



Metodologia analítica per a l'especiació de mercuri en mostres del medi aquàtic

Carmen Ibáñez Palomino

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

Hg

Metodologia Analítica per a l'Especciació de Mercuri en Mostres del Medi Aquàtic

Carmen Ibáñez Palomino

Metodologia Analítica per a l'Especciació de Mercuri en Mostres del Medi Aquàtic

Carmen Ibáñez Palomino



Facultat de Química
Departament de Química Analítica

Tesi Doctoral
Desembre 2012



**Facultat de Química
Departament de Química Analítica**

Programa de Doctorat

Química Analítica del Medi Ambient i la Pol·lució
Bienni 2006-2008

Tesi Doctoral

**METODOLOGIA ANALÍTICA PER A
L'ESPECIACIÓ DE MERCURI EN MOSTRES
DEL MEDI AQUÀTIC**

Presentada per

Carmen Ibáñez Palomino

Desembre del 2012

José Fermín López Sánchez, Professor Titular, i Angels Sahuquillo, Professora Agregada, del Departament de Química Analítica de la Universitat de Barcelona

FAN CONSTAR

que la present memòria que porta per títol:

“Metodologia analítica per a l’especiació de mercuri en mostres del medi aquàtic”

ha estat realitzada sota la seva direcció per Carmen Ibáñez Palomino per optar al Títol de Doctor per la Universitat de Barcelona.

Barcelona, Setembre del 2012

Dr. J. Fermín López Sánchez
Professor Titular del Departament de
Química Analítica de la Universitat de
Barcelona

Dra. Angels Sahuquillo
Professora Agregada del Departament
de Química Analítica de la Universitat
de Barcelona

*A mis padres,
por volver a darme la vida*

AGRAÏMENTS

En primer lloc vull agrair a la Roser i al Fermín per haver-me acollit en el seu grup de recerca des d'un principi. Així mateix, vull agrair a l'Angels i al Fermín, de nou, per l'ajuda i el suport rebuts durant aquests anys de treball, en especial a l'Angels per totes les hores que m'ha dedicat en aquests últims mesos. Sense ells aquesta Tesi no hauria estat possible.

A tots els companys que han passat pel grup Qüestram, als que ja han marxat i als que encara continuen voltant al meu costat. Pels bons moments al lab, als sopars, a les cases... perquè continuem quedant i compartint bones estones durant molt de temps!

Als meus amics de dins i fora de la facultat, als que estan lluny, als que gairebé no ens veiem però sé que sempre hi són i, sobretot, als meus pilars de cada dia, per fer-me somriure, per escoltar-me, per animar-me, per renyar-me, per la companyia virtual, per fer-me ser la persona que sóc avui dia, per... TOT!

Als que ja no hi són i als que han entrat en aquesta nova etapa de la meva vida, perquè cadascú m'ha fet sentir especial alguna vegada.

A la meva família, per estar sempre al meu costat, per ajudar-me sense esperar res a canvi, per preocupar-se tant per mi, per la il·lusió que em desperten les meves dues princeses... Gràcies!

I com diria la Suelen, *Para Noooooossa Alegriaaa* 

ÍNDIX

Acrònims	13
-----------------------	----

Capítol 1: INTRODUCCIÓ I OBJECTIUS

1.1 Mercuri: introducció general	
1.1.1 Propietats fisicoquímiques.....	17
1.1.2 L'element: origen i obtenció.....	17
1.1.3 El mercuri al medi ambient	18
1.1.4 Toxicitat i exposició humana.....	22
1.1.4.1 Metilmercuri	24
1.1.4.2 Mercuri elemental i compostos inorgànics de mercuri	25
1.2 Especiació analítica de mercuri	
1.2.1 Importància de l'especiació	27
1.2.2 Etapes de l'especiació analítica de mercuri	28
1.2.2.1 Presa de mostra i emmagatzematge.....	29
1.2.2.2 Extracció.....	31
1.2.2.3 Preconcentració	32
1.2.2.4 Mètodes per a la determinació.....	32
1.3 Materials de referència per a l'especiació de mercuri	36
1.4 Objectius	38

Capítol 2: INSTRUMENTACIÓ, PATRONS I MATERIALS DE REFERÈNCIA

2.1 Determinació de mercuri total	
2.1.1 Digestió de la mostra	43
2.1.2 Mesura mitjançant tècniques espectroscòpiques	44

2.1.2.1 CV-AFS	44
2.1.2.2 ICP-MS	46
2.2 Especiació de mercuri	
2.2.1 Extracció de la mostra	49
2.2.2 Mesura mitjançant tècniques acoblades	
2.2.2.1 HPLC-UV-CV-AFS	50
2.3 Patrons i materials de referència	
2.3.1 Solucions patró	53
2.3.2 Materials de referència	53

Capítol 3: METODOLOGIA ANALÍTICA PER A L'ESPECIACIÓ DE MERCURI

3.1 Introducció.....	57
3.2 Estudis preliminars	59
3.3 Selecció de la fase mòbil	63
3.4 Optimització del sistema HPLC-AFS.....	72
3.4.1 Influència del medi de preparació dels patrons de mesura.....	72
3.4.2 Influència de la composició de la fase mòbil	77
3.4.3 Efecte del reductor.....	82
3.5 Optimització de la fase mòbil.....	85
3.5.1 Efecte de la proporció de metanol	85
3.5.2 Efecte del material del sistema d'injecció	88
3.5.3 Establiment de paràmetres cromatogràfics.....	90
3.5.3.1 Eficàcia	90
3.5.3.2 Resolució	91
3.5.4 Establiment de paràmetres de qualitat	92
3.5.4.1 Límit de detecció	92

3.5.4.2 Límit de quantificació.....	93
3.5.4.3 Interval de linealitat	94
3.6 Estudis d'especiació amb tres espècies de mercuri	96
3.6.1 Optimització de la fase mòbil.....	96
3.6.2 Paràmetres de qualitat	
3.6.2.1 Sensibilitat i interval de linealitat	98
3.6.2.2 Límits de detecció i quantificació.....	98
3.6.2.3 Estudis de recuperació	99
3.6.3 Estabilitat de l'espècie EtHg ⁺	101
3.7 Estudis preliminars de preconcentració <i>on-line</i> en aigües.....	104

Capítol 4: EFECTE DEL PRETRACTAMENT DE MOSTRA EN SEDIMENTS

4.1 Introducció.....	113
4.2 Selecció de la mostra	115
4.3 Pretractaments de mostra estudiats.....	116
4.4 Caracterització dels sediments.....	118
4.5 Paràmetres de qualitat.....	122
4.6 Determinació de mercuri total	123
4.7 Especiació de mercuri.....	126
4.8 Conclusions	129

Capítol 5: APLICACIÓ DE LA METODOLOGIA A MÀTRIS AMBIENTALS I BIOLÒGIQUES

5.1 Introducció.....	133
5.2 Aigües	134
5.2.1 Descripció de les mostres	134
5.2.2 Caracterització de les mostres	134

5.2.3	Estudis de recuperació	136
5.3	Sediments i teixits biològics d'origen marí	140
5.3.1	Descripció de les mostres	140
5.3.2	Determinació de mercuri total	141
5.3.3	Especiació de mercuri.....	143
5.3.3.1	Sediments	144
5.3.3.2	Teixits biològics d'origen marí.....	146
5.4	Sòls	152
5.4.1	Descripció de les mostres	152
5.4.2	Procediment experimental	152
5.4.3	Discussió de resultats	153
Conclusions		159
Referències bibliogràfiques		163
Annex I		175
Publicació científica 1: <i>Certified reference materials for analytical mercury speciation in biological and environmental matrices: Do they meet user needs?; a review</i>		
Annex II		183
Publicació científica 2: <i>Inorganic mercury and methylmercury determination in polluted waters by HPLC coupled to cold vapour atomic fluorescence spectroscopy</i>		

ACRÒNIMS

- ACN:	Acetonitril
- AAS:	Espectroscopia d'absorció atòmica
- AES:	Espectroscopia d'emissió atòmica
- AFS:	Espectroscopia de fluorescència atòmica
- APDC:	Pirrolidinditiocarbamat d'amoni
- AR:	Aigua règia
- ARm:	Aigua règia modificada
- CE:	Electroforesi capil·lar
- CVG / CV:	Generació de vapor fred
- CRM:	Material de referència certificat
- EPA:	Agència de Protecció Ambiental dels Estats Units
- ETAAS:	Espectroscopia d'absorció atòmica electrotèrmica
- EtHg ⁺ :	Etilmercuri
- GC:	Cromatografia de gasos
- FI:	Injecció en flux
- FM:	Fase mòbil
- HG:	Generació d'hidrurs
- HPLC / LC:	Cromatografia de líquids
- IAEA:	Agència Internacional de l'Energia Atòmica
- IARC:	Agència Internacional per la Recerca del Càncer
- ICP:	Plasma acoblat inductivament
- IDMS:	Espectrometria de masses per dilució isotòpica
- IRMM:	Institut de Materials de Referència i Mesures
- ISO:	Organització Internacional de Normalització
- LOD:	Límit de detecció
- LOI:	Pèrdua de pes a 550 °C

- LOQ:	Límit de quantificació
- MIP:	Plasma induït per microones
- MeHg ⁺ :	Metilmercuri
- MS:	Espectrometria de masses
- MW:	Microones
- NRCC:	Consell Nacional de Recerca del Canadà
- ODS:	Octadecilsilà
- OES:	Espectroscopia d'emissió òptica
- OMS:	Organització Mundial de la Salut
- PEEK:	Polieteretercetona
- PTFE:	Politetrafluoroetilè (Teflon)
- QC:	Control de qualitat
- RM:	Material de referència
- RSD:	Desviació estàndard relativa
- SPE:	Extracció en fase sòlida
- SPME:	Microextracció en fase sòlida
- SS:	Acer inoxidable
- TBAB:	Bromur de tetrabutilamoni
- UV:	Radiació ultraviolada
- WWTP:	Planta de tractament d'aigües residuals

Capítol 1

Introducció i objectius

1.1 Mercuri: introducció general

1.1.1 Propietats fisicoquímiques

El mercuri és un element químic de nombre atòmic 80 i pes atòmic 200,59 u. El seu nom i abreviatura (Hg) procedeix del grec llatinitzat *hydrargyros* (dels mots *hydor*, ‘aigua’, i *argyros*, ‘plata’). Es troba al grup 12 de la taula periòdica i es caracteritza per ser l’únic metall líquid a temperatura i pressió ambient. El mercuri elemental és un metall blanc, platejat i brillant i, si no està encapsulat, s’evapora parcialment formant vapors de mercuri, que són incoloros, inodors i tòxics. La seva densitat a 20 °C és de 13,55 g mL⁻¹, el seu punt de fusió és el més baix de tots els metalls (-38,83 °C) i el seu punt d’ebullició és de 356,73 °C.

El mercuri té set isòtops estables (196, 198, 199, 200, 201, 202, 204) i quatre isòtops radiactius inestables (194, 195, 197, 203). Pot existir en tres estats d’oxidació estables: mercuri elemental (metà·lic, Hg⁰), mercuri monovalent, Hg (I) (principal forma inorgànica: ió mercurós, Hg₂²⁺) i mercuri divalent, Hg (II) (principal forma inorgànica: ió mercúric, Hg²⁺ i principals formes orgàniques: metilmercuri, MeHg⁺; etilmercuri, EtHg⁺).

1.1.2 L’element: origen i obtenció

El mercuri es troba de manera natural al medi ambient i existeix en una gran varietat de formes químiques. El mercuri és un element constitutiu de l’escorça terrestre present en una concentració mitjana de 0,05 mg kg⁻¹, amb variacions locals significatives. En la seva forma pura, se’l coneix com mercuri “elemental” o “metà·lic” (Hg⁰). La

major part del mercuri a l'atmosfera és vapor de mercuri elemental, però a altres compartiments del medi rarament es troba en aquesta forma, és més comú trobar-lo en forma de compostos i sals inorgàniques. El mercuri pot enllaçar-se amb altres elements com a mercuri monovalent o divalent (Hg(I) i Hg(II)). A partir del Hg(II) es poden formar molts compostos orgànics i inorgànics de mercuri ¹.

El mercuri s'extrau com a sulfur de mercuri (mineral de cinabri). Al llarg de la història, els jaciments de cinabri han estat la font mineral per a l'extracció comercial de mercuri metàl·lic. La forma metàl·lica es refina a partir del mineral de sulfur de mercuri escalfant el mineral a temperatures superiors als 540 °C. D'aquesta manera es vaporitza el mercuri contingut al mineral i, després, es capten i es refreden els vapors per a formar el mercuri metàl·lic líquid.

Durant el seu cicle, el mercuri pot canviar d'estat i espècie, però la seva forma més simple és el mercuri elemental, molt nociu per als éssers humans i el medi ambient. Una vegada alliberat, a partir dels minerals o dipòsits de combustibles fòssils i minerals presents a l'escorça terrestre, i emès a la biosfera, el mercuri pot tenir una gran mobilitat i circular entre la superfície terrestre i l'atmosfera. Els sòls, les aigües i els sediments aquàtics es consideren els principals dipòsits de mercuri al medi ambient i, per tant, constitueixen les matrius de més alt interès.

1.1.3 El mercuri al medi ambient

A la biosfera, les emissions de Hg poden provenir de fonts naturals, fonts antropogèniques o mixtes.

Dins les fonts naturals es troben els processos que donen lloc a mobilització o emissió de Hg generat de forma natural a l'escorça terrestre, per activitat volcànica o per erosió de les roques, amb una transferència de massa de mercuri a l'atmosfera. Els compostos naturals de mercuri més comuns al medi ambient són el mercuri metàl·lic, sulfur de mercuri, clorur de mercuri i metilmercuri.

Pel que respecta a les fonts antropogèniques, aquestes es corresponen, per una banda, amb els alliberaments deguts a la mobilització d'impureses de mercuri, tal com matèries primeres i combustibles fòssils, especialment carbó. I, d'altra banda, també les constitueixen aquelles emissions ocasionades durant la fabricació, fuites, eliminació o incineració de productes que contenen mercuri o d'altres alliberaments generats pel mercuri emprat en diferents processos ².

Les fonts mixtes estan constituïdes per aquelles emissions que impliquen una transferència de massa de mercuri a l'atmosfera mitjançant processos biològics i geològics mobilitzant el mercuri que anteriorment havia estat dipositat a la superfície terrestre per activitats humanes o naturals. Els processos més importants que alliberen mercuri d'origen mixt al medi ambient són la combustió de biomassa i l'emissió de mercuri dels sòls i l'oceà.

Certs microorganismes i processos naturals poden afavorir la generació i transformació del mercuri al medi ambient ¹. El mercuri elemental a l'atmosfera pot transformar-se en formes inorgàniques de mercuri, fet que obre una significativa via per a la sedimentació de mercuri elemental emès.

El compost orgànic de mercuri més comú que generen els microorganismes i els processos naturals a partir d'altres formes és el

metilmercuri. El MeHg^+ és particularment preocupant perquè té la capacitat de travessar les membranes biològiques podent així acumular-se (bioacumulació i biomagnificació) en molts peixos d'aigua dolça i salada comestibles, així com en mamífers marins comestibles, en concentracions milers de vegades majors que les de les aigües circumdants. A la Figura 1.1 es mostra el procés de biomagnificació d'aquest element al medi aquàtic ³.

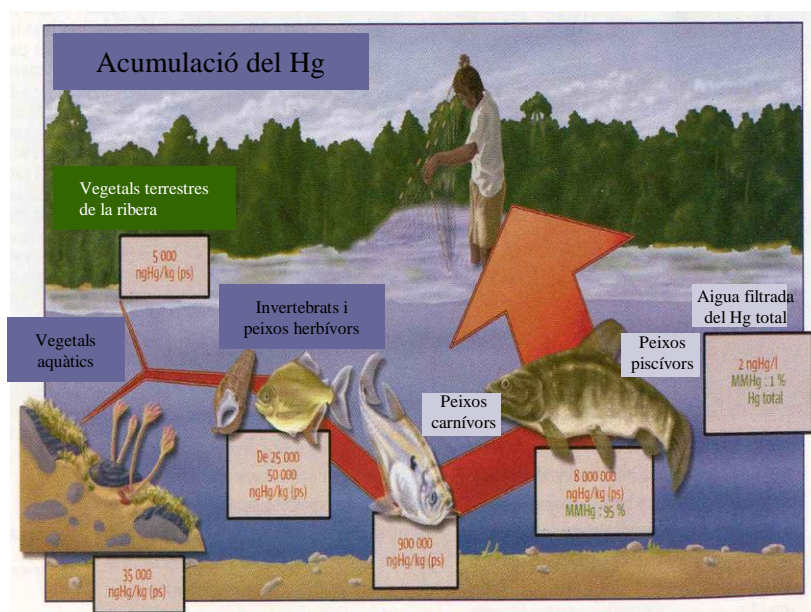


Figura 1.1: Biomagnificació de les concentracions de mercuri al medi aquàtic. Adaptada de la referència ³.

El metilmercuri pot formar-se al medi ambient per metabolisme microbià (processos biòtics) així com per processos químics que no impliquen a organismes vius (processos abiòtics). No obstant, es sol considerar que la seva formació a la naturalesa és deguda sobre tot a processos biòtics que estan lligats amb la presència de bacteries que es troben en sediments de rius, llacs i estuaris. En l'actualitat no es coneixen fonts antropogèniques directes de metilmercuri, encara que

antigament van existir. No obstant, i de forma indirecta, les alliberacions antropogèniques de mercuri elemental o inorgànic contribueixen als nivells de metilmercuri al medi ambient degut a la seva possible transformació.

Pel que se sap del cicle global del mercuri (Figura 1.2) ⁴, els alliberaments actuals s'agreguen al fons global de mercuri en la biosfera; mercuri en constant mobilització, dipositat en superfícies terrestres i aquàtiques i remobilitzat.

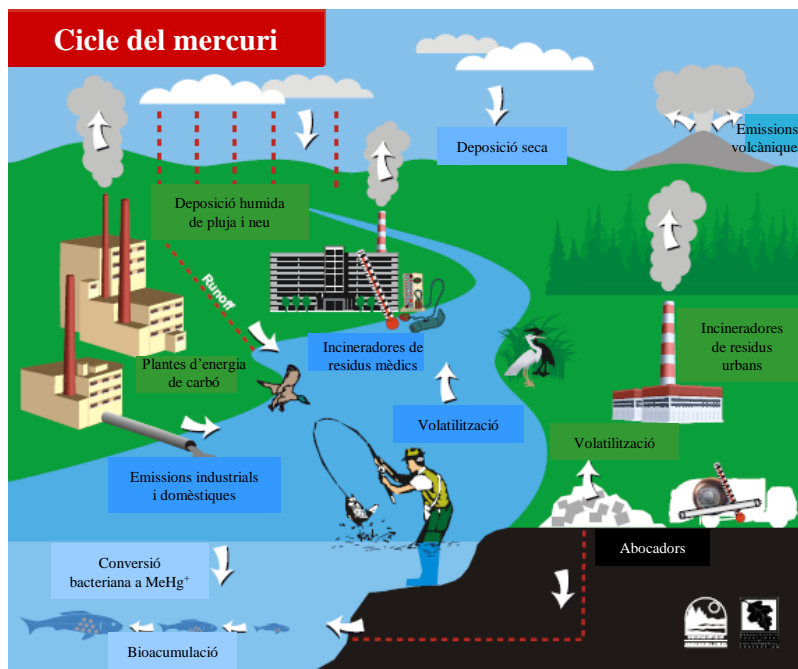


Figura 1.2: Cicle del mercuri. Adaptada de la referència ⁴.

El mercuri és persistent, ja que no pot descompondre's en substàncies menys tòxiques en el medi ambient. Els únics dipòsits a llarg termini per a l'eliminació del mercuri de la biosfera són els sediments del fons del mar i, fins a cert punt, els abocadors controlats, quan el mercuri està físicoquímicament immobilitzat i roman sense alteració davant l'activitat antropogènica o natural (climàtica i

geològica). Això també significa que, encara que els alliberaments antropogènics de mercuri es vagin eliminant, la reducció d'algunes concentracions de mercuri, i les corresponents millores ambientals, no serà sinó molt lenta, segurament de diverses dècades. Tanmateix, hi pot haver millores més ràpides en llocs determinats o en regions afectades sobretot per fonts locals o regionals.

1.1.4 Toxicitat i exposició humana

El cas més rellevant d'exposició humana a compostos de mercuri que va provocar una greu intoxicació a gran escala va ser el de la contaminació de la badia de Minamata al Japó als anys 50. Milers de persones es van veure afectades amb lesions cerebrals i centenars van morir per la ingesta de peix i marisc contaminat amb MeHg^+ provinent dels abocaments de mercuri d'una indústria química. De totes maneres, al marge de casos severos d'exposició i, donat que el mercuri es troba present de forma natural al medi ambient, l'ésser humà està exposat a nivells generalment baixos de Hg a l'aire, l'aigua i els sediments.

La toxicitat del mercuri depèn de la seva forma química i, per tant, els símptomes i signes varien segons es tracti d'exposició a mercuri elemental, als composts inorgànics de mercuri, o als composts orgànics de mercuri (en particular els composts d'alquilmercuri).

Les fonts d'exposició també varien notablement d'una a una altra forma de mercuri. Pel que fa als composts d'alquilmercuri, dels quals el metilmercuri és el més important, la font d'exposició més significativa és la dieta, particularment la dieta a base de peixos i mariscs. El tiomersal ($\text{C}_9\text{H}_9\text{HgNaO}_2\text{S}$), un derivat de l'etilmercuri (EtHg^+), emprat com antisèptic i agent antifúngic, s'ha emprat al llarg de moltes

dècades com a conservant en vacunes infantils. La toxicitat d'aquest és similar a la del metilmercuri i s'ha associat amb l'autisme en nens i respostes al·lèrgiques. En el cas del vapor de mercuri elemental, la font més important per a la població en general són les amalgames dentals, però de vegades l'exposició en l'ambient laboral pot ser força superior. Respecte a compostos inorgànics de mercuri, els aliments constitueixen la font d'exposició més important per a la majoria de la gent. Tanmateix, per a certs grups de la població, l'ús de cremes i sabons a base de mercuri per aclarir la pell, i l'ús de mercuri amb propòsits rituals o en medicina tradicional, també pot conduir a l'exposició a mercuri inorgànic o elemental.

En termes generals, hi ha dos grups especialment vulnerables als efectes del Hg. Els fetus són sensibles sobretot als seus efectes sobre el desenvolupament, ja que l'exposició intrauterina a MeHg^+ , per consum matern de peix o marisc, pot danyar el cervell i el sistema nerviós durant el creixement del nadó. El segon grup és el de les persones exposades de forma sistemàtica (exposició crònica) a nivells elevats de Hg (com poblacions que practiquen la pesca de subsistència o persones exposades per motius laborals) ⁵.

Encara que és ben sabut que el mercuri i els seus compostos són substàncies summament tòxiques, el grau de toxicitat d'aquestes substàncies, sobretot la del metilmercuri, està actualment en discussió. Les investigacions de l'última dècada mostren que els efectes tòxics poden generar-se a concentracions més baixes, i que podrien afectar més població mundial del que s'havia pensat. Com els mecanismes de certs efectes tòxics subtils, i la demostració de la seva existència, són qüestions summament complexes, encara no s'ha arribat a comprendre en la seva totalitat aquest problema.

Hi ha diverses formes per reduir l'exposició humana a fonts de mercuri i prevenir els efectes perjudicials per a la salut com per exemple: fomentar les energies netes, deixar d'utilitzar mercuri a les mines auríferes, acabar amb la mineria del Hg o eliminar progressivament productes no essencials que continguin mercuri. És per això que s'estan adoptant diverses mesures per reduir els nivells de mercuri en certs productes o retirar progressivament altres productes que el contenen (piles, termòmetres, làmpades, cosmètics...). Als serveis de salut de quasi tots els països s'utilitzen amalgames dentals; al 2009, una consulta d'experts organitzada per la Organització Mundial de la Salut (OMS) va concloure que una prohibició mundial i a curt termini de les amalgames plantejaria problemes de salut pública i pel sector de l'odontologia, però que en canvi convenia prosseguir la seva eliminació gradual fomentant la prevenció i alternatives a les amalgames, així com activitats d'investigació i desenvolupament per obtenir alternatives costo-eficaces, la formació dels professionals de la branca i un major nivell de conscienciació pública ⁵.

1.1.4.1 Metilmercuri

Entre els composts orgànics de mercuri, el metilmercuri ocupa un lloc especial perquè molta població està exposada a ell, i els seus efectes tòxics estan més ben caracteritzats que els d'altres composts orgànics de mercuri. Es considera que, dins del grup dels composts orgànics de mercuri, els composts d'alquilmercuri (en particular, etilmercuri i metilmercuri) són similars en toxicitat (a més, ambdós han estat utilitzats com a plaguicides). En canvi, altres composts orgànics de mercuri, com el fenilmercuri, s'assemblen més al mercuri inorgànic en els seus efectes tòxics.

El metilmercuri és un neurotòxic molt ben documentat que pot provocar efectes perjudicials particularment al cervell en formació. A més, aquest compost traspasa amb facilitat la barrera placentària i la barrera hematoencefàlica; per això és molt preocupant l'exposició durant l'embaràs. La principal conseqüència sanitària del MeHg⁺ és l'alteració del desenvolupament neurològic, per això, l'exposició a aquesta substància durant l'etapa fetal pot afectar ulteriorment al pensament cognitiu, la memòria, la capacitat de concentració, el llenguatge i les aptituds motores i espai-visuals del nen. Així mateix, alguns estudis indiquen que fins i tot un petit augment en l'exposició al metilmercuri pot causar efectes perjudicials en el sistema cardiovascular i un increment en la mortalitat.

Considerant la importància de les malalties cardiovasculars a tot el món, aquests resultats, encara que no estiguin confirmats, suggereixen que les exposicions al metilmercuri requereixen més atenció i un seguiment addicional. A més, basant-se en la seva avaluació general, el Centre Internacional d'Investigació sobre el Càncer (International Agency for Research on Cancer, IARC, 1993) considera que els compostos de metilmercuri poden ser carcinògens per als éssers humans (grup 2B: l'agent és probablement carcinògen pels humans)⁶.

1.1.4.2 Mercuri elemental i compostos inorgànics de mercuri

Degut a la seva alta pressió de vapor a temperatura ambient, la via principal d'exposició al mercuri elemental és per inhalació dels seus vapors. Prop del 80% dels vapors inhalats són absorbits pels teixits pulmonars. Aquest vapor també penetra amb facilitat la barrera de sang del cervell i la seva neurotoxicitat està ben documentada. L'absorció

intestinal de mercuri elemental és baixa. El mercuri elemental pot oxidar-se en els teixits corporals a la forma divalent inorgànica. S'han observat trastorns neurològics i de comportament en éssers humans després de inhalació de vapor de mercuri elemental. Alguns dels símptomes són: tremolors, labilitat emocional, insomni, pèrdua de la memòria, canvis al sistema neuromuscular i mals de cap. S'han observat així mateix efectes al ronyó i al tiroides. Les altes exposicions també han ocasionat mortalitat.

El mercuri inorgànic presenta una menor capacitat de difusió a través de les membranes biològiques degut al seu caràcter hidròfil. Així, només un 15% del Hg assimilat ho farà en aquesta forma. El síndrome principal d'intoxicació aguda per una sal de mercuri és el trastorn digestiu.

En quant a carcinogenicitat, l'avaluació general del IARC (1993) conclou que el mercuri metàl·lic i els compostos inorgànics de mercuri no són classificables en quant a carcinogenicitat per als éssers humans (grup 3: l'agent no és classificable respecte la seva carcinogenicitat en humans)⁶.

1.2 Especiació analítica de mercuri

1.2.1 Importància de l'especiació

L'especiació analítica és el terme que es sol usar per a representar la distribució de determinada quantitat d'un element químic entre les seves diverses espècies (ions i molècules) en una matriu. Els principals grups d'espècies de mercuri són el mercuri elemental i les seves formes orgàniques i inorgàniques.

L'especiació desenvolupa un paper important en estudis de la toxicitat i exposició al mercuri d'organismes vius ¹. L'espècie química influeix, per exemple, en els següents aspectes:

- La disponibilitat física que determina l'exposició;
- El transport dins de l'organisme cap als teixits en els quals té efectes tòxics;
- La seva toxicitat;
- La seva acumulació, biomodificació, destoxicació en teixits, així com la seva excreció;
- La seva biomagnificació en anar pujant d'un a un altre nivell tròfic de la cadena alimentària (aspecte important sobretot en el cas del metilmercuri).

L'especiació també incideix en el transport del mercuri dins de cada compartiment mediambiental i entre un i altre, com l'atmosfera i els oceans. Per exemple, l'especiació és un factor determinant per a estudiar la distància que recorre el mercuri emès en l'aire des de la seva font d'emissió. El mercuri adsorbit en partícules i compostos de mercuri iònic (divalent) es troba sobretot en el sòl i en l'aigua propers a les fonts d'emissió (distàncies locals a regionals), mentre que el vapor

de mercuri elemental es transporta a escala mundial, la qual cosa fa de les emissions de mercuri una preocupació d'abast mundial. Un altre exemple és l'anomenada "incidència de reducció del mercuri en l'alba polar", quan es presenta una transformació de mercuri elemental en mercuri divalent a causa d'una major activitat solar i a la presència de cristalls de gel, amb la qual cosa s'observa un increment substancial en la deposició del mercuri durant un període de tres mesos (de març a juny, aproximadament).

A més, l'especiació és important per a millorar la capacitat de controlar les emissions de mercuri en l'aire. Per exemple, alguns instruments de control capten raonablement bé les emissions de composts inorgànics de mercuri, però la majoria d'aquest tipus d'instruments capta poc mercuri elemental.

El creixent interès científic per l'especiació analítica de mercuri queda reflectit en l'abundant bibliografia trobada sobre aquest tema, on es posa de manifest que cal l'estudi de les diverses formes químiques de mercuri mitjançant el desenvolupament de nous mètodes analítics.

1.2.2 Etapes de l'especiació analítica de mercuri

Un mètode ideal d'especiació analítica ha de proporcionar informació de qualitat preservant, a més, la integritat de les espècies.

Els principals passos a considerar en l'especiació de Hg en mostres ambientals són els següents: ⁷

- Presa de mostra amb especial atenció a protocols de neteja;
- Pretractament / preservació / emmagatzematge de la mostra abans del seu anàlisi per tal de preservar la concentració i distribució d'espècies;

- Extracció de la mostra ambiental garantint la integritat de les espècies;
- *Clean-up* / preconcentració per aconseguir una concentració final d'acord amb els límits de detecció de la tècnica de detecció seleccionada;
- Separació de les espècies d'interès;
- Detecció i quantificació.

Degut a la seva relativa existència en el medi i als seus efectes tòxics, les principals formes de mercuri que majoritàriament han d'ésser identificades i determinades són el Hg^{2+} i el CH_3Hg^+ . A continuació es descriuen els passos considerats per a aquestes dues espècies.

1.2.2.1 Presa de mostra i emmagatzematge

Degut als problemes de contaminació que poden sorgir durant la presa de mostra i l'emmagatzematge cal prestar especial atenció a la descontaminació del material, al material, al rentat de les mostres i a l'apropiat emmagatzematge d'aquestes.

Pel que respecta a la presa d'aigües superficials, normalment es realitza de forma manual, emprant guants de plàstic. Les mostres de precipitacions poden ser recollides per mostrejadors automàtics, amb sistemes de filtració incorporats si es desitja. Quan es tracta de sòls o sediments, les mostres han de ser preparades amb cura ja que la quantitat de MeHg^+ és molt baixa (<2% del Hg total) i una manipulació inadequada pot comportar resultats erronis. A més a més, canvis de pH, potencials redox, humitat, etc., poden influir significativament en l'estabilitat del metilmercuri en sediments. És relativament poc conegut

l'efecte de l'emmagatzematge sobre l'estabilitat del metilmercuri en mostres biològiques. És poc probable una contaminació externa significativa amb MeHg^+ , però s'han de tenir precaucions extremes per tal d'evitar la contaminació per Hg^{2+} . En el cas de mostres de sang, aquestes s'han d'obtenir mitjançant una extracció. S'ha de tenir en compte que la mostra s'ha de recollir sense afegir cap tipus d'additiu ni coagulant, ja que, per una banda, aquests poden contenir impureses de mercuri i, d'altra banda, és probable que trenquin les espècies originals de mercuri. Pel que respecta a les mostres de cabell, la IAEA i la OMS recomanen l'ús de només aigua i acetona per tal d'eliminar les restes de pols i greix a les mostres. És preferible analitzar les mostres biològiques fresques o després de liofilitzar-les, ja que processos de congelació i descongelació repetits poden provocar la descomposició del MeHg^+ , sobretot en el cas dels bivalves ⁸.

La selecció del material és crítica per tal de preservar les espècies de Hg a les mostres. La pèrdua de Hg^{2+} és mínima en ampolles de quars o borosilicat ⁹, però majors pèrdues per retenció són observades en ampolles de polipropilè o polietilè. El polietilè permet la difusió del mercuri elemental a través de les parets de l'ampolla i facilita la degradació del MeHg^+ ^{10,11}. Les solucions de MeHg^+ són estables en ampolles de vidre a 4 °C, però el millor material d'emmagatzematge és el politetrafluoroetilè (PTFE) ¹², aquest material assegura la mínima contaminació.

Rigorosos procediments de neteja són emprats als laboratoris d'anàlisi, allà on hi hagi un contacte amb les mostres. Existeixen diferents procediments de neteja, però sempre s'inclou un rentat en banys d'àcid durant diversos dies ¹³. El rentat amb àcid té un efecte favorable en l'estabilitat del Hg^{2+} i del MeHg^+ en les mostres ¹¹.

Després d'aquest tractament, el material és esbandit amb aigua desionitzada lliure de mercuri o aigua doblement destil·lada i és emmagatzemat en una zona lliure de mercuri. Alguns autors recomanen emmagatzemar el material de laboratori en nítric o clorhídric diluïts fins el seu posterior ús ⁷.

1.2.2.2 Extracció

En aquesta etapa es poden produir errors deguts a una incompleta extracció de l'anàlit o per la generació d'artefactes que poden causar la interconversió d'espècies. Les tècniques més emprades són la hidròlisi àcida o bàsica, la destil·lació i l'extracció amb fluids supercrítics.

La digestió àcida combinada amb l'extracció amb dissolvent va ser proposada per primer cop per Westöö ¹⁴. Molts procediments, que deriven d'aquest protocol, inclouen els següents passos:

- a) alliberament de les espècies organomercúriques de la matriu orgànica per desplaçament del grup mercapto amb un halogen a pH baix,
- b) extracció selectiva de les espècies organomercúriques amb tolué,
- c) purificació de l'extracte orgànic per extracció amb una solució aquosa de cisteïna,
- d) dissociació del complex organomercuri-tiol en medi àcid,
- e) re-extracció amb solvent orgànic i preconcentració per evaporació del dissolvent.

L'extracció amb microones de les espècies de mercuri és un mètode extremadament ràpid (2 – 10 min). El procediment pot ser automatitzat i controlat, permetent l'extracció simultània de les espècies no volàtils de mercuri. Sistemes oberts i tancats són emprats en l'extracció alcalina i àcida de les espècies presents a les mostres. No

obstant, l'extracció mitjançant microones pot generar MeHg^+ artificialment ¹⁵.

Estudis de la formació artificial de MeHg^+ demostren que la transformació de les espècies té lloc durant el pretractament de mostra i, més específicament, en els mètodes de destil·lació ^{16,17}. La quantitat de MeHg^+ produïda en l'extracció està relacionada amb la quantitat de mercuri inorgànic present a la mostra i amb el mètode d'extracció. Quan les concentracions de Hg^{2+} són molt elevades, la determinació de MeHg^+ es pot veure afectada. En aquests casos cal una pre-separació de les espècies organomercúriques del Hg^{2+} mitjançant extracció líquid/líquid ¹⁷.

1.2.2.3 Preconcentració

La determinació de MeHg^+ i EtHg^+ en mostres ambientals (aigua, sediment i biota) pot requerir una etapa de preconcentració per tal d'assolir els límits de detecció de la tècnica d'anàlisi. Tradicionalment, s'emprava l'extracció líquid/líquid i en fase sòlida amb diferents tipus d'adsorbents sòlids. Per tal de minimitzar costos i reduir l'ús de substàncies contaminants, es busquen alternatives fàcils d'automatitzar i que consumeixin el mínim dissolvent possible. En aquest sentit, tant la microextracció en fase sòlida (SPME) com el mètode de purga i trampa (criogènic i a temperatura ambient) reuneixen ambdós requisits ².

1.2.2.4 Mètodes per a la determinació

Les tècniques de separació cromatogràfiques solen ser els mètodes més emprats per a la separació de dues o més espècies de Hg. No obstant, es descriuen mètodes basats en separacions no

cromatogràfiques per a la determinació d'un nombre màxim de dues espècies.

Mètodes no cromatogràfics

L'anàlisi per injecció en flux (FIA) és el sistema més adequat per a aquest tipus de separacions simples. La diferència de comportament del Hg^{2+} i el MeHg^+ front a l'acció d'agents reductors es pot utilitzar per aconseguir una separació amb detecció per CV-AAS ¹⁸.

L'electroforesi capil·lar és una tècnica basada en la separació dels compostos de mercuri segons les seves càrregues iòniques. Aquesta tècnica és molt convenient per dur a terme l'especiació de Hg de rutina i ha estat validada per determinar MeHg^+ en mostres de tonyina ¹⁹.

Una altra tècnica descrita a la bibliografia és l'atrapament criogènic que constitueix un dels millors mètodes per la separació tant dels hidrurs com dels derivats etilats dels compostos de mercuri ²². Mentre que l'ús del NaBH_4 és més comú per la generació d'hidrurs i de vapor fred, el $\text{NaB}(\text{C}_2\text{H}_5)_4$ és el que més s'utilitza per a la derivatització *in-situ* del Hg^{2+} i el CH_3Hg^+ a pH 4,9 (es formen els compostos volàtils dietilmercuri i metiletilmercuri, respectivament). Posteriorment, les espècies derivatitzades són preconcentrades en una trampa criogènica de la qual s'elueixen segons els seus punts d'ebullició.

Mètodes cromatogràfics

La cromatografia de gasos (GC) s'utilitza per espècies que són volàtils o que poden formar compostos volàtils. Existeix una clara tendència a utilitzar columnes capil·lars obertes, de tipus no polar, que contenen una fase estacionària de fenil o metilsilicona ^{21,33}. Aquest

tipus de columnes requereixen un volum de mostra més petit i proporcionen millor resolució i una separació més eficient que les columnes empaquetades ^{22,23,24,25,26,27,28}. Amb la finalitat de convertir les espècies de mercuri iònic en formes volàtils, mètodes de derivatització *off-line* i *on-line* són necessaris a l'hora de treballar amb GC. La generació d'hidrurs és sensible a interferències de metalls pesants presents en els extractes, però pot ser emprada en la determinació de MeHg⁺ després de la seva separació de la matriu ²⁹. Els detectors més emprats en GC en l'anàlisi de mostres són AFS ^{17,30,31}, MIP-AES ^{32,34} i ICP-MS ^{34,35}.

El fet d'haver d'incloure una etapa de derivatització dels compostos de mercuri quan la separació es realitza amb GC ha portat a desenvolupar mètodes alternatius per a la separació, tal com la cromatografia de líquids (HPLC ó LC). L'HPLC permet un tractament més senzill de la mostra que en el cas de la GC i és capaç de separar una gran varietat de compostos organomercúrics ^{36,37,38,39,40,41,42,43,44,45}. Aquestes tècniques de LC normalment necessiten reactius tal com el 2-mercaptoetanol, cisteïna o ditiocarbamats per a la complexació i posterior separació de les espècies de mercuri. La separació té lloc en una columna C₁₈ de fase inversa i la fase mòbil normalment consisteix en una barreja de solvent orgànic – aigua que conté l'agent complexant. La utilització de formadors de parells iònics també està contemplada a la bibliografia ³⁸: està demostrat que la utilització de sals d'amoni quaternari, com a formadores de parells iònics, és efectiva per a la separació tant de Hg inorgànic com de compostos organomercúrics. Per tal d'assegurar que tot el mercuri procedent de la columna arriba al detector en forma de vapor (Hg⁰), cal un pas previ d'oxidació (química o fotogràfica), per tenir l'espècie Hg²⁺, i una posterior reducció que té lloc

al generador de vapor fred (CV). Els detectors més emprats en HPLC per determinar espècies organomercúriques són AFS³⁷ i ICP-MS²⁰. En els últims anys ha augmentat enormement l'ús de l'ICP-MS com a sistema de detecció, però l'AFS ofereix una possibilitat de detecció molt més econòmica i senzilla, mantenint pràcticament els mateixos ordres de sensibilitat i selectivitat, de tal manera que ha esdevingut com una de les tècniques més utilitzades per a l'especiació de mercuri.

Límits de detecció

A la Taula 1.1 es mostren els límits de detecció (LOD) de diversos mètodes d'anàlisi emprats en l'especiació de mercuri. Es pot observar que els límits de detecció més baixos s'obtenen amb mètodes que fan servir detectors del tipus AFS i ICP-MS.

Taula 1.1: Límits de detecció per a tècniques acoblades per a l'especiació de Hg

Mètode	Espècie	LOD (ng g⁻¹)	Referència
HPLC-CV-AFS	MeHg ⁺	0,1	46
Preconc-HPLC-CV-AFS	MeHg ⁺	0,001	47
Preconc-HPLC-CV-ICP-IDMS	MeHg ⁺	0,015	33
Deriv-GC-MIP-AES	MeHg ⁺	5	15
Deriv-multiGC-MIP-AES	Hg ²⁺	0,2	48
	MeHg ⁺	0,2	
Deriv-SPME-multiGC-ICP-MS	Hg ²⁺	0,27	49
	MeHg ⁺	0,027	
Preconc-HPLC-UV	MeHg ⁺	14,6	42
Preconc-CE-Amperometria	MeHg ⁺	3,0	50

1.3 Materials de referència per a l'especiació de mercuri

La utilitat d'un material de referència certificat (CRM) per a la validació de mètodes analítics o per al control de qualitat s'atribueix principalment a les seves propietats, concretament a la homogeneïtat i l'estabilitat. No obstant, també és convenient seleccionar els CRMs adequats en termes de representativitat front a les mostres a analitzar. Per tal d'avaluar la utilitat d'un CRM per a l'especiació analítica de mercuri, s'han de considerar una sèrie d'aspectes respecte a les mostres que s'analitzen al laboratori: l'origen de la matriu, el tipus d'espècies de mercuri i els nivells de concentració.

Es va revisar la bibliografia sobre l'especiació de mercuri en mostres ambientals i biològiques en el període 2006 – 2011, i es va redactar un article científic (tipus *review*) a la revista *Analytica Chimica Acta* (Annex I) analitzant críticament la disponibilitat que actualment hi ha de CRMs per a l'especiació de mercuri en aquestes mostres. Es van comparar les característiques dels CRMs amb les matrius i les mostres abastades als articles publicats als últims cinc anys sobre especiació de mercuri, principalment en aigües, sòls, sediments, fangs d'aigües residuals, organismes aquàtics, sang, orina i cabell.

De totes les dades recollides en aquesta publicació, es va extreure que els CRMs són àmpliament emprats en treballs de recerca d'especiació analítica de mercuri. No obstant, s'ha d'assegurar que la similitud de la matriu d'aquests amb les mostres de camp sigui la màxima possible per tal d'obtenir informació valuosa. Així, quan es selecciona un CRM, no només s'han de considerar els valors certificats de les espècies de Hg, sinó també els principals components de la matriu.

El nostre anàlisi dels CRMs actualment disponibles indica que encara hi ha una manca d'aquests materials en matrius ambientals tal com sòls i aigües de diferent origen. Pel que respecta a les aigües, la inestabilitat tant del Hg total com del MeHg^+ en mostres emmagatzemades ⁵¹ pot ser un desavantatge pels productors de CRMs. Encara que està descrit que a nivells ambientals (ng L^{-1}) el MeHg^+ pot ser estabilitzat a llarg termini després d'acidificar la mostra amb HCl i mantenint-la preservada de la llum ⁵², tot i que, segurament, els baixos nivells de concentració dificultarien la producció.

Mentre que per organismes marins hi ha disponibles diversos CRMs, existeix un nombre reduït de materials per fluids biològics i cap per orina. Pel que respecta a les espècies de Hg, matrius de CRMs amb Hg inorgànic i EtHg^+ són escasses. És ben segur que el desenvolupament d'una futura legislació sobre els nivells de concentració de les espècies de Hg promourà la producció de nous materials. Quan altres eines d'assegurament de la qualitat no són disponibles, els processos de fortificació en mostres han de ser dissenyats amb cura per tal de simular el comportament de les espècies de Hg que naturalment es dona en la matriu d'interès.

1.4 Objectius

Degut a la necessitat d'estudis sistemàtics per a l'establiment de mètodes eficaços per a la determinació d'espècies de mercuri en matrius ambientals i biològiques complexes, que assegurin la inalterabilitat de les mateixes durant la seva manipulació, aspectes que són avui dia els punts més febles en l'especiació analítica, l'objectiu de la present Tesi es basa en l'optimització de mètodes analítics per a estudiar l'especiació de mercuri en mostres del medi aquàtic mitjançant la tècnica acoblada HPLC-UV-CV-AFS.

Dins d'aquest marc, la Tesi aborda uns objectius específics que es descriuen a continuació:

- Optimització de totes les condicions experimentals implicades en la determinació de mercuri inorgànic i metilmercuri mitjançant CV-AFS establint, en primer lloc, les condicions òptimes de detecció i, a continuació, estudiant la separació de les espècies mitjançant cromatografia de líquids en fase inversa; tot establint els paràmetres de qualitat per al mètode analític proposat.

- Modificació i/o optimització del mètode analític per tal de determinar altres espècies de mercuri que de manera poc habitual es puguin trobar en mostres ambientals i/o biològiques.

- Desenvolupament d'un mètode de preconcentració *on-line* per a l'especiació de mercuri en aigües.

- Establiment dels efectes de pretractament en la determinació de mercuri en mostres de sediments.

- Aplicació de la metodologia analítica desenvolupada a mostres ambientals i biològiques (aigües, sediments i biota) prèviament

estudiant diferents mètodes d'extracció d'espècies emprant materials de referència.

Els resultats obtinguts dins del tres primers objectius es mostren i es discuteixen al Capítol 3 de la present memòria; els estudis realitzats per a l'avaluació dels efectes de pretractament de mostra en sediments es descriuen al Capítol 4, i l'últim capítol descriu l'aplicació a mostres ambientals i biològiques del medi aquàtic.

Als annexos I i II s'inclouen els articles científics publicats fins al moment. L'Annex I consta d'un article sobre la determinació de Hg^{2+} i MeHg^+ en aigües contaminades mitjançant HPLC-UV-CV-AFS (que correspon a una part del Capítol 3 i a l'apartat 5.2), mentre que a l'Annex II es troba un *review* sobre materials de referència certificats per a l'especiació de mercuri en matrius biològiques i ambientals. Actualment s'està finalitzant la redacció de dos articles més, un sobre l'efecte del pretractament de mostra en sediments i l'altre sobre l'aplicació de la metodologia a mostres ambientals i biològiques (capítols 4 i 5, respectivament).

Capítol 2

Instrumentació, patrons i materials de referència

2.1 Determinació de mercuri total

2.1.1 Digestió de la mostra

El procés de digestió per a la determinació de mercuri total ha d'assegurar la total transformació de totes les formes químiques de mercuri a mercuri inorgànic (Hg^{2+}).

Per a la digestió de mostres sòlides es va utilitzar l'extracció mitjançant aigua règia segons el procediment recomanat per la norma ISO 11466 ⁵³. Per a l'extracció de mercuri i elements volàtils, cal connectar un capçal d'absorció a la sortida del refrigerant d'aigua, tal i com es mostra a la Figura 2.1. El fet que aquest procediment no faci servir àcid fluorhídric ni perclòric, junt amb el fet que el sistema sigui senzill, el fa un mètode útil quan s'han de tractar un elevat nombre de mostres de forma reproduïble i ha estat àmpliament emprat en la digestió de mostres ambientals.

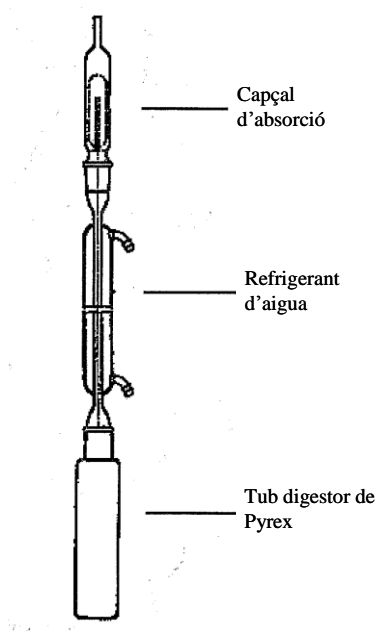


Figura 2.1: Sistema per a la digestió amb aigua règia.

2.1.2 Mesura mitjançant tècniques espectroscòpiques

Les principals tècniques utilitzades com a detectors a la present Tesi van ser el generador de vapor fred amb detector de fluorescència atòmica (CV-AFS) i el plasma acoblat inductivament amb detector de masses (ICP-MS). A continuació es descriuen breument aquestes tècniques i la instrumentació emprada.

2.1.2.1 CV-AFS

✓ *Generador de vapor fred (CV)*

Sistema de generació d'hidrurs P.S.Analytical model 10.004: consta d'una bomba peristàltica multicanal de velocitat constant (100 rpm) que permet el bombeig de diferents reactius i la formació de vapor de mercuri en un bucle de reacció. El vapor format arriba a un separador gas-líquid on és arrossegat cap al detector mitjançant un corrent d'argó (300 mL min⁻¹) i és assecat en una membrana PermaPure mitjançant nitrogen a contracorrent (2,5 L min⁻¹). A la Figura 2.2 es mostra l'esquema de l'instrument.

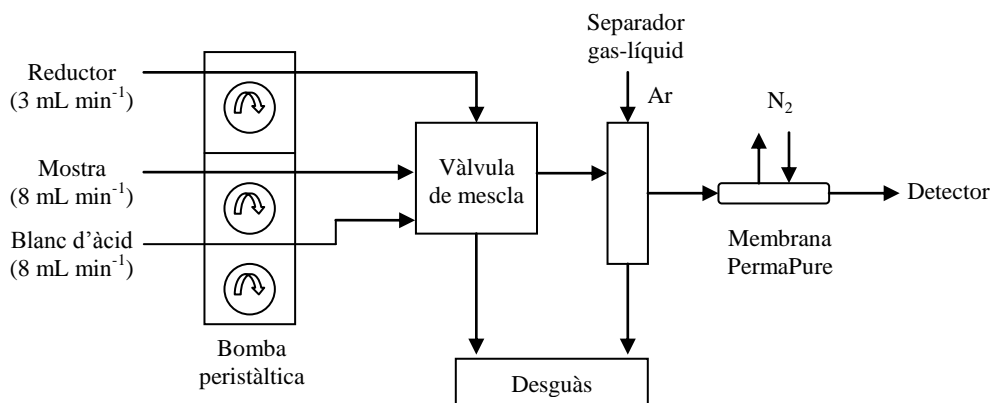


Figura 2.2: Esquema del generador de vapor fred (CV).

✓ *Detector AFS*

Espectrofotòmetre de fluorescència atòmica P.S.Analytical Merlin 10.023: detector de mercuri d'elevada sensibilitat que funciona basant-se en principis de la fluorescència atòmica. A la Figura 2.3 es mostra la configuració òptica del detector.

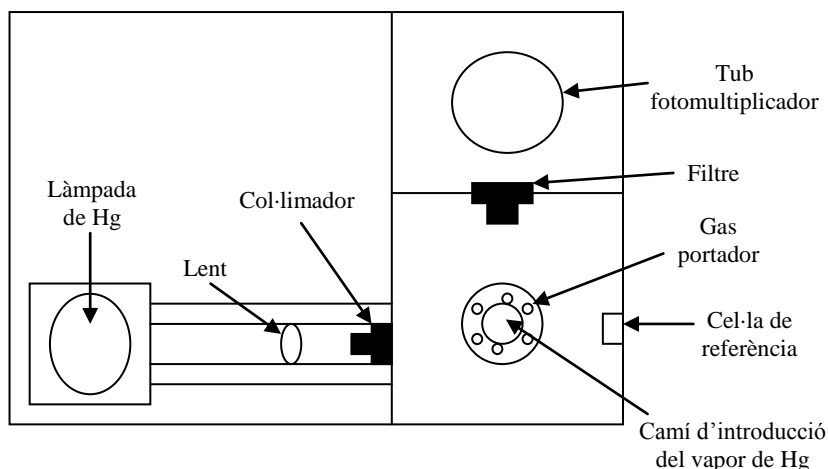
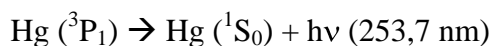


Figura 2.3: Configuració òptica del detector AFS.

El mercuri entra en el detector en forma gasosa i és conduït cap a una cel·la de mesura. La font de radiació i el fotomultiplicador es troben en angle recte un respecte l'altre per tal de mesurar el senyal de fluorescència sense interferències de la font. El mercuri vapor absorbeix la radiació promocionant-se a un estat energètic superior i després torna al seu estat fonamental emetent radiació a la seva longitud d'ona característica (253,7 nm), essent aquesta radiació la que detecta l'espectrofotòmetre.



L'obtenció de la radiació d'excitació requerida s'aconsegueix amb una làmpada de mercuri específica i un filtre fixat a 254 nm. Un

tub fotomultiplicador detecta l'emissió de fluorescència que prové de la mostra.

L'ús de la làmpada i el filtre fan que el detector sigui molt específic i ajuda a la minimització d'efectes d'interferència.

2.1.2.2 ICP-MS

El plasma acoblat inductivament amb detector de masses (ICP-MS) és una de les tècniques analítiques més freqüentment emprades en el camp de la determinació multielemental. L'ICP-MS és una eina potent per a la determinació de traces i ultra-traces i que presenta una elevada precisió a les mesures. A la present Tesi, es va utilitzar l'equip Agilent 7500ce series Octopole Reaction System, del qual es pot observar un esquema a la Figura 2.4.

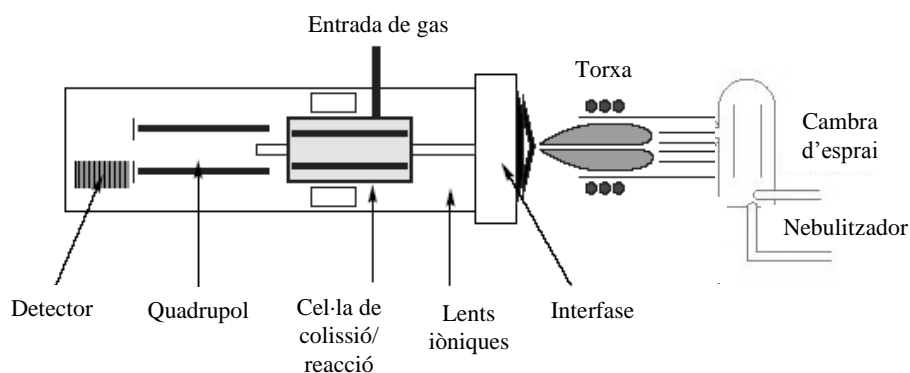


Figura 2.4: Esquema del sistema ICP-MS.

El sistema ICP-MS està format per:

✓ *Nebulitzador*. El sistema d'injecció de la mostra líquida es realitza mitjançant un sistema nebulitzador. Aquest sistema aconsegueix l'atomització, per efecte Venturi, del líquid que entra al dispositiu per un canal gràcies a una bomba peristàltica.

✓ *Cambra d'esprai.* La seva funció és separar i eliminar les gotes grans (superiors a 10 μm) de solució que s'hagin format durant el procés de nebulització. Aquestes van a parar a les parets de la cambra i es treuen per drenatge. D'aquesta manera s'elimina un 99% de mostra en solució.

✓ *Torxa i bobina d'inducció.* La torxa, formada per tres tubs concèntrics de quars, és a on es genera el plasma d'argó. Està envoltada d'una espiral que transmet una radiofreqüència al gas d'argó que circula per l'interior. En aquesta part és on es produeix la ionització de la mostra.

✓ *Interfase.* Tant el plasma com els ions passen des de condicions atmosfèriques a alt buit gràcies a la interfase. Aquesta està formada per dos cons de metall de Ni a través dels quals el plasma i els ions són extrets al MS a través d'un nivell de buit creixent.

✓ *Lents iòniques.* Aquestes quatre lents tenen la missió d'enfocar el feix d'ions que prové dels cons i entra al quadrupol.

✓ *Cel·la de col·lisió/reacció.* Consisteix en una cel·la pressuritzada, situada després de les lents iòniques, on s'eliminen les interferències poliatòmiques degut als efectes del gas reactiu que interacciona amb les interferències (reacció) i del gas inert que xoca amb els interferents (col·lisió).

✓ *Quadrupol.* La seva funció és separar els ions en funció de la relació massa/càrrega (m/z). Consta de quatre barres metàl·liques

paral·leles i equidistants a l'eix a les quals se'ls aplica un potencial. Aquest genera una sèrie de camps responsables de la trajectòria que adquireixen els ions en entrar al quadrupol. Només els ions d'una determinada massa/càrrega tenen una trajectòria estable i arriben al detector.

✓ *Detector.* És el responsable d'enregistrar el senyal corresponent a l'ió que arriba. El més utilitzat és el *Channeltron electron multiplier* i el seu efecte és molt semblant a un fotomultiplicador. Quan els ions positius surten de l'analitzador de masses, són atrets per un potencial negatiu que fa que els ions impactin sobre la superfície essent, així, detectats.

2.2 Especiació de mercuri

2.2.1 Extracció de la mostra

Tal i com s'ha descrit anteriorment, l'etapa de preparació de mostra per a l'especiació de mercuri és crítica. L'extracció s'ha de realitzar mitjançant un procés suficientment suau per tal de mantenir la integritat de les espècies originals.

Per a l'extracció de mostres sòlides es va utilitzar l'extracció assistida per microones. El tipus d'àcids emprats i els programes de temps i temperatura aplicats al microones variaran en funció del tipus de mostra a analitzar.

L'equip de microones utilitzat durant aquesta Tesi ha estat el Milestone ETHOS TOUCH model SK 12T. Aquest sistema consta de 12 recipients de Teflon que es tanquen hermèticament i es controlen mitjançant una sonda de temperatura. A la Figura 2.5 es mostra una imatge de l'equip.



Figura 2.5: Microones emprat en l'extracció d'espècies de Hg.

2.2.2 Mesura mitjançant tècniques acoblades

2.2.2.1 HPLC-UV-CV-AFS

El mètode utilitzat en l'especiació de mercuri està basat en l'acoblament cromatografia de líquids (HPLC) – radiació ultraviolada (UV) – generació de vapor fred (CV) – espectroscopia de fluorescència atòmica (AFS). A la Figura 2.6 es mostra l'esquema de l'acoblament HPLC-UV-CV-AFS.

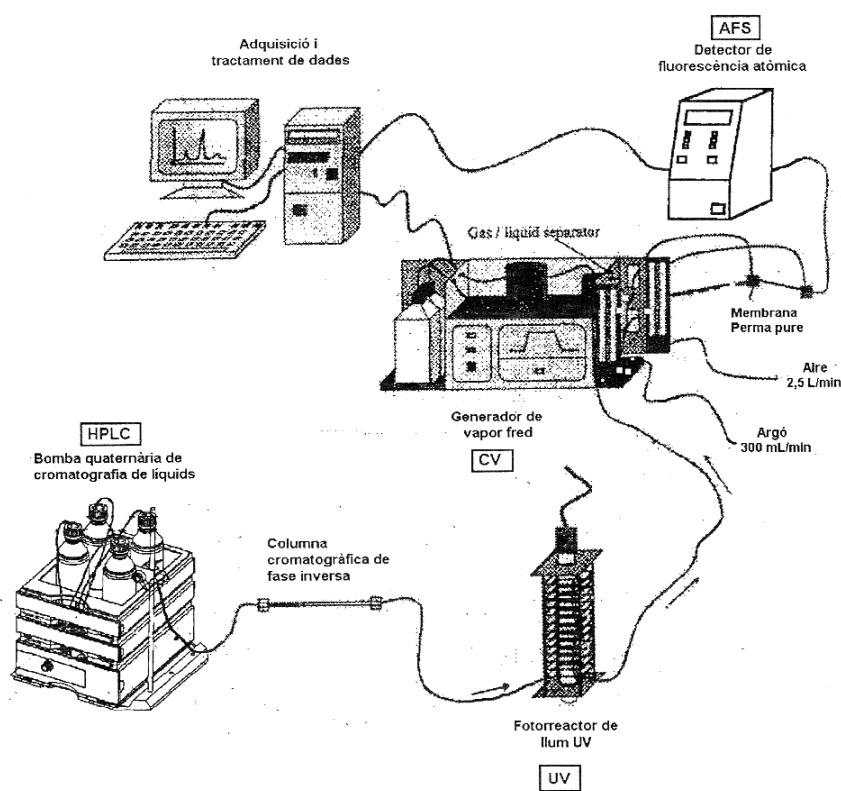


Figura 2.6: Esquema de l'acoblament HPLC-UV-CV-AFS.

La mostra s'injecta en el sistema cromatogràfic a través d'un injector manual mitjançant una xeringa de 500 μ L. Un cop separades les espècies de mercuri (Hg^{2+} , MeHg^+ i, si és el cas, EtHg^+), l'eluent passa pel fotorreactor UV on les espècies organomercúriques són trencades i queden també en forma de Hg^{2+} . Tot el Hg^{2+} arriba al mòdul generador de vapor fred on es barreja amb el reductor i s'obté vapor de mercuri metàl·lic que arriba al detector de AFS mitjançant un corrent d'argó. El control de l'instrument i l'adquisició de dades es realitza amb el programa informàtic Pendragon 1.0.

✓ *Sistema HPLC*

- Injectors manuals Rheodyne 7725i (SS) i 9725 (PEEK).
- Bucle d'injecció de 100 μ L de SS i PEEK.
- Bomba quaternària Agilent 1100:
 - Interval de cabal: 0,001 – 10 mL min⁻¹
 - Pressió: Rang operatiu 0 – 400 bar fins 5 mL min⁻¹
Rang operatiu 0 – 200 bar fins 10 mL min⁻¹
 - Rang de pH recomanat 1,0 a 12,5

✓ *Columna cromatogràfica*

ODS Hypersil (*reversed phase*) Thermo Hypersil-Keystone; dimensions: 250 x 4,6 mm; diàmetre de partícula: 5 μ m; diàmetre de porus: 120 Å; rang de pH: 2 a 8; pressió màxima: 400 bar.

✓ *Fotorreactor UV*

Per tal de fragmentar els compostos organomercúrics (MeHg^+ , EtHg^+) s'ha utilitzat un fotorreactor que consta d'una làmpada UV i

d'un tub de PTFE enrotllat en espiral on té lloc la fotoreacció (Figura 2.7).

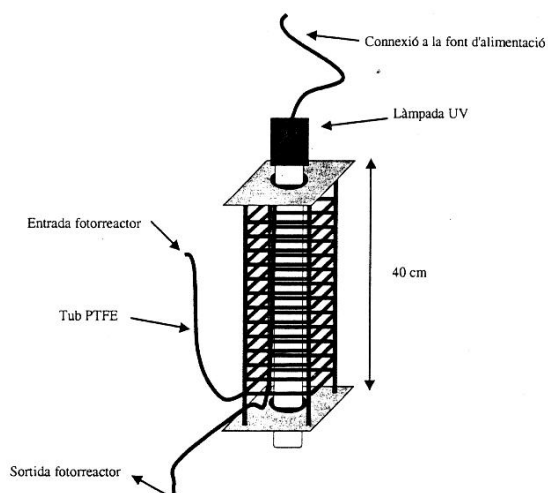


Figura 2.7: Fotorreactor UV

Es tracta d'una làmpada Heraeus TQ 150 que genera 150W de radiació al voltant de 250 nm. La làmpada està introduïda en un suport sobre el qual està enrotllat un tub de PTFE de 0,5 mm de diàmetre i 12 metres de longitud. Tot aquest sistema està recobert d'una làmina d'alumini que reflecteix la radiació no absorbida i evita la seva sortida cap a l'exterior. Aquesta etapa de fotooxidació prèvia a la reducció és necessària per a les espècies organomercúriques ja que sinó no es generaria el vapor de mercuri elemental i no es detectarien.

2.3 Patrons i materials de referència

2.3.1 Solucions patró

- Mercuri inorgànic (Hg^{2+}): solució mare de 1000 mg L^{-1} (com a Hg) preparada a partir de HgCl_2 (Merck, Darmstadt, Alemanya) dissolt en HNO_3 al 1% (v/v) (Panreac, Hiperpur, valor màxim garantit de $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$ de Hg).

- Metilmercuri (MeHg^+): solució mare de 1000 mg L^{-1} (com a Hg) preparada a partir de CH_3HgCl (Carlo Erba, Milà, Itàlia) dissolt en metanol al 3%.

- Etilmercuri (EtHg^+): solució mare de 1000 mg L^{-1} (com a Hg) preparada a partir de $\text{C}_2\text{H}_5\text{HgCl}$ (Carlo Erba, Milà, Itàlia) dissolt en acetonitril al 20%.

Aquestes solucions mare s'emmagatzemen en ampolles de vidre topazi a una temperatura de $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Les solucions de treball es preparen diàriament a partir de les solucions mare mitjançant les dilucions apropiades.

2.3.2 Materials de referència

- IAEA-405: Sediment d'estuari de la *International Atomic Energy Agency* (Àustria), amb valors recomanats de $0,81 \pm 0,04 \text{ mg kg}^{-1}$ pel Hg total i $5,49 \pm 0,53 \mu\text{g kg}^{-1}$ pel MeHg^+ (com a Hg inorgànic).

- ERM-CC580: Sediment d'estuari del *Institute for Reference Materials and Measurements* (Bèlgica), amb valors certificats de $132 \pm 3 \text{ mg kg}^{-1}$ pel Hg total i $75,5 \pm 3,7 \mu\text{g kg}^{-1}$ pel MeHg^+ .

- BCR 463: Tonyina del *Institute for Reference Materials and Measurements* (Bèlgica), amb valors certificats de $2,85 \pm 0,16 \text{ mg kg}^{-1}$ pel Hg total i $3,04 \pm 0,16 \text{ mg kg}^{-1}$ pel MeHg⁺.

- DOLT-4: Fetge de peix (*Squalus acanthias*) del *National Research Council Canada* (Canadà), amb valors certificats de $2,58 \pm 0,22 \text{ mg kg}^{-1}$ pel Hg total i $1,33 \pm 0,12 \text{ mg kg}^{-1}$ pel MeHg⁺ (com a Hg).

Capítol 3

Metodologia analítica per a l'especiació
de mercuri

3.1 Introducció

L'especiació analítica de mercuri es basa en tècniques acoblades que consten d'una tècnica de separació acoblada a diferents detectors d'espectroscopia molecular o atòmica, tals com AFS, AAS, ICP-MS i UV. El detector d'AFS proporciona una bona especificitat i sensibilitat adequada per a la determinació de mercuri total en mostres mediambientals. A més a més, donat que aquest detector presenta un baix cost i és senzill d'utilitzar, l'AFS és un detector fàcil d'introduir en laboratoris que realitzen anàlisis de rutina. Per això, en aquesta Tesi, s'ha desenvolupat metodologia analítica per a l'especiació de mercuri fent servir l'acoblament HPLC-UV-CV-AFS com a tècnica de mesura.

En la primera part d'aquest capítol, es presenta un estudi sistemàtic dels factors que fan variar el senyal de fluorescència i la separació de les espècies de mercuri en fase inversa. Els factors a considerar van ser: el medi de preparació dels patrons de mesura; la composició de la fase mòbil i el tipus d'agent reductor emprat. Un cop estudiats aquests factors, es van establir les condicions òptimes per a la separació i detecció del Hg^{2+} i del MeHg^+ . Els estudis es centren principalment en aquestes dues espècies de mercuri ja que, en mostres del medi aquàtic, són les que més àmpliament es descriuen a la bibliografia.

Estudis basats en altres espècies orgàniques de mercuri són molt menys freqüents; l' EtHg^+ és la tercera espècie més esmentada a la bibliografia seguida pel PhHg^+ ⁵⁴. Tot i que no és molt comú trobar aquestes espècies a les mostres reals, en una segona etapa del treball, es va modificar el mètode anteriorment optimitzat per tal de poder determinar l' EtHg^+ juntament amb les altres dues espècies.

Degut a que els nivells de concentració de mercuri que es troben a les aigües naturals són molt baixos (ng L^{-1}), en molts casos cal una etapa prèvia de preconcentració, ja que sinó no seria possible detectar les diferents espècies tant per AFS com per ICP-MS. És per això que, en la darrera part d'aquest capítol, s'introdueix un estudi preliminar sobre la preconcentració *on-line* d'espècies de mercuri en mostres d'aigua.

3.2 Estudis preliminars

En estudis previs d'especiació de mercuri i metilmercuri realitzats al grup de recerca es va emprar una fase mòbil descrita a la bibliografia formada per una barreja de metanol – aigua amb bromur de tetrabutilamoni (TBAB) 0,01M com a formador de parells iònics i NaCl 0,025M en una proporció 52:48⁵⁵. Els resultats van mostrar una manca de reproductibilitat, sobretot a baixes concentracions. Donat que a la bibliografia s'han descrit problemes d'adsorció de compostos de mercuri quan el sistema cromatogràfic conté elements d'acer inoxidable⁵⁶, es va dur a terme un estudi comparatiu de dos sistemes d'injecció (acer inoxidable (SS) i PEEK) per tal de comprovar la influència d'aquest en la reproductibilitat del senyal obtingut.

Per a preparar la fase mòbil es pesen les quantitats adequades de TBAB i NaCl i es dissolen en aigua doblement desionitzada. La dissolució resultant i el metanol es filtren a través d'una membrana de niló de 0,20µm de porus. Finalment, es barregen el metanol i la dissolució aquosa en la proporció adequada. L'etapa de reducció es va dur a terme mitjançant una dissolució aquosa de SnCl₂ al 1,5% en HCl al 4% a un cabal d'uns 4 mL min⁻¹.

Fent servir els dos sistemes d'injecció (SS i PEEK) es va realitzar un estudi basat en fer passar volums creixents (des de 150µL fins a 2 mL) de dissolució patró mescla de Hg²⁺ i MeHg⁺ de 500 µg L⁻¹ de concentració per a cada espècie, a través d'un bucle de 100 µL de capacitat.

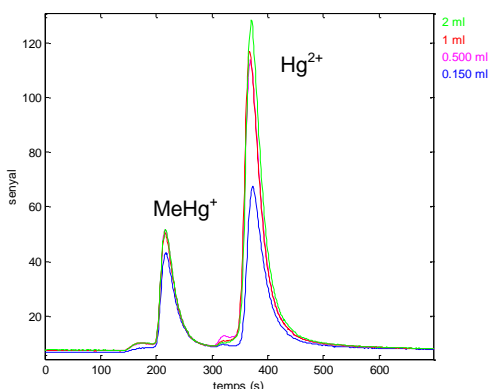


Figura 3.1: Cromatogrames obtinguts per a una mescla de Hg^{2+} i MeHg^+ en funció del volum emprat (SS).

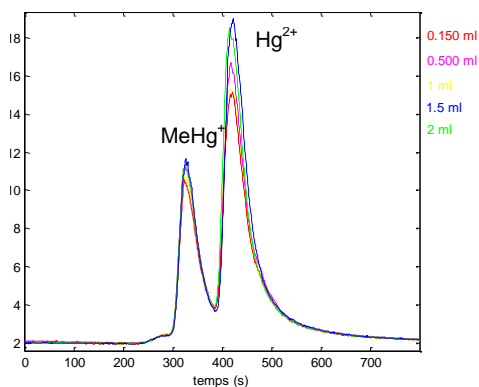


Figura 3.2: Cromatogrames obtinguts per a una mescla de Hg^{2+} i MeHg^+ en funció del volum emprat (PEEK).

La Figura 3.1 mostra els resultats obtinguts emprant un sistema d'injecció d'acer inoxidable. Com es pot observar, l'alçada de pic del Hg^{2+} experimenta un augment del 50% a mesura que s'incrementa el volum de solució patró. Aquest fet és degut a la retenció del Hg^{2+} a l'injector a mesura que la solució patró va passant. Aquest efecte de memòria no és tan acusat en el cas del MeHg^+ , ja que l'augment del senyal és d'aproximadament un 20%. La quantificació d'aquest efecte es mostra a la Figura 3.3 on es representen les àrees dels pics cromatogràfics per ambdues espècies en funció del volum de mostra que s'ha fet passar pel bucle d'injecció.

Les Figures 3.2 i 3.4 mostren els resultats obtinguts amb un sistema d'injecció de PEEK. En aquest cas, la intensitat de senyal pel Hg^{2+} experimenta un augment del 30% a mesura que s'augmenta el volum passat pel bucle. Pel que fa al MeHg^+ , la variació del senyal és només del 15%, valor acceptable per afirmar que aquesta espècie queda poc retinguda en el sistema d'injecció de PEEK, en aquest

sistema de treball. Al cromatograma obtingut, es pot observar que en aquest sistema i amb aquesta fase mòbil, no s'aconsegueix una total resolució dels pics.

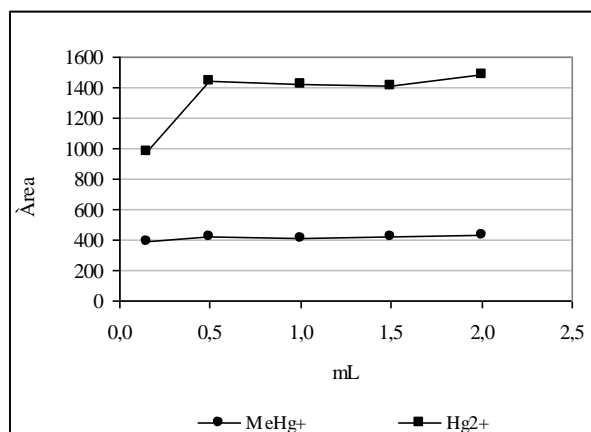


Figura 3.3: Variació de l'àrea de pic en funció del volum emprat (SS).

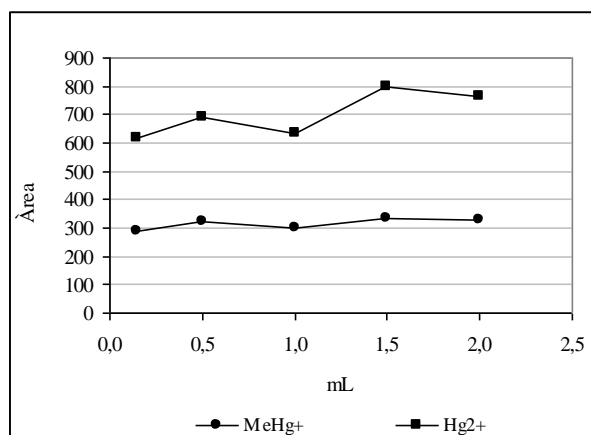


Figura 3.4: Variació de l'àrea de pic en funció del volum emprat (PEEK).

El fet d'obtenir intensitats de senyal inferiors quan s'empra un sistema de PEEK, respecte a les obtingudes amb SS (7 vegades pel cas del Hg²⁺ i 5 vegades pel MeHg⁺), és també indicador de la disminució dels efectes de memòria quan s'empra PEEK.

Amb l'objectiu d'establir la reproductibilitat de la injecció per a cada material, es van injectar 5 volums diferents (0,15 - 0,5- 1 - 1,5 i 2 mL) d'una dissolució patró d'ambdues espècies en 3 dies no consecutius. Els valors de desviació estàndard relativa (RSD) es van calcular fent el valor promig de les RSD de les àrees de pic obtingudes en cada dia diferent per a tots els volums. Els resultats obtinguts es mostren a la Figura 3.5. Mentre que pel MeHg^+ la reproductibilitat en termes de RSD és similar en ambdós sistemes, la reproductibilitat del Hg^{2+} millora significativament al sistema de PEEK.

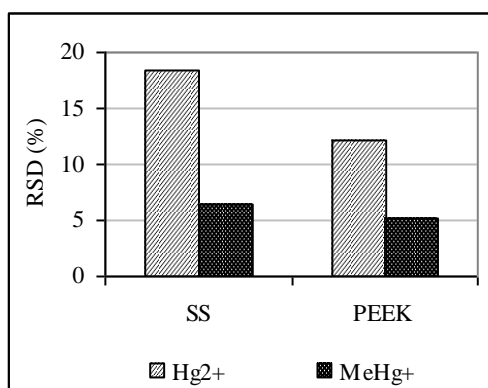


Figura 3.5: RSD (%) obtinguda pel Hg^{2+} i el MeHg^+ emprant SS i PEEK.

Es pot concloure que, fent servir aquesta fase mòbil, tot i que el sistema de PEEK origina resultats més reproduïbles que el sistema d'acer inoxidable, existeixen altres factors que provoquen problemes de reproductibilitat en el senyal del Hg^{2+} , ja que es continua obtenint una RSD del 12%. L'efecte de memòria persistent que s'observa emprant aquesta fase mòbil pot ser degut a altres factors independentment de la composició del sistema d'injecció. Doncs, atribuint aquesta manca de reproductibilitat a la composició de la fase mòbil, el primer estudi que es va portar a terme va ser l'assaig de diferents fases mòbils tot mantenint el sistema d'injecció inicial de SS.

3.3 Selecció de la fase mòbil

Quan s'empra cromatografia de líquids com a tècnica de separació, les fases mòbils més emprades per a l'especiació de mercuri en mostres biològiques i ambientals contenen tampons, modificadors orgànics, formadors de parells iònics o agents quelatants ⁵⁷. Quan s'utilitza TBAB com a formador de parells iònics, l'aparició de pics dobles, cues i efectes de memòria es soluciona només si s'afegeixen grans proporcions de metanol o 2-mercaptoetanol ^{36,56,70,74}. La preparació de les solucions de TBAB en presència de NaCl millora la forma dels pics, però aquesta solució no és recomanable quan es treballa amb detector d'ICP-MS ⁵⁶. L'ús d'agents quelatants, tals com la L-cisteïna ^{59,61} o els pirrolidinditiocarbamats (PDCs) d'amoni o sodi ^{44,63,65,66,84}, estableixen un enllaç covalent estable entre els grups mercapto i el mercuri, que sembla que prevé l'adsorció del mercuri en els grups silanol de les fases estacionàries.

En aquest apartat es descriu un estudi sistemàtic, no descrit prèviament a la bibliografia, que es va dur a terme per tal de comparar tres fases mòbils de diferent naturalesa en la determinació de Hg^{2+} i MeHg^+ emprant HPLC-UV-CV-AFS com a tècnica de mesura.

Les fases mòbils emprades en aquest estudi estan constituïdes per una barreja de dissolvent orgànic – aigua on la fase aquosa conté TBAB, L-cisteïna o APDC. La composició de les fases mòbils emprades a l'estudi es mostra a la Taula 3.1.

En tots els casos, el sistema d'injecció emprat va ser d'acer inoxidable i es va treballar en fase inversa amb el mateix tipus de columnes C_{18} . Com a reductor es va fer servir una dissolució aquosa de SnCl_2 al 1,5% en HCl al 4% a un cabal d'uns 4 mL min^{-1} . En cada cas,

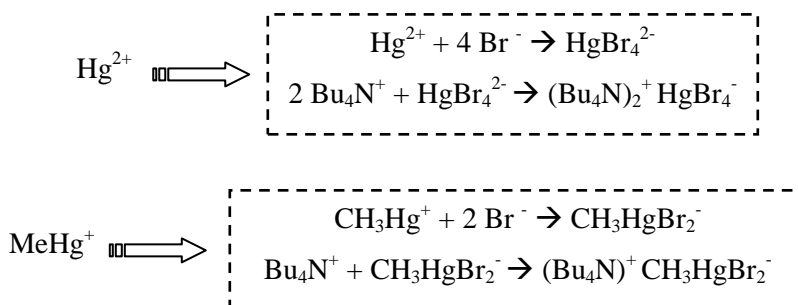
es van preparar en el moment de l'anàlisi solucions patró mescla de Hg^{2+} i MeHg^+ en fase mòbil a concentracions de 50, 100, 250 i 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ per a cadascuna de les espècies.

Taula 3.1: Composició de les fases mòbils estudiades

	Fase orgànica	Fase aquosa	Proporció
TBAB	MeOH	TBAB 0,01M + NaCl 0,025M (pH 5,7)	50:50
L-cisteïna	-	L-cisteïna 0,5% (m/v) + NH_4Ac 0,06M (pH 5)	100
APDC	ACN	APDC 0,0015M + NH_4Ac 0,01M (pH 5,5)	65:35

a) TBAB

La separació de les espècies es va dur a terme mitjançant bromur de tetrabutilamoni (TBAB) com a formador de parells iònics. Està demostrat que la utilització de sals d'amoni quaternàries, tot i que no és molt comú, és efectiva per a la separació d'aquestes espècies^{36,56,58}. La formació dels parells iònics té lloc de la següent forma:



La fase mòbil va consistir en una barreja de metanol – aigua que conté TBAB en una concentració 0,01M i NaCl 0,025M a pH 5,7. La separació de les dues espècies es va dur a terme en condicions isocràtiques a una proporció 50:50 i a un cabal de 1,2 mL min⁻¹. Es va preferir l'addició de MeOH com a modificador orgànic en lloc de 2-mercaptoetanol degut a la seva menor toxicitat.

Amb una dissolució patró individual es van establir l'ordre d'elució i els temps de retenció (t_R) de cada espècie. Cada dissolució patró mescla es va injectar per triplicat en 3 dies consecutius. Com a exemple, a la Figura 3.6 es mostren els cromatogrames obtinguts en una de les sessions de treball.

Tal com s'observa, per a concentracions menors o igual a 100 µg L⁻¹ el Hg²⁺ presenta problemes en la detecció. Per aquesta espècie, en augmentar la concentració s'observa un augment del senyal que no és lineal (probablement degut a l'efecte de memòria) i presenta una reproductibilitat en termes de RSD del 9%. Pel que respecta al MeHg⁺, el senyal que s'obté és lineal amb la concentració i presenta una RSD inferior al 4%. Els temps de retenció (t_R) d'ambdues espècies fluctuen en cada cromatograma però, la variació és en tots els casos inferior al 6%.

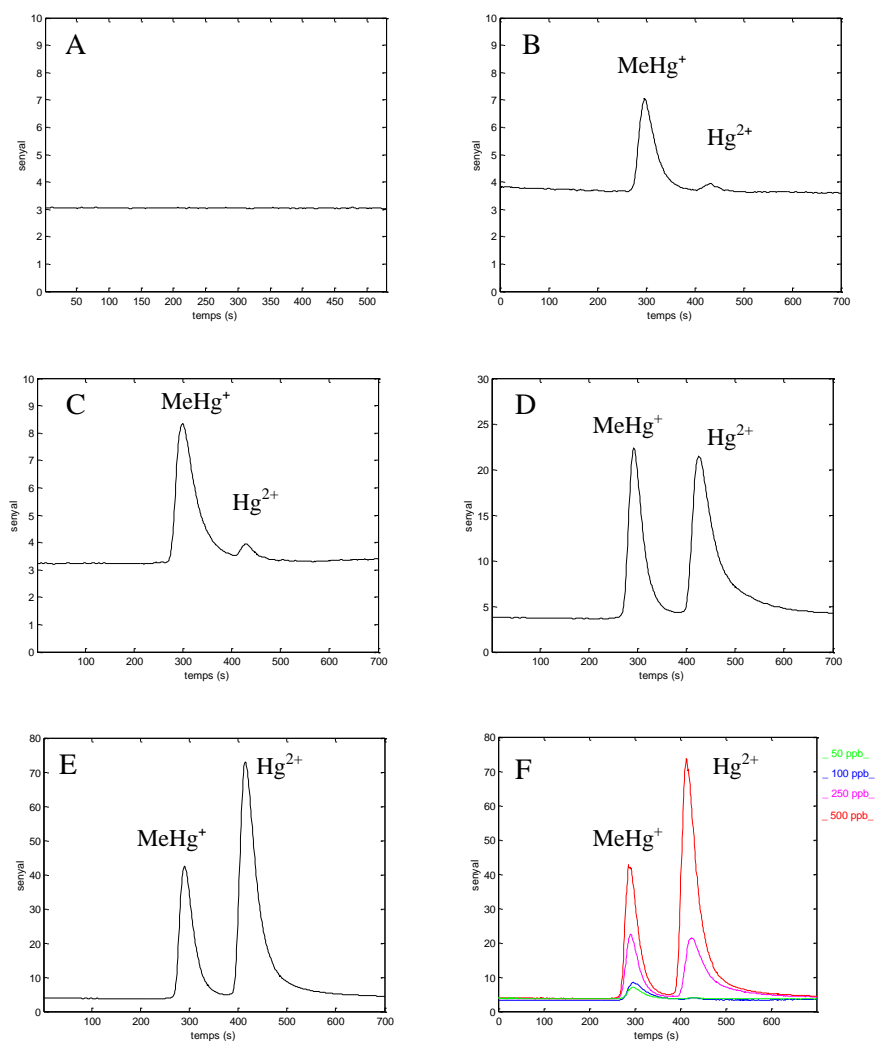
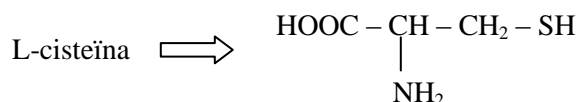


Figura 3.6: Cromatogrames obtinguts per a una mescla de Hg^{2+} i MeHg^+ amb TBAB. A: blanc (FM + reductor), B: $50 \mu\text{g L}^{-1}$, C: $100 \mu\text{g L}^{-1}$, D: $250 \mu\text{g L}^{-1}$, E: $500 \mu\text{g L}^{-1}$, F: superposició.

b) L-cisteïna

La separació de les espècies es va portar a terme mitjançant L-cisteïna (àcid 2-amino-3-mercaptopropiònic) com a fase mòbil ^{59,60,61}. El grup mercapto d'aquest compost crea un enllaç covalent molt estable

amb el mercuri, originant compostos del tipus $\text{Hg}(\text{cys})_n$ ($n = 2, 3, 4$) en funció de la relació molar ⁶².



La fase mòbil va consistir en una dissolució aquosa que conté L-cisteïna a una concentració 0,5% (m/v) i NH_4Ac 0,06M a pH 5. La separació de les dues espècies es va dur a terme en condicions isocràtiques a un cabal d' 1,2 mL min^{-1} .

Amb una dissolució patró individual de 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ es van establir l'ordre d'elució i els temps de retenció (t_R) de cada espècie. Cada dissolució patró mescla es va injectar per duplicat en 2 dies no consecutius. Com a exemple, a la Figura 3.7 es mostren els cromatogrames obtinguts en una de les sessions de treball.

Com es pot observar, les dues espècies de mercuri es van poder detectar a concentracions de 50 $\mu\text{g L}^{-1}$. A més, el senyal és lineal amb la concentració i els pics són reproduïbles, tant pel que fa a la intensitat del senyal (RSD <4%), com en els temps de retenció (<2%). S'obté però una resolució dolenta, ja que el Hg^{2+} elueix en pocs minuts i seguidament elueix el MeHg^+ . Aquest fet és degut a que els complexos formats tenen càrrega i, per tant, en un sistema cromatogràfic en fase inversa els compostos queden poc retinguts. L'addició d'un 5% de metanol a la fase mòbil va comportar un solapament dels pics que va impedir la seva quantificació.

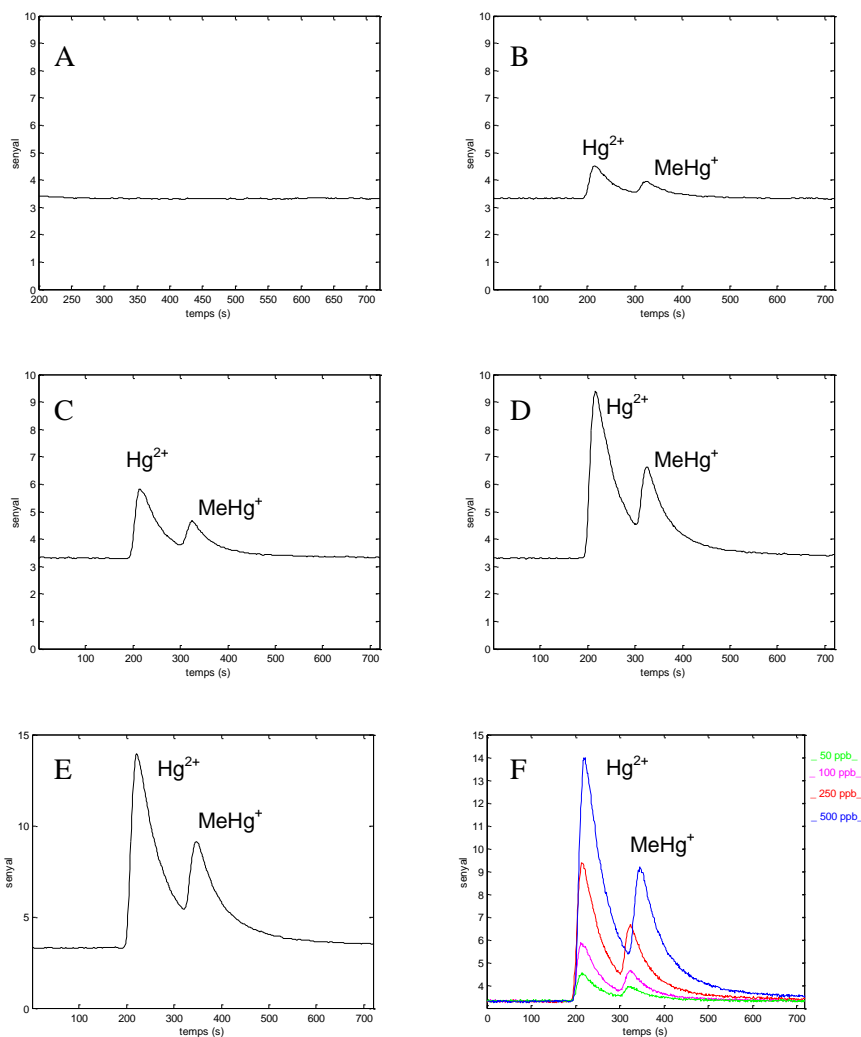
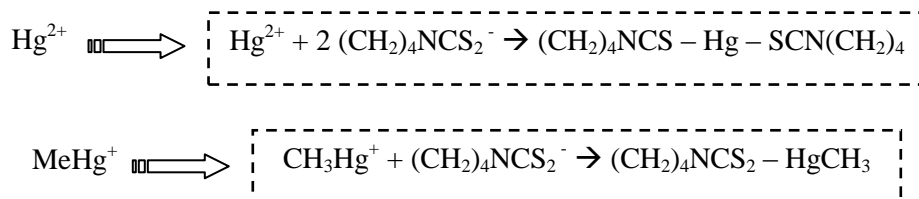


Figura 3.7: Cromatogrames obtinguts per a una mescla de Hg^{2+} i MeHg^+ amb L-cisteïna. A: blanc (FM + reductor), B: $50 \mu\text{g L}^{-1}$, C: $100 \mu\text{g L}^{-1}$, D: $250 \mu\text{g L}^{-1}$, E: $500 \mu\text{g L}^{-1}$, F: superposició.

c) APDC

En aquest cas, la separació de les espècies es va dur a terme emprant pirrolidinditiocarbamat d'amoni (APDC) com a agent complexant^{44,63,64,65}. L'APDC no és selectiu i reacciona amb molts ions metàl·lics, però si la detecció es realitza mitjançant CV-AFS no

apareixen problemes d'interferències ⁶⁶. La formació dels quelats té lloc de la següent forma:



En aquest cas la fase mòbil va consistir en una barreja d'acetonitril – aigua que conté APDC en una concentració 0,0015M i NH₄Ac 0,01M a pH 5,5. La separació de les dues espècies es va portar a terme en condicions isocràtiques a una proporció 65:35 i un cabal de 1,5 mL min⁻¹.

Amb una dissolució patró individual de 500 µg L⁻¹ es van establir l'ordre d'elució i els temps de retenció (t_R) de cada espècie. Cada dissolució patró mescla es va injectar per duplicat en 3 dies consecutius. Com a exemple, a la Figura 3.8 es mostren els cromatogrames obtinguts en una de les sessions de treball.

Com es pot observar, les dues espècies de mercuri presenten una bona i similar intensitat de senyal, obtenint-se pics sense cues i reproduïbles tant en intensitat de senyal (RSD <6%) com en temps de retenció (RSD <0,5%). D'altra banda, s'observa també una bona linealitat de la resposta i molt bona resolució.

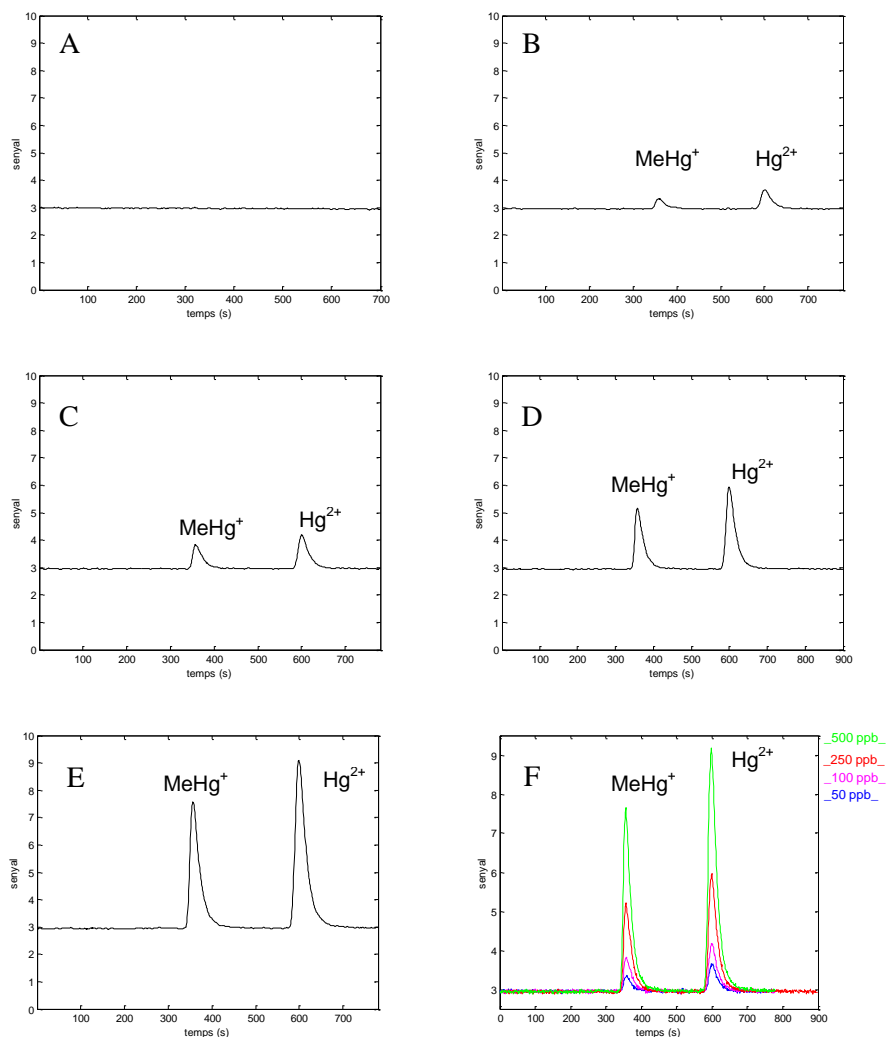


Figura 3.8: Cromatogrames obtinguts per a una mescla de Hg^{2+} i MeHg^+ amb APDC. A: blanc (FM + reductor), B: $50 \mu\text{g L}^{-1}$, C: $100 \mu\text{g L}^{-1}$, D: $250 \mu\text{g L}^{-1}$, E: $500 \mu\text{g L}^{-1}$, F: superposició.

A partir dels resultats obtinguts es va veure que la fase mòbil que proporcionava els millors resultats des d'un punt de vista cromatogràfic era la tercera de les estudiades (ACN:APDC), malgrat la menor intensitat del senyal de fluorescència per ambdues espècies i el temps d'anàlisi lleugerament superior. Abans de continuar amb els estudis

emprant aquesta fase mòbil, es va estudiar la influència del percentatge de dissolvent orgànic a la fase mòbil ACN:APDC per tal de reduir el temps d'anàlisi mantenint una bona separació. A la Figura 3.9 es mostren els cromatogrames obtinguts en funció del percentatge de dissolvent orgànic. Com es pot observar, en passar de 65% a 75% d'ACN el temps d'anàlisi disminueix en 4 minuts mentre que la intensitat del senyal augmenta un 40%.

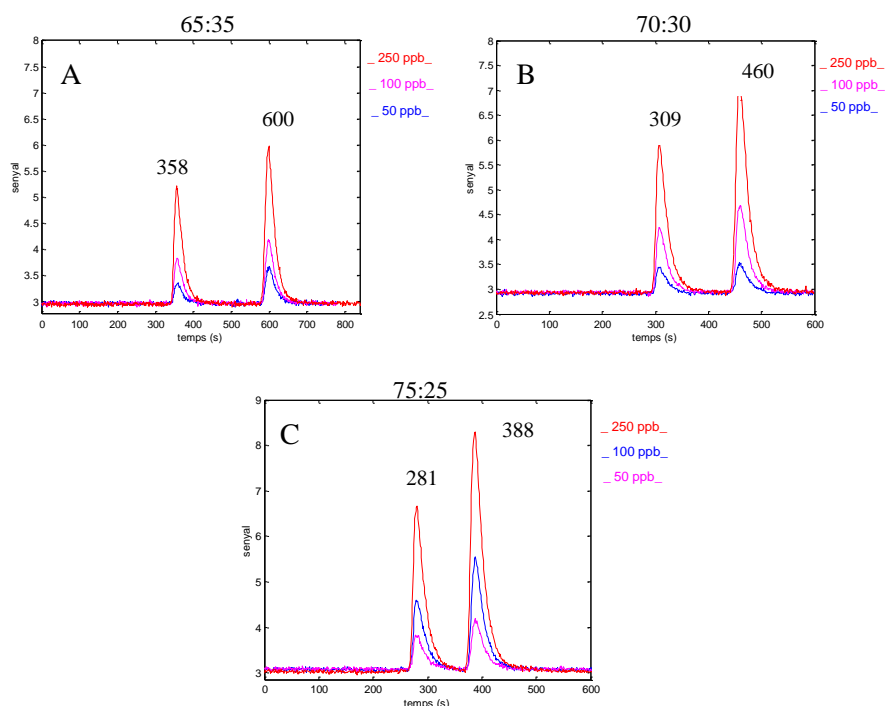


Figura 3.9: Cromatogrames obtinguts per a una mescla de Hg^{2+} i MeHg^+ amb ACN:APDC com a fase mòbil a diferents proporcions. A: 65:35, B: 70:30, C: 75:25. Es mostren els temps de retenció (en segons) per a cada espècie.

El fet que el percentatge de dissolvent orgànic a la fase mòbil fes variar la intensitat del senyal de fluorescència d'una manera significativa, va portar a realitzar estudis sistemàtics, no descrits a la bibliografia, sobre els possibles factors que afecten al senyal de detecció.

3.4 Optimització del sistema HPLC-AFS

En aquest apartat es mostren els resultats obtinguts en diferents estudis duts a terme per tal d'establir l'efecte que té el medi de preparació dels patrons de treball, la composició de la fase mòbil i el reductor emprat sobre la intensitat del senyal de fluorescència. Aquests estudis estan realitzats en *batch*, és a dir, injectant directament al sistema sense passar per la columna cromatogràfica. El treballar en *batch* proporciona l'avantatge de realitzar els assajos d'una forma molt més ràpida, però requereix la preparació de dissolucions individuals de cada espècie, ja que no es disposa d'una etapa de separació. El sistema d'injecció emprat en tots els casos va ser d'acer inoxidable.

3.4.1 Influència del medi de preparació dels patrons de mesura

Un dels factors que poden influir en la intensitat del senyal de fluorescència és la solució que s'ha fet servir a l'hora de preparar els patrons de treball. En aquest estudi, els patrons van ser preparats, en el moment de l'assaig, en HCl al 4% (mateix medi de l'etapa de reducció) i en fase mòbil (FM) i es va estudiar el seu comportament emprant tres solucions de mesura diferents: ACN:APDC, ACN:H₂O i MeOH:APDC.

Es va treballar amb solucions patró de 25, 50, 100 i 250 µg L⁻¹ de concentració per Hg²⁺ i MeHg⁺. Com a reductor es va fer servir una dissolució aquosa de SnCl₂ al 1,5% en HCl al 4% a un cabal de 4 mL min⁻¹.

- ACN:APDC (70:30)

La Figura 3.10 mostra l'efecte del medi de preparació sobre les dissolucions patró de Hg^{2+} . Es pot observar que en medi de HCl la intensitat del senyal decreix 3 vegades respecte als patrons preparats en fase mòbil. El MeHg^+ experimenta el mateix comportament en aquestes condicions.

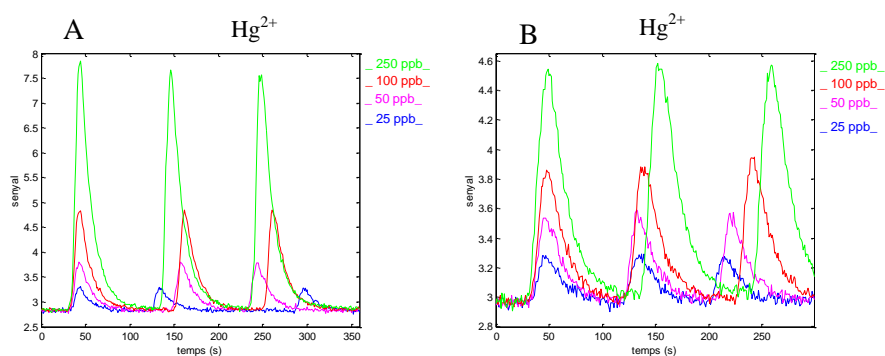


Figura 3.10: Superposició de pics obtinguts per a diferents concentracions de Hg^{2+} quan és preparat en FM (A) i en HCl (B) emprant ACN:APDC com a solució de mesura.

La quantificació d'aquest efecte es mostra a la Figura 3.11 on es pot comprovar que quan els patrons es preparen en medi HCl, l'àrea dels pics disminueix. Mentre que pel patró més concentrat, el senyal del Hg^{2+} decreix un 50% i el del MeHg^+ un 60%, aquest efecte passa a ser d'un 25% a concentracions de $50 \mu\text{g L}^{-1}$ i no és significatiu per concentracions inferiors.

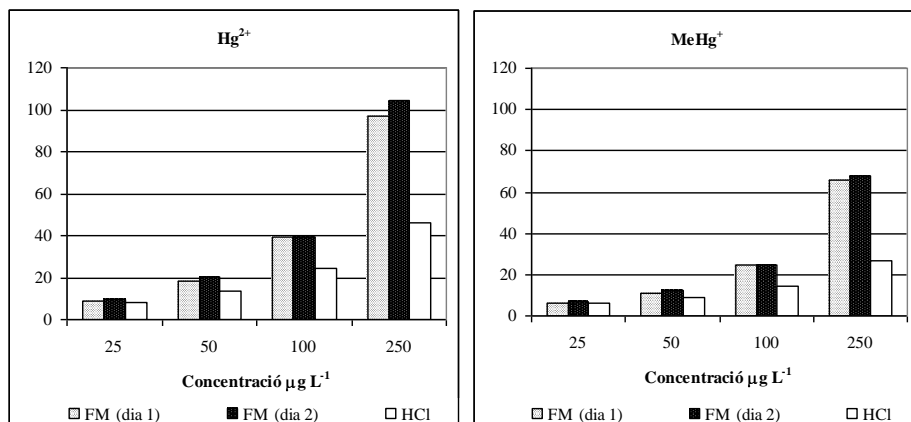


Figura 3.11: Àrea de pic obtinguda per al Hg^{2+} i el MeHg^+ en funció de la concentració i del medi emprant ACN:APDC com a solució de mesura.

- ACN:H₂O (70:30)

Amb la mateixa composició de dissolució de mesura, però sense l'addició de l'agent complexant, s'observa un comportament oposat a l'obtingut en l'assaig anterior. Com a exemple, a la Figura 3.12 es pot observar que pel MeHg^+ en medi HCl la intensitat del senyal augmenta 15 vegades respecte als patrons preparats en fase mòbil. El Hg^{2+} experimenta el mateix comportament en aquestes condicions.

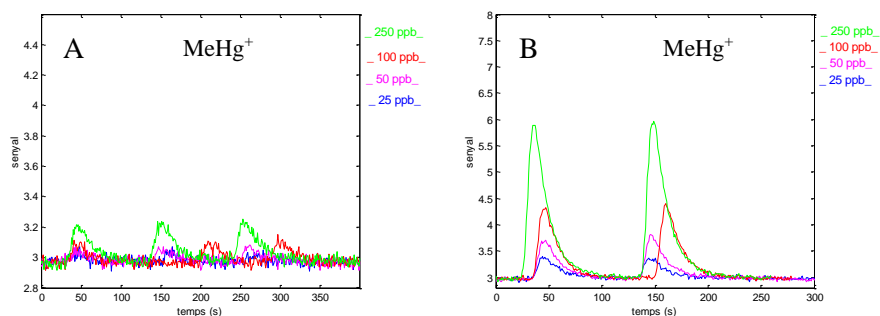


Figura 3.12: Superposició de pics obtinguts per a diferents concentracions de MeHg^+ quan és preparat en FM (A) i en HCl (B) emprant ACN:H₂O com a solució de mesura.

Com s'observa a la Figura 3.13, l'àrea dels pics d'ambdues substàncies augmenta molt significativament quan els patrons són preparats en HCl. El fet de no tenir al medi cap agent complexant fa que les espècies de mercuri siguin més inestables i s'obtingui una intensitat de senyal baixa. A més, pel Hg^{2+} existeix efecte de memòria que fa que la resposta no augmenti de manera lineal amb la concentració.

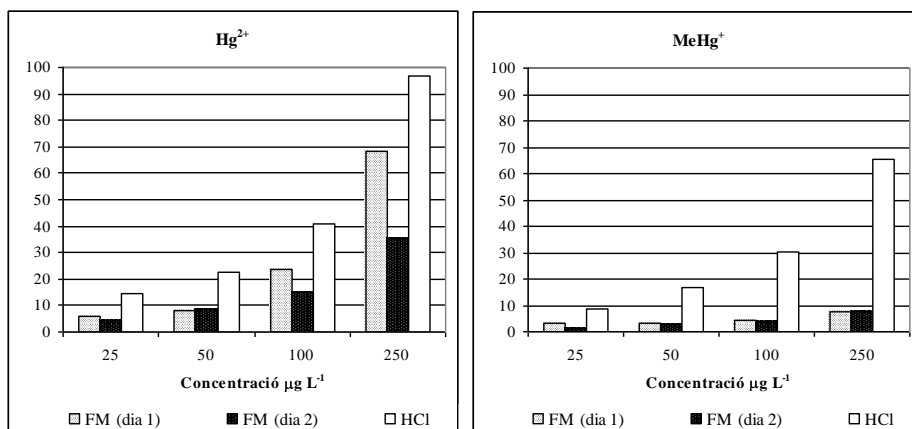


Figura 3.13: Àrea de pic obtinguda per al Hg^{2+} i el MeHg^+ en funció de la concentració i del medi emprant ACN: H_2O com a solució de mesura.

- MeOH:APDC (70:30)

L'ús de metanol com a dissolvent orgànic i en presència de l'agent complexant (APDC), comporta resultats semblants a l'ACN. Com a exemple, a la Figura 3.14 es pot observar que en preparar els patrons de Hg^{2+} en HCl la intensitat del senyal decreix unes 1,5 vegades respecte als patrons preparats en fase mòbil. El MeHg^+ experimenta el mateix comportament en aquestes condicions.

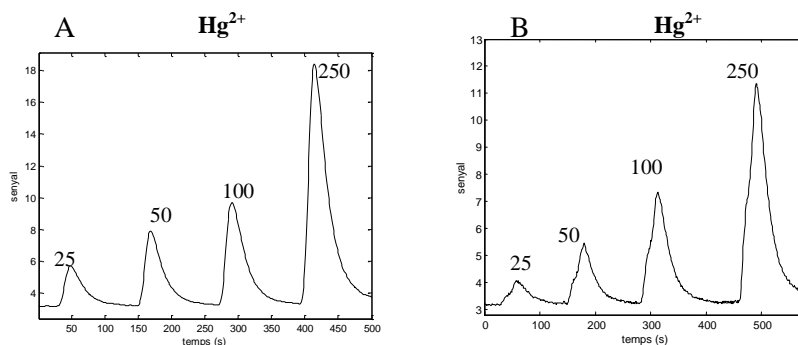


Figura 3.14: Pics obtinguts per a diferents concentracions ($\mu\text{g L}^{-1}$) de Hg^{2+} quan és preparat en FM (A) i en HCl (B) emprant MeOH:APDC com a solució de mesura.

Quantificant aquest efecte, a la Figura 3.15 es pot observar com en preparar els patrons en medi HCl l'àrea dels pics obtinguts disminueix en un 30% per ambdues espècies.

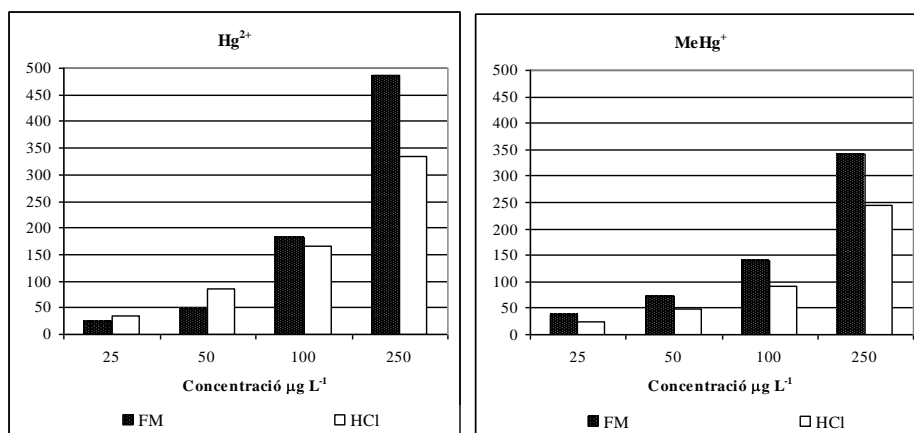


Figura 3.15: Àrea de pic obtinguda per al Hg^{2+} i el MeHg^+ en funció de la concentració i del medi emprant MeOH:APDC com a solució de mesura.

Com a conclusió d'aquest estudi, es posa de manifest que quan s'empren fases mòbils amb APDC com a agent complexant, la preparació dels patrons en medi HCl fa disminuir el senyal de fluorescència, per tant, el senyal obtingut és millor quan les dissolucions patró es preparen en fase mòbil.

En preparar els patrons de treball en la fase mòbil MeOH:APDC, es va observar que en la primera dilució que es feia del patró de Hg^{2+} (50 mg L^{-1}) apareixia un precipitat blanquinós que enterbolia la solució resultant. Quan es treballa amb HPLC, cal evitar obturacions a la columna cromatogràfica perquè provocarien una sobrepressió al sistema, per tant, s'ha d'evitar la injecció de solucions que continguin precipitat.

Es va realitzar un estudi basat en preparar diverses dissolucions patró de Hg^{2+} a concentracions decreixents, partint d'una solució mare de 50 mg L^{-1} preparada en HCl al 4%, i observant a quina concentració no apareixia precipitat. Es van preparar cinc dilucions des de 1/10 (5 mg L^{-1} de Hg^{2+}) fins a 1/50 (1 mg L^{-1} de Hg^{2+}) en medi MeOH:APDC (70:30). El resultat obtingut a l'assaig va mostrar que a dilucions més petites de 1/50 (major concentració de Hg^{2+}) apareixia un precipitat a la solució patró resultant. Per tant, a l'hora de preparar qualsevol arbre de dilució, les dilucions prèvies a les solucions finals de treball es realitzaran en medi àcid (HCl al 4%) i només les solucions finals de mesura es prepararan en fase mòbil.

3.4.2 Influència de la composició de la fase mòbil

Un cop escollit el medi de preparació de les solucions patró de mesura en funció del tipus de fase mòbil emprada, es va estudiar l'efecte que té la composició de la fase mòbil sobre el senyal de detecció. Es van provar diferents combinacions d'APDC, ACN, H_2O i MeOH per tal d'aconseguir una dissolució de mesura que proporcionés la major sensibilitat de les espècies al detector de fluorescència. La

composició de les solucions de mesura emprades a l'estudi es mostra a la Taula 3.2.

Taula 3.2: Composició de les solucions de mesura

Fase orgànica	Fase aquosa	Proporció
ACN	APDC 0,0015M + NH ₄ Ac 0,01M pH 5,5	70:30
ACN	H ₂ O	70:30
MeOH:ACN (65:15)	APDC 0,0015M + NH ₄ Ac 0,01M pH 5,5	80:20
MeOH	APDC 0,0015M + NH ₄ Ac 0,01M pH 5,5	70:30

Es va treballar amb solucions patró de 25, 50, 100 i 250 µg L⁻¹ de concentració per a cadascuna de les espècies Hg²⁺ i MeHg⁺. Com a reductor es va fer servir una dissolució aquosa de SnCl₂ al 1,5% en HCl al 4% a un cabal de 4 mL min⁻¹. En tots els casos les dissolucions patró es van preparar en el medi adequat d'acord amb els resultats obtinguts a l'estudi anterior.

Per a cada solució de mesura, es van injectar per triplicat les dissolucions patró en dues sessions de treball, excepte per les solucions formades per ACN:H₂O i MeOH:APDC que es van realitzar en una sessió de treball cadascuna.

Com a exemple, a la Figura 3.16 es mostren els pics obtinguts per a les dues espècies de mercuri en diferents sessions de treball.

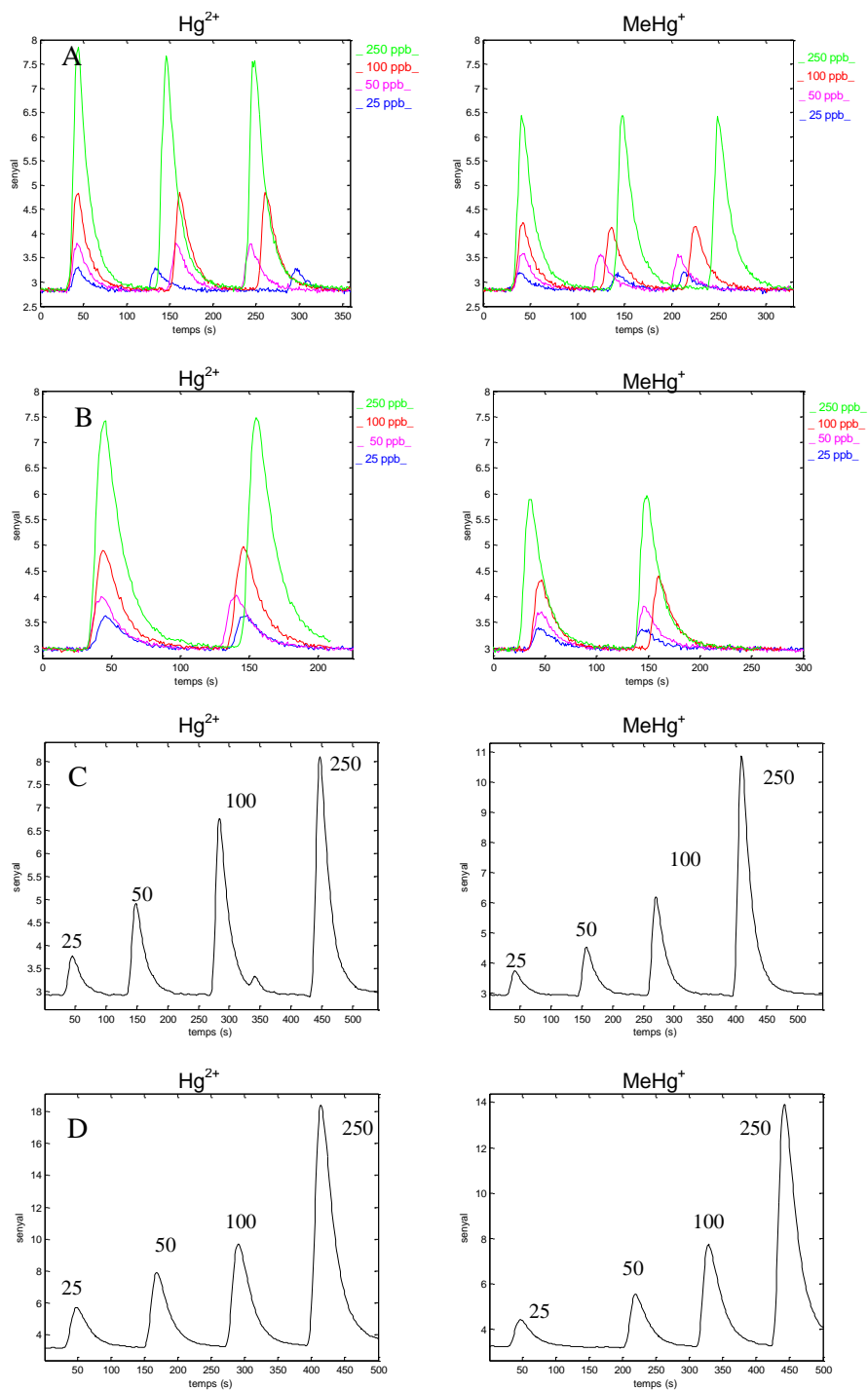


Figura 3.16: Pics obtinguts a diferents concentracions ($\mu\text{g L}^{-1}$) per al Hg^{2+} i el MeHg^+ emprant com a solució de mesura: A: ACN:APDC, B: ACN: H_2O , C: MeOH:ACN:APDC, D: MeOH:APDC.

Després de la separació cromatogràfica, l'eluat de la columna passa per una etapa d'oxidació amb l'objectiu d'assegurar que l'espècie de mercuri corresponent està en forma de Hg^{2+} . Posteriorment, al generador de vapor fred es duu a terme la reducció a Hg^0 que és l'espècie detectada. En aquest treball, s'ha emprat una làmpada UV per a dur a terme l'oxidació. Donat que als medis de separació assajats les espècies de mercuri estan formant complexos, cal pensar que l'etapa d'oxidació serà més efectiva i, per tant, comportarà una resposta més elevada en medi aquós. Per aquest motiu, en aquest estudi s'ha pres el senyal obtingut en solucions aquoses com la intensitat màxima de referència a efectes de comparació dels senyals.

En comparar el senyal obtingut emprant solucions de mesura que contenen ACN amb el màxim de referència s'obté que el senyal és unes 25 vegades menor. Es va consultar a la bibliografia possibles efectes de la fotooxidació UV sobre l'acetonitril i es va trobar que el nitrogen de la molècula podia ser oxidat a N_2 ^{67,68} i, està descrit que molècules diatòmiques com el N_2 tenen un efecte de *quenching* amb el Hg que fa disminuir la intensitat del senyal de fluorescència ⁵⁶. Per aquest motiu, es va pensar en emprar un dissolvent orgànic diferent a l'acetonitril a la solució de mesura i es va optar pel metanol. Si es compara el senyal obtingut emprant MeOH:APDC (Figura 3.16-D) amb el senyal obtingut emprant ACN:APDC (Figura 3.16-A) es veu que amb la solució de mesura que conté metanol s'obté un senyal unes 5 vegades major. Aquest fet és degut a que s'ha eliminat l'efecte *quenching* que produïa l'ACN. A la bibliografia alguns autors descriuen l'ús de barreges de MeOH i ACN, juntament amb l'APDC, com a fase mòbil ⁶⁹. L'ús d'una barreja MeOH:ACN:APDC (Figura 3.16-C) comporta l'obtenció d'un

senyal d'intensitat intermèdia a quan es fan servir els dissolvents per separat.

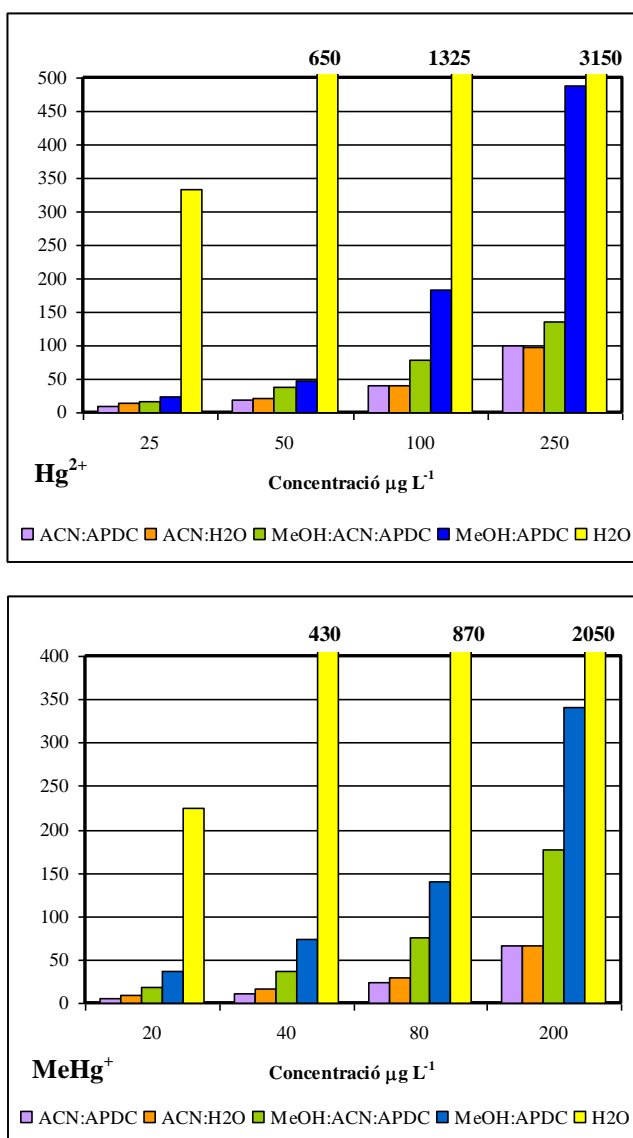


Figura 3.17: Àrees de pic obtingudes per al Hg²⁺ i el MeHg⁺ emprant diferents solucions de mesura.

A la Figura 3.17 es recull de forma gràfica les àrees dels pics obtingudes per a cada espècie a les concentracions estudiades. S'observa com la resposta màxima s'obté en medi aquós. Les fases que

no contenen APDC o que contenen ACN, proporcionen una intensitat de senyal significativament menor que la fase formada per MeOH:APDC. Encara que aquesta fase té una intensitat de senyal 6 vegades menor que la de l'aigua, és la fase mòbil que proporciona els millors resultats.

Es pot concloure que la composició de fase mòbil que comporta la màxima resposta (àrea de pic del senyal de fluorescència) per ambdues espècies és la que conté MeOH:APDC. Posteriorment, i tal i com es descriu a l'apartat 3.5, es van dur a terme estudis amb l'etapa de separació cromatogràfica.

3.4.3 Efecte del reductor

Tots els assajos anteriors es van realitzar fent servir SnCl_2 com agent reductor al generador de vapor fred. Un cop vist els resultats obtinguts amb les diverses fases mòbils, es va realitzar un estudi comparatiu entre l'ús de SnCl_2 i NaBH_4 com a reductors. La composició de les fases mòbils seleccionades per a aquest estudi es mostra a la Taula 3.3.

D'acord amb estudis descrits a la bibliografia ⁷⁰, es va fer servir una dissolució aquosa de NaBH_4 a una concentració del 0,05% en NaOH al 0,5% a un cabal d'uns 4 mL min^{-1} i una dissolució d'HCl 0,1M a un cabal de 8 mL min^{-1} .

Es va treballar amb solucions patró de 25, 50, 100 i $250 \mu\text{g L}^{-1}$ de concentració per a cadascuna de les dues espècies per separat, Hg^{2+} i MeHg^+ . Els patrons van ser preparats, en el moment de l'assaig, en el medi adequat per a cadascuna de les solucions de mesura i es van injectar per triplicat en una sessió de treball.

Taula 3.3: Composició de les solucions de mesura

Fase orgànica	Fase aquosa	Proporció
MeOH	APDC 0,0015M + NH ₄ Ac 0,01M pH 5,5	70:30
ACN	H ₂ O	70:30

A la Figura 3.18 es mostren els resultats obtinguts per ambdues espècies de mercuri en diferents sessions de treball.

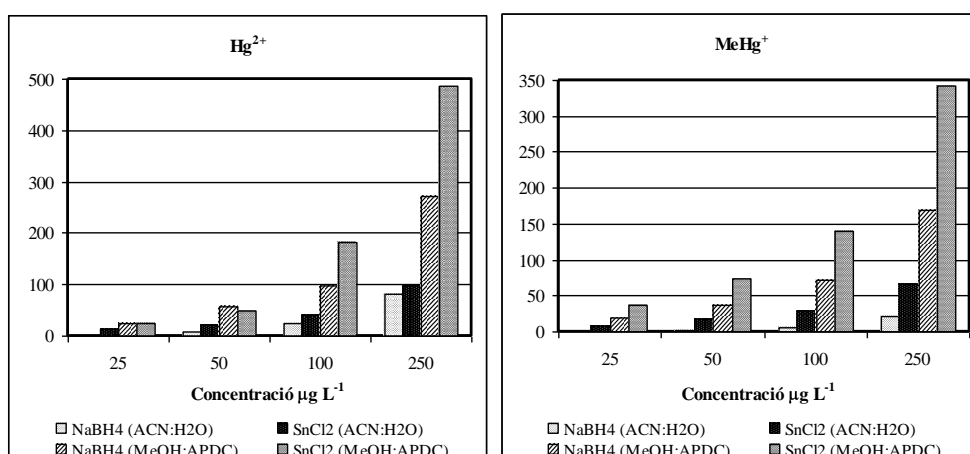


Figura 3.18: Àrea de pic obtinguda per al Hg²⁺ i el MeHg⁺ en funció de la concentració (µg L⁻¹) i del reductor emprant com a solucions de mesura MeOH:APDC i ACN:H₂O.

Com es pot observar a la Figura 3.18, les àrees de pic obtingudes per a les dues espècies quan es fa servir NaBH₄ com a reductor són menors que quan es fa servir SnCl₂. Emprant MeOH:APDC, en el cas concret del Hg²⁺, s'obtenen àrees similars per als patrons de 25 i 50 µg L⁻¹ però, en passar a concentracions majors, s'obtenen àrees un 50% menors quan es fa servir NaBH₄. Pel MeHg⁺, les àrees que s'obtenen emprant NaBH₄ són un 50% menors en l'interval de concentració estudiat. Quan es fa servir ACN:H₂O com a solució de mesura, també

s'obtenen àrees de pic menys en emprar NaBH_4 com a reductor, concretament un 65% menys pel cas del MeHg^+ i un 20% en el cas del Hg^{2+} .

Com a conclusió d'aquest estudi, es pot extreure que el SnCl_2 proporciona millors resultats que el NaBH_4 en quant a eficàcia de l'etapa de reducció. Aquests resultats concorden amb estudis trobats a la bibliografia on es descriu que la gran quantitat de H_2 que es genera a l'etapa de reducció quan es fa servir el NaBH_4 pot produir efectes de *quenching* amb el Hg que fan disminuir la intensitat del senyal de fluorescència ⁷¹. La presència d'un 17% d'hidrogen a la composició del gas portador fa disminuir un 95,6% la sensibilitat del mercuri a la fluorescència atòmica, mentre que una composició amb un 48% d'hidrogen provoca una disminució en el senyal del 99% ⁷². No obstant, també està descrit que treballar a concentracions de NaBH_4 menors de 10^{-5} M redueixen els efectes de *quenching* ⁷³.

Com a conclusió global dels estudis per establir els diferents factors que afecten al senyal de detecció, es pot concloure que la fase mòbil que proporciona una major resposta de les espècies de mercuri en el detector d'AFS és la que està formada per MeOH:APDC, quan les solucions patró de mesura es preparen en fase mòbil i es fa servir com a reductor una dissolució aquosa de SnCl_2 .

3.5 Optimització de la fase mòbil

Un cop establertes les condicions que comporten un millor senyal de fluorescència per ambdues espècies, tant pel que fa a la composició de la fase mòbil, la preparació dels patrons i l'etapa de reducció, es va abordar la separació. Amb aquest fi, es van realitzar estudis basats en l'optimització de la fase mòbil en relació a la proporció de fase aquosa i fase orgànica. Tanmateix es van establir els paràmetres cromatogràfics i els límits de detecció i quantificació.

3.5.1 Efecte de la proporció de metanol

Per a la composició de fase mòbil seleccionada (MeOH:APDC) es va estudiar com afecta la proporció de dissolvent orgànic en la separació de les espècies. Les proporcions emprades en aquest estudi es mostren a la Taula 3.4.

Taula 3.4: Composició de la fase mòbil

% MeOH	70	75	80	82	85
% APDC	30	25	20	18	15

El sistema d'injecció emprat a l'assaig va ser d'acer inoxidable. Com a reductor es va fer servir una dissolució aquosa de SnCl₂ al 1,5% en HCl al 4% a un cabal d'uns 4 mL min⁻¹. En cada cas, es van preparar en el moment de l'anàlisi solucions patró mescla de Hg²⁺ i MeHg⁺ a concentracions de 25, 50, 100 i 250 µg L⁻¹ per cadascuna de les espècies. Cada patró va ser injectat per duplicat en cada una de les sessions de treball. Amb una dissolució patró individual de cada espècie es va establir l'ordre d'elució.

Com a exemple, a la Figura 3.19 es mostren els cromatogrames obtinguts per a un patró de $100 \mu\text{g L}^{-1}$ en funció de la proporció de metanol emprada.

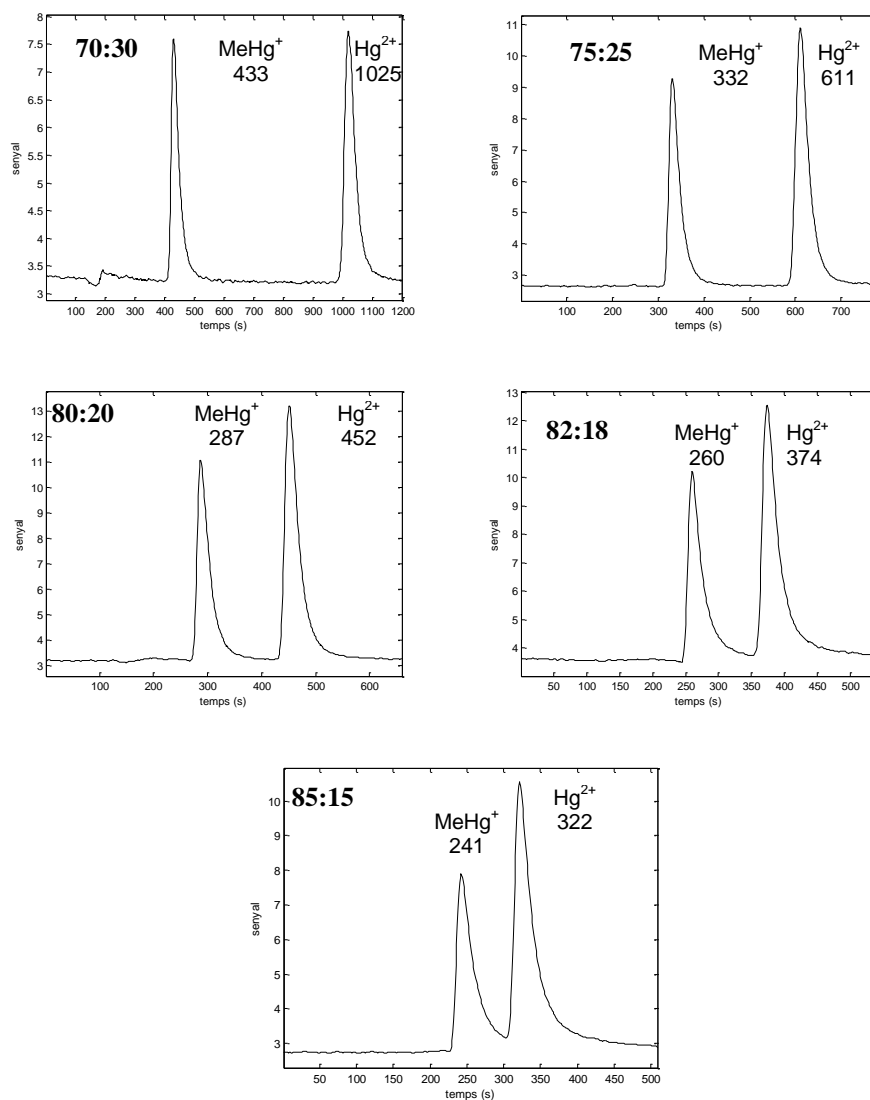


Figura 3.19: Cromatogrames obtinguts per a una mescla de Hg^{2+} i MeHg^+ de $100 \mu\text{g L}^{-1}$ de concentració emprant $\text{MeOH}:\text{APDC}$ com a fase mòbil a diferents proporcions. Es mostren els temps de retenció (s) per a cada espècie.

La integració del senyal obtingut per a cada espècie, en funció de la proporció de metanol a la fase mòbil, es mostra a la Figura 3.20. Tal com s'observa, la fase mòbil que proporciona les majors àrees dels pics cromatogràfics, mantenint una bona separació, és la que conté un 80% de metanol.

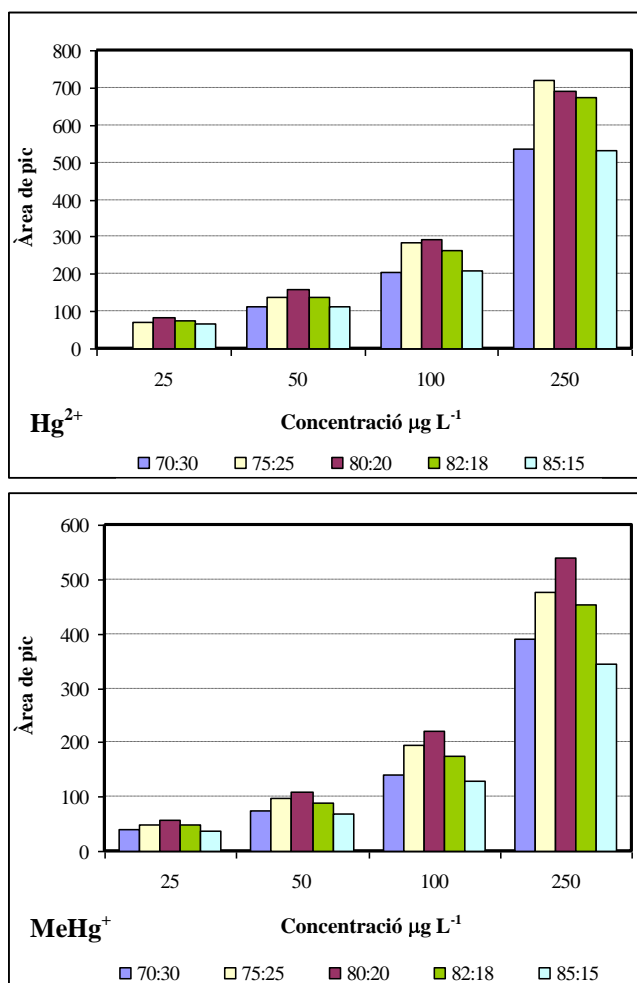


Figura 3.20: Àrees de pic obtingudes per al Hg^{2+} i el MeHg^+ emprant diferents proporcions de MeOH.

Es va calcular la linealitat de la resposta en l'interval de concentracions estudiat, en termes de coeficient de correlació al quadrat

(r^2), la sensibilitat de la tècnica, en termes de pendent de la recta, i el factor de selectivitat (α) per a cadascuna de les fases mòbils. A la Taula 3.5 es mostren els resultats obtinguts.

Taula 3.5: Factor de selectivitat, linealitat i sensibilitat

% MeOH	α	r^2		Pendent	
		Hg ²⁺	MeHg ⁺	Hg ²⁺	MeHg ⁺
70	2,53	0,99904	0,99747	1,8943	1,5670
75	1,97	0,99997	0,99990	2,5539	1,8955
80	1,68	0,99976	0,99993	2,3675	2,1522
82	1,53	0,99955	0,99950	2,3660	1,8159
85	1,41	0,99925	0,99843	1,8394	1,3713

Com es pot observar, a totes les composicions s'obté un senyal força lineal ($r > 0,999$), però la que proporciona una millor sensibilitat és la que conté un 80% de metanol, especialment per al MeHg⁺.

Per tant, tenint en compte la bona separació de les espècies, el temps d'anàlisi, la sensibilitat de la tècnica i la linealitat en l'interval de concentracions, es va escollir com a fase mòbil la formada per MeOH:APDC a una proporció 80:20.

3.5.2 Efecte del material del sistema d'injecció

Donat que en estudis preliminars (apartat 3.2) es va observar que emprant TBAB a la part aquosa de la fase mòbil, l'ús d'un sistema d'injecció de PEEK proporcionava millor reproductibilitat que un d'acer inoxidable (SS), sobretot pel cas del Hg²⁺, es van estudiar els possibles efectes de memòria en el sistema d'injecció per a la fase mòbil seleccionada (MeOH:APDC 80:20). Tots dos injectors, SS i

PEEK, van ser avaluats sota les mateixes condicions. Es van injectar cinc volums creixents (0,25 – 2 mL) de solució patró de Hg^{2+} i MeHg^+ (contenint aproximadament $100 \mu\text{g L}^{-1}$ de cada espècie) per tal de determinar la reproductibilitat. Els resultats van mostrar una RSD del 2% pel Hg^{2+} i del 3% pel MeHg^+ , independentment del material del sistema d'injecció i del volum de mostra injectat. No obstant, per prevenir possibles efectes de memòria al sistema d'injecció quan es treballa amb mostres amb nivells de concentració majors de $100 \mu\text{g L}^{-1}$, és molt recomanable netejar el sistema d'injecció amb $300 \mu\text{L}$ de fase mòbil abans de cada anàlisi.

Les condicions finals de treball per a la determinació de Hg^{2+} i MeHg^+ emprant HPLC-UV-CV-AFS com a tècnica de mesura es troben resumides a la Taula 3.6.

Taula 3.6: Condicions finals de treball per a la determinació de Hg^{2+} i MeHg^+ emprant HPLC-UV-CV-AFS

Condicions del sistema HPLC	
Columna cromatogràfica	RP-C ₁₈ (ODS Hypersil 250x4,6 mm; 5 μm)
Fase mòbil	80% MeOH : 20% 0,0015 mol L ⁻¹ APDC i 0,01 mol L ⁻¹ NH ₄ CH ₃ COO (pH 5,5 ajustat amb CH ₃ COOH)
Cabal	1,5 mL min ⁻¹
Volum d'injecció (bucle)	100 μL
Sistema d'injecció d'acer inoxidable	Etapa de rentat amb 300 μL de fase mòbil en posició de càrrega abans de cada anàlisi
Condicions del CV-AFS	
Concentració SnCl ₂	1,5% en HCl al 4%
Cabal SnCl ₂	4 mL min ⁻¹
Cabal gas portador (Ar)	300 mL min ⁻¹
Cabal gas d'assecat (N ₂)	2,5 L min ⁻¹

3.5.3 Establiment de paràmetres cromatogràfics

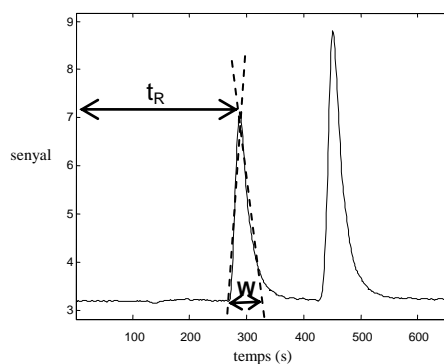
Un cop establertes les condicions finals de treball (Taula 3.6), es va calcular l'eficàcia de la columna i la resolució dels pics cromatogràfics fent servir MeOH:APDC (80:20) com a fase mòbil.

3.5.3.1 Eficàcia

Dos termes relacionats entre sí que s'empren com a mesura quantitativa de l'eficàcia d'una columna cromatogràfica són l'alçada de plat (H) i el nombre de plats teòrics (N). Aquests termes es relacionen mitjançant l'equació: $N = L/H$ on L és la longitud (usualment en centímetres) de l'empaquetament de la columna.

El nombre de plats es pot calcular a partir de les dades experimentals mitjançant la següent equació: $N = 16 \cdot \left(\frac{t_R}{W} \right)^2$

on t_R és el temps de retenció i
W l'amplada de base.



L'amplada de base (W) es va mesurar manualment fent servir l'aplicació Clepto 21.5 del programa informàtic MATLAB[®]. Es va calcular el valor mig de sis mesures fetes en dos patrons mescla de 25, 50 i 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ (n=2). A la Taula 3.7 es mostren els resultats obtinguts per a una columna de 25 cm de longitud.

Taula 3.7: Eficàcia

	W (segons)	t _R (segons)	N	H (cm)
Hg²⁺	55	452	1081	0,023
MeHg⁺	49	287	549	0,046

Com es pot observar a la taula, s'obté una alçada de plat d'unes poques dècimes de mil·límetre, tot i que pel Hg²⁺ l'eficàcia obtinguda és millor.

3.5.3.2 Resolució

La resolució (R_S) ens dona una mesura quantitativa de la separació entre dos pics cromatogràfics en relació a la seva amplada. La resolució proporciona una mesura quantitativa de la capacitat de la columna per a separar dos anàlits. La resolució es pot calcular a partir

de dades experimentals com: $R_S = 2 \cdot \frac{(t_{R(B)} - t_{R(A)})}{W_A + W_B}$

A la Taula 3.8 es mostren les dades emprades per al càlcul de la resolució i el resultat obtingut.

Taula 3.8: Resolució

	W (segons)	t _R (segons)	R _S
Hg²⁺	55	452	3,17
MeHg⁺	49	287	

Tal com s'observa, s'obté una molt bona resolució dels pics, fet que era d'esperar ja que com es mostra al cromatograma obtingut per a la barreja MeOH:APDC (80:20) (Figura 3.19), els pics presenten una certa cua, però arriben a línia base en ambdós casos.

3.5.4 Establiment de paràmetres de qualitat

Aplicant les condicions finals de treball (Taula 3.6), tant pel sistema d'injecció, com per a la fase mòbil i el reductor, es van establir els límits de detecció i quantificació i la linealitat del mètode proposat. Es va treballar amb solucions patró mescla de Hg^{2+} i MeHg^+ a concentracions de 25, 50, 100 i 250 $\mu\text{g L}^{-1}$, per a cadascuna de les espècies, que van ser preparades en el moment de l'anàlisi.

3.5.4.1 Límit de detecció

De forma general, el límit de detecció en una tècnica de fluorescència atòmica es defineix com el senyal obtingut pel blanc més tres vegades la seva desviació estàndard: $S_{LD} = S_b + 3 \cdot \sigma_b$ essent,

S_{LD} = senyal en el límit de detecció

S_b = senyal del blanc

σ_b = desviació estàndard del blanc

En tècniques acoblades, com l'HPLC-CV-AFS, el criteri utilitzat per a calcular el límit de detecció ha estat el de considerar la concentració en el límit de detecció (C_{LD}) com aquella que correspon a tres vegades la desviació estàndard del senyal de fons (S_{FONS}) dividit pel pendent de la recta de calibratge (a) de l'espècie considerada. L'equació que es va aplicar va ser la següent: $C_{LD} = 3 \cdot S_{FONS} / a$

Es van realitzar dues rectes de calibratge amb solucions patró mescla de Hg^{2+} i MeHg^+ (2,5 – 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ per a cadascuna de les espècies) en dos dies no consecutius ($n = 23$). A la Taula 3.9 es donen els paràmetres de la rectes de calibratge, per a cada espècie, obtingudes utilitzant l'ajust dels mínims quadrats, essent “a” el pendent de la recta i “b” l'ordenada a l'origen.

Taula 3.9: Rectes de calibratge per al Hg^{2+} i el MeHg^+

	Hg^{2+}	MeHg^+
Recta de regressió 1	a = 0,0795 b = 0,0184 $r^2 = 0,9992$	a = 0,0925 b = -0,0253 $r^2 = 0,9998$
Recta de regressió 2	a = 0,0786 b = -0,0057 $r^2 = 0,9997$	a = 0,0852 b = -0,0150 $r^2 = 0,9999$

Es van obtenir unes mitjanes pel senyal del blanc de 3,35 i 3,46 amb unes desviacions estàndard (S_{FONS}) de 0,05 i 0,04, respectivament. La concentració en el límit de detecció (C_{LD}) obtinguda va ser de $1,5 \mu\text{g L}^{-1}$ per al Hg^{2+} i de $1,4 \mu\text{g L}^{-1}$ per al MeHg^+ .

3.5.4.2 Límit de quantificació

De forma general, el límit de quantificació es defineix com el senyal obtingut pel blanc més deu vegades la seva desviació estàndard:

$$S_{\text{LD}} = S_b + 10 \cdot \sigma_b$$

Per calcular el límit de quantificació en tècniques acoblades es va aplicar la següent equació: $C_{\text{LD}} = 10 \cdot S_{\text{FONS}} / a$

El pendent de la rectes de calibratge per a cadascuna de les espècie es dona a la Taula 3.9. Per a les desviacions estàndard (S_{FONS}) obtingudes (0,05 i 0,04), s'obté una concentració en el límit de quantificació (C_{LQ}) de $5,1 \mu\text{g L}^{-1}$ per al Hg^{2+} i de $4,6 \mu\text{g L}^{-1}$ per al MeHg^+ .

3.5.4.3 Interval de linealitat

L'interval de linealitat es va obtenir injectant per duplicat solucions patró de Hg^{2+} i MeHg^+ a concentracions d'entre 5 i 1000 μg

L⁻¹ per a cada espècie, en tres sessions de treball independents. D'acord amb els resultats obtinguts es va observar que el senyal de fluorescència es mostrava lineal fins a una concentració de 750 µg L⁻¹ (r >0,999) per ambdues espècies.

A la Taula 3.10 es mostra un resum dels paràmetres de qualitat per a l'especiació de Hg²⁺ i MeHg⁺ emprant la metodologia optimitzada.

Taula 3.10: Paràmetres de qualitat per a l'especiació de Hg²⁺ i MeHg⁺

(µg L ⁻¹)	Hg ²⁺	MeHg ⁺
LOD	1,5	1,4
LOQ	5,1	4,6
Interval de linealitat	5 – 750	

Com es pot observar, s'obtenen uns límits de detecció i quantificació molt baixos per a la tècnica acoblada HPLC-UV-CV-AFS per ambdues espècies. Per tant, es pot concloure que aquesta tècnica acoblada és comparable en quant a sensibilitat a altres tècniques emprades en l'especiació de mercuri que no inclouen una etapa de preconcentració^{36,37,70,74,75}.

Per tant, el mètode analític proposat és adequat per a la determinació de Hg²⁺ i MeHg⁺ en aigües naturals provinents d'àrees contaminades per activitats mineres. A la bibliografia es troben concentracions de mercuri en aquestes àrees de fins a 2,5 µg L⁻¹ a Alaska⁷⁶ i de fins a 13 – 20 µg L⁻¹ a Califòrnia i Almadén (Espanya)^{77,78,79}, i en aquest últim punt han assolit inclòs nivells de 11000 µg L⁻¹ en algunes mostres d'aigua⁸⁰. Les concentracions de MeHg⁺ només es

reporten en uns pocs casos per a aquests tipus de mostres, essent aquesta espècie aproximadament un 0,02 – 0,23% del mercuri total 77,78 .

Part dels resultats descrits fins ara en aquest capítol han estat publicats com a article científic a la revista *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* (Annex II).

3.6 Estudis d'especiació amb tres espècies de mercuri

Tots els estudis realitzats fins ara en aquesta Tesi han estat enfocats a l'especiació de mercuri inorgànic i metilmercuri, però degut al cert interès trobat a la bibliografia per altres espècies orgàniques de mercuri, es va modificar el mètode optimitzat per tal de poder determinar conjuntament una tercera espècie, l'etilmercuri (EtHg⁺).

3.6.1 Optimització de la fase mòbil

Seguint el mètode d'especiació anteriorment descrit, es van analitzar solucions patró mescla de les tres espècies sota les mateixes condicions cromatogràfiques establertes fins el moment.

Els cromatogrames obtinguts van mostrar que les condicions emprades no permetien una completa separació de les dues espècies organomercúriques. La Figura 3.21-A mostra que, fins i tot a baixes concentracions (25 µg L⁻¹), els pics d'aquestes espècies no estan completament resolts. La resolució pot millorar si s'augmenta el temps de residència de les espècies a dins la columna, fet que es pot aconseguir incrementant la proporció de component aquós a la fase mòbil, és a dir, reduint el poder d'elució de la fase mòbil. Per aquesta raó, la proporció de APDC/NH₄Ac va ser incrementada del 20% al 25%. Els resultats obtinguts es mostren a la Figura 3.21-B, on s'observa que la resolució entre els pics de MeHg⁺ i EtHg⁺ es veu incrementada fins i tot a concentracions altes (200 µg L⁻¹). D'aquesta manera, la fase mòbil permet, en part, superar les diferències significatives en les característiques químiques i físiques de les espècies de mercuri i, per tant, permet la determinació de diversos compostos

(cations de mercuri inorgànic i compostos d'alquilmercuri altament polars, com el MeHg^+ i l' EtHg^+) en una única etapa de separació.

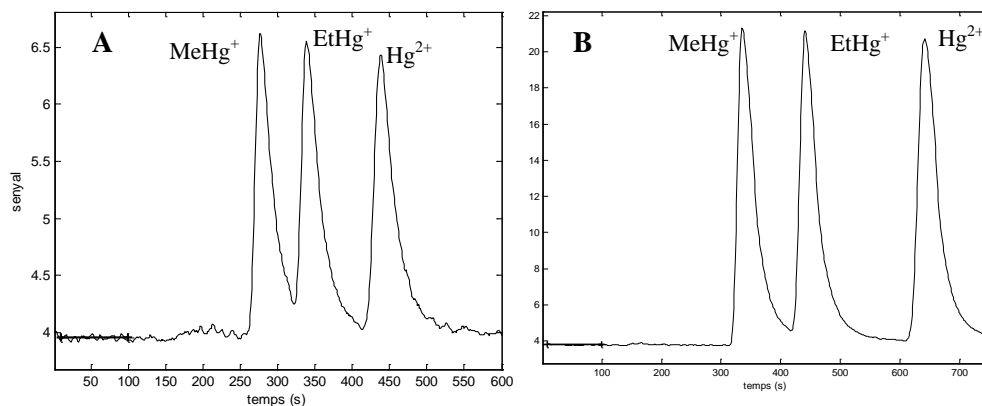


Figura 3.21: Separació de les tres espècies de mercuri amb diferents proporcions de composició de fase mòbil. A: 80:20 ($25 \mu\text{g L}^{-1}$), B: 75:25 ($200 \mu\text{g L}^{-1}$)

Les condicions experimentals per a la separació de les tres espècies es mostren a la Taula 3.11.

Taula 3.11: Condicions experimentals per a l'especiació de Hg^{2+} , MeHg^+ i EtHg^+

Fase mòbil	75% MeOH – 25% APDC 1,5 mM + NH_4Ac 10 mM pH 5,5 Cabal: $1,5 \text{ mL min}^{-1}$
Reductor	SnCl_2 al 1,5% en HCl 4% Cabal: $4 \pm 1 \text{ mL min}^{-1}$
Temps	800 s

3.6.2 Paràmetres de qualitat

3.6.2.1 Sensibilitat i interval de linealitat

Després d'escollir la fase mòbil adequada, diverses solucions patró preparades en fase mòbil van ser analitzades per tal d'obtenir la recta de calibratge i l'interval de linealitat.

Pel que respecta a sensibilitat, es van obtenir uns valors de pendent de la recta de 2,13, 1,74 i 2,15 pel Hg^{2+} , l' EtHg^+ i el MeHg^+ , respectivament. Per a totes les espècies, el mètode mostra una adequada linealitat ($r^2 > 0,99$) en el rang de concentracions des de 10 fins a 500 $\mu\text{g L}^{-1}$.

3.6.2.2 Límits de detecció i quantificació

Després d'establir l'adequada proporció de fase orgànica/fase aquosa a la fase mòbil (75:25), es van determinar els límits de detecció i de quantificació. Aquests paràmetres de qualitat van ser establerts per a les tres espècies estudiades fent servir solucions patró mescla de Hg^{2+} , MeHg^+ i EtHg^+ de 5, 12,5, 25, 50, 100 i 250 $\mu\text{g L}^{-1}$ en una sessió de treball.

Es va realitzar una sèrie d'11 mesures consecutives obtenint-se una mitjana pel senyal del blanc de 3,68 amb una desviació estàndard (S_{FONS}) de 0,07. La concentració en el límit de detecció ($C_{\text{LD}} = 3 \cdot S_{\text{FONS}} / a$) obtinguda va ser de 3,7 $\mu\text{g L}^{-1}$ per al Hg^{2+} , 3,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ per al MeHg^+ i 3,7 $\mu\text{g L}^{-1}$ per a l' EtHg^+ . Pel que respecta a la concentració en el límit de quantificació ($C_{\text{LQ}} = 10 \cdot S_{\text{FONS}} / a$) es va obtenir un valor de 12 $\mu\text{g L}^{-1}$ per a les tres espècies, Hg^{2+} , MeHg^+ i EtHg^+ .

3.6.2.3 Estudis de recuperació

Per tal d'avaluar la funcionalitat del mètode amb mostres reals, es van fortificar dues mostres d'aigua a una concentració coneguda de mercuri i es van analitzar en dies diferents. Les mostres escollides pels estudis de recuperació van ser un aigua de l'aixeta de la xarxa metropolitana de Barcelona i una altra mineral embotellada. Les mostres es van filtrar a través d'una membrana de 20 μm i es van fortificar amb 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Hg^{2+} , MeHg^+ i EtHg^+ , que correspon a una concentració baixa de mercuri tenint en compte el límit de quantificació del mètode. Les solucions patró, els blancs, i les mostres van ser preparats i analitzats en tres dies diferents per tal d'avaluar la reproductibilitat. Els resultats obtinguts es troben resumits a la Figura 3.22.

Per a l'espècie de MeHg^+ s'obté una recuperació al voltant del 100% amb una desviació estàndard per sota del 10% per ambdues mostres d'aigua en les diferents sessions de treball. En el cas del Hg^{2+} i de l' EtHg^+ s'observa un comportament invers: pel Hg^{2+} s'obté una recuperació al voltant del 150% mentre que per l' EtHg^+ es troba al voltant del 80%; la dispersió dels resultats és també major que l'obtinguda pel MeHg^+ .

Aquest comportament es pot observar més clarament a la Figura 3.23. Aquests cromatogrames suggereixen que l' EtHg^+ podria estar sotmès a reaccions químiques en aquestes matrius que provoquen la formació de Hg^{2+} . A la Figura 3.23-A correspon a una solució patró mescla de les tres espècies de mercuri i es pot observar com els pics tenen unes alçades i àrees comparables. A les figures 3.23-B i C s'observa la disminució del pic d' EtHg^+ i l'augment del pic de Hg^{2+} quan la matriu és una mostra d'aigua. Per aquesta raó, una sèrie

d'experiments addicionals es van portar a terme per tal de comprovar si l' EtHg^+ estava essent convertit a la forma inorgànica de mercuri durant les sessions de mesura.

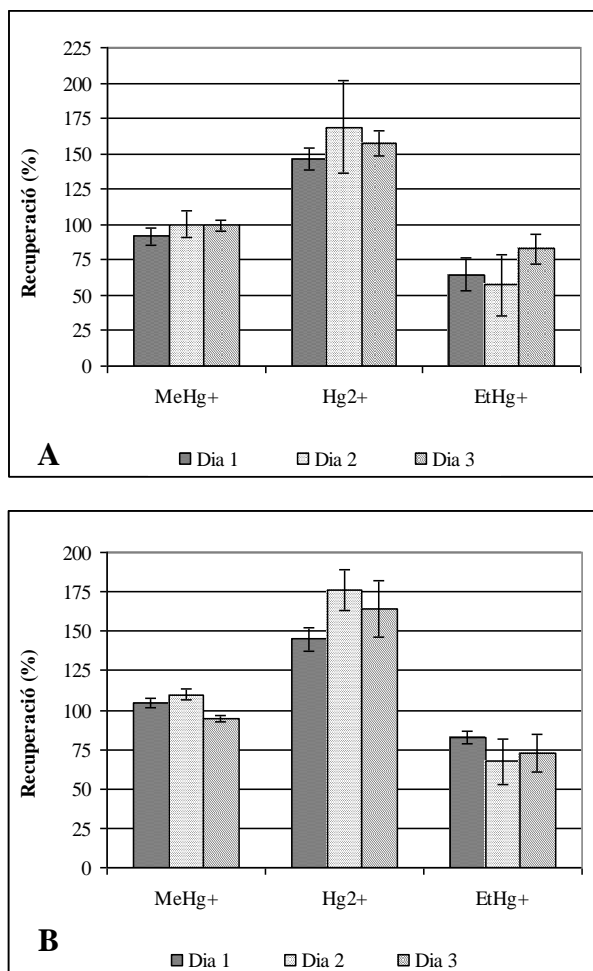


Figura 3.22: Recuperacions obtingudes per a les tres espècies de mercuri en A: aigua mineral, B: aigua de l'aixeta.

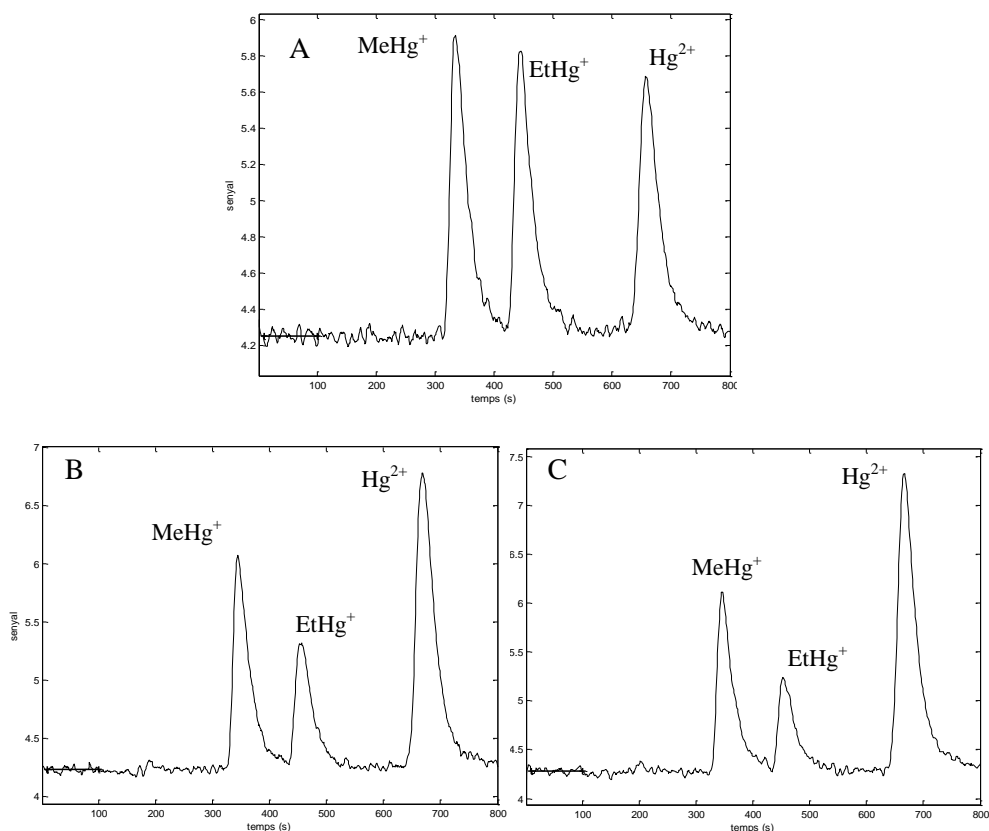


Figura 3.23: Cromatogrames obtinguts en la determinació de $20 \mu\text{g L}^{-1}$ de MeHg^+ , EtHg^+ i Hg^{2+} en diferents mostres d'aigua fortificades. A: solució patró, B: aigua mineral, C: aigua aixeta.

3.6.3 Estabilitat de l'espècie EtHg^+

Per tal de determinar si els canvis observats en la quantificació dels pics d' EtHg^+ i Hg^{2+} en les mostres d'aigua fortificades eren deguts a la conversió de l' EtHg^+ en Hg^{2+} o deguts a interferències de la matriu, es van portar a terme una sèrie d'experiments. Es van fortificar les dues mostres d'aigua, mineral i d'aixeta, amb $20 \mu\text{g L}^{-1}$ de MeHg^+ , EtHg^+ i Hg^{2+} , mescles de dos compostos $\text{EtHg}^+/\text{Hg}^{2+}$, $\text{MeHg}^+/\text{EtHg}^+$ i EtHg^+ sol. Les mostres van ser injectades primerament al moment de la seva

preparació (t_0) i després a diferents temps fixats per tal de controlar l'evolució dels pics cromatogràfics. Els resultats obtinguts es mostren a la Figura 3.24.

A la Figura 3.24-A es pot observar que una solució patró preparada en aigua doblement desionitzada no presenta cap alteració als pics i que els tres compostos són detectats amb una sensibilitat similar. Les figures 3.24-B i C mostren la degradació de l' EtHg^+ en la mostra d'aigua de l'aixeta. El cromatograma a t_0 va ser enregistrat just després de fortificar la mostra amb les tres espècies. Amb el pas del temps s'observa un increment gradual del pic de Hg^{2+} alhora que el pic d' EtHg^+ va disminuint. D'una manera similar, les mescles compostes per EtHg^+ i una altra espècie mostren el mateix comportament fins i tot quan la mostra no es fortifica amb les tres espècies simultàniament. A la Figura 3.24-C s'observa l'evidència de la formació de Hg^{2+} a partir d' EtHg^+ després de 24 hores. El cromatograma D es va obtenir després de fortificar un aigua mineral amb una barreja de les tres espècies. Es pot observar que els pics obtinguts pel MeHg^+ i l' EtHg^+ són similars al llarg del temps. Després de 24 hores, el Hg^{2+} mostra un lleuger augment en l'alçada de pic, però no es pot considerar que sigui degut a una conversió de l' EtHg^+ a Hg^{2+} perquè el pic de l' EtHg^+ no mostra una disminució del àrea. Tampoc no es va observar cap canvi significatiu a l'alçada de pic quan la mostra va ser fortificada amb dos espècies o només amb EtHg^+ . La Figura 3.24-E mostra la superposició dels pics d' EtHg^+ a tres temps diferents, i no hi ha evidència de la formació de Hg^{2+} després de 24 hores. Pel cas de l'aigua mineral, no es pot demostrar que existeixi cap reacció química entre els components de la matriu i el mercuri, ja que a diferència de l'aigua de l'aixeta, la mineral no ha sofert un procés de potabilització amb agents químics.

Per tant, es recomana que l'anàlisi d'especiació en mostres de matriu complexa es dugui a terme amb immediatesa després de ser mostrejades.

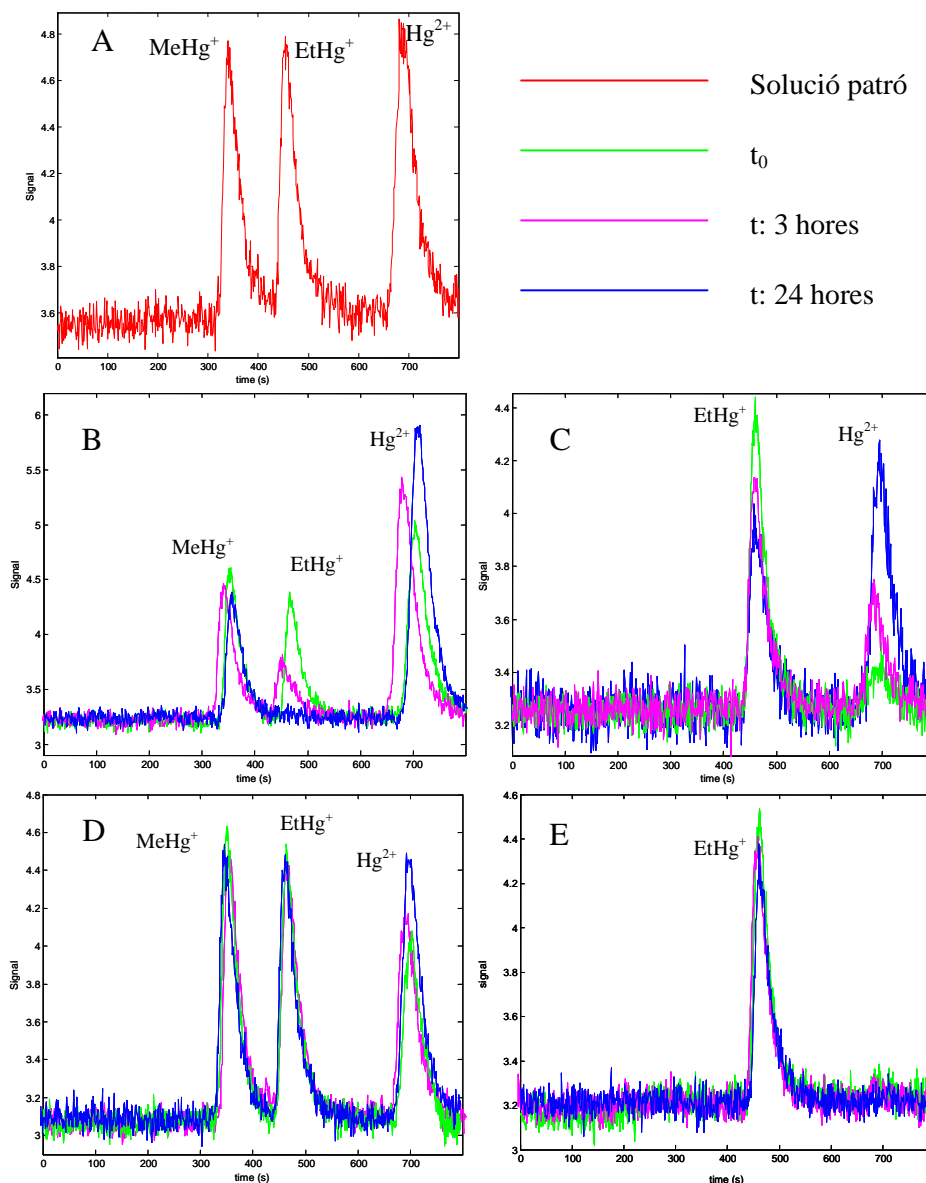


Figura 3.24. Cromatogramens obtinguts en l'especiació de mercuri en aigües fortificades. A: solució patró mescla de MeHg^+ , EtHg^+ i Hg^{2+} ($20 \mu\text{g L}^{-1}$); B: aigua aixeta amb MeHg^+ , EtHg^+ i Hg^{2+} ; C: aigua aixeta amb EtHg^+ ; D: aigua mineral amb MeHg^+ , EtHg^+ i Hg^{2+} ; E: aigua mineral amb EtHg^+ .

3.7 Estudis preliminars de preconcentració *on-line* en aigües

L'acoblament de la cromatografia de líquids a un detector de fluorescència atòmica és una tècnica accessible per a molts laboratoris de rutina que analitzen mostres ambientals. D'acord amb els resultats mostrats a l'apartat 3.5.4 de la present Tesi, l'aplicabilitat del mètode proposat per a l'especiació de Hg^{2+} i MeHg^+ en aigües naturals provinents d'àrees no contaminades, requereix el desenvolupament d'una etapa prèvia de preconcentració.

Per tal de poder analitzar mostres d'aigua amb concentracions de mercuri inferiors al límit de quantificació ($4,5 \mu\text{g L}^{-1}$) del sistema HPLC-UV-CV-AFS, es va acoblar un altre sistema de preconcentració constituït per una bomba binària i una precolumna C_{18} de 10 mm de longitud. La precolumna es va connectar a una vàlvula de sis ports i dues posicions que alterna el flux entre la mostra i la fase mòbil del sistema HPLC. La Figura 3.25 mostra el recorregut de la mostra i la fase mòbil en posició de càrrega (a) i d'elució (b). Aquest sistema permet l'ús de grans volums de mostra per a la preconcentració de l'anàlit. D'aquesta manera, es vol aconseguir preconcentrar *on-line* mostres que continguin mercuri inorgànic i metilmercuri en concentracions de l'ordre de ng L^{-1} .

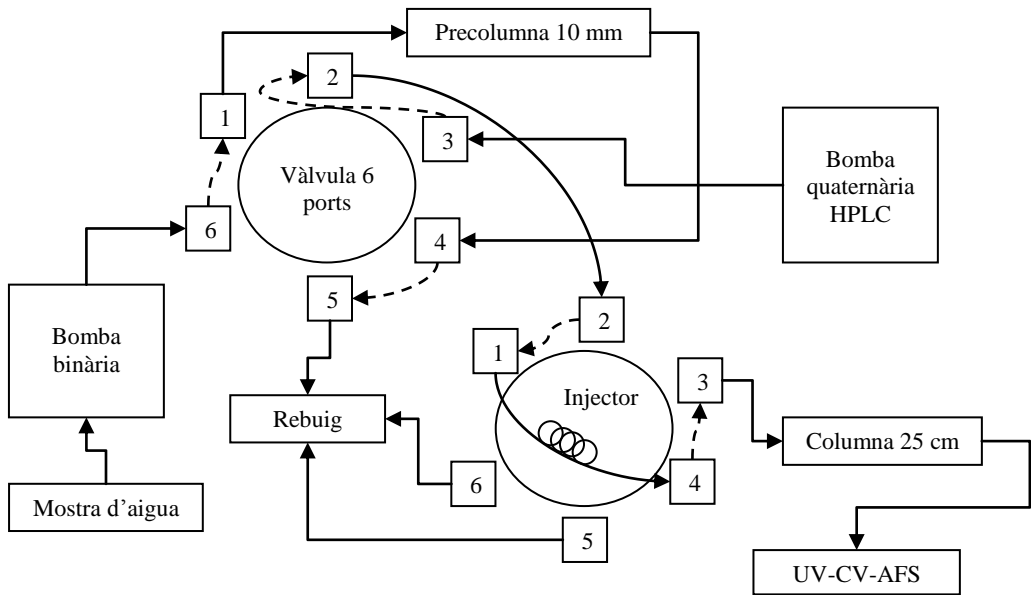


Figura 3.25.a: Esquema del sistema de preconcentració *on-line* amb la vàlvula en posició de càrrega.

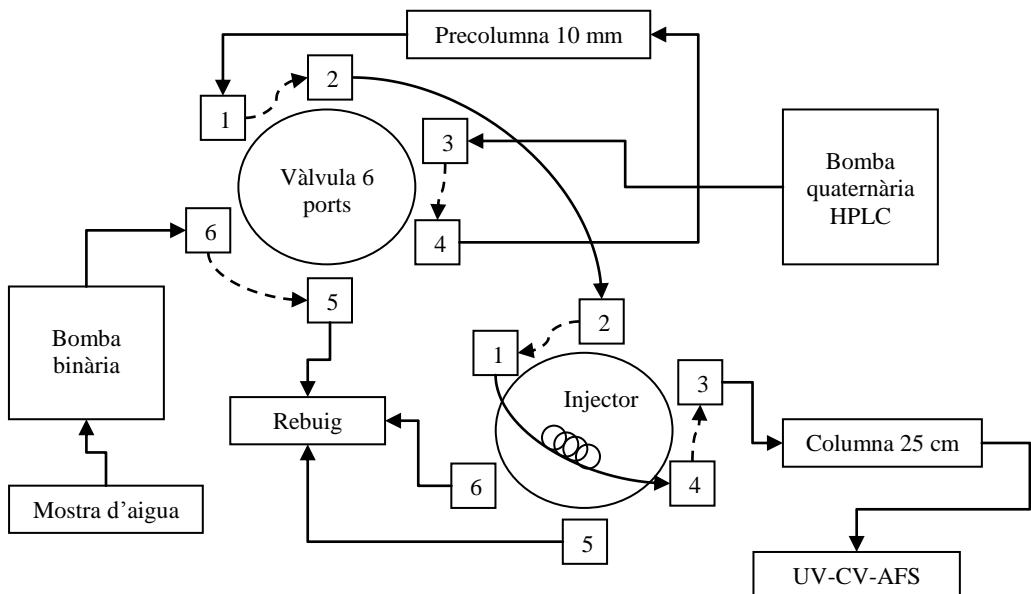


Figura 3.25.b: Esquema del sistema de preconcentració *on-line* amb la vàlvula en posició d'elució.

La Figura 3.26 mostra un exemple de cromatograma emprant la mateixa fase estacionària a la precolumna que la de la columna cromatogràfica (C_{18}) quan es preconcentren 100 mL d'una solució patró de 50 ng L^{-1} de les dues espècies i eluint amb fase mòbil (MeOH:APDC 80:20) per tal d'avaluar la recuperació de cada espècie. Mentre que per a l'espècie MeHg^+ s'obté una recuperació del 80%, l'espècie Hg^{2+} no queda ben retinguda i només es recupera un 25% de la concentració inicial.

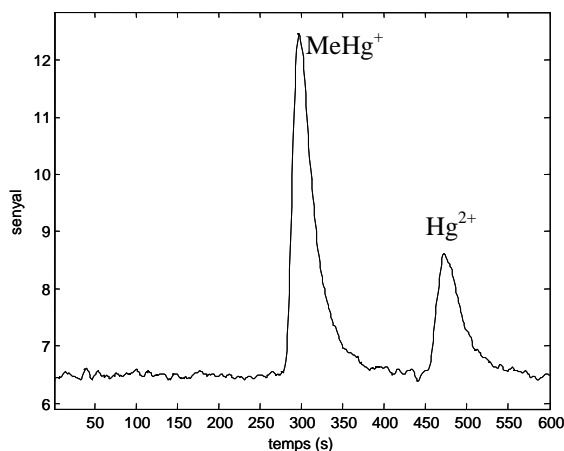


Figura 3.26: Cromatograma obtingut en la preconcentració de 100 mL de solució patró mescla de 50 ng L^{-1} .

Per assajar si amb l'addició d'APDC/ NH_4Ac a la mostra abans de preconcentrar millorava la recuperació i per tal de poder avaluar la capacitat de retenció de la precolumna, es va analitzar una solució patró mescla de Hg^{2+} i MeHg^+ de 20 ng L^{-1} de concentració en dues sessions de treball independents. Aquesta es va preparar en aigua doblement desionitzada juntament amb l'addició d'un excés d'APDC/ NH_4Ac per tal de complexar tot el mercuri abans d'introduir-lo a la precolumna. Amb l'ajut de la bomba binària, es van fer passar diferents volums de solució patró (25, 50 i 75 mL) i, posteriorment, es van eluir amb fase

mòbil per tal d'avaluar la recuperació de cada espècie. Les elucions es van analitzar alhora que es mesuraven els patrons de la recta de calibratge (alternant la vàlvula de preconcentració amb l'injector del sistema HPLC). Entre cada càrrega i elució de la precolumna, es va fer passar fase mòbil per tal d'assegurar la neteja del sistema de preconcentració i evitar al màxim els efectes de memòria. Per a l'espècie Hg^{2+} i fins a 50 mL de volum preconcentrat, es va obtenir una recuperació gairebé del 100%, però a volums majors (75 mL) la recuperació disminueix fins a un 68%. D'altra banda, pel MeHg^+ es va obtenir una recuperació prop del 100% per a tots els volums assajats.

Donat que les condicions anteriors de treball van indicar la potencialitat del sistema de preconcentració, es van dur a terme altres assajos estudiant un interval més ampli de volums de mostra preconcentrada. Tenint en compte el límit de quantificació del mètode optimitzat ($\sim 5 \mu\text{g L}^{-1}$) i partint d'una solució patró mescla de 50 ng L^{-1} , caldria preconcentrar un volum mínim de 10 mL de mostra per poder quantificar els pics. Per tant, es van fer passar volums de mostra des de 12,5 fins a 100 mL per la precolumna i es van analitzar les elucions alhora que els patrons de la recta de calibratge. A més, per avaluar la reproductibilitat del sistema, aquest assaig es va dur a terme en tres sessions de treball diferents. A la Figura 3.27 es mostren els cromatogrames obtinguts en una de les sessions.

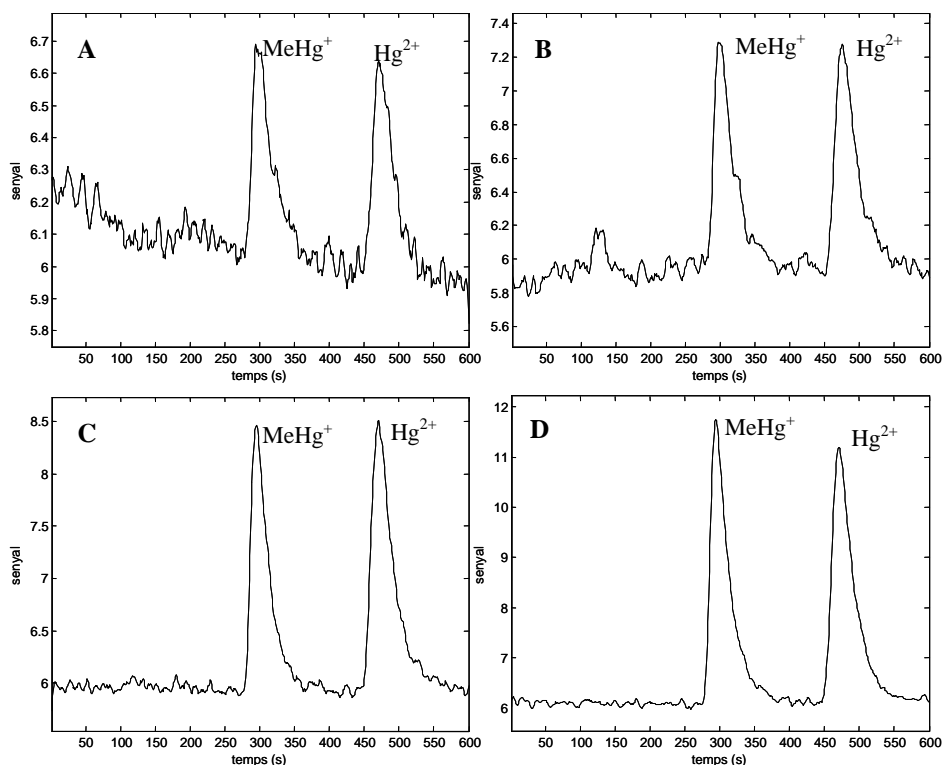


Figura 3.27: Cromatogrames obtinguts en la preconcentració de diferents volums de solució patró mescla de 50 ng L^{-1} (A: 12,5 mL; B: 25 mL; C: 50 mL; D: 100 mL).

A la Figura 3.28 es representen les recuperacions obtingudes per a la preconcentració dels diferents volums assajats. Per ambdues espècies, es pot observar que el percentatge de recuperació va disminuint a mesura que augmenta el volum de mostra fins als 50 mL, i a volums més grans es manté una recuperació al voltant del 70%. Aquests resultats, només es van obtenir en una de les tres sessions de treball, probablement degut a efectes de memòria que van donar lloc a una manca de reproductibilitat en la quantificació de les espècies, sobretot en el cas del Hg^{2+} , on les recuperacions anaven des del 15 al 120%.

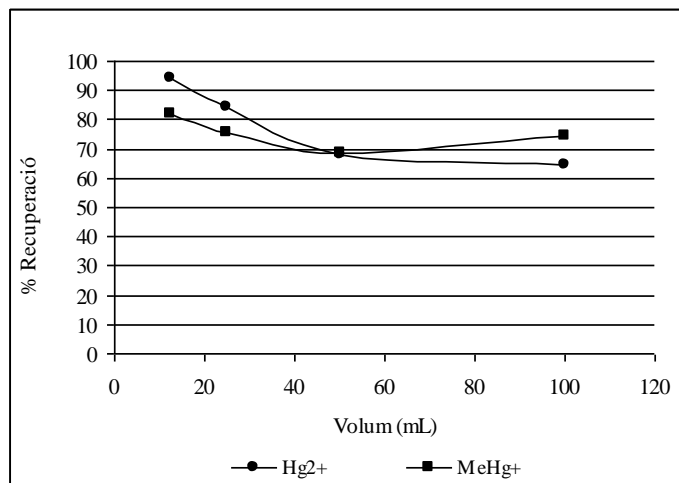


Figura 3.28: Recuperació obtinguda per a les dues espècies de mercuri després de preconcentrar diferents volums d'una solució patró mescla de 50 ng L⁻¹.

Els estudis de preconcentració *on-line* constitueixen una línia de recerca que es va començar a desenvolupar a l'última etapa d'aquesta Tesi. Els resultats preliminars obtinguts semblen indicar que aquest sistema de vàlvula de dos posicions i precolumna de C₁₈, permet la preconcentració d'espècies de mercuri *on-line* amb factors de preconcentració de 100 – 500. Actualment, es continua treballant en aquesta línia dins del grup de recerca per tal de millorar la reproductibilitat dels factors de recuperació.

Capítol 4

Efecte del pretractament de mostra en
sediments

4.1 Introducció

Com ja s'ha comentat anteriorment, l'avaluació de la distribució dels diferents compostos de mercuri en mostres mediambientals és una tasca clau en la química analítica. Els sòls i els sediments constitueixen embornals de metalls traça i les seves concentracions són majors que les que es poden trobar en altres compartiments ambientals, com en el cas de les aigües. Tenint en compte l'elevada afinitat del mercuri inorgànic pels sulfurs, és lògic esperar que aquest fort lligand controli la química del mercuri en els sediments en contacte amb aigües anòxiques. En sòls i sediments, el punt més crític és la baixa concentració que es troba d'espècies organomercúriques. En els sediments, el MeHg^+ no sol superar l'1,5% del contingut de mercuri total^{81,82,83} i, normalment, es troba en presència d'elevades concentracions de mercuri inorgànic. Per això, la baixa concentració de MeHg^+ present en moltes mostres de sediments requereix una etapa de preconcentració prèvia a l'anàlisi. D'altra banda, els elevats nivells de Hg^{2+} presenten no només problemes en la separació cromatogràfica, sinó també una major dificultat que és la generació artificial de MeHg^+ , la qual és avui dia una qüestió de seriosa preocupació⁸⁴.

Mentre que els procediments analítics per a la determinació d'espècies de mercuri en sediments es troben descrits a la literatura, pocs estudis estan dirigits a l'etapa de pretractament de mostra, la qual és crítica a l'hora de mantenir la integritat de les espècies. A la bibliografia, els pretractaments d'assecat de mostra més freqüents són la liofilització^{85,86,87} i l'assecat a l'aire^{88,89}. En aquest capítol, es descriuen estudis centrats en establir l'efecte de cinc pretractaments en la determinació de mercuri total i les seves espècies en tres mostres de

sediment de diferent origen i concentració. Els procediments de pretractament de mostra avaluats van ser congelar a -80 i -20 °C, assecar a temperatura ambient, assecar a l'estufa a 40 °C i liofilitzar. El contingut pseudo-total de Hg va ser determinat per CV-AFS i per ICP-MS, després d'una digestió amb aigua règia. La tècnica prèviament optimitzada HPLC-UV-CV-AFS va ser emprada per l'especiació i determinació de Hg^{2+} i MeHg^+ . El control de qualitat de les mesures es va dur a terme mitjançant l'anàlisi de dos materials de referència de sediment d'estuari.

4.2 Selecció de la mostra

Cinc mostres de sediments que provenien d'altres treballs realitzats al grup de recerca, dues mostres del Port de Barcelona (P1 i P2) i tres mostres de la llacuna de Venècia (MRS, S1 i S2), i un sediment de riu provinent d'una antiga zona d'alta activitat industrial (S3) es van caracteritzar en termes de contingut de mercuri total. Per això, es va agafar una porció de cada mostra (entre 50 i 80 g de mostra humida), es va deixar assecar a l'aire i es va triturar amb morter d'àgata. Els resultats obtinguts després d'una digestió amb aigua règia i mesura amb CV-AFS es mostren a la Taula 4.1. Sobre dues de les mostres amb concentració de mercuri intermèdia (S1 i P1) es va dur a terme l'especiació emprant el mètode d'extracció EPA 3200⁹⁰. Com era d'esperar, només es va detectar l'espècie Hg^{2+} que es corresponia amb la concentració de Hg total trobada amb una recuperació del 90%. Per tal d'abastar un ampli interval de concentracions de mercuri en sediments, l'efecte del pretractament es va estudiar sobre les mostres S1 i S2 de la llacuna de Venècia i sobre la mostra S3 de la zona industrialitzada. Els sediments escollits van ser aquells dels que es disposava una major quantitat de mostra.

Taula 4.1: Contingut de Hg trobat a les mostres inicials

Origen	Port de Barcelona		Llacuna de Venècia			Zona industrial
Mostra	P1	P2	MRS	S1	S2	S3
Hg (mg kg⁻¹)	4,1	2,0	3,4	7,1	2,2	123

4.3 Pretractaments de mostra estudiats

Les mostres de sediment es van prendre amb el seu contingut d'aigua original, es van traslladar al laboratori, es van homogeneïtzar i es van distribuir en porcions per tal d'aplicar els diferents pretractaments tal i com es mostra a la Figura 4.1.

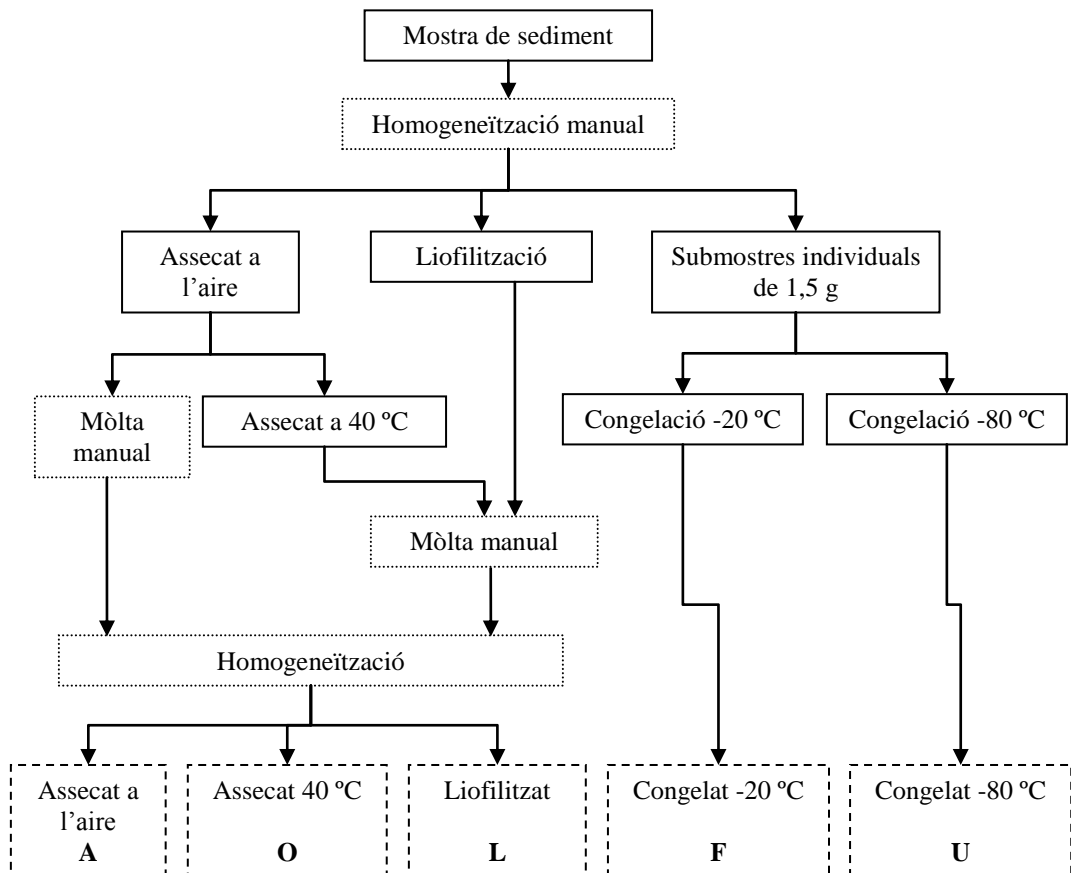


Figura 4.1: Esquema dels pretractaments assajats.

✓ Sediments assecats a l'aire i a 40 °C: aquestes porcions van ser primerament assecades a temperatura ambient durant 72 hores. Una meitat d'aquestes es van moldre manualment amb un morter d'àngata i es van guardar en ampolles de polietilè. La porció restant es va assecar a una estufa a 40 °C, es va moldre i es va embotellar. Els sediments assecats a l'aire i a l'estufa es van identificar com A i O, respectivament.

✓ Sediments liofilitzats: les mostres a liofilitzar (etiquetades com L) primer es van congelar a -80 °C i seguidament es van liofilitzar a 0,110 mbar durant 18 hores. Després es van moldre manualment amb un morter d'àngata i es van conservar en ampolles de polietilè a temperatura ambient.

✓ Sediments congelats a -20 i -80 °C: les mostres a congelar van ser immediatament transferides del contenidor de plàstic original a pesa-substàncies de vidre en porcions individuals per tal d'afavorir la seva posterior manipulació. Les mostres etiquetades com F i U van ser emmagatzemades a -20 °C i -80 °C, respectivament.

4.4 Caracterització dels sediments

La caracterització de les mostres de sediments es va dur a terme mitjançant la determinació de components majoritaris, l'anàlisi elemental de C, H, N i S, la determinació de metalls pesants i metalls traça, la pèrdua de pes a 550 °C (*Loss On Ignition* – LOI), la determinació de la humitat i dels clorurs, la mesura de pH i conductivitat. Els resultats obtinguts es mostren a les taules 4.2 i 4.3.

✓ Components majoritaris: la quantificació es va realitzar fent servir un espectròmetre de fluorescència de raigs X (Phillips PW 2400) amb tubs d'excitació de Rh i Au. Després d'assecar la mostra a 100 °C, es va fer una dilució 1:20 amb tetraborat de liti i es va fondre a 1350 °C en un forn inductiu de radio-freqüències (Philips PERL'X2 Micro-processing System) per tal d'obtenir perles de 30 mm de diàmetre. Els elements majoritaris es van determinar mitjançant una sèrie de mostres geològiques de referència internacional per a la calibració.

✓ Anàlisi elemental orgànica (AEO): la determinació de C, H, N i S totals es va realitzar mitjançant l'instrument Elemental Analyser EA 1108 CHNS-O, emprant càpsules d'estany i V₂O₅ com additiu. Es va fer una combustió de la mostra a 1000 °C i es va analitzar amb cromatografia de gasos.

✓ Metalls pesants i metalls traça: es va mesurar una alíquota d'un extracte d'aigua règia mitjançant ICP-OES (Optima 3200 RL) i ICP-MS (Agilent 7500ce series Octopole Reaction System), respectivament.

Taula 4.2: Anàlisi elemental, components majoritaris, LOI, clorurs, pH i conductivitat dels sediments estudiats

	S1	S2	S3
% en pes sec			
N	0,49 ± 0,04	0,21 ± 0,01	0,109 ± 0,008
C	11,3 ± 0,2	8,1 ± 0,2	5,9 ± 0,2
H	1,11 ± 0,06	0,42 ± 0,05	0,44 ± 0,02
S	1,02 ± 0,06	0,88 ± 0,05	0,10 ± 0,01
Fe₂O₃	3,54 ± 0,05	3,36 ± 0,01	5,3 ± 0,1
MnO	0,05 ± 0,01	0,05	0,06
TiO₂	0,39 ± 0,01	0,37 ± 0,01	0,49
CaO	16,2 ± 0,1	18,91 ± 0,01	21,1 ± 0,2
K₂O	1,77 ± 0,03	1,69 ± 0,01	2,25 ± 0,04
P₂O₅	0,41	0,17	0,13
SiO₂	29,3 ± 0,2	29,5 ± 0,1	36,1 ± 0,3
Al₂O₃	7,98 ± 0,08	7,5 ± 0,2	11,34 ± 0,09
MgO	7,60	8,5 ± 0,7	2,35 ± 0,01
Na₂O	2,54 ± 0,04	1,88 ± 0,05	0,618 ± 0,007
LOI a 550°C	22,8 ± 0,7	15 ± 4	6,8 ± 0,7
Cl⁻ (g L⁻¹)	4,69	3,35	0,72
pH	7,53	8,00	8,06
Conductivitat (mS cm⁻¹)	20,0	15,41	3,84

✓ Pèrdua de pes a 550 °C (LOI): les mostres es van tractar inicialment a 300 °C en un bany de sorra i després a 550 °C en una mufla. La temperatura inicial de la mufla es va situar a 350 °C i es va anar augmentant fins a 550 °C en increments de 50 °C. Les mostres es van mantenir a aquesta temperatura durant 16 hores. Les pèrdues de pes proporcionen una estimació del contingut de matèria orgànica i s'expressen en percentatge.

✓ Humitat: es va pesar 1 g de mostra i es va assecat en una estufa a 105 ± 2 °C fins a pes constant. D'aquí es va obtenir la correcció en pes sec que es va aplicar a totes les concentracions analítiques obtingudes.

✓ Clorurs: la determinació es va realitzar volumètricament seguint el mètode de Mohr en un extracte aquós sediment:aigua 1:5.

✓ pH i conductivitat: es van mesurar en un extracte aquós 1:2,5 fent servir un pH-metre (CRISON pH-Meter Basic 20+) i un conductímetre (CRISON EC-Meter Basic 30+), respectivament.

Taula 4.3: Concentració de metalls pesants i traça i contingut d'humitat a les mostres de sediment sotmeses als diferents pretractaments (A: assecat a l'aire, O: assecat a 40 °C, L: liofilitzat, F: congelat a -20 °C, U: congelat a -80 °C)

(mg kg ⁻¹)	Pre-tractament	Cu	Cr	Ni	Pb	Zn	Cd*	As*	Humitat (%)
S1	A	198	37,1	24,8	135	860	5,0	13,3	2,6
	O	209	35,8	26,9	140	853	4,3	13,7	1,8
	L	181	32,6	23,9	166	793	4,2	12,9	2,2
	F	203	36,7	26,4	143	860	4,2	12,9	50,4
	U	197	36,4	26,8	133	880	4,8	14,6	50,2
S2	A	104	26,1	18,9	66,9	439	3,2	11,5	2,0
	O	108	26,7	22,2	64,2	455	2,7	10,9	1,3
	L	111	25,6	21,4	73,1	456	2,8	11,0	1,5
	F	108	26,3	21,6	68,8	455	2,8	11,4	38,9
	U	108	26,8	22,1	67,1	459	3,0	11,8	38,4
S3*	A	29,1	47,6	27,8	120	94,9	0,40	29,1	2,1
	O	31,9	48,9	30,7	130	98,8	0,41	30,4	1,1
	L	30,1	48,1	30,0	120	104	0,52	29,3	0,8
	F	30,1	47,9	26,7	121	88,1	0,44	27,9	35,1
	U	27,9	47,1	27,6	113	88,9	0,45	27,2	36,0

* per ICP-MS

Els resultats obtinguts de la caracterització (Taula 4.2) mostren que el sediment S1 presenta continguts de C, H, N, S i de matèria orgànica superiors a les altres mostres. La mostra que presenta uns nivells més baixos de matèria orgànica és la S3 (6,8%) amb un valor de LOI tres vegades inferior a la mostra S1. Pel que fa al contingut de SiO₂, les mostres S1 i S2 tenen nivells similars, mentre que el de la S3 és lleugerament superior. De la resta dels components majoritaris, el més abundant a totes les mostres és el calci seguit per l'alumini. A la Taula 4.3 s'observen uns nivells de contaminació de metalls més elevats a la mostra S1 excepte pel cas de l'As i el Cr que presenten una concentració superior a la mostra S3.

4.5 Paràmetres de qualitat

Es van establir paràmetres de qualitat per a l'especiació de mercuri inorgànic i metilmercuri en sediments mitjançant HPLC-UV-CV-AFS.

Es va calcular el límit de detecció ($C_{LD} = 3 \cdot S_{FONS} / a$) per a les dues espècies de mercuri, partint d'1 g de sediment i extracció amb microones, obtenint-se uns valors de 150 i 160 $\mu\text{g kg}^{-1}$ pel Hg^{2+} i el MeHg^+ , respectivament (n=33).

Per a totes les mostres estudiades, la repetitivitat (RSD_r) i la reproductibilitat (RSD_R), en termes de desviació estàndard relativa, van ser calculades seguint la norma ISO 5725-1⁹¹. Es van obtenir resultats del mateix ordre de magnitud que del mètode amb patrons, amb uns valors de RSD_r del 5 al 7% i un 8% de RSD_R per a totes les mostres.

Es va calcular la relació entre la concentració de mercuri total a l'extracte de microones respecte a la digestió per aigua règia obtenint-se unes eficiències d'extracció del 70 – 90% per a tots els sediments.

L'exactitud del mètode va ser avaluada mitjançant l'anàlisi de dos materials de referència (RM) de sediment d'estuari. Com era d'esperar, i d'acord amb el LOD del mètode d'anàlisi d'espècies, només es va detectar Hg^{2+} als RMs. Les concentracions obtingudes pel mercuri total van ser de $0,88 \pm 0,03 \text{ mg kg}^{-1}$ pel IAEA-405 i $129,7 \pm 0,2 \text{ mg kg}^{-1}$ pel ERM-CC580. Entre els valors certificats (apartat 2.3.2) i els valors obtinguts, mitjançant l'extracció àcida, no es van trobar diferències significatives, amb un nivell de confiança del 95%.

4.6 Determinació de mercuri total

En estudis previs del grup de treball en la determinació de Hg en matrius de sediments, s'havia descrit que la presència d'àcid nítric al detector de fluorescència atòmica provocava efectes de *quenching* que feien augmentar la intensitat del senyal ⁹². Per tal de minimitzar la presència d'àcid nítric a les mostres, es va modificar el procediment d'aigua règia (indicat com ARm) recomanat per la ISO 11466 ⁵³ canviant el HNO₃ 0,5M emprat al capçal d'absorció per HCl 4%.

Per tal de digerir la mostra es pesa 1 g de mostra en un tub de digestió de Pyrex de 250 mL i s'addicionen 7 mL d'HCl 35% i 2,3 mL d'HNO₃ 69% (relació 3:1). El capçal d'absorció de mercuri s'omple amb 15 mL d'HCl 4% i es connecta al final del tub de reflux. Es fa una pre-digestió de la mostra durant 16 hores a temperatura ambient i, passat aquest temps, s'escalfa a 130 °C durant 2 hores. Un cop el sistema s'ha refredat, es transfereix l'àcid restant al capçal d'absorció al tub de Pyrex (esquema del muntatge a l'apartat 2.1.1). La suspensió resultant es filtra amb un filtre sense cendres (*Whatman* 40) i el residu sòlid s'esbandeix diverses vegades amb HCl 4%. El filtrat resultant junt amb el rentat es porta a un volum final de 50 mL. Aquestes solucions es transfereixen a ampolles de polietilè i s'emmagatzemen a 4 °C fins al moment de l'anàlisi.

Per a la determinació de mercuri total, la mostra, patró o blanc són introduïts directament al generador de vapor fred (CV). El volum emprat és d'aproximadament 20 mL ja que la mostra és contínuament bombejada fins que el senyal detectat s'estabilitza. Per tal d'assegurar que el mercuri present als extractes procedents de l'extracció assistida per microones (especiació) es troba en forma de Hg²⁺, aquests són

oxidats abans de l'anàlisi mitjançant l'addició de 50 µL d'una solució de KBrO₃/KBr 0,55%.

A la Figura 4.2 es mostra la concentració de Hg pseudo-total trobada a les mostres de sediments (extractes d'aigua règia) subjectes als diferents pretractaments. En tots els casos, s'ha corregit pel contingut d'humitat i s'expressa sobre mostra seca. Per a la mostra S1, la concentració de Hg mesurada per CV-AFS a les mostres congelades és menor que l'obtinguda quan la mostra és assecada. No obstant, quan els extractes són mesurats per ICP-MS, no es troben diferències significatives (test F) en la concentració de Hg amb respecte al pretractament de mostra aplicat. Una situació similar es troba per a la mostra S2, es pot observar que la concentració de Hg a les mostres congelades és lleugerament inferior que a les altres mostres assecades, independentment de la tècnica de mesura. Una possible explicació d'aquest comportament pot ser la dificultat en la manipulació de les mostres humides, ja que el transvasament de la mostra del pesa-substàncies al tub de digestió pot ser no quantitatiu, provocant petites pèrdues de mostra durant el procés d'extracció. Un altre motiu també podria ser que l'alt contingut en aigua de les mostres (35 – 50%) proporcionés una extracció no del tot efectiva. Per altra banda, quan el sediment S3 és analitzat per qualsevol de les dues tècniques, es troba la mateixa concentració de Hg en tots els pretractaments, tenint en compte la desviació estàndard.

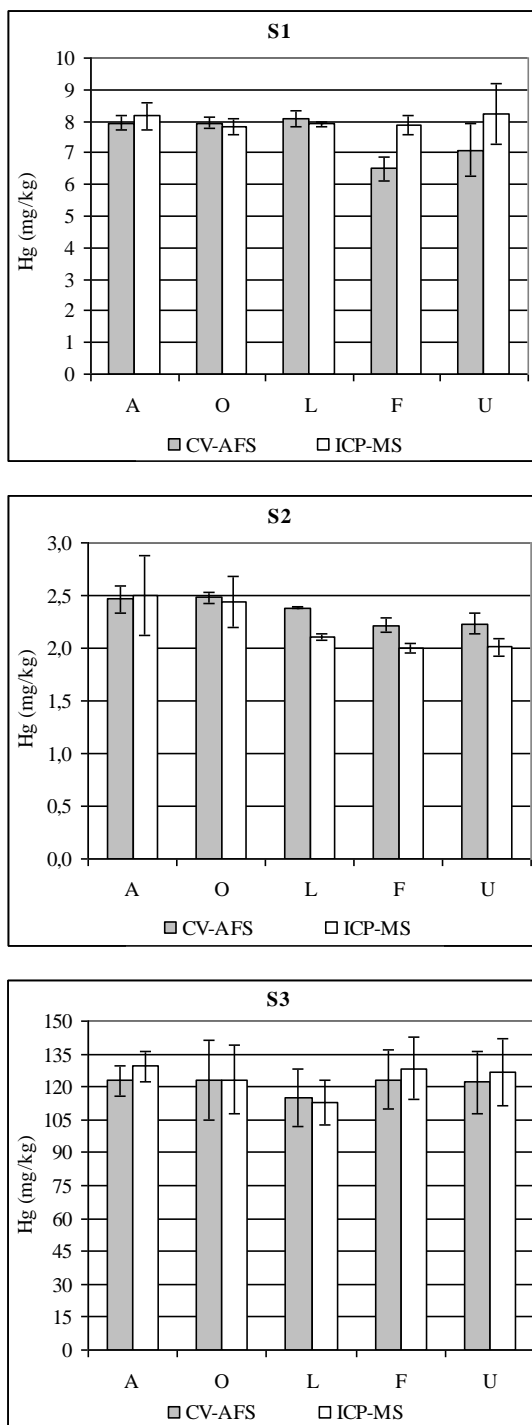


Figura 4.2: Concentració de Hg pseudo-total trobada als sediments en funció del pretractament i mesurats amb CV-AFS i ICP-MS (A: assecat a l'aire, O: assecat a 40 °C, L: liofilitzat, F: congelat a -20 °C, U: congelat a -80 °C).

4.7 Especiació de mercuri

L'extracció d'espècies de mercuri es va portar a terme seguint el mètode EPA 3200⁹⁰. Aquest procediment implica l'extracció assistida per microones (MW) de les espècies de mercuri en sòls i sediments emprant una solució d'HNO₃ 4,0 M. La mostra de sediment homogeneïtzada es pesa ($1,0 \pm 0,2$ g) al recipient d'extracció, s'afegeixen 10 mL d'HNO₃ 4,0 M, es tanquen hermèticament els recipients de microones i llavors són irradiats a 100 °C durant 10 minuts. Un cop acabat el programa de microones, es deixen refredar els recipients fins a temperatura ambient. Tot seguit, els extractes són filtrats a través de filtres sense cendres (*Whatman 40*) i es porten a un volum final de 20 mL amb aigua doblement desionitzada. Les solucions es transfereixen a ampolles de polietilè i s'emmagatzemen a 4 °C fins al moment de l'anàlisi.

La determinació de les espècies de mercuri als extractes de microones obtinguts es va realitzar mitjançant la tècnica HPLC-UV-CV-AFS. La separació dels compostos s'aconsegueix injectant 100 µL de mostra, blanc o patró al sistema HPLC. La fase mòbil per l'anàlisi de Hg²⁺ i MeHg⁺ és la composta per MeOH:APDC pH 5,5 (1,5 mM APDC + 10 mM NH₄Ac) a una proporció 80:20, tal i com està descrit al Capítol 3. Com a reductor es va fer servir SnCl₂ 1,5% en HCl 4%.

A l'anàlisi d'especiació es va trobar que només el Hg²⁺ era present en quantitats detectables, el MeHg⁺ estava per sota del límit de detecció, independentment del pretractament aplicat. Aquest resultat era d'esperar degut a la baixa concentració de metilmercuri que es troba de forma natural als sediments (<1,5% del Hg total). A la Figura 4.3 es mostra un cromatograma típic d'un extracte de microones d'una mostra

de sediment superposat amb cromatograma d'una solució patró que conté les dues espècies de mercuri.

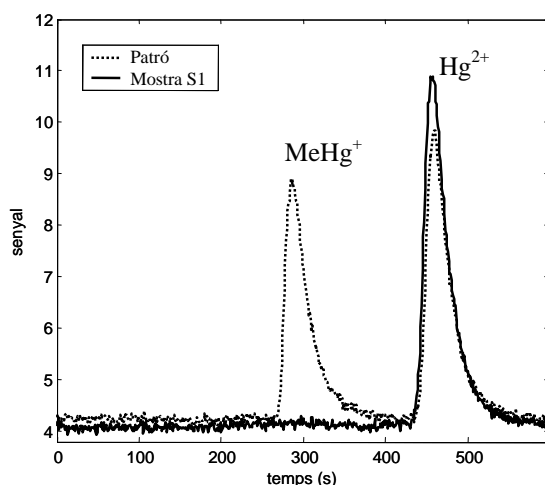


Figura 4.3: Cromatograma obtingut per a la mostra S1 superposat amb un patró de $50 \mu\text{g L}^{-1}$ de cada espècie.

A la Figura 4.4 es mostren les concentracions de mercuri obtingudes després d'analitzar l'extracte de microones per diferents tècniques. En el cas de la mostra S1, la concentració total de mercuri a l'extracte després de ser oxidat (mesurat tant per CV-AFS com per ICP-MS) és aproximadament un 25% més gran que la de Hg^{2+} (HPLC-UV-CV-AFS). Aquest comportament no s'observa a la mostra S2, on els nivells de concentració del Hg^{2+} i del total de l'extracte són similars, que és el comportament esperat. Per a la mostra S3 s'observa una major dispersió als resultats obtinguts, però aquesta mostra té uns nivells de concentració de mercuri dos ordres de magnitud major que les mostres anteriors. Per a totes les mostres assecades es va obtenir una recuperació del 80% pel Hg^{2+} respecte al pseudo-total. Si es comparen els diferents pretractaments assajats a totes les mostres, la variabilitat dels resultats obtinguts per a la concentració de mercuri és del mateix ordre de magnitud que la del mètode per sí mateix ($\text{RSD} < 10\%$).

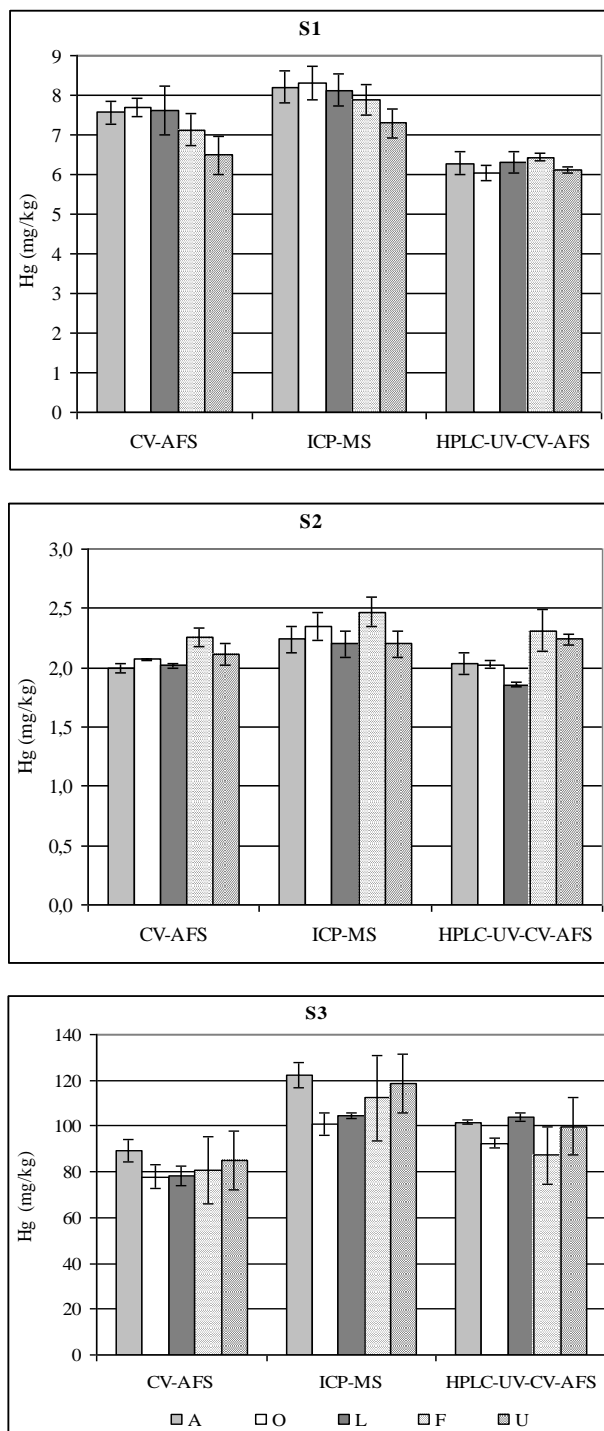


Figura 4.4: Concentració de mercuri obtinguda als extractes de microones mesurats per diferents tècniques (A: assecat a l'aire, O: assecat a 40 °C, L: liofilitzat, F: congelat a -20 °C, U: congelat a -80 °C).

4.8 Conclusions

Quan s'analitza mercuri total als sediments és recomanable qualsevol dels pretractaments que inclouen un assecat a baixa temperatura de la mostra, ja que no hi ha diferències significatives entre l'assecat a l'aire, a 40 °C o la liofilització.

Als resultats obtinguts per a l'especiació de mercuri s'observa que l'única espècie detectada a totes les mostres és el Hg^{2+} , com era d'esperar. Per a la concentració trobada d'aquesta espècie, la variabilitat dels resultats obtinguts per als diferents pretractaments assajats és del mateix ordre de magnitud que la que proporciona el mètode per sí mateix (RSD <10%). D'aquesta manera, per les matrius de sediment analitzades no es pot avaluar cap efecte del tipus de pretractament assajat. No obstant, degut a que la manipulació de les mostres congelades pot portar a una major dispersió dels resultats, qualsevol dels pretractaments amb assecat està recomanat.

L'objectiu d'aquest estudi es centrava en avaluar els efectes que poden sorgir en la determinació de mercuri total i les seves espècies quan una mostra de sediment és tractada amb diferents pretractaments d'assecat. Donat que als estudis d'especiació, l'extracció amb microones amb HNO_3 4M originava valors de recuperació pel Hg^{2+} del 80% respecte al contingut de mercuri pseudo-total, estudis posteriors (apartat 5.3) es van centrar en els processos d'extracció i les tècniques de mesura.

Capítol 5

Aplicació de la metodologia a matrius
ambientals i biològiques

5.1 Introducció

L'interès per la determinació d'espècies de mercuri en mostres ambientals és degut a la persistència natural al medi ambient i als diferents mecanismes pels quals el mercuri canvia la seva forma química. Un cop introduït al medi aquàtic, el mercuri es pot trobar en diferents formes solubles i, també, es pot associar a la matèria orgànica. Els sòls, les aigües i els sediments aquàtics es consideren els principals dipòsits de mercuri al medi ambient i, per tant, constitueixen les matrius de més alt interès. El mercuri que es troba al medi aquàtic presenta una gran bioacumulació principalment en animals i és per això que l'estudi de mostres biològiques aquàtiques també és d'un elevat interès.

En aquest capítol es descriu l'aplicació de la metodologia analítica desenvolupada a aquest tipus de matrius ambientals i biològiques. Pel cas dels sòls, només es va determinar el contingut de mercuri total.

5.2 Aigües

La Directiva Europea de l'Aigua⁹³, la qual busca establir un marc per a la protecció de les aigües superficials i subterrànies, inclou el mercuri i els seus compostos a la llista de substàncies perilloses i prioritàries com a un dels elements per a establir l'estat de la qualitat físico-química de l'aigua. No obstant, actualment, la Directiva 98/83/CE considera només la concentració de mercuri total, establint un valor paramètric d' $1 \mu\text{g L}^{-1}$ ⁹⁴.

Per tal d'aplicar la metodologia desenvolupada a mostres d'aigua, en aquest apartat es descriu un estudi de recuperació en aigües de diferent origen després d'haver estat fortificades amb Hg^{2+} i MeHg^+ a dos nivells de concentració.

5.2.1 Descripció de les mostres

Es va disposar de 7 mostres d'aigua de diferent origen: embotellada mineral Lanjarón (mineralització dèbil), de la xarxa metropolitana de Barcelona, de riu (riu Besòs), de mar (platja del Fòrum), de plantes de tractament d'aigües residuals (WWTP) i de rebuig industrial (fàbrica de paper) del nord d'Espanya. Les mostres es van filtrar amb filtres sense cendres (*Whatman* 40) i es van emmagatzemar a 4°C en ampolles de polietilè d'alta densitat.

5.2.2 Caracterització de les mostres

Per tal de caracteritzar les mostres d'aigua, es van realitzar mesures de pH i de conductivitat després de ser filtrades. També es va

analitzar el contingut de metalls pesants mitjançant ICP-MS. Els resultats obtinguts es mostren a la Taula 5.1.

Taula 5.1: Característiques de les mostres d'aigua estudiades

Mostra	pH	Conductivitat ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	$\mu\text{g L}^{-1}$						
			Cr	Ni	Cu	Zn	As	Cd	Pb
Mineral	6,3	183	< 0,5	4,7	0,7	14	1,5	< 0,02	0,28
Aixeta	7,4	566	0,6	14	480	252	1,0	0,34	0,53
Riu	8,0	1502	1,8	28	6,0	34	4,2	0,15	0,81
Mar	8,3	41900	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 1	< 0,1	< 0,02	< 0,05
WWTP-1	7,9	13160	< 0,5	17	< 0,5	27	< 0,1	< 0,02	< 0,05
WWTP-2	7,5	1390	2,3	11	17	37	1,5	0,17	1,5
Industrial	4,2	2170	18	8,5	1,3	627	0,7	0,03	2,1

Si es comparen els valors de pH mesurats, s'observa que la majoria de les mostres tenen un pH neutre-bàsic, excepte en l'aigua mineral que és lleugerament àcid i l'aigua industrial que presenta un pH força àcid degut al seu origen. Aquesta mostra és la que presenta una major contaminació per metalls pesants, sobretot de Pb, Zn i Cr. A l'aigua de l'aixeta es troben uns nivells de Cu i Zn més alts que a la resta de mostres, fet que és degut a que aquesta aigua està en contacte permanent amb les canonades, tot i que el Cu es troba per sota del límit establert per la Directiva 98/83/CE (2 mg L^{-1})⁹⁴. Per altra banda, l'aigua de mar és la que presenta una major conductivitat, degut a la seva salinitat, i no presenta concentracions detectables de metalls pesants. L'aigua mineral presenta una conductivitat molt baixa com correspon a un aigua de mineralització feble.

5.2.3 Estudis de recuperació

La majoria dels materials de referència certificats disponibles per mercuri total en aigua consisteixen en mostres d'aigua fortificada. Degut a que no existeixen CRMs per l'especiació de Hg^{2+} i MeHg^+ en aigües naturals, es van realitzar estudis de recuperació emprant les 7 matrius d'aigua, anteriorment descrites, fortificades a dos nivells de concentració (aproximadament a 2 i 20 vegades sobre el LOQ de la tècnica acoblada, indicat a l'apartat 3.5.4). Les mostres d'aigua van ser primerament caracteritzades per tal de determinar el contingut de Hg total mitjançant CV-AFS i, a totes les matrius, es va trobar per sota del LOD ($<0,04 \mu\text{g L}^{-1}$). Cada mostra d'aigua va ser analitzada per triplicat en tres sessions de treball independents, emprant solucions patró de Hg^{2+} i MeHg^+ (d'entre 5 i $230 \mu\text{g L}^{-1}$ per a cada espècie) per al calibratge. Les mostres fortificades que contenien aproximadament 10 i $100 \mu\text{g L}^{-1}$ per a cadascuna de les espècies, es van preparar enrasant amb la matriu d'aigua corresponent, prèviament filtrada amb filtres de polièster de $0,20 \mu\text{m}$. Les condicions de mesura amb el sistema HPLC-UV-CV-AFS són les descrites a l'apartat 3.5. La Figura 5.1 mostra com a exemple els cromatogrames obtinguts de solucions patró i d'una mostra d'aigua fortificada (WWTP-1) per a les dues espècies de mercuri a dos nivells de concentració. Les recuperacions obtingudes van ser del 90 al 115% per ambdues espècies a totes les matrius, independentment del nivell de concentració i de la complexitat de la matriu (Figura 5.2).

Quan es treballa amb matrius d'elevada salinitat, com és el cas de l'aigua de mar, la tècnica acoblada desenvolupada en aquesta Tesi (HPLC-AFS) presenta majors avantatges front la mesura amb ICP-MS, ja que amb aquesta tècnica les recuperacions que s'obtenen són més

baixes, degut a la disminució del poder d'ionització del plasma ⁶¹ i a que existeix el risc d'obturació del nebulitzador degut a la presència de sals.

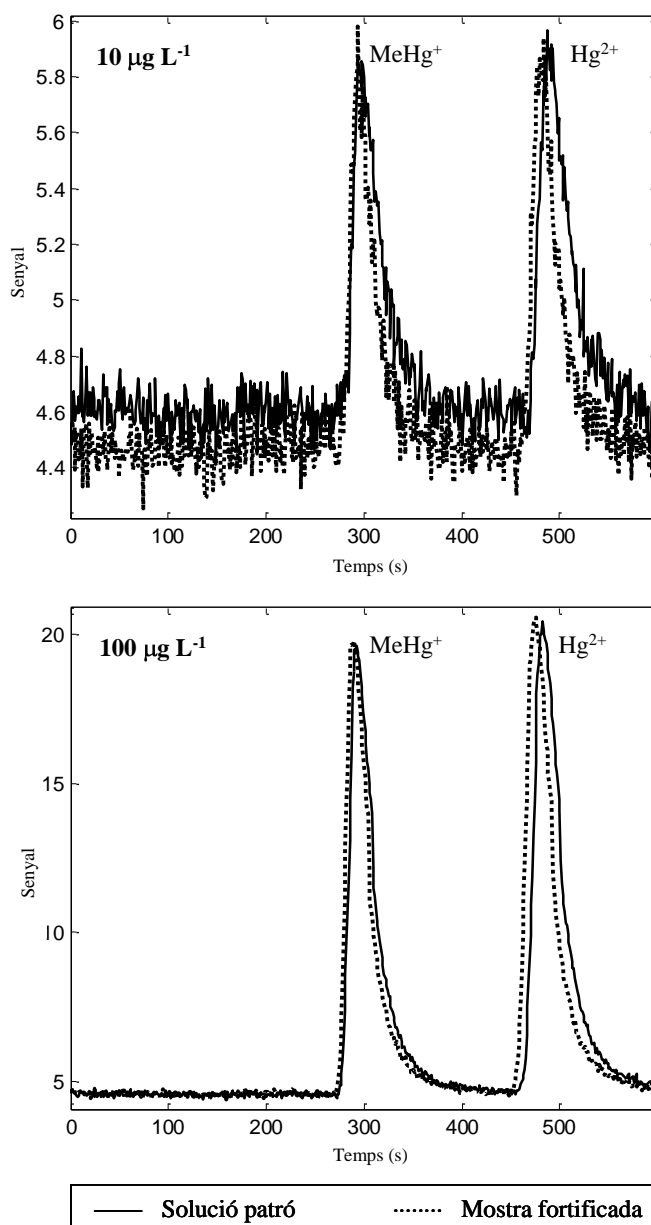


Figura 5.1: Cromatogrames de solucions patró i d'una mostra d'aigua fortificada (WWTP-1) per a les dues espècies de mercuri a dos nivells de concentració (10 i 100 µg L⁻¹).

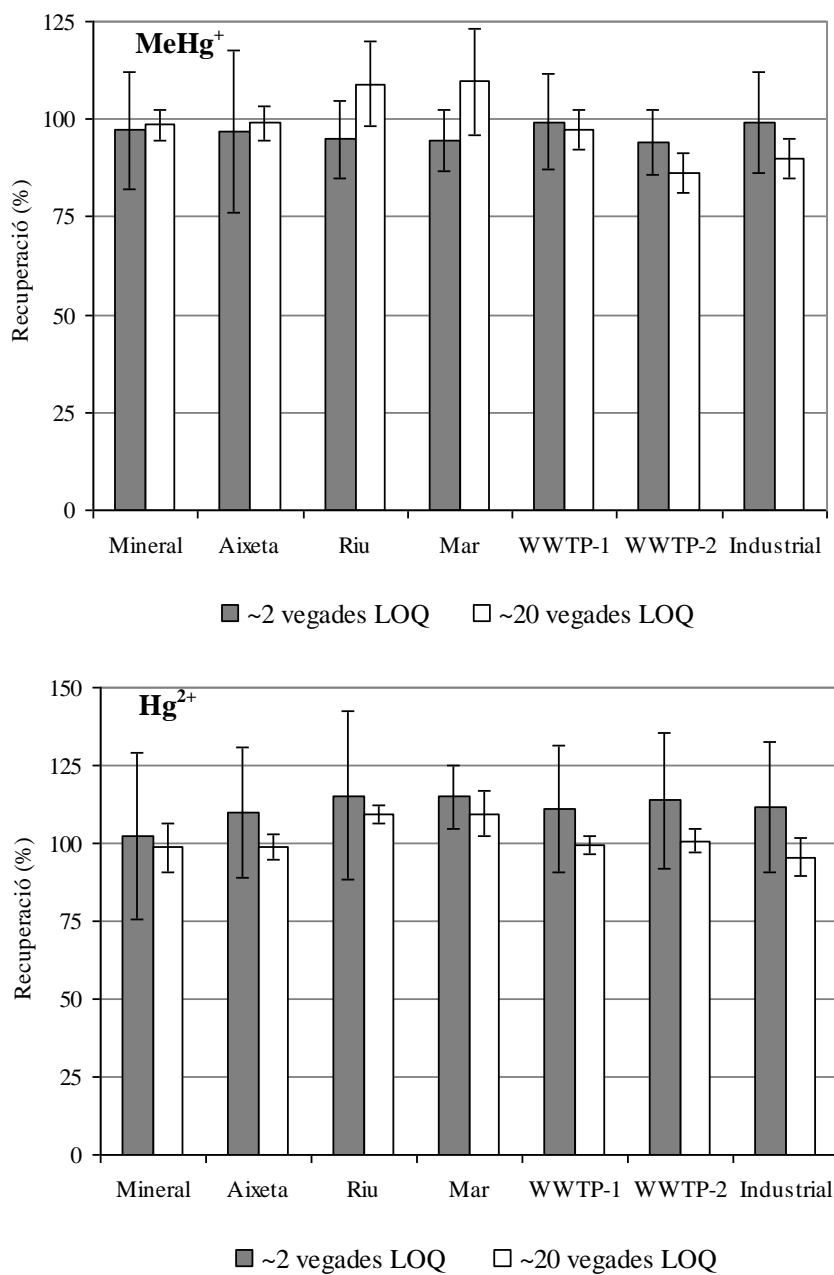


Figura 5.2: Recuperacions obtingudes per a les dues espècies de mercuri a dos nivells de concentració (10 i 100 $\mu\text{g L}^{-1}$) en set matrius d'aigua.

Les dades obtingudes als estudis de recuperació van ser tractades estadísticament fent servir ANOVA d'un factor per a cada matriu d'aigua. La repetitivitat (RSD_r) i la reproductibilitat (RSD_R) van ser calculades seguint la norma ISO 5725-1⁹¹. Es va obtenir una bona repetitivitat dins de cada sessió de treball, amb valors de RSD_r de 1,5 a 5% pel $MeHg^+$ a totes dues concentracions, excepte per l'aigua de riu que es van tenir uns valors de 7 – 9%. Pel cas del Hg^{2+} , els valors obtinguts van ser de 2 a 5%, excepte per la mostra WWTP-2 a baixa concentració i la mostra d'aigua mineral a alta concentració, donant una RSD_r del 6,7%. Els valors reportats a la literatura per a la repetitivitat en aigües naturals fortificades (500 o 50 $\mu g L^{-1}$) es troben entre el 4 i el 8% per a totes dues espècies de mercuri^{36,70}. Pel que respecta a la reproductibilitat, per a la menor concentració assajada, els valors de RSD_R es troben entre el 10 i el 20% per a les dues espècies, excepte pel $MeHg^+$ en l'aigua de l'aixeta i pel Hg^{2+} en les aigües mineral i de riu que presenten uns valors de RSD_R del 25 – 27%. Per nivells de concentració majors, els valors de RSD_R van del 3 al 10% per ambdues espècies, excepte pel $MeHg^+$ en l'aigua de mar (14%).

En referència al temps de retenció, la reproductibilitat obtinguda en tres sessions de treball independents (RSD , $n=6$ cada sessió) va ser del 2 – 3% pel Hg^{2+} ($t_R=7,5$ minuts) i del 1 – 1,5% pel $MeHg^+$ ($t_R=4,5$ minuts), tenint en compte tant les solucions patró com les mostres d'aigua analitzades. Els valors obtinguts es poden considerar més que acceptables donat l'ús d'una tècnica acoblada (HPLC-UV-CV-AFS) i l'anàlisi de matrius d'aigua de complexitat creixent.

Aquests resultats es troben publicats a la revista *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* (Annex II).

5.3 Sediments i teixits biològics d'origen marí

En aquest apartat es descriuen els diferents procediments d'extracció estudiats en sediments i teixits biològics, tant per a la determinació del contingut total de mercuri com per l'estudi de les seves espècies, i la seva aplicació a la metodologia desenvolupada.

5.3.1 Descripció de les mostres

Per aquest estudi es van emprar quatre materials de referència certificats, dos sediments d'estuari (IAEA-405 i ERM-CC580) i dos teixits biològics (BCR 463 i DOLT-4, tonyina i fetge de peix, respectivament), i unes mostres comercials de musclos d'origen gallec.

Els materials de sediment tenen una concentració de mercuri total de dos ordres de magnitud de diferència l'un respecte a l'altre, per tant, s'abasta un interval ampli de concentració de mercuri en sediments. La concentració de MeHg^+ als materials és 0,67% i 0,06% del Hg total pel IAEA-405 i pel ERM-CC580, respectivament, per tant, es pot considerar que pràcticament tot el mercuri es troba en la forma Hg^{2+} . Els dos materials biològics presenten concentracions totals de mercuri del mateix ordre de magnitud però amb proporcions de metilmercuri diferents. Mentre que al material BCR 463 tot el mercuri es troba en forma de MeHg^+ , al DOLT-4 aquesta espècie representa aproximadament un 50% del mercuri total. La descripció i els valors certificats de mercuri dels materials es troben a l'apartat 2.3.2. En el cas dels musclos, es va disposar d'1 kg de mostra que es va preparar adequadament per a ser posteriorment analitzada. Els musclos es van esbandir amb aigua de la xarxa i es va separar el teixit de la closca. Un cop triturat i homogeneïtzat tot el teixit obtingut, aquest es va liofilitzar

i finalment es va moldre manualment amb morter d'àngata. Es va calcular el contingut inicial d'aigua a la mostra essent aquest d'un 80%.

5.3.2 Determinació de mercuri total

Es va dur a terme la determinació de mercuri pseudo-total mitjançant extracció amb aigua règia (ISO 11466⁵³) i detecció per CV-AFS i ICP-MS, tal i com s'ha descrit a l'apartat 4.6.

Donat que es disposava de materials amb valors de concentració de Hg certificats i que amb matrius biològiques no s'havia treballat abans, inicialment es va realitzar la digestió dels materials mitjançant aigua règia sense modificar el procediment de la ISO, per tal d'estudiar l'efecte de *quenching* que provoca la presència de HNO₃ al detector de fluorescència atòmica. Els resultats obtinguts van mostrar uns valors de recuperació d'un 130% de manera sistemàtica quan la determinació es duia a terme per CV-AFS. El fet que la mesura dels extractes per ICP-MS proporcionés recuperacions del 95 – 105%, posava de manifest que també en el cas de les matrius biològiques s'observaven els efectes de *quenching* que feien augmentar la intensitat del senyal de fluorescència, tot i els factors de dilució aplicats a l'extracte resultant abans de mesurar-lo. Per tant, les digestions per a la determinació de Hg total en els CRMs es van dur a terme amb el procediment d'aigua règia modificat (ARm). Per a tots els materials de referència assajats, es van obtenir unes recuperacions del 95 – 110% per a ambdues tècniques de detecció, CV-AFS i ICP-MS. A la Figura 5.3 es mostren els resultats obtinguts per a cada material de referència i on es pot veure que els valors obtinguts, considerant la desviació estàndard, es solapen amb els valors certificats corresponents.

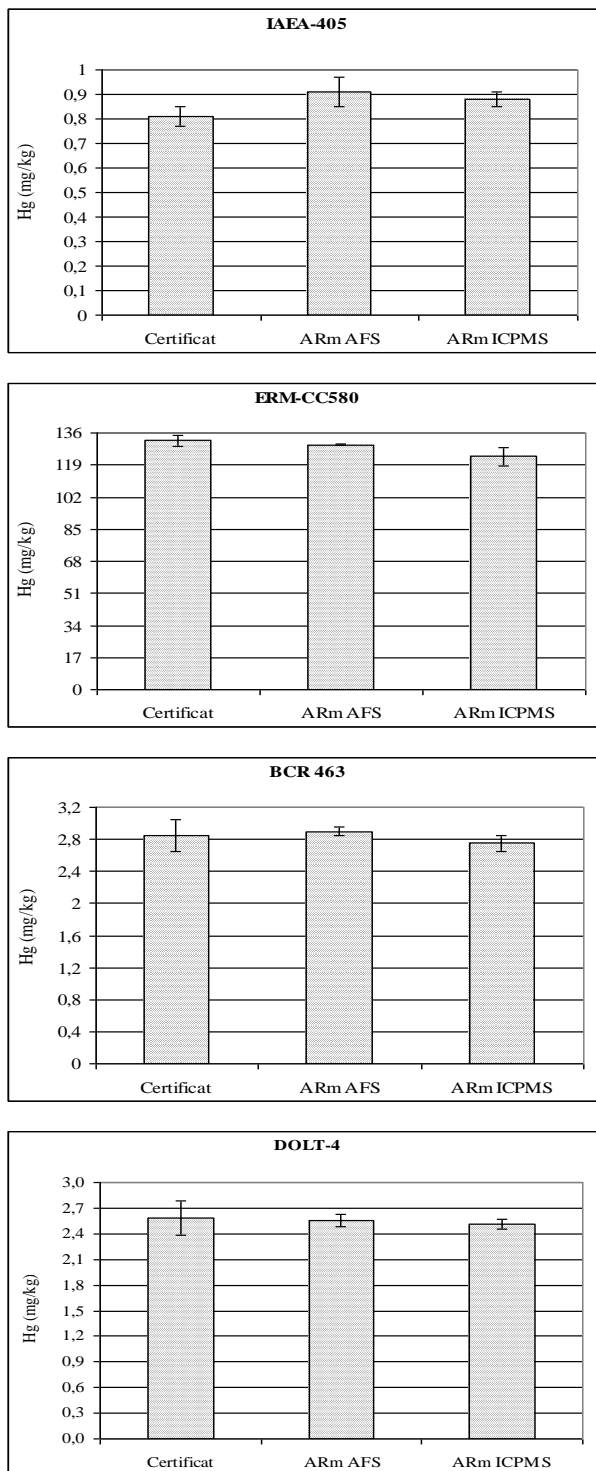


Figura 5.3: Concentració de Hg total trobada als diferents CRMs emprant CV-AFS i ICP-MS. La primera columna correspon al valor certificat.

De la mateixa manera, per a la mostra de musclos comercial, tot i que una extracció amb aigua règia (sense modificar) pot ser un mètode adequat quan la mesura es duu a terme per ICP-MS, la seva determinació per CV-AFS requereix l'ús de HCl 4%. La concentració de mercuri total trobada a la mostra va ser de $0,085 \pm 0,008 \text{ mg kg}^{-1}$.

Així doncs, per a la determinació de mercuri total en mostres de sediments i de teixits de peix, una extracció amb aigua règia emprant HCl 4% al capçal d'absorció (descripció del muntatge a l'apartat 2.1.1), proporciona una matriu de mesura adequada tant per ICP-MS com per CV-AFS. Quan la tècnica de determinació és l'ICP-MS, l'ús de HNO₃ 0,5M al capçal d'absorció no presenta cap inconvenient a la mesura.

5.3.3 Especiació de mercuri

Un cop establert el sistema d'extracció de mercuri total, el treball d'investigació es va centrar en l'estudi d'un sistema per extreure quantitativament les espècies de mercuri de les matrius esmentades. Pel que respecta a l'especiació de teixits biològics, a la bibliografia es descriuen tant extraccions àcides com bàsiques^{95,96,97}, però no es van trobar mètodes normalitzats d'extracció d'espècies en aquestes matrius. Donat que un dels mètodes més emprats en l'especiació de sediments és el mètode EPA 3200⁹³ per mercuri extraïble, que empra HNO₃ 4M com a extractant, es va provar d'aplicar la mateixa extracció àcida als dos tipus de matrius assajades. Ja que un dels objectius d'aquesta Tesi és proposar metodologia analítica per a la determinació d'espècies de mercuri emprant AFS com a detector, i tenint en compte els problemes de *quenching* que presenta l'ús de HNO₃, es va assajar també una modificació del mètode fent servir HCl 4M com a extractant. Aquest

mètode es basa en una extracció àcida (amb HNO_3 o HCl 4M) assistida per microones (MW) durant 10 minuts a 100 °C. Els extractes obtinguts en tots els casos es van analitzar amb la tècnica HPLC-UV-CV-AFS, prèviament optimitzada i que es descriu al Capítol 3.

Per poder dur a terme un correcte balanç de masses en els extractes de mostra on s'ha fet l'especiació, cal realitzar la determinació de mercuri total a l'extracte d'especiació. A tal efecte, i quan la mesura es realitza amb CV-AFS, cal que l'extracte obtingut es sotmeti a un segon procés de digestió que permeti l'oxidació de totes les formes químiques de mercuri a Hg^{2+} . Aquest procés és especialment important en el cas dels teixits biològics on el contingut d'espècies organomercúriques sol ser alt. En el cas dels sediments, l'aportació a la concentració de Hg total de les espècies orgàniques no sol ser significativa. En canvi, quan la mesura de mercuri total es realitza mitjançant ICP-MS, aquesta digestió prèvia no és necessària i es pot mesurar directament l'extracte d'especiació.

5.3.3.1 Sediments

A la Figura 5.4 es mostra un resum dels resultats obtinguts (concentració de Hg) als extractes d'especiació dels materials de referència certificats de sediments i que es comenten a continuació.

En el cas dels sediments, els nivells de MeHg^+ a l'extracte de mesura es troben per sota del límit de detecció de la tècnica emprada, ja que, com s'ha dit anteriorment, aquesta espècie correspon únicament al 0,06 – 0,67% del Hg total. Les recuperacions del Hg^{2+} es van calcular respecte al contingut de mercuri total certificat, ja que aquesta espècie representa més d'un 99% del total.

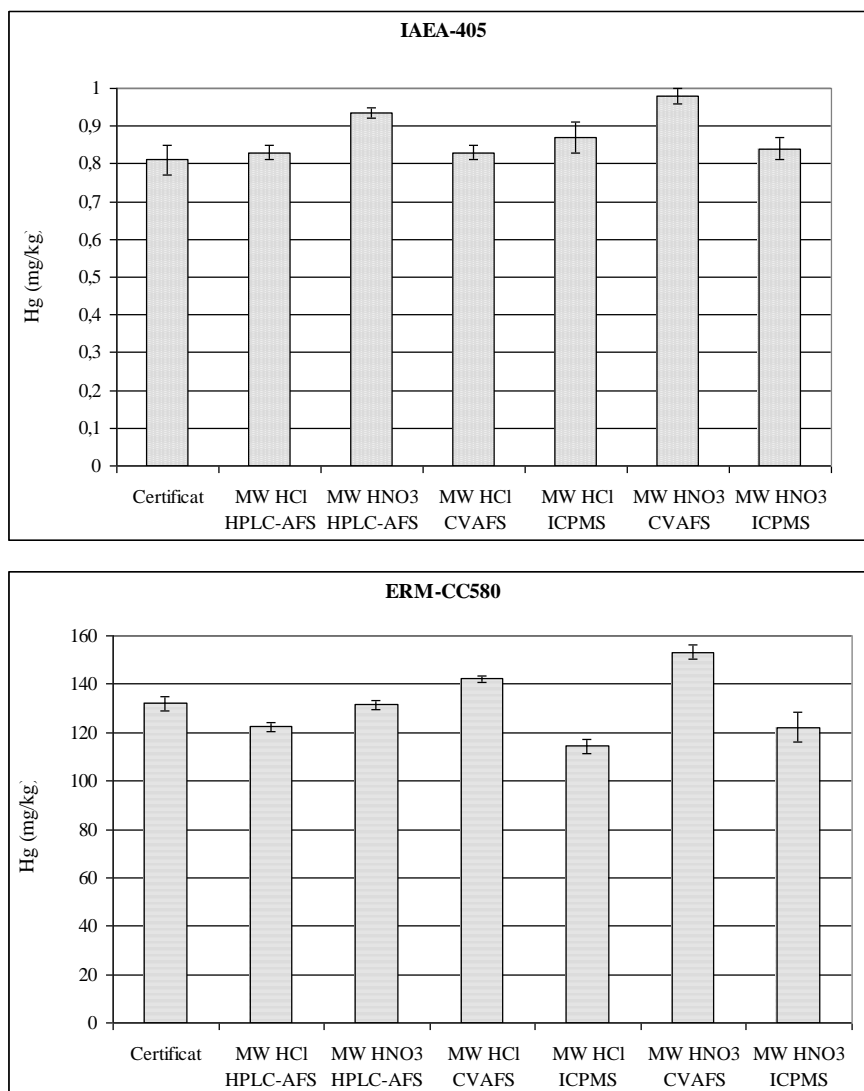


Figura 5.4: Concentració de Hg trobada als extractes d'especiació dels CRMs de sediments. La primera columna correspon al valor de Hg total certificat.

Emprant HNO_3 com a extractant es van obtenir unes recuperacions pel Hg^{2+} de $115 \pm 2\%$ pel material IAEA-405 i $97 \pm 1\%$ pel ERM-CC580. Quan el mètode va ser modificat fent servir HCl com a extractant, les recuperacions obtingudes van ser de $102 \pm 3\%$ pel IAEA-405 i $93 \pm 1\%$ pel ERM-CC580. Per tant, qualsevol dels dos extractants pot ser emprat per l'anàlisi d'espècies de mercuri en sediments, ja que

s'obtenen unes bones recuperacions en ambdós CRMs. Aquests resultats corresponen a les columnes identificades com MW HCl HPLC-AFS i MW HNO₃ HPLC-AFS a la Figura 5.4.

La mesura del contingut total de mercuri als extractes d'especiació (amb HNO₃ i HCl) directes es va realitzar mitjançant CV-AFS i ICP-MS. Els resultats obtinguts corresponen a les últimes quatre columnes de la Figura 5.4. A la Taula 5.2 es mostren les recuperacions obtingudes que van ser calculades respecte al contingut de mercuri total certificat. Com es pot observar a la taula, les recuperacions obtingudes són de l'ordre del 100% pels dos materials independentment del tipus d'extracció i de la tècnica emprada, excepte en el cas del MW HNO₃ CV-AFS on es torna a posar de manifest l'efecte de *quenching* ja que les recuperacions obtingudes són més elevades que la resta.

Taula 5.2: Recuperacions obtingudes pel Hg total a l'extracte d'especiació dels CRMs de sediments

% Recuperació	MW HCl	MW HCl	MW HNO ₃	MW HNO ₃
	CV-AFS	ICP-MS	CV-AFS	ICP-MS
IAEA-405	103	107	121	103
ERM-CC580	108	90	116	93

5.3.3.2 Teixits biològics d'origen marí

Per a l'estudi d'aquestes mostres biològiques i, donat que a la bibliografia les extraccions àcides descrites empren en molts casos HCl^{98,99,100}, es van iniciar els estudis d'extracció amb HCl seguint les mateixes condicions descrites anteriorment.

A la Figura 5.5 es mostra un resum dels resultats obtinguts (concentració de Hg) als extractes d'especiació dels materials de referència certificats de teixit biològic i que es comenten a continuació.

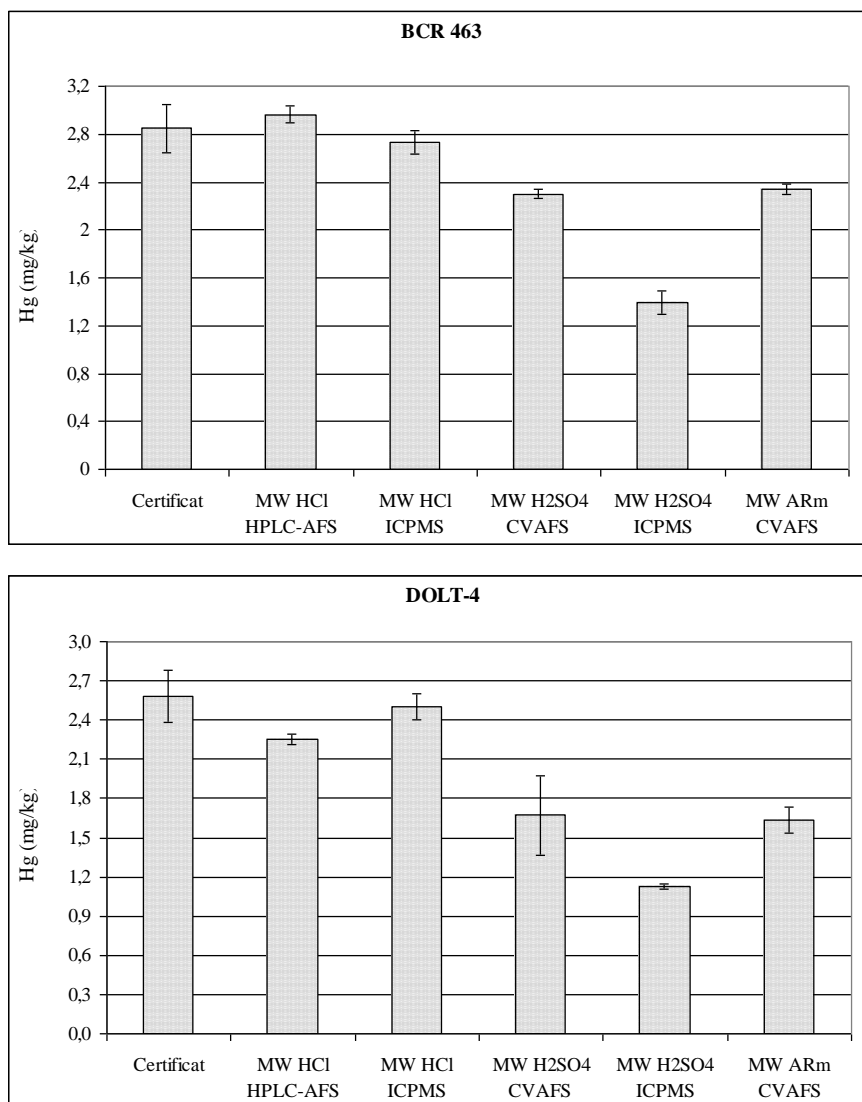


Figura 5.5: Concentració de Hg trobada als extractes d'especiació dels CRMs de teixit biològic. La primera columna correspon al valor de Hg total certificat.

Tot el mercuri que conté el material BCR 463 es troba en forma de MeHg^+ que es va quantificar mitjançant HPLC-AFS amb una recuperació del 97% respecte al valor certificat (columna MW HCl HPLC-AFS a la Figura 5.5).

Pel cas del material DOLT-4, aproximadament un 50% del contingut de mercuri es troba en forma de MeHg^+ , la recuperació d'aquesta espècie va ser del 104%. A l'extracte d'aquesta mostra, també es va detectar l'espècie Hg^{2+} a un nivell de concentració que equival a un 65% del mercuri restant a la mostra, calculat com la diferència entre els valors certificats pel contingut total de mercuri i el metilmercuri. Per tant, considerant la suma d'espècies a l'extracte d'HCl s'obté una recuperació del 85% respecte al contingut total certificat (columna MW HCl HPLC-AFS a la Figura 5.5)

Per mesurar el contingut total de mercuri a l'extracte d'especiació mitjançant CV-AFS, cal una digestió prèvia de l'extracte per tal d'oxidar totes les espècies presents a Hg^{2+} . Als assajos que es descriuen a continuació, les recuperacions obtingudes es van calcular en base al contingut de mercuri total certificat.

Primerament, es va provar d'oxidar els extractes amb KBrO_3/KBr seguint el mètode EPA 245.7¹⁰¹ (per aigües), però no es va poder mesurar el contingut de mercuri degut a incompatibilitats de la matriu resultant amb el sistema de detecció de fluorescència atòmica ja que es produïa una mena d'escuma al CV que impedia la generació i l'arribada del vapor de mercuri al detector.

Posteriorment, es va provar de digerir els extractes mitjançant un programa de microones amb H_2SO_4 (45 minuts de rampa fins a 190 °C). Mesurant amb CV-AFS i emprant l'addició estàndard com a mètode de calibratge es van obtenir recuperacions del 80% pel BCR

463 i del 65% pel DOLT-4, mentre que la mesura amb ICP-MS va proporcionar recuperacions del 50% pels dos materials (columnes MW H₂SO₄ CV-AFS i MW H₂SO₄ ICP-MS a la Figura 5.5).

A la vista dels resultats poc satisfactoris, es va assajar un procés d'oxidació per aigua règia amb la modificació descrita anteriorment (ARm) i es va mesurar per CV-AFS mitjançant recta de calibratge externa. Els valors de recuperació obtinguts van ser del 80% pel BCR 463 i del 65% pel DOLT-4 (columna MW ARm CV-AFS a la Figura 5.5).

L'obtenció de factors de recuperació del 96% pels dos materials quan es duu a terme la determinació de mercuri total per ICP-MS a l'extracte d'especiació original (sense el procés d'oxidació posterior), indica que l'extracció de les espècies ha estat quantitativa (columna MW HCl ICP-MS a la Figura 5.5). Quan la determinació de mercuri total es fa per CV-AFS, el mètode d'oxidació més efectiu i pràctic ha estat la digestió amb ARm, tot i que es podrien assajar altres possibles mètodes d'oxidació per tal de millorar les recuperacions.

A la mostra de teixit de músculo, com que es disposava d'una quantitat elevada, es van assajar els dos mètodes d'extracció àcida amb microones emprats anteriorment a les mostres de sediment (amb HCl i HNO₃ 4M). Les determinacions per l'especiació es van realitzar mitjançant HPLC-UV-CV-AFS. La concentració de mercuri als extractes obtinguda com a suma d'espècies va ser la mateixa per ambdós extractants. Mentre que els cromatogrames obtinguts amb HCl van mostrar tres espècies de mercuri (Hg²⁺, MeHg⁺ i EtHg⁺), els obtinguts amb HNO₃ mostraven només la presència de dues espècies (MeHg⁺ i Hg²⁺). Cal destacar però que el nivell de concentració de

mercuri als extractes d'especiació es trobava just al LOQ del mètode ($\sim 4,5 \mu\text{g L}^{-1}$). No obstant, aquest fet posa de manifest que l'ús d'un extractant oxidant fort com el HNO_3 podria provocar la degradació de l' EtHg^+ a Hg^{2+} durant el procés d'extracció. A la Figura 5.6 es mostren els cromatogrames obtinguts per a les dues extraccions realitzades a una mostra de músculo.

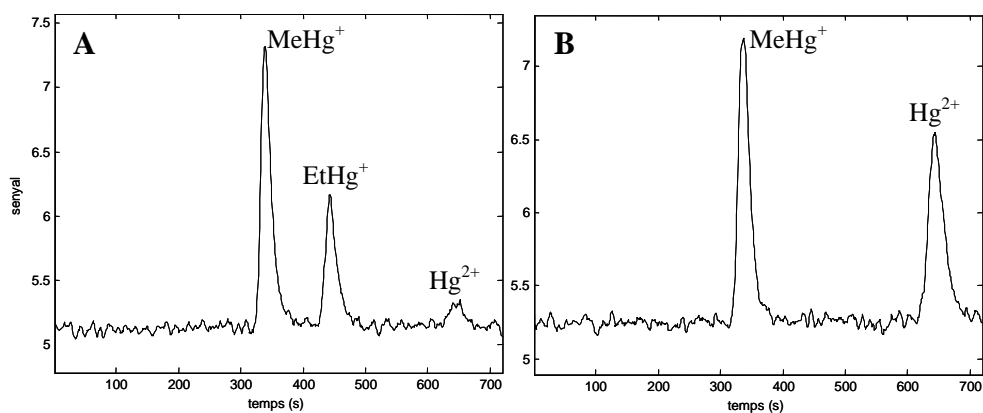


Figura 5.6: Cromatogrames obtinguts per a una mostra de músculo amb extracció per MW amb HCl (A) i HNO_3 (B).

La comparació dels resultats obtinguts amb ambdós extractants es va realitzar també amb el material de referència DOLT-4 (teixit biològic de peix), obtenint-se unes recuperacions del 92% i del 86% per a l'espècie certificada de MeHg^+ , fent servir HCl i HNO_3 com a extractants, respectivament. Al quantificar l'espècie de Hg^{2+} , es va observar que amb l'extracció amb HCl aquesta corresponia a un 23% del Hg total, mentre que fent servir HNO_3 representava un 47%. Aquest augment d'un 24% en l'espècie Hg^{2+} es pot atribuir a l'efecte oxidant del HNO_3 : tenint en compte que al material de referència el MeHg^+ representa un 51% del Hg total, es posa de manifest que el HNO_3 provoca la conversió a Hg^{2+} d'un 5% del MeHg^+ i d'una part del mercuri present al material del que no s'ha identificat la seva forma

química (~20%). A la Figura 5.7 es mostren els cromatogrames obtinguts per a les dues extraccions realitzades al material DOLT-4.

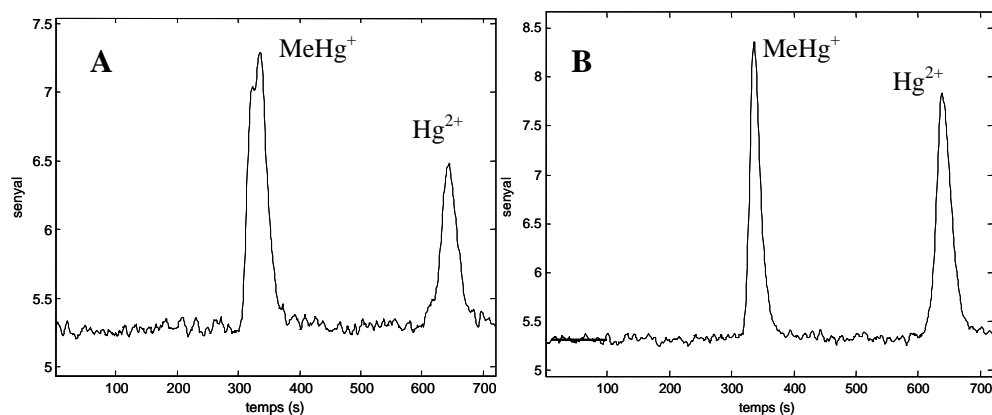


Figura 5.7: Cromatogrames obtinguts per al material DOLT-4 amb extracció per MW amb HCl (A) i HNO₃ (B).

De tot aquest estudi, es pot concloure que per a la determinació de Hg total l'extracció per aigua règia (ARm) proporciona bones recuperacions per a totes les matrius assajades, tant emprant CV-AFS o ICP-MS com a tècnica de mesura. En el cas de l'especiació, l'extracció per microones amb HCl proporciona una bona extracció de totes les espècies, però en el cas dels teixits biològics la mesura del mercuri total de l'extracte és recomanable realitzar-la per ICP-MS, tot i que la posterior oxidació de l'extracte amb ARm i la seva determinació per CV-AFS proporciona també unes recuperacions acceptables.

5.4 Sòls

En el marc d'aquesta Tesi i dins d'un projecte europeu del *Institute for Reference Materials and Measurements* (IRMM) es va participar en la caracterització del material de referència ERM-CC141 *Loam Soil* analitzant el contingut de Hg extraïble per aigua règia seguint la norma ISO 11466⁵³.

5.4.1 Descripció de les mostres

Es van rebre dues unitats de ERM-CC141 (ampolles de vidre topazi amb aproximadament 24 g de sòl en pols) i una mostra de control de qualitat (QC) (ampolla de vidre topazi amb aproximadament 50 g de sòl en pols). El contingut de Hg al material ERM-CC141 es troba a l'interval de concentracions de 0,05 – 0,1 mg kg⁻¹.

5.4.2 Procediment experimental

A continuació es descriuen les instruccions que es van rebre per a realitzar el procediment de mesura:

- 1) Les mostres es poden emmagatzemar a 18 °C.
- 2) Abans d'obrir una mostra, el material ha de ser manualment homogeneïtzat agitant l'ampolla a l'inrevés durant 2 minuts.
- 3) S'han de realitzar 6 mesures independents (3 replicats de cada mesura) per a les mostres de ERM-CC141 i una mesura independent per la mostra de QC.
- 4) La preparació de la mostra per a la determinació de Hg lixiviat amb aigua règia s'ha de realitzar seguint la norma ISO 11466.

5) Els resultats han de ser corregits per la humitat. La determinació de la humitat s'ha de realitzar el mateix dia que el de la preparació de la mostra (preferiblement abans de la preparació de la mostra). S'agafa una porció apart de com a mínim 1 g de cada ampolla (3 replicats per cada ampolla de ERM-CC141 i 1 replicat pel QC) i s'asseca en una estufa a 105 ± 2 °C fins a pes constant.

6) Les determinacions (incloent la preparació de mostra) han de ser realitzades en dos dies d'acord amb el següent esquema:

Ordre d'anàlisi	Dia 1	Dia 2
1	ERM-CC141 ampolla 1, 1 ^{er} replicat	ERM-CC141 ampolla 2, 2 ^{on} replicat
2	Mostra QC	ERM-CC141 ampolla 1, 3 ^{er} replicat
3	ERM-CC141 ampolla 1, 2 ^{on} replicat	ERM-CC141 ampolla 2, 3 ^{er} replicat
4	ERM-CC141 ampolla 2, 1 ^{er} replicat	
Totes les digestions d'un dia poden ser realitzades en una tanda		

Les mostres QC, els blancs i els patrons poden ser inserits en aquesta seqüència en funció dels procediments requerits pel laboratori. Els límits de quantificació dels mètodes emprats han de ser suficientment baixos per tal de permetre un anàlisi fiable al rang de concentració especificat per a les mostres.

5.4.3 Discussió de resultats

Els resultats que es van obtenir en la determinació de mercuri extraïble a les mostres de sòls estudiades es mostren a la Taula 5.3. Es pot observar que la concentració trobada de Hg al material ERM-

CC141 es troba dins de l'interval establert a les directrius proporcionades per l'IRMM ($0,05 - 0,1 \text{ mg kg}^{-1} \text{ Hg}$).

Taula 5.3: Concentració de Hg extraïble per aigua règia

Mostra	Hg (mg kg^{-1})
ERM-CC141 (ampolla 1)	$0,074 \pm 0,002$
ERM-CC141 (ampolla 2)	$0,074 \pm 0,003$
QC	$0,20 \pm 0,01$

Posteriorment es va disposar de l'informe de certificació del material ERM-CC141 ¹⁰² i es van avaluar els resultats obtinguts amb les dades reportades. El valor certificat de Hg extraïble pel mètode d'aigua règia va ser de $0,080 \pm 0,008 \text{ mg kg}^{-1}$. Tot i que el valor que es va obtenir ($0,074 \pm 0,002 \text{ mg kg}^{-1}$) es troba dins de l'interval certificat, el resultat no va ser acceptat ja que el resultat obtingut per a la mostra QC no es corresponia amb el valor certificat. A la Figura 5.8 es mostren els resultats obtinguts pels laboratoris participants acceptats. D'altra banda, a la Figura 5.9 es mostren els resultats obtinguts pel contingut de Hg extraïble per aigua règia per a cada replicat analitzat i per cada laboratori participant. En el nostre cas, el codi de laboratori assignat va ser el L23.

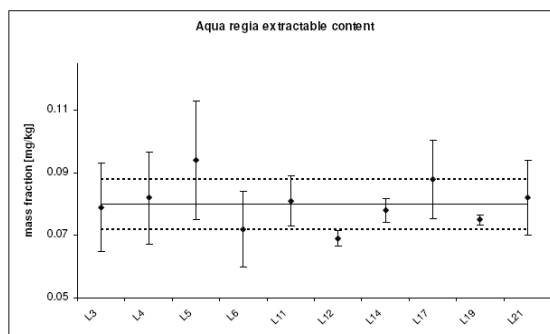


Figura 5.8: Resultats obtinguts pels laboratoris participants acceptats. Les línies horitzontals representen el valor certificat i la incertesa expandida.

Lab code	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4	Sample 5	Sample 6	Mean	U_{char}
L0	0.150	0.110	0.100	0.100	0.100	0.100	0.110	0.020
L1	0.080	0.410	0.230	0.470	0.130	0.060	0.230	0.174
L2	0.510	0.310	0.035	0.480	0.190	0.050	0.263	0.206
L3	0.082	0.074	0.077	0.080	0.084	0.075	0.079	0.004
L4	0.090	0.072	0.076	0.088	0.089	0.076	0.082	0.008
L5	0.091	0.095	0.097	0.094	0.093	0.095	0.094	0.002
L6	0.069	0.068	0.078	0.073	0.072	0.069	0.072	0.004
L11	0.087	0.083	0.080	0.081	0.078	0.075	0.081	0.004
L12	0.069	0.073	0.069	0.071	0.066	0.065	0.069	0.003
L13	0.080	0.081	0.079	0.077	0.081	0.075	0.079	0.002
L14	0.083	0.074	0.081	0.076	0.077	0.075	0.078	0.003
L15	0.084	0.072	0.066	0.072	0.073	0.070	0.073	0.002
L16	0.081	0.070	0.065	0.072	0.073		0.072	0.003
L17	0.087	0.088	0.089	0.092	0.086	0.085	0.088	0.003
L19	0.075	0.075	0.075	0.073	0.075	0.076	0.075	0.001
L21	0.085	0.081	0.083	0.083	0.082	0.077	0.082	0.003
L22	0.095	0.095	0.089	0.118	0.095	0.089	0.097	0.004
L23	0.075	0.072	0.073	0.075	0.076	0.070	0.074	0.001

Figura 5.9: Contingut de Hg extraïble per aigua règia d'acord amb la ISO 11466 (mg kg^{-1}).

Conclusions

D'acord amb els objectius proposats i els resultats obtinguts a la present Tesi, es poden extreure les següents conclusions:

- La comparació de tres fases mòbils de diferent composició en l'especiació analítica de mercuri emprant HPLC-UV-CV-AFS va revelar que l'addició d'APDC com agent complexant a la fase aquosa, proporcionava els millors resultats sota les condicions experimentals assajades. A la fase orgànica, és preferible l'ús de MeOH en lloc d'ACN per tal de prevenir efectes de *quenching* al senyal de fluorescència.

- La separació de Hg^{2+} i MeHg^+ mitjançant la tècnica acoblada HPLC-UV-CV-AFS s'aconsegueix emprant una columna de fase inversa (C_{18}), utilitzant com a fase mòbil, en condicions isocràtiques, una mescla de MeOH:APDC (80:20) a pH 5,5, i com a reductor una dissolució a l'1,5% de SnCl_2 en HCl al 4%. Mentre que per a la separació de Hg^{2+} , MeHg^+ i EtHg^+ , i en les mateixes condicions de treball, la proporció de la fase mòbil és de 75:25. Els límits de detecció i de quantificació obtinguts en aquestes condicions indiquen l'aplicabilitat dels mètodes proposats per a la determinació d'espècies de mercuri en mostres ambientals contaminades.

- Referent a la preconcentració *on-line* de mostres d'aigua fortificades amb Hg^{2+} i MeHg^+ , el sistema implantat (vàlvula i precolumna C_{18}) permet la preconcentració de les mostres amb factors de 100 – 500, tot i que cal millorar la reproductibilitat del mètode.

- La determinació de mercuri total en mostres sòlides s'aconsegueix mitjançant una digestió amb aigua règia (ISO 11466), que ha de ser modificada quan la mesura es realitza amb CV-AFS. Els efectes de *quenching* que provoquen la presència de HNO₃ al detector queden suprimits quan es fa servir HCl al capçal d'absorció (ARm). Aquest mètode també proporciona bones recuperacions quan la mesura es realitza per ICP-MS.

- Quan s'analitza el contingut de mercuri total o de les seves espècies en mostres de sediments és recomanable qualsevol dels pretractaments de mostra que inclouen un assecat a baixa temperatura, ja que no hi ha diferències significatives entre l'assecat a l'aire, a 40 °C o la liofilització.

- L'aplicació de la metodologia d'especiació a mostres del medi aquàtic ha posat de manifest que pel cas dels sediments, una extracció assistida per microones amb HNO₃ (EPA 3200) o HCl com a extractant proporciona bones recuperacions tant si es realitza la mesura amb CV-AFS com per ICP-MS. En el cas dels teixits biològics d'origen marí, l'extracció es duu a terme amb HCl com a extractant, ja que un àcid més oxidant, com és l'HNO₃, pot provocar l'oxidació de les espècies orgàniques presents a l'extracte generant més Hg²⁺. Per a la determinació del contingut de Hg total a l'extracte, és recomanable que la mesura es realitzi per ICP-MS, tot i que una posterior oxidació de l'extracte amb ARm i la seva mesura per CV-AFS proporciona unes recuperacions acceptables.

Referències bibliogràfiques

¹ Evaluación Mundial sobre el Mercurio. Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA). Diciembre de 2002.

² L. Carrasco Cabrera (2011) La contaminación del medio acuático por mercurio avances y mejoras en la metodología analítica para su especiación. Tesis Doctoral.

³ Mineralogía y geoquímica ambiental: Minerales, metales, gases y la salud humana y ambiental – Hg
(http://www.uclm.es/users/higueras/MGA/Tema08/Minerales_salud_4_3.htm)
Juliol 2012

⁴ Massachusetts Department of Environmental Protection. Executive Office of Environmental Affairs. USA.

⁵ Organización Mundial de la Salud
(<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs361/es/>) Juliol 2012

⁶ International Agency for Research on Cancer (IARC)
(<http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/index.php>) Juliol 2012

⁷ T. Stoichev et al. (2006) Speciation analysis of mercury in aquatic environment. *Applied Spectroscopy Reviews* 41: 591-619.

⁸ N. Pirrone, K.R. Mahaffey (2005) Dynamics of mercury pollution on regional and global scales: Atmospheric processes and human exposures around the world. Part-II, chapter 8, 153–190.

⁹ Krivan, V. and Haas, H.F. (1988) Prevention of loss of mercury(II) during storage of dilute solutions in various containers. *Fresen J Anal Chem* 332: 1–6.

¹⁰ Parker, J.L. and Bloom, N.S. (2005) Preservation and storage techniques for low level aqueous mercury speciation. *Sci Total Environ* 337: 253–263.

¹¹ Yu, L.P. and Yan, X.P. (2003) Factors affecting the stability of inorganic and methylmercury during sample storage. *Trends Anal Chem* 22: 245–253.

¹² Lansens, P., Meuleman, C., and Baeyens, W. (1990) Long-term stability of methylmercury standard solutions in distilled, deionized water. *Anal Chim Acta* 229: 281–285.

-
- ¹³ Jackson, T.A. (1988) The mercury problem in recently formed reservoirs of northern Manitoba (Canada): effect of impoundment and other factors on the production of methylmercury by microorganisms in sediments. *Can J Fish Aquat Sci* 45: 97–121.
- ¹⁴ Westöö G. (1966) Determination of methylmercury compounds in foodstuffs. *Acta Chemica Scandinavica* 20 (8), 2131 – 2137.
- ¹⁵ Landaluze, J.S., de Diego, A., Raposo, J.C., and Madariaga, J.M. (2004) Methylmercury determination in sediments and fish tissues from the Nerbioi-Ibaizabal estuary (Basque Country, Spain). *Anal Chim Acta* 508: 107–117.
- ¹⁶ Hintelmann, H. (1999) Comparison of different extraction techniques used for methylmercury analysis with respect to accidental formation of methylmercury during sample preparation. *Chemosphere* 39: 1093–1105.
- ¹⁷ Morrison, M.A. and Weber, J.H. (1997) Determination of monomethylmercury cation in sediments by vacuum distillation followed by hydride derivatization and atomic fluorescence spectrometric detection. *Appl Organomet Chem* 11: 761–769.
- ¹⁸ Uria, Sanz-Medel (1998) Inorganic and methylmercury speciation in environmental samples. *Talanta* 47 (3), 509 – 524.
- ¹⁹ Carro A.M., Lorenzo R.A., Cela R. (1996) Validation and quality control of methylmercury determinations by means of capillary electrophoresis. *Mikrochim Acta* 123: 73–86.
- ²⁰ Cela R., Lorenzo R.A., Mejuto M.C, Bollain M.H., Casals C., Botana A., Rudi E., Medina I. (1992) Studies on organomercury compounds speciation. *Mikrochim Acta* 109: 111–116.
- ²¹ Rudi E., Lorenzo R.A., Casals C., Carro A.M., Cela R. (1992) Studies on organomercury compounds speciation. *J Chrom A* 605: 69–80.
- ²² C. Dietz, Y. Madrid, C. Cámara, P. Quevauviller (2000) The capillary cold trap as a suitable instrument for mercury speciation by volatilization, cryogenic trapping, and gas chromatography with atomic absorption spectrometry. *Anal Chem* 72: 4178-4184.
- ²³ Liang, L., Horvat, M., and Bloom, N.S. (1994) An improved speciation method for mercury by GC/CVAFS after aqueous phase ethylation and room temperature precollection. *Talanta* 41: 371–379.

²⁴ Fischer, R., Rapsomanikis, S., and Andreae, M.O. (1993) Determination of methylmercury in fish samples using GC/AA and sodium tetraethylborate derivatization. *Anal Chem* 65: 763–766.

²⁵ Bowles, K.C. and Apte, S.C. (2000) Determination of methylmercury in sediments by steam distillation/aqueous-phase ethylation and atomic fluorescence spectrometry. *Anal Chim Acta* 419: 145–151.

²⁶ Cai Y., Monsalud S., Jaffé R., Jones R.D. (2000) Gas chromatographic determination of organomercury following aqueous derivatization with sodium tetraethylborate and sodium tetraphenylborate. Comparative study of gas chromatography coupled with atomic fluorescence spectrometry, atomic emission spectrometry and mass spectrometry. *J Chromatog A* 876: 147–155.

²⁷ Gebersmann, C., Heisterkamp, M., Adams, F.C., and Broekaert, J.A.C. (1997) Two methods for the speciation analysis of mercury in fish involving microwave-assisted digestion and gas chromatography-atomic emission spectrometry. *Anal Chim Acta* 350: 273–285.

²⁸ Liang, L., Horvat, M., Cernichiari E., Gelein B., Balogh S. (1996) Simple solvent extraction technique for elimination of matrix interferences in the determination of methylmercury in environmental and biological samples by ethylation GC-CV-AFS. *Talanta* 43: 1883–1888.

²⁹ Morrison, M.A. and Weber, J.H. (1997) Determination of monomethylmercury cation in sediments by vacuum distillation followed by hydride derivatization and atomic fluorescence spectrometric detection. *Appl Organomet Chem* 11: 761–769.

³⁰ Bowles, K.C. and Apte, S.C. (2000) Determination of methylmercury in sediments by steam distillation/aqueous-phase ethylation and atomic fluorescence spectrometry. *Anal Chim Acta* 419: 145–151.

³¹ Horvat, M., Bloom, N., and Liang, L. (1993) Comparison of distillation with other current isolation methods for the determination of methylmercury compounds in low-level environmental samples, Part I Sediments. *Anal Chim Acta* 281: 135–152.

³² Landaluze, J.S., de Diego, A., Raposo, J.C., and Madariaga, J.M. (2004) Methylmercury determination in sediments and fish tissues from the Nerbioi-Ibaizabal estuary (Basque Country, Spain). *Anal Chim Acta* 508: 107–117.

³³ Wilken, R.D. and Falter, R. (1998) Determination of methylmercury by the species-specific isotope addition method using a newly developed HPLC-ICP-MS coupling technique with ultrasonic nebulization. *Appl Organomet Chem* 12: 551–557.

³⁴ Rodriguez Martin-Doimeadios, R.C., Tessier, E., Amouroux, D., Guyoneaud, R., Duran, R., Caumette, P., and Donard, O.F.X. (2004) Mercury methylation/demethylation and volatilisation pathways in estuarine sediment slurries using species-specific enriched stable isotopes. *Mar Chem* 90: 107–123.

³⁵ Lambertsson, L., Lundberg, E., Nilsson, M., and Frech, W. (2001) Application of enriched stable isotope tracers in combination with isotope dilution GC-ICP-MS to study mercury species transformation in sea sediments during in situ ethylation and determination. *J Anal Atom Spectrom* 16: 1296–1301.

³⁶ Rio-Segade S., Bendicho C. (1999) On line HPLC separation and CV-AFS determination of methylmercury and inorganic mercury. *Talanta* 48: 477–484.

³⁷ Hintelmann, H. and Wilken, R.D. (1993) The analysis of organic mercury compounds using liquid chromatography with on line atomic fluorescence spectrometry detection. *Appl Organomet Chem* 7: 173–180.

³⁸ X. Yin, W. Frech, E. Hoffmann, C. Lüdke, J. Skole (1998) Mercury speciation by coupling cold vapour atomic absorption spectrometry with flow injection on-line preconcentration and LC separation. *Fresenius J Anal Chem* 361: 761-766.

³⁹ Falter, R. and Schöler, H.F. (1994) Interfacing HPLC and CV-AAS with on-line UV irradiation for the determination of organic-mercury compounds. *J Chromatogr A* 675: 253–256.

⁴⁰ Falter R., Ilgen E. (1997) Coupling of the RP C18 preconcentration HPLC-UV-PCO-AFS for the determination of methylmercury in sediment and biological tissue. *Fresen J Anal Chem* 358: 407–410.

⁴¹ Falter R., Ilgen E. (1997) Determination of trace amounts of methylmercury in sediment and biological tissue by using water vapour distillation in combination with RP C18 preconcentration and HPLC-HPF/HHPN-ICP-MS. *Fresen J Anal Chem* 358: 401–406.

-
- ⁴² Hempel M., Hintelmann H., Wilken R.D. (1992) Determination of organic mercury species in soils by high performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *Analyst* 117: 669–672.
- ⁴³ D.M. Sánchez, R. Martín, R. Morante, J. Marín, M.L. Munuera (2000) Preconcentration speciation method for mercury compounds in water samples using SPE followed by RP-HPLC. *Talanta* 52: 671:679.
- ⁴⁴ Qvarnström J., Tu Q., Frech W. and Lüdke K. (2000) Flow injection liquid chromatography–cold vapour atomic absorption spectrometry for rapid determination of methyl and inorganic mercury. *Analyst* 125: 1193–1197.
- ⁴⁵ C. Sarzanini, G. Sacchero, M. Aceto, O. Abollino, E. Mentaste (1992) Simultaneous determination of methyl-, ethyl-, phenyl- and inorganic mercury by CV-AAS with on-line chromatographic separation. *J of Chromatog* 626: 151-157.
- ⁴⁶ Hintelmann, H. and Wilken, R.D. (1993) The analysis of organic mercury compounds using liquid chromatography with on line atomic fluorescence spectrometry detection. *Appl Organomet Chem* 7: 173–180.
- ⁴⁷ Shade, C.W. and 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. *Environ Sci Technol* 39: 4974–4982.
- ⁴⁸ Rodriguez Pereiro, I., Wasik, A., and Lobinski, R. (1998) Characterization of multicapillary gas chromatography–microwave-induced plasma atomic emission spectrometry for the expeditious analysis for organometallic compounds. *J Chromatogr A* 795: 359–370.
- ⁴⁹ Jitaru, P. and Adams, F.C. (2004) Speciation analysis of mercury by solid-phase microextraction and multicapillary gas chromatography hyphenated to inductively coupled plasma time-of-flight mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1055: 197–207.
- ⁵⁰ E.P.C. Lai, W. Zhang, X. Trier, A. Georgi, S. Kowalski, S. Kennedy, T. MdMuslim, E. Dabek-Zlotorzynska (1998) Speciation of mercury at ng/ml concentration by capillary electrophoresis with amperometric detection. *Anal Chim Acta* 364: 63.
- ⁵¹ M. Leermakers, P. Lansens, W. Baeyens, (1990) Storage and stability of inorganic and methylmercury solutions. *Fresenius J Anal Chem* 336, 655–662.

⁵² J.L. Parker, N.S. Bloom, (2005) Preservation and storage techniques for low-level aqueous mercury speciation. *Sci Total Environ* 337, 253–263.

⁵³ International Organisation for Standardisation ISO 11466 (1995) Soil Quality - Extraction of trace metals soluble in aqua regia.

⁵⁴ C. Ibáñez-Palomino, J.F. López-Sánchez, A. Sahuquillo (2012) Certified reference materials for analytical mercury speciation in biological and environmental matrices: Do they meet user needs?; a review. *Analytica Chimica Acta* 720, 9– 15.

⁵⁵ M. Dolores Granados Ruiz (2002) Metodologia per a la determinació de mercuri en mostres ambientals. Desenvolupament de l'acoblament LC-UV-CV-AFS per a l'especiació de mercuri. Màster Experimental en Química.

⁵⁶ C. Harrington, T. Catterick (1997) Problems encountered during the development of a method for the speciation of mercury and methylmercury by high-performance liquid chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry. *J Anal Atom Spectrom* 12: 1053-1056.

⁵⁷ C.F. Harrington, (2000) The speciation of mercury and organomercury compounds by using high-performance liquid chromatography. *Trends Anal Chem* 19, 167.

⁵⁸ Yen-Sun Ho, Peter C. Uden (1994) Determination of inorganic and organic mercury compounds by ion-pair high-performance liquid chromatography. *J Chromatog A* 688: 107-116.

⁵⁹ R. Martínez Blanco, M. Tagle Villanueva, J.E. Sánchez Uría, A. Sanz-Medel (2000) Field sampling, preconcentration and determination of mercury species in river waters. *Anal Chim Acta* 419: 137-144.

⁶⁰ R. Rai, W. Maher, F. Kirkowa (2002) Measurement of inorganic and methylmercury in fish tissues by enzymatic hydrolysis and HPLC-ICP-MS. *J Anal At Spectrom* 12: 1560- 1563.

⁶¹ A. Castillo, A.F. Roig-Navarro, O.J. Pozo (2006) Method optimization for determination of four mercury species by micro-liquid chromatography-ICP-MS coupling in environmental water samples. *Anal Chim Acta* 577: 18-25.

⁶² B.O. Leung, F. Jalilehvand (2006) Complex formation of mercury(II) with cysteine in aqueous solution. *Photon Factory Activity Report* 23, Part B.

⁶³ X. Yin, W. Frech, E. Hoffmann, C. Lüdke, J. Skole (1998) Mercury speciation by coupling CV-AAS with flow injection on-line preconcentration and LC separation. *Fresenius J Anal Chem* 361: 761-766.

⁶⁴ Dong, L.M., Yan, X.P., Li, Y., Jiang, Y., Wang, S.-W., and Jiang, D.Q. (2004) On-line coupling of flow injection displacement sorption preconcentration to high performance liquid chromatography for speciation analysis of mercury in seafood. *J Chromatogr A* 1036: 119-125.

⁶⁵ Li, Y., Yan, X.-P., Dong, L.-M., Wang, S.-W., Jiang, Y., and Jiang, D.Q. (2005) Development of an ambient temperature post-column oxidation system for high-performance liquid chromatography on-line coupled with cold vapour atomic fluorescence spectrometry for mercury speciation in seafood. *J Anal Atom Spectrom* 20: 467-472.

⁶⁶ Li-Ping Yu (2005) Cloud point extraction preconcentration prior to HPLC coupled with CV-AFS for speciation analysis of mercury in fish samples. *J Agric Food Chem* 53: 9656-9662.

⁶⁷ J. Zhuang, C.N. Rusu, J.T. Yates Jr. (1999) Adsorption and photooxidation of CH₃CN on TiO₂. *J Phys Chem B* 103: 6957-6967.

⁶⁸ N.N. Lichtin, M. Avudaithai (1996) TiO₂-photocatalyzed oxidative degradation of CH₃CN, CH₃OH, C₂HCl₃ and CH₂Cl₂ supplied as vapors and in aqueous solution under similar conditions. *Environ Sci Technol* 30: 2014-2020.

⁶⁹ Li, Y., Yan, X.-P., Dong, L.-M., Wang, S.-W., Jiang, Y., and Jiang, D.Q. (2005) Development of an ambient temperature post-column oxidation system for high-performance liquid chromatography on-line coupled with cold vapour atomic fluorescence spectrometry for mercury speciation in seafood. *J Anal Atom Spectrom* 20: 467-472.

⁷⁰ J.L. Gómez-Ariza, F. Lorenzo, T. García-Barrera (2004) Simultaneous determination of mercury and arsenic species in natural freshwater by LC with on-line UV irradiation, generation of hydrides and cold vapor and tandem atomic fluorescence detection. *J Chromatogr A* 1056: 139-144.

⁷¹ H. Morita, H. Tanaka, S. Shimomura (1995) Atomic fluorescence spectrometry of mercury: principles and developments. *Spectrochimica Acta* 50B: 69-84.

⁷² A. D'Ulivo and S. Rapsomanikis (1997) Improvements in the Atomic Fluorescence Detection of Mercury. *Analytical Lett* 30, 2109.

⁷³ Y.W. Chen, J. Tong, A. D'Ulivo, and N. Belzile (2002) Determination of mercury by continuous flow cold vapour atomic fluorescence spectrometry using micromolar concentration of sodium tetrahydroborate as reductant solution. *Analyst* 127, 1541.

⁷⁴ L.N. Liang, G.B. Jiang, J.F. Liu, J.T. Hu (2003) Speciation analysis of mercury in seafood by using high-performance liquid chromatography on-line coupled with cold-vapor atomic fluorescence spectrometry via a post column microwave digestion. *Anal Chim Acta* 477, 131.

⁷⁵ J. Margetínová, P. Houserová-Pelcová, V. Kubáň (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. *Anal Chim Acta* 615, 115.

⁷⁶ J.E. Gray, P.M. Theodorakos, E.A. Bailey, and R.R. Turner (2000) Distribution, speciation, and transport of mercury in stream-sediment, stream-water, and fish collected near abandoned mercury mines in southwestern Alaska, USA. *Sci Total Environ* 260, 21.

⁷⁷ J.E. Gray, M.E. Hines, P.L. Higuera, I. Adatto, and B.K. Lasorsa (2004) Mercury Speciation and Microbial Transformations in Mine Wastes, Stream Sediments, and Surface Waters at the Almadén Mining District, Spain. *Environ Sci Technol* 38, 4285.

⁷⁸ J.J. Rytuba (2000) Mercury mine drainage and processes that control its environmental impact. *Sci Total Environ* 260, 57.

⁷⁹ J.J. Berzas Nevado, L.F. García Bermejo, and R.C. Rodríguez Martín-Doimeadios (2003) Distribution of mercury in the aquatic environment at Almadén, Spain. *Environ Pollut* 122, 261.

⁸⁰ P. Higuera, R. Oyarzun, J. Lillo, J.C. Sánchez-Hernández, J.A. Molina, J.M. Esbrí, and S. Lorenzo (2006) The Almadén district (Spain): Anatomy of one of the world's largest Hg-contaminated sites. *Sci Total Environ* 356, 112.

⁸¹ Ramalhosa E, Rio-Segade S, Pereira E, Vale C, Duarte A (2001) Microwave-assisted extraction for methylmercury determination in sediments by high performance liquid chromatography-cold vapour atomic fluorescence spectrometry. *J Anal Atom Spectrom* 16: 643–647.

⁸² Shi J, Liang L, Jiang G, Jin X (2005) The speciation and bioavailability of mercury in sediments of Haihe River, China. *Environ Int* 31: 357–365.

⁸³ Issarova N, Abi-Ghanema C, Bermonda A (2009) Fractionation studies of mercury in soils and sediments: A review of the chemical reagents used for mercury extraction. *Anal Chim Acta* 631: 1–12.

⁸⁴ Hintelmann H, Falter R, Ilgen G, Evans R.D (1997) Determination of artifactual formation of monomethylmercury (CH_3Hg^+) 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.

⁸⁵ Agah H (2009) Mercury speciation in the Persian Gulf sediments. *Environ Monit Assess* 157: 363-373.

⁸⁶ J.C. Raposo (2008) Mercury biomethylation assessment in the estuary of Bilbao (North of Spain). *Environ Pollution* 156, 482-488.

⁸⁷ R.C. Rodríguez (2003) Using Speciated Isotope Dilution with GC-Inductively Coupled Plasma MS To Determine and Unravel the Artificial Formation of Monomethylmercury in Certified Reference Sediments. *Anal Chem* 75, 3202-3211.

⁸⁸ Berzas Nevado JJ (2008) Determination of monomethylmercury in low- and high-polluted sediments by microwave extraction and gas chromatography with atomic fluorescence detection. *Anal Chem Acta* 608, 30-37.

⁸⁹ Baralkiewicz D (2007) Inorganic and methyl-mercury speciation in sediments of the Swarzedzkie Lake. *Chem and Ecology* 23, 93-103.

⁹⁰ EPA Method 3200 - Mercury Species Fractionation and Quantification by Microwave Assisted Extraction, Selective Solvent Extraction and/or Solid phase Extraction.

⁹¹ International Organisation for Standardisation ISO 5725-1 (1994) Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results. Part 1: General principles and definitions, 1st edn. Geneve.

⁹² Guevara. (2006) Comparison of three strategies to evaluate uncertainty from in-house validation data. A case study: mercury determination in sediments. *Anal Bioanal Chem* 385: 1298–1303.

⁹³ Directive 2000/60/EC of the European Parliament and the Council of 23 October 2000 establishing a framework for Community action in the field of water policy.

⁹⁴ Directive 98/83/EC of the Council of 3 November 1998 on the quality of water intended for human consumption.

⁹⁵ Kuballa (2009) Determination of methylmercury in fish and seafood using optimized digestion and derivatization followed by gas chromatography with atomic emission detection. *Eur Food Res Tech* 228, 425-431.

⁹⁶ Reyes (2008) Comparison of methods with respect to efficiencies, recoveries, and quantitation of mercury species interconversions in food demonstrated using tuna fish. *Anal Bioanal Chem* 390, 2123-2132.

⁹⁷ Díaz (2008) Speciation analysis of organomercurial compounds in Fish Tissue by capillary gas chromatography coupled to microwave-induced plasma atomic emission detection. *Avan Quím* 3 (2), 59-67.

⁹⁸ Vallant (2007) Development of a new HPLC method for the determination of inorganic and methylmercury in biological samples with ICP-MS detection. *J Anal Atom Spectrom* 22, 322-325.

⁹⁹ Yu (2005) Cloud Point Extraction Preconcentration Prior to High-Performance Liquid Chromatography Coupled with Cold Vapor Generation Atomic Fluorescence Spectrometry for Speciation Analysis of Mercury in Fish Samples. *J Agri Food Chem* 53, 9656-9662.

¹⁰⁰ Dong (2004) On-line coupling of flow injection displacement sorption preconcentration to high-performance liquid chromatography for speciation analysis of mercury in seafood. *J Chrom A* 1036, 119.

¹⁰¹ EPA Method 245.7 - Mercury in Water by Cold Vapor Atomic Fluorescence Spectrometry.

¹⁰² The Certification of the Mass Fraction of the Total Content and the Aqua Regia Extractable Content of Hg in Loam Soil ERM®-CC141.

Annex I





Review

Certified reference materials for analytical mercury speciation in biological and environmental matrices: Do they meet user needs?; a review

Carmen Ibáñez-Palomino, José Fermín López-Sánchez, Angels Sahuquillo*

Departament de Química Analítica, Universitat de Barcelona, Avda. Diagonal, 645, 08028 Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 17 November 2011
 Received in revised form
 22 December 2011
 Accepted 5 January 2012
 Available online 17 January 2012

Keywords:

Reference materials
 Certified reference materials
 Mercury speciation
 Methylmercury
 Environmental matrices
 Biological matrices

ABSTRACT

The usefulness of a certified reference material (CRM) for analytical method validation and quality control purposes is attributed mainly to its key properties, namely homogeneity and stability. However, it is also advisable to select suitable CRMs in terms of representativeness. To assess the representativeness of a CRM for analytical mercury speciation, a number of aspects must be considered in regard to the routine samples analyzed: the origin of the matrix, the type of mercury species and the level of concentration.

This review critically analyzes the availability of current CRMs for mercury speciation analysis in environmental and biological fields. The characteristics of the CRMs are compared with the matrices and samples covered in papers published in the last five years on mercury speciation, mainly in water, soils, sediments, sewage sludge, seafood, blood, urine and hair.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

Contents

1. Introduction	10
2. Present trends of analytical mercury speciation	10
3. CRMs available for analytical mercury speciation	12
4. Use of CRMs in the literature reviewed	12
5. CRMs for analytical mercury speciation: do they meet user needs?	13
6. Final remarks	14
Acknowledgments	14
References	14

Abbreviations: AAS, atomic absorption spectroscopy; AFS, atomic fluorescence spectroscopy; CV, cold vapor; CRM, certified reference material; EtHg⁺, ethylmercury; HPLC, high performance liquid chromatography; ICP-MS, inductively coupled plasma mass spectrometry; MeHg⁺, methylmercury; PhHg⁺, phenylmercury; SRM, standard reference material.

* Corresponding author. Tel.: +34 93 403 92 74; fax: +34 93 402 12 33.
 E-mail address: angels.sahuquillo@ub.edu (A. Sahuquillo).

0003-2670/\$ – see front matter © 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.
 doi:10.1016/j.aca.2012.01.015



Carmen Ibáñez-Palomino was born in Spain, in 1983. She received her degree and MSc in Chemistry from the University of Barcelona in 2006 and 2007, respectively. Currently, she develops her PhD in the Analytical Chemistry Department of the University of Barcelona. Her research is based on development of analytical methodology for Hg speciation in environmental matrices.



José Fermín López-Sánchez was born in Spain, in 1962. He received his MSc and PhD in Chemistry from the University of Barcelona in 1986 and 1990, respectively. In 1987 he joined the Analytical Chemistry Department of the University of Barcelona as Assistant Professor. Since 1993 he has been Associated Professor at the Analytical Chemistry Department of the University of Barcelona. His current research interests are: development of analytical procedures for chemical speciation in environmental and biological matrices, focusing in sample treatment/extraction methods and determination by hyphenated techniques; method validation and feasibility studies on reference materials.



Angels Sahuquillo was born in Spain, in 1967. She got her PhD in Chemistry from the University of Barcelona in 1996. In 1991 she joined the Analytical Chemistry Department of the University of Barcelona as Scientific Collaborator and since 1992 she got different temporary positions with teaching responsibilities being Aggregate Professor since 2007. Her current research interests are: development of methodology for chemical speciation in environmental and biological matrices by hyphenated techniques and aspects related with quality assurance such as method validation, preparation of quality control materials and organization of proficiency testing schemes.

1. Introduction

Mercury is one of the most toxic elements for humans and health ecosystems and consequently it is one of the most widely studied environmental pollutants. Analytical speciation of mercury in biological and environmental matrices has gained in relevance, since the scientific community became aware of the role of its chemical form in toxicity, biogeochemistry and bioavailability [1,2]. Although the total mercury content in samples can be used to assess ecological impact and health risk, it is very important to distinguish the very toxic alkyl compounds (mostly methylmercury (MeHg⁺)) from the other, less toxic, inorganic Hg forms. Once formed, MeHg⁺ is bioaccumulated and biomagnified in the aquatic food-chain (with bioaccumulation factors up to 10⁶), with a consequent increase in the exposure levels, thus contributing to a greater risk of toxicity [3,4].

The determination of Hg species in field samples requires suitable methodology including sample collection, sample pretreatment and measurement [5]. The potential instability of species and their preservation during sample processing are the main challenges to species integrity, without which meaningful conclusions cannot be reached [1,6]. Moreover, the establishment of maximum limits in legislation for contaminants is possible only when the results obtained for species are independent of the analytical method used [7].

Reference materials (RMs) are among the most useful analytical tools for evaluating the overall efficiency of the obtained results, method validation, verification of the correct use of a method, estimation of measurement uncertainty, calibration, internal quality control activities and external quality assurance purposes. While method validation calls for a certified reference material (CRM), a working level RM is adequate for quality control purposes. When selecting a CRM for a specific purpose, not only should the key properties of homogeneity and stability of the material be considered, but also the chemical form of the analyte of interest, the level of concentration, the matrix match and potential interferences, the measurement uncertainty and the value assignment procedure [8]. The usefulness of a CRM is highly dependent on its similarity with samples analyzed daily in the laboratory, in terms of major components, sample origin, levels of concentration of analyte and potential interferences, and physical form, among others.

Here we critically review the application and usefulness of current CRMs for analytical mercury speciation studies. For this purpose, we considered the scientific literature from 2006 up to June 2011 that addresses mercury speciation analysis in environmental and biological fields. We compare the characteristics of the CRM used with the matrices and samples covered in these scientific articles which focus mainly on water, soils, sediments, aquatic organisms, biological fluids and hair.

2. Present trends of analytical mercury speciation

Here we reviewed a total of 101 papers dealing with mercury speciation in environmental and biological fields published from January 2006 to June 2011. Ten of these were published in 2006, seven in 2011 and an average of 20 papers per year from 2007 to 2010.

Most of the studies focus on the development of new analytical methods, including sample pretreatment, preconcentration strategies and/or instrumental measuring conditions (62%), or on environmental studies of various matrices (32%). Fig. 1 shows the percentage distribution of studies included in each field. The remaining 6% are devoted to the determination of Hg exposure levels in biological fluids and hair or to the determination of Hg binding proteins to assess the metabolic pathways and transportation of Hg species. Most papers of this type have appeared since 2009.

Of the papers describing the development of analytical methodology, 38% address the optimization of several sample pretreatment methods, focusing in many cases on the implementation of on-line preconcentration systems, while 36% center only on the measuring step and the remaining ones (26%) develop new methodology for sample pretreatment and measurement steps. Most of the papers describing environmental studies include the determination of Hg species in waters, sediments, soils and a range of seafood matrices. Only in two cases is the analysis of other kinds of samples, such as sludge and plankton, described. Regarding research into exposure levels in living beings, biological fluids (blood, serum, plasma and urine) and hair are used as target matrices.

With respect to Hg species, the main concern addressed in the literature sampled is the determination of inorganic mercury

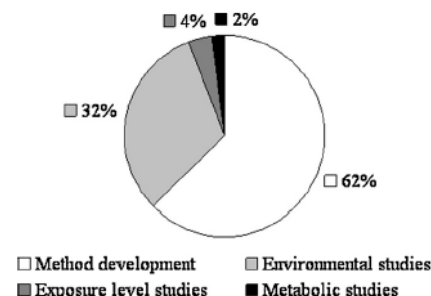


Fig. 1. Distribution of publications on the basis of type of study.

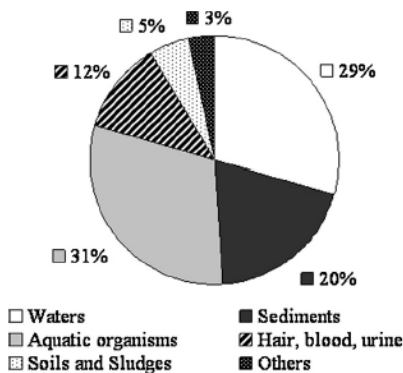


Fig. 2. Type of matrices studied in field samples.

(Hg^{2+}) and/or methylmercury (MeHg^*), which is normally completed with the determination of total Hg content. In some cases, one of the species is calculated by the difference from the total content. Studies on other organic species are much less frequent: 23% of the papers also report on ethylmercury (EtHg^*) [10,12,13,21,36,50,54,57,67,69,75,78,81,86,91,93,104–106,109–111,114] and 10% consider phenylmercury (PhHg^*) [10,12,13,18,50,67,75,81,93,109]. Research into dimethylmercury (DMeHg) [19,53,74,87,88] and diethylmercury (DEtHg) [21] are described in only 5% and 1% of the papers, respectively. Moreover, these organic species are reported only in three cases when field samples were analyzed [57,88,114], the concentration levels falling below the detection and quantification limits in most cases. The presence of these species in the literature sampled is explained mainly by the use of standard solutions and/or spiked samples in recovery studies.

The analytical techniques mentioned in these studies are based mainly on a separation technique coupled to an atomic spectroscopic detector. Liquid or gas chromatography is widely used as separation technique, and capillary electrophoresis is also described in some cases. These techniques are coupled to the most common detection systems used in analytical speciation such as (CV)AFS, (CV)AAS or ICP-MS. When the analysis is not based on coupling systems, several selective extraction methods are described prior to the final determination by the above-mentioned detectors.

Of the 101 papers reviewed, 32.7% do not include the analysis of field samples and describe the use of standard solutions or only matrix CRMs [9–41]. The remaining studies focus on various types of applications for field samples. Fig. 2 shows the percentage distribution of the matrices used in analytical mercury speciation literature. Water, sediments and aquatic organisms account for 80% of the matrices analyzed while hair and biological fluids account for 12%, and soils or sewage sludge samples 5%. The remaining 3% of the applications (named as *others* in Fig. 2) includes uncommon samples for studies of this nature, such as cosmetics, waste batteries, and rice and wheat flour.

Table 1 shows the concentrations of total Hg, Hg^{2+} and MeHg^* for most of the sample matrices described in the literature. The determinations for the *others* category (Fig. 2) have not been included. MeHg^* is commonly the only organic Hg species found in samples and in some cases its concentration is calculated as the difference between total Hg and Hg^{2+} and thus is not a direct

Table 1
Concentrations of Hg species found in field samples.

Matrix/sample	Description	units	Total Hg	Hg^{2+}	MeHg^*	References
Waters	Sea, river and lake water	$\mu\text{g L}^{-1}$	0.40–18 8.60–109.11 8.60–109.11	0.24–6 15–102 97–165	<LOD–5 9–74 <LOD–52	[40,52,53,55,57,72,74,76,77,78,84,85, 86,89,94,95,101,103,104,112,116,117]
Mineral materials	Sediment, soil and sewage sludge	$\mu\text{g kg}^{-1}$	42–2305 0.7–360 600–74,000	15–102 97–165 465–18,000	<LOD–52 120–880	[50,55,56,60,70,77,80,84,85,90,96,101, 102,107,109,112,117]
Aquatic organisms	Seafood and plankton	$\mu\text{g kg}^{-1}$	0.8–700 1000–8280	<LOD–280 540–1730	<LOD–650 1300–8170	[44,50,64,66–68,70,71,81,83,85,86,91, 93–95,97,101,105,109,111]
Biological samples	Blood, serum, plasma and urine	$\mu\text{g L}^{-1}$	<1–115	<LOD–7	0.15–1.09	[54,71,78,91,97,100]
	Hair	mg kg^{-1}	0.13–11	0.11–0.72	0.09–11	[43,57,110,113–115,118]

Table 2
CRMs available for Hg speciation in environmental and biological matrices (last access to databases September 2011).

Matrix	Code	Supplier	Storage	Certified value mg kg ⁻¹ as Hg (dry mass)	
				Total Hg	MeHg ^a
Estuarine sediment	ERM-CC580	IRMM	+4 °C in the dark	132 ± 3	0.0755 ± 0.0037 ^a
Marine sediment	IAEA-433	IAEA	<25 °C in the dark	0.168 ± 0.017	0.00017 ± 0.00007
Fish tissue	IAEA-407	IAEA	<25 °C in the dark	0.222 ± 0.024	0.200 ± 0.021
Lake Superior fish tissue	SRM-1946	NIST	-80 °C	0.433 ± 0.009 ^b	0.394 ± 0.015 ^b
Lake Michigan fish tissue	SRM-1947	NIST	-80 °C	0.254 ± 0.005 ^b	0.233 ± 0.010 ^b
Tuna fish	ERM-CE454	IRMM	+4 °C in the dark	5.24 ± 0.10	5.50 ± 0.17 ^a
Cod fish tissue	CRM 17402-a	NMIJ	15–35 °C in the dark	0.61 ± 0.02	0.58 ± 0.02
Mussel tissue	SRM-1074b	NIST	-80 °C	0.017 ± 0.0011 ^b	0.00705 ± 0.0004 ^b
Mussel tissue	SRM-2974a ^c	NIST	Room T or below	0.195 ± 0.003	0.06906 ± 0.00081
Mussel tissue	SRM-2976	NIST	21–25 °C or below	0.0610 ± 0.0036	0.02809 ± 0.00031
Mussel tissue	SRM-2977	NIST	Room T or below	0.101 ± 0.004	0.0366 ± 0.0010
Oyster tissue	SRM-1566b	NIST	10–30 °C in desiccator	0.0371 ± 0.0013	0.0132 ± 0.0007
Fish protein	DORM-3	NRC-CNRC	Cool and in the dark	0.382 ± 0.060	0.355 ± 0.056
Dogfish liver	DOLT-4	NRC-CNRC	Cool and in the dark	2.58 ± 0.22	1.33 ± 0.12
Lobster hepatopancreas	TORT-2	NRC-CNRC	Cool	0.27 ± 0.06	0.152 ± 0.013
Human hair (spiked)	IAEA-085	IAEA	<20 °C in the dark	23.2 (22.4–24.0)	22.9 (21.9–23.9)
Human hair	IAEA-086	IAEA	<20 °C in the dark	0.573 (0.534–0.612)	0.258 (0.236–0.279)
Human hair	CRM 113	NIES	-20 °C in the dark	4.42 ± 0.20	3.8 ± 0.4
Caprine blood (spiked)	SRM-955c ^d	NIST	-20 °C or below	17.8 ± 1.6 μg L ⁻¹	4.5 ± 1.0 μg L ⁻¹

^a Certified value as MeHg⁺.

^b Wet-mass basis.

^c Additional certified value: Hg²⁺: 0.122 ± 0.003 mg kg⁻¹.

^d Additional certified values: Hg²⁺: 9.0 ± 1.3 μg L⁻¹ and EtHg⁺: 5.06 ± 0.47 μg L⁻¹.

measurement [42–44]. On the basis of the values found in the literature, excluding biological samples, we can define two concentration ranges in order to evaluate the number of samples with a relatively low or high Hg species content. Depending on the matrix, concentrations can range from a few ng L⁻¹ to mg kg⁻¹, and in most cases the concentrations reported are low. Hg is naturally present in waters at very low concentrations while contaminated waters can register up to μg L⁻¹. For mineral materials, the concentrations reported correspond mostly to sediments and soils and only one study provides data on sewage sludge. The highest concentrations of MeHg⁺ are reported in aquatic organisms, as expected, and matrices with concentrations below the detection limits correspond to plankton. For biological samples, the ranges shown in Table 1 correspond to blood, serum, plasma, urine, and hair samples, as described in the literature.

3. CRMs available for analytical mercury speciation

There are currently 19 CRMs available (see Table 2) with certified values for total Hg and MeHg⁺ in biological (seafood, hair and blood) and environmental samples. Only the CRMs SRM-2974a (mussel tissue) and SRM-955c (caprine blood) provide additional certified Hg²⁺ and EtHg⁺ contents. CRMs are provided by various organizations, such as the International Atomic Energy Agency (IAEA), the Institute for Reference Materials and Measurements (IRMM), the National Institute for Environmental Studies (NIES), the National Institute of Standards and Technology (NIST), the National Metrology Institute of Japan (NMIJ) and the National Research Council of Canada (NRC-CNRC).

For 53% of the CRMs, the producers describe a sterilization step by γ -irradiating the material at a range of doses in order to eliminate bacteria as potential source of instability for MeHg⁺. However, in one case the producer specifically avoids sterilization because this process is considered to cause MeHg⁺ decomposition [45]. As reported in the literature, the application of different γ -irradiation doses had not a significant effect on the MeHg⁺ contents found in thirteen studied matrices (biological samples and sediments) [119,120], except for a hake sample. Gamma-irradiation is even recommended for long-term stabilization of a sediment CRM [120]. In our opinion, whereas the effect of sample pretreatment on integrity

of the species has to be taken into account in environmental or exposure studies, the approach for a CRM producer is different. The producer has to assure that the final concentration of Hg species is homogeneous and stable in the produced material, although the concentration levels in the initial bulk material changed during the preparation protocol.

Regarding storage conditions for CRMs, it is generally recommended to protect these materials from direct sunlight and UV-radiation, and keep them at room temperature or below. Some frozen tissue homogenates from NIST should be stored at temperatures of -20 °C or -80 °C, in order to avoid that the tissue homogenate will lose its powder-like form. In these cases, potential users of CRMs must be aware of the required facilities to store samples at -80 °C.

Regarding environmental matrices, only estuarine and marine sediments are available as CRMs. The preparation of these materials is based on a drying step (air or freeze-drying) followed by grinding and sieving.

Most of the biological materials found in the literature are fish and bivalve mollusk tissues that have been freeze-dried, ground and sieved during their preparation. Only in three cases [46–48] is the material delivered as frozen tissue homogenate containing from 70 to 90% of moisture. Other biological materials comprise organs or protein hydrolysate of seafood, which are provided as dried powder after the removal of most of the fat. In all cases, the bulk matrix is derived from aquatic edible animals.

The preparation steps for hair CRM involve a washing procedure followed by milling and sieving. In the case of caprine blood CRM, EDTA is added as an anticoagulant and the blood is frozen, providing four vials of the certified analytes at a range of concentrations. Certified contents for total Hg, Hg²⁺, MeHg⁺ and EtHg⁺ are reported for one of the vials.

The Hg species present in the CRMs are of natural origin, except for IAEA-085 and SRM-955c which are spiked.

4. Use of CRMs in the literature reviewed

Although analytical laboratories are aware of the importance of assessing the quality of their analytical results, some studies measure Hg species in various matrices (e.g. water, landfill leachate,

sediment and/or seafood samples) but do not use CRMs or any other quality control activity (14% of the papers reviewed). Unlike sediments and seafood, for water analysis, for which there is a lack of CRMs for speciation purposes, the spiking of waters samples of distinct origins at natural concentrations of MeHg⁺ and Hg²⁺ is an alternative strategy [49]. Recovery studies using spiked samples of water, blood, urine and fish are described in 13% papers reviewed. In a few cases (4%), and mainly in studies focusing on method development and the establishment of quality parameters, only standard solutions are used.

Recent trends in Hg speciation reveal the widespread use of CRMs for numerous purposes in 70% of the analytical studies reviewed: about half of these (46%) describe analytical method development, around 20% environmental studies and 4% exposure-metabolic studies. As expected, the main use of matrix CRMs is in the establishment of quality parameters for the method validation step (accuracy, precision, recovery studies and limit of quantification). Optimization of extraction methods by means of CRMs [14,27,35,41,50], assessment of species transformation during extraction procedures [33], evaluation of uncertainties [29] and quality control matrices in routine analysis [51] are other uses described in the literature.

Not all matrices have CRMs for Hg species. If a CRM for a given matrix is available (e.g. a water RM with certified values for major compounds and heavy metals), the certified material can be fortified with the species of interest and then used for method validation [15,52,53]. The same approach is described for the determination of Hg species in rice and wheat flours where matrix CRMs for total Hg content are spiked and the extraction efficiency of Hg compounds is evaluated [54]. In the latter, the spiking procedure consisted of adding a standard solution to 2 g of flour CRM, followed by drying and extraction. When no other tools are available, the use of spiked samples is very common in analytical laboratories. In these cases, and with the aim to obtain meaningful results, spiking/fortification procedures must be carefully designed in order to select the most suitable strategy to introduce a single Hg species or mixture into the matrix. The type of compound to be added (e.g. counter anions, purity), the maximum volume or weight to be added to the matrix, the contact time and conditions, and further pretreatment steps (e.g. drying, sieving, milling) are some of the variables that should be addressed in order to prepare a spiked sample with a similar profile to a field sample. Moreover, although the incorporation of a spiking solution into a liquid matrix is relatively straightforward for assuring the homogeneous distribution of the species in the matrix, this process can be much more complicated when working with a solid matrix with a higher potential non-homogeneity.

For matrices for which no CRM is available, the literature describes the use of various matrix CRMs with the respect to the target samples. For instance, in studies involving urine, cells or soil samples, the use of CRMs of lobster hepatopancreas (TORT-2), dogfish muscle (DORM-2) and sediments (ERM-CC580) are reported, respectively [32,55–57]. Furthermore, in a study on Hg speciation in seaweed and cosmetics, a CRM for total Hg in ash was applied [44]. For the determination of Hg in soils [58] TORT-2 and DORM-2 are reported while a sediment (IAEA-405), DORM-2 and a mussel tissue (SRM 2976) have been applied for water analysis. When using CRMs in this way, the concept of commutability of RMs must be taken into account. According to the International Vocabulary of Metrology [59], the commutability of a RM is the closeness of agreement between the relation among the measurements for a given amount in this material, obtained from two given measurement procedures, and the relation obtained among the measurement results for other specific materials. The term commutability is widely used in clinical laboratories to describe the capacity of a reference or control material for a specific measurement to show properties comparable to those of authentic clinical

samples when measured by distinct analytical approaches [60]. In this regard, the question is whether the results obtained in the method validation of Hg species in a given matrix are representative of a distinct matrix. Although commutability in this case cannot be completely assured, only a high degree of equivalency between the matrices studied allows consideration of this possibility. For example, in a study dealing with the evaluation of uncertainty budgets, it is stated that an overestimation may occur when the uncertainty values obtained in samples with a high organic matter content (sewage sludge of domestic origin) are used for mostly inorganic matrices (fly ashes or calcareous soils) [61]. Thus, to gather information on key and bulk components, such as organic matter or fat content, a complete chemical characterization of matrices is the first step to undertake to ensure the selection of an appropriate CRM.

5. CRMs for analytical mercury speciation: do they meet user needs?

Quality assurance of the procedures used for Hg speciation requires the analysis of representative CRMs for the relevant species. To ensure the accuracy of the results, CRMs should be of similar composition and have concentration levels similar to the samples analyzed [8,62].

When comparing sample pretreatments performed on field samples with those described in the production of CRMs for Hg species, we found that in most cases a similar procedure was applied. For sediments and seafood samples the main procedure applied for drying, both in the literature and for CRMs preparation, is lyophilization, followed by a grinding step. However, some seafood CRMs are delivered as frozen tissue homogenates containing from 70 to 90% moisture [46–48].

Current CRMs for mercury speciation are certified for total Hg and MeHg⁺ contents and only in one case is the content of Hg²⁺ in a mussel tissue (SRM-2974a) certified, while Hg²⁺ and EtHg⁺ are certified in one caprine blood (SRM-955c). Total Hg and MeHg⁺ are the main species reported when analyzing field samples, while the presence of other methylated, ethylated or phenylated species is negligible.

One of the handicaps of Hg speciation is encountered when dealing with samples in which the content of organic species is 10-, 100- or 1000-fold higher than inorganic ones or vice versa. In these cases, analytical methods must allow the correct quantification of species even when the responses obtained (e.g. chromatographic peak area) are overlapped. In order to ascertain whether current CRMs are limited by this drawback, Table 3 shows the percentage of MeHg⁺ with respect to total Hg in CRMs and field samples. The percentage ranges are quite close, except for blood samples in which the content of MeHg⁺ is higher in samples than in the one CRM available. In sediment samples the predominant species is inorganic Hg both in CRMs and field samples, even when up to 2% of MeHg⁺ is reported in field samples. In contrast, for biological samples a 100% of MeHg⁺ can be reached.

Regarding the concentrations of Hg species, in the studies in which the matrices of the samples and the CRMs applied are of

Table 3
Percentage of MeHg⁺ content in CRMs and field samples.

Matrix	% MeHg ⁺ vs total Hg	
	CRMs	Field samples
Sediments	0.06–0.1	<0.1–2
Seafood	35–100	35–100
Blood	25	60–95
Hair	45–100	40–100
Water	–	1–10

the same nature, the concentrations are also the same (65% of the cases). In the remaining 35%, the field samples ($\mu\text{g kg}^{-1}$) register lower concentrations than those found in the CRMs (mg kg^{-1}).

6. Final remarks

CRMs are widely used in analytical mercury speciation research works. Nevertheless, the highest degree of matrix similarity with field samples should be ensured in order to obtain valuable information. Thus, when selecting a CRM, not only should the certified values of Hg species be considered but also the main matrix components.

Our analysis of the CRMs current available indicates that there is still a lack of these materials in environmental matrices such as soils and waters of distinct origin. For waters, the instability of both total Hg and MeHg* in stored samples [121] can be a handicap for CRM producers. Even if it is described that MeHg* at ambient level (ng L^{-1}) could be long-term stabilized after acidifying the sample with HCl and keeping in the dark [122], the low concentration levels would surely make difficult the production.

While several CRMs are available for aquatic organisms, there are a reduced number of these materials for biological fluids and none for urine. Regarding Hg species, matrix CRMs with inorganic Hg and EtHg* are scarce. It is for sure that development of future legislation on concentration levels of Hg species will also promote the production of new materials. When no other quality assurance tools are available, spiking/fortification procedures on field samples or blank materials must be carefully designed in order to simulate the behavior of Hg species that occur naturally in the matrix of interest.

Acknowledgments

The authors thank the Dirección General de Investigación (DGI-CyT) del Ministerio de Ciencia e Innovación (Spain) for the funding through the project CTQ2010-15377 and the Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca de la Generalitat de Catalunya for the financial support (2009 SGR 1188). Carmen Ibáñez-Palomino acknowledges a pre-doctoral grant from the Universitat de Barcelona.

References

- [1] C.F. Harrington, *Trends Anal. Chem.* 19 (2000) 167–179.
- [2] K. Leopold, M. Foulkes, P. Worfold, *Anal. Chim. Acta* 663 (2010) 127–138.
- [3] M. Horvat, D. Gibicar, Speciation of mercury: environment, food, clinical and occupational health, in: R. Cornelis, H. Crews, J. Caruso, K. Heumann (Eds.), *Handbook of Elemental Speciation II*, John Wiley & Sons Ltd., 2005, Chapter 2, 12.
- [4] K. Leopold, M. Foulkes, P. Worfold, *Trends Anal. Chem.* 28 (2009) 426–435.
- [5] M. Leermakers, W. Baeyens, Ph. Quevaullier, M. Horvat, *Trends Anal. Chem.* 24 (2005) 383–393.
- [6] L. Hinojosa Reyes, J.L. Guzmán Mar, A. Hernández-Ramírez, J.M. Peralta-Hernández, J.M. Alfaro Barbosa, H.M. Skip Kingston, *Microchim. Acta* 172 (2011) 3–14.
- [7] M.B. de la Calle, H. Entenberg, T.P.J. Linsinger, R. Montoro, J.J. Sloth, R. Rubio, M.J. Baxter, J. Feldmann, P. Vermaercke, G. Raber, *Trends Anal. Chem.* 30 (2011) 641–651.
- [8] Selection and Use of Reference Materials, A Basic Guide for Laboratories and Accreditation Bodies, Eurachem Guide prepared by B. King, EEE-RM Working Group, October, 2002.
- [9] P. Tajés-Martínez, E. Becerro-González, S. Muniategui-Lorenzo, D. Prada-Rodríguez, *Talanta* 68 (2006) 1489–1496.
- [10] J. Soares dos Santos, M. de la Guardia, A. Pastor, *Talanta* 69 (2006) 534–537.
- [11] H. Li, Y. Zhang, C. Zheng, L. Wu, Y. Lv, X. Hou, *Anal. Sci.* 22 (2006) 1361–1365.
- [12] P. Houserová, P. Kubán, V. Kubán, *Electrophoresis* 27 (2006) 4508–4515.
- [13] X.-B. Yin, J. Chromatogr. A 1154 (2007) 437–443.
- [14] M. Wang, W.Y. Feng, J. Shi, F. Zhang, B. Wang, M. Zhu, B. Li, Y. Zhao, Z. Chai, *Talanta* 71 (2007) 2034–2039.
- [15] A.S. Ribeiro, M.A. Vieira, S. Willis, R.E. Sturgeon, *Anal. Bioanal. Chem.* 388 (2007) 849–857.
- [16] D. Point, W. Clay Davis, J.I. Garcia Alonso, M. Monperrus, S.J. Christopher, O.F.X. Donard, P.R. Becker, S.A. Wise, *Anal. Bioanal. Chem.* 389 (2007) 787–798.
- [17] L. Carrasco, S. Díez, J.M. Bayona, *J. Chromatogr. A* 1174 (2007) 2–6.
- [18] M.V. Balarama Krishna, J. Castro, T.M. Brewer, R. Kenneth Marcus, *J. Anal. At. Spectrom.* 22 (2007) 283–291.
- [19] F. Taube, L. Pommer, T. Larsson, A. Shchukarev, A. Nordin, *Water Air Soil Pollut.* 193 (2008) 155–163.
- [20] D. Point, J.I. Garcia Alonso, W.C. Davis, S.J. Christopher, A. Guichard, O.F.X. Donard, P.R. Becker, G.C. Turk, S.A. Wise, *J. Anal. At. Spectrom.* 23 (2008) 385–396.
- [21] R. Ito, M. Kawaguchi, N. Sakui, H. Honda, N. Okanouchi, K. Saito, H. Nakazawa, *J. Chromatogr. A* 1209 (2008) 267–270.
- [22] S.J. Balogh, E.B. Swain, Y.H. Noller, *Environ. Pollut.* 154 (2008) 3–11.
- [23] H. Zhong, W.X. Wang, *Environ. Sci. Technol.* 43 (2009) 8998–9003.
- [24] Y. Yin, Z. Wang, J. Peng, J. Liu, B. He, G. Jiang, *J. Anal. At. Spectrom.* 24 (2009) 1575–1578.
- [25] S. Trümpler, S. Nowak, B. Meermann, G.A. Wiesmüller, W. Buscher, M. Sperling, U. Karst, *Anal. Bioanal. Chem.* 395 (2009) 1929–1935.
- [26] A.M. Serra, J.M. Estela, V. Cerda, *Talanta* 78 (2009) 790–794.
- [27] G.M. Mizanur Rahman, T. Fahrnholtz, H.M. Skip Kingston, *J. Anal. At. Spectrom.* 24 (2009) 83–92.
- [28] D. Placido Torres, V.I.A. Frescura, A.J. Curtius, *Microchem. J.* 93 (2009) 206–210.
- [29] Z. Jokai, P. Fodor, *J. Anal. At. Spectrom.* 24 (2009) 1229–1236.
- [30] A.C. Ion, I. Ion, D.N. Stefan, L. Barbu, *Mater. Sci. Eng. C* 29 (2009) 1–4.
- [31] R.C. Campos, R.A. Gonçalves, G.P. Brandão, M.S. Azevedo, F. Oliveira, J. Wasserma, *Spectrochim. Acta Part B* 64 (2009) 506–512.
- [32] J.J. Berzas Nevado, R.C. Rodríguez Martín-Doimeadís, M. Jiménez Moreno, J.L. Martins do Nascimento, A.M. Herculano, M.E. Crespo-López, *Microchem. J.* 93 (2009) 12–16.
- [33] A. Castillo, P. Rodríguez-González, G. Centíno, A.F. Roig-Navarro, J.I. Garcia Alonso, *Anal. Chem.* 82 (2010) 2773–2783.
- [34] F. Moreno, T. García-Barrera, J.L. Gómez-Ariza, *Analyst* 135 (2010) 2700–2705.
- [35] H. Miesel, E. Stanisz, *Cent. Eur. J. Chem.* 8 (2010) 594–601.
- [36] L.G. Martín, L.T. Jongwana, A.M. Crouch, *Electrochim. Acta* 55 (2010) 4303–4308.
- [37] I. López, S. Cuello, C. Cámara, Y. Madrid, *Talanta* 82 (2010) 594–599.
- [38] M.V. Balarama Krishna, K. Chandrasekaran, D. Karunasagar, *Talanta* 81 (2010) 462–472.
- [39] W.Y. Feng, M. Wang, G. Ming, H. Yuan, J. Shi, B. Wang, M. Zhu, H. Ouyang, Y. Zhao, Z. Chai, *J. Anal. At. Spectrom.* 26 (2011) 156–164.
- [40] Z. Pedrero, S. Mounicou, M. Monperrus, D. Amouroux, *J. Anal. At. Spectrom.* 26 (2011) 187–194.
- [41] M. Park, H. Yoon, C. Yoon, J.Y. Yu, *Environ. Geochem. Health* 33 (2011) 49–56.
- [42] E. Vereda Alonso, M.T. Siles Cordero, A. García de Torres, P. Cañada Rudner, J.M. Cano Pavón, *Talanta* 77 (2008) 53–59.
- [43] Stefan Halbach, G. Welb, *J. Appl. Toxicol.* 30 (2010) 674–679.
- [44] M.L. Chen, H.J. Ma, S.Q. Zhang, J.H. Wang, *J. Anal. At. Spectrom.* 26 (2011) 613–617.
- [45] Certificate of Analysis: Certified Reference Material No.13, National Institute for Environmental Studies, 1996.
- [46] Certificate of Analysis: Standard Reference Material® 1946, National Institute of Standards & Technology, 2003.
- [47] Certificate of Analysis: Standard Reference Material® 1947, National Institute of Standards & Technology, 2007.
- [48] Certificate of Analysis: Standard Reference Material® 1974b, National Institute of Standards & Technology, 2003.
- [49] B. Jackson, V. Taylor, R.A. Baker, E. Miller, *Environ. Sci. Technol.* 43 (2009) 2463–2469.
- [50] J. Margatino, P. Houserova-Pelcova, V. Kuban, *Anal. Chim. Acta* 615 (2008) 115–123.
- [51] M. Rajan, J. Darrow, M. Hua, B. Barnett, M. Mendoza, B.K. Greenfield, J.C. Andrews, *Environ. Sci. Technol.* 42 (2008) 5568–5573.
- [52] W.R.L. Cairns, M. Ranaivo, R. Hennebel, C. Turetta, G. Capodaglio, C.F. Ferrari, A. Dommergue, P. Cescon, C. Barbante, *Anal. Chim. Acta* 622 (2008) 62–69.
- [53] C.H. Conaway, F.J. Black, P. Weiss-Penzias, M. Gault-Ringold, A. Russell Flegel, *Atmos. Environ.* 44 (2010) 1788–1797.
- [54] L.-Y. Lin, L.-F. Chang, S.-J. Jiang, *J. Agric. Food Chem.* 56 (2008) 6868–6872.
- [55] S. Remy, P. Prudent, J.L. Probst, *Appl. Geochem.* 21 (2006) 1855–1867.
- [56] G.J. Zagury, C.M. Neculita, C. Bassten, L. Deschenes, *Environ. Toxicol. Chem.* 25 (2006) 1138–1147.
- [57] Y.-K. Tsoi, S. Tam, K. Sze-Yin Leung, *J. Anal. At. Spectrom.* 25 (2010) 1758–1762.
- [58] Y. Rojas Challa, L. Rojas de Astudillo, A. Ramirez, A. Escalona, G. Martinez, *Air Soil Water Res.* 1 (2008) 21–29.
- [59] International vocabulary of metrology—Basic and general concepts and associated terms (VIM), Joint Committee for Guides in Metrology/JCGM 200-2008.
- [60] H.W. Vesper, W.G. Miller, G.L. Myers, *Clin. Biochem. Rev.* 28 (2007) 139–147.
- [61] A. Sahuquillo, G. Rauret, in: A. Fajgel, M. Belli, U. Sansone (Eds.), *Uncertainty and Traceability: The View of the Analytical Chemist in Combining and Reporting Analytical Results*, The Royal Society of Chemistry, United Kingdom, 2007, pp. 143–153.
- [62] M. Horvat, *Chemosphere* 39 (1999) 1167–1179.
- [63] P. Montuori, E. Jover, S. Díez, N. Ribas-Fitó, J. Sunyer, M. Triassi, J.M. Bayona, *Sci. Total Environ.* 369 (2006) 51–58.
- [64] S.C. Hight, J. Cheng, *Anal. Chim. Acta* 567 (2006) 160–172.
- [65] S. Covelli, R. Bianchi, J. Kotnik, M. Horvat, J. Faganelli, A. Brambati, *Sci. Total Environ.* 368 (2006) 210–223.

Annex II



Inorganic mercury and methylmercury determination in polluted waters by HPLC coupled to cold vapour atomic fluorescence spectroscopy

Carmen Ibáñez-Palomino, J. Fermín López-Sánchez and Àngels Sahuquillo*

*Departament de Química Analítica, Facultat de Química, Universitat de Barcelona
C/Martí i Franquès 1-11, 08028, Barcelona, Spain*

(Received 28 July 2009; final version received 19 March 2010)

A systematic study of Hg^{2+} and CH_3Hg^+ (MeHg^+) speciation using hyphenated techniques, was performed for high-performance liquid chromatography coupled to on-line UV irradiation and cold-vapour atomic fluorescence spectroscopy (HPLC-UV-CV-AFS). First, a comparative study of the behaviour of three mobile phase compositions (using tetrabutylammonium bromide (TBAB), L-cysteine and ammonium pyrrolidinedithiocarbamate (APDC)) is presented. The separation and detection system was optimised by considering factors that modify fluorescence signal and the separation such as, the addition of different percentages of an organic modifier (methanol (MeOH) and acetonitrile (ACN)) to the mobile phase, the type of reducing agent used (SnCl_2 and NaBH_4) and the potential memory effects of the material of which the injection system is made (stainless steel, PEEK). The mobile phase selected for its sensitivity was a mixture 80 : 20 MeOH : 0.0015 mol l⁻¹ APDC and 0.01 mol l⁻¹ $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$ (pH 5.5). The detection and quantification limits were close to 1.5 and 5 $\mu\text{g l}^{-1}$ for both species (as Hg), respectively. Recoveries obtained using fortified water samples of distinct origin (soft mineral, tap, river, seawater, and wastewater), ranged from 90 to 115% for concentrations about 2 and 20 times over quantification limits. Good repeatability was obtained (about 5%) independently of the concentrations, with reproducibility values about 20% at low concentrations and 5–10% at higher concentrations. Our proposed method proved to be straightforward for use by environmental laboratories for routine Hg^{2+} and MeHg^+ determinations in polluted water samples.

Keywords: cold vapour atomic fluorescence spectroscopy; mercury; methylmercury; speciation

1. Introduction

Interest in the determination of mercury species in environmental samples is of global concern because of their natural persistence in the environment and the distinct mechanisms by which they change chemical form [1]. Although all forms of mercury are toxic, the potential effects are related to the chemical form. There is a potentially large number of organic mercury compounds (methyl, ethyl and phenyl mercury), but because of the decrease in production and use of organomercurials, methylmercury (MeHg^+) is by far the most common chemical form in the environment. MeHg^+ is the form in which

*Corresponding author. Email: angels.sahuquillo@ub.edu

mercury accumulates and biomagnifies in the aquatic food chain [2]. Once introduced into aquatic systems, mercury can be found in distinct soluble forms and can also associate with particulate matter. The European Water Directive [3], which seeks to establish a framework for the protection of surface and groundwater, includes mercury and its compounds in a list of priority and hazardous substances, as one of the elements for establishing the status of physico-chemical water quality. However, at present, the European Drinking Water Directive considers only total mercury concentration, establishing a parametric value of $1\mu\text{g l}^{-1}$ [4].

Analytical mercury speciation is based on hyphenated techniques, coupling a separation technique to distinct atomic or molecular spectroscopic detectors, such as AFS, atomic absorption spectroscopy (AAS), inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS) and UV. The selection of liquid reversed-phase chromatography as a separation technique avoids the derivatisation step required with gas chromatography [5,6]. In the literature, the mobile phases most used in HPLC for mercury speciation in environmental and biological samples, contain buffers, organic modifiers, ion pair reagents or chelating agents [7]. When using tetrabutylammonium bromide (TBAB) as ion-pair reagent, the appearance of double peaks, tailing and memory effects are solved only by adding high percentages of methanol as organic modifier or 2-mercaptoethanol [8–11]. The preparation of TBAB solutions in the presence of NaCl, which improves peak shapes, is not recommended in conjunction with an ICP-MS detector [10]. The use of chelating agents, such as L-cysteine [12–14], ammonium or sodium pyrrolidinedithiocarbamate (APDC, SPDC) [15–19], establishes a stable covalent bond between mercapto groups and mercury that appears to prevent the adsorption of mercury on silanol groups of stationary phases. The lack of selectivity shown by APDC is overcome using a suitable concentration of reagent in the mobile phase.

In the present work we measured Hg^{2+} and MeHg^+ by coupling HPLC to an AFS detector, with a previous on-line oxidation step (UV lamp) followed by a reduction to elemental mercury (HPLC-UV-CV-AFS). This detector provides extremely good sensitivity and specificity for total mercury determination in environmental samples. Moreover, given that this detector is inexpensive, it can easily be introduced into laboratories that perform routine analyses [20].

The aim of this study was first to compare the performance of three mobile phase compositions of distinct nature on Hg^{2+} and MeHg^+ determination, in order to ascertain the effects described in the literature when using other spectroscopic detectors. Subsequently, we conducted a systematic study of the factors that modify fluorescence signal and the obtained separation. The factors considered were as follows: addition of a range of percentages of an organic modifier (MeOH and ACN) to the mobile phase; type of reducing agent used; and the material from which the injection system is made. After establishing quality parameters, the proposed analytical method was applied to mercury species determination in fortified water samples of distinct origin (soft mineral, tap, river, sea, and waste).

2. Experimental

2.1 Instrumentation

The HPLC system consisted of an Agilent 1100 quaternary pump and degasser (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) equipped with a manual sampler injector Rheodyne

(7725i Stainless Steel (SS) and 9725 Polyetheretherketone (PEEK)) and a 100 μL sample loop. The separation of mercury species (Hg^{2+} and MeHg^+) was achieved in an analytical RP-C₁₈ column (ODS Hypersil 250 mm \times 4.6 mm id, 5 μm , Thermo Hypersil-Keystone). After separation, a photo-oxidation step was carried out in a 12-m length \times 0.5 mm id PTFE tube coiled around a UV-lamp with 150W of irradiation (Heraeus TQ 150). The reduction step was achieved in a cold vapour generator (CV) 10.004 (P.S. Analytical, Orpington, UK) where the effluent is mixed with the reducing agent. The metallic mercury vapour obtained reaches the gas-liquid separator, where it is dragged into the detector by an argon stream (300 ml min^{-1}) and dried in a PermaPure membrane with nitrogen (2.51 min^{-1}). Measurements were made in a Merlin Mercury Atomic Fluorescence Detector model 10.023 (P.S. Analytical).

2.2 Standards, reagents and glassware

Doubly deionised water obtained from a Millipore system was used throughout. An inorganic mercury stock solution of 1132 mg l^{-1} (as Hg) was prepared by dissolving an appropriate amount of HgCl_2 (Merck, Darmstadt, Germany) in 1% (v/v) HNO_3 (Panreac, Hiperpur, maximum guaranteed value of 0.1 $\mu\text{g l}^{-1}$ for mercury). A stock solution of methylmercury 800 mg l^{-1} (as Hg) was prepared by dissolving CH_3HgCl (Carlo Erba, Milan, Italy) in 3% methanol. Both solutions were stored at 4°C. Working solutions were prepared daily from the stock solutions by appropriate dilution.

All reagents were of analytical grade quality. Tetrabutylammonium bromide (TBAB), L-cysteine, ammonium pyrrolidinedithiocarbamate (APDC) and sodium borohydride were purchased from Sigma-Aldrich (Fluka). Sodium hydroxide, sodium chloride, ammonium acetate, nitric acid 65% and acetonitrile (ACN) gradient grade were from Merck. Tin chloride 2-hydrate, hydrochloric acid 35% (Hiperpur) and methanol (MeOH) HPLC-gradient grade were obtained from Panreac (Barcelona, Spain).

All glassware was soaked in HNO_3 10% (Merck, maximum of 0.005 mg l^{-1} for mercury) for at least 16 hours, and then rinsed with double deionised water.

2.3 Samples and spiking procedure

Seven water samples, mineral (soft mineralisation), tap, river, sea, waste from two treatment plants (WWTP) and one industrial waste, were passed through 0.45- μm filter membranes and stored at 4°C in high-density polyethylene bottles. The origin, pH and conductivity values for each sample after filtration are shown in Table 1 together with some heavy metals content determined by ICP-MS. For recovery studies, final solutions of about 10 and 100 $\mu\text{g l}^{-1}$ for the two mercury species were prepared by making up volume with the corresponding water matrix, previously passed through 0.20- μm polyester filters, in the same way as all the solutions introduced into the chromatographic system.

3. Results and discussion

3.1 Selection of mobile phase

A preliminary study was performed to compare three mobile phases, TBAB [8,9], L-cysteine [12] and APDC [19], under the most common experimental conditions described in the literature. For TBAB, the addition of MeOH as organic modifier was

Table 1. Characteristics of the water samples tested.

Water matrix	Origin	pH	Conductivity ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	$\mu\text{g l}^{-1}$						
				Cr	Ni	Cu	Zn	As	Cd	Pb
Soft mineral water	Commercial (Lanjarón)	6.3	183	<0.5	4.7	0.7	14	1.5	<0.02	0.28
Tap water	Barcelona service	7.4	566	0.6	14	480	252	1.0	0.34	0.53
River water	Riu Besòs (Barcelona)	8.0	1502	1.8	28	6.0	34	4.2	0.15	0.81
Seawater	Fòrum Beach (Barcelona)	8.3	41900	<0.5	<0.5	<0.5	<1	<0.1	<0.02	<0.05
WWTP-1	Cantabria	7.9	13160	<0.5	17	<0.5	27	<0.1	<0.02	<0.05
WWTP-2	Bizkaia	7.5	1390	2.3	11	17	37	1.5	0.17	1.5
Industrial wastewater (Paper mill)	Cantabria	4.2	2170	18	8.5	1.3	627	0.7	0.03	2.1

Table 2. Composition of the mobile phases tested in preliminary studies.

	Organic phase	Aqueous phase	Ratio	Flow rate (ml min^{-1})	References
TBAB	MeOH	TBAB 0.01 M NaCl 0.025 M pH 5.7 (with HCl)	50:50	1.2	[8,9]
L-cysteine	-	L-cysteine 0.5% (m/v) $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$ 0.06 M pH 5 (with CH_3COOH)	100	1.2	[12]
APDC	ACN	APDC 0.0015 M $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$ 0.01 M pH 5.5 (with CH_3COOH)	65:35	1.5	[19]

preferred to 2-mercaptoethanol because of its lower toxicity effects. The composition of the mobile phases is shown in Table 2.

A solution of 1.5% SnCl_2 prepared in 4% HCl was used as reducing agent at a flow rate close to 4 ml min^{-1} . Working standard solutions of Hg^{2+} and MeHg^+ (between 40 and $570 \mu\text{g l}^{-1}$ for each species) were prepared in the corresponding mobile phase. Each standard solution was injected in triplicate in three independent working sessions for each mobile phase composition. As an example, Figure 1 shows the results obtained in a single working session for each mobile phase. The sensitivity of the fluorescence detector differed depending on the mobile phase composition.

When using MeOH:TBAB as mobile phase (Figure 1a), with a relatively high MeOH percentage, a lack of linearity and reproducibility for Hg^{2+} signal (second peak) was detected. This observation could be attributed to memory effects, which have also been described when using ICP-MS as detector [10]. This notion was confirmed by the finding that Hg^{2+} was detected only from concentrations about $280 \mu\text{g l}^{-1}$, thereby revealing the retention of this species in the chromatographic system. In contrast, a linear response and good reproducibility (RSD < 4%) was obtained for MeHg^+ .

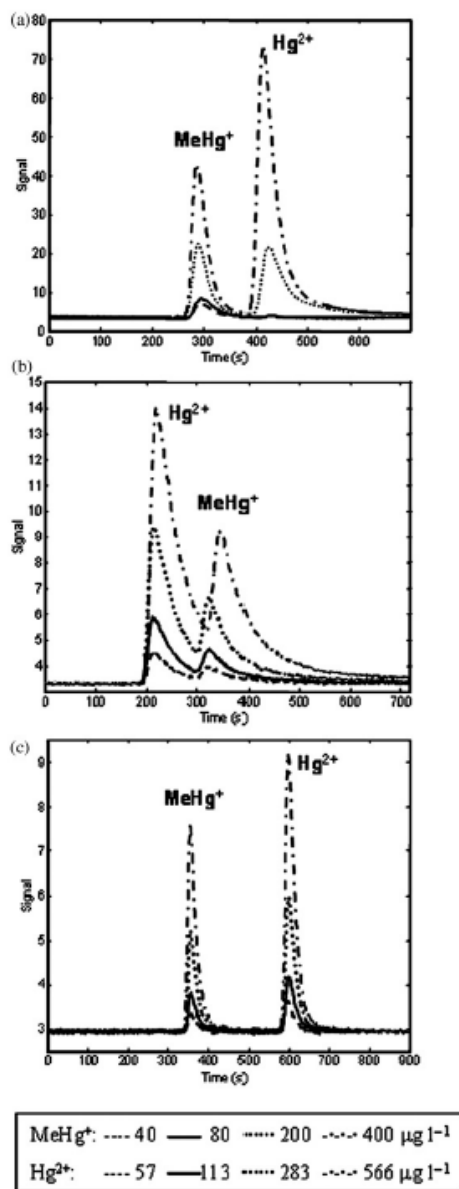


Figure 1. Chromatograms of standard solutions containing a range of concentrations of MeHg^+ and Hg^{2+} using three mobile phases: (a) MeOH:TBAB (50:50); (b) L-cysteine (100%); (c) ACN:APDC (65:35). Water phase composition and flow rates as shown in Table 2.

When working with L-cysteine as mobile phase (Figure 1b), good resolution of the peaks of the two species was not achieved in our working conditions with an AFS detector; however, reproducibility of the obtained signal for Hg^{2+} was better than when using TBAB in the mobile phase, and memory effects were not observed.

Using ACN:APDC as a mobile phase (Figure 1c), we achieved a good linear response in the whole concentration range studied and signal reproducibility with RSD less than 6% for both species. Moreover, a good resolution of the peaks was achieved. Thus, from a chromatographic point of view, ACN:APDC showed the best performance and was consequently used for further assays.

To reduce the time of analysis, the organic solvent proportion (ACN) was increased from 65 to 75%. This increase not only reduced the time of analysis to less than 10 minutes but also led to an increase of about 40% in the intensity of the fluorescence signal. On the basis of the effects observed, we performed a systematic study of the factors that affect the detection signal when using APDC in the aqueous phase.

3.2 Optimisation of HPLC-AFS system

We examined the effect of mobile phase composition and reducing conditions on detector sensitivity. To this end, assays were carried out in batch without chromatographic column and simulating the eluting medium. Working standard solutions of Hg^{2+} and MeHg^+ (between 20 and $285 \mu\text{g l}^{-1}$ for each species) were made up with the corresponding medium.

To study the effect of eluting solution, various compositions containing an aqueous solution of APDC, and different organic modifiers such as, ACN (providing good results in preliminary studies) and MeOH, were tested, and one mixture without APDC was also included (Table 3). In all cases, a solution of 1.5% SnCl_2 in 4% HCl was used as a reducing agent at flow rate close to 4 ml min^{-1} . Each standard solution was injected in triplicate in two independent working sessions for each eluting solution composition.

Given that when any eluting solution is substituted by a pure solvent mercury species are not strongly complexed, then presumably the oxidation step is more effective and consequently a greater signal response should be obtained in the detector. On this basis, we chose the intensity of emission obtained in pure water solutions as the maximum signal that a detector yields in the working conditions tested.

The results obtained for each species using the eluting solutions are shown in Figure 2. When using solutions containing ACN (three first bars), signals were about 25 times lower than those obtained with water. This observation can be attributed to the quenching effects on mercury fluorescence signal [21] caused by the photo-oxidation products of ACN [22–23]. When MeOH was used as organic phase (third and fourth bars), the signal

Table 3. Composition of eluting solutions used in batch studies.

Organic phase	Aqueous phase	Ratio
ACN	APDC 0.0015 M $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$ 0.01 M (pH 5.5)	70 : 30
ACN	H_2O	70 : 30
MeOH: CAN (65 : 15)	APDC 0.0015 M $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$ 0.01 M (pH 5.5)	80 : 20
MeOH	APDC 0.0015 M $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$ 0.01 M (pH 5.5)	70 : 30

obtained was about six times lower than that achieved with pure water, and about five times higher than when ACN is used as organic modifier (first and second bars in Figure 2). Therefore, the eluting solution MeOH:APDC provided the maximum response, as peak area, for both species.

The effect of the reducing agent on detector sensitivity was studied for the eluting solutions with extreme behaviour (second and last solvent mixtures in Table 3). The reducing agents examined were the two most used in the literature: SnCl_2 [5,24] and NaBH_4 [11,13]. The experimental conditions used in this study were a solution of 1.5% SnCl_2 in 4% HCl at flow rate close to 4 ml min^{-1} , and a solution of 0.05% NaBH_4 in 0.5% NaOH at flow rate close to 4 ml min^{-1} , with the addition of 0.1 M HCl at flow rate close to 8 ml min^{-1} for hydride generation. Each standard solution was injected in triplicate in one working session for each eluting solution.

The peak areas obtained when using SnCl_2 were higher than when using NaBH_4 (Figure 3). When MeOH:APDC was used as eluting solution, peak areas obtained with SnCl_2 were about two times higher for both mercury species. When using ACN:H₂O as eluting solution and SnCl_2 as reductant, peak areas for MeHg^+ were about three times higher than those obtained with NaBH_4 , and about 1.2 times higher for Hg^{2+} . These

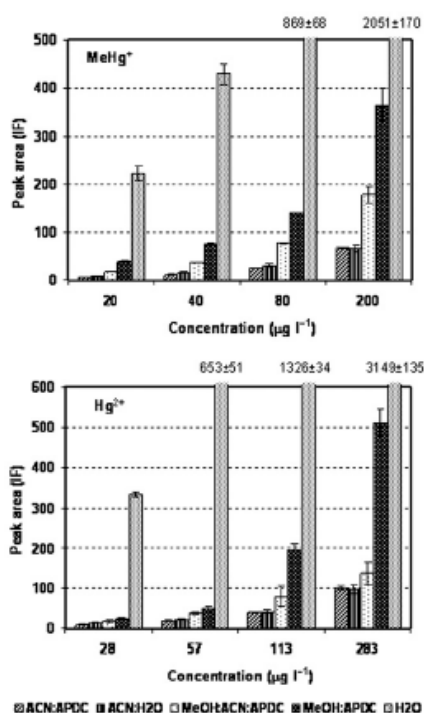


Figure 2. Peak area (intensity of fluorescence) for each species when using different eluting solutions compared to pure water.

results are consistent with studies that describe the quenching effects between mercury and the hydrogen produced in the reduction step when NaBH_4 is used as reductant [11,21]. It is described in the literature that the presence of 17% of hydrogen in the carrier gas composition decreased atomic fluorescence sensitivity for mercury down to 95.6%, whereas a composition of 48% of hydrogen caused a decrease of 99% on mercury signal [25]. However, it is also reported that NaBH_4 concentration lower than 1×10^{-5} M reduced the quenching effects [26]. In this work, when using MeOH:APDC as eluting solution and a solution of NaBH_4 at micromolar level (1×10^{-5} M) in 0.2 M NaOH, peak areas for both mercury species were 2 times lower than those obtained with SnCl_2 at the previous experimental conditions. Thus, SnCl_2 was used as reducing agent for the subsequent HPLC system optimisation.

We selected the mobile phase composition on the basis of sensitivity provided on detection (MeOH:APDC). Using 1.5% SnCl_2 in 4% HCl as reducing agent, we then examined the proportion of MeOH in the mixture in order to achieve greater separation in a shorter time. Working standard solutions of Hg^{2+} and MeHg^+ (between 20 and $285 \mu\text{g l}^{-1}$ for each species) were injected in duplicate in the chromatographic system. For the percentages of MeOH studied (70–85%), the results in terms of resolution, time of analysis and sensitivity (in terms of slope values in the calibration graph) are shown in Table 4. A mobile phase of MeOH:APDC (80:20) was a good compromise for time of analysis under 10 minutes, and good sensitivity and chromatographic resolution for

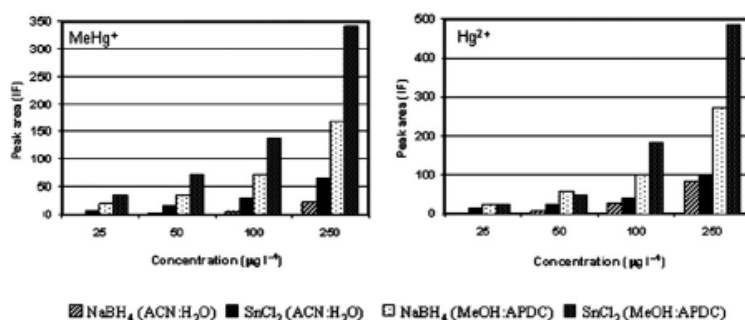


Figure 3. Peak area (intensity of fluorescence) for each species when using two distinct reducing agents.

Table 4. Analytical parameters at a range of methanol proportions in the mobile phase.

MeOH (%)	Retention time (s)		Resolution	Time of analysis (s)	Sensitivity (slope)	
	MeHg ⁺	Hg ²⁺			MeHg ⁺	Hg ²⁺
70	433	1025	8.9	1200	1.567	1.894
75	332	611	5.2	800	1.895	2.554
80	287	452	3.2	600	2.152	2.367
82	260	374	2.6	550	1.816	2.366
85	241	322	1.9	500	1.371	1.839

both species. Thus, the final selected conditions for the proposed HPLC-UV-CV-AFS method for Hg^{2+} and MeHg^+ determination are summarised in Table 5.

3.3 Effect of injector material

When using liquid chromatography for mercury speciation, the stainless steel components used during injection lead to adsorption of the species [10]. We examined potential memory effects of injection systems made of two materials: SS and PEEK. For the selected mobile phase (MeOH: APDC 80:20), both injectors were tested in the same conditions. Five injections with increasing volumes from 0.25 to 2 ml of a standard solution of Hg^{2+} and MeHg^+ (containing about $100 \mu\text{g l}^{-1}$ in each species) were introduced in the chromatographic system in order to determine reproducibility. Results showed a relative standard deviation (RSD) of about 2% for Hg^{2+} and 3% for MeHg^+ , independently of the material of the injection system and the sample volume introduced. However, to prevent the memory effects in the injection system when dealing with samples with concentration levels higher than $100 \mu\text{g l}^{-1}$, we highly recommend cleaning the system with 300 μL of mobile phase prior to analysis.

3.4 Analytical figures of merit and method applicability

The detection limits achieved for mercury species (calculated as $3 \text{SD}_{\text{BLANK}}/\text{slope}$; $n = 23$) were 1.5 and $1.4 \mu\text{g l}^{-1}$ (as Hg) for Hg^{2+} and MeHg^+ , respectively. The quantification limits ($10 \text{SD}_{\text{BLANK}}/\text{slope}$; $n = 23$) were 5.1 and $4.6 \mu\text{g l}^{-1}$ (as Hg) for Hg^{2+} and MeHg^+ , respectively. The detection and quantification limits were checked experimentally by injecting standard solutions from 0.5 to $10 \mu\text{g l}^{-1}$. Both species were detected at about $1 \mu\text{g l}^{-1}$ and were quantifiable from concentrations between 4 and $5 \mu\text{g l}^{-1}$. The detection and quantification limits obtained are lower or similar to those of other analytical methods using CV-AFS or CV-AAS detectors, which do not involve a pre-concentration step [8,9,11,27,28].

Linearity range was obtained by injecting in duplicate standard solutions of Hg^{2+} and MeHg^+ (between 5 and $1000 \mu\text{g l}^{-1}$ for each species) in three independent working sessions. Fluorescence signal was observed to be lineal up to $750 \mu\text{g l}^{-1}$ ($r > 0.999$).

Table 5. Final selected conditions for the determination of Hg^{2+} and MeHg^+ by HPLC-UV-CV-AFS.

<i>HPLC system conditions</i>	
Column	RP-C ₁₈ (ODS Hypersil 250 mm × 4.6 mm id, 5 μm)
Mobile phase	80% MeOH: 20% $0.0015 \text{ mol l}^{-1}$ APDC and 0.01 mol l^{-1} $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$ (pH 5.5 with CH_3COOH)
Flow rate	1.5 ml min^{-1}
Injected volume (loop)	100 μL
Stainless steel injection system	Cleaning step with 300 μL of mobile phase in load position before each analysis
<i>CV-AFS conditions</i>	
SnCl_2 concentration	1.5% in 4% HCl
SnCl_2 flow rate	4 ml min^{-1}
Carrier argon flow rate	300 ml min^{-1}
Nitrogen flow rate	2.51 min^{-1}

To our knowledge there are no certified reference materials (CRMs) for Hg^{2+} and MeHg^+ species in natural waters. Most of the CRMs available for total mercury consist of spiked water samples. For that reason, recovery studies were undertaken using seven water matrices (see Table 1) spiked at two concentrations (about 2 and 20 times over the quantification limits). Water samples were previously characterised in order to determine total mercury content, and in all matrices Hg content was under detection limit ($<0.05 \mu\text{g l}^{-1}$). Each water sample was analysed in triplicate in three independent working sessions, using working standard solutions of Hg^{2+} and MeHg^+ (between 5 and $230 \mu\text{g l}^{-1}$ for each species) for calibration. Water samples were prepared following the procedure described in Section 2.3. Figure 4 shows chromatograms of standard solutions and one spiked wastewater sample for both mercury species at two concentration levels.

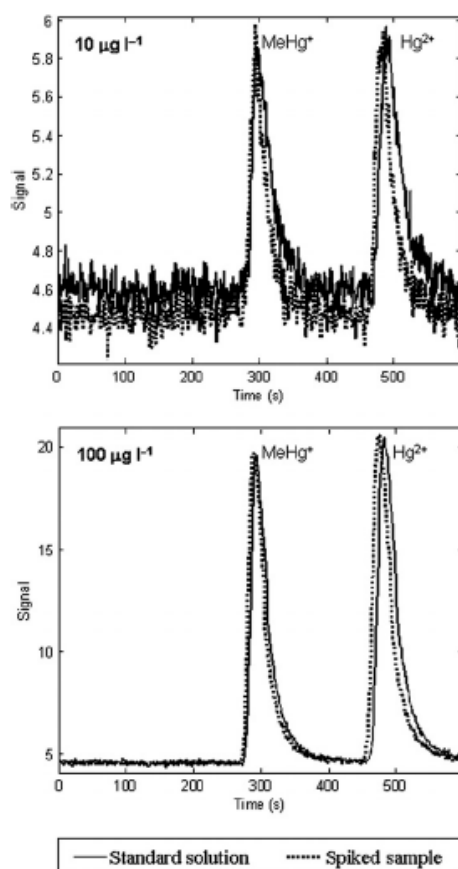


Figure 4. Chromatograms of standard solutions and a spiked wastewater sample for both mercury species at two concentration levels (10 and $100 \mu\text{g l}^{-1}$).

Recoveries ranged from 90 to 115% for both mercury species in all matrices, independently of the concentration level and water matrix complexity (Figure 5). Low recovery values encountered when working with high saline matrices in ICP-MS technique [14] were overcome in CV-AFS.

Data from the recovery study were processed statistically using one-way ANOVA for each water type. RSD_r (repeatability) and RSD_R (reproducibility) were calculated following ISO 5725-1 [29]. Good intra-day repeatability was obtained, with RSD_r values from 1.5 to 5% for $MeHg^+$ at both concentrations, except for river water with values of 7–9%. The obtained values for Hg^{2+} ranged from 2 to 5%, except for WWTP-2 at low concentration and mineral water at high concentration, giving RSD_r about 6.7%. Reported values in the literature for repeatability ranged from 4 to 8% for both mercury species, in spiked (500 or 50 $\mu g l^{-1}$) natural fresh waters [9,11].

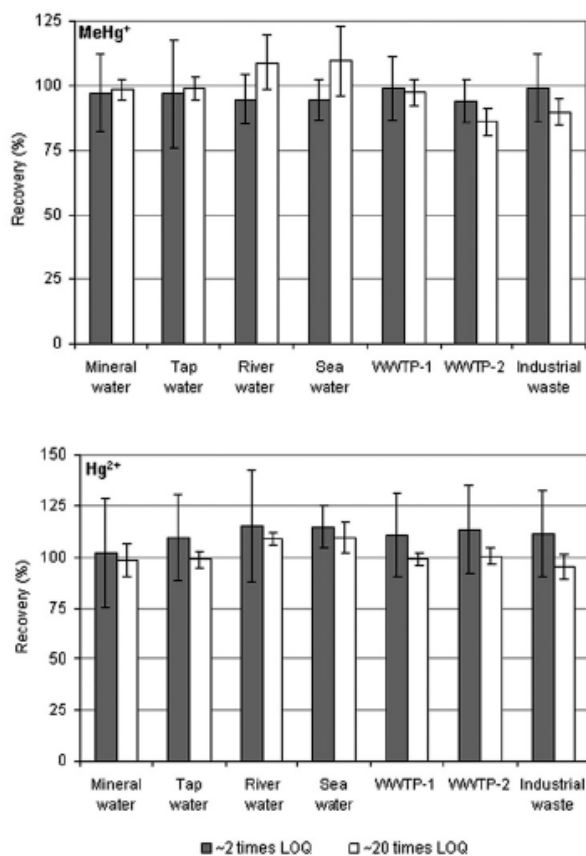


Figure 5. Recoveries obtained for the two mercury species at two concentrations in seven water matrices.

Regarding reproducibility, for the lower concentration assayed, RSD_R values ranged from 10 to 20% for both species, except for $MeHg^+$ in tap water and Hg^{2+} in mineral and river waters with RSD_R values ranging from 25 to 27%. For higher concentration levels, RSD_R values ranged from 3 to 10% for both species, except for $MeHg^+$ in seawater (14%).

With respect to retention time, the reproducibility for three independent working sessions (RSD , $n=6$ each day) ranged from 2–3% for Hg^{2+} ($t_R=7.5$ min) and 1–1.5% for $MeHg^+$ ($t_R=4.5$ min) considering standard solutions as well as water samples analysed. The values obtained are more than acceptable given the use of a coupled technique (HPLC-UV-CV-AFS) and the analysis of water matrices of increasing complexity.

Given the quality parameters established, the proposed analytical method is suitable for Hg^{2+} and $MeHg^+$ determination in natural waters from polluted areas with mining activities. Reported mercury concentrations in these areas are up to $2.5 \mu g l^{-1}$ in Alaska [30], and up to $13\text{--}20 \mu g l^{-1}$ in California and Almadén (Spain) [31–33] and have even reached values of $11,000 \mu g l^{-1}$ in some water samples from the latter [34]. $MeHg^+$ concentrations have been reported for only in few cases for this type of sample, accounting for about 0.02 to 0.23% of total mercury [31,32]. The broad application of the proposed method for the analysis of Hg^{2+} and $MeHg^+$ in natural waters from non-polluted areas would require the development of a pre-concentration step.

4. Conclusion

The comparison of three mobile phase compositions in the analytical speciation of mercury (Hg^{2+} , $MeHg^+$) using HPLC-UV-CV-AFS revealed that the addition of APDC as complexing agent in the aqueous phase provided the best results under our experimental conditions. We recommend replacing ACN by MeOH in order to prevent the quenching effects on mercury fluorescence signal.

The use of SS or PEEK in the injection system leads to same results, when a cleaning step with mobile phase is included in the routine.

A chromatographic system using a RP-C₁₈ column and a mixture of MeOH:APDC (80:20) as mobile phase, with a solution of 1.5% SnCl₂ in 4% HCl as reducing agent, proved an easy and robust analytical method for Hg^{2+} and $MeHg^+$ determination by CV-AFS in polluted waters. Compared to the instrumentation required in other analytical techniques, the atomic fluorescence detector is user-friendly, economic and sensitive, thus rendering the proposed method highly applicable for routine polluted environmental samples.

Acknowledgements

The authors thank the Dirección General de Investigación (DGICYT) for the Project No. CTQ2007-62261/BQU and Carmen Ibáñez-Palomino also thanks the Universitat de Barcelona for a pre-doctoral grant.

References

- [1] United Nations Environment Programme (UNEP) – Chemicals, Global Mercury Assessment (Geneva, 2002).

- [2] M. Horvat, in *Trace Element Speciation for Environment, Food and Health*, edited by L. Ebdon, L. Pitts, R. Cornelis, H. Crews, O.F.X. Donard, and Ph. Quevauviller (The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2001), Ch. 7, pp. 127–141.
- [3] Directive 2000/60/EC of the European Parliament and the Council of 23 October 2000 establishing a framework for Community action in the field of water policy.
- [4] Directive 98/83/EC of the Council of 3 November 1998 on the quality of water intended for human consumption.
- [5] M. Logar, M. Horvat, H. Akagi, and B. Pihlar, *Anal. Bioanal. Chem.* **374**, 1015 (2002).
- [6] Y. Mao, G. Liu, G. Meichel, Y. Cai, and G. Jiang, *Anal. Chem.* **80**, 7163 (2008).
- [7] C.F. Harrington, *Trends Anal. Chem.* **19** 167, (2000).
- [8] L.N. Liang, G.B. Jiang, J.F. Liu, and J.T. Hu, *Anal. Chim. Acta* **477**, 131 (2003).
- [9] S. Río-Segade and C. Bendicho, *Talanta* **48**, 477 (1999).
- [10] C. Harrington and T. Catterick, *J. Anal. At. Spectrom.* **12**, 1053 (1997).
- [11] J.L. Gómez-Ariza, F. Lorenzo, and T. García-Barrera, *J. Chromatogr. A* **1056**, 139 (2004).
- [12] R. Martínez Blanco, M. Tagle Villanueva, J.E. Sánchez Uría, and A. Sanz-Medel, *Anal. Chim. Acta* **419**, 137 (2000).
- [13] E. Bramanti, C. Lomonte, M. Onor, R. Zamboni, A. d'Ulivo, and G. Raspi, *Talanta* **66**, 762 (2005).
- [14] A. Castillo, A.F. Roig-Navarro, and O.J. Pozo, *Anal. Chim. Acta* **577**, 18 (2006).
- [15] J. Qvarnström, Q. Tu, W. Frech, and K. Lüdke, *Analyst* **125**, 1193 (2000).
- [16] X. Yin, W. Frech, E. Hoffmann, C. Lüdke, and J. Skole, *Fresenius' J. Anal. Chem.* **361**, 761 (1998).
- [17] Y. Li, X.-P. Yan, L.-M. Dong, S.-W. Wang, Y. Jiang, and D.Q. Jiang, *J. Anal. At. Spectrom.* **20**, 467 (2005).
- [18] L.P. Yu, *J. Agric. Food Chem.* **53**, 9656 (2005).
- [19] R. Falter and G. Ilgen, *Fresenius' J. Anal. Chem.* **358**, 407 (1997).
- [20] A. Guevara-Riba, A. Sahuquillo, J.F. López-Sánchez, and R. Rubio, *Anal. Bioanal. Chem.* **385**, 1298 (2006).
- [21] H. Morita, H. Tanaka, and S. Shimomura, *Spectrochim. Acta* **50B**, 69 (1995).
- [22] J. Zhuang, C.N. Rusu, and J.T. Yates Jr, *J. Phys. Chem. B* **103**, 6957 (1999).
- [23] N.N. Lichtin and M. Avudaithai, *Environ. Sci. Technol.* **30**, 2014 (1996).
- [24] H. Bagheri and A. Gholami, *Talanta* **55**, 1141 (2001).
- [25] A. D'Ulivo and S. Rapsomanikis, *Analytical Lett.* **30**, 2109 (1997).
- [26] Y.W. Chen, J. Tong, A. D'Ulivo, and N. Belzile, *Analyst* **127**, 1541 (2002).
- [27] J. Margetinová, P. Houserová-Pelcová, and V. Kubán, *Anal. Chim. Acta* **615**, 115 (2008).
- [28] H. Hintelmann and R.-D. Wilken, *Appl. Organometal. Chem.* **7**, 173 (1993).
- [29] International Organisation for Standardisation. ISO 5725-1. *Accuracy (Trueness and Precision) of Measurement Methods and Results. Part 1: General Principles and Definitions*, 1st ed. (Geneva, 1994).
- [30] J.E. Gray, P.M. Theodorakos, E.A. Bailey, and R.R. Turner, *Sci. Total Environ.* **260**, 21 (2000).
- [31] J.E. Gray, M.E. Hines, P.L. Higuera, I. Adatto, and B.K. Lasorsa, *Environ. Sci. Technol.* **38**, 4285 (2004).
- [32] J.J. Rytuba, *Sci. Total Environ.* **260**, 57 (2000).
- [33] J.J. Berzas Nevado, L.F. García Bermejo, and R.C. Rodríguez Martín-Doimeadios, *Environ. Pollut.* **122**, 261 (2003).
- [34] P. Higuera, R. Oyarzun, J. Lillo, J.C. Sánchez-Hernández, J.A. Molina, J.M. Esbrí, and S. Lorenzo, *Sci. Total Environ.* **356**, 112 (2006).

