

**Entwicklung und Einsatz von Kopplungstechniken zwischen
Kollisionszellen Plasmamassenspektrometrie und elektrophoretischen
bzw. chromatographischen Trennverfahren zur heteroelement-
spezifischen Detektion von umwelt- und biologisch relevanten
Substanzen**

Kumulative Dissertationsschrift zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

am Fachbereich Umweltwissenschaften der Universität Lüneburg

Vorgelegt von

**Daniel Pröfrock
Amelinghausen**

1. Gutachter: Prof. Dr. Wolfgang Ruck

(Institut für Ökologie und Umweltchemie, Universität Lüneburg)

2. Gutachter: Prof. Dr. Andreas Prange

(Institut für Küstenforschung, GKSS Forschungszentrum, Geesthacht)

Prüfungsausschuss:

Prof. Dr. Wolfgang Ruck (Vorsitzender)

Prof. Dr. Andreas Prange

Prof. Dr. Werner Härdtle

Prof. Dr. Thorsten Aßmann

Prof. Dr. Mirjam Steffensky

Tag der Disputation: 25.05.2005

Amelinghausen 2005

Ich versichere, dass ich die eingereichte Dissertation „**Entwicklung und Einsatz von Kopplungstechniken zwischen Kollisionszellen Plasmamassenspektrometrie und elektrophoretischen bzw. chromatographischen Trennverfahren zur heteroelement-spezifischen Detektion von umwelt- und biologisch relevanten Substanzen**“ selbständig und ohne unerlaubte Hilfsmittel verfasst habe.

Anderer als der von mir angegebenen Hilfsmittel und Schriften habe ich mich nicht bedient. Alle wörtlich oder sinngemäß den Schriften anderer Autorinnen oder Autoren entnommenen Stellen habe ich kenntlich gemacht.

Daniel Pröfrock

Amelinghausen, den 16.02.2005

Gegenstand der vorliegenden kumulativen Promotionsarbeit sind die folgenden 5 Arbeiten, die bei verschiedenen englischsprachigen „Peer-Review“ Journals zur Publikation eingereicht wurden. Alle Arbeiten sind angenommen und bereits publiziert.

Beitrag 1:

Daniel Pröfrock, Peter Leonhard, Andreas Prange

Determination of sulfur and selected trace elements in metallothionein-like proteins using capillary electrophoresis hyphenated to inductively coupled plasma mass spectrometry with an octopole reaction cell

Anal Bioanal Chem (2003) 377: 132-139

Beitrag 2

Daniel Pröfrock, Peter Leonhard, Andreas Prange

Determination of phosphorus in phosphorylated deoxyribonucleotides using capillary electrophoresis and high performance liquid chromatography hyphenated to inductively coupled plasma mass spectrometry with an octopole reaction cell

J. Anal. At. Spectrom., 2003, 18, 708-713

Beitrag 3

Daniel Pröfrock, Peter Leonhard, Wolfgang Ruck, Andreas Prange

Development and characterisation of a new interface for coupling capillary LC with collision-cell ICP-MS and its application for phosphorylation profiling of tryptic protein digests

Anal Bioanal Chem (2005) 381: 194-204

Beitrag 4

Daniel Pröfrock, Peter Leonhard, Steven Wilbur, Andreas Prange

Sensitive, simultaneous determination of P, S, Cl, Br and I containing pesticides in environmental samples by GC hyphenated with collision-cell ICP-MS

J. Anal. At. Spectrom., 2004, 19, 623-631

Beitrag 5

Brice Bouyssiére, Peter Leonhard, **Daniel Pröfrock**, Franck Baco, Clementina Lopez Garcia, Steve Wilbur, Andreas Prange

Investigation of the sulfur speciation in petroleum products by capillary gas chromatography with ICP-collision cell-MS detection

J. Anal. At. Spectrom., 2004, 19, 700-702

Beiträge der Autoren zu den einzelnen Arbeiten

Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über die Beiträge der einzelnen Autoren zu den einzelnen Arbeiten.

Beitrag	1	2	3	4	5
Journal	ABC	JAAS	ABC	JAAS	JAAS
Erschienen	09/03	07/03	01/05	05/04	05/04
Impakt Faktor (02/05)	1,715	3,2	1,715	3,2	3,2
Zitiert (06/05)	14	8	0	3	1
Idee	DP, AP	DP, AP	DP, AP	DP, AP	BB, DP, PL
Untersuchungsaufbau	DP	DP	DP	DP	BB, DP, PL
Daten Erhebung	DP, PL	DP, PL	DP	DP	BB, DP
Daten Analyse	DP	DP	DP	DP, PL	BB, DP, PL
Erstellung des Manuskriptes	DP	DP	DP	DP	BB

Abkürzungen der einzelnen Journals

ABC Analytical and Bioanalytical Chemistry

JAAS Journal of Analytical Atomic Spectrometry

Abkürzungen der beteiligten Autoren

DP Daniel Pröfrock

PL Peter Leonhard

BB Brice Bouyssiere

AP Andreas Prange

Danksagung

Die vorliegenden Arbeiten wurden in der Zeit von Juni 2001 bis Dezember 2004 am Institut für Küstenforschung des GKSS Forschungszentrum in Zusammenarbeit mit dem Institut für Ökologie und Umweltchemie der Universität Lüneburg angefertigt.

Herrn Prof. Dr. Ing. Wolfgang Ruck möchte ich an dieser Stelle für die freie Gestaltungsmöglichkeit dieser Arbeit sowie für seine allseits gute Betreuung während des Studiums und der Promotion danken.

Weiterhin gilt mein besonderer Dank Herrn Prof. Dr. Andreas Prange für die Überlassung des interessanten und vielfältigen Themas sowie für seine engagierte Betreuung und stetiges Interesse an den durchgeführten Arbeiten.

Allen Mitarbeitern in der Abteilung Marine Bioanalytische Chemie am Institut für Küstenforschung der GKSS danke ich für die gute Zusammenarbeit und die zahlreichen anregenden Diskussionen. Besonders bedanken möchte ich mich an dieser Stelle bei Herrn Dr. Peter Leonhard für die vielen Diskussionen und die erfolgreiche Zusammenarbeit während der letzten Jahre.

Abschließend möchte ich meiner Frau Heike für ihre Unterstützung und ihre Geduld während der vergangenen drei Jahre danken.

Abkürzungen

ICP-MS	inductively coupled plasma mass spectrometry
CC-ICP-MS	collision cell inductively coupled plasma mass spectrometry
HR-ICP-MS	high resolution inductively coupled plasma mass spectrometry
MIP	microwave induced plasma
ICP	inductively coupled plasma
ICP-QMS	inductively coupled plasma quadrupole mass spectrometry
ESI	electrospray ionisation
MALDI	matrix assisted laser desorption ionisation
GC	gas chromatography
CE	capillary electrophoresis
ESI-MS-MS	electrospray ionisation tandem mass spectrometry
ESI-TOF-MS	electrospray ionisation time of flight mass spectrometry
ESI-qQ-TOF-MS	electrospray ionisation quadrupole time of flight mass spectrometry
HPLC	high performance liquid chromatography
ECD	electron capture detector
NPD	nitrogen-phosphorus detector
AED	atom emission detector
MS	mass spectrometry
RP	reversed phase
eV	electron volt
DNA	desoxy ribonucleic acid
RNA	ribonucleic acid
CZE	capillary zone electrophoresis
CGE	capillary gel electrophoresis
EOF	electro osmotic flow
TXRF	total x-ray fluorescence analysis
CID	collisional induced diossciation

Inhaltsverzeichnis

<u>Abstract</u>	<u>9</u>
<u>1 Einleitung und Fragestellung</u>	<u>10</u>
<u>2 Theoretische Grundlagen der verwendeten Techniken</u>	<u>14</u>
2.1 Trenntechniken	14
2.1.1 Kapillarelektrophorese (CE)	14
2.1.2 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) und Gaschromatographie (GC)	16
2.2 Detektionstechniken	18
2.2.1 Quadrupol ICP-MS (ICP-MS)	18
2.2.2 Kollisionzellen ICP-MS (CC-ICP-MS)	20
2.2.3 Elektrospray Ionisations Tandem Massenspektrometrie (ESI-MS-MS)	24
2.3 Nachweis von Heteroatomen mit gekoppelten, ICP-MS basierenden Techniken – Stand der Wissenschaft	26
2.3.1 CE Kopplungen	28
2.3.2 GC Kopplungen	30
2.3.3 HPLC Kopplungen	33
2.3.4 Zusammenfassung	36
<u>3 Zusammenfassung der einzelnen Beiträge</u>	<u>38</u>
3.1 Beitrag 1	38
3.2 Beitrag 2	43
3.3 Beitrag 3	46
3.4 Beitrag 4	49
3.5 Beitrag 5	52

4 Generelle Diskussion der Ergebnisse	54
5 Zusammenfassung und Ausblick	59
6 Literaturverzeichnis	62
7 Anhang	66
7.1 Publikationen in Originalform	66
7.2 Liste der Veröffentlichungen	76
7.2.1 <i>Peer Review Papers</i>	76
7.2.2 <i>Vorträge</i>	77
7.2.3 <i>Poster</i>	79
7.2.4 <i>Preise</i>	81

Abstract

The following cumulative doctoral thesis summarizes five already published peer reviewed publications concerning the application of quadrupole based collision-cell inductively coupled plasma mass spectrometry (CC-ICP-MS) as a sensitive and selective method for a hetero-element specific detection of phosphorus, sulfur, chlorine, bromine and iodine containing compounds in life-science and environmental related research.

Different separation techniques such as capillary electrophoresis (CE), gas chromatography (GC) and liquid chromatography (HPLC) have been used for sample introduction and highly resolved separation of the compounds of interest.

Electrospray ionisation tandem mass spectrometry (ESI-MS-MS) has been used as a second detection technique to obtain molecule specific information and to demonstrate the potential of a complementary application of element and molecule specific mass spectrometry in life-science related research.

The use of inert cell gases such as helium and xenon, a kinetic energy discrimination due to special instrumental tune conditions and the application of low-flow separation technique for sample introduction enables an effective reduction of the interfering background especially on the highly disturbed mass of ^{31}P and ^{32}S .

In contrast to the established methodologies no additional techniques such as membrane desolvation or mathematical calculations were necessary to further reduce the interfering background to an acceptable level or to compensate for effects on the instrumental response due to the conditions of the separation technique used. Metalloproteins, DNA nucleotides, phosphorylated proteins as well as pesticides and petroleum products have been used as model compounds to demonstrate the potential of their element specific detection and to determine the strength and current limitations of the applied separation techniques combined with CC-ICP-MS as detector.

Overall the collision-cell ICP-MS based element specific determination of various substance classes via their content of the elements phosphorus, sulphur, chlorine, bromine or iodine opens certain new application fields for elemental mass spectrometry and eliminates different problems related with other standard detection techniques commonly used in combination with the applied separation techniques.

1 Einleitung und Fragestellung

Aktuelle Fragestellungen im Bereich der Lebens- und Umweltwissenschaften sind mittlerweile so komplex geworden, dass eine sinnvolle Untersuchung einer Thematik durch eine einzelne Fachrichtung kaum noch möglich ist. Insbesondere in den Lebenswissenschaften, die durch die Entwicklungen im Bereich der Genetik und der Proteinanalytik große Fortschritte gemacht haben, ist die Zusammenarbeit einzelner Disziplinen heutzutage unabdingbar.

Nur über den komplementären Einsatz verschiedener Methoden und Herangehensweisen sowie der synergistischen Interpretation der gewonnenen Daten und Erkenntnisse ist eine zielführende Problembearbeitung möglich.

Für das Verständnis vieler Fragestellungen ist es daher schon lange nicht mehr ausreichend, nur die Konzentration einer Verbindung oder eines Elements zu bestimmen, um eine Aussage treffen zu können.

Viel wichtiger sind Informationen darüber, in welcher Form bzw. Spezies beispielsweise ein Element vorliegt, welche Struktur, Liganden oder Veränderungen ein Makromolekül aufweist oder welche Effekte auf zellulärer Ebene durch das Vorhandensein oder Fehlen einzelner Verbindungen ausgelöst werden.¹

Moderne massenspektrometrische Verfahren und ihr komplementärer Einsatz, zusammen mit anderen analytischen- oder biochemischen Techniken können bei der Lösung dieser Fragestellungen helfen.

Erste Schritte in Richtung einer komplementären Anwendung verschiedener massenspektrometrischer Verfahren wurden in der, auf induktiv gekoppelter Plasma Massenspektrometrie (ICP-MS) basierenden metall- bzw. metalloidspezifischen Detektion von Metalloproteinen, Arsenozuckern oder Selenoproteinen gemacht. Dabei wurden die Zielanalyten über ihre natürlich vorhandene Metall bzw. Metalloidmarkierung („*Element Tag*“) nach erfolgter chromatographischer- oder elektrophoretischer Trennung detektiert.¹

Die ständige Weiterentwicklung im Bereich der ICP-MS basierenden Elementspeziesanalytik von der Untersuchung kleiner, zumeist anthropogen eingetragener, gut definierter, recht stabiler Organometallverbindungen in unterschiedlichsten Umweltkompartimenten und Probenmatrices hin zur metall- bzw. metalloidspezifischen Detektion von unbekanntem, zum Teil empfindlicher Proteinen, Nucleinsäuren oder Kohlenhydratkomplexen warf bald die Frage nach einer

weitergehenden Charakterisierung der über ihre Metall- bzw. Metalloid- Markierung („*Element-Tag*“) gefundenen Komplexe auf. Dies kann mit ICP-MS nicht geleistet werden, da unter den herrschenden Plasmabedingungen sämtliche molekülspezifische Information verloren geht.¹

Für den Bereich der Lebenswissenschaften, der sich heute hauptsächlich mit Proteom- und Genomforschung befasst, zählen auf Elektrosprayionisation (ESI) oder Matrix unterstützter Laser Desorbptions Ionisation (MALDI) basierende massenspektrometrische Verfahren zu den Standardtechniken, die für eine molekülspezifische Detektion sowie zur Molekülcharakterisierung eingesetzt werden. Anders als in der ICP-MS bleibt bei diesen Techniken das zu detektierende Molekül erhalten und Informationen zu seiner molekularen Masse und zu seiner Struktur können ermittelt werden. Anwendungsbereiche sind beispielsweise das Peptidmapping²⁻⁴, Proteinsequenzierung⁴⁻⁷ oder der Nachweis von post-translatorisch veränderten Proteinen⁸⁻¹².

In der dargestellten Kombination gibt es mittlerweile eine Vielzahl von Beispielen, die über den komplementären Einsatz von metall- und molekülspezifischer Detektion zum Nachweis und zur Charakterisierung von Metalloproteinen¹³⁻¹⁶ sowie Metalloidverbindungen¹⁷⁻²⁰ geführt hat.

Die Limitation des beschriebenen Ansatzes ist darin zu sehen, dass nur solche Strukturen untersucht werden können, die eine natürliche Metall- bzw. Metalloidmarkierung aufweisen.

Mittlerweile stehen Derivatisierungstechniken zur Verfügung, über die selbst eine Markierung von Makromolekülen möglich ist. Kritisch hierbei ist die Frage, in wie weit das so detektierte Molekül seine Eigenschaften durch solche Modifikationen verändert hat. Weiterhin stellt sich die Frage, welchen Einfluss solche Markierungen haben, wenn sie *in vivo* durchgeführt werden.

Spätestens mit der Einführung der Hochauflösenden ICP-MS und der Kollisions- bzw. Reaktionszellen ICP-MS hat sich die ICP-MS von einer metallspezifischen hin zu einer elementspezifischen Detektionstechnik entwickelt.

So ist beispielsweise die Verwendung der Heteroelemente Phosphor, Schwefel, Chlor, Brom oder Iod als Markierung möglich, die natürlicherweise in einer Vielzahl von Biomolekülen oder Verbindungen anthropogenen Ursprungs enthalten sind.

Schwefel ist beispielsweise in Form der Aminosäuren Cystein und Methionin mit einer kumulativen Häufigkeit von etwa 5 % in jedem natürlichen Peptid enthalten.

Statistisch gesehen kann daher in jedem Peptid, das mehr als 20 Aminosäuren umfasst, mindestens eine schwefelhaltige Aminosäure erwarten werden.²¹

Ein ähnliches Bild ergibt sich für den Phosphor, der in Form einer reversiblen Phosphorylierung der Aminosäuren Serin, Threonin und Tyrosin in ca. 75 % aller in eukaryotischen Organismen anzutreffenden Proteine vorhanden ist. Daneben ist er maßgeblich an der Struktur der DNS beteiligt.

Chlor, Brom und Iod sind in einer Vielzahl von pharmazeutischen Substanzen, Umweltschadstoffen und ihrer Metaboliten anzutreffen.

Die Verwendung von CC-ICP-MS als heteroelementspezifischen Detektor in Verbindung mit hocheffizienten Trennmechanismen wie Flüssigkeitschromatographie (HPLC), Kapillarelektrophorese (CE) oder Gaschromatographie (GC) trägt somit zu einer starken Erweiterung der mit ICP-MS detektierbaren Substanzklassen bei und bietet gleichzeitig diverse Vorteile im Vergleich zu anderen Detektionstechniken.

Zu den herausragenden Eigenschaften zählen hohe Empfindlichkeit und damit verbundene Nachweisstärke, ein sich über 7 bis 8 Größenordnungen erstreckender dynamischer Bereich, Multielementfähigkeit sowie der zum Teil komponentenunabhängige Ionisationsprozess. Hieraus ergeben sich insbesondere neue Ansätze für die Quantifizierung unbekannter Substanzen.

Die vorliegende kumulative Dissertationsschrift fasst 5 „Peer Review“ Publikationen zu diesem Themenkomplex zusammen, die im Anhang beigelegt sind.

Ziel dieser Arbeit ist es aufzuzeigen, inwieweit insbesondere der Einsatz der quadrupolbasierenden Kollisionzellen ICP-MS (CC-ICP-MS) als heteroelementspezifische Detektionstechnik neue Möglichkeiten bei der Bearbeitung von Fragestellungen im Bereich der Lebens- und Umweltwissenschaften eröffnen kann und wo zur Zeit die limitierenden Faktoren zu sehen sind.

Insgesamt wurde in allen Arbeiten das Ziel verfolgt, über die Reduktion des Matrixeintrags in das Plasma sowie spezielle Einstellungen am CC-ICP-MS System, Interferenzen, die eine empfindliche Detektion der ausgewählten Heteroelemente stören, zu minimieren.

Weiterhin sollten Ansätze entwickelt werden, die auf der Basis des komplementären Einsatz von CC-ICP-MS und Elektrosprayionisations Tandem Massenspektrometrie (ESI-MS-MS) neben der reinen Elementinformation weitere molekül- bzw. strukturspezifische Informationen der detektierten Komponenten liefern.

Zu diesem Zweck sollen Kopplungen zwischen CC-ICP-MS und unterschiedlichen Trenntechniken realisiert bzw. neu entwickelt werden.

Anhand ausgewählter Proben soll die Anwendbarkeit der heteroelementspezifischen Detektion unter Verwendung unterschiedlicher gekoppelter Systeme untersucht werden.

Dabei sollen insbesondere solche Zielanalyten untersucht werden, die sich im Hinblick auf weiterführenden Arbeiten im Rahmen einer chemisch biologischen Stoffbewertung als Biomarker (beispielsweise Metallothioneine) oder für eine wirkungsbezogene Analytik (beispielsweise Nukleotide, Nukleotidaddukte, Proteinphosphorylierung) einsetzen lassen.

2 Theoretische Grundlagen der verwendeten Techniken

Der folgende Abschnitt umfasst eine kurze Darstellung der theoretischen Grundlagen, die den eingesetzten Trenn- und Detektionstechniken zugrunde liegen, die im Rahmen der verschiedenen Beiträge zur Anwendung kamen. Hinweise auf weiterführende Literatur zu den verwendeten Methoden finden sich in den einzelnen Passagen.

2.1 Trenntechniken

2.1.1 Kapillarelektrophorese (CE)

Im Vergleich zur Gelelektrophorese, die routinemäßig für hochaufgelöste Trennungen im Bereich der Protein und DNS/RNS Analytik verwendet wird, bietet die Anwendung von Kapillaren als Elektromigrationskanal verschiedene Vorteile für die Trennung von Ionen, kleinen organischen bzw. anorganischen Molekülen oder biologisch relevanten Makromolekülen.

Der Hauptvorteil der Kapillarelektrophorese (CE) ergibt sich aus dem großen Verhältnis des Volumens zur Oberfläche, welches Kapillaren aufweisen, wodurch eine effiziente Ableitung der Jouleschen Wärme ermöglicht wird, die durch das angelegte elektrische Feld erzeugt wird. Dies ermöglicht den Einsatz von Spannungen bis zu 30 kV, wodurch im Vergleich zur Gelelektrophorese wesentlich schnellere Trennungen erreicht werden können (wenige Minuten vs. einige Stunden). Kommerziell erhältliche Systeme können mittlerweile kleinste Probenvolumina reproduzierbar handhaben (bis 0,2 nL), was insbesondere wichtig ist, wenn das Gesamtvolumen einer Probe limitiert ist oder Methoden automatisiert werden sollen. Einen guten Überblick über die Theorie der Kapillarelektrophorese kann man bei *Jorgenson und Lukacs* finden.²²

Der Trennmechanismus der CE basiert auf der Ladung und der Größe der Analyten, die sich in einem angelegten elektrischen Feld bewegen. Die elektrophoretische Mobilität (μ) der geladenen Analyten kann über die *Debye-Huckel-Henry* Theorie abgeschätzt werden

$$\mu = q / 6\pi\eta r \quad (1)$$

wobei q den Ladungszustand des Analyten beschreibt, η die Viskosität des verwendeten Elektrophoresepuffers darstellt und r den *Stokes`Radius* des Analyten beschreibt.

Unter „normalen“ Elektrophoresebedingungen ist der Einlass der Kapillare als Anode (+) und der Auslass als Kathode (-) geschaltet. Unter diesen Bedingungen kommt es zu einer Auftrennung der Analyten nach ihrer spezifischen elektrophoretischen Mobilität im angelegten elektrischen Feld.

Wäre das angelegte elektrische Feld die einzige Kraft, die die Mobilität der Analyten beeinflusst, so würden nur positiv geladene Substanzen den Kapillarauslass (Detektor) erreichen, während neutrale Substanzen statisch im Bereich des Einlasses der Kapillare verharren würden und anionische Spezies sich weg vom Detektor in Richtung Anode bewegen würden.

Neben dem elektrischen Feld werden die Analyten durch den sog. Elektroosmotischen Fluss (EOF) innerhalb der Kapillare beeinflusst. Der EOF wurde bereits 1879 identifiziert und durch Helmholtz beschrieben.²³

Dieser ist insbesondere abhängig von der Ladungsverteilung nahe der inneren Kapillaroberfläche. Durch die Dissoziation der Silanolgruppen ist diese negativ geladen. Dadurch werden kationische Bestandteile der verwendeten Elektrophoresepufferlösung angezogen. Die sich bildende Ionenschicht besitzt eine positive Ladungsdichte, die exponentiell abnimmt je weiter man sich von der Kapillaroberfläche entfernt. Dieser exponentielle Abfall wird auch als „ ξ -Potential“ bezeichnet. Die als „*Stern-Schicht*“ bezeichnete Doppelschicht, die sich nahe der Kapillaroberfläche ausbildet, ist mehr oder weniger statisch. Daneben kommt es zur Ausbildung einer diffusen Grenzschicht, die auch als „*Outer Helmholtz-Plane*“ (OHP) bezeichnet wird.

Während der Elektrophorese bewegen sich die Kationen in der OHP in Richtung der Kathode, wobei sie auch Wassermoleküle aus der Pufferlösung in Richtung der Kathode bewegen. Dieser gerichtete Fluss zeigt im Vergleich zum aus der Flüssigkeitschromatographie bekannten parabolischen Flussprofil ein nahezu flaches Flussprofil, was maßgeblich für die hohe Trenneffizienz der Kapillarelektrophorese verantwortlich ist.

Die Migrationsgeschwindigkeit bzw. die Mobilität V_i der Analyten ergibt sich aus

$$V_i = (\mu_{ep} + \mu_{eo})E \quad (2)$$

wobei μ_{ep} der durch das angelegte elektrische Potential bedingten Mobilität entspricht, μ_{eo} die durch den EOF verursachten Mobilität darstellt und E das angelegte elektrische Feld beschreibt.

Der EOF ist invers proportional zur Viskosität des verwendeten Puffersystems sowie proportional zu dessen Dielektrizitätskonstante, der angelegten Feldstärke sowie dem ξ -Potential. Dies hat zur Folge, dass der EOF mit steigender Pufferkonzentration abnimmt, während ein steigender pH Wert eine Erhöhung des EOF nach sich zieht, was auf eine verstärkte Dissoziation der Silanolgruppen an der Kapillaroberfläche zurückzuführen ist.

Insgesamt stehen, abhängig von den zu untersuchenden Analyten und der zu behandelnden Fragestellung, verschiedene kapillarelektrophoretische Trennmodi zur Verfügung.

Dazu zählen die Kapillar Zonen Elektrophorese (CZE), die Mizellarelektrokinetische Kapillarchromatographie (MEKC), bei der oberflächenaktive Modifier dem Elektrophoresepuffer zugesetzt werden, die Kapillare Isoelektrische Fokussierung (cIEF), die Kapillare Isotachophoresis (cITP) oder die Kapillar Gelelektrophorese (CGE), bei der siebende Polymere als Trennmatrix verwendet werden.

Aufgrund seiner Vielseitigkeit und seiner Einfachheit ist die CZE der am weitesten verbreitete kapillarelektrophoretische Trennmodus.

Im Rahmen dieser Arbeit kam nur die CZE zum Einsatz, da dieser Trennmodus in Bezug auf die eingesetzten Trennmedien (Puffer) die beste Kompatibilität mit dem eingesetzten Detektor (CC-ICP-MS) aufweist.

Eine empfehlenswerte und detaillierte Abhandlung über die Theorie sowie die Möglichkeiten der Kapillarelektrophorese findet man bei *Landers et al.*²⁴

2.1.2 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) und Gaschromatographie (GC)

Anders als bei der Kapillarelektrophorese wo einzelne Komponenten aufgrund ihrer größen- und ladungsbedingten unterschiedlichen Migration in einem elektrischen Feld getrennt werden, basiert die HPLC bzw. die GC auf der dynamischen Verteilung der zu trennenden Komponenten zwischen einer stationären und einer mobilen Phase. Im Falle der GC handelt es sich bei der mobilen Phase um ein Gas; bei der HPLC kommt eine Flüssigkeit zum Einsatz. In beiden Fällen bewegt sich die mobile

Phase kontinuierlich an der stationären Phase vorbei und übernimmt den Transport der zu trennenden Probenbestandteile. Je nach dem, welche chemischen Eigenschaften die zu trennenden Komponenten und die verwendete stationäre Phase aufweisen, kommt es zwischen ihnen zu mehr oder weniger starken intermolekularen Wechselwirkungen. Die einzelnen Komponenten werden dabei von der stationären Phase gelöst oder von ihr adsorbiert.

Da in der Gasphase der Molekülabstand etwa 10 mal größer ist als in einer Flüssigkeit, kommt es in der GC lediglich zu Wechselwirkungen zwischen der stationären Phase und den Probenmolekülen. Durch eine Veränderung der Säulentemperatur wird eine Änderung des Partialdrucks der zu trennenden Komponenten erzeugt, so dass diese sich mit dem Trägergasstrom durch die Säule bewegen können.²⁵

Während die GC nur für solche Substanzen geeignet ist, die leicht flüchtig sind bzw. sich unzersetzt verdampfen lassen, können mit der HPLC abhängig vom verwendeten Trennmodus auch nichtflüchtige, thermisch labile sowie hochmolekulare Substanzen getrennt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde insbesondere die Umkehrphasenflüssigkeitschromatographie verwendet (RP-HPLC).

In der RP-HPLC hat die stationäre Phase einen unpolaren bzw. hydrophoben Charakter, während die mobile Phase polar ist bzw. hydrophile Eigenschaften aufweist. Insgesamt beruht der Trennmechanismus der RP-HPLC auf der Verteilung der verschiedenen Probenbestandteile zwischen einer an der Oberfläche der stationären Phase ausgebildeten Grenzschicht und der mobilen Phase. Durch Veränderungen in der Zusammensetzung der mobilen Phase (Gradientenelution) ändern sich diese Verteilungsgleichgewichte und auch stark mit dem Säulenmaterial wechselwirkende Komponenten werden dann in der Säule zum Detektor weitertransportiert.²⁵

2.2 Detektionstechniken

2.2.1 *Quadrupol ICP-MS (ICP-QMS)*

Massenspektrometrische Systeme setzen sich in der Regel aus einer Ionenquelle, einem Massenfilter und einem Detektor zusammen. Bei der im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten induktiv gekoppelten Plasmamassenspektrometrie dient ein Argonplasma als Ionenquelle, das bei Atmosphärendruck betrieben wird.

Als Plasma bezeichnet man ein quasi neutrales, elektrisch leitfähiges Gas, das weitgehend aus frei beweglichen Elektronen und positiven Ionen sowie elektrisch neutralen Atomen und Molekülen besteht, die sich in ständiger ungeordneter Wärmebewegung befinden. Dieses wird über die Induktion einer hochfrequenten Wechsellspannung in den Argongasstrom erzeugt, der durch ein aus drei konzentrischen Quarzrohren bestehenden Aufbau, der sogenannten „*Torch*“ strömt. Diese wird von den Windungen der Induktionsspule umschlossen. Durch das magnetische Feld der Spule wird ein kontinuierlicher Strom im Argongas induziert. Durch eine Hochspannungsentladung die einen Teil des Argons ionisiert, werden freie Elektronen erzeugt, die zum Zünden des Plasmas führen. Im Bereich der Spule kommt es zur Bildung eines ortstabilen, sich selbst erhaltenden Plasmas. Aufgrund der hohen Gastemperatur (4500-8000 K), der hohen Elektronentemperatur (8000-10000 K) sowie der hohen Elektronendichte von bis zu $3 \cdot 10^{15} \text{ cm}^{-3}$, die im Plasma erreicht werden, ergibt sich eine annähernd vollständige Verdampfung und Atomisierung der in das Plasma eingebrachten Probenbestandteile in einer weitestgehend chemisch inerten Umgebung.

Die gebildeten, in der Regel einfach positiv geladenen Ionen werden über ein Interface und eine Ionenoptik aus dem Plasma extrahiert und in gebündelter Form zum Massenfilter weitergeleitet. Das Interface hält dabei die Druckdifferenz zwischen Plasma (Atmosphärendruck) und dem Massenfilter (etwa 10^{-5} Pa) aufrecht. Im Rahmen dieser Arbeit wurden ICP-MS Systeme mit quadrupol basierenden Massenfiltern eingesetzt.

Ein Quadrupolmassenfilter besteht aus vier parallel verlaufenden, symmetrisch angeordneten Metallstäben, wobei gegenüber liegende Stäbe elektrisch miteinander verbunden sind. An diese Stäbe werden überlagerte Gleich- und Wechsellspannungen so angelegt, dass gegenüberliegende Stäbe die gleiche,

benachbarte Stäbe eine entgegengesetzte Polung aufweisen. Abhängig von der Kombination von Gleich- und Wechselspannung können nur Ionen mit einem bestimmten Masse/Ladungsverhältnis das entstehende elektrostatische Wechselfeld passieren. Alle anderen Ionen werden in dem Feld abgelenkt und gelangen nicht bis zum Detektor.

Mit Quadrupolsystemen lässt sich nur eine Einheitsauflösung erreichen, so dass minimale Massendifferenzen zweier Ionen nicht unterschieden werden können.

Mehr Details zur Quadrupoltheorie im Zusammenhang mit ICP-MS findet man bei *Montaser et al.*²⁶

Abbildung 1 zeigt den schematischen Aufbau eines Quadrupol ICP-MS System der Firma Agilent Technologies.

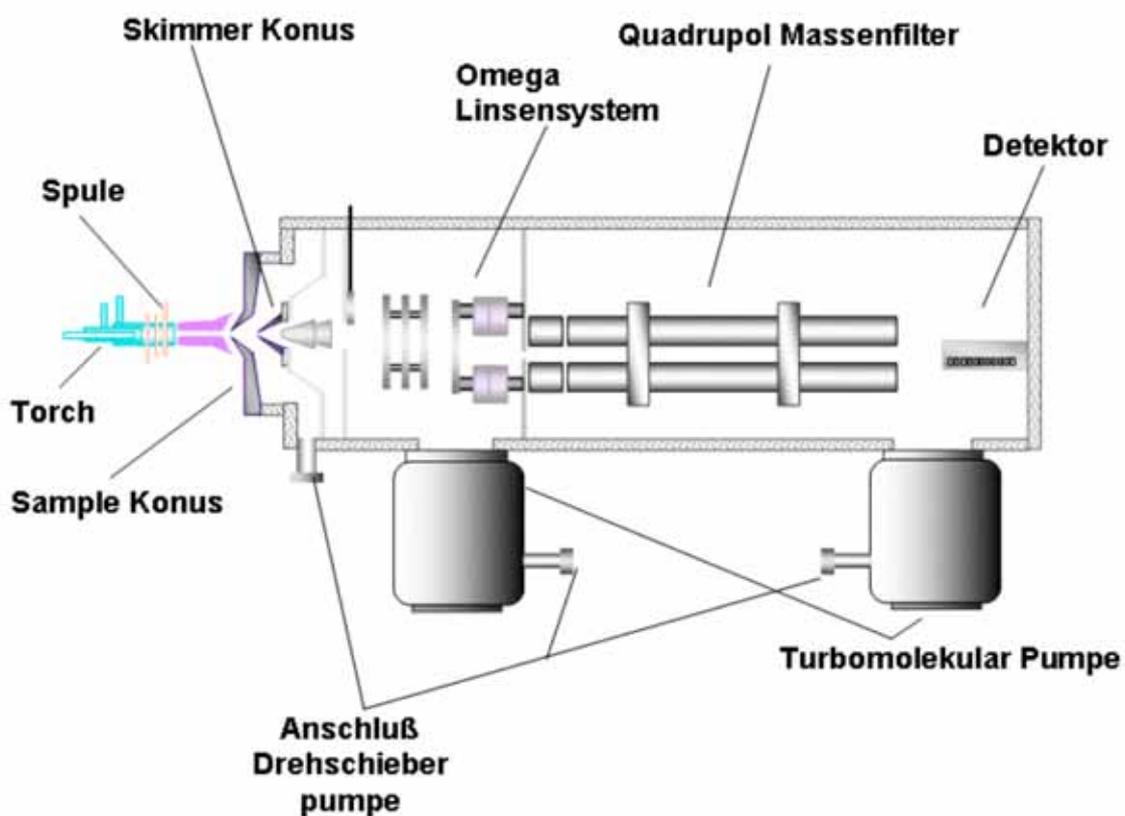


Abbildung 1 Schematische Darstellung eines Quadrupol ICP-MS System (Agilent 7500 s)

2.2.2 Kollisionzellen ICP-MS (CC-ICP-MS)

Die bereits beschriebenen Bedingungen im Plasma führen nicht nur zu einer Ionisierung der zu untersuchenden Probenbestandteile sondern auch zur Bildung von polyatomaren Interferenzen in der Form von Molekülionen.

Argon-, stickstoff- und sauerstoffbasierende Polyatome sind hauptsächlich für den spektralen Untergrund verantwortlich, der bereits ohne jegliche Probenzufuhr in das Plasma, gemessen werden kann. Dieser ist insbesondere auf das verwendete Plasmagas und die in ihm enthaltene Verunreinigungen sowie auf die Umgebung, in der das Plasma brennt, zurückzuführen.

Die Menge und die Zusammensetzung der zu untersuchenden Probenmatrix kann weiterhin zur Bildung von polyatomaren Interferenzen und damit zu einer Erhöhung des spektralen Untergrundes beitragen.

Diese Polyatome weisen ähnliche Masse- zu Ladungsverhältnisse auf wie die eigentlichen Analytionen.

Wie bereits dargestellt, ist mit einem quadrupolbasierenden ICP-MS nur eine Einheitsauflösung zu erreichen, so dass diese zum Teil recht geringen Massendifferenzen nicht voneinander getrennt werden können.

Hochauflösende ICP-MS (HR-ICP-MS) ist in der Lage, diese geringen Massendifferenzen voneinander zu trennen und ermöglicht so die interferenzfreie Detektion einer Vielzahl von Elementen. Nachteilig wirkt sich hier die drastische Empfindlichkeitsreduzierung aus, die mit der Erhöhung des Auflösungsvermögens einhergeht.

So reduziert sich beispielsweise bei einer Auflösung von $m/\Delta m = 10000$ die Gesamtempfindlichkeit des Systems auf ca. 1 % der Ausgangsempfindlichkeit bei einer Auflösung von $m/\Delta m = 300$. Weiterhin erfordern einige Interferenzen Auflösungen, die mit kommerziell verfügbaren ICP-MS Systemen nicht erreicht werden können.

Ein seit einigen Jahren im Bereich der ICP-MS immer stärker verfolgter Lösungsansatz zur Reduzierung plasmabedingter Interferenzen basiert auf der Verwendung von Kollisions- und Reaktionszellen in Verbindung mit Quadrupol ICP-MS Systemen.

Ziel ist es, in der zumeist als Multipol ausgebildeten Kollisions- und Reaktionszelle, polyatomare Interferenzen durch Kollisionen oder Reaktionen mit eingeleiteten Gasen zu minimieren.

Abhängig vom verwendeten CC-ICP-MS System werden verschiedene Mechanismen innerhalb der Kollisions- bzw. Reaktionszelle zur Interferenzminimierung eingesetzt.

Hierzu zählen kollisionsinduzierte Dissoziationen (*CID*), Ionen-Molekülreaktionen sowie die kinetische Energiediskriminierung.

Die kollisionsinduzierte Dissoziation (*CID*) von Molekülionen ist insbesondere aus der organischen Massenspektrometrie bekannt und wird dort zur Fragmentierung und Strukturaufklärung ausgewählter Masse zu Ladungsverhältnisse verwendet. Inerte Gase wie Stickstoff oder Argon werden hier hauptsächlich als Zellgas eingesetzt.

Versuche, über *CID* polyatomare Interferenzen zu minimieren, zeigten, dass die erreichte Fragmentierung mit einem in der gleichen Größenordnung angesiedelten Verlust an Analytzählrate einhergeht.²⁷ Dieser Mechanismus setzt voraus, dass die in der Kollisionszelle erreichten Energien größer sind als die Bindungsenergien der interferierenden Polyatome. Näheres zur Berechnung der Dissoziationsenergien wird in den Beiträgen 1 bis 4 sowie bei *Leonhard et al.*²⁸ erklärt.

Erste Beschreibungen von Ionen-Molekülreaktionen zur Interferenzminimierung in der ICP-MS findet man in einer Publikation von *Rowan und Houk.*²⁹ Eine Übersicht der möglichen Ionen-Molekülreaktionen wurde kürzlich von *Baranov et al* veröffentlicht.³⁰

Zu den wichtigsten Reaktionen zur Reduzierung plasmabedingter Interferenzen zählen Ladungstransfer ($\text{Ar}^+ + \text{H}_2 \rightarrow \text{H}_2^+ + \text{Ar}$), Protonentransfer ($\text{ArH}^+ + \text{H}_2 \rightarrow \text{H}_3^+ + \text{Ar}$) und Wasserstoffatomtransfer ($\text{Ar}^+ + \text{H}_2 \rightarrow \text{ArH}^+ + \text{H}$).

Durch Additionsreaktionen, beispielsweise durch eine Oxidation ($\text{Me}^+ + \text{O}_2 \rightarrow \text{MeO}^+ + \text{O}$), lassen sich ebenfalls Störungen minimieren.

Wichtige Voraussetzung ist dabei, dass die angestrebte Reaktion energetisch begünstigt ist. Ferner darf die Masse des sich ergebenden Produkts nicht mit anderen Massen interferieren³¹.

Für Phosphor und Schwefel wurde beispielsweise eine Oxidationsreaktion eingesetzt, um beide Elemente durch Addition in weniger interferierten Massenbereichen zu messen ($^{31}\text{P}^{16}\text{O}^+$, m/z 47, $^{32}\text{S}^{16}\text{O}^+$, m/z 48). Bei titanreichen Proben kann es hier aber auch zu Interferenzen mit $^{48}\text{Ti}^+$ kommen.^{32, 33}

Kinetische Energiediskriminierung von Polyatomen und die damit verbundene Reduzierung störender Interferenzen ist auf Kollisionen im inneren der Reaktionszelle und auf Potentialdifferenzen im Ionenpfad des ICP-MS zurückzuführen. Abhängig von der Masse und der Atomgröße des verwendeten Zellgases sowie dem Wirkungsquerschnitt, werden die kinetischen Energien aller die Zelle durchfliegenden Ionen reduziert.

Bedingt durch ihren größeren Querschnitt kollidieren interferierende Polyatome statistisch gesehen häufiger mit dem Zellgas, so dass sie im Vergleich zu den kleineren Analytionen eine stärkere Reduzierung ihrer kinetischen Energie erfahren. Diese ist nach der Passage der Zelle nicht mehr ausreichend, um die Potentialdifferenz zwischen der Reaktionszelle und dem sich anschließenden Quadrupolmassenfilter zu überwinden, während die kinetische Energie der Analytionen noch ausreicht, um diese zu überwinden.

Die im Rahmen der Einzelarbeiten durchgeführten Berechnungen haben gezeigt, dass die unter den verwendeten Bedingungen beobachteten Interferenzreduktionen hauptsächlich auf kinetische Energiediskriminierung zurückgeführt werden konnten. Einzig bei den in Beitrag 1 durchgeführten Untersuchungen wurden rechnerisch Kollisionsenergien innerhalb der Zelle ermittelt, die für eine Dissoziation der interferierenden Polyatome ausreichen würden.

Eine umfangreiche Darstellung zu den Mechanismen der kinetischen Energiediskriminierung im Zusammenhang mit dem in dieser Arbeit verwendeten CC-ICP-MS System wurde von *Yamada et al* und *Leonhard et al.*^{34, 35} veröffentlicht.

Eine detaillierte allgemeine Darstellung über den Einsatz von Kollisions- und Reaktionszellen in Verbindung mit ICP-MS sowie über die zugrundeliegende Theorie beschreiben *Tanner et al.*³⁶

Abbildung 2 zeigt den schematischen Aufbau des im Rahmen der Beiträge 1 und 2 verwendeten Kollisionszellen ICP-MS Systeme der Firma Agilent Technologies (Agilent 7500 c).

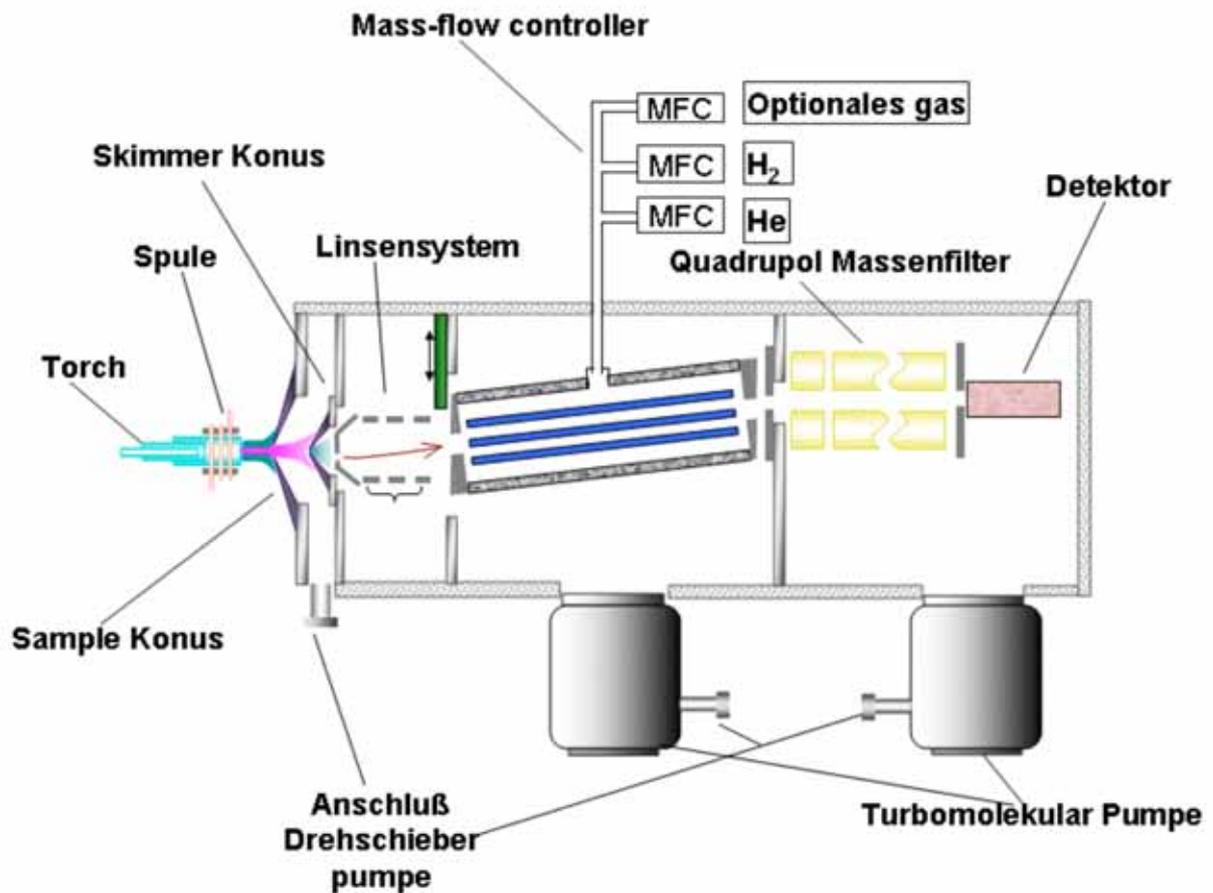


Abbildung 2 Schematische Darstellung des in den Beiträgen 1 und 2 verwendeten Kollisionszellen ICP-MS (Agilent 7500 c mit „Off-Axis“ Octapole Kollisionszelle)

Die Abbildung 3 zeigt den schematischen Aufbau des in den Beiträgen 3-5 verwendeten Kollisionszellen ICP-MS System (Agilent 7500 cs). Dieses weist eine veränderte Ionenoptik sowie eine lineare Anordnung der Kollisionszelle zu dem sich anschließenden Quadrupolmassenfilter auf. In ihrer Gesamtheit führen diese technischen Veränderungen zu einer um den Faktor 3 bis 5 höheren Empfindlichkeit des Gesamtsystems bei gleich guter Matrixtoleranz und Interferenzreduktion, wie eigene Messungen gezeigt haben.

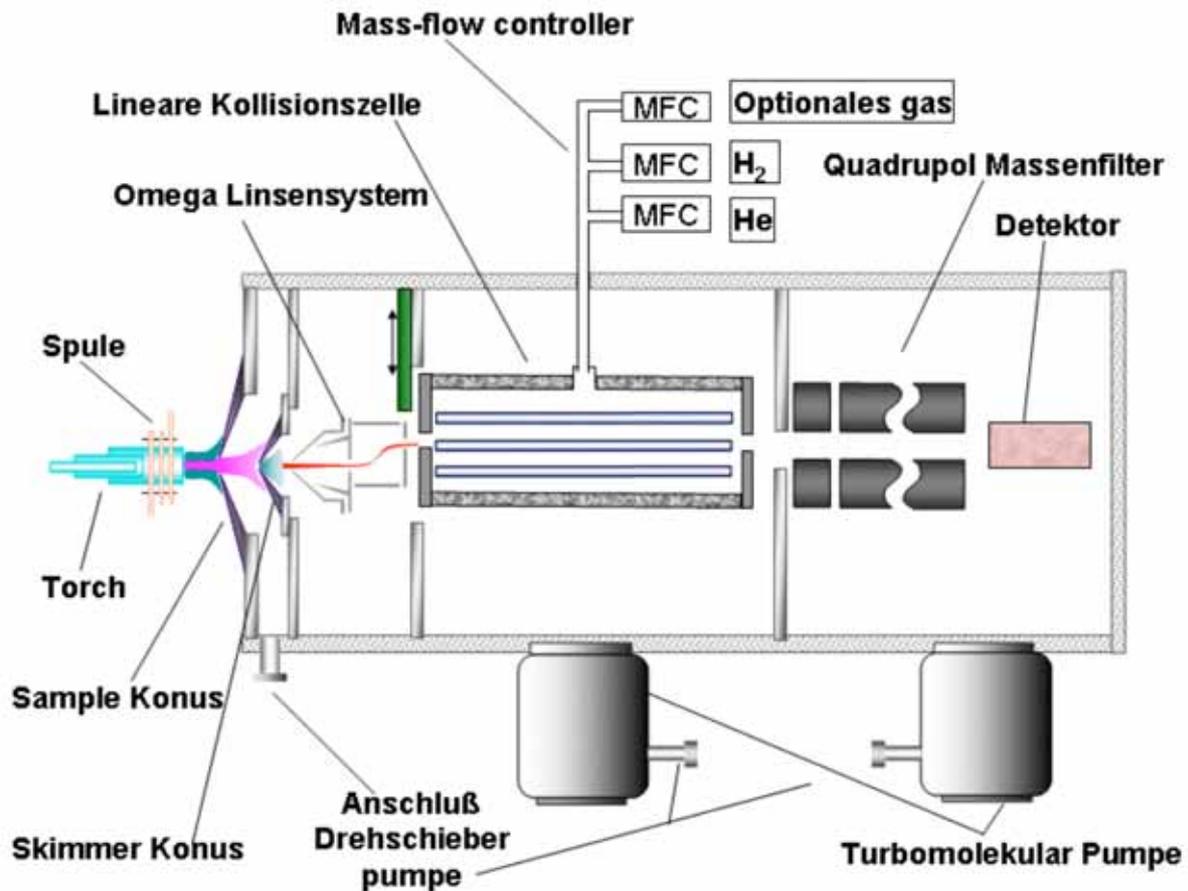


Abbildung 3 Schematische Darstellung des in den Arbeiten 3, 4 und 5 verwendeten Kollisionszellen ICP-MS (Agilent 7500 cs mit linearer Octapole Kollisionszelle und „Off-Axis“ Omega Linsensystem)

2.2.3 Elektrospray Ionisations Tandem Massenspektrometrie (ESI-MS-MS)

Im Gegensatz zur ICP-MS, bei der nach dem Ionisationsprozess als Folge der herrschenden Plasmabedingungen sämtliche molekulspezifischen Informationen der zu untersuchenden Probe verlorengegangen sind, bleiben beim Elektrospray Ionisationsprozess (ESI) molekulspezifische Informationen erhalten.

Die zu untersuchende Probe wird dabei versprüht und über eine Potentialdifferenz von bis zu 5 kV in den stufenweise evakuierten Interfacebereich des Massenspektrometers geleitet.

Nach der Zerstäubung kommt es in dem Nebel zur Ausbildung kleiner elektrostatisch geladener Tröpfchen. Das in ihnen enthaltene Lösungsmittel verdampft, wobei eine Agglomeration der Tropfen durch ihre gegenseitige elektrische Abstoßung unterbunden wird. Durch eine immer weiter fortschreitende Verdampfung des

Lösungsmittels kommt es zu einer Reduzierung des Tropfendurchmessers und einer starken Erhöhung der Ladungsdichte, bis schließlich eine Coulomb Explosion stattfindet. Am Ende dieses Prozesses bleiben einfach und mehrfach geladene Probenmoleküle übrig, die im Massenspektrometer nach ihrer Masse zu Ladungsverhältnissen getrennt werden können.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein quadrupolbasierendes Tandemmassenspektrometer verwendet. Abbildung 4 zeigt eine schematische Darstellung eines solchen Massenspektrometers mit der zugehörigen ESI Ionisationsquelle. Dieses besteht aus drei linear zueinander angeordneten Quadrupolmassenfiltern, deren Funktionsweise bereits unter 2.2.1 beschrieben wurde.

Der erste und der dritte Quadrupol werden dabei als Massenfilter betrieben, während der zweite zur Weiterleitung der Ionen und als Kollisionszelle dient. In diesen Bereich wird ein Stoßgas wie z.B. Stickstoff eingeleitet.

Durch Kollisionen der Ionen mit dem Stoßgas wird ihre kinetische Energie in Vibrationsenergie umgewandelt, die schließlich zu einer Fragmentierung des Ions führt, die auch als kollisionsinduzierte Dissoziation (CID) bezeichnet wird.

So ist es möglich, mit Hilfe des ersten Quadrupol ein Gesamtmassenspektrum der Probe aufzunehmen und aus diesem gezielt Ionen mit bestimmten Masse zu Ladungsverhältnissen auszuwählen („*Precursor Ion*“ oder „*Mutterion*“), die dann in die Kollisionszelle weitergeleitet und dort fragmentiert werden.

Die dabei entstehenden Ionen werden im dritten Quadrupol aufgetrennt und ergeben das Fragment- bzw. Produktionenspektrum der vorab ausgewählten „*Mutterionen*“, aus dem direkte Rückschlüsse auf ihre Struktur möglich sind.

Solche „MS-MS“ Experimente werden beispielsweise für die Ermittlung der Aminosäuresequenz von Proteinen oder Peptiden verwendet.

Abbildung 4 zeigt noch einmal den schematischen Aufbau eines Elektrospray Tandem Massenspektrometers sowie die einzelnen Phasen des Elektrospray Prozesses.

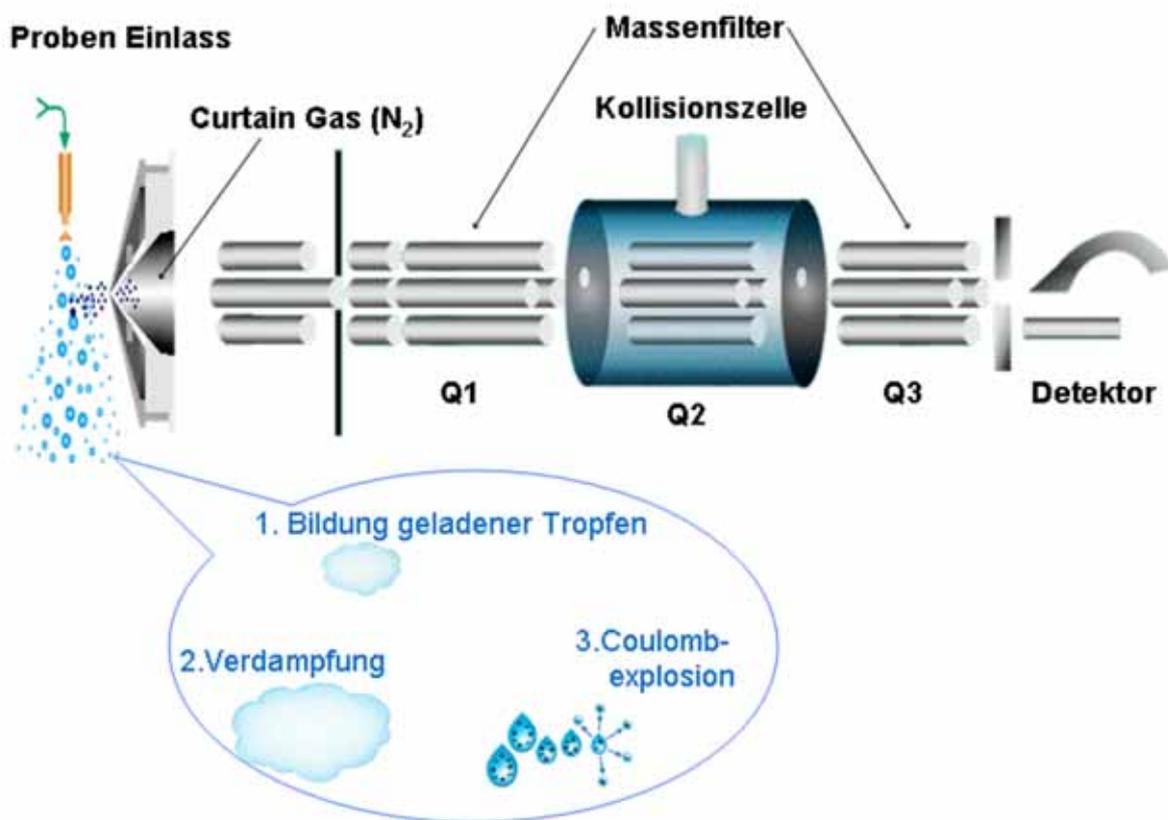


Abbildung 4 Schematische Darstellung des in Beitrag 2 und 3 verwendeten Elektrospray Ionisations Tandem Massenspektrometers (ESI-MS-MS) und des Elektrospray Prozesses (Applied Biosystems API 4000)

2.3 Detektion von Heteroatomen mit gekoppelten, ICP-MS basierenden Techniken – Stand der Wissenschaft

Heteroelemente wie Phosphor, Schwefel, Chlor, Brom oder Iod zählen zu den am schwierigsten mit ICP-MS zu detektierenden Elementen. Hohe erste Ionisationspotentiale, schlechte Ionisierungseffizienzen in einem Argonplasma sowie die Bildung von interferierenden Molekülionen im ca. 7000 K heißen Plasma zählen zu den Hauptprobleme bei der ICP-MS basierenden Detektion der genannten Heteroelemente.

Tabelle 1 gibt einen Überblick über die Ionisationspotentiale, die Ionisationseffizienzen und die Hauptinterferenzen der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Elemente.

Tabelle 1 Übersicht über die Ionisationspotentiale, die Ionisationseffizienzen und die Hauptinterferenzen der untersuchten Heteroelemente

Element	Isotope	Erstes Ionisations Potential	Ionisations Effizienz	Interferierende Molekülonen
P	³¹ P	10,484 eV	35 %	¹⁴ N ¹⁶ O ¹ H ⁺
S	³² S, ³³ S, ³⁴ S, ³⁶ S	10,357 eV	15 %	¹⁶ O ₂ ⁺
Cl	³⁵ Cl, ³⁷ Cl	13,01 eV	< 1 %	
Br	⁷⁹ Br, ⁸¹ Br	11,84 eV	5 %	
I	¹²⁷ I	10,454 eV	30 %	

Mit Quadrupol-, Kollisionszellen- und hochauflösender ICP-MS stehen drei leistungsfähige Techniken für eine heteroelementspezifische Detektion zur Verfügung. Der Vollständigkeit halber sei hier auch noch die Flugzeit ICP-MS (*Time-of Flight ICP-MS*) genannt, die jedoch aufgrund ihrer Seltenheit kaum Anwendung findet.

Da die Detektion von Cl, Br und I nur durch hohe Ionisationspotentiale und schlechte Ionisationseffizienzen limitiert wird, können diese Elemente mit ausreichender Empfindlichkeit über die Verwendung von Quadrupol ICP-MS nachgewiesen werden. Für die selektive und empfindliche Detektion von Phosphor und Schwefel ist der Einsatz von Kollisions- bzw. Reaktionszellen- oder hochauflösender ICP-MS erforderlich, um die interferierenden Molekülonen zu reduzieren bzw. physikalisch abzutrennen.

Neben den plasmabedingten Interferenzen limitieren weiterhin die durch die zum Probeneintrag verwendeten Trenntechniken verursachten Interferenzen eine heteroelementspezifische Detektion mit ICP-MS.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden CE, HPLC und GC als Trenntechniken verwendet. Menge, Zusammensetzung (wässrig oder organisch) und der Aggregatzustand (flüssig oder gasförmig) dessen was über das Trennsystem an Matrix in das Plasma eingetragen wird, sind hier die maßgeblichen Faktoren, die Einfluss auf die Bildung von weiteren Interferenzen haben.

Im folgenden wird ein Überblick über die Anwendungsbereiche und Limitationen von CE-, GC- und HPLC-Kopplungen in Verbindung mit ICP-MS als heteroelementspezifischen Detektor gegeben.

2.3.1 CE Kopplungen

Verschiedene Autoren beschreiben den Einsatz von CE-ICP-MS Kopplungen zur heteroelementspezifischen Detektion.

Schaumlöffel und Prange veröffentlichten die ersten Arbeiten zur heteroelementspezifischen Detektion mit CE-ICP-MS im Rahmen der Entwicklung einer auf Isotopenverdünnungsanalyse basierenden Quantifizierungsmethode für Metallothionein-Isoformen (MT), die zusätzlich Aussagen über die stöchiometrische Zusammensetzung der einzelnen Isoformen zulässt.

Hochauflösende ICP-MS in der mittleren Auflösung ($m/\Delta m=3000$) wurde verwendet, um die verschiedenen Interferenzen abzutrennen, die insbesondere die einzelnen Schwefelisotope überlagern.

Ein Elementspezies-unspezifischer Multielement Spike (^{33}S , ^{106}Cd , ^{65}Cu , ^{70}Zn) wurde zur Durchführung der Isotopenverdünnungsanalyse verwendet.

Die entwickelte Methodik erlaubte die Quantifizierung und stöchiometrische Charakterisierung von kommerziell erhältlichen MT Präparationen.

Nachweisgrenzen für Schwefel und verschiedenen Spurenelemente im mg L^{-1} Bereich wurden erreicht, was insbesondere auf die geringen Probenmengen zurückzuführen ist, die normalerweise bei CE Experimenten injiziert werden (in der Regel wenige nL).

Da keine probenspezifischen Standards für die Quantifizierung erforderlich sind, bietet sich diese Technik insbesondere für die Untersuchung unbekannter Substanzen an.³⁷⁻⁴¹

Polec-Pawlak et al verwendeten den von *Prange und Schaumlöffel* beschriebenen Ansatz zur Quantifizierung und stöchiometrischen Charakterisierung von Metallothioneinisoformen in Rattenleberproben.

ESI-MS wurde zusätzlich zur molekulspezifischen Charakterisierung der aufgetrennten Isoformen verwendet.⁴²

Yeh et al beschreiben in zwei Publikationen den Einsatz einer CE Kopplung mit Reaktionszellen ICP-MS zur phosphorspezifischen Detektion von Ribonukleotiden in Glutamatproben sowie zur schwefelspezifischen Detektion von schwefelhaltigen Aminosäuren.

Sauerstoff wurde als Reaktionsgas verwendet, um beispielsweise Schwefel als Oxid auf der weniger interferierten Masse 48 ($^{16}\text{O}^{32}\text{S}^+$) zu detektieren.

Nachweisgrenzen für Phosphor bis zu $36 \mu\text{g L}^{-1}$ bzw. $47 \mu\text{g L}^{-1}$ Schwefel konnten erreicht werden.

In einer erst kürzlich erschienenen Publikation beschreiben *Van Lierde et al* den Einsatz von CE gekoppelt mit hochauflösender ICP-MS in der mittleren Auflösung zur stöchiometrischen Charakterisierung des Zinkproteins Metallobetalactamase AE036.

Auch hier wurde die bekannte Schwefelstöchiometrie des Proteins zu Quantifizierung herangezogen. Albumin und ZnCl_2 wurden als Schwefel bzw. Zn Standard für eine externe Kalibration verwendet, wodurch noch einmal die Komponentenunabhängigkeit des ICP-MS Detektionsprozesses gut verdeutlicht werden konnte.⁴³

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass vor allem hochauflösende ICP-MS in Verbindung mit CE zur heteroelementspezifischen Detektion eingesetzt wird.

Die Notwendigkeit bei einer Auflösung von $m/\Delta m=3000$ zu arbeiten reduziert zwar die Gesamtempfindlichkeit des Systems, es bleibt jedoch die Multielementfähigkeit erhalten.

Für CE Kopplungen mit Reaktionszellen ICP-MS wurden bisher noch keine simultane Detektion von Heteroelementen und Spurenelementen demonstriert, was insbesondere für biomedizinische Fragestellungen von großem Interesse sein kann.

Zwei Teile dieser Arbeit (Beitrag 1 und 2) befassen sich daher mit der Fragestellung, inwieweit der Einsatz einer CE Kopplung mit einem Kollisionszellen ICP-MS für eine simultane Detektion von Heteroelementen wie Phosphor und Schwefel sowie ausgesuchten Spurenelementen geeignet ist.

Helium und Xenon wurden als inerte Zellgase verwendet, um störende polyatomare Interferenzen zu minimieren.^{44, 45}

2.3.2 GC Kopplungen

Die heteroelementspezifische Detektion mit GC Kopplungen nimmt eine Sonderstellung ein.

Anders als bei CE oder HPLC Kopplungen, bei denen kontinuierlich relativ große, matrixhaltige Flüssigkeitsmengen als feines Aerosol ins Plasma gelangen, die dort verdampft und schließlich atomisiert und ionisiert werden müssen, gelangt bei GC Kopplungen quasi keine Matrix in das Plasma.

Einzig die in der Regel organische Lösungsmittelmatrix der injizierten Probe belastet das Plasma.

Da diese innerhalb der ersten Minuten eines chromatographischen Laufs von der Trennsäule eluiert wird, ergibt sich keine weitere nennenswerte Belastung des Plasmas während der eigentlichen chromatographischen Trennung und der Elution der Probenspezies.

Das zumeist als GC Trägergas verwendete hochreine inerte Helium stellt für das Plasma ebenfalls keine Matrix dar, sondern kann zur Empfindlichkeitssteigerung des Gesamtsystems beitragen^{46, 47}.

GC Kopplungen tragen meistens über einen speziellen Injektor den gesamten Gasstrom aus der Trennsäule direkt in das Plasma ein. Dieser Bereich ist durch das Argon Kühlgas, welches in der ICP Torch strömt, relativ gut vor Umgebungseinflüssen abgeschirmt, so dass kaum O₂ oder N₂ in das Plasma gelangen kann.

Dies hat zur Folge, dass selbst bei Quadrupol basierenden GC-ICP-MS Kopplungen kaum Interferenzen auf den Massen ³¹P sowie ³⁴S festzustellen sind. Das Isotop ³²S zeigt in der Regel noch einen erhöhten Untergrund, kann aber bei ausreichender Schwefelkonzentration in der Probe ebenfalls mit gemessen werden.

Meija et al verwendeten eine GC Kopplung mit Quadrupol ICP-MS zur Untersuchung flüchtiger Selen- und Schwefelspezies, die im Metabolismus der hyperakkumulierenden Pflanze *Brassica juncea* gebildet werden. Schwefel wurde hier auf der Masse ³⁴S detektiert.⁴⁸

In einer aktuellen Arbeit von *St. Remy et al* wird eine GC Kopplung mit Hochauflösender ICP-MS zur schwefelspezifischen Detektion und Quantifizierung von Homocystein in Serumproben verwendet.

Durch die Verwendung einer Auflösung von $m/\Delta m=3000$ konnte Schwefel als $^{32}\text{S}^+$ interferenzfrei auf seinem Hauptisotop detektiert werden.

Krupp et al verwendeten eine GC Kopplung mit einem Hochauflösenden Multikollektor ICP-MS zur präzisen Isotopenverhältnismessung in gasförmigen Schwefelproben. Absolute Nachweisgrenzen im pg Bereich für alle gemessenen Schwefelisotope wurden erreicht. Aus einer 30 ng Schwefelprobe konnte das Isotopenverhältnis $^{32}\text{S}/^{34}\text{S}$ mit einer relativen Standardabweichung von 0.03% bestimmt werden.⁴⁹

Rodriguez-Fernandez et al koppelten GC über ein selbstentwickeltes Interface mit hochauflösender ICP-MS zur Speziation unbekannter schwefelhaltiger Verbindungen, die ursächlich für die Entstehung von Mundgeruch verantwortlich sind.

Alle Messungen wurden mit dem Hauptisotop ^{32}S durchgeführt. schwefelspeziesabhängige Nachweisgrenzen zwischen 8 und 33 $\mu\text{g L}^{-1}$ konnten erreicht werden.⁵⁰

Schwarz und Heumann beschreiben ein aus Quadrupol ICP-MS und ECD bestehendes zweidimensionales online-Detektionssystem für eine GC Kopplung. Die Kopplung wurde zur elementselektiven Detektion von flüchtigen, chlor-, brom- und iodhaltigen Verbindungen herangezogen, die aus Meerwasser bzw. Luftproben isoliert wurden.

Für die ICP-MS Detektion wurden absolute Nachweisgrenzen von 0.5 pg für iodierte, 10 pg für bromierte sowie 50 pg für chlorierte Verbindungen erreicht - unabhängig von den zur Berechnung eingesetzten Kalibrationskomponenten. Dies verdeutlicht ebenfalls noch einmal die Komponentenunabhängigkeit des ICP-MS Detektionsprozess.

Die absoluten Nachweisgrenzen der simultan durchgeführten ECD Detektion variierten je nach Verbindung zwischen 0.03-11 pg.⁵¹

Vonderheide et al verwendeten „schnelle“ Gaschromatographie und ICP-MS zur elementspezifischen Detektion von bromierten Flammschutzmitteln in Klärschlämmen.

Helium als Plasmazusatzgas führte zu einer deutlichen Empfindlichkeitssteigerung. Nachweisgrenzen im unteren $\mu\text{g L}^{-1}$ Bereich wurden hier erzielt.

Erst kürzlich veröffentlichten *Wuilloud et al* eine Arbeit über den Nachweis von iodierten Phenolspezies in Wasserproben unter Verwendung einer GC-ICP-MS Kopplung.

Durch den Einsatz von unterschiedlichen Festphasen-Mikroextraktionsmethoden konnten Nachweisgrenzen im untersten ng L^{-1} Bereich erzielt werden. Die Zugabe von Sauerstoff als Plasmazusatzgas führte zu einer Verbesserung der instrumentellen Nachweisgrenzen.⁵²

Pavageau et al demonstrierten den Einsatz von Quadrupol ICP-MS und GC zur Detektion von Phosphinmissionen in einer Tabakfabrik. Kryotrapping wurde zur selektiven Probennahme und Anreicherung verwendet.⁵³

Insgesamt zeigt sich, dass sowohl Quadrupol als auch Hochauflösende ICP-MS im Bereich der GC Analytik von heteroelementhaltigen Verbindungen eingesetzt werden. Außer beim Schwefel konnten in der Regel die Hauptisotope der einzelnen Elemente zur Detektion herangezogen werden.

Für eine reine schwefelspezifische Detektion wurde bisher nur hochauflösende ICP-MS verwendet, die bei einer Auflösung von $m/\Delta m=3000$ eine interferenzfreie Detektion auf dem Hauptisotop ^{32}S zulässt.^{50, 54}

Die Analytik von Pestiziden mit GC-CC-ICP-MS wird erstmalig von *Vonderheide et al* beschrieben.

Kollisionzellen ICP-MS wurde zur phosphorspezifischen Detektion phosphorhaltiger Pestizide verwendet. Stickstoff wurde zur Empfindlichkeitssteigerung des ICP-MS verwendet. Gleichzeitig kam es jedoch auch zu einer Erhöhung des Untergrundes auf der Masse ^{31}P . Helium und kinetische Energiediskriminierung wurden daher zur Untergrundreduktion verwendet.

Nachweisgrenzen im hohen ng L^{-1} Bereich wurden bei der Untersuchung von Wasserproben ermittelt.⁵⁵

Leider wird in dieser Arbeit das Potential der GC-CC-ICP-MS, insbesondere ihre Multielementfähigkeit, nicht ausgeschöpft. Da fast alle Pestizide mindestens eins der Heteroelemente Phosphor, Schwefel, Chlor, Brom oder Iod enthalten, ermöglicht der Einsatz von GC-CC-ICP-MS ein schnelles und hochselektives Pestizidscreening in Umweltproben.

GC-AED bietet eine ähnlich hohe Selektivität für Heteroelemente, zeigt jedoch wesentlich schlechtere Empfindlichkeiten im Vergleich zu anderen GC Detektoren.

In Beitrag 4 dieser Arbeit wird erstmalig der Einsatz einer GC Kopplung mit Kollisionzellen ICP-MS zur simultanen, elementspezifischen Detektion von phosphor-, schwefel-, chlor-, brom- und iodhaltigen Pestiziden beschrieben, welche insbesondere durch ihre hohe Selektivität, Robustheit und Nachweisstärke im Vergleich mit etablierten Detektionstechniken für Pestizide hervorsticht.

2.3.3 HPLC Kopplungen

HPLC Kopplungen mit ICP-MS wurden bereits für verschiedene Anwendungen im Bereich der heteroelementspezifischen Detektion angewendet.

Kritische Punkte bei der Realisation entsprechender Kopplungen ergeben sich insbesondere aus der Menge und der Art des verwendeten HPLC Eluenten.

Bei zu großen Flussraten wird vergleichsweise mehr Plasmaenergie benötigt, um das durch den Zerstäuber produzierte Aerosol zu trocknen und schließlich zu atomisieren bzw. zu ionisieren.

Angeichts der hohen Ionisationspotentiale der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Elemente kann dies eine schlechtere Ionisationseffizienz zur Folge haben.

Die Art des Eluenten hat einen großen Einfluss auf die Gesamtempfindlichkeit der HPLC-ICP-MS Kopplung sowie ihre Langzeitstabilität.

Während rein wässrige mobile Phasen, wie sie beispielsweise bei der zumeist isokratisch durchgeführten Größenausschlusschromatographie (SEC) verwendet werden, relativ unproblematisch eingesetzt werden können, ist der Einsatz von mobilen Phasen mit einem hohen Anteil an organischen Lösungsmitteln, wie sie beispielsweise bei Gradiententrennungen eingesetzt werden, teilweise recht problematisch.

Die unvollständige Oxidation der organischen Bestandteile der mobilen Phase führt zur Deposition von Kohlenstoff auf dem Sample- und Skimmerkonus des ICP-MS. Dies zieht oftmals einen kontinuierlichen Empfindlichkeitsverlust während einer chromatographischen Trennung nach sich, bis die Konen zugewachsen sind und keine Ionentransmission mehr gewährleistet ist.

Durch die Zugabe von Sauerstoff kann dieser Effekt minimiert werden, es besteht dabei jedoch die Gefahr, dass der Untergrund auf den Massen ^{31}P und ^{32}S zum Teil stark erhöht wird.

Für einige Elemente ergibt sich aus dem Einsatz von organischen mobilen Phasen eine Empfindlichkeitssteigerung, die auf verbesserte Ionisierungsvorgänge und Energieübertragung im Plasma zurückzuführen sind.⁵⁶ Ab einem bestimmten Anteil organischer Lösungsmittel in der mobilen Phase kommt es jedoch auch hier zu einer Signalsuppression.

Bereits 1993 setzten *Takatera und Watanabe* HPLC-ICP-MS zur heteroelementspezifischen Detektion von Iodoaminosäuren ein, die sie in enzymatisch Verdauten Rinder Thyroglobulinproben vermuteten.

Für Iod erreichten sie absolute Nachweisgrenzen zwischen 35 bis 130 pg, wodurch sich im Vergleich zu den damaligen auf radioaktiven Isotopen basierenden Standardanalysetechniken eine um etwa eine Größenordnung verbesserte Empfindlichkeit ergab.⁵⁷

Radlinger und Heumann zeigten erstmalig die simultane Detektion von verschiedenen Chlor, Brom und Iodspezies, die sich durch Anlagerung an Huminstoffe gebildet haben.

Verschiedene Wasserproben wurden untersucht und über den Einsatz der online-Isotopenverdünnungsanalyse war es möglich, verschiedene Iodspezies zu quantifizieren.

Die Quantifizierung der gefundenen Chlor- und Bromspezies war nicht möglich, da ein Quadrupol ICP-MS System verwendet wurde und unter den gewählten Bedingungen spektrale Interferenzen die Chlor- und Bromdetektion störten.⁵⁸

Neuere Veröffentlichungen verwenden HPLC-ICP-MS hauptsächlich für die Detektion von Chlor, Brom und Iodspezies in Medikamenten⁵⁹ und ihren Abbauprodukten^{60, 61} sowie in Lebensmitteln⁶².

Jensen et al setzten in diesem Zusammenhang Membrandesolvatisierung ein, um eine Reduzierung der organischen Phase zu erreichen, bevor diese das Plasma erreicht.

Bis zu 100 % Methanol konnte als mobile Phase eingesetzt werden, es ergaben sich jedoch komponentenabhängige Unterschiede in der Empfindlichkeit, die auf einen Verlust einzelner Analyten im Desolvatisierungssystem zurückzuführen sind.

Siethoff et al demonstrierten als erstes den komplementären Einsatz von element- und molekulspezifischer Massenspektrometrie zur heteroelementspezifischen Detektion.

Hochauflösende ICP-MS und HPLC wurde verwendet um Styrenoxidaddukte der verschiedenen DNS Nukleotide phosphorspezifisch zu detektieren und über die bekannte Phosphorstöchiometrie zu quantifizieren.

ESI-MS wurde zur molekülspezifischen Charakterisierung einzelner Addukte verwendet. Durch den Einsatz einer Säulenschaltung zur Vorkonzentrierung der Probe konnte die Detektion von 14 veränderten Nukleotiden in einer Gesamtheit von 10^8 Nukleotiden gezeigt werden, was etwa der Empfindlichkeit entspricht, die mit Standardtechniken der DNS Analytik erreicht werden.⁶³

Der komplementäre Einsatz von HPLC gekoppelt mit ICP-MS und ESI-MS zur Untersuchung von post-translatorisch veränderten Proteinen wird erstmalig von *Wind et al* am Beispiel verschiedener phosphorylierter Proteine beschrieben. Hochauflösende ICP-MS mit einer Auflösung von $m/\Delta m=3000$ zur Abtrennung isobarer Interferenzen und Kapillar-LC zur Verbesserung der chromatographischen Auflösung und der Empfindlichkeit kamen bei ihren Versuchen zum Einsatz.⁶⁴

Sie führten auch erste Versuche mit Kollisionszellen ICP-MS und Wasserstoff als Zellgas zur Interferenzreduzierung durch.

Zusätzlich musste Membrandesolvatisierung eingesetzt werden, um den Untergrund auf der Masse ^{31}P auf ein annehmbares Maß zu reduzieren. Daneben kam es insbesondere bei Peptiden mit längeren Retentionszeiten zu Verlusten im Desolvatisierungssystem.

Weiterhin ging ein Teil der durch den Einsatz von Kapillar LC verbesserten chromatographischen Auflösung durch das große Totvolumen des Desolvatisierungssystems wieder verloren⁶⁴.

In einigen Versuchen wurde Schwefel simultan mit Phosphor detektiert und als interner Standard zur Quantifizierung von phosphorylierten Proteinen und zur Bestimmung ihres Phosphorylierungsgrades verwendet⁶⁵.

Bei allen Versuchen wurden PFA Mikrozerstäuber bzw. ein modifizierter Direkt-Injektions-Hocheffizienzzerstäuber (DIHEN) zur Kopplung von Kapillar-LC und HR-ICP-MS verwendet.

Die gewählten Optionen stellen einen Kompromiss dar, da beide Zerstäubertypen normalerweise optimale Empfindlichkeit bei höheren Flussraten erzielen.⁶⁶

Ein Beitrag dieser Arbeit (Beitrag 2) beschäftigt sich daher mit der Fragestellung, inwieweit eine direkte Kopplung von HPLC und Kollisionszellen ICP-MS zur

phosphorspezifischen Detektion von DNS Nukleotiden ohne den zusätzlichen Einsatz von Membrandesolvatisierung zu realisieren ist.

In einer zweiten Arbeit (Beitrag 3) wurde ein neues Interface zur Kopplung von Kapillar-HPLC mit CC-ICP-MS entwickelt, um die Flussraten der LC und die damit einhergehenden, matrixbedingten Interferenzen noch weiter zu reduzieren.

Erstmalig konnte mit diesem Interface der Einsatz von nano-LC in Verbindung mit ICP-MS gezeigt werden.

2.3.4 Zusammenfassung

Zusammenfassend zeigen sich folgende Problemfelder bezüglich einer heteroelementspezifischen Detektion mit Hilfe der ICP-MS:

- Eine Phosphorspezifische Detektion unter gekoppelten Bedingungen mit einem Kollisionszellen ICP-MS konnte bisher nur in Verbindung mit zusätzlichen Techniken wie Membrandesolvatisierung gezeigt werden. Nur so war es möglich, akzeptable Untergrundzählraten zu erreichen. Gleichzeitig zeigten sich Verluste einzelner Komponenten im Desolvatisierungssystem sowie todvolumenbedingte Veränderungen in der chromatographischen Auflösung.⁶⁴
- Die durch den Einsatz von organischen Lösungsmitteln bedingten Veränderungen im Plasma, die insbesondere im Verlauf einer Gradiententrennungen zu ständig wechselnden Empfindlichkeiten für einzelne Elemente führen, erfordern insbesondere bei quantitativen Betrachtungen mathematische Kompensationsrechnungen. Gleichzeitig ist ein direkter Eintrag von großen Mengen organischer Lösungsmittel in das Plasma, wie sie bei Gradiententrennungen verwendet werden, gar nicht oder nur im geringen Umfang in Verbindung mit dem Einsatz von Sauerstoff zur Kohlenstoffoxidation möglich.^{63, 65}
- Eine schwefelspezifische Detektion mit gekoppelten Systemen unter Verwendung des Hauptisotops ³²S konnte bisher nur unter Verwendung von hochauflösender ICP-MS gezeigt werden.^{42, 67}

Nur in Verbindung mit GC als Trenntechnik und den sich daraus ergebenden besonderen Plasmabedingungen konnte Quadrupol ICP-MS zur Schwefeldetektion auf dem Isotop ^{34}S verwendet werden.⁴⁸

^{32}S zeigte auch unter diesen Bedingungen einen stark erhöhten auf die polyatomare Interferenz $^{16}\text{O}_2^+$ zurückzuführenden Untergrund.

Unter Verwendung eines Kollisionszellen ICP-MS wurden folgende Ansätze im Rahmen dieser Arbeit verfolgt und untersucht, um die oben definierten Problemfelder zu lösen:

- Helium bzw. Xenon als Zellgas und kinetische Energiediskriminierung durch spezielle Einstellungen der *Tune-Parameter* wurden eingesetzt, um Interferenzen auf der Masse des Phosphors (^{31}P) sowie auf dem Hauptisotop des Schwefels (^{32}S) auf ein annehmbares Maß zu reduzieren.
- Ein neues Interface zur Kopplung von Kapillar HPLC und CC-ICP-MS wurde entwickelt, um die Menge dessen, was über das Trennsystem an Matrix in das Plasma eingetragen wird, auf ein Minimum zu reduzieren, um somit die Nachweisempfindlichkeit bei gleichzeitiger Steigerung der chromatographischen Auflösung zu verbessern und den Einsatz von Gradienten mit hohem Anteil an organischen Lösungsmitteln zu ermöglichen.
- GC als Trenntechnik sowie ein CC-ICP-MS System mit einer linearen Kollisionszelle sowie einer verbesserten Ionenoptik wurden eingesetzt, um matrixbedingte Interferenzen noch weiter zu reduzieren und somit erstmalig die simultane Detektion der Heteroelemente Phosphor, Schwefel, Chlor, Brom und Iod im ng L^{-1} Bereich zu ermöglichen. Durch den Einsatz von Helium als Zellgas zur Untergrundminimierung konnte Schwefel mit hoher Empfindlichkeit auf seinem Hauptisotop ^{32}S detektiert werden.

3 Zusammenfassung der einzelnen Beiträge

Im folgenden werden die 5 Einzelbeiträge dieser Arbeit zusammengefasst und wichtige Ergebnisse kurz dargestellt.

3.1 Beitrag 1

“Determination of sulfur and selected trace elements in metallothionein-like proteins using capillary electrophoresis hyphenated to inductively coupled plasma mass spectrometry with an octopole reaction cell”

Analytical and Bioanalytical Chemistry (2003) 377 : 132-139

Wie in Kapitel 2.3.1 dargestellt, zählt die Kapillarelektrophorese zu den derzeit leistungsfähigsten Trenntechniken die für biologisch relevante Fragestellungen zur Verfügung steht. In Verbindung mit ICP-MS steht eine leistungsfähige Technik zur elementspezifischen Detektion von biologisch relevanten Molekülen zur Verfügung. Seit ihrer Entdeckung im Jahre 1957 durch *Margoshes und Vallee* stehen Metallproteine wie Metallothioneine im Fokus verschiedenster Untersuchungen. Metallothioneine zählen zu einer Gruppe niedermolekularer Proteine (6-7 kDa), die in der Regel aus 61-68 Aminosäuren bestehen. Durch ihren hohen Cysteingehalt bzw. Schwefelgehalt können insbesondere d¹⁰ Elemente wie Cu, Zn, Cd und Hg gut komplexiert werden.⁶⁸ Metallothioneine treten zumeist in zwei Hauptisoformen auf (MT-1 bzw. MT-2), die kleine Unterschiede in ihren Aminosäuresequenzen aufweisen, welche auf einen genetischen Polymorphismus zurückzuführen sind. Daneben bilden verschiedene Tierarten Subisoformen der beiden Hauptisoformen MT-1 und MT-2 aus.⁶⁹ Neben den zwei Hauptisoformen wurden weitere Isoformen (MT-3, MT-4) in spezifischen Geweben von Säugetieren gefunden.^{70, 71} Die Proteinbiosynthese von Metallothioneinen kann durch verschiedenste Faktoren induziert werden. Zu den wichtigsten zählen Schwermetallionen wie Cu⁺, Cd²⁺ oder Zn²⁺, Hormone, Vitamine, Antibiotika oder durch Strahlung bzw. Sauerstoff verursachter zellulärer Stress.⁶⁹

Metallothioneine sind in verschiedene Prozesse auf zellulärer Ebene eingebunden. Dazu zählen Schwermetalldetoxifizierung, Zink- und Kupferhomeostasis, Schutz vor oxidativen Schäden oder als ein Teil des „*Acute Phase Systems*“.⁷⁰

Aufgrund ihrer besonderen Rolle im Metabolismus verschiedenster Tierarten und ihrer Induzierbarkeit durch anorganische Kontaminaten in der Umwelt, wurde bereits vor etwa 20 Jahren darüber nachgedacht Metallothioneine als empfindlichen Bioindikator für die Schwermetallbelastung aquatischer Organismen zu verwenden.⁷²⁻⁷⁷

Da verschiedene Metallothioneinisoformen unterschiedliche Funktionen im Organismus haben, werden robuste und hochauflösende Trenntechniken benötigt, um die einzelnen Isoformen voneinander trennen zu können und Aussagen über ihr Verhalten bei unterschiedlichen Stoffwechselphysiologischen Zuständen eines Organismus treffen zu können.

Kapillarelektrophorese gekoppelt mit ICP-MS stellt eine gute Kombination für die hochaufgelöste Trennung und anschließende elementspezifische Detektion von MT Isoformen dar.

Wie bereits erwähnt, zeichnen sich Metallothioneine durch ihren hohen Cystein und damit verbundenen Schwefelgehalt aus. Da dessen Stöchiometrie weitestgehend bekannt und konstant ist, bietet sich die Möglichkeit, darüber Metallothioneine zu quantifizieren bzw. die stöchiometrische Zusammensetzung einzelner Isoformen zu ermitteln.⁶⁸⁻⁷¹

Schwefel zählt zu den Elementen, die in der ICP-MS stark durch polyatomare Interferenzen gestört werden, die sich unter den im Plasma herrschenden Bedingungen bilden. Insbesondere das im Plasma ubiquitär vorkommende polyatomare Ion $^{16}\text{O}_2^+$ mit einer Masse von 31,98983 Da überlagert das Hauptisotop des Schwefels (^{32}S), das eine Masse von 31,97207 Da aufweist.

Das Auflösungsvermögen normaler quadrupolbasierender ICP-MS Systeme ist nicht ausreichend, um die oben genannten exakten Massen voneinander zu trennen, so dass in einem Massenspektrum bei Einheitsauflösung vor allem das interferierende Molekülion $^{16}\text{O}_2^+$ in Erscheinung tritt.

Hochauflösende Sektorfeld ICP-MS mit einer Auflösung von $m/\Delta m = 4000$ eignet sich zur physikalischen Abtrennung aller spektralen Interferenzen, die eine Bestimmung von Schwefel mit ICP-MS stören. Trotz einer um ca. 90 % reduzierten

Empfindlichkeit sind je nach verwendeter Trenntechnik Nachweisgrenzen im oberen ng L⁻¹ bis unteren µg L⁻¹ Bereich möglich

Schaumlöffel und Prange verwendeten daher eine Kopplung zwischen CE und einem hochauflösenden Sektorfeld ICP-MS sowie Isotopenverdünnungsanalyse zur Quantifizierung und stöchiometrischen Charakterisierung von Metallothioneinisoformen.³⁸

Die Langzeitstabilität der hochauflösenden ICP-MS, insbesondere in der mittleren und hohen Auflösung, unterliegt oftmals starken Schwankungen. So kommt es häufig zu einer Drift der Massenachse des verwendeten Systems, welche in der Regel auf thermische Veränderungen in der Umgebung des Magneten zurückzuführen ist.

Quadrupolbasierende ICP-MS Systeme zeichnen sich im Vergleich dazu durch Ihre Robustheit und Langzeitstabilität aus. Mit der Markteinführung von Kollisions- bzw. Reaktionszellen ICP-MS Systemen steht eine weitere Technik zur Reduktion von spektralen Interferenzen zur Verfügung.

Beitrag 1 zeigt, inwieweit quadrupolbasierende Kollisionszellen ICP-MS gekoppelt mit Kapillarelektrophorese unter der Verwendung von Xenon als Zellgas für die simultane Bestimmung von Spurenelementen und Schwefel auf seinem Hauptisotop ³²S in Metallothionein Proben geeignet sind und wo zur Zeit die limitierenden Faktoren liegen.

Die verwendeten Trennbedingungen und die durchgeführten Probenvorbereitungsschritte basieren auf den bei *Pröfrock et al* durchgeführten Optimierungen.⁷⁸

Der Einsatz von Xenon als Zellgas mit einer Flussrate von ca. 0,2 mL min⁻¹ führte zu einer drastischen Reduktion des spektralen Untergrundes auf allen Schwefelisotopen. Die Berechnung der unter den gewählten instrumentellen Parametern zu realisierenden Kollisionsenergie zeigte, dass diese ausreichen würden, um eine Dissoziation der interferierenden ¹⁶O₂⁺ Molekülonen herbeizuführen. Da neben der ¹⁶O₂⁺ Interferenz die gesamte Ionentransmission des Systems reduziert wird, scheint es jedoch wahrscheinlicher, dass die Interferenzreduzierung hauptsächlich auf eine kinetische Energiediskriminierung der ¹⁶O₂⁺ Molekülonen durch die relativ großen und schweren Xe Atome zurückzuführen ist.

Daraus ergab sich insgesamt eine Verschlechterung der instrumentellen Nachweisgrenzen im Vergleich zu Ergebnissen, die unter Verwendung von Wasserstoff oder Helium als Zellgas ermittelt wurden.^{28, 35}

Unter gekoppelten Bedingungen wurden Nachweisgrenzen für Schwefel und Cadmium von 15 bzw. 1 mg L⁻¹ erreicht. Diese hohen relativen Nachweisgrenzen sind insbesondere auf die kleinen Probenmengen zurückzuführen, die in der CE eingesetzt werden (hier wenige nL Injektionsvolumen) sowie auf die insgesamt reduzierte Empfindlichkeit des CC-ICP-MS Systems welche durch die Verwendung von Xe als Zellgas bedingt wird.

Anhand eines Metallothionein 1 (MT-1) Standards konnte gezeigt werden, dass CE-CC-ICP-MS eine geeignete Methode zur simultanen Detektion von Schwefel, Kupfer, Zink und Cadmium in biologisch relevanten Molekülen ist.

Schwefel und Cadmium Elementstandards wurden erfolgreich für eine komponentenunabhängige Bestimmung des Schwefel- und Cadmiumgehalts der verwendeten MT-1 Präparation nach CE Trennung verwendet.

Mit Hilfe der Totalreflexions-Röntgen-Fluoreszenz Analyse (TXRF) als unabhängige Mikromethode wurde der Gesamtschwefel und Cadmiumgehalt der untersuchten Probe zusätzlich bestimmt und so die Anwendbarkeit des komponentenunabhängigen Kalibrationsansatzes bestätigt.

Um abzuklären, inwieweit Realproben, die Metallothioneine auf natürlichem Konzentrationsniveau aufweisen, mit der entwickelten Methode untersucht werden können, wurden metallothioneinähnliche Proteine aus einer Fischprobe extrahiert und mit CE-CC-ICP-MS elementspezifisch detektiert.

Kupfer-, Zink- und Cadmiumhaltige Spezies konnten in der Probe ohne die Verwendung von Xe als Zellgas detektiert werden. Mit Xenon als Zellgas zeigte sich, dass alle detektierten Spezies auch Schwefel enthielten, was auf die Anwesenheit von metallothioneinähnlichen Proteinen hindeutet. Cadmium war unter diesen Bedingungen nicht mehr detektierbar, da es insgesamt nur in geringer Konzentration in der Probe enthalten war und seine Ionentransmission zusätzlich stark durch das verwendete Zellgas reduziert wurde.

Die Ergebnisse verdeutlichen, dass die Anwendung der CE-ICP-MS Kopplung unter Verwendung von Xe als Zellgas im Hinblick auf die erreichbaren Nachweisgrenzen bei Realproben an ihre Grenzen stößt. Abhilfe kann hier eine weitergehende Probenvorbereitung schaffen, die Anreicherungsschritte und eine Matrixabtrennung

beinhaltet. Eine Erhöhung der aufgegebenen Probenmenge durch „*Stacking Methoden*“, wie sie in der jüngsten Literatur beschrieben werden, kann ebenfalls zu einer Empfindlichkeitssteigerung und damit verbundenen Verbesserung der Nachweisgrenzen beitragen.⁷⁹

Weiterführende Untersuchungen mit molekülspezifischen Detektionstechniken können dabei helfen, die detektierten schwefelhaltigen Proteine zweifelsfrei über ihre Aminosäuresequenz als Metallothionein zu identifizieren.

3.2 Beitrag 2

“Determination of phosphorus in phosphorylated deoxyribonucleotides using capillary electrophoresis and high performance liquid chromatography hyphenated to inductively coupled plasma mass spectrometry with an octopole reaction cell”

J. Anal. At. Spectrom., 2003, 18, 708-713

Beitrag 2 befasst sich mit der phosphorspezifischen Detektion von DNS Nukleotiden. Neben den Elementen Kohlenstoff, Wasserstoff, Sauerstoff und Stickstoff zählen Nichtmetalle wie Schwefel und Phosphor zu den am häufigsten in biologischen Proben anzutreffenden Elementen.

Phosphor spielt eine wichtige Rolle im Bereich der Proteinphosphorylierung, der Speicherung und des Transports von Energie auf zellulärer Ebene oder als strukturgebender Bestandteil des Ribose/Desoxyribose-Phosphor Skelett der RNS bzw. DNS Kette.⁸⁰

Die Bestimmung von Phosphor gibt so beispielweise Auskunft über den Phosphorylierungsgrad von Proteinen⁶⁵, welcher einen großen Einfluss auf verschiedene metabolische Prozesse hat, oder sie ermöglicht den Nachweis und die Quantifizierung von RNS oder DNS bzw. ihrer Addukte aufgrund der bekannten Phosphorstöchiometrie.⁶³

Auf ³²P basierende radioaktive Labelingtechniken gehören zu den Standardmethoden, die im Bereich der Phosphorylierungsanalyse zum Einsatz kommen.

Aufgrund der Handhabung radioaktiver Materialien sind diese Techniken jedoch ausgewählten Laboratorien vorbehalten. Daneben verursachen diese Methoden insbesondere bei *in vivo* Experimenten Stress auf zellulärer Ebene, der ebenfalls Effekte auf das eigentliche Untersuchungsobjekt haben kann.

ICP-MS ist die derzeit empfindlichste Detektionstechnik für eine massenspezifische Detektion des Phosphors. Polyatomare Interferenzen ($^{14}\text{N}^{16}\text{O}^1\text{H}^+$, $^{15}\text{N}^{16}\text{O}^+$) die unter den herrschenden Plasmabedingungen gebildet werden, stören dabei im erheblichen Maße eine empfindliche Detektion. Verschiedene Autoren beschreiben den Einsatz der Hochauflösenden ICP-MS als phosphorspezifischen Detektor.^{63, 64} In allen Fällen wurde zusätzlich Membrandesolvatisierung eingesetzt, um den verbleibenden spektralen Untergrund auf ein annehmbares Niveau zu reduzieren.

Nachteilig wirkt sich hier aus, dass bestimmte Substanzen starke Wechselwirkungen mit der Desolvatisierungsmembran zeigen und diese so teilweise nicht mehr detektiert werden können.

Eine Alternative zur Phosphor Detektion mittels Hochauflösenden ICP-MS stellt die Kollisionzellen ICP-MS dar.

In Beitrag 2 wurde ein spezielles Tuning der Octopol- und Quadrupolbiasspannungen in Verbindung mit Helium als Zellgas verwendet, um den Untergrund auf der Masse des Phosphors zu reduzieren. Auf den Einsatz von Desolvatisierungstechniken konnte verzichtet werden.

Berechnungen der unter den gegebenen Bedingungen erreichten Kollisionsenergien zeigten, dass diese nicht für eine Dissoziation der beiden Hauptinterferenzen $^{14}\text{N}^{16}\text{O}^{1}\text{H}^+$ bzw. $^{15}\text{N}^{16}\text{O}^+$ ausreichen.

Kinetische Energiediskriminierung sowie die durch das Tuning bedingte Potentialbarriere zwischen Oktopol und Quadrupol sind daher hauptsächlich für die Untergrundreduktion auf der Masse des Phosphors verantwortlich.

Der Einsatz von Membrandesolvatisierung zur weiteren Untergrundreduktion, wie er in der Literatur bereits in Verbindung mit anderen Kollisionzellen ICP-MS Systemen beschrieben wurde, war bei dem verwendeten System nicht notwendig.⁶⁴

Instrumentelle Nachweisgrenzen im ng L^{-1} Bereich für Phosphor und verschiedene simultan bestimmte Spurenelemente konnten unter den etablierten Bedingungen erreicht werden.

Mischungen aus einfach phosphorylierten Desoxynukleotiden sowie Proben einer enzymatisch verdauten DNS-Probe wurden als Modellverbindungen zur Methodenoptimierung und Bestimmung der Nachweisgrenzen unter gekoppelten Bedingungen verwendet.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine CE, sowie eine HPLC basierende Trennmethode für die vier Nukleotide dCMP, dTMP, dGMP und dAMP entwickelt und optimiert. Durch den Einsatz der HPLC konnten die Nachweisgrenzen im Vergleich zur CE abhängig von der betrachteten Komponente um den Faktor 10 und mehr verbessert werden. Gleichzeitig ergab sich eine Halbierung der Analysenzeiten auf etwa 13 Minuten.

Unter den gleichen HPLC Bedingungen wurde ESI-MS als komplementäre Technik eingesetzt, um die detektierten Komponenten nicht nur über ihre Retentionszeiten sondern auch über ihre molekülspezifische Information zu identifizieren.

Phosphorhaltige Standards und Flussinjektionsanalyse (*FIA*) wurden für eine komponentenunabhängige Quantifizierung verwendet. Dabei konnten gute Übereinstimmungen mit dem über Totalreflexion-Röntgen-Fluoreszenz-Analyse (*TXRF*) ermittelten Phosphorgesamtgehalt erzielt werden.

Der komplementäre Einsatz von CC-ICP-MS und ESI-MS kann dabei helfen, Nukleotide oder Nukleotidaddukte gezielt über ihren Phosphorgehalt für eine weitergehende Charakterisierung mittels ESI-MS auszuwählen. Die erreichbaren Nachweisgrenzen sind vergleichbar mit denen der radioaktiven Labelingtechniken, die normalerweise für Quantifizierungen von Phosphor - über Szintillatorzählungen verwendet werden.

3.3 Beitrag 3

“Development and characterization of a new interface for coupling capillary-LC with collision-cell ICP-MS and its application for phosphorylation profiling of tryptic protein digests”

Analytical and Bioanalytical Chemistry (2005) 381: 194-204

Im Rahmen von Beitrag 3 wurde die direkte Kopplung von Kapillar- und Nano-HPLC mit einem Kollisionszellen ICP-MS entwickelt und optimiert.

Ziel war es, CC-ICP-MS als komplementären und hochselektiven Detektor für das Screening von tryptisch verdauten Proteinen auf phosphorylierte Peptide einzusetzen. Wie bereits in Beitrag 2 erläutert, zählt Phosphor zu den stark durch polyatomare Interferenzen gestörten Elementen.

Da das Auftreten dieser Interferenzen weitestgehend durch die Menge und die Zusammensetzung dessen, was in das Plasma eingetragen wird, bestimmt wird, wurde die Idee entwickelt über die Verwendung von Kapillar- und Nano-HPLC als Trenntechnik, die in das Plasma eingetragene Flüssigkeitsmenge auf ein Minimum zu reduzieren.

Von Kapillar- bzw. Nano-HPLC spricht man, wenn Säulen mit einem Innendurchmesser von 300 µm bzw. <300 µm eingesetzt werden.

Gleichzeitig bot sich die Möglichkeit von den verbesserten chromatographischen Eigenschaften (Auflösung, Peakempfindlichkeit) von Kapillar- bzw. Nano-HPLC im Vergleich zur konventionellen HPLC zu profitieren.

Diese Techniken zählen mittlerweile in Verbindung mit Elektrospray Massenspektrometern zu den Standardtechniken im Bereich des Peptid Mappings^{81, 82}, der Proteinsequenzierung^{7, 83} oder der Identifizierung von posttranslatorisch modifizierten Proteinen^{10, 84, 85}, was insbesondere auf ihre gute Kompatibilität mit dem Elektrosprayionisierungsprozess und ihre besseren chromatographischen Eigenschaften im Vergleich zur analytischen HPLC zurückzuführen ist.

Die reversible Phosphorylierung von Proteinen an den Aminosäuren Serin, Threonin und Tyrosin stellt einen allgegenwärtigen und wichtigen dynamischen Prozess in eukariotischen lebenden Systemen dar, der die Struktur von Proteinen, ihre katalytische Aktivität während physiologischer Prozesse, Protein-Protein

Wechselwirkungen oder die Regulierung der Genexpression sowie der Proteinbiosynthese beeinflusst.⁸⁶

Die Effizienz des Elektrosprayionisierungsprozesses ist stark abhängig von der Struktur der zu untersuchenden Komponenten und den verwendeten chromatographischen Bedingungen.

Dies führt häufig dazu, dass modifizierte Peptide im Vergleich zu unmodifizierten Peptiden eine schlechtere Ionisierungseffizienz aufweisen, so dass insbesondere geringkonzentrierte, phosphorylierte Peptide unter Umständen im Massenspektrum nicht in Erscheinung treten.

Weiterhin zeigen große phosphorylierte Peptide schlechte Fragmentationseigenschaften, was zur Folge hat, dass sie im Rahmen von MS-MS Experimenten nur schwer erkennbar sind bzw. keine aussagekräftigen Fragmentationsmuster liefern.

Aufgrund der hohen Selektivität für Elemente ermöglicht der komplementäre Einsatz von Kollisionzellen ICP eine sehr gezielte Vorauswahl einzelner Peptide für eine weiterführende Charakterisierung mittels molekulspezifischer Detektionstechniken. Da es sich beim ICP um einen fast komponentenunabhängigen Ionisationsprozess handelt, eröffnet sich weiterhin die Möglichkeit, phosphorylierte Peptide nach erfolgter chromatographischer Trennung nachzuweisen, die im ESI Prozess aufgrund ihrer Struktur nicht in Erscheinung getreten sind.

Die Hauptprobleme bei der Kopplung von Kapillar-LC und CC-ICP-MS und ihr Einsatz für das Phosphorylierungsscreening sind in der Handhabung der kleinen Flussrate (um die $4 \mu\text{L min}^{-1}$) sowie in der Reduzierung des spektralen Untergrundes auf der Masse des Phosphors zu sehen.

Insgesamt wurden drei verschiedene Zerstäuber und zwei verschiedene Sprühkammersysteme auf ihre Eignung hin untersucht.

Parameter wie Signalintensität, Signalstabilität, Oxidbildungsrate sowie die Bildungsrate doppelt geladener Ionen wurden herangezogen, um die verschiedenen Zerstäuber-Sprühkammerkombinationen näher zu charakterisieren.

Auf der Basis eines Zerstäubers, der normalerweise in einem Kapillarelektrophoreseinterface verwendet wird, wurde ein neues Interface konstruiert, das bei einer Flussrate von $3 \mu\text{L min}^{-1}$ seine maximale Empfindlichkeit zeigt. Durch die Verwendung einer speziellen Mikrosprühkammer war es möglich, direkt in das Injektorrohr der ICP-Fackel zu zerstäuben.

Das geringe Volumen der Sprühkammer (kleiner 4 mL) sowie das todvolumenoptimierte Design des Zerstäubers reduzieren die Bandenverbreiterung auf ein Minimum und erlauben somit hochaufgelöste Trennungen.

Bis zu 80 % organische mobile Phase wurden während einer Gradiententrennung eingesetzt ohne das dabei das Plasma beeinflusst wurde. Eine Zugabe von Sauerstoff zur Kohlenstoffoxidation war nicht notwendig.

Am Beispiel von Beta Casein wurde der komplementäre Einsatz von CC-ICP-MS und ESI-MS-MS für eine selektive Vorauswahl und anschließende Charakterisierung eines phosphorylierten Peptides demonstriert. Bis zu 400 fmol eines phosphorylierten Peptides konnten mit dem beschriebenen Aufbau elementspezifisch detektiert werden.

Im Vergleich zu den in Beitrag 2 durchgeführten Untersuchungen konnten die Nachweisgrenzen für Phosphor noch einmal verbessert werden. Dies ist insbesondere auf das verwendete ICP-MS System (verbesserte Ionenoptik, lineares Kollisionszellen Design) sowie auf den weitaus geringeren Verdünnungseffekt zurückzuführen, der sich durch den Einsatz von Kapillar-LC ergibt (1 mL min⁻¹ Flussrate vs. 3 µL min⁻¹ Flussrate).⁴⁵

Mittlerweile wurde die entwickelte Kopplung auch für das Screening verschiedener Realproben wie Rückenmarksflüssigkeit (Cerebrospinalflüssigkeit (CSF)) oder des Tau-Protein angewendet.

Beide Probentypen wurden auf das Vorhandensein von phosphorylierten Proteinen bzw. Peptiden hin untersucht und stehen eng in Verbindung mit der Entstehung neurodegenerativer Erkrankungen wie beispielsweise der Alzheimer'schen Erkrankung.

Insgesamt eröffnet die entwickelte Kopplung verschiedene neue Anwendungen, die bisher durch unzureichende Empfindlichkeit oder inkompatible chromatographische Bedingungen nicht mit ICP-MS als Detektor untersucht werden konnten.

3.4 Beitrag 4

“Sensitive, simultaneous determination of P, S, Cl, Br and I containing pesticides in environmental samples by GC hyphenated with collision-cell ICP-MS”

J. Anal. At. Spectrom., 2003, 19, 623-631

Für die in Beitrag 4 durchgeführten Untersuchungen kam erstmalig ein neues Kollisionszellen ICP-MS System zur Anwendung, das sich zum Zeitpunkt der Arbeiten noch in seiner Beta Testphase befand. Das verwendete System basiert auf dem in den Beiträgen 1 und 2 verwendeten CC-ICP-MS der Firma Agilent Technologies.

Es zeichnet sich durch eine veränderte Ionenoptik und eine linear zur Ionenoptik angeordnete Kollisionszelle aus. Im Zusammenspiel ermöglichen beide Komponenten eine verbesserte Ionentransmission bei gleichbleibend guter Matrixtoleranz und Interferenzminimierung. Insgesamt zeigte das verwendete System um den Faktor 3 bis 5 höhere Empfindlichkeiten im Vergleich zum Vorgängermodell, was sich vor allem in einer Verbesserung der Nachweisgrenzen niederschlägt.

Der ständig wachsende Einsatz von Pestiziden in Land- und Forstwirtschaft hat zu einer starken Verbreitung dieser Verbindungen und ihrer Abbauprodukte in der Umwelt geführt.⁸⁷ So ist beispielsweise der Einsatz verschiedener Organochlorpestizide seit vielen Jahren verboten. Ihrer Persistenz in der Umwelt sowie ihrer lipophilen Eigenschaften haben insbesondere in Gebieten wo sie vermehrt eingesetzt wurden, zur Akkumulation in der Nahrungskette geführt.

Das Monitoring dieser vielfältigen Substanzen zur Überprüfung von Wasser oder Lebensmitteln auf mögliche Belastungen erfordert empfindliche analytische Techniken, die ein simultanes Screening auf das Vorhandensein einer Vielzahl von Verbindungen ermöglicht.

Gaschromatographie (GC) und Flüssigkeitschromatographie (HPLC) in Kombination mit verschiedenen Detektoren zählen zu den bevorzugten Techniken, die zum Pestizidnachweis eingesetzt werden. Da fast alle Pestizide Heteroelemente enthalten, wurden in der Vergangenheit vor allem elementselektive Detektoren wie NPD^{88, 89}, FPD^{90, 91} oder ECD^{92, 93} in Verbindung mit GC eingesetzt.

AED erlaubt die simultane elementspezifische Detektion der Heteroelemente Stickstoff, Phosphor, Schwefel, Chlor, Brom und Fluor.

Nachteilig wirkt sich hier die geringe Empfindlichkeit sowie die geringe Matrixtoleranz des AED Detektors aus.⁹⁴⁻⁹⁷

Der Einsatz von GC-ICP-MS zur heteroelementspezifischen Detektion wird in der Literatur bereits seit einiger Zeit diskutiert. Vor allem die Detektion von Schwefel ist dabei problematisch, so dass bei schwefelspezifischen Applikationen in der Regel hochauflösende ICP-MS eingesetzt wurde.⁵⁰

Die Messung von Pestiziden mit ICP-MS konnte bisher nur für phosphorhaltige Verbindungen gezeigt werden.⁵⁵

Vor diesem Hintergrund und aufgrund der Tatsache, dass es sich bei ICP-MS um eine empfindliche Multielementtechnik handelt, entstand die Idee, eine GC Kopplung mit CC-ICP-MS als elementspezifischen Detektor für die simultane Detektion phosphor-, schwefel-, chlor-, brom- und iodhaltiger Pestizide im Rahmen eines schnelles Pestizidscreening von Umweltproben zu verwenden.

Parameter wie Zellgas, Zellgasfluss, Spannung der Extraktionslinse 1, Plasmaleistung sowie der Einsatz von Plasmazusatzgasen wurden optimiert um ein Maximum an Empfindlichkeit für die detektierten Heteroelemente zu erzielen.

Die besten Ergebnisse konnten unter Verwendung einer harten Ionenextraktion, niedriger Plasmaleistung sowie mit Helium als zusätzlichem Plasmagas erzielt werden.

Nachweisgrenzen und Reproduzierbarkeiten wurden über die Trennung einer Multi-Komponenten Pestizidmischung ermittelt.

Für die Retentionszeiten und die Peakflächen, die für quantitative Auswertungen herangezogen wurden, ergaben sich relative Standardabweichungen von unter 0,8 bzw. 8 %. Abhängig vom detektierten Element konnten Nachweisgrenzen im untersten ng L⁻¹ Bereich (³¹P, ⁷⁹Br, ¹²⁷I) bzw. unterem µg L⁻¹ Bereich (³²S, ³⁵Cl) erzielt werden.

Die entwickelte Methodik wurde für die Bestimmung von Pestiziden in verschiedenen Gemüse- und Fruchtproben verwendet. Gute Übereinstimmung erreichte man dabei mit zuvor über GC-MS ermittelte Pestizidgehalte.

Eine Quantifizierung konnte über Einzelverbindungsstandards oder über eine komponentenunabhängige Kalibration (CIC) durchgeführt werden.

Der Einsatz von „*Retention Time Locking (RTL)*“ sowie die Anwendung einer Pestiziddatenbank ermöglichte die weitere Identifizierung einiger Pestizide in den untersuchten Proben, für deren Retentionszeit bisher keine Daten vorhanden waren. Insgesamt erlaubt der beschriebene Aufbau eine schnelle, selektive und empfindliche Detektion von Pestiziden in Umweltproben. Durch den Einsatz von RTL wird die Anzahl der identifizierbaren Verbindungen nur durch den Umfang der verwendeten Datenbank sowie das Auflösungsvermögen der gaschromatographischen Trennung limitiert.

3.5 Beitrag 5

Beitrag 5 dieser Arbeit ist als „Spin-Off“ von Beitrag 4 anzusehen. Er basiert auf den in Beitrag 4 durchgeführten Optimierungen, die hier direkt für die Untersuchung einer neuen Probenmatrix übernommen wurden.

“Investigation of the sulfur speciation in petroleum products by capillary gas chromatography with ICP-collision-cell-MS detection”

J. Anal. At. Spectrom., 2003, 19, 700-702

Erdölprodukte wie Heizöl, Schiffsdiesel oder Benzin enthalten abhängig von der geographischen Herkunft des verwendeten Rohöls unterschiedlich hohe Schwefelkonzentrationen.

Nationale und internationale Bestimmungen zum Schutz der Umwelt fordern in den kommenden Jahren eine drastische Reduktion des Schwefelgehalts in Erdölprodukten.

Da die gängigen Entschwefelungsverfahren komponentenabhängige Effizienzen aufweisen, ist es nicht mehr ausreichend nur Gesamtschwefelgehalte zu bestimmen. Im Rahmen der Prozessoptimierung werden daher Informationen zur Speziation des Schwefels benötigt, um gezielt einzelne Prozessparameter zu optimieren mit dem Ziel der maximalen Schwefeeliminierung in den einzelnen Endprodukten.

Gaschromatographie in Verbindung mit verschiedenen elementselektiven- (MIP-AED) oder molekülspezifischen Detektoren (Elektron Impact Massenspektrometrie) wird routinemäßig zur Untersuchung von Erdölprodukten verwendet.

Erdölprodukte bestehen in der Regel aus einer Vielzahl von Einzelkomponenten, von denen nur ein kleiner Teil schwefelhaltig ist. Während der chromatographischen Trennung werden daher kontinuierlich unterschiedlichste Kohlenwasserstoffe von der GC Säule eluiert, die zu einer starken Untergrunderhöhung bei den genannten Detektionstechniken führt. Dies wirkt sich insbesondere auf die Nachweisstärke und die Langzeitstabilität negativ aus.

ICP-MS als GC Detektor bietet neben hoher Selektivität und Empfindlichkeit den Vorteil, dass unter den herrschenden Plasmabedingungen sämtliche Matrix, die von der Säule eluiert wird, komplett atomisiert bzw. ionisiert wird und somit nur noch die

einzelnen in den Probenbestandteilen enthaltenen Elemente in das Massenspektrometer gelangen.

Ziel in Beitrag 5 war es, zu überprüfen inwieweit GC in Verbindung mit Kollisionzellen ICP-MS zur empfindlichen Speziation von Schwefelkomponenten in unterschiedlichen Erdölprodukten geeignet ist.

Aufgrund der schon im Rahmen von Beitrag 4 erläuterten besonderen Plasmabedingungen, die bei der Verwendung von GC als Trenn- und Probeneinführungssystem erzielt werden, war es durch die Verwendung von Helium als Zellgas erstmalig möglich, Schwefel ebenfalls auf seinem Hauptisotop als $^{32}\text{S}^+$ zu messen, wodurch sich wesentlich höhere Empfindlichkeiten erzielen lassen.

Der durch die Bildung von $^{16}\text{O}_2^+$ Molekülonen verursachte Untergrund auf der Masse ^{32}S konnte effektiv reduziert werden.

Da das Gesamtsystem auf den elementspezifischen Nachweis von Schwefel hin optimiert wurde, konnte dessen Nachweisgrenze im Vergleich zu den Ergebnissen aus Beitrag 4 noch weiter verbessert werden.

Insgesamt liegen die mit dem verwendeten GC-CC-ICP-MS System erzielten Nachweisgrenzen um ein bis zwei Größenordnungen unter denen, die mit Techniken erreicht werden können, die standardmäßig im Bereich der Schwefelanalytik zum Einsatz kommen.

Verschiedene Erdölprodukte bzw. deren Zwischenprodukte aus dem Entschwefelungsprozess wurden im Hinblick auf das Vorhandensein von Schwefelspezies hin untersucht und diese quantifiziert.

GC gekoppelt mit CC-ICP-MS ermöglicht insgesamt eine hochselektive und hochempfindliche Speziation und Quantifizierung von Schwefelkomponenten in Erdölprodukten und somit eine gezielte Prozessoptimierung hin zu schwefelärmeren Endprodukten.

4 Generelle Diskussion der Ergebnisse

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass mit der Kollisionszellen ICP-MS ein empfindlicher, robuster und hochselektiver Detektor für den Nachweis von Heteroelementen zur Verfügung steht.

In Verbindung mit chromatographischen (GC, HPLC) oder elektrophoretischen (CE) Trenntechniken eröffnen sich eine Vielzahl von neuen Anwendungsbereichen in den Lebenswissenschaften und der Umweltforschung, die in dieser Form bisher nicht bearbeitet werden konnten.

Anwendungsbeispiele sind die Metalloproteinanalytik, DNS Adduktanalytik, Proteinphosphorylierungsstudien sowie das Pestizidscreening und die Speziation des Schwefels in Erdölprodukten.

Die mit CE als Trenntechnik durchgeführten Experimente verdeutlichten noch einmal das auf den Einsatz von nL-Proben zurückzuführende Problem der relativ hohen Nachweisgrenzen dieser Trenntechnik.

In Zusammenhang mit der Schwefeldetektion unter Verwendung von Xenon als Zellgas verschärft sich diese Situation noch einmal, da neben dem interferierenden Untergrund auf der Masse des Schwefels die gesamte Ionentransmission des Systems verringert wurde.

Hier zeigt sich deutlich die Limitation des beschriebenen Aufbaus. Die so erreichbaren Nachweisgrenzen reichen daher nur bei entsprechend hohen Konzentrationen der zu untersuchenden Spezies aus, um diese in Realproben sicher nachweisen zu können.⁴⁴

Der erfolgreiche Einsatz von CE insbesondere für die Trennung von Realproben setzt daher eine effektive Probenvorbereitung voraus, die Anreicherungs- bzw. Aufkonzentrationsschritte sowie eine Matrixelimination beinhaltet.

Der Einsatz von „*Sample-Stacking*“-Techniken kann weiterhin helfen, größere Probenvolumina für kapillarelektrophoretische Trennungen einzusetzen, ohne dabei die Trenneffizienz negativ zu beeinflussen.⁷⁹

Ein Verbesserungspotential im Bereich der CE-ICP-MS Kopplungen ist insbesondere auf Seiten des Zerstäubers zu sehen. Hier können die in der Entwicklung der in Beitrag 3 beschriebenen Kopplung zwischen Kapillar-LC und CC-ICP-MS gemachten Erfahrungen helfen, die make-up Flussrate des verwendeten Interfaces weiter zu

reduzieren, was sich positiv auf die Empfindlichkeit und den Matrixeintrag in das ICP sowie damit einhergehende Interferenzen auswirken würde.

Trotz der beschriebenen Limitationen ist das Haupteinsatzgebiet der CE-ICP-MS auch weiterhin im Bereich der Metallproteinanalytik zu sehen, da bisher mit keiner anderen Technik ähnlich hochaufgelöste Trennungen und elementspezifische Charakterisierungen einzelner Spezies einer komplexen Probenmischung in ihrem nativen Zustand demonstriert werden konnten.

Auch bei Analyten, die beispielsweise starke Wechselwirkungen mit HPLC-Säulenpackungen zeigen oder die durch diese verändert werden könnten, ist CE weiterhin die Methode der Wahl.⁹⁸

HPLC Kopplungen mit ICP-MS sind in zweifacher Hinsicht limitiert:

Konventionelle Zerstäuber und Sprühkammern, die als Interface Verwendung finden, zeichnen sich in der Regel durch schlechte Zerstäubungseffizienzen aus. So gelangen beispielsweise bei den häufig verwendeten konzentrischen Zerstäubern (Flussraten 50 – 1000 $\mu\text{L min}^{-1}$) weit unter 10 % dessen was zerstäubt wurde überhaupt in das Plasma. Der Rest wird in der Regel durch Kondensation in der Sprühkammer abgeschieden.

Bei Eluenten mit einem hohen Anteil an organischem Lösungsmittel, führt der hohe Dampfdruck, den die gängigen organischen mobilen Phasen (Methanol, Acetonitril) aufweisen, zu einem verstärkten Matrixeintrag in das Plasma.

Kohlenstoffdeposition auf den Konen und den Linsen, verringerte Langzeitstabilität, Untergrunderhöhung sowie eine verringerte Ionisierungseffizienz zählen zu den wichtigsten resultierenden Effekten.

Die Zugabe von Sauerstoff zum Zerstäubergas reduziert effektiv die Kohlenstoffdeposition im ICP-MS System und die damit einhergehende reduzierte Langzeitstabilität. So ist es möglich, auch bei höheren Flussraten bis zu einem gewissen Grad organische Lösungsmittel einzusetzen.

Untergrunderhöhung und verringerte Ionisierungseffizienzen für verschiedene Elemente lassen sich auf diese Weise jedoch nicht kompensieren, da beide Faktoren direkt von der Menge dessen, was in das Plasma gelangt, abhängig sind.

Der Einsatz von CC-ICP-MS als phosphorspezifischen Detektor in Verbindung mit unterschiedlichen, flüssigkeitsbasierenden Trenntechniken verdeutlichte eindrucksvoll, welchen Einfluss die in das Plasma eingebrachte Flüssigkeitsmenge auf die Bildung von Interferenzen sowie auf die Eigenschaften des Gesamtsystems hat.^{45, 99}

Durch die konsequente Reduzierung der eingetragenen Flüssigkeitsmengen auf wenige $\mu\text{L min}^{-1}$, was durch einen eigens entwickelten Mikrozerstäuber möglich wurde, konnten die oben beschriebenen Probleme, die mit HPLC-ICP-MS Kopplungen einhergehen, weitestgehend eliminiert werden:

Bei der verwendeten Flussrate ($3 \mu\text{L min}^{-1}$) zeigte der entwickelte Zerstäuber keine Kondensatbildung und damit eine 100 % Transporteffizienz. Gleichzeitig konnten Zählraten erreicht werden, die mit anderen Zerstäubern unter ähnlichen Bedingungen nur bei wesentlich höheren Flussraten erzielt werden.

Aufgrund der insgesamt geringen Menge an Matrix, die so in das Plasma eingetragen wird, kann ohne die Zugabe von Sauerstoff zur Kohlenstoffoxidation gearbeitet werden.

Gradienten mit bis zu 80 % Organikanteil konnten verwendet werden, ohne dass sich Auswirkungen auf die Ionisierungseffizienzen oder den spektralen Untergrund zeigten.⁹⁹

Noch deutlicher zeigte sich, welchen Einfluss die aus dem verwendeten Chromatographiesystem kommende Matrix auf die Bildung von Interferenzen, und damit verbunden den instrumentellen Untergrund eines CC-ICP-MS Systems hat, wenn GC als Trenntechnik bzw. als Probeneinführungssystem verwendet wird.

Da nur gasförmige Bestandteile (Trägergas, wenige μL verdampftes Probenlösungsmittel, zu trennende flüchtige Substanzen) in das Plasma eingetragen werden, und somit keine Trocknung der zerstäubten Probe erforderlich ist, ergibt sich ein trockenes Plasma, das schon bei geringer Plasmaleistung ausreichend Energie besitzt, die verbleibende Matrix zu zerstören und die Probenbestandteile zu ionisieren.

Dies wirkt sich vor allem auf den spektralen Untergrund von ^{31}P und ^{32}S aus, so dass in diesem Fall mit Helium als Zellgas eine ausreichende Untergrundreduktion für beide Elemente erzielt werden konnte.

Gleichzeitig verdeutlichten die durchgeführten Versuche, wie die sorgfältige Optimierung der ICP-MS Bedingungen abseits der Norm, in ihrer Gesamtheit eine erhebliche Empfindlichkeitssteigerung bringen kann. Entscheidenden Einfluss haben hier Parameter wie Extraktionslinsenspannung sowie die Auswahl geeigneter Plasmazusatzgase, die den Ionisationsprozess positiv beeinflussen.^{47, 100, 101}

In Kombination mit GC wird durch die Verwendung von CC-ICP-MS als Detektor eine Selektivität und Nachweisstärke erreicht, die in dieser Form mit den etablierten Techniken nicht erreicht werden kann.

So zeigt die Kombination aus GC und AED eine hohe Spezifität für Heteroelemente bei schlechten Nachweisgrenzen und Matrixempfindlichkeit.

Elementselektive Detektoren wie NPD oder ECD dagegen zeigen beste Nachweisgrenzen bei heteroelementhaltigen Verbindungen. Hier fehlt es jedoch an Spezifität, so dass es nicht möglich ist, Aussagen darüber zu machen, welche Elemente anteilig in einer Substanz vorkommen.

In Verbindung mit GC sind also hochpräzise Trennbedingungen und daraus resultierende reproduzierbare Retentionszeiten zwingend notwendig, um einzelne Substanzen in einer Mischung sicher identifizieren zu können.

Am Beispiel der Pestizide, die in fast allen Fällen mehrere verschiedene Heteroatome enthalten, zeigt sich, wie über die Kombination von heteroelementspezifischer Detektion mittels CC-ICP-MS und präzise ermittelten Retentionszeiten eine sehr sichere Identifizierung einzelner Komponenten in einer komplexen Mischung möglich ist, die mit elementselektiven Detektoren nicht erreicht werden kann, insbesondere wenn Komponenten koeluiieren.

Der Einsatz der CC-ICP-MS wird einzig durch die Schwierigkeiten bei der Detektion von Stickstoff, Kohlenstoff und Fluor limitiert.

In ihrer Gesamtheit eröffnen die dargestellten Arbeiten neue Einsatzbereiche für eine elementspezifische Detektion mittels ICP-MS, die insbesondere den komplementären Einsatz zusammen mit molekülspezifischen Detektionstechniken wie ESI-MS-MS oder ESI-qQ-TOF-MS beinhalten. Beispielhaft seien hier die Beiträge 2 und 3 genannt.

Vor allem die Kombination zwischen Kapillar-LC und CC-ICP-MS auf der Basis eines optimierten Mikrozerstäubers eröffnet neben dem dargestellten Beispiel weitere Anwendungsfelder für eine elementspezifische Detektion. Hierzu zählen beispielsweise die Untersuchung anderer heteroelementhaltiger Verbindungen wie etwa Pestizide oder Medikamente bzw. Anwendungen, die den Einsatz organischer mobiler Phasen erfordern sowie eine erhöhte Empfindlichkeit und chromatographische Auflösung benötigen.

Eine weitere Verbesserung im Hinblick auf höhere Empfindlichkeit, bessere chromatographische Auflösung und noch geringeren Matrixeintrag ins Plasma kann

durch die Verwendung von Nano-LC und Säulenschalttechniken erzielt werden. Erste Versuche in diese Richtung wurden vor allem durch das Totvolumen der verwendeten LC Anlage limitiert, welches zu veränderten Retentionszeiten und vergleichsweise schlechten chromatographischen Trennungen führte.

Der in Beitrag 3 beschriebene Ansatz eröffnet vor allem im medizinischen Bereich neue Möglichkeiten.

Insbesondere erlaubt der Einsatz von CC-ICP-MS als phosphorspezifischen Detektor den Verzicht auf die in Biologie und Medizin sonst üblichen auf radioaktivem Phosphor basierenden „*Labelingtechniken*“ zur Detektion und Quantifizierung von phosphorylierten Verbindungen wie Nukleinsäuren oder Proteinen.

Diese Art der Markierung stellt vor allem bei Untersuchungen an lebenden Systemen einen erheblichen Stressfaktor dar, so dass immer die Frage zu klären bleibt, inwieweit der mit diesen Techniken detektierte Status eines biologischen Systems überhaupt eine Aussage zulässt.

Insbesondere bei Arbeiten mit Nukleinsäuren, die aus *in-vivo* Systemen isoliert wurden, bleibt die Frage offen inwieweit Veränderungen am Untersuchungsobjekt auf den Einfluss der radioaktiven Markierung zurückzuführen sind.

Weiterhin kann durch den beschriebenen Ansatz auf die Handhabung radioaktiver Materialien verzichtet werden, was in der Regel nur in bestimmten Laboratorien möglich ist. Gleichzeitig ergibt sich ein positiver Effekt auf die Arbeitssicherheit im Labor.

Der komplementäre Einsatz von CC-ICP-MS in Verbindung mit molekulspezifischen Detektionstechniken kann die Auffindung phosphorylierter Peptide in komplexen Mischungen stark beschleunigen und bietet gleichzeitig die Option quantitative Informationen zu ermitteln.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen dieser aus fünf einzelnen Arbeiten bestehenden kumulativen Promotionsarbeit wurden Kopplungen zwischen CE, GC, HPLC bzw. Kapillar-LC und einem quadrupolbasierenden Kollisionszellen ICP-MS realisiert bzw. neu entwickelt. Die realisierten Kopplungen wurden für die Trennung sowie elementspezifische Detektion verschiedener biologisch- bzw. umweltrelevanter Verbindungsklassen über die in ihnen enthaltenen Heteroatome Phosphor, Schwefel, Chlor, Brom und Iod verwendet. Diese zählen zu den am schwierigsten mit ICP-MS zu detektierenden Elementen.

Ein weiteres Ziel bestand darin, die komplementäre Nutzung von Kollisionszellen ICP-MS und ESI-MS-MS im Zusammenhang mit biologischen Fragestellungen aufzuzeigen.

Insgesamt erlaubt der Einsatz der elementspezifischen Detektion den empfindlichen und gleichzeitig hochselektiven qualitativen sowie quantitativen Nachweis unterschiedlichster Substanzklassen über die in ihnen enthaltenen mit ICP-MS detektierbaren Elemente.

Helium oder Xenon als Zellgas sowie eine auf die verwendeten instrumentellen „Tune“ Bedingungen zurückzuführende kinetische Energiediskriminierung wurden eingesetzt, um störende Interferenzen, insbesondere auf den Massen ^{31}P und ^{32}S , effektiv zu reduzieren.

Für die Kopplung von CE und GC mit CC-ICP-MS wurden kommerziell erhältliche Interface verwendet. Für die Kopplung von Kapillar-LC mit CC-ICP-MS wurde im Rahmen dieser Arbeit ein neues Interface entwickelt und charakterisiert, das die Handhabung von LC Flussraten im Bereich von 0,1 bis etwa $10 \mu\text{L min}^{-1}$ erlaubt, was mit bisher in der Literatur beschriebenen Technologien nicht möglich ist. Durch die geringe Flussrate und den damit verbundenen geringen Matrixeintrag in das Plasma konnte erstmalig die Verwendung von Gradienten mit hohem Anteil an organischen Lösungsmitteln, wie sie in der Proteinanalytik eingesetzt werden gezeigt werden, ohne dass zusätzlich Sauerstoff zur Matrixoxidation dem Plasma zugeführt werden musste bzw. negative Effekte auf das Plasma zu erkennen waren.

Mit dem entwickelten Interface konnte erstmalig die direkte Kopplung von Nano-LC und CC-ICP-MS gezeigt werden, ohne das ein „make-up Fluss“ eingesetzt werden musste.

Abhängig von der eingesetzten Trenntechnik wurden recht unterschiedliche Nachweisgrenzen für Phosphor und Schwefel erreicht: So lagen diese beim Einsatz der CE im oberen $\mu\text{g L}^{-1}$ bzw. unterem mg L^{-1} Bereich, während in Verbindung mit GC Nachweisgrenzen im untersten bzw. mittleren ng L^{-1} Bereich möglich waren.

Durch die selektive Optimierung der instrumentellen Bedingungen auf die Detektion von Schwefel konnten Nachweisgrenzen erreicht werden, die um etwa 2 Größenordnungen unter denen lagen, die mit Standard GC Detektoren erreicht werden können.

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass sich durch die Verwendung von Trenn- und Interfacetechniken, die wenig Matrix in das Plasma eintragen, sowie durch den Einsatz der Kollisionszellentechnologie neue Anwendungsbereiche für die quadrupolbasierende ICP-MS erschließen lassen, die in dieser Form bisher nicht bearbeitet werden konnten bzw. die den Einsatz der wesentlich teureren Hochauflösenden ICP-MS erforderten.

Ein hoher Grad an Automatisierbarkeit und Robustheit ist mit der entwickelten Kapillar-LC-CC-ICP-MS Kopplung erreicht worden. Im Hinblick auf eine komplementäre Routineanwendung zusammen mit ESI-MS-MS wird dieser Ansatz zur Zeit noch durch die fehlende kommerzielle Verfügbarkeit des verwendeten Interfaces sowie dessen Empfindlichkeit bei unsachgemäßer Handhabung limitiert.

Im Hinblick auf zukünftige Anwendungen und die Routinetauglichkeit der heteroelementspezifischen Detektion ist zur Zeit das größte Potential im Bereich der GC-CC-ICP-MS zu sehen. Die kommerzielle Verfügbarkeit, Automatisierbarkeit und Robustheit der verwendeten Kopplung sowie die hohe Selektivität und substanz-unabhängige Nachweisstärke der CC-ICP-MS machen den in den Arbeiten 4 und 5 beschriebenen Aufbau zu einer echten Alternative für eine Vielzahl gängiger elementselektiver Detektoren wie Atomemissions-Detektor (AED), Stickstoff-Phosphor Detektor (NPD) oder Elektronen Einfang Detektor (ECD), die routinemäßig in Verbindung mit GC eingesetzt werden.

Als reiner Detektor hinter einer chromatographischen oder elektrophoretischen Trenntechnik ist CC-ICP-MS zu Zeit für einen Routinemäßigen Einsatz in einem Handelslabor noch recht teuer. Aufgrund der guten Kompatibilität zwischen den verwendeten Interfacesystemen mit dem eingesetzten CC-ICP-MS System ist es jedoch möglich, jede der beschriebenen Kopplungen innerhalb von maximal einer

halben Stunde zu realisieren, so dass auch andere Applikationen auf dem System gefahren werden könnten.

Neue Regelwerke im Bereich der Gesetzgebung und damit verbundene veränderte Anforderungen an die Nachweisstärke der zu verwendenden analytischen Methoden könnte hier als An Schub dienen, auf alternative, leistungsfähigere Detektoren wie die induktiv gekoppelte Plasma Massenspektrometrie umzusteigen.

Ein weiterer Anreiz könnte die Entwicklung einfacherer und speziell auf den Einsatz in Verbindung mit GC zugeschnittener und in sich auf das nötigste reduzierter ICP-MS Systeme sein, die zu wesentlich günstigeren Preisen angeboten werden können.

Die Verwendung von „*Heteroelement Tags*“ wie Phosphor und Schwefel bietet weiterhin ein großes Potential im Bereich der Quantifizierung von Proteinen, für die in den seltensten Fällen zertifizierte reine Standards erhältlich sind.

Da Schwefel in Form der Aminosäuren Cystein und Methionin quasi in jedem Protein enthalten ist, kann dieses Element zur komponentenunabhängigen Quantifizierung herangezogen werden, sobald seine Stöchiometrie in dem betrachteten Protein bzw. dessen Aminosäuresequenz bekannt ist. Diese lässt sich mittlerweile recht einfach über MS-MS Experimente ermitteln.

Gleichzeitig könnten so die zumeist auf dem Einbau radioaktiver Phosphor- bzw. Schwefelisotope beruhenden biologischen Standardtechniken substituiert werden, die eine spezielle Infrastruktur erfordern und damit nur bestimmten Forschergruppen zugänglich sind. Insbesondere bei in vivo Experimenten können je nach Fragestellung die Untersuchungsergebnisse negativ beeinflusst bzw. verfälscht werden.

Der komplementäre Einsatz von element- und molekülspezifischen Detektionstechniken wird zukünftig dazu beitragen, unbekannte Zielanalyten in den Lebenswissenschaften hochselektiv zu detektieren, zu quantifizieren als auch zu charakterisieren.

6 Literaturverzeichnis

- (1) Szpunar, J.; Lobinski, R.; Prange, A. *Applied Spectroscopy* **2003**, *57*, 102A-112A.
- (2) Argetsinger, L. S.; Kouadio, J. L. K.; Steen, H.; Stensballe, A.; Jensen, O. N.; Carter-Su, C. *Molecular and Cellular Biology* **2004**, *24*, 4955-4967.
- (3) Jensen, O. N.; Larsen, M. R.; Roepstorff, P. *Proteins-Structure Function and Genetics* **1998**, 74-89.
- (4) Jensen, O. N.; Podtelejnikov, A. V.; Mann, M. *Analytical Chemistry* **1997**, *69*, 4741-4750.
- (5) Wilm, M.; Shevchenko, A.; Houthaeve, T.; Breit, S.; Schweigerer, L.; Fotsis, T.; Mann, M. *Nature* **1996**, *379*, 466-469.
- (6) Shevchenko, A.; Jensen, O. N.; Podtelejnikov, A. V.; Sagliocco, F.; Wilm, M.; Vorm, O.; Mortensen, P.; Boucherie, H.; Mann, M. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1996**, *93*, 14440-14445.
- (7) Cagney, G.; Emili, A. *Nature Biotechnology* **2002**, *20*, 163-170.
- (8) Jensen, O. N. *Current Opinion in Chemical Biology* **2004**, *8*, 33-41.
- (9) Zhou, H. L.; Watts, J. D.; Aebersold, R. *Nature Biotechnology* **2001**, *19*, 375-378.
- (10) Ficarro, S. B.; McClelland, M. L.; Stukenberg, P. T.; Burke, D. J.; Ross, M. M.; Shabanowitz, J.; Hunt, D. F.; White, F. M. *Nature Biotechnology* **2002**, *20*, 301-305.
- (11) Stensballe, A.; Andersen, S.; Jensen, O. N. *Proteomics* **2001**, *1*, 207-222.
- (12) Mann, M.; Ong, S. E.; Gronborg, M.; Steen, H.; Jensen, O. N.; Pandey, A. *Trends in Biotechnology* **2002**, *20*, 261-268.
- (13) Szpunar, J.; Lobinski, R. *Pure and Applied Chemistry* **1999**, *71*, 899-918.
- (14) Mounicou, S.; Polec, K.; Chassaigne, H.; Potin-Gautier, M.; Lobinski, R. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **2000**, *15*, 635-642.
- (15) Chassaigne, H.; Lobinski, R. *Journal of Chromatography A* **1998**, *829*, 127-136.
- (16) Polec, K.; Mounicou, S.; Chassaigne, H.; Lobinski, R. *Cellular and Molecular Biology* **2000**, *46*, 221-235.
- (17) Casiot, C.; Vacchina, V.; Chassaigne, H.; Szpunar, J.; Potin-Gautier, P.; Lobinski, R. *Analytical Communications* **1999**, *36*, 77-80.
- (18) Ogra, Y.; Ishiwata, K.; Takayama, H.; Aimi, N.; Suzuki, K. T. *Journal of Chromatography B* **2002**, *767*, 301-312.
- (19) Encinar, J. R.; Sliwka-Kaszynska, M.; Polatajko, A.; Vacchina, V.; Szpunar, J. *Analytica Chimica Acta* **2003**, *500*, 171-183.
- (20) Encinar, J. R.; Ouerdane, L.; Buchmann, W.; Tortajada, J.; Lobinski, R.; Szpunar, J. *Analytical Chemistry* **2003**, *75*, 3765-3774.
- (21) Wind, M.; Wegener, A.; Eisenmenger, A.; Kellner, R.; Lehmann, W. D. *Angewandte Chemie-International Edition* **2003**, *42*, 3425-3427.
- (22) Jorgenson, J. W.; Lukacs, K. D. *Analytical Chemistry* **1981**, *53*, 1298.
- (23) Helmholtz, H. Z. *Annal. Phys. Chem* **1879**, 337.
- (24) Landers, J. P., Ed. *Handbook of Capillary Electrophoresis Second Edition*; CRC Press: Boca Raton, New York, London, Tokyo, 1997.
- (25) Naumer, H.; Heller, W. *Untersuchungsmethoden in der Chemie - Einführung in die moderne Analytik*; Georg Thieme: Stuttgart New York, 1997.

- (26) Montaser, A. *Inductively coupled plasma mass spectrometry*, Wiley-VCH: New York, 1998.
- (27) Douglas, D. J. *Canadian Journal of Spectroscopy* **1989**, *34*, 38-49.
- (28) Leonhard, P. PhD, Universität Lüneburg, Lüneburg, 2002.
- (29) Rowan, J. T.; Houk, R. S. *Appl. Spectrosc.* **1989**, *43*, 976-980.
- (30) Baranov, V. I.; Tanner, S. D. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **1999**, *14*, 1133-1142.
- (31) Bandura, D. R.; Baranov, V. I.; Tanner, S. D. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **2000**, *15*, 921-928.
- (32) Baranov, V. I.; Quinn, Z. A.; Bandura, D. R.; Tanner, S. D. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **2002**, *17*, 1148-1152.
- (33) Bandura, D. R.; Baranov, V. I.; Tanner, S. D. *Analytical Chemistry* **2002**, *74*, 1497.
- (34) Yamada, N.; Takahashi, J.; Sakata, K. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **2002**, *17*, 1213-1222.
- (35) Leonhard, P.; Pepelnik, R.; Prange, A.; Yamada, N.; Yamada, T. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **2002**, *17*, 189-196.
- (36) Tanner, S. D.; Baranov, V. I.; Bandura, D. R. *Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy* **2002**, *57*, 1361-1452.
- (37) Prange, A.; Schaumlöffel, D.; Bratter, P.; Richarz, A. N.; Wolf, C. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* **2001**, *371*, 764-774.
- (38) Schaumlöffel, D.; Prange, A.; Marx, G.; Heumann, K. G.; Bratter, P. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2002**, *372*, 155-163.
- (39) Wang, Z. X.; Prange, A. *Analytical Chemistry* **2002**, *74*, 626-631.
- (40) Prange, A.; Schaumlöffel, D. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **1999**, *14*, 1329-1332.
- (41) Schaumlöffel, D.; Prange, A. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* **1999**, *364*, 452-456.
- (42) Polec-Pawlak, K.; Schaumlöffel, D.; Szpunar, J.; Prange, A.; Lobinski, R. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **2002**, *17*, 908-912.
- (43) Van Lierde, V.; Chery, C. C.; Strijckmans, K.; Galleni, M.; Devreese, B.; Van Beeumen, J.; Moens, L.; Vanhaecke, F. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **2004**, *19*, 888-893.
- (44) Profrock, D.; Leonhard, P.; Prange, A. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2003**, *377*, 132-139.
- (45) Profrock, D.; Leonhard, P.; Prange, A. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **2003**, *18*, 708-713.
- (46) Durrant, S. F. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* **1993**, *347*, 389-392.
- (47) Sesi, N. N.; Mackenzie, A.; Shanks, K. E.; Yang, P. Y.; Hieftje, G. M. *Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy* **1994**, *49*, 1259-&.
- (48) Meija, J.; Montes-Bayon, M.; Le Duc, D. L.; Terry, N.; Caruso, J. A. *Analytical Chemistry* **2002**, *74*, 5837-5844.
- (49) Krupp, E. M.; Pecheyran, C.; Meffan-Main, S.; Donard, O. F. X. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2004**, *378*, 250-255.
- (50) Rodriguez-Fernandez, J.; Montes-Bayon, M.; Pereiro, R.; Sanz-Medel, A. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **2001**, *16*, 1051-1056.
- (51) Schwarz, A.; Heumann, K. G. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2002**, *374*, 212-219.
- (52) Wuilloud, R. G.; de Wuilloud, J. C. A.; Vonderheide, A. P.; Caruso, J. A. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **2003**, *18*, 1119-1124.

- (53) Pavageau, M. P.; Pecheyran, C.; Demange, M.; Donard, O. F. X. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **2003**, *18*, 323-329.
- (54) St Remy, R. R. D.; Montes-Bayon, M.; Sanz-Medel, A. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2003**, *377*, 299-305.
- (55) Vonderheide, A. P.; Meija, J.; Montes-Bayon, M.; Caruso, J. A. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **2003**, *18*, 1097-1102.
- (56) Larsen, E. H.; Ludwigsen, M. B. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **1997**, *12*, 435-439.
- (57) Takatera, K.; Watanabe, T. *Analytical Chemistry* **1993**, *65*, 759-762.
- (58) Radlinger, G.; Heumann, K. G. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* **1997**, *359*, 430-433.
- (59) Axelsson, B. O.; Jornten-Karlsson, M.; Michelsen, P.; Abou-Shakra, F. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2001**, *15*, 375-385.
- (60) Jensen, B. P.; Gammelgaard, B.; Hansen, S. H.; Andersen, J. V. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **2003**, *18*, 891-896.
- (61) Kannamkumarath, S. S.; Wuilloud, R. G.; Stalcup, A.; Caruso, J. A.; Patel, H.; Sakr, A. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **2004**, *19*, 107-113.
- (62) Sanchez, L. F.; Szpunar, J. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **1999**, *14*, 1697-1702.
- (63) Siethoff, C.; Feldmann, I.; Jakubowski, N.; Linscheid, M. *Journal of Mass Spectrometry* **1999**, *34*, 421-426.
- (64) Wind, M.; Edler, M.; Jakubowski, N.; Linscheid, M.; Wesch, H.; Lehmann, W. D. *Analytical Chemistry* **2001**, *73*, 29-35.
- (65) Wind, M.; Wesch, H.; Lehmann, W. D. *Analytical Chemistry* **2001**, *73*, 3006-3010.
- (66) Wind, M.; Eisenmenger, A.; Lehmann, W. D. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **2002**, *17*, 21-26.
- (67) Schaumlöffel, D.; Prange, A.; Marx, G.; Heumann, K. G.; Brätter, P. *Anal Bioanal Chem* **2002**, *372*, 155-163.
- (68) Stillman, M. J. *Coordination Chemistry Reviews* **1995**, *144*, 461-511.
- (69) Kägi, J. H. R. *Methods in Enzymology* **1991**, *205*, 613-626.
- (70) Nordberg, M. *Talanta* **1998**, *46*, 243-254.
- (71) Vallee, B. L. *Neurochem.Int.* **1995**, *27*, 23-33.
- (72) Brown, D. A.; Bawden, C. A.; Chatel, K. W.; Parson, T. R. *Environmental Conservation* **1977**, *4*, 213-216.
- (73) Teigen, S. W.; Andersen, R. A.; Daae, H. L.; Skaare, J. U. *Environmental Toxicology and Chemistry* **1999**, *18*, 2364-2369.
- (74) Berger, B.; Dallinger, R.; Thomaser, A. *Environmental Toxicology and Chemistry* **1995**, *14*, 781-791.
- (75) Hogstrand, C.; Haux, C. *J. Exp. Mar. Biol.* **1990**, *138*, 69-84.
- (76) Sulaiman, N.; George, S.; Burke, M. D. *Marine Ecology Progress Series* **1991**, *68*, 207-212.
- (77) Viarengo, A.; Burlando, B.; Dondero, F.; Marro, A.; Fabbri, R. *Biomarkers* **1999**, *4*, 455-466.
- (78) Profrock, D.; Prange, A.; Schaumlöffel, D.; Ruck, W. *Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy* **2003**, *58*, 1403-1415.
- (79) Alvarez-Llamas, G.; de la Campa, M. D. F.; Sanz-Medel, A. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **2003**, *18*, 460-466.
- (80) Löffler, G.; Petrides, P. E. *Biochemie und Pathobiochemie*; Springer, 1998.
- (81) Huang, E. C.; Henion, J. D. *Analytical Chemistry* **1991**, *63*, 732-739.
- (82) Banks, J. F. *Journal of Chromatography A* **1996**, *743*, 99-104.

- (83) Bauer, M. D.; Sun, Y. P.; Wang, F. *Journal of Protein Chemistry* **1999**, *18*, 337-347.
- (84) Zhou, W.; Merrick, B. A.; Khaledi, M. G.; Tomer, K. B. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2000**, *11*, 273-282.
- (85) Sickmann, A.; Marcus, K.; Schafer, H.; Butt-Dorje, E.; Lehr, S.; Herkner, A.; Suer, S.; Bahr, I.; Meyer, H. E. *Electrophoresis* **2001**, *22*, 1669-1676.
- (86) Yan, J. X.; Packer, N. H.; Gooley, A. A.; Williams, K. L. *Journal of Chromatography A* **1998**, *808*, 23-41.
- (87) Bester, K.; Huhnerfuss, H.; Neudorf, B.; Thiemann, W. *Chemosphere* **1995**, *30*, 1639-1653.
- (88) Lartiges, S.; Garrigues, P. *Analisis* **1993**, *21*, 157-165.
- (89) Lee, X. P.; Kumazawa, T.; Sato, K.; Suzuki, O. *Chromatographia* **1996**, *42*, 135-140.
- (90) Lartiges, S. B.; Garrigues, P. *Analisis* **1995**, *23*, 418-421.
- (91) Torres, C. M.; Pico, Y.; Manes, J. *Chromatographia* **1995**, *41*, 685-692.
- (92) Mukherjee, I.; Gopal, M. *Journal of Chromatography A* **1996**, *754*, 33-42.
- (93) Pablos-Espada, M. C.; Arrebola-Liebanas, F. J.; Garrido-Frenich, A.; Martinez-Vidal, J. L. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* **1999**, *75*, 165-179.
- (94) Rinkema, F. D.; Louter, A. J. H.; Brinkman, U. A. T. *Journal of Chromatography A* **1994**, *678*, 289-297.
- (95) Linkerhagner, M.; Stan, H. J. *Zeitschrift Fur Lebensmittel-Untersuchung Und-Forschung* **1994**, *198*, 473-479.
- (96) Hankemeier, T.; Louter, A. J. H.; Rinkema, F. D.; Brinkman, U. A. T. *Chromatographia* **1995**, *40*, 119-124.
- (97) Stan, H. J.; Linkerhagner, M. *Journal of Chromatography A* **1996**, *750*, 369-390.
- (98) Prange, A.; Schaumlöffel, D. *Anal Bioanal Chem* **2002**, 441-453.
- (99) Profrock, D.; Leonhard, P.; Prange, A. *Anal Bioanal Chem* **2005**.
- (100) Profrock, D.; Leonhard, P.; Wilbur, S.; Prange, A. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **2004**, *19*, 623-631.
- (101) Bouyssiere, B.; Leonhard, P.; Profrock, D.; Baco, F.; Garcia, C. L.; Wilbur, S.; Prange, A. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **2004**, *19*, 700-702.

7 Anhang

7.1 Publikationen in Originalform

Da die Copyrights der einzelnen Arbeiten bei den verschiedenen Verlagen liegen, enthält die elektronische Version dieser kumulativen Promotionsarbeit nur Abstracts der zugrundeliegenden Einzelarbeiten.

Kopien der Einzelarbeiten können über den jeweiligen „*Reprint Author*“ bzw. direkt über den Verfasser dieser Promotionsarbeit bezogen werden.

Die in der Universitätsbibliothek der Universität Lüneburg einsehbaren Originalfassungen dieser kumulativen Promotionsarbeit beinhalten die kompletten zugrundeliegenden Einzelarbeiten in ihrer jeweiligen Printform.

7.1.1

Daniel Pröfrock, Peter Leonhard, Andreas Prange

Determination of sulfur and selected trace elements in metallothionein-like proteins using capillary electrophoresis hyphenated to inductively coupled plasma mass spectrometry with an octopole reaction cell

Anal Bioanal Chem (2003) 377 : 132-139

Abstract:

The determination of sulfur in biologically relevant samples such as metalloproteins is described. The analytical methodology used is based on robust on-line coupling between capillary electrophoresis (CE) and octopole reaction cell inductively-coupled plasma mass spectrometry (ORC-ICP-MS). Polyatomic ions that form in the plasma and interfere with the determination of S at mass 32 are minimised by addition of xenon to the collision cell. The method has been applied to the separation and simultaneous element-specific detection of sulfur, cadmium, copper, and zinc in commercially available metallothionein preparations (MT) and metallothionein-like proteins (MLP) extracted from liver samples of bream (*Abramis brama* L.) caught in the river Elbe, Germany. Instrumental detection limits have been calculated according to the German standard procedure DIN 32645 for the determination of sulfur and some simultaneously measured trace elements in aqueous solution. For sulfur detection limits down to 1.3 µg L⁻¹ (S-34) and 3.2 µg L⁻¹ (S-32) were derived. For the other trace elements determined simultaneously detection limits ranging from 300 ng L⁻¹ (Ni-58) to 500 ng L⁻¹ (Zn-66, Mn-55) were achieved. For quantification of sulfur and cadmium in a commercially available MT preparation under hyphenated conditions the use of external calibration is suggested. Finally, the need for proper sample-preparation technique will be discussed.

Reprints: A. Prange (reprint author), GKSS Forschungszentrum Geesthacht GmbH, Max Planck Str. 1, D-21502 Geesthacht

7.1.2

Daniel Pröfrock, Peter Leonhard, Andreas Prange

Determination of phosphorus in phosphorylated deoxyribonucleotides using capillary electrophoresis and high performance liquid chromatography hyphenated to inductively coupled plasma mass spectrometry with an octopole reaction cell

J. Anal. At. Spectrom., 2003, 18, 708-713

Abstract

The determination of phosphorus in a biologically relevant sample matrix such as DNA is described. The analytical methodology used is based on a robust on-line coupling of capillary electrophoresis (CE) or high performance liquid chromatography (HPLC) with inductively coupled plasma mass spectrometry, equipped with an octopole reaction system (ORS-ICP-MS). Polyatomic ions formed in the plasma and the interface region of the ICP-MS that interfere with the determination of P at mass 31 were minimised by the addition of helium to the collision cell. Instrumental detection limits of 125 ng L⁻¹ for ³¹P, and in the range of 18 to 49 ng L⁻¹ for the other trace elements, were achieved under the conditions described. In order to demonstrate the high separation and detection efficiency of the system, the method developed has been applied to the element specific detection of phosphorus in monophosphorylated deoxynucleotides and to enzymatically digested calf thymus DNA after CE and HPLC separation, respectively. Both hyphenated techniques provide baseline separation of the four deoxynucleotide monophosphates (dNMP), which are present in the DNA chain. With CE-ICP-MS, detection limits for phosphorus down to 53 µg L⁻¹ (2-deoxyguanosin-5-monophosphate, dAMP) (corresponding to 0.6 pg P absolute) have been achieved. RSDs of the migration times were about 5%. Using HPLC-ICP-MS, detection limits down to 3 µg L⁻¹ (2-deoxythymidine-5-monophosphate, dTMP) (corresponding to 0.03 ng P absolute) were obtained. The migration/elution order of the deoxynucleotides investigated was obtained by comparison with the migration/retention times of commercially available dNMP's. Furthermore it was checked if HPLC-ESI-MS can be operated under the same chromatographic conditions for the confirmation of the elution order and for the characterisation of unknown peaks. Finally, flow injection

analysis (FIA) was used for the quantification of the phosphorus content in the dNMP samples. Using FIA, detection limits for phosphorus of $2.5 \mu\text{g L}^{-1}$ corresponding to 25 pg phosphorus absolute were achieved.

Reprints: A. Prange (reprint author), GKSS Forschungszentrum Geesthacht GmbH, Max Planck Str. 1, D-21502 Geesthacht

7.1.3

Daniel Pröfrock, Peter Leonhard, Wolfgang Ruck, Andreas Prange

Development and characterization of a new interface for coupling capillary-LC with collision-cell ICP-MS and its application for phosphorylation profiling of tryptic protein digests

Anal Bioanal Chem (2005) 381: 194-204

Abstract:

A comparison of different nebulisers for direct hyphenation of capillary and nano liquid chromatography (Cap-LC, Nano-LC) and quadrupole-based collision cell inductively coupled plasma mass spectrometry (CC-ICP-MS) for phosphorylation profiling of tryptic protein digests is described. Helium was used as cell gas and specially tuned instrumental conditions were used to achieve background minimisation at the mass of phosphorus, because of kinetic energy discrimination of the interfering polyatomic ions. The proposed set-up is based on a modified capillary electrophoresis interface and a home-made 4-mL spray chamber. It enables the use of gradient conditions with a highly concentrated organic mobile phase as often used in protein phosphorylation analysis, without the need to apply membrane desolvation for removal of the organic phase or further background minimisation. No significant signal suppression or other negative effects caused by the organic mobile phase occur, because of the low flow rates used in Cap-LC and the robust plasma conditions of the CC-ICP-MS instrument. A tryptic digest of beta-casein was investigated as model compound to demonstrate the applicability of the proposed set-up for phosphorylation profiling in protein analysis using quadrupole based collision-cell ICP-MS as phosphorus-specific detector. Detection limits for phosphorylated peptides down to the sub picomole level were obtained. As a complementary technique, electrospray ionisation tandem mass spectrometry (ESI-MS-MS) with data base searching was used for further characterisation of the phosphorylated peptides detected.

Reprints: A. Prange (reprint author), GKSS Forschungszentrum Geesthacht GmbH,
Max Planck Str. 1, D-21502 Geesthacht

7.1.4

Daniel Pröfrock, Peter Leonhard, Steven Wilbur, Andreas Prange

Sensitive, simultaneous determination of P, S, Cl, Br and I containing pesticides in environmental samples by GC hyphenated with collision-cell ICP-MS

J. Anal. At. Spectrom., 2004, 19, 623-631

Abstract:

A sensitive and highly selective methodology for the determination of a wide range of pesticides, based on the simultaneous element-specific determination of phosphorus, sulfur, chloride, bromine and iodine by gas chromatography hyphenated with octopole reaction cell-inductively coupled plasma mass spectrometry (GC-CC-ICP-MS) is described. The chromatographic system was optimised for separation efficiency and short run times and was coupled via a commercially available interface with an octopole reaction cell ICP-MS system which is equipped with an on-axis collision cell. Instrumental settings were optimised with respect to high sensitivity for the target nuclides P-31, S-32, Cl-35, Br-79 and I-12 and minimized background levels especially for the ions most affected by interferences, such as P-31(+), S-32(+). Helium and nitrogen were tested as additional plasma gases for possible sensitivity enhancement of the element-specific detection resulting from improved ionisation processes inside the plasma. Due to the multi-element capability of the instrumental setup and the good accuracy of the retention times that were achieved, identification of the detected pesticides can be carried out using their retention times, the element compositions and element ratios present in each chromatographic peak. For the different pesticides detection limits down to the ppt level or the low ppb level were obtained. The average RSDs of the retention times and the peak areas were better than 0.8% and 8%, respectively. The analytical methodology developed has been applied to the screening of different fruit extracts for pesticides. Peaks were identified by comparison of the retention times obtained and by their elemental composition. Quantitative results have been obtained both by external calibration and by using a compound independent calibration.

Reprints: A. Prange (reprint author), GKSS Forschungszentrum Geesthacht GmbH,
Max Planck Str. 1, D-21502 Geesthacht

7.1.5

Brice Bouyssiere, Peter Leonhard, Daniel Pröfrock, Franck Baco, Clementina Lopez Garcia, Steve Wilbur, Andreas Prange

Investigation of the sulfur speciation in petroleum products by capillary gas chromatography with ICP-collision-cell-MS detection

J. Anal. At. Spectrom., 2004, 19, 700-702

Abstract:

Recent regulations concerning the low-sulfur gasoline require analytical methods able to provide specific information on sulfur containing compounds present in petroleum products at the ng g(-1) range. The on-line coupling of capillary GC with ICP-collision cell-MS was proposed for the speciation of sulfur in hydrocarbon matrices. The technique showed an absolute detection limit 0.5 pg for a 1 µL sample injected in the splitless mode which is about two orders of magnitude lower than the currently used techniques.

Reprints: A. Prange (reprint author), GKSS Forschungszentrum Geesthacht GmbH, Max Planck Str. 1, D-21502 Geesthacht

7.1.6

Daniel Pröfrock, Andreas Prange, Dirk Schaumlöffel, Wolfgang Ruck

Optimization of capillary electrophoresis-inductively coupled plasma mass spectrometry for species analysis of metallothionein-like proteins extracted from liver tissues of Elbe-bream and Roe deer

Spectrochimica Acta Part B 58 (2003) 1403-1415

Abstract:

Species analysis of metallothionein-like proteins (MLP) in liver tissues from Elbe-Bream (*Abramis brama* L.) and Roe Deer (*Capreolus capreolus* L.) using capillary electrophoresis (CE) combined with inductively coupled plasma mass spectrometry detection is described. In order to allow systematic development of the method, commercially available metallothionein (MT) preparations of rabbit liver were used. Optimum separation efficiency was obtained by investigating the influence of parameters such as voltage, capillary temperature, buffer concentration, buffer pH and the use of different buffer systems. Instrumental parameters such as CE capillary position, interface adjustment and contamination problems are also discussed. Separation was performed using uncoated fused silica capillaries with 75 µm i.d. and 70 cm length. The optimum conditions were found to be: Separation voltage 30 kV, positive polarity, capillary temperature 288.15 K and a buffer concentration of 100 mmol l⁻¹ Tricine-NH₃ adjusted to pH 7.2. Sample preparation was performed so as to minimize oxidation and heavy metal contamination of the samples. The high molecular mass protein matrix was reduced by acetonitrile precipitation. For commercial MT preparations the relative standard deviations (R.S.D) in the retention times were 0.9% for MT-1 and 1.9% for MT-2; the R.S.D's in the peak areas were less than 6% for MT-1 and 16% for MT-2, respectively. Under optimized conditions the MLPs in the real samples could be separated efficiently in less than 10 min. By comparison with the migration times of commercially available MT preparations, two of the observed peaks could be assigned to MT-1 and MT-2.

Reprints: A. Prange (reprint author), GKSS Forschungszentrum Geesthacht GmbH, Max Planck Str. 1, D-21502 Geesthacht

7.2 Liste der Veröffentlichungen

7.2.1 Peer Review Papers

Daniel Pröfrock, Andreas Prange, Dirk Schaumlöffel, Wolfgang Ruck

Optimization of capillary electrophoresis-inductively coupled plasma mass spectrometry for species analysis of metallothionein-like proteins extracted from liver tissues of Elbe-bream and Roe deer

Spectrochimica Acta Part B 58 (2003) 1403-1415

Daniel Pröfrock, Peter Leonhard, Andreas Prange

Determination of sulfur and selected trace elements in metallothionein-like proteins using capillary electrophoresis hyphenated to inductively coupled plasma mass spectrometry with an octopole reaction cell

Anal Bioanal Chem (2003) 377 : 132-139

Daniel Pröfrock, Peter Leonhard, Andreas Prange

Determination of phosphorus in phosphorylated deoxyribonucleotides using capillary electrophoresis and high performance liquid chromatography hyphenated to inductively coupled plasma mass spectrometry with an octopole reaction cell

J. Anal. At. Spectrom., 2003, 18, 708-713

Daniel Pröfrock, Peter Leonhard, Steven Wilbur, Andreas Prange

Sensitive, simultaneous determination of P, S, Cl, Br and I containing pesticides in environmental samples by GC hyphenated with collision-cell ICP-MS

J. Anal. At. Spectrom., 2004, 19, 623-631

Brice Bouyssiere, Peter Leonhard, **Daniel Pröfrock**, Franck Baco, Clementina Lopez Garcia, Steve Wilbur, Andreas Prange

Investigation of the sulfur speciation in petroleum products by capillary gas chromatography with ICP-collision-cell-MS detection

J. Anal. At. Spectrom., 2004, 19, 700-702

Daniel Pröfrock, Peter Leonhard, Wolfgang Ruck, Andreas Prange

Development and characterization of a new interface for coupling capillary-LC with collision-cell ICP-MS and its application for phosphorylation profiling of tryptic protein digests

Analytical and Bioanalytical Chemistry (2005) 381: 194-204

7.2.2 Vorträge

Daniel Pröfrock, Peter Leonhard, Andreas Prange

Development and application of hyphenated techniques for bio-response linked instrumental analysis (BLIA): The determination of DNA Adducts

2nd Franco Spanish Workshop on Bio-Inorganic Analytical Chemistry 2002, Pau, Frankreich, 26.09-28.09.2002

Daniel Pröfrock, Peter Leonhard, Andreas Prange

Determination of phosphorus in phosphorylated deoxyribonucleotides using capillary electrophoresis and HPLC hyphenated to ICP-MS with octopole reaction cell

8th Analytical Russian-German-Ukrainian Symposium (ARGUS) 2003, Hamburg, Deutschland, 31.08 – 05.09.2003

Daniel Pröfrock, Peter Leonhard, Andreas Prange

Development and application of hyphenated techniques for bio-response linked instrumental analysis (BLIA) based on ³¹P detection: The determination of DNA Adducts

CSI XXXIII Colloquium Spectroscopicum Internationale 2003, Granada, Spanien, 07.09-12.09.2003

Daniel Pröfrock, Peter Leonhard, Andreas Prange

Einsatz von ICP-MS in einem Großforschungszentrum – Beispiele und Erfahrungen aus der Praxis

6. Agilent User Meeting im Rahmen des 18. ICP-MS Anwendertreffen, Berlin, Deutschland, 06.10-09.10 2003

Daniel Pröfrock, Peter Leonhard, Andreas Prange

Kopplungstechniken (CE, HPLC, GC) in der ICP-MS und deren Anwendung in der Proteinanalytik

DGMS Workshop „Fortschritte in der anorganischen Massenspektrometrie zur Spuren-, Ultraspuren-, Spezies- und Isotopenanalytik“, im Rahmen der DGMS Tagung 2004, Leipzig, Deutschland, 07.03-10.03 2004

Daniel Präfro, Peter Leonhard, Rudi Grimm, Andreas Prange

Nachweis von post-translatorisch veränderten Proteinen mit Hilfe von Kapillar-LC und Kollisionszellen ICP-MS

7. Agilent User Meeting im Rahmen des 19. ICP-MS Anwendertreffen, Zürich, Schweiz, 01.09-03.09 2004

Daniel Präfro, Peter Leonhard, Andreas Prange

Hyphenation of capillary and nano HPLC to collision cell ICP-MS as a complementary approach for the detection of post-translational modified proteins via phosphorus specific detection

3rd Franco Spanish Workshop on Bio-Inorganic Analytical Chemistry 2004, Oviedo, Spanien, 30.09-02.10.2004

7.2.3 Poster

Daniel Pröfrock, Andreas Prange, Dirk Schaumlöffel, Wolfgang Ruck

*Optimisation of an on-line CE-ICP-MS system for species analysis of metallothioneins in the liver cytosol of Elbe bream (*Abrami brama L.*) and Roe deer (*Capreolus capreolus L.*)*

ICP-MS Anwendertreffen 2001, Wien, Österreich, 10.09-15.09.2001

Daniel Pröfrock, Peter Leonhard, Andreas Prange

Hyphenation of different separation techniques with octopole reaction cell ICP-MS for species analysis of biologically relevant molecules

European Winter Conference on Plasma Spectrochemistry 2003, Garmisch Partenkirchen, Deutschland, 12.01-17.01.2003

Peter Leonhard, **Daniel Pröfrock**, Andreas Prange

Overcoming the problem of interferences in the determination of sulfur and phosphorus by ICP-MS with an octopole reaction cell

European Winter Conference on Plasma Spectrochemistry 2003, Garmisch Partenkirchen, Deutschland, 12.01-17.01.2003

Daniel Pröfrock, Peter Leonhard, Andreas Prange, Bernd Neidhart, Wolfgang Ruck

Elementspezifische Charakterisierung von Metallothioneinen unter Verwendung einer On-Line Kopplung zwischen CE und Kollisionzellen ICP-MS

Anakon 2003, Konstanz, Deutschland, 02.04-05.04.2003

Daniel Pröfrock, Peter Leonhard, Andreas Prange, Bernd Neidhart, Wolfgang Ruck

Analytik von DNS-Nukleotiden unter Verwendung von CE und HPLC gekoppelt mit Kollisionzellen ICP-MS

Anakon 2003, Konstanz, Deutschland, 02.04-05.04.2003

Peter Leonhard, **Daniel Pröfrock**, Andreas Prange, Bernd Neidhart

Die Bestimmung von Phosphor und Schwefel mit ICP-MS mit integrierter Kollisionzelle

Anakon 2003, Konstanz, Deutschland, 02.04-05.04.2003

Daniel Pröfrock, Peter Leonhard, Andreas Prange

Development and application of hyphenated systems for bio-response linked instrumental analysis (BLIA) based on ³¹P detection: The determination of DNA adducts

The 5th international symposium on speciation of elements in biological, environmental and toxicological sciences 2003, Almunecar (Granada), Spanien, 13.09-16.09.2003

Daniel Pröfrock, Peter Leonhard, Andreas Prange

Anwendung von gekoppelten Systemen zur element- und molekulspezifischen Detektion von DNS-Nukleotiden und DNS-Addukten als Grundlage für eine Wirkungsspezifische Analytik gentoxischer Effekte.

ICP-MS Anwendertreffen 2003, Berlin, Deutschland, 06.10-09.10.2003

Peter Leonhard, **Daniel Pröfrock**, Andreas Prange

Anwendung von GC-ICP-MS mit Kollisionszellen Technologie zur simultanen, elementspezifischen Detektion von phosphor-, schwefel-, chlor-, brom- und iodhaltiger Pestizide

ICP-MS Anwendertreffen 2003, Berlin, Deutschland, 06.10-09.10.2003

Daniel Pröfrock, Peter Leonhard, Steven Wilbur, Andreas Prange

The liaison of organic and inorganic chemistry: Determination of heteroelements for the elemental speciation of pesticides in environmental samples by GC-collision-cell-ICP-MS

Winter Conference on Plasma Spectrochemistry 2004, Fort Lauderdale, Florida, USA, 12.01-17.01.2004

Daniel Pröfrock, Peter Leonhard, Andreas Prange

Development of hyphenated systems for a bio-response linked instrumental analysis (BLIA) based on element- and molecule specific detection techniques and their application on the determination of DNA nucleotides and DNA adducts

Winter Conference on Plasma Spectrochemistry 2004, Fort Lauderdale, Florida, USA, 12.01-17.01.2004

Daniel Pröfrock, Peter Leonhard, Steven Wilbur, Andreas Prange

A new direction in elemental mass spectrometry: Determination of heteroelements for the elemental speciation of pesticides in environmental samples by GC-Collision-Cell-ICP-MS

A.M.S.E.L Workshop 2004, AWI Bremerhaven, Deutschland, 07.06-08.06.2004

Daniel Pröfrock, Peter Leonhard, Rudi Grimm, Andreas Prange

Anwendung von Kapillar-LC gekoppelt mit Kollisionszellen ICP-MS als komplementären Ansatz für den Nachweis von post-translatorisch veränderten Proteinen über phosphorspezifische Detektion

19. ICP-MS Anwendertreffen 2004, Zürich, Schweiz, 01.09-03.09.2004

Daniel Pröfrock, Peter Leonhard, Rudi Grimm, Andreas Prange

New Interface design for coupling capillary-LC and collision-cell ICP-MS and its complementary application for the detection of phosphorylated proteins

European Winter Conference on Plasma Spectrochemistry 2005, Budapest, Ungarn, 30.01-03.02.2005

7.2.4 Preise

Anakon 2003 Posterpreis, Kategorie Spezies Analytik

ICP-MS Anwendertreffen 2003 1st Posterpreis

ICP-MS Anwendertreffen 2003 3rd Posterpreis

European Winter Conference on Plasma Spectrochemistry 2005 JAAS Posterpreis