

UNIVERSITETET FOR MILJØ- OG BIOVITENSKAP



Forord

Denne masteroppgaven ble utført ved Institutt for plante- og miljøvitenskap (IPM) ved Universitetet for miljø og biovitenskap (UMB), Ås. Temaet for oppgaven ble foreslått av overingeniør Karl Andreas Jensen og førsteamanuensis Elin Gjengedal, begge ved IPM, etter ønske om å utvikle en metode for bestemmelse av metylkvikksølv i biota og sedimenter ved bruk av instrumenter tilgjengelig på instituttet.

Arbeidet med oppgaven har vært spennende og utfordrende, og gitt meg mange gode minner og erfaringer. Det gav meg også muligheten til å delta på et interessant seminar, ”Nordic environmental chemistry conference” i flotte omgivelser i Longyearbyen, Svalbard. Jeg vil rette en stor takk til min veileder Elin Gjengedal for god veiledning og oppmuntrende ord under arbeidet. Jeg vil også takke Solfrid Lohne, avdelingsingeniør ved IPM, og Karl Andreas Jensen for svært god hjelp på laboratoriet og nyttige diskusjoner. En takk rettes også til Lojana Mohanathas for godt samarbeid i det innledende arbeidet til oppgaven, og til min venninne Tone Grinde for korrekturlesing.

Takk også til familie, venner og min kjæreste Vincent som har vært til god støtte under hele arbeidet.

UMB, Ås 14.05.10

Berit Glomstad

Sammendrag

Arbeidet i denne masteroppgaven har bestått i å utvikle en metode for bestemmelse av metylkvikksølv (MeHg) i sedimenter og biota (muskel, lever og rogn i fiskeslaget lake (*Lota lota*)). Ved å ta i bruk instrumentering som var tilgjengelig ved Institutt for plante- og miljøvitenskap var det ønskelig å utvikle en metode som var enkel og rimelig i bruk, og hadde god nøyaktighet og presisjon. Metoden måtte også ha en kvantifiseringsgrense (LOQ) som var lavere enn konsentrasjoner av MeHg som finnes i naturlige prøver av biota og sediment.

Kvikksølv (Hg) ble frigjort fra prøvematriks ved hjelp av hydrogenbromid (HBr). Separasjon av MeHg fra andre kvikksølvspecier ble oppnådd ved ekstraksjon med toluen og tilbakeekstraksjon med L-cysteinløsning. Prøvene ble oppsluttet i UltraClave, som er basert på mikrobølgeteknikk, for oksidasjon av MeHg til Hg^{2+} . Ved hjelp av tinnklorid (SnCl_2) ble Hg^{2+} redusert til Hg^0 , før deteksjon med CV-AAS.

Metodens nøyaktighet er vurdert som god etter analyse av tre sertifiserte referansematerialer, DORM-2 (fiskemuskel), DOLT-4 (fiskelever) og ERM-CC580 (estuar sediment). Metodens presisjon anses også som tilfredsstillende, da MeHg i rogn og sediment kunne bestemmes med tre gjeldende siffer. Forurensning av prøver, trolig både fra benyttede reagenser og utstyr, har for øvrig vist seg å være en utfordring ved metoden. Dette kunne sees ut fra analyse av metodeblank som gav høye og varierende måleverdier (fra 0,36 $\mu\text{g/l}$ til 0,74 $\mu\text{g/l}$). Metodens LOQ påvirkes av verdiene i blank. Foreløpig verdi for LOQ er 0,025 $\mu\text{g/l}$ ($n=3$), eller 0,00020 mg/kg ved en antatt innvekt på 1,5 g. Videre arbeid for å finne årsakene til forurensningen og en løsning på problemet, er nødvendig før en endelig LOQ for metoden kan bestemmes. Instrumentets deteksjonsgrense (LOD) på 0,0055 $\mu\text{g/l}$, som beskriver yteevnen til instrumentet, viser at forbedringer med hensyn på LOQ er mulig.

Høy LOQ og forurensning av prøver er hovedsakelig et problem ved bestemmelse av MeHg i sedimenter, hvor konsentrasjonen av MeHg ofte er lav. Bestemmelse av en endelig verdi for LOQ vil være avgjørende for om metoden kan benyttes for analyse av sedimenter. I biota ble det ikke målt verdier ned mot LOQ. Metoden virker derfor å være tilfredsstillende for bestemmelse av MeHg i fisk, som i norske innsjøer er rapportert å ha verdier mellom 0,05 mg/kg og 4 mg/kg. Videre arbeid for å løse problemene med forurensning av prøvene anbefales da metoden er enkel og rimelig i bruk og utviser gode resultater.

Abstract

The aim of this master thesis has been to develop a method for determination of methylmercury (MeHg) in sediment and biota (muscle, liver and roe from burbot (*Lota lota*)). It was deemed important that the method should show high accuracy and precision. In addition, the limit of quantification (LOQ) should be lower than the concentration values found in natural samples of sediment and biota. Through using instruments available at the Department of Plant and Environmental Sciences, it was desired that the method would be both affordable and simple to use.

Dissolution of the mercury (Hg) from sample matrices was obtained through the use of hydrobromic acid (HBr). MeHg was subsequently separated from other mercury species by extraction with toluene, followed by a back-extraction with L-cysteine. The samples were digested using UltraClave, a microwave technique. In this step MeHg is oxidized, forming Hg^{2+} . This is followed by the reduction of Hg^{2+} by tin chloride (SnCl_2) to Hg^0 and detection by cold vapour atomic absorption spectroscopy (CV-AAS).

After analysis of three certified reference materials, DORM-2 (fish muscle), DOLT-4 (fish liver) and ERM-CC580 (estuarine sediment), the accuracy of the method is considered to be high. The precision of the method is also deemed to be acceptable as MeHg in roe and sediments could be determined with three significant numbers. However, contamination of the samples, presumably stemming from both reagents and equipment, proved to be a challenge. This could be seen by occasionally high and varying values in method blanks (from 0.36 $\mu\text{g/l}$ to 0.74 $\mu\text{g/l}$) which affects the method's LOQ. The preliminary value for the LOQ is 0.025 $\mu\text{g/l}$ ($n=3$), or 0.00020 mg/kg when a sample weight of 1.5 g is assumed. Before a final LOQ is defined, further study is necessary to determine the reason for the contamination and to resolve the problem. The instrument's limit of detection (LOD) of 0.0055 $\mu\text{g/l}$ demonstrates the capacity of the instrument and shows that improvements regarding the LOQ are feasible.

A high LOQ and contamination of samples are primarily a problem for the determination of MeHg in sediments as this sample matrix often has low levels of MeHg. An evaluation of the final LOQ will be decisive for whether the method can be used for the determination of MeHg in sediments. No values close to LOQ were measured in the biota samples. Consequently, the

method seems to be satisfactory for determining MeHg in samples of fish given that reported values of MeHg in fish from Norwegian lakes are between 0.05 mg/kg and 4 mg/kg.

Continuation of the work to firmly establish and solve the problems of sample contamination is recommended as the method is affordable and user-friendly and displays promising results.

Innholdsfortegnelse

1 Innledning.....	7
2 Teori	9
2.1 Kvikksølv	9
2.1.1 Kilder.....	9
2.1.2 Kvikksølv i det akvatiske økosystemet	12
2.1.3 Bioakkumulasjon og biomagnifikasjon.....	13
2.1.4 Toksisitet av kvikksølv.....	15
2.1.4.1 Effekter i miljøet	15
2.1.4.2 Helseeffekter i mennesker	16
2.2 Generelle trinn i metoder for bestemmelse av MeHg i biota og sediment.....	19
2.2.1 Utvinning av MeHg fra prøvematriks	19
2.2.2 Oppkonsentrering	20
2.2.3 Separasjon	21
2.2.4 Deteksjon.....	23
2.2.5 Prøvetakning, konservering og lagring	24
2.3 Utviklet metode	24
2.3.1 Utvinning fra prøvematriks og ekstraksjon av MeHg.....	24
2.3.2 Oppslutning i UltraClave	25
2.3.3 Deteksjon med CV-AAS.....	27
3 Eksperimentelt.....	29
3.1 Materiell	29
3.2 Metode.....	31
3.2.1 Dobbel ekstraksjon.....	33
3.2.2 Enkel ekstraksjon	33
3.2.3 Oppslutning av prøver i UltraClave	33
3.2.4 Deteksjon.....	34
3.2.5 Vurdering av metodens yteevne	35
3.2.5.1 Nøyaktighet i metoden	35
3.2.5.2 Påvirkning fra Hg^{2+}	36
3.2.5.3 Presisjon i metoden ved bestemmelse av MeHg i prøver av fisk og sediment	36
3.2.5.4 Effektivitet av oppslutning og stabilitet av MeHg standard.....	37
3.2.6 Bestemmelse av total kvikksølv i prøver av fisk og sediment	37
4 Resultat.....	38
4.1 Enkel og dobbel ekstraksjon og nøyaktighet i metoden.....	38
4.2 Gjenfinning av MeHg-standard.....	39
4.3 Påvirkning fra Hg^{2+}	40
4.4 Effektivitet av oppslutning i UltraClave og stabilitet av MeHg-standard.....	41
4.5 Deteksjons- og kvantifiseringsgrense.....	41
4.6 Presisjon i metoden ved bestemmelse av MeHg i rogn og sediment	42
4.7 Bestemmelse av MeHg og total Hg i prøver av fisk og sediment.....	43
5 Diskusjon.....	44
5.1 Nøyaktighet i metoden	44
5.1.1 Sertifiserte referansematerialer	44
5.1.2 Gjenfinning av standard	48
5.2 Spesifisitet i metoden	49
5.3 Deteksjonsgrense og kvantifiseringsgrense	50

5.4 Presisjon i metoden ved bestemmelse av MeHg i rogn og sediment.....	53
5.5 Linearitet og måleområde.....	53
5.6 Bestemmelse av MeHg og total Hg i prøver av fisk og sediment.....	54
5.7 Stabilitet av MeHg standard.....	55
5.8 Andre hensyn ved metoden.....	55
6 Konklusjon og videre arbeid.....	57
Referanser.....	59

Vedlegg 1: Program benyttet for oppslutning i UltraClave.....	63
Vedlegg 2: Innveker og måledata for SRM DORM-2.....	64
Vedlegg 3: Innveker og måledata for SRM DOLT-4 og ERM-CC580.....	65
Vedlegg 4: Gjenfinning MeHg-standard.....	66
Vedlegg 5: Innveker og måledata, MeHg i fisk og sediment.....	67
Vedlegg 6: Innveker og måledata, total Hg i fisk og sediment.....	68
Vedlegg 7: Q-test.....	69
Vedlegg 8: Poster for NECC 2010: "Simple determination of methylmercury in sediment and biota".....	70-71

1 Innledning

Flere hendelser opp gjennom historien har satt fokus på kvikksølv (Hg) som et giftig grunnstoff som kan utgjøre en stor helserisiko for mennesker. Et av de mest alvorlige tilfellene av kvikksølvforurensning fant sted i Minamata Bay i Japan i 1953. Flere hundre mennesker døde og enda flere fikk varige nevrologiske skader etter å ha spist fisk forurenset av kvikksølv som følge av utslipp fra en kjemisk fabrikk. Et annet eksempel på forgiftning forekom i Irak i 1972, da frø behandlet med soppmiddel inneholdende kvikksølvforbindelser ble benyttet i brødbaking (Yassi *et al.* 2001). Få tilfeller av kvikksølvforgiftning er så alvorlig som disse eksemplene. Det eksisterer for øvrig en frykt for at forurensning med kvikksølv skal få alvorlige følger også i dag. I Amazonas i Brasil benyttes kvikksølv til utvinning av gull. Denne praksisen antas å stå for 80 % av kvikksølvutslippene til atmosfæren i Brasil (Uria & Sanz-Medel 1998).

Etter det nevnte tilfellet av kvikksølvforgiftning i Minamata ble det oppdaget at det alvorlige utfallet hadde sammenheng med akkumulering av monometylkvikksølv (CH_3Hg^+), (heretter kalt metylkvikksølv, MeHg), i fisk. Det ble tydelig at bestemmelse av de ulike kvikksølvspesiene var nødvendig for å oppnå en bedre forståelse av mobilitet, biotilgjengelighet, bioakkumulasjon og toksisitet. Dette medførte at det ble viktig å utvikle gode analytiske metoder for spesieringsanalyser (Harrington 2000). Spesieringsanalyser defineres av IUPAC som den analytiske aktiviteten for identifisering og kvantifisering av én eller flere individuelle kjemiske specier i en prøve (Templeton *et al.* 2000). Dette krever av metoden at enkelte former for kvikksølv kvantifiseres mens andre former av samme grunnstoff må utelukkes (Gonzalvez *et al.* 2010).

Selv om alle former for kvikksølv er giftig, er økologiske bekymringer og helseeffekter oftest knyttet til metylkvikksølv. Det er blitt utviklet mange ulike metoder for bestemmelse av denne forbindelsen, og instrumentene som benyttes har stadig blitt forbedret. Problemer ved bestemmelse av MeHg i naturlige prøver har blant annet vært knyttet til nøyaktigheten av målingene, da kunstig dannelse eller omdannelse av MeHg underveis i analyseprosessen kan forekomme (Leermakers *et al.* 2005). En annen utfordring ved enkelte metoder har vært å oppnå lave nok deteksjonsgrenser til at de kan benyttes for naturlige prøver som kan ha svært lave konsentrasjoner av MeHg (Harrington 2000). Metodene som benyttes avhenger av konsentrasjon av MeHg og av type prøve som analyseres. For faste prøver, som biota og

sediment, beskrives enkelte deler av spesieringsanalysen som vanskelig. Frigjøring av kvikksølvspeciene fra prøvematriks er et særlig kritisk trinn for denne typen prøver (Leermakers *et al.* 2005).

Målsetningen i denne oppgaven var å utvikle en metode for bestemmelse av MeHg i biota (muskel, lever og rogn fra fisk) og sediment. Det ble lagt vekt på at metoden skulle ha god nøyaktighet og presisjon, noe som er avgjørende i sporanalyser. Krav til nøyaktigheten var at målte verdier i sertifiserte referansematerialer (SRM) skulle ha god overensstemmelse med sertifiserte områder. For presisjon var det ønskelig at MeHg skulle kunne bestemmes med minst 2 signifikante siffer. Metoden måtte kunne bestemme MeHg uten betydelig interferens, og kvantifiseringsgrensen være tilfredsstillende til at metoden kunne benyttes i de aktuelle prøvematriksene. Samtidig skulle metoden være enkel og rimelig i bruk slik at den skal kunne benyttes for rutinemessige analyser ved hjelp av instrumenter som var tilgjengelig på vårt laboratorium, kalddamp atomabsorpsjonsspektroskopi (CV-AAS) og UltraClave.

2 Teori

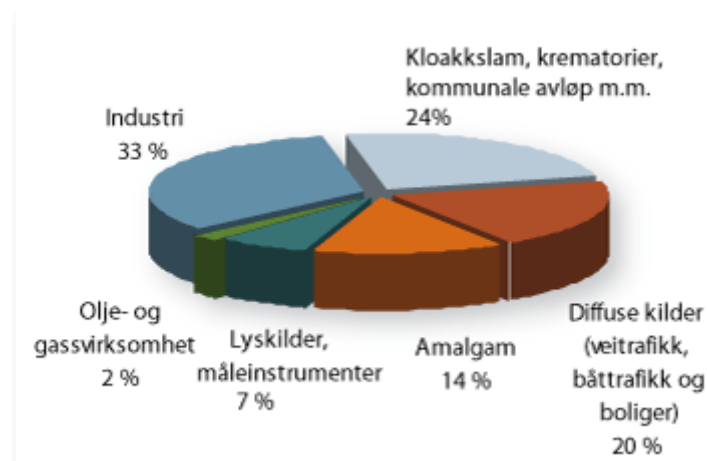
2.1 Kvikksølv

Kvikksølv, som har atomnummer 80, er et naturlig forekommende, men ikke-essensielt metall, det vil si at det ikke er funnet å ha noen biologisk relevans. Det har et smeltepunkt på $-38,9\text{ }^{\circ}\text{C}$ og er det eneste metalliske grunnstoffet som er flytende ved romtemperatur. Det er det mest flyktige metallet og fordamper lett til en fargeløs og luktfri gass (Environment Canada 2008). Kvikksølv har vært kjent i flere tusen år og har blitt benyttet innen mange ulike områder gjennom historien. Allerede for 30 000 år siden ble det brukt som fargepigment i hulemalerier sør i Europa. Siden er det blant annet blitt benyttet i kosmetikk, legemidler og til vitenskapelige formål (Environment Canada 2008; Wibetoe 2010). Kvikksølv kan være nøytralt (Hg^0), på enverdig (Hg^+) eller toverdig (Hg^{2+}) form, hvor Hg^{2+} er den mest stabile av de ladde formene. Disse kan kombineres med flere organiske og uorganiske ligander. Hg kan også reagere med andre metaller som tinn (Sn), kobber (Cu), gull (Au) og sølv (Ag) og danne såkalte amalgamer. Denne egenskapen gjør at kvikksølv har blitt brukt, og fortsatt brukes enkelte steder i verden, til ekstraksjon av gull. Utvinning og bruk av kvikksølv i industrien økte sterkt under den industrielle revolusjonen. I dag er det velkjent at kvikksølv er et giftig grunnstoff. Mange bruksområder for Hg er derfor forsvunnet, men metallet tas fortsatt i bruk både i industri og kommersielle produkter i store deler av verden (Environment Canada 2008). Klima- og forurensningsdirektoratet (Klif 2009) beskriver kvikksølv som en av de farligste miljøgiftene og har konstatert at det utgjør en fare for miljøet og menneskers helse.

2.1.1 Kilder

Kvikksølv finnes naturlig i miljøet både i luft, vann og jord. Den viktigste naturlige kilden til kvikksølv er mineralet sinober (HgS) som kan inneholde så mye som 86 % Hg. I tillegg kan Hg finnes i lave konsentrasjoner i granitt og enkelte andre bergarter i jordskorpa. Prosesser som vulkanutbrudd og forvitring av mineraler frigjør kvikksølv fra jordskorpa. Mesteparten av Hg fra naturlige kilder frigis som elementær kvikksølv damp (Hg^0). Mindre mengder kan for øvrig frigis som oksider, sulfider, halogenider, partikulært kvikksølv eller som metylkvikksølv (Environment Canada 2008). Små mengder Hg slippes også ut ved forbrenning av biomasse da Hg fra atmosfæren kan tas opp av planter (Gustin *et al.* 2008).

Utslipp fra antropogene kilder bidrar til økte nivåer av kvikksølv i naturen. Forbrenning av fossile brensler, særlig kull, industrielle prosesser, sementproduksjon og produksjon av metaller er noen av kildene som bidrar til kvikksølvforurensning (AMAP & ACAP 2005; Dittmann & Driscoll 2009; Evans *et al.* 2005). Kvikksølv er blitt brukt i flere kommersielle produkter som termometre, batterier og lyspærer på grunn av evnen til å lede elektrisitet og til å reagere presist på endringer i temperatur og trykk. Ødeleggelse eller nedbrytning av disse produktene på søppelfyllinger kan friggi Hg til miljøet, i form av gass eller i væske som lekker fra fyllingen (Environment Canada 2008). I Norge er det innført et generelt forbud mot bruk av kvikksølv i produkter, gjeldende fra 2008. Metallurgisk industri og amalgam brukt i tannfyllinger var i 2005 de største kildene til kvikksølvutslipp i Norge (figur 2.1). I tillegg var det betydelige bidrag fra krematorier, kommunale avløp, kloakkslam og sigevann fra fyllinger, samt fra vei- og båttrafikk. Langtransportert tilførsel fra andre land antas for øvrig å være mer enn dobbelt så stor enn det som kommer fra norske utslipp (Klif 2009).

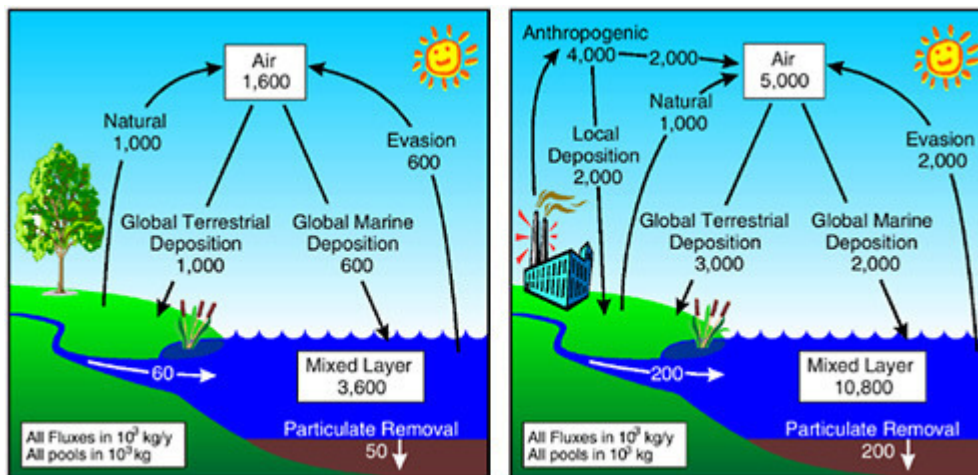


Figur 2.1: Utslipp av Hg i Norge i 2005. Total mengde er omtrent 1 tonn (Klif 2009).

Mens utslippene fra Europa og Nord-Amerika har avtatt de siste 20 årene har det vært en økning i utslipp fra Asia, særlig fra Kina. Årsaken til dette er økt industriell aktivitet og befolkningsvekst som fører til mer forbrenning av kull. Asia står nå for så mye som 50 % av de globale kvikksølvutslippene, fulgt av Afrika, Europa og Nord-Amerika (AMAP 2005; AMAP & ACAP 2005).

Hvor mye antropogene kilder har bidratt til å øke kvikksølvnivået i naturen er usikkert, da det er vanskelig å skille utslipp fra naturlige kilder fra remobilisering av antropogene

kvikksølvdeponier. Ved å studere sedimenter i innsjøer har en forøvrig funnet at det er betydelig høyere nivåer av kvikksølv i overflatesedimentene, som antas å være avsatt de siste tiårene, enn i referansesedimentene som er tatt fra dypere lag av sedimentene og som representerer det naturlige bakgrunnsnivået av kvikksølv (Fjeld *et al.* 1994; Krabbenhoft & Rickert 2008). Anslagsvis er den globale atmosfæriske avsetningen omtrent tredoblet fra preindustriell tid (Dittmann & Driscoll 2009) (figur 2.2).



Figur 2.2: Omtrentlige verdier for den globale kvikksølvsyklusen i dag og i preindustriell tid (Norling *et al.* 2004).

Frigjort kvikksølv, fra naturlige eller antropogene kilder, kan ha lang oppholdstid i atmosfæren, avhengig av tilstandsformen. Hg i atmosfæren finnes som gass, hovedsakelig som Hg⁰, eller bundet til partikler. Partikulært Hg vil ofte felles ut nær utslippskilden, mens Hg⁰ har lang oppholdstid i atmosfæren, opptil halvannet år. Denne kan derfor transporteres over store avstander. Hg⁰ kan oksideres til Hg²⁺ som så avsettes sammen med nedbør eller adsorbent til små partikler i terrestriske eller akvatiske økosystem. Transporten av Hg i atmosfæren gjør utslipp av Hg til et globalt problem som påvirker områder fjernt fra kildene til forurensning. Blant annet er det funnet høye konsentrasjoner av kvikksølv i arktiske områder (Environment Canada 2008; Klif 2009). Langtransportert atmosfærisk avsetning er den viktigste årsaken til tilførsel av kvikksølv i de fleste akvatiske økosystem, med unntak av områder med utslippskilder i nærmiljøet (Krabbenhoft & Rickert 2008).

2.1.2 Kvikksølv i det akvatiske økosystemet

I vann finnes kvikksølv i tre ulike oksidasjonstilstander, Hg^0 , Hg^+ og Hg^{2+} . Ladningen avhenger blant annet av redoksforholdene i systemet (vanLoon & Duffy 2005). Hg^+ finnes i liten grad da den kun er stabil som Hg_2^{2+} og lett omdannes til Hg^0 eller Hg^{2+} . Under svakt reduserende eller oksiderende forhold er Hg^0 forholdsvis stabil. Elementært kvikksølv tapes imidlertid lett til atmosfæren ved fordampning og spiller på den måten en viktig rolle i den globale kvikksølvsyklusen. Under aerobe forhold vil Hg^{2+} være den dominerende formen i vann. Denne har sterk affinitet for flere uorganiske og organiske ligander og har en tendens til å danne forbindelser med kloridioner og hydroksylgrupper. Komplekser med løst organisk materiale vil ofte være dominerende i ferskvann, men påvirkes av redoksforhold, pH og tilstedeværelse av sulfid som kan utkonkurrere organiske materialer (Ullrich *et al.* 2001; vanLoon & Duffy 2005).

Ved lave pH-verdier og reduserende forhold kan kvikksølv felles ut som kvikksølvulfid (HgS). Dette utgjør en viktig del av det totale kvikksølvinnholdet i sedimenter. Kvikksølv finnes også forbundet med organisk materiale eller uorganiske partikler i sedimenter. Sedimenter er det viktigste lageret for kvikksølv i ferskvannssystemer (Ullrich *et al.* 2001; vanLoon & Duffy 2005).

Metylkvikksølv (MeHg) finnes i mye lavere konsentrasjon i ferskvann enn Hg^{2+} men utgjør allikevel en svært viktig form for kvikksølv i akvatiske økosystem. MeHg dannes ved at karbon i en metylgruppe bindes til kvikksølv, hovedsakelig ved mikrobielle prosesser, selv om abiotisk metylering også er påvist (Fjeld & Rognerud 1993). Metylering kan foregå både i vann og sedimenter og under aerobe og anaerobe forhold (Ullrich *et al.* 2001).

Metyleringshastigheten er for øvrig størst ved anaerobe forhold og i grensesjiktet mellom sedimenter og vann, hvor frigjøring av metyalkvikksølv fra sediment til vann favoriseres av korte diffusjonsavstander (Fjeld & Rognerud 1993). Partikulært materiale som slår seg til ro på bunnen av innsjøen er en viktig kilde til å bringe kvikksølv til grensesjiktet mellom vann og sedimenter (Ullrich *et al.* 2001). Metylkvikksølv kan danne komplekser med flere ligander som for eksempel klor, som dominerer i saltvann, og svovel. Metylkvikksølvhydroksid (CH_3HgOH) er den mest stabile formen i ferskvann. I tillegg utgjør forbindelser med løst organisk materiale en viktig del (Ullrich *et al.* 2001; vanLoon & Duffy 2005).

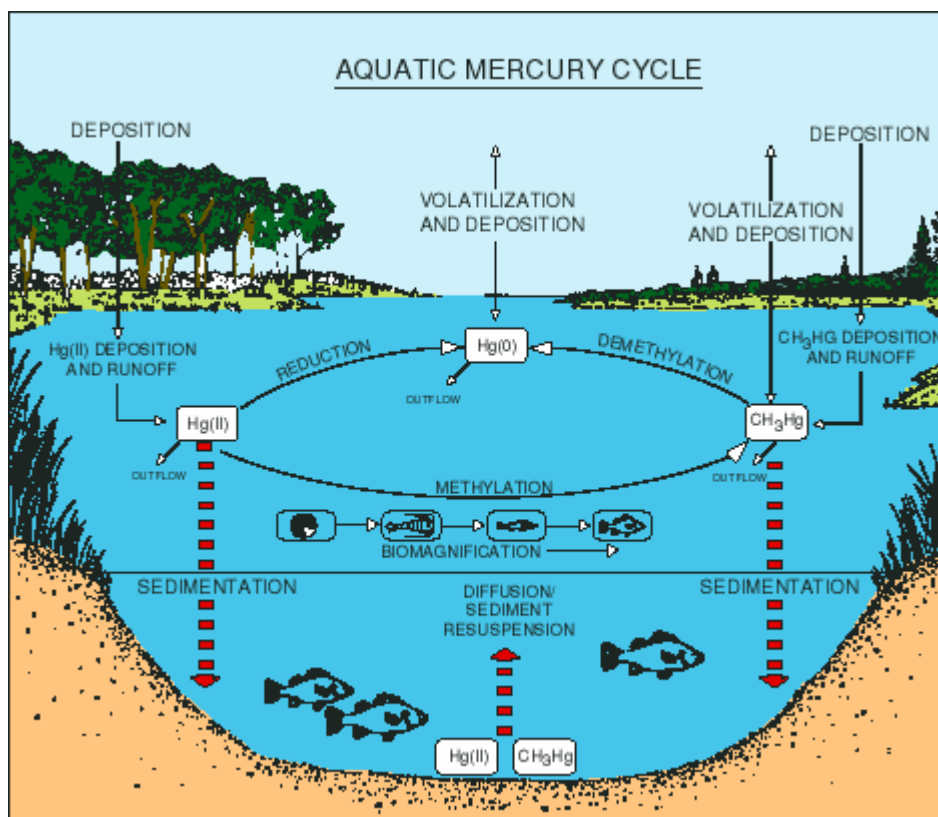
Metylkvikksølv er forholdsvis stabilt i vann, men demetylering kan foregå både i vann og sedimenter. Dette skjer ved mikrobielle prosesser og ved nedbrytning grunnet UV-stråling fra sollys. Dette bidrar til å holde konsentrasjonen av MeHg i vann lav i forhold til andelen av Hg^{2+} . Totale kvikksølvkonsentrasjoner i vann er rapportert å variere mellom 0,2 til 100 ng/l, mens innholdet av MeHg ligger på rundt 0,05 ng/l (Uria & Sanz-Medel 1998). Grenseverdien for total Hg i drikkevann er satt til 0,5 µg/l (Folkehelseinstituttet 2009). Videre metylering av MeHg til dimetylkvikksølv (DMeHg) kan forekomme, først og fremst i nøytrale eller alkaliene miljø. DMeHg er en flyktig forbindelse som kan unnslippe til atmosfæren. Der brytes den ned til Hg(II) ved fotolyse og felles ut med nedbør (Ullrich *et al.* 2001; vanLoon & Duffy 2005). Også andre kvikksølvforbindelser, som blant annet etylkvikksølv (EtHg), er påvist å kunne finnes i jord og sedimenter. EtHg forekommer imidlertid kun i små konsentrasjoner i miljøet (Issaro *et al.* 2009).

2.1.3 Bioakkumulasjon og biomagnifikasjon

Ved hjelp av redoksreaksjoner, metylering- og demetyleringsreaksjoner transformeres Hg fra en tilstandsform til en annen i miljøet. Tilstandsformen er avgjørende for toksisitet og tilgjengelighet for opptak av Hg i organismer. I tillegg er det avgjørende for kvikksølvs evne til å bioakkumulere i organismer (Watras *et al.* 1998). Bioakkumulasjon er avhengig av opptakshastigheten av forbindelsen i en organisme gjennom mat eller ved absorpsjon, i forhold til hastigheten organismen skiller ut eller bryter ned forbindelsen (vanLoon & Duffy 2005). Metylkvikksølv tas lettere opp i organismer enn uorganisk kvikksølv og bioakkumuleres i større grad. Akkumulasjon av metylkvikksølv i levende organismer forklares med at forbindelsen er fettløselig, har proteinbindende egenskaper og høy affinitet for tiolgrupper (AMAP & ACAP 2005; Ullrich *et al.* 2001; Uria & Sanz-Medel 1998). Kvikksølv oppkonsentreres også i sedimenter, og finnes derfor ofte i høyere konsentrasjoner i sedimenter enn i vann. Denne oppkonsentreringen ser ut til å være på grunn av binding til sulfidgrupper i sedimentene (Uria & Sanz-Medel 1998).

Kvikksølv har vist seg å øke i konsentrasjon med økende trofisk nivå, noe som beskrives som biomagnifikasjon. Dette innebærer at organismer som befinner seg lengst opp i næringskjeden ofte har de høyeste verdiene av kvikksølv. Biomagnifikasjon oppstår ved trofisk transport når kvikksølv absorberes fra karbonkilder, og respirasjonen av karbon skjer raskere enn utrensningen av kvikksølv (Evans *et al.* 2005; Watras *et al.* 1998). Trofisk nivå hos fisk kan

bestemmes ved å studere forholdet mellom isotoper av nitrogen ($N^{15}/N^{14} = \delta^{15}N$) (Sharma *et al.* 2008). Høye verdier av $\delta^{15}N$ indikerer høyt trofisk nivå og er forbundet med de høyeste verdiene av kvikksølv (Evans *et al.* 2005). Fisk metylerer ikke kvikksølv selv, men får det inn hovedsakelig gjennom mat. Opptak av kvikksølv på lave trofiske nivå er derfor svært avgjørende for konsentrasjonen i fisk. Metylkvikksølv tas opp fra vann av seston og føres så videre i den akvatiske næringskjeden ved opptak i zooplankton og deretter fisk (Watras *et al.* 1998). I tillegg til trofisk nivå viser kvikksølvkonsentrasjonen innad i et fiskeslag seg å øke med økt alder og størrelse av fisken (Evans *et al.* 2005; Fjeld & Rognerud 1993). Det er vist at metylkvikksølv utgjør den største andelen av det totale innholdet av kvikksølv i fisk. Opptil 99 % av kvikksølvet i fisk er rapportert å være metylkvikksølv (Dittmann & Driscoll 2009; Fjeld & Rognerud 1993; Ullrich *et al.* 2001). Som tidligere nevnt er denne andelen mye lavere i vann. Den store forskjellen mellom konsentrasjonen av MeHg i vann og fisk understreker betydningen av de biomagnifiserende egenskapene til kvikksølv, og viser at spesieringsanalyser er nødvendig for å oppnå god forståelse av distribusjon av kvikksølv i det akvatiske økosystemet. Den akvatiske kvikksølvsyklusen er vist i figur 2.3.



Figur 2.3: Den akvatiske kvikksølvsyklusen. Uorganisk kvikksølv metyleres i vann og sedimenter. Metylkvikksølv tas opp i små organismer i vannet og videreføres så til høyere organismer gjennom mat. På den måten biomagnifiseres metylkvikksølv oppover næringskjeden (Krabbenhoft & Rickert 2008).

Ulike faktorer i miljøet, som mengde løst organisk karbon (DOC) som er til stede, pH og temperatur påvirker distribusjon og transformasjon av kvikksølv mellom ulike tilstandsformer i det akvatiske økosystemet (Ullrich *et al.* 2001). Høyt innhold av DOC øker tilførselen av Hg fra nedslagsfelt og våtmark til innsjøer og elver på grunn av at Hg bindes til det organiske materialet og fraktes med dette ut i vannet (Fjeld & Rognerud 1993). Større tilgang på uorganisk kvikksølv og karbon som følge av transport fra nedslagsfelt fører til økt metyleringshastighet. I tillegg kan organisk materiale fungere som vekstsubstrat for metylerende bakterier. Metylering av uorganisk kvikksølv er den viktigste kilden til metylkvikksølv i innsjøer. Ved store konsentrasjoner av DOC i vann kan for øvrig metylering reduseres ved at Hg^{2+} gjøres utilgjengelig for metylering på grunn av binding til DOC, og på grunn av at lysinntregning og dermed fotolytisk nedbrytning av MeHg reduseres (Dittmann & Driscoll 2009). Metylering og frigjøring av metylkvikksølv fra sedimenter ser ut til og fremmes av sure forhold. Ved en økning i tilgangen på metylkvikksølv økes også opptak i organismer på lave trofiske nivå. Dette gjenspeiles i konsentrasjoner i organismer på høyere trofisk nivå og kan være noe av årsaken til at det ofte er funnet høyere konsentrasjoner av kvikksølv i fisk fra innsjøer med lav pH (Dittmann & Driscoll 2009; Ullrich *et al.* 2001; Watras *et al.* 1998). Høy temperatur har vist seg å øke metyleringshastigheten og frigjøringen av metylkvikksølv fra sedimenter, trolig på grunn av at det har en positiv effekt på mikrobiell aktivitet (Evans *et al.* 2005; Ullrich *et al.* 2001).

2.1.4 Toksisitet av kvikksølv

2.1.4.1 Effekter i miljøet

Kvikksølv er giftig for alle levende organismer og kan være skadelig selv i små konsentrasjoner (AMAP & ACAP 2005; Environment Canada 2008; Klif 2009). Evnen til å bioakkumulere og biomagnifisere oppover i næringskjeden skaper bekymring, da dette innebærer at det kan finnes høye konsentrasjoner av kvikksølv i fisk selv fra vann med lave kvikksølvkonsentrasjoner (Evans *et al.* 2005). Faren for kvikksølvforgiftning øker i områder hvor den atmosfæriske avsetningen er høy og forholdene som fremmer metylering er tilstede. Effekter av kvikksølv i dyr avhenger av tid og grad av eksponering, og vil variere mellom ulike arter da enkelte arter er mer sensitive for kvikksølveksponering enn andre (Scheulhammer *et al.* 2007). Fisk som gjedde, abbor og ørret i ferskvann er eksempler på fiskeslag som befinner seg høyt opp i næringskjeden og har stor sannsynlighet for å

akkumulere høye konsentrasjoner av kvikksølv. Effektene av kvikksølv på fisk i naturlige økosystem er forholdsvis lite kjent, men fisk virker å kunne tolerere nokså høye konsentrasjoner av kvikksølv i kroppen (Environment Canada 2008). I områder med svært høy forurensning av kvikksølv er det for øvrig observert en effekt på vekst og overlevelse. I laboratorieforsøk er kvikksølv vist å påvirke blant annet adferd, produksjon av kjønnshormoner og reproduksjon. Kvikksølv kan overføres til fiskefoster fra moren og føre til økt dødelighet blant foster (Scheulhammer *et al.* 2007).

Flere fugler og pattedyr har fisk som en viktig del av kostholdet og kan derfor bli utsatt for kvikksølvforgiftning. Utsatte fuglearter er havørn, fiskeørn, lom og isfugl, mens for pattedyr er mink, oter, isbjørn og sel blant dyr i faresonen (Scheulhammer *et al.* 2007). I studier utført på fugl og pattedyr er kvikksølveksponering funnet å påvirke adferd og reproduksjon, samt å ha nevrologiske effekter (Environment Canada 2008). Ved høye konsentrasjoner har det ført til økt dødelighet hos fugl (Scheulhammer *et al.* 2007).

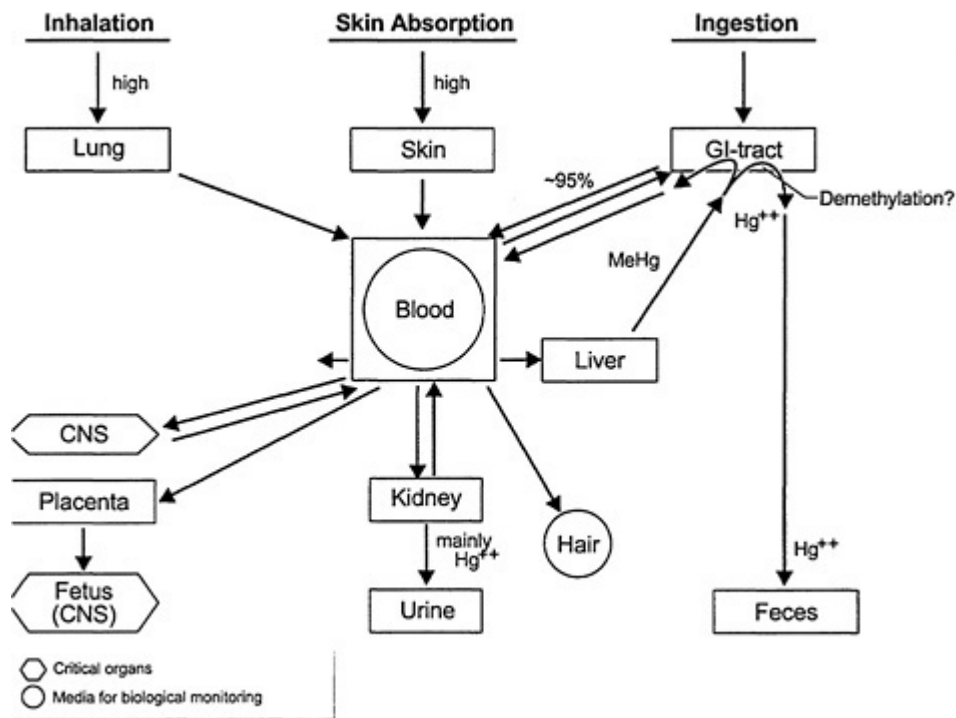
2.1.4.2 Helseeffekter i mennesker

Mennesker kan eksponeres for ulike former for kvikksølv via forskjellige eksponeringsveier. Inhalert elementært kvikksølv fra lufta og amalgam i tannfyllinger er viktige kilder. I tillegg er enkelte yrkesgrupper utsatt, som for eksempel tannleger og arbeidere i smeltverk (Yassi *et al.* 2001). Metylkvikksølv fra forurenset fisk utgjør for øvrig i de fleste tilfeller den største faren for mennesker. Fisk som føde er forbundet med mange positive helseeffekter i mennesker, og er en verdifull næringskilde. I enkelte samfunn utgjør fisk en stor del av kostholdet. Mennesker fra slike samfunn er særlig utsatt for kvikksølvforurensning dersom innholdet av kvikksølv i fisk og sjømat er høy. Overvåkning over konsentrasjonen av MeHg i fisk, samt informasjon om dette, er derfor av stor betydning for menneskers helse.

Omtrent all metylkvikksølv som kommer inn i kroppen gjennom mat, blir absorbert. Selv om mat er ansett som den viktigste kilden til metylkvikksølv i mennesker kan noe også komme fra inhalasjon eller absorpsjon gjennom huden som vist i figur 2.4. Kvikksølvet tas opp i blodet og går inn i de røde blodcellene. Med blodomløpet blir det transportert til ulike organer i kroppen. Den største andelen av metylkvikksølv akkumuleres i nyrene. Metylkvikksølv kan passere gjennom blod-/hjernebarrieren og dermed gjøre skade på sentralnervesystemet. Hjernen (sentralnervesystemet) akkumulerer om lag 10 % av kvikksølvet i kroppen og er det

mest kritiske organet når det gjelder kvikksølvforgiftning. Kvikksølv vil også kunne akkumuleres i lever og enkelte andre organer i kroppen (Committee on the Toxicological Effects of Methylmercury 2000; Environment Canada 2008; Mergler et al. 2007).

Metylkvikksølv er en nervegift som blant annet kan føre til blokkering av bindingssteder på enzymer, innvirke på proteinsyntesen og hindre binding av tymidin i DNA (Uria & Sanz-Medel 1998).



Figur 2.4: Opptak, distribusjon og ekskresjon av metyalkvikksølv i kroppen. Sentralnervesystemet (CNS), spesielt hjernen, og foster er særlig utsatt ved kvikksølvforgiftning (Committee on the Toxicological Effects of Methylmercury 2000).

Halveringstiden for kvikksølv i menneskekroppen er på omtrent 70 dager. Kroppen har evne til å skille ut kvikksølv, men akkumulering oppstår når opptak skjer raskere enn utskillingen. Kvikksølv skilles ut av kroppen hovedsakelig som Hg^{2+} gjennom urin og avføring.

Metylkvikksølv inkorporeres i hår hvor det er forholdsvis stabilt. Hår kan derfor brukes til å overvåke eksponering for kvikksølv over tid. Også blod brukes ofte i biologisk overvåkning av metyalkvikksølv (Committee on the Toxicological Effects of Methylmercury 2000; Environment Canada 2008; Krabbenhoft & Rickert 2008). Urin viser eksponering kun for uorganisk og metallisk kvikksølv (Folkehelseinstituttet 2009).

Symptomene på forgiftning fra metylkvikksølv varierer med grad av eksponering. Kjente symptomer er prikking i huden, nummenhet, nedsatt koordinasjonsevne og sjelving. Det kan også påvirke syn, hørsel og tale, og ved høye konsentrasjoner gi utslag i unormal oppførsel, påvirke intellektet, føre til cerebral lammelse og i verste fall koma og død (AMAP & ACAP 2005; Environment Canada 2008). Verdens helseorganisasjon (WHO) har estimert at 5 % av voksne mennesker med en kvikksølvkonsentrasjon i blodet på 200 µg/L, vil oppleve neurologiske effekter (Mergler *et al.* 2007).

Mye av bekymringen knyttet til kvikksølveksponering gjelder overføring av kvikksølv fra mor til foster gjennom morkaka. Fosterets hjerne er mer sensitiv til kvikksølveksponering enn en voksen hjerne, og det kan forekomme skader på fosteret ved konsentrasjoner som ikke påvirker moren (AMAP & ACAP 2005; Environment Canada 2008). Også spedbarn kan få overført kvikksølv fra mor via morsmelk. Morsmelk inneholder en mindre andel metylkvikksølv i forhold til det som er i morens blod, men mer av uorganisk kvikksølv. Dette, i tillegg til at det er en forholdsvis hurtig vekst hos spedbarn som fører til fortykning, gjør at nivået av metylkvikksølv ofte reduseres de første månedene etter fødselen (Mergler *et al.* 2007). Eksponering av metylkvikksølv til foster og spedbarn er forbundet med forsinket mental og motorisk utvikling hos barnet. Blant annet påvirker det læreevne og utvikling av språk, hørsel og koordinasjon. Det er også knyttet til adferdsproblemer hos barn. Barn som er utsatt for metylkvikksølv før fødsel har vist seg å gjøre det dårligere på tester angående språk, hukommelse, oppmerksomhet og motorikk (AMAP & ACAP 2005; Environment Canada 2008; Mergler *et al.* 2007).

De alvorlige effektene metylkvikksølv har på menneskers helse har ført til at det er innført kostholdsrad for inntak av fisk. Disse rådene, innført av mattilsynet i Norge, sier at gravide og ammende bør unngå å spise gjedde og abbor som er over 25 cm, og ørret og røye på mer enn en kilo. Andre bør ikke spise disse fiskeslagene mer enn en gang i måneden (Klif 2009). Grenseverdien for kvikksølv i fisk i Norge og EU er 0,5 mg/kg, med unntak av for spesifikke fiskeslag som blant annet gjedde, kveite, uer og hai, som har en grense på 1 mg/kg. Provisorisk tolerabelt ukentlig inntak (PTWI) er satt til 1,6 µg metylkvikksølv per kg kroppsvekt (Folkehelseinstituttet 2009).

2.2 Generelle trinn i metoder for bestemmelse av MeHg i biota og sediment

Som tidligere nevnt har forskjellige kvikksølvspecier ulik biotilgjengelighet og toksisitet. Dette gjør det nødvendig å ha gode metoder for bestemmelse av individuelle kvikksølvspecier, og ikke kun totalt kvikksølvinnhold i ulike prøvematrikser. Mange spesieringsanalyser av kvikksølv i sedimenter og biota fokuserer på bestemmelse av MeHg i tillegg til total kvikksølv. Det er også utviklet metoder for bestemmelse av andre kvikksølvforbindelser som EtHg eller elementært Hg, eller definerte grupper av kvikksølv som organisk bundet Hg. Det er for øvrig mangel på referansematerialer for disse speciene eller gruppene av kvikksølv (Issaro *et al.* 2009).

For bestemmelse av MeHg finnes det flere ulike metoder. Metodene består ofte av en kombinasjon av analytiske trinn hvor MeHg først frigjøres fra prøvematriksen, deretter separeres fra andre kvikksølvspecier før det detekteres med en valgt deteksjonsteknikk. Et oppkonsentreringstrinn kan benyttes dersom konsentrasjonen i prøvematerialet er lav (Uria & Sanz-Medel 1998). Dette kapittelet gir en kort oversikt over teknikker som tas i bruk i de ulike trinnene for bestemmelse av MeHg i sedimenter og biota. En nærmere beskrivelse av teknikkene som benyttes i denne oppgaven blir gitt i kapittel 2.3.

2.2.1 Utvinning av MeHg fra prøvematriks

Utvinning av MeHg fra prøvematriksen blir ofte sett på som det vanskeligste trinnet i spesieringsanalyser av kvikksølv i faste prøvematrikser som biota og sediment. Utfordringene i dette trinnet ligger i å oppnå en fullstendig frigjøring av MeHg og samtidig unngå endring i spesieringen ved at MeHg omdannes til andre kvikksølvforbindelser, eller at det dannes kunstig MeHg (Leermakers *et al.* 2005; Margetinova *et al.* 2008). Bindingene mellom kvikksølv og prøvematriks, som for eksempel bindinger til leirmineraler, humusforbindelser og sulfider, må brytes, samtidig som bindingen til metylgruppen opprettholdes. Den første metoden for frigjøring av kvikksølv fra matriks som fokuserte på bestemmelse av individuelle kvikksølvspecier i stedet for totalt innhold, ble utviklet av Westöö i 1966. Denne metoden tok i bruk konsentrert HCl for frigjøring av kvikksølvspeciene før ekstraksjon av kvikksølvkloridet i benzen. Kvikksølvspeciene ble så overført til vandig fase ved omdannelse til hydroksider ved hjelp av ammoniumhydroksid mettet med natriumsulfat (Harrington 2000). Siden den gang har flere modifikasjoner av denne metoden blitt utviklet. Benzen har til stor grad blitt erstattet med forbindelser som toluen ($C_6H_5CH_3$) eller diklormetan (CH_2Cl_2) på

grunn av de skadelige egenskapene til benzen (Issaro *et al.* 2009), mens cystein ($C_3H_7NO_2S$), tiosulfat ($S_2O_3^{2-}$) eller andre forbindelser med tiolgrupper, nå er mer vanlig for tilbakeekstraksjon til vandig fase (Harrington 2000). Tilsetning av ulike forbindelser i syretrippet har blitt benyttet for å øke effektiviteten av utvinningen. Margetinova *et al.* (2008) undersøkte effektiviteten for frigjøring av kvikksølv i zoobenthos og sedimenter ved tilsetning av forbindelser som kobberklorid ($CuCl_2$), kaliumbromid (KBr), natriumklorid (NaCl), sitronsyre ($C_6H_8O_7$) eller metanol (CH_3OH) til 3 M HCl. De fant at blandinger av HCl med flere av disse forbindelsene gav økt effektivitet i forhold til kun bruk av 3 M HCl. Økning av konsentrasjonen fra 3 M til 6 M HCl gav for øvrig god effektivitet uten tilsetning av andre forbindelser. I tillegg viste de at økt tid for behandling av prøven med syre, og til en viss grad økt temperatur, hadde en positiv effekt på utvinningsgraden.

De fleste teknikkene for utvinning av MeHg er basert på metoden utviklet av Westöö og modifikasjoner av denne. Det finnes for øvrig andre teknikker som også er i bruk. Alkalin utvinning av kvikksølv med bruk av sterke eller svake baser har blant annet vist seg å være effektiv for fiskeprøver (Harrington 2000). Behandling med baser som tetrametylammoniumhydroksid (TMAH) og kaliumhydroksid (KOH) sammen med metanol har gitt god effektivitet for biologiske prøver, men har ikke vært vellykket for sedimenter (Leermakers *et al.* 2005). Alkaliene løsninger er vanskeligere å få på ren form sammenlignet med sure løsninger. I tillegg har tilstedeværelse av store mengder organisk materiale, sulfider og jernioner ved bruk av denne metoden medført problemer ved senere trinn i analyseprosessen (Uria & Sanz-Medel 1998). En annen alternativ teknikk som har blitt benyttet for sediment- og jordprøver er destillasjon (Harrington 2000). Her dannes det flyktige forbindelser av kvikksølvspesiene som samles opp på lukkede beholdere. Teknikken har vist seg å være effektiv, og bruk av organiske løsemidler unngås, men den er funnet å være den metoden som genererer kunstig MeHg i størst grad (Uria & Sanz-Medel 1998). Mikrobølgeteknikk har blitt benyttet for å øke hastigheten og effektiviteten av utvinningen (Harrington 2000).

2.2.2 Oppkonsentrering

Da MeHg finnes i lave konsentrasjoner i naturlige prøver, særlig i sedimenter og i vann, kan det kreves et oppkonsentreringstrinn før deteksjon. Væskevæske-ekstraksjon etter syrebehandling av både biota, sediment og vann har blitt benyttet for oppkonsentrering. I fast

fase ekstraksjon (SPE) eller fast fase mikroekstraksjon (SPME), kan kompleksagenter som sulfhydril bomullsfibre (SCF), ditiokarbamater ($C_4H_6N_2Na_2S_4$) eller 2-mecaptoetanol (C_2H_6OS) benyttes for å holde tilbake kvikksølvspesiene på kolonner for oppkonsentrering. Disse frigjøres deretter med syre (Margetinova *et al.* 2008; Uria & Sanz-Medel 1998). En av de mest vellykkede metodene for oppkonsentrering er dannelse av derivater av kvikksølvspesiene ved bruk av natriumborhydrid ($NaBH_4$) eller natriumboretyl $NaB(C_2H_5)_4$. Derivatene samles opp på kolonner ved lav temperatur og frigjøres så ved oppvarming av kolonnene (Uria & Sanz-Medel 1998).

2.2.3 Separasjon

Kromatografi blir ofte sett på som den mest effektive metoden for separasjon av ulike kvikksølvspesier, og kromatografiske separasjoner koblet til sensitive atomdetektorer har vært de mest populære tilnærmingene i spesieringsanalyser når det gjelder kvikksølv (Uria & Sanz-Medel 1998). Gasskromatografi (GC) var tidligere den mest brukte separasjonsteknikken for bestemmelse av ulike kvikksølvspesier (Harrington 2000). Det er en god teknikk for separasjon av flyktige spesier eller når det enkelt kan dannes flyktige derivater. Prøveinnføring til detektoren er enkel og effektiv da prøver på gassform ofte foretrekkes i atomdetektorer, noe som gir god sensitivitet (Uria & Sanz-Medel 1998). At GC kun kan benyttes for flyktige spesier begrenser for øvrig bruk av denne teknikken (Gonzalvez *et al.* 2010). Det har også vært et problem med lav reproduserbarhet ved bruk av GC som separasjonsteknikk (Harrington 2000). Interaksjoner mellom kvikksølvspesiene og pakningsmaterialene i kolonnen har ført til problemer som endret retensjonstid, forminket topphøyde eller areal og minneeffekter. Passivisering av pakningsmaterialet med $HgCl_2$ har blitt benyttet for å unngå disse effektene. En annen metode for å forsøke å løse disse problemene har vært derivatisering av kvikksølvforbindelsene før separasjon i kolonna, slik at et upolart pakningsmiddel kan benyttes for separasjon av de upolare derivatene (Leermakers *et al.* 2005).

En alternativ separasjonsteknikk til GC er væskechromatografi, fortrinnsvis "high performance liquid chromatography" (HPLC). Den største utfordringen ved denne teknikken har vært lav sensitivitet som følge av dårlig effektivitet for prøveinnføringen til detektorene av de flytende prøvene ved bruk av forstøvere (Uria & Sanz-Medel 1998). I takt med utviklingen av mer sensitive detektorer har imidlertid bruken av HPLC økt mye. De fleste metodene med HPLC

benytter omvendtfase-separasjon med en silikabundet stasjonærfase og mobilfase inneholdende en organisk forbindelse, en kelaterende eller ionepardannende forbindelse og en pH-buffer. Den viktigste fordel med væskekromatografi over andre teknikker er muligheten til å separere mange ulike organisk kvikksølvforbindelser (Leermakers *et al.* 2005).

Dersom det kun skal separeres ut en eller to kvikksølvspecier, kan ikke-kromatografiske teknikker være et godt alternativ, da disse kan ha god sensitivitet samtidig som de ofte er raskere og rimeligere i bruk enn kromatografiske teknikker. Mens ikke-kromatografiske teknikker var lite brukt tidligere, har dette i dag blitt en akseptert teknikk i spesieringsanalyser for bestemmelse av flere grunnstoffer. Den økte interessen for denne type separasjoner kan sees på antall publiserte artikler som har økt fra under 20 publikasjoner i 1977, til rundt 400 publiserte artikler i dag (Gonzalvez *et al.* 2010). Ikke-kromatografiske separasjoner kan utføres ved bruk av utvalgte kjemiske reagenser. Ved enkel ekstraksjon benyttes en reagens, mens det i sekvensiell ekstraksjon benyttes flere reagenser som velges ut i fra prøvematriksen som skal analyseres, og hvilke kvikksølvspecier som er av interesse. Enkle ekstraksjoner benyttes for bestemmelse av kun en kvikksølvspecie. Det antas at hver kvikksølvspecie har en egen reaktivitet og at den ønskede specien derfor kan ekstraheres selektivt ved hjelp av kjemiske spesieringsanalyser. Mangel på selektive reagenser medfører for øvrig en usikkerhet som må tas hensyn til ved tolking av resultatet. Ved bruk av sekvensielle ekstraksjoner separeres definerte grupper av kvikksølvspecier, for eksempel vannløselig Hg, syreløselig Hg eller organisk bundet Hg, basert på deres løselighet i et løsemiddel. Også her er ikke-selektivitet hos reagensene et problem, samt at kvikksølv kan reabsorberes og redistribueres under ekstraksjonene. Både enkle og sekvensielle ekstraksjoner har for øvrig vist seg å være sensitive nok til å kunne benyttes i naturlige prøver (Issaro *et al.* 2009). En mye benyttet metode er selektiv væskevæske-ekstraksjon hvor den ønskede specien ekstraheres i et organisk løsemiddel og dermed separeres fra de andre kvikksølvspeciene. Dette etterfølges ofte av et tilbakeekstraksjonstrinn (Gonzalvez *et al.* 2010). En annen framgangsmåte er å benytte kvikksølvspecienes ulike evne til og reduseres av reduksjonsmidler. Et eksempel er bruk av tinnklorid (SnCl_2) som reduserer Hg^{2+} til Hg^0 . Hg^{2+} kan dermed detekteres med CV-AAS mens MeHg, som ikke lar seg redusere av SnCl_2 , ikke blir detektert. Etter bestemmelse av uorganisk Hg har blant annet foto-oksidasjon blitt benyttet for oksidasjon av organiske kvikksølvspecier til Hg^{2+} slik at total kvikksølv kan detekteres. Dette gjør det mulig å bestemme MeHg indirekte ved subtraksjon av den organiske delen. Bruk av mikroorganismer for å separere MeHg fra uorganisk kvikksølv har også blitt undersøkt. MeHg har vist seg å

bindes til en type gjærsoppceller (*Saccharomyces cerevisiae*) etter inkubasjon ved 37 °C i 30 min, mens Hg²⁺ ikke viste noen affinitet for disse cellene (Uria & Sanz-Medel 1998).

2.2.4 Deteksjon

Hybridteknikker hvor kromatografiske metoder kobles til en detektor, er som tidligere nevnt ofte ansett for å være de beste teknikkene for spesieringsanalyser. Uria & Sanz-Medel (1998) har listet opp egenskaper for den ideelle detektoren brukt til denne typen teknikker.

Detektoren bør være sensitiv og spesifikk for kvikksølv, ha evne til å håndtere gasser og væsker ettersom GC eller HPLC benyttes, ha on-line kobling til separasjonskolonnen og et bredt lineært måleområde. Det bør også være en multigrunnstoff og multiisotopisk teknikk. De største utfordringene har vært at detektorene ikke er spesifikke for kvikksølv og at sensitiviteten ikke er god nok for å detektere kvikksølv i naturlige prøver. Den vanligste metoden benyttet i spesieringsanalyser for bestemmelse av kvikksølv var tidligere gasskromatografi elektroninnfangningsdeteksjon (GC-ECD). Denne detektoren er ikke selektiv for kvikksølv, noe som krever rensing av ekstraktet før deteksjon. Gasskromatografi mikrobølgeindusert atomemisjonspektroskopi (GC-MIP-AES) erstattet derfor til dels GC-ECD på grunn av detektorens spesifisitet for kvikksølv (Uria & Sanz-Medel 1998). I senere tid har induktivt koblet plasma massespektrometri (ICP-MS) koblet til kromatografiske separasjonsteknikker blitt en stadig mer utbredt metode ettersom tilgjengeligheten av dette instrumentet har økt (Shade & Hudson 2005). ICP-MS er den detektoren som kommer nærmest de ideelle egenskapene satt opp av Uria & Sanz-Medel ved at den er sensitiv, selektiv og kan måle ulike isotoper. I tillegg oppnås god nøyaktighet og presisjon (Leermakers *et al.* 2005). Ulempen med ICP-MS er at instrumentet er dyrt samt at det forbrukes store mengder av plasmagass, særlig når det er koblet til kromatografiske teknikker. Dette gjør metoden lite egnet for rutinemessige analyser. AAS er kjent for å være en robust og enkel analytisk teknikk som er lite følsom for matriksinterferenser, og som er tilgjengelig i mange laboratorier. Flamme-AAS er en av de eldste detektorene som er blitt benyttet i spesieringsanalyser. Den kan enkelt kobles til flow-injection systemer (FI) og er billig i drift. Ulempen er imidlertid at sensitiviteten ofte ikke er god nok. Elektrotermisk fordampning (ET-AAS) har bedre sensitivitet, men er igjen vanskelig å benytte i kontinuerlige analyser (Gonzalvez *et al.* 2010). Ved bruk av kalddamp (CV-AAS) kan det oppnås god sensitivitet. Dette gjør at AAS har vært, og fortsatt er, blant de mest populære deteksjonsteknikkene for

kvikksølv. Kalddamp kan også benyttes sammen med atomfluorescensspektroskopi (AFS), en annen sensitiv og mye brukt metode (Morita *et al.* 1998; Uria & Sanz-Medel 1998).

2.2.5 Prøvetakning, konservering og lagring

I tillegg til de nevnte analytiske trinnene er prøvetakning, konservering og lagring av prøven før analyseprosessen viktige trinn i spesieringsanalyser. Bevaring av MeHg i prøver kan være vanskelig da forbindelsen kan brytes ned på flere ulike måter, som ved mikrobiell aktivitet, oksidasjon eller ved UV-stråling (Uria & Sanz-Medel 1998). Effekten av lagring på stabiliteten av MeHg i både biota og sedimenter er noe omdiskutert. Biologiske prøver blir ofte frosset eller frysetørket dersom de ikke analyseres umiddelbart etter prøvetakning. Gjentatt tining og frysing kan imidlertid føre til nedbrytning av MeHg. Sedimenter analyseres ofte ferske. Dersom lagring er nødvendig bør de oppbevares mørkt ved lave temperaturer eller de bør frysetørkes. Anbefalt materiale i beholdere som benyttes under analysen er glass eller teflon (Leermakers *et al.* 2005). Alt utstyr som benyttes bør syrevaskes før bruk for å unngå kontaminering.

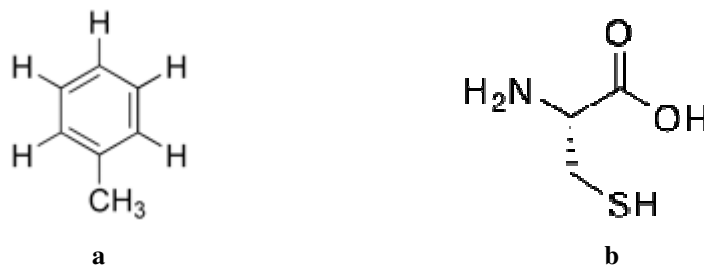
2.3 Utviklet metode

I denne oppgaven frigjøres MeHg fra prøvematriks ved hjelp av hydrogenbromid (HBr). Separasjon av MeHg fra uorganisk Hg oppnås gjennom ekstraksjon med toluen og tilbakeekstraksjon med L-cystein. Prøven oppsluttes i UltraClave for oksidasjon av MeHg til Hg^{2+} , før deteksjon med CV-AAS.

2.3.1 Utvinning fra prøvematriks og ekstraksjon av MeHg

Ved tilsats av en halogenert syre til prøven blir kvikksølv frigjort fra prøvematriksen gjennom dannelsen av halogener (som for eksempel HgCl_2 eller CH_3HgCl). De dannede organiske kvikksølvhalogenene ekstraheres så med et organisk løsemiddel, i dette tilfellet toluen (figur 2.5a). HCl er en mye benyttet syre til dette formålet. Det er for øvrig vist at ekstraksjonen fra vandig fase til toluen forenkles når HBr benyttes i stedet for HCl (Stevens & Robertson 1974). Simpson (1961) bestemte fordelingskoeffisientene for MeHg-halogener mellom vann og toluen. Dette viste at metylkvikksølv ble ekstrahert over i toluen i større grad som CH_3HgBr enn CH_3HgCl . Ved ekstraksjon med toluen separeres MeHg fra uorganisk

kvikksølv. Uorganiske forbindelser av kvikksølv kan ikke ekstraheres ut med et organisk løsemiddel og vil derfor bli værende i syrefasen. MeHg tilbakeekstraheres så med L-cystein (figur 2.5b). MeHg bindes til tiolgruppen i L-cystein og danner et nøytralt 1:1 vannløselig kompleks (Harry *et al.* 2004; Shade & Hudson 2005; Stevens & Robertson 1974). Med tilbakeekstraksjonen blir MeHg ført tilbake til vandig løsning som kan oppsluttes i UltraClave samtidig som prøven oppkonsentreres. Tilbakeekstraksjon vil også rense ekstraktet. EtHg danner ikke komplekser med L-cystein og vil derfor bli separert ut før prøven oppsluttes (Harry *et al.* 2004). Det er imidlertid ikke funnet i litteraturen om eventuelle andre organiske kvikksølvformer ekstrahert med toluen kan danne komplekser med denne forbindelsen.



Figur 2.5: a) Toluen består av en benzenring og en metylgruppe (Wikipedia 2009). b) L-cystein. Metylkvikksølv bindes til tiolgruppen og det dannes nøytrale 1:1 kompleks (Wikipedia 2010).

2.3.2 Oppslutning i UltraClave

Informasjonen i dette avsnittet er hentet fra Gjengedal (2009b) og Jensen (2009) dersom annet ikke er oppgitt.

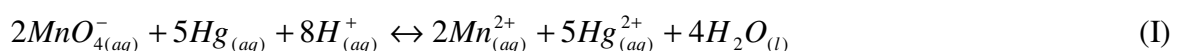
Oppslutning, eller dekomponering av prøver, kan benyttes for å få prøver på væskeform dersom det ikke kan analyseres på fast materiale, og for å oppnå homogene prøver. I dette tilfellet ble det brukt for å oksidere MeHg til Hg²⁺ som kan detekteres ved bruk av CV-AAS. Oppslutning av prøvene ble utført med UltraClave som baseres på mikrobølgeteknikk. Prøvene plasseres i beholdere og settes i "load" bestående av vann og syre. En antenne sender ut mikrobølger som beveger seg gjennom et elektromagnetisk felt. Ettersom bølgene beveger seg vil polare molekyler stadig vippe rundt, noe som kalles dipolrotasjon, mens positivt og negativt ladde ioner vil få en bevegelse fram og tilbake, kalt ionisk migrasjon. Dette skaper friksjon og dermed varme som varmer opp load og prøver. Fordeler ved bruk av UltraClave er at det kan brukes på store prøvemasser, opp til 25 g organisk materiale og 250 g uorganisk prøve. Innveining av større masse gjør at en får et mer homogent uttak av heterogene prøver og

at det kan analyseres på lavere deteksjons- og kvantifiseringsgrenser dersom konsentrasjonen av analytten i prøven er lav. Det oppnås god presisjon da trykk og temperatur er likt i alle beholderne.

For å dekomponere prøven tas det i bruk en syre som er passende for materialet i prøven. Dersom det er organisk materiale i prøven vil en oksiderende syre benyttes. Ved valg av syre må det tas hensyn til eventuelle interferenser som kan dannes, og det må passes på at prøven ikke blir flyktig eller felles ut med den aktuelle syra. Salpetersyre (HNO₃) anbefales ofte til dette bruket. Den kan løse de fleste grunnstoffer, med unntak av edelmetaller, er sterkt oksiderende og gir få interferenser. Ved bruk av HNO₃ og høy temperatur vil det være en svært liten rest av organisk materiale i prøven, noe som gir god nøyaktighet. Andre brukte syrer kan være saltsyre (HCl), flussyre (HF), svovelsyre (H₂SO₄), perklorsyre (HClO₄), “konge vann” og hydrogenperoksid (H₂O₂).

Prøven, tilsatt syre, plasseres i posisjonskarusell i et vannbad tilsatt H₂SO₄ og H₂O₂ (load) (figur 2.6). Tilsats av H₂SO₄ har til hensikt å sørge for å beholde polariteten i løsningen, da vann blir upolart ved høye temperaturer. Systemet trykkes ved hjelp av nitrogengass til 40-50 bar. Under prosessen kan det dannes store mengder nitrose gasser (NO_x). H₂O₂ oksiderer disse gassene til nitrat og forhindrer dermed ukontrollert trykkøkning. Det høye trykket inne i UltraClaven gjør at det kan oppnås svært høy temperatur uten at prøver og vann koker. Dette forhindrer både kontaminering forårsaket av sprut fra andre prøver og tap av prøve. Dersom trykket blir for høyt reguleres dette ved hjelp av et bevegelig lokk som løftes når trykket øker. I prøven inne i UltraClaven vil det foregå en eksoterm reaksjon. I prøver med høyt organisk innhold legges det inn “hviletrinn” hvor temperaturen holdes konstant noen minutter. Dette gjøres ved 50 °C som en sikkerhet dersom det skulle forkomme svært eksoterme reaksjoner i prøven, og ved 110 °C da det er ved denne temperaturen at de fleste eksoterme reaksjoner skjer.

Etter dekomponering er det viktig å beholde kvikksølv på ioneform (Hg²⁺) for å hindre fordampning av Hg⁰ og dermed tap av analytt. Stabilisering av prøven kan utføres ved å tilsette et sterkt oksidasjonsmiddel som K₂Cr₂O₇ eller KMnO₄. Kaliumpermanganat, som ble benyttet i denne oppgaven, virker på kvikksølv etter følgende likning (Lohne 2009):





Figur 2.6: Oppslutning i UltraClave. Teflonrørene inneholdende prøvene er plassert i posisjonskarusell. Denne senkes så ned i load, et vannbad bestående av 320 ml vann, 2-3 ml H_2SO_4 og 20-30 ml H_2O_2 , som varmes opp ved hjelp av mikrobølger.

2.3.3 Deteksjon med CV-AAS

Spektroskopiske teknikker baseres på reaksjoner mellom stråling og materiale. Deler av prøven eksiteres ved hjelp av en energikilde. Informasjon om prøven oppnås ved å måle emittert stråling når den aktuelle analytten går tilbake til grunntilstand, eller ved å måle absorbert stråling som følge av eksitasjonen (Holler *et al.* 2007).

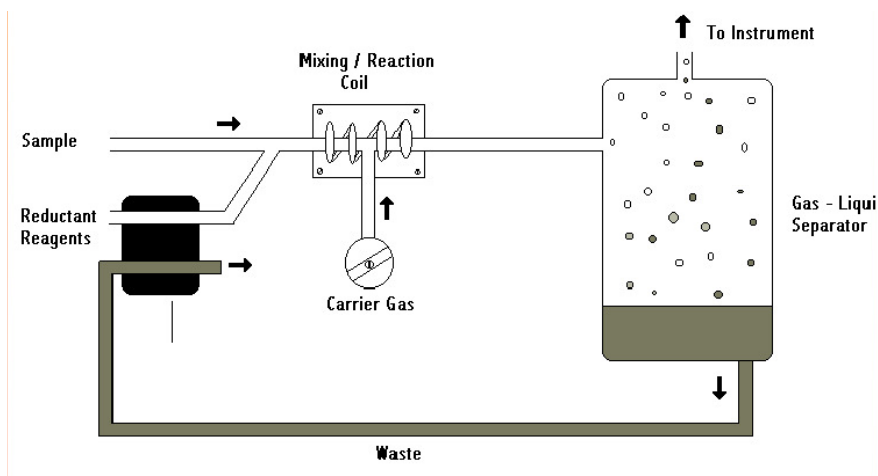
Atomene absorberer stråling med en bestemt bølgelengde, avhengig av energidifferansen mellom grunntilstand og eksitert tilstand av atomet. Bølgelengden er karakteristisk for hvert enkelt atom, noe som gjør det mulig å identifisere atomene i en prøve (Holler *et al.* 2007). I atomabsorpsjonsspektroskopi sendes en lysstråle med ønsket bølgelengde inn mot prøven, og intensiteten av lysstrålen som slipper gjennom prøven måles. Nedgangen i intensitet vil være proporsjonal med mengde analytt i prøven (Lohne 2009).

Atomspektroskopi krever atomisering av prøven. Dette kan utføres ved hjelp av ulike atomiseringsteknikker, hvor flamme, elektrotermisk og induktivt koblet plasma er de mest brukte. Kalddamp er en form for atomisering som kun benyttes for kvikksølv, da dette er det eneste metalliske grunnstoffet som finnes på gassform i betydelig grad ved romtemperatur (Holler *et al.* 2007). Bestemmelse av MeHg med CV-AAS forutsetter at prøven dekomponeres for at MeHg skal omdannes til Hg^{2+} . Dette er nødvendig da $SnCl_2$ kun reduserer Hg^{2+} og ikke MeHg (Shade & Hudson 2005). Før analyse reduseres det toverdige kvikksølv til flyktig, elementært kvikksølv. Dette føres inn i et rør ved hjelp av en bæregass,

hvor absorpsjon ved bølglengde 253,7 nm måles. For å unngå at reduksjonsmiddelet (SnCl_2) blir brukt opp under analyse kan overskuddet av oksidasjonsmiddel fjernes rett før analyse ved tilsats av oksalsyre eller hydroksylamin. Eventuelt kan det benyttes høy konsentrasjon (10 % (v/V)) av reduksjonsmiddelet for å være sikker på at alt kvikksølv reduseres. Likning (II) viser reduksjon av kvikksølv med tinnklorid (Lohne 2009).



Kvikksølvbestemmelse ved CV-AAS kan automatiseres ved hjelp av Flow Injection Analysis (FIA). Fordeler ved bruk av automatiserte metoder er at kostnader for operatører reduseres, det blir mindre avfall, de er hurtige og presisjonen kan bedres ved at menneskelige feil unngås. I denne oppgaven ble det benyttet Flow Injection Mercury System (FIMS). Her injiseres prøvene i en kontinuerlig strøm. To peristaltiske pumper suger prøve, bæreløsning og reduksjonsmiddel inn i systemet og fører avfall ut. Prøven suges inn i injektoren og gjennom en loop. Injektoren snur på seg slik at bæreløsning suges inn og fører prøven med seg til blandkammeret. Reduksjonsløsningen suges rett inn i blandkammeret hvor Hg^{2+} blir redusert til elementært kvikksølv. Volumet av prøven, det som befinner seg i loopen, vil være nøyaktig det samme hver gang, i dette tilfellet 500 μl . Argongass (bæregass) føres inn i systemet og blandes med kvikksølv gassen, som skilles fra væska i en væske-gass-separator. Gassen føres inn i et rør, og en lyskilde sender ut lys med den bestemte bølglengden (253,7 nm) mot prøven. En detektor på den andre siden av røret måler intensiteten av lys som slipper igjennom. Absorbert lys vil være proporsjonal med konsentrasjonen av kvikksølv i prøven (Gjengedal 2009a; Lohne 2009). Et system for kalddampgenerering er vist i figur 2.8.



Figur 2.8: Skjematisk tegning for kalddampgenerering. Prøven blandes med reduksjonsmiddel i et blandkammer. Bæregass fører med seg flyktig Hg^0 inn i en væske-gass-separator og videre inn i instrumentet for deteksjon (Lohne 2009).

3 Eksperimentelt

3.1 Materiell

En oversikt over instrumenter, utstyr og reagenser og gasser som ble benyttet er vist i tabellene 3.1 til 3.3.

Tabell 3.1: Utstyr og instrumenter benyttet ved oppslutning og analyse

Instrument	Produsent
UltraClave 3	Milestone
Posisjonskarusell 40 posisjoner	Milestone
Prøveveksler AS 90	Perkin Elmer
FIMS 400	Perkin Elmer

Tabell 3.2: Utstyr benyttet ved forbehandling av prøver og annet laboratoriearbeid.

Utstyr	Produsent
Analysevekt (4-desimalers)	Sartorius
Toppvekt (3-desimalers)	Sartorius
Elektroniske pipetter. 10-300 µl, 50-1000 µl og 100-5000 µl	Biohit
Finnpipetter. 2-10 ml	Thermo Scientific
Målekolber i glass. 50, 100 og 1000 ml	Kebo lab as
Polypropylenrør. 15 og 50 ml	Greiner bio-one
Teflonrør. 18 ml	Milestone
Vertikalt ristebrett SM-30	Edmund Bühler
Sentrifuge Labfuge M	Heraeus
Stavmikser MR430HC	Braun
B-pure renseanlegg for vann (motstand minst 18 µS)	Barnstead

Tabell 3.3: Reagenser og gasser

Reagenser og gasser	Kjemisk Formel	Konsentrasjon	Kvalitet	Produsent
Toluen	$C_6H_5CH_3$	92,14 M	Pro analysi	Merck
L-cysteinhydroklorid-monohydrat ¹	$C_3H_8ClNO_2S \cdot H_2O$	-	For biokjemi	Merck
L-cysteinhydroklorid-monohydrat ¹	$C_3H_8ClNO_2S \cdot H_2O$	-	> 99,0 % renhet	Sigma-Aldrich
Natriumsulfat ¹	Na_2SO_4	-	Pro analysi	Merck
Natriumacetat ¹	CH_3COONa	-	Pro analysi	Merck
Hydrogenbromid	HBr	47 % (V/V)	Pro analysi	Merck
Salpetersyre	HNO_3	Minst 65 % (V/V)	Ultrapure	UMB ²
Saltsyre	HCl	Minst 37 % (V/V)	Ultrapure	UMB ²
Svovelsyre	H_2SO_4	96 % (V/V)	Pro analysi	Merck
Hydrogenperoksid	H_2O_2	30 % (V/V)	Pro analysi	Merck
Kaliumpermanganat	$KMnO_4$	5 % (v/V)	Pro analysi	Merck
Tinn(II)klorid-dihydrat ¹	$SnCl_2$	-	For analyse	Merck
Argongass (til FIMS)	Ar	Komprimert	5.0	Yara
Nitrogengass (til UltraClave)	N_2	Komprimert	2.6	Yara
Etanol	C_2H_5OH	96 %	Teknisk	Vinmonopolet
Metylkvikksølvklorid ¹	CH_3HgCl	-	Analytisk kvalitet	Sigma-Aldrich
Kvikksølv	Hg (metall) løst i 2,5 % HNO_3	$1000 \pm 3 \mu g/ml$	99,9999 % renhet	Spectrapure Standards

¹Fast stoff

²Ultrapure HNO_3 og HCl ble destillert ved UMB fra syrer produsert av Merck.

Alt vann benyttet til fortykning av prøver og tillaging av standarder var Milli-Q vann fra renseanlegget fra Barnstead. For tillaging av reduksjonsmiddel og bæreløsning benyttet i FIMS ble det benyttet destillert vann.

Metylkvikksølvstandard ble laget ved å veie inn 108,680 mg CH₃HgCl, tilsvarende 86,825 mg Hg. Dette ble løst i 85,86 g vann tilsatt 0,8 ml HCl (37 %). Dette gav en endelig konsentrasjon på 1000 mg/l. Av standarden ble det laget en mellomstandard på 10 mg/l tilsatt 0,1 M HCl. Det ble også laget en mellomstandard på 10 mg/l fra Hg²⁺-standard på 1000 mg/l. Denne ble tilsatt 0,2 M HNO₃. Mellomstandardene ble oppbevart i 100 ml glasskolber. Både standardene og mellomstandardene ble oppbevart mørkt og ved 4 °C.

MeHg er beskrevet som ”meget giftig ved innånding, hudkontakt og svelging” (Sigma-Aldrich 2009), og kan akkumuleres i kroppen. Det ble benyttet nitrilhansker N-DEX Plus fra Best ved håndtering av MeHg, samt standard verneutstyr som vernebriller og laboratoriefrakk. Avfall fra både MeHg og Hg²⁺ ble behandlet som spesialavfall ved høye konsentrasjoner. Det ble utvist stor forsiktighet ved håndtering av kvikksølv da det, i tillegg til og tas opp gjennom mat, både kan tas opp i kroppen ved inhalasjon og ved absorpsjon gjennom huden (Committee on the Toxicological Effects of Methylmercury 2000).

Benyttede sertifiserte referansematerialer (SRM) med oppgitte sertifiserte områder er vist i tabell 3.4.

Tabell 3.4: Sertifiserte referansematerialer med sertifiserte områder

Sertifisert referansemateriale	Sertifisert område CH ₃ Hg ⁺ (mg/kg)	Produsent
DORM-2 (Dogfish muscle)	4,47 ± 0,32	NRC ¹
DOLT-4 (Dogfish liver)	1,33 ± 0,12	NRC ¹
ERM-CC580 (Estuarine sediment)	0,075 ± 0,004	ERM ²

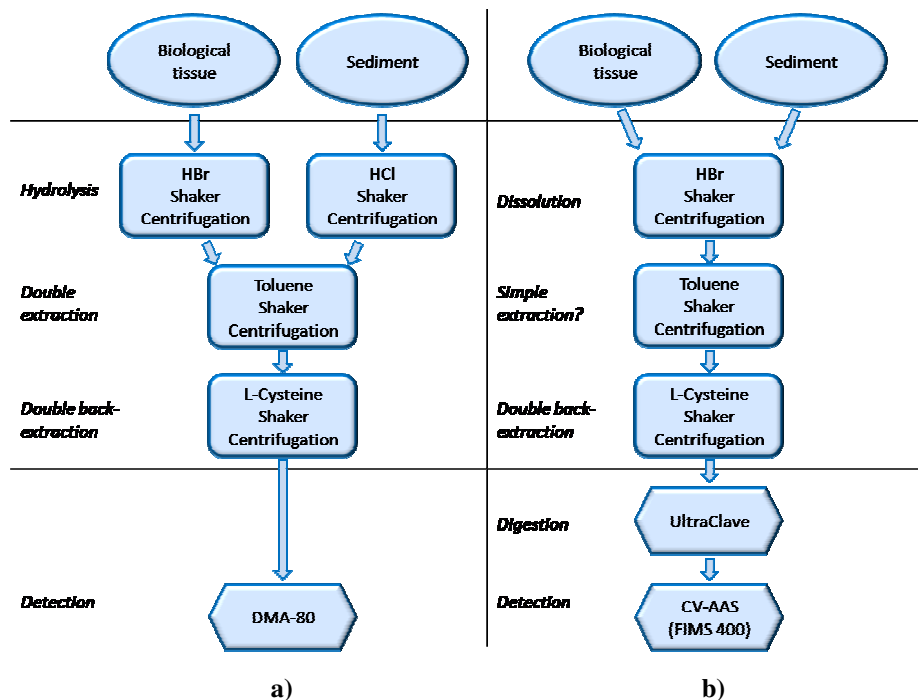
1) NRC: National Research Council of Canada (NRC 1993; NRC 2008).

2) ERM: European Reference Materials (ERM 2004).

3.2 Metode

Det ble tatt utgangspunkt i en metode beskrevet av Maggi *et al.* (2009). I denne opprinnelige metoden ble homogenisert prøvemateriale behandlet med HBr før dobbel ekstraksjon med toluen og dobbel tilbakeekstraksjon med L-cysteinløsning. Metylkvikksølv ble detektert med Direct Mercury Analyser (DMA-80). Et oppsett for denne metoden er vist i figur 3.1a. For

bestemmelse av metylkvikksølv i denne oppgaven, ble det foretatt noen endringer i den opprinnelige metoden. For det første ble DMA-80 erstattet med CV-AAS som deteksjonsteknikk (avsnitt 2.3.3). I DMA-80 dekomponeres prøvene i instrumentet. De tørkes ved oppvarming og dekomponeres videre ved hjelp av en katalysator slik at det dannes Hg^0 . Kvikksølv dampen fanges opp på en gullfelle, frigjøres termisk og detekteres med AAS ved 254 nm (Milestone 2003). Ved bruk av CV-AAS måtte det innføres et eget opplutningstrinn for oksidasjon av MeHg til Hg^{2+} , da denne teknikken er basert på reduksjon av Hg^{2+} til Hg^0 med SnCl_2 som beskrevet i avsnitt 2.3.3. Oppslutning ble derfor utført ved hjelp av UltraClave (avsnitt 2.3.2). En mulig forenkling av metoden, med reduksjon fra dobbel til enkel ekstraksjon med toluen, ble så undersøkt. Metoden med disse endringene er vist i figur 3.1b. Prosedyren for dobbel og enkel ekstraksjon er beskrevet i henholdsvis avsnittene 3.2.1 og 3.2.2, og opplutning og deteksjon i henholdsvis 3.2.3 og 3.2.4. Vurdering av metodens yteevne ble utført som beskrevet i avsnitt 3.2.5.



Figur 3.1: a) Metode for bestemmelse av MeHg som beskrevet av Maggi *et al.* (2009). Det ble utført dobbel ekstraksjon og DMA-80 ble benyttet for deteksjon. b) CV-AAS ble valgt som teknikk for deteksjon. Dette medførte at et opplutningstrinn var nødvendig. Ekstraksjonen ble forenklet til enkel ekstraksjon. Spørsmålstegnet bak "simple extraction" viser at dette var problemstillingen da utviklingen av metoden ble påbegynt (Glomstad *et al.* 2010) (vedlegg 8).

3.2.1 Dobbel ekstraksjon

Alle syrene som er beskrevet i metoden er benyttet med konsentrasjonene oppgitt i tabell 3.3.

Homogenisert prøvemateriale ble veid inn i 50 ml polypropylenrør og tilsatt 10 ml HBr. Prøvene ble ristet i 5 min og sentrifugert i 10 min. Det ble så tilsatt 20 ml toluen før risting i 20 min, etterfulgt av 20 min sentrifugering. Toluene ble tatt ut og overført til nye 50 ml polypropylenrør. Ekstraksjonen ble deretter gjentatt med 15 ml toluen. Løsningene fra de to ekstraksjonene ble slått sammen og 6 ml L-cysteinløsning (1 % v/w) ble tilsatt for tilbakeekstraksjon. Prøvene ble ristet i 20 min og sentrifugert i 5 min dersom dette var nødvendig for å skille fasene. L-cysteinen ble tatt ut og overført til 15 ml polypropylenrør. Dette ble gjentatt med nye 6 ml L-cysteinløsning. Ekstraktene av L-cystein ble slått sammen og blandet godt. 2,5 ml av L-cysteinløsningen ble tatt ut for opplutning i UltraClave.

L-cysteinløsning ble laget ved å løse 1 % L-cysteinhydroklorid-monohydrat, 12,5 % natriumsulfat og 0,775 % natriumacetat i vann. Løsningen ble oppbevart i en målekolbe av glass. Det ble laget ny løsning for hver analyse. Risting av prøvene ble utført på Edmund Bühler SM-30 vertikalt ristebrett ved hastigheten 300 min^{-1} . Sentrifugering ble utført på Heraeus Labfuge M ved 2400 rpm.

3.2.2 Enkel ekstraksjon

For å spare tid og bruk av reagenser, samt forbedre metodens nøyaktighet, var det ønskelig å undersøke effektiviteten av en enkel ekstraksjon med toluen i stedet for dobbel ekstraksjon. Prøvene ble tilsatt HBr og ristet og sentrifugert som beskrevet i avsnitt 3.2.1. Det ble deretter tilsatt 25 ml toluen. To ulike ristetider med toluen, 20 min og 40 min, ble undersøkt. 20 min viste seg å gi like god effektivitet som 40 min og ble derfor benyttet for videre bruk. Prøvene ble sentrifugert i 20 min. 20 ml toluen ble så tatt ut for tilbakeekstraksjon med L-cysteinløsning på samme måte som for dobbel ekstraksjon.

3.2.3 Opplutning av prøver i UltraClave

Etter dobbel tilbakeekstraksjon med L-cystein ble 2,5 ml av prøven pipettert ut og overført til teflonrør for opplutning. Teflonrørene ble satt til opplutning i en load bestående av 20-30 ml H_2O_2 og 2-3 ml H_2SO_4 i 320 ml vann. Maksimum temperatur under opplutningen var $250 \text{ }^\circ\text{C}$.

En nærmere beskrivelse av programmet som ble benyttet er vist i vedlegg 1. Prøvene ble tilsatt HNO₃ før oppslutning. Det ble tilsatt fra 1 ml til 1,5 ml HNO₃, avhengig av hvor mange ganger prøven skulle fortynnes for videre analyse. Fortynning av prøvene er nødvendig for å komme innenfor det validerte måleområdet for den instrumentelle metoden, og for å oppnå passende syrekonsentrasjon i prøvene. De oppsluttede prøvene ble overført til 15 ml polypropylenrør og fortynnet til ønsket volum. De ble tilsatt en dråpe KMnO₄ som er et sterkt oksidasjonsmiddel for å beholde kvikksølv på ioneform (Hg²⁺). Dette forhindrer fordampning og dermed tap av analytt.

3.2.4 Deteksjon

Oppsluttet prøveløsning ble tatt opp ved hjelp av prøveveksler AS 90 og analysert med Perkin Elmer FIMS 400 ved måling av absorpsjons på 253,7 nm. Det ble gjort tre replikate målinger av hver prøve. Bæreløsning som ble benyttet i FIMS bestod av 8,5 % HCl (V/V).

Reduksjonsløsningen for reduksjon av Hg²⁺ til Hg⁰ inneholdt 10 % SnCl₂ (v/V) løst i 8,5 % HCl (V/V). Instrumentet ble kalibrert med en kalibreringsrekke av Hg²⁺-standarder. Det ble benyttet to ulike kalibreringsrekker, en for prøvematrikser med høyt innhold av kvikksølv og en for prøver med lavere kvikksølvinnhold. Disse er vist i tabell 3.5. "Høy" kalibreringsrekke ble brukt for muskel og lever fra fisk mens den "lave" ble benyttet for sedimenter og rogn som hadde lave konsentrasjoner av kvikksølv. Kalibreringsstandardene ble laget ut fra Hg²⁺-standard på 10 mg/l via en mellomstandard på 200 µg/l. Standardene med konsentrasjoner på 0,5 µg/l og lavere ble laget fra standarden på 10 µg/l for å unngå for mange ganger fortynning. Alle standardene ble tilsatt samme mengde KMnO₄ som prøvene.

Tabell 3.5: Benyttede kalibreringsrekker. Høy kalibreringsrekke ble benyttet for muskel og lever fra fisk, mens lav kalibreringsrekke ble benyttet for sedimenter og rogn som har lavere kvikksølvinnhold.

	Prøvemateriale	Hg ²⁺ (µg/l)				
		0	0,5	1	5	10
Høy kalibreringsrekke	Fiskemuskel, lever	0	0,5	1	5	10
Lav kalibreringsrekke	Sedimenter, rogn	0	0,2	0,5	1	5

3.2.5 Vurdering av metodens yteevne

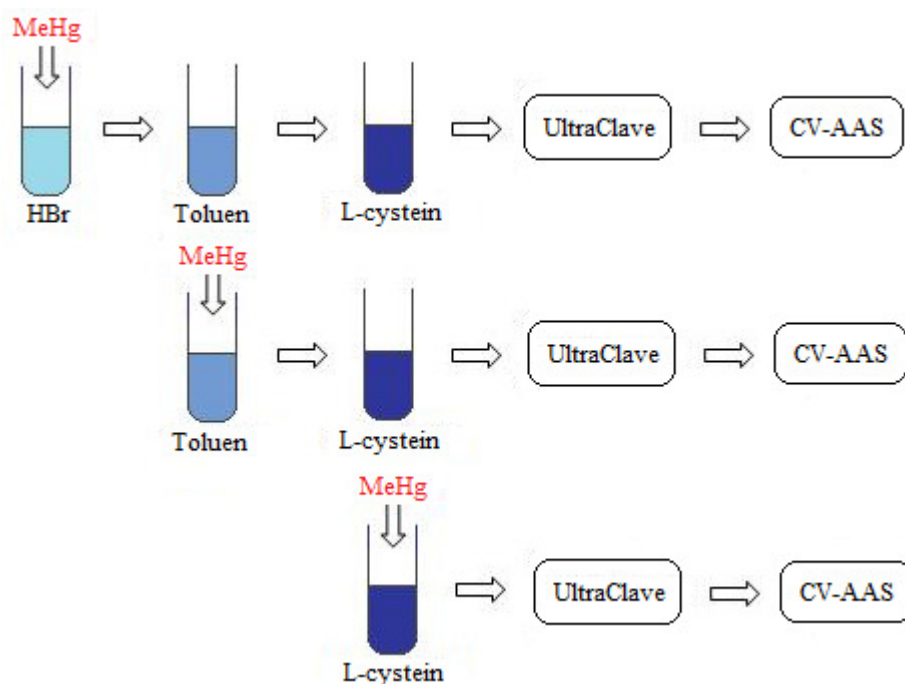
Alle de omtalte prøvene ble oppsluttet i UltraClave og analysert med CV-AAS som beskrevet i avsnittene 3.2.3 og 3.2.4.

3.2.5.1 Nøyaktighet i metoden

Metodens nøyaktighet ble undersøkt ved hjelp av sertifiserte referansematerialer. For biologiske prøver ble SRM DORM-2 og DOLT-4 benyttet. Bestemmelse av MeHg i DORM-2 ble gjort ved både dobbel og enkel ekstraksjon som beskrevet i avsnittene 3.2.1 og 3.2.2. For DOLT-4 ble det kun utført enkel ekstraksjon basert på erfaringene gjort ved sammenligning av enkel og dobbel ekstraksjon med DORM-2. I DOLT-4 ble det dannet emulsjon i prøven etter tilsats av toluen. Dette ble fjernet ved tilsats av 3-4 ml etanol (95 %). På grunn av dannelse av et lag mellom de to fasene som gjorde det vanskelig å ta ut 20 ml toluen for tilbakeekstraksjon, ble det tatt ut kun 15 ml, og i ett tilfelle, 10 ml toluen.

Metodens nøyaktighet for sedimenter ble undersøkt ved hjelp av SRM ERM-CC580. Samme prosedyre som for biologiske prøver, med enkel ekstraksjon, ble benyttet.

MeHg-standard ble også brukt for å se på metodens nøyaktighet. Blankprøver ble spiket med 0,3 ml av MeHg-standard på 10 mg/l, mens DORM-2 og ERM-CC580 ble spiket med 0,2 ml av samme standard. Da de spikede blankprøvene gav lav gjenfinning, ble det undersøkt om ristetiden med HBr hadde innvirkning på tapet. Gjenfinningen ble undersøkt ved ulike ristetider, 5 min, 1 min og uten resting før tilsats av toluen. Blankprøver ble ikke sentrifugert da det ikke var noe bunnfall i disse. For å undersøke i hvilke trinn i metoden tapet av MeHg forekom, ble det tilsatt MeHg i hvert av de tre ulike ekstraksjonstrinnene som vist i figur 3.2. Like mengder med MeHg ble tilsatt til noen prøver i syretrinet, til andre prøver i ekstraksjonstrinet med toluen, og i en tredje gruppe med prøver ble MeHg tilsatt direkte i L-cysteinløsningen før oppslutning. Det ble også tilsatt HBr til en gruppe prøver som var spiket med MeHg i toluentrinnet. Prøvene fulgte vanlig prosedyre fra det trinnet hvor MeHg ble tilsatt.



Figur 3.2: Tilsetning av MeHg ved ulike trinn i ekstraksjonen. MeHg ble tilsatt i HBr i enkelte blank, i toluen i andre og i L-cystein i en tredje gruppe av blankprøver.

3.2.5.2 Påvirkning fra Hg^{2+}

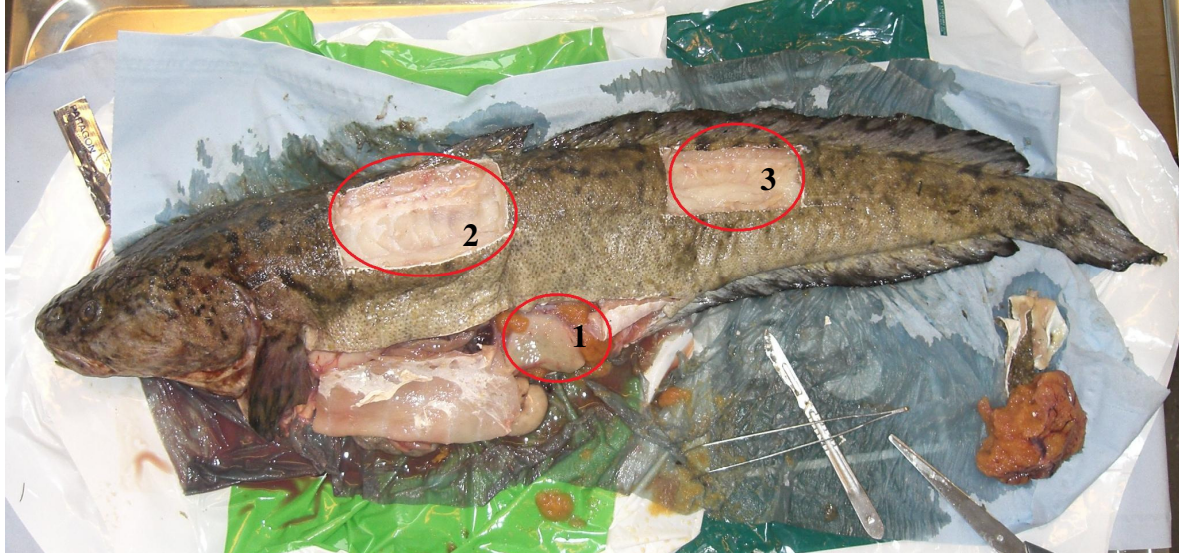
Det ble undersøkt om tilstedeværelse av Hg^{2+} påvirker målingen av MeHg. Blankprøver og DORM-2 ble spiket med 0,3 ml av Hg^{2+} -standard på 10 mg/l. Blankprøvene ble ekstrahert med enkel ekstraksjon, mens det ble utført både dobbel og enkel ekstraksjon av spiket DORM-2.

3.2.5.3 Presisjon i metoden ved bestemmelse av MeHg i prøver av fisk og sediment

Innholdet av MeHg ble bestemt i fiskeslaget lake (*Lota lota*). Det ble tatt prøver fra lever, rogn og muskel tre steder på fisken som vist i figur 3.3. Muskelprøvene ble tilsatt vann (omtrent 3:1) og homogenisert ved hjelp av stavmikser. Rogn og lever ble homogenisert på samme måte men uten tilsats av vann. Det ble veid ut seks paralleller av rogn for bestemmelse av metodens presisjon, og tre paralleller av de øvrige prøvene, alle på omtrent 1,5 g (nøyaktige innvekter er gitt i vedlegg 5). Det ble utført enkel ekstraksjon før oppslutning og deteksjon.

Sedimenter ble gitt fra Norsk institutt for vannforskning (NIVA). Prøvene, fra Bjørvika i Oslofjorden, ble forbehandlet ved NIVA. De ble tørket ved 60 °C, siktet gjennom en 100 µm

sikt og homogenisert (Dahl 2010). Det ble veid inn seks paralleller på omtrent 2 g (nøyaktige innvekter er gitt i vedlegg 5). Prøvene ble analysert etter enkel ekstraksjon.



Figur 3.3: I tillegg til prøver fra lever og rogn, ble det tatt prøver fra muskel av fisken på tre ulike steder, markert med rød ring og nummer for de ulike prøvene.

3.2.5.4 Effektivitet av opplutning og stabilitet av MeHg standard

40 μl av MeHg-standard (10 mg/l) tilsatt 1,5 ml HNO_3 ble oppluttet i UltraClave og analysert for å undersøke effektiviteten av opplutningen. Stabiliteten til MeHg-standard oppbevart mørkt og kjølig (4 °C) ble undersøkt ved å måle konsentrasjonen i en standard som var lagret én dag, en som var lagret én uke og en som var lagret én måned. Samme mengde av standardene ble også analysert uten opplutning på UltraClave for å undersøke om MeHg var blitt omdannet til Hg^{2+} under lagringen.

3.2.6 Bestemmelse av total kvikksølv i prøver av fisk og sediment

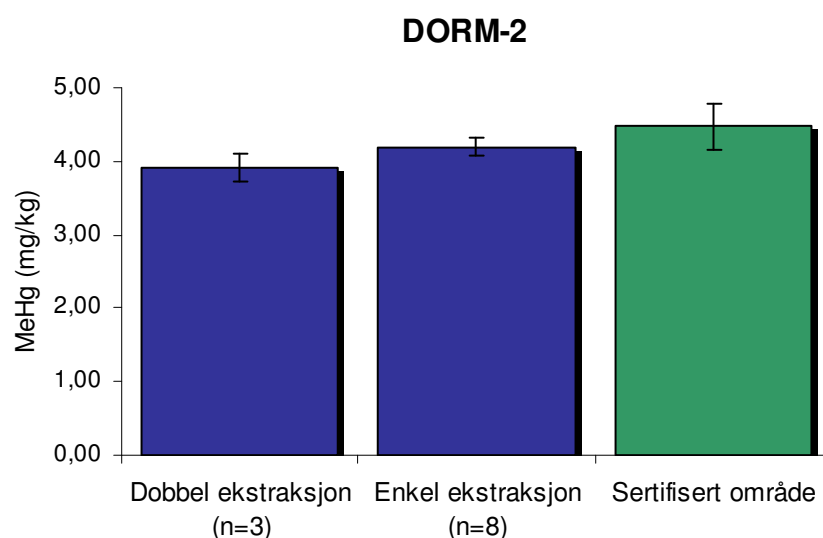
Totalt Hg ble bestemt i fiskeprøvene ved å oppslutte omtrent 1,5 g prøver tilsatt 5 ml HNO_3 før deteksjon med CV-AAS. Av sedimentene ble det veid inn omtrent 0,5 g og tilsatt 5 ml HNO_3 for opplutning (nøyaktige innvekter er vist i vedlegg 6).

4 Resultat

4.1 Enkel og dobbel ekstraksjon og nøyaktighet i metoden

Enkel og dobbel ekstraksjon i den nye metoden for bestemmelse av MeHg ble sammenlignet ved analyse av referansematerialet DORM-2 (fiskemuskel). Resultatet er vist i figur 4.1.

Enkel ekstraksjon gav verdier som var innenfor det sertifiserte området, mens målt verdi ved dobbel ekstraksjon var noe lavere enn det sertifiserte området. Enkel ekstraksjon ble derfor valgt for videre bruk.



Figur 4.1: Målte verdier ved dobbel og enkel ekstraksjon med tilhørende usikkerheter og sertifisert område av referansematerialet DORM-2 (fiskemuskel). n tilsvarer antall paralleller som ble analysert.

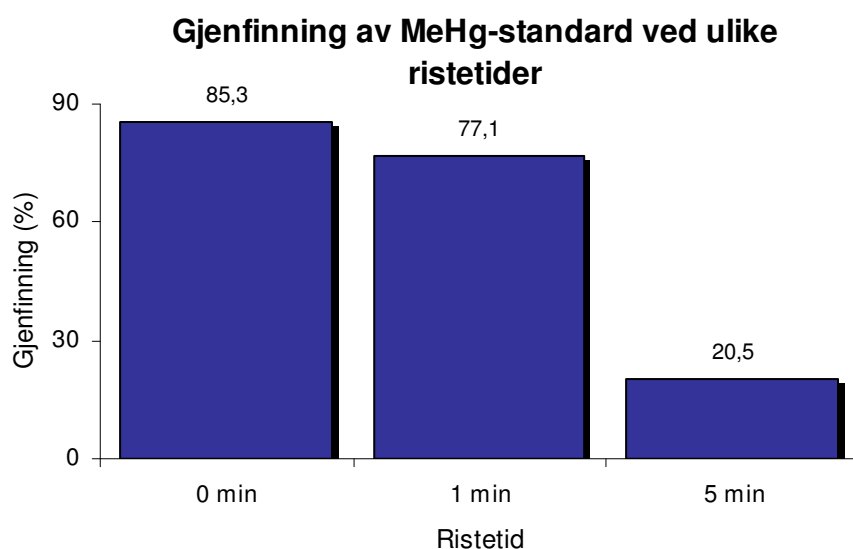
Resultatet for analyse av DORM-2 med enkel ekstraksjon er oppgitt i tallverdier i tabell 4.1. Resultatene fra analyse av ytterligere to referansematerialer, et biologisk referansemateriale, DOLT-4, og et estuar sediment, ERM-CC580, er også gitt i tabellen. I DOLT-4 ble emulsjon i prøven løst med tilsats av etanol. For ERM-CC580 ble blankverdier trukket fra da disse var høyere enn LOQ. Av tabellen kan det sees at de målte verdiene med usikkerhet var innenfor det sertifiserte området for alle de tre referansematerialene. Måleverdier er vist i vedlegg 2 og 3.

Tabell 4.1: Oversikt over målte verdier og sertifiserte områder av de benyttede referansematerialene. n tilsvarer antall paralleller som ble analysert.

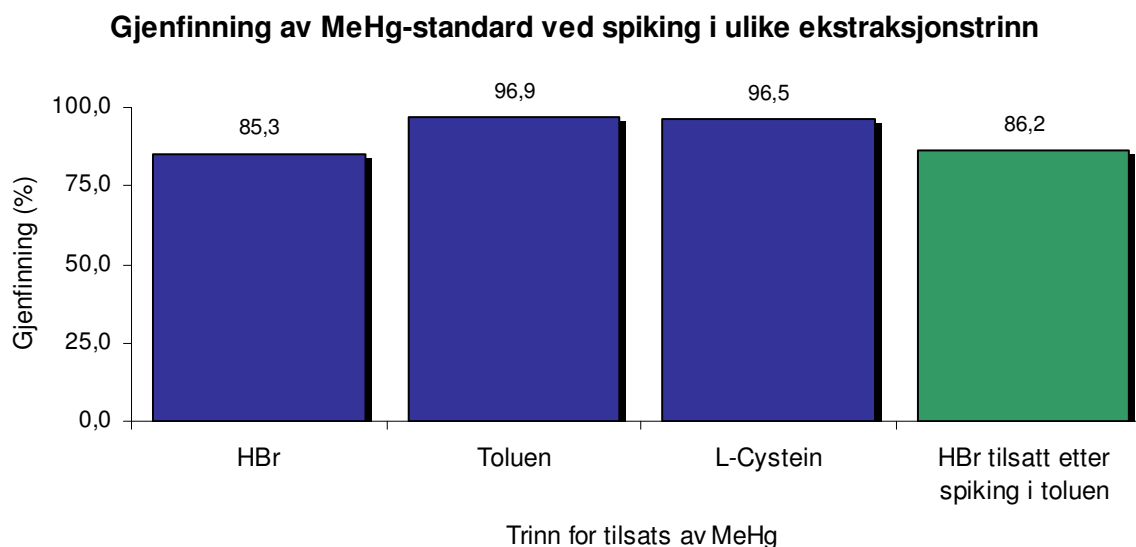
SRM	Målte verdier (mg/kg)	Sertifisert område (mg/kg)
DORM-2, fiskemuskel (n=8)	4,2 ± 0,12	4,47 ± 0,32
DOLT-4, fiskelever (n=6)	1,19 ± 0,017	1,33 ± 0,12
ERM-CC580, estuar sediment (n=6)	0,0722 ± 0,00092	0,075 ± 0,004

4.2 Gjenfinning av MeHg-standard

Spiking av blankprøver med MeHg-standard gav lav gjenfinning. Dette ble ikke opplevd ved spiking av referansematerialene DORM-2 og ERM-CC580, som i begge tilfeller gav god gjenfinning av standarden. Da det viste seg at MeHg ikke ble tapt dersom prøvene ble spiket i toluentrinnet eller i L-cystein, ble det antatt at tapet forekom i syretrinnet når prøven ristes med HBr. Effekten av ulike ristetider med HBr ble derfor undersøkt. Gjenfinningen av MeHg viste seg å minke med økt ristetid, som vist i figur 4.2. Selv uten noe risting med HBr var gjenfinningen lavere ved spiking i dette trinnet enn ved spiking i de to påfølgende trinnene som vist i figur 4.3. Tilsats av HBr etter spiking i toluentrinnet gav omtrent samme gjenfinning som når spiking ble utført i HBr. Resultatene fra målingene er vist i vedlegg 4.



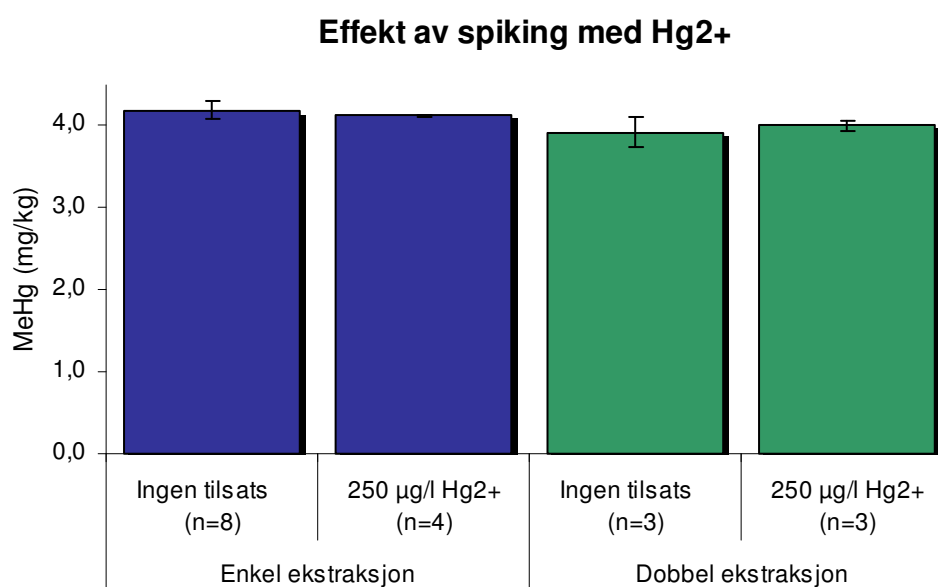
Figur 4.2: Gjenfinning av MeHg-standard i spikede blankprøver ved ulike ristetider med HBr. Tapet økte med økt ristetid.



Figur 4.3: Gjenfinning av MeHg-standard i blankprøver når prøvene ble spiket i ulike trinn i ekstraksjonen. Blank spiket med MeHg i syretrinet ble ikke ristet.

4.3 Påvirkning fra Hg^{2+}

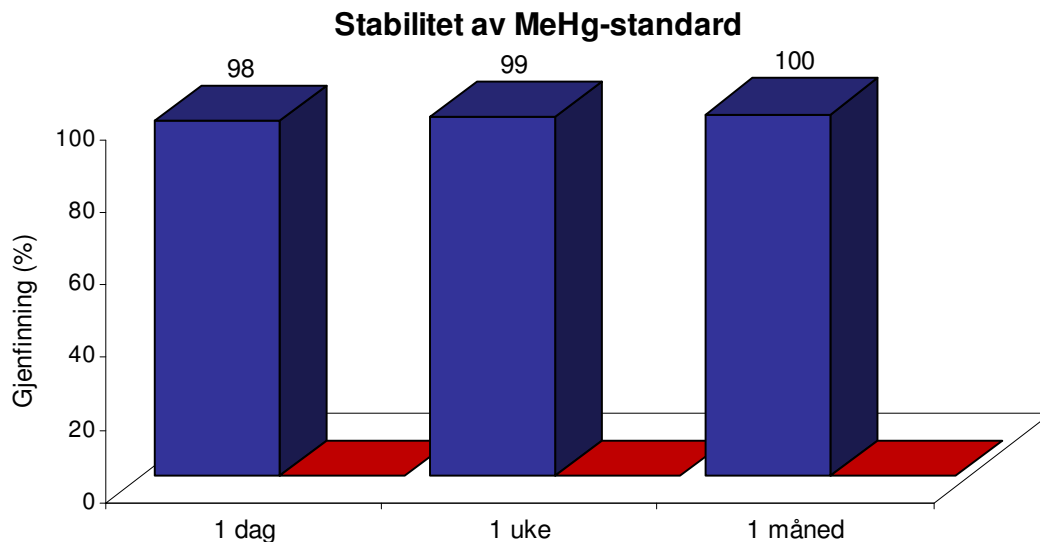
Det ble undersøkt om tilstedeværelse av høye konsentrasjoner av Hg^{2+} ville påvirke målingen. DORM-2 ble spiket med $250 \mu\text{g/l } Hg^{2+}$. Det ble utført både enkel og dobbel ekstraksjon. Spikede prøver gav ingen betydelige endringer i resultatet i forhold til ikke-spikede prøver, som vist i figur 4.4. Det ble ikke detektert kvikksølv i blank som var spiket med Hg^{2+} .



Figur 4.4: Målte verdier av DORM-2 med og uten spiking med Hg^{2+} . Spiking gav ingen økning i målte verdier.

4.4 Effektivitet av oppslutning i UltraClave og stabilitet av MeHg-standard

Oppslutning av MeHg-standard på 10 mg/l i UltraClave gav en gjenfinning på nær 100 %. Bestemmelse av MeHg i standarder med samme konsentrasjon som var lagret i glass i kjøleskap viste ingen endring i konsentrasjon over en periode på 1 måned som vist i figur 4.5. De samme standardene ble analysert uten oppslutning. Det ble ikke detektert kvikksølv i disse prøvene.



Figur 4.5: Målte konsentrasjoner i MeHg-standarder som var lagret 1 dag, 1 uke og 1 måned. Blå søyler viser gjenfinning av oppsluttede standarder mens rød søyler viser gjenfinning av de samme standardene uten oppslutning. Det ble ikke detektert kvikksølv i prøver som ikke var oppsluttet.

4.5 Deteksjons- og kvantifiseringsgrense

Metodens deteksjonsgrense (LOD) og kvantifiseringsgrense (LOQ) er beregnet som henholdsvis $3 \cdot SD$ og $10 \cdot SD$ for metodeblank, det vil si blankprøver som har fulgt hele prosedyren for metoden. Metodens LOD og LOQ er vist i tabell 4.2. LOD og LOQ ble beregnet ut fra blank som var fortynnet 4 ganger etter oppslutning i UltraClave. Analyse av de tre benyttede referansematerialene krevde imidlertid ulike fortynninger for å oppnå konsentrasjoner som var innenfor det validerte måleområdet. Referansematerialet for sedimenter, ERM-CC580, ble fortynnet 4 ganger, mens fiskelever (DOLT-4) og fiskemuskel (DORM-2) ble fortynnet henholdsvis 18 og 30 ganger. Når det ble beregnet LOD og LOQ med blankprøver som fulgte samme prosedyre som disse referansematerialene virket grenseverdiene å øke med antall ganger blank ble fortynnet etter oppslutning. Disse beregnede verdiene for LOD og LOQ kan også sees i tabell 4.2. De nevnte fortynningene i

tabellen viser antall fortynninger som ble gjort med blank etter oppslutning i UltraClave. Sedimenter og rogn som ble analysert i denne oppgaven ble fortynnet 4 ganger etter oppslutning, mens lever og muskel ble fortynnet 6 ganger. Ved omtale av LOD og LOQ i denne oppgaven er det verdiene som er beregnet for prøver med lavt innhold av MeHg (uthevet i tabell 4.2) som er benyttet dersom annet ikke er omtalt.

Tabell 4.2: Metodens LOD og LOQ. Prøver med ulike konsentrasjoner av MeHg må fortynnes ulikt etter oppslutning for å komme innenfor validert måleområde. Fortynningene vist i tabellen tilsvarer antall ganger prøven ble fortynnet etter oppslutning. LOD og LOQ påvirkes av dette og ble derfor beregnet for prøver med høyt, middels og lavt innhold av MeHg. Prøver som ble analysert i denne oppgaven hadde lavt innhold av MeHg og ble fortynnet 4 eller 6 ganger (uthevet).

Innhold av MeHg i prøve	Fortynning	LOD		LOQ	
		µg/l	mg/kg*	µg/l	mg/kg*
Lavt (ERM-CC580)	4	0,0074	0,000059	0,025	0,00020
Middels (DOLT-4)	18	0,103	0,00083	0,344	0,00275
Høyt (DORM-2)	30	0,285	0,00228	0,950	0,00760

* Antatt innvekt på 1,5 g

Instrumentets LOD, bestemt ved hjelp av syntetiske blankprøver, var 0,0055 µg/l. Disse blankprøvene var kun tilsatt HNO₃ i deionisert vann for å oppnå samme syrekonsentrasjon som kalibreringsstandardene for instrumentet.

4.6 Presisjon i metoden ved bestemmelse av MeHg i rogn og sediment

Metodens presisjon skulle beregnes ut i fra seks paralleller av rognprøvene. En av parallellene viste seg ved hjelp av Q-testen å være en uteligger (vedlegg 7), og ble derfor utelatt i beregningen av presisjonen. Standardavviket for prøvene var på 0,00017 mg/kg og RSD på 0,45 %.

Presisjonen ble også beregnet ut fra seks paralleller av sedimentprøvene som ligger lavere i måleområdet enn rogn. SD for disse var på 0,00019 mg/kg mens RSD var på 6,9 %.

Resultatet for begge målingene kan sees i tabell 4.3.

Tabell 4.3: Målte verdier av MeHg i rogn og sediment, samt beregnet gjennomsnitt, SD og RSD.

	Rogn	Sediment
Parallell	MeHg (mg/kg)*	MeHg (mg/kg)*
1	0,0378	0,0028
2	0,0381	0,0028
3	0,0379	0,0026
4	0,0379	0,0030
5	0,0382	0,0026
6	-	0,0030
Gjennomsnitt	0,0380	0,0028
SD	0,00017	0,00019
RSD	0,45 %	6,9 %

* RSD i siste rad er ikke oppgitt i mg/kg men i %.

4.7 Bestemmelse av MeHg og total Hg i prøver av fisk og sediment

Metylkvikksølv og totalt kvikksølv ble bestemt i muskelprøver, lever og rogn fra ferskvannsfisken lake. Fisken ble fanget i Glomma i Eidsberg/Skiptvet kommuner i februar 2010, var 74 cm lang og veide omtrent 4,5 kg. MeHg og totalt Hg ble også bestemt i sedimenter fra Bjørvika i Oslofjorden. Prøvene var tatt fra omtrentlig de øverste 25 cm av sedimentene. Målte verdier samt beregnet andel MeHg av total Hg ut fra middelverdiene, er vist i tabell 4.4.

Tabell 4.4: Innhold av MeHg og totalt Hg i fiskeslaget lake og i sediment fra Bjørvika. Tallene på muskelprøvene viser til området på fisken prøvene ble tatt fra som vist i figur 3.3.

Prøve	MeHg (mg/kg)	Totalt Hg (mg/kg)	Andel MeHg (%)
Muskel 1	0,39 ± 0,028	0,42 ± 0,015	94
Muskel 2	0,46 ± 0,020	0,516 ± 0,0045	88
Muskel 3	0,50 ± 0,015	0,54 ± 0,013	91
Lever	0,202 ± 0,0019	0,228 ± 0,0050	89
Rogn	0,0380 ± 0,00017	0,0419 ± 0,00039	91
Sediment	0,0028 ± 0,00019	7,2 ± 0,51	0,04

5 Diskusjon

5.1 Nøyaktighet i metoden

5.1.1 Sertifiserte referansematerialer

Med hensyn på å forenkle metoden var det ønskelig å erstatte dobbel ekstraksjon med enkel ekstraksjon. For å oppnå god nøyaktighet i metoden er det avgjørende at ekstraksjonen er effektiv, slik at all MeHg overføres fra væskefasen til den organiske fasen. Det måtte derfor undersøkes at effektiviteten ikke ble redusert ved bruk av enkel ekstraksjon. Ved enkel ekstraksjon samsvarte de målte verdiene med det sertifiserte området, mens med dobbel ekstraksjon ble resultatet noe lavere. Effektiviteten ved enkel ekstraksjonen ser derfor ikke ut til å reduseres i forhold til dobbel ekstraksjon. Forbedret nøyaktighet i metoden ved enkel ekstraksjon kan ha sammenheng med at det ved bruk av dobbel ekstraksjon kreves et fullstendig uttak av toluen uten at det følger med forurensning fra syrefasen. Dette er fordi tilstedeværelse av HBr når MeHg skal tilbakeekstraheres med L-cystein, kan påvirke likevekten mot fritt L-cystein og molekylært CH_3HgBr , og dermed hindre fullstendig overføring fra toluen til L-cystein (Stevens & Robertson 1974). Uttak av all toluen kan vanskelig la seg gjøre uten at noe av den organiske fasen går tapt. Det ble antatt at MeHg var homogent fordelt i toluen etter ekstraksjon. Ved enkel ekstraksjon kunne det derfor tas ut et mindre, men eksakt volum av den organiske fasen for tilbakeekstraksjon. Det totale innholdet av MeHg kunne så beregnes da benyttet volum var kjent. På denne måten unngås det at organisk fase går tapt, samtidig som faren for tilstedeværelse av HBr i toluen reduseres. Enkel ekstraksjon ble valgt for videre bruk i metoden da dette så ut til å forbedre metodens nøyaktighet samtidig som det forenklet metoden. En annen fordel er at forbruket av toluen reduseres med 10 ml per prøve ved bruk av enkel ekstraksjon.

Med det andre biologiske referansematerialet som ble benyttet for å undersøke metodens nøyaktighet, DOLT-4, ble det som tidligere nevnt dannet emulsjon i ekstraksjonstrinnet (figur 5.1). Emulsjon er fordeling av én væske som små dråper i en annen væske, hvor de to væskene ikke er blandbare (Brekke 2010). Det antas at emulsjonen ble dannet på grunn av høyt fettinnhold i referansematerialet (Maggi *et al.* 2009). Det var viktig å finne en god metode for å løse emulsjon da dette problemet kan oppstå også ved analyse av andre typer prøver. Bruk av etanol løste emulsjonen, men det ble liggende et lag mellom syrefasen og den organiske fasen som gjorde det vanskelig å ta ut 20 ml toluen slik det ble gjort med DORM-2.



Figur 5.1: Emulsjon dannet ved ekstraksjon av MeHg med toluen i SRM DOLT-4 (fiskelever).

Dette gjorde at det ble tatt ut et noe mindre volum av toluen (10-15 ml) for tilbakeekstraksjon med L-cystein. Da MeHg er antatt å være homogent fordelt i toluen, ble ikke dette forventet å ha noen innvirkning på resultatet. Målte verdier av DOLT-4 var innenfor det sertifiserte området. Bruk av etanol virker derfor å være en tilfredsstillende metode for å løse emulsjon i prøver.

Bestemmelse av MeHg i sedimenter blir ofte beskrevet som vanskelig sammenlignet med biologiske prøver (Liang *et al.* 2004). Også i denne oppgaven ble det opplevd større vansker med bestemmelse av MeHg i ERM-CC580 enn i DORM-2 og DOLT-4. Problemene kom hovedsakelig av høye blankverdier. Sedimenter som ikke kommer fra svært forurensede områder har lavt innhold av MeHg. Forhøyde bakgrunnsverdier, som ikke nødvendigvis medfører problemer ved analyse av prøver med høyt innhold av MeHg, kan ha stor innvirkning på resultatet ved bestemmelse av MeHg i sedimenter. Målt verdi av MeHg i ERM-CC580 gav først et resultat som var høyere enn det sertifiserte området. Blankverdiene viste seg imidlertid å overstige LOQ og ble derfor trukket fra den målte verdien. De høye verdiene i blank var ikke like tydelige ved analyse av DORM-2 og DOLT-4. Dette var på grunn av det høye innholdet av MeHg i disse prøvene og på grunn av at DORM-2 og DOLT-4 ble fortynnet henholdsvis 30 og 18 ganger etter oppslutning, mot 4 ganger for ERM-CC580. Dette førte til at forurensning i blank ble fortynnet bort.

Blankprøver kan avdekke eventuelle systematiske feil i metoden, som for eksempel forurensning fra reagenser eller utstyr. En mulig årsak til høye blankverdier er forurensninger i L-cysteinløsningen. L-cystein fra to ulike leverandører, Merck og Sigma-Aldrich, ble prøvd ut. Med L-cystein fra Sigma-Aldrich ble det målt blankverdier som var omtrent dobbelt så høy som med den fra Merck. Det ble ikke funnet L-cystein hvor renhet med hensyn på Hg var oppgitt. Dersom L-cystein er kilden til forurensningen kan en mulig løsning på problemet være å benytte en annen kompleksbinder for tilbakeekstraksjon. Natriumtiosulfat, 2-mercaptoethanol eller natriumsulfid er blitt foreslått for ekstraksjon av MeHg fra organisk fase (Leermakers *et al.* 2005; Westoo 1967). Alternativt kan L-cystein forsøkes å renses før bruk.

En annen årsak til høye blankverdier som ble undersøkt var forurensning fra teflonrørene brukt til oppslutning. Mohanathas (2010) detekterte kvikksølv i enkelte teflonrør som ble benyttet for oppslutningen. Dersom kvikksølv fra prøvene fester seg i veggene på teflonrørene vil dette, i tillegg til å være et problem med hensyn på forurensning, også kunne være en kilde til tap av analytt. Dette kan være en medvirkende årsak til høye verdier i blank. Deteksjon av kvikksølv i enkelte av rørene viser at grundig vask av teflonrørene etter oppslutning er viktig. Dette gjøres vanligvis ved å legge rørene i syrebad inneholdende 1:1 HNO₃ og vann. Dersom det er høye konsentrasjoner i prøvene bør ekstra vasking utføres ved at det gjennomføres en oppslutning med ren HNO₃.

Et annet problem ved bestemmelse av MeHg i sedimenter er kunstig dannelse av MeHg, noe som er beskrevet av flere forfattere (Bloom *et al.* 1997; Hintelmann 1999; Leermakers *et al.* 2005; Uria & Sanz-Medel 1998). Dette skjer ved ekstraksjon av MeHg fra prøvematriksen som følge av tilstedeværelse av naturlige organiske forbindelser som kan avgi metylgrupper. Kunstig metylering virker å forekomme i større eller mindre grad avhengig av teknikken som benyttes for ekstraksjon. Både bruk av syrer, baser og destillasjon for frigjøring av MeHg har vist seg å kunne forårsake kunstig metylering. Flere forfattere har funnet at destillasjon gir høyest grad av kunstig metylering, mens en blanding av KBr, H₂SO₄ og CuSO₄ før ekstraksjon med diklormetan, er den teknikken hvor det dannes minst kunstig MeHg. Kunstig metylering forekommer ikke bare i sedimenter, men i flere andre prøvematrikser som vann, barnåler, alger og referansematerialer for fisk (Bloom *et al.* 1997; Hintelmann 1999). Problemet virker for øvrig å være mest utbredt ved analyse av sedimenter da andelen av MeHg vanligvis er svært lav. I sedimenter fra norske innsjøer som ikke er direkte forurenset fra punktkilder er verdiene av kvikksølv funnet å kunne variere mellom omtrent 0,05 mg/kg til 1 mg/kg (Rognerud & Fjeld 2001). MeHg utgjør omtrent 0,1 til 1,5 % av denne totale verdien (Harrington 2000). Da forholdet mellom uorganisk kvikksølv og MeHg er svært høyt, vil bestemmelsen av MeHg kunne påvirkes i betydelig grad selv om kun en liten andel av uorganisk kvikksølv omdannes. Innhold av organisk materiale i prøvene virker å være en avgjørende faktor. Bloom *et al.* (1997) fant at det ble dannet minst kunstig MeHg i sedimenter med lavt innhold av organisk materiale. I vann virker kunstig metylering også å øke med innhold av organisk materiale, samt med konsentrasjonen av Hg²⁺ i vannet. Dette kan derfor være et problem også i vann med mye organisk materiale. I fisk er andelen av MeHg så høy at eventuell dannelse av kunstig MeHg ikke vil innvirke på resultatet.

I ERM-CC580 som ble benyttet i denne oppgaven er andelen av MeHg kun 0,057 % av total Hg. Dannelse av kunstig MeHg vil derfor kunne være av betydning for bestemmelse av MeHg i dette referansematerialet. Hintelmann (1999) fant at 0,006-0,05 % av tilsatt uorganisk kvikksølv ble omdannet til MeHg, avhengig av benyttet teknikk. Dersom dette gjelder for naturlig organisk kvikksølv, ville det i ERM-CC580 medført en overestimering på 10-88 %. God overensstemmelse mellom målte verdier og sertifiserte områder i SRM tyder for øvrig på at dette ikke er et problem ved denne metoden. Det er imidlertid viktig å være oppmerksom på muligheten for at dette kan forekomme og at det kan påvirke metodens nøyaktighet.

Ved bestemmelse av MeHg i sedimenter, var det i metoden utformet av Maggi *et al.* (2009) benyttet HCl i syretrippet i stedet for HBr. Frigjøring av MeHg som bromid har for øvrig vist seg å være enklere enn frigjøring som klorid i biologiske prøver, og HBr har også vist seg å effektivt frigge MeHg fra sedimenter (Stevens & Robertson 1974). I tillegg er det vist at ekstraksjon fra væskefase til toluen er mer effektiv for CH₃HgBr enn CH₃HgCl som beskrevet i avsnitt 2.3.1. I denne oppgaven ble det utført et forsøk hvor HCl ble benyttet i stedet for HBr for frigivning av MeHg i SRM DORM-2. Målte verdier av MeHg ble da lavere enn ved bruk av HBr, noe som støtter tidligere funn om forenkling av frigjøring av MeHg som bromid eller mer effektiv ekstraksjon. Da data i litteraturen indikerer at HBr kan gi bedre resultater enn HCl, samt at det var ønskelig å ha en felles metode som kunne benyttes både for biota og sediment, ble HBr benyttet for sedimenter i denne oppgaven. Dette gav gode resultater som samsvarte med SRM. Hydrogenbromid antas derfor å være velegnet for frigjøring av MeHg, også fra sedimenter.

Nøyaktighet er samsvar mellom målt verdi og sann verdi (Skoog *et al.* 2004). For alle de tre benyttede referansematerialene, DORM-2, DOLT-4 og ERM-CC580, var det god overensstemmelse mellom målte verdier og sertifiserte områder. Dette tyder på at metodens nøyaktighet er god. God nøyaktighet i metoden indikerer at alle leddene i metoden fungerer etter sin hensikt. Det vil si at MeHg frigjøres i stor grad fra prøvematriksen ved bruk av HBr og at ekstraksjon med toluen og tilbakeekstraksjon med L-cystein er effektiv. Oppslutningen i UltraClave virker å være fullstendig og deteksjonen kvantitativ.

Maggi *et al.* (2009) analyserte referansematerialene DORM-2, DOLT-3 (tidligere batch av DOLT-4) og BCR-580 (opprinnelig navn på ERM-CC580). Verdiene for DORM-2 og DOLT-3 var noe lavere enn det sertifiserte området, mens BCR-580 var innenfor oppgitte

verdier. Noe bedre resultater ble dermed oppnådd for DORM-2 og DOLT-3 med metoden benyttet i denne oppgaven. Årsaken kan være de nevnte forbedringene ved bruk av enkel ekstraksjon. Valg av instrument kan også ha hatt betydning for resultatet. Det er ikke beskrevet hvordan emulsjon i DOLT-3 ble løst, noe som kan ha medvirket til forholdsvis lave måleverdier i dette referansematerialet.

5.1.2 Gjenfinning av standard

Gjenfinning av MeHg i spiket blank var lav når MeHg ble tilsatt i HBr og vanlig prosedyre for enkel ekstraksjon ble fulgt. Omtrent all MeHg ble imidlertid funnet igjen når spikingen ble utført direkte i toluen eller i L-cystein. Dette tydet på at noe MeHg tapes i syretrinet. Det ble derfor undersøkt om ristetiden med HBr hadde innvirkning på resultatet. Figur 4.2 viser tydelig at tapet av MeHg ble mindre når ristetiden ble redusert. En mulig forklaring kan være at MeHg fester seg i veggene på beholderne i dette trinnet. Dette virker for øvrig ikke å være et problem etter at toluen og L-cystein er tilsatt. SRM DORM-2 og ERM-CC580 ble også spiket med MeHg. I disse tilfellene ble det ikke observert store tap av spiket MeHg når vanlig prosedyre ble fulgt. En årsak til dette kan være at når det er prøvemateriale til stede vil det være mange ioner i løsning som kan okkupere bindingsplassene på beholderveggene, og dermed hindre MeHg i å binde seg i like stor grad. Bruk av beholdere med andre materialer, som glass eller teflon, kan muligens redusere dette tapet.

Når risting med HBr ble unngått, slik at toluen ble tilsatt umiddelbart etter spiking med MeHg, ble gjenfinningen betraktelig bedre. Den var allikevel lavere enn ved spiking direkte i toluen eller i L-cystein som vist i figur 4.3. Dersom binding til beholderveggene skjer svært raskt, kan dette være årsaken til tap, selv når toluen tilsettes rett etter spiking. En annen mulig forklaring er at ekstraksjonen fra væskefase til organisk fase er ufullstendig. Det er vist at ved bruk av HCl kan noe MeHg bli værende i vannfasen etter ekstraksjon med organisk løsemiddel (Westoo 1966). Dette kan være tilfellet også ved bruk av HBr selv om ekstraksjonen forbedres ved bruk av HBr i stedet for HCl som beskrevet i avsnitt 2.3.1. HBr ble tilsatt til noen paralleller som var spiket med MeHg i toluentrinnet. Dette gav omtrent samme gjenfinning som når spikingen ble utført i HBr (figur 4.3). Dette kan tyde på at tilstedeværelse av HBr påvirker likevekten av fordeling mellom syrefasen og toluen.

Problemene som oppstod ved analyse av blank spiket med MeHg virket ikke å gjøre seg gjeldende ved analyse av SRM. Tap av analytt ved behandling av HBr som beskrevet i dette avsnittet vil derfor trolig ikke være et problem ved bestemmelse av MeHg i biota og sediment. Dersom spiket MeHg oppfører seg likt som MeHg i virkelige prøver kan for øvrig dette være et problem dersom metoden skal benyttes til bestemmelse av MeHg i andre prøvematrikser, som for eksempel vann. Forsøket viser at syretrinnet, eller overgangen fra syre til toluen trolig er det mest kritiske trinnet, noe som en bør være oppmerksom på ved bruk av metoden.

5.2 Spesifisitet i metoden

Den benyttede metoden er en indirekte bestemmelse av MeHg da det er Hg^{2+} som reduseres til Hg^0 og dermed detekteres i instrumentet. Det er viktig at ekstraktet som oppsluttes i UltraClave kun inneholder MeHg, da eventuelle andre former for Hg vil oksideres til Hg^{2+} sammen med MeHg. Hg^{2+} er den viktigste formen for kvikksølv i miljøet i tillegg til MeHg, og vil i enkelte prøvematrikser utgjøre en stor andel av det totale kvikksølvinnholdet. Resultatene fra bestemmelsen av MeHg i DORM-2 som var spiket med Hg^{2+} og ikke-spiket DORM-2 var omtrent like, både ved enkel og dobbel ekstraksjon. Dette tyder på at Hg^{2+} separeres effektivt ut i ekstraksjonen og ikke påvirker analysen på noen måte.

Med unntak av EtHg, er det som nevnt under teorikapittelet ikke funnet noe i litteraturen om eventuelle andre organiske former for kvikksølv kan ekstraheres ut med toluen og tilbakeekstraheres med L-cystein. Konsentrasjonen av andre organiske kvikksølvforbindelser i naturlige prøver vil for øvrig trolig ikke være høy nok til å kunne påvirke resultatet i betydelig grad. Denne usikkerheten angående tilstedeværelse av eventuelle andre kvikksølvforbindelser er en av ulempene ved bruk av ikke-kromatografisk separasjon i kombinasjon en deteksjonsteknikk som ikke er spesifikk for MeHg. Overensstemmelse med SRM er imidlertid en god indikasjon på at det er MeHg som måles. Utelukking av interferens fra andre specier, i dette tilfellet Hg^{2+} som antas å være den specien som utgjør størst fare for interferens, bidrar til å styrke antakelsen om at det er MeHg som detekteres. Spiking kan også gjøres med andre kvikksølvforbindelser dersom det er mistanke om påvirkning fra disse. Det eksisterer for øvrig en viss usikkerhet til om spikede forbindelser oppfører seg likt som tilsvarende forbindelser i naturlige prøver.

Deteksjonsteknikken, CV-AAS, er en teknikk med forholdsvis få interferenser. De fleste spektrale interferenser unngås ved at kvikksølv fjernes fra matrisen (Nunes *et al.* 2005). Ionisasjonsinterferenser, det vil si dannelse av ioner som absorberer på andre bølgelengder enn nøytrale atomer, kan være et problem i teknikker hvor atomiseringen foregår ved høy temperatur, som flamme-AAS og ICP-MS (Skoog *et al.* 2007). Dette er ikke et problem i CV-AAS, da det ikke benyttes høye temperaturer i atomiseringstrinnet. Kjemiske interferenser kan imidlertid forekomme ved bruk av CV-AAS. For eksempel vil tilstedeværelse av jodid føre til redusert signal da det kan dannes Hg_2I_2 eller HgI_2 som ikke reduseres av SnCl_2 (Lohne 2009). Andre grunnstoffer som er funnet å kunne interferere med målingen er Se, Ag, Au, Te og Pt (Gjengedal 2009a).

Tilstedeværelse av flyktige nitrogenoksider kan interferere med målingen. Forbindelser som NO_2 , NO og N_2O_4 kan dannes i prøvene under opplutning med HNO_3 . Dette problemet er mest utbredt ved opplutning i åpne beholdere hvor opplutningen ikke er fullstendig og det blir værende igjen en rest av organisk materiale sammen med nitrogenoksidene (Nunes *et al.* 2005). I denne oppgaven benyttes lukkede beholdere ved opplutning av prøven i UltraClave og det blir værende igjen lite organisk materiale ved bruk av HNO_3 og høy temperatur. Ved fare for dannelse av nitrose gasser bør det imidlertid tilsettes et oksidasjonsmiddel som H_2O_2 i prøvene som oksiderer disse gassene. Effektiviteten av opplutningen ble undersøkt ved opplutning av MeHg-standard. Dette gav en gjenfinning på nær 100 %, noe som viser at opplutning av denne var fullstendig og at MeHg ble effektivt brutt ned til Hg^{2+} . Det samme antas å gjelde for SRM på grunn av god overensstemmelse med sertifiserte verdier. Opplutning av DORM-2 med 1 ml, 1,5 ml og 2,5 ml gav alle gode måleresultater. Dersom det ikke er tilsatt tilstrekkelig mengde syre vil dette også kunne sees ved at løsningen blir farget. For opplutning av prøvene av fisk og sedimenter i denne oppgaven ble det benyttet 1,5 ml HNO_3 . Det ble ikke påvist noen form for interferens i metoden i dette arbeidet.

5.3 Deteksjonsgrense og kvantifiseringsgrense

Metodens LOD og LOQ var på henholdsvis 0,0074 $\mu\text{g/l}$ og 0,025 $\mu\text{g/l}$, eller 0,000059 mg/kg og 0,00020 mg/kg dersom innvekt på 1,5 g ble antatt. Disse verdiene ble beregnet ut fra tre paralleller av blank som ble analysert forholdsvis tidlig i prosessen med metodeutviklingen. Som omtalt i avsnitt 5.1.1 var blankverdiene høye, trolig på grunn av forurensning fra reagenser og utstyr. Underveis i metodeutviklingen ble det imidlertid også opplevd problemer

med ujevne måleverdier i blank. Laveste og høyeste verdi målt i blank i løpet av prosessen var henholdsvis 0,36 µg/l og 0,74 µg/l. Ujevne målinger gir et høyt standardavvik og dermed høy LOD og LOQ. Oppgitt LOD og LOQ er den optimale verdien som ble oppnådd. Dette er for øvrig et trinn i metodeutviklingen som må anses som uferdig, da grunnlaget for bestemmelse av disse grenseverdiene ikke er godt nok. Problemet med høye blankverdier og årsaken til variasjonene i målingene må undersøkes nærmere før LOD og LOQ kan fastslås med større sikkerhet. Som tidligere nevnt er det antatt at L-cystein er en kilde til forurensning. Dette gir forhøyde verdier, men kan ikke forklare variasjonene i blank, da forurensningen fra reagensen vil være lik i alle tilfellene. Forurensning fra teflonrørene benyttet i oppslutningen vil imidlertid kunne gi utslag i ujevne målinger, da bidraget fra denne kilden til forurensning ikke vil være likt i alle prøvene. Arbeidet utført av Mohanathas (2010), hvor forurensning fra teflonrørene ble undersøkt, viste at innholdet av MeHg i rørene varierte. Av 5 undersøkte rør hadde 2 verdier på over 0,4 µg/l mens de 3 resterende målte lavere enn 0,04 µg/l. Dette viser at bidragene fra teflonrørene kan føre til betydelige forskjeller ved analyse av blank.

En annen faktor som kan bidra til økt SD er at målingene kan være ustabile lavt i måleområdet. Økt antall ganger fortynning i blank gir lavere måleverdier da forurensningene blir fortynnet ut. Dersom målingene blir mer ustabile jo lavere konsentrasjoner som måles, kan dette bidra til at LOD og LOQ ble høyere når disse ble beregnet ut fra blank som var fortynnet flere ganger, som vist i tabell 4.2. Disse verdiene for LOD og LOQ var ikke relevante for analyse av prøver i denne oppgaven da prøvene hadde lavt innhold av MeHg og ikke krevde mye fortynning etter oppslutning. De ble imidlertid brukt for å undersøke om blankverdiene oversteg LOQ ved de aktuelle fortynningene og dermed måtte tas hensyn til.

I løpet av det tidsrommet hvor arbeidet med oppgaven pågikk ble det ikke funnet en løsning på problemet med høye og varierende verdier i blank. Dersom dette ikke løses vil ikke de oppgitte verdiene for LOD og LOQ være gjeldende for metoden. Disse verdiene ble beregnet forholdsvis tidlig i metoden. Teflonrørene var da nylig innkjøpt og dermed lite brukt. Forurensning fra teflonrør kan være et økende problem etter hvert som rørene blir benyttet. Dersom dette er tilfellet vil LOD og LOQ kun være gjeldende for rene teflonrør. Det må da undersøkes om det er mulig å vaske rørene slik at en unngår forurensning, for eksempel ved oppslutning med syre før hver analyse. Alternativt kan det undersøkes om det samme problemet oppstår dersom kvartsrør benyttes for oppslutning. For at de oppgitte verdiene for LOD og LOQ skal kunne benyttes, eller om mulig forbedres, er det avgjørende at årsaken til

variasjonen i blankprøver utarbeides. Dersom det ikke blir funnet en løsning på problemene må LOD og LOQ revurderes. Det må da også undersøkes om LOQ er tilfredsstillende for bruk av metoden til bestemmelse av MeHg i prøvematrikser med lavt innhold av MeHg, som i sedimenter. Alternative reagenser for tilbakeekstraksjon, eventuelt rensing av L-cystein, videre undersøkelse av mulig forurensning fra teflonrør samt optimalisering av instrumentet med hensyn på å gi stabile målinger lavt i måleområdet er tiltak som bør gjøres før bestemmelse av endelige verdier for LOD og LOQ. Instrumentets LOD på 0,0055 µg/l viser verdien for deteksjonsgrensen som potensielt kan oppnås med dette instrumentet, dersom denne ikke begrenses av forurensninger gjennom prøveopparbeidelsen.

Uria & Sanz-Medel (1998) mente at en metode for bestemmelse av individuelle kvikksølvspecier som skal benyttes for virkelige prøver bør ha en deteksjonsgrense lavere enn 1 µg/l. Den foreløpige deteksjonsgrensen ved denne metoden er betydelig lavere enn dette. For at LOD og LOQ skal være tilfredsstillende bør verdiene for øvrig være lavere enn innholdet i prøvematerialene det er ønskelig å analysere. Grenseverdiene ble omregnet fra µg/l til mg/kg med antatt innvekt på 1,5 g for å kunne sammenligne disse med kjente verdier i fisk og sedimenter. Rognerud & Fjeld (2002) bestemte kvikksølvinnholdet i de viktigste fiskeartene i 20 innsjøer i Hedmark. De rapporterte om verdier fra 0,05 mg/kg og opp til 4 mg/kg. Metylkvikksølv utgjør den største andelen av det totale kvikksølvinnholdet i fisk og vil derfor være omtrent i det samme intervallet (Rognerud & Fjeld 2002). Disse verdiene er godt over LOQ som er på 0,00020 mg/kg. I sedimenter er innholdet av MeHg som tidligere nevnt betydelig lavere. Etter en undersøkelse av 210 innsjøer i Norge ble gjennomsnittlig verdi for totalt kvikksølv funnet å være 0,26 mg/kg i overflatesedimentene (Rognerud & Fjeld 2001). Ved å anta at MeHg utgjør 0,1 % av denne verdien vil konsentrasjonen av MeHg være 0,00026 mg/kg. Denne verdien er over LOQ. Med tanke på at både konsentrasjonen av totalt innhold i sedimenter og andelen av MeHg kan variere, i tillegg til de omtalte usikkerhetene med LOQ, kan det vanskelig fastslås med sikkerhet at metoden kan benyttes for bestemmelse av MeHg i alle sedimenter. Ved lave konsentrasjoner i prøvene kan imidlertid enkelte grep gjøres for å overkomme LOQ. Det kan benyttes en høyere innvekt eller færre fortyninger. En mulighet kan også være å forsøke å benytte et mindre volum av L-cystein for tilbakeekstraksjon, noe som vil oppkonsentrere prøven. Dersom dette reduserer effektiviteten av tilbakeekstraksjonen kan det forsøkes med økt konsentrasjon av L-cysteinløsningen. Westöö (1968) fant at en økning i konsentrasjonen fra 1 % til 10 % gav forbedret ekstraksjon.

5.4 Presisjon i metoden ved bestemmelse av MeHg i rogn og sediment

Gjentatte paralleller tatt fra rogn og sediment ble brukt til å vurdere presisjonen til metoden. SD og RSD for parallellene av rogn var på henholdsvis 0,00017 mg/kg og 0,45 %. For sedimentene var de tilsvarende verdiene på 0,00019 mg/kg og 6,9 %. Høyere RSD for sediment kommer av at innholdet av MeHg er lavere enn i rogn (0,0028 mg/kg mot 0,0380 mg/kg i rogn). Det var ønskelig å kunne bestemme MeHg med minst to signifikante siffer. Med de oppnådde SD kan MeHg bestemmes med 3 signifikante siffer. Metodens presisjon er derfor godkjent med hensyn på det som var det opprinnelige målet.

Rogn ble valgt blant fiskeprøvene for bestemmelse av presisjon da denne prøvematriksen var lett å homogenisere. RSD ble også beregnet for parallellene til muskelprøvene og fra lever. RSD for lever, som også enkelt kunne homogeniseres med stavmikseren, var på 0,93 %. RSD for fiskemuskel var noe høyere, fra 3 til 7 %. Høyere RSD for disse prøvene antas å komme av vanskeligheter med å homogenisere prøvene. Tilsats av mer vann før homogenisering med stavmikseren kunne muligens ha forenklet dette. Homogenisering av prøvematriks er et viktig ledd for å oppnå god presisjon i metoden. Det ble imidlertid ikke lagt stor vekt på teknikken for homogenisering i denne oppgaven. Det ble derfor valgt en matriks som var godt homogenisert for å undersøke hvor god presisjon som kunne oppnås i metoden.

Presisjon i målingene av sedimentene var interessant da disse befant seg lavt i måleområdet. Målte verdier for sedimentene var på omtrent 0,2 µg/l. I avsnitt 5.3 ble det kommentert at målingene var lite presise for blank. Analysen av sedimentene viste at konsentrasjoner ned til 0,2 µg/l kan bestemmes ved denne metoden med god presisjon.

5.5 Linearitet og måleområde

Korrelasjonskoeffisienten for kalibreringskurva beskriver lineariteten til metoden. Kalibreringskurva ble godkjent med en korrelasjonskoeffisient som var høyere enn 0,9998. Lavere verdier enn denne forekom ikke under arbeidet med metoden. Metoden er derfor lineær i området fra LOQ til 10 µg/l. Linearitet ved høyere konsentrasjoner ble ikke undersøkt da det ikke var nødvendig for bruk av metoden.

Ved bruk av CV-AAS beregnes konsentrasjonen av kvikksølv i prøven ved hjelp av nedgang i intensitet i lysstrålen som sendes gjennom prøven basert på Beer-Lambert's lov (Skoog et al. 2007). Målte verdier av prøvene må være innenfor det lineære området. Det validerte område for metoden er derfor fra LOQ til 10 µg/l. Det ble for øvrig benyttet to ulike måleområder, en for prøver med høyt innhold av MeHg som var fra 0 til 10 µg/l, og en for prøver med lavere konsentrasjoner fra 0 til 5 µg/l. Grunnen til at det ble benyttet et "lavt" måleområde var for å bedre nøyaktigheten ved analyse av prøver med lavt kvikksølvinnhold.

5.6 Bestemmelse av MeHg og total Hg i prøver av fisk og sediment

Bestemmelse av total kvikksølv i fisk og sediment ved oppslutning i UltraClave og deteksjon med CV-AAS er en velutviklet og mye benyttet metode internt på UMB. Enkel bestemmelse av total Hg ved bruk av samme instrument er en fordel da det ofte er aktuelt å bestemme dette i tillegg til MeHg. Bestemmelse av MeHg og total Hg i lake viste at mesteparten av kvikksølvet i fisken, både i muskel, lever og rogn, forelå som MeHg. Fra 86 % til 91 % ble funnet å være MeHg. Dette stemmer godt med tidligere funn om at kvikksølv i fisk hovedsakelig foreligger som MeHg. Bestemmelse av total kvikksølv ble utført fire dager etter MeHg. Våtvekten kan være noe forandret på grunn av fordampning. Dette ville i så fall gitt en noe høyere andel av MeHg enn de oppgitte verdiene. Innholdet av MeHg var høyest i muskelprøvene hvor det varierte fra 0,4 til 0,5 mg/kg i de tre ulike prøvene. I to av muskelprøvene var innholdet av total Hg over 0,5 mg/kg som er grensa for omsetning av fisk i Norge. Innholdet av kvikksølv i rogn (0,0380 mg/kg) var lavt i forhold til i muskelprøvene. Dette ble på forhånd antatt å kunne være høyt på grunn av mekanismen for overføring av kvikksølv fra mor til foster.

Det totale kvikksølvinnholdet i sedimentene fra Bjørvika var 7,2 mg/kg. Dette er svært høyt i forhold til verdiene som er funnet i norske innsjøsedimenter av Rognerud & Fjeld (2001), som var mellom 0,05 mg/kg og 1 mg/kg. Disse innsjøene var imidlertid ikke i umiddelbar nærhet til noen utslippskilder. Bjørvika er derimot et forurenset område, slik at noe høyere verdier av total kvikksølv var forventet. Analyse av sedimentene viste at andelen MeHg av total Hg var lav, kun 0,04 %. Sedimentene var tatt fra de øverste 25 cm (Dahl 2010). Metyleringshastigheten er størst i grensesjiktet mellom vann og sedimenter (avsnitt 2.1.2). Andelen av MeHg kan derfor antagelig være høyere i øvre del av sjiktet som prøvene ble tatt fra.

5.7 Stabilitet av MeHg standard

Under metodeutviklingen ble det benyttet MeHg standard. Det var nødvendig å undersøke stabiliteten av denne for å påvise at konsentrasjonen av MeHg ikke endret seg i løpet av prosessen, som følge av endring i specieringen. Standarden på 10 mg/l viste seg å være stabil ved lagring i glass i kjøleskap opp til 1 måned. Stabiliteten ble ikke undersøkt utover dette tidsrommet. Da det ikke ble detektert kvikksølv ved analyse av standard uten oppslutning viste dette at kvikksølvet forelå som MeHg og ikke var omdannet til Hg^{2+} . Dette er samtidig et bevis på at MeHg ikke reduseres av SnCl_2 og dermed ikke detekteres med CV-AAS.

Lagring av MeHg-standard vil ikke være relevant for bruk av denne metoden, da MeHg ikke benyttes i den instrumentelle analysen. Forbindelsen har imidlertid vært benyttet under metodeutviklingen. Ved bruk av MeHg for videre utvikling av metoden er det nyttig å vite at denne kan oppbevares under de gitte forholdene. Dette kan begrense avfall fra denne svært giftige forbindelsen, da samme standard kan benyttes i minst 1 måned.

5.8 Andre hensyn ved metoden

Som tidligere nevnt er MeHg en svært giftig forbindelse. En fordel ved denne metoden er at bruk av denne forbindelsen unngås, da instrumentet kalibreres ved hjelp av Hg^{2+} . Bruk av MeHg bør begrenses, både av hensyn til helse for de som arbeider med metoden og med tanke på miljø. Selv om Hg^{2+} også er en giftig forbindelse er det mindre risiko knyttet til denne enn MeHg.

Toluen som benyttes i denne metoden er også en helseskadelig forbindelse som bør håndteres med varsomhet. Langvarig eksponering gjennom innånding kan gi alvorlige helseskader. Det er fare for lungeskader dersom forbindelsen svelges, og det er en mulighet for at det kan gi fosterskade dersom gravide blir eksponert for forbindelsen. Alt arbeid med toluen ble utført i avtrekkskap. Toluene er biologisk nedbrytbar, og ved utslipp i miljøet vil det meste dunste av. Det antas derfor ikke å gi langvarige skadelige effekter. Ved eksponering av vannlevende organismer er det for øvrig vist at det kan føre til stor dødelighet selv i små konsentrasjoner (VWR 2008). Bruk av alle skadelige forbindelser bør begrenses til et minimum. Ved denne metoden benyttes det et forholdsvis stort volum av toluen (25 ml) til hver prøve. De 20 ml toluen som tas ut for tilbakeekstraksjon "renses" ved hjelp av L-cystein og bør derfor være

ren med hensyn på kvikksølv. Gjenbruk av toluen kan derfor være mulig for å redusere forbruket av toluen. Selv om dette ville være hensiktsmessig med tanke på forbruket av toluen, vil eksponering for de som arbeider med metoden være den samme. Det ble foretatt litteratursøk for å finne alternative forbindelser for toluen, men det ble ikke funnet gode erstatninger. Andre organiske løsemidler som har blitt tatt i bruk, som benzen og diklormetan, gir ingen fordeler med hensyn på miljø og sikkerhet.

De øvrige reagensene som benyttes i metoden bør behandles med forsiktighet som alle kjemikalier. Ved bruk av verneutstyr og korrekt håndtering av disse forbindelsene bør de ikke utgjøre en fare for verken helse eller miljø. Alle de benyttede reagensene er forholdsvis rimelig å anskaffe og kostnadene for bruk av CV-AAS og UltraClave er også lave. UltraClave er et instrument som foreløpig ikke er vanlig på mange laboratorier, og som er forholdsvis dyrt å anskaffe. Oppslutningstrinnet er også noe tidkrevende, omtrent 1,5 til 2 timer. Det kan imidlertid oppsluttes 40 prøver samtidig i dette instrumentet. Da ekstraksjonen også er noe arbeidsom ble ekstraksjon og oppslutning ofte utført en dag, mens analysen ble gjort den påfølgende dagen. Dette krever arbeidskraft som vil øke utgiftene for metoden noe. Metoden kan allikevel beskrives som en forholdsvis enkel og rimelig metode som er egnet for rutinemessige analyser.

6 Konklusjon og videre arbeid

Bestemmelse av metylkvikksølv i tre sertifiserte referansematerialer, DORM-2 (fiskemuskel), DOLT-4 (fiskelever) og ERM-CC580 (estuar sediment), viste at det var god overensstemmelse mellom målte verdier og sertifiserte områder. Metodens nøyaktighet anses derfor som god for de undersøkte prøvetypene. Presisjonen i metoden viste seg også å være tilfredsstillende, da MeHg i rogn og sediment kunne bestemmes med tre gjeldende siffer.

Metodens nøyaktighet ble forbedret ved bruk av enkel ekstraksjon med toluen fremfor dobbel ekstraksjon. Dette reduserte også tiden for gjennomføring av analysen. Metoden er allikevel noe tidkrevende. Tiltak som kan vurderes for å korte ned arbeidstiden er å redusere tider for risting og sentrifugering av prøvene, samt å undersøke effekten ved erstatning av dobbel tilbakeekstraksjon med L-cystein, med enkel tilbakeekstraksjon. Metoden er imidlertid enkel og rimelig i bruk, og uten påviste interferenser. Da MeHg bestemmes indirekte ved den benyttede metoden, var det ønskelig å utføre en sammenlignende laboratorieprøving (SLP) for vurdering av metoden mot teknikker som benytter andre analyseprinsipper. Dette var ikke mulig i det gitte tidsrommet arbeidet pågikk, men bør gjøres for en fullstendig validering av metoden.

Metodens kvantifiseringsgrense er beregnet til 0,025 µg/l, eller 0,00020 mg/kg når en innvekt på 1,5 g er antatt. Dette er imidlertid en foreløpig verdi av LOQ. Årsakene til høye og varierende måleverdier i blank må utarbeides før en endelig verdi av LOQ kan bestemmes. L-cysteinløsningen antas å være en kilde til forurensning. Alternative reagenser som kan erstatte L-cystein, eventuelt metoder for rensing av løsningen, bør undersøkes. Videre arbeid bør også utføres for å bestemme om teflonrørene benyttet ved oppslutning kan bidra til høye måleverdier. Det bør undersøkes hvordan disse kan vaskes for å unngå problemet, eller om de eventuelt bør erstattes av kvartsrør. Instrumentet yteevne virker ikke å være en begrensning for metodens LOQ, da dette har en LOD på 0,0055 µg/l.

Metodens anvendelighet ble undersøkt på ulike prøver av fisk og sediment. Det ble ikke målt verdier av MeHg ned mot LOQ i fiskeprøvene. Metoden virker å være tilfredsstillende for bruk til denne prøvematriksen. Videre undersøkelser av flere biologiske prøvetyper bør imidlertid gjøres for å kunne hevde at metoden kan benyttes for biota generelt. Bekreftelse av at metoden fungerer for blant annet seston og zooplankton kan være interessant for

overvåkning av MeHg i akvatiske økosystem. Emulsjon, som kan være et problem ved analyse av biologiske prøver, ser ut til å kunne løses ved tilsats av etanol.

MeHg kunne bestemmes også i sedimentprøver med den foreløpige verdien av LOQ. Nivået i sedimenter er for øvrig lavt og nær LOQ. Bruk av metoden for analyse av sedimenter er derfor noe mer kritisk. Metodens anvendelighet for denne prøvetypen bør vurderes på nytt etter at en endelig verdi for LOQ er bestemt. Lav LOQ vil også være avgjørende dersom metoden skal benyttes for andre prøvematrikser med lavt innhold av MeHg. Blant annet var det ønskelig å benytte metoden for bestemmelse av MeHg i vann. Det lave innholdet av MeHg i vann tilsier imidlertid at et oppkonsentreringstrinn før deteksjon er nødvendig. Dette var tenkt utført ved bruk av gullfelle som kobles til CV-AAS.

En ulempe ved metoden er det forholdsvis høye forbruket av toluen. Erstatning av denne forbindelsen med en mindre skadelig forbindelse ville vært hensiktsmessig, både med tanke på helse og miljø.

Referanser

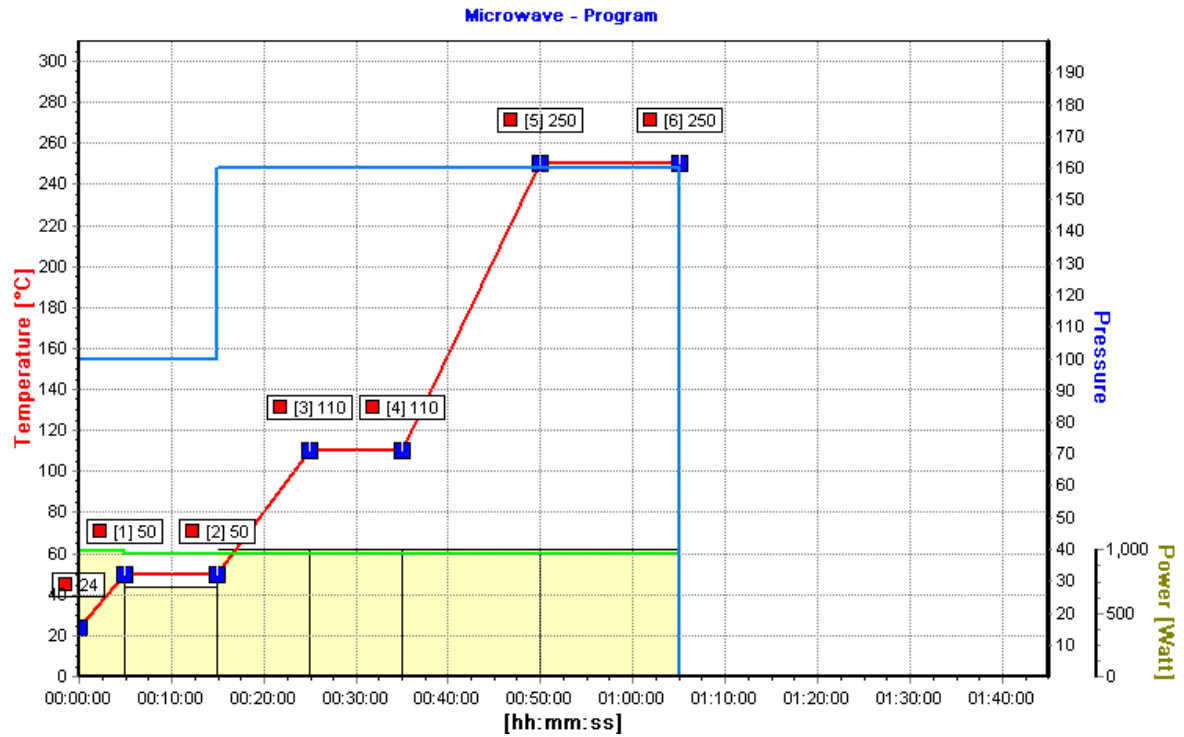
- AMAP. (2005). *AMAP Assessment 2002: Heavy Metals in the Arctic*: Arctic Monitoring and Assessment Programme (AMAP), Oslo. Tilgjengelig fra: <http://www.amap.no/> (Scientific reports) (lest 03.05.10).
- AMAP & ACAP. (2005). *Mercury - a priority pollutant*: Arctic Monitoring and Assessment Programme (AMAP), Arctic Council Action Plan to Eliminate Pollution of the Arctic (ACAP). Tilgjengelig fra: <http://www.amap.no/documents/index.cfm?action=getfile&dirsub=/Fact%20Sheets%20-%20ACAP&FileName=FINAL%20-%20merc%20post%20corrections-101205%20screen.pdf> (lest 03.05.10).
- Bloom, N. S., Colman, J. A. & Barber, L. (1997). Artifact formation of methyl mercury during aqueous distillation and alternative techniques for the extraction of methyl mercury from environmental samples. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 358 (3): 371-377.
- Brekke, M. (2010). *Emulsjon -1* Store norske leksikon.
- Committee on the Toxicological Effects of Methylmercury. (2000). Chemistry, Exposure, Toxicokinetics, and Toxicodynamics. I: *Toxicological Effects of Methylmercury* s. 44: The National Academies Press, Washington DC.
- Dahl, I. (2010). *Personlig meddelelse*: NIVA, Oslo.
- Dittmann, J. A. & Driscoll, C. T. (2009). Factors influencing changes in mercury concentrations in lake water and yellow perch (*Perca flavescens*) in Adirondack lakes. *Biogeochemistry*, 93: 179-196.
- Environment Canada. (2008). *Mercury and the Environment*. Tilgjengelig fra: <http://www.ec.gc.ca/MERCURY/EN/index.cfm> (lest 03.05.10).
- ERM. (2004). *Certificate of analysis ERM-CC580*: European Reference Materials, Geel, Belgia.
- Evans, M. S., Lockhart, W. L., Doetzel, L., Low, G., Muir, D., Kidd, K., Stephens, G. & Delaronde, J. (2005). Elevated mercury concentrations in fish in lakes in the Mackenzie River Basin: The role of physical, chemical, and biological factors. *Science of the Total Environment*, 351: 479-500.
- Fjeld, E. & Rognerud, S. (1993). Use of path-analysis to investigate mercury accumulation in Brown trout (*Salmo-trutta*) in Norway and the influence of environmental-factors. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 50 (6): 1158-1167.
- Fjeld, E., Rognerud, S. & Steinnes, E. (1994). Influence of environmental-factors on heavy-metal concentration in lake-sediments in southern Norway indicated by path-analysis. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 51 (8): 1708-1720.
- Folkehelseinstituttet. (2009). *B.6.07 Metaller*. Oslo. Tilgjengelig fra: http://www.fhi.no/eway/default.aspx?pid=233&trg=MainLeft_6039&MainArea_5661=6039:0:15,4520:1:0:0:::0:0&MainLeft_6039=6041:69495::1:6043:7:::0:0 (lest 30.04.10).
- Gjengedal, E. (2009a). *Chapter 33 Automated Methods of Analysis*. KJM340 Instrumentell uorganisk analyse: Institutt for plante- og miljøvitenskap, Universitetet for miljø- og biovitenskap, Ås.
- Gjengedal, E. (2009b). *Prøvetakning, lagring, forbehandling og oppslutting/dekomponering*. KJM340 Instrumentell uorganisk analyse: Institutt for plante- og miljøvitenskap, Universitetet for miljø- og biovitenskap, Ås.

- Glomstad, B., Mohanathas, L., Jensen, K. A., Lohne, S. & Gjengedal, E. (2010). *Simple determination of methylmercury in sediment and biota*. Nordic Environmental Chemistry Conference, Longyearbyen.
- Gonzalvez, A., Armenta, S., Cervera, M. L. & de la Guardia, M. (2010). Non-chromatographic speciation. *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, 29 (3): 260-268.
- Gustin, M. S., Lindberg, S. E. & Weisberg, P. J. (2008). *An update on the natural sources and sinks of atmospheric mercury*: Pergamon-Elsevier Science Ltd. 482-493 s.
- Harrington, C. F. (2000). The speciation of mercury and organomercury compounds by using high-performance liquid chromatography. *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, 19 (2-3): 167-179.
- Harry, G. J., Harris, M. W. & Burka, L. T. (2004). Mercury concentrations in brain and kidney following ethylmercury, methylmercury and Thimerosal administration to neonatal mice. *Toxicology Letters*, 154 (3): 183-189.
- Hintelmann, H. (1999). Comparison of different extraction techniques used for methylmercury analysis with respect to accidental formation of methylmercury during sample preparation. *Chemosphere*, 39 (7): 1093-1105.
- Issaro, N., Abi-Ghanem, C. & Bermond, A. (2009). Fractionation studies of mercury in soils and sediments: A review of the chemical reagents used for mercury extraction. *Analytica Chimica Acta*, 631 (1): 1-12.
- Jensen, K. A. (2009). *Lukket dekomponering med ultraclave*. KJM340 Instrumentell uorganisk analyse: Institutt for plante- og miljøvitenskap, Universitetet for miljø- og biovitenskap, Ås.
- Klif. (2009). *Kvikksølv*: Miljøstatus i Norge, Klima- og forurensningsdirektoratet. Tilgjengelig fra: <http://www.miljostatus.no/Tema/Kjemikalier/Noen-farlige-kjemikalier/Kvikksolv/> (lest 21.04.10).
- Krabbenhoft, D. P. & Rickert, D. A. (2008). Mercury Contamination of Aquatic Ecosystems USGS (United States Geological Survey), U.S. Department of the Interior
- Leermakers, M., Baeyens, W., Quevauviller, P. & Horvat, M. (2005). Mercury in environmental samples: Speciation, artifacts and validation. *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, 24 (5): 383-393.
- Liang, L., Horvat, M., Feng, X. B., Shang, L. H., Lil, H. & Pang, P. (2004). Re-evaluation of distillation and comparison with HNO₃ leaching/solvent extraction for isolation of methylmercury compounds from sediment/soil samples. *Applied Organometallic Chemistry*, 18 (6): 264-270.
- Lohne, S. (2009). *Kvikksølv i fisk - CVAAS*. KJM340, Instrumentell uorganisk analyse: Institutt for plante- og miljøvitenskap, Universitetet for miljø- og biovitenskap, Ås.
- Maggi, C., Berducci, M. T., Bianchi, J., Giani, M. & Campanella, L. (2009). Methylmercury determination in marine sediment and organisms by Direct Mercury Analyser. *Analytica Chimica Acta*, 641 (1-2): 32-36.
- Margetinova, J., Houserova-Pelcova, P. & Kuban, V. (2008). Speciation analysis of mercury in sediments, zoobenthos and river water samples by high-performance liquid chromatography hyphenated to atomic fluorescence spectrometry following preconcentration by solid phase extraction. *Analytica Chimica Acta*, 615 (2): 115-123.
- Mergler, D., Anderson, H. A., Chan, L. H. M., Mahaffey, K. R., Murray, M., Sakamoto, M. & Stern, A. H. (2007). *Methylmercury exposure and health effects in humans: A worldwide concern*: Royal Swedish Acad Sciences. 3-11 s.
- Milestone. (2003). *DMA-80 Direct Mercury Analyser*: Milestone Inc. Tilgjengelig fra: <http://www.milestonesci.com/merc-tech.php> (lest 19.04.10).

- Mohanathas, L. (2010). *Enkel bestemmelse av metylkvikksølv i ekstraherte og dekomponerte biologiske prøvetyper ved bruk av kalddamp atomabsorpsjonsspektroskopi. Masteroppgave: Universitetet for miljø- og biovitenskap, Ås.*
- Morita, M., Yoshinaga, J. & Edmonds, J. S. (1998). The determination of mercury species in environmental and biological samples (Technical report). *Pure and Applied Chemistry*, 70 (8): 1585-1615.
- Norling, P., Wood-Black, F. & Masciangioli, T. M. (2004). I: *Water and Sustainable Development: Opportunities for the Chemical Sciences - A Workshop Report to the Chemical Sciences Roundtable*, s. 20: The National Academies Press, Washington, DC.
- NRC. (1993). *DORM-2 Dogfish Muscle Certified Reference Material for Trace Metals*: National Research Council of Canada, Ottawa, Canada.
- NRC. (2008). *DOLT- 4 Dogfish Liver Certified Reference Material for Trace Metals*: National Research Council of Canada, Ottawa, Canada.
- Nunes, D. L., dos Santos, E. P., Barin, J. S., Mortari, S. R., Dressler, V. L. & Flores, E. M. D. (2005). Interference of nitrite and nitrogen dioxide on mercury and selenium determination by chemical vapor generation atomic absorption spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy*, 60 (5): 731-736.
- Rognerud, S. & Fjeld, E. (2001). Trace element contamination of Norwegian lake sediments. *Ambio*, 30 (1): 11-19.
- Rognerud, S. & Fjeld, E. (2002). Kvikksølv i fisk fra innsjøer i Hedmark, med hovedvekt på grenseområdene mot Sverige: Norsk institutt for vannforskning (NIVA), Oslo.
- Scheulhammer, A. M., Meyer, M. W., Sandheinrich, M. B. & Murray, M. W. (2007). *Effects of environmental methylmercury on the health of wild birds, mammals, and fish*: Royal Swedish Acad Sciences. 12-18 s.
- Shade, C. W. & Hudson, R. J. M. (2005). Determination of MeHg in environmental sample matrices using Hg-thiourea complex ion chromatography with on-line cold vapor generation and atomic fluorescence spectrometric detection. *Environmental Science & Technology*, 39 (13): 4974-4982.
- Sharma, C. M., Borgstrom, R., Huitfeldt, J. S. & Rosseland, B. O. (2008). Selective exploitation of large pike *Esox lucius* - Effects on mercury concentrations in fish populations. *Science of the Total Environment*, 399 (1-3): 33-40.
- Sigma-Aldrich. (2009). *HMS-Datablad (Methylmercury(II) chloride)*: Sigma-Aldrich Norway AS, Oslo.
- Simpson, R. B. (1961). Association constants of methylmercury with sulfhydryl and other bases. *Journal of the American Chemical Society*, 83 (23): 4711-&.
- Skoog, D. A., West, D. M., Holler, F. J. & Crouch, S. R. (2004). I: *Fundamentals of Analytical Chemistry*, s. 93,168: Thomson Brooks/Cole, Belmont, USA.
- Skoog, D. A., Holler, F. J. & Crouch, S. R. (2007). I: *Principles of Instrumental Analysis*, s. 132, 147-148, 236-237, 245, 249: Thomson Brooks/Cole, Belmont, USA.
- Stevens, A. A. & Robertson, E. A. (1974). Determination of Methylmercury in Water. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 2 (3): 266-274.
- Templeton, D. M., Ariese, F., Cornelis, R., Danielsson, L. G., Muntau, H., Van Leeuwen, H. P. & Lobinski, R. (2000). Guidelines for terms related to chemical speciation and fractionation of elements. Definitions, structural aspects, and methodological approaches (IUPAC Recommendations 2000). *Pure and Applied Chemistry*, 72 (8): 1453-1470.
- Ullrich, S. M., Tanton, T. W. & Abdrashitova, S. A. (2001). Mercury in the aquatic environment: A review of factors affecting methylation. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 31 (3): 241-293.

- Uria, J. E. S. & Sanz-Medel, A. (1998). Inorganic and methylmercury speciation in environmental samples. *Talanta*, 47 (3): 509-524.
- vanLoon, G. W. & Duffy, S. J. (2005). Metals and semi-metals in the hydrosphere. I: *Environmental Chemistry A Global Perspective*, s. 290-291: Oxford University Press.
- VWR. (2008). *HMS-datablad Toluene*: VWR International, Stockholm.
- Watras, C. J., Back, R. C., Halvorsen, S., Hudson, R. J. M., Morrison, K. A. & Wentz, S. P. (1998). Bioaccumulation of mercury in pelagic freshwater food webs. *Science of the Total Environment*, 219 (2-3): 183-208.
- Westoo, G. (1966). Determination of methylmercury in foodstuffs. I. Methylmercury compounds in fish, identification and determination. *Acta Chemica Scandinavica*, 20 (8): 2131-2137.
- Westoo, G. (1967). Determination of methylmercury in foodstuffs. 2. Determination of methylmercury in fish, egg, meat and liver. *Acta Chemica Scandinavica*, 21 (7): 1790-1800.
- Westoo, G. (1968). Determination of methylmercury salts in various kinds of biological material. *Acta Chemica Scandinavica*, 22 (7): 2277-2280.
- Wibetoe, G. (2010). *Kvikksølv*: Kjemisk institutt, Universitetet i Oslo. Tilgjengelig fra: <http://www.kjemi.uio.no/periodesystemet/vis.php?e=Hg&vis=alt> (lest 03.05.10).
- Wikipedia. (2009). *Toluene*. Tilgjengelig fra: <http://no.wikipedia.org/w/index.php?title=Toluene&oldid=6289816> (lest 03.05.10).
- Wikipedia. (2010). *Cysteine*. Tilgjengelig fra: <http://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Cysteine&oldid=353442513> (lest 03.05.10).
- Yassi, A., Kjellström, T., Kok, T. d. & Guidotti, T. L. (2001). I: *Basic environmental health*, s. 258, 345-346: Oxford University Press, New York.

Vedlegg 1: Program benyttet for oppslutning i UltraClave



Figur I: Programmet som ble benyttet for oppslutning. Det ble lagt inn "hviletrinn" ved 50 °C og 110 °C i tilfellet eksoterme reaksjoner i prøvene. Maksimum temperatur var 250 °C.

Vedlegg 2: Innvekter og måledata for SRM DORM-2

Tabell I: Innvekter, målte verdier av MeHg i µg/l og resultat beregnet i mg/kg for DORM-2, og i DORM-2 spiket med 0,3 ml Hg²⁺-standard på 10 mg/l. Spiking førte ikke til betydelig endring i målt konsentrasjon. Prøvene ble fortynnet 30 ganger etter oppslutning. Ved enkel ekstraksjon ble all toluen tatt ut i de fire første parallellene, mens det i de fire siste ble tatt ut 20 av 25 ml toluen for tilbakeekstraksjon.

Enkel ekstraksjon	MeHg (µg/l)	Innvekt (g)	MeHg (mg/kg)
1	6,1	0,5006	4,4
2	6,0	0,5065	4,2
3	6,0	0,5012	4,3
4	5,7	0,5016	4,1
5	4,5	0,4969	4,1
6	4,7	0,5041	4,2
7	4,6	0,5056	4,1
8	4,6	0,5016	4,1
Dobbel ekstraksjon			
1	1,1	0,0987	4,1
2	7,6	0,7042	3,9
3	5,2	0,4995	3,8
Enkel ekstraksjon, spiket			
1	4,6	0,4983	4,1
2	4,6	0,5019	4,1
3	4,6	0,5008	4,1
4	4,6	0,5007	4,1
Dobbel ekstraksjon, spiket			
1	8,0	0,7046	4,1
2	7,8	0,7002	4,0
3	7,7	0,7009	4,0

Eksempel på beregning av innhold av MeHg oppgitt i mg/kg (parallell 8, enkel ekstraksjon):

$$\text{MeHg (mg / kg)} = \frac{4,6 \mu\text{g / l} \cdot \frac{12 \text{ ml} \cdot 30}{1000 \text{ ml / l}} \cdot \frac{25 \text{ ml}}{20 \text{ ml}}}{0,5016 \text{ g}} = 4,1$$

Vedlegg 3: Innvekter og måledata for SRM DOLT-4 og ERM-CC580

Tabell II: Innvekter, målte verdier av MeHg i $\mu\text{g/l}$ og resultat beregnet i mg/kg for DOLT-4 og ERM-CC580. DOLT-4 ble fortynnet 18 ganger etter opplutning, mens ERM-CC580 ble fortynnet 4 ganger. For DOLT-4 ble det tatt ut 15 av 25 ml toluen for tilbakeekstraksjon med unntak av parallell 3 hvor det ble tatt ut 10 ml. Etanol er blandbar med toluen og tilsatt mengde må derfor legges til det totale volumet av toluen. I parallell 1 til 3 ble det tilsatt 3 ml etanol, mens i parallell 4 til 6 ble det tilsatt 4 ml. For ERM-CC580 ble det tatt ut 20 ml toluen. For ERM-CC580 er blankverdi på $0,239 \mu\text{g/l}$ trukket fra.

DOLT-4	MeHg ($\mu\text{g/l}$)	Innvekt (g)	MeHg (mg/kg)
1	1,70	0,5041	1,36
2	1,65	0,5013	1,33
3	1,15	0,5295	1,32
4	1,64	0,5087	1,35
5	1,62	0,4929	1,38
6	1,65	0,4978	1,38
ERM-CC580			
1	0,8510	0,5010	0,073
2	0,8440	0,5038	0,072
3	0,8654	0,5133	0,073
4	0,8475	0,5064	0,072
5	0,8376	0,5035	0,071
6	0,8466	0,5127	0,071

Vedlegg 4: Gjenfinning MeHg-standard

Tabell III: Gjenfinning ved spiking av blank med 0,3 ml av MeHg-standard på 10 mg/l. Hg beregnet er beregnet total verdi når det er tatt hensyn til 30 gangers fortyning og uttakk av 20 av 25 ml toluen for tilbakeekstraksjon. Beregnet verdi av MeHg skal teoretisk være 250 µg/l.

Hg målt (µg/l)	Hg beregnet (µg/l)	Gjenfinning (%)	Merknad
5,631	211,2	84,5	Spiking i HBr, ingen risting
5,653	212,0	84,8	Spiking i HBr, ingen risting
5,772	216,5	86,6	Spiking i HBr, ingen risting
5,335	200,1	80,0	Spiking i HBr, 1 min risting
4,943	185,4	74,1	Spiking i HBr, 1 min risting
1,365	51,17	20,5	Spiking i HBr, 5 min risting
1,363	51,12	20,4	Spiking i HBr, 5 min risting
8,161	244,8	97,9	Spiking i toluen
7,997	239,9	96,0	Spiking i toluen
8,075	242,2	96,9	Spiking i toluen
8,025	240,7	96,3	Spiking i L-cystein
8,035	241,1	96,4	Spiking i L-cystein
8,053	241,6	96,6	Spiking i L-cystein
5,737	215,1	86,0	Spiking i toluen, deretter tilsatt HBr
5,751	215,7	86,3	Spiking i toluen, deretter tilsatt HBr

Tabell IV: Gjenfinning av MeHg-standard lagret ulike tider, oppsluttet og ikke oppsluttet. 40 µl av MeHg-standard på 10 mg/l ble fortennet til 75 ml. Teoretisk verdi er derfor 5.33 µg/l.

Hg (µg/l)	Gjenfinning (%)	Merknad
5,217	97,8	Lagret 1 dag, oppsluttet
5,261	98,7	Lagret 1 uke, oppsluttet
5,311	99,6	Lagret 1 måned, oppsluttet
0,094	1,8	Lagret 1 dag, ikke oppsluttet
-0,006	-0,1	Lagret 1 uke, ikke oppsluttet
0,020	0,4	Lagret 1 måned, ikke oppsluttet

Vedlegg 5: Innveker og måledata, MeHg i fisk og sediment

Tabell V: Måledata for bestemmelse av MeHg i prøver av fisk og sediment. Det ble utført enkel ekstraksjon med uttak av 15 ml toluen for tilbakeekstraksjon for fiskemuskel 1 og 3 og 20 ml toluen for de øvrige prøvene.

Blankverdi på 0,11 µg/l er trukket fra. Andelen vann som ble tilsatt før homogenisering er tatt hensyn til i beregning av MeHg i muskelprøvene. Muskel og lever ble fortynnet 6 ganger mens rogn ble fortynnet 4 ganger.

Fiskemuskel 1	MeHg (µg/l)	Innvekt (g)	Andel vann	MeHg (mg/kg)
1	3,47	1,6159	0,33	0,37
2	3,04	1,4824	0,33	0,35
3	3,56	1,5081	0,33	0,41
Fiskemuskel 2				
1	5,48	1,6791	0,33	0,43
2	5,71	1,6044	0,33	0,47
3	5,49	1,6407	0,33	0,44
Fiskemuskel 3				
1	4,89	1,8326	0,34	0,47
2	4,31	1,5445	0,34	0,49
Lever				
1	3,375	1,5166	-	0,194
2	3,486	1,5514	-	0,196
3	3,507	1,5469	-	0,198
Rogn				
1	2,4798	1,5788	-	0,0901
2	1,1226	1,6070	-	0,0378
3	1,1969	1,7109	-	0,0381
4	1,1606	1,6651	-	0,0379
5	1,1204	1,6011	-	0,0379
6	1,1067	1,5663	-	0,0382
Sediment				
1	0,1934	1,9647	-	0,0059
2	0,1936	2,0061	-	0,0058
3	0,1877	2,0111	-	0,0056
4	0,2036	2,0126	-	0,0061
5	0,1924	2,0621	-	0,0056
6	0,2042	2,0361	-	0,0060

Eksempel på beregning av innhold av MeHg oppgitt i mg/kg (parallell 1, fiskemuskel 1):

$$MeHg (mg / kg) = \frac{(3,47 - 0,11) \mu g / l \cdot \frac{12 ml \cdot 6}{1000 ml / l} \cdot \frac{25 ml}{15 ml}}{1,6159 g - (1,6159 \cdot 0,33)} = 0,37$$

Vedlegg 6: Innvekter og måledata, total Hg i fisk og sediment

Tabell VI: Resultater for bestemmelse av total Hg i fisk og sediment. Andelen vann som ble tilsatt før homogenisering er tatt hensyn til i beregning av MeHg i muskelprøvene. Prøvene ble fortynnet til 50 ml etter oppslutning.

Fiskemuskel 1	MeHg (µg/l)	Innvekt (g)	Andel vann	MeHg (mg/kg)
1	8,07	1,4985	0,33	0,40
2	8,03	1,4229	0,33	0,42
3	8,83	1,5210	0,33	0,43
Fiskemuskel 2				
1	9,693	1,4126	0,33	0,512
2	9,603	1,3918	0,33	0,515
3	9,923	1,4218	0,33	0,521
Fiskemuskel 3				
1	10,07	1,4358	0,34	0,53
2	9,90	1,3475	0,34	0,56
3	10,01	1,3943	0,34	0,54
Lever				
1	6,526	1,3983	-	0,233
2	6,700	1,4651	-	0,229
3	6,888	1,5414	-	0,223
Rogn				
1	1,2905	1,5573	-	0,0414
2	1,2814	1,5215	-	0,0421
3	1,2823	1,5220	-	0,0421

Vedlegg 7: Q-test

Q-testen ble benyttet for å undersøke om en av de målte verdiene av MeHg i rogn fra lake var en såkalt "uteligger" (uthevet verdi). Målte verdier oppgitt i mg/kg, satt opp i stigende rekkefølge:

0,0378 – 0,0379 – 0,0379 – 0,0381 – 0,0382 – **0,0901**

$$Q = \frac{x_q - x_n}{w} = \frac{0,0901 - 0,0382}{0,0901 - 0,0378} = 0,99235$$

hvor x_q er verdien som skal undersøkes, x_n er nærmeste verdi til x_q og w er spredningen i feltet. Verdier kan utelukkes dersom Q overstiger Q_{crit} gitt i tabell VII ved det aktuelle konfidensintervallet. Fra tabellen kan det sees at verdien 0,0901 mg/kg kan utelukkes med 99 % konfidensintervall.

Tabell VII: Verdier for Q_{crit} ved gitte konfidensintervall. I dette tilfellet er det 6 observasjoner (uthevet).

Antall observasjoner	90 % konfidensintervall	95 % konfidensintervall	99 % konfidensintervall
3	0,941	0,970	0,994
4	0,765	0,829	0,926
5	0,642	0,710	0,821
6	0,560	0,625	0,740
7	0,507	0,568	0,680
8	0,468	0,526	0,634
9	0,437	0,493	0,598
10	0,412	0,466	0,598

Vedlegg 8: Poster for NECC 2010: "Simple determination of methylmercury in sediment and biota"

Oppgitt LOQ på poster er forskjellig fra verdien i oppgaven grunnet feil i beregninger.

Berit Glomstad, Lojana Mohanathas, Karl Andreas Jensen, Solfrid Lohne, and Elin Gjengedal

Norwegian University of Life Sciences, Dept. of Plant and Environmental Sciences, N-1432 Aas, Norway

Introduction

The need for an analytical method to differentiate naturally occurring species of mercury is important, i.e. to understand the distribution and pathways of the highly toxic methylmercury (MeHg, CH₃Hg⁺) into the food web. The two most common chemical forms of mercury present in environmental samples are MeHg, and ionic mercury (Hg²⁺), where MeHg is up to 100 times more toxic than inorganic ionic mercury.

Method

MeHg was initially separated from sample matrices in order to avoid interferences during the subsequent extraction with organic solvent. After back-extraction of MeHg into an aqueous medium, a complete digestion in the high-pressure microwave autoclave UltraClave was conducted. A strong oxidizing agent (KMnO₄) was added to digested samples in order to stabilize mercury on its ionic form. Finally, Hg(II) was reduced to Hg(0) with tin(II) chloride (SnCl₂) and quantified using cold vapour atomic absorption. Thus MeHg was actually determined by implication, since CVAAS is no speciation technique.

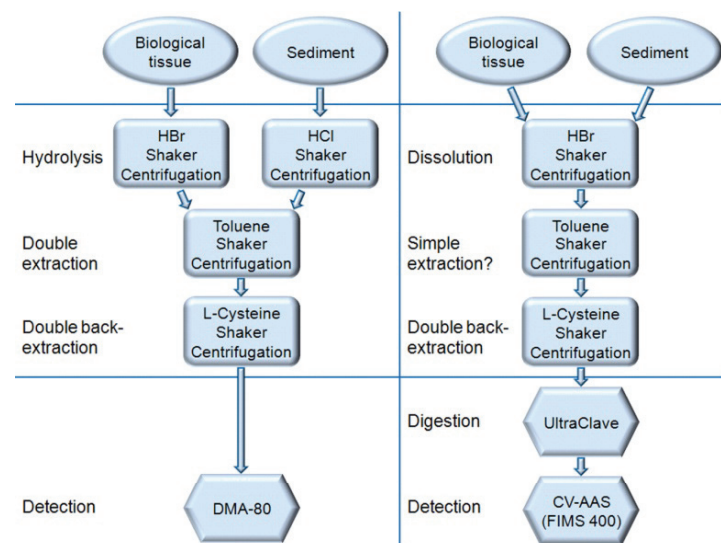


Figure 1. Scheme of the proposed method for MeHg analysis in sediment and biological tissues (right). The first part of the method, the dissolution, organic extraction, and back-extraction followed the main features in a scheme suggested by Maggi *et al.* (2009) (left). Samples were dissolved from the matrix with HBr. MeHg was extracted with toluene, and then back-extracted with L-Cysteine.

Results and Discussion

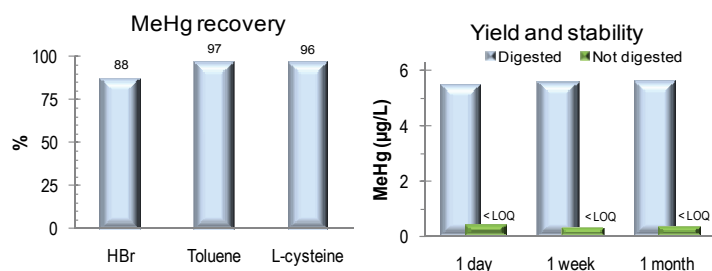


Figure 2. Dissolution of sample with HBr is the most critical step with respect to loss of analyte; left figure. Right figure show no loss of MeHg in a standard solution stored for one month. No Hg²⁺ was detected in undigested solution; i.e. the measured mercury in digested solution was MeHg.

Sample treatment was optimized with respect to the singularities in our proposed method. In addition to avoid loss in the different initial steps, a complete yield in the digestion step is critical (**Fig. 2**). Result show that work time can be reduced by conducting only simple extraction instead of double in step 2 (**Fig. 1** and **Fig. 3b**). Dissolution of samples turned out to be the most critical step with respect to loss of MeHg (**Fig. 2**, left). We suspect that the loss of MeHg in step 1 is related to its characteristic adhering surfaces.

Addition of Hg²⁺ to biota (dogfish muscle) had no influence on final measurement, i.e. only MeHg was extracted by toluene (**Fig. 3b**). The analytical performance of the suggested method was evaluated by analysis of certified reference materials. Dissolution of both biological tissues and sediment may be conducted with HBr, i.e. we see no need for using HCl for sediment like Maggi *et al.* (2009) (**Fig. 1** and **Fig. 3a & 3b**).

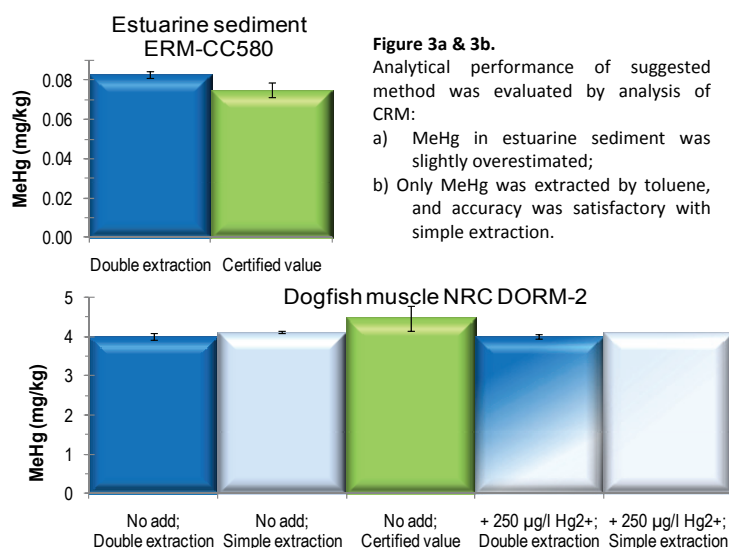


Figure 3a & 3b. Analytical performance of suggested method was evaluated by analysis of CRM:
a) MeHg in estuarine sediment was slightly overestimated;
b) Only MeHg was extracted by toluene, and accuracy was satisfactory with simple extraction.

Table 1. Assessed method qualities in terms of limit of quantification (10x SD (method blank)).

Limit of quantification (1.5 g sample weight)	Biota*	Sediment**
LOQ (µg/L)	0.06	0.006
LOQ (mg/kg)	0.02	0.0002

* Simple extraction, 30 x dilution ** Double extraction, 4 x dilution

Conclusion and Continuation

Method improvement will continue, but with no use of the MeHg reagent; the CVAAS technique use Hg(II) standard for calibration. No use of MeHg is of great importance when attempting to reduce consumption of this highly toxic reagent. Obtained results show that only MeHg was extracted by toluene and the digestion of MeHg in L-Cysteine was complete. Simple extraction with toluene was sufficient. Compared with biota, sediments need less dilution and further improvements may be achieved with use of cleaner reagents (L-Cysteine). For comparison, undigested samples will also be analysed using ICP-OES after hydride generation.

References

Maggi, C., M.T. Berducci, J. Bianchi, M. Giani, L. Campanella (2009) Methylmercury determination in marine sediment and organisms by Direct Mercury Analyser. *Analytica Chimica Acta* **641**, 32-36.