Sonderdruck aus

Deutsche
Forschungsgemeinschaft

Analytische Methoden zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe

Analysen in biologischem Material

Bearbeitet von
Jürgen Angerer und Karl-Heinz Schaller
Arbeitsgruppe „Analytische Chemie"
der Senatskommission zur Prüfung
gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe

Herausgegeben von
Helmut Greim
Vorsitzender der Kommission

Band 2

WILEY-VCH DFG

Methylquecksilber

Anwendbarkeit Bestimmung in Vollblut

Analyt. Messprinzip Kapillargaschromatographische, statische Headspace-Technik mit massenspektrometrischer Detektion (Headspace-GC/MS)

Abgeschlossen im Oktober 2004

Zusammenfassung

Das hier beschriebene Verfahren erlaubt die empfindliche und spezifische Quantifizierung von Methylquecksilber im Blut von umweltbedingt gegenüber dieser Substanz exponierten Personen.
Das Methylquecksilber ($MeHg^+$) wird mit Kaliumbromid/Schwefelsäure aus seinen Matrixbindungen freigesetzt und aus dem Blut in *tert.*-Butylmethylether extrahiert. Anschließend erfolgt die Derivatisierung des extrahierten Methylquecksilbers mit Natriumtetraethylborat in gepufferter Lösung bei einem pH-Wert von pH = 5.
Das ethylierte, flüchtige Methylquecksilber wird mittels Dampfraumanalyse nach Kryofokussierung kapillargaschromatographisch bestimmt. Dazu wird der derivatisierte Extrakt in gasdicht verschlossenen Headspace-Gläschen auf 60 °C erwärmt. Nach der Einstellung des Verteilungsgleichgewichtes des ethylierten Methylquecksilbers zwischen flüssiger und gasförmiger Phase wird die Dampfraumphase in ein Kryo-Probenaufgabesystem überführt, dort aufkonzentriert und anschließend gaschromatographisch untersucht. Als Detektor dient ein Massenspektrometer im Elektronenstoß-Ionisations-Modus.
Die Kalibrierung erfolgt mit wässrigen Vergleichsstandards, die in der gleichen Weise behandelt werden wie die zu analysierenden Proben. Als Interner Standard dient D_3-$MeHg^+$, welches den Blutproben bzw. den Standards zugesetzt wird.

Analytische Methoden Band 2
Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe
der Deutschen Forschungsgemeinschaft – Arbeitsgruppe „Analytische Chemie"

17. Lieferung, Ausgabe 2006

Methylquecksilber

Präzision in der Serie:	Standardabweichung (rel.)	s_w = 3,1%; 4,2%; 2,9% und 3,2%
	Streubereich	u = 6,9%; 9,4%; 6,5% und 7,1%
	bei einer dotierten Konzentration von 1,8; 5; 10 und 25 µg pro Liter Blut und n = 10 Bestimmungen	
Präzision von Tag zu Tag:	Standardabweichung (rel.)	s_w = 6%
	Streubereich	u = 12,5%
	bei einer dotierten Konzentration von 5 µg pro Liter Blut und n = 20 Bestimmungen	
Richtigkeit:	Wiederfindungsrate	r = 92–116%
	bei einer dotierten Konzentration von 1 µg/L	
Nachweisgrenze:	0,4 µg Methylquecksilber pro Liter Blut	

Methylquecksilber

Methylquecksilber (Methyl-Hg) gehört zur Gruppe der organischen Quecksilberverbindungen. Organische Hg-Verbindungen leiten sich meist von Hg (II) ab und besitzen ein oder zwei kovalent gebundene Alkyl- bzw. Arylreste. Organische Hg-Kationen formen oft wasserlösliche Salze mit anorganischen und organischen Säuren, haben eine hohe Affinität zu Thiol-Gruppen und sind lipophil (besonders das Chlorid) [1, 2].

Außer Methyl-Hg fanden Ethyl-Hg-, Methoxyethyl-Hg- und Phenyl-Hg-Verbindungen z. T. weltweit Anwendung als Fungizide und Saatgutbeizmittel [2]. Seit 1988 sind Pflanzenschutzmittel auf der Basis von organischen Hg-Verbindungen in der BRD vollständig verboten [3]. Heutzutage werden organische Hg-Verbindungen nur noch vereinzelt verwendet, so z. B. die Ethyl-Hg-Verbindung Thiomersal (CH_3CH_2–Hg–S–C_6H_4–COOH) als Konservierungsmittel in Impfstoffen, Immunglobulin-Präparaten und in Nasen- und Augentropfen [4].

Aufgrund der ausgeprägten Bioakkumulation in der aquatischen Nahrungskette und der hohen Toxizität ist Methyl-Hg der relevanteste Vertreter aus der Gruppe der organischen Hg-Verbindungen. Methyl-Hg entsteht in der Umwelt überwiegend durch Biomethylierung von anorganischem Quecksilber aus natürlichen und anthropogenen Quellen. Die Allgemeinbevölkerung wird hauptsächlich durch Verzehr von Fisch und anderen Meeresprodukten mit Methyl-Hg belastet [1]. Der Anteil von Methyl-Hg am Gesamt-Quecksilbergehalt in Fisch beträgt 80–90% [5].

In vitro wurde eine Methylierung von Quecksilber durch Bakterien im Darm und der Mundhöhle nachgewiesen [6, 7]. Eine *in vivo*-Methylierung von anorganischem Quecksilber im Menschen ist gegenüber der Aufnahme von Methyl-Hg durch Fisch mengenmäßig jedoch nur von untergeordneter Bedeutung [8, 9].

Toxikologische Eigenschaften sind in mehreren Übersichtsarbeiten und Monographien behandelt worden [1, 4, 10, 11]. Wegen des Verdachts auf kanzerogene Wirkung wurden organische Quecksilberverbindungen (beinhaltet Methyl-Hg, Ethyl-Hg und Phenyl-Hg) von der Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe der Deutschen Forschungsgemeinschaft in die Kategorie 3B eingeordnet [12].

Die täglich aus der Nahrung aufgenommene Menge an Methyl-Hg liegt im Mittel bei 2 µg bzw. 0,03 µg/kg Körpergewicht und Tag [4]. Der PTWI (provisional tolerable weekly intake) der WHO beträgt 3,3 µg/kg Körpergewicht bzw. 0,47 µg/kg Körpergewicht und Tag, die RfD (reference dose) der U.S. EPA beträgt hingegen nur 0,1 µg/kg Körpergewicht und Tag [4].

Gemäß der Empfehlung der Kommission „Human-Biomonitoring" (HBM) des Umweltbundesamtes wird zur Quantifizierung und umweltmedizinischen Bewertung einer Aufnahme von Hg-Spezies meistens der Gehalt an Gesamt-Quecksilber in verschiedenen Indikator-Materialien herangezogen. Gesamt-Quecksilber in den Indikatormaterialien Blut und Haar reflektiert die Aufnahme von organischem Quecksilber, welches im Regelfall der Exposition mit Methyl-Hg durch Fischverzehr äquivalent ist. Gesamt-Quecksilber in Urin erfasst die Belastung mit anorganischem Quecksilber und korreliert mit der Anzahl der Zahnfüllungen [4].

Als Referenzwerte für die innere Belastung mit organischem Quecksilber (als Gesamt-Quecksilber) wurden 1,5 µg/L im Blut von Kindern bzw. 2 µg/L im Blut von Erwachsenen ohne Amalgamfüllungen ermittelt (Fischkonsum bis zu dreimal pro Woche) [4]. Die gesundheitliche Relevanz der inneren Belastung kann anhand der von der HBM-Kommission vorgeschlagenen Beurteilungswerte (HBM-Werte) eingestuft werden. HBM-I- (Prüf- bzw. Kontrollwert) und HBM-II-Wert (Interventions- bzw. Massnahmewert) beziehen sich auf Blut. Als HBM-I-Wert wurden 5 µg/L festgelegt, der HBM-II-Wert beträgt 15 µg/L Blut [4].

Die Untersuchungen auf Methyl-Hg-Belastungen werden meist im Blut vorgenommen. Jedoch ist die Selektivität des zugrundelegenden Messparameters Gesamt-Quecksilber eingeschränkt, da auch anorganisches Quecksilber aus beruflicher Exposition oder Amalgamfüllungen miterfasst wird. Angesichts der unterschiedlichen Expositionsquellen und Toxizitäten der einzelnen Hg-Spezies gewinnt deren selektive Bestimmung zunehmend umweltmedizinisches Interesse. Methoden zur direkten Bestimmung von Methyl-Hg werden bereits zur routinemäßigen Analyse von Blut [13, 14], Urin [8, 15], Haar [16] und Gewebe [17] eingesetzt.

Mit Hilfe des hier vorgestellten Verfahrens wurden unter Routinebedingungen mehr als 300 Blutproben beruflich nicht exponierter Personen analysiert. Folgende Populationskenndaten in µg/L Blut wurden dabei ermittelt:

Tab. 1. Methyl-Hg-Gehalte in Blutproben beruflich nicht exponierter Personen der Allgemeinbevölkerung ($n = 356$).

	Methyl-Hg-Konzentration im Blut [µg/L]
Mittelwert	1,7
Median	1,1
95. Perzentil	5,2
Minimum	0,5
Maximum	29,5

In 6% der untersuchten Fälle wurde dabei der HBM-I-Wert für organisches Quecksilber (5 µg/L Blut) überschritten. 49 dieser Blutproben wurden parallel auf Methyl-Hg und Gesamt-Quecksilber (mittels Kaltdampf-AAS) untersucht. Beide Parameter zeigten eine gute Korrelation ($r^2 = 0,868$). Im Mittel betrug der Anteil von Methyl-Hg am Gesamt-Quecksilber 67% (Bereich: 20–100%).

Autor: *H.W. Hoppe*
Prüfer: *R. Heinrich-Ramm*

Methylquecksilber

Anwendbarkeit Bestimmung in Vollblut

Analyt. Messprinzip Kapillargaschromatographische, statische Headspace-Technik mit massenspektrometrischer Detektion (Headspace-GC/MS)

Abgeschlossen im Oktober 2004

Inhaltsverzeichnis

1 Grundlage des Verfahrens
2 Geräte, Chemikalien und Lösungen
2.1 Geräte
2.2 Chemikalien
2.3 Lösungen
2.4 Vergleichsstandards
3 Probenahme und Probenvorbereitung
3.1 Probenaufbereitung
4 Instrumentelle Arbeitsbedingungen
4.1 Arbeitsbedingungen für das Probenaufgabesystem
4.2 Gaschromatographische und massenspektrometrische Arbeitsbedingungen
5 Analytische Bestimmung
6 Kalibrierung
7 Berechnung der Analysenergebnisse
8 Standardisierung der Messergebnisse und Qualitätssicherung
9 Beurteilung des Verfahrens
9.1 Präzision
9.2 Richtigkeit
9.3 Nachweisgrenze
9.4 Störeinflüsse
10 Diskussion der Methode
11 Literatur

17. Lieferung, Ausgabe 2006

I-M

1 Grundlage des Verfahrens

Das Methylquecksilber ($MeHg^+$) wird mit Kaliumbromid/Schwefelsäure aus seinen Matrixbindungen freigesetzt und aus dem Blut in *tert.*-Butylmethylether extrahiert. Anschließend erfolgt die Derivatisierung des extrahierten Methylquecksilbers mit Natriumtetraethylborat in gepufferter Lösung bei einem pH-Wert von pH = 5.
Das ethylierte, flüchtige Methylquecksilber wird mittels Dampfraumanalyse nach Kryofokussierung kapillargaschromatographisch bestimmt. Dazu wird der derivatisierte Extrakt in gasdicht verschlossenen Headspace-Gläschen auf 60 °C erwärmt. Nach der Einstellung des Verteilungsgleichgewichtes des ethylierten Methylquecksilbers zwischen flüssiger und gasförmiger Phase wird die Dampfraumphase in ein Kryo-Probenaufgabesystem überführt, dort aufkonzentriert und anschließend gaschromatographisch untersucht. Als Detektor dient ein Massenspektrometer im Elektronenstoß-Ionisations-Modus.
Die Kalibrierung erfolgt mit wässrigen Vergleichsstandards, die in der gleichen Weise behandelt werden wie die zu analysierenden Proben. Als Interner Standard dient D_3-$MeHg^+$, welches den Blutproben bzw. den Standards zugesetzt wird.

2 Geräte, Chemikalien und Lösungen

2.1 Geräte

Gaschromatograph mit massenselektivem Detektor und Datensystem zur Auswertung

Kaltaufgabesystem für die Gaschromatographie (z. B. von Gerstel)

Gerät zur automatischen Aufgabe von Dampfraumproben (Headspace-Automat) (z. B. von Perkin-Elmer)

Kapillargaschromatographische Säule:
Länge: 60 m; innerer Durchmesser: 0,32 mm; stationäre Phase: 14% Cyanopropylphenyl-, 86% Dimethylpolysiloxan; Filmdicke: 1,2 µm (z. B. Rtx-1701, Restek)

Heizblock mit Bohrungen für 22-mL-Headspace-Vials (z. B. von Labor-Technik Barkey)

Überkopf-Schüttler (z. B. von Heidolph)

Laborrüttler (z. B. Multi-Tube Vortexer von Baker)

Laborzentrifuge (z. B. von Heraeus)

Magnetrührer (z. B. Ikamag)

pH-Meter mit Einstabmesskette (z. B. Mettler-Toledo)

Variabel einstellbare 100-µL- und 1-mL-Pipetten (z. B. von Eppendorf)

Automatische Pipetten (z. B. Eppendorf Multipette)

10-µL-Glasspritze (z. B. von Hamilton)

22-mL-Headspace-Vials mit teflonkaschierten Butylgummisepten und Aluminiumbördelkappen sowie Verschluss- und Öffnungszangen (z. B. Macherey-Nagel)

22-mL-Glasröhrchen mit teflonkaschiertem Schraubdeckel (z. B. Macherey-Nagel)

10-, 25-, 100- und 500-mL-Messkolben (z. B. Brand)

250- und 500-mL-Becherglas (z. B. Brand)

2.2 Chemikalien

Methylquecksilber-II-Chlorid (> 98%) (z. B. Merck Nr. 806100)

1 M D_3-Methylmagnesiumiodid in Diethylether, Isotopenreinheit 99% (z. B. Aldrich, Nr. 293091)

Quecksilber-II-Chlorid p. a. (z. B. Merck)

Aqua bidest. (entsprechend ASTM-Typ I)

tert-Butylmethylether, p. a. (z. B. Merck)

Aceton, p. a. (z. B. Merck)

Natriumtetraethylborat ($NaBEt_4$) (98%) (z. B. Promochem)

Natriumacetat-Trihydrat p. a. (z. B. Merck)

Kaliumbromid p. a. (z. B. Merck)

Salzsäure (37%) (z. B. Merck)

Schwefelsäure (98%) (z. B. Merck)

Helium 4.6 (z. B. Linde)

Rinderblut, defibriniert (z. B. von ACILA GMN mbH)

2.3 Lösungen

Acetat-Puffer (pH 5):

In einem 250-mL-Becherglas werden 100 g Natriumacetat-Trihydrat eingewogen und in ca. 180 mL bidest. Wasser gelöst. Die Einstellung des pH-Wertes von 5 er-

folgt durch vorsichtige Zugabe von ca. 20 mL konzentrierter Salzsäure (37%) und wird mit einem pH-Meter kontrolliert. Der Puffer ist bei Raumtemperatur ca. 3 Monate haltbar.

2 M KBr/1 M H_2SO_4-Lösung:

In einem 500-mL-Becherglas werden 125 g Kaliumbromid eingewogen und in ca. 200 mL bidest. Wasser gelöst. Es werden unter Rühren auf dem Magnetrührer vorsichtig 26 mL konzentrierte Schwefelsäure (98%) zugegeben. Die Lösung wird unter Nachspülen mit bidest. Wasser in einen 500-mL-Messkolben überführt und mit bidest. Wasser bis zur Marke aufgefüllt. Die Lösung ist bei Raumtemperatur in einer Braunglasflasche für mindestens 1 Jahr haltbar.

Wässrige 1%ige Natriumtetraethylborat-Arbeitslösung:

Warnung: Trockenes Natriumtetraethylborat ist bei längerem Luftkontakt selbstentzündlich und deshalb sehr vorsichtig zu handhaben! Das Einwiegen der Substanz sollte deshalb in einem entsprechenden Abzug erfolgen!
In einen 100-mL-Messkolben werden zügig ca. 1000 mg Natriumtetraethylborat eingewogen und mit bidest. Wasser bis zur Marke aufgefüllt. Die resultierende Lösung wird in geeigneten Gefäßen in 2-mL-Aliquote aufgeteilt und bis zur Anwendung bei –18 °C gelagert.
Die wässrige Lösung ist gefahrlos zu handhaben. Die Haltbarkeit dieser Lösung beträgt bei –18 °C mindestens ein Jahr, bei Raumtemperatur jedoch nur 24 h.

1 M Salzsäure:

10 mL 37%ige HCl wird in einem 100-mL-Messkolben vorgelegt, der mit bidest. Wasser bis zur Marke aufgefüllt wird.

0,1 M Salzsäure:

1 mL 37%ige HCl wird in einem 100-mL-Messkolben vorgelegt, der mit bidest. Wasser bis zur Marke aufgefüllt wird.

2.4 Vergleichsstandards

2.4.1 Interner Standard (D_3-$MeHg^+$)

Ausgangslösung des Internen Standards:

Die Ausgangslösung (ca. 25 g/L) wird gemäß der im Anhang gegebenen Synthesevorschrift hergestellt.

Dotierlösung des Internen Standards:

In einem 10-mL-Messkolben werden ca. 5 mL 0,1 M HCl vorgelegt. Anschließend pipettiert man mit Hilfe einer 10-µL-Glasspritze 1 µL der Ausgangslösung des Internen Standards (ca. 25 g/L) hinzu. Der Messkolben wird schließlich mit 0,1 M HCl bis zur Eichmarke aufgefüllt (c ~ 2,5 mg/L).

2.4.2 Vergleichsstandards

Ausgangslösung:

Unter einem Abzug werden 29,1 mg Methylquecksilber-II-Chlorid in einem 25-mL-Messkolben genau eingewogen. Die Substanz wird in 5 mL Aceton gelöst und der Kolben mit 0,1 M HCl bis zur Marke aufgefüllt. Die Konzentration der Lösung beträgt c = 1000 mg/L, bezogen auf Methylquecksilber ($MeHg^+$).

Stammlösung:

In einem 25-mL-Messkolben werden ca. 5 mL 0,1 M HCl vorgelegt. Es werden 25 µL der Ausgangslösung hinzupipettiert. Nach dem Umschwenken wird der Kolben mit 0,1 M HCl bis zur Marke aufgefüllt (c = 1 mg/L).

Alternativ kann für den Ansatz der $MeHg^+$-Stammlösung auch von einer käuflich erhältlichen Ausgangslösung von Methylquecksilber-II-Chlorid (10 mg/L, Fa. Dr. Ehrenstorfer) ausgegangen werden.

Aus der $MeHg^+$-Stammlösung werden durch Verdünnung mit bidest. Wasser in 22-mL-Headspace-Vials gemäß dem in Tabelle 2 angegebenen Pipettierschema Kalibrierstandards hergestellt, die $MeHg^+$-Konzentrationen zwischen 1 und 50 µg/L enthalten.
Die angegebenen Konzentrationen beziehen sich auf ein ideales Endvolumen von genau 2 mL, das vom real vorliegenden durch die Dotierung um maximal 7,5% abweicht. Mögliche Verdünnungseffekte wurden nicht beobachtet. Die Abweichung wird bei Erstellung der Kalibrierkurve und Berechnung des Analysenergebnisses kompensiert, da über den inneren Standard ausgewertet wird.

Tab. 2. Pipettierschema zur Herstellung von wässrigen Vergleichsstandards.

Volumen der $MeHg^+$-Stammlösung (1 mg/L) [µL]	Volumen des vorgelegten Wassers [mL]	$MeHg^+$- Konzentration des Vergleichsstandards [µg/L]
0	2	0
2	2	1
10	2	5
20	2	10
50	2	25
100	2	50

Da $MeHg^+$ sehr stabil ist, können die im Abschnitt 2.4 aufgeführten Ausgangslösungen, Dotierlösungen und Stammlösungen in Glasgefäßen im Kühlschrank mindestens 1 Jahr aufbewahrt werden. Die eigentlichen Kalibrierstandards auf Basis von Wasser sollten zeitgleich mit den Proben angesetzt und aufbereitet werden.

3 Probenahme und Probenvorbereitung

Ca. 5–8 mL Blut werden mit einem Einmalentnahmesystem mit Antikoagulanzzusatz (z. B. EDTA-K-Monovetten, Sarstedt) durch langsame Aspiration entnommen. Bei Lagerung im Kühlschrank sind die Vollblutproben mindestens 2 Wochen, bei Lagerung in der Tiefkühltruhe (–18 °C) mindestens ein Jahr stabil.

3.1 Probenaufbereitung

In einem 22-mL-Headspace-Vial werden zu 2 mL Vollblut, 25 µL der Dotierlösung des Internen Standards (D_3-$MeHg^+$, ca. 2,5 mg/L) sowie 2 mL der 2 M KBr/1 M H_2SO_4-Lösung pipettiert. Das Vial wird verschlossen und die Probe für 30 s auf einem Laborschüttler (Vortex) intensiv durchmischt.
Es werden 5 mL *tert.*-Butylmethylether hinzugegeben und die Probe wird direkt danach intensiv am Überkopfschüttler durchmischt (30 min, 50 U/min^{-1}).
Nach Zentrifugation (5 min, 3000 g) werden insgesamt ca. 4 mL der klaren organischen Phase in ein neues 22-mL-Headspace-Vial überführt. Dem Extrakt wird anschließend 1 mL des Acetatpuffers pH 5 hinzugegeben und der Flüssigkeitsstand des Puffers auf dem Headspace-Vial markiert. Das Headspace-Vial wird in einem Heizblock platziert und die Lösung bei 75 °C *ohne* Zufuhr eines Luft- oder Stickstoffstromes bis zur Markierung eingedampft.
Zu dem erkalteten, wässrigen Rückstand werden 50 µL der 1%igen Natriumtetraethylborat-Lösung als Derivatisierungsreagenz pipettiert, das Headspace-Vial sofort gasdicht verschlossen und für 10 s auf einem Laborschüttler (Vortex) intensiv durchmischt. Die so erhaltenen Messlösungen sind mindestens 24 h bei Raumtemperatur stabil. Die Probe wird nun der statischen Headspace-GC/MS-Messung zugeführt.
Im Headspace-Autosampler wird die Probe dazu für 30 Minuten bei 60 °C inkubiert, damit sich das Verteilungsgleichgewicht des ethylierten Methylquecksilbers zwischen der Dampfraumphase und der flüssigen Phase einstellt.

4 Instrumentelle Arbeitsbedingungen

4.1 Arbeitsbedingungen für das Probenaufgabesystem

Headspace-Autosampler

Inkubation:	60 °C, 30 Minuten
Druckaufbau:	29 psi (200 kPa) während 30 s
Inject time:	30 s
Transfer line:	120 °C

Kaltaufgabesystem

Verdampferröhrchen:	Glas-Insert, 92 × 2 mm, gefüllt mit ca. 5 mg Tenax
Kühlung:	flüssiger Stickstoff
Injektortemperaturen:	Ausgangstemperatur 5 °C, 30 s isotherm, dann Anstieg mit 12 °C/s auf 280 °C, dann 2 min isotherm

4.2 Gaschromatographische und massenspektrometrische Arbeitsbedingungen

Kapillarsäule:	Material:	Fused Silica
	Stationäre Phase:	Rtx-1701
	Länge:	60 m
	Innerer Durchmesser:	0,32 mm
	Filmdicke:	1,2 µm
Detektor:	Massenselektiver Detektor (MSD)	

Temperaturen:	Säule:	Ausgangstemperatur 70 °C, 1 Minute isotherm, Anstieg mit 12 °C/min auf 140 °C, dann mit 30 °C/min auf 240 °C, 4 Minuten isotherm bei Endtemperatur
	Transfer Line:	280 °C
Trägergas:	Helium 4.6	
Säulenvordruck:	5 psi (const. pressure)	
Ionisationsart:	Elektronenstoßionisation (EI)	
Ionisationsenergie:	70 eV	
Dwell time:	120 ms	
Elektronenmultiplier:	1400 V + 600 V	

Alle anderen Parameter sind nach Herstellerangaben zu optimieren. Es wird bei maximal möglicher Geräteempfindlichkeit gemessen.

5 Analytische Bestimmung

Die Probendosierung erfolgt mit der Technik des Balanced-Pressure-Samplings. Nach der Inkubationsphase wird im Headspace-Vial mittels Trägergas ein Druck von ca. 200 kPa (29 psi) aufgebaut. Anschließend expandiert die Dampfraumphase während 30 s auf das Kryo-Probenaufgabesystem, das mit 35 kPa (5 psi) den gleichen Vordruck wie die Trennsäule aufweist. Um eine Peakverbreiterung zu unterdrücken, wird der Analyt an Tenax fokussiert und nach thermischer Desorption als schmale Bande auf den Kopf der Trennsäule gebracht. Es folgt die gaschromatographische Auftrennung und massenspektrometrische Detektion.
Bei jeder Analysenserie wird eine Qualitätskontrollprobe sowie ein Reagentienleerwert, bestehend aus 2 mL bidest. Wasser, mitanalysiert. Es gelten die zeitlichen Verläufe der in Tabelle 3 aufgeführten Ionenspuren im SIM-Modus des Massenspektrometers.

Tab. 3. Retentionszeiten und Massen.

Verbindung (Ethyliert)	Retentionszeit [min]	Massen
Me-Hg	9,21	244* 243
D_3-Me-Hg	9,19	249

*Die mit * gekennzeichneten Massen werden zur quantitativen Auswertung herangezogen.*

Die in Tabelle 3 angegebenen Retentionszeiten können nur als Anhaltspunkt dienen. Der Anwender hat sich selbst von der Trennleistung der verwendeten Kapillarsäule und des daraus resultierenden Retentionsverhaltens der Substanzen zu überzeugen.
In Abbildung 1 ist beispielhaft das GC/MS-Chromatogramm eines mit 1 µg/L dotierten aufgearbeiteten, wässrigen Kalibrierstandards abgebildet. Abbildung 2 zeigt das Chromatogramm einer aufgearbeiteten Humanblutprobe mit einem Gehalt von 1,8 µg Methylquecksilber pro Liter Blut. Abbildung 3 zeigt das Chromatogramm eines Reagentienleerwertes (aufgearbeitetes bidest. Wasser).
Liegen die Messwerte oberhalb des Bereichs der Kalibriergeraden (>50 µg/L), werden die Blutproben mit bidest. Wasser im Verhältnis 1:10 verdünnt, erneut aufgearbeitet und vermessen.

6 Kalibrierung

Zur Erstellung einer Kalibrierkurve werden die wässrigen Vergleichsstandards nach dem Pipettierschema in Abschnitt 2.4.2 angesetzt und analog den Blutproben gemäß Abschnitt 3.1 aufgearbeitet und entsprechend der Abschnitte 4 und 5 gaschromatographisch/massenspektrometrisch analysiert.
Die Kalibrierkurve wird erstellt, indem die Konzentrationen der Vergleichsstandards gegen den Quotienten aus den Peakflächen des MeHg-Derivates und des Derivates des Internen Standards D_3-MeHg aufgetragen werden. Steigung und Achsenabschnitt der Kalibrierkurve werden mittels linearer Regression berechnet. Gegebenenfalls kann diese Berechnung über die Auswertesoftware des GC/MS-Systems erfolgen. Dabei sollten zu jeder Analysenserie alle Standards für eine neu zu erstellende Kalibrierkurve mitgeführt werden.
Der Linearitätsbereich der Kalibrierkurve umfasst Methylquecksilber-Konzentrationen zwischen der Nachweisgrenze und mindestens 50 µg/L.
Abbildung 4 zeigt die Kalibrierkurven für Methylquecksilber im Konzentrationsbereich 1–25 µg/L, die auf der Basis von Wasser- und Humanblutstandards angesetzt wurden. Unter Routinebedingungen wird auf wässriger Basis kalibriert.

7 Berechnung der Analysenergebnisse

Die Berechnung der Methylquecksilber-Konzentration in Vollblutproben erfolgt auf der Basis einer externen Kalibrierkurve (vgl. Abschnitt 6). Mit den ermittelten Quotienten der Peakflächen des Methylquecksilbers und des Internen Standards D_3-Methylquecksilber geht man in die entsprechende Kalibriergerade ein und ermittelt die dazugehörige Konzentration des Methylquecksilbers in µg pro Liter Blut. Gegebenenfalls kann diese Berechnung über die Auswertesoftware des GC/MS-Systems erfolgen.
Ermittelte Reagenzienleerwerte sind gegebenenfalls von den Analysenergebnissen der Realproben zu subtrahieren.

8 Standardisierung der Messergebnisse und Qualitätssicherung

Zur Sicherung der Qualität der Analysenergebnisse wird gemäß den Richtlinien der Bundesärztekammer [18] und den speziellen Vorbemerkungen dieses Werkes verfahren. Zur Präzisionskontrolle wird bei den einzelnen Analysen eine Kontrollprobe mit untersucht, die eine konstante Konzentration an Methylquecksilber aufweist. Da käufliches Material derzeit nicht zur Verfügung steht, muss das Kontrollmaterial selbst hergestellt werden.
Dazu versetzt man Rinderblut mit einer definierten Menge des Analyten Methylquecksilber. Von diesem Kontrollmaterial wird ein Jahresbedarf hergestellt, in geeigneten Gefäßen aliquotiert und bei –18 °C tiefgefroren aufbewahrt.
Die Konzentration dieses Kontrollbluts sollte in der Mitte des am häufigsten auftretenden Konzentrationsbereichs liegen. Der Sollwert und die Toleranzbereiche des Qualitätskontrollmaterials werden im Rahmen einer Vorperiode (an 20 Tagen je eine Analyse des Kontrollmaterials) ermittelt [19, 20].

9 Beurteilung des Verfahrens

9.1 Präzision

Zur Ermittlung der Präzision in der Serie wurde eine Humanblutprobe mit Methylquecksilber in den Konzentrationen 1,8 µg/L, 5 µg/L, 10 µg/L und 25 µg/L dotiert, aufgearbeitet und analysiert. Bei der 10fachen Bestimmung dieser dotierten Blutproben ergaben sich die in Tabelle 4 dokumentierten Präzisionen in der Serie.

Tab. 4. Präzisionen in der Serie.

	n	Konzentration [µg/L]	Standardabweichung (rel.) [%]	Streubereich [%]
In der Serie	10	1,8	3,1	6,9
	10	5	4,2	9,4
	10	10	2,9	6,5
	10	25	3,2	7,1
Von Tag zu Tag	20	5	6,0	12,5

Darüber hinaus wurde die Präzision von Tag zu Tag bestimmt. Hierzu wurden Blutproben von unbelasteten Personen gepoolt, mit einer Methylquecksilberkonzentration von 5 µg/L dotiert und an 20 verschiedenen Tagen aufgearbeitet und analysiert. Die so ermittelten Präzisionen sind ebenfalls Tabelle 4 zu entnehmen.

9.2 Richtigkeit

Zur Prüfung der Richtigkeit des Verfahrens wurden Wiederfindungsversuche durchgeführt. Dazu wurden Blutproben von Personen der Allgemeinbevölkerung gepoolt, in drei Aliquote aufgeteilt und mit Methylquecksilber im Konzentrationsbereich zwischen 1 und 25 µg/L dotiert, 10fach aufgearbeitet und analysiert. Durch den Vergleich zwischen der MeHg-Konzentration in der undotierten und den dotierten Blutproben lässt sich die relative Wiederfindungsrate der Methode bestimmen. Die so ermittelten, mittleren relativen Wiederfindungsraten sind Tabelle 5 zu entnehmen.

Tab. 5. Mittlere, relative Wiederfindungsraten für Methylquecksilber in dotierten Humanblutproben.

n	Dotierte Konzentration [µg/L]	Rel. Wiederfindung [%]	Bereich [%]
10	1	106	92 – 116
10	10	101	95 – 109
10	25	99	95 – 103

9.3 Nachweisgrenze

Unter den angegebenen Arbeitsbedingungen und unter Zugrundelegen eines Signal/Rausch-Verhältnisses von 3:1 beträgt die Nachweisgrenze für Methylquecksil-

ber 0,4 µg/L Blut. Nach DIN 32645 wurde als Nachweisgrenze für Methylquecksilber 0,37 µg/L Blut und als Bestimmungsgrenze 1,31 µg/L Blut ermittelt.

9.4 Störeinflüsse

Bei Verwendung der Lösungsmittel und Reagentien des angegebenen Reinheitsgrades treten keine Störungen des $MeHg^+$-Nachweises auf. Reagenzienleerwerte wurden bei der Aufarbeitung bislang nicht beobachtet. Eine Querempfindlichkeit gegenüber den Hg-Spezies Hg^{2+}, Dimethylquecksilber, Ethylquecksilber und Phenylquecksilber besteht nachweislich nicht. Aus Natriumtetraethylborat freigesetztes Triethylboran stört die Quantifizierung ebenfalls nicht [21].
Untersuchungen an einer Humanblutprobe, der unterschiedlich hohe Mengen $Hg(NO_3)_2$ zugesetzt wurden, zeigen, dass die Derivatisierung von $MeHg^+$ auch bei hohen Hg^{2+}-Gehalten von bis zu 500 µg/L Blut nicht unterdrückt wird (vgl. Tabelle 6).

Tab. 6. $MeHg^+$-Gehalt einer humanen Blutprobe nach Zusatz verschiedener Mengen einer $Hg(NO_3)_2$-Lösung.

Hg^{2+}-Konzentration im Blut [µg/L]	$MeHg^+$-Konzentration im Blut [µg/L]
1,5	1,83
50	1,88
125	1,78
250	1,80
500	1,80

Auf dem beschriebenen Messsystem werden routinemäßig Analysen von LHKWs und BTX im Blut durchgeführt. Gegenseitige Störungen wurden nicht beobachtet.

10 Diskussion der Methode

Bedingt durch starke Matrixeffekte sind die Verfahren zur direkten Bestimmung von Methylquecksilber im Blut relativ komplex. Zur Reduzierung der Matrixbindungen kommen überwiegend hydrolytische und extraktive Methoden mit nachfolgender gaschromatographischer Bestimmung zur Anwendung.
Nach dem Verfahren von Westöö [22] oder dessen Varianten [23–25] wird das Blut zunächst stark sauer aufgeschlossen und das Methylquecksilber in Gegenwart von NaCl oder KBr in Benzol, Toluol oder Ether extrahiert. Liang et al. behandeln die

eingedampfte Blutprobe mit methanolischer KOH und extrahieren das Methylquecksilber anschließend im sauren Milieu in Dichlormethan [13, 17].
In Abhängigkeit von der Selektivität des benutzten Detektionsverfahrens schließt sich gegebenenfalls noch eine Aufreinigung des Extraktes mittels Rückextraktion in wässrige Cysteinacetat- oder Thiosulfat-Lösung an [23, 25]. Alternative Isolationstechniken für Methylquecksilber in organischer Matrix basieren auf Ionenchromatographie, Verdampfung oder Destillation. Diese ebenfalls komplexen Verfahren werden jedoch fast ausschließlich nur zur Analyse von Fisch, anderen Meeresprodukten, Sediment und Wasser eingesetzt [26,27].
Methylquecksilber kann in Form der Bromidsalze gaschromatographiert und mittels ECD empfindlich detektiert werden [23, 28]. Dieses zum Teil immer noch angewandte Verfahren setzt jedoch eine Passivierung der Trennsäule durch regelmäßig wiederholte Injektion einer $HgCl_2$-Lösung voraus, um eine Zersetzung von MeHgBr während der Auftrennung zu minimieren [14, 23, 29].
Neuere Verfahren zur Bestimmung von Methylquecksilber in biologischen Proben methylieren MeHgBr im organischen Extrakt beispielsweise mit Diazomethan zu $MeHgCH_2Br$ [25], ethylieren in wässrigem Milieu mit $NaBEt_4$ zu MeHgEt [13, 21] oder überführen Methylquecksilber in das Hydrid [30]. Diese kovalenten Derivate sind flüchtig und weisen gute gaschromatographische Eigenschaften auf. Die Detektion erfolgt mittels massenselektiver Detektion (GC/MSD) [25], Kaltdampf-Atomfluoreszenz (GC-CVAFS) [13, 17] oder GC/AAS [30]. Die Nachweisgrenzen der GC/ECD- und GC/MS-Verfahren für Methylquecksilber in Humanblut liegen bei ca. 0,5 µg/L, die für GC/CVAFS bei 0,02 µg/L. Als Interne Standards werden meist Ethylquecksilber und Propylquecksilber eingesetzt.
Zentrale Schritte des vorliegenden Verfahrens sind die Isolierung von $MeHg^+$ aus der Blutmatrix mittels Westöö-Extraktion, dessen Derivatisierung zu MeHgEt mittels Natriumtetraethylborat und die Quantifizierung mittels Isotopenverdünnungsanalyse. Ebenfalls vorhandene Hg-Spezies wie Hg^{2+} und $EtHg^+$ werden zu Diethylquecksilber derivatisiert und können chromatographisch leicht von $MeHg^+$ und eventuell vorhandenem Dimethylquecksilber abgetrennt werden. Eine Inhibierung der $MeHg^+$-Derivatisierung durch konkurrierende Hg^{2+}-Ethylierung findet auch bei hohen Hg^{2+}-Konzentrationen im Blut bis zu 500 µg/L nicht statt (vgl. Tabelle 6).

Versuche zur Vereinfachung der Probenvorbereitung durch direkte Ethylierung von $MeHg^+$ im Blut ohne vorgeschaltete Westöö-Extraktion verliefen erfolglos. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Liang et al. [13] lag auch bei sehr hohen $NaBEt_4$-Konzentrationen die Wiederfindung von $MeHg^+$ sehr niedrig (< 5%).
Bei der Westöö-Extraktion hat sich *tert*-Butylmethylether gegenüber Toluol als Lösungsmittel bewährt. Es weist ebenfalls gute Extraktionseigenschaften auf und kann bereits bei relativ niedrigen Temperaturen (75 °C) durch Eindampfen (*ohne* Luftstrom) gegen einen wässrigen Puffer ersetzt werden. Signifikante $MeHg^+$-Ver-

luste treten nur dann auf, sobald das Verdampfen des Lösungsmittels durch einen Stickstoff- oder Luftstrom beschleunigt wird. Eine Inert-Atmosphäre ist beim Eindampfen nicht notwendig.
Weitere Extraktions- oder Reinigungsschritte sind nicht nötig, da $MeHg^+$ nach der Ethylierung mittels statischer Headspace-Technik direkt in der wässrigen Phase gemessen werden kann.
Nach den Erfahrungen des Autors kann die Kalibrierung auf Wasserbasis erfolgen. Simultan in Wasser und Humanblut angesetzte Kalibrierkurven waren linear und verliefen parallel (vgl. Abbildung 4). Dies bedeutet, dass Matrixeffekte keine signifikante Rolle spielen.
Demgegenüber fand die Prüferin jedoch eine um 18% größere Steigung der Kalibriergeraden auf Blutbasis und empfiehlt deshalb eine matrixbezogene Kalibrierung. Unter dieser Voraussetzung bestätigte sie die Wiederfindungsrate der Methode und ermittelte im Zuge der Methodenprüfung in einer Paralleluntersuchung an Humanblutproben vergleichbare $MeHg^+$-Konzentrationen.
Die Ursache für diese Diskrepanz in der Steigung der wässrigen im Vergleich zur blutbasierten Kalibriergeraden konnte nicht abschließend geklärt werden. Vermutlich liegt eine Ursache in den unterschiedlichen Inkubationsbedingungen des Headspace-Automaten des Autors (30 min h^{-1}, 60 °C, ohne Schütteln) und der Prüferin (20 min, 60 °C, mit Schütteln).
Das Messsystem ist ein handelsübliches statisches Headspace-GC/MS-System mit einem kühlbaren Einlasssystem zur Kryofokussierung der Analyte an Tenax. Durch die Fokussierung wird ein Empfindlichkeitsgewinn um den Faktor 10–20 erzielt.
Als Trennsäule kommt eine mittelpolare Rtx-1701-Säule (60 m × 0,32 mm, 1,2 µm Filmdicke) zur Anwendung. Die im Zuge der Prüfung verwendete DB-1-Säule (60 m × 0,32 mm, 1,1 µm Film) führte zu vergleichbaren Ergebnissen. Als Nachweissystem dient ein Quadrupol-MSD, der im SIM-Modus arbeitet.
Als Interner Standard hat sich D_3-$MeHg^+$ bewährt. Unter den angegebenen Reaktionsbedingungen finden keine Isotopen-Austauschreaktionen statt.
Abbildung 5 zeigt die Spektren von ethyliertem nativem und deuteriertem $MeHg^+$ mit den typischen Molekular-Ion-Clustern m/z 242–248 bzw. m/z 245–251, die der natürlichen Isotopenzusammensetzung von Hg entsprechen. Trotz der partiellen Überlappung der Molekular-Ion-Cluster können für beide Spezies gut separierte Ionen ausgewählt werden, die eine empfindliche und spezifische Detektion von MeHgEt und dem Internen Standard ermöglichen. Geeignete Massen sind demnach m/z 244 (Quantifier) und m/z 243 (Qualifier) für MeHgEt und m/z 249 für D_3-MeHgEt.
Da D_3-$MeHg^+$ nicht kommerziell erhältlich ist, wurde es im Labor in Anlehnung an die Methode von Breitlinger et al. durch eine Grignard-Umsetzung von D_3-Methylmagnesium-Iodid mit einem Überschuss and $HgCl_2$ in guter Ausbeute (ca. 65%) und hoher Isotopenreinheit (>99%) synthetisiert (s. Anhang) [31]. Unter den angegebenen Synthesebedingungen wird das Dimethylierungsprodukt D_6-Me_2Hg nur geringfügig gebildet (ca. 8%). Die D_3-$MeHg^+$-Ausgangslösung enthält noch ca. 3% Hg^{2+}.

Die aufarbeitungsbedingten $MeHg^+$-Verluste über alle Schritte des Verfahrens konnten nicht ermittelt werden, da MeHgEt nicht in reiner Form vorlag. Die Peakflächen des Internen Standards D_3-$MeHg^+$ in aufgearbeiteten Blutproben betragen im Mittel 85% der entsprechenden wässrigen Proben. Dies bedeutet, dass die Verluste für den entscheidenden Schritt der Isolierung aus der Blutmatrix mittels Westöö-Extraktion nur ca. 15% betragen dürften.
In neueren Publikationen zur Hg-Speziesanalytik in Umweltproben (Sediment, Wasser, Fisch) wird die Problematik der artifiziellen Methylierung von Hg^{2+} diskutiert [32–34]. Demnach sind insbesondere die auf Extraktion im alkalischen Milieu oder Destillation beruhenden Verfahren zur Abtrennung von $MeHg^+$ hierfür anfällig und können Hg^{2+} zu 0,001–0,1% in MeHg umsetzen [32]. Demgegenüber weist die Extraktion unter sauren Bedingungen nach Westöö nur eine sehr geringe (0,002–0,005%) oder überhaupt keine Konversationsrate auf [33, 34] .
Entsprechende systematische Untersuchungen für Humanblut existieren nicht. Die Ergebnisse der Hg^{2+}-Dotierungsexperimente (vgl. Tabelle 6) lassen aber den Schluss zu, dass für das vorliegende Verfahren eine künstliche Bildung von $MeHg^+$ in Blut selbst bei sehr hohen Hg^{2+}-Konzentrationen keine oder nur eine untergeordnete Rolle spielt.

Das Verfahren erlaubt die empfindliche und zuverlässige Quantifizierung von $MeHg^+$ in Blut und ist somit eine sinnvolle Alternative zur Bestimmung von Gesamt-Quecksilber als Indikator für die Belastung mit organischem Quecksilber. Die Selektivität des Messparameters Gesamt-Quecksilber ist bekanntlich eingeschränkt, da auch anorganisches Quecksilber aus beruflicher Exposition oder Amalgamfüllungen miterfasst wird.
Die hohe Wiederfindungsrate und gute Präzision der Methode ist wesentlich auf die Westöö-Extraktion und den isotopenmarkierten Internen Standard D_3-$MeHg^+$ zurückzuführen. Die hohe Empfindlichkeit und Selektivität resultiert aus der Kombination von Headspace-GC/MS mit der Technik der Kryofokussierung. Die Zuverlässigkeitskriterien sowie die erreichte Nachweisgrenze genügen den Anforderungen im umweltmedizinischen Konzentrationsbereich.

Verwendete Messgeräte:

Headspace-Autosampler HS-40 (Perkin-Elmer), Kaltaufgabesystem KAS 3 (Gerstel GmbH) und Gaschromatograph HP-5890 II, gekoppelt mit massenselektivem Detektor HP-5971A der Firma Hewlett-Packard

11 Literatur

[1] *WHO (World Health Organization):* Methylmercury. ICPS-Environmental Health Criteria. WHO, Geneva, 1990.
[2] *R. Von Burg* und *M.R. Greenwood:* Methylmercury. In: Metals and their compounds in the environment, ed. by E. Merian. VCH, Weinheim, 1045–1088 (1991).
[3] Bundesverordnung zur Pflanzenschutzanwendung vom 27. 7. 1988 (BGBl. I, S. 1196).
[4] *Kommission Human-Biomonitoring des Umweltbundesamtes:* Stoffmonographie Quecksilber – Referenz- und Humanbiomonitoring-Werte (HBM). Bundesgesundhbl. 42, 522–532 (1999).
[5] *S. Nishigaki, Y. Tamura et al.:* Investigations on mercury levels in tuna, marlin and marine products. Ann. Rep. Tokyo Metropol. Res. Lab. Pub. Health. 24, 239–248 (1973).
[6] *T. Edwards und B.C. McBride:* Biosynthesis and degradation of methylmercury in human faeces. Nature 253, 463–464 (1975).
[7] *U. Heintze, S. Edwardsson, R. Derand* und *D. Birkhed:* Methylation of mercury from dental amalgam and mercuric chloride by streptococci in vitro. Scand. J. Dent. Res. 91, 150–152 (1983).
[8] *H. W. Schiwara, M. Daunderer, H. Kirchherr et al.:* Bestimmung von Kupfer, Quecksilber, Methylquecksilber, Zinn, Methylzinn und Silber in Körpermaterial von Amalgamträgern. Klin. Lab. 38, 391–403 (1992).
[9] *L. Barregard, M. Horvat* und *A. Schutz:* No indication of in vivo methylation of inorganic mercury in chloralkali workers. Environ. Res. 67, 160–167 (1994).
[10] *T. W. Clarkson:* The three modern faces of mercury. Environ. Health Perspect. 110, Supplement 1, 11–23 (2002).
[11] *H. J. Seidel* und *T. Krefeld:* Umweltmedizinische Katastrophen. Teil 1: Die Minamata-Krankheit. Umweltmed. Forsch. Prax. 3, 176–184 (1998).
[12] *Deutsche Forschungsgemeinschaft:* MAK- und BAT-Werte-Liste, Mitteilung 41, Wiley-VCH, Weinheim (2005).
[13] *L. Liang, C. Evens, S. Lazoff, J. S. Woods, E. Cernichiari, M. Horvat, M. D. Martin* und *T. DeRouen:* Determination of methyl mercury in whole blood by ethylation-GC-CVAFS after alkaline digestion-solvent extraction. J. Anal. Toxicol. 24, 328–332 (2000).
[14] *H. Akagi, E. S. Castillo, N. Cortes-Maramba, A. T. Francisco-Rivera* und *T.D. Timbang:* Health assessment for mercury exposure among schoolchildren residing near a gold processing and refining plant in Apokon, Tagum, Davao del Norte, Philippines. Sci. Total Environ. 259, 31–43 (2000)
[15] *N. Ishihara:* Excretion of methyl mercury in human feces. Arch. Environ. Health 55, 44–47 (2000).
[16] *M. Dermelj, M. Horvat, A. Byrne* und *P. Stegnar:* Mercury, methyl mercury and selenium in scalp hair of inhabitants from mediterranean areas. Chemosphere 16, 877–886 (1987).
[17] *L. Liang, N. S. Bloom* und *M. Horvat:* Simultaneous determination of mercury speciation in biological materials by GC/CVAFS after ethylation and room-temperature precollection. Clin. Chem. 40, 602–607 (1994).
[18] *Bundesärztekammer:* Richtlinie der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung quantitativer laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen. Dt. Ärztebl. 100, A3335–A3338 (2003).
[19] *J. Angerer und G. Lehnert:* Anforderungen an arbeitsmedizinisch-toxikologische Analysen – Stand der Technik. Dt. Ärztebl. 37, C1753–C1760 (1997).
[20] *J. Angerer, Th. Göen* und *G. Lehnert:* Mindestanforderungen an die Qualität von umweltmedizinisch-toxikologischen Analysen. Umweltmed. Forsch. Prax. 3, 307–312 (1998).

[21] *N. Bloom:* Determination of picogram levels of methylmercury by aqueous phase ethylation, followed by cryogenic gas chromatography with cold vapour atomic fluorescence detection. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 46, 1131–1140 (1989).
[22] *G. Westöö:* Determination of methylmercury salts in various kinds of biological material. Acta Chem. Scand. 22, 2277–2280 (1968).
[23] *H. von Burg, F. Farris und J.C. Smith:* Determination of methylmercury in blood by gas chromatography. J. Chromatogr. 97, 65–70 (1974).
[24] *L. Goolvard und H. Smith:* Determination of methylmercury in human blood. Analyst 105, 726–729 (1980).
[25] *P. Brunmark, G. Skarping und A. Schutz:* Determination of methylmercury in human blood using capillary gas chromatography and selected-ion monitoring. J. Chromatogr. 573, 35–41 (1992).
[26] *M. Horvat, K. May, M. Stoeppler und A.R. Byrne:* Comparative studies of methylmercury determination in biological and environmental samples. Appl. Organometall. Chem. 2, 515–524 (1988).
[27] *M. Horvat und A.R. Byrne:* A modified method for the determination of methylmercury by gas chromatography. Talanta 37, 207–212 (1990).
[28] *K.H. Schaller, W. Zschiesche und K. Gossler:* Gas-chromatographischer Nachweis von Methylquecksilber im Vollblut im Nanogrammbereich. Fresenius Z. Anal. Chem. 290, 113 (1978).
[29] *J.E. O'Reilly:* Gas chromatographic determination of methyl and ethyl mercury: „Passivation" of the chromatographic column. J. Chromatogr. 238, 433–444 (1982).
[30] *H. Bin, J. Gui-bin und N. Zhe-ming:* Determination of methylmercury in biological samples and sediments by capillary gas chromatography coupled with atomic absorption spectrometry after hydride derivatization and solid phase microextraction. J. Anal. At. Spectrom. 13, 1141–1144 (1998).
[31] *D.K. Breitlinger und W.A. Herrmann (eds.):* Synthetic methods of organometallic and inorganic chemistry. Vol. 5: Copper, silver, gold, zinc, cadmium and mercury. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York 1999.
[32] *N.K. Bloom, J.A.Colman und L.Barber:* Artifact formation of methyl mercury during aqueous distillation and alternative techniques for the extraction of methyl mercury from environmental samples. Fresenius J. Anal. Chem. 358, 371–377 (1997).
[33] *H. Hintelmann, R. Falter, G. Ilgen und R. D. Evans:* Determination of artifactual formation of monomethylmercury in environmental samples using stable Hg^{2+} isotopes with ICP-MS detection: Calculation of contents applying species-specific isotope addition. Fresenius J. Anal. Chem. 358, 363-370 (1997).
[34] *H. Hintelmann:* Comparison of different extraction techniques used for methylmercury analysis with respect to accidental formation of methylmercury during sample preparation. Chemosphere 39, 1093–1105 (1999).

Autor: *H. W. Hoppe*
Prüfer: *R. Heinrich-Ramm*

Addendum: Herstellung einer D_3-MeHgCl-Ausgangslösung in *tert.*-Butylmethylether

Der Ansatz erfolgt gemäß der Synthese von D. K. Breitlinger [31]. Unter einem Abzug wird Quecksilber-II-chlorid ($HgCl_2$) in trockenem *tert.*-Butylmethylether (TBME) bis zur Sättigung (ca. 40 mg/mL) gelöst. Zu 5 mL dieser Lösung in einem 22-mL-Schraubdeckelgläschen werden bei Raumtemperatur unter kräftigem Rühren mit einer Glaspipette innerhalb von einer Minute 1 mL einer 1 M Lösung von D_3-Methylmagnesiumiodid (CD_3MgI) in Diethylether getropft. Es bildet sich ein gelblicher Niederschlag. Nach 10 Minuten Rühren wird der Ansatz je einmal mit 4 mL 1 N HCl und 4 mL 0,1 N HCl gewaschen. Die gewaschene TBME-Phase trennt sich gut ab und kann als D_3-$MeHg^+$-Ausgangslösung eingesetzt werden. Die Lagerung erfolgt in einem 22-mL Glasröhrchen mit Schraubdeckel und teflonkaschiertem Innenseptum bei –18 °C.
Reaktionshauptprodukt ist D_3-$MeHg^+$, dessen Konzentration ca. 25 mg/mL (bei einer Reaktionsausbeute von ca. 65%) beträgt. Zudem wurde ca. 8% d_6-Me_2Hg und ca. 3% nicht umgesetztes Hg^{2+} nachgewiesen. Die Isotopenreinheit von D_3-$MeHg^+$ ist größer als 99%, bestimmt über das Peakhöhen-Verhältnis von $MeHg^+$ zu D_3-$MeHg^+$ auf den Massenspuren m/z 244 und m/z 249.

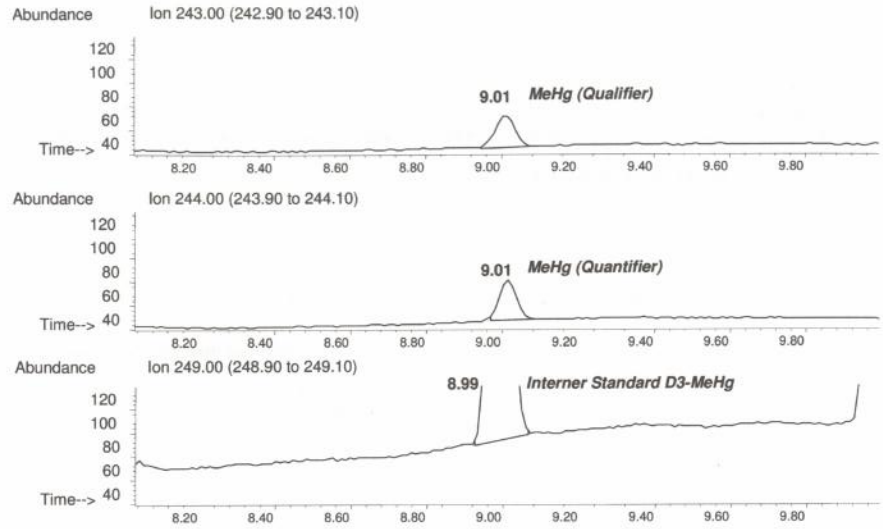

Abb. 1. Beispielchromatogramm eines aufgearbeiteten, wässrigen Kalibrierstandards 1 µg $MeHg^+$/L.

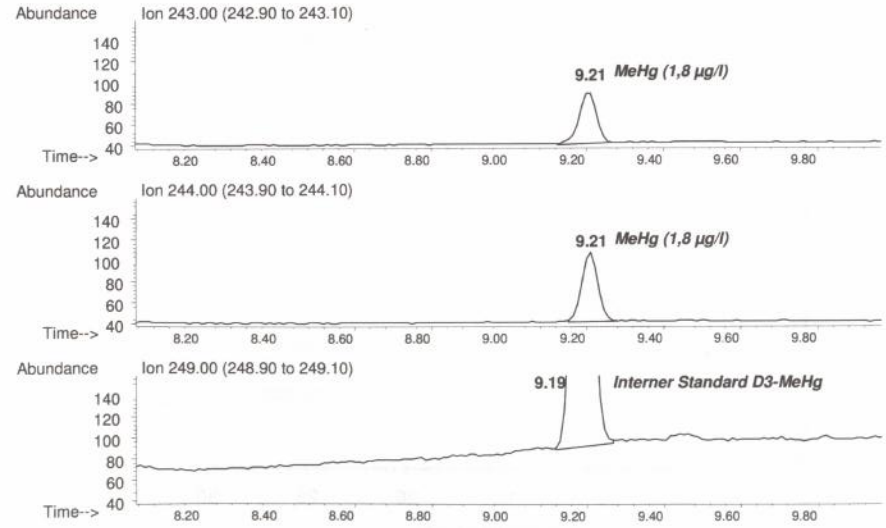

Abb. 2. Beispielchromatogramm einer aufgearbeiteten Humanblutprobe eines Probanden mit einer $MeHg^+$-Konzentration von 1,8 µg/L Blut.

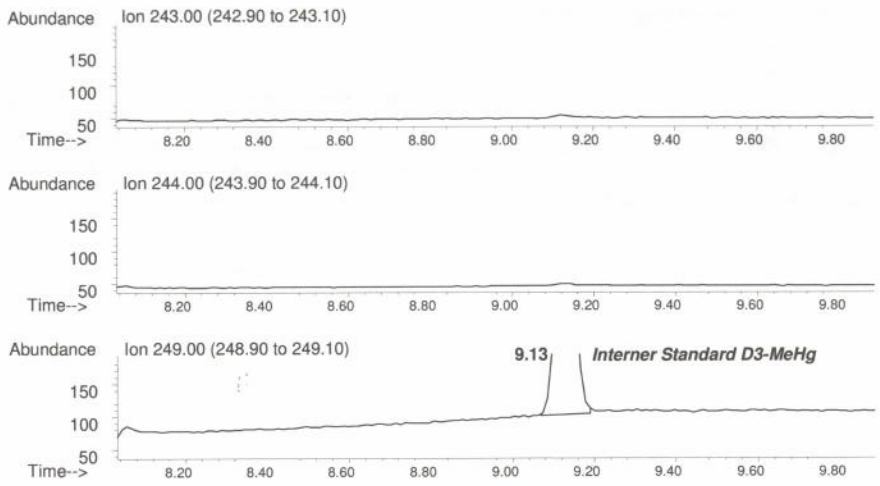

Abb. 3. Beispielchromatogramm eines aufgearbeiteten Reagentienleerwertes (Wasser).

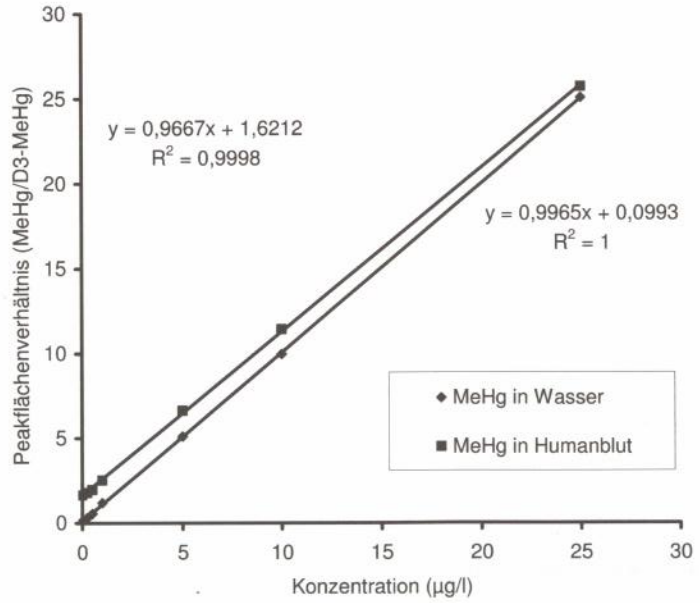

Abb. 4. Vergleich der Kalibriergeraden auf Wasser- und Humanblut-Basis.

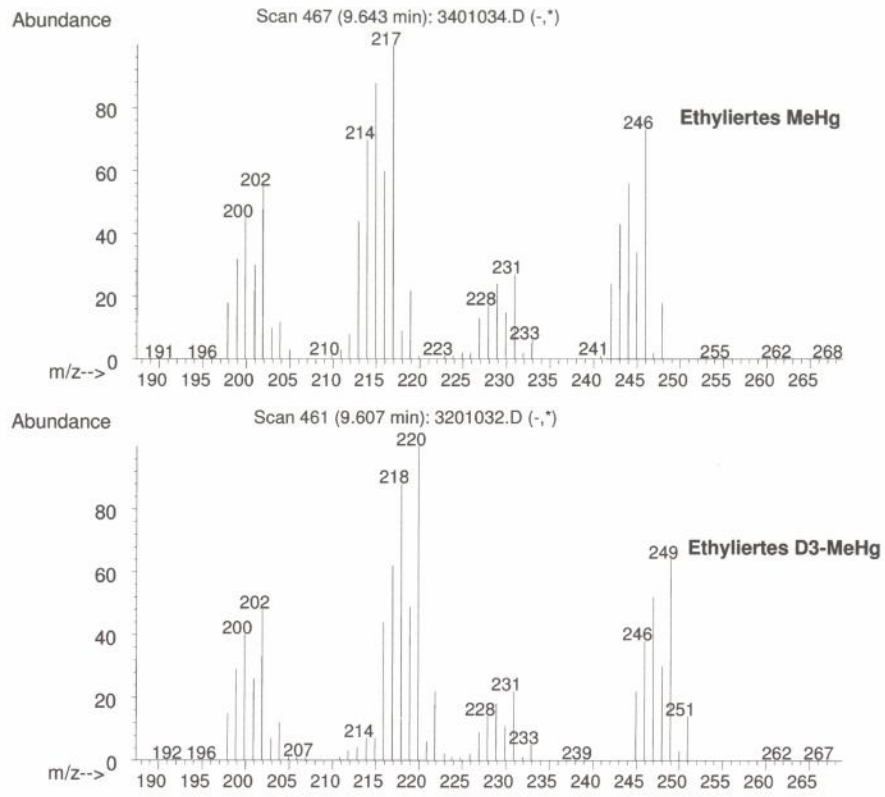

Abb. 5. Massenspektren des ethylierten $MeHg^+$ und des ethylierten Internen Standards D_3-$MeHg^+$.