

**Ausarbeitung, Validierung und Anwendung einer Methode zur simultanen  
Bestimmung von Monomethylquecksilber und anorganischem Quecksilber in  
Fischgewebe und Fischembryonen**

**DISSERTATION**

**zur Erlangung des Doktorgrades  
des Fachbereiches Chemie  
der Universität Hamburg**

**aus dem  
Institut für Biochemie und Lebensmittelchemie  
- Abteilung für Lebensmittelchemie –  
der Universität Hamburg**

**vorgelegt vom**

**Lebensmittelchemiker  
Markus Bunke  
aus Hamburg**

**Hamburg 2007**

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Oktober 2000 bis November 2005 unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Dr. H. Steinhart am Institut für Biochemie und Lebensmittelchemie, Abteilung für Lebensmittelchemie, der Universität Hamburg angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Dr. H. Steinhart
2. Gutachter: Prof. Dr. J.A.C. Broekaert

Begutachtende der Disputation:

Prof. Dr. Dr. H. Steinhart

Prof. Dr. P. Burger

Dr. A. Paschke

Tag der Disputation: 7.9.2007

Die finanzielle Unterstützung der Arbeit erfolgte durch das Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit innerhalb des Umweltforschungsplans 200 22 230 des Umweltbundesamtes.

Herrn Prof. Dr. Dr. Steinhart und Herrn Dr. Uwe Harms danke ich für die Bereitstellung des interessanten Themas und für die stetige Unterstützung während des Fortgangs der Arbeit.

Herrn Prof. Broekaert danke ich für die Übernahme der Zweitbegutachtung der Arbeit.

Fr. Dr. Ulrike Kammann und besonders Herrn Dr. Haarich danke ich für die Hilfe bei der Beantwortung allgemeiner Fragestellungen und die Durchsicht der Arbeit.

Frau Linda Neumann danke ich für die allgegenwärtige Unterstützung und die gute Zusammenarbeit im Labor.

Den Mitarbeitern des Bundesamtes für Seeschifffahrt und Hydrographie Hamburg-Sülldorf danke ich für die unkomplizierte Bereitstellung etlicher Gerätschaften.

Herrn Michael Vobach danke ich für die die Betreuung der 237. Fahrt auf der Walther Herwig III und für die Probennahme auf der 249. Fahrt.

Herrn Dr. Lang danke ich für die Probennahme auf der 255. Fahrt der Walther Herwig III.

Der Glasbläserei Universität Hamburg Institut für anorganische Chemie danke ich für die netten Gespräche zur Optimierung der Glasgerätschaften

Herrn Enghusen von der FH-Bergedorf danke ich für die Hilfe bei der Programmierung des Integration-Programm mit LABVIEW®

Meinen Eltern und Großeltern danke ich besonders dafür, dass Sie mir das Studium ermöglicht haben.

Meiner liebsten Cathrin, meiner Schwester und meinem Bruder danke ich für die Durchsicht des Skripts

**Erläuterungen der Abkürzungen, Maßeinheiten und Symbole**

a	Jahr
A	Ampere
AD	Außendurchmesser
A/D	analog/digital
AAS	Atomabsorptionsspektrometer
AES	Atomemissionsspektrometer
AFS	Atomfluoreszenzspektrometer
BFAFi	Bundesforschungsanstalt für Fischerei
BLMP	Bund/Länder Mess Programm
BSH	Bundesamt für Seeschifffahrt und Hydrographie
°C	Grad Celsius
CRM	Zertifiziertes Referenzmaterial
CV-	Cold vapour (Kaltdampf)
DOM	dissolved organic mater (gelöstes organische Substanz)
EFSA	European Food Safty Authority (Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit)
Et	Ethyl-
EtOH	Ethanol
FE	Flächeneinheiten
FIMS	Flow Injection Mercury System
g	Erdbeschleunigung
GC	Gaschromatographie bzw. Gaschromatograph
H <sub>2</sub> O bidest.	Wasser, doppelt gereinigt
HBM	Human-Bio-Monitoringwerte
Hg	Quecksilber
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
ICP	Induktiv gekoppeltes Plasma
ID	Innendurchmesser
IFÖ	Institut für Fischereiökologie
k.A.	keine Angabe
LD <sub>50</sub>	letale Dosis, bei der 50% der Versuchstiere sterben
MeHg	Methylquecksilber
MeOH	Methanol
M.D.	Minamata Disease /Minamata Krankheit

---

min.	Minute
MS	Massenspektrometrie bzw. Massenspektrometer
mV	Millivolt
NMR	Nuclear magnetic resonance oder Kernresonanzspektrometrie
n.n.	nicht nachweisbar
SOP	Standard Operating Procedure oder Arbeitsanleitung
Std.	Standard
STEB	Sodiumtetraethylborate/Natriumtetraethylborat
THF	Tetrahydrofuran
TMAH	Tetramethylammoniumhydroxid
TS	Trockensubstanz
T	Temperatur [°C]
WHO	Weltgesundheitsorganisation
z.A. oder p.A.	zur Analyse
ZNS	Zentrales Nervensystem

mathematisch-/statistische Erläuterungen

$x_{CRM}$	= 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	= Prüfgröße
$x_{obs,i}$	= 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.....	10
2. Allgemeiner Teil.....	14
2.1 Natürliches Vorkommen, physikalische Eigenschaften und Verwendung von Quecksilber und Quecksilberverbindungen.....	14
2.2 Quecksilber und Quecksilberverbindungen in der Umwelt.....	22
2.2.1 Globaler Quecksilberkreislauf.....	22
2.2.2 Biotransformation des Quecksilbers.....	26
2.2.3 Bioakkumulation/Biomagnifikation: Methylquecksilber in der marinen Nahrungskette .....	28
2.3 Toxizität.....	31
2.3.1 Toxikinetik .....	31
2.3.2 Elementares Quecksilber .....	31
2.3.4 Anorganisches Quecksilber ( $\text{Hg}^{2+}$ ) .....	32
2.3.5 Organische Quecksilberverbindungen.....	32
2.3.3 Toxische Wirkungen .....	35
2.4 Nationale und Internationale Grenzwerte bzw. Empfehlungen für die maximale Aufnahme von Quecksilber und Quecksilberverbindungen.....	39
3. Problemstellung und Zielsetzung.....	41
4. Methodenentwicklung.....	43
4.1 Speziierungsanalyse des Quecksilbers.....	43
4.2 Auswahl der Komponenten für die entwickelte Methode.....	45
4.2.1 Methoden der Probenvorbereitung (Optimierung des Aufschlusses verschiedener Probenmatrices).....	46
4.2.2 Auswahl des Derivatisierungsreagenz.....	49
4.2.3 Auswahl und Überprüfung eines geeigneten Adsorbens und Optimierung der Arbeitsbedingungen für die Vor-Säulen-Sorption und -Desorption von Alkylquecksilberderivaten.....	50
4.2.4 Untersuchung und Optimierung der Ausbeute an Alkylquecksilberderivaten in Abhängigkeit von pH-Wert, Reaktionstemperatur und -zeit sowie Reagenzienmenge .....	52
4.2.4 Herstellung und Überprüfung einer geeigneten Trennsäule für die isotherme Gaschromatographie von Alkylquecksilberderivaten .....	55

## Inhaltsverzeichnis

---

4.2.5 Überprüfung und Optimierung der technischen Merkmale eines beheizbaren Interface für die Pyrolyse der Alkylquecksilberderivate.....	56
4.2.6 Auswahl des Detektors.....	58
4.2.7 Zusammenfassung.....	60
4.2.8 Messanordnung.....	61
4.3.1 Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze.....	63
4.3.2 Überprüfung der Richtigkeit von Untersuchungsergebnissen bzw. Nachweis systematischer Fehler.....	63
4.3.4 Überprüfung der Leistungsfähigkeit der Methode.....	66
5. Felduntersuchungen.....	67
5.1 Quecksilbergehalte in pelagischen Fischembryonen.....	67
5.1.3 Ergebnisse.....	72
5.1.4 Diskussion.....	78
5.2 Quecksilbergehalte von Klieschenfilet und Klieschenlebern ( <i>Limanda limanda</i> ).....	82
5.2.1 Einleitung.....	82
5.2.2 Material und Methoden.....	82
5.2.3 Ergebnisse.....	84
5.3 Sprotten ( <i>Sprattus sprattus</i> ).....	91
6. Zusammenfassung.....	95
6.1 Summary.....	97
7. Literatur.....	99

### *FORSCHUNGSBERICHT FKZ 200 22 230*

1. Einleitung.....	135
1.1 Aufgabenstellung.....	135
1.2 Planung und Ablauf des Forschungsvorhabens.....	136
1.3 Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den bei dem Forschungsvorhaben angeknüpft wurde.....	137
1.3.1 Globaler Quecksilberkreislauf.....	137
1.3.2 Biotransformation des Quecksilbers.....	139
1.3.3 Bioakkumulation/-magnifikation des Quecksilbers.....	140
1.3.4 Speziierungsanalyse des Quecksilbers.....	142
1.3.5 Methoden der Probenvorbereitung.....	145
1.4 Zusammenarbeit mit anderen Stellen.....	146

2. Eigene Untersuchungen .....	146
2.1 Kurzbeschreibung der ausgearbeiteten Methode.....	146
2.2 Herstellung und Überprüfung einer geeigneten Trennsäule für die isotherme Gaschromatographie von Alkylquecksilberderivaten .....	148
2.3 Auswahl und Überprüfung eines geeigneten Adsorbens und Optimierung der Arbeitsbedingungen für die Vor-Säulen-Sorption und -Desorption von Alkylquecksilberderivaten .....	149
2.4 Überprüfung und Optimierung der technischen Merkmale eines beheizbaren Interface für die Pyrolyse der Alkylquecksilberderivate .....	150
2.5 Untersuchung und Optimierung des alkalischen Aufschlusses von verschiedenen Probenmatrices .....	153
2.6 Untersuchung und Optimierung der Ausbeute an Alkylquecksilberderivaten in Abhängigkeit von pH-Wert, Reaktionstemperatur und -zeit sowie Reagenzmenge .....	155
3. Validierung der Methode .....	158
3.1 Ermittlung der Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze nach der modifizierten Leerwertmethode.....	158
3.1.1 Theoretischer Hintergrund.....	158
3.1.2 Praktische Durchführung.....	159
3.2 Überprüfung der Richtigkeit von Untersuchungsergebnissen (Nachweis systematischer Fehler).....	161
3.2.1 Theoretischer Hintergrund.....	161
3.2.2 Praktische Durchführung.....	164
3.3 Durchführung von Wiederfindungsexperimenten zur Überprüfung der Richtigkeit der Analyse von Monomethylquecksilber .....	168
3.4 Überprüfung der Leistungsfähigkeit der Methode .....	170
3.4.1 Theoretischer Hintergrund.....	170
3.4.2 Praktische Durchführung.....	171
3.5 Zusammenfassung/Schlussfolgerungen.....	174
4. SOP: Arbeitsanleitung, Zusammenbau der Apparatur .....	176
4.1 Zweck und Anwendungsbereich .....	176
Kurzbeschreibung des Verfahrens .....	177
4.2 Chemikalien.....	177
4.3 Lösungen .....	179
4.4 Geräte und Hilfsmittel.....	180

## Inhaltsverzeichnis

---

4.5 Anleitungen und Betriebsanweisung zum Zusammenbau der Komponenten.....	182
4.6 Herstellung und Anschluss der Tenax-TA <sup>®</sup> Adsorptions-/Desorptionseinheit.....	185
4.7 Herstellung und Installation der Gaschromatographiesäule.....	186
4.8 Herstellung und Installation der Pyrolyseeinheit .....	187
4.9 Anschluss des Detektors an einen PC oder einen Integrator.....	188
4.10 Durchführung von Messungen .....	190
4.10.1 Warnhinweise .....	190
4.10.2 Probenvorbereitung und Aufschluss .....	190
4.10.3 Kalibrierung/Analyse von Proben.....	191
4.10.4 Auswertung.....	193
5. Literatur .....	195
6. Anhang .....	211
9. Tabellarische Übersicht der Ergebnisse der Untersuchungen der Umweltproben .....	213
9.1 Ergebnisse der Untersuchungen der Fischembryonen 2002 .....	213
9.2 Ergebnisse der Untersuchungen der Fischembryonen 2003 .....	214
9.3 Ergebnisse der Untersuchungen der Klieschenfiletproben 2003 .....	216
9.4 Ergebnisse der Untersuchungen der Klieschenleberproben 2003 .....	217
9.5 Ergebnisse der Untersuchungen der Sprottenfiletproben 2003 .....	219

## 1. Einleitung

Das Spurenmetall Quecksilber und insbesondere seine organometallischen Verbindungen stellen durch ihre hohe Toxizität eine Gefahr für alle Organismen dar, insbesondere für die Organismen höherer trophische Stufen einschließlich des Menschen. Deshalb zählen u.a. Gamo et al. (2003) Methylquecksilber zu den 12 wichtigsten Umweltschadstoffen.

Quecksilber gelangt sowohl durch natürliche als auch durch anthropogene Prozesse in die Umwelt. So tragen terrestrische und marine Vulkanausbrüche und Erosion ebenso zur Belastung mit dem Schwermetall bei wie jede Art der industriellen Tätigkeit, bei der fossile Brennstoffe eingesetzt werden. Weiterhin sind Emissionen durch Müllverbrennungsanlagen (z.B. durch unsachgemäße Entsorgung von Batterien oder Energiesparlampen), Industrieabwässer u.a. der Chlor-Alkali Industrie, Einträge der Landwirtschaft und der Einsatz von Quecksilber in der Goldgewinnung wichtige Quellen für die Belastung der Umwelt durch Quecksilber.

Die weltweite Quecksilberbelastung hat sich in den vergangenen 150 Jahren durch die intensive industrielle Tätigkeit des Menschen etwa verdreifacht (Fitzgerald 2005). Die Quecksilberschmutzung wurde zunächst als akutes, lokales Phänomen betrachtet, gilt heute aber als globales, weit verbreitetes und chronisches Problem (Europäische Kommission 2005).

Dies liegt in erster Linie an den einzigartigen Eigenschaften des Spurenmetalls Quecksilber und seinen Verbindungen.

Quecksilber ist das einzige Metall, das in elementarer Form bereits bei Raumtemperatur flüssig ist und dabei einen hohen Dampfdruck aufweist (siehe Abbildung 2.1). In der Erdatmosphäre kommt Quecksilber hauptsächlich in der gasförmigen, elementaren Form ( $\text{Hg}^{(0)}$ ) vor und verteilt sich in der Troposphäre weiträumig. Zwischen dem gasförmigen Quecksilber und dem aquatischen Systemen findet ein ständiger Austausch statt. Ein Teil des Quecksilbers, das von der gasförmigen Phase in die wässrige Phase übergeht, wird an gelöste organische Substanz gebunden (DOM) und reichert sich im Sediment an (Ravichandran 2004). Zunehmende Quecksilberfreisetzungen in die Atmosphäre führen daher auch zu steigenden Quecksilberkonzentrationen im Meer, in Flüssen und Seen sowie in deren Sedimenten. Umgekehrt können steigende Quecksilberkonzentrationen in Gewässern auch zu steigender Luftbelastung mit gasförmigen Quecksilber beitragen.

So unterliegen Quecksilberemissionen einem weltweiten, komplizierten atmosphärischen Kreislauf. Selbst in weit von direkten Emissionsquellen entlegenen Gebieten - wie der Antarktis - werden deshalb hohe Quecksilberkonzentrationen gemessen (Fitzgerald 2005). Zu dem direkten Eintrag durch anthropogene Aktivitäten kommt zusätzlich noch der Einfluss der globalen Erderwärmung auf die Quecksilberbelastung der Meeresumwelt. Durch die Erderwärmung wird mit einem weiteren Schmelzen der Polkappen gerechnet. Dieser Vorgang wird zu einer weiteren Erhöhung des mobilen Quecksilberpools führen und könnte zum wichtigsten Faktor für die Freisetzung von Quecksilber in der Zukunft werden (Macdonald 2005).

Infolge komplexer biologischer, physikalisch-chemischer und chemischer Transformationsprozesse, die vor allem in aquatischen Systemen ablaufen, entstehen aus elementarem Quecksilber bzw. deren anorganischen Verbindungen die deutlich stärker toxischen Organoquecksilberverbindungen Methylquecksilber (MeHg) und Dimethylquecksilber ( $\text{CH}_3\text{HgCH}_3$ ) (Boening, 2000). Das sehr leicht flüchtige Dimethylquecksilber entweicht aufgrund seines hohen Dampfdruckes schnell aus der Wassersäule. Methylquecksilber hingegen wird in der aquatischen Nahrungskette akkumuliert.

So ist der Verzehr von Meeresfrüchten und Fischen für den Menschen in der Regel die wichtigste Quelle für die Belastung mit (Methyl-) Quecksilber. Dies machte bereits die Vergiftungskatastrophe in der Minamata-Bucht in Japan in den fünfziger Jahren des 20. Jahrhunderts, bei der mehr als 1000 Menschen durch den Verzehr von mit hohen Methylquecksilberkonzentrationen kontaminierten Fischen starben, deutlich. Auch durch den dauerhaften Genuß weniger stark kontaminierter Meerestiere kann zudem eine chronische Vergiftung mit Methylquecksilber ausgelöst werden. Bei kaum einer anderen toxischen Substanz wird die maximal empfohlene bzw. tolerierbare Aufnahmemenge derart häufig ausgeschöpft oder überschritten wie bei der Aufnahme von MeHg durch den Verzehr von Fisch und Meeresfrüchten. Die EFSA (Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit) kam 2004 zu dem Schluß, dass die geschätzten Aufnahmemengen der europäischen Verbraucher im oberen Bereich der international anerkannten Sicherheitsgrenzwerte liegen.

Da Methylquecksilber im Körper akkumuliert wird und lange Retentions-Halbwertszeiten aufweist, sollte der Belastung mit diesem Schadstoff mehr Beachtung zugemessen werden.

Die ubiquitäre Ausbreitung mit globalem Ausmaß, die starke Bio-Akkumulation/Biomagnifikation und die enorme Toxizität, führten zu intensiver internationaler Forschung über Quecksilber und zu verstärktem Interesse auf dem Gebiet der Speziesanalytik organischer Quecksilberverbindungen.

Die im Vergleich zu anorganischem Quecksilber stärkeren toxischen Eigenschaften der organischen Quecksilberverbindungen begründen die dringende Notwendigkeit auch entsprechende analytische Verfahren zu beherrschen, welche die Bestimmung von Methylquecksilber neben anorganischem Quecksilber in verschiedenen biologischen Matrices zulassen. Nur dann lassen sich Bildungsmechanismen von Methylquecksilber aufklären, Informationen über die Bindungsart und somit der Toxizität der vorliegenden Quecksilberspezies erlangen, die Verteilungen in unterschiedlichen Kompartimenten verstehen, die Belastung von Mensch und Umwelt durch diese Verbindungen besser quantifizieren und geeignete Maßnahmen zur Reduktion treffen.

Bisherige Routineuntersuchungen des Quecksilbergehaltes von Fischen und anderen Meerestieren waren in der Bundesforschungsanstalt für Fischerei (BFA-Fi) bisher auf die Analytik des Gesamtquecksilbergehaltes beschränkt. Um die Speziationsanalytik durchführen zu können, ist die Entwicklung einer Methode, die mit relativ preiswerter instrumenteller Ausrüstung auskommt, wesentliche Voraussetzung.

Ziel der hier vorgelegten Doktorarbeit war es, im Rahmen des Forschungsprojektes „Ausarbeitung und Validierung einer Methode zur Bestimmung von Methylquecksilber und anorganischem Quecksilber in Fischgewebe und Zooplankton“ (Umweltbundesamt UFO-PLAN FKZ 200 22 230) an der BFA-Fi (Bundesforschungsanstalt für Fischerei) eine derartige Methode zu entwickeln und zu validieren. Sie sollte auch als Grundlage für andere Forschungseinrichtungen und Untersuchungsämter dienen, um eine entsprechende Analytik aufzubauen.

Desweiteren wurde die Methode in Felduntersuchungen im Rahmen des integrierten chemischen und biologischen Effektmonitorings an marinen Organismen aus Nord- und Ostsee angewendet. Ziel war die Bestimmung der Konzentrationen in Muskel- und Leberproben des Indikatororganismus Kliesche (*Limanda limanda*) auf einem ausgedehnten Stationsnetz, um räumliche Unterschiede zu untersuchen. Zudem wurden im Rahmen von Routineuntersuchungen zur Häufigkeit von Missbildungen

pelagischer Fischembryonen Proben auf ihren Gehalt an anorganischen und organischen Quecksilberverbindungen analysiert, um festzustellen, ob eine validierte, quantitative Bestimmung von Quecksilberverbindungen in marinen, pelagischen Fischeiern möglich ist – und sich derartige Fischeier prinzipiell als akkumulative Bioindikatoren für diese Verbindungen eignen.

## 2. Allgemeiner Teil

### ***2.1 Natürliches Vorkommen, physikalische Eigenschaften und Verwendung von Quecksilber und Quecksilberverbindungen***

Quecksilber zählt zu den seltenen Elementen. Es ist mit ca.  $1 \cdot 10^{-5}$  % am Aufbau der Erdkruste beteiligt und kommt in der Natur hauptsächlich als Quecksilber(II)-Sulfid - dem sog. Zinnober - und elementar als Quecksilberdampf ( $\text{Hg}^0$ ) vor.

Vorkommen von flüssigem elementarem Quecksilber sind sehr selten. Elementares Quecksilber kann dabei in Tropfenform im Zinnober oder anderen Erzen eingeschlossen vorkommen.

Da elementares Quecksilber einen hohen Dampfdruck besitzt und in der Natur in Spuren überall verbreitet ist, entweicht gasförmiges Quecksilber durch Erosion und Ausspülungen permanent aus der Erdkruste in die Atmosphäre. Aus den Weltmeeren verdampfen ebenfalls beträchtliche Mengen von Quecksilber in die Atmosphäre. Weiterhin wird es insbesondere dort freigesetzt, wo hohe Temperaturen herrschen: Das Verbrennen von fossilen Brennstoffen wie Kohle oder Gas führt ebenso wie Vulkanausbrüche zur Freisetzung von Quecksilber. Es kann angenommen werden, dass auch eine allgemein steigende globale Durchschnittstemperatur Einfluss auf den Quecksilberkreislauf hat. Dazu veranschaulicht Abbildung 2.1 die Auswirkungen der Erhöhung der Temperatur auf die Sättigungskonzentration von Quecksilber in der Luft. So bewirkt beispielsweise eine Steigerung der Temperatur von  $20^\circ\text{C}$  auf  $24^\circ\text{C}$  eine Steigerung der Sättigungskonzentration von Quecksilber in der Luft um ca. 40%. In einem geschlossenen Raum stellt sich bei Vorhandensein von nur wenigen Tropfen Quecksilber bei einer Temperatur von  $20^\circ\text{C}$  ein Quecksilbergehalt der Luft von etwa  $13,2 \text{ mg/m}^3$  ein. Damit wird der Arbeitsplatzgrenzwert (AGW) von  $0,1 \text{ mg/m}^3$  schon um den Faktor 130 überschritten.

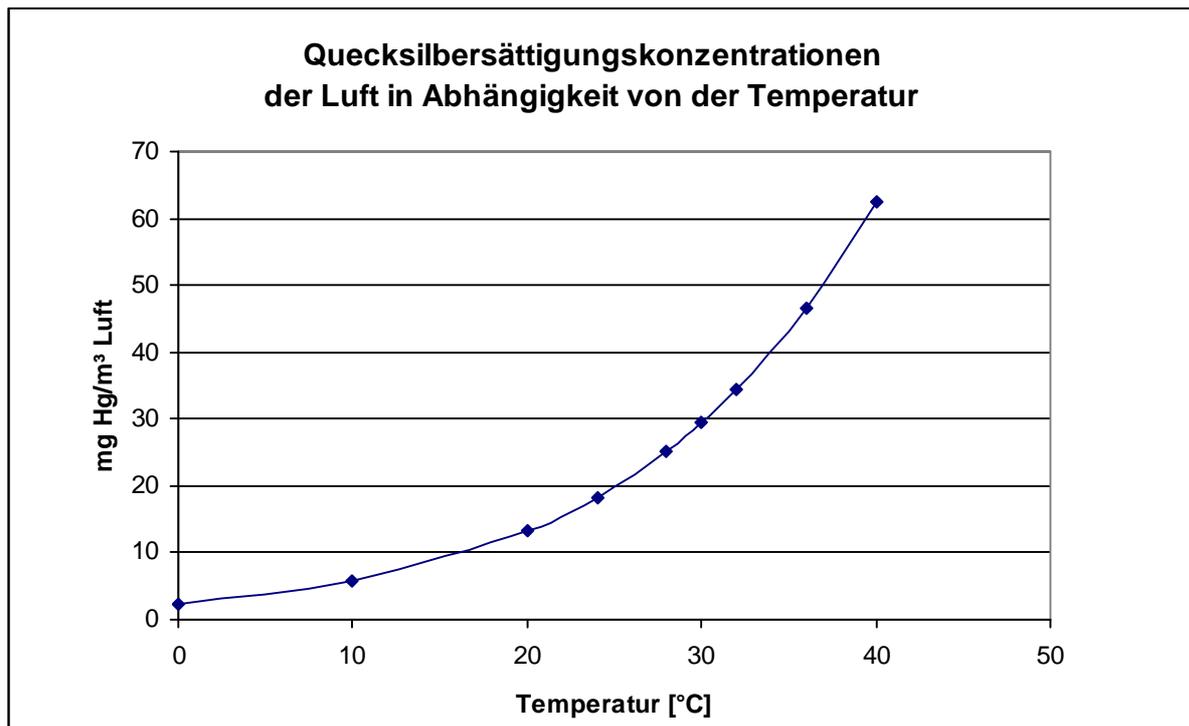


Abbildung 2.1. Quecksilbersättigungskonzentrationen der Luft in Abhängigkeit von der Temperatur (Werte nach Synowietz 1984)

### Verwendung

Aufgrund der ökotoxikologischen Problematik (siehe unten), die sich bei der Verwendung von Quecksilber ergibt, ist insbesondere in der Europäischen Union ein deutliches Bestreben zu erkennen, den Gebrauch von Quecksilber stark zu reduzieren. Während die weltweiten Emissionen zwischen 1990 und 2000 um rund 20% zunahm, verringerten sich die Emissionen innerhalb der EU um etwa 60%. Die Europäische Kommission hat Anfang 2005 ein gemeinschaftliches Strategiepapier für die Quecksilberproblematik verabschiedet, in welchem 20 Maßnahmen zur Emissionsminderung beschlossen wurden (EU-Kommision 2005). Das momentane Weltmarktvolumen des Quecksilbers wird auf 3600 Tonnen beziffert. Der weltweit größte Quecksilberlieferant, das staatseigene spanische Unternehmen MAYASA, liefert ca. 1000 Tonnen Quecksilber pro Jahr. Dabei handelt es sich zum größten Teil um Überschussquecksilber der Chlor-Alkaliindustrie. Der Bergbau zur Förderung und Produktion von Quecksilber wurde von der MAYASA 2004 eingestellt und wird vermutlich nicht mehr aufgenommen werden, da zukünftig ausreichend Quecksilber auf dem Weltmarkt vorhanden sein dürfte bzw. aufbereitetes Quecksilber durch bevorstehende Stilllegungen von Chlor-Alkali-Anlagen angeboten werden wird.

Aufgrund der einzigartigen physikalischen, chemischen und technologischen Eigenschaften und wegen des niedrigen Marktpreises von Quecksilber werden Quecksilber und Quecksilberverbindungen vielfältig verwendet. Bis heute wurden für viele dieser Anwendungen noch keine Ersatzstoffe gefunden.

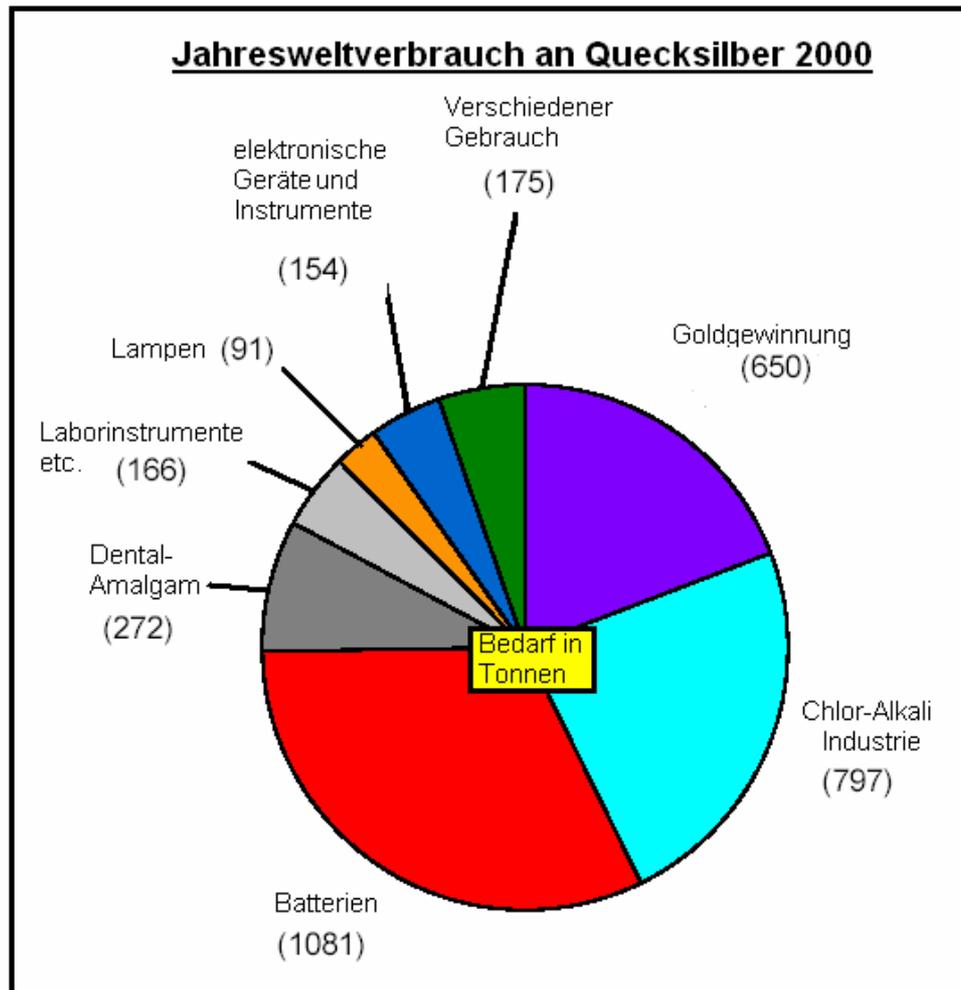


Abbildung 2.2 Jahresverbrauch an Quecksilber im Jahr 2000  
Daten aus (Europäische Kommission 2004)

Die Abbildung 2.2 zeigt den weltweiten Verbrauch an Quecksilber im Jahr 2000. Dabei ist der größte Anteil am Jahresweltverbrauch auf die Verwendung von Quecksilber als Bestandteil von Batterien zurückzuführen.

Obwohl seit Mitte des Jahres 2001 der Verkauf von Quecksilberoxid-Zellen (bis zu 40% Quecksilbergehalt) verboten ist, dürfen nach §13(1) Batterienverordnung, **Batterien** noch 0,0005 % und Knopfzellen bis zu 2 % Quecksilber enthalten. Das Umweltbundesamt nahm für das Jahr 2001 eine Rücknahmekquote bei Knopfzellen (inkl. Quecksilberoxid-Zellen) von etwa 10 % an. Da im Jahr 2001 ca. 21 Tonnen (t)

dieser Batterien verkauft wurden, ist der Verbleib von rund sechs Tonnen Quecksilber ungeklärt (Umweltbundesamt 2002).

Der zweitwichtigste Verbraucher von Quecksilber ist die **Chlor-Alkali-Industrie**.

Dabei wird Quecksilber als Bestandteil der Kathode bei der Chlor-Alkali-Elektrolyse verwendet. Neue Anlagen arbeiten nach dem quecksilberfreien Membranverfahren, doch erfolgt der Umstieg auf diese umweltschonende Technologie eher zögerlich: 1998 lag der Anteil der Anlagen innerhalb der EU, die nach dem Prinzip der Chlor-Alkali-Elektrolyse arbeiten, bei 65%. Bis November 2006 ist dieser Anteil auf etwa 50% gesunken und soll im Jahr 2010 bei unter 35% liegen. Erst 2020 werden alle Anlagen der Chlorindustrie (Umsatz der Chlorindustrie 2006: 240 Milliarden €) ohne Quecksilber auskommen (EUROCHLOR Pressemitteilung 2006). In der EU ist die Chlor-Alkaliindustrie auch der größte Eigner von Quecksilber. Aufgrund der Umstellung des Herstellungsverfahrens von Chlor und der Vorgaben der EU-Kommission, die Ausfuhren von Überschussquecksilber aus der EU bis 2011 zu stoppen, ist damit zu rechnen, dass in Zukunft große Mengen Quecksilber durch Einlagerung in Salzstöcken etc. - und falls möglich durch andere Beseitigungsstrategien - aus dem Verkehr gezogen werden.

Der weltweit freie Handel mit elementarem Quecksilber und vor allem der sehr niedrige Preis von etwa 5 €/kg Quecksilber macht noch immer die Verwendung im **Goldbergbau** attraktiv. Dabei wird die amalgamierende Wirkung des Quecksilbers genutzt, um feinste Goldpartikel mit dem Quecksilber als Amalgam zu binden. Das erhaltene Quecksilberamalgam wird anschließend im Freien so stark erhitzt, dass das Quecksilber verdampft und nur noch das Gold übrig bleibt. Dabei werden erhebliche Mengen Quecksilberdampf freigesetzt. Nach Rodrigues (1997) sind für die Gewinnung von einem Kilogramm Gold zwischen 1,3 - 2,0 Kilogramm Quecksilber zur Amalgamierung und Extraktion notwendig. Diese Menge wird bei der beschriebenen Goldgewinnung vollständig in die Atmosphäre emittiert. In Gebieten, in denen diese Methode der Goldgewinnung praktiziert wird, wie beispielsweise dem Amazonasgebiet, werden entsprechend der gewonnenen Goldmengen sehr große Quecksilbermengen verbraucht bzw. freigesetzt. Als Folge sind langwierige Umweltschäden bzw. Belastungen der aquatischen Umwelt zu beobachten (Santos et al. 2000). Diese primitive Methode der Goldgewinnung wird entsprechend häufig in unterentwickelten Regionen, meist ohne Kenntnisse der Gefahren für Mensch und

Umwelt und den Konsequenzen für die eigene Lebensgrundlage, durchgeführt (Maydl 2004 Dissertation). Längerfristig wird so regional emittiertes Quecksilber weiträumig verteilt, so dass auch regional begrenzte - jedoch großskalige Emissionen - den globalen Quecksilber-Gesamtpool beeinflussen.

Quecksilberamalgam findet außerdem seit Langem weltweite Verbreitung in der Verwendung als **Dentallegierung**. Dabei wird die Eigenschaft des Quecksilbers, mit verschiedenen Metallen (in Zahnfüllungen meist Kupfer, Silber, Zink und Indium) plastisch verformbares Amalgam zu bilden, ausgenutzt, um Zahnfüllungen herzustellen. Diese Zahnfüllungen besitzen eine lange Haltbarkeit und wirken der Ausbreitung weiterer kariöser Zahnzerstörung vorbeugend entgegen. Dabei wird die Vermehrung von Bakterien durch die bakteriziden Wirkungen der Metalle des Amalgams reduziert.

Die Verwendung von Quecksilber in der **Medizin** wurde schon 1527 durch Paracelsus beschrieben. Dabei wurde sogenannte graue Salbe (Verreibungen von Quecksilber oder Quecksilberoxid) zur Behandlung von Syphilis eingesetzt. Die Verwendung dieser Salbe verursachte bei den Erkrankten die typischen Symptome einer Quecksilbervergiftung. Neueste Studien diskutieren, ob die degenerativen Erscheinungen, die soziale Isolation und der Rückgang der künstlerischen Aktivität am Ende von Shakespeares Leben mit einer Erkrankung an Syphilis zusammenhing oder die Behandlung mit „grauer Salbe“ zu den o.g. typischen Symptomen einer Quecksilbervergiftung führte (Ross 2005).

Die stark keimhemmende Wirkung des Quecksilbers wird auch bei der Verwendung von quecksilberhaltigen **Desinfektionsmitteln** (Mercurochrom®) noch heute genutzt. Diese enthalten teilweise bis zu 30 % Quecksilber. Mercurochrom® ist noch immer im Einsatz, wurde jedoch teilweise schon durch quecksilberfreie Desinfektionsmittel ersetzt.



Abbildung 2.3: Strukturformeln von  
 Mercuriochrom®  
 2,7-Dibrom-4-(hydroxomercurio)-fluorescein-  
 Dinatriumsalz

und

Thiomersal  
 2-(Ethylmercuriothio)-benzoesäure-  
 Natriumsalz

Thiomersal ist ein organisches Quecksilbersalz, das als Konservierungsstoff in verschiedenen äußerlich angewandten Medikamenten (z.B. Augentropfen) und in einigen **Impfstoffen** (z.B. Tetanus) eingesetzt wird. Die Grundimmunisierung von Kleinkindern wird teilweise mit vielen Einzelpräparaten durchgeführt. Deshalb wird diskutiert, ob die Verwendung von Thiomersal zu neuronalen Schäden bei Kleinkindern führen kann (Burbacher et al. 2005). In der Bundesrepublik werden zunehmend thiomersalfreie Impfstoffe eingesetzt oder es wird auf Kombinations-Impfpräparate zurückgegriffen, so dass die Belastung in diesem für Quecksilberexposition sehr sensible Alter minimiert wird. Mutter et al. (2006) kommen zu dem Schluß, dass Thimerosal enthaltende Impfstoffe für genetisch bedingt anfällige Individuen einen potentiell pathogenen Faktor für Autismus darstellt.

**Leuchtstoffröhren, Energiesparlampen** und **Quecksilberhochdrucklampen** enthalten ebenfalls elementares Quecksilber. Bei der Herstellung einer Energiesparlampe werden ca. 7 mg elementares Quecksilber eingesetzt. Das Öko-Institut Freiburg kommt in einer aktuellen Studie (2005) zu dem Schluss, dass durch den geringeren Strombedarf einer Energiesparlampe innerhalb der Lebensdauer insgesamt weniger Quecksilber freigesetzt wird als bei einer herkömmlichen Glühlampe. Dabei wird das durch Stromerzeugung freigesetzte Quecksilber berücksichtigt. Die Verwendung von Quecksilberdampf in der Lampentechnik bietet zahlreiche technologische Vorteile gegenüber der Verwendung anderer Metalle. Bei dieser Anwendung ist vor allem der niedrige Schmelzpunkt und der hohe Dampfdruck des Quecksilbers von technischer Bedeutung.

**Blutdruckmessgeräte** und **Barometer** älterer Bauart enthalten ebenso wie **Präzisionsthermometer** Quecksilber. Die Thermometer basieren auf dem zur

Temperatur direkt proportionalen Wärmeausdehnungskoeffizienten des Quecksilbers. Noch heute werden im chemischen Labor solche Thermometer eingesetzt. Auch quecksilberhaltige Fieberthermometer sind aufgrund der langen Lebensdauer noch nicht restlos durch elektronische Messgeräte ersetzt worden und in vielen Haushalten noch immer in Benutzung. Weiterhin werden Quecksilberschalter als elektronisches Bauteil in Bewegungssensoren eingesetzt. In chemischen Laboratorien wird Quecksilber als Sperrflüssigkeit vor allem für Schutzgase eingesetzt. Zinnober (HgS) wird bis heute als rotes Pigment in der Malerei verwendet.

Die europäische Kommission schätzt den Anteil des Quecksilberverbrauches für elektronische Geräte auf 22 % des Gesamtverbrauches (Kommission der europäischen Gemeinschaften (2000)).

Die Verwendung von Quecksilberverbindungen in der Landwirtschaft als **Saatbeizmittel** und als **Schädlingsbekämpfungsmittel** ist in den vergangenen Jahren stark zurück gegangen, jedoch noch nicht vollständig eingestellt worden.

Quecksilberfulminat ( $\text{Hg}(\text{CNO})_2$ ) wurde vor allem im 1. Weltkrieg als **Initialsprengstoff** sowie zur Herstellung von Zündhütchen für Patronen verwendet. Bei der Detonation von Quecksilberfulminat wird elementares Quecksilber emittiert. Während der beiden Weltkriege war ein Anstieg der Quecksilberkonzentrationen in der Luft zu erkennen (siehe Abbildung 2.4, Schuster et al. 2002). Neben vermehrter Verbrennung fossiler Brennstoffe oder geologischer Prozesse kann auch die vermehrte Verwendung von Quecksilberfulminat eine Ursache für diesen Anstieg sein.

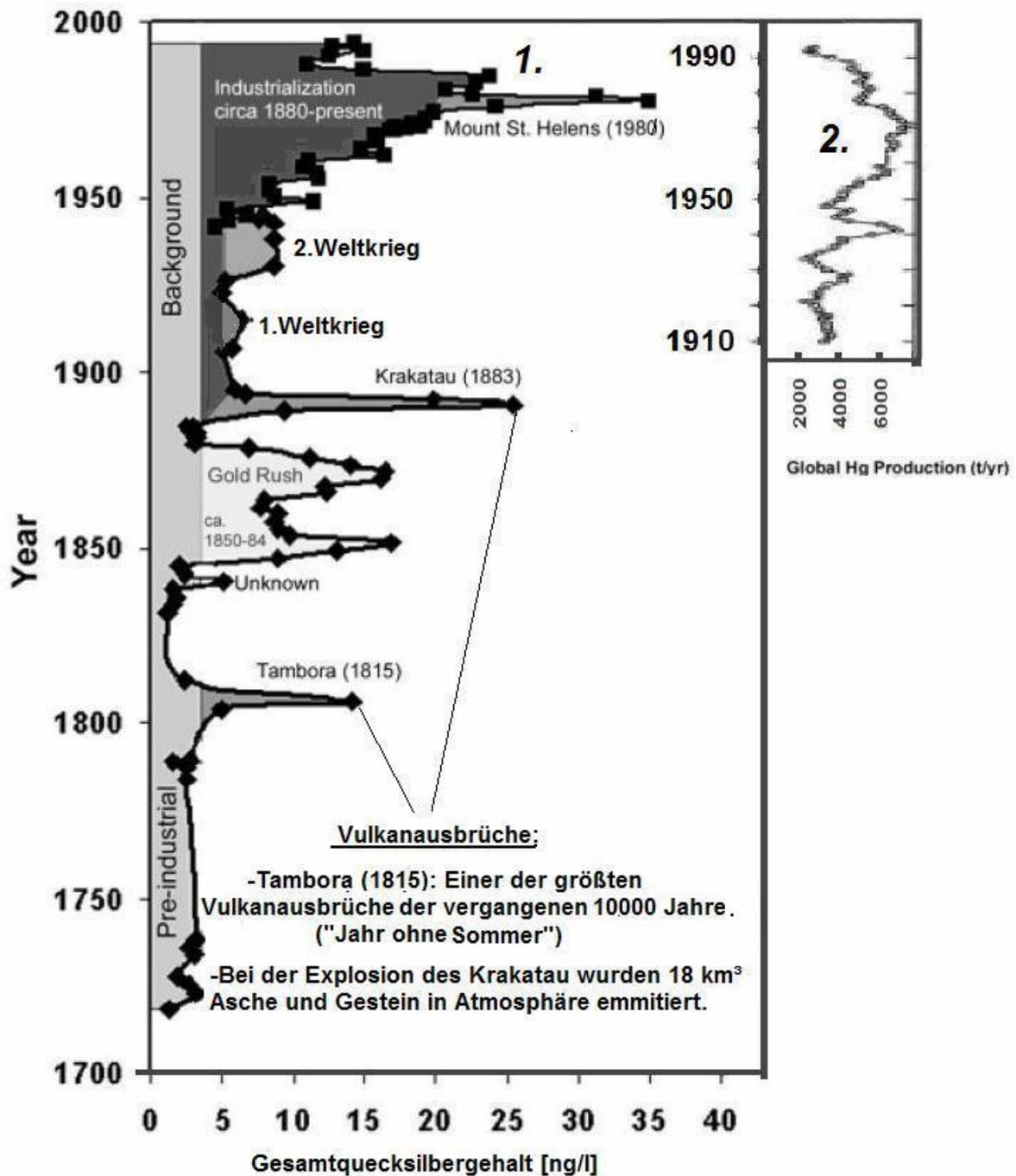


Abbildung 2.4: Dargestellt ist der historische Verlauf der Quecksilberkonzentration (1.) im Schmelzwasser des Gletschereises in Nordamerika (Upper Fremont Glacier) und die weltweite Jahresproduktion (2.) von Quecksilber von 1910 bis 1990. (Entnommen aus Schuster et al. (2002); teilweise modifiziert)

Die Abbildung 2.4 veranschaulicht exemplarisch den historischen Verlauf der Quecksilberkonzentration im Schmelzwasser des Gletschereises in Nordamerika (Upper Fremont Glacier). Ereignisse wie große Vulkanausbrüche (1815, 1883, 1980), der Goldrausch und die Weltkriege sind durch deutliche Anstiege der Quecksilberkonzentration gekennzeichnet. Schuster et al. (2002) beziffern den Anteil

der Gesamtquecksilberbelastung während der vergangenen 270 Jahre der auf Vulkanausbrüche zurückzuführen ist, auf 6%.

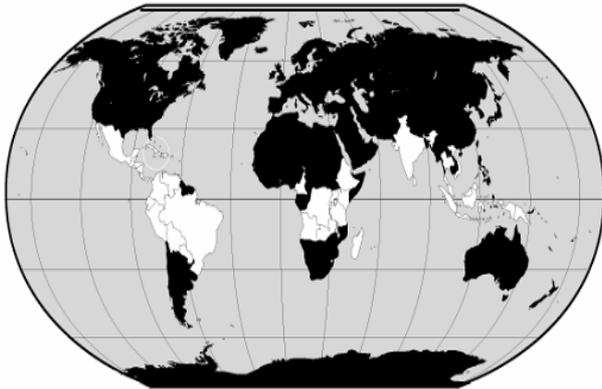
Durch die vielfältigen Einsatzmöglichkeiten von Quecksilber und Quecksilberverbindungen und die weit verbreitete - nicht fachgerechte - Entsorgung von Batterien, Knopfzellen und o.g. technischen Geräten über den Hausmüll, stellt auch die **Verbrennung von Hausmüll** eine nennenswerte innerstädtische Expositionsquelle von Quecksilber dar. Deshalb werden für Müllverbrennungsanlagen Maximalwerte des Quecksilberausstoßes festgelegt.

## **2.2 Quecksilber und Quecksilberverbindungen in der Umwelt**

### 2.2.1 Globaler Quecksilberkreislauf

In der Atmosphäre liegt der größte Teil des Quecksilbers als elementares Quecksilber  $\text{Hg}^0$  vor. Das elementare Quecksilber ist leichtflüchtig, relativ schlecht wasserlöslich und verbleibt aufgrund seiner geringen chemischen Reaktivität lange in der Atmosphäre (Ebinghaus et al. 2002). Durch diese lange Verweildauer wird es weltweit in der Erdatmosphäre transportiert. So kommt es zum Quecksilbereintrag in Regionen, die weit entfernt von anthropogen beeinflussten Gebieten liegen. Werte für die global freigesetzten natürlichen und anthropogenen Mengen schwanken und sind daher schwer abzuschätzen: Fitzgerald (1989) schätzt, dass jährlich 2000 t Quecksilber in der Atmosphäre anthropogenen Ursprungs sind, während die natürlichen Einträge jährlich etwa 4000 t betragen. Nach einer von der Oslo- und Paris-Kommission zum Schutz der Meeresumwelt des Nordostatlantiks (OSPAR) veröffentlichten Studie werden 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  $1,9 \times 10^{-9} \text{g m}^{-3}$ . Dieser stimmt relativ gut mit den Messwerten von  $1-2 \times 10^{-9} \text{g m}^{-3}$  überein, 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 2.1 zusammengestellt.

Tabelle 2.1: 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°N	0,077	0,0114
30-70°N	0,88	1,80
10-30°N	1,08	2,26
10° N-10°S	0,54	1,44
10-30°S	0,47	1,1
30-70°S	0,43	0,97
70-90°S	0,015	0,037

Die geschätzten Einträge von Quecksilber in die Atmosphäre durch Verflüchtigung (evasional flux) aus verschiedenen Meeresgebieten gibt Tabelle 2.2 wieder.

Tabelle 2.2: Zusammenstellung über geschätzte, aus dem Meer in die Atmosphäre austretende Quecksilbermengen (evasional flux)

Gebiet	Verflüchtigung (Evasional Flux ) ( $\times 10^{-9} \text{ g m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ )	Referenz
Nordatlantik	$15,8 \pm 10,8$	Mason et al. 1998
Äquatorialer Pazifik	1,33 – 12	Mason und Fitzgerald 1993a,b
Nordpazifik	0,25	Mason und Fitzgerald 1996a
Nordsee (gesamt)	0,92 - 1,83	Coquery and Cossa 1995
Zentrale Nordsee	1,23	Leermakers et al. 1997
Nordsee (Southern Bight)	0,88 - 2,17	Baeyens und Leermakers 1998
Ostsee (durchschnittlicher Sommer)	1,58	Wängberg et al. 2001
Ostsee (durchschnittlicher Winter)	0,83	Wängberg et al. 2001
Mittelmeerseewasser (Sommer)	10-13	Ferrara R. 2001
Mittelmeerseewasser (Winter)	0.7-2.0	Ferrara R. 2001

Zwischen der Erdatmosphäre (Troposphäre) und den Ozeanen wird Quecksilber ständig ausgetauscht. So entsteht ein Kreislauf des Quecksilbers zwischen den Ozeanen und der Atmosphäre. Diese Menge wird als Quecksilberpool bezeichnet. Mason et al. (1994a) und Fitzgerald et al. (2005) schätzen, dass sich infolge dieses Austausches und der vermehrten anthropogenen Quecksilberemissionen der Quecksilbergehalt der Meere in den zurückliegenden 150 Jahren von  $0,1 \times 10^{-9} \text{g l}^{-1}$  auf  $0,3 \times 10^{-9} \text{g l}^{-1}$  in etwa verdreifachte. Die von verschiedenen Arbeitsgruppen im Wasser der Ozeane gemessenen Quecksilbergehalte lagen zwischen 0,1 und  $1 \times 10^{-9} \text{g l}^{-1}$  (Schmidt und Dicke 1990, Mason und Fitzgerald 1993b, 1996; Heyer et al. 1994, Kammann et al. 1994, Mason et al. 1995b, 1998; Baeyens und Leermakers 1998). Für die Deutsche Bucht wurden 2003 im Mittel  $0,63 \times 10^{-9} \text{g l}^{-1}$  ermittelt. In den äußeren Bereichen der ausschließlichen Wirtschaftszone (AWZ) betrug die durchschnittlich ermittelte Konzentration  $0,25 \times 10^{-9} \text{g l}^{-1}$  (BSH 2005). Die Abbildung 2.5 zeigt vereinfacht den heutigen sowie den vorindustriellen Quecksilberkreislauf.

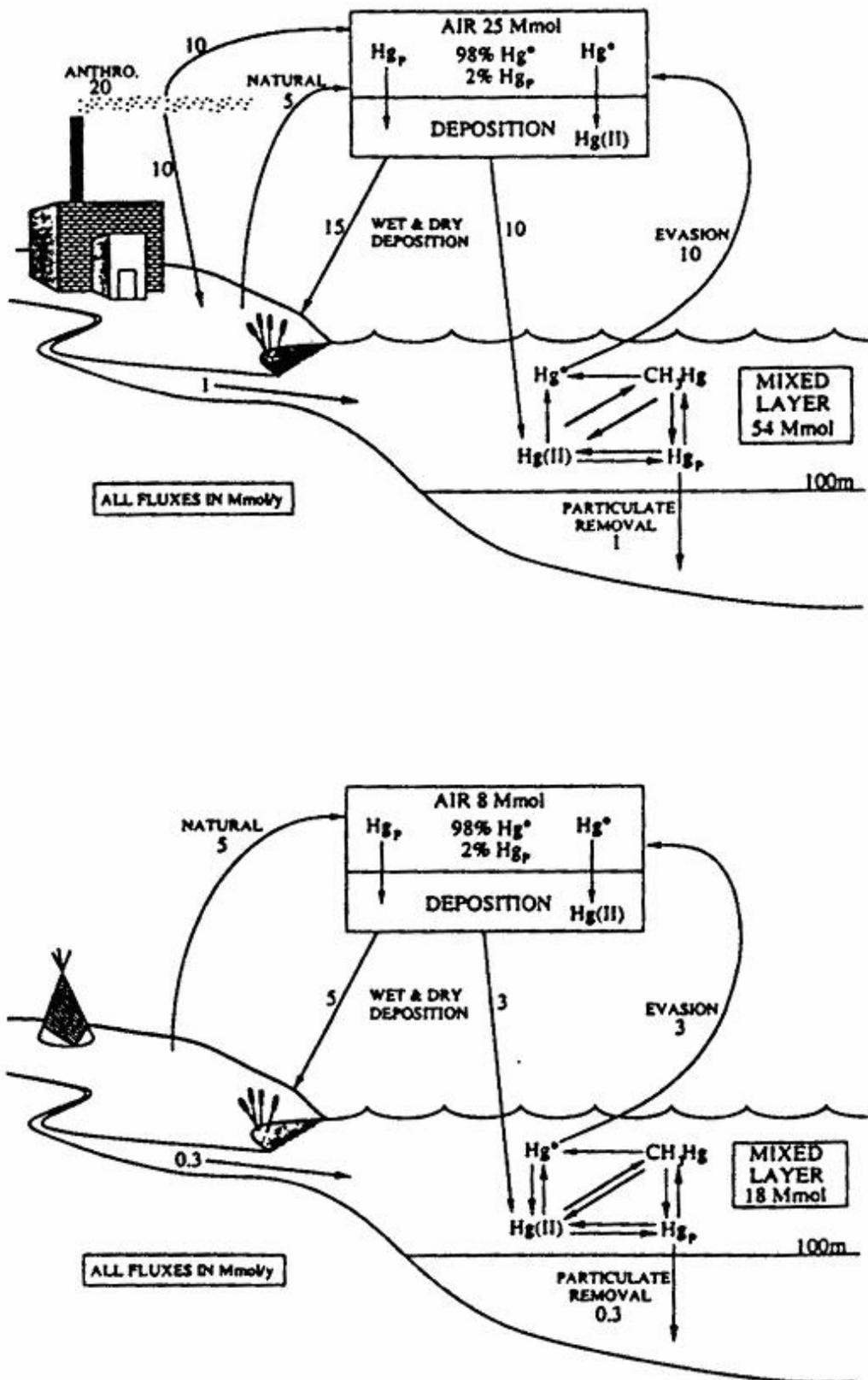


Abbildung 2.5: Gegenwärtiger und vorindustrieller Quecksilberkreislauf (entnommen aus Mason et al. 1994a).

Ein besonderes Phänomen ereignet sich jedes Jahr in den Polarregionen zu Beginn des polaren Frühlings. Erstmals berichteten Schroeder et al. 1998 von den sogenannten mercury depletion events (MDE). Schroeder et al. (1998) stellten während dieser Ereignisse einen Rückgang der Quecksilberkonzentration in der Luft der Arktis von etwa 1,4-1,5 ng/m<sup>3</sup> auf teilweise <0,1pg/m<sup>3</sup> (unterhalb der Nachweisgrenze der Methode) fest. Gleichzeitig steigen die Quecksilberkonzentrationen im Schnee stark an. Dieses Ereignis tritt periodisch in den ersten Monaten nach den polaren Sonnenaufgängen auf. Mittlerweile wurde dieses Phänomen auch in der Antarktis beobachtet. Ebinghaus et al. (2002) nehmen an, dass Ozon und Brom- und / oder Bromoxidradikale an diesen Ereignissen maßgeblich beteiligt sind. Diese außergewöhnlichen Erscheinungen und die Tatsache, dass diese erst vor wenigen Jahren entdeckt wurde, können als Beleg dafür angesehen werden, dass trotz der intensiven Forschung längst noch nicht alles über den komplexen globalen Quecksilberkreislauf bekannt ist.

### 2.2.2 Biotransformation des Quecksilbers

An den Austauschprozessen zwischen Erdatmosphäre und Ozeanen sind verschiedene chemische Formen (= Spezies) des Quecksilbers beteiligt. Die dominierenden Spezies sind das elementare Quecksilber (Hg<sup>0</sup>), anorganisches Quecksilber (Hg<sup>2+</sup>) und die Organometallverbindungen Monomethylquecksilber (CH<sub>3</sub>Hg<sup>+</sup>) und Dimethylquecksilber (CH<sub>3</sub>HgCH<sub>3</sub>). Es gibt zahlreiche Untersuchungen zur Aufklärung der Mechanismen, nach denen Quecksilber in einem natürlichen Prozess in seine verschiedenen Spezies umgewandelt (biotransformiert) wird (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, 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). Vor allem zwei von Sulfat-reduzierenden Bakterien gesteuerte Mechanismen scheinen bei der Biotransformation im Wasser bzw. in Sedimenten wirksam zu werden. Beim ersten wird Hg<sup>2+</sup> aus HgS durch Oxidation des Sulfids über Sulfid zum Sulfat löslich gemacht. Anschließend wird Hg<sup>2+</sup> durch Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (NADH) zu

$\text{Hg}^0$  reduziert, dessen Dampfdruck so hoch ist, dass es in die Gasphase (d.h. in die Atmosphäre) übergehen kann.

Beim zweiten Mechanismus wird  $\text{Hg}^{2+}$  zu Monomethyl- und Dimethylquecksilber methyliert. Dabei wird angenommen, dass beim Acetyl-Coenzym-A-Stoffwechsel Methylcorrinoide (Methyl-Vitamin-B<sub>12</sub>) als Überträger der CH<sub>3</sub>- Gruppe auf  $\text{Hg}^{2+}$  dienen.

Neue Untersuchungen von Ekstrom et al. 2003 zeigen hingegen, dass auch Bakterien, die diesen Stoffwechselweg genetisch bedingt nicht nutzen können, in der Lage sind, MeHg zu bilden. Der genaue Mechanismus der Bildung von MeHg aus  $\text{Hg}^{2+}$  durch Bakterien kann demnach als noch nicht vollständig geklärt angesehen werden. Dass Bakterien die Methylierung von Quecksilber bewirken, gilt jedoch als hinreichend gesichert.

Die gebildete organische Quecksilberverbindung Dimethylquecksilber ist flüchtig, gelangt in die Atmosphäre und kann dort durch die UV-Strahlung photolysiert oder durch Oxidation zu  $\text{Hg}^0$ ,  $\text{Hg}^{2+}$  oder  $\text{MeHg}^+$  umgewandelt werden (Fitzgerald 1989). 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.

Pongratz und Heumann (1998) fanden hohe Gehalte an Organoquecksilberverbindungen in abgelegenen Regionen der Ozeane mit hoher biologischer Aktivität (Süd-Atlantik, Arktis, Süd-Pazifik). In Modellexperimenten konnte die Bildung von Methylquecksilber durch polare Makroalgen belegt werden. Der Einfluss von gelöstem organischem Material (DOM = dissolved organic matter) ist ein entscheidender Parameter, der für die Bioakkumulation von MeHg verantwortlich ist (Ravichandran 2004). Dabei ist vor allem der Gehalt an schwefelhaltigen funktionellen Gruppen in der gelösten organischen Substanz von großer Bedeutung. Die Bindungskonstanten zwischen Quecksilber und Schwefel hängen wesentlich von der Oxidationsstufe des enthaltenen Schwefels ab. So werden beispielsweise für Schwefel in der Oxidationsstufe +6 (als Sulfat) Stabilitätskonstanten des Komplexes zwischen  $\text{Hg}^{2+}$  und  $\text{SO}_4^{2-}$  von  $10^{1,3}$  angegeben, während für den Komplex zwischen  $\text{Hg}^{2+}$  und reduziertem  $\text{S}^{2-}$  Stabilitätskonstanten von  $10^{52,4}$  angegeben werden. Xia et al. (1998) haben mittels XANES (X-ray absorption near edge structure) - der Nahkantenspektroskopie durch Röntgenstrahlung - den Anteil des reduzierten Schwefels innerhalb der gelösten

organischen Substanz in einem Fluß in Florida mit 46-35% beziffert. Der Gesamtgehalt an Schwefel innerhalb der DOM beträgt zwischen 0,5-2%. Der genaue Einfluss der gelösten organischen Substanz im marinen System ist von sehr komplexer Natur, da viele Parameter wie pH-Wert, Redoxpotential, Temperatur und Komplexierungsreaktionen die Methylierung von Quecksilber beeinflussen. Als gesichert wird angesehen, dass gelöste organische Substanzen die Bioverfügbarkeit von Quecksilber für Mikroorganismen wesentlich beeinflussen (Ravichandran 2004).

Ebinghaus et al. (1994) konnten auch eine Transmethylierung von anorganischem Quecksilber durch andere Organometallverbindungen zeigen. Innerhalb von 168 Stunden methylierte beispielsweise Trimethylbleichlorid in 10-fachem Überschuss in steriler Lösung dabei 100% des zugegebenen  $\text{Hg}^{2+}$  zu MeHg. Siciliano et al. (2005) diskutieren zudem die Bildung von MeHg aus DOM unter dem Einfluss von UV-Licht.

### 2.2.3 Bioakkumulation/Biomagnifikation: Methylquecksilber in der marinen Nahrungskette

In der Fachliteratur ist vielfach die Bioakkumulation von MeHg innerhalb der marinen Nahrungskette nachgewiesen worden (Von Burg und Greenwood 1991; Bloom 1992; Suedel et al. 1994, Campbell et al. 2005). Höhere Lebewesen scheinen keinen effektiven Entgiftungsmechanismus für die Beseitigung von hohen Belastungen mit Hg oder Methylquecksilber zu besitzen.

Am Beginn der marinen Nahrungskette steht das Bakterio-, Phyto- und Zooplankton. Kainz und Mazumder (2005) konnten durch Untersuchungen unterschiedlicher Fraktionen des Phytoplanktons bereits auf der niedrigsten trophischen Stufe der marinen Nahrungskette, eine Zunahme des Methylquecksilbergehaltes in Abhängigkeit von der Planktongröße feststellen. Dabei wurde das Plankton aufgrund seiner Größe in Seston- (10-64  $\mu\text{m}$ ), Mikro- (100-200  $\mu\text{m}$ ), Meso- (200-500  $\mu\text{m}$ ) und Makrozooplankton (>500  $\mu\text{m}$ ) eingeteilt. Die dabei ermittelten Gehalte von Methylquecksilber stiegen als Funktion der Größe des Planktons an. Für das Sestonplankton wurden Gehalte von 4-48  $\mu\text{g}/\text{kg}$  Trockengewicht ermittelt, die sich kontinuierlich bis zum Makrozooplankton auf 94-240  $\mu\text{g}/\text{kg}$  Trockengewicht erhöhten. Die Autoren stellten dabei ausserdem fest, das Phytoplankton Methylquecksilber deutlich effektiver akkumuliert als Bakterien oder Algen. Mason et al. (1995a, 1995c) zeigten, dass auf der unteren Ebene des marinen Nahrungsnetzes anorganisches

Quecksilber und Monomethylquecksilber durch das Phytoplankton aufgenommen und etwa um den Faktor  $10^5$  bis  $10^6$  gegenüber dem Wasser angereichert (biokonzentriert) werden.

Zahlreiche Veröffentlichungen (Von Burg und Greenwood 1991; Bloom 1992; Suedel et al. 1994, Baeyens et al. 2003) belegen den weiteren Anstieg der Methylquecksilbergehalte von Fischen in Abhängigkeit der trophischen Ebene. Innerhalb des marinen Nahrungsnetzes werden Quecksilberverbindungen schrittweise weiter angereichert, wobei sich gleichzeitig der Anteil des Monomethylquecksilbers am Gesamtquecksilber von  $< 1\%$  bis zu etwa  $10\%$  auf der Ebene des Phytoplanktons und 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). Besonders stark sind Haie von der Akkumulation betroffen. Für Katzenhaie (*Scyliorhinus canicula*) aus der Nordsee wurden durchschnittliche Methylquecksilbergehalte von  $0,61\text{mg/kg}$  festgestellt. Ob diese hohen Werte alleine auf die Ernährung der Haie oder durch den speziellen Stoffwechsel der Knorpelfische zurückzuführen ist, ist nicht klar. Ähnliche hohe Werte werden auch auf der höchsten trophischen Ebene der marinen Nahrungskette, den Meeresäugern, gefunden. Joiris R.C. et al (2001) stellte bei der Untersuchung von Schweinswalen Methylquecksilbergehalte von  $0,51\text{mg MeHg /kg}$  Muskelfleisch fest.

Der Tabelle 2.3 lassen sich die Durchschnittsgehalte von Quecksilber und Methylquecksilber in marinen Organismen entnehmen.

Tabelle 2.3 : Quecksilber in pflanzlichen und tierischen Organismen verschiedener Regionen des Atlantischen Ozeans sowie der Nord- und Ostsee (Gesamtquecksilbergehalte bezogen auf Trockensubstanz). Auszugsweise entnommen aus: Von Burg und Greenwood 1991; Bloom 1992; Suedel et al. 1994;

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, Sprotte, Kliesche)	30-4.300	95
Thunfisch	150-7.500	98
Muskelgewebe	30-6.100	98
Meeressäugetiere (Leber)	500 > 10.000	<<98*)

\*) Anreicherung des MeHg in der Leber variabler als im Filet, vermutlich findet eine Demethylierung in der Leber statt.

Alle bisher an Meerestieren durchgeführten Untersuchungen zeigen, dass sich Monomethylquecksilber vor allem an schwefelhaltige funktionelle Gruppen im Eiweiß des Muskelgewebes und der inneren Organe bindet und so akkumuliert wird. Hier findet das  $\text{CH}_3\text{Hg}^+$ -Kation aufgrund seiner Neigung, mit nukleophilen Liganden stabile Komplexe zu bilden, ausreichend Bindungspartner. Harris et al. (2003) zeigten mit Hilfe der Röntgenabsorptionsspektroskopie, dass Methylquecksilber in Fischfilet zum größten Teil als Cysteinkomplex vorliegt.

Nach Rabenstein (1978) kann  $\text{CH}_3\text{Hg}^+$  mit solchen Stoffen veränderliche Bindungen eingehen, die mehrere reaktive Gruppen enthalten. So verbindet sich  $\text{CH}_3\text{Hg}^+$  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 mit Glycin zu  $\text{CH}_3\text{HgNH}_2^+\text{CH}_2\text{CO}_2^-$  (Assoziation mit der Aminogruppe).

## 2.3 Toxizität

### 2.3.1 Toxikinetik

Im Gegensatz zu anderen Spurenelementen wie z.B. Selen oder Chrom, die in definierter Spezies und in definierten Konzentrationsbereichen für Stoffwechselforgänge essentiell sind, wirkt Quecksilber stets toxisch auf den Organismus und hat (bis auf seine hohe Toxizität) keine physiologische Bedeutung für den Menschen (Salonen et al. 1995). Insofern ist es nicht mit anderen Spurenelementen vergleichbar.

Entscheidend für die toxischen Wirkungen der Quecksilber-Spezies sind:

1. die Löslichkeit der Verbindung und damit der Anteil, der über die Haut, den Gastro-Intestinaltrakt oder die Lunge aufgenommen wird,
2. die Verweildauer innerhalb des Körpers,
3. die Verteilung innerhalb des Körpers und die unterschiedlichen Wirkungen auf unterschiedliche Zielorgane,
4. Komplexierung der Verbindungen durch chemische Reaktionen,
5. mögliche Reaktionsprodukte durch Umwandlungen innerhalb der Organe,
6. die genetische Veranlagung, Quecksilber enzymatisch eliminieren zu können (Mutter et al. 2006).

### 2.3.2 Elementares Quecksilber

Flüssiges elementares Quecksilber, oral aufgenommen, wird fast vollständig (>99,99%) wieder ausgeschieden und führt deshalb kaum zu toxisch wahrnehmbaren Wirkungen. Dieses kann durch eine praktisch unlösliche HgS-Schicht (Löslichkeitsprodukt  $3,00 \times 10^{-54}$  bei 18°C) erklärt werden, die das flüssige elementare Quecksilber überzieht. Dagegen wird inhalativ aufgenommener elementarer Quecksilberdampf zu 80% über die Lunge resorbiert. Davon wiederum gehen etwa 80% direkt in das Blut über, der Rest verbleibt im Lungengewebe (Marquardt 1997). Das so aufgenommene elementare Quecksilber verteilt sich, bedingt durch seine lipophilen Eigenschaften, gleichmäßig im gesamten Körper und kann die Blut-Hirnschranke passieren. Diese Eigenschaft des elementaren Quecksilberdampfes führte zu zahlreichen kontroversen Diskussionen über die Verwendung von Amalgamen als Dentallegierung (Mutter et al. 2004). In

Dentalamalgamen liegt das Quecksilber ebenfalls elementar vor, und eine Belastung des Menschen erfolgt durch stetiges Einatmen messbarer Mengen Quecksilberdampfes. Abrieb durch Zahnbürsten, das Kauen von Nahrung und Kaugummis, Freisetzungen aufgrund elektrochemischer Reaktionen in der Mundhöhle und besonders das Entfernen von Plomben fördert die Freisetzung von Quecksilberdampf aus der Zahnfüllung zusätzlich (Mutter et al. 2004).

In vielen Ländern wird ein Verbot der Verwendung von Amalgamen diskutiert. Durch die Einwirkung von Katalase und von Wasserstoffperoxid kann  $\text{Hg}^0$  im Körpergewebe oder Hirn zu  $\text{Hg}^{2+}$  oxidiert werden, welches dann in als Reaktionspartner für Enzyme zur Verfügung steht und zu toxischen Wirkungen führen kann.

Die Halbwertsretentionszeiten im menschlichen Körper betragen für elementares Quecksilber 58 Tage. Die Ausscheidung erfolgt durch Abatmen und Ausscheidung durch Schweiß und Speichel, über Faeces und Urin sowie durch Ablagerungen in Haaren und Nägeln (Counter und Buchanan 2004).

#### 2.3.4 Anorganisches Quecksilber ( $\text{Hg}^{2+}$ )

Die direkte orale Aufnahme anorganischer Quecksilberverbindungen ist normalerweise ein eher seltenes Ereignis. Nennenswerte Dosen werden nur durch vorsätzliche Einnahme oder Unfälle erreicht. Die Resorption ist direkt proportional zu der Löslichkeit der entsprechenden Verbindung. Beispielsweise werden bei der Einnahme von Quecksilber-(II)-chlorid zwischen 2-15% der Menge durch den Gastrointestinaltrakt resorbiert. Die Akkumulation findet vor allem in der Niere statt. Normalerweise wird die Blut-Hirn-Schranke nicht passiert. Jedoch findet bei Neugeborenen und Säuglingen, bei denen die Blut-Hirn-Schranke noch nicht vollständig ausgebildet ist, auch eine Anreicherung im Gehirn statt. Die Halbwertszeit der Elimination beträgt 1-2 Monate. Im Körper findet eine Umwandlung in organisches Methylquecksilber durch Bakterien des Verdauungssystems statt. Die Eliminierung erfolgt durch Abatmen und Ausscheidung durch Schweiß und Speichel, über Faeces und Urin sowie bei Frauen über die Milch beim Stillen (Counter und Buchanan, 2004).

#### 2.3.5 Organische Quecksilberverbindungen

Für den Menschen ist das mit der Nahrung aufgenommene MeHg die wichtigste Quelle für Quecksilberexpositionen. MeHg wird durch den Gastrointestinaltrakt zu

etwa 95% resorbiert (Marquard 1997, Counter und Buchanan 2004), ins Blut aufgenommen und mit diesem gleichmäßig im gesamten Körper verteilt. Methylquecksilber besitzt die Eigenschaft, die Blut-Hirn-Schranke sowie die Plazenta zu durchdringen. Im Gehirn wird es angereichert und langsam zum anorganischen Quecksilber(II)<sup>2+</sup> demethyliert. Dieses wiederum bindet kovalent an Sulfhydryl-Gruppen und inhibiert dann zahlreiche wichtige neuronale Enzymsysteme. Da die Blut-Hirn-Schranke nahezu undurchlässig für Hg<sup>2+</sup> ist, diffundiert nur ein sehr kleiner Teil ins Blut zurück. Dadurch kommt es zur Akkumulation von Hg<sup>2+</sup> im Hirn. Diese Eigenschaft erklärt die starke Neurotoxizität der organischen Quecksilberverbindungen.

Massenvergiftungen in Japan in der Minamata-Bucht in den fünfziger Jahren des 20. Jahrhunderts machten erstmals auf erschreckende Weise deutlich, wie gefährlich beispielsweise der Verzehr von Meerestieren mit hohen Methylquecksilberkonzentrationen ist. Von 1953 bis 1960 leitete ein Industriebetrieb, der Acetaldehyd aus Acetylen produzierte und dabei Quecksilber als Katalysator einsetzte, quecksilberhaltige Abwässer in die Minamata-Bucht in Japan ein. Der Quecksilber- und Methylquecksilbergehalt in den Fischen aus der Minamata-Bucht war infolge des Eintrages der Fabrik deutlich höher als in allen anderen Gewässern und erreichte Gehalte von bis 11 mg/kg Frischgewicht. Das eingeleitete Quecksilber lag zum großem Teil bereits als Methylquecksilber (Eto et al. 2002) vor oder wurde u.a. von Bakterien in Methylquecksilber umgewandelt und reicherte sich in den Fischen aus der Minamata-Bucht an. So gelangten durch antropogene Einleitungen letztlich ungewöhnlich große Mengen Quecksilber in das Meer und somit in die Nahrungskette der Menschen. Diese Umweltkatastrophe führte zu einer Massenvergiftung der ansässigen Bevölkerung, die sich in dieser Gegend traditionell hauptsächlich von Fisch ernährte. In den folgenden 36 Jahren wurde bei 2252 Menschen offiziell eine Methylquecksilbervergiftung diagnostiziert, 1043 von ihnen starben an den Folgen. Ein ähnlicher Vorfall ereignete sich 1965 am Agano Fluß bei Niigata, ebenfalls in Japan.

Der Vorfall in der Minamatabucht formte den Begriff "Minamata-Krankheit" (Minamata disease, kurz MD). Der Verlauf der "Minamata-Krankheit", die eigentlich als Vergiftung zu bezeichnen ist, ist von starken Schädigungen des Zentralnervensystems gekennzeichnet und führt häufig zum Tode.

Die, gemessen an der Anzahl der Betroffenen, schwerste je durch Quecksilber verursachte Vergiftung ereignete sich 1971-1972 im Irak. Der Grund dafür war der Verzehr von Brot, das aus Saatweizen gebacken wurde. Als Beizmittel für 90000 Tonnen Saatweizen wurde ein methylquecksilberhaltiges Fungizid verwendet (EPA 2001). Der Verzehr dieses Brotes führte aufgrund der hohen Konzentrationen schon nach kurzer Zeit zu schwersten Vergiftungsfällen. Nachträgliche epidemiologische Studien (1985) kamen zu dem Ergebnis, dass 50.000 bis 100.000 Menschen quecksilberexponiert waren. 2.000 Menschen sind infolge der Vergiftung verstorben. Die durchschnittliche tägliche Aufnahme an Quecksilberverbindungen betrug bei Erwachsenen 9-12 mg und bei Kindern 2,5 mg. Der von der WHO (Weltgesundheitsorganisation) empfohlene Wert von 1,6 µg/kg/Woche für die Aufnahme von Quecksilberverbindungen wurde so um mehr als das 200-fache überschritten.

1996 ereignete sich ein weiterer folgenschwerer Fall einer Intoxikation mit einer Organoquecksilberverbindung. Dieser Vorfall machte besonders deutlich, wie stark die Bindungsform bzw. Spezies des Quecksilbers die Giftigkeit bestimmt. Bei der Herstellung eines NMR-Standards gelangten 0,1 bis 0,5ml (0,6-1,6g) Dimethylquecksilber auf die Latex Handschuhe der Chemieprofessorin Dr. Karen Wetterhahn (Strasdeit 1998). Latex bietet jedoch keinen Schutz gegen Dimethylquecksilber, da dieses in Sekunden durch den Handschuh diffundiert. Das Dimethylquecksilber wird nahezu vollständig über die Haut resorbiert.

Dem Ereignis wurde zunächst keine Bedeutung beigemessen, so dass auch die ersten charakteristischen Symptome einer Schädigung der ZNS nicht entsprechend gedeutet und behandelt wurden. Fünf Monate nach diesem Vorfall zeigten sich jedoch deutliche Symptome einer Quecksilbervergiftung durch organische Quecksilberverbindungen. Die eingeleitete Therapie konnte nicht mehr verhindern, dass Frau Wetterhahn nach weiteren fünf Monaten verstarb (Blayney 2001).

Der typische zeitliche Verlauf einer solchen akuten Vergiftung ist durch eine Latenzperiode von mehreren Wochen bis Monaten gekennzeichnet (Marquard 1997), bevor die eigentlichen Symptome der Vergiftung auftreten. Dieser Umstand erschwert die Diagnose einer Vergiftung mit Organoquecksilberverbindungen.

Diese Vorfälle zeigten die starke Toxizität metallorganischer Verbindungen und führten zu verstärktem Interesse internationaler Forschung auf dem Gebiet der Speziesanalytik und der genauen Untersuchung des Verlaufes einer Intoxikation mit

Organoquecksilberverbindungen. Aufgrund der Vorfälle im Irak und in Japan ist die enorme akute Toxizität bei der Aufnahme großer Mengen an Methylquecksilber als hinreichend gesichert anzusehen, während mögliche toxische Effekte im Bereich niedriger Dosen noch immer umstritten sind.

### 2.3.3 Toxische Wirkungen

Eine **karzinogene** Wirkung von Methylquecksilber wird u.a. von Tamashiro et al. (1986) diskutiert. Die Autoren konnten bei MD Patienten eine gesteigerte Leberkrebsanfälligkeit feststellen. Kinjo et al. (1996) stellten bei der Untersuchung von 1351 Überlebenden der MD fest, dass diese ein erhöhtes Leukämie-Risiko aufweisen. In Tierversuchen fanden diverse Autoren keinen direkten Zusammenhang zwischen Langzeit-Exposition mit niedrigen Dosen von MeHg-Chlorid und der Bildung von Tumoren. Mitsumori et al. (1990) hingegen konnte durch die Verabreichung von hohen Dosen an MeHgCl bei männlichen B6C3F1-Mäusen gehäuft Nierentumore induzieren. Eine eventuelle Karzinogenizität von Methylquecksilber kann noch nicht als hinreichend gesichert angesehen werden, ist jedoch wahrscheinlich.

Eine mögliche **Mutagenität** von MeHg wird auf dessen 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).

**Genotoxische** Wirkungen von Quecksilber werden ebenfalls diskutiert, jedoch konnten diese weder durch Studien an Menschen, noch durch Tierversuche eindeutig verifiziert werden. Jedoch gibt es Indizien für dosisabhängige chromosomale Anomalien im Rückenmark von Mäusen durch die Gabe hoher Dosen von Quecksilberchlorid. Neueste Untersuchungen zeigten schon bei sehr niedrigen Konzentrationen (30 nM MeHg) an neuronalen Zellen **Apoptose** (Sakaue et al. 2005).

Die **Immunotoxische** Wirkung von Quecksilberverbindungen auf den Menschen ist bisher kaum untersucht worden, aber durch Tier- und *in-vitro* Versuche klar belegt. Shenker et al. (2000) wiesen immunotoxische Wirkungen durch Inkubation von humanen T-Zellen mit MeHgCl nach. Während für das ebenfalls untersuchte HgCl<sub>2</sub> ein LD<sub>50</sub> von 20µM ermittelt wurde, lag der LD<sub>50</sub>-Wert von MeHgCl mit 2,5µM signifikant niedriger. In Tierversuchen stellten Thompsen et al. (1998) durch die Gabe

von 3mg/l MeHgCl im Trinkwasser eine Veränderung der B- und T-Zellen sowie verringerte GSH-Konzentrationen in Splenozyten fest. Die pre- und perinatalen Wirkungen von MeHg auf das Immunsystem zeigten in Tierversuchen Veränderungen der Anzahl der weißen Blutkörperchen und andere für die Immunabwehr wichtigen Parameter (Ilbäck et al. 1991). Müller et al. (2001) konnten die Inhibition der Glutathione-S-transferase T1 durch Thiomersal belegen, wodurch der Fremdstoffmetabolismus gestört wird. In vitro hemmen Konzentrationen von Quecksilber und Thimerosal, wie sie einige Tage nach einer Impfung auftreten, die Methioninsynthetase (MS) um 50 %. Ein normales Funktionieren der Methioninsynthetase ist entscheidend für biochemische Schritte, die für die Hirnentwicklung, die Aufmerksamkeitsleistung und für die Produktion von Glutathion nötig sind, einem wichtigen antioxidativen und entgiftenden Agens (Mutter et al. 2006)

Gatti et al. (2004) konnten **cytotoxische** Wirkungen von MeHgOH in Konzentrationsbereichen feststellen, die durch lange andauernden Aufnahme auch niedriger Konzentrationen an Methylquecksilber auftreten können. Autoimmunreaktionen werden vor allem im Zusammenhang mit elementarem Quecksilber nach der Implementierung von Plomben diskutiert. Rowley und Monestier (2005) beschreiben mögliche Mechanismen der Bildung hochspezifischer Antikörper und der polyklonalen Aktivierung des Immunsystems als Reaktion auf subtoxische Quecksilberkonzentrationen.

Die **Niere** ist ein zentrales Zielorgan für toxische Effekte von Quecksilberexpositionen jeglicher Spezies (Zalups und Lash 1994, Zalups und Barfuss 1996). Innerhalb der Niere ist das *pars recta* des *Tubulus proximalis* besonders von den toxischen Effekten betroffen. Dieses wird durch die nukleophilen Eigenschaften der betroffenen Nierenzellen erklärt (Zalups 2000). Nach Zalups (2000) führt die starke Bindung zwischen Schwefel und Quecksilber dazu, dass insbesondere Albumine, Metallothione, Glutathion und Cystein an der Aufnahme, der Akkumulation, dem Transport und der Toxizität beteiligt sind. Tamashiro et al. (1986) brachten Todesfälle durch Nierenschäden beim Menschen der Minamata-Region mit der Minamata Krankheit in Verbindung. Dyll-Smith et al. (1990) und Barr et al. (1972) konnten irreparable Nierenfunktionsstörungen mit der Verwendung von Ammoniumquecksilberchlorid-haltiger Bleichcreme und deren Aufnahme über die Haut zeigen. Zalups (2000) kommt zu dem Schluss, dass die Ausscheidungsmenge

an Quecksilber über den Urin stärker mit dem Ausmaß der Nierenschäden korreliert als die Anreicherung innerhalb der Niere selbst. Dieses weist darauf hin, dass die über diesen Ausscheidungspfad transportierten Quecksilberverbindungen eine starke **akute** Toxizität auf die Niere aufweisen.

Quecksilber unterschiedlicher Spezies stehen zudem im Verdacht, das **Herzkreislaufsystem** negativ zu beeinflussen und Bluthochdruck sowie eine veränderte Herzfrequenz zu bewirken. Zahlreiche Autoren haben unregelmäßige Herzfrequenz mit der Aufnahme von alkylquecksilberhaltigem Mehl (Jalil and Assasi 1961), ethylquecksilberbelastetem Fleisch (Cinca et al. 1980) und der Methylquecksilberaufnahme durch den Konsum von Meerestieren (Grandjean et al. 2004) in Verbindung gebracht. Salonen (1995) stellte in einer Studie an 1833 männlichen Finnen fest, dass auch das Herzinfarktrisiko mit steigender Aufnahme von Methylquecksilber erhöht ist. Tierversuche konnten diese Beobachtungen größtenteils bestätigen.

Unbestritten ist die starke **Neurotoxizität** von organischen Quecksilberverbindungen. Quecksilber-(II)-chlorid wirkt in vitro etwa 100 mal weniger giftig auf Neurone als Ethylquecksilber (DETH, 2004).

Die Massenvergiftungen in Japan und im Irak mit sehr hohen Dosen MeHg hatten zahlreiche Studien über die Wirkungen von MeHg auf das zentrale Nervensystem zur Folge. Dabei wurde besonders deutlich, dass toxische Wirkungen auf das ZNS bei ungeborenen Kindern, Säuglingen und Kleinkindern deutlicher ausgeprägt auftreten, als bei Erwachsenen. Choi et al. (1989) stellten bei Untersuchungen an Kindern ebenfalls fest, dass das entwickelnde Nervensystem schon bei deutlich niedrigeren Konzentrationen von MeHg-Expositionen reagiert als jenes von Erwachsenen. Die typischen Symptome der sogenannten CMD (congenital Minamata disease = angeborene Minamata Krankheit) sind verzögerte geistige Entwicklung, Wachstumsstörungen, Ataxie des Kleinhirns, Sprachstörungen und deformierte Knochen. Bei vielen der Kinder wurden zudem noch das Aufmerksamkeitsdefizitsyndrom und erhöhter Speichelfluss (je 95%), Krampfanfälligkeiten (82%) und Schielen (77%) festgestellt. Einige dieser Symptome waren zumindest teilweise reversibel, während andere, beispielsweise verringerte Intelligenz und Sprachstörungen, nicht verschwanden (Harada 1995).

Untersuchungen zur Vergiftungskatastrophe im Irak kamen zu ähnlichen Ergebnissen, während die Ausprägungen der Krankheitsbilder, bedingt durch höhere Dosen, meist noch stärker als die in Japan waren. Untersuchungen von Cox et al. (1989) zu Dosis-Wirkungsbeziehungen konnten eindeutig den Zusammenhang zwischen der Schwere der Schäden am ZNS und steigenden Quecksilberkonzentrationen nachweisen.

Dagegen zeigen neue Studien von Mutter et al. (2006), dass neben der tatsächlichen Höhe der Expositionsdosis auch genetische Veranlagungen die toxischen Wirkungen von Quecksilber entscheidend beeinflussen können: In der erwähnten Studie wurden Zusammenhänge zwischen Autismus und der Fähigkeit, Quecksilber über die Cystein- und Glutathionsynthese eliminieren zu können, untersucht. Offensichtlich sind bei autistischen Kindern aufgrund genetischer Polymorphismen beide Stoffwechselwege -die entscheidend für die natürliche Entgiftung von Quecksilber sind – gestört bzw. weniger aktiv.

Die neurologischen Schäden hoher Dosen von MeHg auf Erwachsene entsprechen weitestgehend denen bei Kindern, sind insgesamt aber erst bei höheren Konzentrationen zu erwarten und teilweise nach erfolgreicher Entgiftung reversibel (Eto et al. 2002).

Die Wirkung **chronisch** niedriger Belastungen mit MeHg sind demgegenüber deutlich schwerer zu untersuchen und zu belegen. Die Schwierigkeit liegt zum einen darin, weniger schwerwiegende Störungen des ZNS mit der Belastung durch eine Substanz eindeutig belegen zu können, zum anderen gestaltet sich die Untersuchung einer bereits längerfristig zurückliegenden chronischen Belastung schwierig. Parameter wie Quecksilbergehalte im Blut oder Urin sind für die Untersuchung deshalb nur schlecht geeignet, weil aufgrund der stetigen Eliminierung von Quecksilber aus dem Körper zeitlich zurückliegende Ereignisse nur unzureichend erfasst werden können. Zur Beurteilung einer zeitlich zurückliegenden Quecksilberexposition werden deshalb Haaruntersuchungen durchgeführt (Cox et al. 1989). Die so ermittelten Quecksilbergehalte in älteren Haarabschnitten lassen Rückschlüsse auf die Aufnahmemengen der jüngeren Vergangenheit zu, weil Quecksilber - proportional zu der Exposition - auch in den Haaren zu finden ist. Da die Kopfhaare ein gleichmäßiges Längenwachstum von ca. 0,35 mm/Tag aufweisen (Umbach 1995), kann so je nach Länge der vorhandenen Haare eine Untersuchung der Quecksilberexpositionen der Vergangenheit durchgeführt werden. Das

Quecksilber ist vermutlich - aufgrund der hohen Affinität zu Schwefel-Verbindungen - innerhalb der Disulfidbrücken gebunden.

Eine weitere Schwierigkeit liegt in der Art der Bewertung und der Bewertungskriterien der Studien durch Beobachtungen und Tests, die den Entwicklungsstand der untersuchten Individuen wiedergeben sollen. Dabei werden Testbatterien zur Bewertung von Schäden herangezogen, die unter neurophysiologischen und neuropsychologischen Gesichtspunkten entwickelt wurden. Dass solche Studien zu widersprüchlichen Schlussfolgerungen kommen können, zeigten Schlussfolgerungen aus Studien von Davidson et al. (1998). Dabei wurden, im Gegensatz zu einer Studie auf den Färöer Inseln von Grandjean et al. (1997), keine Zusammenhänge zwischen prä- und postnatalen MeHg Expositionen und der geistigen Entwicklung gefunden, während Grandjean deutliche Zusammenhänge belegen konnte: Besonders stark von den neurotoxischen Wirkungen sind Föten und Kinder betroffen, deren Gehirn sich noch in der Entwicklungsphase befindet. Um diese spezielle Suszeptibilität des sich entwickelnden Gehirns genauer zu untersuchen, wurde zwischen 1986 und 1987 eine Studie auf den Faroer Inseln mit 1022 aufeinander folgenden Einzelgeburten durchgeführt (Grandjean et al. 1997). Die Mütter dieser Kinder verzehrten durchschnittlich drei Fisch- oder Walmahlzeiten pro Woche. Dieser Studie zufolge gibt es einen Zusammenhang zwischen Quecksilberexposition in-utero und der geistigen Entwicklung im Kindesalter. Zusätzlich zu den Störungen des ZNS wurde bei den untersuchten Kindern, auch bei Konzentrationen unter 10µg/l im Nabelschnurblut (<HBM II, Human-Bio-Monitoringwerte des Umweltbundesamtes), ein erhöhter Blutdruck festgestellt.

#### ***2.4 Nationale und Internationale Grenzwerte bzw. Empfehlungen für die maximale Aufnahme von Quecksilber und Quecksilberverbindungen***

Von den staatlichen Überwachungsbehörden unterschiedlicher Nationen werden verschiedene Empfehlungen für die maximale tolerierbare Aufnahme von Methylquecksilber bzw. Höchstgehalte für Quecksilber- und Methylquecksilbergehalte in Fischen und anderen Lebensmitteln festgesetzt.

Die Tabelle 2.4. fasst diese Grenzwerte bzw. Empfehlungen zusammen:

Tabelle 2.4: Empfehlungen und Grenzwerte für die Gehalte und Aufnahme unterschiedlicher Quecksilberspezies:

Verordnung/Gesetz Einrichtung	Umfang des Grenzwertes bzw. der Empfehlung	Grenzwert/ max. tolerierbare Menge
VO 221/2002 (EG) Kommission	Gesamtquecksilber in Fischerzeugnissen	<0,5mg/kg Frischgewicht <1 mg/kg* Frischgewicht
Trinkwasserverordnung Mineralwasserverordnung	Gesamtquecksilber Gesamtquecksilber	<1 µg/L Wasser <1 µg/L Wasser
Codex alimentarius Commission (CAC) CAC GL7-1991	Gesamtquecksilber in Fischerzeugnissen	<0,5mg/kg Frischgewicht <1 mg/kg** Frischgewicht
National Research Council NRC	MeHg-Gesamtaufnahme	<0,7 µg/kg/Woche
EPA 1985 EPA 1995 U.S.Environmental Protection Agency Agency for Toxic Substances and Disease Registry FDA, U.S. Food and Drug Administration	MeHg-Gesamtaufnahme MeHg-Gesamtaufnahme  MeHg-Gesamtaufnahme  MeHg-Gesamtaufnahme	<0,3 µg/kg*Tag <0,1µg/kg*Tag  <0,3µg/kg*Tag  <0,5µg/kg*Tag
Weltgesundheitsorganisation (WHO) alt  JECFA neu Joint Expert Committee on Food Additives (FAO/WHO)	Quecksilberexposition (Gesamt-Hg) MeHg-Gesamtaufnahme  MeHg-Gesamtaufnahme	<5 µg/kg davon nicht mehr als 3,3 µg/kg Woche MeHg <1,6 µg/kg Körper- gewicht/Woche
Gefahrstoffverordnung	Arbeitsplatzgrenzwert (AGW)	0,1 mg/m <sup>3</sup>
Umweltbundesamt	HBM-I*** Blut-Hg-Gehalt HBM-II*** Blut-Hg-Gehalt	<5 µg/Liter <15 µg/Liter
Dänische Lebensmittelbehörde	MeHg-Gesamtaufnahme	<55 µg/Woche

\* alle unter 3.3.1.1 VO221/2002 genannten Fischarten: Bsp. Hai, Aal, Heilbutt, Barsch, Rotbarsch, Schwertfisch, Thunfisch, Rochen, Butterfisch, Hecht, Stör, Bonito, Steinbeißer, Seeteufel

\*\* Raubfische

\*\*\* Human-Bio-Monitoringwerte:

< HBM-I: unbedenklich, kein Handlungsbedarf

>HBM-I aber <HBM-II: gesundheitliche Beeinträchtigung nicht sicher ausgeschlossen, Kontrolle der Belastungsquelle, ggf. Verminderung unter vertretbarem Aufwand

>HBM-II: gesundheitliche Beeinträchtigung möglich, umweltmedizinische Betreuung notwendig, akuter Handlungsbedarf zur Reduktion der Belastung

Das wissenschaftliche Gremium CONTAM der Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit (EFSA) sprach zudem in einer Pressemitteilung 2004 die Empfehlung aus, dass Frauen mit Kinderwunsch und stillende Frauen sowie Kleinkinder keine Fische zum Verzehr auswählen sollten, die am Ende der Nahrungskette stehen.

### **3. Problemstellung und Zielsetzung**

Im Rahmen nationaler (Bund/Länder-Messprogramm) und internationaler Meeresumweltschutzkonventionen (OSPAR und HELCOM) zum Schutz der Meeresumwelt wird in Deutschland u.a. von der Bundesforschungsanstalt für Fischerei (BFAFI) im Institut für Fischereiökologie (IFÖ) regelmäßig der Quecksilbergehalt von Meerestieren untersucht. Bei der bislang in der BFAFI im IFÖ verwendeten Methode konnte nur der Gesamtquecksilbergehalt der Meeresorganismen bestimmt werden, ohne dabei weitere Informationen über die vorhandenen Quecksilberspezies zu erlangen. Die internationale Meeresschutzkonvention für die Nordsee und den Nordostatlantik (OSPAR) führt Quecksilber **und** organische Quecksilberverbindungen in der „*List of Substances for Priority Action*“ auf. Auch die Helcom-Kommission für die Ostsee listet Quecksilber **und** organische Quecksilberverbindungen unter „*Selected substances for immediate priority action (Rec. 19/5, Attachment, Appendix 3)*“ auf. Ebenso wird Quecksilber **und** seine Verbindungen in der Wasserrahmenrichtlinie (2000/60/EG Anhang X) in der Liste der „prioritären Stoffe“ geführt. In diesem Zusammenhang war es notwendig, dass die Monitoringinstitute der Vertragsstaaten eine Datengrundlage schaffen, auf deren Basis eine Bewertung der Belastung der Gewässer durch Quecksilber **und** seine Verbindungen durchgeführt werden kann. Dieses umfasst u.a. die Bestimmung der Konzentration und der Verhältnisse von Gesamtquecksilber zu Quecksilber bei marinen Biota verschiedener trophischer Stufen in Abhängigkeit von der Art und dem untersuchten Gewebe. Ebenso sollte untersucht werden, ob es bei den Indikatorspezies räumliche Unterschiede zwischen den Monitoringgebieten innerhalb der Nord- und Ostsee gibt, die sich von den bisher bekannten Verteilungsmustern des Gesamtquecksilbergehalt unterscheiden.

Umweltqualitätsziele und Bewertungskriterien sollen auf der Basis realer Messungen im marinen Bereich aufgestellt werden.

Die Erforschung der Ursache-Wirkungsbeziehung zwischen chronischer Einwirkung niedriger Mengen an Methylquecksilber und gesundheitlichen Schäden einschliesslich Auswirkungen auf die Reproduktionsfähigkeit ist sowohl zum Schutz des Menschen als auch des marinen Ökosystems von großer Bedeutung. Es ist zu erwarten, dass zukünftig Grenzwerte für Fische und Meeresfrüchte eingeführt werden, die zwischen maximal zulässigen Methylquecksilbergehalten und

Gesamtquecksilbergehalten differenzieren (Burscher, 2005). Im Rahmen eines Richtlinien-Entwurfes der EU zur Einführung von Qualitätszielen für prioritäre Stoffe wird für Methylquecksilber ein Wert von  $20\mu\text{g}/\text{kg}$  Frischgewicht für marine Biota diskutiert (pers. Mitteilung Haarich, 2006). Um solche Grenzwerte überprüfen zu können, benötigen die zuständigen Institutionen (u.a. die Lebensmitteluntersuchungsämter) Methoden zur Speziationsanalytik dieser Verbindungen.

Ziel der vorliegenden Doktorarbeit, die im Rahmen eines vom Umweltbundesamt geförderten Projektes (UFOPLAN FKZ 200 222 30) angefertigt wurde, war die Entwicklung und Validierung einer einfachen, preiswerten und analytisch robusten Methode, mit der es möglich ist, Methylquecksilber und anorganisches Quecksilber in Meerestieren simultan zu bestimmen. Die sehr geringen Konzentrationen von MeHg und  $\text{Hg}^{2+}$  in Umweltproben erfordern die Kombination eines leistungsstarken Systems zur Trennung (i.d.R. chromatographisches Verfahren) mit einem nachweisstarken und spezifischen Detektor wie Atomabsorptions-, Atomemissions- oder Atomfluoreszenz-Spektrometer.

Bei der Planung und Entwicklung der Methode wurde besonders darauf geachtet, dass das analytische System möglichst aus zuverlässigen und leistungsstarken Standardkomponenten besteht, welche leicht zu beschaffen und zu warten sind.

Innerhalb des Projektes lag der methodische Schwerpunkt in der Auswahl und Anwendung eines passenden chemischen Trennprinzips, der Kombination der eingesetzten instrumentellen Komponenten, der Steuerung des Ablaufes und der Optimierung der Verfahrensparameter.

Die hier entwickelte und validierte Methode wurde abschließend durch anwendungsorientierte Untersuchungen von pelagischen Fischeiern sowie Gewebeproben von Sprotten und Klieschen auf ihre Eignung für den Routineeinsatz im marinen Schadstoffmonitoring verifiziert.

Der abschließende Projektbericht, der im Rahmen dieser Doktorarbeit angefertigt wurde, ist unter Kapitel 8 im Anhang dieser Arbeit zu finden.

## 4. Methodenentwicklung

### 4.1 Speziierungsanalyse des Quecksilbers

In den vergangenen 45 Jahren ist eine sehr große Anzahl an wissenschaftlichen Veröffentlichungen zur Speziierungsanalyse von Organometall- und Organoquecksilberverbindungen erschienen.

Simpson schuf 1961 dafür die Grundlagen und trug zur Charakterisierung der Organoquecksilberverbindungen wesentlich bei. Die Analytik dieser Verbindungen hat sich bis heute naturgemäß grundlegend geändert und wird nun mit einer Vielzahl an modernen Methoden und Analyseverfahren durchgeführt.

Nachfolgend werden verschiedene Möglichkeiten der Speziationsanalytik von Quecksilberverbindungen kurz vorgestellt, einen ausführlicheren Überblick über die Entwicklung der Methoden ist im Anhang 8 dieser Arbeit (Abschnitt 1.3.4.1 - 1.3.4.5, Abschlußbericht des Projektes FKZ 200 22 230) dargestellt.

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

Bei dieser Methode wird Monomethylquecksilber zunächst aus seiner Bindung an Matrixbestandteile durch Behandlung mit nicht oxidierenden Säuren freigesetzt, gereinigt und als Monomethylquecksilberhalogenid durch Gaschromatographie unter Verwendung eines Elektroneneinfangdetektors (ECD) bestimmt.

Während des gaschromatographischen Trennprozesses traten jedoch häufig Verluste des Monomethylquecksilbershalogenids durch thermische Zersetzung auf. Weitere Nachteile der SE/GC Methode bestehen vor allem darin, dass nur Monomethylquecksilber bestimmt werden kann und der Anteil an anorganischem Quecksilber ( $\text{Hg}^{2+}$ ) indirekt ermittelt wird. Weiterhin findet bei dieser Methode keine elementspezifische Detektion statt.

#### 4.1.2 Methode der selektiven Reduktion

Bei der Methode der selektiven Reduktion wird das Quecksilber(II)-Kation zu elementarem Quecksilber reduziert und nach der sog. Kaltdampftechnik bestimmt. Dabei geht man davon aus, dass mit ausgewählten Reduktionsmitteln vorerst nur anorganisches Quecksilber umgesetzt wird, während organisch gebundenes Quecksilber aufgrund seiner geringeren Reaktivität innerhalb einer vorgegebenen

Reaktionszeit nicht reduziert wird. Nach der Zugabe eines Katalysators und der Herstellung spezieller Redox-Bedingungen wird anschliessend auch das organisch gebundene Quecksilber freigesetzt und kann dann in einem zweiten Schritt bestimmt werden. Aus der Differenz von Gesamtquecksilber und anorganischem Quecksilber wird dann der Gehalt an organischem ( $\approx$  Monomethylquecksilber) indirekt ermittelt. Eine speziesspezifische Identifizierung des organisch gebundenen Quecksilbers ist mit dieser Methode nicht möglich.

#### 4.1.3 Hydrid-Methode (Derivatisierung mit Natrium-Tetrahydroborat)

Grundlage der Hydrid-Methode ist der Umsatz von Monomethylquecksilber mit Natrium-Tetrahydroborat ( $\text{NaBH}_4$ ) zur Erzeugung des flüchtigen Monomethylquecksilberhydrids ( $\text{CH}_3\text{HgH}$ ). Dieses kann anschliessend mit Headspace-GC und Fourier Transformations-Infrarot-Spektrometrie (FTIR) bestimmt werden.

Diese Methode hat den Nachteil hoher Nachweisgrenzen und ist deshalb nicht für die Untersuchung von Umweltproben geeignet. Zudem können sich während der Derivatisierung Radikale bilden, die die Kohlenstoff-Quecksilber-Bindung des organischen Quecksilbers spalten und dieses zu elementarem Quecksilber ( $\text{Hg}^0$ ) reduziert. Eine Unterscheidung der Quecksilberspezies ist dann nicht mehr möglich.

#### 4.1.4 Derivatisierung der Quecksilberspezies mit Hilfe der Grignardreaktion

Die Derivatisierung von anorganischen und organischen Quecksilberverbindungen ist nach vorgeschaltetem Aufschluß auch über die Grignardreaktion möglich.

Dabei werden die Quecksilberverbindungen alkyliert und so in flüchtige Verbindungen umgesetzt. Nach einem Anreicherungsschritt kann anschliessend eine gaschromatographische Trennung erfolgen. Ein entscheidender Nachteil dieser Methode ist die Bildung flüchtiger Nebenprodukte bei der Verwendung von Grignardreagenzien, die häufig zu Störungen bei der Analytik der Quecksilberverbindungen führen.

#### 4.1.5 Derivatisierung mit Natrium-Tetraethylborat (Alkylierungs-Methode)

Bei der Derivatisierung der mit Natriumtetraethylborat (STEB) werden, nach einem geeignetem Aufschluß des Untersuchungsmaterials, anorganisches Quecksilber und Monomethylquecksilber simultan in die leicht flüchtigen Ethylderivate überführt. Nach

der Freisetzung der Derivate kann eine Zwischenanreicherung (purge and trap) der Ethylderivate in einer Kühlfalle, an geeigneten Adsorbentmaterialien oder in einem organischen Lösungsmittel erfolgen.

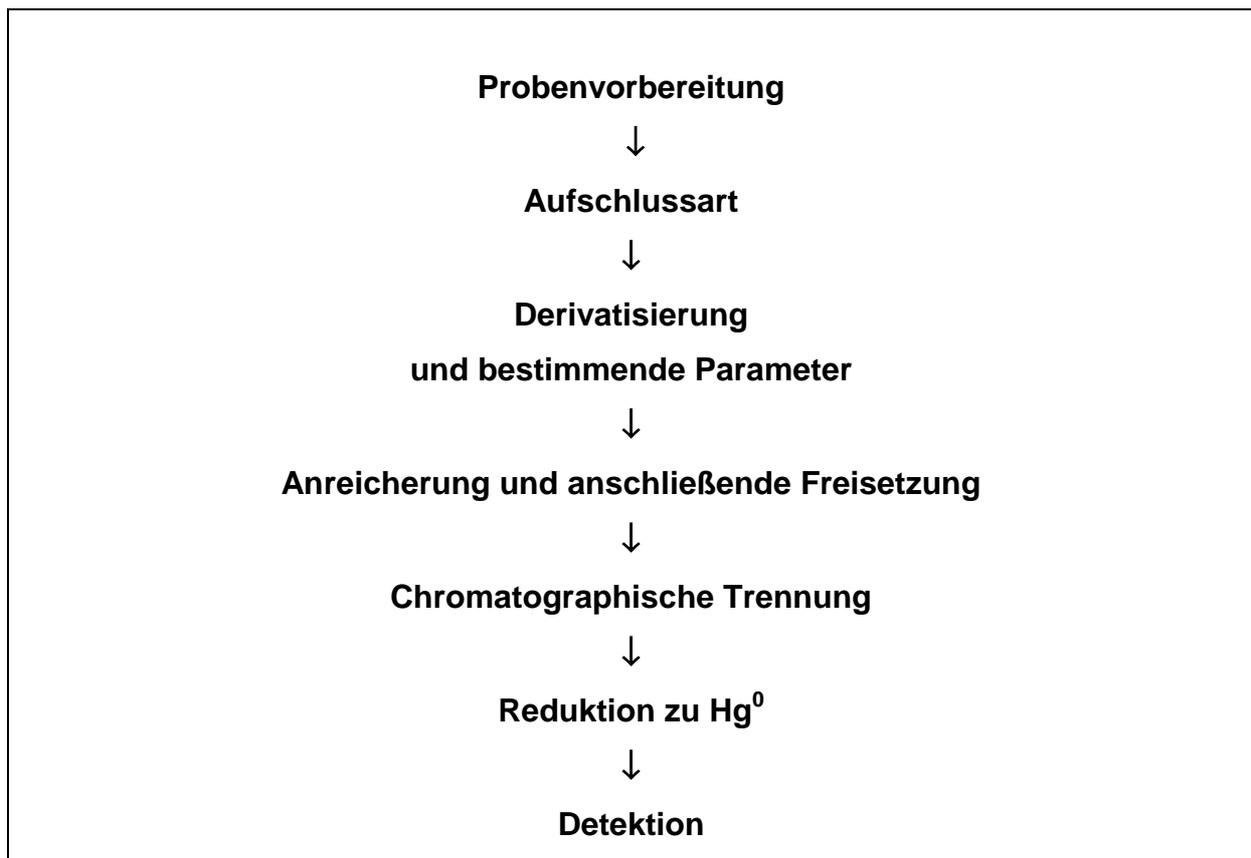
Anschließend können die Ethylderivate simultan gaschromatographisch getrennt und mit einem nachweisstarken elementspezifischen Detektor, z.B. ein Atomabsorptions-, Atomemissions-, Atomfluoreszenz- oder Massen-Spektrometer bzw. ICP-MS (Induktiv gekoppeltes Plasma in Verbindung mit massenspektrometrischer Detektion) detektiert werden.

Diese Methode der Quecksilberspeziesanalytik hat den Vorteil, dass bei der Verwendung von kommerziell erhältlichem, sehr reinem Natriumtetraethylborat (STEB) kaum Störungen auftreten. Ein weiterer großer Vorteil der Derivatisierung mit STEB liegt darin, dass es möglich ist, die flüchtigen Reaktionsprodukte mit Hilfe eines Gasstromes aus der Lösung freizusetzen. Dieser Schritt ist von großer Bedeutung für die Praktikabilität der Methode, da neben der Zwischenanreicherung der Derivatisierungsprodukte an einem Adsorbentmaterial keine weitere Aufreinigung nötig ist (Gomez-Ariza et al. 2004), die zwangsläufig zu Verlusten der Analyte führen würde.

#### ***4.2 Auswahl der Komponenten für die entwickelte Methode***

Im folgenden Kapitel werden die Gründe für die Auswahl der eingesetzten Komponenten sowie die Vorgehensweise bei der Entwicklung der Methode beschrieben. Die Auswahl der eingesetzten Komponenten war durch apparative Vorgaben reglementiert, so dass nur Gerätschaften zum Einsatz kommen konnten die bereits in der BFA-FI vorhanden, durch andere Bundesbehörden zu beschaffen, selbst herzustellen oder sehr preisgünstig zu erwerben waren.

Bei den Überlegungen wurden für folgende analytischen Fragestellungen Lösungen gesucht:



#### 4.2.1 Methoden der Probenvorbereitung (Optimierung des Aufschlusses verschiedener Probenmatrices)

Biologisches Untersuchungsmaterial muss zunächst so vorbehandelt werden, dass Methylquecksilber und anorganisches Quecksilber für die Derivatisierung vollständig verfügbar vorliegt. 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 und Sturgeon 1997, Cai et al. 1998, Vazquez et al. 1999, Tu et al. 2000, Slaets und Adams 2000, Dietz et al. 2001, 2000, 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.

Hintelmann (1999) stellte durch den Einsatz von Quecksilberisotopen und anschließender GC-MS Analyse fest, dass bei der bis dahin weit verbreiteten Probenvorbereitung und Extraktion durch Wasserdampfdestillation (Falter und Illgen, 1997) deutliche Artefakte auftreten können. Während und besonders am Ende der

Destillation bildet sich demzufolge unkontrolliert Methylquecksilber, so dass anschließend zu hohe Gehalte an Methylquecksilber detektiert werden. Bloom (1997) entdeckte ebenfalls deutliche Methylquecksilberzunahmen bei der von ihnen angewendeten Wasserdampfdestillationsmethode an Flusswasserproben.

Für biologische Proben bietet sich vor der anschließenden Schwermetallbestimmung eine Behandlung mit ethanolischer oder methanolischer Natron- oder Kalilauge, Trichloressigsäure oder Perchlorsäure an (Ebinghaus et al. 1994). Neue Arbeiten nutzen zur Voranreicherung von Methylquecksilber die Technik der Festphasen-Extraktion (SPE). Celo et al. 2004 berichten jedoch auch bei dieser Methode von deutlichen Artefakten. So wurden bei Untersuchungen von Wasser bis zu 40% des anorganischen Quecksilbers im Verlauf der Extraktion zu Methylquecksilber umgewandelt.

Für diese Arbeit kamen die Methoden infrage, 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.

Eigene Untersuchungen zur Lyse von Fischzellen und Zooplankton haben gezeigt, dass die Lyse deutlich erleichtert ist, wenn das Untersuchungsmaterial vorher gefriergetrocknet wird. Nach der Gefriertrocknung ist eine Mikrohomogenisierung möglich, die dazu beiträgt, die Lyse deutlich zu beschleunigen. So kommen Back et al. (1995) zu dem Schluss, dass eine Mikrohomogenisation von Zooplankton die Bestimmung von Quecksilber und MeHg verbessert. Die untersuchten Proben lagen deshalb alle gefriergetrocknet vor bzw. wurden vor dem Aufschluss gefriergetrocknet und mit Hilfe eines Stößel mikrohomogenisiert. Durch den Wasserentzug bei der Gefriertrocknung und anschließender Zugabe von wässriger Lösung ist die Wirkung der Aufschlusslösung besonders stark, weil diese schnell und tief in das Untersuchungsmaterial eindringen kann.

Da Methylquecksilber gegenüber stark oxidativen Bedingungen empfindlich ist und Zersetzungen oder speziesbezogene Veränderungen ausgeschlossen werden sollten, konzentrierten sich die Untersuchungen besonders auf alkalische Aufschlüsse bei Raumtemperatur.

In der Literatur findet man viele verschiedene Ansätze, um dies zu erreichen: Beichert et al. (2000) berichten 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) fanden heraus, dass eine Behandlung von Sediment mit Salzsäure ( $6 \text{ mol/l}^{-1}$ ) nicht ausreicht, um Methylquecksilber vollständig freizusetzen. Fischer (1993) stellte fest, dass MeOH/KOH gut geeignet ist, um unterschiedliche biologische Matrices (Hummer Hepatopankreas (= Mitteldarmdrüse), Fischleber und Fischfilet) aufzuschließen. Back et al. (1995) verwendeten ebenfalls MeOH/KOH um Zooplankton aufzuschließen. Ikingura et al. (1999) verwendeten EtOH/KOH. Horvat (1994) berichtet ebenfalls von guten Ergebnissen mit MeOH/KOH.

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

Deshalb wurde mithilfe einer Mikrowelle versucht, den Aufschluss zu vervollständigen und zu beschleunigen. Da auch diese Modifikationen der Methode nicht das gewünschte Ergebnis einer klaren Lösung lieferten, wurden die Versuche unter Zusatz von Tetramethylammoniumhydroxid (TMAH) durchgeführt.

TMAH ist ein nicht oxidierendes, sehr stark gewebeauflösendes Reagenz, welches die Spezies des zu untersuchenden Metalls nicht verändert. Ebinghaus (1991) erzielte gute Ergebnisse bei der Extraktion von Adeninnukleotiden aus Bakterien mit TMAH.

Chytyk (2001) verwendete TMAH für die Arsenspeziationsanalytik und folgerte ebenfalls, dass TMAH ein geeignetes Reagenz ist, um biologische Matrices aufzuschließen. Weiterhin wurden von Ebinghaus et al. (1994) Stabilitätsuntersuchungen von Methylquecksilberchlorid in 20% TMAH-Lösung durchgeführt. Diese zeigten, dass Methylquecksilber in TMAH-Lösung mindestens 10 Tage lang stabil ist.

Eigene Aufschlussversuche mit TMAH wurden an folgenden biologischen Materialien durchgeführt:

- Wasserflöhe (*Cyclops spec*)
- Krill (*Euphausia superba*)
- Fischleber (Kliesche: *Limanda limanda*, Dorsch: *Gardus morhua*)

- Fischfilet (Kliesche: *Limanda limanda*, Dorsch: *Gardus morhua*)
- Hummer (*Homarus spec.*)
- Seewassernacktschnecken

Nahezu sämtliche Aufschlussversuche führten zu klaren Aufschlusslösungen, so dass davon ausgegangen werden konnte, dass die Proben gut für die Derivatisierung vorbereitet waren.

#### 4.2.2 Auswahl des Derivatisierungsreagenz

MeHg und anorganisches Quecksilber liegen in biologischen Proben nicht als gasförmige Verbindungen vor. Um diese Verbindungen für eine gaschromatographische Trennung zu erschließen, müssen diese in gasförmige Derivate umgesetzt werden. Als Derivatisierungsreagenz kommen unterschiedliche Reagenzien in Frage. Da in der vorliegenden Arbeit die Unterscheidung zwischen  $\text{Hg}^{2+}$  und MeHg im Vordergrund stand, war es also nötig, beide Verbindungen so zu derivatisieren, dass sie anschließend in einem chromatographischen Prozess getrennt werden konnten. Die Derivatisierung sollte möglichst einfach durchzuführen sein und ohne störende Derivatisierungsprodukte ablaufen, welche die anschließende Trennung und Detektion beeinträchtigen könnten.

Zwar bietet der Einsatz von Grignard-Reagenzien den Vorteil der freien Wahl des zu übertragenden Liganden, diese Art der Derivatisierung hat jedoch auch den entscheidenden Nachteil der Bildung zahlreicher flüchtiger unbekannter Nebenprodukte während der Derivatisierung.

Gewählt wurde die Derivatisierung mit Natriumtetraethylborat (STEB). Die Verwendung von Natriumtetraethylborat hat den Vorteil der weiten Verbreitung in der Speziesanalytik und ist kommerziell in dafür vorgesehener hoher Reinheit erhältlich. Die nötigen Anforderungen, die Derivatisierungsprodukte chromatographisch trennen zu können, werden ebenfalls erfüllt. Ein weiterer großer Vorteil der Derivatisierung mit STEB liegt darin, dass es möglich ist, die flüchtigen Reaktionsprodukte mit Hilfe eines Gasstromes aus der Lösung freizusetzen. Dieser Schritt ist von großer Bedeutung für die Methode, da neben der Zwischenanreicherung der Derivatisierungsprodukte an einem Adsorbermaterial keine weitere Aufreinigung nötig ist (Gomez-Ariza et al. 2004), die zwangsläufig zu Verlusten der Analyte führen würde.

### 4.2.3 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, derivatisierte Alkylquecksilberverbindungen vor der gaschromatographischen Trennung anzureichern.

Bloom (1989) und Back et al. (1995) verwendeten Carbotrap, einen graphitierten Kohlenstoff, mit einer sehr großen Oberfläche (10 bis 200 m<sup>2</sup>/g.). Eigene Versuche mit Carbotrap B und Carbotrap C zeigten schnell, dass diese Substanzen für das angestrebte Design der Analytik nicht geeignet sind, um eine vollständige Sorption und der Hg-Derivate zu gewährleisten.

Puk und Weber (1994b), Ceulemans und Adams (1996) und 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 Desorptionsvorgang durch Aufheizen dauert entsprechend lange. Außerdem kondensiert bei Temperaturen von < -190°C 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 freizusetzen. Die Verwendung einer Kühlfalle erwies sich deshalb ebenfalls als nicht praktikabel für die gewählte Methode.

Baeyens 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 (1999) und Kannan et al. (1998) benutzten Tenax-TA<sup>®</sup> als Vorsäulen-Sorptionsmaterial. Bei Tenax-TA<sup>®</sup> handelt es sich um ein polymeres Adsorbens, welches auf 2,6-Diphenyl-p-phenylenoxid basiert. Es ist bis zu + 350 °C thermisch stabil. Das „Bluten“ des Materials ist sehr gering, so dass Substanzen mit wenig Tailing eluieren. Tenax-TA<sup>®</sup> 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. Vorteilhaft ist auch die hohe Temperaturbeständigkeit dieses Materials.

Die Kombination der positiven Eigenschaften von Tenax-TA<sup>®</sup> machen es zu dem geeignetsten Material für die Vorsäulenanreicherung von Hg-Ethyl-Derivaten.

Die Herstellung der Adsorptionsröhrchen ist sehr einfach und schnell selbst zu bewerkstelligen. Die Desorption der alkylierten Quecksilberverbindungen erfolgt mit Hilfe einer äußeren Heizspirale durch Aufheizen des Tenax Röhrchens auf + 250°C. Die Verwendung einer Zeitschaltuhr in Verbindung mit einem Labornetzteil ermöglicht - bei konstanter Spannung und Stromstärke - die Ermittlung der genauen Zeit, die nötig ist, 250°C zu erreichen und nicht zu überschreiten. Eine genaue Anleitung zur Herstellung und Installation der Adsorptionsröhrchen und der Desorptionseinheit ist im Anhang dieser Arbeit im Kapitel 8.6 - der SOP - beschrieben. Die so hergestellten Adsorptionsrohre sind mehrere hundert Male wiederverwendbar. Da die alkylierten Verbindungen vollständig desorbieren, ist es nicht notwendig, die Rohre nach dem Gebrauch von Rückständen zu reinigen. Kommerziell erhältliche und bereits fertig gepackte Tenax-TA<sup>®</sup> Röhrchen erwiesen sich als problematisch in der Anwendung. Es traten Blindwerte auf, die auch nach mehrmaligen Aufheizen des Röhrchens nicht verschwanden. Es ist zu vermuten, dass die Röhrchen während des Verschlussprozesses mit quecksilberhaltigem Erdgas verschlossen werden, was nicht geklärt werden konnte. Auch deshalb wurden die Röhrchen selbst angefertigt. Die Abbildung 4.9 zeigt schematisch das Vorgehen und den Aufbau der Vorsäulen-Sorption auf Tenax-TA.

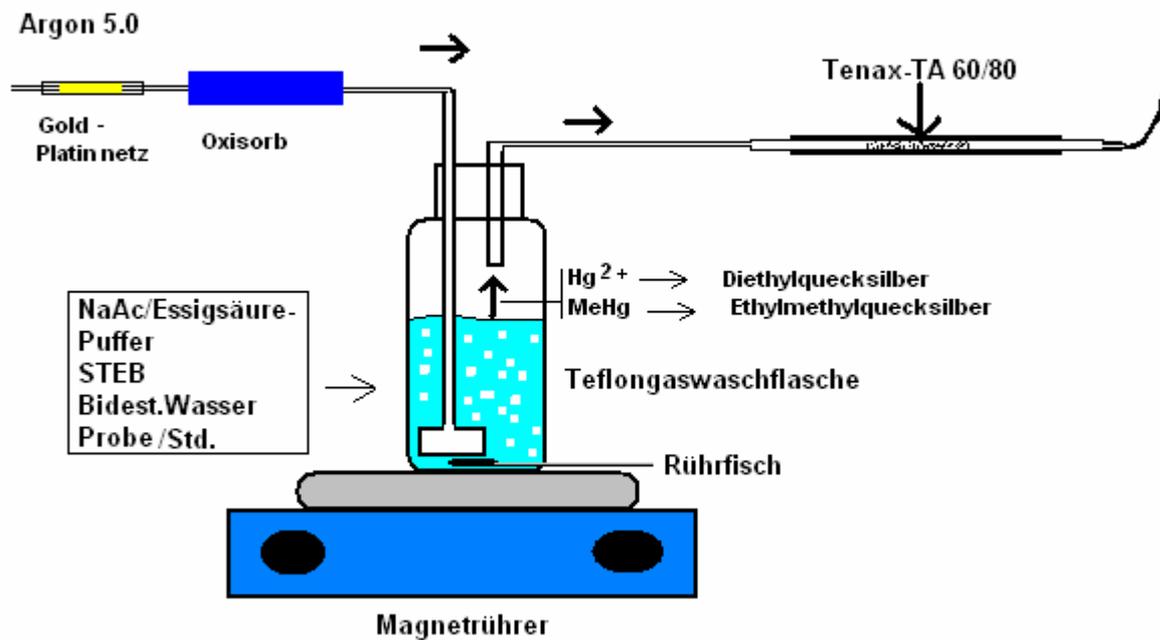


Abbildung 4.9: Schematische Darstellung der Vorsäulen-Sorption auf Tenax-TA.

#### 4.2.4 Untersuchung und Optimierung der Ausbeute an Alkylquecksilberderivaten in Abhängigkeit von pH-Wert, Reaktionstemperatur und -zeit sowie Reagenzienmenge

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 4.10:

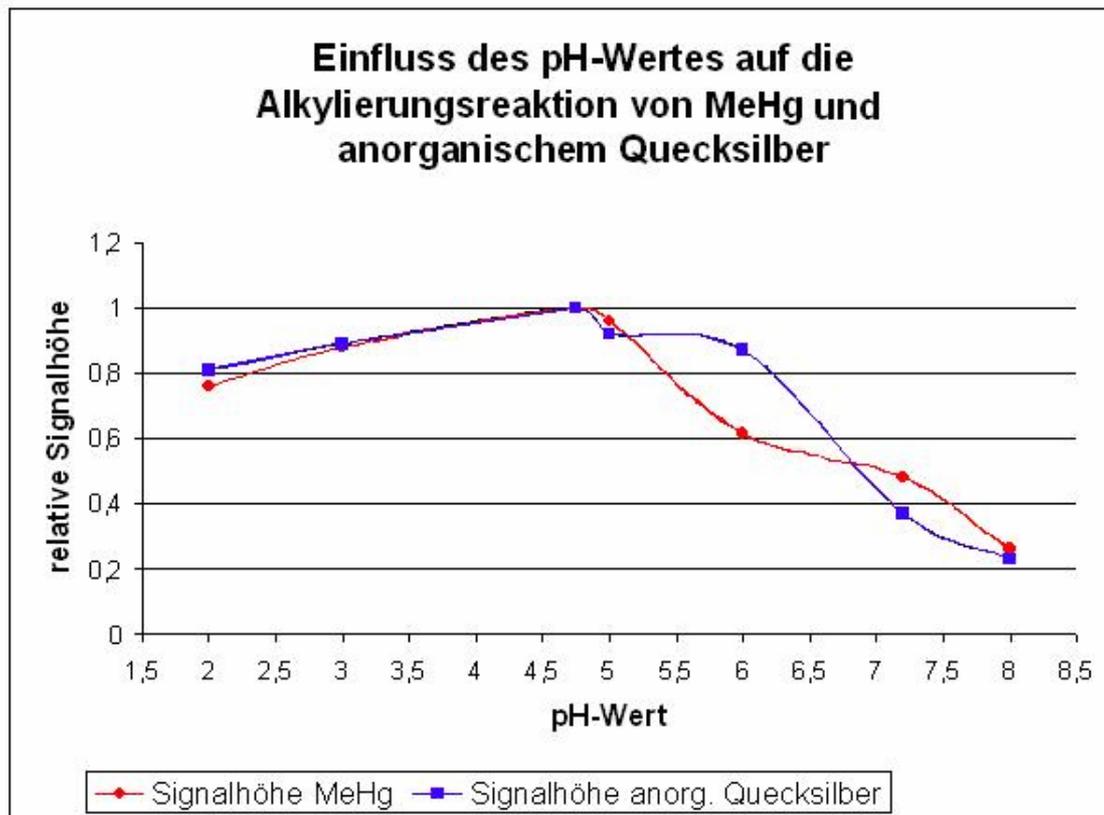


Abbildung 4.10: Einfluss des pH-Wertes auf die Alkylierungsreaktion von Methyl- und anorganischem Quecksilber mit Natriumtetraethylborat.

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  $\text{pH} \approx 4,75$  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.

Anschließend wurde untersucht, ob eine Erhöhung oder Senkung der Derivatisierungstemperatur Vorteile gegenüber der Derivatisierung bei Raumtemperatur hat. Abbildung 4.11 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.

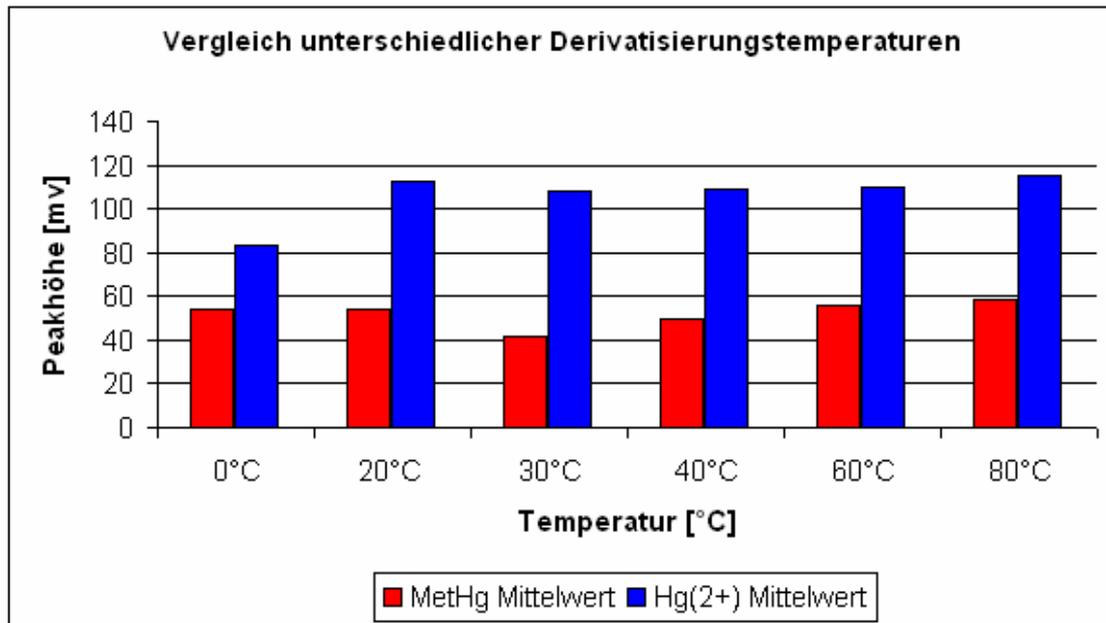


Abbildung 4.11: Einfluss unterschiedlicher Temperaturen auf die Ausbeute an Methylethylquecksilber und Diethylethylquecksilber bei der Derivatisierungsreaktion mit Natriumtetraethylborat. GC-AFS (HP-5890-Brooks Rand AFS-2), Ethylierung mit Natriumtetraethylborat, Purge and Trap auf Tenax-TA<sup>®</sup>, 15% OV3 auf DMCS WAW 60/80, GC-Gas Helium 5.0, Flussgeschwindigkeit 40 ml/min.

Die Reaktionszeit des STEB mit den Quecksilberspezies ist kein kritischer Parameter während der Derivatisierung. Bei Versuchen mit unterschiedlichen Reaktionszeiten des STEB mit Standards oder Probenaufschlüssen konnten trotz Variierung der Reaktionsdauer zwischen 10 und 600 Sekunden keine Unterschiede in der Signalthöhe festgestellt werden.

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 (purge time) von exakt 300 Sekunden.

Die Abbildung 4.12 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.

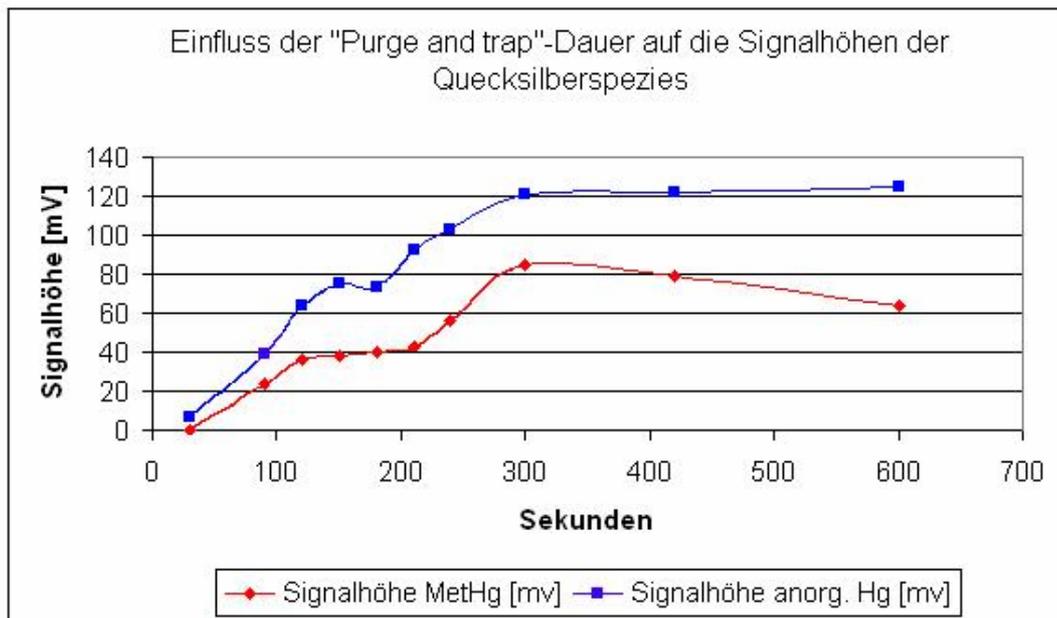


Abbildung 4.12: Einfluss der "Purge and trap"-Dauer auf die detektierten Signalhöhen der Quecksilberspezies.

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

#### 4.2.4 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) führten bei der gaschromatographischen Analytik von Methylquecksilber einen Vergleich der Leistungsfähigkeit von Kapillar- und gepackten Säulen durch. Dabei wurden nur sehr geringfügig bessere Nachweisgrenzen für (FSOT)-Kapillarsäulen im Vergleich zu gepackten Säulen festgestellt.

Hight, und Corcoran (1987), Horvat et al. (1990), Rapsomanikis und Craig (1991) Fischer et al. (1993) und 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 für die beschriebene Methode 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 die Verwendung von 15% OV-3 auf Chromosorb WAW-DMCS das günstigste Verhältnis von Trennleistung zu der benötigten 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.

#### 4.2.5 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 CV-AAS oder CV-AFS zu  $\text{Hg}^0$  reduziert werden. Um zum gewünschten Ergebnis zu kommen, gibt es unterschiedliche Lösungsansätze:

Theoretisch ist die Reduktion mit Hilfe eines Lasers oder starkem UV-Licht denkbar. Eine einfache und praktikable Lösung kann auch mit einem beheizbaren Interface erreicht werden. Eigene Untersuchungen zeigten, dass die pyrolytische bzw. thermische Zersetzung der alkylierten Quecksilberverbindungen eine einfache und zuverlässige Methode ist.

Da für die Pyrolyse Temperaturen von ca. 700-1500°C notwendig sind, muss mit Materialien gearbeitet werden, die bei diesen Temperaturen thermisch dauerhaft stabil sind. Metallische Materialien kommen bei der Spurenanalytik aus mehreren Gründen nicht dafür infrage. Hochreines Quarzglas hingegen ist chemisch weitgehend inert und schmilzt im Vergleich zu normalem Glas erst bei deutlich höheren Temperaturen. Als Heizquelle bietet sich neben einer offenen Gasflamme ein elektrisch betriebenes Interface mit Nickel-/Chromwiderstandsdraht als Heizquelle an. Bei einer offenen Gasflamme ist die Temperatur zum einen nur sehr schwer zu regeln, zum anderen ist der Einsatz in einem Labor in dem Spurenanalytik

betrieben wird, aus analytischen (Quecksilberrückstände im Gas) und sicherheitstechnischen Gründen kaum durchführbar.

Wesentlicher Bestandteil einer elektrisch beheizten 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. Die genaue Anleitung für die Herstellung und Installation der Pyrolyseeinheit findet sich im Anhang 8 in der SOP.

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. eine Pyrolysetemperatur von 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.

Die Abbildung 4.13 zeigt die Ergebnisse eines Versuchs zur Untersuchung der Abhängigkeit der Signalhöhen der Standardsubstanzen von der Pyrolysetemperatur.

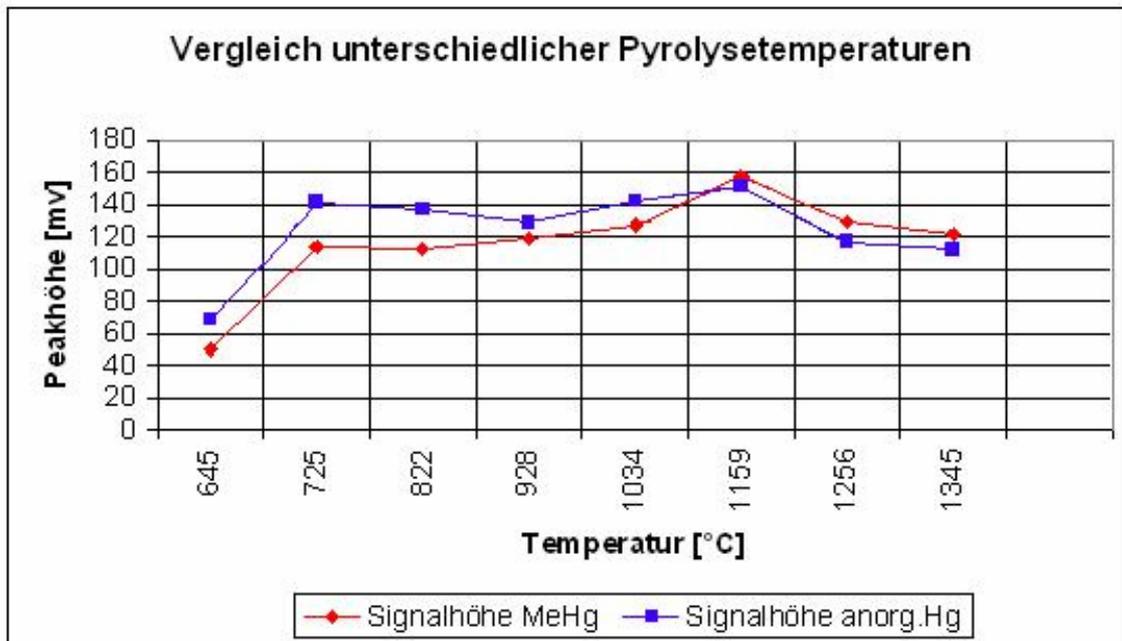


Abbildung 4.13 : Abhängigkeit der Signalintensität von Methylquecksilber und anorganischem Quecksilber von der Pyrolyse-Temperatur.

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

#### 4.2.6 Auswahl des Detektors

Bei der bisher beschriebenen Methode liegen die alkylierten, angereicherten, chromatographisch getrennten und pyrolysierten Quecksilberverbindungen als  $\text{Hg}^0$  vor. Als Detektor zur Erfassung und Quantifizierung von Quecksilberdampf bietet sich die Verwendung eines Kaltdampf- (CV-) Atomabsorptionsspektrometers (CV-AAS) oder eines Atomfluoreszenzspektrometers (CV-AFS) an. Beide Detektoren zeichnen sich durch eine hohe Elementspezifität und sehr niedrige Nachweisgrenzen aus. Eigene Untersuchungen an einem CV-AAS (aus dem FIMS-400 von Perkin Elmer) und einem CV-AFS (Brooks Rand Model 2) zeigten eine sehr gute Eignung beider Detektoren. Der AAS Detektor arbeitet nach dem Prinzip der Signalabschwächung durch Absorption, während der AFS Detektor eine Signalzunahme durch Fluoreszenz registriert. Bei intensiven Vergleichen wies der CV-AFS-Detektor instrumentelle Vorteile und eine geringere absolute Nachweisgrenze auf. Die geringste Menge Quecksilber, die gerade noch erfassbar ist, soll für ein neues Gerät dieser Bauart nach Angaben des Herstellers 0,1pg betragen (persönliche Mitteilung Brooks Rand). Aufgrund der Vorteile wurde für die Methode in dieser Arbeit der CV-AFS Detektor ausgewählt. Folgende schematische Abbildung (4.14) zeigt die Arbeitsweise eines CV-AFS Detektors.

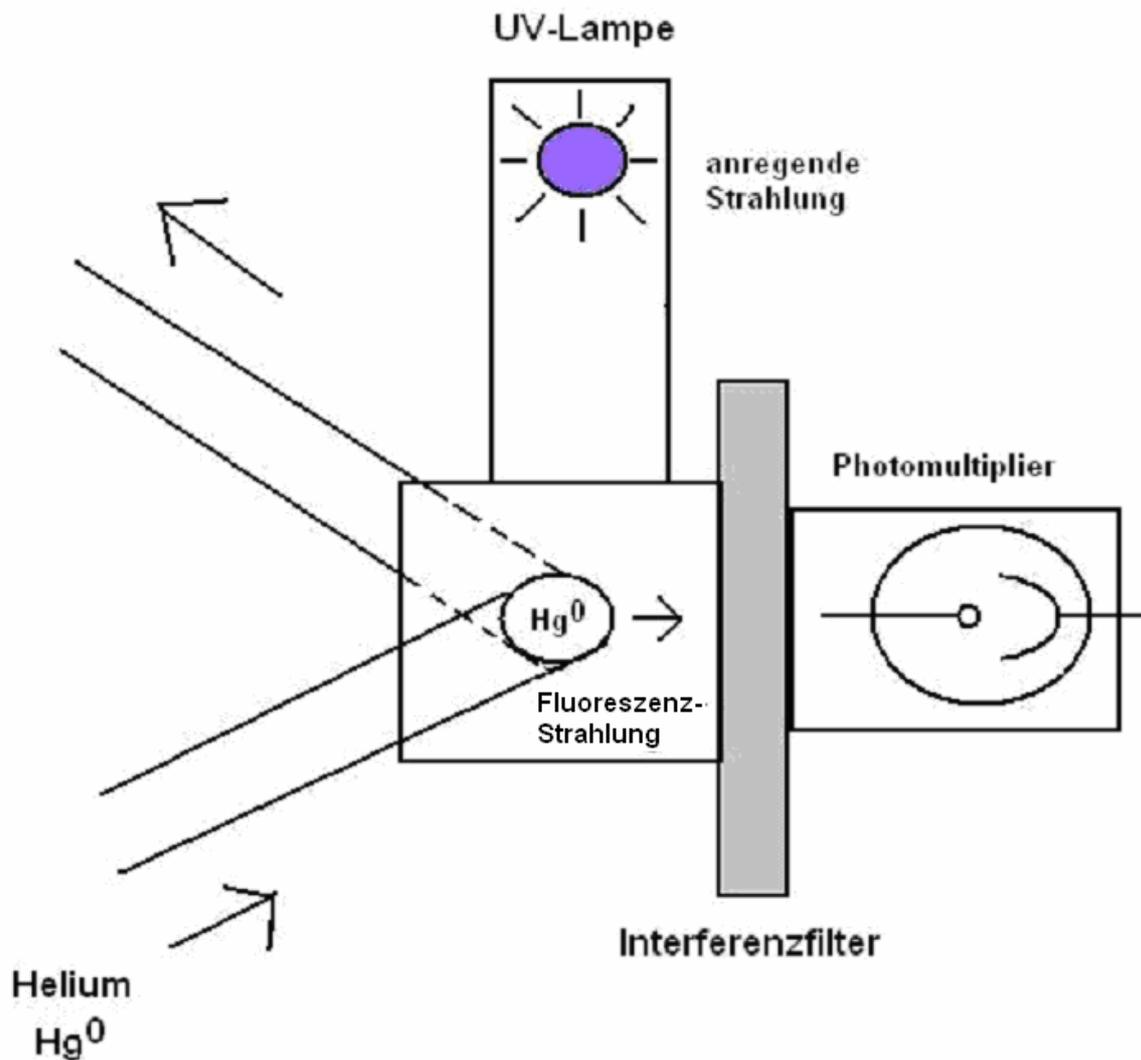
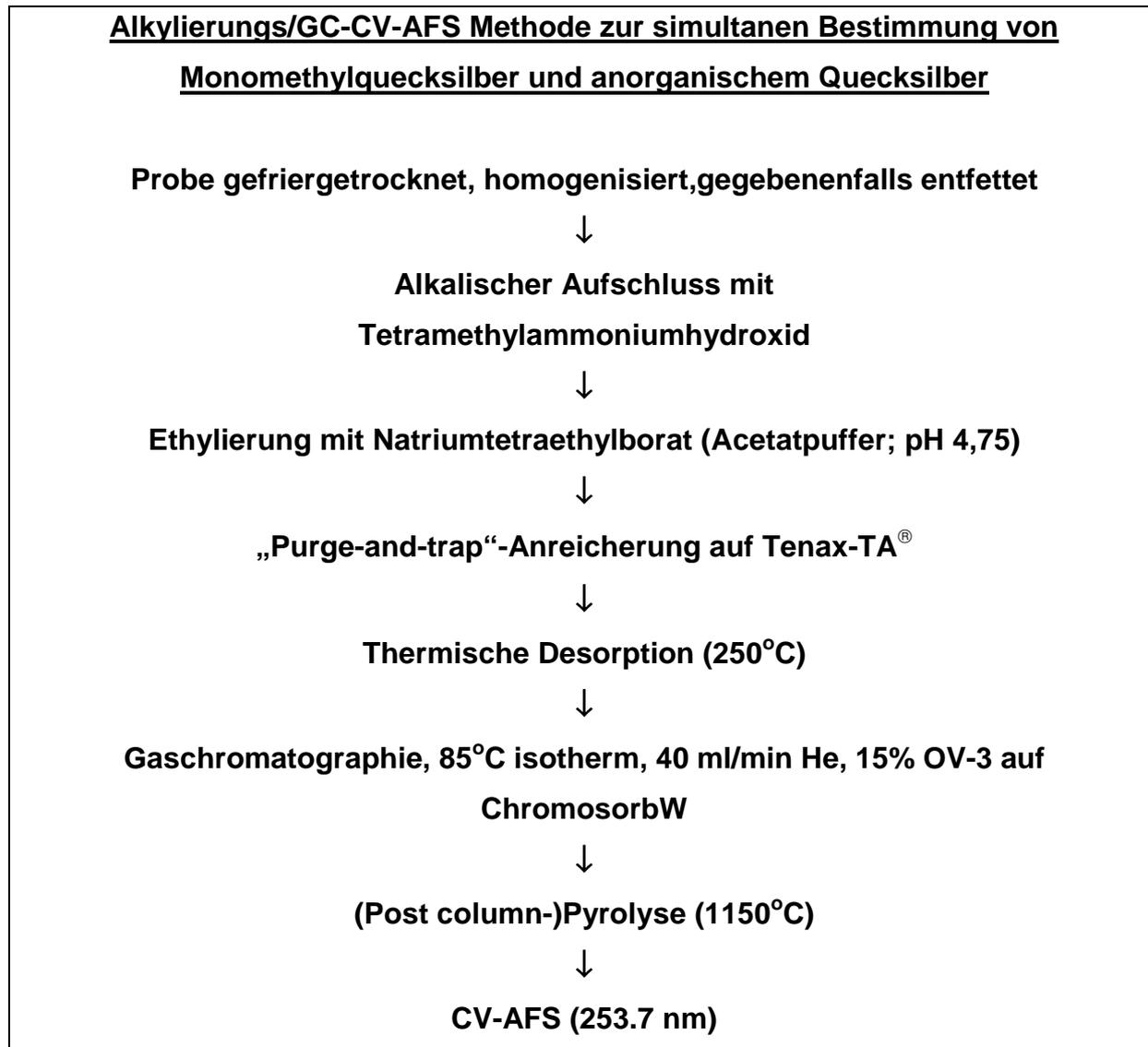


Abbildung 4.14: Schematischer Aufbau eines CV-AFS-Detektors

Der größte Vorteil eines AFS gegenüber eines AAS liegt im sehr einfachen Aufbau und der einfachen Wartung dieses Detektors. Als Strahlungsquelle für die Anregung bei 254nm dient eine UV-Quecksilber-Röhrenlampe. Diese Lampen werden vielfach auch für andere Anwendungen, u.a. in der Mineralfluoreszenz, zum Löschen von EPROM's und zum Entkeimen verwendet. Dementsprechend sind derartige Lampen weit verbreitet und sehr preiswert. Ein Nachteil des Detektors ist, dass sehr reine Gase (mind. Helium 5.0) verwendet werden müssen, um niedrige Nachweisgrenzen zu erreichen. Es sollte kein Stickstoff Verwendung finden, da dies zum starken Quenching führt, welches die Sensitivität um den Faktor 50 herabsetzen würde.

## 4.2.7 Zusammenfassung

Die Vorgehensweise bei der Analytik von MeHg und Hg<sup>2+</sup> mit der entwickelten Methode ist in folgendem Fließdiagramm schematisch zusammenfassend dargestellt.



Die zu untersuchende Probe sollte gefriergetrocknet und feinst homogenisiert vorliegen. Proben, die mehr als 10% Fett enthalten, können zur Vermeidung von Schaumbildung während des purge-Schrittes unter Einhaltung neutraler Bedingungen entfettet werden. Der Fettrückstand sollte auf den Gesamtquecksilbergehalt nach Salpetersäure-Mikrowellenaufschluss untersucht werden, um Verluste bei der Aufarbeitung ausschließen zu können.

Der Aufschluss der Probe erfolgt durch Lyse unter Zugabe von Tetramethylammoniumhydroxid. Anschließend werden die enthaltenen

Quecksilberverbindungen ( $\text{CH}_3\text{Hg}^+$  und  $\text{Hg}^{2+}$ ) 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.

Mithilfe eines Argon-Gasstroms werden die gasförmigen Quecksilberverbindungen aus der Lösung ausgetrieben und auf einem Adsorptionsröhrchen mit Tenax-TA<sup>®</sup> gesammelt. Durch Aufheizen des Adsorptionsröhrchens werden die gesammelten Verbindungen desorbiert und anschließend gaschromatographisch getrennt. Die Detektion erfolgt mittels Kaltdampf-Atomfluoreszenzspektrometrie (CV-AFS) nach vorheriger (post-column) Pyrolyse der Hg-Derivate zu  $\text{Hg}^0$ . Bei der CV-AFS dient das Fluoreszenzsignal der Quecksilberlinie bei 253,7 nm als Maß der Quecksilberkonzentration in der Küvette.

#### 4.2.8 Messanordnung

Folgende Abbildung zeigt die in dieser Arbeit entwickelte und verwendete Messanordnung. In Kapitel 9 des Anhangs (Forschungsbericht FKZ 200 22 230) dieser Arbeit werden eine genaue Anleitung zum Zusammenbau, die technischen Spezifikationen und Hinweise zur Inbetriebnahme der beschriebenen Methode gegeben.

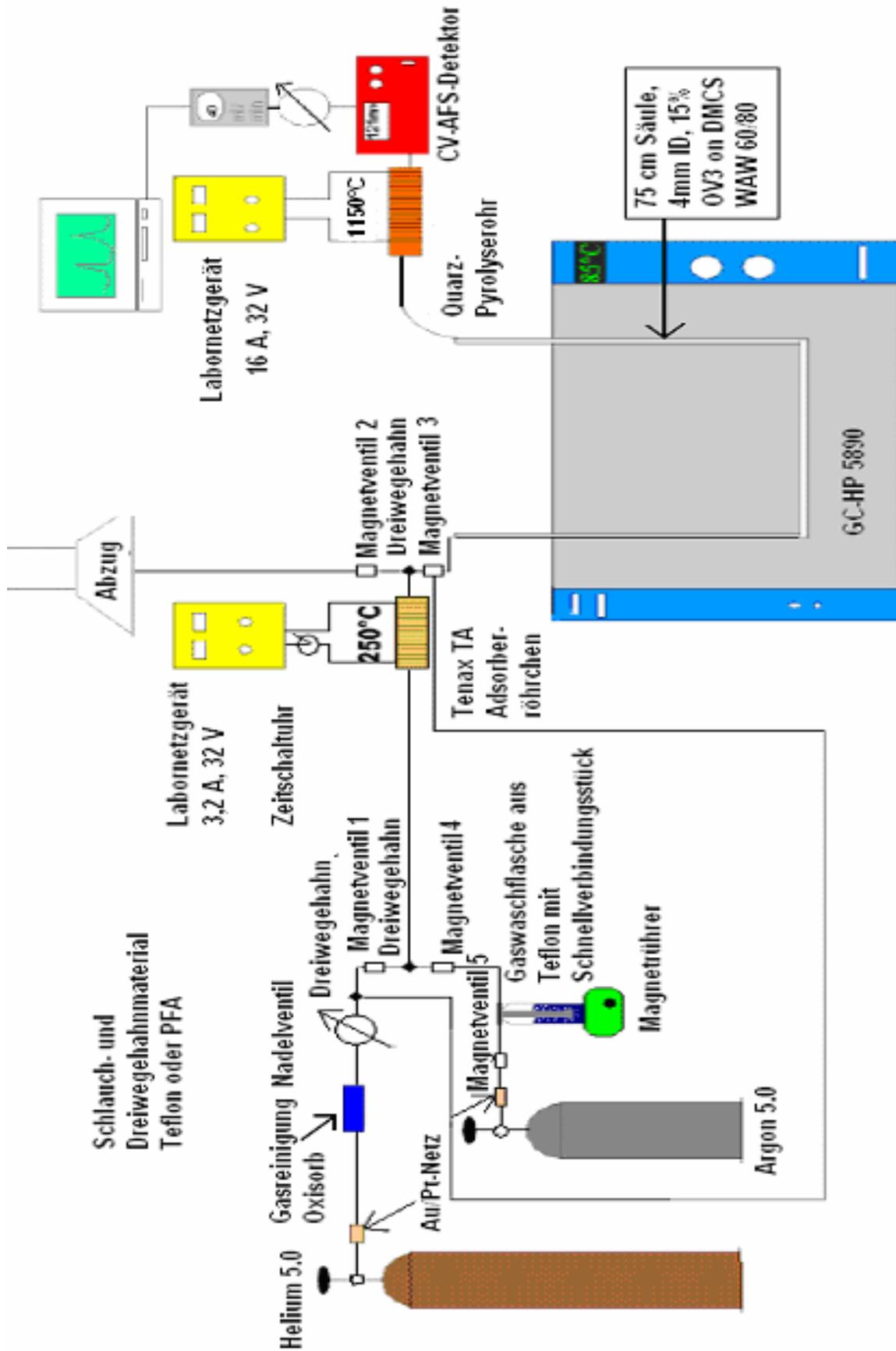


Abbildung 4.15: Messanordnung

### 4.3 Validierung der Methode

Die Methodvalidierung wurde im Rahmen des Forschungsprojektes:

**„Ausarbeitung und Validierung einer Methode zur Bestimmung von Methylquecksilber und anorganischem Quecksilber in Fischgewebe und Zooplankton“** (Umweltbundesamt UFO-PLAN FKZ 200 22 230) durchgeführt.

Der Abschlußbericht zu diesem Projekt ist im Anhang dieser Arbeit zu finden. Darin wird in den Kapiteln 3.1 - 3.5 die genaue Vorgehensweise bei der Validierung, der mathematisch-theoretische Hintergrund, die praktische Durchführung und die Berechnungen der Verfahrensparameter dargestellt.

An dieser Stelle werden nur die wesentlichen Ergebnisse der Validierung kurz wiedergegeben.

#### 4.3.1 Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze

Die Ergebnisse der ermittelten Nachweis- ( $x_{NG}$ ), Erfassungs- ( $x_{EG}$ ) und Bestimmungsgrenze ( $x_{BG}$ ) der entwickelten Methode sind in Tabelle 4.1 zusammengefasst:

Tabelle 4.1: Ergebnisse der Bestimmung von  $x_{NG}$ ,  $x_{EG}$ ,  $x_{BG}$  für MeHg und anorg. Hg nach dem modifizierten Leerwertverfahren und dem Untersuchungsmaterial Kabeljauleber.

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

#### 4.3.2 Überprüfung der Richtigkeit von Untersuchungsergebnissen bzw. Nachweis systematischer Fehler

Die Überprüfung der Richtigkeit von Untersuchungsergebnissen erfolgte durch die Untersuchung der folgenden zertifizierten Referenzmaterialien:

- NRCC-CRM TORT-2 (Lobster Hepatopancreas Reference Material for Trace Metals. National Research Council Canada).  
Dabei handelt es sich um gefriergetrocknetes Material, welches aus der Mitteldarmdrüse von Hummern gewonnen wurde. Bei diesem Material ist der Gehalt an Methylquecksilber und Gesamtquecksilber zertifiziert.
- NIST-2976 (Mussel tissue. LGC Promochem). Für dieses Muschelgewebe ist der Methylquecksilber und Gesamtquecksilbergehalt zertifiziert.
- BCR CRM 414 (Plankton, Institute for Reference Materials and Measurements (IRMM)). Hierbei handelt es sich um gefriergetrocknetes Plankton. Bei diesem Material ist der Gesamtquecksilbergehalt zertifiziert.

und

durch Zusatzversuche (Spiking-Experimente), bei denen eine definierte Menge des Analyten dem zu testenden Probenmaterial zugesetzt wird.

Die Tabellen 4.1-4.4 fassen die Ergebnisse der Untersuchungen zusammen:

Tabelle 4.2: Zusammenstellung der Ergebnisse zur Richtigkeitsüberprüfung der Analytik von Monomethylquecksilber, Gesamt-Quecksilber (gemessen als anorganisches Quecksilber) und anorganischem Quecksilber durch Untersuchung des zertifizierten Referenzmaterials *NRCC-CRM TORT-2 (Lobster Hepatopancreas Reference Material for Trace Metals)*.

Parameter	Ergebnis
$x_{CRM}$ (TORT-2); Methylquecksilber	$152,0 \times 10^{-6} \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$
$u(x_{CRM})$	$13,0 \times 10^{-6} \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$
$\bar{x}_{q,pred}$ (TORT-2); Methylquecksilber	$125,02 \times 10^{-6} \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$
$u_{c,prec}(\bar{x}_{q,pred}) =$	$8,47 \times 10^{-6} \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$
$x_{CRM}$ (TORT-2); Gesamtquecksilber	$270,0 \times 10^{-6} \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$
$u(x_{CRM})$	$6,0 \times 10^{-6} \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$
$\bar{x}_{q,pred}$ (TORT-2); Gesamtquecksilber	$288,2 \times 10^{-6} \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$

$u_{c,prec}(\bar{x}_{q,pred}) =$	$11,56 \times 10^{-6} \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$
$x_{CRM}$ (TORT-2); anorganisches Quecksilber	$118,0 \times 10^{-6} \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$
$u(x_{CRM})_{anorgHg}$	$14,3 \times 10^{-6} \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$
$\bar{x}_{q,pred}$ (TORT-2); anorganisches Quecksilber	$123,4 \times 10^{-6} \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$
$u_{c,prec}(\bar{x}_{2,q,pred}) =$	$9,08 \times 10^{-6} \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$

Tabelle 4.3: Zusammenstellung der Ergebnisse zur Richtigkeitsüberprüfung der Analytik von Monomethylquecksilber und Gesamt-Quecksilber (gemessen als anorganisches Quecksilber) durch Untersuchung des zertifizierten Referenzmaterials *NIST-2976 (Mussel tissue)*.

Parameter	Ergebnis
$x_{CRM}$ (NIST-2976); Methylquecksilber	$27,8 \times 10^{-6} \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$
$u(x_{CRM})$	$0,35 \times 10^{-6} \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$
$\bar{x}_{q,pred}$ (NIST-2976); Methylquecksilber	$26,7 \times 10^{-6} \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$
$u_{c,prec}(\bar{x}_{q,pred}) =$	$0,56 \times 10^{-6} \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$
$x_{CRM}$ (NIST-2976); Gesamtquecksilber	$61,0 \times 10^{-6} \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$
$u(x_{CRM})$	$1,29 \times 10^{-6} \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$
$\bar{x}_{q,pred}$ (NIST-2976); Gesamtquecksilber	$59,7 \times 10^{-6} \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$
$u_{c,prec}(\bar{x}_{q,pred}) =$	$1,91 \times 10^{-6} \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$

Tabelle 4.4: Zusammenstellung der Ergebnisse zur Richtigkeitsüberprüfung der Analytik von Gesamt-Quecksilber (gemessen als anorganisches Quecksilber) durch Untersuchung des zertifizierten Referenzmaterials *BCR CRM 414 (Plankton)*

Parameter	Ergebnis
$x_{CRM}$ (CRM 414); Gesamtquecksilber	$276,0 \times 10^{-6} \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$
$u(x_{CRM})$	$18,0 \times 10^{-6} \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$
$\bar{x}_{q,pred}$ (CRM 414); Gesamtquecksilber	$267,6 \times 10^{-6} \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$
$u_{c,prec}(\bar{x}_{q,pred}) =$	$27,3 \times 10^{-6} \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$

Die Ergebnisse der Untersuchungen von zertifiziertem Referenzmaterial und die Ergebnisse der Wiederfindungsexperimente (hier nicht dargestellt) zeigten, dass systematische Fehler bei der Bestimmung der Analyte Monomethylquecksilber, anorganisches Quecksilber und Gesamtquecksilber nicht nachgewiesen werden konnten.

Die verwendeten Untersuchungsmaterialien entsprachen bezüglich ihrer Matrixbestandteile annähernd den gemäß Aufgabenstellung zu untersuchenden Matrices (Fischgewebe und Fischembryonen) 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).

#### ***4.3.4 Überprüfung der Leistungsfähigkeit der Methode***

Zur Überprüfung der Leistungsfähigkeit der Methode wurde eine zweifache robuste Varianzanalyse mit Wiederholungsmessungen durchgeführt. Dabei wurde geprüft, ob der analytische Fehler der ausgearbeiteten Methode klein genug ist, um inhomogene Verteilungen innerhalb und zwischen Probenmaterialien erkennen zu können.

Die robuste Varianzanalyse zeigte, dass die durch die Unterschiede im Analytgehalt zwischen den Testmaterialien hervorgerufene Varianzkomponente die größte der drei untersuchten Varianzkomponenten ist. Die dem analytischen Fehler zugeordnete Varianzkomponente machte nur etwa 4% (für Monomethylquecksilber) bzw. 1,4% (für anorganisches Quecksilber) der Summe aller drei Varianzkomponenten aus, so dass die Unterschiede im Analytgehalt zwischen und innerhalb des Untersuchungsmaterials sicher erkannt werden können.

## **5. Felduntersuchungen**

### **5.1 Quecksilbergehalte in pelagischen Fischembryonen**

#### **5.1.1 Einleitung**

Eine der Zielsetzungen der vorliegenden Doktorarbeit war es zu ermitteln, ob messbare Mengen an anorganischen und organischen Quecksilber in befruchteten Fischeiern feststellbar sind und damit eine validierte, quantitative Bestimmung von Quecksilberverbindungen in marinen, pelagischen Fischeiern möglich ist.

Dies würde eine Aussage darüber zulassen, ob sich aus ihrer natürlichen Umgebung entnommene Fischeier als akkumulative Bioindikatoren für sowohl anorganische Quecksilberverbindungen als auch Organoquecksilberverbindungen prinzipiell eignen.

#### **5.1.2 Material und Methoden**

Im Rahmen von zwei Forschungsreisen zur Erfassung der Häufigkeit und der Verbreitung von Missbildungen bei pelagischen Fischembryonen wurden in den Jahren 2002 und 2003 an mehreren Stationen im Gebiet der deutschen Bucht Proben entnommen. Die Seereisen fanden jeweils Ende Februar bis Anfang März (während der Hauptlaichzeit) mit dem Fischereiforschungsschiff WALTHER HERWIG III statt. Dabei wurde ein Planktonnetz nach Apstein (1m Durchmesser, 500µm Maschenweite) in 1-5 m Tiefe zur Probennahme von pelagisch verdrifteten Fischembryonen eingesetzt (Abbildung 5.1 a und 5.1b). Dazu wurde das Planktonnetz über einen Zeitraum von 10-15 Minuten in möglichst gleichbleibender Tiefe mit ca. 1 Knoten Geschwindigkeit in einer Entfernung von etwa 5 m zum Schiff geschleppt. Am Ende des Planktonnetzes befindet sich ein Gefäß, welches das erfasste Plankton sammelt und nach dem Schleppen vom eigentlichen Netz zur Entleerung entfernt werden kann.



Abbildung 5.1a und b : Planktonnetz nach Apstein (Quelle: Abb.5.1a: Mit freundlicher Genehmigung der Hydro-Bios Anlagenbau GmbH. Abbildung 5.1b: Eigenes Bild von der 237. Reise Fischereiforschungsschiff Walther Herwig III)

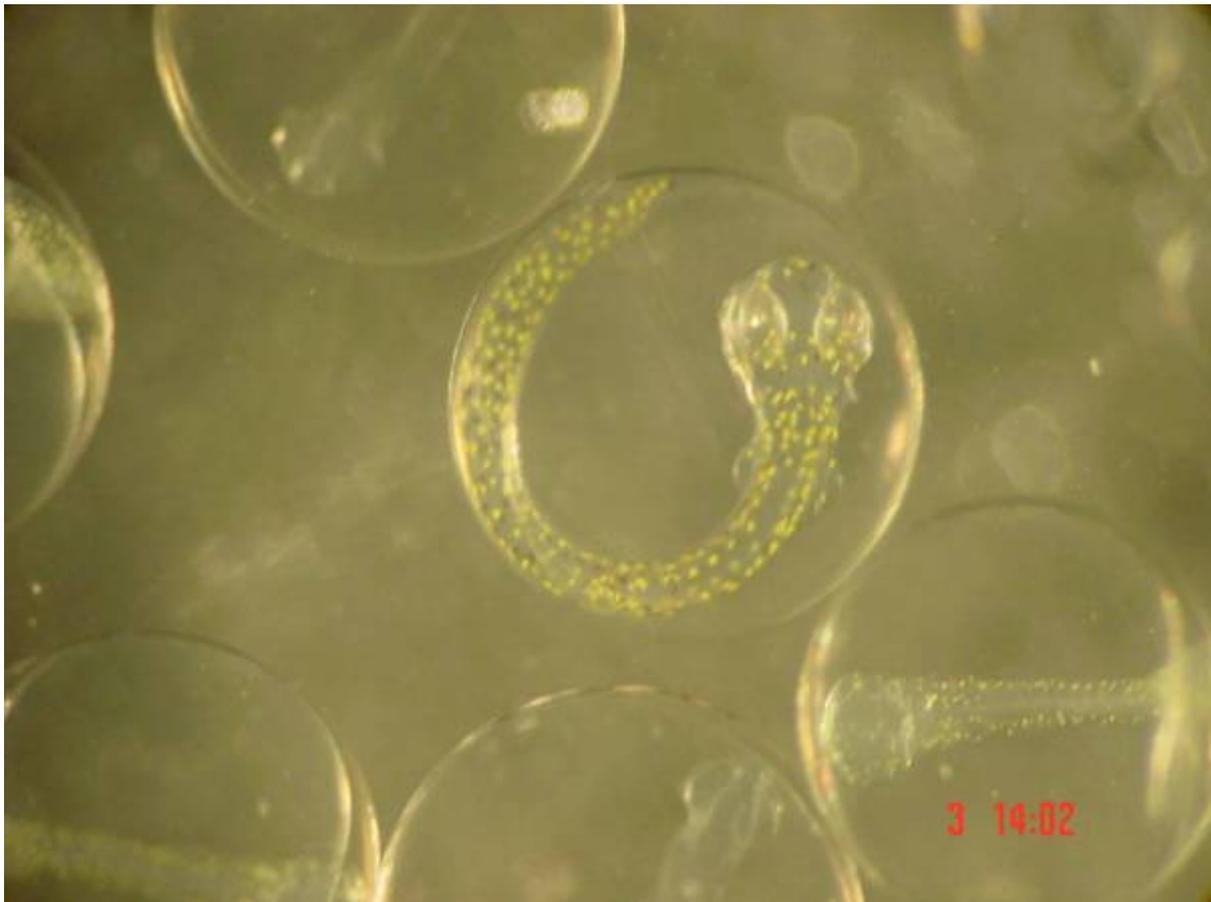


Abbildung 5.2: Lichtmikroskopische Aufnahme von Fischembryonen (Vergrößerung)  
(5.2: Eigenes Bild von der 237. Reise Fischereiforschungsschiff mit der Walther Herwig III)

Die Abbildung 5.2 zeigt die Fischembryonen einer Probe aus der Nordsee unter dem Lichtmikroskop. Die entnommenen Proben beinhalteten Fischeier unterschiedlicher Freiwasserlaicher wie Kliesche, Scholle, Wittling (nur im südlichen Untersuchungsgebiet anzutreffen), Steinbutt, Flunder, Kabeljau, Doggerscharbe, Sprotte, Knurrhahn, Seezunge und Seequappe. Jedes einzelne Fischei wurden von Hand sortiert und so von Fremdstoffen und weitestgehend vom Meerwasser separiert, in Cryogefäße verbracht und unmittelbar nach der Untersuchung unter dem Mikroskop in flüssigem Stickstoff (-196°C) tiefgefroren und bis zur Aufarbeitung in diesem gelagert. Je Station wurden ca. 500 Fischeier unterschiedlicher Arten und Entwicklungsstadien gewonnen.

Durch die Art der Probenentnahme wurden neben den Fischeiern auch Sandaale, Medusen, Nudibranchier und juvenile Fische entnommen, die später in Vorversuchen für Aufschlussexperimente eingesetzt wurden.

Die Abbildung 5.3 zeigt die Stationen der Probenentnahme des Jahres 2002. In diesem Jahr konnten nicht alle geplanten Stationen angefahren werden, da an einigen Tagen schwerer Seegang den Einsatz des Planktonnetzes unmöglich machte.

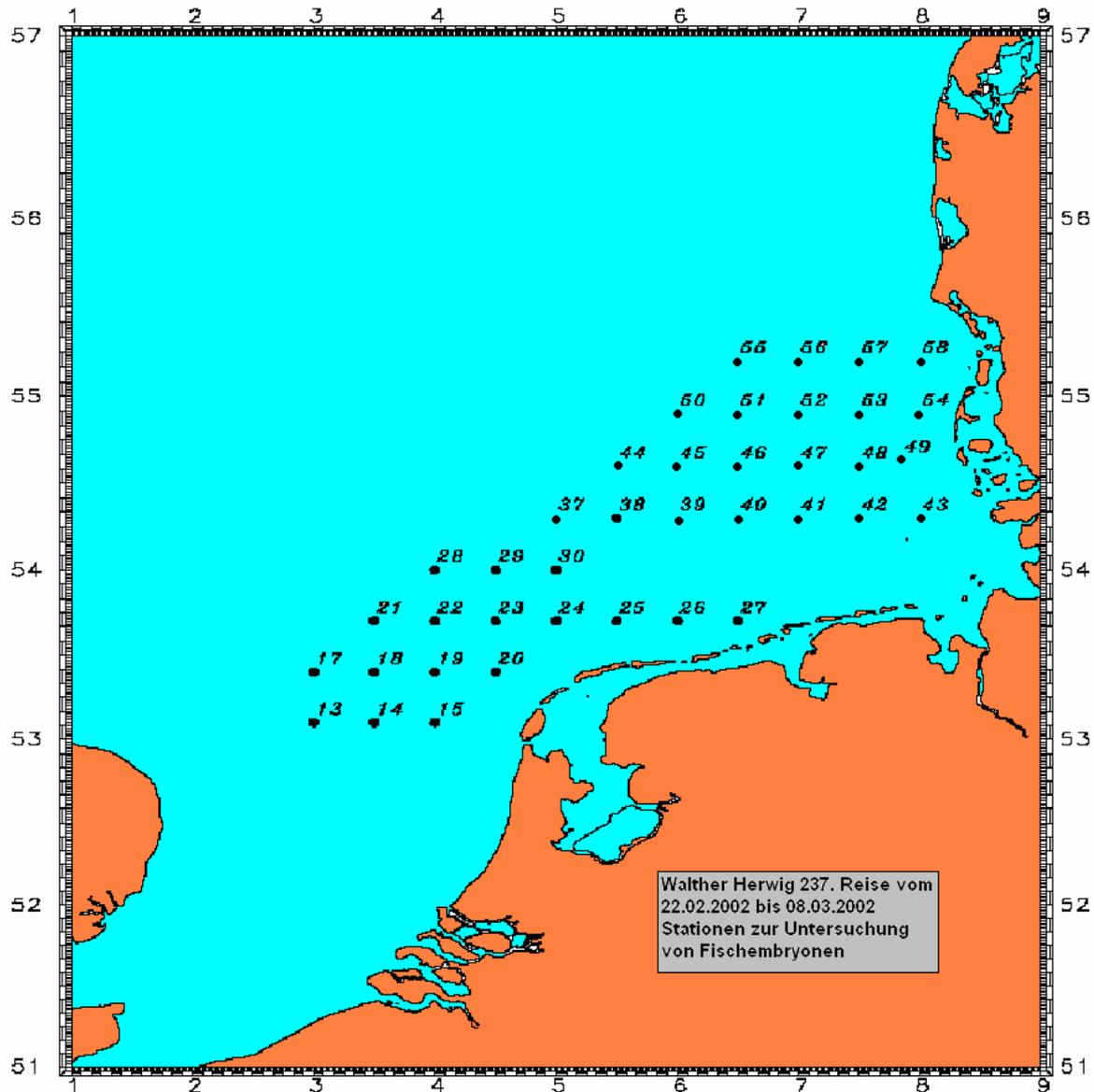


Abbildung 5.3: Stationen der Probenentnahme der Fischembryonen im Jahr 2002  
(Entnommen aus dem Bericht über die 237. Reise FFS Walther Herwig III vom 22.02. bis 08.03.2002;  
teilweise modifiziert)

Im Jahr 2003 herrschten bessere Bedingungen für die Probenentnahme, so dass fast sämtliche geplanten Stationen beprobt werden konnten. Die Abbildung 5.4 zeigt die Stationen der Probenentnahme im Jahr 2003.

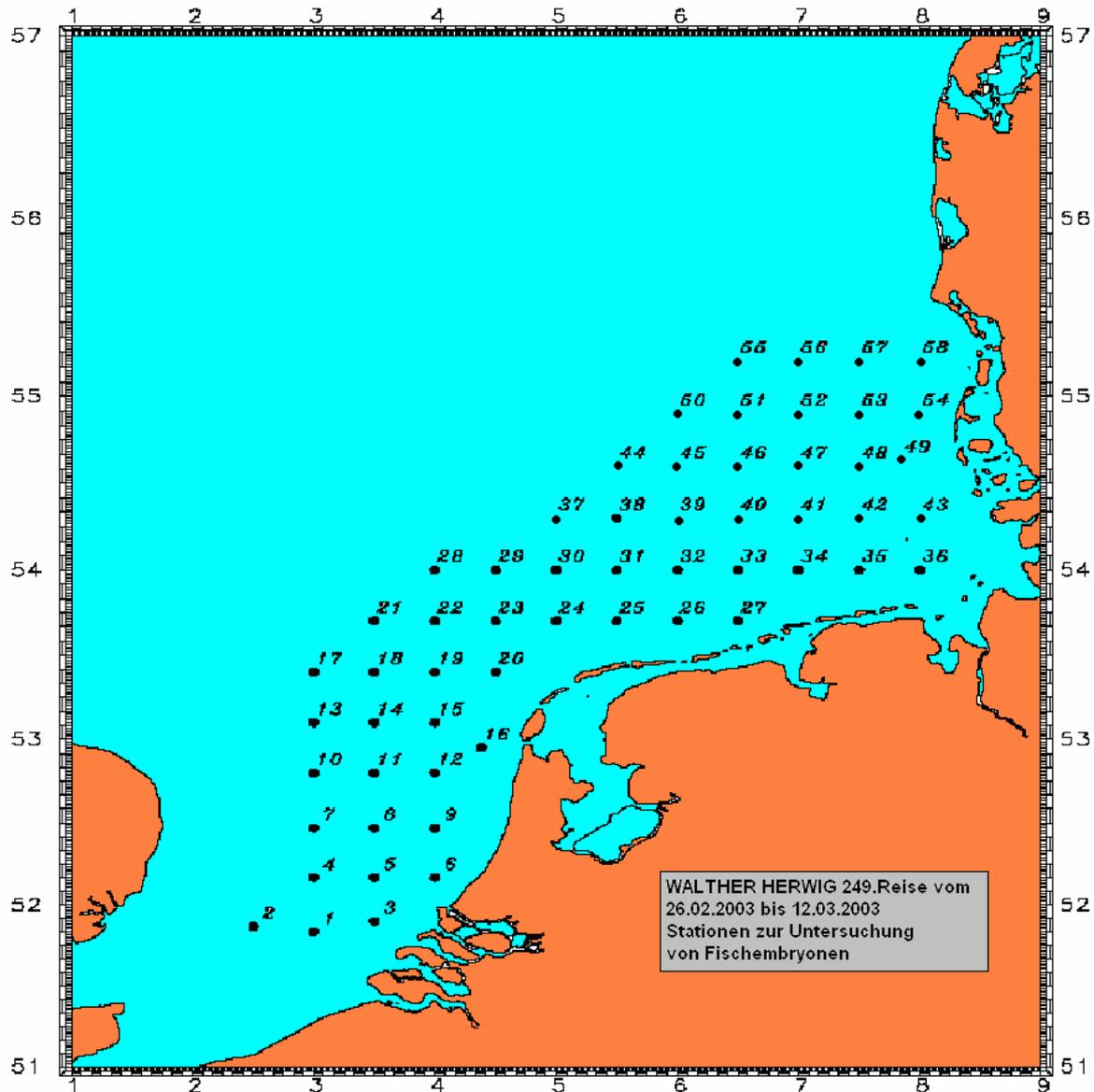


Abbildung 5.4: Stationen der Probenentnahme der Fischembryonen im Jahr 2003  
(Entnommen aus dem Bericht über die 249. Reise FFS Walther Herwig III vom 26.02. bis 12.03.2003 teilweise modifiziert)

Die bei der 237. und 249. Reise des FFS Walther Herwig III gewonnenen Proben wurden wenige Woche nach Ende der Forschungsreise aus dem flüssigem Stickstoff entnommen und gemäß Anlage 8.10.2 für die Bestimmung der Gehalte an anorganischem und Methylquecksilber aufgearbeitet.

## 5.1.3 Ergebnisse

Abbildung 5.5 gibt einen Überblick über Lage der Stationen und den gemittelten Gehalt an anorganischen Quecksilber und Methylquecksilber aus dem Jahr 2002. Die mittleren Gehalte sowie deren Standardabweichungen sind in den Abbildungen 5.6 und 5.7 dargestellt.

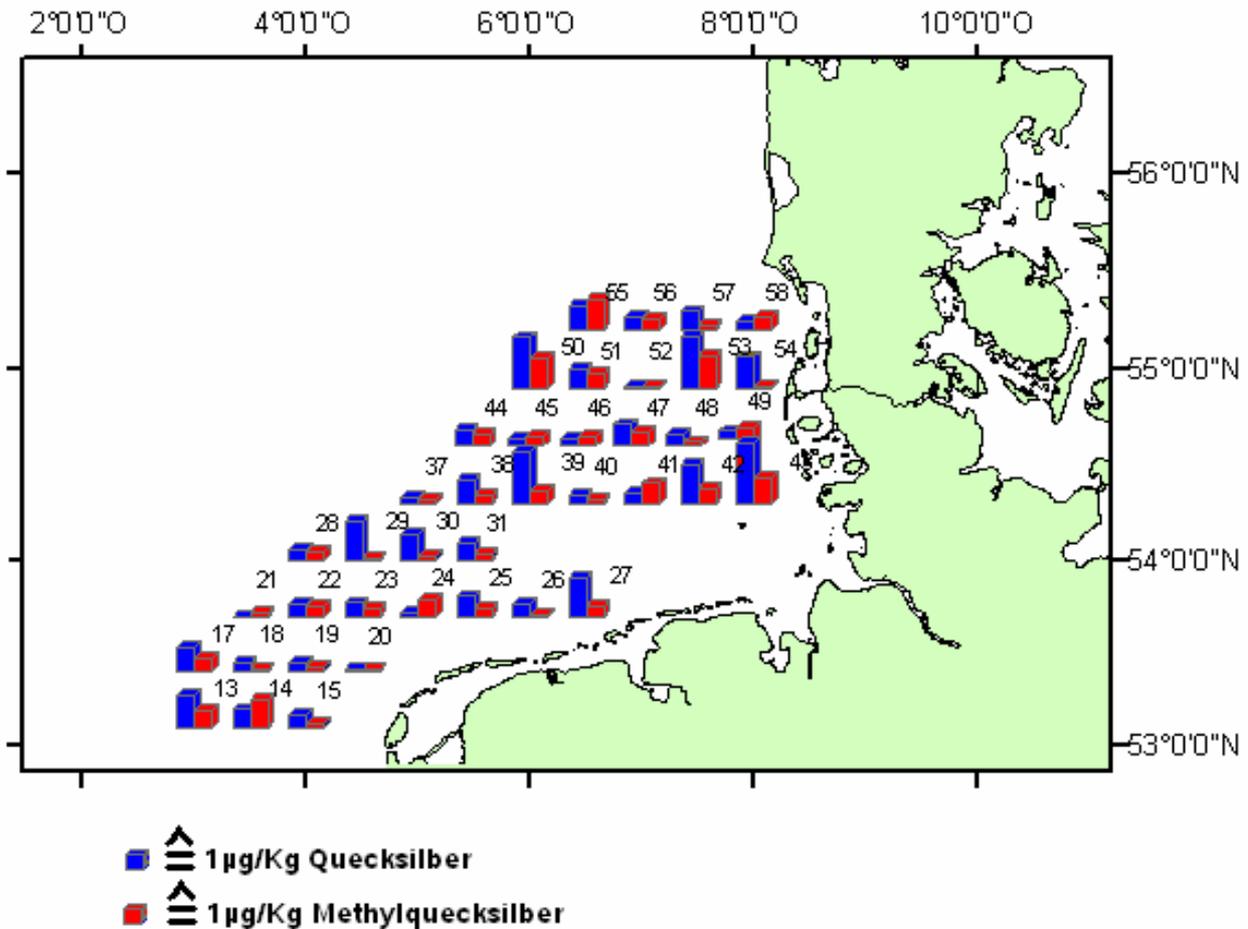


Abbildung 5.5: Dargestellt sind die Mittelwerte (ca. 500 Fischeier /Station) von anorganischem Quecksilber (blau) und Methylquecksilber (rot) mit den zugehörigen Stationsnummern der Untersuchung pelagischer Fischembryonen aus dem Jahr 2002.

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

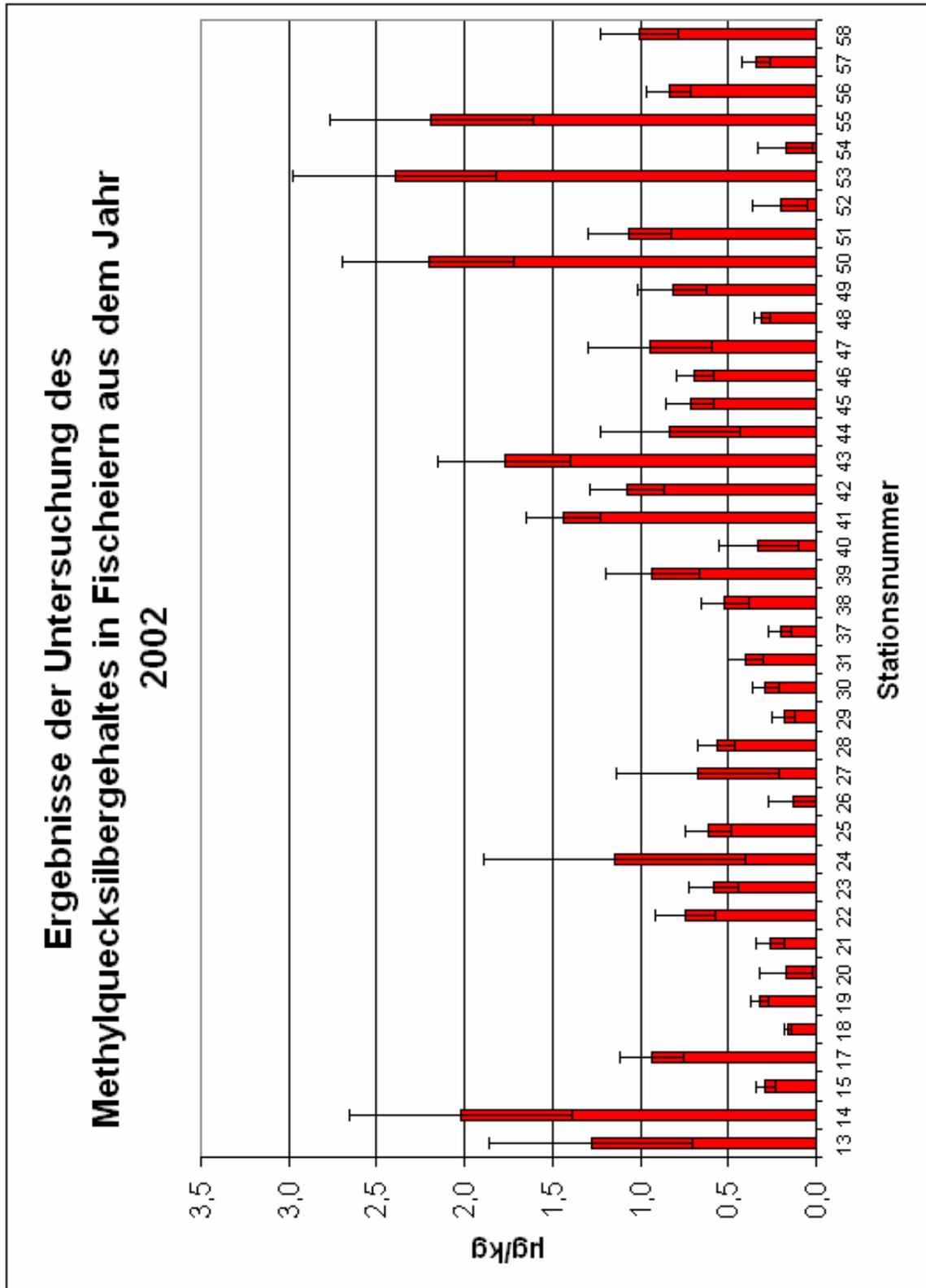


Abbildung 5.6: Übersicht der mittleren Methylquecksilbergehalte und der Standardabweichungen (ausgedrückt als 95% Vertrauensbereich) der Fischeibryonen aus dem Jahr 2002 mit den zugehörigen Stationsnummern.

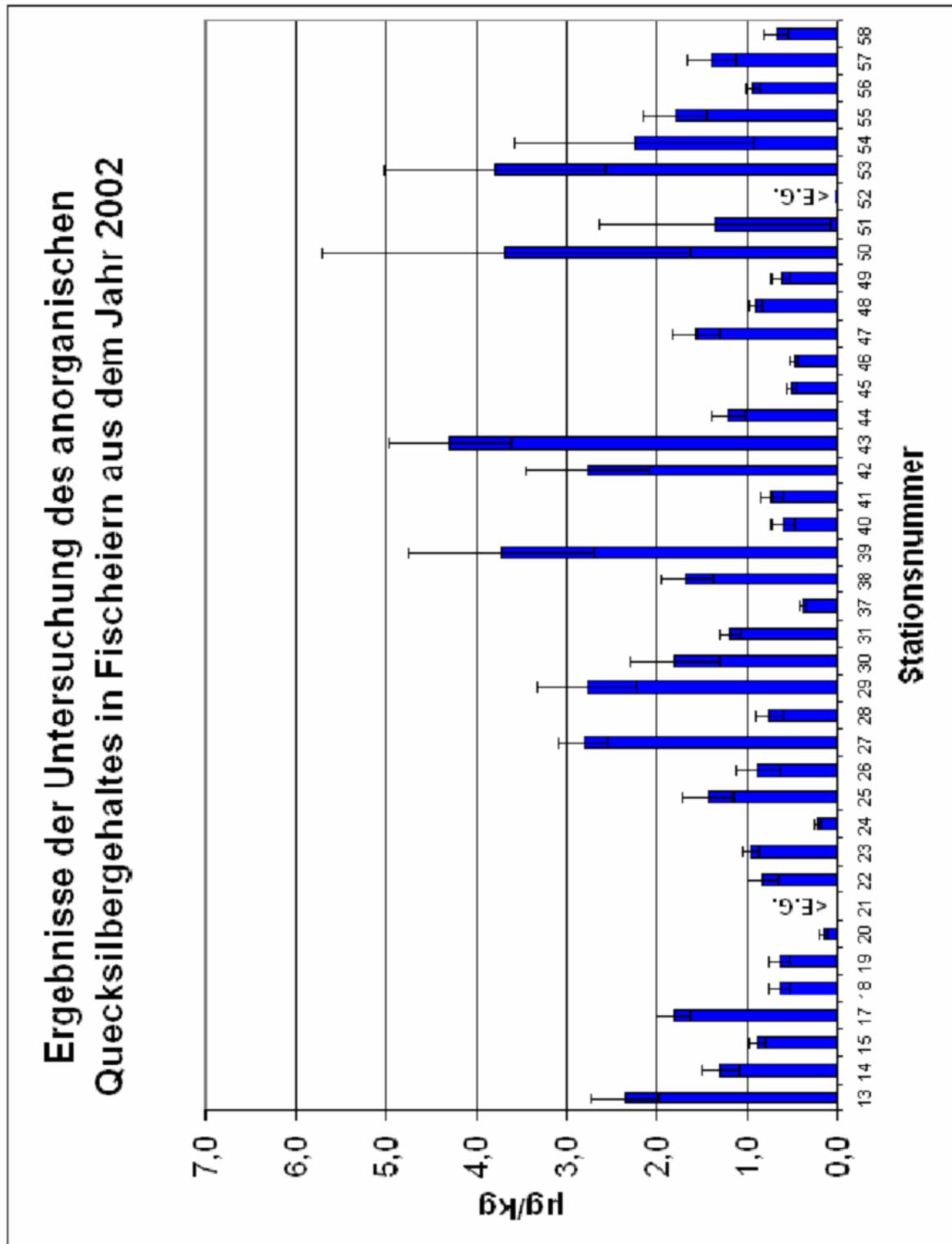


Abbildung 5.7: Übersicht der mittleren Gehalte an anorganischen Quecksilber und der Standardabweichungen (ausgedrückt als 95% Vertrauensbereich) der Fischeibryonen aus dem Jahr 2002 mit den zugehörigen Stationsnummern.

Die Abbildung 5.8 gibt einen Überblick über Lage der Stationen und der mittleren Gehalte an anorganischen Quecksilber und Methylquecksilber aus dem Jahr 2003

Die gemittelten Gehalte sowie deren Standardabweichungen sind in den Abbildungen 5.9 und 5.10 dargestellt.

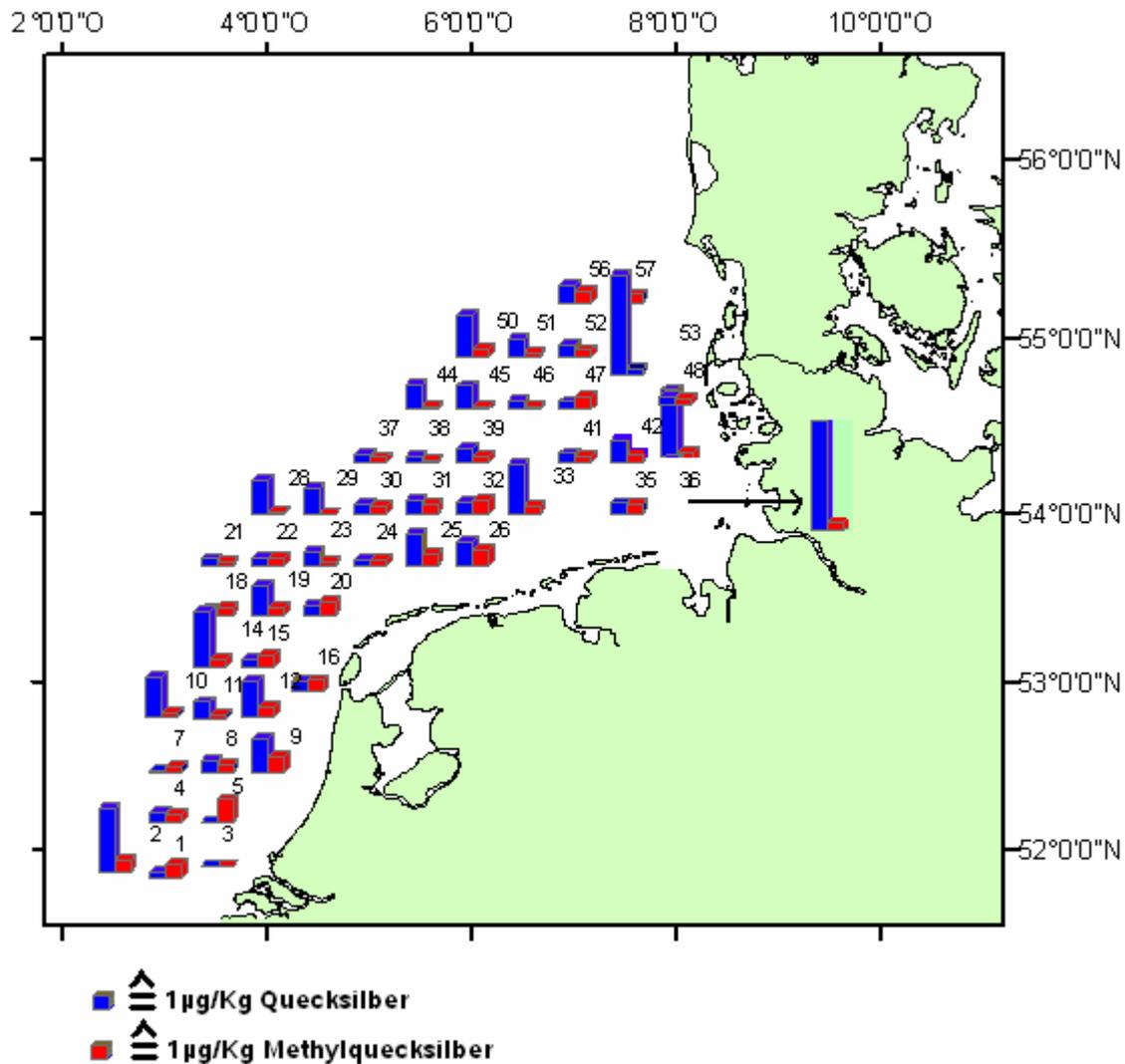


Abbildung 5.8: Dargestellt sind die mittleren Gehalte von anorganischem Quecksilber (blau) und Methylquecksilber (rot) mit den zugehörigen Stationsnummern der Untersuchung pelagischer Fischembryonen aus dem Jahr 2003

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

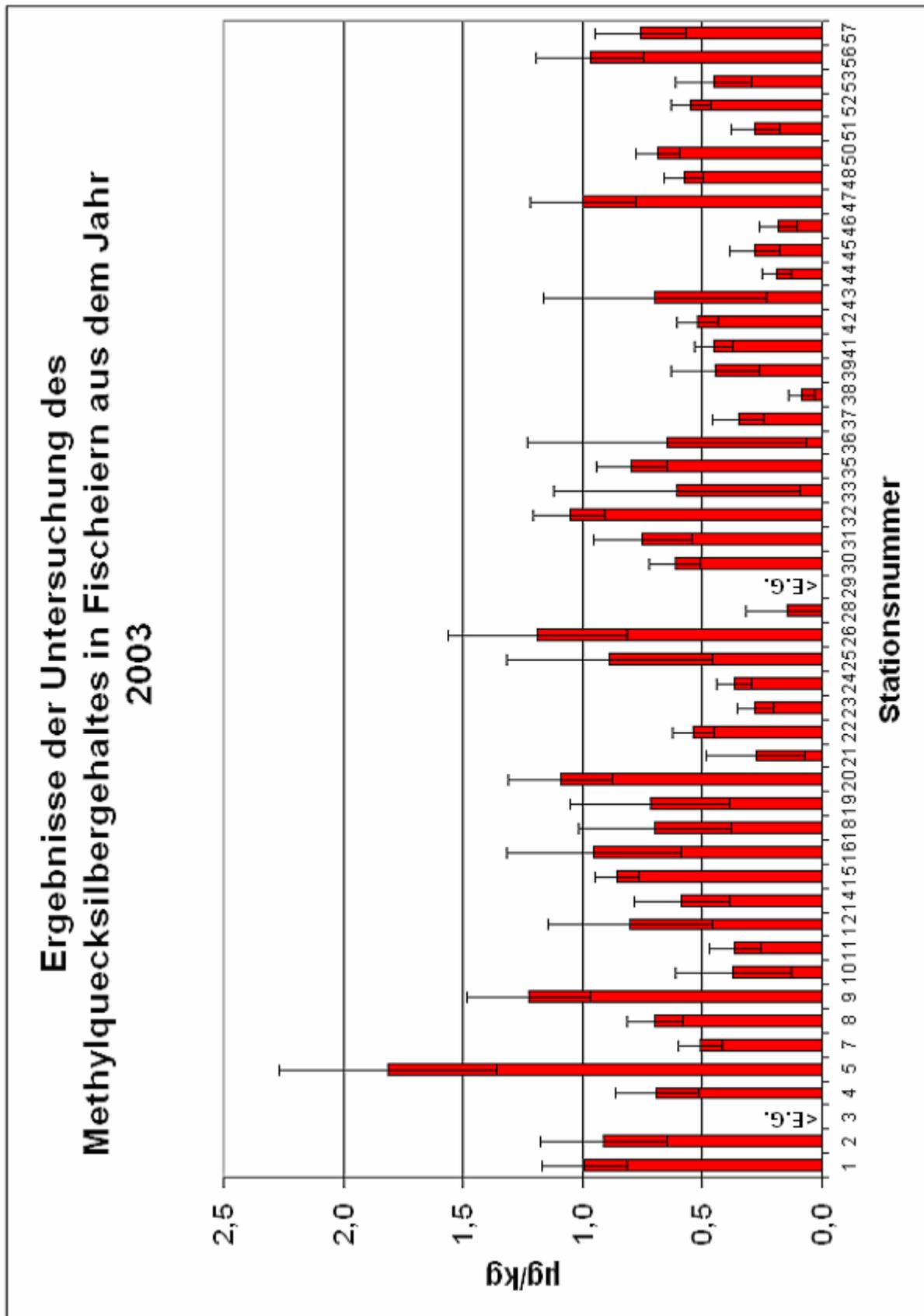


Abbildung 5.9: Übersicht über die mittleren Methylquecksilbergehalte und deren Standardabweichungen (ausgedrückt als 95% Vertrauensbereich) der Fischeibryonen aus dem Jahr 2003 mit den zugehörigen Stationsnummern.

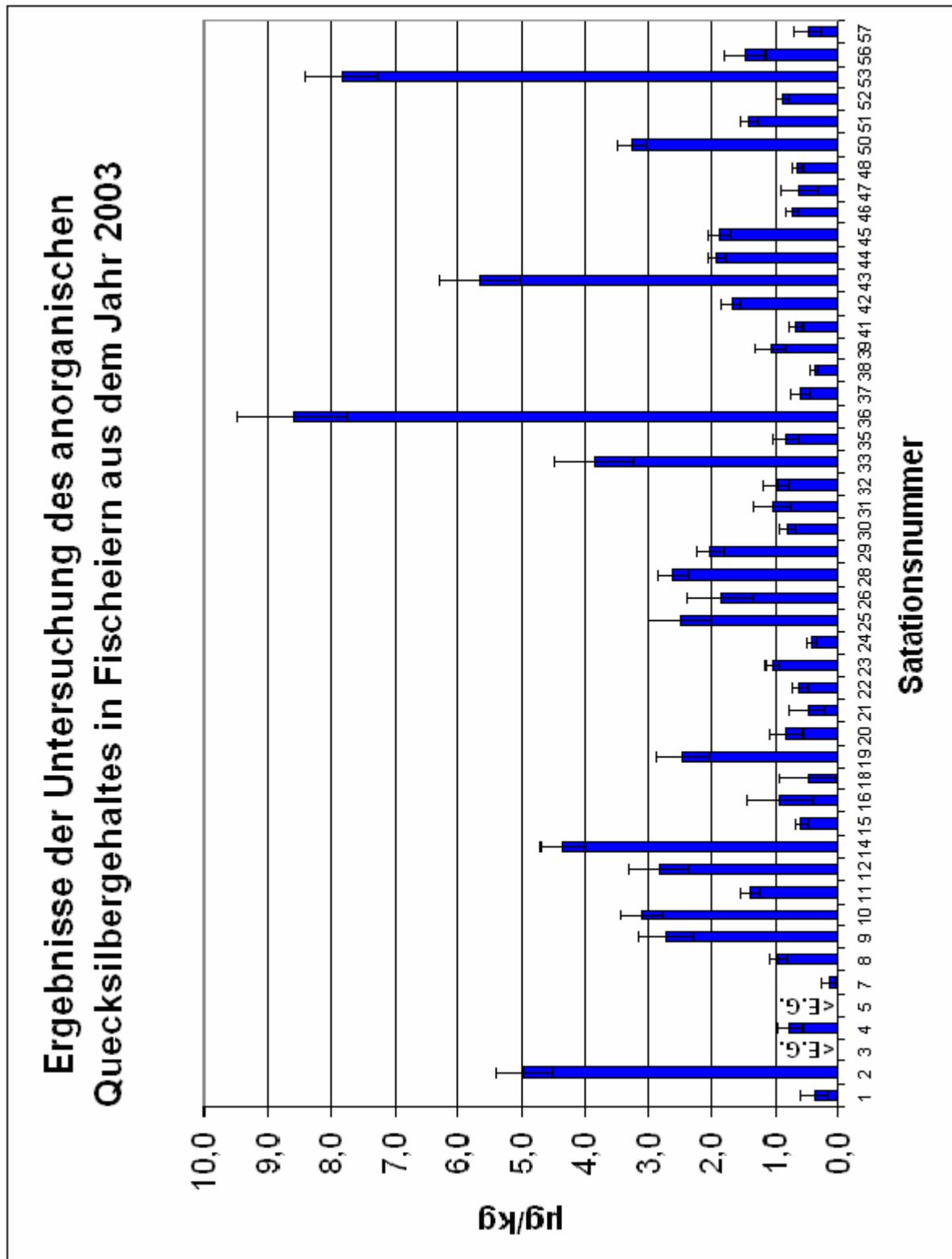


Abbildung 5.10: Übersicht über die mittleren Gehalte an anorganischen Quecksilber und deren Standardabweichung (ausgedrückt als 95% Vertrauensbereich) der Fischeibryonen aus dem Jahr 2003 mit den zugehörigen Stationsnummern.

#### 5.1.4 Diskussion

Betrachtet man die Messwerte der vorliegenden Untersuchungen, so fällt zunächst auf, dass die festgestellten Gehalte an anorganischen und organischen Quecksilber in marinen pelagischen Fischeiern sehr gering sind. Vergleicht man die an Fischeiern festgestellten Werte (im Durchschnitt 1,7 µg/kg anorganisches Quecksilber und 0,73 µg/kg Methylquecksilber, siehe Abschnitt 5.2) mit denen von ausgewachsenen Fischen (im Durchschnitt 5µg/kg anorganisches Quecksilber und 101,4µg MeHg/kg), so sind die Methylquecksilberkonzentrationen in Fischeiern um etwa das 100fache niedriger als z.B. in Klieschenfilets. Die Ergebnisse der untersuchten Fischembryonen aus der Nordsee zeigen, dass die in dieser Arbeit entwickelte Methode für die Untersuchung von Konzentrationen um 1 µg MeHg/kg Frischgewicht an die Grenze ihrer Leistungsfähigkeit stößt. Nichtsdestotrotz ließen sich in den Fischeiern messbare Mengen an anorganischen und organischen Quecksilber feststellen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen lassen sich nur bedingt mit den Ergebnissen anderer Studien vergleichen - denn die wenigen Studien mit ähnlicher Fragestellung differieren von der hier vorgestellten Arbeit durch einige methodische Unterschiede:

So erfolgte die von Johnston et al. 2001 durchgeführte Analyse der Gehalte an Gesamtquecksilber und Methylquecksilber in Fischeiern nicht - wie in der hier vorgestellten Studie - simultan. Johnston et al. 2001 bestimmten vielmehr zunächst den Gesamtquecksilbergehalt mittels AAS nach vollständiger Reduktion. In einem anschließenden Schritt wurden die Organoquecksilberverbindungen nach Zugabe von Natriumbromid, Schwefelsäure und Kupfersulfat mit Hexan/Dichlormethan - nach der Methode der selektiven Reduktion - extrahiert und erneut auf den Gesamtquecksilbergehalt hin untersucht. Unter der Annahme, dass das gesamte extrahierte Organoquecksilber Methylquecksilber ist, wurde der so ermittelte Gesamtquecksilbergehalt mit dem Gehalt an MeHg gleichgesetzt. Diese Vorgehensweise ermöglichte keine Aussagen über den Gehalt der Fischeier an anorganischen Quecksilber, da so bei 3 von 7 Untersuchungsgebieten Gehalte an Methylquecksilber ermittelt wurden, welche höher lagen als die Gesamtquecksilbergehalte. Die Autoren erklären diesen widersprüchlichen Umstand damit, dass die Gehalte der Fischeier an anorganischem Quecksilber nahe der Nachweisgrenze der Methode lagen. Die teilweisen widersprüchlichen Resultate von

Johnston et al. 2001 zeigen den Vorteil der in der vorliegenden Studie verwendeten Methode, bei der anorganisches Quecksilber und MeHg simultan bestimmt werden. Ein weiterer methodischer Unterschied zu vergleichbaren Studien wie der von Johnston et al. 2001 und Latif et al. 2001 ist die Art der Probennahme bzw. die Art der Proben. Johnston et al. 2001 und Latif et al. 2001 untersuchten unbefruchtete Fischembryonen des amerikanischen Zanders (*Stizostedion vitreum*), die durch Abstreichen oder durch direkte Entnahme aus dem Körper der Muttertiere gewonnen wurden. Diese Eier hatten also keinen direkten Kontakt mit dem Umgebungswasser. Dieser Umstand könnte die Tatsache erklären, dass Johnston et al. 2001 - im Gegensatz zu den hier ermittelten Ergebnissen - kein anorganisches Quecksilber in den Fischeiern fanden.

Andererseits ist ein niedriger Gehalt an anorganischem Quecksilber in Fischeiern nicht überraschend: Es ist zu erwarten, dass die relativen Gehalte an anorganischem Quecksilber in Fischeiern, die sich noch im Körper des Muttertieres befinden, in der gleichen Größenordnung liegen wie die Gehalte an anorganischem Quecksilber in anderem Fischgewebe. Letztere sind erfahrungsgemäß sehr niedrig, da anorganisches Quecksilber im Organismus deutlich weniger effektiv akkumuliert wird (Watras et al. 1998).

Daher ist zu vermuten, dass anorganisches Quecksilber erst beim Kontakt der Fischeier mit dem Seewasser aufgenommen und gegenüber dem Meerwasser angereichert wird. Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten pelagischen Fischeier wiesen einen durchschnittlichen Gehalt an anorganischem Quecksilber von 1,7 µg/kg auf. Der durchschnittliche  $\text{Hg}^{2+}$ -Gehalt in der offenen Nordsee beträgt etwa 0,2 bis 0,5 ng/Liter, in Küstennähe bis zu 4 ng/Liter (Messprogramm Meeresumwelt 2005). Im Vergleich zum Nordseewasser hat sich folglich der Quecksilbergehalt der Fischeier bereits nach ca. 1 bis 10 Tagen (= die durchschnittliche Verweildauer der untersuchten Eier im Meerwasser, Vobach pers. Mitteilung 2006) in etwa um das 1000fache bis 10000fache angereichert. Dies entspricht in etwa den von Mason et al. (1995a, 1995c) festgestellten Akkumulationsraten des Phytoplanktons für Quecksilberverbindungen.

Im Gegensatz zu den in dieser Arbeit ermittelten messbaren Konzentrationen an anorganischem Quecksilber in den untersuchten Fischeiern ergab die Analyse des MeHg-Gehaltes ähnliche Werte wie in Johnston et al. 2001. Die pelagischen Fischeier aus den Jahren 2002 und 2003 wiesen einen MeHg-Durchschnittsgehalt

von 0,73 µg/kg Frischgewicht bzw. 9,43 µg/kg Trockengewicht auf. Diese Werte liegen damit in einer ähnlichen Größenordnung wie die meisten von Johnston et al. 2001 ermittelten MeHg Konzentrationen von 6,7 bis 24,3 µg/kg bzw. ng/g Trockengewicht - von wenigen Ausnahmen abgesehen (s.u.).

Auch wenn die Methylquecksilberkonzentrationen in der vorliegenden Studie den von Johnston et al. 2001 ermittelten Konzentrationen ähneln, sind die Ergebnisse nur sehr bedingt übertragbar - zum einen aufgrund der oben diskutierten Unterschiede bezüglich der Probennahme, zum anderen aufgrund der Unterschiede zwischen den untersuchten Ökosystemen. So stellten Johnston et al. 2001 in manchen Gebieten sehr viel höhere Methylquecksilberkonzentrationen fest (bis zu 769 µg/kg Trockengewicht). Der Wasseraustausch in einem räumlich begrenzten See (wie von Johnston et al. 2001 untersucht) ist deutlich geringer als im offenen Meer. Kontaminationen eines Sees mit Schadstoffen wirken sich deshalb langfristig nachhaltiger aus, da die Verdünnungs- und Austauschprozesse im offenen Meer fehlen (der von Johnston et al. 2001 festgestellte extrem hohe Messwert von 769 ng/g ließ sich durch langjährige Belastung des Sees mit quecksilberhaltigen Industrieabwässern erklären). Zudem können Bedingungen wie pH-Wert, Gehalte an DOM, Redoxpotential und damit die Bioverfügbarkeit von Quecksilber und Quecksilberverbindungen in einem See deutlich stärker variieren als die nahezu konstanten Bedingungen der Nordsee.

Eine derart hohe Variabilität der Quecksilberkonzentrationen konnte in der vorliegenden Studie nicht festgestellt werden. Zwar wurden insbesondere im schleswig-holsteinischen Küstengewässer und im Elbemündungsbereich im Vergleich zu den übrigen Untersuchungsgebieten erhöhte Konzentrationen von anorganischem Quecksilber in den Fischembryonen festgestellt, eine derartiger Trend konnte bei den Methylquecksilbergehalten jedoch nicht beobachtet werden. Die in den Fischembryonen im schleswig-holsteinischen Küstengewässer und im Elbemündungsbereich festgestellten bis zu 3fach höheren Konzentrationen von anorganischem Quecksilber (Stationen 36, 43, 53 siehe Abbildungen 5.10 und 5.7) lassen sich mit der Belastung dieser Gebiete durch Flüsse wie Elbe und Weser erklären - denn der Haupteintragspfad von Quecksilber in die Nordsee/Deutsche Bucht führt über die Flusssysteme (Messprogramm Meeresumwelt 2005).

Eine Bewertung der hier vorgestellten Ergebnisse für das Ökosystem Nordsee ist im Rahmen dieser Studie nur bedingt möglich, da vergleichbare Untersuchungen nicht

existieren und zeitliche Trends noch nicht abschätzbar sind. Der kurze Zeitraum von 2 Jahren lässt noch keine Aussage über einen zeitlichen Trend der Entwicklung der Quecksilberkonzentrationen in Fischeiern zu.

Die Untersuchungen zeigen jedoch, dass Fischeier als akkumulative Bioindikatoren sowohl für anorganische Quecksilberverbindungen als auch für Organoquecksilberverbindungen prinzipiell eignen – insbesondere, da Fischeier am Anfang der marinen Nahrungskette stehen und wichtige Nahrungsquellen vieler Zooplankton - und Nektonorganismen sind. Steigende Belastungen von befruchteten Fischeiern mit anorganische Quecksilberverbindungen als auch Organoquecksilberverbindungen sind somit ein Warnsignal für steigende Akkumulationsraten höherer trophischer Stufen der Nahrungskette, an deren Ende der Mensch als Konsument von Fischen und anderer Meeresorganismen steht. Nicht nur die Akkumulation über die Nahrungskette führt zur Akkumulation von anorganische Quecksilberverbindungen und Organoquecksilberverbindungen in potentiellen Nahrungsfischen – selbst wenn Fischeier nicht von anderen Meeresorganismen gefressen werden, kann davon ausgegangen werden, dass sich vor allem die MeHg-Gehalte der Fischembryonen im Laufe ihrer Entwicklung zum Fisch durch die Ernährung mit MeHg-haltigem Plankton stets erhöhen werden (Campbell et al. 2005).

Die hier vorgelegte Doktorarbeit bestätigt nicht nur, dass bereits Fischeier MeHg enthalten, wie von Johnston et al. 2001 nachgewiesen, sondern weist außerdem nach, dass Eier mariner Fischarten in der pelagischen Phase nach dem Ablachen auch anorganisches Quecksilber akkumulieren - vermutlich durch den Kontakt mit dem Meerwasser. Die Mechanismen dieser Biokonzentrierung, die offensichtlich bereits unmittelbar am Anfang des Lebenszyklus eines Fisches in der Eiphasse stattfindet – ohne dass aktive Nahrungsaufnahme erfolgt – sind weitgehend unbekannt.

## 5.2 Quecksilbergehalte von Klieschenfilet und Klieschenlebern (*Limanda limanda*)

### 5.2.1 Einleitung

Neben der Untersuchung von pelagischen Fischeiern auf ihre Eignung als akkumulative Bioindikatoren für anorganische Quecksilberverbindungen und Organoquecksilberverbindungen war eine weitere Aufgabenstellung der vorliegenden Doktorarbeit die Untersuchung der anorganischen und organischen Quecksilbergehalte von Klieschen-Leber und -Filet.

Die Kliesche (*Limanda limanda*) dient als Indikatororganismus für biologisches Effektmonitoring, welches die Bundesforschungsanstalt für Fischerei im Rahmen des Bund/Länder Messprogrammes durchführt. Es werden z.B. die Auswirkungen von Schadstoffen auf die Abwehr gegen Parasitenbefall untersucht sowie die äußerlich sichtbaren Krankheiten oder krankhaften Veränderungen der inneren Organe überwacht (biologische Effekte).

Die Kliesche eignet sich aufgrund ihrer hohen Abundanz und weiten Verbreitung in Nord-und Ostsee sowie aufgrund ihrer benthischen Lebensweise als Indikator für derartige biologische Effekte von Schadstoffen. So erfasst die Bundesforschungsanstalt für Fischerei die Häufigkeit und regionale Verbreitung von Leberanomalien bei Klieschen der Nordsee seit 1988 zweimal pro Jahr im Rahmen der Überwachung von Fischkrankheiten. Das gehäufte Vorkommen von Lebertumoren und deren Vorstadien bei marinen Plattfischen wie der Kliesche gilt beispielsweise als ein Indikator für Effekte krebserregender Umweltchemikalien (Messprogramm Meeresumwelt 2005).

Generell geht man davon aus, dass benthisch lebende Fische wie die Kliesche einen höheren Gehalt an Schadstoffen aufweisen als pelagische Fische der gleichen trophischen Ebene. Dies gilt auch für Quecksilberverbindungen wie MeHg (Storelli et al. 2005). Dies sollte mit der in der vorliegenden Arbeit entwickelten Methode untersucht werden.

### 5.2.2 Material und Methoden

Im Rahmen von Routinearbeiten des Institutes für Fischereiökologie zu biologischen Schadstoffeffekten bei marinen Fischen wurden bei der 255. Reise der Walther Herwig III vom 25.08. bis 09.09.2003 in 5 Nordseegebieten und einem Ostseegebiet

jeweils 10 Klieschen (Abbildung 5.11) aus unterschiedlichen Hols entnommen. Dabei handelt es sich ausschliesslich um weibliche Tiere, in einem Größenbereich von 20-24 cm Gesamtlänge. Von diesen Fischen wurde direkt nach dem Fang ein definierter Teil des Filets (Körperoberseite zentral, oberhalb der Seitenlinie) und ein Teil der Leber entnommen, in Cryogefäße verbracht und in flüssigem Stickstoff gelagert, um diese später auf deren Quecksilbersgehalte hin zu untersuchen. Durch die zusätzliche Erfassung von makroskopisch sichtbaren äußeren und inneren Krankheiten und Untersuchungen über pathologische Anomalien der Lebern wurden zusätzliche Informationen über die den Status der Proben erlangt. Abbildung 5.12 zeigt die Gebiete aus denen die Proben stammen.

Die Proben wurden gemäß Anlage 8.10.2 für die Bestimmung der Gehalte an anorganischem und Methylquecksilber aufgearbeitet.



Abbildung 5.11 :Kliesche (*Limanda Limanda*. Linnaeus, 1758) Quelle: BFA-FI

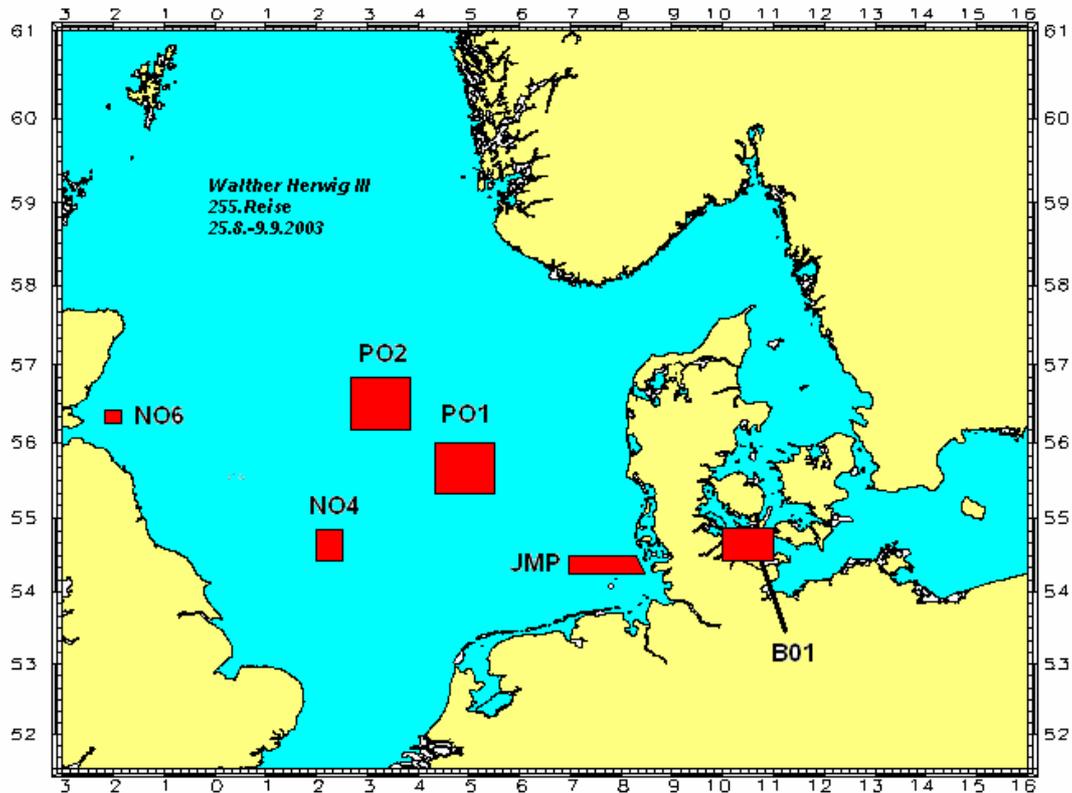
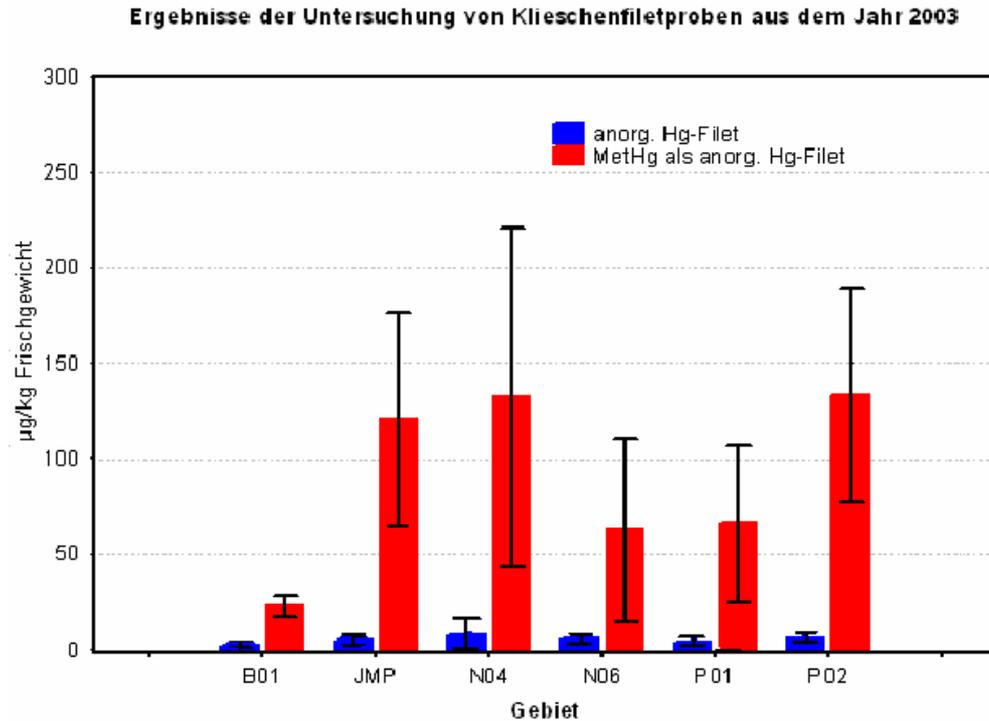


Abbildung 5.12: Ausgewählte Untersuchungsgebiete der Probennahme auf der 255. Reise des FFS Walther Herwig III. (Entnommen aus dem Bericht über die 255. Reise FFS 'Walther Herwig III' vom 25.08. bis 09.09.2003; teilweise modifiziert)

### 5.2.3 Ergebnisse

Die Ergebnisse der Untersuchungen der Klieschenfiletproben sind in der Abbildung 5.13 zusammengefasst.



Box-Plot Mittelwert aus 10 Proben je Stationen und jeweils Doppelbestimmung je Einzelprobe  
Whisker: Mittelwert-Stdabw., Mittelwert+Stdabw.

Abbildung 5.13: Mittelwerte und Standardabweichungen der Gehalte an MeHg und anorganischem Quecksilber der Klieschenfiletproben aus den unterschiedlichen Untersuchungsgebieten.

Die Ergebnisse der untersuchten Klieschenleberproben sind in der Abbildung 5.14 zusammengefasst:

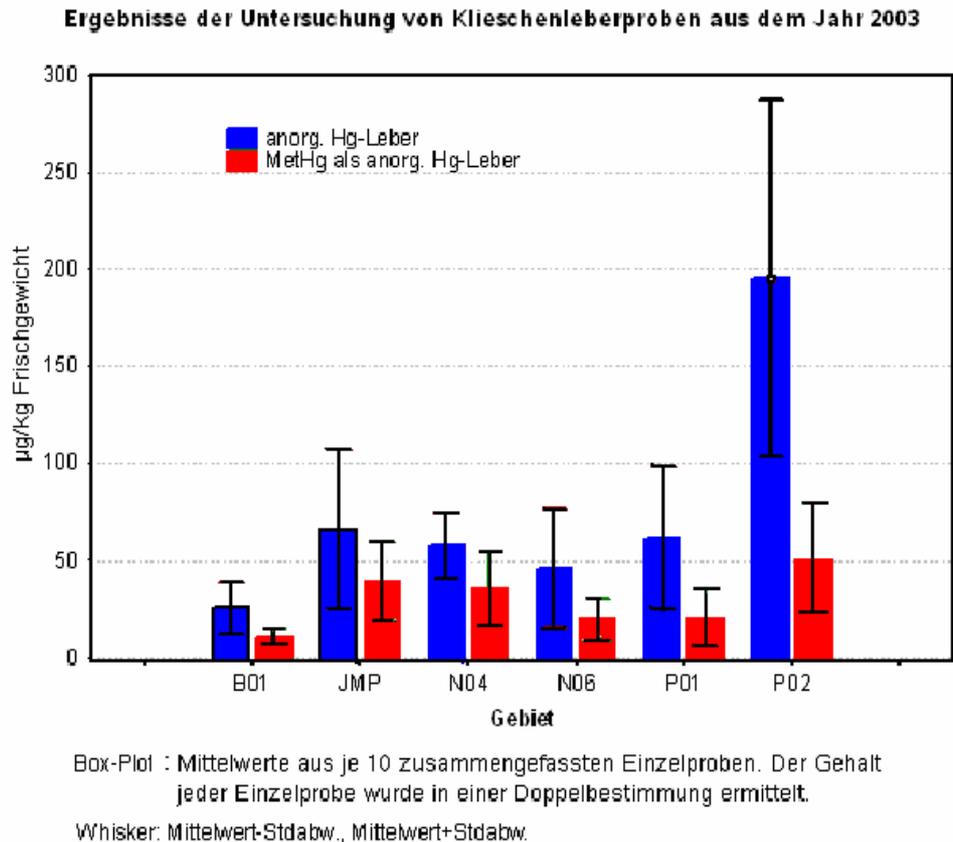


Abbildung 5.14: Mittelwerte und Standardabweichungen der Gehalte an MeHg und anorganischem Quecksilber der Klieschenleberproben aus den unterschiedlichen Untersuchungsgebieten.

### 5.2.4 Diskussion

Die Untersuchungen an 48 weiblichen Klieschen aus der Nordsee ergaben einen Durchschnittsgehalt von 101,4 µg MeHg/kg Frischgewicht im Filet der Tiere. Bei der Untersuchung von 13 Filetproben der Kliesche aus der Nordsee, fanden Baeyens et al. (2003) im gleichen Jahr der Probennahme einen durchschnittlichen Gehalt von 98 µg/kg MeHg Frischgewicht. Die eigenen Ergebnisse stimmen somit sehr gut mit denen von Baeyens et al. 2003 ermittelten überein und bestätigen die Eignung der entwickelten Methode zur Routineanalytik von MeHg in Fischfilet.

In Abbildung 5.13 ist zu erkennen, dass im Filet der MeHg Anteil am Gesamtquecksilbergehalt deutlich überwiegt. Der Anteil von Methylquecksilber am Gesamtquecksilbergehalt betrug bei den 48 untersuchten Klieschen durchschnittlich 93,6% (96,2% - 90%). Durchschnittlich liegen somit nur 6,4% des Gesamtquecksilbers im Filet in der anorganischen Form vor.

Baeyens et al. (2003) stellte bei den untersuchten Klieschen im Filet einen ähnlich hohen durchschnittlichen MeHg Anteil von 97,2% des Gesamtquecksilbergehaltes fest.

Die in der vorliegenden Arbeit an Klieschen ermittelten MeHg-Anteile am Gesamtquecksilbergehalt decken sich in hohem Maße mit vorangegangenen Untersuchungen anderer Fischarten: Jewett et al. 2003 ermittelten bei der Untersuchung von Hechten in Alaska (*Esox lucius*) einen MeHg Anteil von 95% des Gesamtquecksilbergehaltes, für die arktische Äsche (*Thymallus arcticus*) einen Anteil von 94% und für die ebenfalls untersuchten Weißfische (*Coregonus sp.*) MeHg Anteile von 84% am Gesamtquecksilbergehalt. Gochfield (2003) geht generell davon aus, dass der MeHg Anteil am Gesamtquecksilbergehalt in Fischen zwischen 75% bis 95% des Gesamtquecksilbergehaltes liegt. Storelli et al. (2005) ermittelten Methylquecksilberanteile von 90,8% für die Seebarbe (*Mullus barbatus*) in der italienischen Adria. Bei dem ebenfalls untersuchten Seehecht (*Merluccius Merluccius*) wurde ein Anteil von 98,9% MeHg am Gesamtquecksilber festgestellt (Storelli et al. 2005).

Die ermittelten unterschiedlichen MeHg-Gehalte der einzelnen Stationen innerhalb der Nordsee und Ostsee lassen sich teilweise durch regionale Besonderheiten der einzelnen Stationen erklären. Das Gebiet JMP liegt im Einflussgebiet der Elbe und der Weser in die Nordsee und ist durch die Quecksilbereinträge vergangener Jahre (siehe Abbildung 5.12) durch die Flüsse geprägt. Die Elbe war in den vergangenen Jahrzehnten einer der Flüsse, die sehr stark mit Quecksilber belastet waren. Die Einflüsse einer Chlor-Alkalifabrik in der früheren Tschechischen Republik und die Acetaldehyd-Produktion in der früheren DDR führten dazu, dass die Elbe jährlich mehr als 25 Tonnen Quecksilber in die Nordsee eintrug (Wilken und Wallschläger, 1996). Für die Jahre von 1990 bis 1996 wurde ein abnehmender Trend beobachtet. Im Sediment der Elbe wurden 1986 maximale Quecksilberkonzentrationen von 157 mg/kg Sediment ermittelt. Wilken und Wallschläger (1996) geben die natürlichen Hintergrundgehalte von Quecksilber im Sediment mit 0,2 mg/kg an, so dass dieser natürliche Hintergrundwert und den Faktor 700 übertroffen wurde.

Abbildung 5.15 zeigt die Trends in der Quecksilberbelastung in der Feinkornfraktion (< 20 µm) des Baggerguts aus dem Elbeästuar (OSPAR 2003).

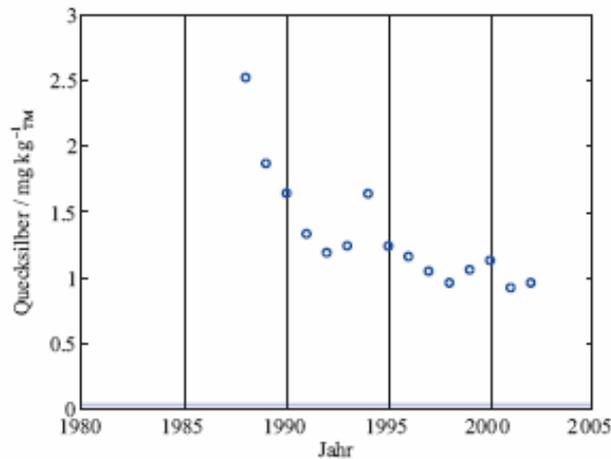


Abbildung 5.15 Trends in der Quecksilberbelastung in der Feinkornfraktion (< 20 µm) des Baggerguts aus dem Elbeästuar (OSPAR, 2003). Die obere und untere Grenze der Elementhintergrundwerte (BSH, Deutsche Bucht) erscheinen in der Grafik als hellblauer Balken (aus: Messprogramm Meeresumwelt 2005).

Auch wenn diese außergewöhnlich hohen Konzentrationen heute nicht mehr erreicht werden, so sind Einflüsse auf die Quecksilberkonzentrationen des Sedimentes der Nordsee in diesem Gebiet auch heute noch sehr wahrscheinlich und könnten eine Erklärung für die erhöhten Quecksilberkonzentrationen in den untersuchten Klieschen sein.

Wie bereits im Abschnitt 5.2.1 erwähnt, geht man davon aus, dass benthisch lebende Fische generell einen höheren Gehalt an MeHg aufweisen als pelagische Fische – v.a. aufgrund der in und auf dem Sediment lebenden Nahrungsorganismen und der damit verbundenen Anreicherung von Quecksilberverbindungen über die Nahrungskette (Storelli et al. 2005). So ernähren sich Klieschen von Mollusken, Schlangensternen und diversen sedimentfressenden Ringelwurmart (z.B. Muus & Nielsen 1999).

Die erhöhten Methylquecksilberkonzentrationen der auf den Station P02 und PO4 gefangenen Klieschen (siehe Abbildung 5.17) könnten durch die Nähe dieser Stationen zu einigen Erdgas- und Ölförderungsplattformen in der Nordsee erklärt werden (siehe Abbildung 5.16). Erdgas enthält, abhängig von der Herkunft, Gehalte zwischen 1-11000 µg/m<sup>3</sup> gasförmiges Quecksilber. Erdgas aus Nord-Deutschland enthält 700-4400 µg/m<sup>3</sup> (Galab, 2005). Da die Restkonzentrationen von Quecksilber im Verkaufsgas max. 28 µg/m<sup>3</sup> betragen dürfen, muß eine Reinigung des Erdgases vor dem Verkauf erfolgen. Ob die Erdgasreinigung direkt nach der Förderung auf offener See durchgeführt wird, ist nicht bekannt. Trotzdem könnte der im Verhältnis

zu den anderen Stationen erhöhte MeHg und Gesamtquecksilbergehalt der Fische aus diesem Gebiet durch Abfallprodukte der Erdgas- und Erdölförderung erklärt werden. Es ist jedoch auch möglich, dass andere unbekannte Faktoren für die erhöhten Gehalte an Quecksilber in Klieschen aus diesen Gebieten verantwortlich sind.

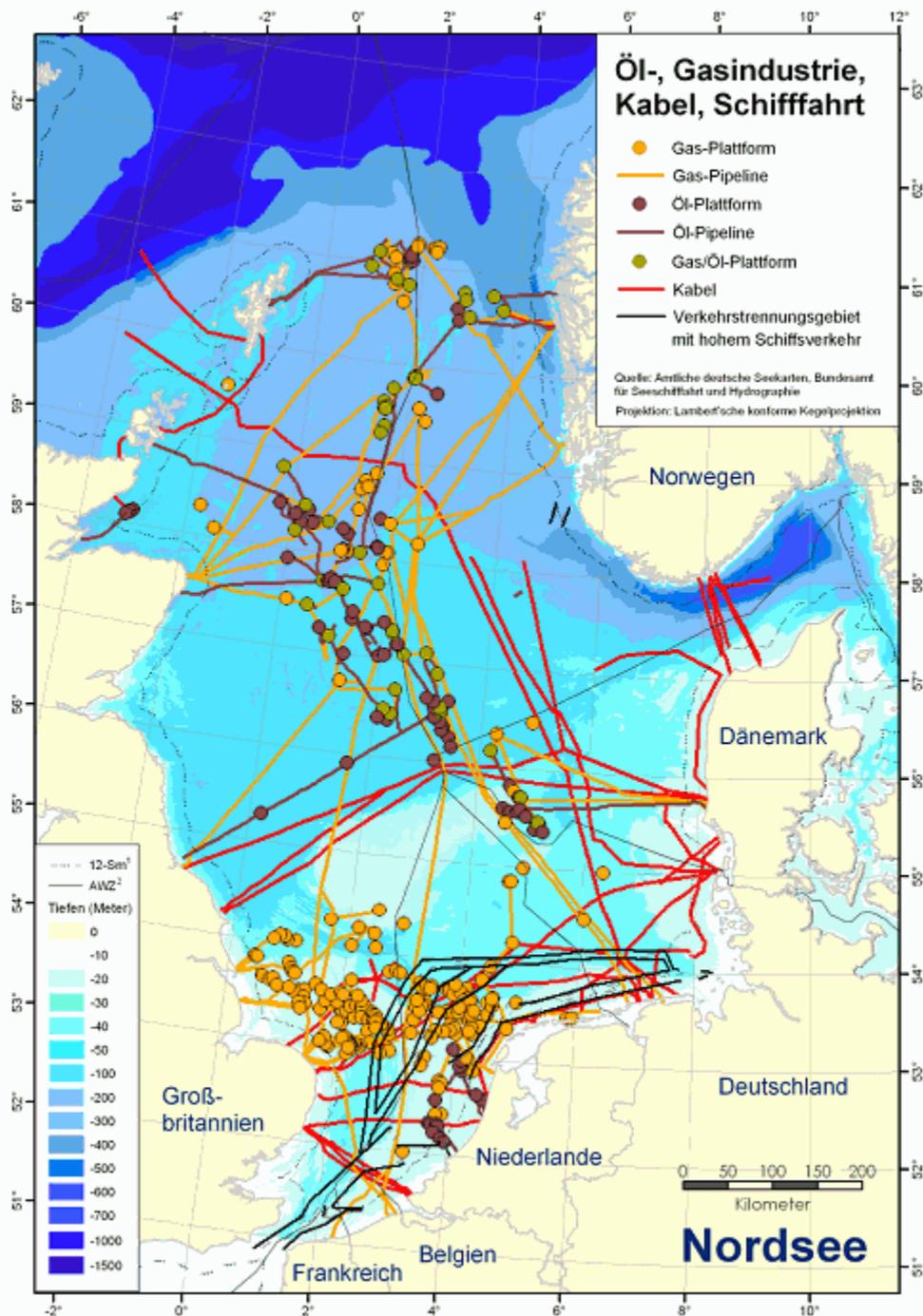


Abbildung 5.16: Standorte von Erdöl- und Gasförderungs-Plattformen und Pipelines innerhalb der Nordsee. Quelle BSH, Entnommen aus <http://gruppen.greenpeace.de/aachen/meere-fotos-plattformen-nordsee.gif>

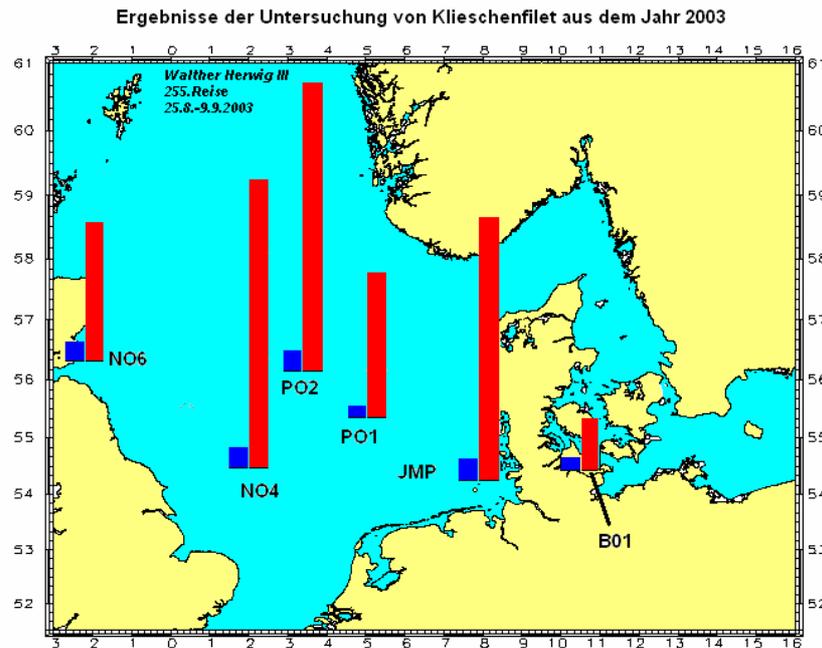


Abbildung 5.17 Zusammenstellung der gemittelten Ergebnisse des Methylquecksilbers (rot) und anorganischen Quecksilbers in Klieschenfiletproben.

Alle 60 untersuchten Klieschenfiletproben enthielten weniger als 500  $\mu\text{g}$  Gesamtquecksilber/kg Körpergewicht. Der höchste Gehalt wurde in einem Tier aus dem Gebiet NO4 ermittelt und lag bei 339,4  $\mu\text{g}/\text{kg}$  Frischgewicht. Die Vorgaben des VO 221/2002 (EU) bezüglich des maximalen Quecksilbergehaltes von Fischen gilt somit für alle untersuchten Klieschenfiletproben als eingehalten. Andererseits werden durch den Verzehr einer einzigen Fischmahlzeit dieses Fisches (200 g Filet) bereits 67  $\mu\text{g}$  MeHg aufgenommen. Damit wird die maximal empfohlene wöchentliche Aufnahmemenge der WHO von 1,6  $\mu\text{g}/\text{kg}$  Körpergewicht für eine 85 kg schwere Person bereits durch eine Fischmahlzeit zur Hälfte ausgeschöpft.

Die Ergebnisse der untersuchten Klieschenleberproben (Abbildung 5.14) zeigen, dass insgesamt deutlich niedrigere Gehalte an MeHg in den Klieschenlebern ermittelt wurden als in den Filetproben. Der Anteil von MeHg am Gesamtquecksilber schwankt innerhalb der untersuchten Stationen zwischen 28- 66,3%, bei einem Mittelwert von 46,8%, und zeigt sich somit als variabler, als das Verhältnis von MeHg zu Gesamtquecksilber in den untersuchten Filetproben. Baeyens et al. (2003) stellte bei der Untersuchung von Klieschenlebern ebenfalls fest, dass die MeHg Anteile am Gesamtquecksilber in der Leber variabler sind als im Filet. Baeyens et al. (2003) ermittelten einen durchschnittliche Anteil von MeHg am Gesamtquecksilbergehalt

von 38,5% bei den Untersuchungen von Klieschenlebern. Diese Beobachtungen decken sich mit den Ergebnissen der Untersuchungen von Jewett et al. (2003): In dieser Arbeit wurde bei der Untersuchung von Hechten ein Anteil zwischen 54-69% MeHg am Gesamtquecksilbergehalt in der Leber bestimmt. Die genauen Gründe für die unterschiedlichen Verhältnisse innerhalb der Leber und des Filets sind nicht vollständig bekannt. Es kann angenommen werden, dass aufgrund enzymatischer Aktivitäten innerhalb der Leber eine Demethylierung von MeHg zu Hg<sup>2+</sup> stattfindet .

Wie bei den Filetproben beobachtet, sind auch die anorganischen Quecksilbergehalte der Leberproben aus dem Gebiet PO2 gegenüber den Leberproben aus anderen Untersuchungsgebieten auffällig. Die Gründe für die hohen Gehalte des anorg. Hg<sup>2+</sup> sind nicht eindeutig zu klären. Wie bereits erwähnt, könnte es einen Zusammenhang zwischen den dort ansässigen Öl- und Erdgasförderungsanlagen und den erhöhten Quecksilbergehalten geben.

### 5.3 Sprotten (*Sprattus sprattus*)

#### 5.3.1 Einleitung

Sprotten ernähren sich fast ausschließlich von tierischem Plankton und sind wiederum eine wichtige Nahrungsquelle für größere Fische wie z. B. Kabeljau (*Gadus morhua*). Sprotten stehen demnach in der Nahrungskette zwischen dem untersuchten Zooplankton und Fischarten höherer Trophiestufen. Um festzustellen, ob eine Akkumulation von organischem bzw. anorganischem Quecksilber über mehrere Trophiestufen (Fischeier → Sprotte → Kabeljau) messbar ist, und ob der Quecksilbergehalt mit der Größe der untersuchten Sprotten korreliert, wurde der Quecksilbergehalt von Sprottenproben unterschiedlicher Längensklassen mit der in dieser Doktorarbeit erarbeiteten Methode bestimmt.

#### 5.3.2 Material und Methoden

Bei der 237. Reise der Walther-Herwig III wurden neben der Entnahme der Zooplanktonproben mehrere Grundschleppnetzfüge durchgeführt. Bei einem dieser Fischereizüge wurden 16 Sprotten (Abbildung 5.18) unterschiedlicher Längensklassen entnommen und anschließend bei -40°C tiefgefroren. Die Abbildung 5.19 zeigt das

Schleppgebiet der Grundsleppfischerei, bei der die Sprottenproben genommen wurden.

Wenige Wochen nach dem Fang wurde den Fischen ein definierter Teil des Filets von der Oberseite entnommen und nach 8.10 aufgearbeitet.



Abbildung 5.18 Sprotte (*Sprattus sprattus*) (Eigenes Bild)

Die Abbildung 5.19 zeigt das Schleppgebiet der Grundsleppfischerei, bei der die Sprottenproben genommen wurden.

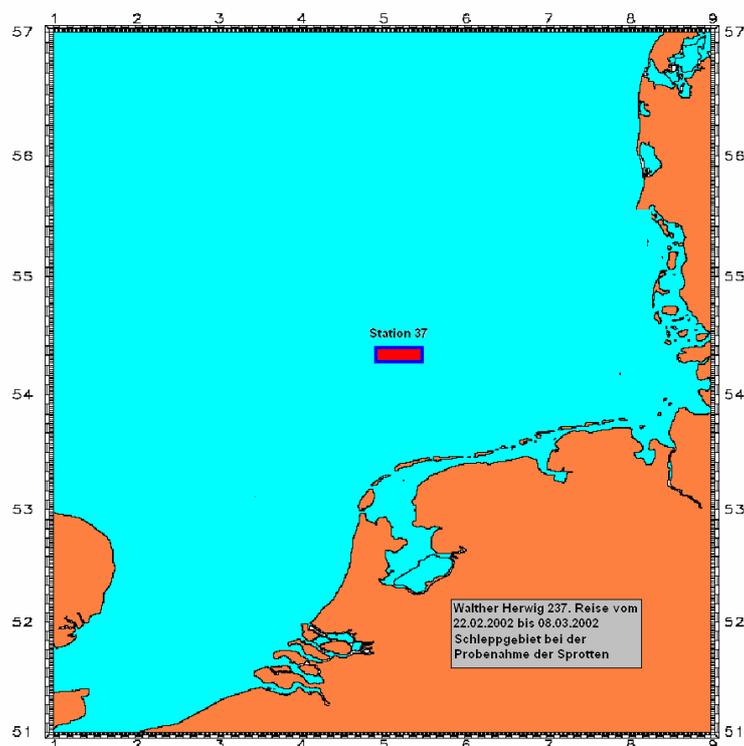


Abbildung 5.19: Schleppgebiet der WH-III bei der Probenahme der Sprotten im Jahr 2002 (Entnommen aus dem Bericht über die 237. Reise FFS Walther Herwig III vom 22.02. bis 08.03.2002 teilweise modifiziert)

### 5.3.3 Ergebnisse

Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in Abbildung 5.20 zusammengefasst. Die Gehalte an anorganischen Quecksilber sind nicht dargestellt, da alle Messwerte unterhalb der Erfassungsgrenze lagen. Der durchschnittliche MeHg-Gehalt aller untersuchten Sprottenfiletproben beträgt 32,5 µg MeHg/kg Frischgewicht.

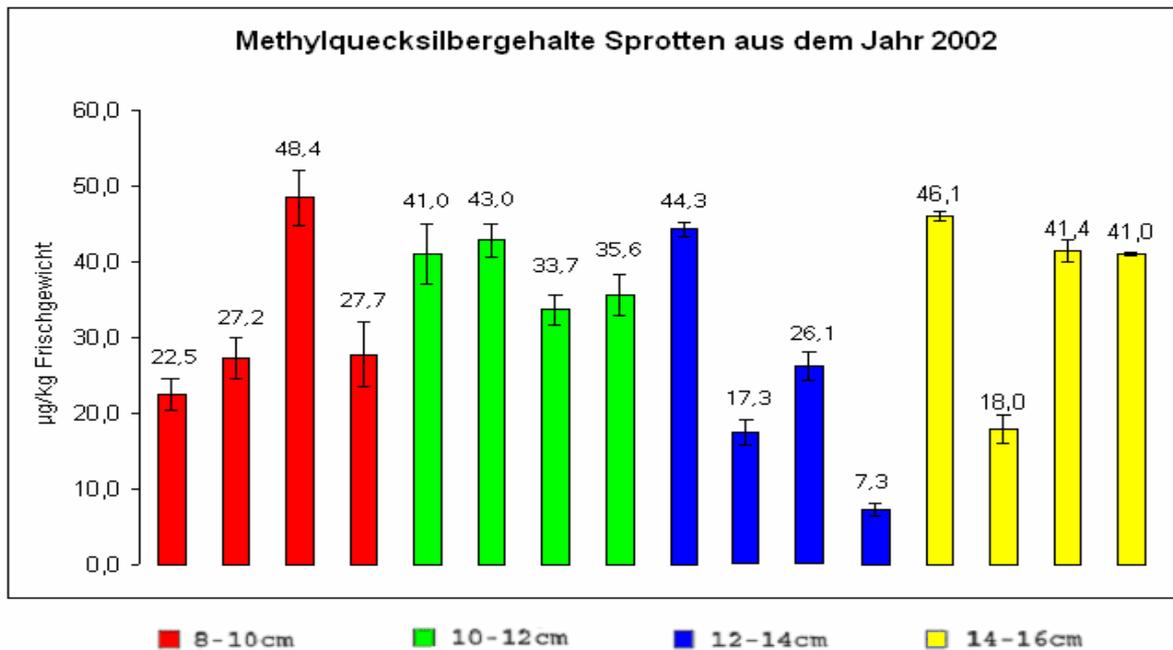


Abbildung 5.20: Gemittelte Methylquecksilbergehalte der Sprottenfiletproben

Die ermittelten Gehalte sind erwartungsgemäß deutlich höher als die der Fischembryonen und ähneln den von Baeyens et al. 2003 ermittelten MeHg-Konzentrationen für Schollen (45 µg/kg).

Ein direkter Zusammenhang zwischen Größenklassen der Sprotten und MeHg-Gehalt konnte nicht festgestellt werden.

In einer vom Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (BGVV) veröffentlichten Stellungnahme vom Februar 1999 wurden die Ergebnisse des Lebensmittelmonitoring hinsichtlich der Quecksilberkonzentrationen verschiedener Fischarten aufgeführt. Im Jahr 1996 wurde bei der Untersuchung von 187 Heringsproben ein Mittelwert der Gesamtquecksilberkonzentration von 54 µg/kg Filet ermittelt. Da Heringe ein ähnliches Nahrungsspektrum wie Sprotten aufweisen, scheint der in dieser Arbeit

ermittelte Gehalt plausibel zu sein. Im Vergleich zu den untersuchten Klieschenfiletproben (s.o.) sind die Gehalte an MeHg deutlich niedriger.

## 6. Zusammenfassung

Quecksilberverbindungen sind ubiquitär in der Umwelt vorhanden und weltweit verteilt. Quecksilber unterliegt, besonders in der Meeresumwelt, zahlreichen biochemischen, physikalischen 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 zunehmend angereichert und führt zu starken 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, Validierung und praxisbezogene Anwendung einer Methode zur simultanen Bestimmung von Monomethylquecksilber und anorganischem Quecksilber in Fischgewebe und Fischembryonen.

Bei der Ausarbeitung und Konzeption des entwickelten Analysesystems wurde Wert darauf gelegt, dass verhältnismäßig einfache herzustellende und preiswerte Bauteile zum Einsatz kamen. Kapitel 8.1 beinhaltet eine SOP und eine genaue Beschreibung, welche Komponenten für die beschriebene Methode verwendet wurden, wie diese hergestellt werden können und wie der Zusammenbau zu erfolgen hat. So sollte es für viele Labore leicht möglich sein, den apparativen Aufbau nachzuvollziehen und ihn preiswert nachbauen zu können.

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 (CV-AFS) zum Einsatz, der sich durch hohe Spezifität und durch sehr niedrige Nachweisgrenzen für Quecksilber auszeichnet. Die Extraktion der Quecksilberverbindungen aus der Probenmatrix erfolgt durch Gefriertrocknung, Mikrohomogenisation, Behandlung mit Tetramethylammoniumhydroxidlösung und anschließender Derivatisierung mit Natriumtetraethylborat bei einem pH-Wert von 4,75 (Natriumacetat/Essigsäurepuffer).

Besonders fettreiche Proben (>10% Fett) können vor der Extraktion entfettet werden. Die ethylierten Quecksilberspezies lassen sich mit Hilfe eines Argon 5.0-Gasstromes aus der Probenaufschlusslösung austreiben und auf dem Adsorbens Tenax-TA<sup>®</sup> anreichern. Durch Aufheizen des Tenax-TA<sup>®</sup> erfolgt die Probenaufgabe in den isothermisch arbeitenden Gaschromatographen. Nach der Trennung der derivatisierten Quecksilberspezies erfolgt dann eine Pyrolyse in einem elektrisch beheizten Quarzrohr mit eingesetztem Platinnetz. Durch die Pyrolyse werden die Quecksilberderivate zu Hg<sup>0</sup> reduziert und mit Hilfe des AFS-Detektors detektiert.

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

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

Bei der Untersuchung von ca. 100 Proben pelagischer Fischembryonen, etwa 60 Klieschenfilet- und 60 Klieschenleberproben und 16 Sprottenproben wurden ebenfalls Ergebnisse ermittelt, die sich gut mit Ergebnissen aus anderen Studien decken bzw. im Falle der Fischembryonen sehr plausibel erscheinen. Die Ergebnisse zeigen, dass die entwickelte Methode geeignet ist, die Routineanalytik des Gesamtquecksilbergehaltes der Bundesforschungsanstalt für Fischerei um den Parameter MeHg zu erweitern.

## 6.1 Summary

Mercury and its compounds are widely distributed in the biosphere.

The dominant mechanism for the current global mercury cycle is atmospheric transport of gaseous (elemental) mercury of natural and anthropogenic origin and its rapid exchange between the atmosphere and the mixed layer of the world oceans. Today, even remote areas give evidence of mercury pollution originating from anthropogenic sources.

The major (chemical) forms of mercury occurring in marine waters are elemental mercury ( $\text{Hg}^0$ ), inorganic mercury ( $\text{Hg}^{2+}$ ) and organic mercury species, particularly monomethylmercury ( $\text{CH}_3\text{Hg}^+$ ). Monomethylmercury is a bioaccumulative environmental toxicant and its toxic effects have been associated with human death and several ailments that include cardiovascular diseases, anemia, kidney and liver damage, developmental abnormalities, neurobehavioral disorders, autoimmune diseases and cancers in experimental animals. Monomethylmercury plays an important role in environmental pollution, as it can be both anthropogenically introduced, and naturally formed via so-called bio-methylation processes. Methylation of mercury is a key process in the bio-geochemical mercury cycle.

It is necessary to speciate and hence distinguishes between inorganic mercury and methylmercury, because the latter is more toxic and more efficiently retained by marine organisms than the first. Speciation also enables a better understanding of the biochemical cycling of mercury in the marine environment.

The aim of this study was the development of an inexpensive analytical tool appropriate for future studies of the accumulation of mercury species and their possible impact on marine biota, primarily fish and zooplankton. For this purpose, a sensitive and reliable method for the simultaneous speciation analysis of monomethylmercury and inorganic mercury has been elaborated. Furthermore, it was tested if this elaborated method is suitable for simultaneous determination of monomethylmercury and inorganic mercury in different tissues of pelagic and benthic fish species as well as in pelagic fish eggs.

A hyphenated instrumental technique, consisting of purge-and-trap injection-gas chromatography-atomic fluorescence detection after in-situ derivatisation (alkylation) with sodium tetraethylborate was used. The biological material to be analysed was freeze-dried and solubilised with tetramethylammoniumhydroxide (TMAH). A sub-portion of the solution obtained was introduced into an acetate buffer solution (pH 4.75) and the sodiumtetraethylborate ( $\text{NaB}(\text{C}_2\text{H}_5)_4$ ) reagent was added. The mercury derivatives ( $\text{CH}_3\text{Hg}(\text{C}_2\text{H}_5)$  and  $(\text{C}_2\text{H}_5)\text{Hg}(\text{C}_2\text{H}_5)$ ) formed were purged from the reaction mixture with an inert gas (Ar), pre-concentrated (trapped) on a Tenax-TA column, from which they were subsequently thermally desorbed ( $250^\circ\text{C}$ ), transferred to a gas chromatograph and separated on an isothermally ( $85^\circ\text{C}$ ) heated column packed with 15% OV-3 on Chromosorb

W (He as carrier gas). The mercury derivatives eluting from the GC were pyrolysed in a heated quartz tube (1150°C) interfacing the outlet of the gas chromatograph with an atomic fluorescence spectrometer (AFS) for Hg<sup>0</sup> detection at 253.7 nm. The minimum detectable determinant concentration (detection limit) and the minimum quantifiable determinant concentration (quantification limit) estimated for monomethylmercury was 0.95 and 2.85  $\times 10^{-6} \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  respectively, and for inorganic mercury 1.94 and 5.82  $\times 10^{-6} \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  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.

The results of the validation analyses showed that the analytical variance for both monomethylmercury 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. 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).

In addition, monomethylmercury and inorganic mercury contents in 100 samples of pelagic fish eggs and about 60 liver and muscle tissue samples of dab (*Limanda limanda*) and 16 samples of sprat (*Sprattus sprattus*) were determined. The results showed that the monomethylmercury and inorganic mercury contents found in liver and muscle tissue of dab were similar to concentrations found in earlier studies using other techniques. Furthermore, the methylmercury and inorganic mercury contents found in the dab and sprat samples were comparable to those found in other marine and limnic fish species.

Moreover, the method was sufficiently sensitive to determine simultaneously monomethylmercury and inorganic mercury contents in pelagic fish eggs.

Therefore, the method elaborated in this study is suitable for routine monomethylmercury and inorganic mercury speciation analysis in zooplankton and fish and therefore the tool of choice to study the accumulation of mercury species and their possible impact on marine organisms.

## 7. Literatur

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

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

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

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**, 245-253 (1999).

Back C.R., Visman V., Watras C.J.: Microhomogenization of individual zooplankton species improves mercury and methylmercury determinations. Can. J. Fish. Aquat. Sci., **52**, 2470-2475 (1995).

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

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

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

Baeyens W., Leermakers M., Papina T., Saprykin A., Brion N., Noyen J., De Gieter M., Elskens M., Goeyens L.: Bioconcentration and biomagnification of mercury and

methylmercury in North Sea and Scheldt estuary fish. Arch. Environ. Contam. Toxicol., **45**(4), 498-508 (2003).

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

Barr R.D., Rees P.H., Cordy P.E., Kungu A., Woodger B.A., Cameron H.M.: Nephrotic syndrome in adult Africans in Nairobi. Br. Med. J., **806**, 131-134 (1972).

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

Beichert A., Padberg S., Wenclawiak 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**, 493-498 (2000).

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**, 951-957 (1998).

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**, 1141-1144 (1998).

Blayney M.B.: The need for empirically derived permeation data for personal protective equipment: the death of Dr. Karen E. Wetterhahn. Appl. Occup. Environ. Hyg., **16**(2), 233-236 (2001).

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**, 151-161 (1988).

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**, 1131-1140 (1989).

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

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**, 371-377(1997) .

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**, 7-13 (1999).

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

BSH-Bericht Nr. 38, Nordseezustand 2003, ISSN-Nr. 0946-6010  
[www.bsh.de/de/Produkte/Buecher/Berichte/Bericht38/index.jsp](http://www.bsh.de/de/Produkte/Buecher/Berichte/Bericht38/index.jsp) (2005)

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

Burbacher T.M., Shen D.D., Liberato N., Grant K.S., Cernichiari E., Clarkson T.: Comparison of Blood and Brain Mercury Levels in Infant Monkeys Exposed to Methylmercury or Vaccines Containing Thimerosal. *Environ Health Perspect.*, **113**, 1015-1021 (2005).

Burscher W.: Quecksilberspezies bestimmen. *Nachrichten aus der Chemie*, **53**, 1152-1153 (2005).

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**, 331-345 (1997).

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**, 565-569 (1998).

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**, 147-155 (2000).

Campbell L.M., Norstrom RJ, Hobson KA, Muir DC, Backus S, Fisk AT.: Mercury and other trace elements in a pelagic Arctic marine food web (Northwater Polynya, Baffin Bay). *Sci Total Environ.*, **351-352**, 247-263 (2005).

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**, 245-252 (1994).

Celo V., Ananth V.R., Scott S.L., Lean D.R.S.: Methylmercury artifact formation during solid-phase extraction of water samples using sulphhydryl cotton fiber adsorbent. *Analytica Chim. Acta*, **516**, 171-177 (2004).

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**, 201-206 (1996).

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

Cinca I., Dumitrescu I., Onaca P., Serbanescu A., Nestorescu B.: Accidental ethyl mercury poisoning with nervous system, skeletal muscle, and myocardium injury. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.*, **43**(2), 143-149 (1980).

Coquery M., Cossa D.: Mercury speciation in surface waters of the North Sea. *Netherlands Journal of Sea Research*, **34**, 245-257 (1995).

Coquery M., Cossa D., Sanjuan J.: Speciation and sorption of mercury in two macro-tidal estuaries. *Mar. Chem.*, **58**, 213-227 (1997).

Cossa D., Martin J.-M., Sanjuan J.: Dimethylmercury formation in the Alboran Sea. *Mar. Poll. Bull.*, **28**, 381-384 (1994).

Cossa D., Martin J.-H., Takayangi K., Sanjuan J.: The distribution and cycling of mercury species in western Mediterranean. *Deep-Sea Res. II*, **44**, 721-747 (1997).

Counter S.A., Buchanan L.H.: Mercury exposure in children: a review. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **198**(2), 209-230 (2004).

Cox C., Clarkson, T.W., Marsh, D.O., Amin-Zaki, L., Tikriti, S., Myers, G.G.: Dose-response analysis of infants prenatally exposed to methyl mercury: an application of a single compartment model to single-strand hair analysis. *Environ. Res.*, **49**(2), 318-332 (1989).

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**, 823-824 (1992).

Craig P.J., Jenkins R.O., Stojak G.H.: The analysis of inorganic and methyl mercury by derivatisation methods; opportunities and difficulties. *Chemosph.*, **39**, 1181-1197 (1999).

Davidson P.W., Myers G.J., Cox C., Axtell C., Shamlaye C., Sloane-Reeves J., Cernichiari E., Needham L., Choi A., Wang Y., Berlin M., Clarkson T.W.: Effects of

prenatal and postnatal methylmercury exposure from fish consumption on neurodevelopment: outcomes at 66 months of age in the Seychelles Child Development Study. *JAMA.*, **280**(8), 701-707 (1998).

Deth R.C.: Truth revealed: New scientific discoveries regarding mercury in medicine and autism. Congressional Testimony before the U.S. House of Representatives. Subcommittee on human rights and wellness (2004).

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**, 4178-4184 (2000).

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.*, **16**, 1397-1402 (2001).

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**, 3859-3866 (1996).

Dyall-Smith D.J., Scurry J.P.: Mercury pigmentation and high mercury levels from the use of a cosmetic cream. *Med J Aust.*, **153**(7), 409-410 und 414-415 (1990).

Ebinghaus R., Wilken R.-D., Chau Y.K., Liu D.: Extraction of adenine nucleotides from bacteria. *NWRI Contribution 91-53*, 11p (1991).

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

Ebinghaus R., Kock H.H., Temme C., Einax J.W., Lowe A.G., Richter A., Burrows J.P., Schroeder W.H.: Antarctic springtime depletion of atmospheric mercury. *Environ Sci Technol.*, **36**(6), 1238-1244 (2002).

EFSA Pressemitteilung vom 18.März 2004: Risikobewertung von Quecksilber in Fisch: Vorsorgliche Empfehlung für besonders gefährdete Bevölkerungsgruppen  
[http://www.efsa.eu.int/press/press\\_release/258/presrel\\_contam\\_01\\_de\\_final1.pdf](http://www.efsa.eu.int/press/press_release/258/presrel_contam_01_de_final1.pdf)  
(2004)

Ekstrom E.B., Morel F.M., Benoit J.M.: Mercury methylation independent of the acetyl-coenzyme A pathway in sulfate-reducing bacteria. *Appl Environ Microbiol.*, 69(9), 5414-5422 (2003).

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**,137-1152 (1999).

Eto K., Tokunaga H., Nagashima K., Takeuchi T.: An autopsy case of minamata disease (methylmercury poisoning)--pathological viewpoints of peripheral nerves. *Toxicol Pathol.*, **30**(6),714-22 (2002).

EPA-823-R-01-001: Water Quality Criterion for the protection of human health: Methylmercury, U.S. Environmental Protection Agency, (2001)  
<http://www.epa.gov/waterscience/criteria/methylmercury/document.html>

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

Eurochlor, Pressemitteilung vom 14.November 2006:  
[www.eurochlor.org/news/detail/index.asp?id=209](http://www.eurochlor.org/news/detail/index.asp?id=209)

Kommission der europäischen Gemeinschaften: KOM (2000) 347, Richtlinie des europäischen Parlaments und des Rates zur Beschränkung der Verwendung bestimmter gefährlicher Stoffe in elektrischen und elektronischen Geräten. (2000)

[http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/site/de/com/2000/com2000\\_0347de01.pdf](http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/site/de/com/2000/com2000_0347de01.pdf)

Europäische Kommission: Mercury Flows in Europe and the World: The impact of decommissioned Chlor alkalie plants Final Report. (2004).

<http://ec.europa.eu/environment/chemicals/mercury/pdf/report.pdf>

Europäische Kommission: Gemeinschaftsstrategie für Quecksilber SEC (2005) 101:

[http://europa.eu.int/comm/environment/chemicals/mercury/pdf/com\\_2005\\_0020\\_de.pdf](http://europa.eu.int/comm/environment/chemicals/mercury/pdf/com_2005_0020_de.pdf)

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**, 401-406 (1997).

Ferrara R., Mazzolai B., Lanzillotta E., Nucaro E., Pirrone N.: Temporal trends in gaseous mercury evasion from the Mediterranean seawaters. Sci. Total Environ., **259**, 183-190 (2000).

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**, 116-118 (1987).

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**, 1457-1460 (1992).

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

Fitzgerald W.F.: Atmospheric and Oceanic Cycling of Mercury. Chemical Oceanography, Volume **10**, ISBN 0-12-588610-1, Academic Press ,152-186 (1989).

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

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 85-108 (1996).

Fitzgerald W.F., Engstrom D.R., Lamborg C.H., Tseng C.M., Balcom P.H., Hammerschmidt C.R.: Modern and historic atmospheric mercury fluxes in northern Alaska: Global sources and Arctic depletion. Environ. Sci. Technol., **39**(2), 557-568 (2005).

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**, 1347-1353 (1998).

GALAB: <http://www.galab.de/laboratories/services/environment/mercury.html>

Gamo M., Oka T., Nakanishi J.: Ranking the risk of 12 major environmental pollutants that occur in Japan. Chemosphere, **53**(4), 277-284 (2003).

Gatti R., Belletti S., Uggeri J., Vettori M.V., Mutti A., Scandroglio R., Orlandini G.: Methylmercury cytotoxicity in PC12 cells is mediated by primary glutathione depletion independent of excess reactive oxygen species generation. Toxicology, **204**,(2-3) 175-185 (2004).

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**, 273-285 (1997).

Gochfield, M.: Cases of mercury exposure, bioavailability, and absorption. *Ecotox. and Environm. Safety*, **56**, 174-179 (2003).

Gomez-Ariza J.L., Lorenzo F., Garcia-Barrera T., Sanchez-Rhodas: Analytical approach for routine methylmercury determination in seafood using gas chromatography-atomic fluorescence spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, **511**, 165-173 (2004).

Gomez-Ariza J.L., Lorenzo F., Garcia-Barrera T.: Guidelines for routine mercury speciation analysis in seafood by gas chromatography coupled to a home modified AFS detector. Application to the Andalusian coast (south Spain). *Chemosphere*, **61**(10), 1401-1409, (2005).

Grandjean P., Weihe P., White R.F.: Milestone development in infants exposed to methylmercury from human milk. *Neurotoxicology*, **16**(1), 27-33 (1995).

Grandjean P., Weihe P., White R.F., Debes F., Araki S., Yokoyama K., Murata K., Sorensen N., Dahl R., Jorgensen P.J.: Cognitive deficit in 7-year-old children with prenatal exposure to methylmercury. *Neurotoxicol. Teratol.*, **19**(6), 417-428 (1997).

Grandjean P., Murata K., Budtz-Jorgensen E., Weihe P.: Cardiac autonomic activity in methylmercury neurotoxicity: 14-year follow-up of a Faroese birth cohort. *J. Pediatr.*, **144**(2), 169-176 (2004).

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

Haarich M., BFA für Fischerei Hamburg, persönliche Mitteilung 2006.

Harada M.: Minamata disease: methylmercury poisoning in Japan caused by environmental pollution *Crit. Rev. Toxicol.*, **25**(1), 1-24 (1995).

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

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

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

Harris H. H., Pickering I. J. and George G. N.: The Chemical Form of Mercury in Fish Science, **301**, 1203 (2003).

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

Heyer K., Engel M., Brockmann U.H., Rick H.-J., Dürselen C.-D., Hühnerfuß H., Kammann U., Steinhart H., Kienz W., Krause M., Karbe L., Faubel A., Regier S.: Local Studies in the German Bight during Winter/Spring 1988/1989. In Sündermann J. (Ed.): Circulation and Contaminant Fluxes in the North Sea. Springer Verlag, Berlin. Kap. 2.3., 90-137 (1994).

HELSINKI KONVENTION, 1992: Bundesgesetzblatt 1994, II, S. 1355 (1994).

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

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**, 812-819 (1996).

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**, 173-180 (1993).

Hintelmann H.: Comparison of different extraction techniques used for methylmercury analysis with respect to accidental formation of methylmercury during sample preparation. Chemosphere, **39**, 1093-1107 (1999).

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

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**, 135-168 (1993).

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**, 533-540 (1994).

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. 1-31 (1996).

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

Ilback N.G.: Effects of methyl mercury exposure on spleen and blood natural killer (NK) cell activity in the mouse. Toxicology; **67**(1),117-24 (1991).

Ikingura J.R., Akagi H.: Methylmercury production and distribution in aquatic systems. Sci Total Environ **234**(1-3),109-118 (1999).

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

Jalili M.A., Abbasi A.H.: Poisoning by ethyl mercury toluene sulphonanilide. Br.J. Ind. Med., **18**, 303-308 (1961).

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

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

Jewett S.C., Zhang X., Naidu A.S., Kelley J.J., Dasher D., Duffy L.K.: Comparison of mercury and methylmercury in northern pike and Arctic grayling from western Alaska rivers. Chemosphere. **50**(3),383-92 (2003).

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**, 597-601 (1997).

Johnston T.A., Bodaly R.A., Latif M.A., Fudge R.J., Strange N.E.: Intra- and interpopulation variability in maternal transfer of mercury to eggs of walleye (*Stizostedion vitreum*). Aquat Toxicol. **52**(1):73-85 (2001).

Joiris C.R., Holsbeek L., Bolbat D., Gascard C., Stanev T., Komakhidze A., Baumgartner W., Birkun A.: Total and organic mercury in the Black Sea harbour porpoise *Phocoena phocoena relicta*. Mar Pollut Bull. **42**(10):905-911 (2001).

Kainz M, Mazumder A.:Effect of algal and bacterial diet on methyl mercury concentrations in zooplankton. Environ. Sci. Technol., **39**(6),1666-1672 (2005).

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**, 109-118 (1998).

Kammann U., Haarich M., Heyer K., Hühnerfuß H., Karbe L., Kersten M., Schmidt D., Steinhart H.: Large Scale Distribution of Contaminants in Spring 1986 and Winter 1986/87. In Sündermann J. (Ed.): Circulation and Contaminant Fluxes in the North Sea. Springer Verlag, Berlin. Kap. 2.3., 90-137 (1994).

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

Kinjo Y., Akiba S., Yamaguchi N., Mizuno S., Watanabe S., Wakamiya J., Futatsuka M., Kato H.: Cancer mortality in Minamata disease patients exposed to methylmercury through fish diet. *J. Epidemiol.*, **6**(3), 134-8 (1996).

Kjellström T., Kennedy P., Wallis S., Mantell C.: Physical and Mental Development of Children with Prenatal Exposure to Mercury from Fish. Stage I: Preliminary tests at age 4. National Swedish Environmental Protection Board Report 3080. Solna Sweden (1986).

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**, 957-977 (1999).

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

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**, 329-340 (1991).

Latif M.A., Bodaly R.A., Johnston T.A., Fudge R.J.: Effects of environmental and maternally derived methylmercury on the embryonic and larval stages of walleye (*Stizostedion vitreum*) *Environ Pollut.*, **111**(1):139-48 (2001).

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

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**, 267-277 (1993).

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

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**, 257-263 (1997).

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

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

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**, 1883-1888 (1996).

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

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**, 453-460 (2000).

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

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**, 1762-1770 (1974).

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**, 230-236 (1995).

Macdonald R.W, Harner T, Fyfe J.: Recent climate change in the Arctic and its impact on contaminant pathways and interpretation of temporal trend data. *Sci Total Environ.*, **342**(1-3), 5-86(2005).

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

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

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**, 1227-1241 (1993b).

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

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 83-99 (1994b).

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**, 665-677 (1995a).

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**, 775-787 (1995b).

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

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

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**, 1835-1845 (1996b).

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

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

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**, 77-96 (1999b).

Marquard H.: *Lehrbuch der Toxikologie*, Hrsg. Marquard H., Schäfer S.G. Heidelberg, Berlin, Spektrum, Akad. Verlag (1997).

Maydl S.: Goldgewinnung als Ursache von chronischen Quecksilbervergiftungen in Mount Diwata, Mindanao, Philippinen, Eine Untersuchung an 314 Probanden  
Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin, Universität München (2004).  
[http://edoc.ub.uni-muenchen.de/archive/00003098/01/Maydl\\_Stefan.pdf](http://edoc.ub.uni-muenchen.de/archive/00003098/01/Maydl_Stefan.pdf)

Messprogramm Meeresumwelt: Zustandsbericht 1999-2002 für Nordsee und Ostsee.  
Kapitel 13.1, 41-47, (2005)

Mitsumori K., Hirano M., Ueda H., Maita K., Shirasu Y.: Chronic toxicity and carcinogenicity of methylmercury chloride in B6C3F1 mice. *Fundam. Appl. Toxicol.*, **14**(1), 179-190 (1990).

Müller M., Westphal G., Vesper A., Bunger J., Hallier E.: Inhibition of the human erythrocytic glutathione-S-transferase T1 (GST T1) by thimerosal. *Int J Hyg Environ Health.*, **203**(5-6), 479-481 (2001).

Mutter J., Naumann J., Sadaghiani C., Walach H., Drasch G.: Amalgam studies: disregarding basic principles of mercury toxicity Review.. *Int. J. Hyg. Environ Health.*, **207**(4), 391-397 (2004).

Mutter J., Naumann J., Schneider R., Walach H., Haley B.: Quecksilber und Autismus: Zunehmende Beweise? *Umwelt-Medizin-Gesellschaft*, **19**, 1/(2006).

Muus, B. J., Nielsen J. G.: *Die Meeresfische Europas*, Kosmos Verlag (1999).

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

Ökoinstitut Freiburg, Pressemitteilung vom 22.September 2005  
[http://www.ecotopten.de/download/PM\\_050922\\_Lampen.pdf](http://www.ecotopten.de/download/PM_050922_Lampen.pdf)

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

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**, 2981-2987. (1996).

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**, 41-56 (1998).

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**, 175-183 (1994b).

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

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

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

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

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**, 1583-1587 (2001).

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**, 563-567 (1991).

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

Ravichandran M.: Interactions between mercury and dissolved organic matter--a review. *Chemosphere*, **55**(3), 319-331 (2004).

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**, 259-269 (1999).

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**, 571-575 (1994).

Ross J.J.:Shakespeare's chancre: did the bard have syphilis? *Clin Infect. Dis.*, **40**(3), 399-404 (2005).

Rodrigues F., Maddock S.: Mercury pollution in two gold mining areas of the Brazilian Amazon. *Journal of Geochemical Exploration*. **58**, 2-3, 231-240 (1997).

Rowley B., Monestier M.: Mechanisms of heavy metal-induced autoimmunity. *Mol. Immunol.* , **42**(7), 833-838 (2005).

Sakaue M., Okazaki M., Hara S.: Very low levels of methylmercury induce cell death of cultured rat cerebellar neurons via calpain activation. *Toxicology* **213**(1-2), 97-106 (2005).

Salonen J.T., Seppänen K., Nyssönen K, Korpela H., Kauhanen J., Kantola M., Tuomilehto J., Esterbauer H., Tatzber F., Salonen R.: Intake of mercury from fish, lipid peroxidation, and the risk of myocardial infarction and coronary, cardiovascular, and any death in eastern Finnish men. *Circulation.*, **91**, 645– 655 (1995).

Santos E.C., Jesus I.M., Brabo E.S., Loureiro E.C., Mascarenhas A.F., Weirich J., Camara V.M., Cleary D.: Mercury exposures in riverside Amazon communities in Para, Brazil. *Environ Res.* **84** (2), 100-107 (2000).

Shenker B.J., Guo T.L., Shapiro I.M.: Mercury-induced apoptosis in human lymphoid cells: evidence that the apoptotic pathway is mercurial species dependent. *Environ Res.* **84**(2), 89-99 (2000).

Schmidt D., Dicke M.: Schwermetalle im Wasser. In Lozán J.L., Lenz W., Rachor E., Watermann B., Westernhagen H.v. (Hrsg.): Warnsignale aus der Nordsee. Parey-Verlag, Berlin und Hamburg, 30-41 (1990).

Schroeder W.H., Anlauf K.G., Barrie L.A., Lu J.Y., Steffen A., Schneeberger D.R., Berg T.: Arctic springtime depletion of mercury, *Nature* **394**, 331-332 (1998).

Schuster, F.P., Krabbenhoft, D.P., Naftz D.L., Dewayne Cecil, L., Olson L.M., Dewild J.F., Susong D.D., Green J.R., Abbott M.L.: Atmospheric Mercury Deposition during the Last 270 Years: A Glacial Ice Record of Natural and Anthropogenic Sources. *Envir. Sci. Technol.*, **36**, 2303-2310 (2002).

Schweinsberger F.: Methylquecksilber in Fisch: Aufnahme und Fallbeschreibung. *Umweltmed. Forsch. Prax.*, **7**(6), 328-330 (2002).

Siciliano S.D., O'Driscoll N.J., Tordon R., Hill J., Beauchamp S., Lean D.R.: Abiotic production of methylmercury by solar radiation. *Environ. Sci. Technol.*; **39**(4),1071-1077 (2005).

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**, 313-330 (1997).

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

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**, 851-857 (1999).

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

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

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

Strasdeit H.: Methylquecksilber: eine Warnung. *Nachr. Chem.Tech.Lab.*, **46**, Nr.9 846-847 (1998).

Storelli M. M., Storelli A., Giacomini-Stuffler R., Marcotrigiano G.O.:Mercury speciation in the muscle of two commercially important fish, hake (*Merluccius merluccius*) and striped mullet (*Mullus barbatus*) from the Mediterranean sea: estimated weekly intake, *Food Chemistry*, **89**(2), 295-300 (2005).

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

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**, 21-89 (1994).

Synowietz C., in V. Schäfer (Ed.), *Chemiker-Kalender*, 3. Auflage, Springer Verlag, 590-591 (1984).

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

Tamashiro H.M., Arakaki M., Futatsuka M., Lee E.S.: Methylmercury exposure and mortality in southern Japan: A close look at causes of death. *J. Epidemiol. Community Health*, **40**(2), 181-185 (1986).

Thompson S.A., Roellich K.L., Grossmann A., Gilbert S.G., Kavanagh T.J.: Alterations in immune parameters associated with low level methylmercury exposure in mice. *Immunopharmacol Immunotoxicol.*, **20**(2), 299-314 (1998).

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**, 743-750 (1997).

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**, 755-764 (1998).

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**, 1583-1588 (2000).

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**, 529-533 (2000).

Umbach W.(Hrsg.): Kosmetik : Entwicklung, Herstellung und Anwendung kosmetischer Mittel. 2., erweiterte Auflage, Stuttgart , New York. Thieme (1995).

Umweltbundesamtes: Stoffmonographie Quecksilber - Referenz- und Human-Biomonitoring-Werte (HBM). Empfehlung, Institut für Wasser-, Boden- und Lufthygiene des Umweltbundesamtes, Kommission „Human-Biomonitoring“ des Umweltbundesamtes. *Bundesgesundheitsbl - Gesundheitsforsch - Gesundheitsschutz*, **42**(6), 522-532 (1999).

Umweltbundesamt Presse-Information 22/02: <http://www.umweltbundesamt.de/uba-info-presse/presse-informationen/pd5402.htm> (2002).

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

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

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**, 1211-1224 (1999).

Vobach M., BFA für Fischerei Hamburg, persönliche Mitteilung 2006.

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

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**, 5477-5484 (2001).

Watras C.J., Back R.C., Halvorsen S., Hudson R.J., Morrison K.A., Wente S.P.: Bioaccumulation of mercury in pelagic freshwater food webs. Sci Total Environ. **219**(2-3):183-208 (1998).

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

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

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

Wilken R.D., Wallschläger D.: The Elbe river: a special example for a European river contaminated heavily with mercury, in: W. Baeyens, R.Ebinghaus, and O.Vasiliev (eds.): Global and Regional Mercury Cycles: Sources, Fluxes and Mass Balances. NATO-ASI-Series, 2. Environment - Vol. 21, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 317 – 328 (1996).

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

Xia K., Weesner F., Blean W.F., Bloom P.R., Skyllberg U.L., Helmke, P.A.: XANES study of oxidation states of sulfur in aquatic and soil humic substances. *Soil. Sci. Soc. Am. J.* **62**, 1240–1246 (1998).

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**, 113-122 (1995).

Zalups R.K., Lash L.H.: Advances in understanding the renal transport and toxicity of mercury. *J. Toxicol. Environ. Health.*, **42**(1), 1-44 (1994).

Zalups R.K., Barfuss D.W.: Nephrotoxicity of inorganic mercury co-administrated with L-cysteine. *Toxicology.*, **109**(1), 15-29 (1996).

Zalups R.K.: Molecular interactions with mercury in the kidney. *Pharmacol Rev.*, **52**(1), 113-143 (2000).

**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<sup>\*)</sup>

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 UBA-FB 200 22 230	No. 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 31Dec. 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 .....	135
1.1 Aufgabenstellung.....	135
1.2 Planung und Ablauf des Forschungsvorhabens.....	136
1.3 Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den bei dem Forschungsvorhaben angeknüpft wurde.....	137
1.3.1 Globaler Quecksilberkreislauf.....	136
1.3.2 Biotransformation des Quecksilbers	
26.....	138
1.3.3 Bioakkumulation/-magnifikation des Quecksilbers.....	139
1.3.4 Speziierungsanalyse des Quecksilbers.....	142
1.3.4.1 Solvent-Extraktions-Gaschromatographie-Methode (SE/GC-Methode) zur spezifischen Bestimmung von Monomethylquecksilber.....	141
1.3.4.2 Methode der selektiven Reduktion.....	43
1.3.4.3 Hydrid-Methode (Derivatisierung mit Natrium-Tetrahydroborat).....	143
1.3.4.4 Derivatisierung mit Hilfe der Grignardreaktion.....	144
1.3.4.5 Derivatisierung mit Natrium-Tetraethylborat (Alkylierungs-Methode) .....	44
1.3.5 Methoden der Probenvorbereitung.....	145
1.4 Zusammenarbeit mit anderen Stellen.....	1465
2. Eigene Untersuchungen.....	146
2.1 Kurzbeschreibung der ausgearbeiteten Methode.....	146
2.2 Herstellung und Überprüfung einer geeigneten Trennsäule für die isotherme Gaschromatographie von Alkylquecksilberderivaten.....	55
2.3 Auswahl und Überprüfung eines geeigneten Adsorbens und Optimierung der Arbeitsbedingungen für die Vor-Säulen-Sorption und -Desorption von Alkylquecksilberderivaten.....	148
2.4 Überprüfung und Optimierung der technischen Merkmale eines beheizbaren Interface für die Pyrolyse der Alkylquecksilberderivate.....	149
2.5 Untersuchung und Optimierung des alkalischen Aufschlusses von verschiedenen Probenmatrices.....	152
2.6 Untersuchung und Optimierung der Ausbeute an Alkylquecksilberderivaten in Abhängigkeit von pH-Wert, Reaktionstemperatur und -zeit sowie Reagenzmenge.....	154
3. Validierung der Methode .....	157

3.1 Ermittlung der Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze nach der modifizierten Leerwertmethode.....	63
3.1.1 Theoretischer Hintergrund.....	158
3.1.2 Praktische Durchführung.....	159
3.2 Überprüfung der Richtigkeit von Untersuchungsergebnissen (Nachweis systematischer Fehler).....	160
3.2.1 Theoretischer Hintergrund.....	161
3.2.2 Praktische Durchführung.....	164
3.3 Durchführung von Wiederfindungsexperimenten zur Überprüfung der Richtigkeit der Analyse von Monomethylquecksilber.....	167
3.4 Überprüfung der Leistungsfähigkeit der Methode.....	169
3.4.1 Theoretischer Hintergrund.....	169
3.4.2 Praktische Durchführung.....	171
3.5 Zusammenfassung/Schlussfolgerungen.....	174
4. SOP: Arbeitsanleitung, Zusammenbau der Apparatur.....	176
4.1 Zweck und Anwendungsbereich.....	176
4.2 Chemikalien.....	177
4.3 Lösungen.....	179
4.4 Geräte und Hilfsmittel.....	180
4.5 Anleitungen und Betriebsanweisung zum Zusammenbau der Komponenten.....	182
4.6 Herstellung und Anschluss der Tenax-TA <sup>®</sup> Adsorptions-/Desorptionseinheit.....	185
4.7 Herstellung und Installation der Gaschromatographiesäule.....	186
4.8 Herstellung und Installation der Pyrolyseeinheit.....	187
4.9 Anschluss des Detektors an einen PC oder einen Integrator.....	188
4.10 Durchführung von Messungen.....	190
4.10.1 Warnhinweise.....	190
4.10.2 Probenvorbereitung und Aufschluss.....	190
4.10.3 Kalibrierung/Analyse von Proben.....	191
4.10.4 Auswertung.....	193
5. Literatur.....	195
6. Anhang.....	211



**Abbildungsverzeichnis**

<b>Abbildung 1:</b> Abhängigkeit der Signalintensität von Methyl-Hg und anorg. Hg von der Pyrolyse-Temperatur.....	151
<b>Abbildung 2:</b> Einfluss des pH-Wertes auf die Alkylierungsreaktion von Methyl- und anorganischem Quecksilber mit Natriumtetraethylborat.....	154
<b>Abbildung 3:</b> Einfluss unterschiedlicher Temperaturen bei der Derivatisierungsreaktion mit Natriumtetraethylborat auf die Ausbeute an Methylethylquecksilber und Diethylquecksilber.....	155
<b>Abbildung 4:</b> Einfluss der "Purge and trap"-Dauer auf die detektierten Signalhöhen der Quecksilberspezies.....	156
<b>Abbildung 5:</b> Schematischer Aufbau der Apparatur zur simultanen gaschromatographischen Bestimmung von $Hg^{2+}$ und Methylquecksilber .....	181
<b>Abbildung 6:</b> Aufbau Tenax-TA <sup>®</sup> -Adsorptionsröhrchen.....	184
<b>Abbildung 7:</b> Aufbau der Adsorptions-/Desorptionseinheit mit Zeitschaltuhr.....	186
<b>Abbildung 8:</b> Gaschromatographische Trennsäule – Schematische Darstellung.....	187
<b>Abbildung 9:</b> Pyrolyseeinheit.....	188
<b>Abbildung 10:</b> Kalibriergerade für Methylquecksilber (Peakhöhe).....	211
<b>Abbildung 11:</b> Kalibriergerade für anorganisches Quecksilber (Peakhöhe).....	211
<b>Abbildung 12:</b> Kalibriergerade für Methylquecksilber (Peakfläche).....	212
<b>Abbildung 13:</b> Kalibriergerade für anorganisches Quecksilber (Peakfläche).....	212

## Verzeichnis der Tabellen

<b>Tabelle 1:</b> 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).....	137
<b>Tabelle 2:</b> Literaturzusammenstellung über geschätzte, aus dem Meer in die Atmosphäre austretende Quecksilbermengen (evasional flux).....	137
<b>Tabelle 3 :</b> Quecksilber in pflanzlichen und tierischen Organismen verschiedener Regionen des Atlantischen Ozeans, sowie der Nord- und Ostsee (Gesamtquecksilbergehalte bezogen auf Trockensubstanz).....	140
<b>Tabelle 4:</b> 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.....	159
<b>Tabelle 5:</b> Ermittelte Standardabweichung $s_x$ , Nachweisgrenze $x_{NG}$ , Erfassungsgrenze $x_{EG}$ und Bestimmungsgrenze $x_{BG}$ der Methode.....	160
<b>Tabelle 6:</b> 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> .....	164
<b>Tabelle 7:</b> 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> .....	166
<b>Tabelle 8:</b> 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> .....	166
<b>Tabelle 9:</b> Zusammenstellung der Ergebnisse zur Richtigkeitsüberprüfung der Analytik von Gesamt-Quecksilber (gemessen als anorganisches Quecksilber); Untersuchung des zertifizierten Referenzmaterials <i>BCR CRM 414 (Plankton)</i> .....	167
<b>Tabelle 10:</b> Probenschema zum durchgeführten Wiederfindungsexperiment mit zugehörigem Gewicht der Teilproben, gemessenem Analytgehalt $x_{obs,i}$ , und der zugehörigen Ergebnisunsicherheit $u(x_{obs,i})$ .....	169
<b>Tabelle 11:</b> Zusammenstellung der Ergebnisse zur Richtigkeitsüberprüfung der Analytik von Monomethylquecksilber durch Wiederfindungs-Experimente.....	169
<b>Tabelle 12:</b> Schema der durchgeführten zweifachen Varianzanalyse mit Wiederholmessungen.....	171
<b>Tabelle 13:</b> Monomethylquecksilbergehalte (jeweils ausgedrückt als $\times 10^{-6} g \cdot kg^{-1} Hg$ pro Leberfrischgewicht) von 12 Kabeljaulebern, die in zwei Teile A und B geteilt wurden.....	172
<b>Tabelle 14:</b> Gehalte für anorganisches Quecksilber (jeweils ausgedrückt als $\times 10^{-6} g \cdot kg^{-1} Hg$ pro Leberfrischgewicht) von 12 Kabeljaulebern, die in zwei Teile A und B geteilt wurden.....	173
<b>Tabelle 15:</b> Ergebnisse der robusten Varianzanalyse.....	174
<b>Tabelle 16:</b> Verwendete Chemikalien.....	178
<b>Tabelle 17:</b> Magnetventil-Stellungen zur Steuerung der „Purge-and-Trap- und Gaschromatographie-Position“.....	189
<b>Tabelle 18:</b> Pipettierschema.....	192

## 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 <sub>2</sub> 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	= Prüfgröße
$x_{obs,i}$	= 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 Methodvalidierung“ (Wellmitz 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 <sup>0</sup> N	0,077	0,0114
30-70 <sup>0</sup> N	0,88	1,80
10-30 <sup>0</sup> N	1,08	2,26
10 <sup>0</sup> N-10 <sup>0</sup> S	0,54	1,44
10-30 <sup>0</sup> S	0,47	1,1
30-70 <sup>0</sup> S	0,43	0,97
70-90 <sup>0</sup> 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 ( $\text{Hg}^0$ ), anorganisches Quecksilber ( $\text{Hg}^{2+}$ -Salze) und die ausgesprochen neurotoxischen Verbindungen Monomethylquecksilber ( $\text{CH}_3\text{Hg}^+$ ) und Dimethylquecksilber ( $\text{CH}_3\text{HgCH}_3$ ). 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  $\text{Hg}^{2+}$  aus  $\text{HgS}$  durch Oxidation des Sulfids über Sulfit zum Sulfat löslich gemacht. Anschließend wird  $\text{Hg}^{2+}$  durch Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (NADH) zu  $\text{Hg}^0$  reduziert, dessen Dampfdruck so hoch ist, dass es in die Gasphase (d.h. in die Atmosphäre) übergehen kann. Beim zweiten Mechanismus wird  $\text{Hg}^{2+}$  zu Monomethyl- und Dimethylquecksilber methyliert. Dabei wirken Methylcorrinoide (Methyl-Vitamin-B<sub>12</sub>) als Überträger der  $\text{CH}_3^-$ -Gruppe auf  $\text{Hg}^{2+}$ . Dimethylquecksilber ist flüchtig, gelangt in die Atmosphäre und wird dort durch die UV-Strahlung zu  $\text{Hg}^0$ , 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
Meeressäugetiere (Leber)	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  $\text{CH}_3\text{Hg}^+$ -Kation aufgrund seiner Neigung, mit nukleophilen Liganden stabile Komplexe zu bilden, ausreichend Bindungspartner.

Nach Rabenstein (1978) kann  $\text{CH}_3\text{Hg}^+$  mit solchen Stoffen auch veränderliche Bindungen eingehen, die mehrere reaktive Gruppen enthalten. So verbindet sich  $\text{CH}_3\text{Hg}^+$  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  $\text{CH}_3\text{Hg}^+$  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 ( $\text{Hg}^{2+}$ ) 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. Kaldampftechnik 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  $\text{SnCl}_2$  als Reduktionsmittel benutzt, um anorganisches Quecksilber zu reduzieren, während das Gesamtquecksilber (bestehend aus anorganisch plus organisch gebundenem Quecksilber) durch Reduktion mit einem Gemisch aus  $\text{SnCl}_2$  und  $\text{CdCl}_2$ , 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 ( $\text{NaBH}_4$ ) als Reagenz zur Erzeugung des flüchtigen Monomethylquecksilberhydrids ( $\text{CH}_3\text{HgH}$ ):



Monomethylquecksilberhydrid wurde dann mittels Headspace-GC und Fourier Transformations-Infrarot-Spektrometrie (FTIR) bestimmt. Wegen der hohen Nachweisgrenze von absolut 200 ng  $\text{CH}_3\text{HgH}$  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  $\text{CH}_3\text{HgH}$ . 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  $\text{NaBH}_4$  freie Radikale bilden, welche die Kohlenstoff-Quecksilber-Bindung spalten, so dass das  $\text{CH}_3\text{Hg}^+$  zu elementarem Quecksilber ( $\text{Hg}^0$ ) reduziert wird. Es lässt sich dann nicht mehr von dem gleichfalls zu elementarem Quecksilber reduzierten  $\text{Hg}^{2+}$  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

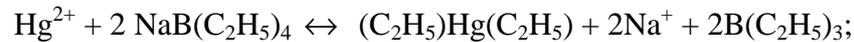
Eine weitere Derivatisierung der Methylquecksilberverbindungen ist mit Hilfe der Grignardreaktion möglich (Bulska et al., 1991, Frech et al., 1998). Dabei werden die Organometallverbindungen alkyliert und so in flüchtige Verbindungen umgesetzt.

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 biologischer Matrices (Fischgewebe und Zooplankton) war es erforderlich, 1. eine geeignete Methode der (chemischen) Probenvorbereitung zu entwickeln und 2. mehrere Analysentechniken 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 ( $\text{CH}_3\text{Hg}^+$  und  $\text{Hg}^{2+}$ ) 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<sup>®</sup> gesammelt. Durch Aufheizen des Adsorptionsröhrchens werden die gesammelten Verbindungen desorbiert und anschließend gaschromatographisch getrennt. Die Detektion erfolgt mittels Kaltdampf-Atomfluoreszenzspektrometrie (CV-AFS) nach vorheriger (post-column-) Pyrolyse der Hg-



## *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 Füllungsänge 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 m<sup>2</sup>/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°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<sup>®</sup> als Vorsäulen Sorptionsmaterial.

Bei Tenax-TA<sup>®</sup> 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<sup>®</sup> 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<sup>®</sup> 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<sup>®</sup> in ein silanisiertes Duranglasrohr gefüllt und dieses beidseitig mit Glaswolle verschlossen. Die so hergestellten Adsorptionsrohre sind mehrer 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<sup>®</sup> 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 CV-AAS oder CV-AFS, zu Hg<sup>0</sup> 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 Methylethyl- 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.

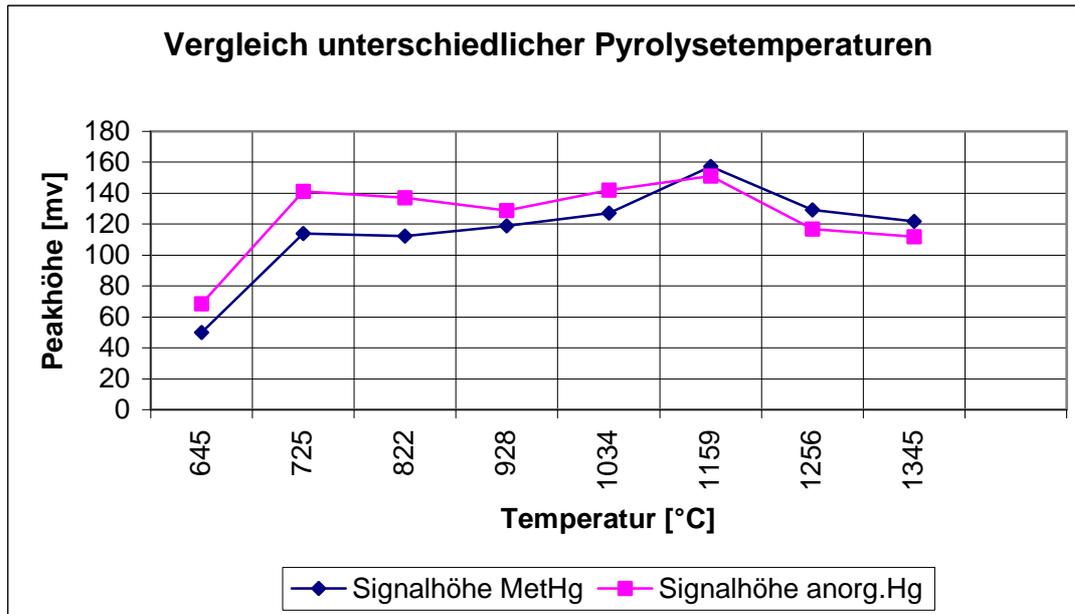


Abbildung 1: Abhängigkeit der Signalintensität von Methyl-Hg und anorg. Hg von der Pyrolyse-Temperatur.

GC-AFS (HP-5890-Brooks Rand AFS-2), Ethylierung mit Natriumtetraethylborat, Purge and Trap auf Tenax-TA<sup>®</sup>, 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 ( $6 \text{ mol/l}^{-1}$ ) 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 Adennukleotiden 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:

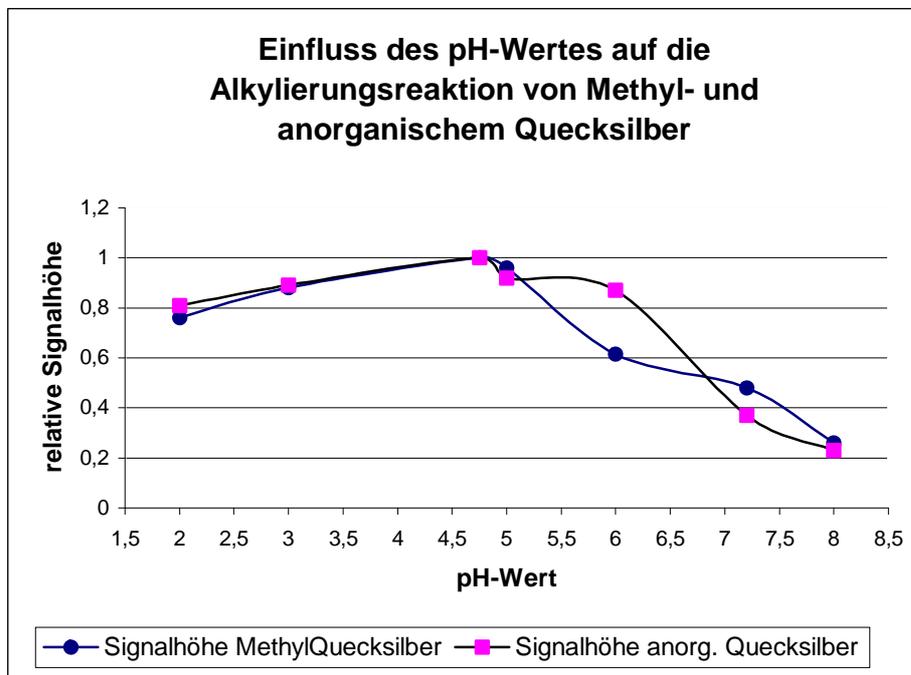


Abbildung 2: Einfluss des pH-Wertes auf die Alkylierungsreaktion von Methyl- und anorganischem Quecksilber mit Natriumtetraethylborat.

GC-AFS (HP-5890-Brooks Rand AFS-2), Ethylierung mit Natriumtetraethylborat, Purge and Trap auf Tenax-TA<sup>®</sup> (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  $\text{pH} \approx 4,75$  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.

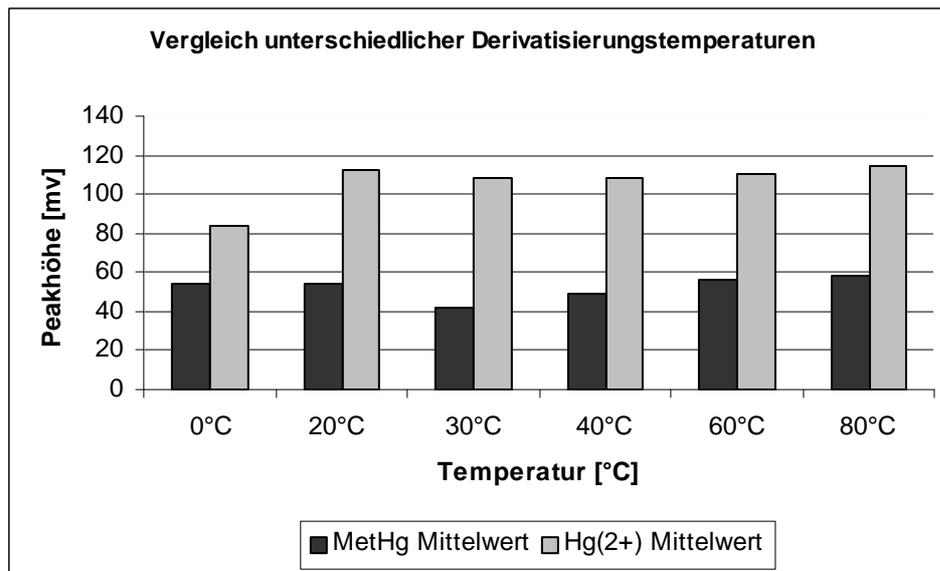


Abbildung 3: Einfluss unterschiedlicher Temperaturen bei der Derivatisierungsreaktion mit Natriumtetraethylborat auf die Ausbeute an Methyläthylquecksilber und Diäthylquecksilber. GC-AFS (HP-5890-Brooks Rand AFS-2), Ethylierung mit Natriumtetraethylborat, Purge and Trap auf Tenax-TA<sup>®</sup>, 15% 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 Ausblaszeit (purge time). Der Parameter Flussgeschwindigkeit wurde bei den Untersuchungen konstant bei 600 ml/min gehalten.

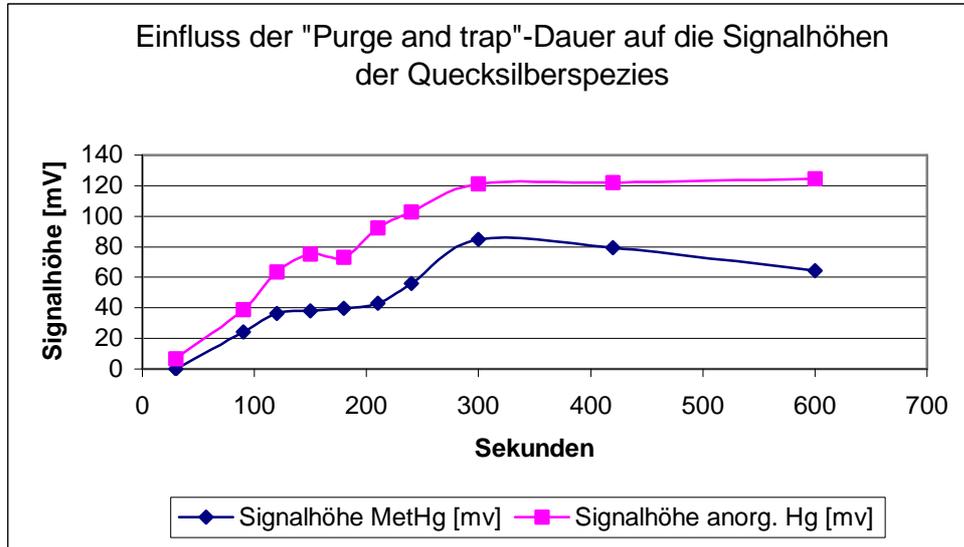


Abbildung 4: Einfluss der "Purge and trap"-Dauer auf die detektierten Signalthöhen der Quecksilberspezies.

GC-AFS (HP-5890-Brooks Rand AFS-2), Ethylierung mit Natriumtetraethylborat, Purge and Trap auf Tenax-TA<sup>®</sup>, 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

<b>MetHg</b> ( $\times 10^{-6} \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ )	<b>Anorg. Hg</b> ( $\times 10^{-6} \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ )
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.

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

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

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

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

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

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

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/CV-AFS-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:

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

Tabelle 12 zeigt die prinzipielle Vorgehensweise bei der Varianzanalyse zur Fehlerrückführung 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/CV-AFS-Methode mit nachfolgender Varianzanalyse zugrunde:

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

Die Analysenergebnisse sind in den Tabelle 13 und 14 zusammengestellt.

Tabelle 13: Monomethylquecksilbergehalte (jeweils ausgedrückt als  $\times 10^{-6} g \cdot kg^{-1} Hg$  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,  $\sigma^2_3$ ,  $\sigma^2_B$  und  $\sigma^2_W$  an der Summe ( $s^2_3 + s^2_B + s^2_W$ ) 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 (CV-AFS) 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<sup>®</sup> anreichern. Durch Aufheizen des Tenax-TA<sup>®</sup> 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 Hg<sup>0</sup> 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.  $\mu\text{g}$  statt  $10^{-6}\text{g}$  ) verwendet.

### Untersuchung von Zooplankton und Fischgewebe

#### Gaschromatographische Bestimmungsmethode von $\text{Hg}^{2+}$ 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 ( $\text{Hg}^0$ ), das anorganische Quecksilber ( $\text{Hg}^{2+}$ ) und die quecksilberorganischen Verbindungen Monomethylquecksilber ( $\text{CH}_3\text{Hg}^+$ ) und Dimethylquecksilber ( $\text{CH}_3\text{HgCH}_3$ ).

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)<sup>+</sup> verstanden. Er wird in  $\mu\text{gkg}^{-1}$  angegeben. Als Standardsubstanz wird Monomethylquecksilberchlorid verwendet.

Name: Monomethylquecksilberchlorid

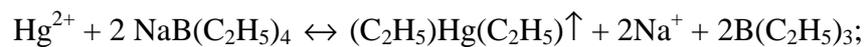
CAS-Nr: [115-09-3]

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

*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<sup>®</sup> gesammelt. Durch Aufheizen des Adsorptionsröhrchens werden die gesammelten Verbindungen desorbiert und anschließend gaschromatographisch getrennt. Die Detektion erfolgt mittels Kaltdampf-Atomabsorptionsspektrometer (CV-AAS) oder Atomfluoreszenzspektrometer (CV-AFS) nach vorheriger Pyrolyse der Hg-Derivate zu Hg<sup>0</sup>. Bei der CV-AFS 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 M $\Omega$ m, frei von Hg
4.1.11	2-Propanol	Merck	11-36- 67	7-16- 24/25- 26	67-63-0	F, X <sub>i</sub>	p.A.
4.1.12	Cyclohexan	Merck	11-38- 50/53- 65-67	9-16- 33-60- 61-62		F, X <sub>n</sub> , 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  $\mu\text{l}$  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  $\mu\text{l}$  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  $\mu\text{l}$  verdünnte Methylquecksilberchlorid-Stammlösung (4.3.1.1) und 100  $\mu\text{l}$  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  $-15^{\circ}\text{C}$  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  $-20^{\circ}\text{C}$  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  $85^{\circ}\text{C}$

- 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<sup>®</sup>
- 5.9 Nickel/Chrom Widerstandsdraht 60 cm,  $\varnothing$  0,5 mm
- 5.10 Oxisorb<sup>®</sup> Gasreinigungssystem
- 5.11 PC mit Kontron Integration Pack 3.0<sup>®</sup> bzw. Notebook mit LabView <sup>®</sup>-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 CV-AFS Detektor II Fa. Brooks Rand
- 5.22 Mikrodosierpipetten für 10-100  $\mu$ l, 200-1000  $\mu$ l, 1000-5000  $\mu$ l
- 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.

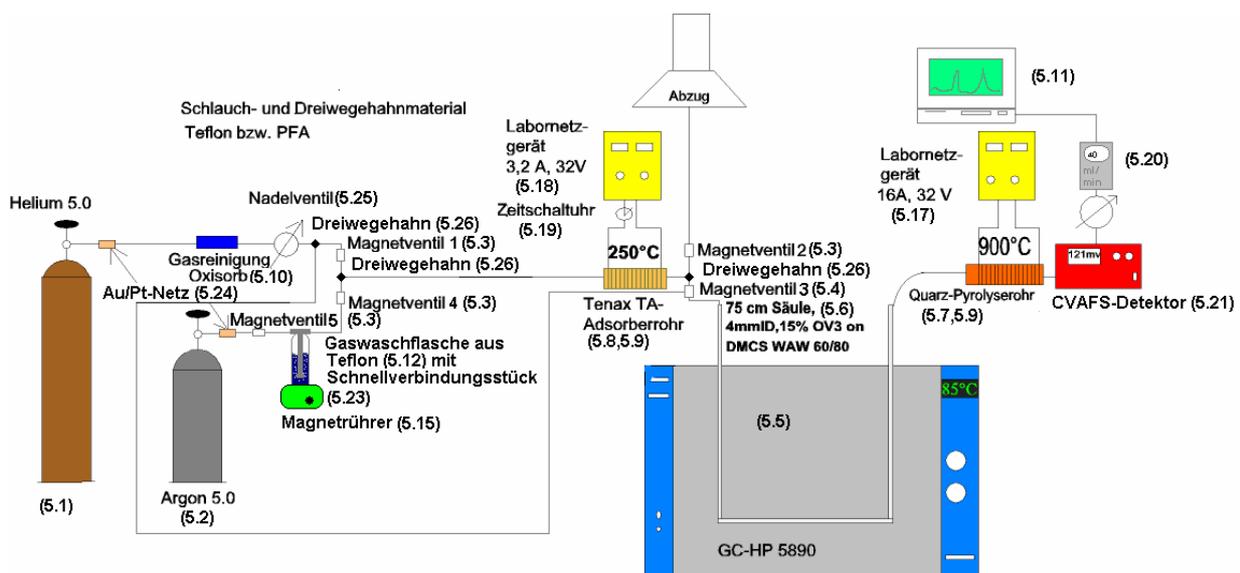


Abbildung 5: Schematischer Aufbau der Apparatur zur simultanen gaschromatographischen Bestimmung von  $\text{Hg}^{2+}$  und Methylquecksilber .

*Anschluss von Gasflaschen, Druckminderer, Durchflussmessgerät, Feinregulierventil, Schläuchen, „Quecksilberfalle“, CV-AFS-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<sup>®</sup>-Adsorptionsröhrchen (5.8) angeschlossen. Siehe dazu 4.6.

Hinter dem Tenax-TA<sup>®</sup>-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 CV-AFS Detektor (5.21)-Eingang angeschlossen. An den Ausgang des CV-AFS 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<sup>®</sup> 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<sup>®</sup> 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.

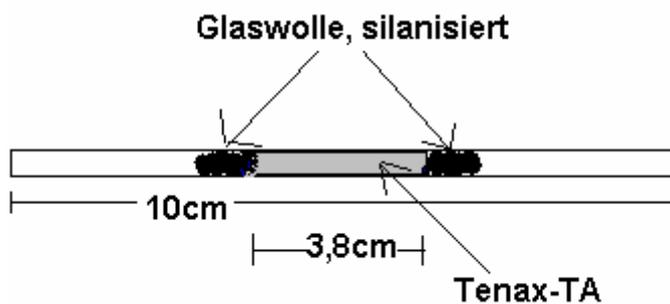


Abbildung 6: Aufbau Tenax-TA<sup>®</sup>-Adsorptionsröhrchen

Das fertige Tenax-TA<sup>®</sup>-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°C aufgeheizt wird.

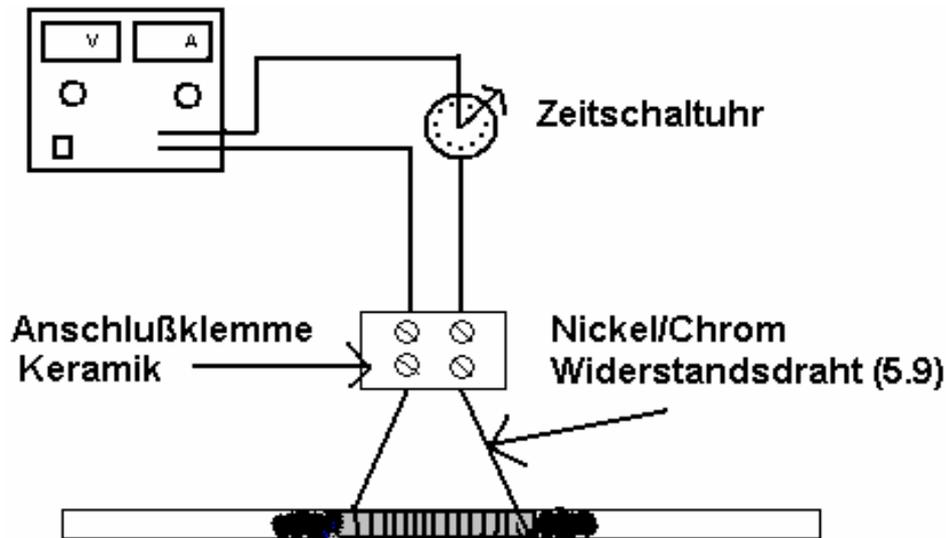


Abbildung 7: Aufbau der Adsorptions-/Desorptionseinheit mit Zeitschaltuhr

#### ***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.

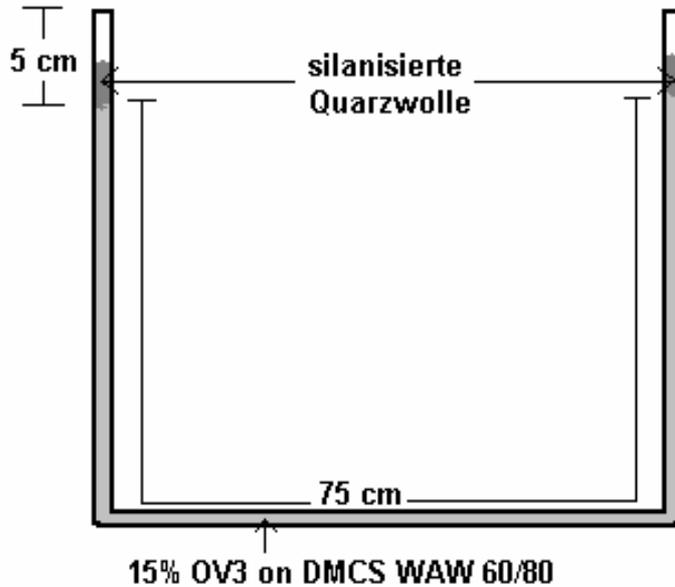


Abbildung 8: Gaschromatographische Trennsäule – Schematische Darstellung

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.

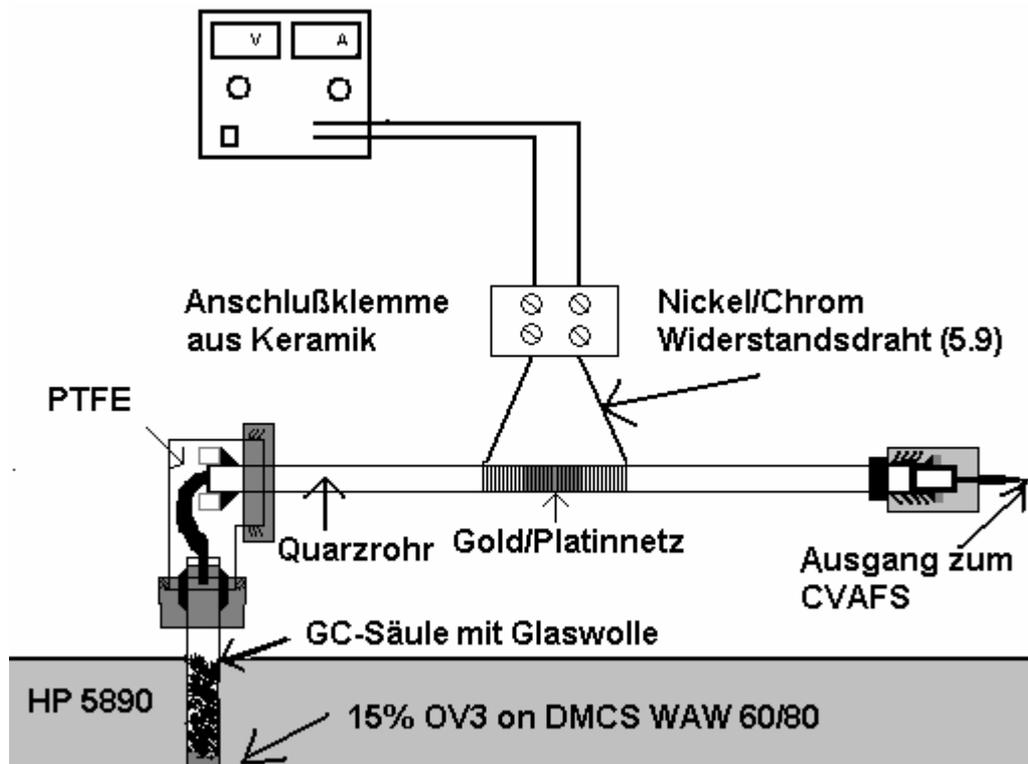


Abbildung 9: Pyrolyseeinheit

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-Wandlertarte 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 ± 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 ± 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 ± 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<sup>2+</sup> Standardmix (4.3.3) wird nach dem vorgegebenen Schema aus Tabelle 18 eine Kalibrierung durchgeführt.

Tabelle 18: Pipettierschema

Reinstwasser [ml]	Standardmix (4.3.3) [ $\mu$ l]	Entspricht MetHg [pg]	Entspricht $Hg^{2+}$ [pg]	Essigsäure- /Acetat Pufferlösung (4.3.4) [ml]	Natriumtetraethylborat- Lösung (STEB) (4.3.5) [ $\mu$ l]
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  $\mu$ l 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<sup>®</sup> 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  $\text{Hg}^0$  reduziert und vom CV-AFS-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  $\mu\text{l}$  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:

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

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

E: Einwaage [mg]

2000: Faktor 2000  $\mu\text{l}$  Aufschlusslösung

$V_{(\text{Probelösung})}$ : Volumen an Aufschlusslösung [ $\mu\text{l}$ ]

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

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

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

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

2000: Faktor 2000  $\mu\text{l}$  Aufschlusslösung

$V_{(\text{Probelösung})}$ : Volumen an Aufschlusslösung [ $\mu\text{l}$ ]

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., Wenclawiak, 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.

Chytyk, J.: Research Projects 2001, University of Alberta, <http://www.ualberta.ca/~medlabsc/chytyk.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/CV-AFS 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

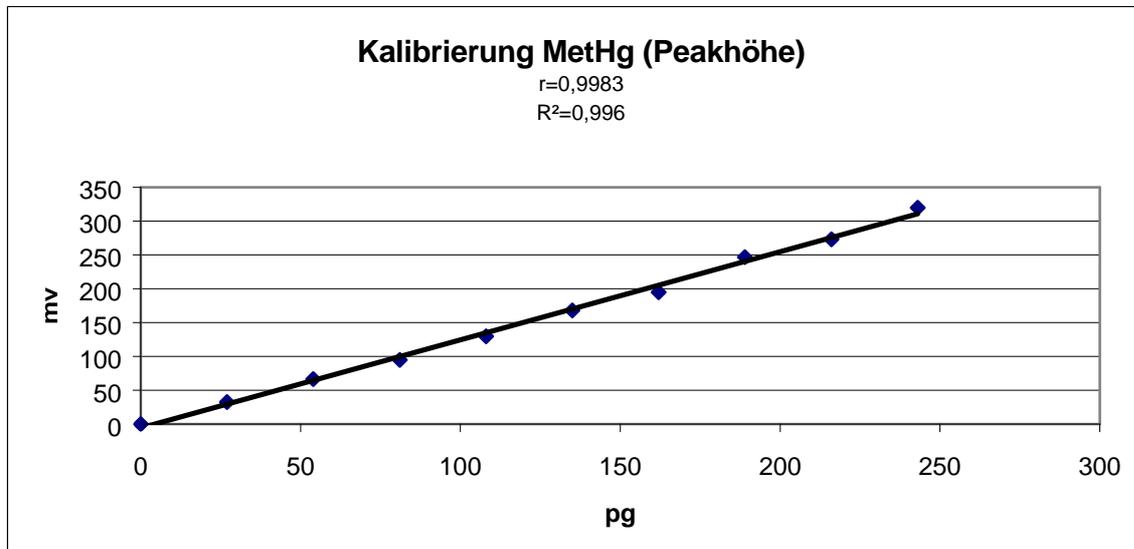


Abbildung 10: Kalibriergerade für Methylquecksilber (Peakhöhe)

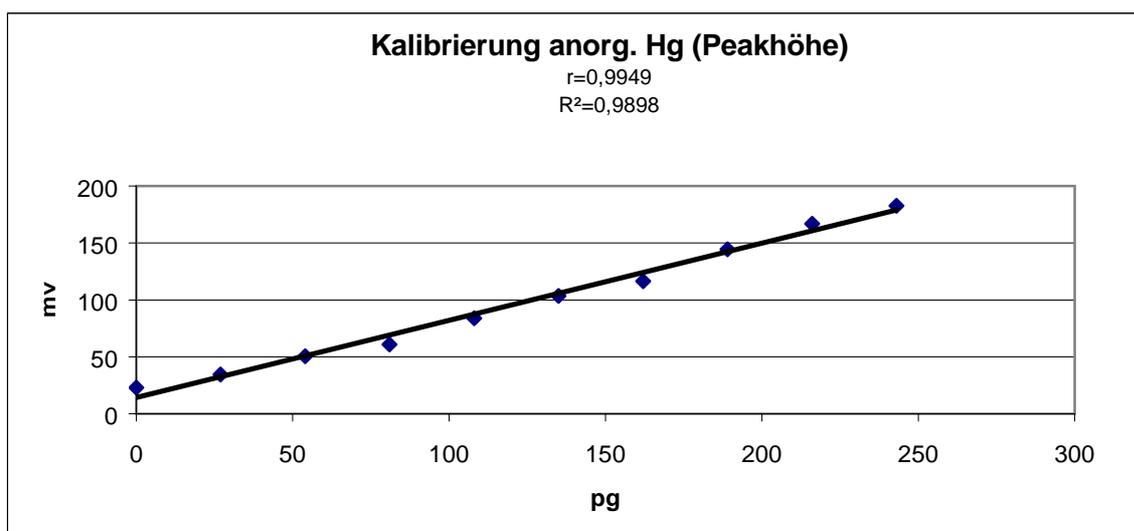


Abbildung 11: Kalibriergerade für anorganisches Quecksilber (Peakhöhe)

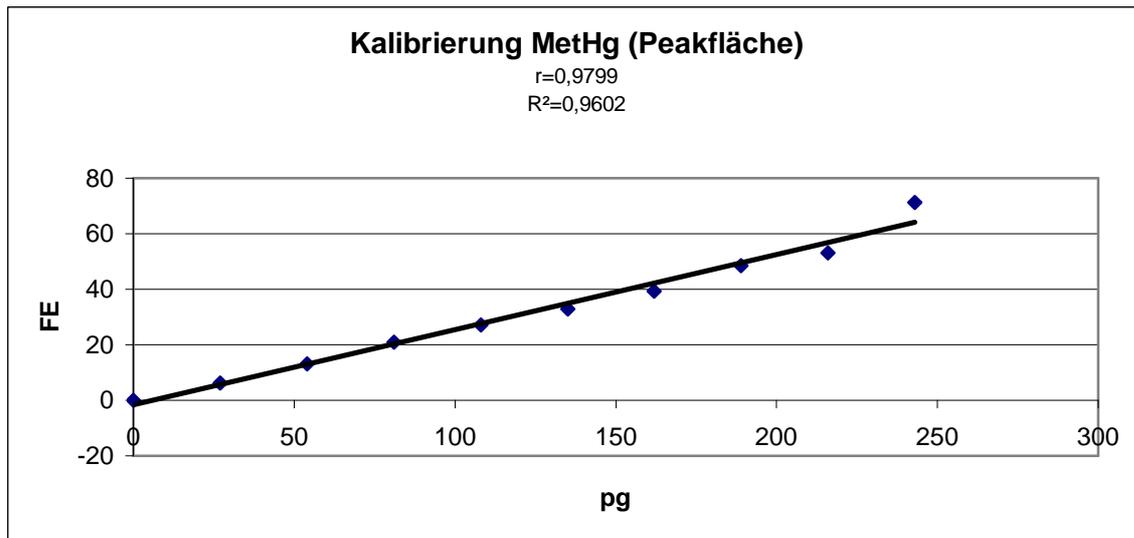


Abbildung 12: Kalibriergerade für Methylquecksilber (Peakfläche)

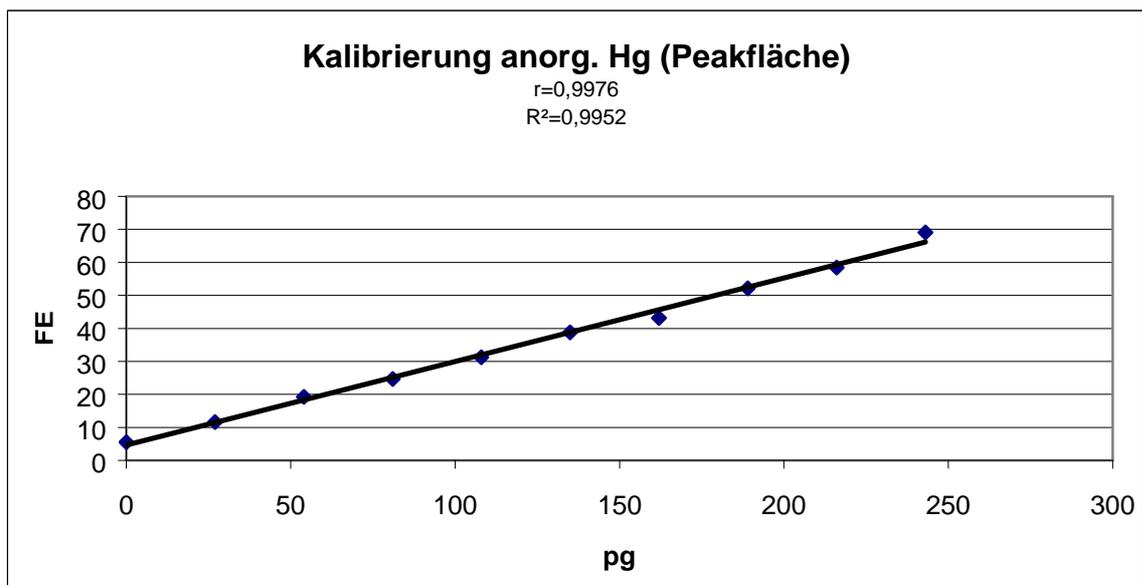


Abbildung 13: Kalibriergerade für anorganisches Quecksilber (Peakfläche)

## 9. Tabellarische Übersicht der Ergebnisse der Untersuchungen der Umweltproben

### 9.1 Ergebnisse der Untersuchungen der Fischembryonen 2002

Tabelle 9.1:

2002 STATION	AUSB	AUSL	Wasser gehalt	Hg Mittelwert	Hg . STDABW.95%	MeHg Mittelwert	MeHG STDABW.95%
13	53°06'N	03°00'E	93,54%	2,3565	0,3700	1,2817	0,5780
14	53°06'N	03°30'E	91,35%	1,2996	0,2040	2,0217	0,6308
15	53°06'N	04°00'E	94,05%	0,8948	0,0957	0,2869	0,0551
17	53°24'N	03°00'E	92,37%	1,8106	0,1974	0,9357	0,1769
18	53°24'N	03°30'E	91,45%	0,6479	0,1101	0,1650	0,0203
19	53°24'N	04°00'E	92,16%	0,6425	0,1118	0,3207	0,0478
20	53°24'N	04°30'E	93,73%	0,1589	0,0513	0,1715	0,1543
21	53°42'N	03°30'E	92,18%	<E.G.	<E.G.	0,2644	0,0796
22	53°42'N	04°00'E	88,97%	0,8301	0,1610	0,7438	0,1666
23	53°42'N	04°30'E	90,57%	0,9664	0,0937	0,5822	0,1415
24	53°42'N	05°00'E	90,33%	0,2267	0,0426	1,1470	0,7478
25	53°42'N	05°30'E	91,43%	1,4335	0,2838	0,6124	0,1304
26	53°42'N	06°00'E	90,31%	0,8905	0,2484	0,1333	0,1353
27	53°42'N	06°30'E	91,33%	2,8168	0,2732	0,6763	0,4606
28	54°00'N	04°00'E	92,72%	0,7547	0,1419	0,5649	0,1051
29	54°00'N	04°30'E	91,44%	2,7660	0,5477	0,1853	0,0660
30	54°00'N	05°00'E	93,73%	1,8069	0,5041	0,2883	0,0747
31	54°00'N	05°30'E	92,87%	1,1872	0,1152	0,4048	0,1008
37	54°18'N	05°00'E	89,07%	0,3764	0,0422	0,2053	0,0667
38	54°18'N	05°30'E	94,97%	1,6704	0,2906	0,5188	0,1318
39	54°18'N	06°00'E	90,72%	3,7228	1,0312	0,9305	0,2689
40	54°18'N	06°30'E	92,76%	0,6033	0,1261	0,3284	0,2239
41	54°18'N	07°00'E	92,04%	0,7267	0,1170	1,4366	0,2126
42	54°18'N	07°30'E	90,38%	2,7714	0,6873	1,0760	0,2087
43	54°18'N	08°00'E	90,77%	4,2960	0,6745	1,7744	0,3779
44	54°36'N	05°30'E	91,73%	1,2066	0,1894	0,8317	0,3959
45	54°36'N	06°00'E	93,60%	0,5097	0,0545	0,7178	0,1335
46	54°36'N	06°30'E	92,74%	0,4770	0,0520	0,6891	0,1061
47	54°36'N	07°00'E	93,98%	1,5586	0,2650	0,9466	0,3512
48	54°36'N	07°30'E	91,96%	0,8993	0,0728	0,3082	0,0441
49	54°38'N	07°51'E	92,92%	0,6312	0,1105	0,8165	0,1976
50	54°54'N	06°00'E	90,33%	3,6740	2,0427	2,2071	0,4878
51	54°54'N	06°30'E	93,45%	1,3565	1,2819	1,0631	0,2381
52	54°54'N	07°00'E	92,11%	<E.G.	<E.G.	0,2038	0,1547
53	54°54'N	07°30'E	93,06%	3,7912	1,2246	2,3970	0,5753
54	54°54'N	08°00'E	92,01%	2,2545	1,3256	0,1733	0,1560
55	55°12'N	06°30'E	88,21%	1,7965	0,3485	2,1878	0,5776
56	55°12'N	07°00'E	92,11%	0,9347	0,0907	0,8373	0,1239
57	55°12'N	07°30'E	93,54%	1,3914	0,2616	0,3418	0,0831
58	55°12'N	08°00'E	92,76%	0,6744	0,1335	1,0083	0,2198

## 9.2 Ergebnisse der Untersuchungen der Fischembryonen 2003

Tabelle 9.2:

2003	AUSB	AUSL	Wasser	Anorg.Hg	Anorg. Hg .	MeHg	MeHg
STATION			gehalt	Mittelwert	STDABW.95%	Mittelwert	STDABW.95%
1	51°50'N	03°00'E	92,8%	0,3840	0,2143	0,9925	0,1796
2	51°52'N	02°30'E	92,1%	4,9496	0,4356	0,9134	0,2622
3	51°54'N	03°30'E	93,5%	<EG	<EG	<EG	<EG
4	52°10'N	03°00'E	94,0%	0,7688	0,2045	0,6908	0,1741
5	52°10'N	03°30'E	92,7%	<EG	<EG	1,8150	0,4538
7	52°28'N	03°00'E	92,4%	0,1414	0,1258	0,5080	0,0904
8	52°28'N	03°30'E	92,7%	0,9498	0,1491	0,6991	0,1168
9	52°28'N	04°00'E	92,9%	2,7215	0,4273	1,2255	0,2561
10	52°48'N	03°00'E	92,4%	3,0961	0,3313	0,3708	0,2403
11	52°48'N	03°30'E	93,1%	1,3868	0,1512	0,3664	0,1063
12	52°48'N	04°00'E	92,9%	2,8227	0,4799	0,8044	0,3443
14	53°06'N	03°30'E	93,0%	4,3496	0,3523	0,5860	0,1981
15	53°06'N	04°00'E	92,7%	0,5775	0,1011	0,8584	0,0901
16	52°57'N	04°23'E	91,7%	0,9270	0,5154	0,9531	0,3622
18	53°24'N	03°30'E	92,2%	0,4776	0,4514	0,7009	0,3189
19	53°24'N	04°00'E	91,9%	2,4450	0,4254	0,7186	0,3348
20	53°24'N	04°30'E	91,7%	0,8224	0,2656	1,0936	0,2198
21	53°42'N	03°30'E	92,1%	0,4868	0,2862	0,2778	0,2036
22	53°42'N	04°00'E	87,1%	0,6059	0,1176	0,5390	0,0868
23	53°42'N	04°30'E	94,9%	1,0455	0,1014	0,2802	0,0765
24	53°42'N	05°00'E	90,8%	0,4351	0,0818	0,3660	0,0728
25	53°42'N	05°30'E	91,1%	2,4841	0,4919	0,8891	0,4268
26	53°42'N	06°00'E	88,9%	1,8494	0,5160	1,1900	0,3737
28	54°00'N	04°00'E	91,9%	2,6069	0,2529	0,1451	0,1742
29	54°00'N	04°30'E	91,9%	2,0232	0,2266	<E.G.	<E.G.
30	54°00'N	05°00'E	85,1%	0,8023	0,1396	0,6151	0,1052
31	54°00'N	05°30'E	91,0%	1,0400	0,2881	0,7511	0,2043
32	54°00'N	06°00'E	91,7%	0,9663	0,2020	1,0563	0,1511
33	54°00'N	06°30'E	91,7%	3,8494	0,6198	0,6051	0,5144
35	54°00'N	07°30'E	88,8%	0,8326	0,2065	0,7966	0,1474
36	54°00'N	08°00'E	91,4%	8,5916	0,8677	0,6487	0,5832
37	54°18'N	05°00'E	94,9%	0,5974	0,1481	0,3513	0,1065
38	54°18'N	05°30'E	92,9%	0,3824	0,0742	0,0863	0,0550
39	54°18'N	06°00'E	92,1%	1,0643	0,2480	0,4479	0,1818
41	54°18'N	07°00'E	92,9%	0,6648	0,1110	0,4521	0,0805
42	54°18'N	07°30'E	92,4%	1,6892	0,1503	0,5236	0,0859
43	54°18'N	08°00'E	91,7%	5,6537	0,6332	0,6984	0,4637
44	54°36'N	05°30'E	91,4%	1,9086	0,1451	0,1910	0,0625
45	54°36'N	06°00'E	91,2%	1,8778	0,1652	0,2805	0,1038
46	54°36'N	06°30'E	93,9%	0,7211	0,1067	0,1843	0,0792
47	54°36'N	07°00'E	92,2%	0,6107	0,2943	0,9966	0,2212
48	54°36'N	07°30'E	94,8%	0,6401	0,0909	0,5781	0,0809
50	54°54'N	06°00'E	88,7%	3,2643	0,2416	0,6867	0,0934
51	54°54'N	06°30'E	92,2%	1,4005	0,1443	0,2791	0,1030

52	54°54'N	07°00'E	95,4%	0,8774	0,1123	0,5499	0,0841
53	54°54'N	07°30'E	92,7%	7,8219	0,5710	0,4544	0,1581
56	55°12'N	07°00'E	92,0%	1,4619	0,3143	0,9702	0,2231
57	55°12'N	07°30'E	91,8%	0,4863	0,2149	0,7612	0,1911

### 9.3 Ergebnisse der Untersuchungen der Klieschenfiletproben 2003

Tabelle 9.3:

Fisch code	GEO-LAENGE	GEO-BREITE	GEBIET	LEN	GEW	ALTER	Hg-Filet	MeHg-Filet	Wassergehalt[%]
1	05°07'73E	55°26'75N	P01	24	136	4	5,964	84,853	81,8%
2	05°07'73E	55°26'75N	P01	20	80	3	4,601	127,337	83,6%
3	05°07'73E	55°26'75N	P01	21	93	3	4,157	21,576	81,2%
4	05°07'73E	55°26'75N	P01	21	101	3	3,085	21,408	81,2%
5	05°07'73E	55°26'75N	P01	21	84	k.a.	4,324	27,948	81,7%
6	05°13'67E	55°25'10N	P01	23	111	3	3,635	107,001	84,0%
7	05°13'67E	55°25'10N	P01	22	109	4	1,709	69,975	80,8%
8	05°13'67E	55°25'10N	P01	22	97	4	8,707	137,228	85,1%
9	05°13'67E	55°25'10N	P01	22	115	4	2,789	30,029	79,9%
10	05°13'67E	55°25'10N	P01	21	102	4	9,279	80,608	80,8%
11	02°53'87E	56°31'17N	P02	23	111	3	4,320	201,136	83,6%
12	02°53'87E	56°31'17N	P02	20	74	3	4,666	130,917	84,5%
14	02°53'87E	56°31'17N	P02	24	125	4	8,672	186,355	82,4%
15	02°53'87E	56°31'17N	P02	23	114	3	8,781	116,440	84,0%
16	03°11'78E	56°41'10N	P02	23	120	4	7,324	139,154	83,5%
17	03°11'78E	56°41'10N	P02	23	126	4	10,764	88,736	83,3%
18	03°11'78E	56°41'10N	P02	22	101	3	9,624	254,157	84,1%
19	03°11'78E	56°41'10N	P02	22	79	4	9,814	100,807	86,0%
20	03°11'78E	56°41'10N	P02	21	94	4	6,999	68,495	82,4%
21	07°30'25E	54°15'66N	JMP	21	110	3	4,095	31,576	78,5%
22	07°30'25E	54°15'66N	JMP	24	148	4	3,995	67,224	79,6%
23	07°37'82E	54°23'77N	JMP	22	120	4	6,619	144,163	80,4%
24	07°37'82E	54°23'77N	JMP	21	95	3	10,935	185,243	83,3%
25	07°37'82E	54°23'77N	JMP	20	101	3	4,104	102,167	79,8%
26	07°37'82E	54°23'77N	JMP	21	99	3	9,512	221,374	80,2%
27	07°37'82E	54°23'77N	JMP	22	115	4	6,257	180,677	81,8%
28	07°37'82E	54°23'77N	JMP	22	123	4	6,952	125,472	80,7%
30	07°37'82E	54°23'77N	JMP	21	109	3	8,860	107,050	79,3%
31	10°24'35E	54°35'46N	B01	22	134	2	2,412	35,394	79,2%
32	10°24'35E	54°35'46N	B01	21	114	2	2,792	19,491	79,2%
33	10°24'35E	54°35'46N	B01	21	113	2	4,118	24,383	79,4%
34	10°24'35E	54°35'46N	B01	23	158	2	2,254	16,658	78,9%
35	10°24'35E	54°35'46N	B01	24	163	3	3,137	29,430	78,9%
36	10°24'35E	54°35'46N	B01	24	166	3	5,943	24,228	79,3%
37	10°24'35E	54°35'46N	B01	21	111	2	0,719	33,414	78,7%
38	10°24'35E	54°35'46N	B01	24	161	3	4,545	19,910	79,0%
39	10°24'35E	54°35'46N	B01	23	140	4	3,479	21,659	80,6%
40	10°24'35E	54°35'46N	B01	21	110	2	2,633	19,210	81,3%
41	02°07'08W	56°16'17N	N06	22	113	3	6,277	62,503	79,4%
42	02°07'08W	56°16'17N	N06	24	129	4	5,666	69,043	79,9%
43	02°07'08W	56°16'17N	N06	22	120	4	9,730	32,243	77,8%
44	02°07'08W	56°16'17N	N06	23	137	4	8,834	193,481	79,1%
45	02°07'08W	56°16'17N	N06	23	136	k.a.	2,503	16,256	78,8%
46	02°07'08W	56°16'17N	N06	20	92	4	5,686	30,855	82,5%
47	02°07'08W	56°16'17N	N06	23	132	4	8,012	50,141	80,1%
48	02°07'08W	56°16'17N	N06	24	149	3	4,894	62,013	80,8%

Fortsetzung Tab.9.3

49	02°07'08W	56°16'17N	N06	23	123	4	6,091	69,850	78,9%
50	02°07'08W	56°16'17N	N06	21	108	3	8,631	76,231	80,4%
51	02°09'35E	54°27'23N	N04	24	139	4	32,585	256,953	80,3%
52	02°09'35E	54°27'23N	N04	21	92	4	7,159	130,946	80,5%
53	02°09'35E	54°27'23N	N04	22	118	4	7,433	359,505	81,5%
54	02°09'35E	54°27'23N	N04	21	103	4	12,174	91,177	81,5%
55	02°09'35E	54°27'23N	N04	22	103	4	7,680	92,079	80,4%
56	02°09'35E	54°27'23N	N04	24	159	4	3,921	51,827	81,5%
57	02°09'35E	54°27'23N	N04	23	126	4	5,802	84,412	80,5%
58	02°09'35E	54°27'23N	N04	22	108	5	4,045	89,134	79,8%

#### 9.4 Ergebnisse der Untersuchungen der Klieschenleberproben 2003

Tabelle 9.4:

Fischcode	GEO LÄNGE	GEO-BREITE	GEBIET	LEN	GEW	ALTER	Hg-Leber	MeHg-Leber	Wassergehalt[%]
1	05°07'73E	55°26'75N	P01	24	136	4	30,907	6,59	75,00%
2	05°07'73E	55°26'75N	P01	20	80	3	50,96	26,791	79,00%
3	05°07'73E	55°26'75N	P01	21	93	3	29,502	10,635	70,40%
4	05°07'73E	55°26'75N	P01	21	101	3	35,688	5,609	76,40%
5	05°07'73E	55°26'75N	P01	21	84	k.a.	30,166	14,858	71,10%
6	05°13'67E	55°25'10N	P01	23	111	3	60,18	23,704	75,90%
7	05°13'67E	55°25'10N	P01	22	109	4	114,953	23,144	76,00%
8	05°13'67E	55°25'10N	P01	22	97	4	136,826	34,128	73,10%
9	05°13'67E	55°25'10N	P01	22	115	4	59,638	55,977	67,50%
10	05°13'67E	55°25'10N	P01	21	102	4	61,094	11,75	73,60%
11	02°53'87E	56°31'17N	P02	23	111	3	207,697	120,017	78,40%
12	02°53'87E	56°31'17N	P02	20	74	3	136,401	31,744	75,90%
13	02°53'87E	56°31'17N	P02	22	104	3	157,894	37,431	71,80%
14	02°53'87E	56°31'17N	P02	24	125	4	105,186	59,366	69,50%
15	02°53'87E	56°31'17N	P02	23	114	3	118,995	32,138	73,90%
16	03°11'78E	56°41'10N	P02	23	120	4	148,567	54,345	75,40%
17	03°11'78E	56°41'10N	P02	23	126	4	123,926	20,874	74,40%
18	03°11'78E	56°41'10N	P02	22	101	3	343,223	77,148	74,50%
19	03°11'78E	56°41'10N	P02	22	79	4	258,749	35,113	78,30%
20	03°11'78E	56°41'10N	P02	21	94	4	349,75	78,437	79,20%
21	07°30'25E	54°15'66N	JMP	21	110	3	63,451	37,611	47,80%
22	07°30'25E	54°15'66N	JMP	24	148	4	80,053	48,846	55,30%
23	07°37'82E	54°23'77N	JMP	22	120	4	70,568	26,368	57,20%
24	07°37'82E	54°23'77N	JMP	21	95	3	41,57	30,142	55,90%
25	07°37'82E	54°23'77N	JMP	20	101	3	38,623	24,173	52,00%
26	07°37'82E	54°23'77N	JMP	21	99	3	58,894	38,201	65,20%
27	07°37'82E	54°23'77N	JMP	22	115	4	168,511	82,977	61,10%
28	07°37'82E	54°23'77N	JMP	22	123	4	74,773	53,504	59,60%
29	07°37'82E	54°23'77N	JMP	23	138	3	17,119	9,022	57,20%
30	07°37'82E	54°23'77N	JMP	21	109	3	41,111	63,774	50,80%

Fortsetzung Tabelle 9.4

31	10°24'35E	54°35'46N	B01	22	134	2	31,761	11,714	58,40%
32	10°24'35E	54°35'46N	B01	21	114	2	51,168	11,418	46,40%
33	10°24'35E	54°35'46N	B01	21	113	2	17,608	8,949	53,00%
34	10°24'35E	54°35'46N	B01	23	158	2	14,312	7,311	48,20%
35	10°24'35E	54°35'46N	B01	24	163	3	14,185	12,485	59,40%
36	10°24'35E	54°35'46N	B01	24	166	3	17,547	8,309	49,80%
37	10°24'35E	54°35'46N	B01	21	111	2	46,618	21,025	59,60%
38	10°24'35E	54°35'46N	B01	24	161	3	25,574	10,103	52,60%
39	10°24'35E	54°35'46N	B01	23	140	4	17,495	9,021	50,30%
40	10°24'35E	54°35'46N	B01	21	110	2	16,326	8,08	52,20%
41	02°07'08W	56°16'17N	N06	22	113	3	96,826	37,084	50,30%
42	02°07'08W	56°16'17N	N06	24	129	4	106,59	44,099	57,40%
43	02°07'08W	56°16'17N	N06	22	120	4	16,805	6,328	45,50%
44	02°07'08W	56°16'17N	N06	23	137	4	31,578	15,275	53,30%
45	02°07'08W	56°16'17N	N06	23	136	k.a.	26,819	14,188	51,70%
46	02°07'08W	56°16'17N	N06	20	92	4	29,764	15,861	48,40%
47	02°07'08W	56°16'17N	N06	23	132	4	28,897	15,511	51,60%
48	02°07'08W	56°16'17N	N06	24	149	3	46,547	25,493	58,30%
49	02°07'08W	56°16'17N	N06	23	123	4	38,605	13,505	43,40%
50	02°07'08W	56°16'17N	N06	21	108	3	34,53	20,347	48,50%
51	02°09'35E	54°27'23N	N04	24	139	4	54,594	55,18	54,30%
52	02°09'35E	54°27'23N	N04	21	92	4	69,496	83,856	56,20%
53	02°09'35E	54°27'23N	N04	22	118	4	76,89	24,469	54,10%
54	02°09'35E	54°27'23N	N04	21	103	4	37,002	10,484	50,50%
55	02°09'35E	54°27'23N	N04	22	103	4	65,473	31,238	56,00%
56	02°09'35E	54°27'23N	N04	24	159	4	28,963	22,834	51,80%
57	02°09'35E	54°27'23N	N04	23	126	4	49,888	29,808	60,20%
58	02°09'35E	54°27'23N	N04	22	108	5	44,318	47,089	57,80%
59	02°09'35E	54°27'23N	N04	21	93	3	63,555	43,608	58,30%
60	02°09'35E	54°27'23N	N04	22	105	4	80,267	29,48	59,60%

**9.5 Ergebnisse der Untersuchungen der Sprottenfiletproben 2003**

Tabelle 9.5

<b>Sprotten</b>	<b>Station</b>	<b>GEO</b>	<b>GEO-</b>	<b>MeHg Filet</b>	<b>Stdabw.</b>	<b>Hg Filet</b>	<b>Länge</b>	<b>Wasser-</b>
		<b>LÄNGE</b>	<b>BREITE</b>	<b>µg/kg</b>	<b>±</b>			<b>gehalt</b>
1	37	54°18'N	05°00'E	22,475	2,147	<E.G.	8,9	80,70%
2	37	54°18'N	05°00'E	27,240	2,716	<E.G.	9,1	80,77%
3	37	54°18'N	05°00'E	48,446	4,567	<E.G.	8,4	78,87%
4	37	54°18'N	05°00'E	27,742	4,290	<E.G.	8,3	80,83%
5	37	54°18'N	05°00'E	41,023	3,987	<E.G.	11,3	77,27%
6	37	54°18'N	05°00'E	43,010	2,297	<E.G.	11,2	80,77%
7	37	54°18'N	05°00'E	33,650	1,902	<E.G.	12	79,70%
8	37	54°18'N	05°00'E	35,621	2,622	<E.G.	11,5	81,07%
9	37	54°18'N	05°00'E	44,291	1,007	<E.G.	12,8	80,33%
10	37	54°18'N	05°00'E	26,080	1,899	<E.G.	13,5	80,26%
11	37	54°18'N	05°00'E	17,318	1,685	<E.G.	13	79,11%
12	37	54°18'N	05°00'E	7,282	0,849	<E.G.	13,1	78,63%
13	37	54°18'N	05°00'E	46,082	0,660	<E.G.	16	80,45%
14	37	54°18'N	05°00'E	17,963	1,916	<E.G.	14,6	78,69%
15	37	54°18'N	05°00'E	41,405	1,472	<E.G.	15,5	79,09%
16	37	54°18'N	05°00'E	40,960	0,220	<E.G.	15	77,67%