



Bestimmung von Methylquecksilber in Fischproben aus der Umweltprobenbank des Bundes

Jan Kösters¹ (jan.koesters@ime.fraunhofer.de), Heinz Rüdel¹ (heinz.ruedel@ime.fraunhofer.de), Christa Schröter-Kermani² (christa.schroeter-kermani@uba.de)

¹ Fraunhofer Institut für Molekularbiologie und Angewandte Oekologie (IME), D-57377 Schmallenberg, ² Umweltbundesamt, FG II 1.2, Corrensplatz 1, D-14191 Berlin

Zusammenfassung

Im Rahmen des Umweltprobenbank-Programms wurden Brassenmuskulatur- und Brassenleber-Homogenate des Jahrgangs 2006 aus Rhein, Donau, Elbe, Saale, Mulde, Saar und dem Belauer See mit einer speziesspezifischen Methode (SID-GC/ICP-MS) und Isotopenverdünnungsanalytik auf Methylquecksilber (CH_3Hg^+) untersucht. Auf das Frischgewicht bezogen wurden Konzentrationen von 93 - 354 ng/g in den Muskelproben und 58 - 184 ng/g in den Leberproben nachgewiesen. Alle Gehalte liegen damit deutlich oberhalb der im EU-Kommissionsentwurf KOM (2006) 397, der Tochterrichtlinie zur Wasserrahmenrichtlinie, vorgeschlagenen Umweltqualitätsnorm für CH_3Hg^+ in Biota von 20 ng/g Frischgewebe. Der Vergleich mit den Gesamtquecksilbergehalten zeigte, dass Brassenmuskulatur und Brassenleber unterschiedliche Anteile von CH_3Hg^+ am Gesamtquecksilber aufweisen. Während in den Leberproben die Anteile an Methylquecksilber je nach Standort stark variierten (30 - 90 %), waren die Schwankungen im Muskelgewebe deutlich geringer. Hier lag der CH_3Hg^+ -Anteil durchschnittlich bei 95 %.

Einleitung

Dank strikter Gesetzgebungen wurde der industrielle Gebrauch von Quecksilber und dessen Verbindungen in den meisten Staaten in den letzten Jahrzehnten stark reduziert. Dennoch stellen Altlasten in Sedimenten, die bei Hochwasserereignissen potentiell verfügbar werden können, auch aktuell eine Gefährdung dar. Eine Ursache hierfür ist die Mobilisierung des anorganischen Quecksilbers durch Biomethylierung in Folge mikrobieller Aktivität in den aquatischen Systemen. Das so entstandene Methylquecksilber (CH_3HgX ; X = anionischer Ligand) hat lipophile Eigenschaften und kann von Organismen durch Zellmembranen aufgenommen werden. Dadurch kann es zu einer Bioakkumulation und im Nahrungsnetz auch zur Biomagnifikation kommen (Merian et al. 2004). Bei der toxikologischen Bewertung ist zu berücksichtigen, dass CH_3HgX bzw. CH_3Hg^+ in Fischen (Harris et al. 2003) aber auch im menschlichen Körper überwiegend an Cystein gebunden vorliegt (Clarkson 2002). Durch diese Komplexbildung wird die direkte toxische Wirkung verringert, da der Inhibierung von Proteinen entgegengewirkt wird. Jedoch ist das Cystein-Konjugat des CH_3Hg^+ in der Lage, die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden. Dies scheint auch die Ursache der erhöhten Neurotoxizität dieser Verbindung zu sein (Bridges und Zalups 2005)

Im Jahr 2000 wurde mit der EU-Wasserrahmenrichtlinie (WRRL) eine Regelung geschaffen, prioritäre Schadstoffe in Gewässern zu identifizieren und zu regulieren. Im Kommissionsentwurf KOM (2006) 397, der Tochterrichtlinie zur WRRL, ist auch die Überwachung einer Umweltqualitätsnorm (UQN) für CH_3Hg^+ in Biota vorgesehen. Als UQN wurde 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ CH_3Hg^+ im Frischgewebe aquatischer Organismen abgeleitet.

In diesem Beitrag sollen die Methoden für die Untersuchung auf Methylquecksilber, die im Rahmen der Umweltprobenbank des Bundes (UPB) angewendet werden, sowie deren Ergebnisse vorgestellt und anhand des UQN-Vorschlags für Methylquecksilber bewertet werden. Für die UPB werden jährlich Brassen von 17 Probenahmegebieten (PNF) in sieben Binnengewässern beprobt (Abb. 1). Die Probenahme der biologischen Proben erfolgt durch das Fach Biogeographie der Universität Trier.

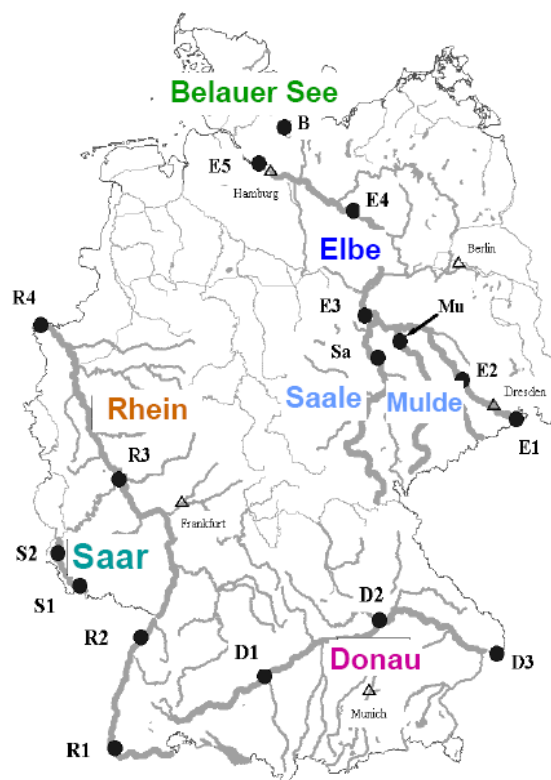


Abb. 1: Probenahmegebiete der Umweltprobenbank in Binnengewässern. Die einzelnen Probenahmegebiete sind durch Punkte symbolisiert (Codes siehe Tab. 2).

Die Umweltprobenbank des Bundes wird vom Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit finanziert und vom Umweltbundesamt koordiniert. Weitere Informationen, Forschungsberichte und Recherchemöglichkeiten zu Schadstoffgehalten sind unter www.umweltprobenbank.de verfügbar.

UPB-Verfahren zur Methylquecksilber-Bestimmung

Zur Probencharakterisierung einiger aquatischer Organismen, die als Homogenat-Teilproben in das UPB-Archiv eingelagert werden, wird routinemäßig auch CH_3Hg^+ mit einem operationalen Verfahren gemessen. Hierbei wird das biologische Probenmaterial mit verdünnter Salzsäure extrahiert und CH_3Hg^+ mittels Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-MS) als Hg bestimmt, nachdem es über einen Ionentauscher vom Hg^{2+} abgetrennt wurde (UBA 1996). Allerdings ist die Methode aufgrund vieler manueller Teilschritte arbeitsintensiv und relativ stör anfällig, was sich auch in teilweise hohen Standardabweichungen der Ergebnisse widerspiegelt. Um das derzeit eingesetzte Verfahren zur Bestimmung von CH_3Hg^+ zusätzlich abzusichern, aber auch um durch einen höheren Grad an Automatisierung eine zeitsparende und robustere Methode zur Verfügung zu haben, wurde ein neues Verfahren etabliert. Dieses basiert auf der Kopplung von Gaschromatographie (GC) und ICP-MS, wobei die speziesspezifische Erfassung flüchtiger Elementverbindungen (Spezies) ermöglicht wird. Das Verfahren hat gegenüber der bisherigen Methodik deutliche Vorteile, da die Trennung der Quecksilberspezies (hauptsächlich CH_3Hg^+ und Hg^{2+}) nach Derivatisierung automatisiert mittels GC erfolgt und die Empfindlichkeit durch Einsatz eines Sektorfeld-ICP-MS (SF-ICP-MS) höher ist.

Durch die Kopplungstechnik und die modifizierte Probenvorbereitung (in Anlehnung an Davis et al. 2007) werden somit entscheidende Verbesserungen hinsichtlich Robustheit, Reproduzierbarkeit, Zeitaufwand und Nachweisstärke erzielt. Nicht zuletzt trägt bei Verwendung isotonenangereicherter Standards der Einsatz der speziesspezifischen Isotopen-Verdünnungs-Analyse (SID, speciated isotope dilution) entscheidend zur Minimierung von Fehlerquellen, wie Probenverlust, nicht vollständige Derivatisierung oder Artefaktbildungen bei, da diese keinen signifikanten Einfluss auf das relative Isotopenverhältnis als primäre Messgröße haben.

Durchführung der speziesspezifischen Isotopen-Verdünnungs-Analysen

Die zu untersuchende Probenmatrix (Fischmuskulatur oder -leber) wird zunächst durch alkalischen Verdau mittels Tetramethylammoniumhydroxid (TMAH) aufgeschlossen. Um die Analyten mittels GC trennen zu können, ist eine Derivatisierung notwendig. Durch Einsatz eines Propylierungsmittels (Natriumtetrapropylborat, NaBPr_4) wird die Addition eines Propylrestes (Pr) an das Methylquecksilber-Kation (CH_3Hg^+) ermöglicht. Die resultierende Verbindung (CH_3HgPr) kann dann mit einem organischen Lösungsmittel (z.B. Hexan) ex-

trahiert und mittels GC analysiert werden. Auf der GC-Säule wird CH_3HgPr chromatographisch von anderen Hg-Spezies - vor allem Hg^{2+} als HgPr_2 - getrennt. Das als Detektor eingesetzte SF-ICP-MS ist in der Lage, zeitaufgelöst und mit hoher Empfindlichkeit die unterschiedlichen Quecksilbermassen aufzuzeichnen. Zur Quantifizierung mittels speziesspezifischer Isotopenverdünnung wird nach dem TMAH-Verdau eine bekannte Menge eines CH_3Hg -Standards zur Probe addiert, der abweichend vom natürlichen Isotopenverhältnis mit einer Isotopensorte stark angereichert ist (z.B. ^{200}Hg als $\text{CH}_3^{200}\text{HgCl}$). Das in der Probe resultierende Verhältnis der Isotope (z.B. $^{200}\text{Hg}/^{202}\text{Hg}$) ist nach dem Zeitpunkt der Addition und homogener Verteilung in der Aufschlusslösung weitgehend konstant, da sich die originär in der Probe vorhandenen und die addierte Methylquecksilberspezies nur noch über ihre Masse differenzieren lassen (Monperrus et al. 2004). Durch Vergleich mit dem entsprechenden natürlichen Isotopenverhältnis kann nun eine sehr zuverlässige Gehaltsbestimmung für CH_3Hg^+ durchgeführt werden. In die entsprechende Berechnungsformel sind als weitere Variable nur Masse und Konzentration der addierten Standardmenge und die Proben einwaage einzusetzen.

Untersuchungsprogramm

Untersucht wurden Brassenmuskulatur-Homogenate (3fach) von 16 UPB-Probenahme flächen (PNF; siehe Abb. 1) der Probenahme 2006. Für fünf PNF (Elbe: Prossen, Barby, Blankenese; Rhein: Weil, Bimmen) wurden auch Brassenleber-Homogenate des gleichen Jahres untersucht (2fach). Zum Methodenvergleich wurden Proben sowohl mit der neu etablierten SID-Methode als auch mit der bisher eingesetzten operationalen Methode (UBA 1996) auf ihren Gehalt an CH_3Hg^+ analysiert. Zur Qualitätssicherung und Methodvalidierung wurden Kontrollproben sowie interne und zertifizierte Referenzmaterialien (CRM) mitgeführt.

Da in allen UPB-Proben routinemäßig auch der Gesamtquecksilbergehalt nach Aufschluss bestimmt wird, können diese Daten jeweils mit den CH_3Hg -Ergebnissen verglichen und der Anteil des Methylquecksilbers am Gesamtquecksilbergehalt berechnet werden.

Ergebnisse und Diskussion

Zunächst wurde die neu etablierte SID-Methode validiert. Dazu wurden die Parameter Reproduzierbarkeit, Nachweis- und Bestimmungsgrenze sowie Blindwerte bestimmt. Die Reproduzierbarkeit der Messungen wird aus den Wiederfindungsdaten der Referenzmaterialien über die relative Standardabweichung (S_{rel}) errechnet. Die Reproduzierbarkeit wird als ausreichend angesehen, wenn $S_{\text{rel}} < 10\%$ ist. Diese Bedingung wird für die CRM erfüllt. Tabelle 1 fasst die entsprechenden Qualitätssicherungsdaten zusammen.

Referenzmaterial	GC-ICP-MS (A)			ICP-MS (B)		
	WF [%]	S _{rel} [%]	n	WF [%]	S _{rel} [%]	n
NIST DORM2	94	3,2	14	70	6,9	8
BCR463 (tuna fish)	100	0,6	17	-	-	-
UPB Brassenmuskelf#	114	1,2	17	92	4,5	8
DOLT3	102	2,4	5	80	(2,4)	2
UPB Brassenleber#	126	1,9	5	106	(1,8)	2

Vergleichswerte beruhen auf nur 3 Messwerten (CV-AAS).

Tab. 1: Wiederfindung (WF) im Vergleich zum zertifizierten bzw. dokumentierten Gehalt und relative Standardabweichung (S_{rel}) für die untersuchten Referenzmaterialien im Methodenvergleich (n = Anzahl der Messungen). **Fett:** CRM.

Die Nachweisgrenze wurde aus Blindwertuntersuchungen ermittelt (DIN 32645: Leerwertmethode). Es ergibt sich ein Wert von 0,5 ng/g bei 1 g Einwaage (Frischgewicht). Durch Multiplikation der Nachweisgrenze mit dem Faktor 3 ergibt sich eine Bestimmungsgrenze von 1,5 ng/g.

Zur Prüfung möglicher Störungen wurde mittels SID die Konzentration im Chemikalienblindwert (Aufschlusslösung) auf 0.001 ng/mL abgeschätzt. Dieser Wert liegt umgerechnet bei unter 50 % der errechneten BG. Das Signal/ Rausch-Verhältnis liegt für diesen Blindwert noch über dem Schwellenwert von 6:1, der als unteres Limit für ein auswertbares Signal herangezogen wurde und die untere Grenze des Messbereiches darstellt.

Die Ergebnisse des Methodenvergleichs sind in Tabelle 2 zusammengestellt. Die spezies-spezifische Methode lieferte deutliche höhere Werte. Bezogen auf diese Ergebnisse ergab die operationale Methode eine durchschnittliche Wiederfindung von 83 ± 3 %. Diese niedrigeren Werte sind vermutlich auf Verluste bei der Probenaufarbeitung zurückzuführen. Da auch die Ergebnisse der CRM für die GC-ICP-MS näher an den zertifizierten Werten lagen, werden die Ergebnisse der spezies-spezifischen Methode als richtig gewertet und im Folgenden diskutiert.

Für die Brassenmuskulatur-Proben wurden mittels GC-ICP-MS auf Trockengewicht (TG) bezogene CH₃Hg-Konzentrationen zwischen 443 ng/g (Donau, Ulm) und 1860 ng/g (Elbe, Zehren) gefunden (Tabelle 2). Für die Brassenleber betrug der Bereich der CH₃Hg-Gehalte 188 ng/g (Rhein, Weil) bis 764 ng/g TG (Elbe, Possen).

Für Blankenese ist auch ein zeitlicher Vergleich möglich, da das untersuchte UPB-Referenzmaterial (Tabelle 1) für die Brassenmuskulatur von diesem Standort stammte. Während 1993 der CH₃Hg-Gehalt 1976 ng/g TG betrug, lag er 2006 mit 463 ng/g TG deutlich niedriger (- 77 %).

PNF	GC-ICP-MS (A)		ICP-MS (B)		WF
	CH ₃ Hg [ng/g]	S _{rel} % (n=3)	CH ₃ Hg [ng/g]	S _{rel} % (n=3)	B/A [%]
Elbe					
Prossen (E1)	1560	2,7	1380	4,8	89
Zehren (E2)	1860	1,2	1520	6,8	82
Barby (E3)	1200	0,4	1040	4,9	87
Cumlosen (E4)	1520	1,1	1250	3,6	83
Blankenese (E5)	463	2,2	402	5,5	87
Mulde					
Dessau (Mu)	1330	2,1	1160	3,7	87
Saale					
Wettin (Sa)	1640	1,2	1360	3,1	83
Rhein					
Weil (R1)	528	1,8	425	4,2	81
Iffezheim (R2)	1170	0,5	939	4,2	80
Koblenz (R3)	636	0,5	508	4,1	80
Bimmen (R4)	939	0,9	742	3,1	79
Saar					
Güdingen (S1)	456	2,4	390	2,6	86
Rehlingen (S2)	536	2,3	456	3,0	85
Donau					
Jochenstein (D1)	1360	0,7	1060	4,1	78
Kelheim (D2)	770	1,0	624	2,3	81
Ulm (D3)	443	1,2	364	3,4	82

Über die Codes ist in Abb. 1 die Lage der PNF ersichtlich.

Tab. 2: Ergebnisse des Methodenvergleichs für die Brassenmuskulatur-Homogenate 2006 (als ng/g TG). Die Wiederfindung (WF) von Methode B wurde im Verhältnis zu Methode A berechnet.

Der Vergleich der CH₃Hg-Konzentrationen mit den Gesamtquecksilbergehalten zeigt, dass Brassenmuskulatur und Brassenleber unterschiedliche Verteilungen von Methyl- und Gesamtquecksilber aufweisen. Während in den Leberproben der Anteil an Methylquecksilber stark variierte (30 - 90 %), waren die Schwankungen im Muskelgewebe deutlich geringer. Im Brassenmuskel lag im Mittel 95 % des Quecksilbers als CH₃Hg⁺ vor (Abb. 2). Damit scheint die Überwachung im Muskelgewebe im Vergleich zur Leber besser geeignet für ein Trendmonitoring. In den UPB-Homogenaten der Brassenmuskulatur lag im Jahr 2006 der Gesamtquecksilbergehalt zwischen 474 ng/g und 1850 ng/g TG (Leberhomogenate: 195 - 2370 ng/g TG). Eher gering belastet

waren die Fische aus der Saar (Güdingen, Rehlingen) und aus Blankenese. Die höchsten Gesamtquecksilbergehalte wiesen die Fische aus dem Ober- und Mittellauf der Elbe sowie aus den Elbenebenflüssen auf. Die geringste Quecksilberbelastung wurde in Brassen aus dem Belauer See gefunden, der nur geringen anthropogenen Einflüssen ausgesetzt ist und als Referenzgebiet für die limnischen Standorte der UPB dient. Hier betrug der Gesamtquecksilbergehalt in der Brassenmuskulatur 145 ng/g TG (2005; der CH₃Hg-Gehalt wurde nicht untersucht).

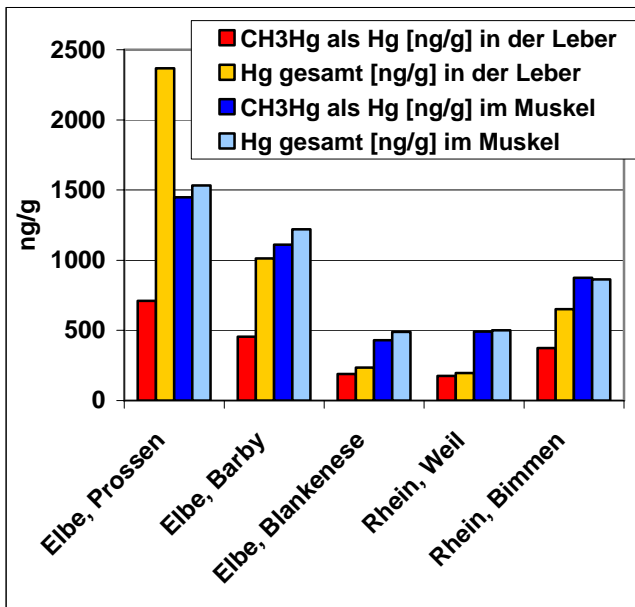


Abb. 2: Vergleich der Methylquecksilbergehalte von Muskulatur- und Leberhomogenaten 2006 (ng/g TG; CH₃Hg-Gehalt umgerechnet auf Hg).

Im Kommissionsentwurf KOM (2006) 397, der Tochterrichtlinie zur WRRL, ist für CH₃Hg⁺ eine Umweltqualitätsnorm (UQN) von 20 µg/kg (= 20 ng/g) CH₃Hg⁺ im Frischgewebe aquatischer Organismen abgeleitet worden. Für eine Bewertung im Rahmen dieser Richtlinie wurden die Ergebnisse der Brassenuntersuchungen für CH₃Hg⁺ auf das Frischgewicht bezogen (Wassergehalt im Brassenmuskel ca. 75 - 80 %, in der Brassenleber ca. 65 - 75 %). Die resultierenden Konzentrationen liegen mit ca. 60 - 360 ng/g deutlich oberhalb der vorgeschlagenen UQN für CH₃Hg⁺. Allerdings ist in der Richtlinie nicht spezifiziert, in welchem Organ bzw. Gewebe die UQN überprüft werden soll oder ob der Organismus als Gesamt-Homogenat untersucht werden soll. Da der Filetanteil in Brassen ca. 30 % (Leber: 1 - 2 %) beträgt, liegt aber auch bei Umrechnung auf das Gesamtfischgewicht unter der Annahme, dass im restlichen Fischkörper kein CH₃Hg⁺ nachzuweisen ist, eine Überschreitung der UQN vor.

Die Ergebnisse belegen, dass weitere Anstrengungen zur Reduktion der Quecksilberbelastung unternommen werden müssen, um dem Ziel der WRRL, der Erreichung eines guten chemischen und ökologischen Zustands für Oberflächengewässer bis zum Jahr 2015, näher zu kommen.

Literatur

- BMU, Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit (2000): Umweltprobenbank des Bundes - Konzeption. Umweltbundesamt, Berlin.
- Bridges C. C., Zalups R. K. (2005): Molecular and ionic mimicry and the transport of toxic metals. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 204, 274-308.
- Clarkson T. W. (2002): The three modern faces of mercury. *Environ. Health Perspect.* 110 (suppl 1), 11-23.
- Davis W. C., Christopher S. J., Pugh R. S., Donard O. F. X., Point D., Horvat M., Gibiar D., Kljakovic Z., Porter B. J., Schantz M. M. (2007): Certification of Methylmercury Content in Two Fresh-frozen Reference Materials: SRM 1947 Lake Michigan Fish Tissue and SRM 1974b Organics in Mussel Tissue (*Mytilus edulis*). *Anal. Bioanal. Chem.* 387, 2335-2341.
- Harris H. H., Pickering I. J., George G. N. (2003): The chemical form of mercury in fish. *Science* 301, 1203.
- KOM (2006) 397: Vorschlag für eine Richtlinie des Europäischen Parlaments und Rates über Umweltqualitätsnormen im Bereich der Wasserpolitik und zur Änderung der Richtlinie 2000/60/EG. http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/site/de/com/2006/com2006_0397de01.pdf
- Merian E., Anke M., Ihnat M., Stoepler M. (2004): Elements and their Compounds in the Environment. Wiley-VCH Verlag, Weinheim.
- Monperrus M., Krupp E., Amouroux D., Donard O. F. X., Rodriguez Martin-Doimeadios R. C. (2004): Potential and limits of speciated isotope-dilution analysis for metrology and assessing environmental reactivity. *Tr. Anal. Chem.* 23, 267-272.
- UBA - Umweltbundesamt (1996): Umweltprobenbank des Bundes - Verfahrensrichtlinien. Hrsg.: Umweltbundesamt. Erich Schmidt Verlag, Berlin.

Korrespondenzadresse

Dr. Jan Kösters
 Fraunhofer Institut für Molekularbiologie und Angewandte Oekologie (Fraunhofer IME)
 Auf dem Aberg 1
 57392 Schmallenberg
 Tel. 02972 302-208
 E-Mail: jan.koesters@ime.fraunhofer.de