



Treball Final de Grau

Analytical performance of an on-line preconcentration system to determine mercury speciation in water.

Rendiment analític d'un sistema de preconcentració en línia per a la determinació d'espècies de mercuri en aigua.

Roger Peró Gascón

Gener de 2014

Aquesta obra està subjecta a la llicència de:
Reconeixement–NoComercial–SenseObraDerivada



<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/es/>

Dubta sempre de tu mateix, fins que les dades no hi permetin ja dubtes.

Louis Pasteur

Vull agrair a la Dra. Àngels Sahuquillo i al Dr. Fermín López haver-me ofert l'oportunitat de desenvolupar aquest TFG en el seu grup de recerca i, especialment, a l'Àngels per guiar-me en aquest projecte i per la seva ajuda i suport.

Gràcies a en Sergio per la seva paciència, per resoldre els meus dubtes i, juntament amb la Virgínia, pels bons moments que hem compartit en el laboratori.

El meu agraïment es fa extensiu a l'Ariane, a en Toni, a l'Albert, a la Carmen i a la Gema per facilitar-me la integració al grup i pel seu gran sentit de la companyonia.

REPORT

CONTENTS

1. SUMMARY	3
2. RESUM	5
3. INTRODUCTION	7
3.1. WATER POLLUTION AND METAL TOXICITY	7
3.2. MERCURY IN THE ENVIRONMENT	8
3.3. MERCURY SPECIATION AND TOXICITY	10
3.4. DETERMINATION OF MERCURY SPECIATION IN WATER	12
4. OBJECTIVE	14
5. PROCEDIMENT EXPERIMENTAL	14
5.1. INSTRUMENTACIÓ I APARELLS	14
5.1.1. Aparells	14
5.1.2. Instrumentació per a la determinació del contingut total de mercuri	15
5.1.3. Instrumentació per a l'especiació de mercuri	16
5.1.4. Instrumentació del sistema de preconcentració en línia	19
5.1.5. Altres instruments	21
5.2. REACTIUS, PATRONS I MATERIAL DE REFERÈNCIA	21
5.2.1. Reactius	21
5.2.2. Patrons	22
5.2.3. Material de referència certificat	22
5.3. METODOLOGIA ANALÍTICA	23
5.3.1. Determinació del contingut total de mercuri	23
5.3.2. Especiació de mercuri	23
5.3.3. Sistema de preconcentració en línia	25
6. RESULTATS I DISCUSSIÓ	26
6.1. OPTIMITZACIÓ DEL SISTEMA DE PRECONCENTRACIÓ	26

6.1.1. Selecció de la longitud de la columna de preconcentració	26
6.1.2. Avaluació de les condicions òptimes de preconcentració	32
6.1.3. Aplicació del mètode de preconcentració en la determinació de mostres ambientals	34
6.1.3.1. <i>Caracterització de les mostres ambientals i del CRM</i>	35
6.1.3.2. <i>Experiments amb les mostres ambientals</i>	36
6.2. ESTABLIMENT DELS PARÀMETRES DE QUALITAT DEL MÈTODE	40
6.2.1. Exactitud del mètode	40
6.2.2. Sensibilitat i interval de linealitat	43
6.2.3. Límits de detecció i de quantificació	44
6.2.3.1. <i>Sistema de preconcentració en línia vs. injecció directa</i>	45
6.2.3.2. <i>Comparació bibliogràfica</i>	48
7. CONCLUSIONS	50
8. REFERENCES AND NOTES	51
9. ACRONYMS	53

1. SUMMARY

Mercury and mercury containing compounds are ubiquitous global pollutants because of their mobility in the environment. Its determination in a variety of samples has become a very important issue due to its high toxicity as well as its accumulative and persistent character. Moreover, mercury is present in several forms which determine its distribution and toxicity.

Its determination is particularly relevant in water since safe drinking water is essential to humans and its contamination has a great impact in human health. Directive 2008/105/EC of the European Parliament and the Council on environmental quality standards in the field of water policy identifies mercury and its compounds as priority hazardous substances.

In the waters, the most relevant mercury species are inorganic mercury (Hg^{2+}) and methylmercury (MeHg^+), the most toxic and bioaccumulative form of mercury.

For these reasons, accurate and reliable determinations of mercury in waters are crucial, especially the determination of the mercury species. Highly sensitive methods are needed owing to the low concentration of mercury species in water samples. An on-line preconcentration system based in the coupling of HPLC with an atomic fluorescence detector can provide high sensitivity and low detection limits and it has lower investment and maintenance costs than using ICP-MS as analytical technique.

This work was aimed to optimize a method for mercury speciation in water samples using an on-line preconcentration system and to apply the developed analytical methodology in environmental samples. Analytical performance of the on-line preconcentration system was evaluated by determining different quality parameters: detection and quantification limits, accuracy, reproducibility and recovery.

The sensitive and robust on-line preconcentration-HPLC-UV-CV-AFS system was a consistent method for the speciation analysis of the two mercury chemical forms in water samples. Optimum results were achieved with an ODS Hypersil (C_{18} ; reverse phase) 2 cm length column for the preconcentration of the species.

A sensitive preconcentration method to determine mercury speciation in environmental water samples is described in this study. Preconcentration of 4 mL are required for the

determination of any kind of water sample. Adequate preconcentration factors and high recoveries were obtained as is shown in the table below.

Specie	Preconcentration factor	Recovery [%]	Relative standard deviation [%]
MeHg⁺	30	74 ± 11	15
Hg²⁺	32	81 ± 11	14

Calibration curves showed high sensitivity, high dynamic range and good linearity in standards concentration range (5–750 µg/L). Low limits of detection and low limits of quantification were achieved and they were very similar to the bibliographic data reviewed. Accuracy of the proposed method was demonstrated by the analysis of the ERM-CA713 certified reference material.

Keywords: Mercury, speciation analysis, preconcentration, inorganic mercury, methylmercury, water samples.

2. RESUM

El mercuri i els seus compostos estan considerats contaminants pràcticament omnipresents en l'ambient a causa de la seva mobilitat en el medi. La seva determinació en una àmplia varietat de mostres ha esdevingut un tema molt important per la seva elevada toxicitat així com el seu caràcter acumulatiu i persistent. D'altra banda, el mercuri està present en diverses formes, que determinen la seva distribució i toxicitat.

La determinació del mercuri en aigua és particularment important ja que l'aigua potable és essencial per als éssers humans i la seva contaminació té un gran impacte en la seva salut. És per això que la Directiva 2008/105/EC del Parlament Europeu i del Consell sobre normes de qualitat ambiental en l'àmbit de la política d'aigües identifica el mercuri i els seus compostos com a substàncies perilloses prioritàries.

En les aigües, les espècies de mercuri més rellevants són el mercuri inorgànic (Hg^{2+}) i el metilmercuri (MeHg^+), l'espècie més tòxica i bioacumulable.

Per aquestes raons, la determinació exacta i fiable de mercuri en les aigües és vital, especialment la determinació de les seves espècies. A causa de la baixa concentració de les espècies de mercuri en les mostres d'aigua, són necessaris mètodes de determinació altament sensibles. Un sistema de preconcentració en línia basat en l'acoblament de HPLC amb un detector de fluorescència atòmica pot proporcionar una elevada sensibilitat i límits de detecció baixos i requereix una menor inversió i costos de manteniment que un ICP-MS.

Aquest treball va tenir com a objectiu optimitzar un mètode per a l'especiació de mercuri en mostres d'aigua mitjançant un sistema de preconcentració en línia i aplicar la metodologia analítica desenvolupada en mostres ambientals. El rendiment analític del sistema de preconcentració en línia es va avaluar a partir de la determinació de diferents paràmetres de qualitat: els límits de detecció i de quantificació, l'exactitud, la reproductibilitat i la recuperació.

El sensible i robust sistema en línia de preconcentració-HPLC-UV-CV-AFS va ser un mètode consistent per a l'anàlisi de l'especiació de les dues formes de mercuri en mostres d'aigua. Els resultats òptims es van obtenir en preconcentrar les espècies mitjançant una columna ODS Hypersil (C_{18} ; fase inversa) de 2 cm de longitud.

En aquests estudi, es descriu un sensible mètode de preconcentració per a la determinació de l'especiació de mercuri en mostres d'aigües ambientals. És necessària la preconcentració de 4 mL de mostra per a la determinació de qualsevol tipus d'aigua. Es van obtenir factors de preconcentració adequats i recuperacions elevades, com es mostra a la següent taula.

Espècie	Factor de preconcentració	Recuperació [%]	RSD [%]
MeHg⁺	30	74 ± 11	15
Hg²⁺	32	81 ± 11	14

Les rectes de calibratge van mostrar una elevada sensibilitat i un ampli interval lineal, amb una bona linealitat en el rang de concentracions dels patrons (5–750 µg/L). Es van assolir límits de detecció i de quantificació baixos i molt semblants a les dades bibliogràfiques ressenyades. L'exactitud del mètode proposat es va demostrar per l'anàlisi del material de referència certificat ERM-CA713.

Paraules clau: mercuri, especiació, preconcentració, mercuri inorgànic, metilmercuri, mostres d'aigua.

3. INTRODUCTION

3.1. WATER POLLUTION AND METAL TOXICITY

Pollution has always been linked with humanity. Prehistoric man created the first fires in caves and there are several evidences of the high levels of pollution associated with inadequate ventilation (1). The forging of metals intensified air pollution later (2). However, it was not until 1950s, after the Second World War, that pollution became a popular issue because of atomic warfare and testing. Severe incidents due to specific highly toxic or bio-accumulative compounds have increased the attention to food safety and environmental pollution (3, 4, 5).

Among the different forms of pollution, water pollution is one of the most relevant studied systems. It not only has a great impact in the environment, but also in human health because safe drinking water is essential to humans. Pollutants may include organic and inorganic substances. From inorganic pollutants, toxic metals have been stated to severely affect living organisms in certain forms and doses. In very small amounts, many of these metals are necessary to support life. However, in larger amounts, they become toxic.

Metal toxicity may take many different forms: poisonous soluble compounds, metals in an oxidation state abnormal to the body, for example chromium (III) is an essential trace element but chromium (VI) is a carcinogen, radioactive metals, such as polonium and plutonium, and metals that may imitate the action of an essential element in the body, interfering with the metabolic process. With regard to the substantial evidence of toxic metal harmful effects and that they are cumulative and non-biodegradable, detection of toxic metals and prevention policies are required.

Directive 2008/105/EC of the European Parliament and the Council on environmental quality standards in the field of water policy established a list of 33 priority substances, selected from amongst those presenting a significant risk to the aquatic environment, in Annex II (6). The Commission reviewed the list and in 2012 it put forward a proposal (COM(2011)876) (7) that includes a revised list of priority substances. It identifies some heavy metals as priority hazardous substances: cadmium and mercury and its compounds. Lead and nickel and its compounds are also priority substances.

European Union list of elements of highest concern includes some heavy metals such as arsenic, cadmium, cobalt, chromium, mercury, manganese, and lead. Within that group, mercury (Hg) is regarded as one of the most harmful elements to human and ecosystem health due to its high toxicity as well as its accumulative and persistent character. Mercury has no beneficial biological function and its presence in living organisms is undesired (8).

3.2. MERCURY IN THE ENVIRONMENT

Mercury is an extremely rare element in the Earth's crust having an average crustal abundance by mass of only 0.08 parts per million (ppm). The most common mercury ore is cinnabar, mercury sulfide (HgS) (9). Figure 1 shows a picture of this ore.



Figure 1. Cinnabar, the principal ore of mercury (Andel, 23/12/13 via Wikimedia Commons, Creative Commons Attribution)

Mercury is released into the environment from both natural sources and processes and as a result of human activities. Once it has entered the environment, mercury cycles between air, land and water until it is eventually removed from the system through burial in deep ocean or lake sediments and through entrapment in stable mineral compounds (10). Figure 2 shows a model of the global mercury cycle that illustrates the main environmental compartments and the ways in which natural and anthropogenic releases as well as re-emissions of mercury previously deposited move between these compartments.

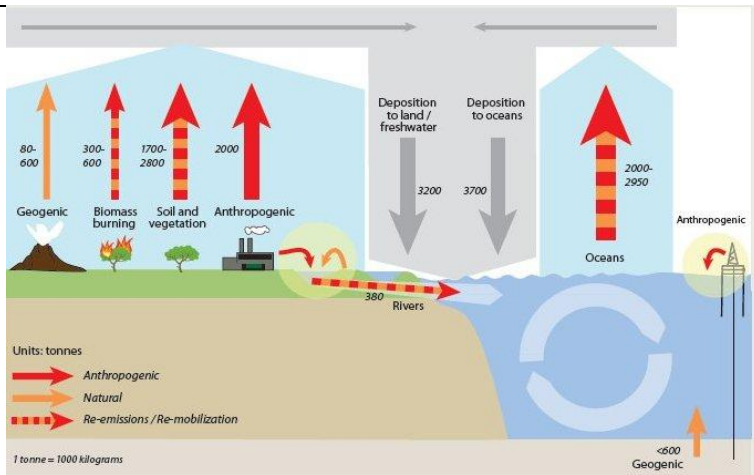


Figure 2. Global mercury cycling (image taken from *Global Mercury Assessment 2013*, ref. 10).

Coal combustion, gold mining and metal production have been stated as the most relevant anthropogenic sources of mercury worldwide (10) as it is shown in figure 3.

Global anthropogenic mercury emissions in 2010

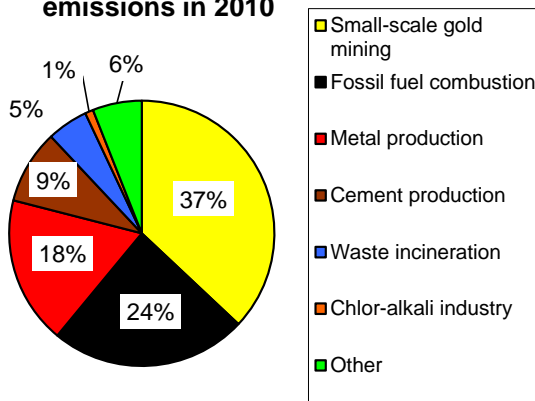


Figure 3. (Adapted from *Global Mercury Assessment 2013*, ref. 10).

Anthropogenic releases of mercury to water include point sources such as power plants, contaminated places such as old mines and small-scale gold mining and deforestation. In 2013 anthropogenic releases to waters are likely to be at least 1000 tons per year (10). These releases had increased the amount of mercury in oceans surface but their effects are lesser in deeper water.

Mercury has a large number of applications. It is used in dental amalgams, in some thermometers, especially the ones which are used to measure high temperatures, in batteries, in mercury quartz and luminescent lamps and as fungicide in agriculture. Some products containing Hg are shown in figure 4.

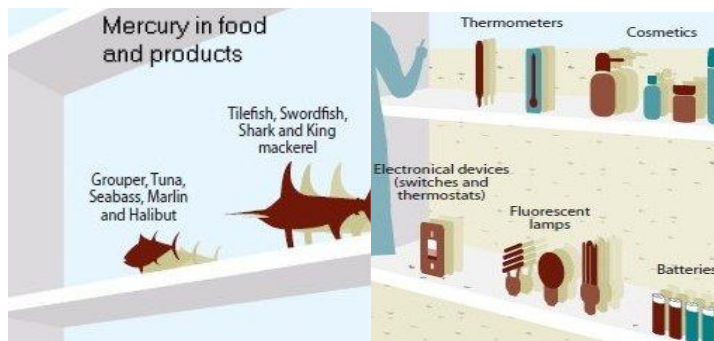


Figure 4. Mercury in food and commercial products (Kirby *et al*, ref. 11).

However, most of the other applications such as chlorine and sodium hydroxide production in chloralkali plants and medical uses as topical antiseptic or as a preservative in vaccines are slowly phased out due to the risk that could represent to health.

3.3. MERCURY SPECIATION AND TOXICITY

Mercury is present in several forms which determine its distribution and toxicity. This element is found in three oxidation states: metallic mercury (Hg^0) as vapor or liquid metal; mercurous (Hg_2^{2+}) as inorganic salts; and mercuric (Hg^{2+}), as inorganic salt or organomercury compounds. In the organometallic derivatives, the mercury atom is covalently bound to one or two carbon atoms.

Although all mercury species are toxic, the effects are closely related to its chemical form. The most relevant species in the environment are elemental mercury (Hg^0), inorganic mercury (Hg^{2+}), monomethylmercury (CH_3Hg^+ , MeHg^+), dimethylmercury (CH_3HgCH_3 , DMeHg) and monoethylmercury ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{Hg}^+$, EtHg^+). Organic mercury compounds tend to be much more toxic than inorganic mercury, and this one more toxic than the elemental form, due to their high biomagnification factors in the food chain and their high liposolubility. They are absorbed, transported through biological membranes and accumulated on nerve cells.

In the biogeochemical cycle of Hg, the species may be converted. A relevant transformation process in aquatic environments is inorganic mercury conversion into monomethylmercury by

microorganisms and microalgae (12). MeHg^+ is readily absorbed by insects and other aquatic organisms and is rapidly accumulated through the aquatic food chain. The concentrations of mercury are determined by the life span of the fish and its feeding habits. The highest concentrations are found in large fish such as swordfish and sharks (13).

The health scares concerning mercury have been numerous since the best-known case, the Minamata Bay disaster in Japan in 1956. Minamata is a small industrial town on the coast of the Shiranui Sea. The major industrial firm in Minamata, the Chisso Corporation, dumped some 37 tons of mercury containing compounds into Minamata Bay from 1932 to 1968. As a result, thousands of local residents, whose normal diet included fish from the bay, developed symptoms of methylmercury poisoning. Since then, there have been many warnings about eating fish and shellfish known to contain high levels of mercury. The most recent recommendations of the United States Environmental Protection Agency (EPA) and the Food and Drug Administration warn women of child-bearing age and young children not to eat shark, swordfish, king mackerel, or tilefish (13).

Mercury poisoning toxicity includes damage to the central nervous system, brain, kidneys and lungs and can result into several diseases such as Minamata disease (3) or Hunter-Russell syndrome. Figure 5 shows mercury exposure pathways and its toxic effects.

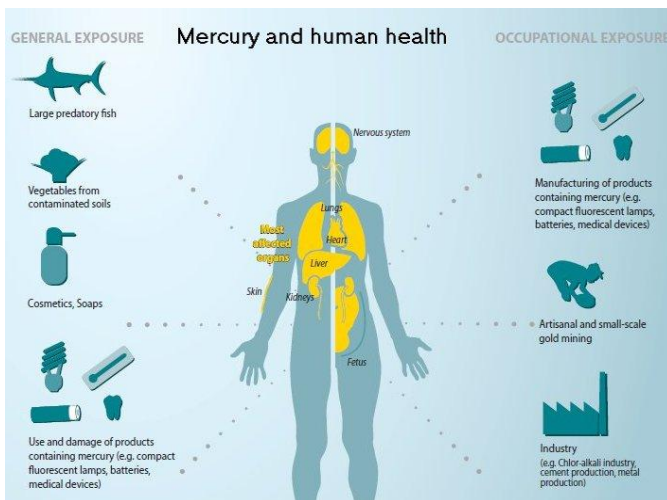


Figure 5. Exposure to mercury and its toxicity (Kirby *et al*, ref. 11).

Because of its importance in the environment, accurate and reliable determinations of mercury are crucial, especially the determination of the mercury species.

3.4. DETERMINATION OF MERCURY SPECIATION IN WATER

In the waters, methylmercury levels tend to be much lower than those of inorganic mercury due to decomposition of organic compounds by solar UV light and the difficulty of methylation reactions in aqueous phase. In sediments and biota, bioaccumulation may increase methylmercury levels.

Since mercury concentrations in waters are expected to be very low (14), effective and highly sensitive methods are required. Furthermore, simple and rapid speciation analysis methods are also needed. Speciation analysis is defined as the “analytical activities of identifying and/or measuring the quantities of one or more individual chemical species in a sample” (15).

Great efforts have been devoted to develop reliable methodologies for mercury determination and speciation analysis. In the available literature, different separation techniques have been used including liquid chromatography (LC), gas chromatography (GC) and capillary electrophoresis (CE). Separation techniques have been coupled to measurement techniques for mercury detection at low concentrations including cold vapor atomic absorption spectrometry (CV-AAS), cold vapor atomic fluorescence spectrometry (CV-AFS), inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES) and inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS).

The combination of GC with atomic spectrometers is popular for mercury speciation owing to its high separation power and excellent detectability but requires precolumn derivatization of mercury to volatile and thermally stable species.

CE rapid separation speed with high efficiency and very small sample volume requirement are its main advantages. However, its precision, sensitivity and reproducibility for mercury speciation are lower to those of GC-HPLC related methods.

HPLC is also a powerful separation technique, easily coupled to a detector and it can be directly applied to non-volatile compounds. Reverse phase (RP) columns with a mobile phase containing an organic modifier and a chelating or ion pair reagent are often used for HPLC separation of mercury species in environmental matrices.

In many cases, direct coupling of HPLC to a detector is not sensitive enough to analyze real samples because of the quite low concentration of mercury species. Especially for environmental water samples analysis, preconcentration methods such as cloud point extraction

(CPE), solid phase extraction (SPE), solid phase microextraction (SPME) as well as dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME) before chromatographic separation are usually necessary (16, 17).

In most applications, SPE is hyphenated to HPLC. A diversity of sulphur containing complexing agents such as dithizone (18), dithiocarbamates and 2-mercaptoethanol (16, 19) have been used for sorption of mercury species on C₁₈ solid phase considering that this complexes are very easily retained. Because of the HPLC separation, the presence of a complexing agent in the mobile phase and in the sample solution is necessary for highly effective separation of the chemically and structurally very different compounds such as mercury species.

Post-column chemical vapour generation (CVG) is also often used to improve the sensitivity and decrease the matrix effects. Before CV system, the conversion of organomercury species to Hg²⁺ after separation is required to obtain higher sensitivity because vapour generation efficiency is highly dependent on mercury species (20). Chemical oxidation, UV irradiation, microwave heating or an external heat source are used to facilitate the decomposition of organomercury species.

In chromatographic methods, ICP-MS and CV-AFS remain the most effective detectors due to their high sensitivity (21). Compared to ICP-MS, an on-line preconcentration system coupled to CV-AFS has very similar sensitivity and linear range, but is a simpler set-up and has lower investment and maintenance costs.

For these reasons, cold vaporization followed by atomic fluorescence spectrometry is a popular method for mercury determination. The cold vapor technique is an atomization method only applicable to the determination of mercury because it is the only metallic element that has an appreciable vapor pressure at ambient temperature. Mercury species are converted to Hg²⁺ by oxidizing treatment of samples followed by reduction of the Hg²⁺ to metallic mercury with SnCl₂. Free mercury atoms in a carrier gas are excited by a collimated UV light source at a wavelength of 253.7 nanometers. The excited atoms emit their absorbed energy at this same wavelength. The fluorescence is omnidirectional and may be detected using a photomultiplier tube or UV photodiode as is shown in figure 6.

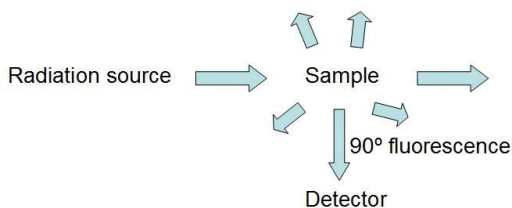


Figure 6. Schema of an atomic fluorescence detector.

AFS differs from atomic absorption spectrometry (AAS) in that it is more sensitive because the fluorescence signal has a very low background. It is also more selective and it is linear over a wide range of concentrations. However, any molecular species present in the carrier gas will quench the fluorescence signal. For this reason, the technique is most commonly used with an inert carrier gas such as argon.

4. OBJECTIVE

The objective of this work is to optimize a method for mercury speciation in water samples using an on-line preconcentration system based in the coupling of HPLC with an atomic fluorescence detector. Subsequently, developed analytical methodology is applied in environmental samples such as tap water and still mineral water. Analytical performance of the on-line preconcentration system is evaluated by determining quality parameters: detection and quantification limits, accuracy, reproducibility and recovery.

5. PROCEDIMENT EXPERIMENTAL

5.1. INSTRUMENTACIÓ I APARELLS

5.1.1. Aparells

- Pipetes automàtiques: per tal de preparar les dissolucions patró i les dissolucions de treball fortificades es van usar pipetes automàtiques Rainin EDP3-Plus de volums 1000, 2000 i 5000 μL .

- Nevera: les dissolucions patró i el material de referència es van emmagatzemar a 4°C en una nevera Savoid.
- Agitador magnètic: per tal d'homogeneïtzar les dissolucions es va emprar una placa calefactora amb agitació magnètica model A-06 de SBS Instruments i un nucli magnètic.
- Dispensador d'aigua Milli-Q: sistema Elix 3- Milli-Q Gradient A10 Millipore.

5.1.2. Instrumentació per a la determinació del contingut total de mercuri

El mètode de determinació del contingut total de mercuri es basa en l'acoblament d'un generador de vapor fred amb detecció per espectrometria de fluorescència atòmica. Per a la determinació del contingut total de mercuri, les espècies de mercuri s'oxiden a Hg^{2+} i aquest es redueix a mercuri metàl·lic amb $SnCl_2$. El mercuri elemental es condueix al detector AFS i es mesura la fluorescència a 253,7 nm (22). Les dades s'adquireixen mitjançant el programa informàtic Avalon.

La instrumentació es descriu més detalladament a continuació:

- Generador de vapor fred (CV): sistema de generació d'hidrurs P. S. Analytical model 10.004. Consta d'una bomba peristàtica multicanal de velocitat constant (100 rpm) que bombeja la dissolució reductora i permet la formació de vapor de mercuri en un bucle de reacció. El vapor format es transfereix a un separador gas-líquid, s'arrossega cap al detector mitjançant un corrent d'argó (gas portador, 300 mL/min) i s'asseca en una membrana PermaPure mitjançant nitrogen a contracorrent (gas d'assecat, 2,5 L/min). A la figura 7 es mostra l'esquema del generador de vapor fred.

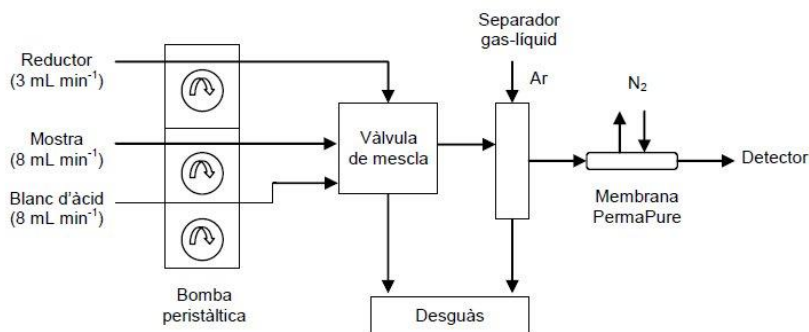


Figura 7. Esquema del generador de vapor fred.

- Detector d'espectrometria de fluorescència atòmica (AFS): espectrofotòmetre de fluorescència atòmica P. S. Analytical Merlin 10.023. Permet la detecció de mercuri amb una elevada sensibilitat. A la figura 8 es mostra la configuració òptica del detector.

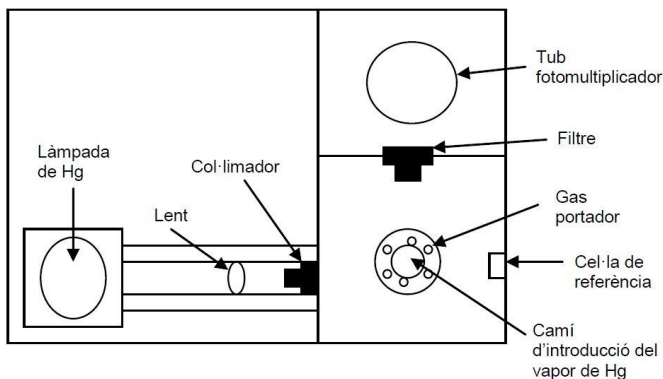


Figura 8. Configuració òptica del detector AFS.

La tècnica es fonamenta en el fenomen de la fluorescència, la propietat d'una substància d'emetre radiació en ser irradiada prèviament. La radiació d'excitació requerida s'aconsegueix amb una làmpada de mercuri específica i un filtre fixat a 254 nm. L'ús d'aquests dos elements fan que el detector sigui molt selectiu i ajuda a la minimització d'efectes d'interferència.

El mercuri entra en el detector en estat gasós i es condueix cap a una cel·la de mesura. El mercuri en forma de vapor absorbeix la radiació, es promociona a un estat energètic superior i, posteriorment, torna al seu estat fonamental, emetent radiació a la seva longitud d'ona característica (253,7 nm):



Un tub fotomultiplicador detecta l'emissió de fluorescència que prové de la mostra. La font de radiació i el tub fotomultiplicador es troben en angle recte (90°) un respecte l'altre per tal de mesurar el senyal de fluorescència sense interferències de la font.

5.1.3. Instrumentació per a l'especiació de mercuri

El mètode utilitzat per a l'especiació de mercuri està basat en l'acoblament de cromatografia de líquids d'alta resolució (HPLC) – radiació ultraviolada (UV) – generació de

vapor fred (CV) – espectrometria de fluorescència atòmica (AFS). A la figura 9 es pot veure un esquema de l'acoblament.

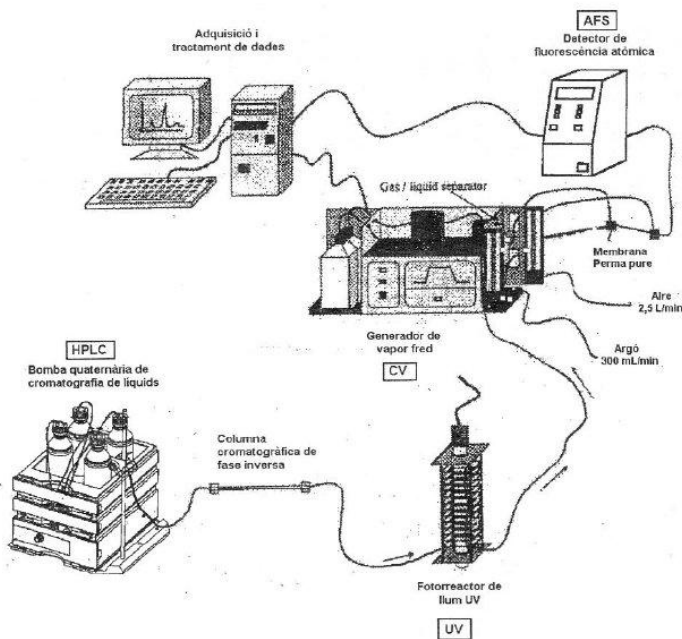


Figura 9. Esquema de l'acoblament HPLC-UV-CV-AFS.

La dissolució patró o problema s'injecta manualment en el sistema cromatogràfic a través d'un bucle d'injecció de 100 μL . Les espècies de mercuri (Hg^{2+} , MeHg^+) se separen en la columna cromatogràfica i es transfereixen al fotoreactor UV, on les espècies organomercuriques són degradades i tot el mercuri esdevé mercuri inorgànic. El Hg^{2+} arriba al generador de vapor fred, on es barreja amb el reductor i s'obté vapor de mercuri metàl·lic, que es transfereix al detector d'AFS mitjançant un corrent d'argó. El control de l'instrument i l'adquisició de les dades es realitza amb el programa informàtic Pendragon 1.0.

A continuació es descriu més detalladament la instrumentació emprada per a l'especiació de mercuri, ometent el generador de vapor fred i el detector de fluorescència, que s'han explicat en el subapartat 5.1.2.

- Sistema HPLC:
 - Injector manual Rheodyne 7725i d'acer inoxidable (SS).

- Bucle d'injecció de 100 μL de SS.
- Bomba quaternària Agilent 1100:
 - o Interval de cabal: 0,001 – 10 mL min^{-1} .
 - o Pressió: Rang operatiu 0 – 400 bar fins 5 mL min^{-1} .
Rang operatiu 0 – 200 bar fins 10 mL min^{-1} .
 - o Rang de pH recomanat: 1,0 a 12,5.
- Columna cromatogràfica: ODS Hypersil (C_{18} ; fase inversa) Thermo Hypersil-Keystone.
 - o Dimensions: 250 x 4,6 mm; diàmetre de partícula: 5 μm ; diàmetre de porus: 120 Å.
 - o Pressió màxima: 400 bar.
 - o Rang de pH: 2 a 8.
- Fotoreactor UV: per tal de degradar els compostos organomercúrics s'usa un fotoreactor que consta d'una làmpada de radiació ultraviolada (UV) i d'un tub de tefló (PTFE) enrotllat en espiral on té lloc la fotoreacció. La làmpada UV és una làmpada Heraeus TQ 150 que genera 150W de radiació al voltant de 250 nm. 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. L'esquema del fotoreactor UV es mostra a la figura 10.

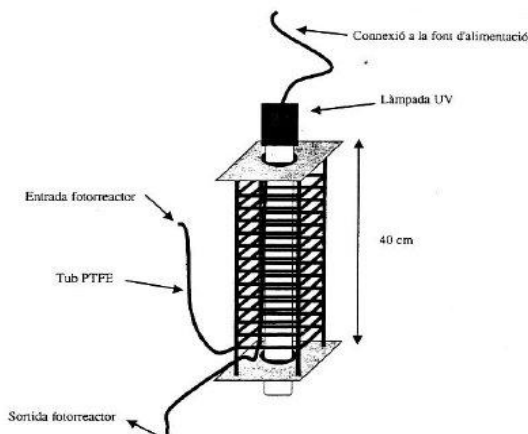


Figura 10. Esquema del fotoreactor UV.

5.1.4. Instrumentació del sistema de preconcentració en línia

Donat que els límits de detecció (LOD) del sistema acoblat són massa elevats per a l'especiació de mercuri en mostres d'aigua, es va optar per un sistema de preconcentració en línia, incorporant una columna de preconcentració prèvia a l'acoblament HPLC-UV-CV-AFS. Per preconcentrar les dissolucions de treball en aquesta columna, s'usa una bomba isocràtica.

- Bomba isocràtica Agilent 1260 Infinity:
 - Interval de cabal: 0,2 – 10,0 mL min⁻¹.
 - Pressió: Rang operatiu 0 – 600 bar fins 5 mL min⁻¹.

Rang operatiu 0 – 200 bar fins 10 mL min⁻¹.

Les especificacions de la columna de preconcentració són les mateixes de la columna cromatogràfica excepte que té una longitud menor. Es van estudiar columnes de 10, 20 i 50 mm de longitud. A la figura 11 es mostra una fotografia del sistema de preconcentració en línia, realitzant un augment de la imatge en la columna de preconcentració.

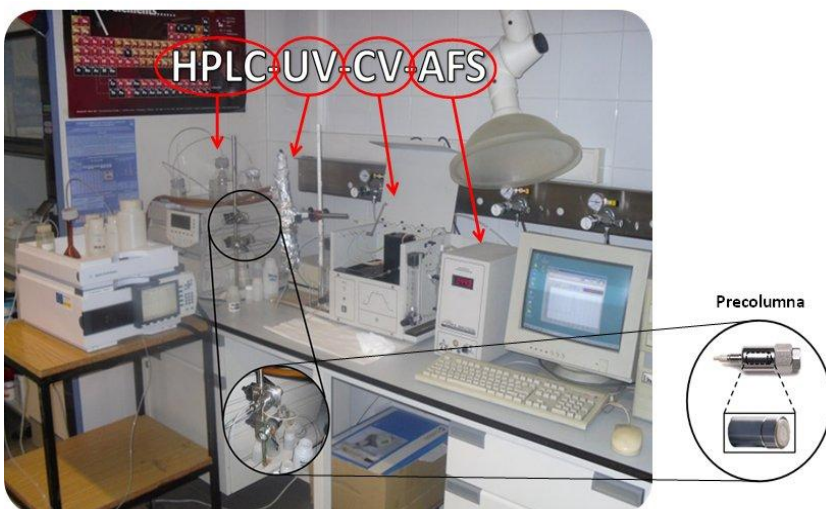
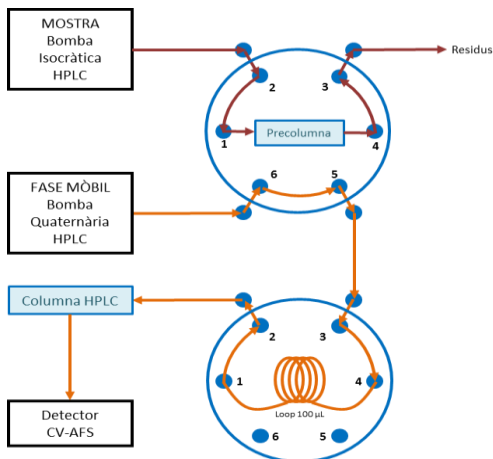


Figura 11. Sistema de preconcentració en línia per a la determinació d'espècies de mercuri en aigua.

Per a l'acoblament del sistema de preconcentració amb l'HPLC-UV-CV-AFS es disposa de dues vàlvules, cadascuna amb sis vies i dues posicions. A la figura 12 es mostra l'esquema de la posició de les vàlvules en les etapes de preconcentració de les espècies de mercuri (A) i d'elució (B).

A)



B)

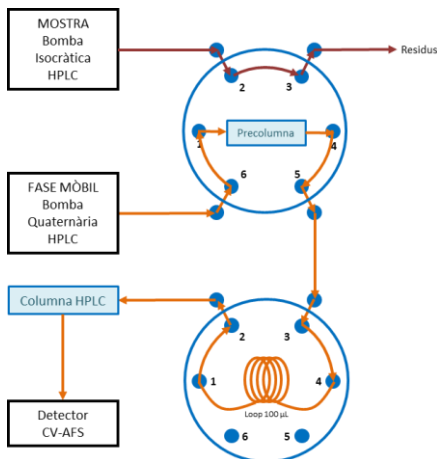


Figura 12. Posició de les vàlvules en les etapes de: A) Preconcentració. B) Elució.

Tal com s'indica a la figura anterior, la vàlvula superior té connectades la bomba isocràtica, que impulsa la dissolució de treball, la columna de preconcentració per dues vies i la bomba HPLC, que impulsa la fase mòbil (FM). La vàlvula inferior té connectats el bucle d'injecció de 100 μL i la columna cromatogràfica. Ambdues vàlvules estan connectades de manera que el flux surt de la vàlvula superior i entra a la vàlvula inferior.

En l'etapa de preconcentració (A) la vàlvula superior està en posició de càrrega. La dissolució de treball es bombeja, passa per la columna de preconcentració, on es retenen les

espècies de Hg i després es recull en el rebuig. La FM passa a flux constant per les dues vàlvules i continua pel sistema HPLC-UV-CV-AFS, sense haver passat per la precolumna ni interaccionat amb les espècies d'interès de la dissolució de treball. En l'etapa de preconcentració no s'enregistra cap cromatograma.

A continuació de l'etapa de preconcentració (A) es procedeix a la d'elució (B). La vàlvula superior es canvia a la posició d'injecció i la FM passa per la columna de preconcentració. La FM elueix les espècies de mercuri cap a la columna cromatogràfica. En aquesta etapa la bomba isocràtica es manté aturada.

5.1.5. Altres instruments

- Balança analítica: les pesades dels sòlids per a la preparació de la FM es van realitzar amb una balança analítica precisa model 205A Superbal Series, amb una precisió de 0,1mg.
- Balança granetari: les pesades de la dissolució reductora es van realitzar amb una balança model HF-2000G.
- pH-metre: per a la mesura del pH de la FM s'ha usat un pH-metre Crison, model Basic 20+.

5.2. REACTIUS, PATRONS I MATERIAL DE REFERÈNCIA

5.2.1. Reactius

- Aigua doblement desionitzada (Milli-Q, 18,2 M Ω /cm de resistivitat).
- Dissolució reductora: dissolució aquosa amb 1,5% de SnCl₂ (sòlid SnCl₂·2H₂O (màx. 0,000005% Hg) PA-ACS, Panreac) en 4% d'HCl (HCl 35% TMA Hiperpur, valor garantit de Hg \leq 1 μ g/L, Panreac).
- Dissolució d'HCl 4%.
- Dissolució de KBrO₃/KBr 0,55%: per a la determinació del contingut total de mercuri, s'addiciona aquest agent oxidant a les mostres perquè és necessari que tot el mercuri present en la dissolució es trobi en forma de mercuri inorgànic (Hg²⁺).
- 2-mercaptoetanol (purum \geq 99.0%, Fluka).

Reactius utilitzats en la preparació de la FM (80% metanol / 20% dissolució aquosa de pirrolidinditiocarbamat d'amoni (APDC) i d'acetat d'amoni):

- Metanol (HPLC-gradient grade, PAI-ACS, Panreac).
- Dissolució 0,0015 M d'APDC (purum p. a., Fluka) i 0,01 M d'acetat d'amoni (p. a. ACS, Reag. Ph. Eur., Merck). Es pesa la quantitat necessària d'APDC i d'acetat d'amoni, es dilueix amb aigua Milli-Q i el pH s'ajusta a 5,5 amb àcid acètic. Es filtra al buit amb un filtre de 0,2 μm de porus.

5.2.2. Patrons

Es van usar les següents dissolucions patró mare:

- Mercuri inorgànic (Hg^{2+}): solució mare de 1000 mg/L de mercuri inorgànic preparada a partir de HgCl_2 (Merck, Darmstadt, Alemanya) dissolt en HNO_3 al 1% (v/v) (Hiperpur, $\text{Hg} \leq 0,1 \mu\text{g/L}$, Panreac).
- Metilmercuri (MeHg^+): solució mare de 1000 mg/L de metilmercuri preparada a partir de CH_3HgCl (Carlo Erba, Milà, Itàlia) dissolt en metanol al 3%.

Es van emmagatzemar en ampolles de vidre topazi a una temperatura de 4°C. Les dissolucions de treball es van preparar diàriament a partir dels patrons mitjançant les dilucions apropiades.

5.2.3. Material de referència certificat

- ERM-CA713: material de referència certificat. Aigua residual (wastewater) subministrada per l'Institut de Materials de Referència i Mesures (IRMM; Bèlgica). Valor certificat de Hg: $1,84 \pm 0,11 \mu\text{g/L}$. A la figura 13 es mostra el CRM.



Figura 13. ERM-CA713. Volum: 100 mL.

5.3. METODOLOGIA ANALÍTICA

5.3.1. Determinació del contingut total de mercuri

Es prepara el blanc, una dissolució aquosa d'HCl 4%, que permet mantenir el senyal del detector estable. Les mostres i els patrons es preparen addicionant també 4% d'HCl. Les mostres es fortifiquen amb la dissolució patró adequada i s'addiciona l'agent oxidant KBrO₃/KBr 0,55%. Les dissolucions patró es preparen només amb mercuri inorgànic.

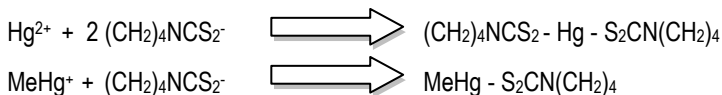
La dissolució reductora es prepara pesant la quantitat necessària de SnCl₂·2H₂O i dissolent el sòlid en una dissolució aquosa d'HCl 4%.

La bomba peristàltica bombeja dissolució reductora a un flux de 3 mL/min i blanc d'àcid, patró o mostra a 8 mL/min. L'anàlisi de cada dissolució es realitza en uns 4 minuts aproximadament i es pren com a senyal el valor màxim mesurat pel detector. Donat que el senyal mesurat pel detector pot variar fortament en un període relativament curt de temps, per tal de poder quantificar les mostres es realitzen dues rectes de calibratge, abans d'analitzar les mostres i al finalitzar.

5.3.2. Especiació de mercuri

Les dissolucions patró es preparen a partir de les dissolucions patró mare, mitjançant l'arbre de dilucions adequat, i s'enrasen amb FM. S'injecten manualment en el sistema cromatogràfic mitjançant una xeringa de 500 µL.

La FM conté l'agent complexant APDC i, en eluir les espècies d'interès, es formen els següents complexos, que presenten un enllaç fort entre el mercuri (II) i el sulfur:



Les espècies d'interès se separen en la columna cromatogràfica ja que els complexos formats tenen diferent afinitat amb el reblliment apolar de la columna. Una vegada separades, passen pel fotoreactor UV i es degraden. El mercuri arriba al CV, es barreja amb la dissolució reductora i el vapor de mercuri format es transfereix al detector AFS. S'adquireixen les dades amb el programa informàtic Pendragon. A la taula 1 es resumeixen les condicions cromatogràfiques i de detecció.

Condicions HPLC

Espècies estudiades	MeHg ⁺ ; Hg ²⁺
Columna	ODS Hypersyl (RP-C18; 250 x 4,6 mm; 5 µm)
FM	80% MeOH : 20% 0,0015 M APDC i 0,01 M NH ₄ Ac (pH 5,5)
Cabal	1,5 mL min ⁻¹
Volum d'injecció	100 µL

Condicions CV-AFS

Reductor	SnCl ₂ 1,5% en HCl 4%
Cabal del reductor	3 mL min ⁻¹
Cabal del gas portador (Ar)	300 mL min ⁻¹
Cabal del gas d'assecat (N ₂)	2,5 L min ⁻¹

Taula 1. Condicions cromatogràfiques i de detecció per a l'especiació de mercuri.

El complex del MeHg⁺ queda menys retingut en la columna cromatogràfica i, per tant, el seu pic es detecta abans que el del mercuri inorgànic. El pic cromatogràfic del MeHg⁺ es detecta a un temps de retenció de 280 segons i el del mercuri inorgànic a un temps de retenció de 400 segons aproximadament. Un cromatograma tipus de l'especiació de mercuri es mostra a la figura 14. La integració de l'àrea dels pics es realitza amb el programari informàtic Matlab.

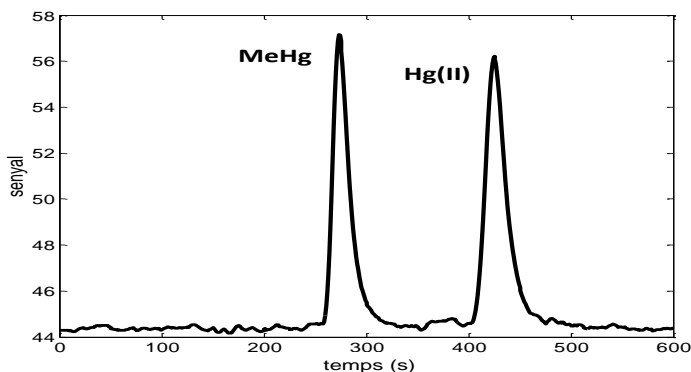


Figura 14. Un cromatograma de la determinació de les dues espècies de mercuri.

Per quantificar les espècies de mercuri en la dissolució de treball, es realitza la recta de calibratge representant el valor de l'àrea del senyal en funció de la concentració del patró. A la figura 15 es mostren unes rectes de calibratge obtingudes, a mode d'exemple.

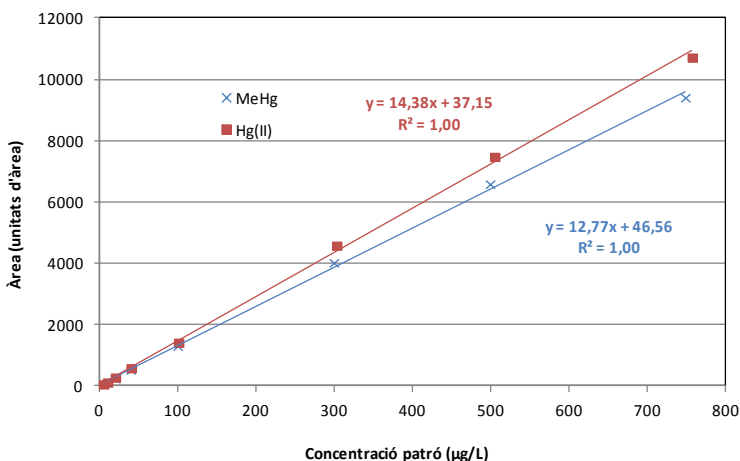
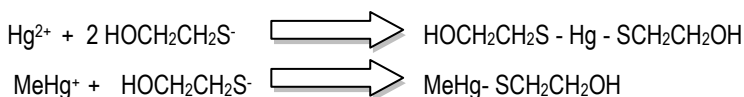


Figura 15. Rectes de calibratge de les dues espècies de mercuri analitzades.

5.3.3. Sistema de preconcentració en línia

Les dissolucions de treball es preparen fortificant l'aigua d'estudi amb la dissolució patró adequada i addicionant la quantitat necessària de 2-mercaptoetanol per tenir una concentració 0,07 mM de l'agent complexant. Es formen complexos estables amb el mercuri (16), anàlegs als d'APDC, mitjançant un fort enllaç entre el mercuri (II) i el sulfur:



Els complexos formats són adsorbits a la columna de preconcentració. Aquestes condicions de treball havien estat establertes pel grup de recerca en treballs anteriors.

Per preconcentrar les dissolucions de treball, la vàlvula superior del sistema de preconcentració es manté en posició de càrrega. La bomba isocràtica bombeja dissolució de treball a un flux de 2 mL/min. Després de preconcentrar el volum desitjat, s'atura la bomba isocràtica i la vàlvula es canvia a la posició d'elució. Les espècies s'elueixen, arriben a la columna cromatogràfica on se separen, es detecten i s'obté el cromatograma en el programari informàtic.

6. RESULTATS I DISCUSSIÓ

6.1. OPTIMITZACIÓ DEL SISTEMA DE PRECONCENTRACIÓ

En iniciar aquest treball, es disposava de les condicions òptimes del mètode cromatogràfic i de detecció, obtingudes en anteriors estudis del grup de recerca i resumides a la taula 1, de l'apartat 5.3.2. De l'etapa de preconcentració s'havia estudiat l'agent complexant i la seva concentració òptima així com el procés d'acondicionament de la columna de preconcentració i el flux de la mostra. Per establir les condicions òptimes del sistema de preconcentració en línia, restava estudiar la longitud òptima de la columna de preconcentració (del mateix tipus que la columna cromatogràfica) i establir un volum de preconcentració de les mostres adequat per aigües d'origens diversos.

6.1.1. Selecció de la longitud de la columna de preconcentració

L'objectiu d'aquest estudi va ser avaluar la longitud òptima de la columna de preconcentració, considerant els següents paràmetres: el volum de saturació de les dissolucions de treball, la regió amb comportament lineal, el percentatge de recuperació i el factor de preconcentració (FP) màxim. Es van estudiar columnes de tres llargades diferents: 1, 2 i 5 cm. Les dissolucions de treball presentaven una relació equimolar de les espècies MeHg^+ i Hg^{2+} o una major concentració de l'espècie orgànica en una relació 10:1 i 5:1, tal com s'indica a la taula 2.

Dissolució de treball	Concentració de MeHg^+ [$\mu\text{g/L}$]	Concentració de Hg^{2+} [$\mu\text{g/L}$]
1	5	5
2	0,5	0,5
3	0,05	0,05
4	5	0,5
5	5	0,1
6	0,5	0,1

Taula 2. Concentració de les espècies de mercuri en les dissolucions de treball.

Es van preconcentrar volums creixents de la dissolució de treball fins que es va assolir el volum de saturació, a partir del qual en augmentar el volum preconcentrat no s'aprecia augment del senyal. A mode d'exemple, a la figura 16 es mostren superposats els cromatogrames de la preconcentració de diversos volums de la dissolució de treball 4 en la precolumna de 2 cm. El pic cromatogràfic amb un temps de retenció d'aproximadament 5 min correspon al MeHg^+ i s'aprecia que el senyal màxim ja s'ha assolit a un volum de 8 mL. En canvi, el Hg^{2+} se satura a 16 mL.

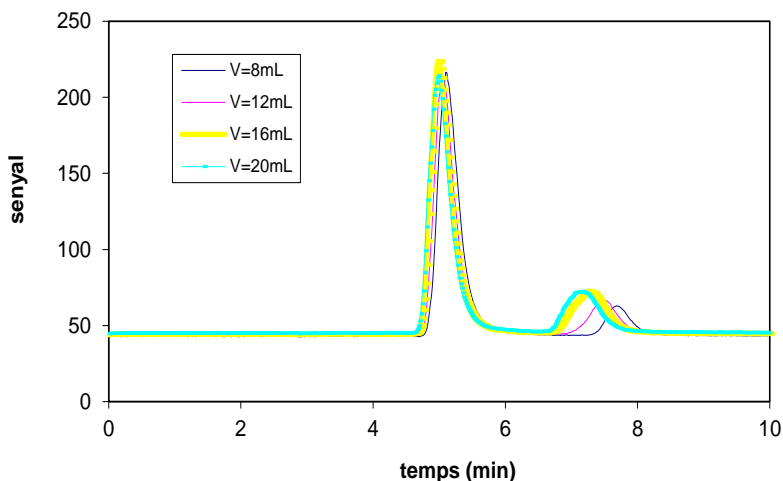


Figura 16. Perfils d'elució de la preconcentració de volums propers al de saturació.

A partir dels cromatogrames de cada experiment, es va representar la concentració de les espècies després de preconcentrar, en funció del volum preconcentrat. En aquests gràfics s'identifica més clarament el volum de saturació de cada espècie ja que correspon al valor màxim de la seva concentració final. També s'identifica la regió amb comportament lineal, en la qual el percentatge de recuperació de l'espècie es manté aproximadament constant i la relació entre la concentració final i el volum preconcentrat és directament proporcional. A mode d'exemple, a partir de les dades de l'estudi de la precolumna de 2 cm i la dissolució de treball 4 es va realitzar la figura 17.

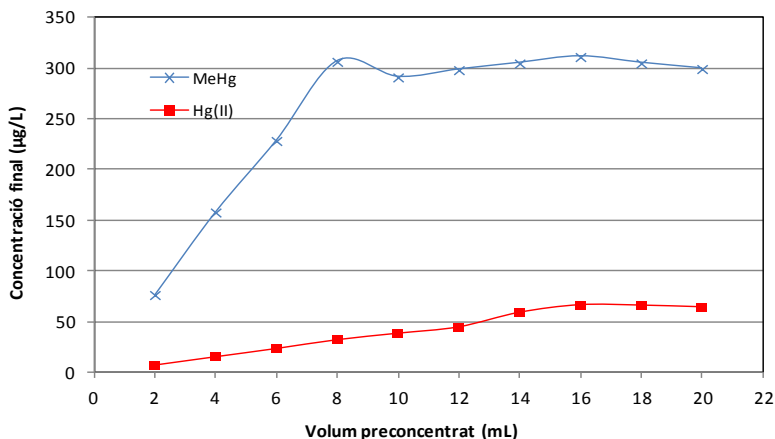


Figura 17. Concentració de cada espècie en funció del volum preconcentrat.

A partir de la concentració inicial de les espècies en la dissolució de treball i la concentració final després de preconcentrar, es va calcular el FP d'acord amb l'expressió:

$$FP = C_f / C_i, \quad \text{on } C_f \text{ i } C_i \text{ són la concentració final i inicial, respectivament.}$$

El percentatge de recuperació (R_A) es va calcular amb l'equació:

$R_A = 100 * q_A / q_{\text{Atèoric}}$, on q_A i $q_{\text{Atèoric}}$ són la quantitat mesurada i teòrica de l'espècie A, respectivament. La quantitat teòrica es va calcular a partir de la concentració inicial de la dissolució de treball i del volum preconcentrat. La quantitat mesurada es va obtenir de la concentració final calculada, considerat un volum del bucle d'injecció de 0,1 mL.

A mode d'exemple, a la taula 3 es mostren les dades de l'estudi de la precolumna de 2 cm en preconcentrar la dissolució de treball 4. S'indiquen els FP i el càlcul dels percentatges de recuperació a partir de les concentracions finals mesurades.

Per tal d'avaluar la idoneïtat de les tres columnes estudiades, es va fer un estudi comparatiu del senyal mesurat en el volum de saturació per a una mateixa dissolució de treball. A la figura 18 es mostren superposats els senyals en el volum de saturació de cada precolumna treballant amb la dissolució 1. Addicionalment, es mostra el senyal mesurat en injectar la dissolució directament al sistema, sense passar per l'etapa prèvia de preconcentració.

Volum [mL]	q_{MeHg^+} [ng]	$q_{\text{MeHg}^+ \text{ teòric}}$ [ng]	R_{MeHg^+} [%]	FP_{MeHg^+}	$q_{\text{Hg}^{2+}}$ [ng]	$q_{\text{Hg}^{2+} \text{ teòric}}$ [ng]	$R_{\text{Hg}^{2+}}$ [%]	$FP_{\text{Hg}^{2+}}$
2	7,7	10	77	15	0,8	1	80	15
4	15,8	20	79	32	1,6	2	80	31
6	22,9	30	76	46	2,4	3	80	48
8	30,7	40	77	61	3,2	4	80	65
10	29,2	50	58	58	3,9	5	78	78
12	29,9	60	50	60	4,5	6	75	90
14	30,5	70	44	61	5,9	7	84	119
16	31,2	80	39	62	6,7	8	84	134
18	30,5	90	34	61	6,6	9	73	133
20	30,0	100	30	60	6,5	10	65	129
22	29,9	110	27	60	6,3	11	57	125

Taula 3. FP i percentatge de recuperació de les espècies en funció del volum preconcentrat. Precolumna de 2 cm; dissolució de treball 4.

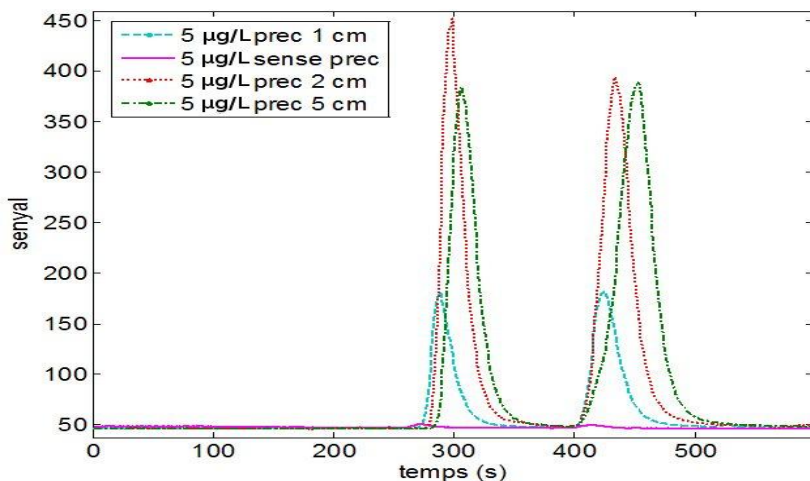


Figura 18. Cromatogrames en el volum de saturació. Dissolució de treball 1.

En els cromatogrames de la figura 18, s'aprecia que els senyals mesurats en estudiar les precolumnes de 2 i 5 cm van ser del mateix ordre, mentre que amb la precolumna d'1 cm es va

obtenir un senyal força menor. També s'observa que sense preconcentrar el senyal mesurat va ser molt menor, al voltant dels valors del límit de quantificació.

A la taula 4 es mostren els valors del volum de saturació, del FP màxim assolit i del percentatge de recuperació obtinguts en l'estudi de les tres precolumnes, treballant amb les tres dissolucions equimoleculares de les dues espècies (1, 2 i 3). Es van realitzar dues rèpliques de cada experiment i s'indica el valor de RSD obtingut entre parèntesi.

Precolumna [cm]	Espècie	Volum saturació [mL]	FP màxim	R _A [%] (RSD [%])
1	MeHg ⁺	5-6	19-41	67 (8) / 34 (10) ^a
	Hg ²⁺	5-8	68 / 20 ^a	70-85 (10)
2	MeHg ⁺	16 / 8 ^a	115 / 67 ^a	74-84 (5) / 160 (20) ^a
	Hg ²⁺	18 / 10 ^a	100-170	71-88 (6) / 160 (21) ^a
5	MeHg ⁺	15 / 8 ^a	110 / 50 ^a	67-77 (10)
	Hg ²⁺	20 / 12 ^a	110-170	75-98 (7)

(a) Dissolució de treball equimolecular 3 (0,05 µg/L).

Taula 4. Volum de saturació, FP màxim i percentatge de recuperació de l'estudi de les precolumnes.

En la taula anterior destaca que en treballar amb la dissolució equimolar de 0,05 µg/L de les espècies, en general, els paràmetres del mètode van esdevenir pitjors ja que van disminuir el volum de saturació i el FP màxim i es van obtenir recuperacions allunyades de les òptimes. No obstant, cal indicar que, en treballar amb una dissolució tant diluïda, la concentració final és de l'ordre del límit de quantificació i, per tant, les recuperacions calculades poden estar afectades per l'error en la quantificació. Per aquesta raó es van obtenir RSD més elevades.

A partir dels valors de la taula anterior es va realitzar la figura 19, que mostra, per a cada precolumna i dissolució de treball equimolar, els factors de preconcentració màxims assolits i els percentatges de recuperació amb les desviacions estàndard corresponents.

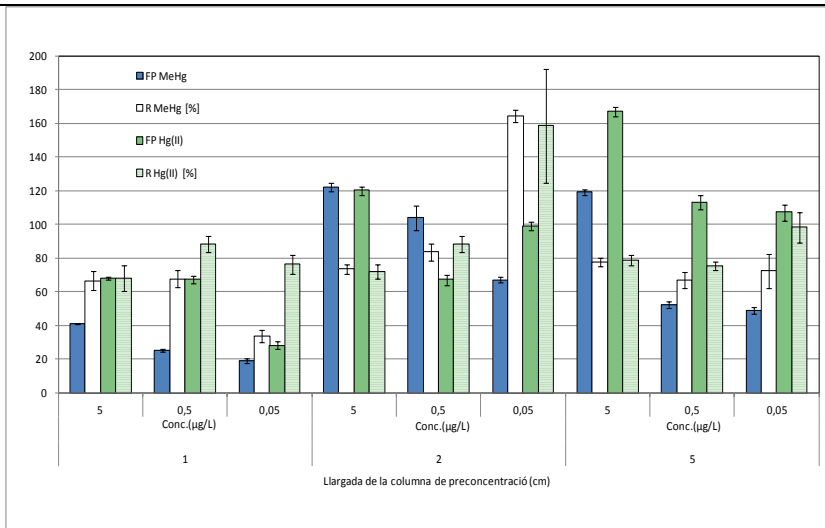


Figura 19. Factors de preconcentració i percentatges de recuperació de l'estudi de les tres precolumnes.

En la figura anterior s'observa que, tot i que, en general, es van obtenir majors FP i recuperacions de l'espècie inorgànica, el comportament d'ambdues espècies va ser similar al llarg de tots els experiments.

En comparar els valors del FP, s'aprecia que en treballar amb la precolumna d'1 cm es va assolir una preconcentració molt menor de les dues espècies respecte a la de les columnes de 2 i 5 cm. Aquest fet és lògic ja que la precolumna més curta té una menor quantitat de rebliment i, per tant, pot interaccionar amb una menor quantitat dels complexos de mercuri i se satura ràpidament.

Encara que amb la precolumna de 2 cm es va assolir una major preconcentració de l'espècie organomercúrica que amb la de 5 cm i amb aquesta darrera una major preconcentració de l'espècie inorgànica, els FP de les precolumnes de 2 i 5 cm van ser molt semblants. Els resultats obtinguts fan pensar que un augment de 3 cm en la longitud de la columna de preconcentració no comporta un augment significatiu del seu rendiment, probablement degut a que la interacció amb les espècies d'interès no augmenta. A més, els cromatogrames obtinguts emprant la precolumna de 5 cm presentaven pics asimètrics pel Hg^{2+} , com s'aprecia a la figura 20.

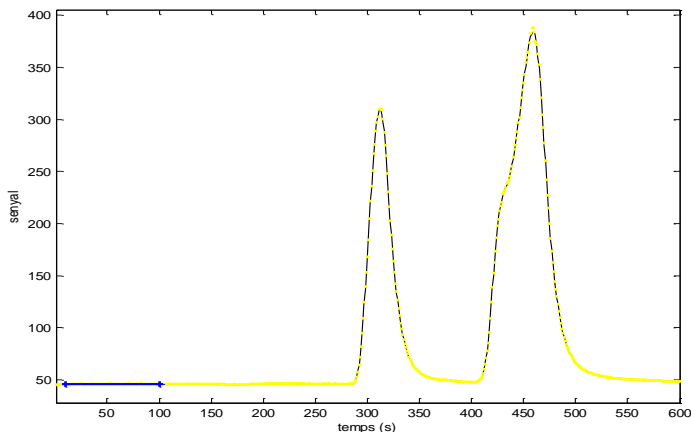


Figura 20. Precolumna de 5 cm; dissolució 5 µg/L de les espècies; volum preconcentrat 30 mL.

Els percentatges de recuperació de les tres precolumnes van ser semblants i es trobaven en l'interval entre 65 i 100%, valors que es van considerar acceptables ja que són elevats. En aquesta discussió s'ometen els percentatges de recuperació obtinguts en treballar amb la dissolució més diluïda perquè, com ja s'ha indicat anteriorment, no es podia quantificar correctament. Comparant les recuperacions calculades en les tres precolumnes s'aprecia que es van obtenir resultats semblants. Per ambdues espècies es va arribar a la conclusió que, en treballar al volum de saturació de la precolumna, el percentatge de recuperació és pràcticament independent de la llargada de la precolumna, si considerem llargades entre 1 i 5 cm.

A partir de les dades de la figura 19, es va veure que la precolumna més adequada per al sistema de preconcentració en línia és la de 2 cm de llargada perquè va permetre l'obtenció de FP més elevats que la columna de 1 cm en els tres nivells de concentració avaluats i valors semblants als de la columna de 5 cm. Tenint en compte que amb les dues columnes de major llargada es van obtenir resultats semblants, es va considerar més adequat l'ús de la precolumna de 2 cm per tal d'evitar un augment innecessari del temps d'anàlisi.

6.1.2. Avaluació de les condicions òptimes de preconcentració

Per tal d'establir el FP màxim i el percentatge de recuperació, es va decidir preconcentrar un volum proper al de saturació de dissolucions de diferents concentracions i relacions molars de les espècies MeHg^+ i Hg^{2+} . Es van preparar dissolucions que només contenien Hg^{2+}

(experiment a), dissolucions que contenen 0,5 $\mu\text{g/L}$ de MeHg^+ i una concentració variable de Hg^{2+} (experiment b) i dissolucions equimolars (experiment c), especificades a la taula 5. Donat que s'havia seleccionat la precolumna de 2 cm, a partir de les dades de la taula 4, es va decidir establir com a volum a preconcentrar 15 mL.

Experiment	a		b		c	
Dissolució	C_{MeHg^+} [$\mu\text{g/L}$]	$\text{C}_{\text{Hg}^{2+}}$ [$\mu\text{g/L}$]	C_{MeHg^+} [$\mu\text{g/L}$]	$\text{C}_{\text{Hg}^{2+}}$ [$\mu\text{g/L}$]	C_{MeHg^+} [$\mu\text{g/L}$]	$\text{C}_{\text{Hg}^{2+}}$ [$\mu\text{g/L}$]
1	0	0,05	0,5	0,05	0,05	0,05
2	0	0,1	0,5	0,1	0,1	0,1
3	0	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
4	0	1	0,5	1	1	1
5	0	5	0,5	5	5	5

Taula 5. Dissolucions preparades per a l'estudi del FP màxim i la recuperació.

A la taula 6 es mostren els valors mitjans del FP màxim, del percentatge de recuperació amb la seva desviació estàndard i la desviació estàndard relativa, calculats a partir dels resultats de les cinc dissolucions de treball de cada experiment.

Experiment	$\text{FP}_{\text{MeHg}^+}$	R_{MeHg^+} [%]	RSD [%]	$\text{FP}_{\text{Hg}^{2+}}$	$\text{R}_{\text{Hg}^{2+}}$ [%]	RSD [%]
a	-	-	-	120	80 ± 13	16
b	84	56 ± 8	15	99	66 ± 4	7
c	113	76 ± 9	12	109	73 ± 3	5
Mitjana	99	66 ± 11	17	109	73 ± 12	17

Taula 6. Factors de preconcentració i percentatges de recuperació en preconcentrar 15 mL.

De la taula anterior s'extreu que si la dissolució contenia només Hg^{2+} (experiment a), el FP de l'espècie va ser major que si la dissolució contenia les dues. Aquest fet pot ser degut a que les espècies hagin de competir per la fase estacionària. Si la dissolució només en conté una, es

reté una major quantitat de l'espècie a la precolumna, assolint un nivell màxim de preconcentració més elevat que no pas si hi són les dues espècies.

En treballar amb dissolucions no equimolars (experiment b) els factors obtinguts van ser sensiblement menors que en treballar amb dissolucions equimolars (experiment c). Donat que és molt probable que les mostres d'aigües reals siguin no equimolars, l'experiment b pot ser que representi més fidelment l'anàlisi d'una mostra d'aigua ambiental.

A partir dels resultats obtinguts en preconcentrar 15 mL de les dissolucions de treball, es va arribar a la conclusió que el FP màxim i el percentatge de recuperació depenen de la relació molar entre les espècies i que s'obtenen majors valors en dissolucions que contenen només una espècie que en dissolucions equimolars i encara menors en dissolucions no equimolars.

No obstant, es va poder establir una mitjana del FP màxim d'aproximadament 100 pel MeHg⁺ i 110 pel Hg²⁺. Aquests valors es van poder considerar vàlids per a un àmplia varietat de mostres ja que, tot i la diferent composició de les dissolucions de treball, les RSD no van ser massa elevades. Les recuperacions de les dues espècies van ser properes al 70% amb desviacions estàndard d'aproximadament 10%. Les condicions optimitzades per a la determinació de les espècies de mercuri en medi d'aigua Milli-Q es resumeixen a la taula 7.

Condicions preconcentració

Espècies estudiades	MeHg ⁺ ; Hg ²⁺
Precolumna	ODS Hypersyl (RP-C18; 20 x 4,6 mm; 5 µm)
Volum preconcentrat	15 mL
FP màxim	100; 110
RA [%]	66 ± 11; 73 ± 12

Taula 7. Condicions de preconcentració optimitzades per determinar les espècies en aigua Milli-Q.

6.1.3. Aplicació del mètode de preconcentració en la determinació de mostres ambientals

Una vegada seleccionada la columna de preconcentració més adequada per al sistema de preconcentració en línia, es va procedir a l'estudi de diverses aigües ambientals per tal d'establir un mètode per a la determinació de les espècies en mostres d'aigua de qualsevol origen.

6.1.3.1. Caracterització de les mostres ambientals i del CRM

Per realitzar l'estudi es va disposar de tres mostres d'aigua de diferents orígens i característiques: aigua de la xarxa metropolitana de Barcelona; embotellada mineral natural de Bronchales (sierra de Albarracín, Teruel; mineralització molt dèbil, residu sec a 180 °C: 35 mg/L) i embotellada mineral natural de Vittel (Lorena, França; mineralització mitja, residu sec a 180 °C: 400 mg/L). També es va disposar del material de referència certificat ERM-CA713. Les mostres es van emmagatzemar a temperatura ambient.

Primer de tot, es van caracteritzar les tres mostres d'aigua i el CRM determinant el pH, la conductivitat i el contingut d'anions i de cations. La composició química de les aigües es mostra a la taula 8.

Paràmetre	Aigua			
	Xarxa	Bronchales	Vittel	CRM
pH	8,1	6,8	7,8	2
Conductivitat [$\mu\text{S}/\text{cm}$]	547	66	767	-
Cl^- [mg/L]	34,1	1,8	7,1	34,8
F^- [mg/L]	0,10	0,06	0,16	-
NO_3^- [mg/L]	5,6	1,7	0,56	-
SO_4^{2-} [mg/L]	43,5	5,5	120	7,9
Ca^{2+} [mg/L]	52,9	3,2	94	115,9
Mg^{2+} [mg/L]	9,0	3,5	43	4,4
Na^+ [mg/L]	20,7	1,6	7,7	186,0
K^+ [mg/L]	3,3	1,4	2,5	21,2

Taula 8. Caracterització de les aigües.

Tal i com es mostra a l'anterior taula, el pH de les matrius ambientals era neutre (6-8) i el pH del CRM era àcid perquè estava acidificat amb HNO_3 per tal que el contingut de cations metàl·lics fos estable durant un llarg període de temps i es continués complint el valor certificat.

L'aigua de Bronchales era la mostra amb un menor contingut d'ions, fet que concorda amb què sigui considerada aigua de baixa mineralització. En comparació, l'aigua de Vittel, de mineralització mitja, i l'aigua de la xarxa tenien un elevat contingut d'ions. El CRM també presentava una elevada concentració dels cations determinats.

6.1.3.2. Experiments amb les mostres ambientals

L'objectiu dels experiments va ser estudiar el comportament de les espècies en les diverses matrius ambientals fortificades i, si fos possible, establir un volum de preconcentració adequat per a la seva determinació en qualsevol de les mostres. Per a la preconcentració, es va usar la columna seleccionada en el subapartat 6.1.1.

En primer lloc, es va determinar el contingut total de Hg de les mostres d'aigua sense fortificar per comprovar que cap de les mostres estava contaminada. El contingut de mercuri de les mostres es trobava per sota del límit de detecció del mètode.

Els experiments es van basar en l'anàlisi de l'especiació de les tres aigües ambientals i d'aigua Milli-Q fortificades a tres nivells, dos equimoleculares i el darrer amb una major concentració de mercuri inorgànic, tal i com es mostra a la taula 9. Es van preconcentrar volums creixents de cada mostra fins assolir el volum de saturació.

Nivell	C _{MeHg⁺} [µg/L]	C _{Hg²⁺} [µg/L]
1	5	5
2	0,5	0,5
3	0,5	5

Taula 9. Concentració de les dissolucions fortificades.

Per poder comparar, a la figura 21 es mostren superposats els cromatogrames de l'anàlisi de l'aigua de xarxa fortificada al nivell equimolecular 1 mitjançant la injecció directa al sistema cromatogràfic i de detecció i mitjançant el sistema de preconcentració en línia. En la determinació per injecció directa, el senyal mesurat va ser molt petit i proper al soroll de fons i, en canvi, en preconcentrar, les espècies es van poder quantificar amb molta seguretat.

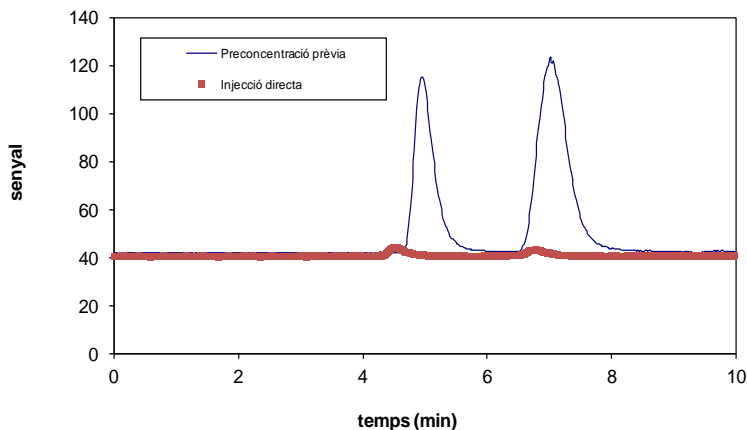


Figura 21. Cromatogrames de l'anàlisi de l'aigua de la xarxa fortificada amb 5 µg/L de les espècies.

Les mitjanes del volum de saturació, FP màxim i percentatge de recuperació de l'anàlisi de les quatre aigües fortificades als tres nivells es mostren a la taula 10.

Espècie	Matriu (aigua)	Volum saturació [mL]	FP màxim	RA [%]	RSD [%]
MeHg⁺	Milli-Q	16	108 ± 2	67 ± 1	1,8
	Xarxa	4	30 ± 1	74 ± 2	2,0
	Bronchales	4	30 ± 2	74 ± 6	7,7
	Vittel	4	27 ± 4	67 ± 9	13,0
Hg²⁺	Milli-Q	16	130 ± 18	81 ± 11	13,6
	Xarxa	5	42 ± 5	84 ± 10	12,3
	Bronchales	8	69 ± 4	86 ± 6	6,4
	Vittel	10	62 ± 2	66 ± 3	3,9

Taula 10. Estudi de la preconcentració de les mostres d'aigua fortificades.

En analitzar les dades de la taula anterior, s'aprecia que el FP màxim del Hg²⁺ va ser major en l'aigua Milli-Q, menor en les aigües minerals i encara menor en l'aigua de xarxa. Per tant, es va extreure que a major contingut salí i quantitat de residu sec de la mostra, menor va ser el FP

de l'espècie i també es va reduir el volum de saturació. Pel MeHg⁺, el FP màxim també va ser molt més elevat en el cas de l'aigua Milli-Q que en les matrius ambientals, que van presentar valors similars.

L'efecte de la matriu de l'aigua en el FP màxim i en el volum de saturació es pot explicar considerant la complexitat de la matriu. En l'especiació del mercuri s'addiciona l'agent complexant 2-mercaptoetanol a la dissolució de treball per tal que es formin complexos estables de mercuri que es retenguin i interaccionin amb la fase estacionària de la precolumna. Tanmateix, els altres cations metàl·lics presents a la matriu també es poden complexar i competir amb el mercuri. Una elevada concentració de cations metàl·lics implica la formació de complexos no desitjats, que no són els d'interès, i que també deuen interaccionar amb la fase estacionària de la columna de preconcentració. Aquest fet provoca que la columna se sature a un menor volum i que el FP de les espècies de mercuri sigui menor.

En canvi, el percentatge de recuperació de cada espècie va ser semblant en les quatre mostres d'aigües. Aquest fet sembla indicar que les recuperacions en el volum de saturació van ser independents de la composició de la matriu. No obstant, ja s'ha comentat que a major complexitat de la matriu menor va ser el nivell de preconcentració assolit i si es preconcentrés un volum elevat d'una mostra amb una matriu complexa, les recuperacions serien molt baixes.

D'altra banda, en comparar els valors obtinguts per a una mateixa mostra, s'aprecia que els FP màxims i els percentatges de recuperació del Hg²⁺ són una mica majors que els del MeHg⁺. Les recuperacions del Hg²⁺ són aproximadament del 80% i les del MeHg⁺ del 70%. Això és degut a què l'espècie inorgànica interacciona més fortament i té més afinitat amb la fase estacionària.

A partir de les dades de la taula anterior, es va veure que el menor volum en què es va saturar una de les espècies en les diverses matrius ambientals va ser 4 mL. Tot i que preconcentrant 4 mL de mostra no es va assolir el màxim FP del Hg²⁺, aquest volum es considera adequat per a les anàlisis de rutina ja que ens assegura treballar en la regió amb comportament lineal de les dues espècies en qualsevol mostra i, per tant, els percentatges de recuperació seran elevats, pràcticament constants i independents dels nivells de concentració de les espècies a la mostra.

A la taula 11 es mostren els FP i els percentatges de recuperació obtinguts en preconcentrar 4 mL de les aigües als tres nivells de concentració. Com que els resultats van ser semblants per a totes les matrius ambientals, la taula mostra també la mitjana.

Espècie	Matriu (aigua)	FP	RA [%]	RSD [%]
MeHg⁺	Milli-Q	29	73 ± 5	7
	Xarxa	29	74 ± 1	2
	Bronchales	34	84 ± 15	18
	Vittel	27	67 ± 9	13
	Mitjana global	30	74 ± 11	15
Hg²⁺	Milli-Q	32	80 ± 4	5
	Xarxa	35	87 ± 9	10
	Bronchales	29	74 ± 17	22
	Vittel	34	84 ± 5	6
	Mitjana global	32	81 ± 11	14

Taula 11. FP i recuperacions de l'anàlisi de les matrius ambientals. Volum preconcentrat: 4 mL.

A la taula anterior s'aprecia que es van obtenir valors del FP i del percentatge de recuperació molt semblants entre ells i, per tant, pràcticament independents de la matriu. Es van assolir nivells de preconcentració similars de les dues espècies i es va poder establir una mitjana del FP de 30 pel MeHg⁺ i de 32 pel Hg²⁺. Les recuperacions van ser elevades perquè es va treballar dins de la regió amb comportament lineal, amb valors propers al 75% i 85% pel MeHg⁺ i Hg²⁺, respectivament, i una desviació estàndard del 10%. Tenint en compte que es van analitzar matrius força diverses, aquestes desviacions estàndard es van considerar adequades. Aquests resultats indiquen que treballant a un volum de preconcentració determinat, sempre que sigui menor que el punt de saturació d'una mostra d'aigua amb matriu complexa, el FP i les recuperacions no depenen de la matriu de la mostra d'aigua. Per tant, es va considerar que el valor mitjà del FP i de les recuperacions de cada espècie mostrats en la taula 11 es podien usar en la determinació de qualsevol tipus de mostra d'aigua.

6.2. ESTABLIMENT DELS PARÀMETRES DE QUALITAT DEL MÈTODE

6.2.1. Exactitud del mètode

Per tal d'avaluar l'exactitud del mètode de preconcentració es va decidir fer l'anàlisi d'un material de referència certificat. Actualment, no es disposa d'un CRM de les espècies de mercuri en aigua, només es certifica el contingut total de mercuri. Es va escollir com a material de referència una aigua residual, amb un valor certificat de contingut total de mercuri de $1,84 \pm 0,11$ µg/L.

Es va analitzar el CRM amb els dos mètodes d'especiació que es disposava: injecció directa de la dissolució al sistema HPLC-UV-CV-AFS o bé mitjançant l'etapa de preconcentració. Per a la determinació usant el sistema de preconcentració en línia, es van preconcentrar 4 mL de dissolució i es van prendre com a valors del FP els establerts en l'estudi de les matrius ambientals, indicats a la taula 11.

A la taula 12 es mostren els resultats obtinguts en l'anàlisi de l'especiació de mercuri per injecció directa, realitzada per triplicat, i mitjançant el sistema de preconcentració en línia, realitzada per duplicat.

Mètode:	Directe	Preconcentració			
Espècie	C_i [µg/L]	C_f [µg/L]	FP	C_i [µg/L]	RSD [%]
MeHg⁺	≤LOD	8,4 ± 0,3	30	0,28 ± 0,01	2,9
Hg²⁺	1,71 ± 0,02	55 ± 2	32	1,72 ± 0,06	3,6
Suma de les espècies	1,71 ± 0,02			2,00 ± 0,07	3,5

Taula 12. Concentracions mesurades pels dos mètodes d'especiació en l'anàlisi del CRM.

Comparant els resultats obtinguts pels dos mètodes d'especiació, s'aprecia que les concentracions mesurades de l'espècie Hg²⁺ van ser molt semblants entre elles i properes al valor certificat de contingut total de mercuri. S'observa que, a la concentració de treball, el Hg²⁺ es va poder determinar pel mètode directe i que, en preconcentrar, també es van obtenir resultats adequats, de manera que es va corroborar la validesa del mètode de preconcentració. La semblança entre la concentració de l'espècie inorgànica i el contingut total de mercuri

certificat indicava que un elevat percentatge del mercuri es trobava en la forma inorgànica, resultat que es va considerar raonable ja que en les mostres d'aigua la concentració del mercuri inorgànic sol ser molt superior a la de les espècies organomercuriques .

Malgrat que l'espècie inorgànica es va poder quantificar mitjançant el mètode per injecció directa, no va ser així pel MeHg^+ ja que la seva concentració en el CRM era propera al límit de detecció del mètode. Per tal de corroborar aquest fet, a la figura 22 es mostra el cromatograma d'una rèplica de l'anàlisi, on s'aprecia que el Hg^{2+} va donar un senyal quantificable però, en canvi, el senyal del MeHg^+ va ser proper al soroll de fons i, per tant, al LOD.

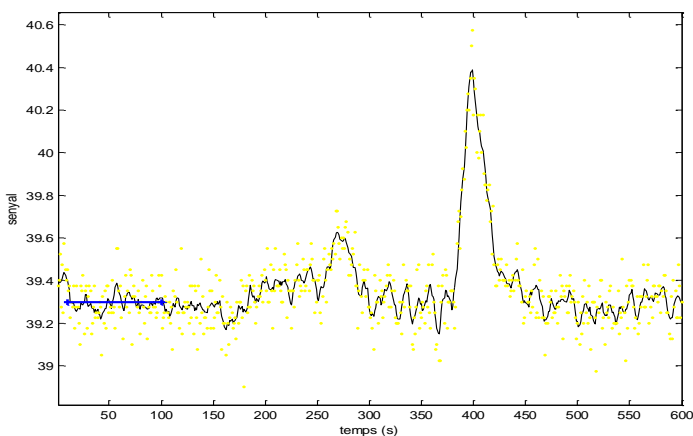


Figura 22. Cromatograma d'una rèplica de l'especiació del CRM sense etapa de preconcentració.

Tanmateix, amb el sistema de preconcentració en línia sí que es va poder observar la presència de metilmercuri i es va poder quantificar l'espècie amb seguretat. Es va comprovar que la seva concentració era molt menor que la del Hg^{2+} .

Considerant com a contingut total de mercuri la suma de les concentracions de les dues espècies detectades, es va decidir comparar la concentració total d'espècies de mercuri mesurada amb cada mètode amb el valor de referència certificat mitjançant un test t. Es va establir un nivell de confiança del 95%, així que el criteri de significació (α) va ser 0,05. Es va calcular l'estadístic t mitjançant l'equació:

$$t = \frac{|x - \mu|}{s} \sqrt{n} \quad s^{-1}, \quad \text{on } x \text{ és la mitjana, } \mu \text{ el valor de referència, } s \text{ la desviació estàndard i } n \text{ el nombre de rèpliques.}$$

Per al mètode directe, es va obtenir un valor de l'estadístic t de 11,3 que va indicar un valor significativament diferent del valor certificat quan es va comparar amb l'estadístic teòric ($t_{\text{taules}}(0,05, 2 \text{ graus de llibertat}, 2 \text{ cues}) = 4,3$). Aquest resultat era lògic ja que, tot i que l'espècie inorgànica sol ser la majoritària en aigua, l'espècie orgànica, que no es va poder quantificar amb el mètode directe, també té una certa contribució al contingut total de mercuri.

L'anàlisi mitjançant el mètode de preconcentració establert va mostrar una concentració total de $2,0 \pm 0,07 \mu\text{g/L}$ de les espècies de Hg. Es va obtenir un valor de t de 3,2, menor que l'estadístic teòric ($t_{\text{taules}}(0,05, 1 \text{ grau de llibertat}, 2 \text{ cues}) = 12,7$) i, per tant, es va concloure que no hi havia diferència significativa entre el contingut total de mercuri mesurat mitjançant el sistema de preconcentració en línia i el valor de referència certificat.

La veracitat de la determinació del contingut total de mercuri mitjançant el mètode de preconcentració en línia va refermar la idea que els factors de preconcentració establerts per a l'anàlisi de 4 mL de dissolució són vàlids per a una àmplia varietat de mostres d'aigua.

Adicionalment, es va analitzar el CRM mitjançant les dues tècniques de determinació de contingut total de Hg que de les quals es disposava. A la taula 13 es mostren els resultats de la determinació per CV-AFS, realitzada per triplicat, i per ICP-MS, realitzada per duplicat.

Rèplica	CV-AFS	ICP-MS
1 [$\mu\text{g/L}$]	1,46	2,17
2 [$\mu\text{g/L}$]	1,33	2,14
3 [$\mu\text{g/L}$]	1,36	-
Mitjana [$\mu\text{g/L}$]	1,38 \pm 0,05	2,16 \pm 0,01
RSD [%]	3,9	0,6

Taula 13. Anàlisi del contingut total de Hg del CRM.

Per a la tècnica CV-AFS, es va obtenir un valor de t de 15,9 que va indicar un valor significativament diferent del valor certificat quan es va comparar amb l'estadístic teòric ($t_{\text{taules}}(0,05, 2 \text{ graus de llibertat}, 2 \text{ cues}) = 4,3$). El baix valor obtingut en emprar CV-AFS pot ser degut a que aquesta tècnica només pot detectar el Hg^{2+} i, encara que es va addicionar un agent oxidant de les espècies organomercúriques, és possible que el rendiment de l'oxidació del MeHg^+ fos molt baix. Per tal d'assegurar una elevada oxidació de les espècies

organomercúriques caldria estudiar i escollir l'agent oxidant òptim. Si l'oxidació no és l'adequada, no tot el mercuri de la mostra es trobarà en la forma inorgànica i el valor del contingut total de mercuri determinat pel mètode CV-AFS serà menor que el real.

Per a la tècnica ICP-MS, es va obtenir un valor de t de 45, que va indicar un valor significativament diferent del valor certificat quan es va comparar amb l'estadístic teòric ($t_{\text{taules}}(0,05, 1 \text{ grau de llibertat}, 2 \text{ bandes}) = 12,7$). Donat que els valors de les dues rèpliques de la determinació per ICP-MS són molt semblants entre si, es devia produir un error sistemàtic en l'instrument o en la preparació dels patrons.

6.2.2. Sensibilitat i interval de linealitat

La sensibilitat d'un instrument o d'un mètode és una mesura de la seva capacitat de diferenciar petites variacions en la concentració de l'anàlit. La definició quantitativa de la sensibilitat, acceptada per la IUPAC, és la de la sensibilitat del calibratge, que es defineix com el pendent de la funció de calibratge en la concentració estudiada (22). Les funcions de calibratge usades són lineals i es poden representar mitjançant l'equació:

$S = m \cdot C + S_{\text{bl}}$, on S és el senyal mesurat, m el pendent de la funció lineal, C la concentració de l'anàlit i S_{bl} el senyal del blanc.

L'interval de linealitat d'un mètode analític es defineix com el rang de concentracions des de la concentració més petita en la qual es pot quantificar (LOQ) fins a la concentració en la qual la funció de calibratge es desvia de la linealitat (LOL) (22).

A mode d'exemple, a la figura 23 es mostren unes rectes de calibratge obtingudes en l'especiació de mercuri per injecció directa dels patrons de concentracions entre 5-750 $\mu\text{g/L}$ al sistema HPLC-UV-CV-AFS i realitzant un ajust de mínims quadrats.

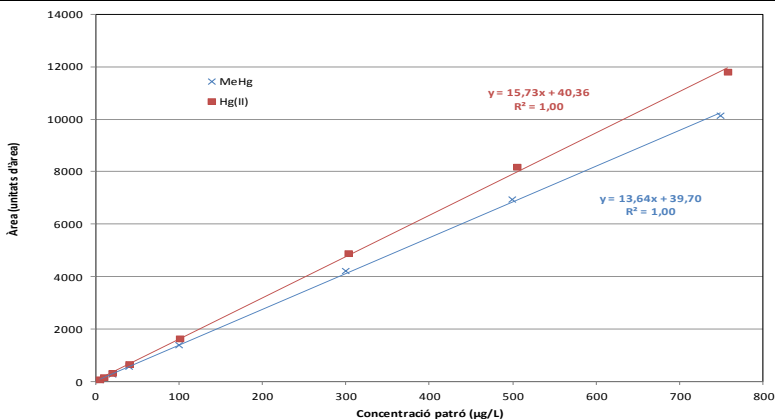


Figura 23. Rectes de calibratge de les dues espècies de mercuri analitzades.

En totes les funcions de calibratge es va apreciar que la sensibilitat del mètode era lleugerament major pel mercuri inorgànic que pel metilmercuri ja que el pendent de la recta de calibratge del Hg^{2+} era lleugerament superior al del MeHg^+ . Els pendents de les rectes de calibratge obtingudes en diferents dies van mostrar valors propers entre ells. El mètode es va considerar força sensible ja que els pendents de les rectes de calibratge eren elevats.

El coeficient de correlació sempre va mostrar un valor proper a la unitat ($R > 0.999$) per ambdues espècies en el rang de concentracions dels patrons. La linealitat del mètode va ser adequada perquè el coeficient de correlació va ser molt proper a la unitat i, en representar la funció de calibratge, es va veure que les dades s'ajustaven a un model lineal de primer ordre i que no se superava el LOL. Es va comprovar que la linealitat es perdia per sobre dels 750 µg/L. Es va concloure que el mètode és lineal en el rang de concentracions de treball de les dues espècies del mercuri (5-750 µg/L).

6.2.3. Límits de detecció i de quantificació

El límit de detecció (LOD) es defineix com la concentració o massa d'anàlit més baixa que es pot detectar amb un cert nivell de confiança (22). El LOD depèn de la relació entre la magnitud del senyal analític i el valor de les fluctuacions estadístiques del senyal del blanc, és a dir una mostra que no conté anàlit.

En una tècnica de fluorescència atòmica el senyal en el LOD (S_{LOD}) es defineix quantitativament com el senyal del blanc (S_b) més tres vegades la seva desviació estàndard (S_b):

$$S_{\text{LOD}} = S_b + 3 * s_b \quad (22)$$

En tècniques acoblades, com és el sistema HPLC-UV-CV-AFS, per calcular la concentració en el límit de detecció (C_{LOD}) s'usa la desviació estàndard del senyal de fons (S_{fons}) i el pendent de la recta de calibratge (b) de l'espècie en qüestió. Es calcula amb l'equació:

$$C_{\text{LOD}} = 3 * S_{\text{fons}} / b \quad (22)$$

Cal destacar que quan es van quantificar les espècies, la recta de calibratge es va realitzar a partir de les àrees dels pics ja que eren més reproduïbles que les alçades. Tanmateix, quan es van calcular els límits de detecció i de quantificació, es van prendre els valors d'alçada màxima dels pics perquè l'estimació del soroll de fons està relacionada amb la intensitat total per l'alçada del pic.

El límit de quantificació (LOQ) es defineix com la menor concentració o massa d'anàlit que es pot detectar amb seguretat i quantificar amb un elevat grau de confiança (22). Es defineix com el senyal del blanc més deu vegades la desviació estàndard: $S_{\text{LOQ}} = S_b + 10 * s_b$.

En tècniques acoblades s'usa l'equació: $C_{\text{LOQ}} = 10 * S_{\text{fons}} / b$.

6.2.3.1. Sistema de preconcentració en línia vs. injecció directa

El programari Matlab va calcular automàticament la desviació estàndard del fons i es va prendre el pendent de la recta de calibratge de l'espècie en qüestió. Per calcular els límits de detecció i de quantificació del sistema de preconcentració en línia va caldre dividir entre el FP.

A la taula 14 es mostren les concentracions en el límit de detecció i de quantificació de la determinació de l'especiació de mercuri per injecció directa al sistema HPLC-UV-CV-AFS, calculant la mitjana dels límits en cinc dies diferents, i pel mètode establert per al sistema de preconcentració en línia, usant la precolumna de 2 cm, preconcentrant 4 mL de la dissolució mostra i considerant els factors de preconcentració de la taula 11.

Mètode	$C_{\text{LOD}} \text{ MeHg}^+$ [ng/L]	$C_{\text{LOQ}} \text{ MeHg}^+$ [ng/L]	$C_{\text{LOD}} \text{ Hg}^{2+}$ [ng/L]	$C_{\text{LOQ}} \text{ Hg}^{2+}$ [ng/L]
Injecció directa	530	1800	570	1900
Preconcentració	18	59	18	60

Taula 14. Límits de detecció i de quantificació dels mètodes d'especiació.

En la taula anterior es veu que el mètode d'especiació sense etapa de preconcentració va presentar uns límits de detecció propers a $0,5 \mu\text{g/L}$ i de quantificació de $1,9 \mu\text{g/L}$, sent lleugerament menors pel MeHg^+ que pel Hg^{2+} però del mateix ordre de magnitud. Els límits del mètode sense etapa de preconcentració són massa elevats per a la determinació de mostres aquoses que no estiguin severament contaminades amb mercuri, sobretot per a l'espècie orgànica, que sol estar present en menor concentració.

En canvi, pel mètode de preconcentració en línia, les concentracions en el límit de detecció i de quantificació van disminuir fortament ja que es van assolir factors de preconcentració relativament grans. Es va obtenir una concentració de $0,018 \mu\text{g/L}$ en el límit de detecció i de $0,06 \mu\text{g/L}$ en el límit de quantificació, valors molt menors que els límits del mètode directe i adequats per a la determinació de les espècies de mercuri en mostres d'aigua, on solen estar presents a molt baixes concentracions. Per últim, indicar que, donat que en totes les matrius el FP del Hg^{2+} va ser lleugerament major que el del MeHg^+ , les concentracions en el límit de detecció i de quantificació de l'espècie inorgànica van ser lleugerament menors.

Per tal de comprovar experimentalment els LOD del mètode establert, es van analitzar dissolucions patró amb una concentració de les espècies de mercuri propera al valor del LOD calculat, preconcentrant dissolucions cada vegada més concentrades. Els cromatogrames que es van obtenir en aquest experiment estan superposats a la figura 24.

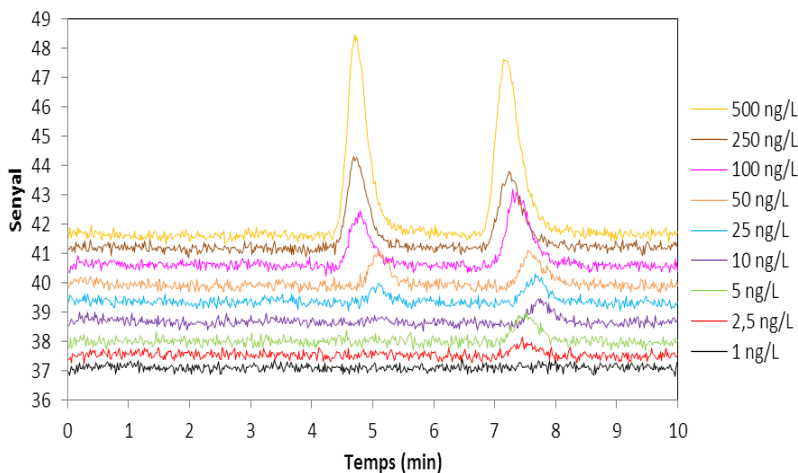


Figura 24. Cromatogrames de la comprovació experimental del LOD.

Tot i que els LOD calculats del mètode van ser els mateixos per a les dues espècies de mercuri, experimentalment es va veure que el mètode va ser capaç de detectar el Hg^{2+} a una concentració força menor que el MeHg^+ . El mercuri inorgànic va donar un senyal clarament detectable a una concentració de 5 ng/L, tot i que ja començava a aparèixer a partir de 2,5 ng/L. En canvi, el metilmercuri no va donar un senyal apreciable fins a una concentració de 25 ng/L i detectable a partir d'uns 50 ng/L. Amb aquest experiment es va comprovar que els LOD del mètode són menors que els calculats pel Hg^{2+} i una mica majors pel MeHg^+ . Aquest fet és degut a què l'espècie inorgànica té més afinitat per la fase estacionària, com s'ha explicat en el subapartat 6.1.2.

D'altra banda, si es volgués establir un volum de saturació diferent per a cada mostra desconeguda i es preconcentrés un volum major que els 4 mL establerts però menor que el volum de saturació per cada matriu, encara es podrien disminuir més els LOD del mètode. A mode d'exemple, a la taula 15 es mostren els LOD i LOQ del sistema de preconcentració en línia en preconcentrar el volum de saturació de cadascuna de les matrius aquoses estudiades. Els límits es van calcular a partir del FP màxim assolit, que és diferent per a cada matriu ambiental, indicats a la taula 10.

Matriu (aigua)	C_{LOD} MeHg⁺ [ng/L]	C_{LOQ} MeHg⁺ [ng/L]	C_{LOD} Hg²⁺ [ng/L]	C_{LOQ} Hg²⁺ [ng/L]
Milli-Q	5	16	4	15
Xarxa	18	60	14	46
Min. baixa	18	60	8	28
Min. mitja	20	66	9	31

Taula 15. Límits del mètode en preconcentrar el volum de saturació.

En comparar els LOD de les taules 14 i 15, s'aprecia que, per a totes les matrius ambientals, el mètode establert va arribar als menors límits possibles de l'espècie orgànica donat que 4 mL era el seu volum de saturació. No obstant, augmentant el volum preconcentrat sí que es va aconseguir disminuir considerablement els límits de l'espècie inorgànica, assolint un límit de detecció de 0,008 $\mu\text{g/L}$ en l'aigua de mineralització dèbil.

En la taula 15 s'aprecia la tendència de LOD i LOQ del Hg^{2+} més elevats a mesura que la matriu és més complexa, sent els LOD del mètode de determinació d'aigua de mineralització

dèbil menors que en el de mineralització mitja i aquests menors que en la determinació de l'aigua de la xarxa. En analitzar aigua Milli-Q es van assolir LOD molt menors que en les mostres ambientals, fet raonable considerant que l'aigua Milli-Q té un baixíssim contingut d'ions que puguin competir amb el mercuri pel complexant i la fase estacionària de la precolumna.

6.2.3.2. Comparació bibliogràfica

Les concentracions en el LOD del mètode d'especiació de mercuri establert en aquest treball es comparen amb les dels mètodes bibliogràfics de determinació de les espècies en aigües a la taula 16.

A la taula 16 es veu que els mètodes que usen un sistema de preconcentració acoblat a una tècnica de separació i detecció per CV-AFS tenen uns límits de detecció molt més elevats que els que realitzen l'anàlisi per ICP-MS. No obstant, la instrumentació de l'ICP-MS té un cost i un manteniment molt més elevats que la instrumentació CV-AFS, que és econòmica i assequible per als laboratoris d'anàlisis de rutina.

En el mètode proposat en aquest treball s'usen per a la preconcentració i la separació columnes ODS Hypersil, que són àmpliament utilitzades en molts laboratoris i tenen una vida útil llarga.

El mètode establert té uns LOD del mateix ordre que els dels mètodes bibliogràfics que usen CV-AFS per a la detecció. Tanmateix, en molts d'aquests mètodes la preconcentració no es realitza en línia de manera que s'allarga el temps d'anàlisi de la mostra i es requereix, en primer terme, una etapa de preconcentració de les espècies i, posteriorment, la seva separació i determinació. En comparació, el sistema de preconcentració en línia presenta un gran nombre d'avantatges: l'anàlisi es realitza en una sola etapa en lloc de dues, es redueix la possibilitat de contaminació de la mostra i la precisió és elevada així com la repetibilitat de les determinacions.

Caract. sistema preconc.	Tècnica detecció	LOD MeHg⁺ [ng/L]	LOD Hg²⁺ [ng/L]	Referència
On-line (SPE; C ₁₈)	CV-AFS	18 ^a ~40 ^b 5 ^c	18 ^a ~5 ^b 4 ^c	Aquest treball
Off-line (SPE; Cys-fibre)	CV-AFS	3 ^d	1	23
On-line (Reactor enrotllat PTFE)	PVG-AFS	-	4-8	24
Off-line (SPE; C ₁₈)	CV-AAS	4300	800	16
Off-line (SPE; Dowex Optipore SD-2)	CV-AAS	2	2	25
Off-line (SPE)	CV-AAS	0,56	0,44	26
Off-line (SPE; C ₁₈ amb ditizona)	ICP-MS	~ 3	~ 3	18
On-line (CEC; material sulfònic)	ICP-MS	0,016	0,042	17
On-line (SPE; C ₁₈)	ICP-MS	0,03	0,12	19

(a) LOD calculat

(b) LOD experimental

(c) LOD preconcentrant el volum de saturació d'aigua Milli-Q

(d) Es determina per diferència entre Hg_{total} i Hg²⁺

Taula 16. Concentracions en el límit de detecció de les tècniques d'especiació de Hg en aigua.

7. CONCLUSIONS

- The sensitive and robust on-line preconcentration-HPLC-UV-CV-AFS system was a consistent method for the speciation analysis of the most relevant mercury species in water samples, inorganic mercury and methylmercury. Compared to the instrumentation required in other analytical techniques, the on-line preconcentration system is user-friendly and economic.
- An ODS Hypersil (C₁₈; reverse phase) column was used for the preconcentration of the species. A 2 cm length column was chosen because it provides similar results than a 5 cm length column.
- Under the optimized conditions, the greatest preconcentration factors were obtained in matrices with low complexity in its composition such as Milli-Q water. In a similar way, the preconcentration factors of still water with low mineral content were greater than medium mineralization water and tap water ones.
- A preconcentration method for mercury speciation in environmental water samples was implemented. High preconcentration factors up to 30 were obtained with 4 mL of sample solution.
- The analytical performance of the on-line preconcentration system was evaluated by determining the quality parameters described.
 - Calibration curves showed high sensitivity, high dynamic range and good linearity in standards concentration range (5-750 µg/L).
 - The average recoveries of MeHg⁺ and Hg²⁺ were high, 74±11% and 81±11%, respectively.
 - The accuracy was determined by the analysis of the ERM-CA713 reference certified material. t-test demonstrated that method results were not significantly different from the reference value.
 - Compared to the bibliographic data reviewed, the proposed method has similar sensitivity, limits of detection and limits of quantification. One step analysis, wide applicability, high precision and high accuracy were the most remarkable advantages of the on-line preconcentration system.

8. REFERENCES AND NOTES

1. Spengler, J. D.; Sexton, K. A. Indoor Air Pollution: A Public Health Perspective. *Science* **1983**, *221*, 9–17.
2. Hong, S.; Candelone, J. P.; Patterson, C. C.; Boutron, C. F. History of Ancient Copper Smelting Pollution During Roman and Medieval Times Recorded in Greenland Ice. *Science* **1996**, *272*, 246–249.
3. Minamata Disease: The History and Measures, *The Ministry of the Environment*, Government of Japan, **2002**. <http://www.env.go.jp/en/chemi/hs/minamata2002/> (accessed Nov 15, 2013).
4. Varma, R.; Varma, D. R. The Bhopal Disaster of 1984. *B. Sci. Technol. Soc.* **2005**, *25*, 37–45.
5. Blum, E. D. *Love Canal Revisited: Race, Class, and Gender in Environmental Activism*. Kansas: University Press of Kansas, reprint **2008**.
6. <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2008:348:0084:0097:EN:PDF> (accessed Dec 16, 2013).
7. http://ec.europa.eu/environment/water/water-dangersub/pdf/com_2011_876.pdf (accessed Dec 16, 2013).
8. Holmes, P.; James, K. A. F.; Levy, L. S.; Is low-level environmental mercury exposure of concern to human health? *Sci. Total Environ.* **2009**, *408*, 171–182.
9. <http://geology.about.com/od/minerals/ig/minpicsulfides/minpicinnabar.htm> (accessed Nov 15, 2013).
10. Global Mercury Assessment 2013: Sources, emissions, releases, and environmental transport. UNEP: Geneva, **2013**.
11. Kirby, A. et al. Mercury time to act. United Nations Environment Programme (UNEP), **2013**.
12. Lehnher, I.; St. Louis, V. L.; Hintelmann, H.; Kirk, J. L. Methylated mercury species in marine waters of the Canadian high and sub Arctic. *Nature Geosci.* **2011**, *4*, 298–302.
13. Skoog, D. A.; Holler, F. J.; Crouch, S. R. *Principles of instrumental analysis*. 6th ed.; Thomson Brooks/Cole: Canada, 2007.
14. Song J. Y.; Hou, M.; Zhang, L. X. Determination of mercury at trace level in natural water samples by hydride generation atomic absorption spectrophotometry after cloud point extraction preconcentration. *Chin. Chem. Lett.* **2006**, *17*, 1217–1220.
15. <http://goldbook.iupac.org/ST06848.html> (accessed Nov 24, 2013).
16. Margetinova, J.; Houserova-Pelcova, P.; Kuban, V.; 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* **2008**, *615*, 115–123.
17. Xiao-yu, J.; Di-rong, G.; Yi, H.; Chao, W.; Tai-cheng, D.; Hang-ting, C. Fast speciation of mercury in seawater by short-column high-performance liquid chromatography hyphenated to inductively coupled plasma spectrometry after on-line cation exchange column preconcentration. *Talanta* **2012**, *88*, 724–729.
18. Yin, Y. G.; Chen, M.; Peng, J. F.; Liu, J. F.; Jiang, G. B.; Dithizone-functionalized solid phase extraction-displacement elution-high performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry for mercury speciation in water samples. *Talanta* **2010**, *81*, 1788–1792.
19. Cairns, W. R. L.; Rinaldo, M.; Hennebelle, R.; Turetta, C.; Capodaglio, G.; Ferrari, C. F.; Dommergue, A.; Cescon, P.; Barbante, C.; Speciation analysis of mercury in seawater from the lagoon of Venice by on-line preconcentration HPLC–ICP-MS. *Anal. Chim. Acta* **2008**, *622*, 62–69.
20. Campos, R. C.; Goncalves, R. A.; Brandao, G. R.; Azevedo, M. S.; Oliveira, F.; Wasserman, J. Methylmercury determination using a hyphenated high performance liquid chromatography ultraviolet cold vapor multipath atomic absorption spectrometry system. *Spectrochim. Acta B* **2009**, *64*, 506–512.
21. Ying, G.; Zeming, S.; Zhou, L.; Peng, W.; Chengbin, Z.; Xiandeng, H. Determination and speciation of mercury in environmental and biological samples by analytical atomic spectrometry. *Microchem. J.* **2012**, *103*, 1–14.

22. Skoog, D. A.; Holler, F. J.; Nieman, T. A. *Principios de análisis instrumental*. 5ª ed.; Madrid: McGraw-Hill, 2001.
23. Chen, M. L.; Ma, H. J.; Zhang, S. Q.; Wang, J. H. Mercury speciation with L-cysteine functionalized cellulose fibre as adsorbent by atomic fluorescence spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom.* **2011**, 26, 613–617.
24. Ying, G.; Wulin, Y.; Chengbin, Z.; Xiandeng, H.; Li, W. On-line preconcentration and in situ photochemical vapor generation in coiled reactor for speciation analysis of mercury and methylmercury by atomic fluorescence spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom.* **2011**, 26, 126-132.
25. Tuzen, M.; Karaman, I.; Citak, D.; Soylak, M. Mercury (II) and methyl mercury speciation on *Streptococcus pyogenes* loaded Dowex Optipore SD-2. *J. Hazard. Mater.* **2009**, 169, 345-350.
26. Turker, A. R.; Cabuk, D.; Yalcinkaya, O. Preconcentration, Speciation, and Determination of Mercury by Solid Phase Extraction with Cold Vapor Atomic Absorption Spectrometry. *Anal. Lett.* **2013**, 46, 1155-1170.

9. ACRONYMS

- s: Standard deviation
- AAS: Atomic absorption spectrometry
- AFS: Atomic fluorescence spectrometry
- APDC: Ammonium pyrrolidinedithiocarbamate
- CE: Capillary electrophoresis
- CEC: Cation exchange chromatography
- CVG/CV: Cold vapour
- CPE: Cloud point extraction
- CRM: Certified reference material
- DLLME: Dispersive liquid-liquid microextraction
- DMeHg: Dimethylmercury
- EPA: United States Environmental Protection Agency
- EtHg⁺: Ethylmercury
- GC: Gas chromatography
- FM: Mobile phase
- FP: Preconcentration factor
- HPLC: High-performance liquid chromatography
- ICP: Inductively coupled plasma
- IRMM: Institute for Reference Materials and Measurements
- IUPAC: International Union of Pure and Applied Chemistry
- LOD: Limit of detection
- LOL: Limit of linearity
- LOQ: Limit of quantification
- MeHg⁺: Methylmercury
- MS: Mass spectrometry
- OES: Optical emission spectrometry

-
- ODS: Octadecylsilyl
 - PTFE: Polytetrafluoroethylene (Teflon)
 - PVG: Photochemical vapour generation
 - RP: Reverse phase
 - RSD: Relative standard deviation
 - SPE: Solid phase extraction
 - SPME: Solid phase microextraction
 - SS: Stainless steel
 - UV: Ultraviolet light

