プロピル化 -HS-GC/MS 法を用いた環境水中メチル水銀及びエチル水銀の同時測定

村山 等, 大野 峻史, 廣瀬 春美, 猪又 義広, 齋藤 辰善, 旗本 尚樹, 家合 浩明

新潟県保健環境科学研究所 (〒950-2144 新潟県新潟市西区曾和314番地 1)

[2019年 3月26日受付, 2019年 6月 3日受理]

Simultaneous Determination of Methylmercury and Ethylmercury in Natural Waters using Propylation-Headspace-GC/MS

Hitoshi MURAYAMA, Takashi ONO, Harumi HIROSE, Yoshihiro INOMATA,
Tatsuyoshi SAITO, Naoki HATAMOTO and Hiroaki YAGOH

Niigata Prefectural Institute of Public Health and Environmental Sciences
(314-1 Sowa, Nishi, Niigata, Niigata 950-2144)

[Received March 26, 2019; Accepted June 3, 2019]

Summary

Simultaneous determination of methylmercury (MeHg) and ethylmercury (EtHg) in natural waters was developed using propylation-headspace (HS)-GC/MS. Sodium tetra (n-propyl) borate was used as a propylating agent. Mercury compounds were extracted as dithizon-complex by toluene, then back extracted into water by evaporating the toluene. The mercury species in the water was propylated in the headspace vial and analyzed with HS-GC/MS. The limits of detection of MeHg and EtHg for 1 L water sample were 0.005 and 0.007 ng/L, respectively. The average recoveries of MeHg and EtHg, performed for several natural water samples, were 91 and 87%, respectively. Using this method, determinations of a small amount of MeHg and EtHg in natural waters are applicable.

Key words: sea water, river water, rain water, organic mercury, sodium tetra(n-propyl)borate

1. はじめに

金属水銀は金属の中で唯一常温中液体であり、体温計や圧力計、乾電池や蛍光灯など、身近な製品に様々な用途で使用されてきた。かつて無機水銀化合物は農薬、消毒剤、歯の治療など多くの分野で使用されており、また、有機水銀化合物であるメチル水銀及びエチル水銀は農薬水銀剤として1963年まで使用されていた¹⁾。1960年代にはアルデヒドを製造する工場に使われていた無機水銀が毒性の高いアルキル水銀に変化²⁾し、排水として流れ出るにより水俣病を引き起こし、多くの被害者を発生させた。これらの事実を踏まえ、水銀汚染防止に向けた国際的な水銀規制を図るため、2013年に国連環境計画の外交会議で、「水銀に関する水俣条約」が採択された。

水銀は自然界にも多く存在し、火山噴火や石炭燃焼によって水銀が環境に放出されていることが知られている。放出時の水銀の形態は金属水銀もしくは無機水銀であるが、一部の無機水銀が環境中で有機水銀に変化することが知られている³⁾。生成した有機水銀は無機水銀に比べて毒性が高く、脂質に蓄積しやすいことからプランクトンを経由して魚類に比較的高濃度で蓄積すると言われているが、環境中での水銀の挙動や分布状況は必ずしも明らかではない。この

ため、環境中で様々な形態で存在する水銀化合物の動態を把握することは、今後の汚染防止や突発的事故等によって放出された後の形態変化と人体への影響を予測する上で重要である。

環境水中の水銀濃度は、国内では水質汚濁防止法に基づき公用水域または地下水の監視として総水銀及びアルキル水銀濃度が測定されているが、定量下限値が0.5 µg/Lと比較的高く、検出されることはほとんどない。環境水中の有機及び無機水銀濃度レベルについては、世界的にはこれまで北アドリア海⁴⁾、地中海⁵⁾、北太平洋⁶⁾、バルト海⁷⁾、北極海⁸⁾など各地で観測された結果が報告されているが、国内では水俣湾地域において海水⁹⁾や湿性降下物¹⁰⁾中の総水銀及びメチル水銀濃度が調査されているのみで、他の調査例は見当たらない。これは、環境水中に存在する水銀化合物の濃度レベルが著しく低く、測定にあたっては選択性の高い前処理と高感度の測定方法が必要なが一因と考えられる。

環境水中に極微量存在する種々の水銀化合物を一斉に分析する方法としては、これまでの多くがエチル化試薬により気化しやすいエチル誘導体とし、GC分離後冷原子蛍光光度計^{11, 12)}または質量分析計 (MS)^{13, 14)}で測定する方法を採用してきた。一方で、エチル化による方法では二価の無機水銀 (水銀 (Ⅱ)) とエチル水銀の

区別が付けられない欠点を有する。このため、エチル化の代わりにプロピル化を行うことにより、この欠点を解消することができ¹⁵⁻¹⁸⁾。Bravo-Sanchez^{ら19)}は、プロピル化試薬を海水中の水銀化合物の測定に用い、プロピル化した水銀化合物を固相マイクロ抽出後 GC-誘導結合プラズマ質量分析計 (GC-ICP-MS) 測定を行ったところ、メチル水銀を0.17 ng/L まで検出できたと報告している。誘導体化を行わず、水中の水銀化合物を強陰イオン交換樹脂で濃縮し、HPLC で分離後 ICP-MS で測定する方法^{20, 21)}では、水銀 (Ⅱ) とメチル水銀及びエチル水銀の同時定量が可能と報告されている。

本研究では環境水中に存在する水銀化合物を同時に定量する方法の確立を目指し、プロピル化試薬により水銀 (Ⅱ) とメチル水銀及びエチル水銀をプロピル誘導体とし、GC/MS により定量する方法を検討した。水試料の濃縮は、「水銀分析マニュアル」²²⁾を参考にジチゾン-トルエン抽出法を採用した。抽出した水銀化合物を水に転溶したのちプロピル化し、ヘッドスペース (HS)-GC/MS で測定したところ、河川水、海水及び雨水などの一般環境水中に極微量存在する水銀化合物の定量が可能となったので報告する。

2. 方法

2. 1 分析試薬及び器具

2. 1. 1 試薬

それぞれの水銀化合物の標準溶液は次のように調製した。水銀 (Ⅱ) は関東化学株式会社製水銀標準液1,000 µg/mL を使用した。メチル水銀は東京化成株式会社製の塩化メチル水銀を用い、99.5% エタノール (和光純薬製農薬・PCB 試験用 (5,000倍濃縮)) で溶解して、メチル水銀として1,000 µg/mL 標準原液を調製した。エチル水銀は東京化成株式会社製塩化エチル水銀を用い、メチル水銀と同様に標準原液を調製した。これらを1%硝酸水で希釈・混合し、0.001 ~ 1 µg/mL の混合標準液を調製した。トルエンは関東化学株式会社製残留農薬・PCB 試験用 (5,000倍濃縮) を使用した。水酸化ナトリウムは関東化学株式会社製 ACS 顆粒を使用した。実験に使用した水はメルク社製 Milli-Q Integra 5 による超純水を使用した。ジチゾンは関東化学株式会社製特級を用い、これを使用時にトルエンに溶かして0.01% 溶液を調製し、「水銀分析マニュアル」に記載のある精製方法に従って精製してから使用した。エチレンジアミン四酢酸四ナトリウム塩四水和物 (EDTA) は和光純薬製を用いた。これを水に溶かし10% EDTA 溶液を調製して使用した。プロピル化試薬には林純薬工業製テトラ (n-プロピル) ほう酸ナトリウム (STPB) を使用した。これをアルゴン雰囲気下で0.1 g 精秤し、0.1 N 水酸化ナトリウムで1% STPB 水溶液になるよう溶解した。これをテフロン容器内で冷凍保存しておき、使用時に常温に戻して使用した。使用後は直ちにアルゴン雰囲気とし、再び冷凍保存することにより繰り返し使用可能となった。2M 酢酸緩衝液は酢酸ナトリウム16.4 g と酢酸11.8 mL を水に溶かし、100 mL にメスアップして調製した。定量用内部標準物質 (IS) として和光純薬工業株式会社製 p-ブロモフルオロベンゼン標準液 (1,000 µg/mL) を用い、これをメタノールで0.5 µg/mL 溶液に希釈調製して用いた。

2. 1. 2 器具

ガラス器具には無機水銀のブランクがあるため、使用前に10%硝酸溶液に一昼夜以上漬けて洗浄した器具を、使用直前に硫酸酸性過マンガン酸カリウム0.01% 溶液を加えて振り混ぜたのち、ヒドロキシルアミン0.2% 溶液を加えて過マンガン酸カリウムを還元し、水で濯いでから使用した。

2. 1. 3 水試料からの抽出操作

2 L 分液ロートに試料水1 L、10% EDTA 2.5 mL と0.01% ジチゾ

ン-トルエン溶液6 mL 及びトルエン1 mL を加え、1 分間振とう抽出した。これを1 時間以上静置してから水層を捨て、トルエン層を10 mL 共栓付き遠心管に移動した。

2. 1. 4 前処理操作

トルエン抽出液に1N-NaOH 2.5 mL を加えて3 分間振とうした後、2,400 rpm で遠心分離し、下層をピペットで吸い出して余分なジチゾンを除いた。再び1N-NaOH 2.5 mL を加えて同じ操作を行い、トルエン層の着色がなくなるまで繰り返した。無色になったトルエン層から5 mL を分取し、50 mL ナスフラスコに入れて40℃、50 hPa の減圧下でロータリーエバポレータによりトルエンを留去した。これに水を5.5 mL 加え、再び同じ条件下でロータリーエバポレータによりトルエンを除き、水銀化合物を水層へ移行させた。これを水5 mL で洗い込みながらヘッドスペースバイアルへ移行させた。

2. 1. 5 プロピル化反応操作

ヘッドスペースバイアル中の試験水に2M 酢酸緩衝液50 µL を加えて軽く振り混ぜ、pH を4.8に調整した。そののち、1% STPB 溶液50 ~ 100 µL 及び IS 溶液2 µL を加えて直ちに密栓し、手で振り混ぜたのちヘッドスペースサンプラー-ガスクロマトグラフ質量分析計 (HS-GC/MS) にセットした。

2. 1. 6 検量線溶液の調製

検量線は、標準溶液に対し試料と同じ前処理操作を行ったのちにプロピル化反応を行い、得られたクロマトグラフから検量線を作成した。すなわち、10 mL 共栓付き遠心管に0.01 ~ 1 ng (水銀 (Ⅱ) は10倍量) の水銀化合物を入れ、0.01% ジチゾン-トルエン溶液6 mL を加えた後2.1.4の前処理操作及び2.1.5のプロピル化反応操作を行った。これを次の測定条件に従って HS-GC/MS 測定を行った。

2. 1. 7 測定条件

HS-GC/MS には日本電子製 MS-62070STRAP-Q1500GC を使用した。HS 条件及び GC/MS 測定条件を Table 1 に示す。HS では感度を上げるため、トラップモードで前処理を行った。トラップの繰り返し回数を増やすと感度は上昇するがその分前処理の時間がかか

Table 1 HS-GC/MS conditions

HS	
Instrument	MS-62070STRAP (JEOL)
Sample volume	10 mL
Sample temp. and time	70°C, 12 min
Sampling mode	Trap (AQUA-TRAP1)
Sampling pressure	100 kPa → 10 kPa
Trap cycle	4 times
Trap desorb temp.	230°C
Injection time	3 min
GC/MS	
Instrument	Q1500GC (JEOL)
Column	InertCap AQATIC-2 (60 m, 0.32 mmφ, 1.8 µm)
Oven temp.	40°C (3 min) → 20°C/min → 230°C (5 min)
Carrier gas	He 2.0 mL/min
Injection mode	Direct injection
Ion source temp.	230°C
Emission current	20 µA
Ionization voltage	70 eV
Detection mode	SIM
Monitor ion	Methylpropyl-Hg : m/z = 260, 217 Ethylpropyl-Hg : m/z = 274, 231 Dipropyl-Hg : m/z = 288, 286 IS (p-Bromofluorobenzene): m/z = 174, 176

る。そこで繰り返し回数を4回とした。HSでの試料温度は70℃に設定した。

2. 1. 8 定量

検量線溶液の測定から得られたそれぞれのプロピル誘導体のピーク面積とISのピーク面積の比から内標準法により検量線を作成し、試料溶液中のプロピル誘導体のピーク面積とISのピーク面積の比から定量計算を行った。

3. 結果及び考察

3. 1 プロピル化試薬の取扱い

プロピル化反応試薬として使用したSTPBは吸湿性が高く、室内空気に触れると潮解して失活しやすい性質がある。このため、0.1 N-NaOHに溶解する際にはアルゴン雰囲気下で行った。また、調製した試薬を保存する際はアルゴンを封入したテフロン製密閉容器内で冷凍庫に保存した。このように調製した試薬は少なくとも一月後まで使用可能であった。使用時は室温にして液体に戻し、連続分注ピペッターを使用して試料液に添加することとし、空気に触れる機会を極力少なくするよう取り扱った。使用後は再びアルゴンで曝気し、空気に触れないよう再び冷凍保存した。それでも反応に使うたびに活性が徐々に低下するので、同じ試薬の繰り返し使用は3回以内とした。

3. 2 抽出及び前処理操作

水試料からの水銀化合物の抽出及び前処理操作として「水銀分析マニュアル」での水試料中のメチル水銀の分析法を参考に手法を検討した。まず、水試料から水銀化合物を抽出する方法としてジチゾン-トルエンを用い、抽出前に試料1Lに対し0.5%過マンガン酸カリウム溶液2.5 mLを加えて攪拌処理を行ったところ、Fig. 1に示すように、過マンガン酸カリウムで処理しない場合に比べてメチル水銀及びエチル水銀が減少する傾向が見られた。そこで、以後は過マンガン酸カリウムを添加しないで抽出を行うことにした。操作の全フローをFig. 2に示す。0.01%ジチゾン-トルエンで抽出したトルエン層には過剰のジチゾンが残っているので、1N-NaOH溶液で洗浄し、トルエンに残っている過剰のジチゾンを除去した。ジチゾンが除去されたかどうかはトルエン抽出液が褐色に着していたので、着色がなくなるまでこの1N-NaOH溶液による洗浄作業を行った。通常は1N-NaOH溶液での洗浄は3回で十分であった。次に、トルエン抽出液中の水銀化合物-ジチゾン錯体を水層へ移行させるため、最初は「水銀分析マニュアル」に従ってエタノール-硫化ナトリウム溶液を用いて水層へ移行させる方法を検討したが、1) エ

Fig. 1 Recovery of Hg species after the treatment of KMnO_4

- 1) Spiked amount of the mercury compound is 1 ng each.
- 2) Treatment procedure of KMnO_4 is described in the text.

タノールがあるとキャピラリーカラムでの分析に支障が生ずる、2) トルエンが残留するとエタノールと同様にキャピラリーカラムでの分析に支障が生ずる、3) プロピル誘導体の生成率が低下するなど、いくつかの問題点が発生したため、次に示すトルエン層中の水銀化合物を直接水層へ移行させる方法を検討した。すなわち、トルエン層に水を加え、ロータリーエバポレータを用いて減圧下でトルエンを留去させた。この際、トルエンを水温50℃、50 hPaで除去するとメチル水銀及びエチル水銀の回収率が低下したので、水温を40℃とし、50 hPaでの減圧下で緩やかにトルエンを留去させた。この方法により水銀化合物を効率的に水層へ移行できた。ただし、トルエンが多く残留するとキャピラリーカラムでの分析に支障が生ずるため、減圧方法には試料間での操作を統一するなどの注意が必要であった。

3. 3 HS-GC/MSによる測定

メチル水銀、エチル水銀及び水銀(II)をプロピル化するとそれぞれメチルプロピル水銀(MePrHg)、エチルプロピル水銀(EtPrHg)及びジプロピル水銀(DiPrHg)が生成する。標準液をプロピル化してHS-GC/MSで測定したところ、Fig. 3に示すマススペクトルとFig. 4に示すクロマトグラムが得られた。低濃度標準溶液を測定し、そのマススペクトルにおいてS/N比が高いイオンをTable 1に示す定量イオン及び確認イオンとした。HSでの加熱温度を65~85℃に変えて検討したところ、いずれの水銀化合物も70℃で最高感度を示したことから、以後70℃で行うこととした。

3. 4 プロピル誘導体の生成率

本試験操作では水試料から抽出したジチゾン-トルエン層の精製及び水層への転溶操作を行っているため、これらの操作を行わないで直接標準溶液を反応させた場合に比べてプロピル誘導体の生成割合が変化する可能性がある。そこで、標準溶液を直接反応させた場

Fig. 2 Schematic flow diagram showing the principal steps in the determination of mercury species by dithizone extraction, aqueous propylation and headspace-GC/MS analysis. See text for a detailed description of each step

Fig. 3 Mass spectra of mercury compounds by HS-GC/MS

Fig. 4 Mass chromatogram of propylated mercury compounds by HS-GC/MS

合のプロピル誘導体の生成率を100%とし、抽出及び前処理操作を行った場合の生成率を調べた。その結果、メチル水銀及びエチル水銀各1 ngではそれぞれ96及び89%と高かったが、水銀(Ⅱ) 10 ngでは42%に低下した。これは水銀(Ⅱ)がジチゾン錯体となった際にプロピル化反応が阻害されるためと推測されるが詳細は不明である。そこで、標準溶液に対しても試料と同じ前処理操作を行うことで定量性を確保することにした。この方法で作成した検量線をFig. 5に示す。メチル水銀及びエチル水銀は低濃度域まで直線性を示したが、水銀(Ⅱ)は低濃度域では感度が低下する傾向にあったため、二次曲線として定量に用いた。

3. 5 操作ブランクと検出下限

操作ブランクはメチル水銀及びエチル水銀では認められなかったが、水銀(Ⅱ)では平均で0.036 ngの操作ブランクが認められたため、検出下限の算出は、メチル水銀及びエチル水銀については精製水1Lへの低濃度(各0.02 ng)の添加試料での繰り返し測定(n = 4)から、水銀(Ⅱ)については操作ブランクの繰り返し測定(n = 9)から求めた。それぞれの標準偏差の3倍を検出下限値とすると、試料濃度に換算した検出下限値はメチル水銀では0.005 ng/L、エチル水銀では0.007 ng/L、水銀(Ⅱ)では0.07 ng/Lであった。

3. 6 添加回収試験

添加回収試験は精製水、河川水及び海水を用いて水銀化合物3種類の同時添加回収試験を行った。河川水は新潟県の一級河川5箇所、

海水は日本海の新潟市沿岸、雨水は新潟市の当研究所の屋上で採取したものを使用した。環境水試料は事前に0.45 µmのメンブランフィルターで濾過し、浮遊物質を除いてから試験に供した。水銀の添加量は、メチル水銀及びエチル水銀はそれぞれ0.3 ng、水銀(Ⅱ)は3 ngとした。これを試料1 Lに添加し、Fig. 4の操作フローに従って処理を行い、試料中水銀化合物濃度T1を求めた(n = 2)。同時に無添加試料についても同じ処理を行い、水銀化合物濃度T0を求めた(n = 2)。(T1-T0)から回収量を算出し、添加量との割合から回収率(%)を求めた。結果をTable 2に示す。

メチル水銀の回収率は全試料で71 ~ 128% (平均91%)と良好であった。また、エチル水銀の回収率についても60 ~ 127% (平均87%)と比較的良好であった。これに対し、水銀(Ⅱ)の回収率は精製水及び雨水では62 ~ 96% (平均77%)であるのに対し、河川水及び海水では101 ~ 202%と高くなる傾向が見られた。水銀(Ⅱ)は3.4の項で述べたように、検量線溶液ではジチゾンでの抽出、前処理操作を行うとプロピル誘導体の生成率が42%と低くなる傾向がある。これに対し、河川水や海水といった実試料では、それに含まれる夾雑物等の影響でプロピル誘導体の生成率が高くなり、見かけ上回収率が100%を超えたものと推測された。従って、現段階では水銀(Ⅱ)の定量値の正確性は低く、今後の改善が必要である。

なお、河川水試料からはメチル水銀が全ての試料から検出されたほか、エチル水銀も5試料中4試料から検出された。また、海水試料からはメチル水銀及びエチル水銀が、雨水試料からはメチル水銀が検出されており、本法が極低濃度の環境水試料のアルキル水銀濃

Fig. 5 Calibration curve of mercury compounds after dithizone-toluene extraction and reverse extraction to water

Table 2 Spike test of the mercury compounds for the pure water and the natural water

Samples	Sampling		Conc. in the sample (ng/L)			Spike test recovery (%)		
	Point	Term	Me-Hg	Et-Hg	Hg (II)	Me-Hg	Et-Hg	Hg (II)
Pure water	-	-	<0.005	<0.007	<0.07	98	84	73
River water	Arakawa R.	2018/11/19	0.036	0.010	<0.07	93	89	148
"	Agano R.	2018/11/19	0.061	0.021	0.08	128	127	202
"	Shinano R.	2019/2/14	0.030	0.009	0.20	89	89	142
"	Seki R.	2018/11/20	0.059	0.013	0.28	97	92	172
"	Hime R.	2019/2/15	0.028	<0.007	0.21	81	78	101
Sea water	Japan Sea	2019/2/27	0.019	0.012	0.09	87	60	155
Rain water	Niigata city	2018/8/6-16	<0.005	<0.007	0.31	71	92	62
"	Niigata city	2018/12/7-20	0.017	<0.007	0.72	77	75	96

1) Spiked amount: 0.3 ng for methyl mercury and ethyl mercury, 3 ng for mercury (Ⅱ)

2) Analytical procedure is shown in the text.

3) Results are the average of two measurements.

Table 3 Measurement result of ERM-CC580

Compound	Measured conc.*	Certified value
Methyl-Hg	61 ± 7	75 ± 4
Ethyl-Hg	31 ± 7	— **

unit: ng/g

*: Repeated number of measurement is 4.

**: There is no certified value for ethylmercury.

度把握に有効であることが示唆された。

3. 7 底質標準試料による確認

測定方法の妥当性を評価する上で、認証値のある標準試料を用いることは有効であるが、環境水では水銀化合物の認証値のある標準品は見当たらない。そこで、認証値のある底質標準試料 ERM-CC580を用いて本測定方法の妥当性確認を行った。この試料を「水銀分析マニュアル」での土壌・底質試料の前処理方法に従い、次のように操作した。試料0.1 gを1N-KOH-エタノール溶液10 mLで30分間超音波抽出した後、1N-HCl 10 mLで弱酸性化した。これに窒素ガスを100 mL/分で5分間通気した後、10%ヒドロキシルアミン塩酸塩 2 mL及び10% EDTA 4 mLを加えて混和し、水で50 mLにメスアップして試料溶液とした。この試料溶液の一部を分取し、0.01%ジチゾン-トルエン溶液 6 mLで水銀化合物を抽出したのち、トルエン層を10 mL共栓付き遠心管に移し、2.1.4 前処理操作以降の操作を行って定量した。結果をTable 3に示す。

メチル水銀の保証値が75 ± 4 ng/gであるのに対し、本法による測定値は61 ± 7 ng/gとやや低いものの近い値を示した。一方、エチル水銀は保証値がないが、31 ± 7 ng/gとメチル水銀の半分程度の濃度が検出された。これまでエチル水銀の保証値がある標準試料はないため、本標準試料による保証値の作成が望まれる。

本研究は新潟県保健環境科学研究所が行っている特定研究「新潟県における環境中の水銀に係る動態の解明」の一環で行ったものである。

要 約

環境水中に存在する水銀化合物を一斉に定量するため、テトラ(n-プロピル)ほう酸ナトリウムを用いてメチル水銀及びエチル水銀をプロピル誘導体とし、HS-GC/MSにより定量する方法を検討した。水試料中の水銀化合物をジチゾン-トルエンを用いて抽出し、抽出液中の水銀化合物を水に転溶したのちプロピル化し、HS-GC/MSで測定した。検出下限値はメチル水銀で0.005 ng/L、エチル水銀で0.007 ng/Lであった。環境水試料を用いて添加回収試験を実施したところ、メチル水銀及びエチル水銀はいずれの媒体に対しても回収率がそれぞれ91及び87%と良好であった。本法を用いることにより河川水、海水及び雨水などの一般環境水中に極微量存在するメチル水銀及びエチル水銀の測定が可能となった。

文 献

- 藤木素士：水銀の精算・需要・用途，pp1-36，「水銀」，喜多村正次，近藤正臣，滝沢行雄，藤井正美，藤木素士共著，講談社サイエンスフィク，東京（1976）
- 西村 肇，岡本達明：メチル水銀の生成機構，pp230-234，「水俣病の科学」日本評論社，東京（2001）
- 藤木素士：水銀の環境変化，pp208-231，「水銀」，喜多村正次，近藤正臣，滝沢行雄，藤井正美，藤木素士共著，講談社サイエンスフィク，東京（1976）
- Faganeli, J., Horvat, M., Covelli, S., Fajon, V., Logar, M., Lipej, L. and Cermelj, B.: Mercury and methylmercury in the Gulf of Trieste (northern Adriatic Sea). *Sci. Total Environ.*, **304**, 315-326 (2003)
- Horvat, M., Kotnik, J., Logar, M., Fajon, V., Zvonaric, T., and Pirrone, N.: Speciation of mercury in surface and deep-sea waters in the Mediterranean Sea. *Atmos. Environ.*, **37**, Supplement No.1, S93-S108 (2003)
- Sunderland, E.M., Krabbenhoft, D.P., Moreau, J.W., Strode, S.A. and Landing, W.M.: Mercury sources, distribution, and bioavailability in the North Pacific Ocean: insights from data and models. *Global Biogeochemical Cycles*, **23**, GB2010,doi:10.1029/2008GB003425 (2009)
- Kuss, J., Cordes, F., Mohrholz, V., Nausch, G., Naumann, M., Kruger, S. and Schulz-Bull, D. E.: The impact of the major Baltic inflow of December 2014 on the mercury species distribution in the Baltic Sea. *Environ. Sci. Technol.*, **51**, 11692-11700 (2017)
- Chetelat, J., Richardson, M.C., MacMillan, G.A., Amyot, M. and Poulain, A.J.: Ratio of methylmercury to dissolved organic carbon in water explains methylmercury bioaccumulation across a latitudinal gradient from north-temperate to Arctic Lakes. *Environ. Sci. Technol.*, **52**, 79-88 (2018)
- Matsuyama, A., Eguchi, T., Sonoda, I., Tada, A., Yano, S., Tai, A., Marumoto, K., Tomiyasu, T. and Akagi, H.: Mercury speciation in the water of Minamata Bay, Japan. *Water, Air, Soil Pollut.*, **218**, 399-412 (2011)
- Marumoto, K. and Matsuyama, A.: Mercury speciation in wet deposition samples collected from a coastal area of Minamata Bay. *Atmos. Environ.*, **86**, 220-227 (2014)
- Leermakers, M., Nguyen, H.L., Kurunczi, S., Vanneste, B., Galletti, S. and Baeyens, W.: Determination of methylmercury in environmental samples using static headspace gas chromatography and atomic fluorescence detection after aqueous phase ethylation. *Anal. Bioanal. Chem.*, **377**, 327-333 (2003)
- Munson, K.M., Babi, D. and Lamborg, C.H.: Determination of monomethylmercury from seawater with ascorbic acid-assisted direct ethylation. *Limnol. Oceanogr. Methods*, **12**, 1-9 (2014)
- Prieto, A., Zuloaga, O., Usobiaga, A., Etxebarria, N., Fernandez, L.A., Marcic, C. and de Diego, A.: Simultaneous speciation of methylmercury and butyltin species in environmental samples by headspace-stir bar sorptive extraction-thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, **1185**, 130-138 (2008)
- Ito, R., Kawaguchi, M., Sakui, N., Okanouchi, N., Saito, K., Seto, Y. and Nakazawa, H.: Stir bar sorptive extraction with in situ derivatization and thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry for trace analysis of methylmercury and mercury (II) in water sample. *Talanta*, **77**, 1295-1298 (2009)
- Demuth, N. and Heumann, K.G.: Validation of methylmercury determinations in aquatic systems by alkyl derivatization methods for GC analysis using ICP-IDMS. *Anal. Chem.*, **73**, 4020-4027 (2001)
- Grinberg, P., Campos, R.C., Mester, Z. and Sturgeon, R.E.: A

- comparison of alkyl derivatization methods for speciation of mercury based on solid phase microextraction gas chromatography with furnace atomization plasma emission spectrometry detection. *J. Anal. At. Spectrom.*, **18**, 902–909 (2003)
- 17) Smaele, T.D., Moens, L., Dams, R., Sandra, P., Van der Eycken, J. and Vandyck, J.: Sodium tetra(n-propyl)borate: a novel aqueous in situ derivatization reagent for the simultaneous determination of organomercury, -lead and -tin compounds with capillary gas chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, **793**, 99–106 (1998)
 - 18) Peñalver, R., Campillo, N. and Hernández-Córdoba, M.: Comparison of two derivatization reagents for the simultaneous determination of organolead and organomanganese compounds using solid-phase microextraction followed by gas chromatography with atomic emission detection. *Talanta*, **87**, 268–275 (2011)
 - 19) Bravo-Sanchez, L.R., Encinar, J.R., Martinez, J.I.F. and Sanz-Medel, A.: Mercury speciation analysis in sea water by solid phase microextraction-gas chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry using ethyl and propyl derivatization. Matrix effects evaluation. *Spectrochimica Acta Part B*, **59**, 59–66 (2004)
 - 20) Cheng, H., Wu, C., Shen, L., Liu, J. and Xu, Z.: Online anion exchange column preconcentration and high performance liquid chromatographic separation with inductively coupled plasma mass spectrometry detection for mercury speciation analysis. *Anal. Chim. Acta*, **828**, 9–16 (2014)
 - 21) Jia, X.Y., Gong, D.R., Han, Y., Wei, C., Duan, T.C. and Chen, H.T.: 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*, **88**, 724–729 (2012)
 - 22) 環境省：水銀分析マニュアル，平成16年3月（2004）[http://nimd.env.go.jp/kenkyu/docs/mercury_analysis_manual\(j\).pdf](http://nimd.env.go.jp/kenkyu/docs/mercury_analysis_manual(j).pdf)