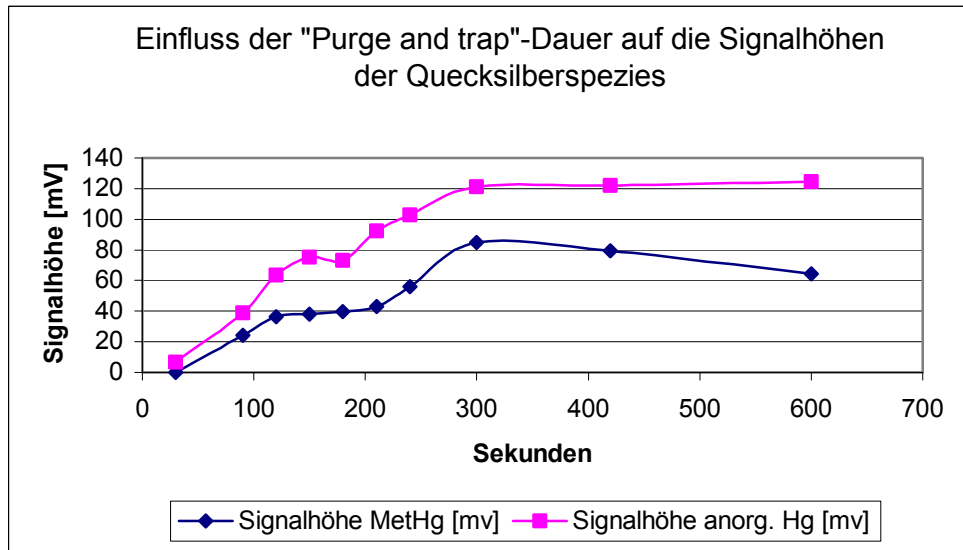


Abbildung 4: Einfluss der "Purge and trap"-Dauer auf die detektierten Signalthöhen der Quecksilberspezies.

GC-AFS (HP-5890-Brooks Rand AFS-2), Ethylierung mit Natriumtetraethylborat, Purge and Trap auf Tenax-TA[®], 15% OV3 auf DMCS WAW 60/80, GC-Gas Helium 5.0, Flussgeschwindigkeit 40 ml/min.

3. Validierung der Methode

3.1 Ermittlung der Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze nach der modifizierten Leerwertmethode

3.1.1 Theoretischer Hintergrund

Nach dem Leerwertverfahren gemäss DIN 32645 bestimmt man die Standardabweichung des Leerwerts (LW) unter folgenden Bedingungen:

- 10 Bestimmungen des LW unter Wiederholbedingungen,
- Vertrauensniveau von 99% (einseitige Fragestellung),
- Einfachbestimmung bei der Analyse,

und errechnet daraus über das einseitige Prognoseintervall einen Mindestgehalt, der sich gerade noch signifikant vom Leerwert unterscheiden lässt. Dies ist die Nachweisgrenze NG.

Die Ermittlung der Leerwertstreuung bietet experimentelle Schwierigkeiten, weil in der Regel keine Probenmatrix verfügbar ist, die frei vom Analyten ist. Als Ausweg bietet sich eine Modifikation der Leerwertmethode an, indem anstelle der Direktbestimmung der Leerwertstreuung die Ergebnisstreuung einer Analysenprobe ermittelt wird, deren Gehalt in der Nähe der Nachweisgrenze liegt. Genauso, wie von der Streuung des LW auf die Streuung der Gehalte geschlossen werden kann, kann auch umgekehrt von der Streuung des Gehaltes einer entsprechenden Probe auf die Streuung des LW geschlossen werden (Huber, 2001).

Die Gleichung für die Bestimmung der NG aus Einzelmessungen an n Leerproben nach DIN 32645 lautet:

$$x_{NG} = \frac{s_L}{b} \cdot t_{p;1-\alpha;f} \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n}};$$

s_L = Standardabweichung der Signale des Leerwerts,

b = Steigung der Kalibriergerade,

t = Quantil der t-Verteilung, Vertrauensniveau nach Norm,

p = 99%, einseitige Fragestellung,

f = $n-1$ Freiheitsgrade,

m = Anzahl der Bestimmungen für zu prüfende Gehalte, nach Norm = 1,

n = Anzahl der Kalibrierdaten (Kalibrierniveaus), nach Norm = 10.

Ersetzt man $\frac{s_L}{b}$ durch die dimensionsgleiche, aus Mehrfachbestimmungen ermittelte

Standardabweichung s_x der Gehalte einer Probe und m durch 1 (entspr. der Normbedingung), so erhält man:

$$x_{NG} = s_x \cdot t_{p;1-\alpha;f} \sqrt{1 + \frac{1}{n}}.$$

Der Analyt kann in einer Probe mit einem Gehalt in Höhe der Nachweisgrenze nur mit einer Wahrscheinlichkeit von 50% nachgewiesen werden. Die Erfassungsgrenze

$x_{EG} = 2x_{NG}$ ist derjenige Minimalgehalt, der in einer Probe mit einer Wahrscheinlichkeit von 99% nachgewiesen werden kann. Die Bestimmungsgrenze (Mindestgehalt einer Probe, ab der eine quantitative Angabe zulässig ist) kann ohne Kenntnis der Streuungsdaten der Kalibriergeraden nicht exakt berechnet, sondern nur abgeschätzt werden. Danach ist $x_{BG} \approx 3x_{NG}$. Nach den Normbedingungen der DIN 32645 ist die Bestimmungsgrenze derjenige Gehalt, bei dem das halbe relative Prognoseintervall des Wertes gerade 33% beträgt.

3.1.2 Praktische Durchführung

Für die nach der modifizierten Leerwertmethode durchgeführten Untersuchungen wurde Kabeljauleber mit Hg-Gehalten (MetHg bzw. anorg. Hg), die messtechnisch gerade noch erfassbar waren, eingesetzt. In Tabelle 4 sind die Ergebnisse der Wiederholmessungen und in Tabelle 5 die berechneten Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenzen zusammengestellt.

Tabelle 4: Ergebnisse der Wiederholmessungen (8 Wiederholanalysen desselben Probenaufschlusses) zur Bestimmung von x_{NG} , x_{EG} , x_{BG} für MetHg und anorg. Hg nach dem modifizierten Leerwertverfahren; Untersuchungsmaterial: Kabeljauleber

MetHg ($\times 10^{-6} \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	Anorg. Hg ($\times 10^{-6} \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)
3,9	13,9
3,5	14,1
4,0	14,1
3,7	14,1
3,2	13,4
3,7	15,0
3,4	15,3
3,2	14,1
3,6 \pm 0,30	14,3 \pm 0,61

Tabelle 5: Ermittelte Standardabweichung s_x , Nachweisgrenze x_{NG} , Erfassungsgrenze x_{EG} und Bestimmungsgrenze x_{BG} der Methode.

Parameter	MetHg ($\times 10^{-6} \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	Anorg. Hg ($\times 10^{-6} \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)
s_x	0,30	0,61
x_{NG}	0,95	1,94
x_{EG}	1,90	3,88
x_{BG}	2,85	5,82

Anmerkung: Aus laborinternen Gründen wurden nicht die Normbedingungen mit n=10, sondern abgewandelte Bedingungen mit n=8 zugrunde gelegt. Die ermittelten Parameter gelten dementsprechend für die abgewandelten Bedingungen; sie dürften sich aber nicht massgeblich von den unter Normbedingungen zu erwartenden Werten unterscheiden.

3.2 Überprüfung der Richtigkeit von Untersuchungsergebnissen (Nachweis systematischer Fehler)

3.2.1 Theoretischer Hintergrund

Die am Ausgang der Informationskette erhaltenen Messwerte (Intensitätswerte y_i) der Alkylierungs/GC-CVAFS-Methode müssen in Stoffgrößen (Gehalte x_i) umgeformt werden. Hierzu dient die in Vorversuchen ermittelte Kalibrierfunktion, die in der allgemeinen Form

$$y = b_0 + b_1 x .$$

darstellbar ist. Durch Umformung erhält man die Analysenfunktion, aus der sich der Analytgehalt x_{pred} einer untersuchten Probe mit dem zugehörigen Intensitätswert y_{obs} wie folgt berechnen lässt:

$$x_{pred} = \frac{(y_{obs} - b_0)}{b_1} .$$

Im EURACHEM/CITAC Guide (QUAM, 2000) wird in Kapitel E.3 ausgeführt, dass die Unsicherheit (Ergebnisunsicherheit) $u(x_{pred})$ des Analytgehaltes x_{pred} , welche durch zufällige Schwankungen (Streuungen) der Intensitätswerte y_i der Kalibrierfunktion hervorgerufen wird, durch die nachfolgende Gleichung berechnet werden kann:

$$u(\bar{x}_{pred}) = \frac{s_{y.x}}{b_1} \sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{N} + \frac{(\bar{x}_{pred} - \bar{x}_{cal})^2}{\sum (x_{cal,i} - \bar{x}_{cal})^2}}$$

p entspricht der Anzahl der Messungen der Testprobe unter Wiederholbedingungen, N steht für die Anzahl der verwendeten Kalibrierstandards und $s_{y.x}$ symbolisiert die Reststandardabweichung des linearen Regressionsmodells (der linearen Kalibrierfunktion).

In dieser Gleichung ist der dem Messvorgang vorangehende Prozess der (chemischen) Probenvorbereitung (z.B. Aufschluss einer Anzahl voneinander unabhängiger Stichproben)

nicht berücksichtigt, welcher durch den Standardfehler des Mittelwerts $\frac{s_{rep}}{\sqrt{n}}$ charakterisiert wird (s_{rep} = Stichproben-Standardabweichung der n Einzelwerte, n = Stichprobenumfang). Berücksichtigt man diese Unsicherheitskomponente, so ergibt sich als Gleichung für die kombinierte “**Präzisionsunsicherheit**”:

$$u_{c,prec}(\bar{x}_{pred}) = \sqrt{\frac{s_{rep}^2}{n} + \left(\frac{s_{y.x}}{b_1}\right)^2 \left(\frac{1}{N} + \frac{(\bar{x}_{pred} - \bar{x}_{cal})^2}{\sum (x_{cal,i} - \bar{x}_{cal})^2}\right)}.$$

Der Nachweis **systematischer Fehler** lässt sich mit Hilfe von Wiederfindungs/Recovery-Experimenten führen. Wertvolle Hinweise zu einem praxisorientierten Ansatz finden sich in den “Harmonised Guidelines for the Use of Recovery Information in Analytical Measurement” (IUPAC 1999).

Wiederfindung/Recovery, ausgedrückt als Wiederfindungs/Recovery-Faktor f_r , ist definiert als das Verhältnis von gemessenem (beobachtetem) Analytgehalt \bar{x}_{obs} zu einem Referenzwert x_{ref} :

$$f_r = \frac{\bar{x}_{obs}}{x_{ref}}.$$

Die gemäß

$$T = \frac{|1 - f_r|}{u(f_r)}$$

errechnete Prüfgröße T zeigt an, ob sich der Wiederfindungs-/Recovery –Faktor f_r signifikant von 1 unterscheidet. D.h., der Test erlaubt eine Aussage darüber, ob der Wiederfindungs-/Recovery-Faktor f_r größer ist als die bei seiner Bestimmung ermittelte Ergebnisunsicherheit $u(f_r)$. Für $T > 2$ wird geschlossen, dass mit einer Wahrscheinlichkeit von 95% ($P=0.95$) ein systematischer Fehler (bias) vorliegt.

Zur Ermittlung des Wiederfindungs/Recovery-Faktors f_r und der zugehörigen Unsicherheit $u(f_r)$ sind bei den eigenen Untersuchungen zwei Wege beschriftet worden:

1. durch Untersuchung zertifizierten Referenzmaterials.

Der Wiederfindungs/Recovery-Faktor f_r wird berechnet aus dem gemessenen Analytgehalt $\bar{x}_{q,pred}$ des Referenzmaterials und dessen zertifiziertem Wert x_{CRM} gemäß

$$f_r = \frac{\bar{x}_{q,pred}}{x_{CRM}}.$$

Die Unsicherheit $u(f_r)$ ergibt sich gemäß:

$$u(f_r) = f_r \sqrt{\left(\frac{u_{c,prec}(\bar{x}_{q,pred})}{\bar{x}_{q,pred}} \right)^2 + \left(\frac{u(x_{CRM})}{x_{CRM}} \right)^2};$$

2. durch Zusatzversuche (Spiking-Experimente).

Eine definierte Menge des Analyten (x_{spike}) wird dem zu testenden Probenmaterial zugesetzt, und Originalprobe (ohne Zusatz) und Probe mit Zusatz werden parallel untersucht. Die Differenz der Untersuchungsergebnisse aus Probe mit Zusatz (\bar{x}_{obs}) und Originalprobe (\hat{x}_{native}) ist der wiedergefundene (recovered) Anteil des zugesetzten Analyten, welcher mit der bekannten zugesetzten Menge (x_{spike}) verglichen wird. Der Wiederfindungs/Recovery-Faktor f_r ergibt sich gemäß

$$f_r = \frac{\bar{x}_{obs} - \hat{x}_{native}}{x_{spike}},$$

(Hinweis: Da nur die Differenz $\bar{x}_{obs} - \hat{x}_{native}$ interessiert, ist es nicht erforderlich, dass \hat{x}_{native} den "wahren" Analytgehalt des Probenmaterials repräsentiert).

Nach Barwick and Ellison (1999) errechnet sich die Unsicherheit $u(f_r)$ des aus Zusatzversuchen abgeleiteten Wiederfindungs/Recovery-Faktors $u(f_r)$ wie folgt:

$$u(f_r) = f_r \sqrt{\frac{u(\bar{x}_{obs})^2 + u(\hat{x}_{native})^2}{(\bar{x}_{obs} - \hat{x}_{native})^2} + \left(\frac{u(x_{spike})}{x_{spike}} \right)^2}.$$

Arbeitet man bei Zusatzversuchen nur mit einer definierten Menge des Analyten, die jeweils annähernd gleichen Teilmengen des Probenmaterials zugesetzt wird, so werden die $x_{obs,i}$ -Werte und die zugehörigen (Ergebnis-)Unsicherheiten $u(x_{obs,i})$ jeweils annähernd gleich groß sein. Ferner kann man davon ausgehen, dass die Unsicherheiten der einzelnen

Zusätze $u(x_{spike,i})$ vernachlässigt werden können, da sie signifikant kleiner als $u(x_{obs,i})$ und $u(\hat{x}_{native})$ sind. Man erhält dann nach Barwick und Ellison (1999) eine vereinfachte Gleichung für die Berechnung von $u(f_r)$:

$$u(f_r) = \frac{1}{\bar{x}_{spike}} \sqrt{\frac{\bar{u}(x_{obs,i})^2}{n} + u(\hat{x}_{native})^2} ;$$

$\bar{u}(x_{obs,i})$ ist der arithmetische Mittelwert der den Einzelwerten $x_{obs,i}$ zugehörigen Unsicherheiten, n ist die Anzahl der Zusatzversuche (Anzahl der untersuchten Teilmengen mit Zusatz), \bar{x}_{spike} ist der arithmetische Mittelwert aus den pro Gewichtseinheit zugesetzten Mengen des Analyten.

3.2.2 Praktische Durchführung

Die Ergebnisse der Auswertung von Untersuchungen der zertifizierten Referenzmaterialien NRCC-CRM TORT-2 (Lobster Hepatopancreas Reference Material for Trace Metals), NIST-2976 (Mussel tissue) und BCR CRM 414 (Plankton) sind in den Tabellen 6 bis 9 zusammengefasst. Dargestellt sind folgende Parameter und ihre Berechnungsgrundlagen: Zertifizierter Gehalt x_{CRM} , mit zugehöriger Ergebnisunsicherheit $u(x_{CRM})$, Mittelwert des gemessenen Analytgehaltes $\bar{x}_{q,pred}$ mit zugehöriger Ergebnisunsicherheit $u_{c,prec}(\bar{x}_{q,pred})$, Wiederfindungs/Recovery-Faktor f_r mit zugehöriger Ergebnisunsicherheit $u(f_r)$, die Prüfgröße T .

Tabelle 6: Zusammenstellung der Ergebnisse zur Richtigkeitsüberprüfung der Analytik von Monomethylquecksilber und Gesamt-Quecksilber (gemessen als anorganisches Quecksilber); Untersuchung des zertifizierten Referenzmaterials *NRCC-CRM TORT-2* (*Lobster Hepatopancreas Reference Material for Trace Metals*).

Parameter	Ergebnis
x_{CRM} (TORT-2); MetHg-Anteil	$152,0 \times 10^{-6} \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$
$u(x_{CRM})$	$13,0 \times 10^{-6} \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$
$\bar{x}_{q,pred}$ (TORT-2); n=5; MetHg-Anteil	$125,02 \times 10^{-6} \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$
$u_{c,prec}(\bar{x}_{q,pred}) = \sqrt{\frac{s_{rep}^2}{n} + \left(\frac{s_{y,x}}{b_1}\right)^2 \left(\frac{1}{N} + \frac{(\bar{x}_{q,pred} - \bar{x}_{cal})^2}{\sum (x_{cal,i} - \bar{x}_{cal})^2}\right)}$	$8,47 \times 10^{-6} \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$
$f_r = \frac{\bar{x}_{q,pred}}{x_{CRM}}$	0,823
$u(f_r) = f_r \sqrt{\left(\frac{u_{c,prec}(\bar{x}_{q,pred})}{\bar{x}_{q,pred}}\right)^2 + \left(\frac{u(x_{CRM})}{x_{CRM}}\right)^2}$	0,0898
$T = \frac{ 1 - f_r }{u(f_r)}$	1,97 ; Befund: T<2
x_{CRM} (TORT-2); Gesamt-Hg	$270,0 \times 10^{-6} \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$
$u(x_{CRM})$	$6,0 \times 10^{-6} \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$
$\bar{x}_{q,pred}$ (TORT-2); n=10; Gesamt-Hg, gemessen als anorganisches Quecksilber	$288,2 \times 10^{-6} \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$
$u_{c,prec}(\bar{x}_{q,pred}) = \sqrt{\frac{s_{rep}^2}{n} + \left(\frac{s_{y,x}}{b_1}\right)^2 \left(\frac{1}{N} + \frac{(\bar{x}_{q,pred} - \bar{x}_{cal})^2}{\sum (x_{cal,i} - \bar{x}_{cal})^2}\right)}$	$11,56 \times 10^{-6} \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$
$f_r = \frac{\bar{x}_{q,pred}}{x_{CRM}}$	1,067
$u(f_r) = f_r \sqrt{\left(\frac{u_{c,prec}(\bar{x}_{q,pred})}{\bar{x}_{q,pred}}\right)^2 + \left(\frac{u(x_{CRM})}{x_{CRM}}\right)^2}$	0,0489
$T = \frac{ 1 - f_r }{u(f_r)}$	0,31; Befund: T<2

Tabelle 7: Zusammenstellung der Ergebnisse zur Richtigkeitsüberprüfung der Analytik von anorganischem Quecksilber; Untersuchung des zertifizierten Referenzmaterials *NRCC-CRM TORT-2 (Lobster Hepatopancreas Reference Material for Trace Metals)*.

Parameter	Ergebnis
x_{CRM} (anorg. Hg) (TORT-2)	$118,0 \times 10^{-6} \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ¹⁾
$u(x_{CRM})_{anorgHg}$	$14,3 \times 10^{-6} \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ²⁾
$\bar{x}_{q,pred}$ (TORT-2); n=5; anorg. Hg-Anteil	$123,4 \times 10^{-6} \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$
$u_{c,prec}(\bar{x}_{q,pred}) = \sqrt{\frac{s_{rep}^2}{n} + \left(\frac{s_{y:x}}{b_1}\right)^2 \left(\frac{1}{N} + \frac{(\bar{x}_{q,pred} - \bar{x}_{cal})^2}{\sum (x_{cal,i} - \bar{x}_{cal})^2}\right)}$	$9,08 \times 10^{-6} \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$
$f_r = \frac{\bar{x}_{q,pred}}{x_{CRM}}$	1,046
$u(f_r) = f_r \sqrt{\left(\frac{u_{c,prec}(\bar{x}_{q,pred})}{\bar{x}_{q,pred}}\right)^2 + \left(\frac{u(x_{CRM})}{x_{CRM}}\right)^2}$	0,148
$T = \frac{ 1 - f_r }{u(f_r)}$	0,31; Befund: T<2

¹⁾ Der Gehalt an anorganischem Quecksilber ist **nicht** zertifiziert und wurde aus der Differenz zwischen dem zertifizierten Wert des Gesamtquecksilbergehalts und des Methylquecksilbergehaltes berechnet.

²⁾ Die Ergebnisunsicherheit des Gehaltes an anorganischem Quecksilber wurde aus den Ergebnisunsicherheiten von Gesamt-Hg und MetHg gemäß Fehlerfortpflanzungsgesetz (Summe der Varianzen der Absolutfehler) berechnet.

Tabelle 8: Zusammenstellung der Ergebnisse zur Richtigkeitsüberprüfung der Analytik von Monomethylquecksilber und Gesamt-Quecksilber (gemessen als anorganisches Quecksilber); Untersuchung des zertifizierten Referenzmaterials *NIST-2976 (Mussel tissue)*.

Parameter	Ergebnis
x_{CRM} (NIST-2976); MetHg-Anteil	$27,8 \times 10^{-6} \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$
$u(x_{CRM})$	$0,35 \times 10^{-6} \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$
$\bar{x}_{q,pred}$ (NIST-2976); n=5; MetHg-Anteil	$26,7 \times 10^{-6} \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$
$u_{c,prec}(\bar{x}_{q,pred}) = \sqrt{\frac{s_{rep}^2}{n} + \left(\frac{s_{y,x}}{b_1}\right)^2 \left(\frac{1}{N} + \frac{(\bar{x}_{q,pred} - \bar{x}_{cal})^2}{\sum (x_{cal,i} - \bar{x}_{cal})^2}\right)}$	$0,56 \times 10^{-6} \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$
$f_r = \frac{\bar{x}_{q,pred}}{x_{CRM}}$	0,960
$u(f_r) = f_r \sqrt{\left(\frac{u_{c,prec}(\bar{x}_{q,pred})}{\bar{x}_{q,pred}}\right)^2 + \left(\frac{u(x_{CRM})}{x_{CRM}}\right)^2}$	0,0235
$T = \frac{ 1 - f_r }{u(f_r)}$	1,70 ; Befund: T<2
x_{CRM} (NIST-2976); Gesamt-Hg	$61,0 \times 10^{-6} \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$
$u(x_{CRM})$	$1,29 \times 10^{-6} \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$
$\bar{x}_{q,pred}$ (NIST-2976); n=10; Gesamt-Hg, gemessen als anorganisches Quecksilber	$59,7 \times 10^{-6} \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$
$u_{c,prec}(\bar{x}_{q,pred}) = \sqrt{\frac{s_{rep}^2}{n} + \left(\frac{s_{y,x}}{b_1}\right)^2 \left(\frac{1}{N} + \frac{(\bar{x}_{q,pred} - \bar{x}_{cal})^2}{\sum (x_{cal,i} - \bar{x}_{cal})^2}\right)}$	$1,91 \times 10^{-6} \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$
$f_r = \frac{\bar{x}_{q,pred}}{x_{CRM}}$	0,979
$u(f_r) = f_r \sqrt{\left(\frac{u_{c,prec}(\bar{x}_{q,pred})}{\bar{x}_{q,pred}}\right)^2 + \left(\frac{u(x_{CRM})}{x_{CRM}}\right)^2}$	0,0375
$T = \frac{ 1 - f_r }{u(f_r)}$	0,56; Befund: T<2

Tabelle 9: Zusammenstellung der Ergebnisse zur Richtigkeitsüberprüfung der Analytik von Gesamt-Quecksilber (gemessen als anorganisches Quecksilber); Untersuchung des zertifizierten Referenzmaterials *BCR CRM 414 (Plankton)*

Parameter	Ergebnis
x_{CRM} (CRM 414); Gesamt-Hg	$276,0 \times 10^{-6} \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$
$u(x_{CRM})$	$18,0 \times 10^{-6} \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$
$\bar{x}_{q,pred}$ (CRM 414); n=8; Gesamt-Hg, gemessen als anorganisches Quecksilber	$267,6 \times 10^{-6} \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$
$u_{c,prec}(\bar{x}_{q,pred}) = \sqrt{\frac{s_{rep}^2}{n} + \left(\frac{s_{y,x}}{b_1}\right)^2 \left(\frac{1}{N} + \frac{(\bar{x}_{q,pred} - \bar{x}_{cal})^2}{\sum (x_{cal,i} - \bar{x}_{cal})^2}\right)}$	$27,3 \times 10^{-6} \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$
$f_r = \frac{\bar{x}_{q,pred}}{x_{CRM}}$	0,97
$u(f_r) = f_r \sqrt{\left(\frac{u_{c,prec}(\bar{x}_{q,pred})}{\bar{x}_{q,pred}}\right)^2 + \left(\frac{u(x_{CRM})}{x_{CRM}}\right)^2}$	0,117
$T = \frac{ 1 - f_r }{u(f_r)}$	0,26; Befund: T<2

3.3 Durchführung von Wiederfindungsexperimenten zur Überprüfung der Richtigkeit der Analyse von Monomethylquecksilber

Die nachfolgend durchgeführten Untersuchungen veranschaulichen die Bestimmung des Wiederfindungs-/Korrekturfaktors f_r und der zugehörigen Ergebnis-/Messunsicherheit $u(f_r)$ durch Analyse von Teilproben einer Kabeljauleber, denen definierte Mengen von Monomethylquecksilber zugesetzt wurden. Dazu wurden von einer zuvor homogenisierten Kabeljauleber 8 Teilproben von etwa 1g entnommen und genau gewogen, sodann mit jeweils 130 µl einer Lösung von $500 \times 10^{-9} \text{ g ml}^{-1}$ Monomethylquecksilber in hochreinem Wasser versetzt und anschließend nach der in 4.10 beschriebenen Methode analysiert. Die vorher durchgeführten Untersuchungen der Kabeljauleber ergaben einen Mittelwert des Monomethylquecksilbergehaltes von $85,01 \times 10^{-6} \text{ g kg}^{-1}$ mit einer Ergebnisunsicherheit von $5,14 \times 10^{-6} \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ (n=5 Wiederholanalysen). Diese Werte gehen bei den nachfolgenden Berechnungen als \hat{x}_{native} und $u(\hat{x}_{native})$ ein. Der Schätzwert der Präzision der Methode - ausgedrückt als relative Wiederhol-Standardabweichung eines Einzelwertes wurde mit 0,125 (Zufallsfehler durch Probenvorbehandlung und Kalibrierung berücksichtigt)

veranschlagt und zur Berechnung der nachfolgend aufgelisteten $u(x_{obs,i})$ - Werte verwendet. Über die Ergebnisse der Wiederfindungsversuche geben die nachfolgenden Tabellen 10 und 11 Auskunft.

Tabelle 10: Probenschema zum durchgeführten Wiederfindungsexperiment mit zugehörigem Gewicht der Teilproben, gemessenem Analytgehalt $x_{obs,i}$, und der zugehörigen Ergebnisunsicherheit $u(x_{obs,i})$.

Teilproben-Nr.	Menge der Teilprobe (g)	$x_{obs,i}$ (10^{-6} g kg $^{-1}$)	$u(x_{obs,i})$ (10^{-6} g kg $^{-1}$)
1	1,274	127,5	15,94
2	1,276	106,0	13,25
3	1,260	122,5	15,31
4	1,266	135,4	16,93
5	1,305	138,3	17,29
6	1,250	140,5	17,56
7	1,263	131,1	16,39
8	1,328	105,2	13,15
9	1,333	136,4	17,05

Tabelle 11: Zusammenstellung der Ergebnisse zur Richtigkeitsüberprüfung der Analytik von Monomethylquecksilber durch Wiederfindungs-Experimente. Dargestellt sind folgende Parameter und ihre Berechnungsgrundlagen: Wiederfindungsfaktor f_r mit zugehöriger Ergebnisunsicherheit $u(f_r)$ und die Prüfgröße T .

Parameter	Ergebnis
$f_r = \frac{\bar{x}_{obs} - \hat{x}_{native}}{x_{spike}}$	$\frac{126,99 - 85,01}{50,63} = 0,829$
$u(f_r) = \frac{1}{\bar{x}_{spike}} \sqrt{\frac{\bar{u}(x_{obs,i})^2}{n} + u(\hat{x}_{native})^2}$	$\frac{1}{50,63} \sqrt{\frac{15,87^2}{9} + 5,14^2} = 0,146$
$T = \frac{ 1 - f_r }{u(f_r)}$	$\frac{ 1 - 0,829 }{0,146} = 1,18$; Befund: $T < 2$

Die in den Abschnitten 3.2 und 3.3 wiedergegebenen Ergebnisse zeigen, dass systematische Fehler bei der Bestimmung der Analyte Monomethylquecksilber, anorganisches Quecksilber und Gesamtquecksilber (gemessen als anorganisches Quecksilber) nicht nachgewiesen werden konnten. Die verwendeten Untersuchungsmaterialien entsprachen bezüglich ihrer Matrixbestandteile annähernd den gemäß Aufgabenstellung zu untersuchenden Matrices (Fischgewebe und Zooplankton) mit zu bestimmenden Analytgehalten im $10^{-6} \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ -Bereich. Daraus wird geschlossen, dass die ausgearbeitete Methode für den beabsichtigten Untersuchungszweck geeignet ist (fit for purpose).

3.4 Überprüfung der Leistungsfähigkeit der Methode

3.4.1 Theoretischer Hintergrund

Im folgenden Abschnitt wird geprüft, ob der analytische Fehler der ausgearbeiteten Alkylierungs-GC/CVAFS-Methode klein genug ist, um inhomogene Verteilungen der Analyten innerhalb und zwischen Probenmaterialien erkennen zu können. Dazu werden von l Testmaterialien jeweils b Testproben entnommen, von denen jeweils r Testportionen unter Wiederholbedingungen analysiert werden.

y_{ijk} ist das Ergebnis der k -ten Wiederholanalyse der Testportion j der Testprobe i . Es gilt:

$$\overline{y_{ij}} = \frac{1}{r} \sum_k y_{ijk}; \overline{y}_i = \frac{1}{b} \sum_j \overline{y}_{ij}; \overline{y} = \frac{1}{l} \sum_i \overline{y}_i$$

Tabelle 12 zeigt die prinzipielle Vorgehensweise bei der Varianzanalyse zur Fehlerauflösung bei Wirksamkeit zweier Teilfehler und des analytischen Fehlers (zweifache Varianzanalyse mit Wiederholmessungen).

Tabelle 12: Schema der durchgeführten zweifachen Varianzanalyse mit Wiederholmessungen

Ursache der Streuung	Quadratsumme	Freiheitsgrade	Varianz	Varianzkomponenten
Streuung zwischen den Testmaterialien	$QS_1 = br \sum_i (\bar{y}_i - \bar{y})^2$	$l-1$	$s_1^2 = \frac{QS_1}{l-1}$	$s_3^2 + r s_W^2 + br s_B^2$
Streuung innerhalb der Testmaterialien, zwischen den Testproben	$QS_2 = r \sum_{i,j} (\bar{y}_{ij} - \bar{y}_i)^2$	$l(b-1)$	$s_2^2 = \frac{QS_2}{l(b-1)}$	$s_3^2 + r s_W^2$
Streuung innerhalb der Testproben, zwischen Testportionen	$QS_3 = \sum_{i,j,k} y_{ijk} - \bar{y}_{ij})^2$	$lb(r-1)$	$s_3^2 = \frac{QS_3}{lb(r-1)}$	s_3^2

Die Varianzkomponenten errechnen sich gemäß $s_3^2 = \frac{QS_3}{lb(r-1)}$, $s_W^2 = \frac{s_2^2 - s_3^2}{r}$, $s_B^2 = \frac{s_1^2 - s_2^2}{br}$.

Bei der Auswertung der Daten der nachfolgend beschriebenen Untersuchungen wurde eine robuste Varianzanalyse nach Maßgabe des Analytical Methods Committee (AMC 1989a und b) durchgeführt, um deren Abweichungen von der Normalverteilung zu kompensieren.

3.4.2 Praktische Durchführung

Folgendes Probenschema liegt den Untersuchungen mit der Alkylierungs-GC/CVAFS-Methode mit nachfolgender Varianzanalyse zugrunde:

Testmaterialien: Lebern von Fischen (Kabeljau, <i>Gadus morhua</i>);
Testproben: Jeweils zwei gleiche Teile (Index A und B) pro Testmaterial ;
Testportionen: Jeweils zwei Portionen (Index a + b) pro Testprobe .

Die Analysenergebnisse sind in den Tabelle 13 und 14 zusammengestellt.

Tabelle 13: Monomethylquecksilbergehalte (jeweils ausgedrückt als $\times 10^{-6} \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \text{Hg}$ pro Leberfrischgewicht) von 12 Kabeljaulebern, die in zwei Teile A und B geteilt wurden. Von diesen Teilen A und B wurden jeweils zwei Analysen unter Wiederholbedingungen der Testportionen a und b durchgeführt.

Testmaterial	Ergebnis der Wiederholanalysen der Testportionen (a und b) der Testproben (A und B)			
	A		B	
Nr.	a	b	a	b
1	3,8	4,1	4,2	4,3
2	4,4	5,4	4,5	4,7
3	5,8	5,7	6,0	6,6
4	6,0	5,8	5,6	5,1
5	5,1	4,9	5,4	5,4
6	3,1	2,9	6,0	5,7
7	8,1	6,7	6,8	6,5
8	5,4	4,9	4,7	4,6
9	3,1	3,0	4,0	3,5
10	10,8	8,6	7,6	8,3
11	4,1	3,9	5,3	5,1
12	3,3	3,2	3,4	3,5

Tabelle 14: Gehalte für **anorganisches Quecksilber** (jeweils ausgedrückt als $\times 10^{-6} \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \text{Hg}$ pro Leberfrischgewicht) von 12 Kabeljaulebern, die in zwei Teile A und B geteilt wurden. Von diesen Teilen A und B wurden jeweils zwei Analysen unter Wiederholbedingungen der Testportionen a und b durchgeführt.

Testmaterial	Ergebnis der Wiederholanalysen der Testportionen (a und b) der Testproben (A und B)			
	A		B	
Nr.	a	b	a	b
1	5,2	5,5	4,2	3,9
2	7,3	8,0	6,0	6,8
3	6,2	5,9	4,6	5,4
4	11,0	11,2	12,2	11,9
5	14,1	16,1	9,5	9,8
6	6,1	6,3	9,6	9,9
7	10,4	9,9	11,9	11,5
8	6,4	5,7	4,7	5,0
9	5,9	5,5	6,6	7,3
10	9,4	10,3	5,6	5,7
11	3,2	3,2	4,4	5,0
12	5,0	5,2	5,1	5,3

Die durch robuste Varianzanalyse ermittelten Werte für die Varianzkomponenten s_3^2 , s_W^2 und s_B^2 sind in Tabelle 15 zusammengestellt.

Tabelle 15: Ergebnisse der robusten Varianzanalyse sowie der prozentuale Anteil der einzelnen Varianzkomponenten, σ^2_3 , σ^2_B und σ^2_W an der Summe $(\sigma^2_3 + \sigma^2_B + \sigma^2_W)$ der untersuchten Varianzkomponenten.

Analyt	s^2_3	s^2_B	s^2_W	Anteil [%] von s^2_3 an $(s^2_3 + s^2_B + s^2_W)$	Anteil [%] von s^2_B an $(s^2_3 + s^2_B + s^2_W)$	Anteil [%] von s^2_W an $(s^2_3 + s^2_B + s^2_W)$
Monomethylquecksilber	0.087	1.774	0.342	4 %	80 %	16 %
Anorganisches Quecksilber	0.158	8.722	2.418	1,4 %	77,2 %	21,4 %

Die robuste Varianzanalyse zeigt, dass die durch die Unterschiede im Analytgehalt zwischen den Testmaterialien hervorgerufene Varianzkomponente s^2_B die grösste der drei untersuchten Varianzkomponenten ist. Die dem analytischen Fehler zugeordnete Varianzkomponente s^2_3 macht im vorgestellten Beispiel nur etwa 4% (Monomethylquecksilber) bzw. 1,4% (anorg. Quecksilber) der Summe aller drei Varianzkomponenten $(s^2_3 + s^2_B + s^2_W)$ aus, so dass die Unterschiede im Analytgehalt zwischen den Lebern und innerhalb der Lebern einzelner Fische sicher erkannt werden können.

3.5 Zusammenfassung/Schlussfolgerungen

Quecksilberverbindungen sind ubiquitär in der Umwelt verteilt. Quecksilber unterliegt, besonders in der Meeresumwelt, zahlreichen biochemischen und geochemischen Umsetzungen. Der wichtigste dabei ablaufende Prozess ist die Methylierung vom anorganischen zum organischen Quecksilber, vor allem zum Monomethylquecksilber. Monomethylquecksilber wird in der marinen Nahrungskette stark angereichert und führt zu hohen Belastungen der Meerestiere mit Methylquecksilber auf hoher trophischer Ebene. Aufgrund der sehr hohen Toxizität von organischen Quecksilberverbindungen ist es nötig, die Routineuntersuchungen von Fischen und anderen Meerestieren zum Gesamtquecksilbergehalt, um die sog. Speziationsanalytik zu erweitern. Die Speziationsanalytik lässt die Unterscheidung von anorganischen und organischen Quecksilberverbindungen zu.

Ziel dieser Arbeit war die Ausarbeitung und Validierung einer Methode zur Bestimmung von organischen Quecksilberverbindungen in Fischgewebe und Zooplankton.

Bei der Konzeption des entwickelten Analysensystems wurde Wert darauf gelegt, dass verhältnismäßig einfache Bauteile zum Einsatz kamen. So sollte es für andere Labore möglich sein, den apparativen Aufbau nachzuvollziehen.

Wegen der hohen Leistungsfähigkeit wurde eine gaschromatographische Trennung mit einer selbstgepackten Säule von 75 cm Länge und 4 mm ID, gefüllt mit dem Säulenmaterial 15% OV3 on DMCS WAW, eingesetzt. Als Trägergas wird Helium 5.0 mit einer Flussgeschwindigkeit von 40 ml/min verwendet.

Als Detektor kommt ein Kaltdampf-Atomfluoreszenzdetektor (CVAFS) zu Einsatz, der sich durch hohe Spezifität für Quecksilber auszeichnet.

Die Extraktion der Quecksilberverbindungen aus der Probenmatrix erfolgt durch Behandlung mit Tetramethylammoniumhydroxidlösung und anschließender Derivatisierung mit Natriumtetraethylborat bei einem pH-Wert von 4,75 (Natriumacetat/Essigsäurepuffer).

Besonders fettreiche Proben (>10% Fett) werden vor der Extraktion entfettet. Die ethylierten Quecksilberspezies lassen sich mit Hilfe eines Argon 5.0-Gasstromes aus der Probenaufschlusslösung austreiben und auf dem Adsorbens Tenax-TA[®] anreichern. Durch Aufheizen des Tenax-TA[®] erfolgt die Probenaufgabe in den isothermisch arbeitenden Gaschromatographen. Nach der Trennung der derivatisierten Quecksilberspezies erfolgt dann eine Pyrolyse in einem elektrisch beheizten Quarzrohr. Durch die Pyrolyse werden die Quecksilberderivate zu Hg⁰ reduziert und mit Hilfe des AFS-Detektors detektiert.

Durch die entwickelte Messanordnung wurden Nachweisgrenzen von $0,95 \times 10^{-6} \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ für Methylquecksilber und $1,94 \times 10^{-6} \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ für anorganisches Quecksilber erreicht.

Die Untersuchung der zertifizierten Referenzmaterialien CRM TORT-2 (Hummer Hepatopankreas), NIST-2976 (Muschelfleisch) und BCR CRM 414 (Plankton) zeigte gute Übereinstimmung der Messergebnisse mit den zertifizierten Werten.

Die Validierung der Methode in Anlehnung an die EURACHEM-Richtlinien (EURACHEM 1998, QUAM 2000) machte deutlich, dass die entwickelte Methode für den beabsichtigten Zweck geeignet ist und die erforderlichen Qualitätskriterien erfüllt.

4. SOP: Arbeitsanleitung, Zusammenbau der Apparatur

Anmerkung: Aus praktischen Gründen werden nachfolgend und abweichend von den bisherigen Textpassagen laborübliche Stoffmengenangaben (z.B. μg statt 10^{-6}g) verwendet.

Untersuchung von Zooplankton und Fischgewebe

Gaschromatographische Bestimmungsmethode von Hg^{2+} und Methylquecksilber

4.1 Zweck und Anwendungsbereich

Diese Methode beschreibt ein Verfahren zur simultanen Bestimmung von anorganischem Quecksilber und Monomethylquecksilber in Fischgewebe und Zooplankton.

Einleitung

Das Schwermetall Quecksilber und seine Verbindungen gehören zu den stärksten Giften in der Umwelt. Von besonderem Interesse ist dabei die Meeresumwelt, da Quecksilber dort zahlreichen chemischen und bio-geochemischen Umsetzungen unterliegt. In der Meeresumwelt kommt Quecksilber in unterschiedlichen Spezies vor. Diese sind die elementare Form (Hg^0), das anorganische Quecksilber (Hg^{2+}) und die quecksilberorganischen Verbindungen Monomethylquecksilber (CH_3Hg^+) und Dimethylquecksilber (CH_3HgCH_3).

Im Vergleich zum anorganischen Quecksilber wird Monomethylquecksilber von biologischen Systemen leichter aufgenommen und stärker angereichert und weist zudem eine hohe Neurotoxizität auf. Deshalb ist die Kenntnis über den genauen Gehalt bzw. die Verteilung der Quecksilberspezies in der marinen Nahrungskette von großer Wichtigkeit.

Begriff

Unter dem Gehalt an Methylquecksilber und Quecksilber wird der nach diesem Verfahren bestimmte Gehalt an Monomethylquecksilber-Kation und Quecksilber(II)⁺ verstanden. Er wird in μgkg^{-1} angegeben. Als Standardsubstanz wird Monomethylquecksilberchlorid verwendet.

Name: Monomethylquecksilberchlorid

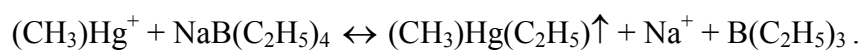
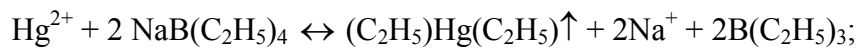
CAS-Nr: [115-09-3]

Name: Quecksilber(II)-Kation: Hg^{2+}

Kurzbeschreibung des Verfahrens

Das gefriergetrocknete und mit einem Mörser fein zerstoßene Untersuchungsmaterial wird in 25%iger Tetramethylammoniumhydroxidlösung (TMAH) bei Zimmertemperatur vollständig aufgelöst. Ein Teil dieser Aufschlusslösung wird in einer Gaswaschflasche mit Natriumacetatpuffer und bidest. Wasser versetzt.

Anschließend werden die enthaltenen Quecksilberverbindungen mit Natriumtetraethylborat (STEB) zu gasförmigen Verbindungen umgesetzt. Folgende Reaktionen laufen dabei ab:



Mit Hilfe eines Argon-Gasstroms werden die gasförmigen Quecksilberverbindungen aus der Lösung ausgetrieben und auf einem Adsorptionsröhrchen mit Tenax-TA[®] gesammelt. Durch Aufheizen des Adsorptionsröhrchens werden die gesammelten Verbindungen desorbiert und anschließend gaschromatographisch getrennt. Die Detektion erfolgt mittels Kaltdampf-Atomabsorptionsspektrometer (CVAAS) oder Atomfluoreszenzspektrometer (CVAFS) nach vorheriger Pyrolyse der Hg-Derivate zu Hg⁰. Bei der CVAFS dient das Fluoreszenzsignal der Quecksilberlinie bei 253,7 nm als Maß der Quecksilberkonzentration in der Küvette.

4.2 Chemikalien

Allgemeine Hinweise

Alle Reagenzien müssen in dicht verschlossenen Behältern und im Dunkeln aufbewahrt werden, um Kontamination und Zersetzungen zu vermeiden.

Tabelle 16: Verwendete Chemikalien

<u>Nummer</u>	<u>Substanz</u>	<u>Hersteller</u>	<u>R-Sätze</u>	<u>S-Sätze</u>	<u>CAS- Nummer</u>	<u>Gefahren -symbol</u>	<u>Qualität</u>
4.1.1	Monomethylquecksilberchlorid	Aldrich			115-09-3	T+	p.A.
4.1.2	Quecksilbernitrat-Stammlösung		34	26- 36/37/3 9-45		C	
4.1.3	Natriumacetat	Merck	-	-	127-09-3	C,	Suprapur
4.1.4	Tetramethylammoniumhydroxid Lösung 25%	Merck	25-34- 52/53	26- 36/37/3 9-45-61		T	Zur Synthese oder besser
4.1.5	Natriumtetraethylborat	Galab	-	-	15523-24- 7		mind. 99,8%
4.1.6	Essigsäure 100% (Eisessig)	Merck	10-35	23.2-26- 45	64-19-7	C	Suprapur
4.1.7	1,1,1,3,3,3 Hexamethyldisilazan	Merck	11- 20/21/2 2-34	16- 36/37/3 9-45	999-97-3	F, C	Zur Synthese
4.1.8	Helium 5.0	Messer- Griesheim					5.0
4.1.9	Argon 4.8	Messer - Griesheim					4.8
4.1.10	Wasser (Reinstwasser)				7732-18-5		>18,2 MΩm, frei von Hg
4.1.11	2-Propanol	Merck	11-36- 67	7-16- 24/25- 26	67-63-0	F, Xi	p.A.
4.1.12	Cyclohexan	Merck	11-38- 50/53- 65-67	9-16- 33-60- 61-62		F, Xn, N	p.A.

Warnhinweise:

Bei den verwendeten Chemikalien handelt es sich z.T. um außerordentlich starke Gifte. Beim Umgang mit Methylquecksilberchlorid sind besondere Sicherheitsmaßnahmen erforderlich. Dazu gehören spezielle Schutzhandschuhe des Types „Silver-Shield“. Unter diesen Handschuhen ist zusätzlich ein Nitrilhandschuh zu tragen. Außerdem wird empfohlen beim Herstellen von Standards eine Staubschutzmaske zu tragen.

Kontaminierte Gerätschaften müssen sofort nach der Kontamination sehr sorgfältig mit Aceton und anschließend mit Wasser gereinigt werden.

4.3 Lösungen

4.3.1 Methylquecksilberchlorid (MetHgCl) zur Analyse, Molekulargewicht 251,078 g/mol

Methylquecksilberchlorid-Stammlösung, $\text{MetHgCl} = 1 \text{ g l}^{-1}$

10 mg Methylquecksilberchlorid werden auf 0,1 mg genau in einen 10 ml Messkolben eingewogen, in ca. 5 ml 2-Propanol (4.1.11) gelöst und anschließend mit 2-Propanol zur Marke aufgefüllt.

4.3.1.1 Verdünnte Methylquecksilberchlorid-Stammlösung, $\text{MetHgCl} = 1 \text{ mg l}^{-1}$

50 μl Methylquecksilberchlorid-Stammlösung werden in einen 50 ml Messkolben gegeben und mit bidest. Wasser bis zur Marke aufgefüllt.

4.3.2 Quecksilber-Stammlösung, $\text{Hg} = 1 \text{ g l}^{-1}$ (handelsübliche Standardlösung für die Atomabsorptionsspektrometrie).

4.3.2.1 Verdünnte Quecksilber-Stammlösung, $\text{Hg} = 1 \text{ mg l}^{-1}$,

50 μl Quecksilber-Stammlösung werden in einen 50 ml Messkolben pipettiert und mit bidest. Wasser bis zur Marke aufgefüllt..

4.3.3 Standardmix aus verdünnter Methylquecksilberchlorid-Stammlösung (4.3.1.1) und verdünnter Quecksilber-Stammlösung (4.3.2.1)

$\text{MetHgCl} = 10 \text{ ng ml}^{-1}$; $\text{Hg} = 10 \text{ ng ml}^{-1}$

100 μl verdünnte Methylquecksilberchlorid-Stammlösung (4.3.1.1) und 100 μl verdünnte Quecksilberchlorid-Stammlösung (4.3.2.1) werden in einem 10 ml Messkolben genau auf 10 ml mit bidest. Wasser aufgefüllt.

Anmerkung zur Stabilität von verdünnten Quecksilberlösungen:

Quecksilber- und Methylquecksilberlösungen sind nur begrenzt lagerfähig. Daher ist die Quecksilber-Stammlösung mindestens in jährlichen Intervallen zu erneuern (Vorratsgefäß mit Datum versehen!), die verdünnte Quecksilber-Stammlösung monatlich zu erneuern und die Quecksilber-Kalibrierlösungen täglich frisch herzustellen.

4.3.4 Essigsäure/Acetatpuffer, $c = 2 \text{ mol l}^{-1}$

164,04 g Natriumacetat wasserfrei (4.1.3), und 120,1 g Essigsäure 100% (4.1.6) werden in einem 1-Liter Messkolben zuerst in ca. 400 ml bidest. Wasser gelöst und anschließend mit bidest. Wasser bis zur Marke aufgefüllt.

4.3.5 Natriumtetraethylborat, Molekulargewicht 150,05 g/mol

Natriumtetraethylboratlösung $c = 0,222 \text{ mol l}^{-1}$

1 g Natriumtetraethylborat wird in einem 100 ml Becherglas in 30 ml bidest.

Wasser gelöst. Anschließend werden Portionen von 5 ml der

Natriumtetraethylboratlösung in 10 ml Quarzreagenzgläser pipettiert, verschlossen und bei mindestens -15°C eingefroren.

Anmerkung zur Stabilität der Natriumtetraethylboratlösung:

Es ist zu beachten, dass Natriumtetraethylborat durch den Kontakt mit Sauerstoff sehr schnell zersetzt wird. Es ist daher wichtig, nach dem Öffnen des Natriumtetraethylboratgefäßes schnell zu arbeiten und die hergestellte Lösung sofort zu portionieren und bis zur Verwendung einzufrieren. Bei -20°C eingefrorene STEB-Lösungen sind 10 Wochen haltbar. Nach dem Auftauen müssen diese vor der Verwendung sorgfältig geschüttelt werden.

Aufgetaute oder frisch angesetzte Lösungen, die nicht innerhalb von einem Tag verbraucht werden, können mit viel Wasser im Abfluss entsorgt werden.

4.4 Geräte und Hilfsmittel

Die Numerierungen der einzelnen Geräte findet sich in Abbildung 5 wieder.

5.1 Helium 5.0 Druckgasflasche mit Reduzierventil für einen Betriebsdruck von $p = 4.0 \text{ bar}$

5.2 Argon 4.8 Druckgasflasche mit Reduzierventil für einen Betriebsdruck von $p = 2.0 \text{ bar}$

5.3 4x Magnetventil „Fa.Bürckert“ Modell 0127 2-Wege

5.4 1x Magnetventil „Fa.Bürckert“ Modell 0127 3-Wege

5.5 Gaschromatograph HP 5890 Serie I, Isotherm 85°C

5.6 GC-Säule selbstgepackt, Duranglas, AD 6 mm, ID 4 mm, Länge 75 cm, U-Form gefüllt mit 15% OV3 auf DMCS WAW 60/80

5.7 Pyrolyse-Quarzrohr AD 6 mm, ID 4 mm, Länge 150 mm

5.8 Adsorptionsröhrchen, Duranglas, Länge 10 cm, AD 6 mm, ID 4 mm gefüllt mit 50 mg Tenax-TA[®]

5.9 Nickel/Chrom Widerstandsdraht 60 cm, $\varnothing 0,5 \text{ mm}$

- 5.10 Oxisorb® Gasreinigungssystem
- 5.11 PC mit Kontron Integration Pack 3.0® bzw. Notebook mit LabView ®-basierter Auswertesoftware
- 5.12 Gaswaschflasche aus PTFE 200 ml
- 5.13 Analysenwaage mit Genauigkeit 0,1 mg
- 5.14 PTFE-Schlauch AD 2 mm, ID 1 mm, ca. 5 m
- 5.15 Magnetrührer mit Magnetstab, teflonbeschichtet
- 5.16 Perkin Elmer FIMS-Fließinjektionssystem mit Software zum Steuern der Magnetventile (nicht in der Abbildung 5 enthalten)
- 5.17 Labornetzgerät 16A 32V (besser 25A, 32V)
- 5.18 Labornetzgerät 3,2A 32V
- 5.19 Zeitschaltuhr für 220V regulierbar zwischen 10-120 Sekunden mit Netzteil
- 5.20 Gasdurchflussmessgerät 1-1000 ml/min
- 5.21 CVAFS Detektor II Fa. Brooks Rand
- 5.22 Mikrodosierpipetten für 10-100 µl, 200-1000 µl, 1000-5000 µl
- 5.23 Schnellverbindungsstücke Fa. Supelco („Quick Connector“)
- 5.24 2x Glasrohr Duranglas, AD 6 mm, ID 4 mm, Länge ca. 100 mm gefüllt mit Gold/Platinnetz
- 5.25 Nadelventil zur Druckfeinregulierung
- 5.26 Dreiwegehahn aus Teflon mit 2 mm-Anschlüssen
- 5.27 Trockenschrank
- 5.28 Bunsenbrenner
- 5.29 Thermometer, Messbereich 0-1150°C
- 5.30 1 Liter-, 50 ml-, 10 ml-Messkolben
- 5.31 100 ml Becherglas
- 5.32 Quarzreagenzgläser 10 ml
- 5.33 Zeitstoppuhr
- 5.34 Zentrifuge
- 5.35 Zentrifugengläser aus Quarz
- 5.36 Gefriertrocknung

4.5 Anleitungen und Betriebsanweisung zum Zusammenbau der Komponenten

Allgemeine Hinweise

Der Zusammenbau der Komponenten erfordert große Sorgfalt und Sauberkeit beim Arbeiten. Die Komponenten müssen genau nach folgendem Schaubild zusammengesetzt und nach den folgenden Beschreibungen installiert werden.

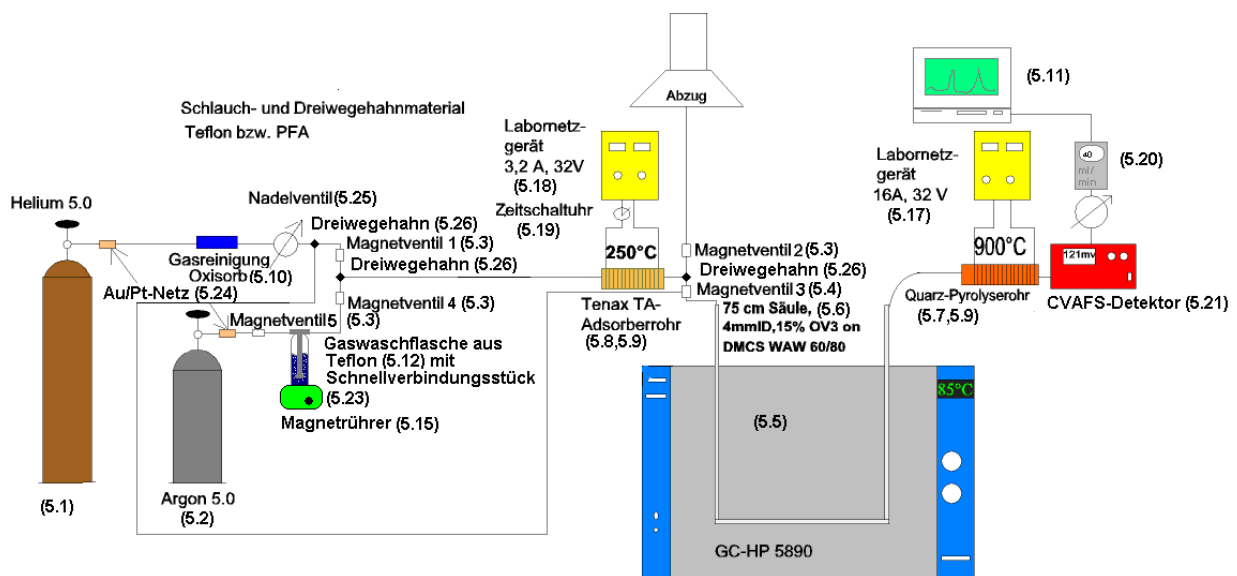


Abbildung 5: Schematischer Aufbau der Apparatur zur simultanen gaschromatographischen Bestimmung von Hg^{2+} und Methylquecksilber.

Anschluss von Gasflaschen, Druckminderer, Durchflussmessgerät, Feinregulierventil, Schläuchen, „Quecksilberfalle“, CVAFS-Detektor, Gaswaschflasche und Magnetventilen

Zuerst werden die Argon- und Heliumdruckgasflaschen (5.1 und 5.2) mit einem passenden Druckminderer für Reinstgase versehen. Anschließend werden Teflonschläuche (6 mm AD) an die Niederdruckseite der Druckminderer angeschlossen. In beide Gasleitungen wird dann eine Quecksilberfalle eingesetzt, die aus einem Glasrohr (6 mm AD, 4 mm ID) gefüllt mit einem Gold/Platinnetz (5.24) besteht.

Zusätzlich wird bei der Heliumanlage ein Nadelventil (5.25) und eine Gasreinigungsanlage (Oxisorb-Kartusche) zur Entfernung von Sauerstoffspuren (5.10) montiert. Zur Montage der Oxisorb-Gasreinigung muss die Bedienungsanleitung des Herstellers genau beachtet

werden. Hinter der Gasreinigung wird bei der Heliumgasversorgung statt eines 6 mm-Teflonschlauches ein dünnerer Teflonschlauch (5.14) (2 mm AD, 1 mm ID) verwendet. Mit Hilfe eines Dreiwegehahns (5.26) wird nun der Heliumgasstrom geteilt. Der kürzere Weg führt zu Magnetventil 1 (5.3), das ein Zweiwegemagnetventil ist. Der zweite lange Weg führt zu Magnetventil 3. Dieses ist ein Dreiwegemagnetventil (5.4). Zum Anschluss der Magnetventil-Steuerung siehe 4.9 *Steuerung der Magnetventile*.

Hinter Magnetventil 1 (5.3) wird ein Dreiwegehahn (5.26) angeschlossen. Von diesem führt ein Weg zu Magnetventil 4 (5.3), der andere wird an das Tenax-TA[®]-Adsorptionsröhrchen (5.8) angeschlossen. Siehe dazu 4.6.

Hinter dem Tenax-TA[®]-Adsorptionsröhrchen (5.8) wird erneut ein Dreiwegehahn angeschlossen der zum einen zum Magnetventil 2 führt, zum anderen zu Magnetventil 3. Hinter dem Magnetventil 2 wird ein Schlauch angeschlossen, der in einem Abzug endet. Magnetventil 3 ist ein Dreiwegemagnetventil (5.4), an das dann die Gaschromatographiesäule (5.6) angeschlossen ist. Zur Herstellung und Installation der Gaschromatographiesäule siehe 4.7.

Hinter der Gaschromatographiesäule (5.6) wird die Pyrolyseeinheit installiert. Dabei muss darauf geachtet werden, dass sich keine brennbaren Stoffe in der direkten Umgebung oder über der Pyrolyseeinheit befinden. Dazu sollte ein Sicherheitsabstand von ca. 50 cm zu Kabeln, Schläuchen, Apparaturen etc. eingehalten werden. Es wird empfohlen, die Pyrolysezelle direkt über dem Aluminiumblech (auf der Oberseite) des Gaschromatographen zu platzieren.

Zur Herstellung und Installation der Pyrolyseeinheit siehe 4.8.

An den Ausgang der Pyrolyseeinheit wird der CVAFS Detektor (5.21)-Eingang angeschlossen. An den Ausgang des CVAFS wird das Durchflussmessgerät (5.20) montiert. Die Ausgabe des Detektorsignals erfolgt über eine BNC-Steckverbindung. Zum Anschluss des Detektors an einen PC oder einen Integrator siehe 4.9.

Hinter die Quecksilberfalle der Argongasversorgung wird Magnetventil 5 (5.3) montiert. Mit Hilfe von zwei Schnellverbindungen (5.23) wird daran die Gaswaschflasche (5.12) installiert. Der Ausgang der Gaswaschflasche (5.12) führt zu Magnetventil 4.

4.6 Herstellung und Anschluss der Tenax-TA[®] Adsorptions-/Desorptionseinheit

Ein etwa 10 cm langes Duran-Glasrohr wird vor dem Füllen mit ca. 10 ml 1,1,1,3,3,3 Hexamethyldisilazan (4.1.7) gespült und im Trockenschrank getrocknet. Anschließend wird in eine Seite des Röhrchens silanisierte Glaswolle eingebracht und ca. 3 cm eingeschoben. Dann werden von der anderen Seite 50 mg Tenax-TA[®] 60/80 oder 80/100 eingefüllt. Anschließend wird auch von dieser Seite das Röhrchen mit silanisierter Glaswolle verschlossen. Abbildung 6 zeigt das fertige Adsorptionsröhrchen. Es wird empfohlen in einem Arbeitsgang mehrere Adsorptionsröhrchen herzustellen.

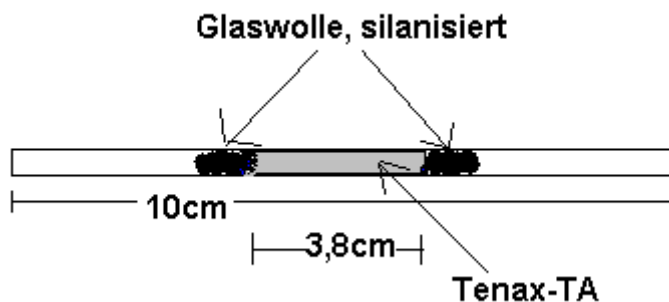


Abbildung 6: Aufbau Tenax-TA[®]-Adsorptionsröhrchen

Das fertige Tenax-TA[®]-Röhrchen wird nun auf der Länge der Tenax-Füllung mit Nickel/Chromwiderstandsdraht umwickelt. Dann wird mit Hilfe der Zeitschaltuhr und durch Variation des Stroms bzw. der Stromstärke die Adsorptions-/Desorptionseinheit so eingestellt, dass das Tenax-Röhrchen innerhalb von ca. 45-50 Sekunden auf eine Temperatur von $T=250^{\circ}\text{C}$ aufgeheizt wird.

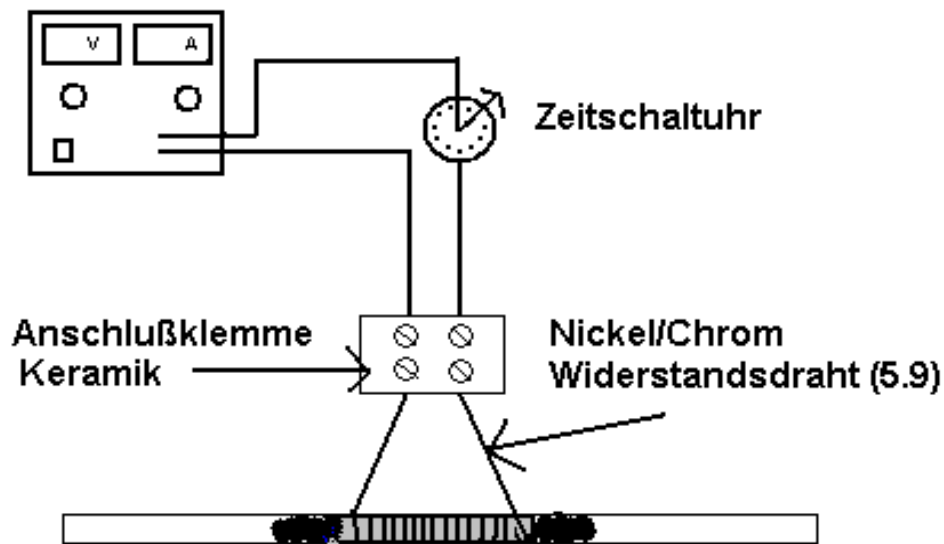


Abbildung 7: Aufbau der Adsorptions-/Desorptionseinheit mit Zeitschaltuhr

4.7 Herstellung und Installation der Gaschromatographiesäule

Die Gaschromatographiesäule (5.6) wird aus einem 85 cm langen Duran-Glasrohr (AD 6 mm, ID 4 mm) selbst hergestellt. Dazu wird das Glasrohr entsprechend der Dimensionen des Gaschromatographen mit einem Bunsenbrenner oder Glasbläserbrenner so stark erhitzt, dass es entsprechend den Anforderungen geformt werden kann.

Als praktikabel erwies sich eine U-Form entsprechend Abbildung 8 für den Gaschromatographen HP-5890 (5.5). Nach dem Abkühlen wird die gesamte Säule mit ca. 15 ml 1,1,1,3,3,3 Hexamethyldisilazan (4.1.7) gespült und im Trockenschrank getrocknet. Danach wird eine Seite der Säule mit silanisierter Glaswolle verschlossen und an eine Wasserstrahlpumpe mit einem Vakuumschlauch angeschlossen. Anschließend wird das Säulenmaterial 15% OV3 on DMCS WAW 60/80 durch vorsichtiges Einsaugen in die Säule eingebracht. Ständiges vorsichtiges Klopfen sorgt dafür, dass die Säulenpackung dicht erfolgt. Dann wird die offene Seite der Säule ebenfalls mit silanisierter Glaswolle verschlossen.

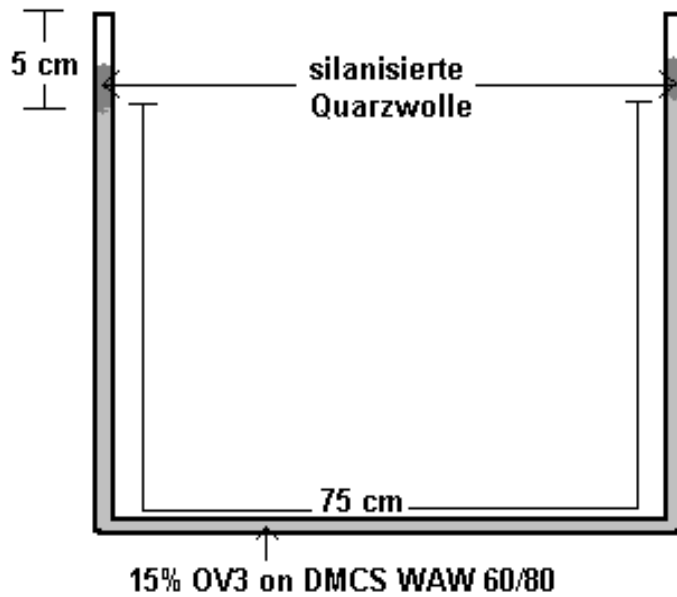


Abbildung 8: Gaschromatographische Trennsäule – Schematische Darstellung

Die Gaschromatographiesäule wird anschließend in einen Gaschromatographen so eingebaut, dass sich die gesamte Füllung innerhalb des Ofens befindet. Der Gaschromatograph wird auf eine Temperatur von 85°C (isotherm) eingestellt. Es wird empfohlen den Gaschromatographen auch über Nacht nicht auszuschalten.

4.8 Herstellung und Installation der Pyrolyseeinheit

Zur Herstellung der Pyrolyseeinheit werden ein Quarzrohr (AD 6 mm, ID 4 mm) von etwa 15-20 cm, ein Gold/Platinnetz, ein sehr leistungsstarkes Labornetzteil (mind. 16A 32V) und ein Nickel/Chromwiderstandsdraht benötigt.

Die Temperatur bei der Pyrolyse beträgt ca. 1150°C.

Zur Installation wird zuerst das Gold/Platinnetz in die Mitte des Quarzrohres eingebracht.

Um die Mitte des Quarzrohres wird ca. 40 cm Nickel/Chromdraht auf einer Länge von etwa 3,5 cm dicht gewickelt. An diesen Draht wird das Labornetzteil angeschlossen.

Abbildung 9 zeigt die vollständige Pyrolyseeinheit.

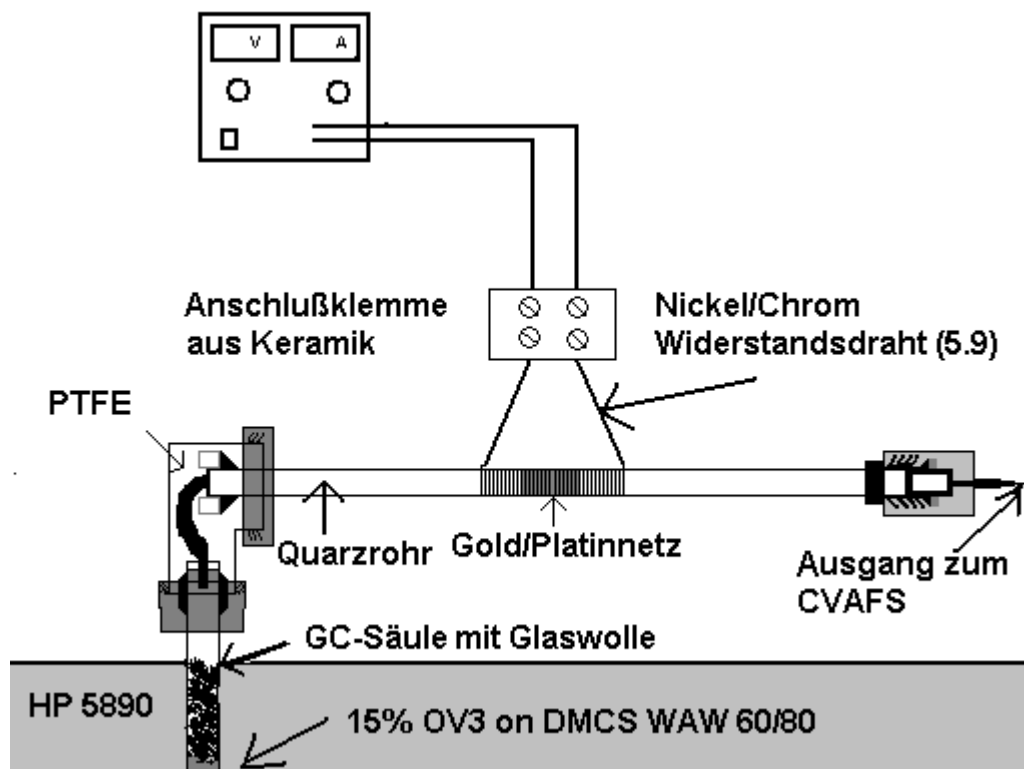


Abbildung 9: Pyrolyseeinheit

Die Schlauchverbindungen zum Quarzrohr müssen aus thermisch stabilem PTFE bestehen und mit Aluminiumfolie umwickelt werden. Das Quarzrohr sollte gut gesichert sein, da der Widerstandsdraht beim Betrieb sehr weich wird und das Gewicht des Röhrchens nicht alleine tragen kann. Deshalb wird empfohlen, an den Ausgang der GC-Säule ein Verbindungsstück in L-Form (90°Winkel, siehe Abb.9) anzuschließen.

Der Anschluss des Nickel/Chromdrahtes an das Netzgerät erfolgt mit Kupferkabeln von mindestens 1 mm Ø. Die Verbindung muss aufgrund der hohen Arbeitstemperatur mit einer Keramikklammer erfolgen.

Während des Betriebes muss die Temperatur des Quarzrohres 1150°C betragen. Die Temperatur muss mit einem geeigneten Thermometer überprüft werden.

4.9 Anschluss des Detektors an einen PC oder einen Integrator

Das Ausgangssignal des Detektors reicht von 0-7000 mV. Eine einfache mögliche Aufzeichnungsmethode ist der Anschluss eines geeigneten Integrators oder X/Y-Schreibers an den Detektor.

Eine weitere Möglichkeit besteht in der Installation einer Digital/Analog-Wandlerkarte in einen PC mit entsprechender Software zum Aufzeichnen und Auswerten der Mess-Signale. In diesem Fall wird die Kontron Integration Software 3.0 mit entsprechender A/D-Karte der Fa. Kontron empfohlen.

Steuerung der Magnetventile

Die Steuerung der Magnetventile wird durch eine Relaisschaltung ermöglicht. Eine solche Steuerung ist bereits in der FIMS-Software für die Amalgamierungsmethode vorgesehen und deshalb leicht zu integrieren. An die RS232-Schnittstelle der FIMS (Flow Injection Mercury System) werden die Magnetventile mit Hilfe einer Relaisschaltung angeschlossen und können so bequem über einen PC gesteuert werden. Die Stromversorgung wird durch ein einfaches 12V-Netzteil sichergestellt. Die Anordnung der Magnetventile erlaubt zwei Stellungen:

Tabelle 17: Magnetventil-Stellungen zur Steuerung der „Purge-and-Trap- und Gaschromatographie-Position“

	Magnetventil 1	Magnetventil 2	Magnetventil 3	Magnetventil 4	Magnetventil 5
1. Purge and Trap- Position	geschlossen	offen	geschlossen	offen	offen
2. Gaschromatographie- Position	offen	geschlossen	offen	geschlossen	geschlossen

Beim Umschalten von Position 1 auf Position 2 muss die Teflongaswaschflasche entfernt sein.

Einrichten und Inbetriebnahme der Apparatur

Zum Einrichten und zur Inbetriebnahme der Apparatur müssen zunächst die Gasflüsse überprüft und wenn nötig korrigiert werden. Außerdem muss mit Hilfe von Seifenlösung oder speziellen „Lecksuchgeräten“ die Dichtigkeit sämtlicher Gasanschlüsse und Verbindungen überprüft werden. Treten Undichtigkeiten auf, muss mit Hilfe von Teflon-Dichtungsband nachgebessert werden.

Am Druckminderer der Heliumgasversorgung darf auf der Niederdruckseite ein Gasdruck von maximal 3,0 bar anliegen. Der Heliumgasfluss wird dann in der Magnetventil-Position 2 (Gaschromatographie) mit Hilfe der Feinregulierung so eingestellt, dass sich ein konstanter Fluss von **40 ml/min \pm 2 ml/min** ergibt. Dazu wird das Gasflussmessgerät (5.20) hinter den Detektor angeschlossen.

Anschließend werden die Magnetventile entsprechend Tabelle 15 auf Magnetventil-Position 1 (Purge and Trap) umgestellt.

Der dann resultierende Gasfluss sollte bei **50 ml/min \pm 10 ml/min** liegen.

Anschließend wird der Fluss des Argons überprüft. Dazu wird eine mit 50 ml Wasser gefüllte Teflongaswaschflasche in den Gasstrom (siehe Abb.1) zwischen Magnetventil 5 und Magnetventil 4, mit Hilfe von Schnellverbindern (5.23), eingebracht.

Nun wird direkt am Ausgang von Magnetventil 2 der Gasfluss gemessen. Dieser sollte bei 580 ml/min \pm 20 ml/min liegen. Durch vorsichtiges Regulieren an der Niederdruckseite des Argon-Gasdruckminderers kann dann der Gasfluss korrigiert werden. Anschließend werden die Temperaturen der Adsorptions-/Desorptionseinheit, des Gaschromatographen und der Pyrolyseeinheit überprüft und wenn nötig gemäß 4.6, 4.7 und 4.8 korrigiert.

4.10 Durchführung von Messungen

4.10.1 Warnhinweise

Bei der Durchführung der Methode sind stets Schutzhandschuhe, Schutzbrille und Kittel zu tragen. Bei der geschilderten Apparatur kommt es an der Pyrolyseeinheit zu sehr hohen Temperaturen von ca. 1000°C. Deswegen darf die Pyrolyseeinheit niemals unbeaufsichtigt gelassen werden. Die Apparatur darf nur von ausgewiesenen Personen in Betrieb genommen werden.

4.10.2 Probenvorbereitung und Aufschluss

Die Probe wird gefriergetrocknet und bei hohen Fettgehalten über 10% (z.B. Fischleber) entfettet.

Entfettung von fettreichen Proben (modifizierte Methode nach Smedes(1999))

Zuerst wird eine doppelte Trockengewichtsbestimmung mit einer repräsentativen Portion der Probe durchgeführt.

Anschließend werden ca. 200 mg der feuchten Probe in ein 10 ml Zentrifugenglas überführt und 1,6 ml 2-Propanol und 2,0 ml Cyclohexan (4.1.12) zugegeben. Dann wird die Probe 2 Minuten mit einem Ultra Turrax homogenisiert.

Nun werden W ml Wasser hinzugefügt. W berechnet sich nach folgender Formel:

$$W = 2,2 - \frac{\text{Probeneinwaage[g]} * \text{Wassergehalt[\%]}}{100}$$

Anschließend wird die Lösung erneut 1 Minute mit dem Ultra Turrax behandelt und bei ca. 450 g zentrifugiert. Die organische (obere) Phase wird mit einer Pipette möglichst vollständig in einen zuvor gewogenen 30 ml-Kolben überführt. Dann werden 20 ml Cyclohexan/2-Propanol 87/13 (w/w) zum Rückstand gegeben und wiederum homogenisiert.

Nach anschließender Zentrifugation wird die organische Phase abgenommen und die organischen Phasen vereinigt. Die organische Phase kann danach am Rotationsverdampfer eingeeengt werden. Nach Abblasen von organischen Lösungsmittelresten mit Stickstoff, Trocknung im Trockenschrank und anschließender Wägung zur Fettgehaltsbestimmung, kann der Rückstand der Analytik organischer Schadstoffe (z.B. PCB's) zugeführt werden. Die wässrige Lösung und der darin suspendierte und entfettete Rückstand wird gefriergetrocknet und kann dann aufgeschlossen werden.

Der gefriergetrocknete Rückstand aus der Entfettungsprozedur oder die native gefriergetrocknete Probe wird mit Hilfe eines Mikrohomogenisators oder eines Mörsers möglichst fein zerstoßen. Etwa 50-100 mg dieser Probe werden in ein 10 ml Quarzgefäß überführt und mit 2 ml Tetramethylammoniumhydroxid versetzt. Der Aufschluss wird bei Zimmertemperatur durchgeführt. Um den Aufschlussvorgang zu beschleunigen, kann eine Schüttelapparatur verwendet werden. Der Aufschluss ist vollständig, wenn die Lösung klar ist und kein Bodensatz mehr vorhanden ist. Bei einigen Proben kann es vorkommen, dass sie unlösliche Bestandteile (Silikate, Chitin etc.) enthalten. Dann sollte die Aufschlusslösung erst nach mindestens 24 Stunden zentrifugiert und der Überstand verwendet werden.

Die Analyse eines Aliquotes des Aufschlusses bzw. der Standards wird wie in 4.10.3 beschrieben durchgeführt.

4.10.3 Kalibrierung/Analyse von Proben

Mit dem Methylquecksilberchlorid/ Hg^{2+} Standardmix (4.3.3) wird nach dem vorgegebenen Schema aus Tabelle 18 eine Kalibrierung durchgeführt.

Tabelle 18: Pipettierschema

Reinstwasser [ml]	Standardmix (4.3.3) [µl]	Entspricht MetHg [pg]	Entspricht Hg ²⁺ [pg]	Essigsäure- /Acetat Pufferlösung (4.3.4) [ml]	Natriumtetraethylborat- Lösung (STEB) (4.3.5) [µl]
50	10	39,95	50	3	500
50	30	119,85	150	3	500
50	50	199,75	250	3	500
50	70	279,65	350	3	500
50	90	359,55	450	3	500
50	0	0	0	3	500
50	Proben- aufschluss			3	500

Dazu werden zuerst immer 50 ml Reinstwasser in die Teflongaswaschflasche (5.12) vorgelegt. Dann werden der Reihenfolge nach der Standardmix (4.3.3) bzw. die Probenaufschlusslösung, 3 ml Essigsäure/Acetatpuffer (4.3.4) und zum Schluss 500 µl Natriumtetraethylboratlösung (4.3.5) in die Teflongaswaschflasche (5.12) pipettiert. Anschließend wird ein Magnetrührstab (5.15) hinzugefügt und die Gaswaschflasche verschlossen. Nun wird die Gaswaschflasche auf einen Magnetrührer (5.15) gestellt und mit Hilfe der Schnellverbinder (5.23) gemäß Abbildung 5 mit der Apparatur verbunden. Die Ventilsteuerung muss sich gemäß Tabelle 17 in der „Purge and trap“-Position befinden.

Dann wird der Magnetrührer eingeschaltet und für exakt 300 Sekunden Argongas durch die Gaswaschflasche geleitet. Der Argongasfluss muss dabei konstant bei 600 ml/min liegen. Dieses kann mit Hilfe der Feinregulierung (5.25) eingestellt werden. Nach Ablauf von **genau** 300 Sekunden wird zuerst das Ventil 5 geschlossen und die Gaswaschflasche (5.12) wird mit den Schnellverbindern (5.23) von der Apparatur getrennt. Dann wird das Magnetventil 4 und das Magnetventil 2 geschlossen und die restlichen Ventile werden gemäß Tabelle 17 auf die Position 2 „Gaschromatographie“-Position umgestellt. Nun wird die Aufzeichnung der Mess-Signale am PC bzw. Integrator gestartet und durch Betätigung der Zeitschaltuhr (5.19) das Tenax-TA[®] Adsorptionsröhrchen innerhalb von einer Minute auf 250°C aufgeheizt. Dabei muss das Netzteil der Pyrolyseeinheit gemäß Abschnitt 4.8 und Abbildung 9 eingeschaltet sein. Die ethylierten

Quecksilberverbindungen eluieren durch das Aufheizen und werden gaschromatographisch getrennt, in der Pyrolyseeinheit zu Hg^0 reduziert und vom CVAFS-Detektor detektiert. Die Mess-Signale werden dabei in Abhängigkeit von der Zeit aufgezeichnet. Dabei wird sowohl die Peakhöhe als auch die Peakfläche aufgezeichnet. Von jeder Kalibrierlösung werden drei Wiederholmessungen durchgeführt.

10 Minuten nach dem Einschalten der Zeitschaltuhr (5.19) ist die Analyse beendet. Die Magnetventile werden danach wieder auf die Position 1 „Purge and trap“ gebracht und die nächste Analyse kann durchgeführt werden.

4.10.4 Auswertung

Eine Auswertung der Mess-Signale ist über die Peakhöhe oder die Peakfläche möglich. Es wird empfohlen, die Auswertung über die Peakhöhe vorzunehmen.

Blindwertkontrolle

Zunächst wird die Analyse ohne Zugabe von Probe oder Standard durchgeführt. Normalerweise ergibt sich dabei kein Blindwert für Methylquecksilber und ein geringer Blindwert für anorganisches Quecksilber. Dieser Blindwert wird in einer Dreifachbestimmung ermittelt und bei der späteren Berechnung für den Gehalt an anorganischem Quecksilber berücksichtigt (subtrahiert).

Dann wird durch Zugabe von 100 μl TMAH-Lösung und anschließender Analyse, der Blindwert des TMAH untersucht. Sollte hier ein gegenüber dem Blindwert erhöhter Wert auftreten, so sollte ein TMAH besserer Qualität verwendet werden. Ist dieses nicht verfügbar, so wird der Blindwert der TMAH-Lösung durch eine Dreifachbestimmung ermittelt und in der späteren Berechnung berücksichtigt.

Lineare Kalibrierfunktion

Bevor die Kalibrierfunktion berechnet wird, wird von den Messwerten der Blindwert abgezogen.

Dann wird der Mittelwert der korrigierten Peakhöhe von drei Wiederholmessungen für die Ermittlung und Berechnung der linearen Kalibrierfunktion verwendet.

Berechnung des Methylquecksilber- und Quecksilbergehaltes mit Hilfe der Kalibrierfunktion

Der Quecksilbergehalt bzw. Methylquecksilbergehalt G der untersuchten Probe ergibt sich nach folgenden Gleichungen:

$$G_{\text{Probe}}[\mu\text{g/kg}] = \frac{G(\text{Blindwertkorrigiert})}{E} * \frac{2000}{V(\text{Probelösung})}$$

$G(\text{Blindwertkorrigiert})$: Gehalt der Probenlösung an Analyt [pg]

E: Einwaage [mg]

2000: Faktor 2000 µl Aufschlusslösung

$V(\text{Probelösung})$: Volumen an Aufschlusslösung [µl]

Wurde die Probe vorher entfettet, ergibt sich der Quecksilbergehalt bzw.

Methylquecksilbergehalt:

$$G_{\text{Probe}}[\mu\text{g/kg}] = \frac{G(\text{Blindwertkorrigiert})}{\left(\frac{(E(\text{entfettet}) * \text{Fettgehalt}[\%])}{100} + E(\text{entfettet}) \right)} * \frac{2000}{V(\text{Probelösung})}$$

$G(\text{Blindwertkorrigiert})$: Gehalt der Probenlösung an Analyt [pg]

$E(\text{entfettet})$: Einwaage [$\mu\text{g} \cdot 10^3$]

2000: Faktor 2000 µl Aufschlusslösung

$V(\text{Probelösung})$: Volumen an Aufschlusslösung [µl]

Fettgehalt [%]

Standardaddition

Bei nur wenigen zu analysierenden Proben bietet es sich an, die Auswertung über das Standardadditionsverfahren vorzunehmen. Der Vorteil dieser Methode liegt vor allem darin, dass die Kalibrierung mit einer geringeren Anzahl von Standards (2-3) durchgeführt werden kann.

Es wird empfohlen die Auswertung mit der Software „SQS“ (Fa. Perkin-Elmer) vorzunehmen. Dieses Programm ist Bestandteil der Software für die FIMS der Fa. Perkin-Elmer. Dabei sollte durch Vorversuche der ungefähre Gehalt an Methyl- und anorg. Quecksilber bestimmt werden. Dieser wird dann in etwa der gleichen, doppelten und dreifachen Konzentration zu der Probe addiert.

Ist das Programm „SQS“ nicht vorhanden, erfolgt die Auswertung der Probenkonzentration, indem zuerst die Gerade der Additionskalibrierfunktion aus den Messwerten berechnet wird.

Der Messwert ohne Standardaddition geteilt durch die Steigung der ermittelten Geraden ergibt dann den Gehalt an Methyl- bzw. anorganischem Quecksilber.

Versuche haben gezeigt, dass sich mit beiden Methoden zuverlässige Ergebnisse erzielen lassen.

5. Literatur

Adams, F., Ceulemans, M., Slaets, S., Speciation analysis; state-of-the art GC techniques. LC GC Europe 14, (2001) 548-563.

Analytical Methods Committee: Robust statistics – how not to reject outliers. Part 1. Basic concepts. Analyst 114 (1989a) 1693-1697.

Analytical Methods Committee,: Robust statistics – how not to reject outliers. Part 2. Inter-laboratory trials. Analyst 114 (1989b) 1699-1702.

Analytical Methods Committee: Analyst 120 (1995) 2303-2308.

Armstrong, H.L., Corns, W.T., Stockwell, P.B., O'Connor, G., Ebdon, L., Evans, E.H.: Comparison of AFS and ICP-MS detection coupled with gas chromatography for the determination of methylmercury in marine samples. Anal. Chim. Acta 390, (1999)245-253.

Baeyens, W., Leermakers, M., Dedeurwaerder, H., Lansens, P.: Modelization of the mercury fluxes at the air-sea interface. Water, Air, and Soil Poll. 56 (1991)731-744.

Baeyens, W., Leermakers, M.: Elemental mercury concentrations and formation rates in the Scheldt estuary and the North Sea. Marine Chemistry 60 (1998) 257-266.

Baeyens, W., Leermakers, M.: Investigation of the headspace and solvent extraction methods for the determination of dimethyl- and monomethylmercury in environmental matrices. Chemosphere 39 (1999) 1107-1117.

Bailey, E., Brooks, A.G.: Determination of methylmercury in biological samples by capillary gas chromatography with electron capture detection. Mikrochim. Acta, 109 (1992)121-123.

Barwick, V.J., Ellison, S.L.R.: Measurement uncertainty: Approaches to the evaluation of uncertainties associated with recovery, Analyst 124 (1999) 981-990.

Barwick, V.J., Ellison, S.L.R.: Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement, *Accred. Qual. Assur.* 5 (2000) 47-53.

Beichert, A., Padberg, S., Wencławiak, B.W.: Selective determination of alkylmercury compounds in solid matrices after subcritical water extraction, followed by solid-phase microextraction and GC-MS. *Appl. Organomet. Chem.* 14 (2000) 493-498.

Benoit, J., Gilmour, C., Mason, R., Heyes, A.: Sulfide controls on mercury speciation and bioavailability to methylating bacteria in sediment pore waters. *Environ. Sci. Technol.* 33 (1998) 951-957.

Bin, H., Gui-bin, J., Zhe-ming, N.: Determination of methylmercury in biological samples and sediments by capillary gas chromatography coupled with atomic absorption spectrometry after hydride derivatization and solid phase microextraction. *J. Anal. Atom. Spectr.* 13 (1998) 1141-1144.

Bloom, N.S.: Determination of picogram levels of methylmercury by aqueous phase ethylation, followed by cryogenic gas chromatography with atomic fluorescence detection. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 46 (1989) 1131-1140.

Bloom, N.S.: On the Chemical Form of Mercury in Edible Fish and Marine Invertebrate Tissue. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 49(1992) 1010-1017.

Bloom, N.S. and Fitzgerald, W.F.: Determination of Volatile Mercury Species at the Picogram Level by Low Temperature Gas Chromatography with Cold Vapor Atomic Fluorescence Detection. *Anal. Chim. Acta* 209 (1988) 151-161.

Bloom, N.S., Colman, J.A. and Barber, L.: Artifact formation of methyl mercury during aqueous distillation and alternative techniques for the extraction of methyl mercury from environmental samples. *Fresenius J. Anal. Chem.* 358 (1997) 371-377.

Bloom, N.S., Gill, G., Cappellino, S., Dobbs, C., McShea, L., Driscoll, C., Mason, R., Rudd, J.: Speciation and cycling of mercury in Lavaca Bay, Texas, sediments. *Environ. Sci. Technol.*, 33 (1999) 7-13.

Boening, D.W.: Ecological effects, transport, and fate of mercury: a general review. *Chemosphere*, 40 (2000) 1335-1351.

Bulska, E., Baxter, D. C. and Frech, W.: Capillary column gas chromatography for mercury speciation. *Anal. Chim. Acta* 249 (1991) 545-554.

Cai, Y., Tang, G., Jaffe, R., Jones, R.: Evaluation of some isolation methods for organomercury determination in soil and fish samples by capillary gas chromatography – atomic fluorescence spectrometry. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 68 (1997) 331-345.

Cai, Y., Monsalud, S., Furton, K.G., Jaffe, R., Jones, R.D.: Determination of methylmercury in fish and aqueous samples using solid-phase microextraction followed by gas chromatography atomic fluorescence spectrometry. *Appl. Organomet. Chem.* 12 (1998) 565-569.

Cai, Y., Monsalud, S., Jaffe, R., Jones, R.D.: Gas chromatographic determination of organomercury following aqueous derivatization with sodium tetraethylborate and sodium tetraphenylborate - Comparative study of gas chromatography coupled with atomic fluorescence spectrometry, atomic emission spectrometry and mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 876 (2000) 147-155.

Carro-Diaz, A. M., Lorenzo-Ferreira, R. A. and Cela-Torrijos, R.: Speciation of Organomercurials in Biological and Environmental Samples by Gas Chromatography with Microwave-Induced Plasma Atomic Emission Detection. *J. Chromatography A* 683 (1994) 245-252.

Ceulemans, M. and Adams, F.C.: Integrated Sample Preparation and Speciation Analysis for the Simultaneous Determination of Methylated Species of Tin, Lead and Mercury in Water by Purge-and-Trap Injection-Capillary Gas Chromatography-Atomic Emission Spectrometry. *J. Anal. Atom. Spec.* 11 (1996) 201-206.

Chytky, J.: Research Projects 2001, University of Alberta,
<http://www.ualberta.ca/~medlabsc/chytky.html> (2001)

- Coquery, M., Cossa, D.: Mercury speciation in surface waters of the North Sea. *Netherlands Journal of Sea Research* 34 (1995) 245-257.
- Coquery, M., Cossa, D., Sanjuan, J.: Speciation and sorption of mercury in two macro-tidal estuaries. *Mar. Chem.*, 58 (1997) 213-227.
- Cossa, D., Martin, J.-M., Sanjuan, J.: Dimethylmercury formation in the Alboran Sea. *Mar. Poll. Bull.* 28 (1994) 381-384.
- Cossa, D., Martin, J.-H., Takayangi, K., Sanjuan, J.: The distribution and cycling of mercury species in western Mediterranean. *Deep-Sea Res. II* 44 (1997) 721-747.
- Craig, P.J., Mennie, D., Ostah, N., Donard, O.F.X., Martin, F.: Novel method for derivatisation of mercury(II) and methylmercury(II) compounds for analysis. *Analyst* 117 (1992) 823-824.
- Craig, P.J., Jenkins, R.O., Stojak, G.H.: The analysis of inorganic and methyl mercury by derivatisation methods; opportunities and difficulties. *Chemosph.* 39 (1999) 1181-1197.
- Dietz, C., Madrid, Y., Camara, C., Quevauviller, P.: The capillary cold trap as a suitable instrument for mercury speciation by volatilization, cryogenic trapping, and gas chromatography coupled with atomic absorption spectrometry. *Anal. Chem.* 72 (2000) 4178-4184.
- Dietz, C., Madrid, Y., Camara, C.: Mercury speciation using the capillary cold trap coupled with microwave-induced plasma atomic emission spectroscopy. *J. Anal. Atom. Spectr.* 2001, 16 (2001)1397-1402.
- Doerffel, K.: Assuring Trueness of Analytical Results. *Fresenius J. Anal. Chem.* 348 (1994) 183-187.
- Donais, M.K., Uden, P.C., Schantz, M.M., Wise, S.A.: Development, validation, and application of a method for quantification of methylmercury in biological marine materials using gas chromatography atomic emission detection. *Anal. Chem.*, 68 (1996) 3859-3866.

Ebinghaus R.: Extraction of Adenin nucleotides from bacteria. NWRI Contributuion 91-53 (1991) 1-18.

Elbinghaus R., Wilken R.-D., Gisder P.: Investigations on the formation of Monomethylmercury(II) in the Elbe. Vom Wasser 82 (1994) 19-35.

Ellison, S.L.R., Barwick, V.J.: Analyst 123 (1998) 1387-1392.

EMEP, 2001: Intercomparison study of numerical models for long-range atmospheric transport of mercury. Stage I. Comparison of chemical modules for mercury transformations in cloud/fog environment. EMEP Report 2/2001; Meteorological Synthesizing Centre-East, Moscow.

Emteborg, H., Snell, J., Qian, J., Frech, W.: Sources of systematic errors in mercury speciation using Grignard reagents and capillary gas chromatography coupled to atomic spectrometry. Chemosph. 39 (1999) 1137-1152.

EURACHEM 1998: The Fitness for Purpose of Analytical Methods. ISBN 0-948926-12-0

Falter, R., Ilgen, G.: Determination of trace amounts of methylmercury in sediment and biological tissue by using water vapor distillation in combination with RP C18 preconcentration and HPLC-HPF/HHPN-ICP-MS. Fresenius J. Anal. Chem., 358 (1997) 401-406.

Filippelli, M.: Determination of trace amounts of organic and inorganic mercury in biological materials by graphite furnace atomic absorption spectrometry and organic mercury speciation by gas chromatography. Anal. Chem. 59 (1987) 116-118.

Filippelli, M., Baldi, F., Brinckman, F.E., Olson, G.J.: Methylmercury determination as volatile methylmercury hydride by purge and trap gas chromatography in line with Fourier-Transform Infrared-Spectroscopy. Environ. Sci. Technol. 26 (1992) 1457-1460.

Fischer, R., Rapsomanikis, S. and Andreae, M.O.: Determination of Methylmercury in Fish Samples Using GC/AA and Sodium Tetraethylborate Derivatization. Anal. Chem. 65 (1993) 763-766.

Fitzgerald, W.F.: Is mercury increasing in the atmosphere? The need for an atmospheric mercury network (AMNET). *Water, Air, Soil Poll.* 80 (1995) 245-254.

Fitzgerald, W.F., Mason, R.P.: The global mercury cycle: oceanic and anthropogenic aspects. In: Baeyens, W. et al. (Eds.), *Global and Regional Mercury Cycles: Sources, Fluxes and Mass Balances*. NATO Series. Kluwer Academic Pub., Amsterdam (1996) 85-108.

Frech, W., Snell, J.P., Sturgeon, R.E.: Performance comparison between furnace atomisation plasma emission spectrometry and microwave induced plasma-atomic emission spectrometry for the determination of mercury species in gas chromatography effluents. *J. Anal. Atom. Spectr.* 13 (1998) 1347-1353.

Gerbersmann, C., Heisterkamp, M., Adams, F.C., Broekaert, J.A.C.: Two methods for the speciation of mercury in fish involving microwave-assisted digestion and gas chromatography-atomic emission spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 350 (1997) 273-285.

Gutierrez, J., Travieso, H., Pubillones, M.A.: Rapid determination of inorganic and methylmercury in fish. *Water, Air, and Soil Pollution* 68 (1993) 315-323.

Harms, U. und Luckas, B.: Atomspektrometrische Methoden zur differenzierten Bestimmung von anorganisch und organisch gebundenem Quecksilber in biologischen Materialien. In: *Fortschritte in der atomspektrometrischen Spurenanalytik*. Welz., B. (Ed.). Verlag Chemie, Weinheim. (1984) 421-429.

Harms, U.: Determination of Methylmercury in Organic Matrices with Gas Chromatography/Atomic Absorption Spectrometry. *Mikrochim. Acta* 109 (1992) 131-132.

Harms, U.: Improvement of Sample Pretreatment for Gas Chromatographic Determination of Methylmercury in Marine Biota. *Appl. Organomet. Chem.* 8, (1994) 645-648.

Harrison, R., Rapsomanikis, S.: *Environmental Analysis Using Chromatography Interfaced with Atomic Spectroscopy*. Ellis Horwood, Chichester. 1989

HELSINKI KONVENTION, 1992: *Bundesgesetzblatt* 1994, II, S. 1355.

Hight, S. and Corcoran, M.: Rapid Determination of Methyl Mercury in Fish and Shellfish: Method Development. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 70(1987) 24-30.

Hill, W.R., Stewart, A.J., and Napolitano, G.E.: Mercury speciation and bioaccumulation in lotic primary producers and primary consumers. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 53 (1996) 812-819.

Hintelmann H.: Comparison of different extraction techniques used for methylmercury analysis with respect to accidental formation of methylmercury during sample preparation. *Chemosphere* 39 (1999) 1093-1105 7.

Hintelmann, H. und Wilken, R.-D.: The analysis of organic mercury compounds using liquid chromatography with on-line atomic fluorescence spectrometric detection. *Appl. Organomet. Chem.* 7 (1993) 173-180.

Horvat, M., Byrne, A.R. and May, K.,: A Modified Method for the Determination of Methylmercury by Gas Chromatography. *Talanta* 37 (1990) 207-212.

Horvat, M., Bloom, N.S. and Liang, L.: Comparison of distillation with other current isolation methods for the determination of methyl mercury compounds in low level environmental samples. *Anal. Chim. Acta* 281 (1993) 135-152 und 153-168.

Horvat M., Mandic V., Liang L., Bloom N.S., Padberg S., Lee Y.-H, Hintelmann H., Benoit J,: Certification of Methylmercury Compounds concentration in marine sediment referenz material, IAEA-356. *Appl. Organomet. Chem.* 8 (1994) 533-540.

Horvat, M.,: "Mercury Analysis and Speciation in Environmental Samples" in: *Global and Regional Mercury Cycles: Sources, Fluxes and Mass Balances*. Edited by W. Baeyens, R. Ebinghaus and O. Vasiliev. Kluwer Academic Publishers. (1996) 1-31.

Huber, W.: Modifikation von DIN 32645 zur Bestimmung der Nachweis- und Erfassungsgrenze. *GIT Labor-Fachzeitschrift* 12 (2001), 1308-1309.

ISO: Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results., ISO 5725, 1994, Geneva.

ISO: Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement (GUM), ISO, 1995, Geneva.

IUPAC 1998: Pure Appl. Chem. 60 (1998) 885.

IUPAC 1999: Harmonised Guidelines for the Use of Recovery Information in Analytical Measurement. Pure Appl. Chem. 71 (1999) 337-348.

Jensen, S. and Jernelöv, A.: Biological methylation of mercury in aquatic organisms. Nature 223 (1969a) 753-754.

Jensen, S. and Jernelöv, A.: Biosynthesis of mono- and dimethylmercury. Nature 223 (1969b) 1453-1454.

Jimenez, M.S., Sturgeon, R.E.: Speciation of methyl- and inorganic mercury in biological tissues using ethylation and gas chromatography with furnace atomization plasma emission spectrometric detection. J. Anal. Atom. Spectrom., 12 (1997) 597-601.

Kannan, K., Smith R.G., Lee R.F., Windom, H.L., Heitmuller, P.T., Macauley J.M., Summers, J.K.: Distribution of total Mercury and Methylmercury in water, sediment, and fish from South Florida Estuaries. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 34 (1998) 109-118.

Kim, J.P., Fitzgerald, W.F.: Sea-air partitioning of mercury in the equatorial Pacific Ocean. Science, 231 (1986) 1131-1133.

Lamborg, C.H., Rolfhus, K.R., Fitzgerald, W.F., Kim, G.: The atmospheric cycling and air-sea exchange of mercury species in the South and equatorial Atlantic Ocean. Deep-Sea Res. II 46 (1999) 957-977.

Lansens, P., Meuleman, C., Baeyens, W.: Long-term stability of methylmercury standard solutions in distilled, deionized water. Anal. Chim. Acta 229 (1990) 281-285.

Lansens, P., Laino, C.C., Meuleman, C. and Baeyens, W.: Evaluation of gas chromatographic columns for the determination of methylmercury in aqueous head space extracts from biological samples. *J. Chromatogr.* 586 (1991) 329-340.

Lee, Y.-H., Munthe, J., Iverfeldt, A.: Experiences with the analytical procedures for the determination of methylmercury in environmental samples. *Appl. Organomet. Chem.* 8 (1994) 659-664.

Leermakers, M., Elskens, M., Panutrakul, S., Monteny, F., Baeyens, W.: Geochemistry of mercury in an intertidal flat of the Scheldt estuary. *Neth. J. Aquat. Ecol.*, 27 (1993) 267-277.

Leermakers, M., Meuleman, C., Baeyens, W.: Mercury speciation in the Scheldt estuary. *Water, Air, Soil Poll.*, 80 (1995) 641-652

Leermakers, M., Baeyens, W., Ebinghaus, R., Kuballa, J. and Kock, H.H.: Determination of Atmospheric Mercury During the North Sea experiment. *Water, Air and Soil Pollution* 97 (1997) 257-263.

Leermakers, M., Galletti, S., De Galan, S., Brion, N., Baeyens, W.: Mercury in the Southern North Sea and Scheldt estuary. *Mar. Chem.*, 75 (2001) 229-248.

Liang, L., Horvat, M., Bloom, N.S.: An improved speciation method for mercury by GC/CVAFS after aqueous phase ethylation and room temperature precollection. *Talanta*, 41 (1994) 371-379.

Liang, L., Horvat, M., Cernichiari, E., Gelein, B., Balogh, S.: Simple solvent extraction technique for elimination of matrix interferences in the determination of methylmercury in environmental and biological samples by ethylation gas chromatography cold vapor atomic fluorescence spectrometry. *Talanta*, 43 (1996) 1883-1888.

Limaverde, AM, de Campos, RC: Selective reduction for the determination of mercury in fish: An adaptation of the Magos method. *Química Nova* 22 (1999) 477-482

Logar, M., Horvat, M., Falnoga, I., Stibilj, V.: A methodological study of mercury speciation using Dogfish liver CRM (DOLT-2). *Fresenius J. Anal. Chem.* 366 (2000) 453-460.

Magos, L.: Selective atomic-absorption determination of inorganic mercury and methylmercury in undigested biological samples. *Analyst* 96 (1971) 847-852.

Mansy, S., Wood, Th.E., Sprowles, J.C. and Tobias, R.S.: Heavy Metal-Nucleotide Interactions. Binding of Methylmercury (II) to Pyrimidine Nucleosides and Nucleotides. Studies by Raman Difference Spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* 96 (1974) 1762-1770.

Martin, F.M., Donard, O.F.X.: Aqueous ethylation of organotin compounds in simple solution for speciation analysis by cryofocusing and detection by atomic absorption spectrometry – comparison with hydride generation. *Fresenius J. Anal. Chem.* 351 (1995) 230-236.

Mason, R.P., Rofhus, K.R., Fitzgerald, W.F.: Methylated and elemental mercury in the surface and deep ocean waters of the North Atlantic. *Water, Air and Soil Pollution* 80 (1995a) 665-677.

Mason, R.P. and Fitzgerald, W.F.: Alkylmercury species in the equatorial Pacific. *Nature* 347 (1990) 457-459,

Mason, R.P. and Fitzgerald, W.F.: The distribution and biogeochemical cycling of mercury in the equatorial Pacific Ocean. *Deep-Sea Res.* 40 (1993) 1897-1924.

Mason, R.P., Fitzgerald, W.F., Hurley, Jr., J., Donaghay, P.L., Sieburth, J.M.: Mercury biogeochemical cycling in a stratified estuary. *Limnol. Oceanogr.* 38 (1993) 1227-1241.

Mason, R.P., Fitzgerald, W.F.: Sources, sinks and biogeochemical cycling of mercury in the ocean. Part 2.3. In: Bayens, W., Ebinghaus, R., Vasiliev, O., (Eds.), *Global and Regional Mercury Cycle: Sources, Fluxes and Mass Balance*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht (1996) 249-272.

Mason, R.P., Morel, F.M.M. and Hemond, H.F.: The role of microorganisms in elemental mercury formation in natural waters. *Water, Air and Soil Pollution* 80 (1995b) 775-787.

Mason, R.P., Rofhus, K.R., Fitzgerald, W.F.: Mercury in the North Atlantic. *Marine Chemistry* 61 (1998) 37-53.

Mason, R.P., Sullivan, K.A.: The distribution and speciation of mercury in the South and equatorial Atlantic. *Deep-Sea research Part II*, 46 (1999) 937-956:

Mason, R.P., Fitzgerald, W.F. and Morel, F.M.M.: The biogeochemical cycling of elemental mercury: Anthropogenic influences. *Geochimica et Cosmochimica Acta*. 58 (1994a) 3191-3198.

Mason, R.P., O'Donnell, J., Fitzgerald, W.F.: Elemental mercury cycling within the mixed layer of the Equatorial Pacific Ocean. In: Watras, C., Huckabee, J. (Eds.), *Mercury Pollution, Integration and Synthesis*. Lewis Publishers, Boca Raton (1994b) 83-99.

Mason, R.P., Reinfelder, J.R. and Morel, F.M.M.: Bioaccumulation of mercury and methylmercury. *Water, Air and Soil Pollution*, 80 (1995c) 915-921.

Mason, R.P., Reinfelder, J.R. and Morel, F.M.M.: Uptake, Toxicity, and Trophic Transfer of Mercury in a Coastal Diatom. *Environ. Sci. Technol.* 30 (1996) 1835-1845.

Mason, R.P., Lawson, N.M., Lawrence, A.L., Leaner, J.J., Lee, J.G., Sheu, G.R.: Mercury in the Chesapeake Bay. *Mar. Chem.*, 65 (1999) 77-96.

Oda, C.E., Ingle, J.D.: Speciation of mercury by cold vapour atomic absorption spectrometry with selective reduction. *Anal. Chem.* 53 (1981) 2305-2309.

O'Reilly, J.: Gas chromatographic determination of methyl and ethyl mercury: "Passivation" of the chromatographic column. *J. Chromatogr.* 238 (1982) 433-444.

OSPAR/SIME ("Draft OSPAR Background Document on Mercury and Organic Mercury Compounds" presented by the UK, SIME 00/5/7-E (L) on the Meeting of the Working

Group on Concentrations, Trends and Effects of Substances in the Marine Environment (SIME); Stockholm 21-25 Febr. 2000)

OSLO und PARIS KONVENTION, 1992: Bundesgesetzblatt 1994, II, S.1360,

Pierrone, N., Keller G.J. and Nriagu, J.O.: Regional differences in worldwide emissions of mercury to the atmosphere. *Atmospheric Environment*, 30 (1996) 2981-2987.

Pongratz, R., Heumann, K.,: Determination of concentration profiles of methylmercury compounds in surface waters of polar and other remote oceans by GC-AFD. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 71 (1998) 41-56.

Puk, R. and Weber, J.,: Critical review of analytical methods for determination of inorganic mercury and methylmercury compounds. *Appl. Organomet. Chem.* 8 (1994a) 293-302.

Puk, R. and Weber, J.: Determination of mercury(II), monomethylmercury cation, dimethylmercury and diethylmercury by hydride generation, cryogenic trapping and atomic absorption spectrometric detection. *Anal. Chim. Acta* 292 (1994b) 175-183.

QUAM 2000: EURACHEM/CITAC Guide, Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement. Second Edition. Editors S.L.R. Ellison , M. Rosslein, A. Williams.

Quevauviller, P., Filippelli, M., Horvat, M.: Method performance evaluation for methylmercury determination in fish and sediment. *Trends in Anal. Chem.* 19 (2000) 157-166.

Quevauviller, P.: Accuracy and traceability in environmental monitoring - pitfalls in methylmercury determinations as a case study. *J. Envir. Monitor.* 2 (2000) 292-299.

Rabenstein, D.L.: The Aqueous Solution Chemistry of Methylmercury and its Complexes. *Acc. Chem. Res.* 11 (1978) 100-107.

Ramalhosa, E., Segade, S.R., Pereira, E., Vale, C., Duarte, A: Microwave treatment of biological samples for methylmercury determination by high performance liquid

chromatography-cold vapour atomic fluorescence spectrometry. *Analyst* 126 (2001) 1583-1587.

Rapsomanikis, S., Craig, P.J.: Speciation of Mercury and Methylmercury Compounds in Aqueous Samples by Chromatography-Atomic Absorption Spectrometry after Ethylation with Sodium Tetraethylborate. *Anal. Chim. Acta* 248 (1991) 563-567.

Rapsomanikis, S.: Derivatisation by ethylation with sodium tetraethylboarte for the speciation of metals and organometallics in environmental samples. A review. *Analyst*, 119 (1994) 1429-1439.

Reuther, R., Jaeger, L., Allard, B.: Determination of organometallic forms of mercury, tin and lead by in situ derivatization, trapping and gas chromatography - atomic emission detection. *Anal. Chim. Acta* 394 (1999) 259-269.

Ritsema, R., Donard, O.F.X.: On-line speciation of mercury and methylmercury in aqueous samples by chromatography-atomic fluorescence spectrometry after hydride generation. *Appl. Organomet. Chem.* 8 (1994) 571-575.

Simon, N.S.: Supercritical fluid carbon dioxide extraction and liquid chromatographic separation with electrochemical detection of methylmercury from biological samples. *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, 68 (1997) 313-330.

Simpson, R.B.: Association Constants of Methylmercury with Sulfhydryl and Other Bases. *J. Am. Chem. Soc.* 83 (1961) 4711-4717.

Slaets, S., Adams, F., Pereiro, I.R., Lobinski, R.: Optimization of the coupling of multicapillary GC with ICP-MS for mercury speciation analysis in biological materials *J. Anal. Atom. Spectrom.* 14 (1999) 851-857.

Slaets, S., Adams, F.C.: Determination of organomercury compounds with a miniaturised automated speciation analyser. *Aal. Chim. Acta* 414 (2000) 141-149.

Slemr, F. and Langer, E.: Increase in global atmospheric concentrations of mercury inferred from measurements over the Atlantic Ocean. *Nature* 355 (1992) 434-437.

Smedes, F. Determination of total lipid using non-chlorinated solvents. *Analyst* 124, 11 (1999) 1711 -1718.

Stoeppler, M., Burow, K., May, K., Padberg, S. and Kloster, G.: Speciation Studies for Arsenic and Mercury – Applications and Prospects, *Mikrochim. Acta* 109 (1992)107-109.

Suedel, B.C., Boraczek, J.A., Peddicord, R.K., Clifford, P.A., and Dillon, T.M.: Trophic Transfer and Biomagnification Potential of Contaminants in Aquatic Ecosystems. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.*,136 (1994) 21-89.

Szpunar-Lobinska, Witte, C., Lobinski, R., Adams, F.C.: Separation techniques in speciation analysis for organometallic species. *Fresenius J. Anal. Chem.* 351 (1995) 351-377.

Templeton M.: IUPAC 2000. *Pure Appl. Chem.* 2000, 72, 1453-1470.

Tseng, C.M., de Diego, A., Martin, F.M., Amouroux, D., Donard, O.F.X.: Rapid determination of inorganic mercury and methylmercury in biological reference materials by hydride generation, cryofocusing, atomic absorption spectrometry after open focused microwave-assisted alkaline digestion. *J. Anal. Atom. Spectrom.* 12 (1997) 743-750.

Tseng, C.M., de Diego, A., Pinaly, H., Amouroux, D., Donard, O.F.X.: Cryofocusing coupled to atomic absorption spectrometry for rapid and simple mercury speciation in environmental matrices. *J. Anal. Atom. Spectrom.*13 (1998) 755-764.

Tu, Q., Qian, J., Frech, W.: Rapid determination of methylmercury in biological materials by GC-MIP-AES or GC-ICP-MS following simultaneous ultrasonic-assisted in situ ethylation and solvent extraction. *J. Anal. Atom. Spectrom.* 15 (2000) 1583-1588.

Ubillus, F, Alegria, A, Barbera, R, Farre, R, Lagarda, MJ: Methylmercury and inorganic mercury determination in fish by cold vapour generation atomic absorption spectrometry. *Food Chemistry* 71 (2000) 529-533

Uria, J., Sanz-Medel, A.: Inorganic and methylmercury speciation in environmental samples. *Talanta*, 47 (1998) 509-524.

Välimäki, I., Perämäki, P.: Determination of mercury species by capillary column GC-QTAAS with purge and trap preconcentration technique. *Mikrochim. Acta* 137 (2001) 191-201.

Vazquez, M.J., Abuin, M., Carro, A.M., Lorenzo, R.A., Cela, R.: Experimental design approach for the extraction of methylmercury from certified reference materials using microwave energy. *Chemosph.* 39 (1999) 1211-1224.

Von Burg, R. und Greenwood, M.R.: Mercury. in : *Metals and their Compounds in the Environment*. Ernest Merian (Ed.), VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, (1991) 1045-1088.

Wängberg, I., Schmolke, St., Schager, P., Munthe, J., Ebinghaus, R., Iverfeldt, A.: Estimates of air-sea exchange of mercury in the Baltic Sea. *Atmospheric Environment* 35 (2001) 5477-5484.

Westöö G.: Determination of Methylmercury Compounds in Foodstuff. I. Methylmercury Compounds in Fish. Identification and Determination. *Acta Chem. Scand.* 20 (1966) 2131-2138.

Westöö G.: Determination of Methylmercury Compounds in Foodstuff. II. Determination of Methylmercury in Fish, Egg, Meat and Liver. *Acta Chem. Scand.* 21 (1967) 1790-1800.

Westöö G.: Determination of Methylmercury Salts in Various Kinds of Biological Material. *Acta Chem. Scand.* 22 (1968) 2277-2280.

Wood, J.M., Kennedy, F.S., Rosen, C.G.: Synthesis of methylmercury compounds by extracts of a methanogenic bacterium. *Nature* 220 (1968) 173-175.

Yong, C. and Bayona, J. M.: Determination of Methylmercury in Fish and River Water Samples Using *in situ* Sodium Tetraethylborate Derivatization Followed by Solid-Phase

Microextraction and Gas Chromatography-Mass Spectrometry. J. Chromatography A 696 (1995) 113-122.

6. Anhang

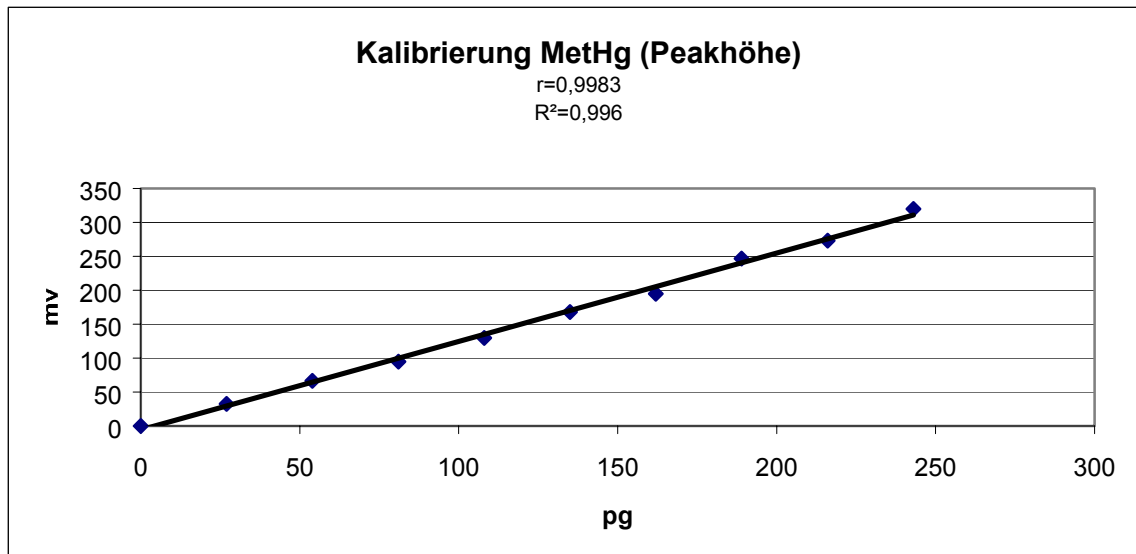


Abbildung 10: Kalibriergerade für Methylquecksilber (Peakhöhe)

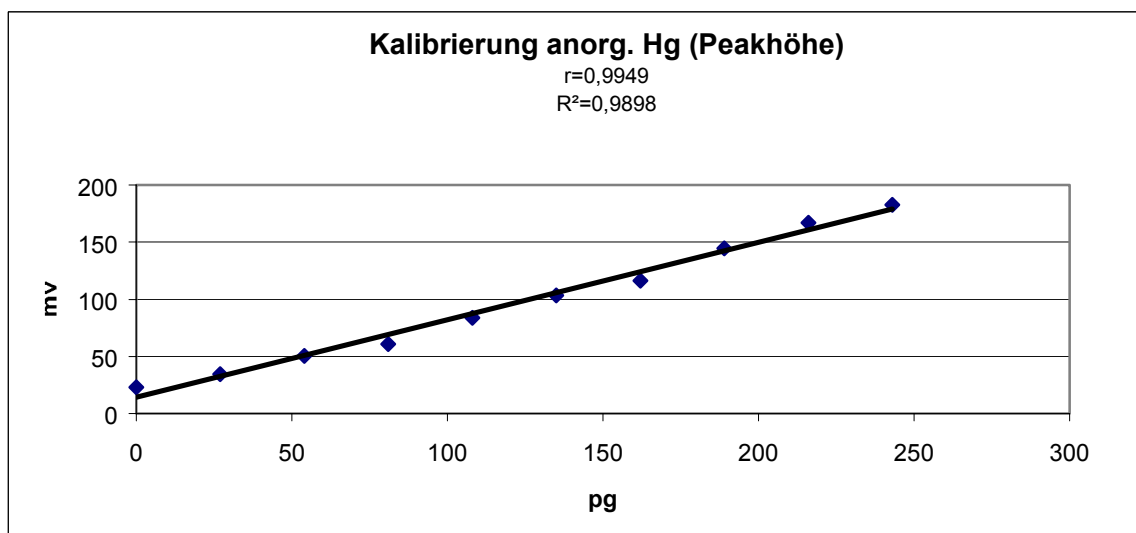


Abbildung 11: Kalibriergerade für anorganisches Quecksilber (Peakhöhe)

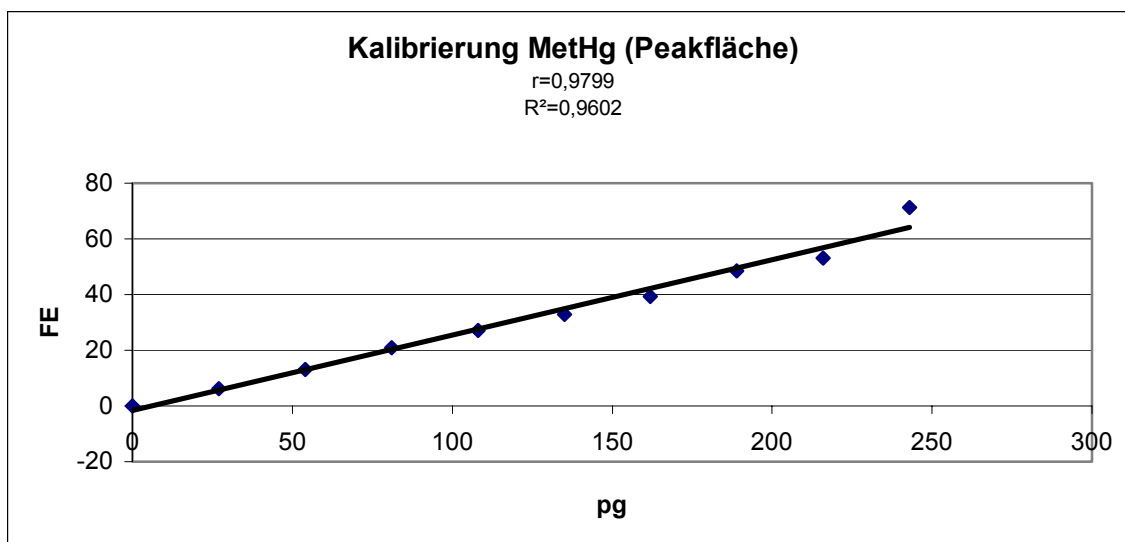


Abbildung 12: Kalibriergerade für Methylquecksilber (Peakfläche)

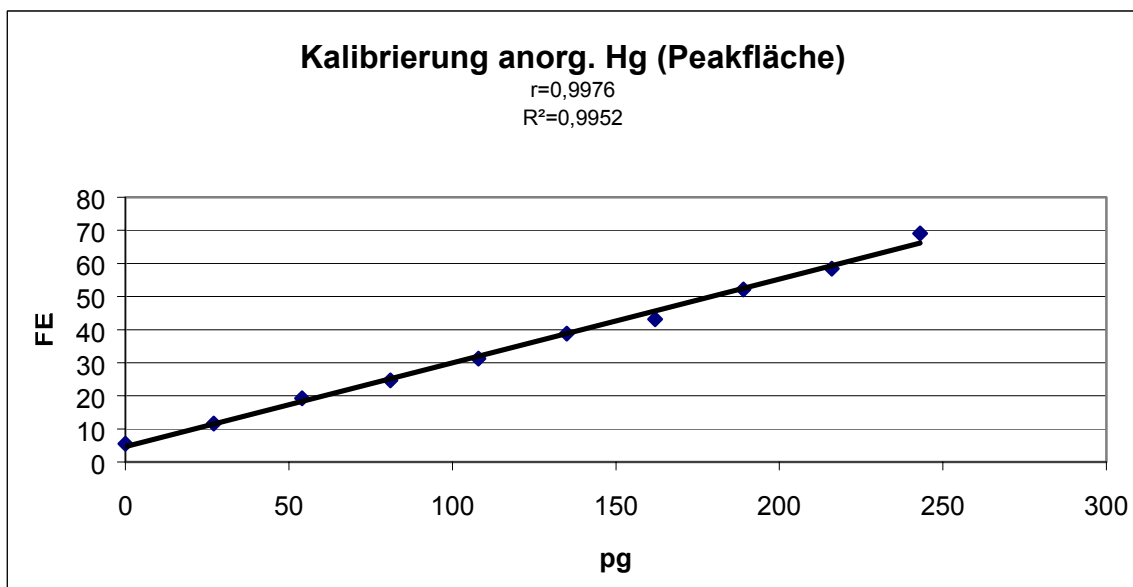


Abbildung 13: Kalibriergerade für anorganisches Quecksilber (Peakfläche)