

## 8 Zusammenfassung

Im Rahmen der Umweltanalytik ist die Erfassung von Schadstoffeinträgen in biologische Kreisläufe und deren Auswirkung von zunehmendem Interesse. In diesem Zusammenhang hat das Biomonitoring einen hohen Stellenwert erhalten. Der Bereich des Biomonitoring umfasst eine Vielzahl an Fragestellungen, bei denen Pflanzen, Tiere und auch der Mensch zu Untersuchungen herangezogen werden. Die Untersuchung von Schwermetalleinträgen stellt einen Schwerpunkt des Biomonitoring dar.

Um eine aussagekräftige Auswertung der Experimente im Biomonitoring sicherzustellen, ist eine effiziente Analytik erforderlich, bei der in zunehmendem Maße eine große Palette an Elementen in sehr geringen Konzentrationen bestimmt werden muss.

Eine der leistungsfähigsten Methoden in der Elementanalytik ist derzeit die ICP-Massenspektrometrie als nachweisstarke Multielementmethode. Im Rahmen dieser Arbeit sollte die ICP-MS bezüglich ihrer Anwendungsmöglichkeiten zum Einsatz bei biologischen Proben untersucht werden. Des Weiteren sollte die Probenvorbereitung hinsichtlich der nachfolgenden Messung mit der ICP-MS optimiert werden und Aufschlusslösungen bezüglich Vollständigkeit charakterisiert werden. Hierbei musste vor allem ein Aufschlussverfahren gefunden werden, mit dem alle biologischen Probentypen vergleichbar vollständig in Lösung gebracht werden können.

Hohe Oxidationspotentiale können durch den Einsatz stark oxidierender Reagenzien oder durch Erhitzen von Säuren mit mittlerem Oxidationspotential unter Druck erreicht werden. In dieser Arbeit wurde der mikrowellengestützte Hochdruckaufschluss angewendet, da dieser unter den derzeitigen Aufschlussmethoden die beste Flexibilität und Leistungsfähigkeit bietet. Es wurde ein dreistufiges Aufschlussprogramm entwickelt, bei dem zunächst eine Voroxidation mit Salpetersäure gefolgt von einer Nachoxidation nach Zugabe von geringen Mengen an Perchlorsäure erfolgte. Im Anschluss wurden die Lösungen zur einheitlichen Verminderung der Säurematrix in einem in Zusammenarbeit mit AGGER (1998) und BREDTHAUER (1996) modifizierten Abdampfroter auf das jeweilige Perchlorsäurevolumen eingengt. Im Rahmen von Testuntersuchungen wurde Zucker als Aufschlussmaterial verwendet, um die Ursachen der teilweise unreproduzierbaren Endvolumina nach dem Einengen zu klären. Es konnte schließlich gezeigt werden, dass dies auf Kondensation in den Luftführungen beruht, so dass eine Modifizierung der technischen Ausführung des Abdampfrotors dringend notwendig erscheint.

Nach erfolgtem Aufschluss können hohe Konzentrationen, d.h. im g/L-Bereich an organischen Restbestandteilen an der Gelbfärbung der Lösungen erkannt werden.

Bereits geringere Mengen an nicht vollständig oxidierten organischen Substanzen können aber Störungen bei atomspektrometrischen Bestimmungen verursachen, so dass bei der Entwicklung eines Aufschlussverfahrens die Vollständigkeit des Aufschlusses kontrolliert werden musste. Hierfür wurden in dieser Arbeit die CHN-Analyse, die ICP-MS und die Viskosimetrie zur Restkohlenstoffbestimmung herangezogen. Die CHN-Analyse zeigte sich aufgrund der geringen möglichen Einwaagen ausschließlich geeignet für die Bestimmung hoher Kohlenstoffgehalte über 1g/L. Mit der ICP-MS konnten Kohlenstoffgehalte ab 1 mg/L bestimmt werden, d.h. mit 1000-facher Empfindlichkeit. Die Bestimmungsgrenze ist hier durch den hohen Kohlenstoffuntergrund aus der Luft limitiert. Die Messung der relativen Viskosität der Aufschlusslösungen gegenüber dem Aufschlussblank sollte dazu dienen, über Abweichungen im Fließverhalten Rückschlüsse auf den Restkohlenstoffgehalt zu ziehen, da unvollständige Aufschlüsse bereits beim Pipettieren veränderte Eigenschaften zeigten. Hierzu wurde ein UBBELOHDE-Viskosimeter verwendet. Es konnte gezeigt werden, dass vollständige Aufschlüsse eine mit dem Blank identische Viskosität aufweisen, während aber unvollständige Aufschlüsse sowohl eine Zunahme als auch eine Abnahme der Viskosität bewirken können. Die Viskositätsmessungen können daher nur dazu dienen, qualitative Aussagen zu machen.

Zur Bestimmung von Elementgehalten in biologischen Proben sowohl in Aufschlusslösungen als auch bei der direkten Messung von Körperflüssigkeiten sollte die ICP-MS auf ihre Möglichkeiten und Grenzen überprüft werden. Im Vordergrund stand hierbei zunächst die Charakterisierung der nicht-spektralen und spektralen Störungen, die bei biologischen Proben auftreten können, sowie deren Reduzierung oder Eliminierung.

Komplexe Matrices verursachen bei der ICP-MS nicht-spektrale Störungen, die im Allgemeinen eine Unterdrückung der Signalintensitäten zur Folge haben. Es konnte in dieser Arbeit durch vergleichende Messungen an zwei verschiedenartigen ICP-MS-Geräten gezeigt werden, dass das Ausmaß dieser Störungen sowohl matrix- als auch gerätebedingt ist. Die Ionenoptiken und das Interface unterschiedlicher Geräte haben einen zum Teil stark verschiedenen Aufbau. Es wurde beobachtet, dass das Gerät mit einfacherem Ionenoptik-Aufbau nicht nur in verschiedenen Matrices eine geringere Signalunterdrückung, sondern auch deutlich weniger ausgeprägte Massenabhängigkeit der nicht-spektralen Effekte zeigte. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass auch bei dem robusteren Gerät hohe Konzentrationen organischer Bestandteile eine Signalerhöhung der schwerionisierbaren Elemente verursachen.

Bei der Analyse biologischer Proben können des Weiteren spektrale Störungen durch Molekülionenbildung aus anorganischen und organischen Probenbestandteilen sowie durch Plasmagas und Aufschlussäuren resultieren.

Spektrale Störungen können durch einen vollständigen Aufschluss und eine Matrixabtrennung vor der Messung reduziert werden. Sowohl spektrale Störungen als auch die Anfälligkeit für nicht-spektrale Störungen werden vor allem durch die Plasma-parameter beeinflusst. So konnten unter Kaltplasmabedingungen zwar durch Argon verursachte Störungen erheblich vermindert werden, durch leichtionisierbare Elemente trat aber bereits bei geringen Konzentrationen eine starke Signalunterdrückung auf.

Die Richtigkeit der Elementbestimmung wird durch die Strategie bei der Messung und Auswertung entscheidend beeinflusst. Neben den Betriebsparametern beinhaltet dies die Auswahl an Isotopen, die Interelementkorrektur, die interne Standardisierung und das Kalibrationsverfahren.

Im Idealfall sollten störungsfreie Isotope zur Elementbestimmung herangezogen werden. Ist dies nicht möglich, ist die Anwendung von Korrekturgleichungen erforderlich. Kann die störungsverursachende Spezies bei der Messung mitbestimmt werden, erfolgt die Korrektur mit guter Richtigkeit. Ist bei Molekülionenbildung die störende Spezies nicht direkt bestimmbar, muss die Korrektur unter Anwendung von zuvor bestimmten Bildungsfaktoren durchgeführt werden. Diese Art der Korrektur ist aber mit einem größeren Fehler behaftet.

Zur Korrektur von Drift und nicht-spektralen Störungen dient die interne Standardisierung. Es konnte gezeigt werden, dass die Anzahl an notwendigen Elementen für eine erfolgreiche Kompensation der Störungen sowohl von der Matrix als auch vom Gerätetyp abhängt. Sind die nicht-spektralen Störungen massenunabhängig, ist die Nutzung eines Elementes ausreichend, während bei starker Massenabhängigkeit auch eine größere Anzahl an Elementen keine ausreichende Kompensation gewährleistet. In diesem Fall ist eine Korrekturfunktion notwendig. Die interne Standardisierung durch Argon erwies sich als ungeeignet.

Die Kalibration spielt eine besondere Rolle innerhalb des Analyseverfahrens. Eines der einzigartigen Features der ICP-MS ist die halbquantitative Übersichtsanalyse. Es konnte gezeigt werden, dass hierbei sowohl in wässrigen Standards als auch in Aufschlusslösungen biologischer Proben eine gute Richtigkeit erzielt werden kann. Allerdings wurde auch gezeigt, dass die Berücksichtigung des Ionisationsgrades notwendig ist, da ansonsten vor allem bei schwerionisierbaren Elementen Minderbefunde auftreten können. Des Weiteren konnte die Übersichtsanalyse genutzt werden, um qualitativ spektrale Störungen aufzuzeigen. Die externe Kalibration mit interner Standardisierung zeigte sich sowohl bei der Messung von Spurenelementen in Aufschlusslösungen als auch in verdünnten Körperflüssigkeiten als gut geeignet. Durch Standardaddition wurden keine besseren Wiederfindungen erzielt, so dass die

externe Kalibration, vor allem unter Berücksichtigung des geringeren Zeit- und Probenaufwandes, vorzuziehen ist.

Von besonderem Interesse war die direkte Bestimmung von Elementspuren in Körperflüssigkeiten. Es konnte gezeigt werden, dass die Analyse von verdünntem Blut, Serum und Urin mit einer Standardkonfiguration der ICP-MS möglich ist. Zur Stabilisierung in Blut- und Serumproben diente 1% TMAH (Tetramethylammoniumhydroxid), wodurch die Stabilisierung der Messwerte bei Einbringen der Probe in das Plasma gegenüber nicht-stabilisierten Lösungen erheblich schneller erreicht werden konnte. Zur internen Standardisierung diente Rhodium. Die durch Kohlenstoff verursachten Störungen, vor allem bei Chrom, konnten in diesen Proben nicht rechnerisch korrigiert werden. In diesem Fall wurde eine Verbesserung der Wiederfindung durch einen Druckaufschluss erzielt.

## Summary

Biological monitoring has achieved an important role in environmental research. In order to obtain representative data, efficient analytical procedures are required, as an increasing number of elements need to be determined at very low concentrations.

Within modern elemental analysis inductively coupled mass spectrometry (ICP-MS) is one of the most powerful methods, being a multielement method with superior detection sensitivity. In this work, the applicability of ICP-MS was to be evaluated for the analysis of biological samples. In addition, sample preparation was to be optimized for the subsequent analysis by ICP-MS, including the characterization of the digestates in respect to complete decomposition of the organic components. A digestion procedure, with which all types of biological samples can be treated with consistent quality was to be developed.

High pressure microwave digestion was applied for sample dissolution, since the method offers good flexibility and performance. A three-step digestion procedure was developed, beginning with pre-oxidation with nitric acid, followed by complete oxidation with perchloric acid. In order to uniformly decrease the volume of acid in the digestates, the solutions were then placed in a evaporating rotor, modified in cooperation with AGGER (1998) and BREDTHAUER (1996), and the acid volume was reduced to the respective perchloric acid volume. Additional tests using sugar as digestion material showed that the irreproducible volumes after evaporation are due to condensation in the tubing carrying the aerosol, so that a further modification of the rotor is required.

After dissolution, high concentrations of residual carbon (> 1 g/L) can be recognized by the intense yellow color of the solutions. However, lower concentrations of carbon can already affect the subsequent ICP-MS analysis, so that the carbon content needs to be monitored during the development of the digestion procedure. For this purpose CHN-analysis, ICP-MS and viscosity measurements were applied. CHN-analysis proved to be suitable only for the determination of high carbon levels, above 1 g/L. With the ICP-MS carbon contents above 1 mg/L could be determined. Here, the detection limits were limited by the high carbon background resulting from air and plasma gas. Measurements of the relative viscosity of the digestates in relation to the acid blank were used to identify differing properties, as indicated by the behavior displayed when pipetting the samples. It was observed that solutions of completely decomposed samples display viscosities similar to that of the acid blank, while incompletely digested samples can cause either an increase or a decrease in viscosity. The method is merely suited to obtain qualitative information.

The applicability of the ICP-MS for the analysis of biological samples was to be investigated in digestates and directly in body fluids. Emphasis was placed on the

characterization of spectral and non-spectral interferences that can arise during the analysis of biological samples, as well as on their reduction or even elimination.

In ICP-MS, complex matrices lead to the occurrence of non-spectral interferences, which in most cases result in signal suppression. The comparison of two different instruments in this work showed that the nature and extent of these interferences depends on the matrix and the instrument, as the design of interface and ion optics can differ significantly.

High concentrations of organic components proved to cause signal enhancement in elements of high ionization potential. Spectral interferences can also occur, resulting from organic and inorganic components of the biological samples, as well as from acids and plasma gas. All interferences are influenced by the plasma parameters. It was shown that cool plasma conditions will reduce Ar-based interferences, while the system becomes more susceptible to signal suppression in the presence of easily ionized elements.

The accuracy of the determination of element contents is determined by the applied strategy, including the isotope selection, interelement corrections, internal standardization, and calibration procedure. It was shown that interelement corrections lead to accurate results if the interfering species can be determined directly during the measurement. In the case of some polyatomic interferences the interfering species needs to be calculated using previously determined formation factors, leading to a larger error.

Internal standardization is applied to correct for drift and non-spectral interferences. It was shown that the number of required internal standards is determined by the matrix and the instrument. A larger number of standards is required if the non-spectral effects are mass-dependent. The use of argon proved to be ineffective.

One of the unique features of ICP-MS is the semiquantitative analysis, with which accurate results were obtained for a number of real samples. However, it was also shown, that the degree of ionization needs to be considered in the response function, as otherwise the recovery of elements with a high ionization potential tends to be too low. The use of the external calibration with internal standardization proved to be suitable for the analysis of digestates and the direct analysis of body fluids. The results could not be improved significantly using standard addition.

Investigations with body fluids showed that diluted blood, serum, and urine can be analyzed for trace elements with a standard configuration of an ICP-MS instrument. The stabilization of the samples with 1% TMAH was effective to improve sample introduction. Rhodium served as internal standard. In this matrix carbon-based interferences could not be compensated by interelement correction, but were successfully eliminated by digestion.