

Nghiên cứu xác định methyl thủy ngân trong bùn lắng bằng phương pháp sắc ký khí ghép nối đầu dò huỳnh quang nguyên tử

- Triệu Quốc An
- Trần Phương Huy
- Nguyễn Văn Đông

Trường ĐH Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM

(Bài nhận ngày 20 tháng 03 năm 2013, nhận đăng ngày 25 tháng 10 năm 2013)

TÓM TẮT

Phương pháp xác định methyl thủy ngân (MeHg) được nghiên cứu trên hệ thống sắc ký khí ghép nối đầu dò huỳnh quang nguyên tử (GC-AFS). Hệ thống GC-AFS được thiết kế và chế tạo dựa trên các thiết bị cơ bản là máy GC và đầu dò AFS chuyên dùng phân tích thủy ngân hiện có tại phòng thí nghiệm. Các thông số vận hành của hệ thống GC-AFS được tối ưu hóa và hiệu năng của hệ thống được xác nhận bằng giản đồ kiểm soát chất lượng về độ nhạy. MeHg trong mẫu bùn lắng được ly trích vào pha dichloromethane (DCM) trong sự hiện diện

của HNO_3 , KCl và CuSO_4 . Dung môi DCM được thổi khô và MeHg được chiết sang pha nước sau đó được ethyl hóa bằng $\text{NaB}(\text{C}_2\text{H}_5)_4$ trong đệm $\text{CH}_3\text{COONa}/\text{CH}_3\text{COOH}$ pH 5,3 chứa $\text{K}_2\text{C}_2\text{O}_4$. $\text{CH}_3\text{HgC}_2\text{H}_5$ được chiết định lượng sang pha hexane và được xác định trên hệ thống GC-AFS. Giới hạn phát hiện của hệ GC-AFS là 1,6 pg MeHg. Giới hạn phát hiện của phương pháp là 0,029 ppb MeHg. Phương pháp này có thể được ứng dụng để xác định methyl thủy ngân trong đất, bùn thải, bùn lắng.

Từ khóa: sắc ký khí, đầu dò huỳnh quang nguyên tử, methyl thủy ngân, trầm tích và bùn lắng.

MỞ ĐẦU

Những hậu quả tiềm ẩn của sự tích tụ Hg trong hệ sinh thái nước đã và đang trở thành vấn đề được lưu tâm nhiều kể từ sau những bi kịch nhiễm độc MeHg ở Minamata, Nhật Bản vào những năm 1950-1960 và tại Iraq [1, 2]. Vì vậy, việc quan trắc hàm lượng Hg trở nên đặc biệt quan trọng trong việc tìm hiểu chu trình chuyển hóa Hg trong hệ sinh thái nước, không chỉ ΣHg mà còn MeHg-nguyên dạng có độc tính cao đối với hệ thần kinh và khả năng tích tụ sinh học. Những phương pháp phổ biến để phân tích MeHg

bao gồm LC-ICPMS [3], GC-ICPMS [4], GC-QT-AAS [5], GC-MIP-AES [6] và GC-AFS [7]. Việc ứng dụng các kỹ thuật làm giàu mẫu trong việc phân tích MeHg kết hợp với sắc ký khí và một số đầu dò cũng được nghiên cứu và phát triển trong những năm gần đây như: kỹ thuật “purge and trap” [8] và vi chiết pha rắn (SPME) [9]. Mặc dù mỗi phương pháp đều có những ưu điểm nổi trội riêng, nhưng GC-AFS vẫn là kỹ thuật được sử dụng phổ biến trong việc phân tích MeHg, chủ yếu vì chi phí vận hành, giá thành

thiết bị thấp và độ nhạy cao nên phù hợp với tình hình nghiên cứu tại Việt Nam.

Trong bùn lắng và đất, thủy ngân tồn tại chủ yếu dưới dạng vô cơ và một phần nhỏ methyl thủy ngân. Việc xác định MeHg trong những đối tượng mẫu này gặp nhiều khó khăn bởi hàm lượng MeHg rất thấp ($< 2\% \Sigma\text{Hg}$). Sau khi được trích ly khỏi nền mẫu bùn dùng môi trường acid phối hợp với một số tác nhân tạo phức [10], MeHg được cô lập/làm giàu bằng các kỹ thuật chiết lỏng lỏng hay chưng cất [11]. Phương pháp chưng cất khá hiệu quả trong việc tách MeHg khỏi nền mẫu bùn nhưng có thể gây sai số dương rất lớn do MeHg sinh ra trong khi chưng cất. Hỗn hợp $\text{KBr}/\text{CuSO}_4/\text{H}_2\text{SO}_4$ cho phép trích ly hiệu quả MeHg trong mẫu bùn khô và giảm thiểu thậm chí loại trừ được sự sản sinh MeHg trong giai đoạn xử lý mẫu [12]. Vừa là acid mạnh vừa có tính oxy hóa mạnh, HNO_3 được dự đoán là một tác nhân hiệu quả để ly trích MeHg từ các mẫu bùn có thành phần phức tạp. Thực tế HNO_3 2M được dùng để ly trích MeHg trong bùn khi dùng vi sóng hỗ trợ [13]. So với các hệ tác chất $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{CuSO}_4/\text{KBr}$, $\text{KOH}/\text{CH}_3\text{OH}$ và $\text{HNO}_3/\text{CuSO}_4$; hỗn hợp $\text{HNO}_3/\text{CuSO}_4$ trích ly MeHg hiệu quả, và tương thích với nhiều nền mẫu khác nhau: khô, ướt, giàu TOC.... Chúng tôi nhận thấy sự phối hợp $\text{HNO}_3/\text{KBr}/\text{CuSO}_4$ là không hiệu quả trong việc ly trích MeHg do sự hình thành Br_2 gây phá hủy một phần MeHg. Trong nghiên cứu này, chúng tôi khảo sát khả năng ly trích MeHg dùng hỗn hợp $\text{HNO}_3/\text{KCl}/\text{CuSO}_4$ trên mẫu bùn và xác định MeHg trên hệ thống GC-AFS. Nội dung chính của nghiên cứu: i. chế tạo giao diện nhằm ghép nối hệ thống GC-AFS ứng dụng để phân tích MeHg và ii. nghiên cứu quy trình xử lý mẫu, ly trích MeHg từ mẫu bùn lắng sử dụng các tác chất: HNO_3 , KCl và CuSO_4 kết hợp với kỹ thuật chiết lỏng lỏng với CH_2Cl_2 .

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Hóa chất và thuốc thử

Tất cả dung dịch được chuẩn bị trong nước không ion ($18\text{M}\Omega\cdot\text{cm}$). HNO_3 (65-67%), n-hexane, MeHgCl , $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$, dichloromethane, $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$, KCl , CH_3COOH băng và CH_3COONa hạng tinh khiết phân tích (Merck); $\text{K}_2\text{C}_2\text{O}_4$ (Reachim); NaBeT_4 (Sigma-Aldrich).

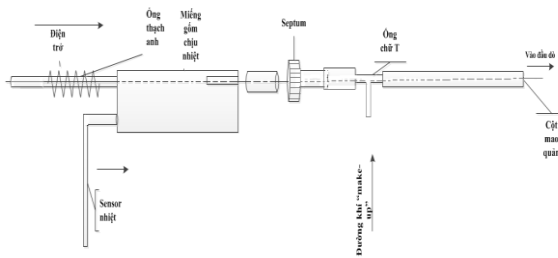
Thiết bị

Máy GC 5890 (Agilent); buồng tiêm on-column, nhiệt độ buồng tiêm 200°C ; cột DB-1 ($30\text{m} \times 0.53\text{mm} \times 0.88\mu\text{m}$) (Supelco, USA), chương trình nhiệt: $60^\circ\text{C}(1\text{phút}) \xrightarrow{20^\circ\text{C}/\text{phút}} 120^\circ\text{C}(1\text{phút}) \xrightarrow{30^\circ\text{C}/\text{phút}} 200^\circ\text{C}(1\text{phút})$; đầu dò AFS (PS Analytical) với lưu lượng khí “make up” là 120 mL Ar/phút và khí bảo vệ là 180 mL Ar/phút; bộ điều khiển nhiệt độ tự chế tạo, dây điện trở, ống thạch anh ($15\text{ cm} \times \text{id } 0,25\text{cm} \times \text{od } 0,5\text{ cm}$), ống sứ chịu nhiệt, ống thủy tinh chữ T, sau khi chế tạo toàn bộ lò nhiệt phân sẽ được giữ ở 520°C ; máy Vortex (IKA vortex Genius 3); máy pH (Schott Lab-850); ống ly tâm PE 50 mL (Isolab); kim tiêm 5 μL (SGE-Australia); các dụng cụ thủy tinh như: vial 40 mL, vial 20 mL, vial 1.5 mL (septum lót Teflon), ống nghiệm có nắp dung tích 10 mL, pipet, beaker...

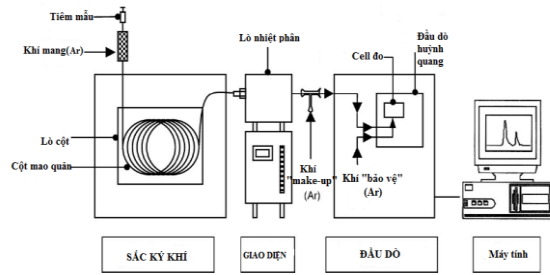
Chế tạo giao diện ghép nối hệ thống GC-AFS

Đầu dò AFS chỉ cho tín hiệu với hơi Hg, vì vậy các hợp chất sau khi qua hệ thống GC phải được phân hủy để chuyển về Hg kim loại trước khi đến đầu dò. Do vậy,

- Giao diện ghép nối hệ thống GC-AFS phải thỏa mãn được các yêu cầu sau: i. Đưa mẫu từ GC đến đầu dò một cách hiệu quả mà không làm mất mát và gây ra “hiệu ứng lưu”, ii. Vận hành ở nhiệt độ cao và ổn định để nhiệt phân các hợp chất thủy ngân hữu cơ và iii. Giao diện phải không làm ảnh hưởng đến thể tích chết của hệ thống.
- Cấu tạo giao diện của hệ GC-AFS được mô tả trong Hình 1.



Hình 1. Mô hình đơn giản của giao diện



Hình 2. Sơ đồ hệ thống GC-AFS

Hệ thống phân tích hoàn chỉnh GC-AFS được mô tả ở Hình 2, các thông số cần khảo sát trước khi phân tích gồm các yếu tố liên quan đến đầu dò, lò nhiệt phân, sắc ký khí.

Kiểm soát chất lượng hệ thống

Kiểm tra hệ thống hàng ngày bằng mẫu chuẩn MeHgEt 1,5 pg/μL (mẫu QC). Mẫu QC được pha mỗi ngày; tiêm trước mẫu, xen kẽ giữa các mẫu và ngay trước khi kết thúc đo. Tín hiệu diện tích của peak MeHgEt được ghi nhận. Từ số liệu tiêm mẫu QC 20 ngày liên tiếp, xây dựng biểu đồ kiểm soát chất lượng (control chart).

Điều chế chuẩn MeHgEt và Et₂Hg

Cân chính xác 0,4191 g dung dịch Hg²⁺ 1000 ppm, và 0,3508 g dung dịch MeHgCl 1049,15 ppm cho vào ống nghiệm có nắp dung tích 10 mL. Thêm 2 mL đệm acetate, 2 mL hexane và 40 μL NaBEt₄ 20%. Đậy nắp và vortex trong vòng 20 phút, sau đó giữ lạnh tại -10°C trong 30 phút. Ly tâm tách lấy pha hexane vào bình 40 mL có septum. Chiết lại pha nước 2 lần với hexane và

gộp các dịch chiết, sau đó thêm hexane đến 40 mL, đậy nắp chặt. Độ tinh khiết của các dung dịch chuẩn này được kiểm tra bằng GC-AFS.

Xác định nồng độ các chuẩn MeHgEt và Et₂Hg

Lấy chính xác 1 mL các chuẩn MeHgEt và Et₂Hg đã được điều chế vào vial 40 mL. Thêm 3 mL HNO₃ và 1 mL HCl, lắc tròn trong 30 phút và tách lấy pha nước. Rửa pha hexane 3 lần, mỗi lần với 2 mL nước và gộp tất cả pha nước vào bình định mức 50 mL, định mức bằng nước cất. Dung dịch này dùng để xác định Hg bằng phương pháp CV-AAS.

Xác định các hợp chất của thủy ngân bằng GC-AFS

Tiêm 5 μL mẫu chứa MeHgEt và Et₂Hg, mỗi mẫu tiêm lặp 3 lần. Tín hiệu hấp thu của mỗi chất tính theo diện tích peak. Việc định lượng các hợp chất dựa trên đường chuẩn của từng chất.

Xử lý mẫu

Ly trích methyl thủy ngân

Cân chính xác khoảng 2 g mẫu vào ống ly tâm PP 50 mL, thêm 10 mL dung dịch hỗn hợp HNO₃ 3M, KCl 0,01M và CuSO₄ 0.1M và đánh siêu âm 30 phút ở 55°C. Ly tâm trong 5 phút tại 3000 vòng/phút, tách lấy pha nước. Lặp lại quá trình ly trích mẫu bằng 5 mL dung dịch hỗn hợp HNO₃/KCl/CuSO₄. Gộp toàn bộ pha nước trong 2 lần ly trích vào ống thủy tinh 40 mL, thêm 3 mL DCM, vortex trong 30 giây, và tách lấy pha hữu cơ. Lặp lại quá trình chiết lỏng-lỏng 2 lần và gộp tất cả pha hữu cơ vào ống thủy tinh 15 mL. Thêm 2 mL đệm và thổi khô DCM.

Ethyl hóa

Sau khi đuổi hoàn toàn pha DCM, thêm 0,25 mL K₂C₂O₄ 1M [14], 1 mL hexane và 40 μL NaBEt₄ 25%. Đậy nắp và vortex trong 20 phút, ly tâm 1000 vòng/phút trong 5 phút. Chuyển pha hexane vào lọ đựng mẫu 1,5 mL và bảo quản ở -10°C đến khi phân tích bằng GC-AFS.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Tối ưu thông số đầu dò

Việc tối ưu là để đạt độ nhạy và độ đặc trưng tốt nhất (độ phân giải) trên sắc ký đồ. Benzene được dùng để thay thế các hợp chất thủy ngân vì benzene cũng cho tín hiệu trên đầu dò AFS.

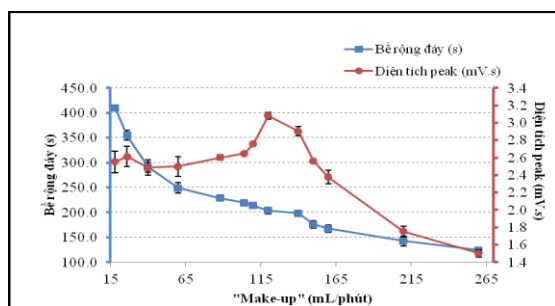
Tối ưu khí "make up"

Khí "make up" giúp đưa toàn bộ hơi Hg từ hệ GC đến đầu dò một cách hiệu quả mà không làm giảm đáng kể độ phân giải của hệ sắc ký và độ nhạy của đầu dò. Kết quả (Hình 3) cho thấy lưu lượng khí make-up trong khoảng 120-140

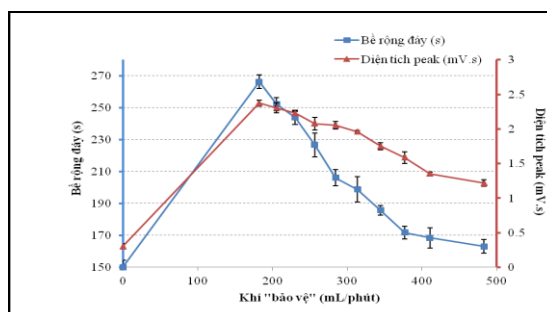
mL/phút đảm bảo hệ thống vận hành với độ phân giải và độ nhạy tốt nhất.

Tối ưu khí bảo vệ

Khí bảo vệ trong cell đo của đầu dò giúp cô lập dòng khí make-up từ GC chứa hơi chất phân tích và ngăn chúng khuếch tán đều khắp trong cell đo, ảnh hưởng trực tiếp đến độ nhạy của đầu dò. Khảo sát này giúp chọn lựa lưu lượng khí bảo vệ dung hòa độ nhạy của đầu dò và độ ổn định của phép đo. Kết quả (Hình 4) cho thấy lưu lượng khí bảo vệ 180-200 mL/phút là khoảng làm việc tốt nhất của đầu dò xét theo tiêu chí độ nhạy và độ ổn định.



Hình 3. Phụ thuộc diện tích và bề rộng peak benzene vào lưu lượng khí "make up"



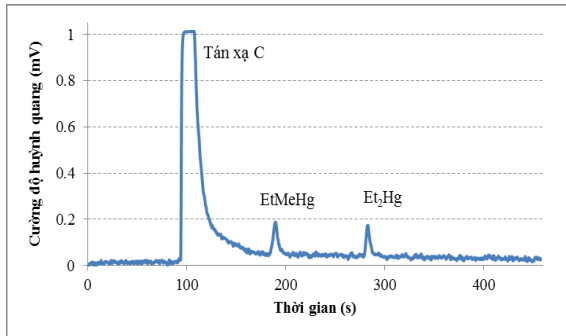
Hình 4. Phụ thuộc diện tích và bề rộng peak benzene vào lưu lượng khí bảo vệ

Tối ưu nhiệt độ lò nhiệt phân

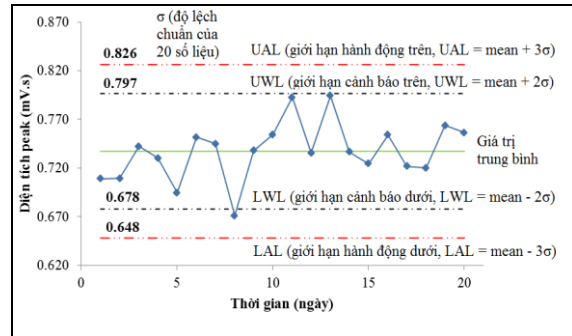
Lò nhiệt phân không chỉ đơn thuần vận chuyển chất phân tích mà còn phân hủy các hợp chất của thủy ngân được phân tách từ GC thành hơi Hg tự do phù hợp với đầu dò.

Kết quả cho thấy khi nhiệt độ lò nhiệt phân tăng đến 250°C, tín hiệu của Et₂Hg bắt đầu xuất hiện. Điều này chứng tỏ hợp Et₂Hg dễ phân hủy hơn MeHgEt [15]. Khi nhiệt độ lớn hơn 550°C, sắc ký đồ xuất hiện một peak rất cao và bề rộng

làm dãn đường nền gây khó khăn trong việc lấy tín hiệu diện tích peak của MeHgEt và Et₂Hg (Hình 5). Peak này có thể là do sự tán xạ của các hạt C-sản phẩm phân hủy của hexane. Sự phân hủy hexane tạo muội than ngoài gây bất lợi cho tín hiệu do đường nền cao và lượng carbon ngưng tụ gây nghẹt cột mao quản dẫn mẫu từ GC sang đầu dò. Do đó, thực tế nên sử dụng nhiệt độ 500-520°C để tránh sự phân hủy dung môi hexane gây muội carbon.



Hình 5. Peak tán xạ C ở nhiệt độ lò nhiệt phân 700°C



Hình 6. Control chart của hệ thống GC-AFS

Kiểm soát chất lượng hệ thống phân tích (QA/QC)

Do hệ GC-AFS được thiết kế lại, việc đánh giá hiệu năng của hệ thống phải được thực hiện. Các tiêu chí đánh giá gồm có: thời gian lưu, độ nhạy và độ ổn định ngắn hạn và dài hạn. Đồ thị kiểm soát chất lượng (Hình 6) cho thấy hệ GA-AFS vận hành ổn định trong 20 ngày khảo sát.

Khảo sát khoảng tuyến tính, giới hạn phát hiện và dung đường chuẩn

Đường chuẩn có hệ số tương quan khá tốt với giá trị R^2 lần lượt là 0,999 và 0,9994. Khoảng tuyến tính của MeHgEt và Et₂Hg là 1-14pg. Độ nhạy của MeHgEt hay Et₂Hg (tính theo Hg) là như nhau. Giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng của thiết bị đối với MeHgEt và Et₂Hg được đánh giá dựa trên tỉ lệ S/N (signal to noise) lần lượt là 1,6 và 5,3 pg đối với MeHgEt; 1,3 và 4,4 đối với Et₂Hg.

Khảo sát quá trình tạo dẫn xuất

Ảnh hưởng của pH và lượng tác chất

Phản ứng ethyl hóa bằng NaBEt₄ trong pha nước phụ thuộc rất nhiều vào pH của dung dịch và lượng tác chất được sử dụng. Khảo sát này cho thấy pH 5,3 và 10-20 μ L NaBEt₄ 25% là các điều kiện ethyl hóa tối ưu.

Ảnh hưởng của ion Cu²⁺ và biện pháp loại trừ

Trong hệ chiết HNO₃/KCl/CuSO₄, Cu²⁺ cạnh tranh với MeHg liên kết các nhóm sulfide và thiol trong nền mẫu đẩy MeHg khỏi nền mẫu,

làm tăng hiệu năng chiết. Tuy nhiên, dư nhiều Cu²⁺ sẽ ảnh hưởng đến quá trình ethyl hóa MeHg. Thực nghiệm cho thấy [Cu²⁺] > 0,1M thì hiệu suất ethyl hóa < 78%. Để khắc phục vấn đề này, ion oxalate (K₂C₂O₄) được dùng để che Cu²⁺. Kết quả cho thấy hiệu suất ethyl hóa được cải thiện khi nồng độ oxalate trong dung dịch > 0,1M. Do đó, 250 μ L dung dịch K₂C₂O₄ 1M được thêm vào dung dịch sau khi thổi khô DCM để loại trừ ảnh hưởng của Cu²⁺.

Khảo sát hệ chiết HNO₃, KCl, CuSO₄, và DCM

Ảnh hưởng của nồng độ KCl

Trong hệ chiết HNO₃/KCl/CuSO₄, KCl cung cấp Cl⁻ cho MeHg⁺ để hình thành hợp chất MeHgCl kém phân cực, từ đó làm tăng khả năng chiết MeHg sang pha hữu cơ [16]. Ion Cl⁻ vừa là đối ion giúp tăng khả năng ly trích MeHg, vừa ảnh hưởng đến phản ứng tạo dẫn xuất. Do đó, việc kiểm soát nồng độ Cl⁻ của dung dịch sau giai đoạn thổi khô DCM là cần thiết. Thực nghiệm cho thấy rằng [Cl⁻] > 0,05M giảm hiệu suất ethyl hóa.

Ảnh hưởng của nồng độ HNO₃

HNO₃ là một hợp phần trong hệ chiết có tính oxy hóa. Chính nhờ tính chất này mà khả năng ly trích MeHg của HNO₃ hiệu quả hơn so với HCl hay H₂SO₄ thông qua phản ứng oxy hóa các phức chất của MeHg với các nhóm sulfur tự do, hoặc thiol, hoặc các peptit, protein có trong nền mẫu

chứa các nhóm sulhydryl [17]. Tuy nhiên, HNO_3 ở nồng độ cao có khả năng chuyển hóa MeHg^+ thành Hg^{2+} gây sai số trong quá trình phân tích. Vì thế, trong khảo sát này, nồng độ HNO_3 trong hệ chiết được thay đổi từ 0,5-3M để đánh giá ảnh hưởng của HNO_3 . Kết quả cho thấy hiệu suất thu hồi cao và ổn định trong khoảng nồng độ khảo sát với hiệu suất thu hồi 94,0-95,1% với các nồng độ MeHg từ 1-5 ppb.

Ứng dụng phân tích methyl thủy ngân trong mẫu bùn lắng

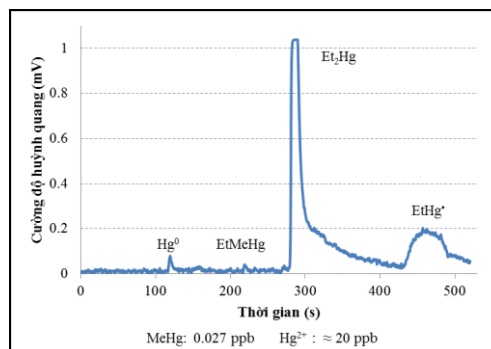
Khảo sát hiệu suất thu hồi

Khảo sát hiệu suất thu hồi được tiến hành trên ba đối tượng mẫu khác nhau: trên chuẩn MeHgCl pha trong nước, trên nền mẫu TOC thấp và TOC cao. Kết quả hiệu suất thu hồi methyl thủy ngân đạt được trên các nền mẫu môi trường trong khoảng 84,6-86,1% ở các nồng độ khác nhau cho thấy phương pháp phân tích có độ tin cậy và độ nhạy cao, đồng thời thỏa mãn những yêu cầu trong phép phân tích vi lượng [18].

Áp dụng trên mẫu thật

Quy trình được áp dụng trên 4 mẫu bùn lắng với nồng độ methyl thủy ngân khác nhau. Các mẫu này được lấy dọc theo lưu vực sông Mekong. Kết quả của 4 mẫu lần lượt như sau: $0,128 \pm 0,004$; $0,052 \pm 0,004$; $0,460 \pm 0,004$ và $0,197 \pm 0,004$. Trong quá trình phân tích MeHg trong các mẫu bùn lắng, một vài peak lạ xuất

hiện trong sắc ký đồ (Hình 7). Mẫu này đại diện cho mẫu bùn MeHg nồng độ thấp và Hg^{2+} nồng độ rất cao.



Hình 7. Sắc ký đồ tiêu biểu của mẫu bùn lắng

KẾT LUẬN

Đề tài đã ghép nối thành công hệ thống GC-AFS và đã tối ưu hóa được các thông số cần thiết cho quá trình phân tích. Đồng thời, một quy trình xử lý mẫu xác định MeHg trong mẫu bùn lắng đã được xây dựng thành công và được áp dụng vào phân tích các mẫu thật, kết quả được kiểm chứng thông qua số liệu của hiệu suất thu hồi trên các loại nền mẫu có hàm lượng TOC khác nhau. Những thành quả đã đạt được là cơ sở cho những nghiên cứu tiếp theo về thủy ngân và các hợp chất của chúng ở những hàm lượng rất thấp ví dụ quan trắc hàm lượng MeHg trong môi trường, đặc biệt trong TP.HCM nói riêng và Việt Nam nói chung.

Methods development for the determination of methyl mercury in sediment samples using gas chromatography with atomic fluorescence detection

- Trieu Quoc An
- Tran Phuong Huy
- Nguyen Van Dong

University of Science, VNU-HCM

ABSTRACT

An analytical method for methylmercury (MeHg) using gas chromatography with atomic fluorescence detection is studied. The instrumental system is made based on a old gas chromatograph interfaced with an atomic fluorescence detector which is specific to Hg, currently available in our lab. Operating parameters for the GC-AFS system are optimised and analytical performances of the system are verified by quality control chart for stability. MeHg in sediment is leached and extracted to dichloromethane (DCM) in the presence of

nitric acid, potassium chloride and copper sulfate. DCM in the extract is purged and MeHg is back extracted to aqueous phase followed by ethylation with sodium tetraethylborate in acetate buffer pH 5.3 containing potassium oxalate. The ethylated MeHg is then extracted to hexane and injected to GC-AFS for quantitation. The instrumental detection limit and method detection limit are 0.5 pg MeHg and 0.029 ppb MeHg (as Hg), respectively. The method can be applied for the determination of MeHg in soil, sludge and sediment samples

Key words: gas chromatography, atomic fluorescence spectrometry detection, Methylmercury, sediment and sludge samples.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] C. Sanfeliu, J. Sebastia, R. Cristofol, E. Rodriguez-Farre, Neurotoxicity of organomercurial compounds, *Neurotoxicity Research*, 5, 283 (2003).
- [2] F. Bakir, S.F. Damluji, L. Amin-Zaki, M. Murtadha, A. Khalidi, N.Y. Al-Rawi, S. Tikriti, H.I. Dhahir, T.W. Clarkson, J.C. Smith, R.A. Doherty, Methylmercury Poisoning in Iraq, *Science*, 181, 230-241 (1973).
- [3] B. Vallant, R. Kadnar, W. Goessler, Development of a new HPLC method for the determination of inorganic and methylmercury in biological samples with ICP-MS detection, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 22, 322-325 (2007).

- [4] L. Lambertsson, E. Lundberg, M. Nilsson, W. Frech, Applications of enriched stable isotope tracers in combination with isotope dilution GC-ICP-MS to study mercury species transformation in sea sediments during ethylation and determination, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 16, 1296-1301 (2001).
- [5] S. Rapsomanikis, J. Craig, Speciation of mercury and methylmercury compounds in aqueous samples by chromatography-atomic absorption spectrometry after ethylation with sodium tetraethylborate, *Analytica Chimica Acta*, 248, 563-567 (1991).
- [6] J. Qian, U. Skyllberg, Q. Tu, W.F. Bleam, W. Frech, Efficiency of solvent extraction methods for the determination of methyl mercury in forest soils, *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 367, 467-473 (2000).
- [7] Y. Cai, S. Monsalud, K. G. Furton, Determination of methyl- and ethylmercury compounds using gas chromatography atomic fluorescence spectrometry following aqueous derivatization with sodium tetraphenylborate, *Chromatographia*, 52, 82-86 (2000).
- [8] Agency, U.S.E.P., Methyl Mercury in Water by Distillation, Aqueous Ethylation, Purge and Trap, CVAFS, in Method 1630 (2001).
- [9] S. Diez, J.M. Bayona, Determination of Hg and organomercury species following SPME: a review, *Talanta*, 77, 21-7 (2008).
- [10] L. Liang, M. Horvat, E. Cernichiari, B. Gelein, S. Balogh, Simple solvent extraction technique for elimination of matrix interferences in the determination of methylmercury in environmental and biological samples by ethylation-gas chromatography-cold vapor atomic fluorescence spectrometry, *Talanta*, 43, 1883-1888 (1996).
- [11] M. Horvat, N.S. Bloom, L. Liang, Comparison of distillation with other current isolation methods for the determination of methyl mercury compounds in low level environmental samples.1. sediments, *Analytica Chimica Acta*, 281(1), 135-152 (1993).
- [12] M. Mailman, R.A. Bodaly, Total mercury, methyl mercury, and carbon in fresh and burned plants and soil in Northwestern Ontario, *Environmental Pollution*, 138, 161-166 (2005).
- [13] C.M. Tseng, A.D. Diego, F.M. Martin, O.F.X. Donard, Rapid and Quantitative Microwave-assisted Recovery of Methylmercury From Standard Reference Sediments, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 12, 629-635 (1997).
- [14] D.Y. Yang, , H.Y.T. Truong, Y.W. Chen, N. Belzile, Improvements of reliability for methylmercury determination in environmental samples, *Analytica Chimica Acta*, 633, 157-164 (2009).
- [15] H.L. Armstrong, W.T. Corns, P.B. Stockwell, G. O'Connor, L. Ebdon, E.H. Evans, Comparison of AFS and ICP-MS detection coupled with gas chromatography for the determination of methylmercury in marine samples, *Analytica Chimica Acta*, 390, 245-253 (1999).
- [16] K.C. Bowles, S.C. Apte, Determination of methylmercury in sediments by steam distillation/aqueous-phase ethylation and atomic fluorescence spectrometry, *Analytica Chimica Acta*, 419, 145-151 (2000).
- [17] H. Hintelmann, H.T. Nguyen, Extraction of methylmercury from tissue and plant samples by acid leaching, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 381, 360-365 (2005).
- [18] Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals A. INTERNATIONAL, Editor 2002.