

Thema:

**Optimierung und Validierung einer analytischen Methode zur Bestimmung
von hetero-organischen Verbindung mittels ICP-QQMS und deren
Anwendung**

- Untersuchung mittels UHPLC-ICP-QQMS/ESI-Q-TOFMS Kopplungsmethode

Masterarbeit

**zur Erlangung des Grades eines
Master of Engineering (M. Eng.)**

Von

Xia Ping

(Matrikel-Nr.: 18408)

Betrieblicher Betreuer:

Dr. habil. Jürgen Mattusch

Unternehmen:

Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung GmbH-UFZ

Departement:

Analytik

Betreuer an der Hochschule:

Prof. Dr. rer. nat. Regina Walter

Datum: 10.12.2015

Arbeitsplan (Abstract)

für die Masterarbeit (FH)

von Frau Ping Xia (B.Eng.)

Hochschule Merseburg Fachbereich INW

Zeitraum: 01.04. – 30.10. 2015

Thema: Optimierung und Validierung einer analytischen Methode zur Bestimmung von Heteroorganischen Verbindungen mittels ICP-QQQMS und deren Anwendung

1. Intensive Literaturrecherche
 - a. zur Analytik mittels ICP-QQQMS
 - b. zu Interferenzproblemen
 - c. zur Analytik mittels organischer MS

2. Optimierung einer oder mehrerer Methoden zur sensitiven und interferenzfreien Detektion von S, P, As in organischen Verbindungen
 - a. Handhabung des ICP-QQQMS
 - b. Auswahl und Optimierung der Reaktions-/Kollisionsgase
 - c. Einsatz der Triple-Quad Anordnung
 - i. Quad 1: Massen- bzw. Massenfenster – Auswahl
 - ii. Quad 3: Identifizierung der Produktionen in Abhängigkeit der Bedingungen der Reaktions-/Kollisionszelle (Quad 2)
 - d. Optimierung auf höchste Sensitivität
 - i. ICP seitig
 - ii. QQQMS seitig
 - iii. Einfluss von Lösungsmittel und Pufferkomponenten auf Sensitivität

3. Validierung der optimierten Methode(n)
 - a. Kalibration
 - b. Lineardynamischer Bereich, LOD, LOQ
 - c. Standardabweichung

4. Anwendung der vorgeschlagen Methode
 - a. Arsenolipide in Meeresorganismen (As, P, S)
 - b. As-Phospholipide (As, P)
 - c. As-Phytochelatine (As, S)

5. Auswertung der Ergebnisse
 - a. Anfertigen der schriftlichen Masterarbeit
 - b. PPT- Präsentation als Verteidigungsvortrag

Danksagung

Allen voran möchte ich mich an dieser Stelle bei Herrn Dr. Jürgen Mattusch für die Überlassung des überaus interessanten Themas und die hervorragende fachliche Unterstützung während der gesamten Arbeit bedanken. Wegen seiner Hilfe habe ich viel gelernt. Ich danke auch Frau Prof. Walter für ihr Engagement um eine externe Arbeit anfertigen zu können und ihre Hilfe.

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebene Hilfsmittel und Literaturstellen angefertigt habe, die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

.....

Xia, Ping

.....

Ort, Datum

Inhalt

Tabelleverzeichnis	VIII
Abkürzungsverzeichnis	IX
1. Einleitung	1
2. Zielstellung	2
3. Theoretische Grundlagen	3
3.1 Eigenschaften der Elemente P, S und As und ausgewählter Verbindungen	3
3.1.1 Phosphor	3
3.1.2 Schwefel	4
3.1.3 Arsen.....	5
3.1.4 Analytik der Elemente P, S und As	8
3.2 Eingesetzte Instrumentenkombination.....	8
3.2.1 ICP-MS	9
3.2.2 ESI-Quadrupol time of flight Massenspektrometrie	11
3.3 Flüssigchromatographie	13
4. Praktische Versuchsdurchführung	14
4.1 Detektion mit Standardproben	14
4.1.1 Experimentelle Bedingungen	14
4.1.2 Chemikalien	16
4.2 Optimierung der ICP-QQQMS Parameter für die Detektion von P, S, As und Se	17
4.2.1 Optimierung der Parameter am ICP-QQQMS	18
4.3 Einfluss des Methanol Gehalts auf Empfindlichkeit	21
4.3.1 Batch-Verfahren	21
4.3.2 Einfluss des MeOH-Gehalts auf die Signalintensität im Fließinjektionsverfahren	22
4.3.3 Andere Einflüsse auf die Signalintensität	24
5. Ergebnisse und Diskussion	25
5.1 Detektion von Standardproben mit ICP-QQQMS/ESI-Q-TOFMS.....	25
5.1.1 Detektion von P- Standardproben	25
5.1.2 Detektion von einer S- Standardprobe.....	26
5.1.3 Detektion von P- und S-Standardverbindungen (Pestizide).....	27
5.2 Kalibrierung und LOD-, LOQ-Bestimmung.....	28
5.2.1 Kalibration für die Elemente der 5. Hauptgruppe.....	29
6. Anwendungen	32
6.1 Algen.....	32
6.1.1 Probenahme	32
6.1.2 Identifizierung	33
6.2 Dorschleber	38
6.2.1 Probenahme	39
6.2.2 Quantifizierung von Arsen in den einzelnen Fraktionen.....	40
6.2.3 Identifizierung der Arsenspezies in Extrakten und Hydrolysaten	42
6.2.4 Identifizierung eines möglichen As-PL im aufkonzentrierten Rohextrakt.....	46
7. ZUSAMMENFASSUNG.....	49
Literatur	51
Anhang 1.....	54
Anhang 2.....	56
Anhang 3.....	57
Anhang 4.....	58
Anhang 5.....	60
Anhang 6.....	62
Anhang 7.....	65

Abbildungungsverzeichnis

Abbildung 1: Ausgewählte organische Arsenverbindungen	6
Abbildung 2: Arsen-Fettsäuren identifiziert in Dorschleber Öl	7
Abbildung 3: Struktur von 4 Arsenozuckern in Algen und mit $[M+H]^+$ m/z Masse	8
Abbildung 4: Verwendete Geräte zur Kopplung von Chromatographie mit ICP-MS und ESI-MS.....	9
Abbildung 5: Schematische Darstellung des ICP-QQQMS	10
Abbildung 6: Aufbau eines ICP-MS mit Reaktionszelle	11
Abbildung 7: Aufbau eines ICP-QQQMS mit Reaktionszelle	11
Abbildung 8: Bestandteile eines ESI-Q-TOFMS	12
Abbildung 9: Einfluss des Option-Gases auf die Empfindlichkeit bei unterschiedlichen Methanolgehalten	19
Abbildung 10: Einfluss von Carrier-Gas auf die Empfindlichkeit bei verschiedenen Fließgeschwindigkeiten	20
Abbildung 11: Verhältnis zwischen Rotationsgeschwindigkeit der peristaltischen Pumpe und der Fließgeschwindigkeit des Eluenten	20
Abbildung 12: Einfluss des Sauerstoffgehalts auf die Bildung von SO^+ und PO^+ in der KRZ	21
Abbildung 13: Empfindlichkeit bei unterschiedlichem MeOH Anteil im Batch-Verfahren	22
Abbildung 14: Abhängigkeit der Empfindlichkeit (Peakhöhe und Peakfläche) vom MeOH-Gehalt für Phosphor (FIA).....	22
Abbildung 15: Abhängigkeit der Empfindlichkeit (Peakhöhe und Peakfläche) vom MeOH-Gehalt für Schwefel (FIA).....	23
Abbildung 16: Abhängigkeit der Empfindlichkeit (Peakhöhe und Peakfläche) vom MeOH-Gehalt für Arsen (FIA)	23
Abbildung 17: Abhängigkeit der Empfindlichkeit (Peakhöhe und Peakfläche) vom MeOH-Gehalt für Selen (FIA).....	23
Abbildung 18: ICP-QQQMS/ESI-Q-TOFMS Chromatogramm von ADP	25
Abbildung 19: ICP-QQQMS/ESI-Q-TOFMS Chromatogramm von AMP	26
Abbildung 20: ICP-QQQMS/ESI-Q-TOFMS Chromatogramm von NSA	26
Abbildung 21: ICP-QQQMS/ESI-Q-TOFMS Chromatogramm von Fenamiphos	27
Abbildung 22: ICP-QQQMS/ESI-Q-TOFMS Chromatogramm von Fenthion.....	28
Abbildung 23: ICP-QQQMS/ESI-Q-TOFMS Chromatogramm von Ethion.....	28
Abbildung 24: Kalibrierung von P mit FIA-Verfahren bei 0% MeOH (Links) und 40% MeOH (Rechts) .	29
Abbildung 25: Kalibrierung von As mit FIA-Verfahren bei 0% MeOH (Links) und 40% MeOH (Rechts)	30
Abbildung 26: Kalibrierung von S mit FIA-Verfahren bei 0% MeOH (Links) und 40% MeOH (Rechts) .	30
Abbildung 27: Kalibrierung von Se mit FIA-Verfahren bei 0% MeOH (Links) und 40% MeOH (Rechts)	31
Abbildung 28: Untersuchte Meeresalgen (UFZ).....	33
Abbildung 29: ICP-MS und ESI-MS Chromatogramm von MA C7 und möglicher Asenolipidpeaks.....	34
Abbildung 30: ICP-MS und ESI-MS Chromatogramm von NIES 9 und möglicher Asenolipidpeaks	35
Abbildung 31: ICP-QQQMS und ESI-Q-TOFMS Chromatogramm (TIC und EIC's) für MA 1	36
Abbildung 32: ICP-QQQMS und ESI-Q-TOFMS Chromatogramm (TIC und EIC's) für MA 2	37
Abbildung 33: AsZ- PO_4 Struktur	38
Abbildung 34: Fließschema der Dorschleberextraktion und der HCl bzw. NaOH Hydrolyse	39
Abbildung 35: ICP-MS Chromatogramme der MeOH Schicht mit NaOH und HCl hydrolysiert	43
Abbildung 36: ICP-MS Chromatogramme des Feststoffs mit NaOH und HCl hydrolysiert	44
Abbildung 37: ICP-MS Chromatogramme der Ölschicht mit NaOH und HCl hydrolysiert	44

Abbildung 38: Vergleich der ICP-MS-Chromatogramme der drei Phasen nach alkalischer Hydrolyse.	45
Abbildung 39: ICP-MS-Chromatogramme des hydrolysierten Rohextraktes und des aufkonzentrierten Rohextrakt	46
Abbildung 40: ICP-MS und ESI-MS Chromatogramme mit möglichem AsPL Peak	46
Abbildung 41: Strukturvorschlag für die m/z Masse 808.4832	47
Abbildung 42: Fragmente von m/z 808.4834 nach MS/MS	47
Abbildung 43: Fragmentierungsschema der $m/z=808,4832$	48

Tabelleverzeichnis

Tabelle 1: Beispiele Struktur von Nukleotiden	4
Tabelle 2: Beispiele für verwendete Pestizide	5
Tabelle 3: Verwendete Analysensysteme	14
Tabelle 4: Parameter am ICP-QQQMS.....	14
Tabelle 5: Parameter am ESI-Q-TOFMS.....	15
Tabelle 6: Parameter der Trennsäule.....	15
Tabelle 7: Geräteinformation zur Probearbeitung	16
Tabelle 8: Verwendete Standardverbindungen mit P	16
Tabelle 9: Verwendete Standardverbindung mit S	16
Tabelle 10: Verwendete Standardverbindungen mit P und S	17
Tabelle 11: Eluenten Lösungen und Fließbedingungen	24
Tabelle 12: Gradienten Tabelle	24
Tabelle 13: Detektierte Massen im ICP-MS und ESI-MS (m/z) für Nukleotide	25
Tabelle 14: Detektierte Massen im ICP-MS und ESI-MS (m/z) für NSA.....	26
Tabelle 15: Detektierte Massen im ICP-MS und ESI-MS (m/z) für ausgewählte Pestizide	27
Tabelle 16: LOD- und LOQ-Bestimmung für P, S, As und Se bei unterschiedlichen Methanolgehalten	31
Tabelle 17: Gefundene AsPL in Meeresalgen (MA1 und MA2) und Vorschläge für die Struktur	38
Tabelle 18: Probebehandlung mit NaOH bzw. HCl.....	40
Tabelle 19: Arsengehaltsverteilung im Rohextrakt, der öligen Phase und des Feststoffes der extrahierten Dorschleber	40
Tabelle 20: Arsengesamtgehalte in Proben nach saurer und alkalischer Hydrolyse	41
Tabelle 21: Quantifizierung des chromatographierbaren Anteils der Arsenspezies	42
Tabelle 22: Parameter des MS/MS Modus bei ESI-Q-TOFMS	47

Abkürzungsverzeichnis

ADP: Adenosindiphosphat

AMP: Adenosinmonophosphat

ATP: Adenosintriphosphat

AsPL: Arsenophospholipide

bzw.: Beziehungsweise

DL: Dorschleber

DDL: Dosen-Dorschleber

ESI-Q-TOFMS: Elektrospray-Ionisation quadrupole time of flight Massenspektrometrie

EIC: Extrakt Ion Chromatogramm

FIA: Fließinjektionsanalyse

ICP-MS: inductively coupled plasma Massenspektrometrie

ICP-QQQMS: inductively coupled plasma triple quadrupole Massenspektrometrie

KRZ: Kollision/ Reaktionszelle

LOD: Nachweisgrenze

LOQ: Bestimmungsgrenze

MA: Meeresalgen

m/z: Masse-zu-Ladungsverhältnis

NSA: Naphthalensulfonsäure

rpm: revolutions per minute

rps: revolutions per second

TIC: Total Ion Chromatogramm

UHPLC: ultra-high performance liquid chromatogram

1. Einleitung

Die Spurenanalytik aus Umweltproben gewinnt heutzutage eine immer größere Bedeutung, die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen müssen immer weiter gesenkt werden, um die mögliche Ausbreitung von schädlichen Substanzen in der Umwelt zu erkennen oder biologische Abbauprozesse zu verfolgen. Schadstoffe wie Pestizide enthalten oft Heteroatome, die zur Identifizierung und Quantifizierung herangezogen werden können. Die Charakterisierung von Schadstoffen und deren Abbauprodukte kann anhand der Bestimmung der Heteroatome Schwefel, Phosphor oder Arsen verbessert werden. Mit dieser zusätzlichen Elementinformation kann man die fremde Substanz identifizieren und quantifizieren. Besondere Aufmerksamkeit muss auf die entsprechende Geräte gelegt werden, um Spurenkonzentrationen zu detektieren.

Die *inductively coupled plasma* Massenspektrometrie, kurz ICP-MS ermöglicht eine elementspezifische Detektion von Substanzen im Spurenbereich. Sie stellt eine sehr sensitive und auch selektive Methode dar, welche häufig nach einer chromatographischen Trennung Anwendung findet. Bei ICP-MS Detektion liegt häufig eine spektrale Störung vor, wie z.B. bei schwefelhaltigen Substanzen, bei denen eine Überlagerung des selektiven Schwefelsignals bei einem Masse-zu-Ladungsverhältnis (m/z) von $m/z = 32$ von polyatomaren Interferenzen, wie zum Beispiel O_2 . Durch diese Überlagerung ist eine eindeutige qualitative und vor allem quantitative Bestimmung schwierig. Mit einer neuen Generation von ICP-MS Geräten *inductively coupled plasma triple quadrupole* Massenspektrometrie können in der Reaktionszelle, neue selektive Spezies wie SO^+ gebildet, und die störenden Signale eliminiert werden. So ist noch eine sensitivere Analyse bestimmter Substanzen möglich.

2. Zielstellung

Im Rahmen dieser Arbeit sollen mit dem Agilent 8800 Triple Quadrupole ICP-MS, kurz ICP-QQQMS, heteroorganische Verbindungen mit S, P und As selektiv und empfindlich bestimmt werden. Dabei wird dieses Gerät als Detektor für die UHPLC eingesetzt. Für die Optimierung der Detektion dieser Elemente sind verschiedene geräteeigene Parameter zu variieren, um die höchste Empfindlichkeit zu erhalten. Daneben sind auch Bedingungen der UHPLC Trennung zu berücksichtigen, wie z.B. das Verhalten der Elementdetektion bei unterschiedlicher Eluentzusammensetzung.

Danach ließen sich aussagekräftige, analytische Parameter ermitteln, wie z.B. die Nachweisgrenze (LOD) und Bestimmungsgrenze (LOQ) für die optimierten Methoden. Dabei wurde für eine Zuordnung der sensitiven ICP-MS- Signale noch mit einem seriellen UV-Detektor und parallel zum ICP-MS mit einem Quadrupol *time of flight* Massenspektrometer (ESI-Q-TOFMS) gearbeitet.

Unter optimierten Detektionsbedingungen sind dann an ausgewählten Proben wie Meeresalgen und Fisch die Validierung der Methode durchzuführen, wobei Analyte wie Arsenozucker, Arsenophosphorlipide oder Arsenschwefellipide im Focus stehen.

3. Theoretische Grundlagen

3.1 Eigenschaften der Elemente P, S und As und ausgewählter Verbindungen

Schwefel, Phosphor als Nebenbestandteile und Arsen als Spurenbestandteile in biologischen Systemen spielen eine große Rolle bei vielen Anwendungen im Bereich Umwelt- und „*life sciences*“ Forschung^{[1][2]}. Sie sind auch wichtiger Bestandteil der schädlichen Stoffe in der Umwelt.

3.1.1 Phosphor

Phosphor, als Element der 5. Hauptgruppe und mit einer molaren Masse von 31 g/mol, kommt in mehreren, sich untereinander stark unterscheidenden Modifikationen vor. Bei Phosphorverbindungen liegen die Oxidationszahlen zwischen -3 bis +5. Zu den anorganischen Phosphorverbindungen zählen das 0-Phosphat und Polyphosphat.

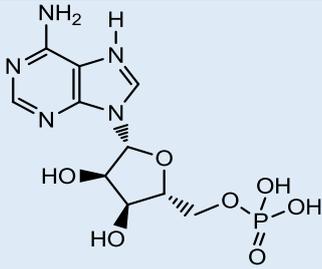
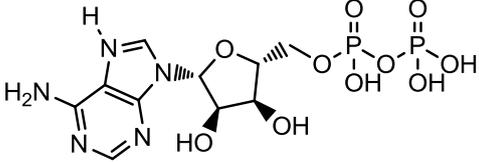
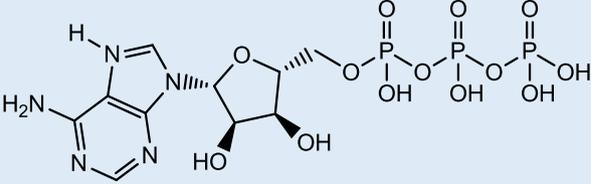
3.1.1.1 Phospholipide

Zu den wichtigen organische Phosphorverbindungen gehören die Phospholipide. Sie sind komplexe Lipide, welche eine Ester Bindung mit Phosphorsäure aufweisen. Sie sind Hauptbestandteil aller Zellmembranen und gehören daher zu den Membranlipiden. Phospholipide besitzen einen hydrophilen Kopf und zwei (statt drei) hydrophobe Kohlenwasserstoffketten. Diese können Doppelbindungen enthalten und bestehen aus 14 bis 24 Kohlenstoffatomen. Phospholipide sind amphiphil, sie können im Wasser Doppelschichten ausbilden, bei denen die hydrophilen Molekülanteile zum Wasser hin und die lipophilen Anteile vom Wasser weg weisen. Phospholipide sind ein Hauptbestandteil der Doppelmembran von Zellen (Zellmembran). Durch ihre chemischen Eigenschaften können Phospholipide den Zellraum gegenüber dem Umgebungsmedium separieren. Die unpolaren Bereiche tragen wesentlich zur Fluidität der Membran bei.^[3]

3.1.1.2 Ausgewählte Verbindungen: Nukleotide

Phosphorverbindungen sind für alle Lebewesen essenziell und bei Aufbau und Funktion der Organismen in zentralen Bereichen beteiligt, wie der DNA und der zellulären Energieversorgung (AMP, ADP, ATP).

Tabelle 1: Beispiele Struktur von Nukleotiden

Nukleotid	Struktur
Adenosinmonophosphat	
Adenosindiphosphat	
Adenosintriphosphat	

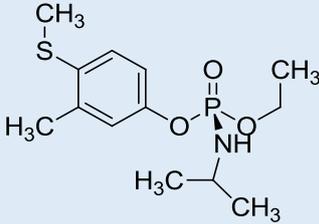
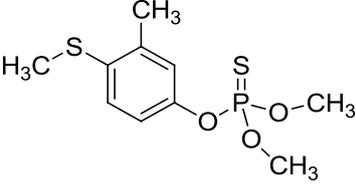
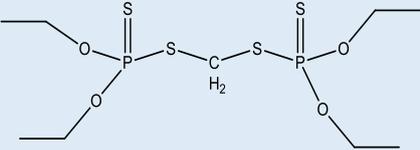
3.1.2 Schwefel

Schwefel, als Element der 6. Hauptgruppe und einer molaren Masse von 32 g/mol, kommt in der Natur häufig in Formen von elementarem Schwefel, Sulfatmineralen oder verschiedenen Sulfiden vor. Des Weiteren ist Schwefel auch für Lebewesen ein sehr wichtiges Element, da es in vielen Aminosäuren und Enzymen vorkommt. Doch durch Industrie und der Verarbeitung von fossilen Brennstoffen wird häufig ein Überschuss an Schwefelspezies freigesetzt. Dieser verteilt sich, z.B. durch den Wasserkreislauf, im Boden oder Gewässern. Anschließend Aufnahme und Metabolisierung durch Organismen führt darüber hinaus zur Freisetzung/Entstehung schwefelhaltiger Metabolite.

3.1.2.1 Ausgewählte Verbindungen: Pestizide

Eine wichtige Gruppe organischer schwefelhaltiger Verbindungen in der Landwirtschaft sind Pestizide. Als Pestizid im weiteren Sinne werden sämtliche Pflanzenschutzmittel sowie die Mittel zur Schädlingsbekämpfung bezeichnet, die lästige oder schädliche Lebewesen töten, vertreiben oder in Keimung, Wachstum oder Vermehrung hemmen. Wegen teilweiser höherer Toxizität dieser Verbindungen ist eine empfindliche Analytik wichtig für die Untersuchung von Wasser und Lebensmitteln^{[4][5]}. In Tabelle 2 werden einige Beispiele von Pestiziden gezeigt.^[6]

Tabelle 2: Beispiele für verwendete Pestizide

Name	Struktur	Sicherheitshinweis	Toxikologische Daten
Fenamiphos		toxisch, umweltgefährlich	Oral (Rats) LD ₅₀ : 10mg/kg Dermal (Rat)LD ₅₀ : 161-208mg/kg Inhalation (4hr)(Rat) LC ₅₀ : 132-198mg/m ³ [6]
Fenthion		toxisch, umweltgefährlich	Oral (Rats)LD ₅₀ : 309 -474 mg/kg Dermal (Rats) LD ₅₀ :>5000 mg/kg Inhalation (4h) (Rats) LC ₅₀ : approximately 0,5mg/l [7]
Ethion		toxisch, umweltgefährlich	Oral (Rats)LD ₅₀ : 40-45 mg/kg Dermal (Rats) LD ₅₀ :915 mg/kg Inhalation (4h) (Rats) LC ₅₀ : 0,45mg/l [8]

3.1.3 Arsen

Arsen kennt man als ein chemisches Element mit dem Elementsymbol As. Seine Ordnungszahl ist 33. Es steht im Periodensystem in der 4. Periode sowie der 5. Hauptgruppe (Stickstoffgruppe), manchmal ist Arsen mit Gruppennachbar Phosphor und Stickstoff vergleichbar. Arsen existiert meistens in drei- und fünfwertiger Form. Verbindungen des dreiwertigen Arsens sind die arsenige Säure (H₃AsO₃) und ihre Metallsalze, die Arsenite. Verbindungen des fünfwertigen Arsens sind die Arsensäure (H₃AsO₄) und ihre Salze, die Arsenate. Dabei sind die Arsenite bis zu 10-mal toxischer als die Arsenate.

Arsen liegt natürlich in Boden, Luft und Wasser vor. Es ist ubiquitär verbreitet und kleine Mengen dieses Elementes sind im Boden wie auch in Nahrungs- und Futtermitteln oder Trinkwasser zu finden. Organische Arsenverbindungen werden vorwiegend von biologisch aktiven Systemen gebildet und

kommen besonders reichlich in Meerestieren in Form von wenig toxischen Arsenobetain, Arsenozucker und Arsenolipiden vor (Abb. 1) ^[9]. Am Ende der 1960er Jahre hat *Lunde* erstmalig Arsenverbindungen in marinen Organismen gefunden ^[10]. Kurz danach hat man gefunden, dass die Konzentration von Arsen besonders hoch in Fisch, Krebstier und Mollusken ist. Durch die Reaktion der Methylierung wandelt sich Arsenit und Arsenat durch Pflanzen- und Meerestier-Metabolismus im Ozean zu Arsenobetain, Arsenozucker und Arsenolipide um. Aber mehr Informationen zu den Arsenverbindungen wie Arsenobetain, Arsenozucker und Arsenolipide (Abb. 1) sind bis heute noch nicht sehr umfassend.

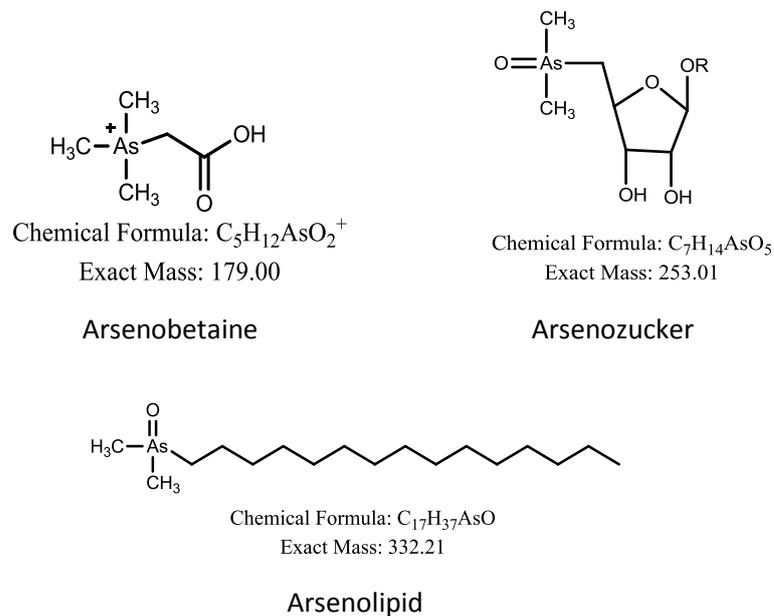


Abbildung 1: Ausgewählte organische Arsenverbindungen

3.1.3.1 Ausgewählte Verbindungen: Arsenolipide

Arsenolipide sind weniger polare Verbindungen, man kann in Algen und marine Lebewesen finden. Die frühen Studien zur Charakterisierung von Arsen in Algen ^[28] wurden hauptsächlich mit den Proportionen von organisch gebundenem und anorganischem Arsen oder des relativen Anteils der wasserlöslichen und fettlöslichen Arsenverbindungen getroffen. Die Verteilung des Arsens in der Lipidfraktion von verschiedenen marinen Organismen wurde schon von *Lunde* nachgewiesen. Er hat mehrere Kulturen von marinen Algen im Labor analysiert, und bemerkt, dass in diesen Lipid-Extrakten Konzentrationen von Arsen von ca. 0,5-4,8 ppm zu finden waren. ^[11]

Dorschleberöl, abgeleitet aus marinem Fisch, enthielt auch hohe Konzentrationen fettlöslicher Arsenverbindungen ^[10]. Die Strukturen der vorhandenen Arsenolipide waren aber noch nicht aufgeklärt. Es wurde schon über die Struktur von 6 Arsenolipiden aus Dorschleberöl berichtet, und durch die Identifizierung werden sie als langkettige Fettsäuren angegeben (Abb. 2).

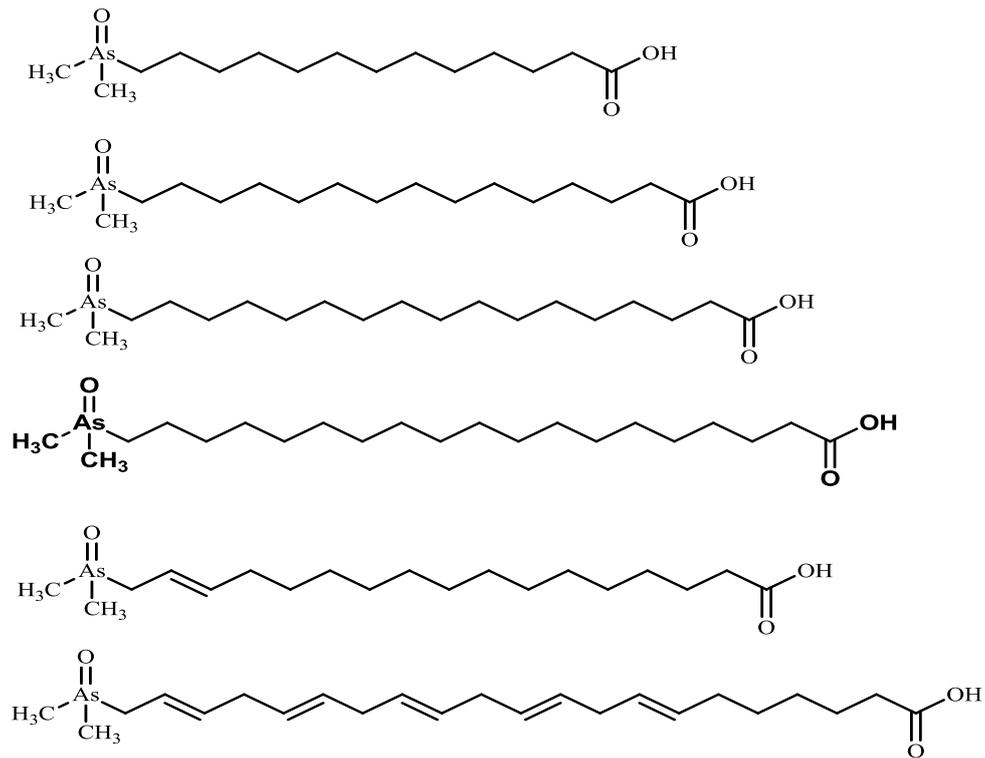


Abbildung 2: Arsen-Fettsäuren identifiziert in Doschleber Öl ^[9]

3.1.3.2 Ausgewählte Verbindungen: Arsenozucker

Der Gehalt an Arsenozucker als marine Metaboliten in Algen beträgt 2-50 mg Arsen/kg, und die Hintergrundkonzentration ist sehr niedrig (Normalerweise 0,5-5 mg Arsen/kg Trockenmasse). ^[12] Durch die chemische Ähnlichkeit von Arsenat und Phosphat können sie sich gegenseitig in biogenen Verbindungen ersetzen, wie z. B. im Arsenozucker die Transportprozesse von Arsenat und Phosphat in die Zelle sind gleich. Phosphat kann sich in der Zelle gespalten werden, wenn Arsenat auch durch den Prozess gespalten würde, die Toxizität würde erhöhen. Um die Toxizität zu verringern, entwickelt die Alge einen stufenweisen Alkylierungsprozess, damit Arsenat zu Arsenozucker umgewandelt werden kann. Meeresorganismen wie Algen, die Arsenozucker enthalten können, werden heute als Lebensmittel verwendet. Deswegen sind mehr Informationen darüber wichtig und interessant. Bis heute wurden einige Strukturen gefunden ^{[13] [14]}.

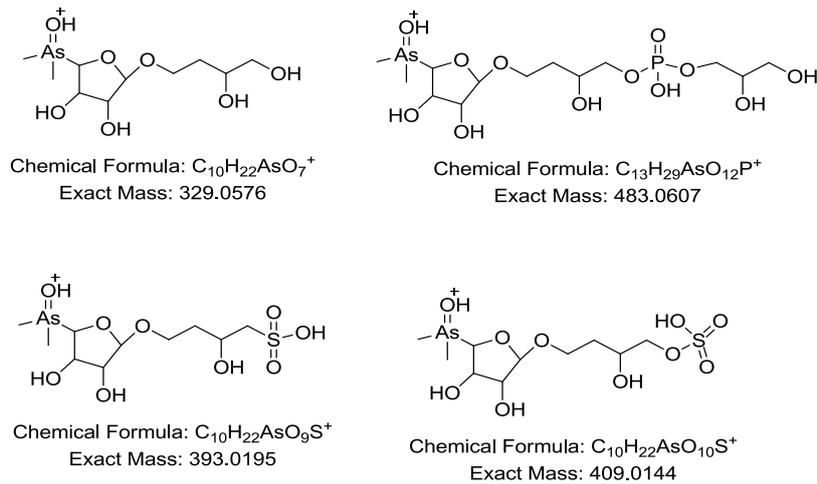


Abbildung 3: Struktur von 4 Arsenozuckern in Algen und mit $[M+H]^+$ m/z Masse

3.1.4 Analytik der Elemente P, S und As

Die Spurenanalytik ist heute eine der wichtigsten Teilgebiete der Analytik. Informationsbedarf an spurenanalytischen Daten haben vor allem die Gebiete der Medizin, Biochemie, Pharmakologie und Kriminaltechnik. In den letzten Jahren erlangte die Spurenanalytik zunehmend Bedeutung in der Halbleiterindustrie, dem Umweltschutz und der Lebensmittelchemie.

Für die empfindliche Analytik dieser Elemente kommt die ICP-MS in Betracht. Allerdings gibt es zahlreiche spektrale Interferenzen. Für eine richtige Quantifizierung sind die Interferenzen zu beseitigen. Durch Auswertung der Signalintensitäten der Elemente (counts/s) kann man nach Kalibration deren Gehalt in der Probe quantifizieren. Für die Analytik der ausgewählten Verbindungen der o.g. Elemente können der ICP-MS Detektion vorgeschaltet chromatographische Trennung eingesetzt werden. Hier erfolgt die Quantifizierung der Verbindung über die elementselektive Detektion, wobei Peak-höhe oder Peakflächen zur Kalibration genutzt wird. Zur Identifizierung der Verbindung kann ein parallel angeordnetes molekül-selektives Massenspektrometer eingesetzt werden, z.B. ein ESI-QTOF-MS.

3.2 Eingesetzte Instrumentenkombination

Bei dieser Arbeit nutzt man hauptsächlich das elementselektive Massenspektrometer ICP-QQQMS. Mit ICP-QQQMS werden die Elemente S, P und As, die in der chromatographisch getrennten Verbindungen detektiert. Mit paralleler ESI-MS Detektion werden die Strukturen der getrennten Verbindungen anhand der genauen Massen analysiert. Mit der Kopplung von beiden Detektoren kann die Identifizierung verbessert werden. Mit UHPLC kann man ein Stoffgemisch isokratisch oder mit Gradientenelution trennen. Abbildung 4 zeigt die gekoppelten Instrumente UHPLC, ICP-QQQMS und ESI-Q-TOFMS, die in dieser Arbeit zum Einsatz kamen.



Abbildung 4: Verwendete Geräte zur Kopplung von Chromatographie mit ICP-MS und ESI-MS

3.2.1 ICP-MS

ICP-MS ist die Abkürzung von Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (engl. inductively coupled plasma mass spectrometry). Diese Analysen-methode ermöglicht die Bestimmung einer Vielzahl von Elementen in relativ kurzer Zeit und ist aufgrund ihrer Nachweistärke inzwischen eines der meist genutzten Verfahren der Spurenelementanalytik.

3.2.1.1 Arbeitsweise des ICP-MS

Bei ICP-MS wird die flüssige Probe zuerst durch eine Düse (Nebulizer) in der Spraykammer vernebelt. Der Zweck einer Spraykammer ist das vernebelte Aerosol zu homogenisieren, und große Tröpfchen zu entfernen. Die kleinen dispergierten Aerosole können leicht in einem Argon-Gasstrom durch die Spraykammer und einem Verbindungsrohr zum ICP-Brenner (Torch) transportiert werden.

Dann werden die Analyte zusammen mit Argon durch das Plasma des ICP Brenner auf 5000-10.000°C erhitzt und die Probe wird in dieser Zeit ionisiert. Die Skimmer leiten das Ionengemisch in das Massenspektrometer (Abbildung 5). In der Octopole Reaktionszelle können spektrale Störungen beseitigt werden ^[15].

Die Octopole Reaktionszelle sitzt im Hochvakuumbereich des Massenspektrometers, der Ionenstrahl läuft durch die Mittelachse der Zelle. In die Reaktionszelle werden Gase eingelassen, die zu Kollisionen oder Reaktionen mit dem Analyt führen können. Der kritische Parameter ist die Konzentration des Gases in der Octopole-Zelle. Zum Beispiel kann Arsen (As^+ $m/z=75$) mit O_2 in der Octopole Reaktionszelle zu AsO^+ $m/z=91$ umgewandelt werden, so dass die Störung ($ArCl^+$, $CaCl^+$) von anderen Ionen auf der Masse $m/z=75$ beseitigt werden kann.

Nach dem Octopol läuft das Ionengemisch weiter zum Quadrupol, der als Massenfiter dient, um nur bestimmte Ionen, die nach ihrer Masse ausgewählt werden, durchzulassen. Dort werden die Analytione durch ein elektrisches Feld beschleunigt, und erreichen dann den Detektor. ^[16]

3.2.1.2 Entwicklung der ICP-QQQMS

Bei den Nichtmetallen wie Phosphor und Schwefel als Spurelemente wird bei realen Anwendungen die Detektion aus zwei Gründen limitiert, Kontamination und spektrale Interferenzen. In dem ICP-MS verwendet man die bereits erwähnte eine Kollision/Reaktion Zelle (KRZ), die die Probleme der spektralen Interferenzen effektiv lösen kann. In dieser Zelle wird die Interferenz der Polyatomionen dadurch beseitigt ^[17], dass der Analyte mit Reaktionsgas (z.B. O₂, H₂ und He) reagiert, und die veränderte Masse z.B. ³²S¹⁶O⁺ ($m/z=48$) dann mit dem nächsten Quadrupol analysiert wird. Aber für einige Interferenzen wirkt die Zelle nicht effektiv, z.B. die Metalloxidion ⁵⁹Co¹⁶O⁺ und ⁷⁵As⁺^{[18][19]}.

Um das Problem zu lösen, hat man das Triple Quadrupole ICP-MS (ICP-QQQMS) entwickelt. Die Bauteile sind in Abbildung 5 und Abbildung 7 dargestellt.

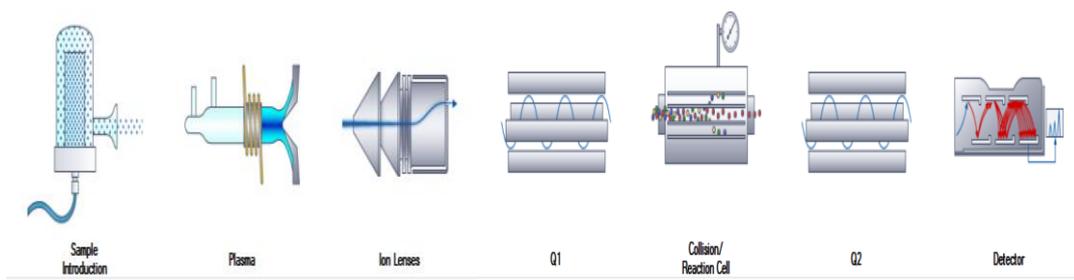


Abbildung 5: Schematische Darstellung des ICP-QQQMS ^[20]

Vergleicht man ICP-MS und ICP-QQQMS, dann sieht man, dass beim ICP-QQQMS noch ein Quadrupol vor die Kollision/Reaktion Zelle (KRZ) gesetzt wurde. Im ICP-MS werden alle positiven Ionen in die KRZ geleitet, um dort mit Reaktionsgas zu reagieren. Danach wird mit dem Quadrupol die bestimmte Masse ausgewählt. Aus Abb. 6 wird ersichtlich, dass ⁸⁰Se⁺ mit m/z 80 mit O₂ in KRZ zu ⁸⁰Se¹⁶O⁺ (m/z 96) reagiert. Wenn am Quadrupol die Masse m/z 96 ausgewählt wird, können immer noch Interferenzen von den folgenden Isotopen ⁹⁶Zr⁺, ⁹⁶Mo⁺, ⁹⁶Ru⁺ aufgetreten, so dass der Quadrupol diese Elemente nicht unterscheiden kann.

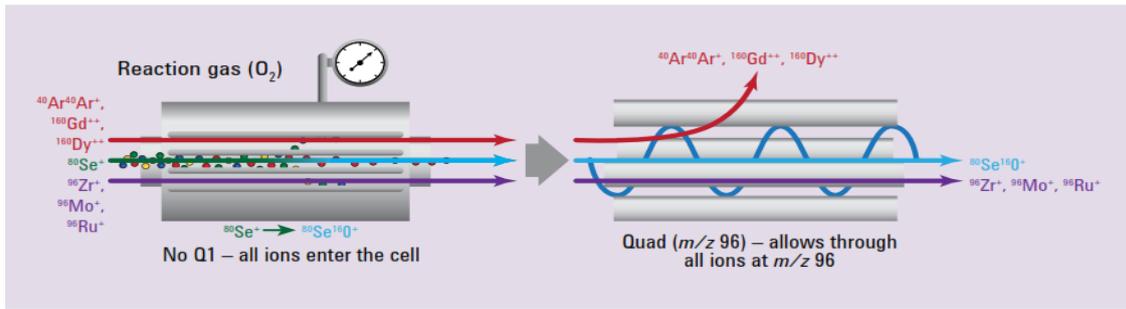


Abbildung 6: Aufbau eines ICP-MS mit Reaktionszelle

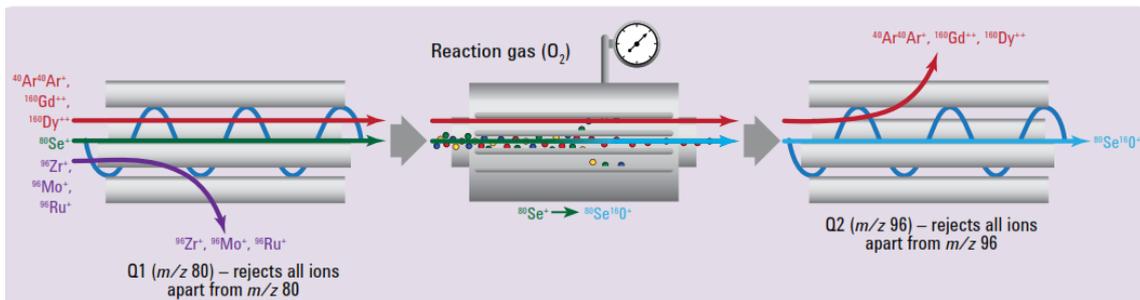


Abbildung 7: Aufbau eines ICP-QQQMS mit Reaktionszelle^[21]

Mit ICP-QQQMS (Abbildung 7) kann dieses Problem mit dem vor der KRZ liegenden Quadrupol gelöst werden. Mit dem ersten Quadrupol wählt man $m/z=80$ aus, so dass viele andere Polyatomionen nicht weiter zur KRZ gelangen können. In der KRZ reagiert $^{80}\text{Se}^+$ zu $^{80}\text{Se}^{16}\text{O}^+$, mit dem zweiten Quadrupol wählt man $m/z=96$ aus, so dass die anderen Interferenzen gut beseitigt werden können.

Aus diesem Grund verwendet man Triple Quadrupole ICP-MS für die Spurenelemente, die in sehr niedrigen Konzentrationen, in der Probe vorliegen und sehr gestört sind

3.2.2 ESI-Quadrupol time of flight Massenspektrometrie

Die Elektrospray-Ionisation Massenspektrometrie ist eine analytische Methode, mit der man die molare Masse ermitteln kann, um auf die die Struktur der Verbindung schließen zu können. Die Abbildung 8 zeigt die Bestandteile dieses Gerätes: P1 ESI-Quelle, P2A Transferkapillare, P3 Quadrupol, P4 Hexapole-Zelle, P5 TOF-Analysator und Detektor.

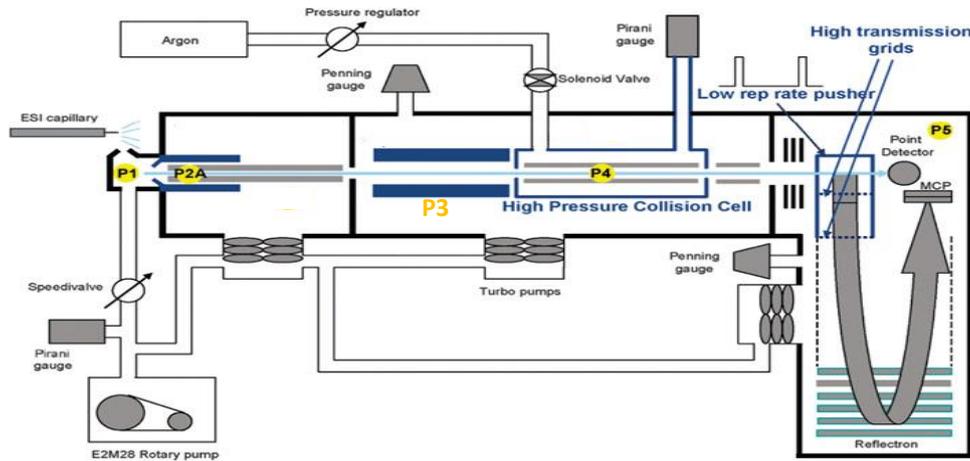


Abbildung 8: Bestandteile eines ESI-Q-TOFMS

3.2.2.1 Arbeitsweise

Die Moleküle sind nach der Trennung mittels HPLC noch mit dem Lösungsmittel verbunden. Zuerst wird eine Lösung des Analyten bei Atmosphärendruck aus einer LC-Kapillare in einem starken elektrischem Feld versprüht. Ab eines Schwellenwerts der angelegten Spannung (2-6 kV) bildet sich ein stabiles Spray, das je nach Ladungspolarität zur Bildung von positiven bzw. negativen Ionen führt. Ein um die Kapillare konzentrisch angeordneter Inertgasstrom (meist N_2) wird zur Unterstützung der Vernebelung gerade bei hohen Flussraten eingesetzt. ^[22]

Zur vollständigen Desolvatation der ladungstragenden Flüssigkeitstropfen und effektiven Ionenbildung wird in einer ESI-Ionenquelle entweder eine beheizte Transferkapillare oder ein Spray entgegen gerichteter, beheizter Stickstoffstrom eingesetzt. Die generierten Ionen werden durch eine Skimmer-Öffnung im Zentrum der Gegenelektrode in den Analysatorteil des Massenspektrometers überführt.

Der Quadrupole-Massenanalysator besteht aus vier parallelen Elektroden. Jede gegenüberliegende Elektrode wird elektrisch miteinander verbunden. Eine Wechselspannung und eine Gleichspannung werden zwischen dem einen und anderen Paar von Stäben angelegt. Die Ionen wandern dann durch den Quadrupol zwischen den Stäben. Nur die Ionen, die ein bestimmtes Masse-zu-Ladungs-Verhältnis (m/z) für ein gegebenes Verhältnis der Gleich- und Wechselspannungen haben, können den Detektor erreichen. Die anderen Ionen werden mit den Elektroden kollidieren. Dies ermöglicht die Auswahl eines Ions mit einem bestimmten m/z (SIM-Model) ^{[23][24]}. Dann gehen die ausgewählten Ionen in die Richtung des Hexapols. Der Hexapol befindet sich in einer Kollisionszelle, um den Ionen durch Stöße mit einem Inertgas (meist Stickstoff oder Argon) Energie zuzuführen. Daraufhin zerfallen die Ionen sehr spezifisch zu anderen leichteren Ionen (Fragmenten).

Die aus der Kollisionszelle kommenden Ionen werden durch einen Ionenstrahlkompressor zu einem feinen Ionenstrahl fokussiert, welcher anschließend durch einen Schlitz weiter geformt wird

(idealerweise in eine Fläche senkrecht zum TOF-Analysator). Im TOF-Analysator werden dann aus diesem Strahl Ionenpakete ins Reflektor-TOF gepulst. Dort werden sie nach ihrem Masse-zu-Ladungsverhältnis (m/z) getrennt und schließlich am Detektor registriert.

TOF ist die Abkürzung von Time-of-Flight. Es ist eine Analyseverfahren zur Unterscheidung von Ionen auf der Basis ihrer Flugzeit. Wenn die Ionen, mit unterschiedlicher m/z , alle gleiche kinetische Energie erhalten, werden die leichteren Ionen sich schneller bewegen, und somit werden kürzere Flugzeiten zwischen der Repellerelektrode und dem Detektor gemessen. Einfach gesagt, "kleinere Ionen fliegen schneller als größere Ionen"^[22].

3.3 Flüssigchromatographie

Die UHPLC, kurz für ultra-high performance liquid chromatography, ist in ihrer Grundfunktionsweise ähnlich der high performance liquid chromatography (HPLC), welche auch als Hochdruckflüssigchromatographie bezeichnet wird. Es ist ein Verfahren der Flüssigchromatographie zur Trennung von Stoffgemischen. Im Unterschied zur HPLC ist UHPLC eine Methode, bei der Trennsäulen mit Partikelgrößen von $<2,5 \mu\text{m}$ zur Anwendung kommen. Diese Trennsäule erzeugen höhere Drücke. Mit der Agilent 1290 sind Drücke bis 1200 bar möglich. Mit HPLC sind es dagegen nur ca. 400 bar. Mit UHPLC kann die Probe in kürzerer Zeit getrennt werden, weil kürzere Säulen und höhere Fließgeschwindigkeit zum Einsatz kommen^[25].

4. Praktische Versuchsdurchführung

4.1 Detektion mit Standardproben

In der Arbeit hat man zuerst die signalbezogenen Parameter des ICP-QQQMS optimiert, da es wichtig ist, die höchste Empfindlichkeit zu erhalten. Bei dieser Untersuchung hat man mit der Kopplungsmethode ICP-QQQMS/ESI-Q-TOFMS analysiert. Nachfolgend sind die experimentellen Bedingungen der Detektion beschrieben. Mit diesen Bedingungen wurden dann P- und S haltige Standardproben analysiert.

4.1.1 Experimentelle Bedingungen

4.1.1.1 Instrumente

Für die durchgeführten Experimente wurden die in Tabelle 3, 4 und 5 aufgelisteten Geräte verwendet.

Tabelle 3: Verwendete Analysensysteme

Geräte/ Software	Spezifikation	Hersteller
UHPLC	1290 Serie mit Auto Sampler Binäre Pumpe (1200 bar) Säulenofen Säulenschaltventil	Agilent, USA
UV-Detektor	VWD	Agilent, USA
ICP-MS	8800 ICP-QQQMS	Agilent, USA
ESI-Q-TOFMS	6530 ESI-Q-TOF LC/MS	Agilent, USA
Auswertungssoftware ICP-MS	MassHunter Workstation	Agilent, USA
Auswertungssoftware ESI-Q-TOFMS	MassHunter Workstation	Agilent, USA

Tabelle 4: Parameter am ICP-QQQMS

Name	Parameter
RF Leistung	1550 W
Zellgas (O ₂)	30%
KRZ exit	7 V

Plasmagas	14 l/min
Sample Depth	7 mm
Makeup gas	1,1 l/min
Carrier Gas	0,7 l/min
Option-Gas	10%
Scanzeit	0,5 s

Tabelle 5: Parameter am ESI-Q-TOFMS

ESI-Q-TOFMS	Parameter
Vcap (Expt	2000 V
Temperature (Gas)	200 °C
Sheath Gas Flow	12 l/min
Fragmentor	80 v
Ionisierung	Positiv
Nebulizer	30 pisp
Massebereich (<i>m/z</i>)	50-1000

4.1.1.2 Elutionsbedingung

Für die Experimente mit chromatographischer Trennung wurde die folgende Trennsäule eingesetzt (vgl. Tabelle 6):

Tabelle 6: Parameter der Trennsäule

Geräte/ Software	Spezifikation	Hersteller
UHPLC- Säule	ZORBAX Eclipse plus C18; 2,1 x 50 mm; 1,8 µm	Agilent, USA

Für die Gradientenelution wurden folgende Lösungen präpariert:

Eluent A: 99,9% Wasser + 0,1% Ameisensäure;

Eluent B: 99,9% Methanol + 0,1% Ameisensäure

Zur Probearbeitung wurden folgende Geräte eingesetzt (vgl. Tabelle 7):

Tabelle 7: Geräteinformation zur Probevorbereitung

Name	Type	Hersteller
Mikrowelle	-	Anton Paar
US-Sonde	UW 200	Bandeln electronic
Ultra-Turrax	T25	Janke & Kunkel
Zentrifuge	5416	Eppendorf
Mikrowaage	210s	Sartorius

4.1.2 Chemikalien

4.1.2.1 Phosphorhaltige Standardproben

Um die Detektion von Phosphor in P-enhaltenden organischen Verbindungen zu optimieren, wurden 3 Nukleotide Adenosintriphosphat (ATP), Adenosindiphosphat (ADP) und Adenosinmonophosphat (AMP) ausgewählt. Die Herstellung der Standardlösungen wird in Tabelle 8 beschreiben.

Tabelle 8: Verwendete Standardverbindungen mit P

Probenname	Molekulare Masse	Konzentration	Verdünnung	Bezugsquelle
AMP+2Na	391,18 g/mol	1mM	1:10	Fluka, Germany
ADP+K+2H ₂ O	501,33 g/mol	1mM	1:10	Fluka, Germany
ATP+H ₂ O+2Na(aq.)	569,15 g/mol	1mM	1:10	Fluka, Germany

Alle Ausgangslösungen der Standardverbindungen wurden mit einer Konzentration von 1mM hergestellt und dann Aliquote auf 1ml mit Wasser auf die Endkonzentration verdünnt.

4.1.2.2 Schwefelhaltige Standardproben

Um die Detektion von Schwefel in S-enhaltenden organischen Verbindungen zu optimieren, wurden Naphthalensulfonsäure (NSA) ausgewählt (Tabelle 9).

Tabelle 9: Verwendete Standardverbindung mit S

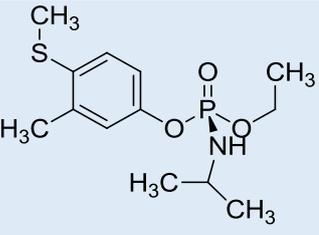
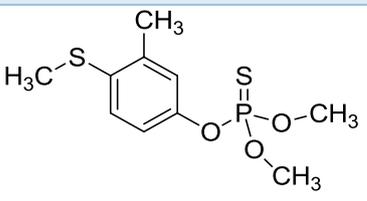
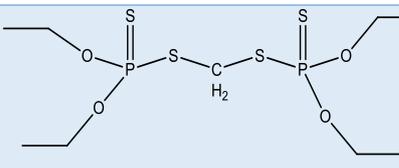
Probenname	Molmasse	Konzentration	Verdünnung	Bezugsquelle
2-Naphthalensulfonic acid, sodium salt	230 g/mol	1mM	1:10	Merck, Germany

Die Ausgangslösung der Standardverbindung wurde mit einer Konzentration von 1mM hergestellt und dann Aliquote von 1ml mit Wasser auf die Endkonzentration verdünnt.

4.1.2.3 P- und S-haltige Standardverbindungen

Die in Tabelle 10 aufgeführten Pestizide enthalten sowohl S als auch P, so dass die Optimierung der Detektionsbedingungen mit Verbindungen gleichzeitig durchgeführt werden kann.

Tabelle 10: Verwendete Standardverbindungen mit P und S

Probenname	Molekulare Masse [g/mol]	Konz.	Struktur	Heteroatome	Quelle
Fenamiphos	303,36	1 mM		S, P	Sigma-Aldrich, Germany
Fenthion	278,33	1 mM		2 S, P	Sigma-Aldrich, Germany
Ethion	384,48	1 mM		4 S, 2 P	Sigma-Aldrich, Germany

Alle Ausgangslösungen der Standardverbindungen wurden mit einer Konzentration von 1mM hergestellt und dann Aliquote auf 1ml mit Wasser auf die Endkonzentration verdünnt.

4.2 Optimierung der ICP-QQQMS Parameter für die Detektion von P, S, As und Se

Unser Ziel bei dieser Arbeit ist Arsenophospholipide bzw. Arsenozucker in Algen und Fisch zu suchen, aber bis heute ist die Information dazu noch gering. Um eine signifikante Information zu diesen Substanzen zu erhalten, muss man die enthaltenden Elemente S und P mittels ICP-MS identifizieren, und empfindlich detektieren können. Wenn die Signale von S oder P mit As im ICP-MS Chromatogramm überlappen, dann kann man annehmen, dass man bei dieser Retentionszeit die erwartete Verbindung suchen kann. Aus diesem Grund ist sowohl die Geräteempfindlichkeit als auch die chromatographische Trenneffizienz insbesondere wichtig.

Um höchste Empfindlichkeit zu erzielen, muss man die Parameter des Gerätes optimieren. Für ICP-QQQMS spielen die Plasmabedingungen und die Reaktionszelle eine große Rolle für eine hohe Empfindlichkeit. In dieser Arbeit wurde Methanol als Gradient Lösung ausgewählt. Organische Lösungsmittel können die Empfindlichkeit des ICP-MS Signal beeinflussen. Deswegen muss der Einfluss des Methanol Gehaltes auf die Empfindlichkeit untersucht werden.

4.2.1 Optimierung der Parameter am ICP-QQQMS

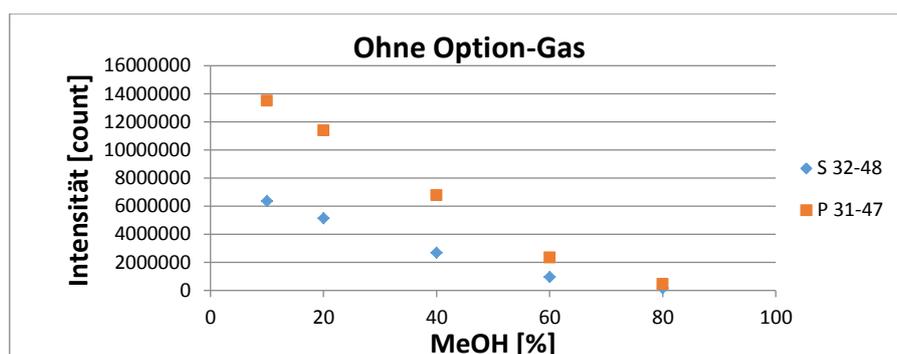
Für die Optimierung wurde die Standardprobe von Fenamiphos mit einer Konzentration 1mM hergestellt. Die Lösung enthält die Elemente Schwefel und Phosphor, so dass man die beiden Elementsignal SO^+ ($m/z=48$) und PO^+ ($m/z=47$) gleichzeitig sehen kann. Die Optimierung der Empfindlichkeit wurde mit dieser Lösung durchgeführt.

4.2.1.1 Parameter zur Optimierung des Plasmas

Das dispergierte Aerosol kann leicht in einem Gasstrom transportiert werden, weil das Argon Gas durch Sprühkammer fließt und danach durch den ICP Brenner geht. Das ICP-QQQMS funktioniert mit 4 Gasen Plasma Gas, Carrier-Gas, Make-up-Gas und Option-Gas. Das Carrier-Gas erzeugt das Aerosol und erzeugt den Transportfluss. Zur Verbesserung der Verneblung und Aerosolbildung wird ein *Make-up-Gas* eingesetzt. Das Option-Gas wird dem Aerosolstrom nach der Sprühkammer zu gegeben.

- **Option-Gas**

Das Option-Gas enthält 20% Sauerstoff und 80% Argon. Es fördert das Verbrennen der Organischen Lösungsmittel, so dass sich keine Kohlenstoffablagerung auf den Konen bilden kann. Mit 10% Option-Gas können Messungen bis zu einem Methanolgehalt von 100% durchgeführt werden. Für die Optimierung des Option-Gasflusses wurden 0% und 15% verglichen. Im Batch-verfahren wurden die Lösungen mit verschiedenem Methanol Gehalt hergestellt, um den Einfluss zu bestimmen. Abbildung 9 zeigt den Einfluss von Option-Gas auf die Empfindlichkeit der Detektion in Abhängigkeit von der Methanolkonzentration für S und P.



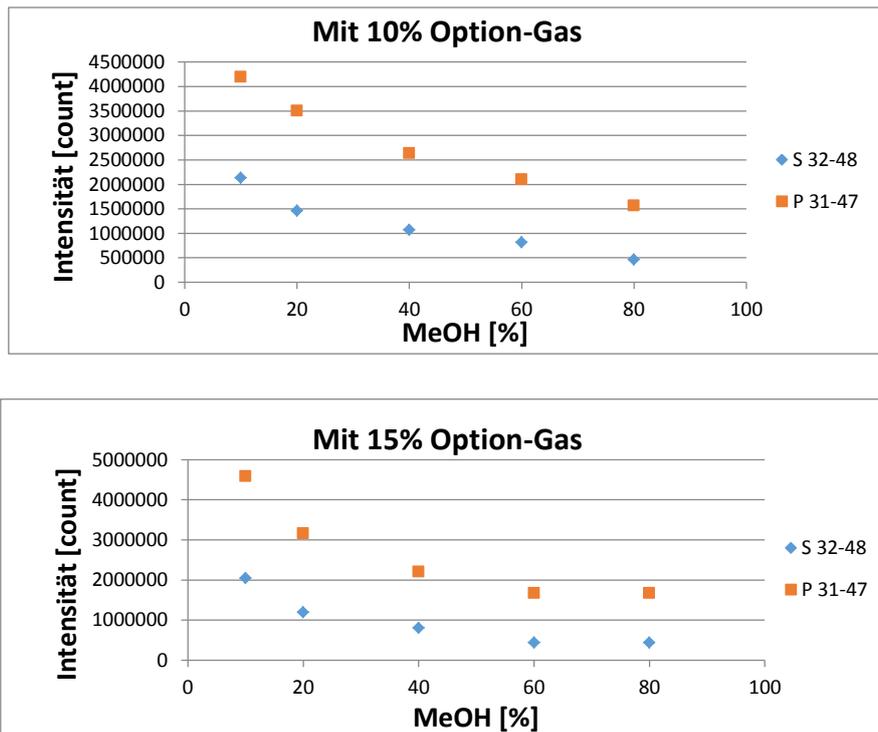


Abbildung 9: Einfluss des Option-Gases auf die Empfindlichkeit bei unterschiedlichen Methanolgehalten

Vergleicht man Abbildung 9 mit verschiedenen Option-Gasmengen, kann man sehen, dass je mehr Methanol in der Probelösung ist je kleiner ist die Empfindlichkeit. Je höher der Gehalt des Option-Gases ist, desto flacher verläuft die Kurve. Es gibt allerdings keinen großen Unterschied zwischen 10% und 15% Option-Gas. Dann kann man sagen, dass bei der Messung mit organischen Lösungsmittel Option-Gas dazu geben werden muss, aber mehr als 10% sind nicht notwendig. Der Verlust an Empfindlichkeit bei Veränderung des Methanolgehaltes von 10 auf 80% beträgt bei 10% Gas ca. 2,7 für P und 4,6 für S. Ohne Option-Gas ist der Empfindlichkeitsunterschied noch größer: ca. 30,5 für P und 42,8 für S. Die Werte sind bezogen auf die Verhältnisse der Empfindlichkeit (Peakfläche) bei 10% MeOH und 80% MeOH.

- **Optimierung des Carrier-Gases in Abhängigkeit von der Fließgeschwindigkeit**

Für die Optimierung des Carrier-Gases für verschiedene Fließgeschwindigkeiten des Analyten wurden die Intensitäts-Carrier-Gasfluss Diagramme aufgenommen. Abbildung 10 zeigt den Einfluss von Carrier-Gas auf die Empfindlichkeit bei verschiedenen Fließgeschwindigkeit. Zur Einstellung der unterschiedlichen Fließgeschwindigkeiten wurde die Drehzahl der Nebulizer-pumpe verändert. Daraus resultiert eine Fließgeschwindigkeit von 0,2ml/min bei 0,05 rps bis 0,94 ml/min bei 0,4 rps.

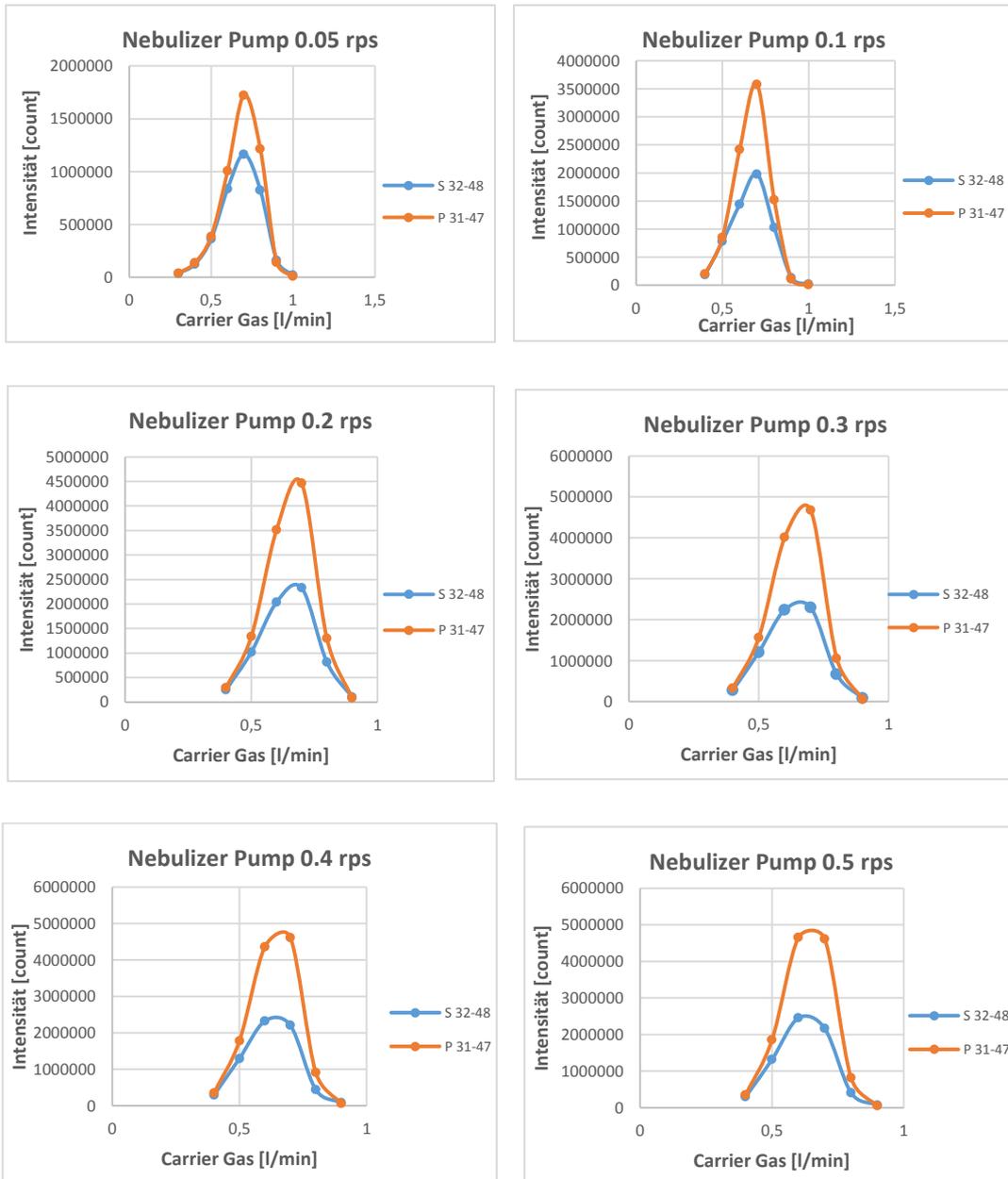


Abbildung 10: Einfluss von Carrier-Gas auf die Empfindlichkeit bei verschiedenen Fließgeschwindigkeiten

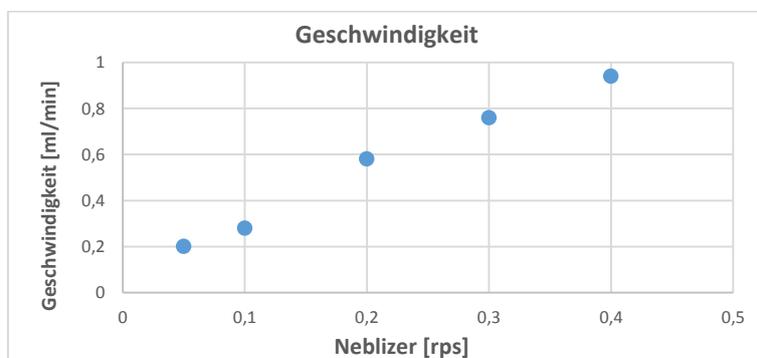


Abbildung 11: Verhältnis zwischen Rotationsgeschwindigkeit der peristaltischen Pumpe und der Fließgeschwindigkeit des Eluenten

Aus Abbildung 10 kann man sehen, dass unabhängig von der Fließgeschwindigkeit der optimale Carrier-Gasfluss bei 0,7 l/min für die höchste Empfindlichkeit für P und S liegt. Es wird auch sichtbar, dass der Carrier-Gasfluss einen sehr großen Einfluss auf die Empfindlichkeit hat und genau eingestellt werden muss. Abbildung 11 zeigt die Abhängigkeit der Fließgeschwindigkeit von der Drehzahl der peristaltischen Pumpe.

4.2.1.2 Parameter zur Optimierung der Reaktionszelle

In diese Arbeit wurde Sauerstoff als Reaktionsgas genutzt. Der Sauerstoffgehalt in der Reaktionszelle hat auf die Vollständigkeit der Reaktion von S^+ zu SO^+ und P^+ zu PO^+ einen großen Einfluss und muss optimiert werden.

- **Einfluss des Sauerstoffgehalts**

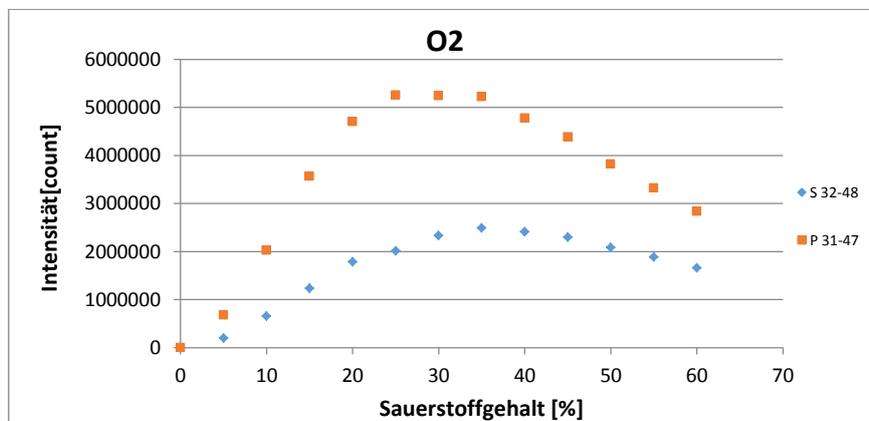


Abbildung 12: Einfluss des Sauerstoffgehalts auf die Bildung von SO^+ und PO^+ in der KRZ

Aus Abbildung 12 kann man sehen, dass sich die Bildung von SO^+ und PO^+ zuerst erhöht, wobei nach ca. 30-40% Sauerstoffgehalt sich die Empfindlichkeit verringert. Das kann man damit erklären, dass sich mit zunehmendem Sauerstoffgehalt der Wirkungsgrad der Bildung von SO^+ und PO^+ erhöht, um bei mehr Sauerstoff mehr Kollisionen einzugehen, die die Analytionen stark abbremsen, so dass sie die Reaktionszelle nicht mehr in Richtung Quadrupole Q2 verlassen können. Der optimale Sauerstoffgehalt wurde zu 35% bestimmt und im Weiteren damit gearbeitet.

4.3 Einfluss des Methanol Gehalts auf Empfindlichkeit

Um den Einfluss des Lösungsmittels Methanol, auf die Signalintensität im Massenspektrum zu untersuchen, wurde wässrige NSA-Lösung (1mg S/l), AMP-Lösung (1mg P/l) und Dimethylarsenat-Lösung (1mg As/l) genutzt. Der Methanolgehalt wurde zwischen 0 und 80% variiert.

4.3.1 Batch-Verfahren

Bei dem Verfahren werden die Standardlösungen mit einem Methanolanteil von 0% bis 80% hergestellt und direkt in das ICP-QQMS injiziert (Methanolanteil im Anhang 4 zu sehen).

Bei dieser Parameteroptimierung wurden Lösungen von 1mg S/l und 1mg P/l untersucht.

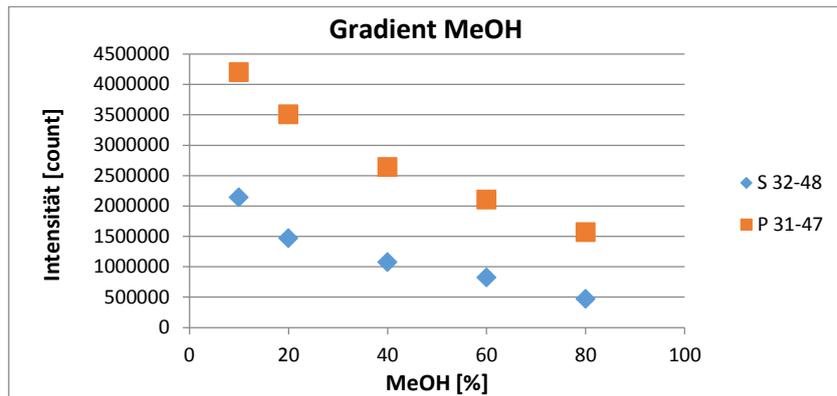


Abbildung 13: Empfindlichkeit bei unterschiedlichem MeOH Anteil im Batch-Verfahren

In Abbildung 13 sieht man abnehmende Intensitäten für PO^+ und SO^+ bei Erhöhung des MeOH-Gehaltes, das heißt, dass bei Batch-Verfahren je mehr Methanol in der Lösung ist je kleiner ist die Empfindlichkeit.

4.3.2 Einfluss des MeOH-Gehalts auf die Signalintensität im Fließinjektionsverfahren

Die gleichen Standardproben wurden auch mit der Fließinjektionsanalyse (FIA) analysiert. Als Transportlösung vom Injektor zum Detektor wurde ein Gemisch (Eluent A: 100% Wasser + 0,1% Ameisensäure und Eluent B: 100% MeOH + 0,1% Ameisensäure) eingesetzt. Die unterschiedlichen Methanolgehalte wurden durch Mischen von Eluent A und B hergestellt (Tabelle im Anhang 4 sehen).

Unter dieser Bedingung der ICP-QQQMS werden durch die Lösung mit 1mg S/l und 1mg P/l untersucht, und mit dem Verhalten im Batchverfahren verglichen.

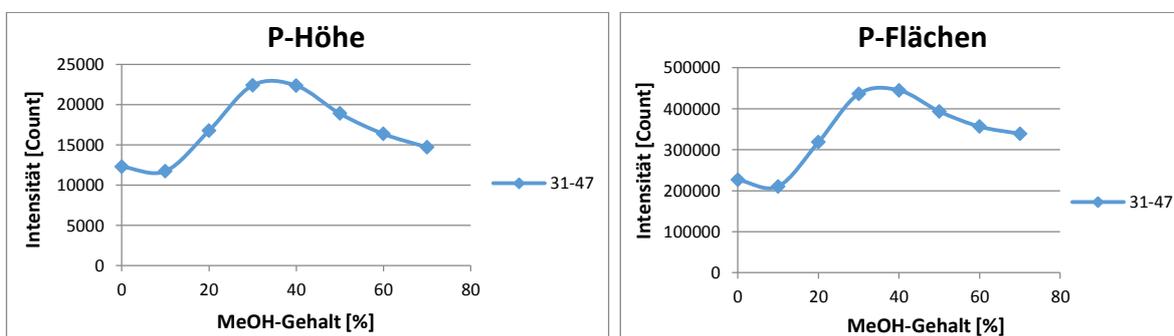


Abbildung 14: Abhängigkeit der Empfindlichkeit (Peakhöhe und Peakfläche) vom MeOH-Gehalt für Phosphor (FIA)

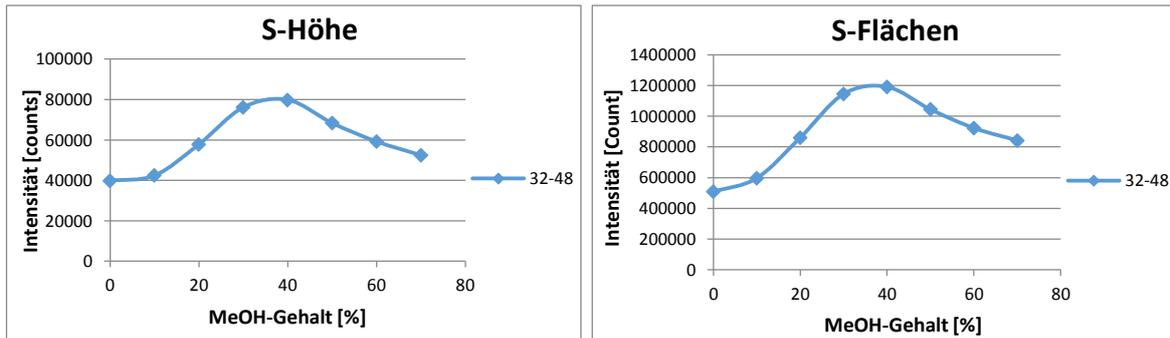


Abbildung 15: Abhängigkeit der Empfindlichkeit (Peakhöhe und Peakfläche) vom MeOH-Gehalt für Schwefel (FIA)

Im FIA Verfahren ist die Tendenz der Signalveränderung in Abhängigkeit vom Methanolgehalt anderes als im Batch-Verfahren, weil die Empfindlichkeit mit zunehmendem Methanolgehalt steigt, z.B. ist bei einem Methanolgehalt von 40% die Empfindlichkeit am höchsten. Es wurden auch noch As und Se hinsichtlich der Signalbeeinflussung durch Methanol untersucht.

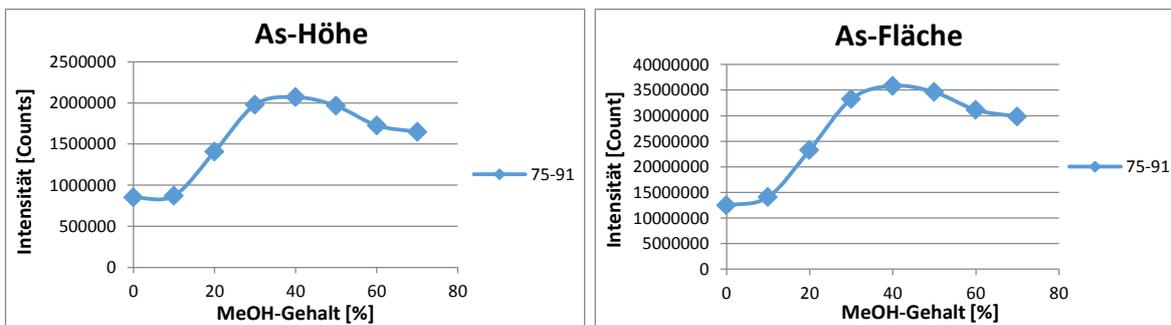


Abbildung 16: Abhängigkeit der Empfindlichkeit (Peakhöhe und Peakfläche) vom MeOH-Gehalt für Arsen (FIA)

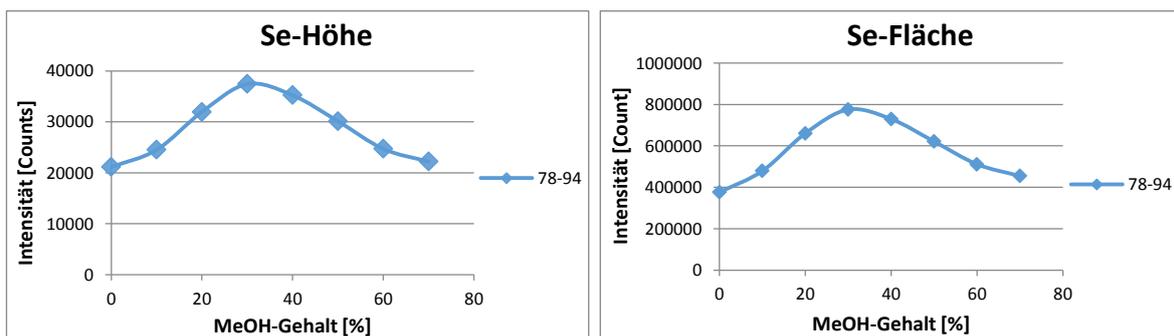


Abbildung 17: Abhängigkeit der Empfindlichkeit (Peakhöhe und Peakfläche) vom MeOH-Gehalt für Selen (FIA)

Bei As und Se ist die Tendenz der Empfindlichkeitveränderung auch wie bei P und S. Man kann einschätzen, dass bei dieser Methode der Einfluss von MeOH bei 30% bis 40% am höchsten. Vergleicht man die Ergebnisse mit dem Batchverfahren, so ergibt sich ein sehr unterschiedliches Verhalten. In beiden Fällen ist es für eine richtige Quantifizierung wichtig, das

Empfindlichkeitsfaktoren in Anhängigkeit vom MeOH-Gehalt eingeführt werden müssen oder es sind technische Voraussetzungen zu schaffen, die einen stabilen MeOH-Gehalt garantieren.

4.3.3 Andere Einflüsse auf die Signalintensität

Um eine hohe und stabile Empfindlichkeit zu bekommen, hat man eine Gegengradient-Methode mit zwei UHPLC getestet. Zwei UHPLC werden über ein T-Stück miteinander verbunden. Die Gradientenlösung wird mit einem gegenläufigen Gradienten vermischt, so dass eine konstante Methanolkonzentration entsteht. Die Bedingungen für die Arbeitsweise der Gegengradienten-Methode gehen aus Tabellen 11 und 12 hervor. Zur Verfolgung der Stabilität des resultierenden Eluenten wurde der zweiten HPLC Germanium ($m/z=74$) als interner Standard zugesetzt und mitdetektiert. Die Chromatogramme kann man im Anhang 1 sehen.

Tabelle 11: Eluenten Lösungen und Fließbedingungen

	Erste UHPLC	Zweite UHPLC
Eluent A	99,9% Wasser + 0,1% Ameisensäure	100 ppb Ge + 0,1% Ameisensäure + H ₂ O
Eluent B	99,9% Methanol + 0,1% Ameisensäure	100 ppb Ge + 0,1% Ameisensäure + MeOH
Säule	-	-
Fließgeschwindigkeit [ml/min]	0,5	0,25
Druck [bar]	75	6-9

Tabelle 12: Gradienten Tabelle

Time [min]	Erste UHPLC		Zweite UHPLC	
	A [%]	B [%]	A [%]	B [%]
0	100	0	0	100
2	20	80	80	20

Auch die isokratische Zugabe von Methanol führt zur Verringerung des Methanoleinflusses auf die Empfindlichkeit. Beide Techniken verdünnen aber die getrennten Analyte, so dass insgesamt nur eine geringe Verringerung der Empfindlichkeitsverbesserung zu sehen ist, die nicht von der Retentionszeit abhängig, so dass keine retentionszeit-abhängigen Empfindlichkeitsfaktoren benötigt werden. Die Chromatogramme sind im Anhang 2 zu sehen.

5. Ergebnisse und Diskussion

5.1 Detektion von Standardproben mit ICP-QQQMS/ESI-Q-TOFMS

Im Folgenden wird die Bestimmung von Verbindungen mit den Heteroatomen S oder P und S und P beschrieben: Zu den Verbindungen mit P zählen die Nukleotide. Zu den Verbindungen mit S zählt Naphthalensulfonsäure. Zu den untersuchten Pestiziden gehören Verbindungen mit S und P. Die Gradiententabelle der Detektion wird im Anhang 4 gezeigt.

5.1.1 Detektion von P- Standardproben

Die in Tabelle 13 aufgeführten Nukleotide und deren Detektionsbedingungen mit ICP-MS und ESI-MS wurden für die Untersuchungen für P-enhaltende Verbindungen verwendet.

Tabelle 13: Detektierte Massen im ICP-MS und ESI-MS (m/z) für Nukleotide

Untersuchungsstoffe	ICP-QQQMS		Positiv ESI-Q-TOFMS	
	m/z	Reaktionsgas	$[M+H]^+$	Chemical Formal
AMP	31-->47	O ₂	348,0704	C ₁₀ H ₁₅ N ₅ O ₇ P ⁺
ADP	31-->47	O ₂	428,0367	C ₁₀ H ₁₆ N ₅ O ₁₀ P ₂ ⁺
ATP	31-->47	O ₂	508,0030	C ₁₀ H ₁₇ N ₅ O ₁₃ P ₃ ⁺

Der erste Quadrupol in ICP-QQQMS wählt P⁺ mit $m/z=31$ aus, in der KRZ mit Reaktionsgas O₂ gefüllt und reagiert es zu ³¹P¹⁶O⁺ mit $m/z=47$, der zweite Quadrupol wählt $m/z=47$ aus, dann wird das Ion detektiert. Und zur entsprechenden Retentionszeit kann man die spezifische Molmasse im ESI-Q-TOFMS Chromatogramm suchen.

Für ATP konnte kein Molmassesignal $[M+H]^+$ gefunden werden, so dass nur mit ADP (Abbildung 18) und AMP (Abbildung 19) weitergearbeitet wurde. Man kann die Peaks im Chromatogramm sehen, und die entsprechenden Massen finden.

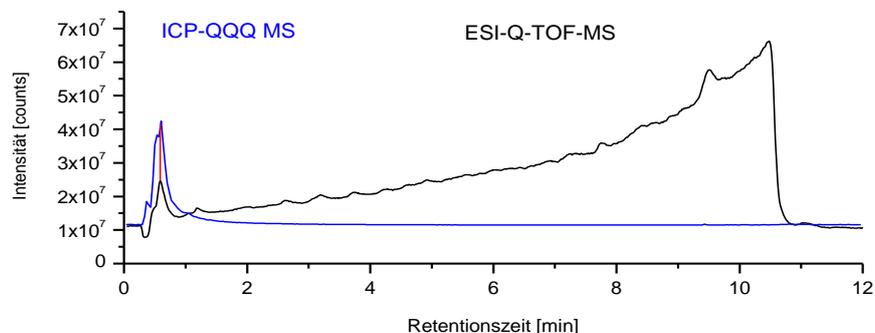


Abbildung 18: ICP-QQQMS/ESI-Q-TOFMS Chromatogramm von ADP

Die Retentionszeit für ADP in ICP-QQQMS Chromatogramm ist 0,5 min. Dann sucht man in ESI-Q-TOFMS Chromatogramm die entsprechende Zeit, und kann dann im Massespektrum die akkurate Masse von $m/z=428,0367$ ermitteln.

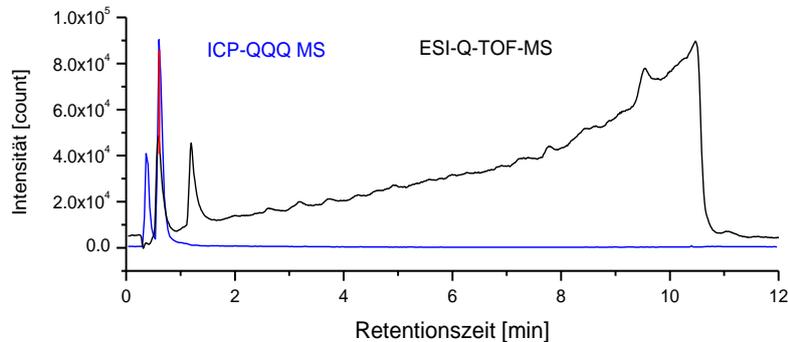


Abbildung 19: ICP-QQQMS/ESI-Q-TOFMS Chromatogramm von AMP

In dem Massespektrum kann man sehen, dass die höchste Intensität von AMP $m/z=348,0704$ ist. Die Retentionszeit in beiden Detektoren ist 0,6 min. Und beim zweiten Peak in ESI-Q-TOFMS gibt es keine Phosphorsignal in ICP-MS, deswegen ist das eine Verbindung, die nicht zu den Nukleotiden gehört.

5.1.2 Detektion von einer S- Standardprobe

Wie aus Tabelle 14 ersichtlich, wurde für die S-Detektion die Naphthalensulfonsäure ausgewählt. Bei dieser Standardprobe wird der erste Quadrupol in ICP-QQQMS S^+ mit $m/z=32$ ausgewählt und in der KRZ mit Reaktionsgas O_2 reagiert es zu $^{32}S^{16}O^+$ mit $m/z=48$. Der zweite Quadrupol wählt $m/z=48$ aus, dann wird das Ion detektiert. Und zur entsprechenden Retentionszeit kann man die spezifische Molmasse im ESI-Q-TOFMS Chromatogramm suchen.

Tabelle 14: Detektierte Massen im ICP-MS und ESI-MS (m/z) für NSA

Untersuchungsstoffe	ICP-QQQMS		Positiv ESI-Q-TOFMS	
	m/z	Reaktionsgas	$[M+H]^+$	Chemical Formal
NSA	32-->48	O_2	209,0300	$C_{10}H_7O_3S^+$

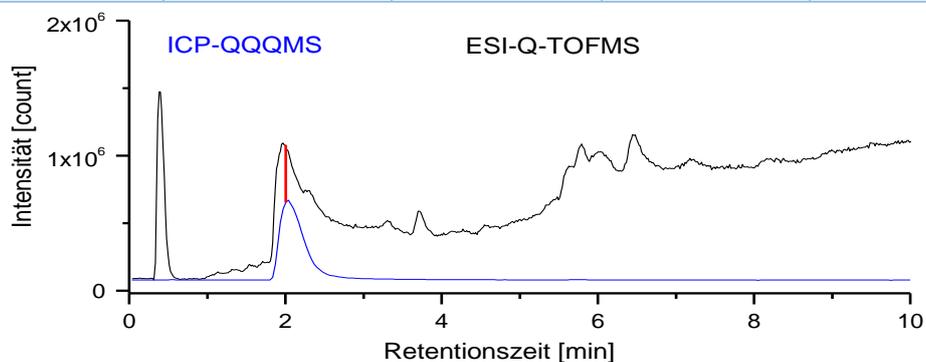


Abbildung 20: ICP-QQQMS/ESI-Q-TOFMS Chromatogramm von NSA

Die Retentionszeit von NSA beträgt 2 min, wobei die beiden Detektoren einen Unterschied von ca. 0,03 min haben. Die höchste Intensität im Massenspektrum von NSA ist bei $m/z=209,03$. Der erste Peak im Chromatogramm (Abbildung 20) liegt im Totvolumen und ist eine unbekannte Verbindung sowie auch diejenigen im Retentionsbereich von 3-8 min. Wie man am Schwefelsignal erkennen kann, enthalten diese Verbindungen keinen Schwefel.

5.1.3 Detektion von P- und S-Standardverbindungen (Pestizide)

Für die simultane Detektion von S und P in einer Verbindung wurden die Tabelle 15 beschriebenen Pestizide genutzt. Bei dieser Standardprobe werden gleichzeitig im ersten Quadrupol im ICP-QQQMS die Masse für P^+ mit $m/z=31$ und S^+ mit $m/z=32$ ausgewählt. In der KRZ mit Reaktionsgas O_2 reagiert es zu $^{31}P^{16}O$ mit $m/z=47$ und $^{32}S^{16}O^+$ mit $m/z=48$. Der zweite Quadrupol wählt PO^+ $m/z=47$ und SO^+ $m/z=48$ aus, dann wird das Ion detektiert. Und zur entsprechenden Retentionszeit kann man die spezifische Molmasse im ESI-Q-TOFMS Chromatogramm suchen.

In Abbildung 21, 22 und 23 zeigt ESI-Q-TOFMS Chromatogramme (TIC) und die Elemente P und S bezogene ICP-QQQMS Chromatogramme (TIC).

Tabelle 15: Detektierte Massen im ICP-MS und ESI-MS (m/z) für ausgewählte Pestizide

Untersuchungsstoffe	ICP-QQQMS		Positiv ESI-Q-TOFMS	
	m/z	Reaktionsgas	$[M+H]^+$	Chemical Formal
Fenamiphos	31-->47	O_2	304,1131	$C_{13}H_{23}NO_3PS^+$
	32-->48			
Fenthion	31-->47	O_2	279,0273	$C_{10}H_{16}O_3PS_2^+$
	32-->48			
Ethion	31-->47	O_2	384,9949	$C_9H_{23}O_4P_2S_4^+$
	32-->48			

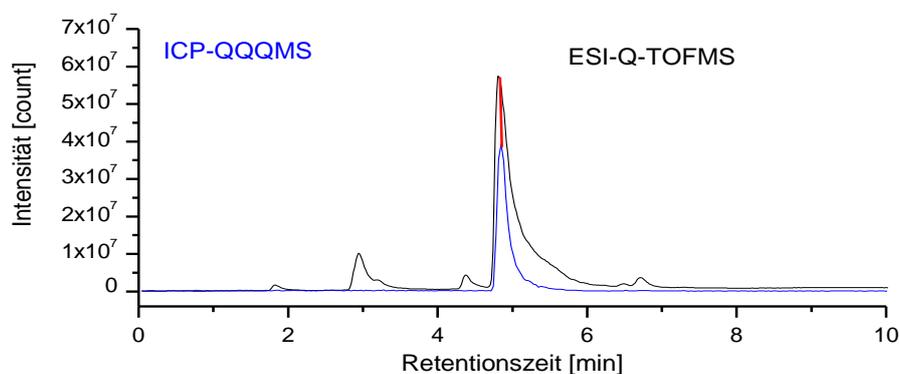


Abbildung 21: ICP-QQQMS/ESI-Q-TOFMS Chromatogramm von Fenamiphos

Aus Abbildung 21 kann man sehen, dass die Retentionszeit von Fenamiphos in beiden Detektoren ca. 4,8 min ist. Mit dem ESI-MS co-eluieren auch P und S Signale vom ICP-MS Peak stellt höchste Intensität von Fenamiphos $m/z=304,1078$ ($m/z_{calc.}=304.1131$). Die zweite Intensität von $m/z=607,2101$ ist die doppelte Masse von m/z 304,1078 ($C_{26}H_{45}N_2O_6P_2S_2^+$ $m/z_{calc.}=607.2189$ $[2M+H]^+$).

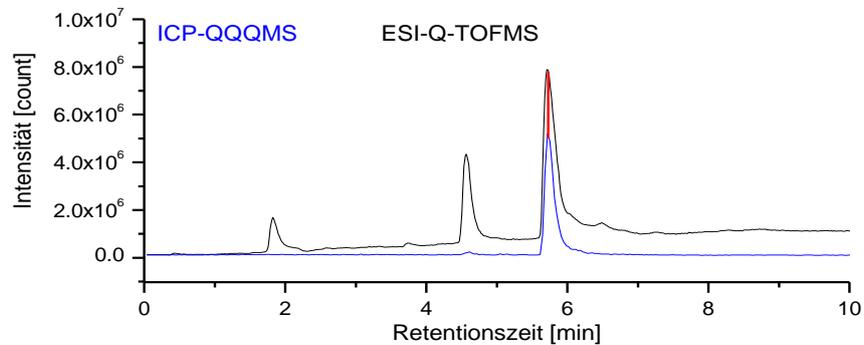


Abbildung 22: ICP-QQQMS/ESI-Q-TOFMS Chromatogramm von Fenthion

Von der überlappte Peak aus Abbildung 22 ist die Retentionszeit in beiden Detektoren ca. 5,8 min. Dann sucht man die entsprechende Intensität in ESI-Q-TOFMS Software, die Intensität von Fenthion $m/z=279,0307$ ($m/z_{calc.}=279,0273$) ist. Die anderen Peaks in ESI-Q-TOFMS sind Verschmutzung.

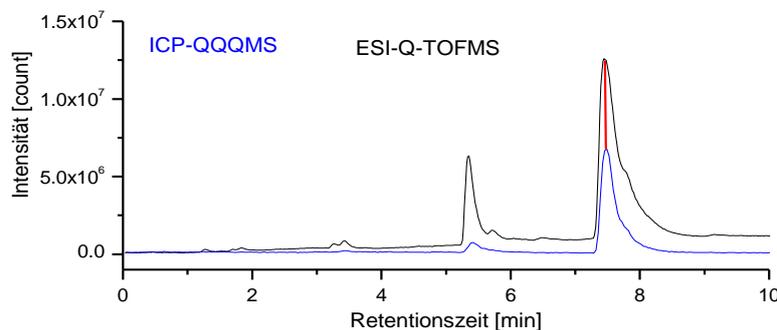


Abbildung 23: ICP-QQQMS/ESI-Q-TOFMS Chromatogramm von Ethion

In der Abbildung 23 findet man Ethion bei der Retentionszeit ca. 7,5 min. Man sucht die entsprechende Intensität in ESI-Q-TOFMS Software, die Intensität von Ethion $[M+H]^+$ $m/z=385,0004$ ($m/z_{calc.}=384.9949$) ist, $m/z=199,005$ ist ein Anteil von Ethionstruktur $C_5H_{12}O_2PS_2^+$ -Radikal ($m/z_{calc.}=199.0016$).

5.2 Kalibrierung und LOD-, LOQ-Bestimmung

Kalibrierung ist eine Methode um unbekannte Konzentrationen eines Stoffes in einer Probe zu bestimmen. Über eine lineare Regression kann ein Zusammenhang zwischen Signalintensität (z.B. Peakfläche) und der bekannten Konzentration hergestellt werden.

Die Formel für die Kalibration lautet: $y = ax + b$. Y ist Messwert, x ist die bekannte Konzentration, a bedeutet hier Anstieg der Geraden, b ist y-Achsenabschnitt.

Die Kalibrierung wird mit dem ICP-QQQMS FIA-Verfahren durchgeführt. Die Massen $m/z=47$ (PO^+), $m/z=48$ (SO^+), $m/z=91$ (AsO^+) und $m/z=94$ (SeO^+) wurden dazu verwendet. Um einen besseren Massebereich zu erkennen kann man auch As^+ zu AsO^+ betrachten. Die Mittelwerte der Peakflächen der Replikate (n=3) wurden gegen die jeweilige Konzentration aufgetragen.

Zur Kalibrierung wurde eine Verdünnungsreihe ($\mu\text{g S/l}$ bzw. $\mu\text{g P/l}$) von $5\mu\text{g/l}$, $10\mu\text{g/l}$, $25\mu\text{g/l}$, $50\mu\text{g/l}$, $100\mu\text{g/l}$ und $200\mu\text{g/l}$ hergestellt. Für die Kalibrierung von Phosphor und Schwefel für die Verbindungen Fenamiphos, Fenthion und Ethion wurden die Konzentrationen auf die jeweiligen Elemente bezogen. Auch die Kalibrierung von Arsen mit Dimethylarsenat (DMA) wurde auf die Masse von Arsen bezogen. Es wurde mit 2 unterschiedlichen Methanolgehalten im Eluenten (0% MeOH und 40% MeOH) kalibriert. Der Vergleich der Anstiege der Kalibrationsgeraden zeigt den Einfluss des organischen Lösungsmittels auf die Empfindlichkeit der Detektion.

5.2.1 Kalibration für die Elemente der 5. Hauptgruppe

5.2.1.1 Phosphor

Abbildung 24 zeigt die Kalibrationen von P im Konzentrationsbereich von 25 bis 200 $\mu\text{g P/l}$ ohne Methanol und mit 40% Methanol im Eluenten.

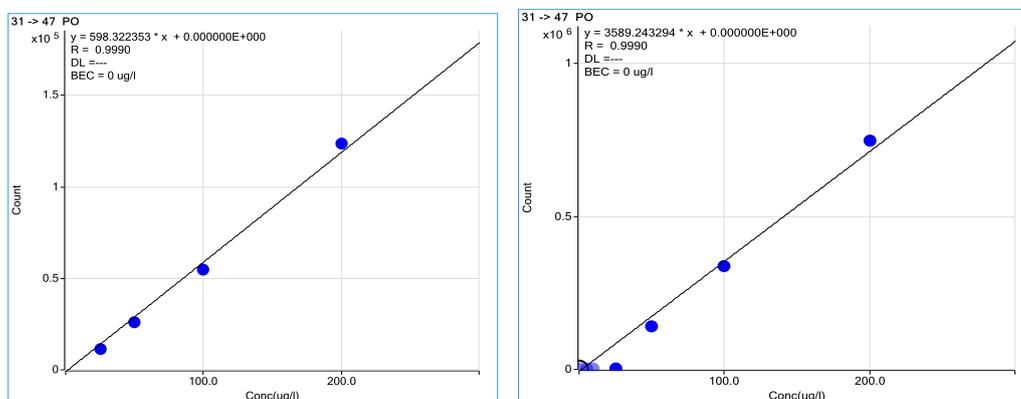


Abbildung 24: Kalibrierung von P mit FIA-Verfahren bei 0% MeOH (Links) und 40% MeOH (Rechts)

Aus den Kalibrationsgeraden konnte nun die Steigung, welche ein Maß für die Empfindlichkeit dargestellt, entnommen werden und mit dieser und der Standardabweichung die Nachweisgrenze (LOD: *Limit of Detektion*) und Bestimmungsgrenze (LOQ: *Limit of Quantification*) bestimmt werden.

$$LOD = \frac{3 * \text{Standardabweichung}}{\text{Anstieg}}$$

$$LOQ = \frac{9 * \text{Standardabweichung}}{\text{Anstieg}}$$

Aufgrund der unterschiedlichen Anstiege z.B. in Abbildung 24 von $a = 598$ bei 0% MeOH und 3589 bei 40% MeOH ist die Nachweisgrenze 25 ppb P bzw. 5 ppb P. Die Steigerung des Anstiegs a bei 40% MeOH ist ca. 6 fache bezogen auf a bei 0% MeOH. Das Bestimmtheitsmaß besitzt in beiden Regressionen den Wert von $r^2 = 0,999$.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 16 dargestellt. Man sieht, dass die Nachweisgrenze durch ein organisches Lösungsmittel wesentlich verbessert werden kann.

5.2.1.2 Arsen

Abbildung 25 zeigt die Kalibrierung von As im Konzentrationsbereich von 25 bis 200 $\mu\text{g As/l}$.

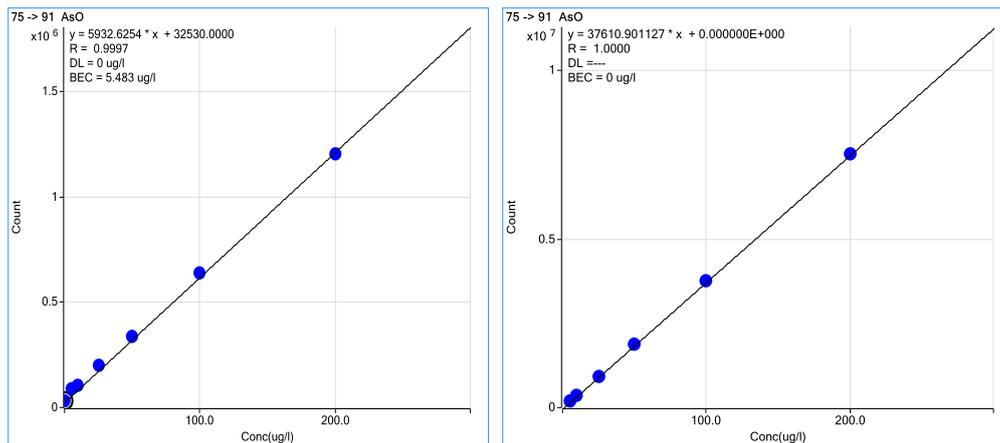


Abbildung 25: Kalibrierung von As mit FIA-Verfahren bei 0% MeOH (Links) und 40% MeOH (Rechts)

Bei Arsen ist die Kalibrierung mit einem Methanolgehalt 40% sehr gut. Die Steigerung bei 40% MeOH ist ca. das 6 fache wie bei 0% MeOH. Die analytischen Parameter für die As-Bestimmung sind in Tabelle 16 zusammengefasst.

5.2.2 Kalibrierung für die Elemente der 6. Hauptgruppe

5.2.2.1 Schwefel

Abbildung 26 zeigt die Kalibrierung von S im Konzentrationsbereich von 25 bis 200 $\mu\text{g S/l}$.

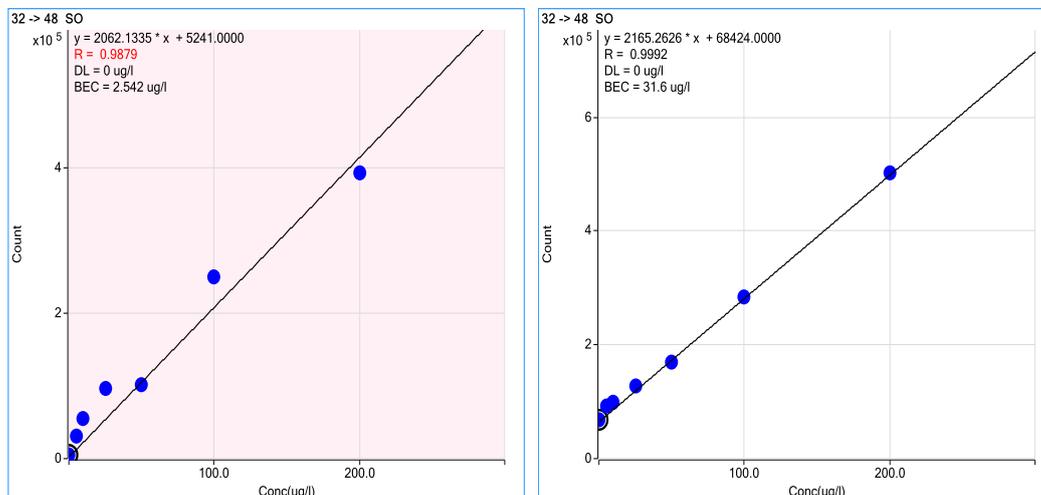


Abbildung 26: Kalibrierung von S mit FIA-Verfahren bei 0% MeOH (Links) und 40% MeOH (Rechts)

Aus der Kalibrierung von Schwefel geht hervor, dass ohne und mit 40% Methanol die Nachweisgrenze weniger als 5 ppb S beträgt, aber bei 0% MeOH ist das Bestimmtheitsmaß weniger als 0,995. Die analytischen Parameter für die S-Bestimmung sind in Tabelle 16 zusammengefasst.

5.2.2.2 Selen

Abbildung 27 zeigt die Kalibration von Se im Konzentrationsbereich von 25 bis 200 µg Se/l.

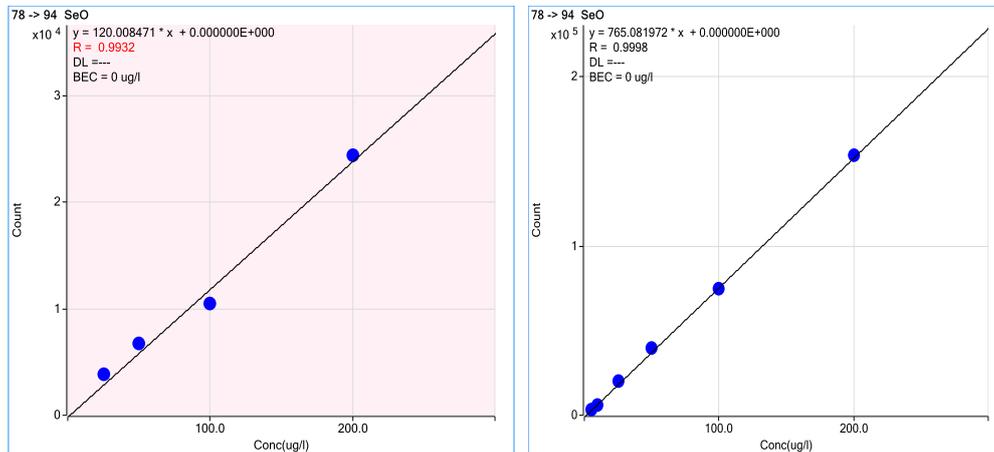


Abbildung 27: Kalibrierung von Se mit FIA-Verfahren bei 0% MeOH (Links) und 40% MeOH (Rechts)

Bei Selen ist das Bestimmtheitsmaß bei der Kalibration ohne MeOH kleiner als 0,995, und die Nachweisgrenze beträgt 11 ppb Se. Bei 40% MeOH wird Selen 6,4-mal empfindlicher detektiert, woraus eine Nachweisgrenze von 5 ppb Se resultiert. Die analytischen Parameter für die Se-Bestimmung sind in Tabelle 16 zusammengefasst.

Tabelle 16: LOD- und LOQ-Bestimmung für P, S, As und Se bei unterschiedlichen Methanolgehalten

	0% MeOH				40% MeOH			
	LOD [µg Se/L]	LOQ [µg Se/L]	a	R ²	LOD [µg Se/L]	LOQ [µg Se/L]	a	R ²
P	5,60	16,79	598,322	0,9990	1,10	3,43	3589,243	0,9990
As	1,03	3,10	5932,6	0,9997	0,54	1,63	37610,9	1
S	5,50	16,50	2062,134	0,9879	4,73	14,19	2165,263	0,9992
Se	11,55	34,65	120,008	0,993	0,74	5,22	765,082	0,9998

Vergleicht man die Kalibrierung der vier Elemente P, As, S und Se, so ist die Kalibrierung bei 40% MeOH empfindlicher, und die berechneten LOD-Wert und LOQ-Wert niedriger. Man kann sagen, dass die Messung mit 40% MeOH niedrigere Konzentrationen bestimmt werden können.

6. Anwendungen

Die Bestimmung von organischen Substanzen wie Pestizide, Farbstoffe oder Pharmaka in der Umwelt ist eine wichtige Aufgabe zum Schutz des Menschen. Darunter befinden sich auch zahlreiche S- und P- oder S, P- enthaltende Substanzen, die identifiziert und quantifiziert werden müssen. Neben dieser anthropogenen Belastung enthalten auch natürliche Verbindungen in Pflanzen, Tieren und im Menschen diese Heteroatome. Beispiele sind Glutathion und Phytochelatine für S-heteroatomare Verbindungen, Nukleotide und Phospholipide für P-heteroatomare Verbindungen sowie Selenoproteine für Se-heteroatomare Verbindungen. Natürlichen Ursprungs können auch As-heteroatomare Verbindungen sein, wie sie in Meeresorganismen wie Algen und Fischen gebildet werden. Zum Beispiel bilden Algen Arsenozucker und Fische Arsenolipide. Zu diesen Verbindungsklassen wurden im Rahmen dieser Arbeit Untersuchungen durchgeführt, die im folgenden Abschnitt beschrieben werden.

Über die erste Struktur der Arsenolipide hat *Morita et al.* ^[27] in der Brown Alge *Undaria pinnatifida* berichtet. Jetzt haben *Carcia-Salgado et al.* ^[28] noch gezeigt, dass zwei Brown Algen *Undaria pinnatifida* und *Hizikia fusiformis* Arsenophosphorlipide (AsPL) enthalten.

In dieser Arbeit werden Untersuchungen zum Auftreten von AsPL in Algen und in Dorschleber untersucht.

6.1 Algen

Algen sind an der Basis der Nahrungskette, und können große Mengen von Arsen in der Form von einer ganzen Reihe von wasser- und lipidlöslichen Verbindungen akkumulieren. Es ist ein Teil des biogeochemischen Arsenzyklus. AsPL als hochmolekulare Arsenverbindungen sind bis jetzt eine Verbindungsguppe über die keine toxikologischen Informationen verfügbar sind. Die Identifizierung von Lipidstrukturen ist nicht einfach aufgrund der hohen Anzahl von verschiedenen Fettsäuren und Kopfgruppen in komplexen Lipidgemischen. Die Polarität und die Arsengruppe haben einen starken Einfluss auf die Eigenschaften der Phospholipid^[32]. Um die strukturellen und Signalfunktion zu bewerten, ist die Kenntnis der Lipidstruktur sehr wichtig.

6.1.1 Probenahme

In dieser Arbeit wurden die in Abbildung 28 gezeigten 4 getrockneten Algenproben untersucht, dies sind Meeresalgen C7 (interne Nummerierung), japanische Meeresalgen (MA1 und MA2 (Hijiki^[29])), und das Standardreferenzmaterial NIES 9 (As_{total} 115 mg/kg). Von allen Proben wurden jeweils 200 mg eingewogen und in 10ml MeOH/H₂O Gemisch mit Verhältnis 1:1 extrahiert. Um die Analyte möglichst vollständig zu extrahieren, stellt man die Proben in einen Horizontalschüttler und schüttelt

sie mit 200 s^{-1} . Nach 24 Stunden (Raumtemperatur) wurden die Proben mit 4000 rps 10 min zentrifugiert. Die MeOH/H₂O Lösungen wurde vom Feststoff abgetrennt und mit ICP-QQQMS und ESI-Q-TOFMS gemessen.



Abbildung 28: Untersuchte Meeresalgen (UFZ)

6.1.2 Identifizierung

Die Gerätebedingungen sind gleich wie die oben gezeigten Bedingungen. Die Trennbedingungen (Gradient) sind im Anhang 4 zusammengefasst. Zum Vergleich wurde noch eine Poroshell Säule eingesetzt (Poroshell, 120EC-C18; 3,0 x 150mm, 2,7 μm), mit der die Trennung aber nicht verbessert werden konnte (Vergleiche der Chromatogramme im Anhang 3 zu sehen).

In den Extrakten der Algen MA C7 und NIES 9 konnten sowohl AsO^+ als auch PO^+ Signale gefunden werden (Abbildung 29 und 30), die auf das Vorhandensein von Asenolipiden hinweisen. Es konnte aber keine typische Masse für die am meisten auftretenden AsZ (AsZ-OH , AsZ-SO_3 , AsZ-SO_4 , AsZ-PO_4) gefunden werden. Für MA 1 und MA 2 (Abbildung 31 und 32) wurde auch nach möglichen AsPL gesucht, da P und As Signale coeluiieren.

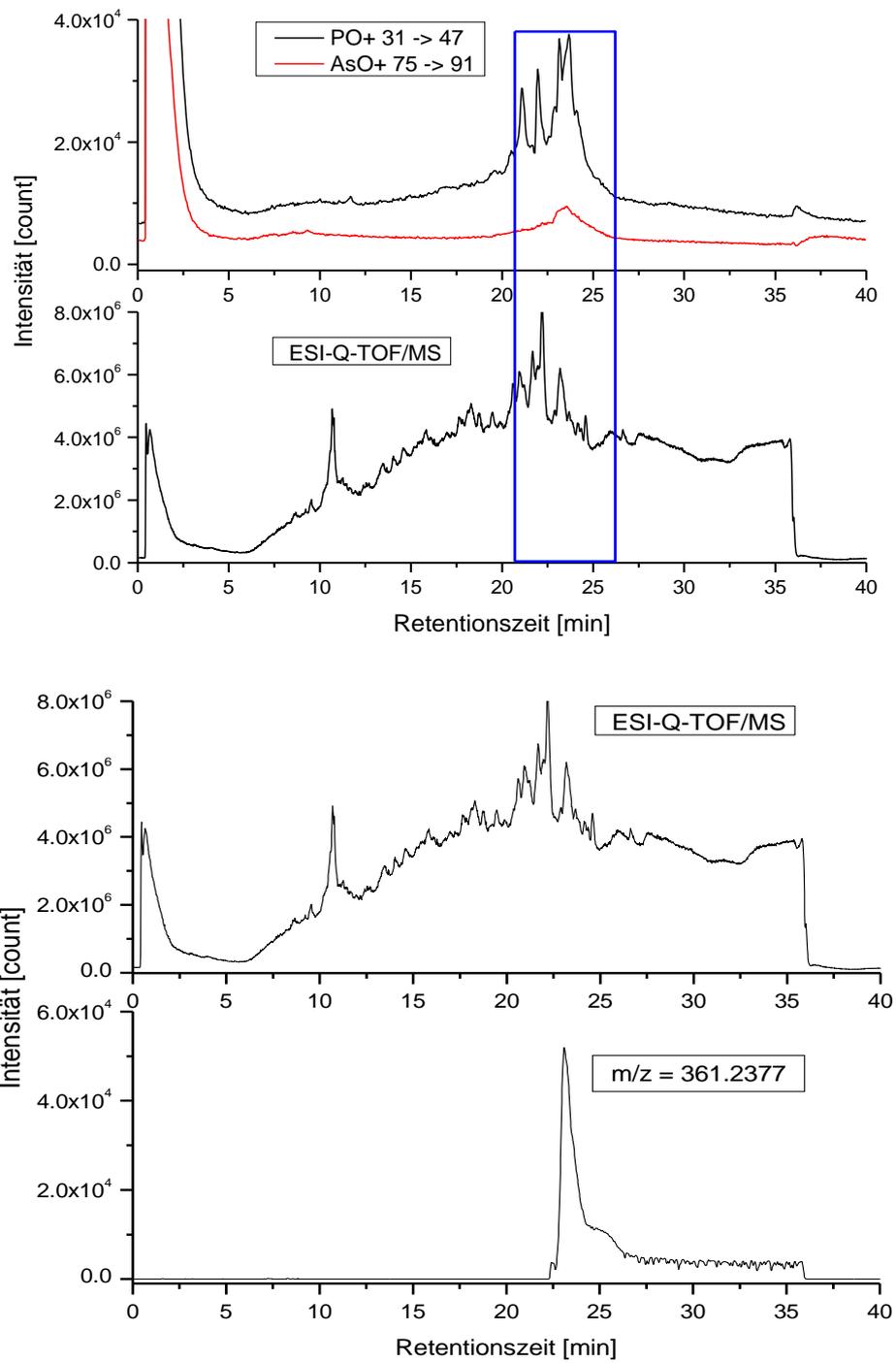


Abbildung 29: ICP-MS und ESI-MS Chromatogramm von MA C7 und möglicher Asenolipidpeaks

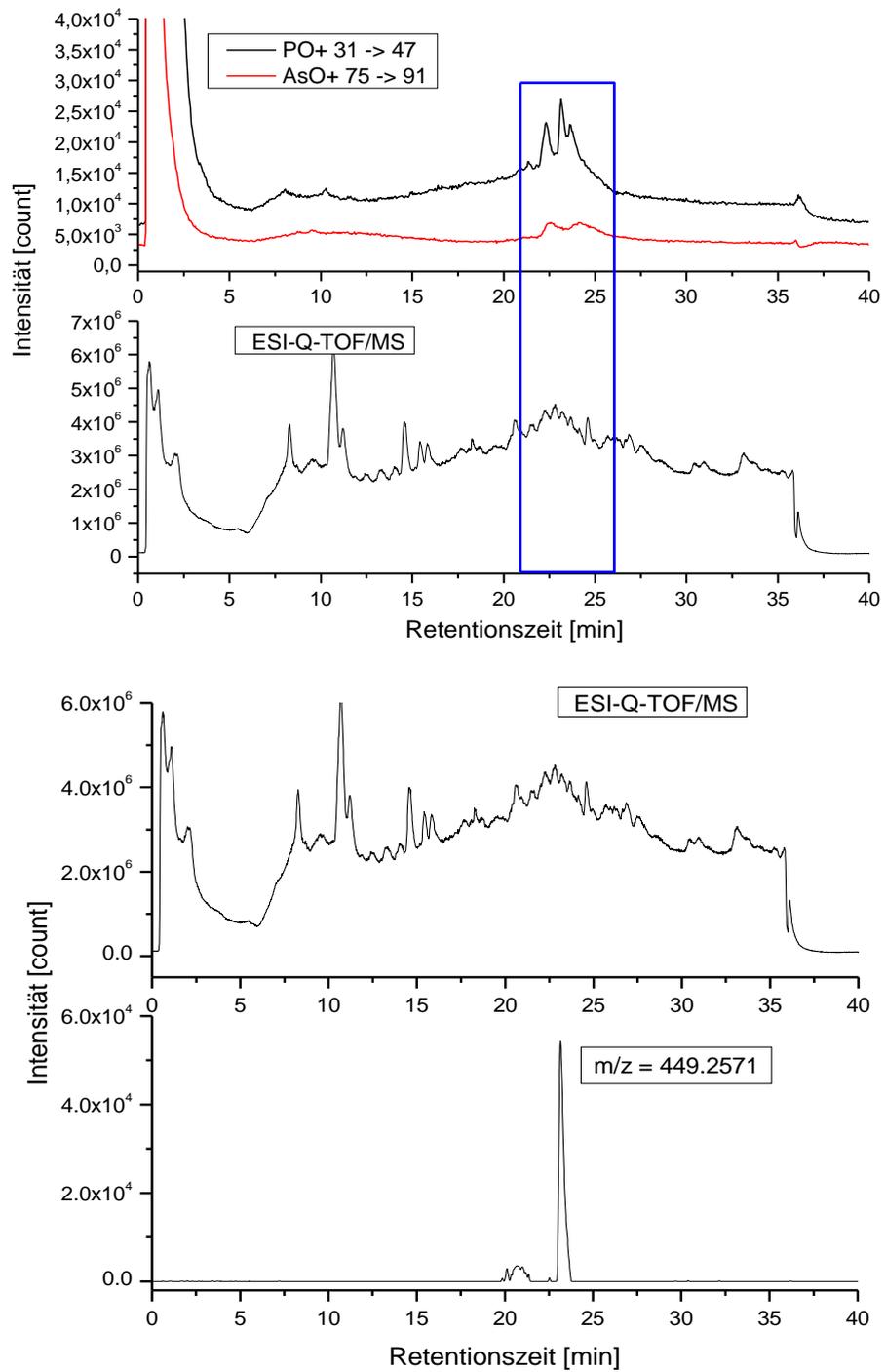


Abbildung 30: ICP-MS und ESI-MS Chromatogramm von NIES 9 und möglicher Asenolipidpeaks

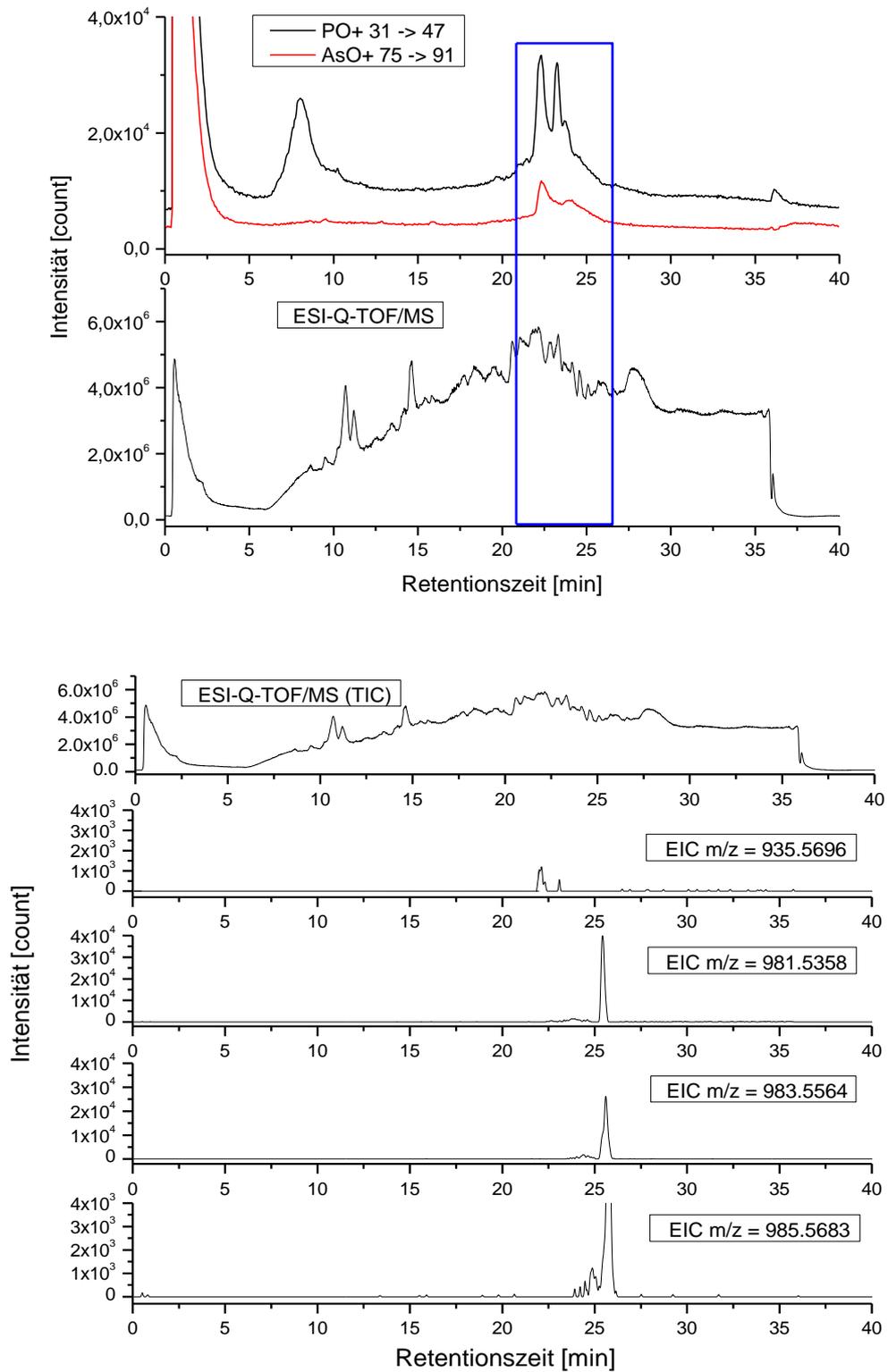


Abbildung 31: ICP-QQQMS und ESI-Q-TOFMS Chromatogramm (TIC und EIC's) für MA 1

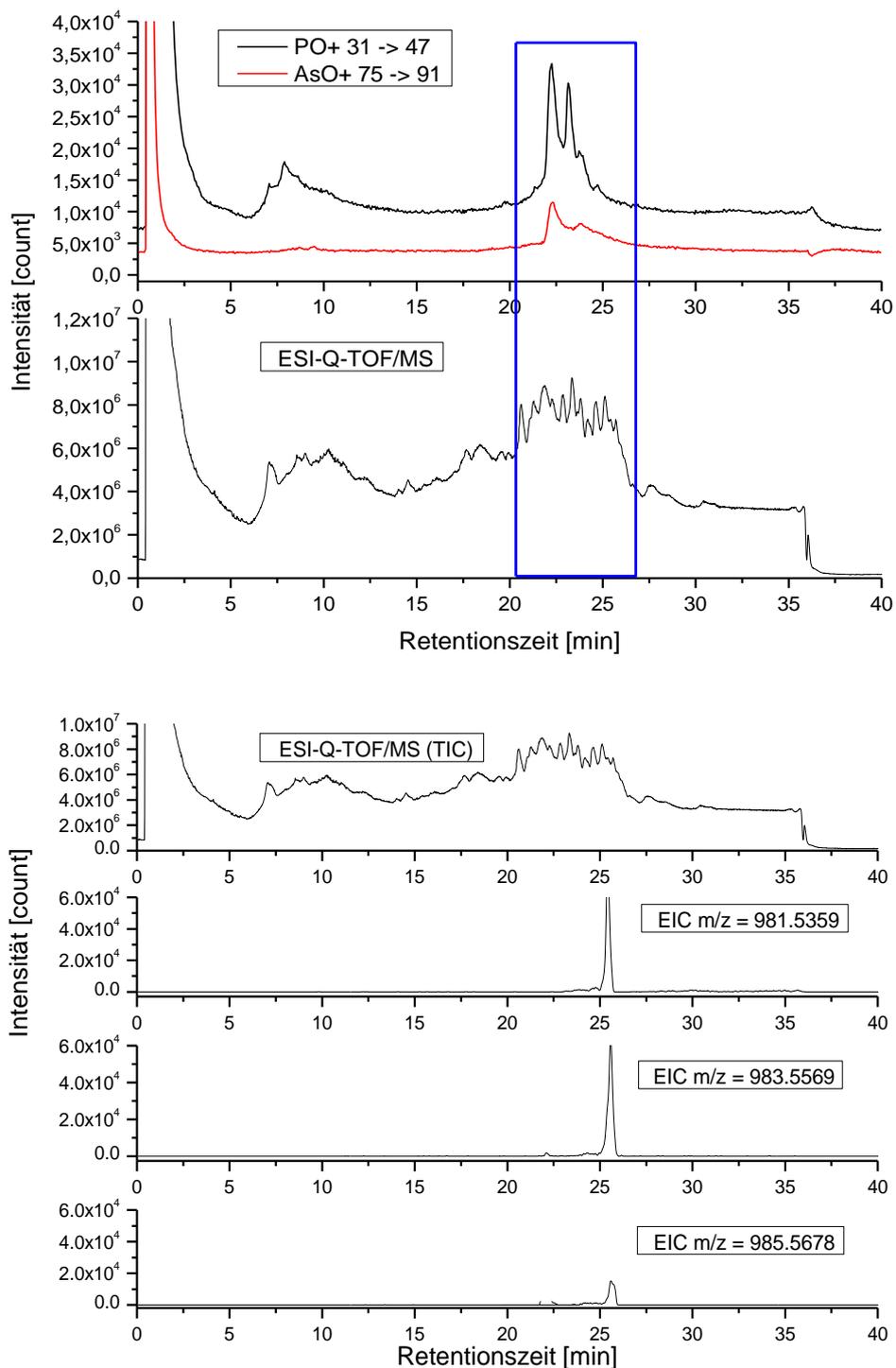


Abbildung 32: ICP-QQQMS und ESI-Q-TOFMS Chromatogramm (TIC und EIC's) für MA 2

Aus dem ICP-QQQMS Chromatogramm kann man sehen, dass die möglichen AsPL (blauer Rahmen) Peaks im Retentionszeitbereich von 20min bis 27min zu finden sein sollte, da dort überlappende Peaks von As und P erscheinen. Dann sucht man mögliche $[M+H]^+$ Massen im ESI-Q-TOFMS Chromatogramm und ermittelt die Summenformel. Strukturvorschläge wurden für Arsenozucker in der Literatur^{[29][30][31]} beschrieben. Als Beispiel ist AsZ-PO₄ Struktur gestellt (Abb. 33), welche gleichzeitig die Elemente As und P enthält.

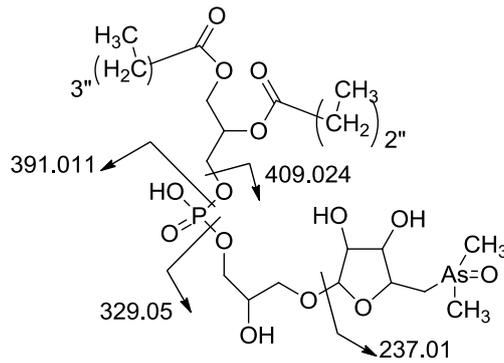


Abbildung 33: AsZ-PO₄ Struktur^[29]

Anhand dieses Strukturvorschlages würde man die entsprechende Struktur für die Formen in Tabelle 17 zeichnen. Es konnten in den Algen MA 1 und MA 2 insgesamt 4 Massen gefunden werden, die auch *Feldman et al.*^[31] beschrieben wurden.

Tabelle 17: Gefundene AsPL in Meeresalgen (MA1 und MA2) und Vorschläge für die Struktur

Verbindung	MA 1 [M + H] ⁺	MA 2 [M + H] ⁺	Chemical Formel	Kettenlänge für 2'' mit Doppelbindung/Kettenlänge für 3'' mit Doppelbindung
AsPL-981	981,5358	981,5359	C ₄₈ H ₉₁ AsO ₁₃ P ⁺	C 16:0/ C 19:3
AsPL-983	983,5564	983,5569	C ₄₈ H ₉₃ AsO ₁₃ P ⁺	C 16:0/ C 19:2
AsPL-985	985,5678	985,5678	C ₄₈ H ₉₅ AsO ₁₃ P ⁺	C 16:0/ C 19:1
AsPL-987	935,5696	-	C ₄₈ H ₉₃ AsO ₁₀ P ⁺	C 16:0/ C 19:2

Die 16: 0 bedeutet 16 Kohlenstoffketten ohne Doppelbindung.

6.2 Dorschleber

Arsenophospholipide hat man schon in Algen und Fisch gefunden. Auch in der Dorschleber konnten Arsenolipide gefunden werden^[32] (Anhang 5). Ob aber auch in der Dorschleber auch As-PL zu finden sind, das interessiert man sehr. Deswegen wurde auch im Rahmen dieser Arbeit versucht, Arsenophospholipide und deren Hydrolyseprodukte zu finden. Für diese Aufgabe wurde die Dosen-Dorschleber mit Methanol extrahiert und der Extrakt einer chemischen Hydrolyse unterzogen.

6.2.1 Probenahme

Die experimentelle Arbeitsweise zeigt Abbildung 34.

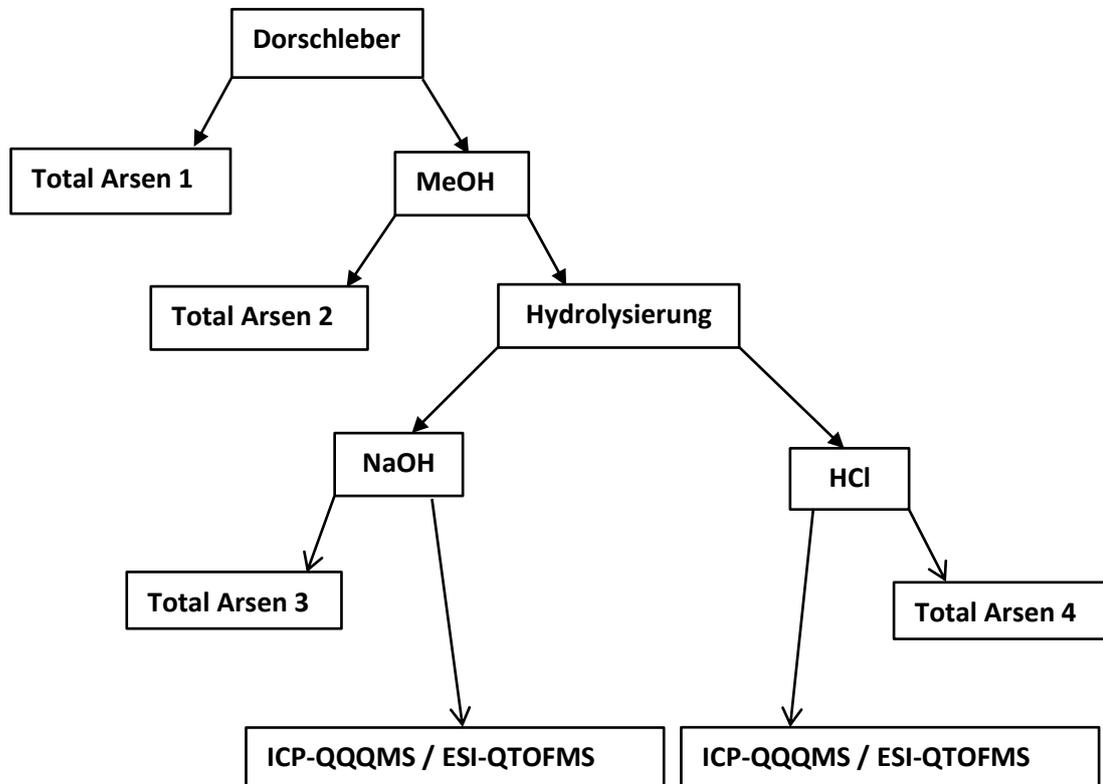


Abbildung 34: Fließschema der Dorschleberextraktion und der HCl bzw. NaOH Hydrolyse

14,9g Dosen-Dorschleber wurde eingewogen und homogenisiert mittels Ultra-Turrax. Davon wurde 2-mal jeweils ca. 0,2g mit 5ml HNO_3 und 0,5ml H_2O_2 mittels Mikrowellenaufschluß aufschlossen und dann der totale Arsengehalt bestimmt. Die Restprobe vom 14,5 g wurde mit Methanol auf 35ml aufgefüllt. Es wird mit fokussiertem Ultraschall 3-mal jeweils 15min extrahiert und dann mit Zentrifuge 4000 rpm 10min zentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren erhält man 3 Schichten, eine methanolische Schicht oben, den restlichen Feststoff unten und in der Mitte eine Ölschicht. Von jeder Schicht wurde mit gleicher Methode der totale Arsengehalte bestimmt. Auf der anderen Seite wurden die Lösungen und der Feststoff mit Natronlauge bzw. Salzsäure versetzt, und danach mit Schüttler 22 Stunden bei 40°C geschüttet. Die Hydrolyse Lösungen wurden mit gleicher Methode auf den totalen Arsengehalt untersucht und mit der Kopplungsmethode ICP-QQQMS/ESI-Q-TOFMS auf Arsenspezies untersucht. Die Hydrolysebedingungen sind in Tabelle 18 zusammengefasst.

Tabelle 18: Probebehandlung mit NaOH bzw. HCl

Probenname	Einwaagen	MeOH	NaOH (1M)	HCl (1M)
methanolische Schicht	50 µl	250 µl	250 µl	-
methanolische Schicht	50 µl	250 µl	-	250 µl
Feststoffschicht	0,2 g	250 µl	250 µl	-
Feststoffschicht	0,2 g	250 µl	-	250 µl
Ölschicht	250 µl	250 µl	250 µl	-
Ölschicht	250 µl	250 µl	-	250 µl

6.2.2 Quantifizierung von Arsen in den einzelnen Fraktionen

Die feste und die flüssigen Phasen nach Zentrifugieren werden mit Salpetersäure und Wasserstoffperoxid in der Mikrowelle aufschlossen. Die totalen Arsengehalte werden mit ICP-MS bestimmt. Man erhält die Arsen totalgehalte 1 bis 4 (Abbildung 34). Total Arsen 1 und 2 sind die As-Gehalte vor der Hydrolyse und Total Arsen 3 und 4 die Arsengehalt nach der Hydrolyse.

Tabelle 19: Arsengehaltsverteilung im Rohextrakt, der öligen Phase und des Feststoffes der extrahierten Dorschleber

Probenname	Einwaage	Behandlung	[As] (ICP-MS) [ng/ml]	[As] _{total} [µg/g]	Prozent [%]	Wiederfindu- ngsrate [%]
DDL (a)	0,200 g	MW	33	4,12	100	-
DDL (b)	0,201 g	MW	30	3,73		
methanolische und Ölschicht (a)	1 ml	MW	31	0,88	22,17	103,5
methanolische und Ölschicht (b)	1 ml	MW	30	0,86		
Feststoffschicht (a)	0,201 g	MW	25,2	3,13	81,32	
Feststoffschicht (b)	0,208 g	MW	27	3,25		

Hier bedeutet DDL die Kurzschreibung für Dosen-Dorschleber, MW ist die Kurzschreibung von Mikrowelle. Aus der Tabelle sieht man, dass die DDL 3,9 µg/g Arsen enthält. Im Feststoff sind nach

Extraktion noch große Mengen an Arsen (3,2 µg/g; 81,3%) enthalten. In der flüssigen Phase sind dagegen nur 0,87 µg As/g (22,2%) enthalten. Die Wiederfindungsrate ist mit 103,5% ein bisschen mehr als 100%. Aber unter Berücksichtigung der Fehlergrenze ist sie kleiner als 5%. Grund dafür könnten Fehler beim Probenaufschluss, bei der Messung oder Wägefehler sein.

Die hydrolysierten Proben wurden ebenfalls auf den As-Totalgehalt untersucht. Es wurden 100 µl eingenommen, und mit 5 ml Salpetersäure und 0,5 ml Wasserstoffperoxid in der Mikrowelle aufgeschlossen. Die Aufschlusslösungen wurden dann mit Wasser auf 25 ml aufgefüllt. Daraus errechnet man dann die totalen Arsengehalte.

Tabelle 20: Arsengesamtgehalte in Proben nach saurer und alkalischer Hydrolyse

Probenname	Hydrolyse	Einwaagen [µl]	Behandlung	As (ICP-MS) [ng/ml]	As-Gehalt in Hydrolyse [µg/g]
MeOH Schicht	NaOH	100	MW	3,5	1,1
MeOH Schicht	HCl	100	MW	2,8	0,9
Feststoff	NaOH	100	MW	3,3	1,6
Feststoff	HCl	100	MW	2,3	0,8
Ölschicht	NaOH	100	MW	4	2,3
Ölschicht	HCl	100	MW	3,9	2,2

Vergleicht man Tabelle 19 und Tabelle 20 kann man sehen, dass nach Hydrolysierung der totale Arsengehalt bei methanolische und Ölschichte mit dem vor der Hydrolyse übereinstimmt (Fehlerbereich $\pm 5\%$). Beim Feststoff werden weitere Arsenverbindungen extrahiert, die Hydrolyseprodukte sein sollten. Es gibt aber große Unterschiede zwischen der Hydrolyse mit NaOH (1,6 µg As/g) und HCl (0,8 µg As/g). Vielleicht wird die Metabolisierung der Arsenverbindung mehr unter alkalischen Bedingungen verbessert. Dies spiegelt sich allerdings nicht bei der Hydrolyse der Ölschicht wieder. Sowohl mit NaOH (2,3 µg As/g) als auch mit HCl (2,2 µg As/g) werden gleiche As-Gehalt gemessen. Diese Gehalte sind sehr hoch, so dass in der öligen Lösung noch unpolare Arsenverbindungen vorhanden sein sollten.

Dann quantifiziert man noch den totalen Arsengehalt aus der Summe der Arsenspezies nach Hydrolysierung durch Integration aller Arsenpeaks im ICP-MS Chromatogramm. Durch den Vergleich

der beiden Methoden kann man bestimmen, wieviel Arsen in Form der Arsenspezies chromatographiert werden können.

Tabelle 21: Quantifizierung des chromatographierbaren Anteils der Arsenspezies

Probenname	Hydrolysierung	Einwaagen [μ l]	As _{konz.} [μ g / l]	As-Gehalt [μ g/g]
Rohextrakt	-	100	897	1,0
Aufkonz. Rohextrakt	-	100	13468	1,4
MeOH Schicht	NaOH	100	1346	0,8
MeOH Schicht	HCl	100	1369	0,9
Feststoff	NaOH	100	682	1,3
Feststoff	HCl	100	654	1,4
Ölschicht	NaOH	100	1048	2,4
Ölschicht	HCl	100	1082	2,6

Beim Vergleich von Tabelle 20 und 21 kann man sehen, dass der Arsentotalgehalt nach Mikrowellenaufschluss mit der Summe der Arsenspezies übereinstimmt (Fehlerbereich $\pm 5\%$). Es gibt keinen großen Unterschied zwischen der Hydrolyse mit NaOH und HCl. Aber die Quantifizierung der Feststoffschicht nach saurer Hydrolyse mit Mikrowelle (0,8 μ g As/g) zeigt eine geringere Konzentration als die Quantifizierung über die Arsenspezies im ICP-MS Chromatogramm (1,4 μ g As/g). Für alle anderen Hydrolysate wurden gute Übereinstimmungen der Konzentrationswerte erhalten. Die Auswertung erfolgte mit dem retentionszeit-abhängigen Empfindlichkeitsfaktor Methode (Vergleich mit dem retentionszeit-unabhängigen Empfindlichkeitsfaktor Methode im Anhang 4 zu sehen). Um herauszufinden, welche Arsenspezies in den Extrakten und Hydrolysaten vorhanden sind, wurden danach alle Proben mit der Kopplungsmethode UHPLC-ICP-QQQMS / ESI-Q-TOFMS analysiert.

6.2.3 Identifizierung der Arsenspezies in Extrakten und Hydrolysaten

Die Analyse der Dorschleber Extrakten und Hydrolysate erfolgte mit derselben Methode, die bei den Algen zum Einsatz kam. Die erhaltenen Chromatogramme werden nach verschiedenen Aspekten betrachtet:

- I. Vergleich der Chromatogramme, erhalten durch verschiedene Hydrolysebedingungen mit NaOH bzw. HCl; (vgl. Abbildung 35, 36 und 37)

- II. Vergleich der Chromatogramme der drei Phasen (MeOH, Feststoff und Öl) in Abhängigkeit von den Hydrolysebedingungen; (vgl. Abbildung 38)
- III. Vergleich des Rohextraktes mit den hydrolysierten Proben. (vgl. Abbildung 39)

Aus diesen Vergleichen soll ersichtlich werden, in welcher Weise sich das Arsenspezies-Muster durch die alkalische bzw. saure Hydrolyse verändert und welche Arsenverbindungen durch diese Prozesse gebildet oder abgebaut werden.

6.2.3.1 Vergleiche der Chromatogramme unter alkalischen und sauren Bedingungen

In dem grün markierten Bereich sind die Arsenolipide anzutreffen. Der mit in blauen Line markierte Bereich ist der Retentionsbereich, wo As-PL anzutreffen sein sollten. Aus den Abbildung 35, 36 und 37 kann man sehen, dass bei alkalischen Bedingungen mehr Peaks als unter sauren Bedingungen zu sehen kann. Aus Abbildung 37 wird ersichtlich, dass nach alkalischer Hydrolyse noch zahlreiche Arsenolipide vorhanden sind, die im Falle der sauren Hydrolyse zu polaren Verbindungen abgebaut wurden, wie aus der Intensität des Peaks bei 0,5 min hervorgeht.

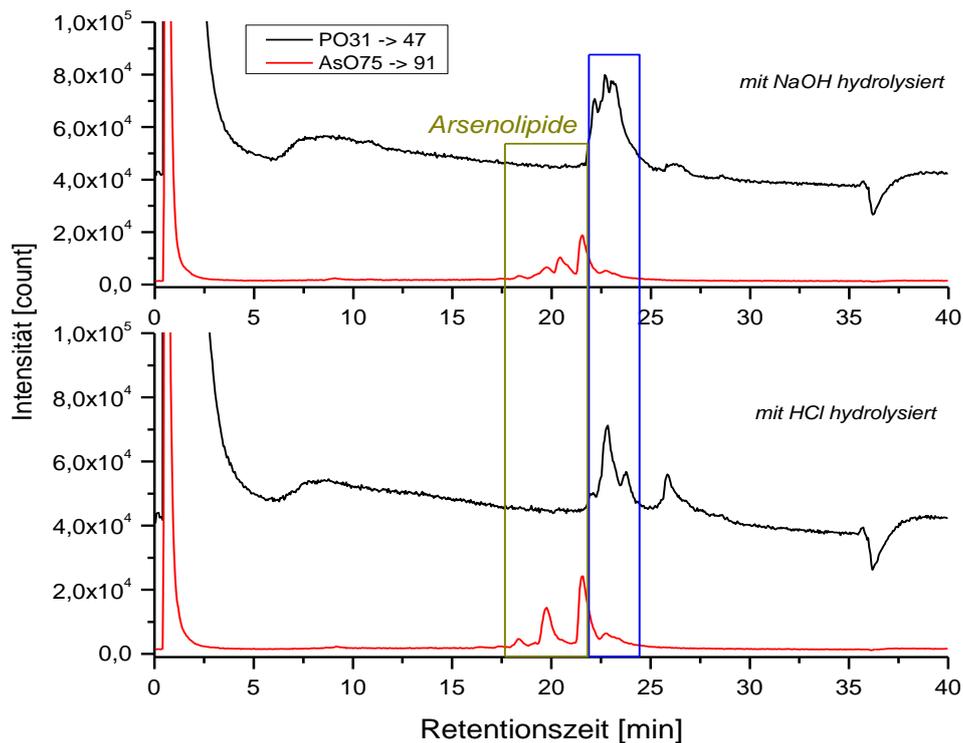


Abbildung 35: ICP-MS Chromatogramme der MeOH Schicht mit NaOH und HCl hydrolysiert

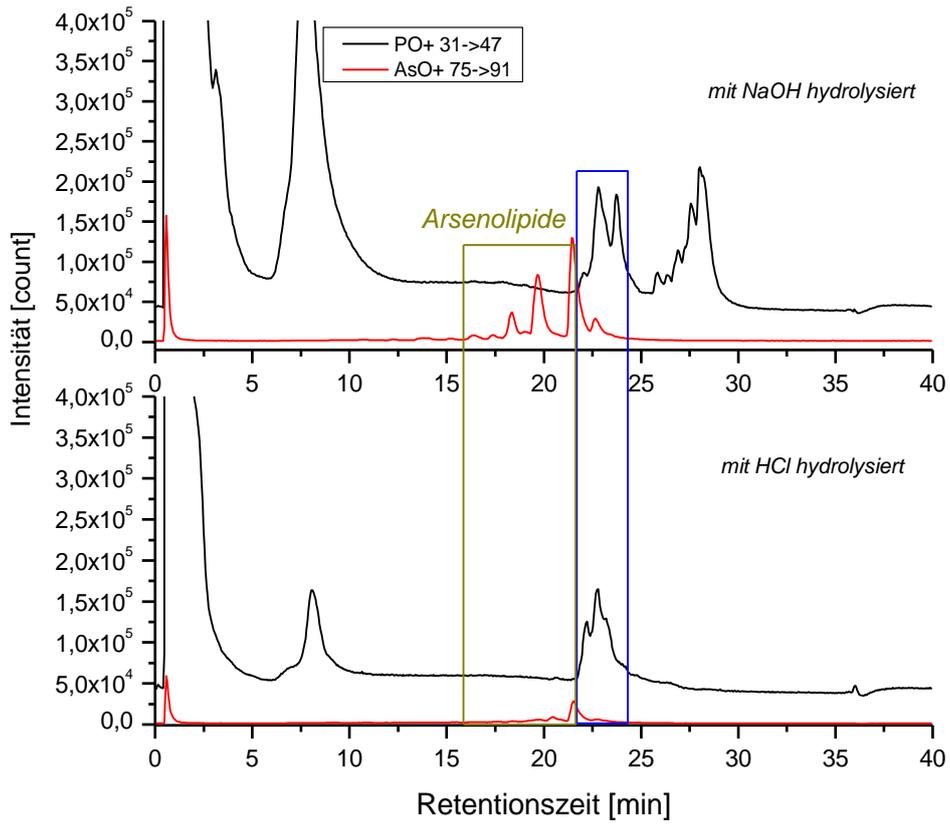


Abbildung 36: ICP-MS Chromatogramme des Feststoffs mit NaOH und HCl hydrolysiert

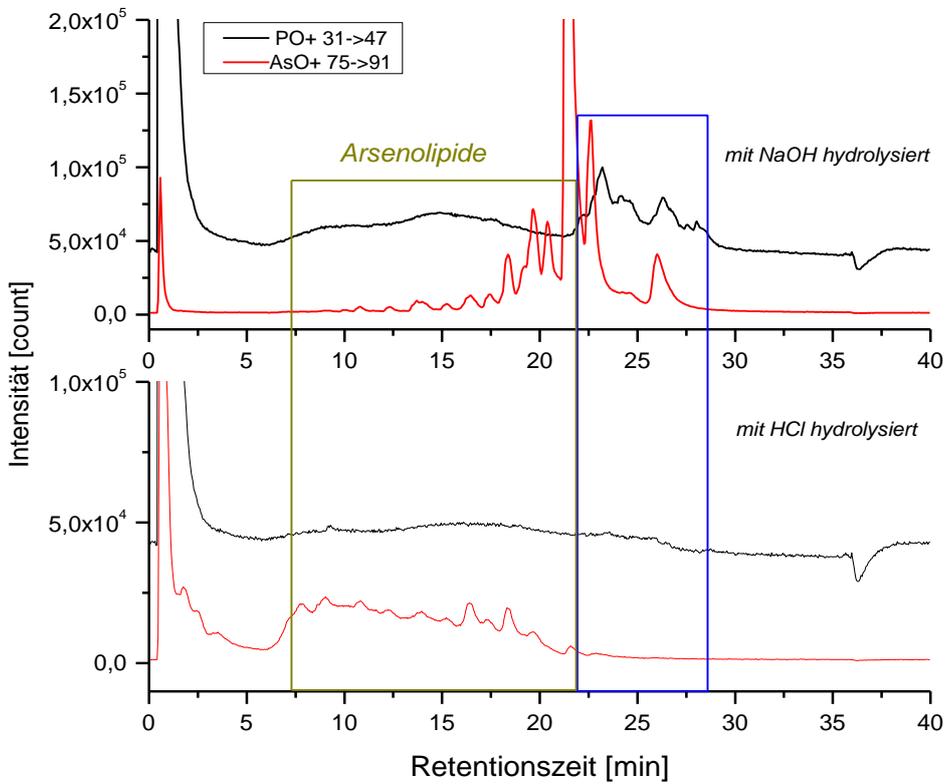


Abbildung 37: ICP-MS Chromatogramme der Ölschicht mit NaOH und HCl hydrolysiert

6.2.3.2 Vergleich der ICP-MS Chromatogramme der drei Phasen

Aus Abbildung 38 kann man erkennen, dass die Ölschicht mehr Arsenolipide enthält als die anderen Phasen. In der MeOH Phase kann man nur kleine Peaks im Retentionszeit-bereich von 17,5 bis 23,5 min sehen. Beim Feststoff-Hydrolysat kann man Arsenolipide bereits bei Retentionszeiten von 13min bis 25 min sehen und beim Öl-Hydrolysat bereits ab 10 min bis 29 min. Die genaue Struktur der Arsenolipide im Feststoff-Hydrolysat und der Ölschicht kann man im Anhang 6 sehen, die entsprechenden Arsenolipid-Strukturen werden im Anhang 5 aufgezeigt.

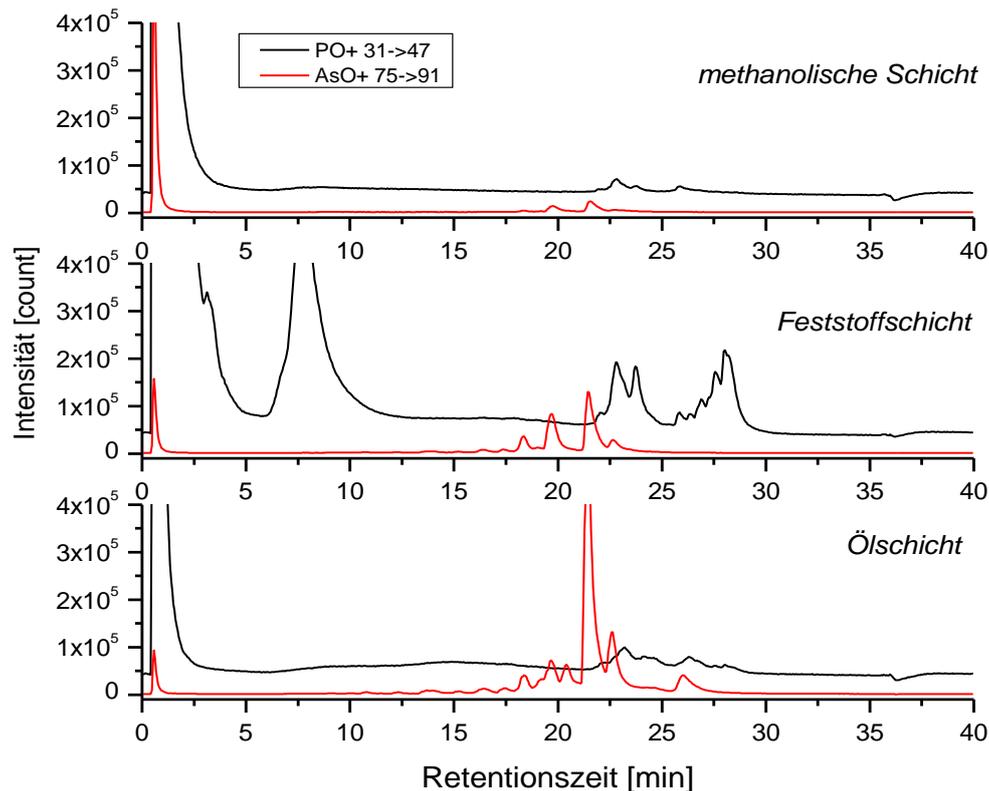


Abbildung 38: Vergleich der ICP-MS-Chromatogramme der drei Phasen nach alkalischer Hydrolyse

6.2.3.3 Vergleich der ICP-MS Chromatogramme der hydrolysierten Probe und des Rohextraktes

Vergleicht man die Chromatogramme der hydrolysierten Rohextrakte mit dem aufkonzentrierten Rohextrakt so kann man sehen, dass sich die Arsenspezies-Muster unterscheiden. Aus dem ICP-QQQMS Chromatogramm des aufkonzentrierten Rohextraktes kann man sehen, dass mögliche AsPL im Zeitbereich von 21min bis 27min (mit blauer Linie eingerahmt) durch die überlappenden Peaks von As und P auftreten könnten. Die Peaks des hydrolysierten Rohextraktes wurden nach kürzeren Retentionszeiten verschoben. Das heißt, dass vielleicht nach der Hydrolyse mehr polare Arsenverbindungen entstanden sind. Um die neuen Verbindungen zu identifizieren, wurde nach der genauen Masse bei gleichen Retentionszeiten im Chromatogramm der ESI-Q-TOFMS (mit Zeitverspätung -0,06min) gesucht und eine mögliche Struktur dieser gesuchten Masse modelliert.

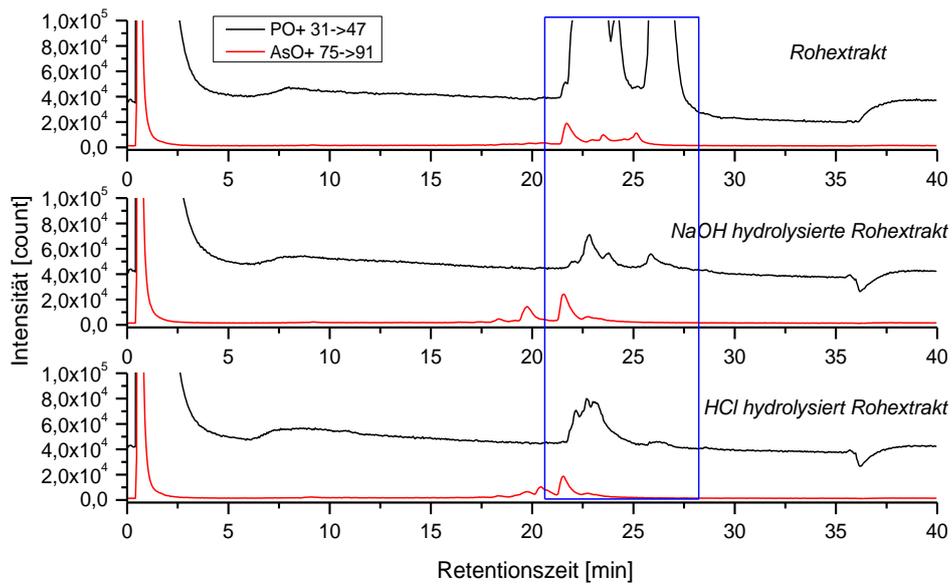


Abbildung 39: ICP-MS-Chromatogramme des hydrolysierten Rohextraktes und des aufkonzentrierten Rohextrakt

6.2.4 Identifizierung eines möglichen As-PL im aufkonzentrierten Rohextrakt

Bei einer Retentionszeit von 26,359 min findet man einen Peak mit $[M+H]^+$ Masse 808,4832. Bezogen auf die Struktur der Phosphorlipide (Anhang 7) modelliert man die mögliche Struktur, wie sie in Abbildung 41 dargestellt ist. Um die mögliche Struktur genauer zu bestimmen, macht man danach von der Masse $m/z=808,4834$ eine MS/MS Fragmentierung mit ESI-Q-TOFMS. Im Massenspektrum kann man nach spezifischen Fragmenten der Struktur suchen und bestimmen, ob die Struktur richtig ist. Tabelle 22 zeigt die eingestellten Parameter von ESI-Q-TOFMS im MS/MS Modus.

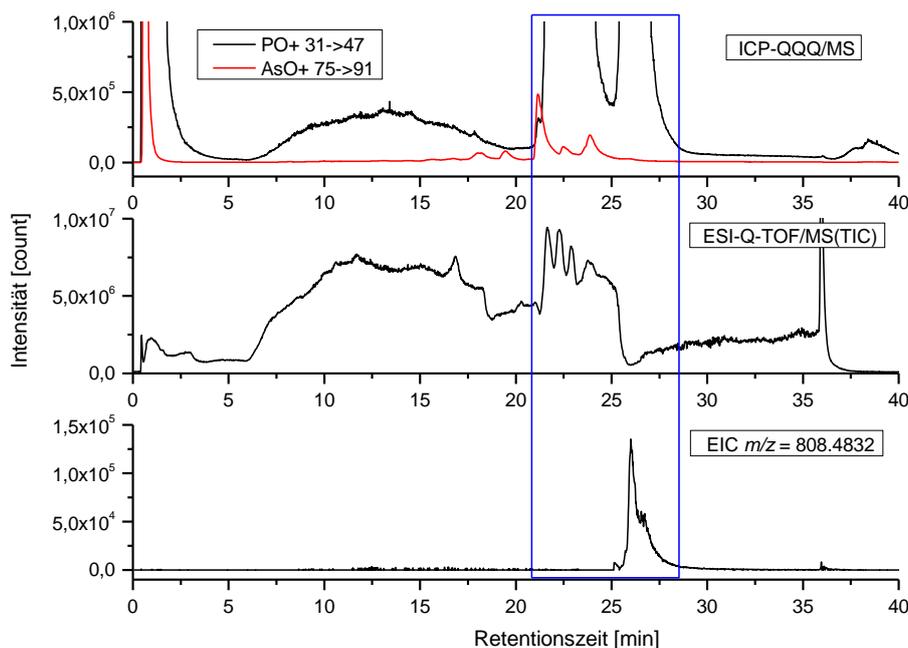
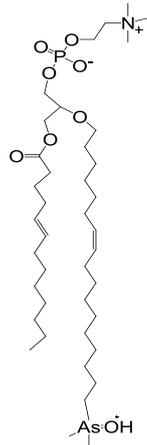


Abbildung 40: ICP-MS und ESI-MS Chromatogramme mit möglichem AsPL Peak



Chemical Formula: $C_{40}H_{80}AsNO_8P^+$
Exact Mass: 808.4832

Abbildung 41: Strukturvorschlag für die m/z Masse 808.4832

Tabelle 22 zeigt die eingestellten Parameter von ESI-Q-TOFMS im MS/MS Modus.

Tabelle 22: Parameter des MS/MS Modus bei ESI-Q-TOFMS

Modul	MS/MS Segment
Polarität	Positiv
Masse Range [m/z]	Minimal: 100; Maximal: 1000
Kollision Energie [V]	30
Retentionszeit [min]	26,359
Delta Ret. Zeit [min]	2
Akquisition Zeit [ms / Spektrum]	1000

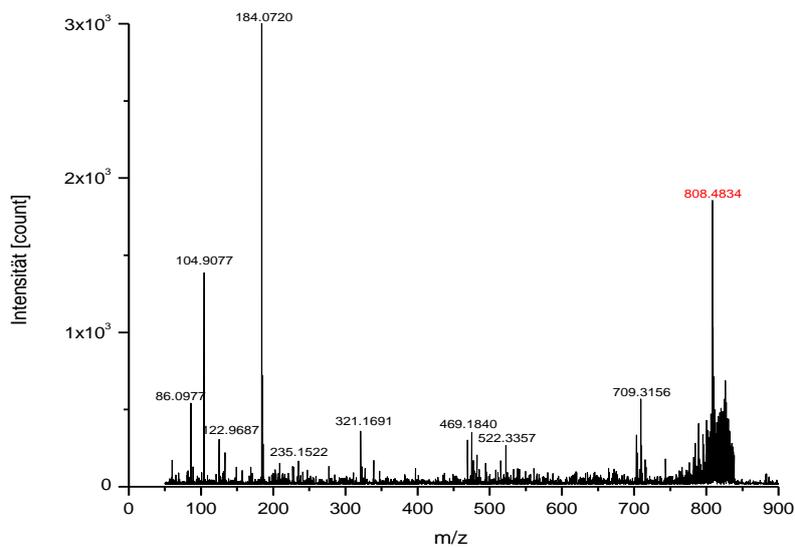


Abbildung 42: Fragmente von m/z 808.4834 nach MS/MS

Das ermittelte Arsenophospholipid und die entsprechend dem MS/MS-Massenspektrum aufgetretenen Fragmente werden in Abbildung 43 gezeigt.

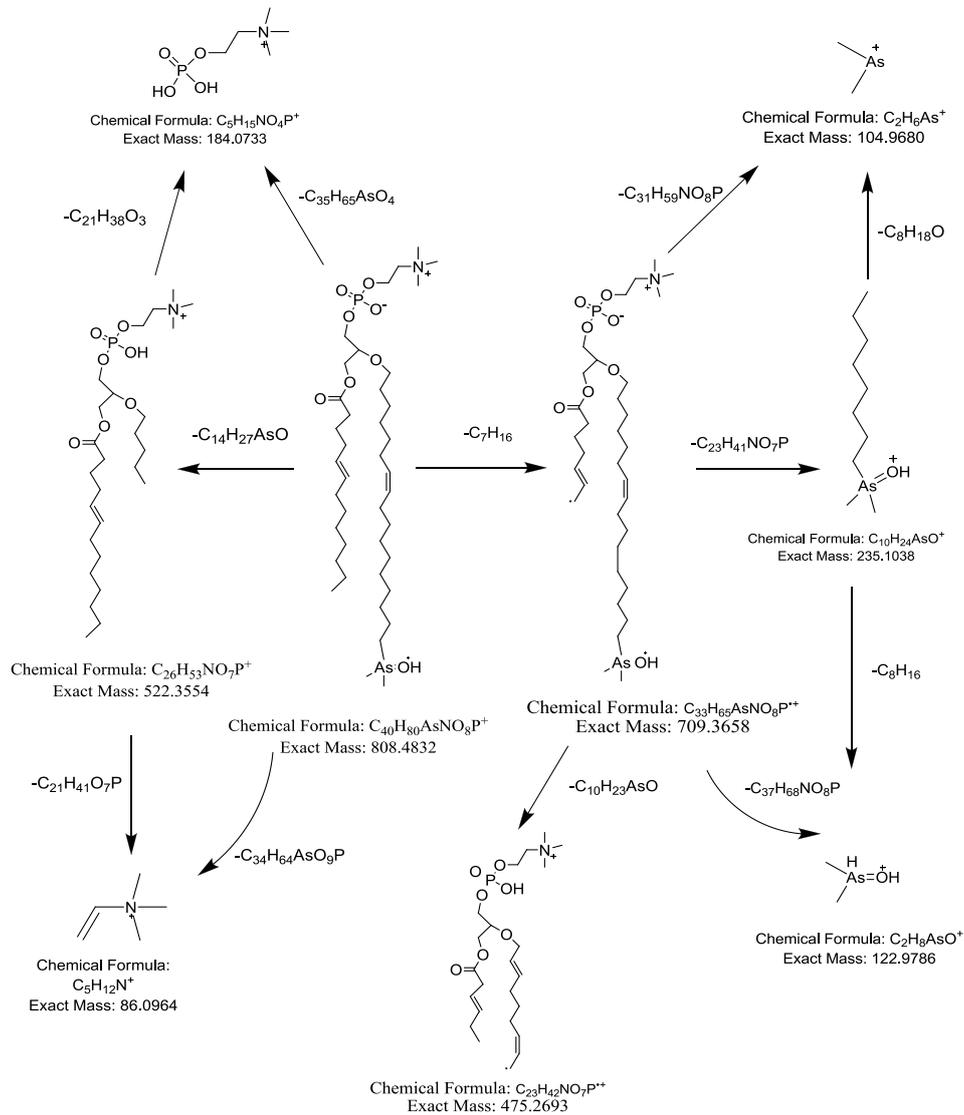


Abbildung 43: Fragmentierungsschema der $m/z=808,4832$

Nach der Abspaltung von $C_{14}H_{27}AsO$ (nicht nachgewiesen) kann ein Fragment $m/z=522,3554$ gebildet werden. Fragment mit $m/z=235,1038$ würde sich aus der Abspaltung von $C_{29}H_{54}NO_8P$ bilden. Das typische Kopfgruppenfragment von zellmembran-bildenden Phospholipiden mit $m/z=184,0720$ konnte ebenfalls nachgewiesen werden (Anhang 7). Das Fragment mit $m/z=122,9786$ ist charakteristisch für Dimethylarsinoyl Gruppe und $m/z=104,9680$ ist charakteristisch für Dimethylarsinyl Gruppe.

Von den entsprechenden Fragmenten kann man sagen, dass die neue gefundene Struktur mit $m/z=808,4832$ ein mögliches Arsenophospholipid ist. Die genaue Position der Doppelbindungen kann mit dieser Methode nicht bestimmt werden.

7. ZUSAMMENFASSUNG

Zur Untersuchung von Arsenolipiden und Arsenophospholipiden in Algen und Dorschleber wurden zuerst die Parameter des ICP-QQQMS mit phosphorhaltigen, schwefelhaltigen und arsenhaltigen Standardverbindungen optimiert. Dabei wurde der Einfluss vom Option-Gasflusses und Carrier-Gasflusses auf die Empfindlichkeit untersucht. Als weiterer wichtiger Parameter wurde der Sauerstoffgehalt, verwendet als Reaktionsgas in der Reaktions-/Kollisionszelle (RKZ), auch untersucht und optimiert und ca. 0,33 ml/min (30%) als effektive Flussmenge ausgewählt. Außer der Optimierung der Parameter vom ICP-QQQMS wurden auch andere mögliche Einflussgrößen verglichen, z.B. Eluentlösung der UHPLC. Zur Beurteilung des Einflusses des Methanolgehaltes der Eluentlösung auf die Signalgröße wurden verschiedene Methoden eingesetzt: Batchverfahren und Fließinjektionsverfahren (FIA). Im Batchverfahren wurde eine Abnahme der Signalintensität mit Erhöhung des Methanolanteils in der Analysenlösung beobachtet. Im Falle der FIA stieg die Signalintensität bis ca. 35% Methanol an und fiel dann bis 70% wieder etwas ab. Dieses Verhalten wurde auch in der HPLC mit Gradientenelution mit Methanol beobachtet. Um die Methanolkonzentration während der ICP-MS Detektion konstant zu halten, wurde eine zweite HPLC eingesetzt und diese mit umgekehrtem Gradienten betrieben. Damit wurde erreicht, dass ein Methanolgehalt zwischen 30 und 40% vorhanden ist, der eine hohe und retentionszeit-unabhängige Empfindlichkeit ermöglicht. Um die Nachweisgrenze und Bestimmungsgrenze zu bestimmen, wurde in zwei Mobilphasen mit 0% und 40% MeOH mit jeweils einer Konzentrationsreihe von 5, 10, 25, 50, 100 und 200 ppb (bezogen auf die Elemente) kalibriert. Für Phosphor wurde eine LOD = 6 µg/l, LOQ = 17 µg/l (0% MeOH), und eine LOD = 1 µg/l und LOQ = 4 µg/l (40% MeOH) ermittelt. Für Schwefel werden ähnliche LOD's und LOQ's gefunden. Für Arsen wurden ein LOD bei 40% MeOH von 0,54 µg/l und LOQ 1,63 µg/l bestimmt.

Mit der optimierten Methode wurden danach Algen und Dosen-Dorschleber-Proben auf mögliche Arseno(phospho)lipide mit Hilfe der Kopplung UHPLC mit paralleler ICP-QQQMS und ESI-Q-TOFMS untersucht. Bei der Analyse der Dorschleber wurden der methanolische Extrakt, eine ölige Lösung und der abzentrifugierte Feststoff auf den Arsentotalgehalt untersucht. Eine Elementspeziation wurde sowohl vom Extrakt als auch von den jeweiligen Phasen nach chemischer Hydrolyse mit Natronlauge und Salzsäure durchgeführt. Es hat sich gezeigt, dass der Extrakt nur etwa 20% des Arsentotalgehaltes der Dorschleber enthält. Die anderen 80% verblieben in der öligen Phase und im Feststoff. Nach chemischer Hydrolyse konnten in den Hydrolyselösungen beachtliche Arsengehalte analysiert und Arsenolipide chromatographiert werden.

Im Überblick kann festgestellt werden, dass

I) Die ICP-MS mit MS/MS Technologie eine vergleichbare Empfindlichkeit zu früheren ICP-MS Systemen hat, aber eine bessere Selektivität. Der Methanolgehalt in der Eluentlösung hat Einfluss auf die Empfindlichkeit. Bei 40% Methanol ist die Empfindlichkeit 6-fach höher als die Empfindlichkeit bei 0% Methanol.

II) Phosphor, Schwefel und Arsen als bekannte Elemente in biologischen Systemen wurden eingesetzt, um optimale Detektionsbedingungen durch Instrumentenoptimierung zu erzielen und die analytischen Parameter nach Kalibrierung zu ermitteln. Sie sind wichtige zusätzliche Elementinformationen, um den Metabolismus-Prozess unbekannter heteroorganischer Verbindungen zu verfolgen und zu charakterisieren.

III) In der Meeresumwelt findet man z.B. Arsenozucker in Meerespflanzen wie Algen und in Meerestieren wie im Hering oder Dorsch kommen ebenfalls organische Arsenverbindungen vor. Sie werden aus Arsenat, das sich in geringen Konzentrationen im Meerwasser befindet, gebildet und gelangen über die Nahrungskette der Meerespflanzen und Meerestiere in den Organismus. Sie sind weniger toxisch (z.B. Arsenobetain) als anorganische Arsenverbindungen.

IV) Die Hydrolysierung der Extraktproben mit Natronlauge und Salzsäure führt zu einer weiteren Freisetzung von arsenorganischen Verbindungen.

V) Mithilfe einer Kombination von methanolischer Extraktion der Dorschleber und der Aufkonzentrierung des Rohextraktes konnte ein bisher unbekanntes Arsenophospholipide identifiziert werden. Es handelt sich dabei um eine phospholipide-ähnliche Struktur mit der Formel $C_{40}H_{79}AsNO_8P$ ($[M+H]^+$ $m/z=808,4832$). Anhand der MS/MS - Daten konnte gezeigt werden, dass die Produkt-Ionen $m/z=122,97$ ($(CH_3)_2AsOH_2^+$), $m/z=104,96$ ($(CH_3)_2As^+$) die bekannten Fragmente für Arsenolipide zeigen und $m/z=184,0720$ ($(CH_3)_3NCH_2PO_4^+$) charakteristisch für eine Kopfgruppe (Cholin) der Phospholipide ist.

Weitere Untersuchungen mit verbesserter Empfindlichkeit sollten durchgeführt werden, um weitere Arseno(phospho)lipide zu finden und deren Struktur weiter abzusichern. Ebenfalls sind effektivere Extraktionsmethoden zu erarbeiten.

Literatur

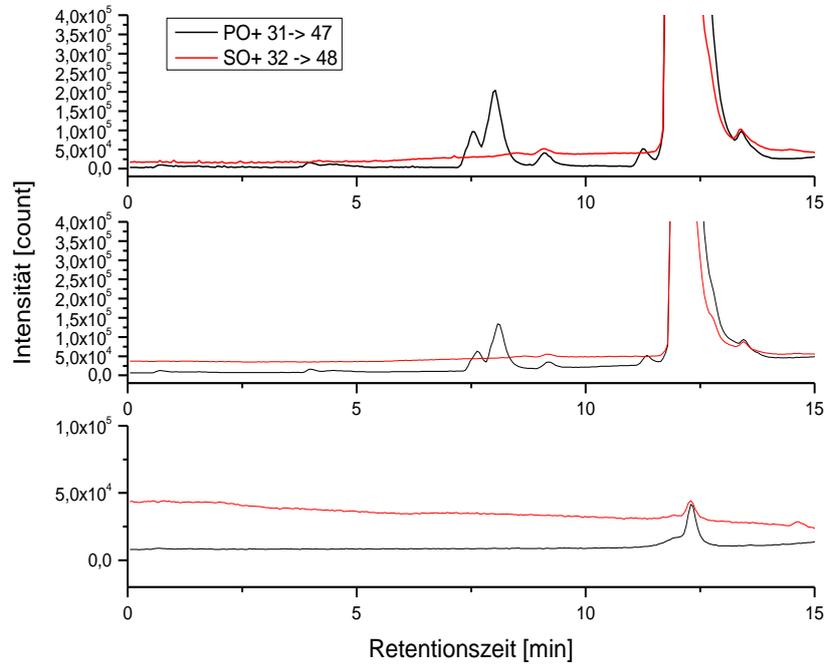
1. Emmett Siffey, Bert Woods and Steve Wilbur
Analysis of silicon, phosphorus and sulfur in 20% methanol using the Agilent 8800 triple Quadrupole ICP-MS. *J. Chromatogr. A.* 86, (2012), 7969-7977.
2. D. Pröfrock, A. Prange
Inductively Coupled Plasm-Mass Spectrometry (ICP-MS) for Quantitative Analysis in Enviromental and Life Sciences: A Review of Challenges, Solutions, and Trends. *Applied Spectroscopy.* 66, (2012), 843-868.
3. <http://flexikon.doccheck.com/de/Phospholipid>
4. R. Singh. Simultaneous Determination of Fenamiphos, its Sulphoxide and Sulphone in Water by High Performance Liquid Chromatography. *Analyst.* 114, (1989), 425-427.
5. Qingxiang Zhou, Huahua Bai, Guohong Xie, Junping Xiao
Trace determination of organophosphorous pestizides in environmental samples by temperature-controlled ionic liquid dispersive liquid-phase microextraction. *J. Chromatogr. A.* 1188, (2008), 148-153.
6. <http://www.accensi.com.au/MSDS-files-05-10/Country%20Fenamiphos%20400.pdf>
7. <http://www.rayfull.com/UploadFiles/PDF/201369102243.pdf>
8. http://www.coopersanimalhealth.com.au/msds/sp/TIXAFly_29101641.pdf
9. <http://de.wikipedia.org/wiki/arsen>
10. G. Lunde. The analysis of arsenic in the lipide phase fopm marine and limnetic algae. *Acta Chem. Scand.* 26, (1972), 2642-4644.
11. G. Sommerfeld, A. Kliemant
Monitoring der Hintergrundbelastung ausgewählter Lebensmittel mit Dioxinen und PCB. *D. Lebensmittelsicherheit.* 5, (2006), 1-8.
12. V. M. Dembitsky, D. O. Levitsky
Arsenolipids. *Progress in lipid research.* 43, (2004), 414-448.
13. G. Grindlay, L. Gras, J. Mora, M.T.C de Loos-Vollebregt
Carbon-related matrix effects in inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy.* 63, (2008), 234-243.
14. A. Rumpler, J. S. Edmonds, M. Katsu, K. B. Jensen, W.r Goessler, G. Raber, H. Gunnlaugsdottir, and K. A. Francesconi
Arsen-Containing Long-Chain Fatty Acids in Cod-Liver Oil: a result of biosynthetic idenity. *Angewandte Chemie.* 47, (2008), 2665-2667.
15. Kevin A. Francesconi
Arsenic species in seafood: Origin and human health implication. *Pure and Applied*

- Chemistry. 82, (2010), 376-381.
16. M. Jose Ruiz- , M. S. Taleshi, W. Goessler and K. A. Francesoni
A method for screening arsenolipids in fish oils by HPLC-ICPMS. *J. Anal. At. Spectrom.* 27, (2012), 502-504.
 17. K. Böting, S. Treu, P. Leonhard, C. Heiß
First experimental proof of asymmetric charge transfer in ICP-MS/MS (ICP-QQQMS) through isotopically enriched oxygen as cell gas. *J. Anal. At. Spectrom.* 29, (2014), 578-582.
 18. G. Grindlay, J. Mora, M. de Loos-Vollebregt, F. Vanhaecke
A systematic study on the influence of carbon on the behavior of hard-to-ionize elements in inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy.* 86, (2013), 42-49.
 19. C. Agatemor, D. Beauchemin
Matrix effects inductively coupled plasma mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 706, (2011), 66-83.
 20. Agilent 7900 ICP-MS Techniques and Operations, Course Number R3925A. (2014), 1-204
 21. Agilent 8800 Triple Quadrupole ICP-MS, technology Transformed performance Redefined. (2014), 8-10
 22. K. A. Zemski Berry, R. C. Murphy
Electrospray Ionisation Tandem Mass Spectrometry of Glycerophosphoethanolamine Plasmalogen Phospholipide. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 4, (2004), 1044-0305.
 23. Xia Ping, (HS-Merseburg) Bachelorarbeit. (2013), 22-28.
 24. B. Bisle. *Das Membranproteom halophiler Archaea-Identifizierung und Quantifizierung.* Diss. Imu, (2007).
 25. K. S. Booksh, B. R. Kowalski. Theory of analytical chemistry [J]. *Analytical Chemistry.* 66(15), (1994), 782A-791A.
 26. C. J. Smith, I. D. Wilson, L. Weidolf, F. Abou-Shaka, M. Thomsen
Enhanced Detection of Sulphur and Phosphorous Containing Compounds in HPLC-Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry Using Chemical Resolution via hexapole Based Reaction with Oxygen. *Chromatographia.* 59, (2004), 165-170.
 27. N. Adhikari, N. Sinha N, R. Narayan RD. K. Saxena.
Lead-induced cell death in testes of young rats. *J. Appl. Toxicol.* 21, (2001), 275–277.
 28. R. Millot, C.J. Allegre, J. Gaillardet and S. Roy
Lead isotopic systematics of major river sediments: a new estimate of the Pb isotopic composition of the Upper Continental Crust *Chemical Geology.* 203, (2004), 75-90.

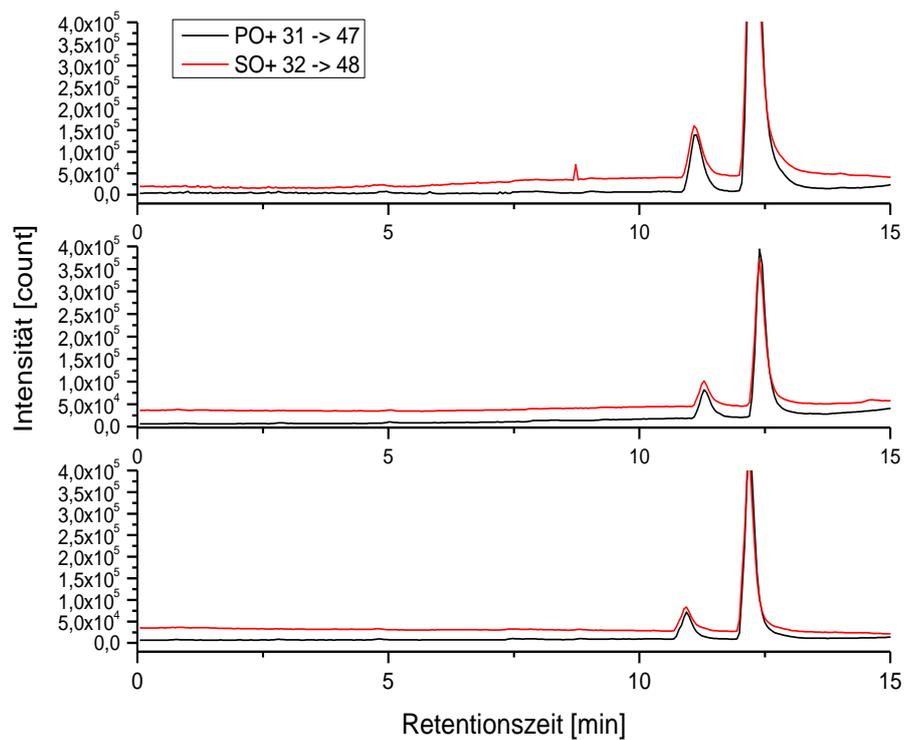
29. A. Raab, C. Newcombe, D. Pitton, R. Ebel, and J. Feldmann
Comprehensive Analysis of Lipophilic Arsenic Species in a Brown Alga (*Saccharia Latissima*).
Anal. Chem. 85, (2013), 2817-2824.
30. A. D. Madsen, W. Goessler, S. N. Pedersen and K. A. Francesconi
Characterization of an algal extract by HPLC-ICP-MS and IC-electrospray MS for use in
arsenosugar speciation studies. *J. Anal. At. Spectrom.* 15, (2000), 657-662.
31. P. Fecher, A. Raab and J. Feldmann
Determination of Arsenic in Algae - Results of an Interlaboratory Trial: Determination of
Arsenic Species in the Water-Soluble Fraction. *Microchimica Acta.* 151, (2005), 156-166.
32. S. Lischka, U. Arroyo-Abad, J. Mattusch, A. Kühn, Ch. Piechotta
The high diversity of arsenolipids in herring fillet (*Clupea harengus*). *Talanta.* 110, (2013),
117-152.

Anhang 1

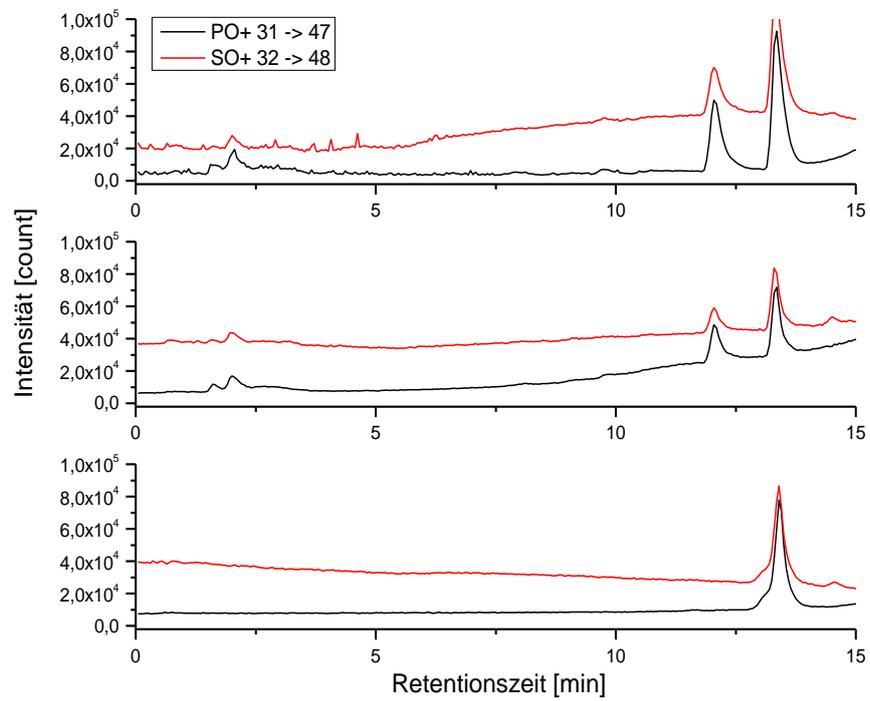
- Fenamiphos mit 1 UHPLC Gradientverfahren (ober), 2 UHPLC Gegengradient (mittel) und 2 UHPLC isokraftische Gradient (unter)



- Fenthion mit 1 UHPLC Gradientverfahren (ober), 2 UHPLC Gegengradient (mittel) und 2 UHPLC isokraftische Gradient (unter)



- Ethion mit 1 UHPLC Gradientverfahren (ober), 2 UHPLC Gegengradient (mittel) und 2 UHPLC isokraftische Gradient (unter)

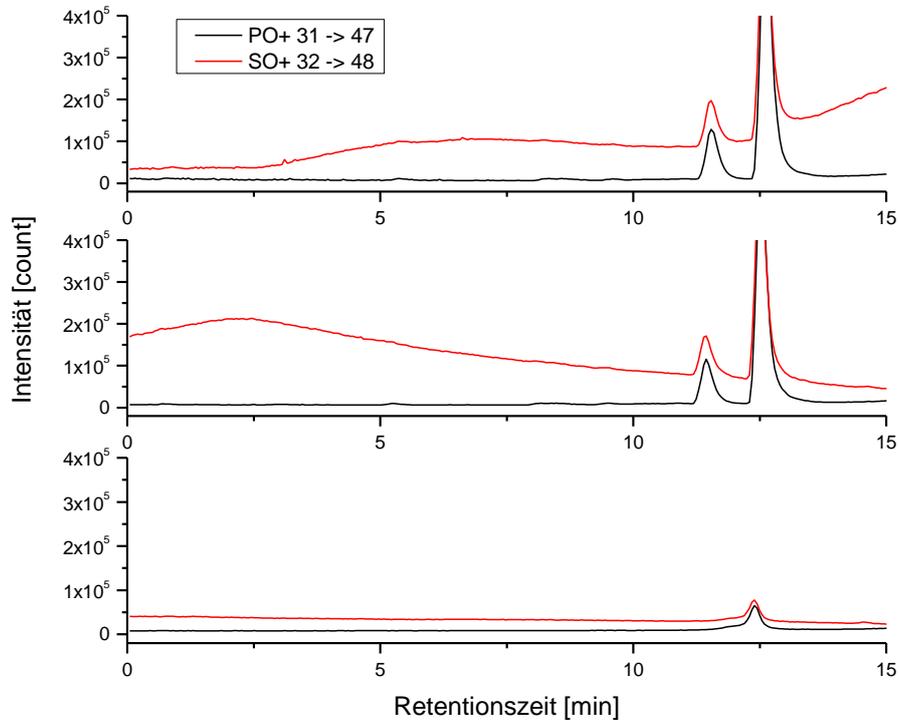


Vergleich die drei Stoffe ist die Signalthöhe mit 1 UHPLC Gradientverfahren am besten.

Anhang 2

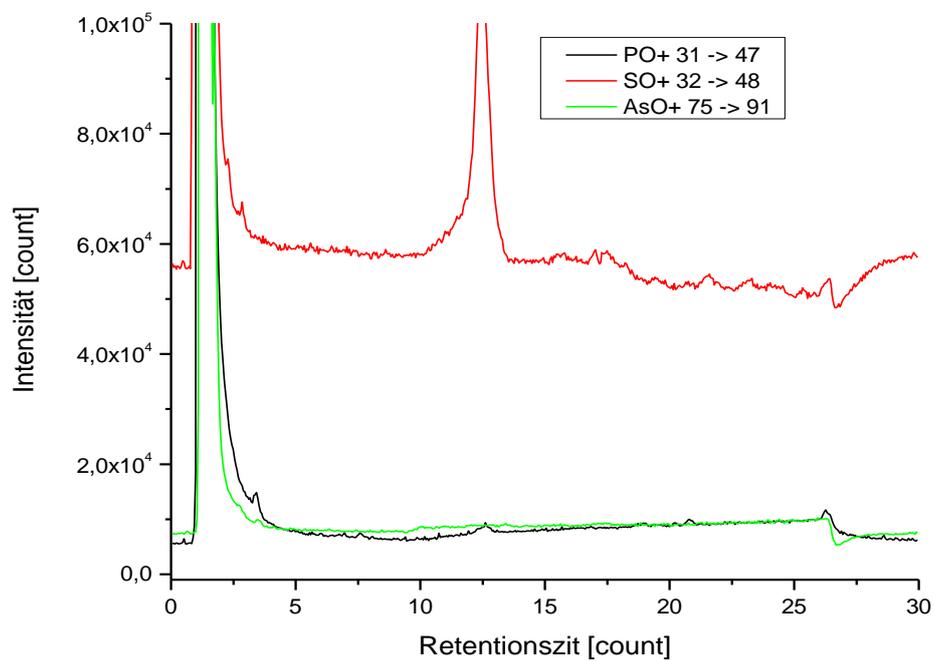
Vergleich Fenthion mit isokraftische Gradienten mit zweiter UHPLC verschiedene Fließgeschwindigkeit

50 $\mu\text{l}/\text{min}$ (ober), 100 $\mu\text{l}/\text{min}$ (mittel), 250 $\mu\text{l}/\text{min}$ (unter)

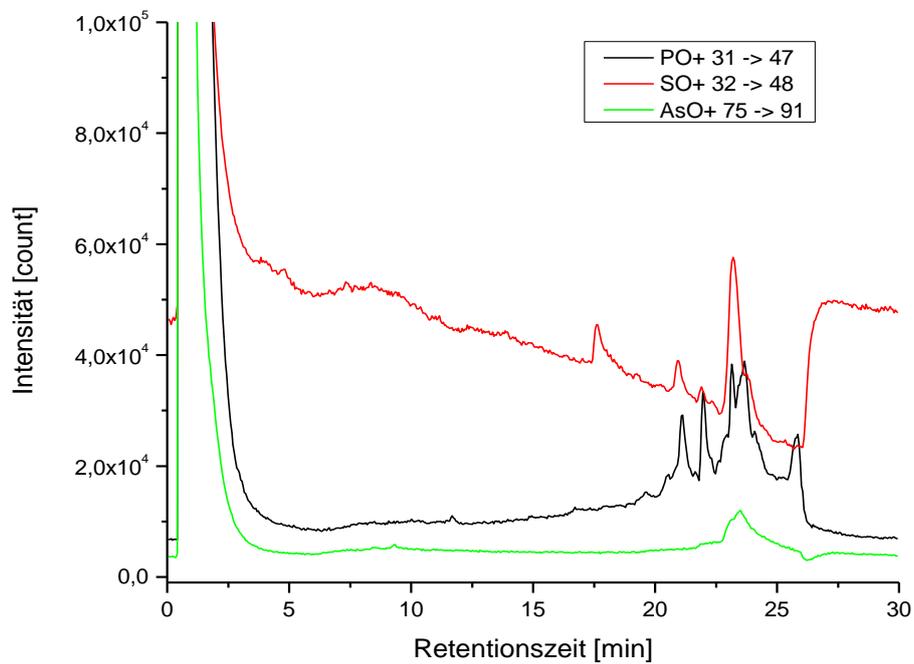


Anhang 3

- Probentrennung mit Poroshell Säule



- Probentrennung mit Zorbax Säule



Anhang 4

- Gradiententabelle für Detektion der Standardproben

Zeit [min]	A [%]	B [%]	Geschwindigkeit [ml/min]	Druck [bar]
0	100	0	0,8	1100
10	30	70	0,8	1100
10,1	100	0	0,8	1100
12	100	0	0,8	1100

- Methanolanteil bei Batchverfahren

Nr.	Standardprobe [ml]	MeOH [ml]	H ₂ O [ml]	Summe [ml]
1	1	0	9	10
2	1	2	7	10
3	1	4	5	10
4	1	6	3	10
5	1	8	1	10

- Methanolanteil bei FIA

MeOH Anteil [%]	Eluent A [%]	Eluent B [%]	Zeit [min]
0	100	0	0-2
10	90	10	0-2
20	80	20	0-2
30	70	30	0-2
40	60	40	0-2
50	50	50	0-2
60	40	60	0-2
70	30	70	0-2

- Gradiententabelle für Algen und Dose-Dorschleber

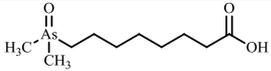
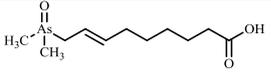
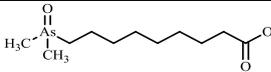
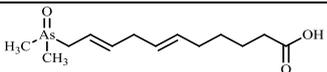
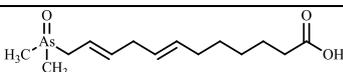
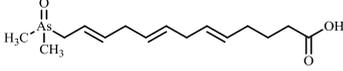
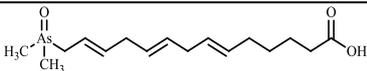
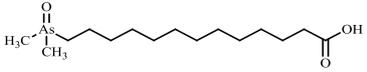
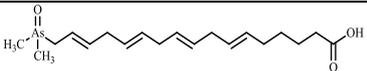
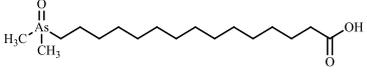
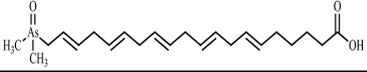
Zeit [min]	A [%]	B [%]	Geschwindigkeit [ml/min]	Druck [bar]
0,00	1	99	0,8	1100
5,00	1	99	0,8	1100
25,00	99	1	0,8	1100
35,00	99	1	0,8	1100
35,10	1	99	0,8	1100
40,00	1	99	0,8	1100

- Vergleich die Arsentotalgehalt nach Hydrolysisierung mit retentionszeit-abhängige Empfindlichkeitsfaktor Methode und retentionszeit-unabhängige Empfindlichkeitsfaktor Methode

	Hydrolysisierung	Chromatogramm Quantifizierung		Mikrowellen Quantifizierung
		Faktor=1	Faktor=3	-
		As total [µg/g]	As total [µg/g]	As total [µg/g]
DL_Rohextrakt	-	1,1	1,0	0,9
DL-methanolische Schichte	NaOH	0,9	0,8	1,1
DL-methanolische Schichte	HCl	0,9	0,9	0,9
DL-Feststoffschichte	NaOH	2,4	1,3	1,5
DL-Feststoffschichte	HCl	3,2	1,5	0,8
DL-Ölschichte	NaOH	4,0	2,4	2,3
DL-Ölschichte	HCl	3,7	2,5	2,2
DL-aufkonz. Rohextrakt		1,2	1,2	-

Anhang 5

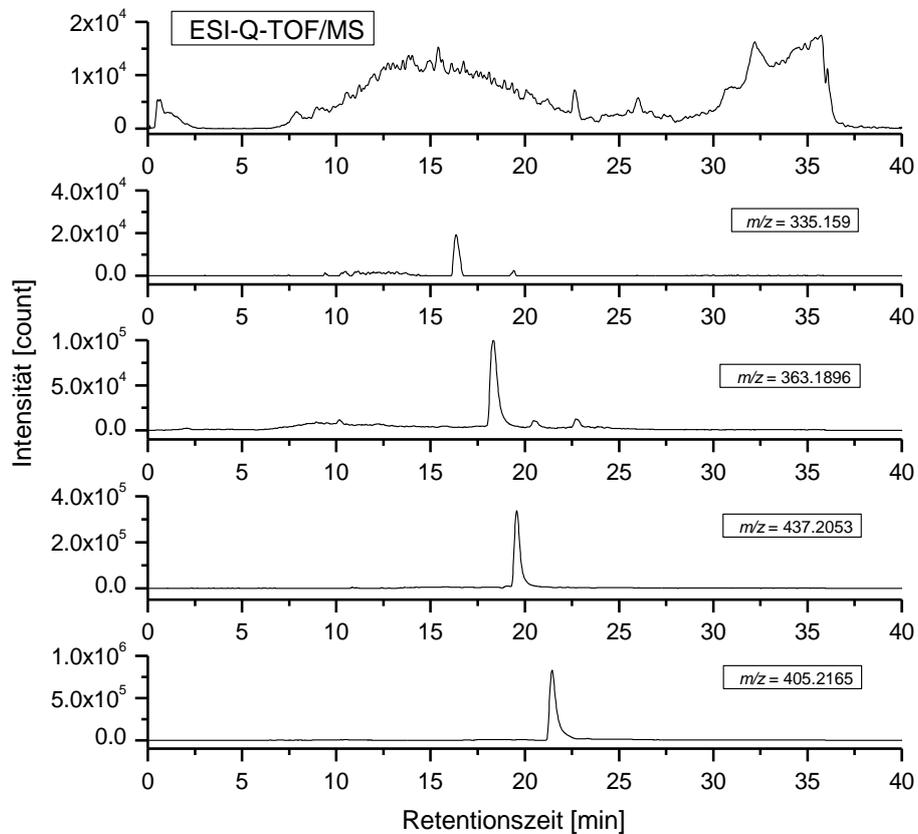
Extrakte Masse und Struktur von ESI/MS in UFZ gefunden werden.

Peak	RT	Ion Formula	Proposed structure	m/z_{exper}	m/z_{calc}	$\Delta m/z$ (ppm)
1	13.9	$C_{10}H_{22}AsO_3$		265.0769	265.0779	-3.8
2	15.7	$C_{11}H_{22}AsO_3$		277.0774	277.0779	-1.8
3	17.4	$C_{11}H_{24}AsO_3$		279.0934	279.0936	-0.7
4	20.9	$C_{13}H_{24}AsO_3$		303.0935	303.0936	-0.3
5	23.3	$C_{14}H_{26}AsO_3$		317.1086	317.1092	-1.9
6	24.3	$C_{15}H_{26}AsO_3$		329.1078	329.1092	-4.3
7	26.7	$C_{16}H_{28}AsO_3$		343.1236	343.1249	-3.8
8	29.3	$C_{15}H_{32}AsO_3$		335.1566	335.1562	1.2
9	30.9	$C_{19}H_{32}AsO_3$		383.1552	383.1562	-2.6
10	33.2	$C_{17}H_{36}AsO_3$		363.1892	363.1875	4.7
11	34.2	$C_{22}H_{36}AsO_3$		423.1880	423.1875	1.2

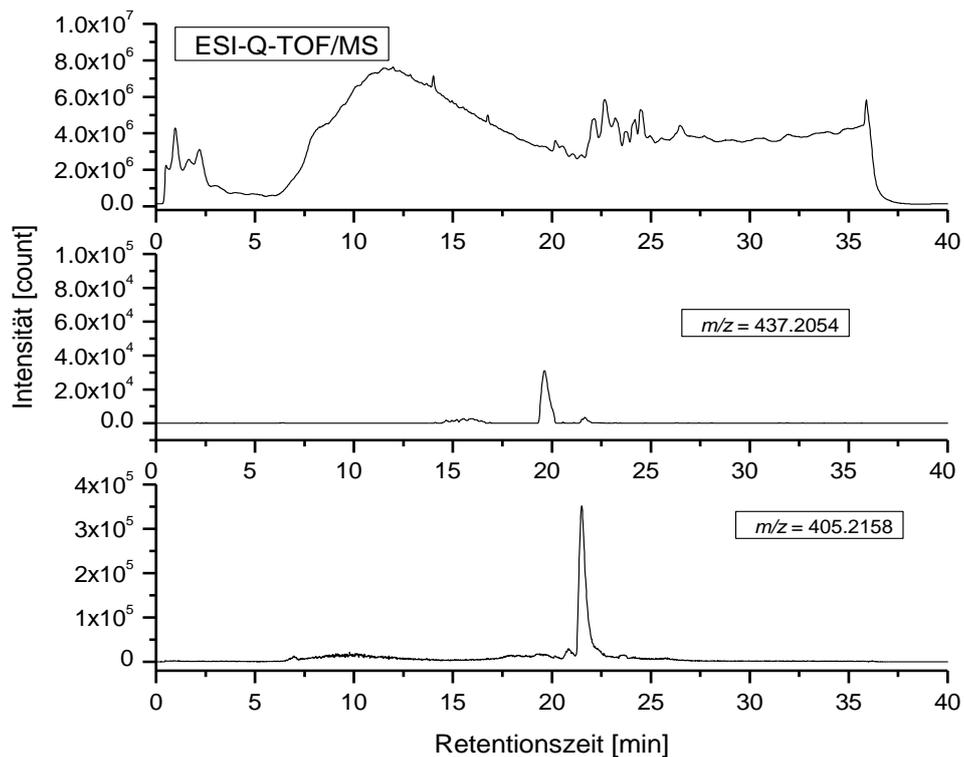
12	34.6	C ₁₉ H ₃₈ AsO ₃		389.2036	389.2031	1.3
13	35.5	C ₂₃ H ₃₈ AsO ₃		437.2027	437.2031	-0.9
14	35.6	C ₂₄ H ₃₈ AsO ₃		449.2024	449.2031	-1.6
15	36.5	C ₁₉ H ₄₀ AsO ₃		391.2195	391.2188	1.8
16	37.0	C ₂₅ H ₄₀ AsO ₃		463.2172	463.2188	-3.5
17	38.7	C ₂₃ H ₃₆ AsO		403.1963	403.1977	-3.5
18	39.6	C ₂₃ H ₃₈ AsO		405.2131	405.2133	-0.5
19	40.1	C ₁₇ H ₃₈ AsO		333.2136	333.2133	0.9
20	42.3	C ₁₉ H ₄₂ AsO		361.2438	361.2446	-2.2
21	46.1	C ₃₁ H ₄₈ AsO		511.2940	511.2916	4.7

Anhang 6

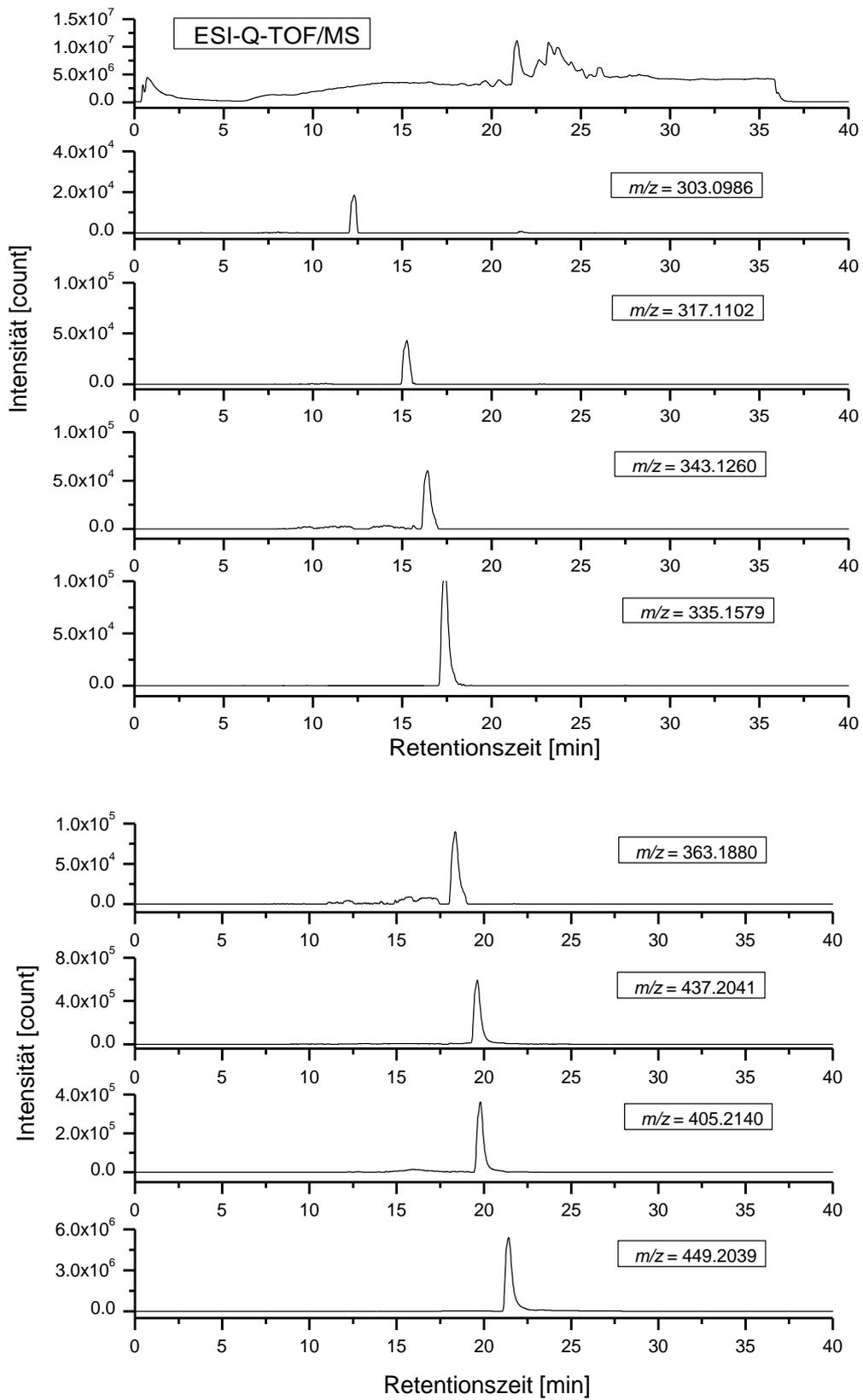
- *Arsenolipide Struktur von Feststoffschichte mit NaOH hydrolysiert*



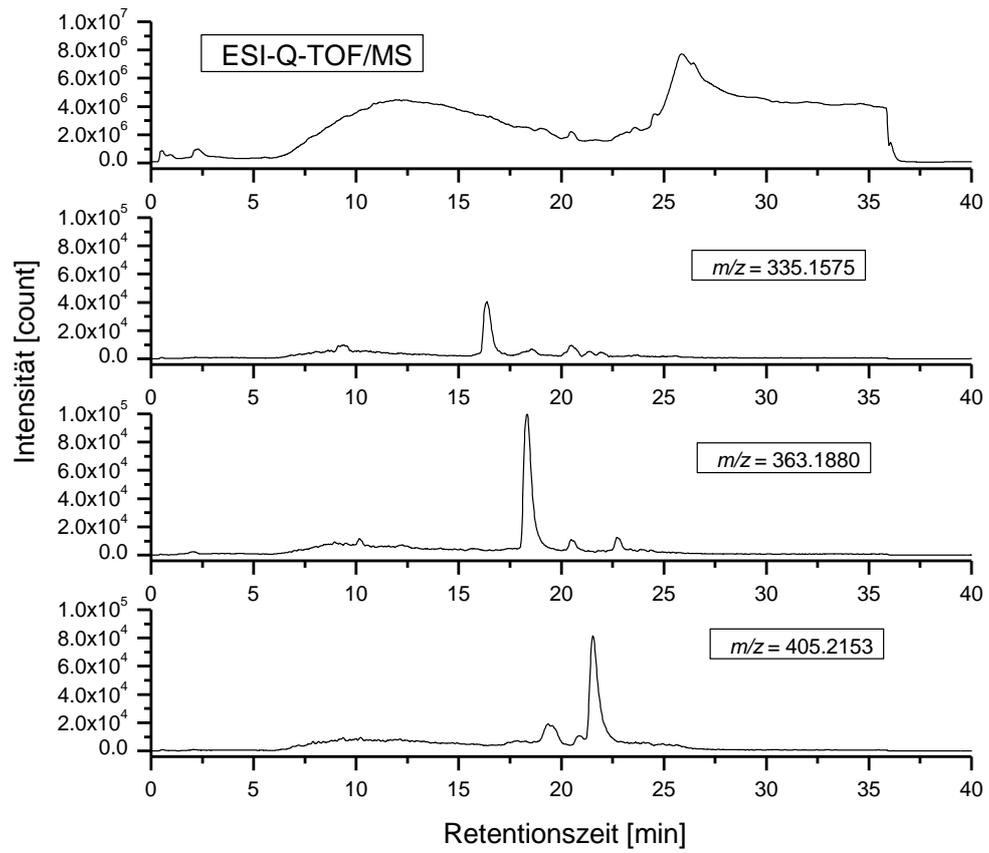
- *Arsenolipide Struktur von Feststoffschichte mit HCl hydrolysiert*



- *Arsenolipide Struktur von Ölschichte mit NaOH hydrolysiert*

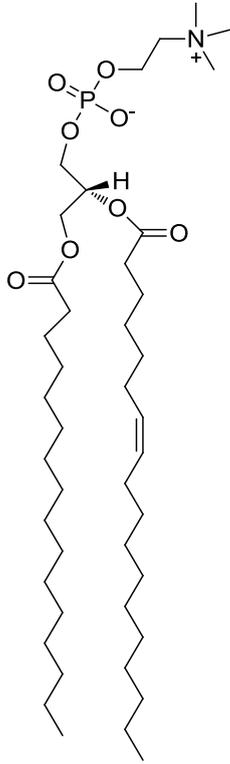


- *Arsenolipide Struktur von Ölschichte mit HCl hydrolysiert*

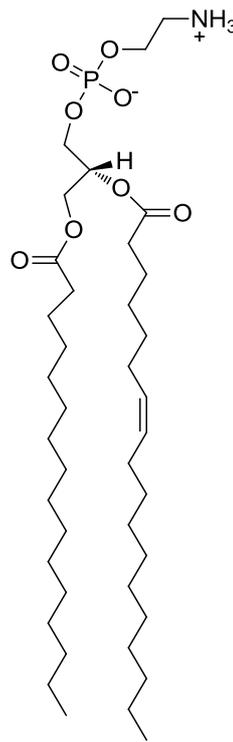


Anhang 7

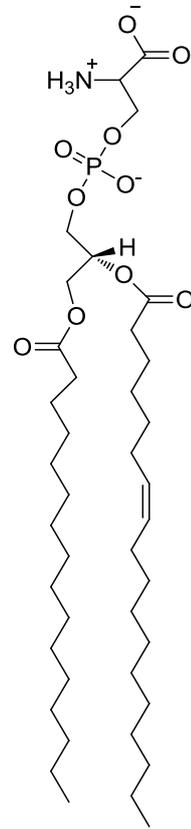
- Phosphorlipide Struktur am Membranbereich der Ozean Metabolismus



Chemical Formula: $C_{42}H_{82}NO_8P$
 Exact Mass: 759.5778
 Molecular Weight: 760.0761

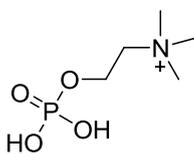


Chemical Formula: $C_{39}H_{76}NO_8P$
 Exact Mass: 717.5309
 Molecular Weight: 717.9964

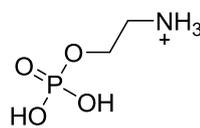


Chemical Formula: $C_{40}H_{75}NO_{10}P^+$
 Exact Mass: 760.5134
 Molecular Weight: 760.9985

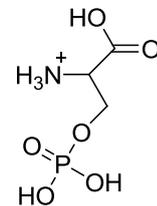
- Kopfgruppen entsprechende Phosphorlipide



Chemical Formula: $C_5H_{15}NO_4P^+$
 Exact Mass: 184.07
 Molecular Weight: 184.15



Chemical Formula: $C_2H_9NO_4P^+$
 Exact Mass: 142.03
 Molecular Weight: 142.07



Chemical Formula: $C_3H_9NO_6P^+$
 Exact Mass: 186.02
 Molecular Weight: 186.08