

Elementspezifische Wechselwirkungen von aquatischen Huminstoffen

Dissertation

zur Erlangung des Grades

„Doktor der Naturwissenschaften“

(Dr. rer. nat.)

am Fachbereich Chemie und Pharmazie
der Johannes Gutenberg-Universität
in Mainz

Giselher Marx

geboren in Wiesbaden

Mainz 2000

Dekan:

[REDACTED]

1. Berichterstatter:

[REDACTED]

2. Berichterstatter:

[REDACTED]

Tag der mündlichen Prüfung:

29.11.2000

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum
von Juni 1997 bis Oktober 2000
am Institut für Anorganische Chemie und Analytische Chemie
im Fachbereich Chemie und Pharmazie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
unter der Betreuung
von [REDACTED] angefertigt.

Herrn [REDACTED] danke ich für die interessante Themenstellung sowie die intensive Unterstützung und Dialogbereitschaft während der Durchführung dieser Arbeit.

Diese Arbeit entstand im Rahmen des Schwerpunktprojektes „Refraktäre organische Säuren in Gewässern, ROSIG“ der Deutschen Forschungsgemeinschaft, der ich für die finanzielle Unterstützung danken möchte.

Mein besonderer Dank gilt [REDACTED] und [REDACTED] für Bereitstellung des umfangreichen Probenmaterials.

Für die gute Zusammenarbeit bei der Entwicklung der online MSIVA für Schwefel bei CE/ICP-MS-Kopplung danke ich [REDACTED] und [REDACTED].

Last but not least möchte ich den Mitgliedern des Arbeitskreises für die gute Zusammenarbeit und die konstruktive Kritik danken.

Der Beginn aller Wissenschaften ist das Erstaunen,
daß die Dinge sind, wie sie sind.

Aristoteles, 384 - 322 v. Chr.

Für meine Eltern
und Susanne

Inhaltsverzeichnis

1.	Allgemeiner Teil	1
1.1.	Einleitung	1
1.2.	Problemstellung	5
1.3.	Zusammenfassung der Ergebnisse	7
1.4.	Summary	8
2.	Grundlagen	10
2.1.	Massenspektrometrische Grundlagen	10
2.1.1.	Induktiv gekoppelte Plasma-Massenspektrometrie	10
2.1.2.	Massenspektrometrische Interferenzen	13
2.1.3.	Massentrennung mit einem Quadrupol-Massenfilter	14
2.1.4.	Massentrennung mit einem doppelfokussierenden Gerät	17
2.1.5.	Massenspektrometrische Isotopenverdünnungsanalyse	19
2.2.	Angewandte chromatographische Trennverfahren	24
2.2.1.	Grundlagen der Größenausschlußchromatographie	24
2.2.2.	Kapillarelektrophorese	25
2.3.	Huminstoffe	28
2.3.1.	Klassifizierung und Isolierung	28
2.3.2.	Genese und Struktur	29
2.3.3.	Wechselwirkungen mit Metallionen	32
2.3.4.	Kinetische Stabilität von Huminstoff-Komplexen	34
3.	Experimenteller Teil	38
3.1.	Eingesetzte Geräte und Chemikalien	38
3.1.1.	Geräte	38
3.1.2.	Chemikalien	39
3.1.3.	Isotopenangereicherte Spikes	40
3.2.	Optimierung der massenspektrometrischen Meßparameter und Qualitätssicherung der Meßmethoden	42
3.2.1.	Optimierung der Linsenpotentiale, Gasflüsse und Plasmaleistung	42
3.2.2.	Korrektur der Detektor-Totzeit	43
3.2.3.	Einfluß des verwendeten Argons auf den Kohlenstoffuntergrund	45

3.2.4.	Teilnahme an der Interlaborstudie IMEP-9 _____	46
3.3.	Kopplung der Größenausschlußchromatographie (SEC) mit einem induktiv gekoppelten Plasma Massenspektrometer (ICP-MS) _____	48
3.3.1.	Aufbau der HPLC/ICP-MS-Kopplung _____	48
3.3.2.	Meßtechnik für transiente Signale _____	49
3.3.3.	Huminstoff-Fraktionierung mit SEC im Vergleich zur Ultrafiltration _____	51
3.4.	Untersuchte Huminstoffe _____	54
3.4.1.	Probenherkunft _____	54
3.4.2.	Probennahme und Probenvorbereitung _____	57
3.5.	Untersuchung der kinetischen Stabilität von Huminstoff-Komplexen _____	58
3.5.1.	Allgemeines _____	58
3.5.2.	Kupfer-Huminstoff-Komplexe _____	59
3.5.3.	Chrom-Huminstoff-Komplexe _____	63
3.5.4.	Kobalt-Huminstoff-Komplexe _____	70
3.6.	Entwicklung einer online Isotopenverdünnungsanalyse für Kohlenstoff, Schwefel und Quecksilber bei HPLC/ICP-MS-Kopplung _____	73
3.6.1.	Aufbau der HPLC/ICP-MS-Kopplung zur online MSIVA _____	73
3.6.2.	Funktionsweise der online MSIVA am Beispiel von Schwefel-Standardverbindungen _____	74
3.6.3.	Anwendung der online MSIVA auf natürliche Wasserproben _____	76
3.6.4.	Nachweisgrenzen der online MSIVA _____	79
3.7.	Quantifizierung der Kohlenstoff-, Schwefel- und Quecksilbergehalte in Huminstoffen mit MSIVA _____	80
3.7.1.	Gesamtgehaltsbestimmung von C, S und Hg in Huminstoffen _____	80
3.7.2.	Gehaltsbestimmung von C, S und Hg in Huminstoffen mit SEC _____	83
3.8.	Untersuchung der Wechselwirkung von Huminstoffen mit Quecksilber _____	119
3.9.	Entwicklung einer online Isotopenverdünnungsanalyse für Schwefel bei CE/ICP-MS-Kopplung _____	130
3.9.1.	Aufbau der CE/ICP-MS-Kopplung zur online MSIVA _____	130
3.9.2.	Bestimmung von Schwefel in Metallothioneinen mit online MSIVA nach CE-Trennung _____	132

4.	Diskussion der Ergebnisse	135
4.1.	Entwicklung einer online MSIVA für Schwefel mit HR-ICP-MS	135
4.1.1.	Quantifizierung von Schwefel mit online MSIVA in chromatographischen Fraktionen bei HPLC/ICP-MS-Kopplung	135
4.1.2.	Quantifizierung von Metallothioneinen mittels online MSIVA von Schwefel bei CE/ICP-MS-Kopplung	136
4.2.	Methodenvalidierung im Rahmen von Interlaborstudien	139
4.2.1.	IMEP-9 Zertifizierungsrunde zur Qualitätssicherung der Analyse von Spurenelementen in Wasser	139
4.2.2.	Interlaborvergleich der Ergebnisse für Kohlenstoff- und Schwefel-Gesamtgehalte in Huminstoffen	143
4.3.	Fraktionierung von Huminstoffen mit SEC	150
4.3.1.	Retentionszeiten von Original-, Fulvin- und Huminsäureproben	150
4.3.2.	Charakteristische Fraktionierung von Proben unterschiedlicher Herkunft mit SEC	151
4.3.3.	Kohlenstoff- und Schwefel-Gehalte in Huminstoff-Fraktionen	155
4.4.	Wechselwirkungen von Huminstoffen mit Quecksilber	159
4.5.	Kinetische Stabilität von Huminstoff-Komplexen	166
5.	Ausblick	171
6.	Literaturverzeichnis	173

1. Allgemeiner Teil

1.1. Einleitung

Huminstoffe (HS) bilden eine bemerkenswerte Klasse von Biomolekülen unterschiedlichen Molekulargewichts, Struktur und Funktionalität. Die gelb bis braunschwarzen Verbindungen sind ubiquitär in allen terrestrischen und aquatischen Systemen zu finden, in denen sie den Hauptanteil des organischen Kohlenstoffs bilden. Sie sind daher ein wichtiger Bestandteil des natürlichen Kohlenstoffkreislaufs (siehe Abb. 1). Die Untersuchung der HS erweist sich aufgrund ihrer hochmolekularen und polydispersen Eigenschaften als äußerst schwierig. Während viele natürliche Makromoleküle durch eine Anzahl von kovalenten Bindungen verbrückt sind und zusätzlich Wasserstoffbrücken oder andere intermolekulare Wechselwirkungen enthalten, haben Huminstoffe weniger innere Bindungen und damit eine eher zufällige Form. Im Englischen wird dies als „*random coil*“ bezeichnet. Es kann nicht mehr von einer definierten Struktur gesprochen werden, da sich das Molekül ständig umformt. Selbst wenn man die Zusammensetzung und Struktur eines einzelnen Moleküls aufklären könnte, wäre diese Information bedeutungslos, da jedes andere Molekül in seiner Einzigartigkeit sicherlich eine andere chemische Struktur besitzt.

Die große Vielfalt ist vielleicht die Hauptcharakteristik dieser natürlichen Verbindungen. Aber gerade die analytische Herausforderung dieser Molekülklasse fasziniert die Forscher seit der Zeit Liebig und Berzelius. Ziechmann [1] faßt die Problematik der HS-Forschung wie folgt zusammen: „*If only we knew exactly what we cannot know about humic substances on principle, we could know more about them.*“ Aufgrund dieser Schwierigkeiten verwendet man daher zur Charakterisierung hauptsächlich Summen- und Gruppenparameter, die das Gesamtsystem beschreiben. Dies sind beispielsweise Elementaranalysen, spektroskopische Verfahren, Redox-Potentiale, Bindungskapazitäten und Angaben über den Anteil absorbierbarer, organischer Halogene (AOX) sowie der Anteil des gelösten, organischen Kohlenstoffs (DOC, *dissolved organic carbon*). Je nach Aufgabengebiet werden noch eine Vielzahl weiterer Parameter verwendet. Im Verlauf der Forschung wurde so durch Akkumulation vieler Informationen ein Mosaik gebildet, das das heutige Bild der Huminstoffe widerspiegelt. Gerade durch das Interesse vieler wissenschaftlicher Disziplinen und deren Zusammenspiel wurde es möglich, die äußerst vielfältige Stoffklasse der Huminstoffe zu untersuchen.

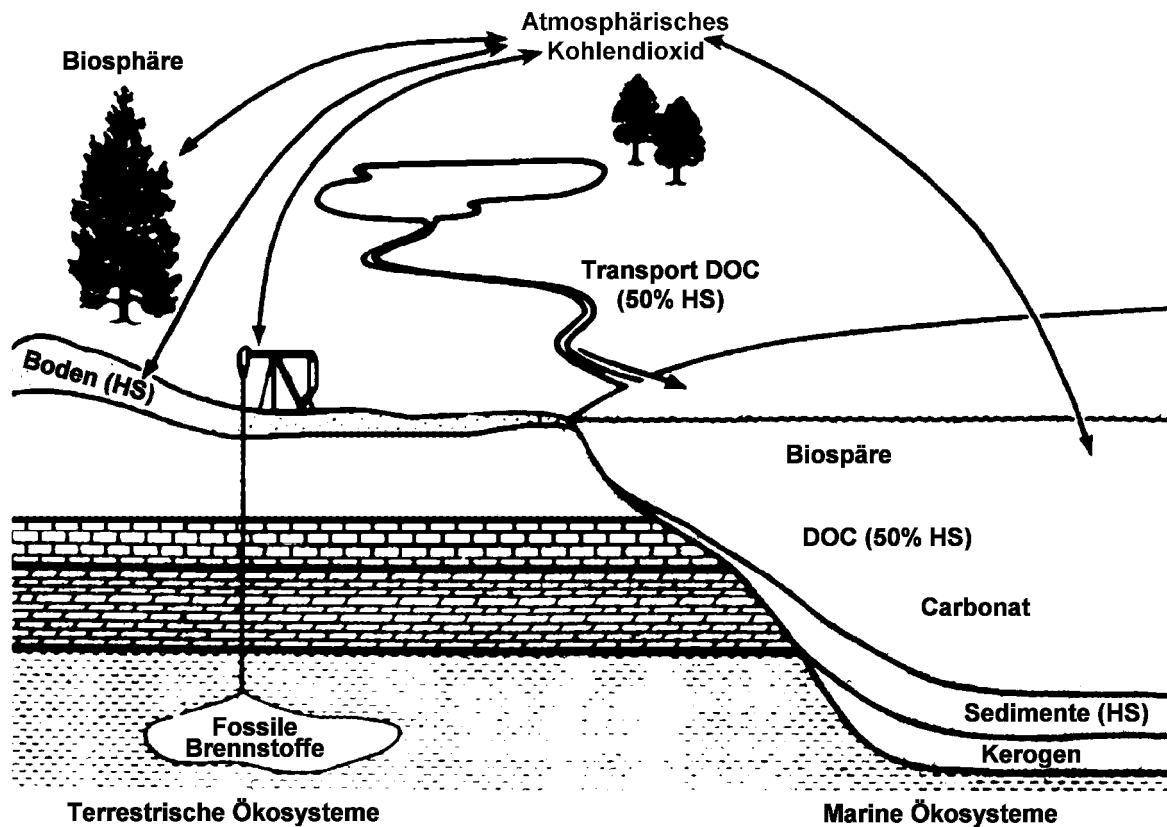


Abb. 1: Darstellung des globalen Kohlenstoffkreislaufes mit Hinweis auf die Bedeutung von HS [2]

Während in den Anfängen der HS-Forschung hauptsächlich terrestrische HS untersucht wurden, werden nun verstärkt auch die aquatischen Systeme untersucht. Dies ist zum einen durch verbesserte Isolationsverfahren und zum anderen durch nachweisstärkere analytische Untersuchungsmethoden möglich geworden. Gerade die aquatischen HS spielen in den Stoffkreisläufen eine große Rolle, da sie einen hohen Einfluß auf die Mobilität und damit auch auf die Bioverfügbarkeit gebundener Stoffe haben. Neben den im Boden weitgehend immobilen Silikaten und Oxiden bilden sie daher die Grundlage für die chemischen, physikalischen und biologischen Eigenschaften eines Ökosystems. Zu den durch aquatische HS mobilisierten Stoffen gehören Pestizide [3], Pharmaka und Schwermetalle, die durch Adsorption oder Komplexbildung gebunden werden. Während die Bedeutung der Pestizide und Pharmaka erst in den letzten Jahren erkannt wurde, ist die Problematik der Schwermetalle (z.B. Quecksilber) schon länger bekannt, wenngleich viele Fragen über das Verhalten in der Umwelt und die Rolle der HS noch offen sind. So ist das Quecksilber nach der Vergiftung der Minamata-Bucht 1956 in die öffentliche Diskussion geraten [4]. Andere Untersuchungen im Amazonasgebiet ergaben, daß

viele Bewohner typische Symptome einer Quecksilbervergiftung aufweisen [5, 6]. Das Quecksilber wird über die Nahrungskette, hauptsächlich als Methylquecksilber in Fischen, aufgenommen und kann beispielsweise in den Haaren der Menschen nachgewiesen werden [7, 8]. Während im Fall des Minamata-Unglücks der Verursacher eindeutig bestimmt werden konnte (Shin Nippon Chisso Fertilizer), ist dies in der Amazonasregion noch nicht möglich. Da in dieser Region verstärkt Gold durch ein Quecksilberamalgamierungsverfahren gewonnen wird, sind wegen der hohen Quecksilberemission des Verfahrens die Goldsucher in den Verdacht geraten. Die Karte in Abb. 2 zeigt die weltweite Emission von Quecksilber durch Goldgewinnung mit Angabe der Zeitperiode.

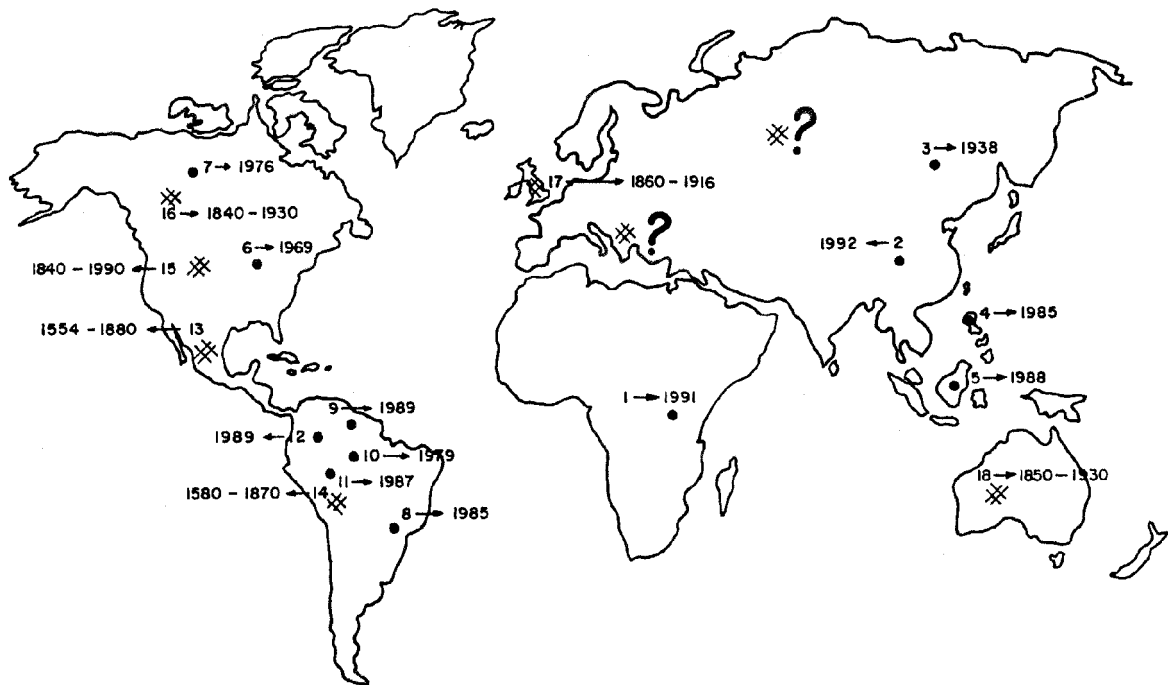


Abb. 2: Historische und aktuelle Orte der Goldgewinnung mit Quecksilberamalgamierungsverfahren [9]

Jedoch können auch geologische Emissionsquellen Ursache der Quecksilberanreicherung in Fischen sein. So korrelieren die Gehalte an Aluminium- und Eisenoxid im Boden mit den Quecksilbergehalten, so daß der Boden als ein Reservoir dient [10]. Es wird angenommen, daß 97 % des Quecksilbers natürlichen Ursprungs ist welches durch Erosion in die Gewässer gelangt. Die Rolle von Huminstoffen wird hier besonders deutlich, da Untersuchungen zeigen, daß der Quecksilbergehalt im Wasser mit dem Gehalt an Huminstoffen korreliert [11]. Dies erklärt auch die Quecksilberproblematik in Regionen, die nicht vom Goldabbau

betroffen sind. Hierzu zählt vor allem Süd-Florida, das weitgehend frei von anthropogenen Einflüssen ist und dessen Fischbestand aber dennoch einen hohen Anteil an Methylquecksilber aufweist [12]. Wie Abb. 3 zeigt werden die Quecksilbergehalte für den Menschen als kritisch erachtet. Auch hier ergaben Untersuchungen, daß die Mobilität von Quecksilber in Zusammenhang mit HS zu sehen ist [13].

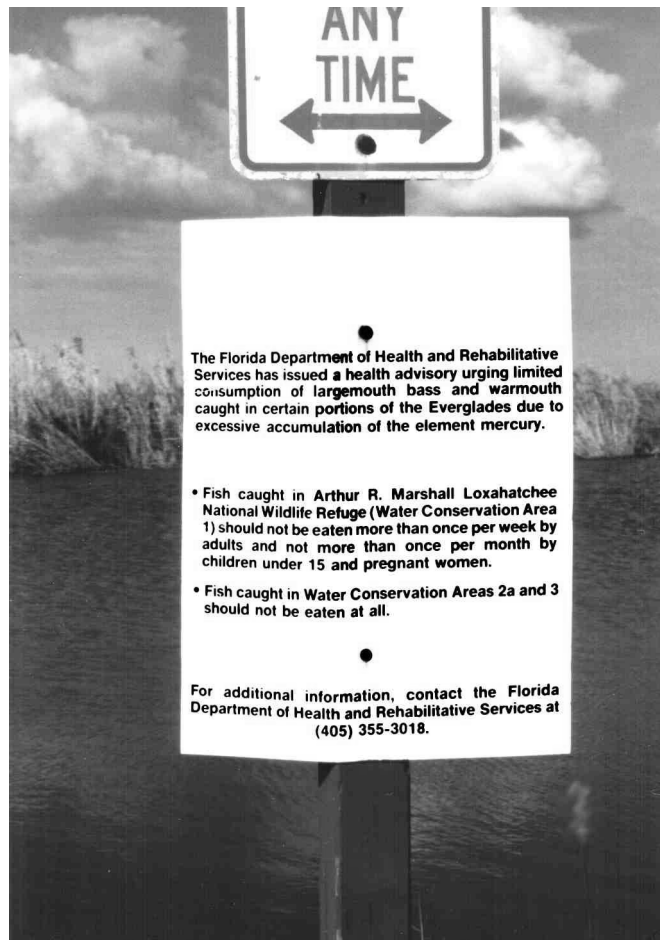


Abb. 3: Warnhinweis in den Florida Everglades bezüglich des Konsums von mit Quecksilber belastetem Fisch

Neben den Wechselwirkungen von HS mit Quecksilber sind aber auch noch andere Schwermetalle von Interesse, da diese gleichsam stabile HS-Komplexe ausbilden. Über den Einfluß von HS auf diese Stoffkreisläufe in der Umwelt ist noch relativ wenig bekannt. Während die oberen Schichten des Bodens die Mobilität der Metallionen herabsetzen und somit eine Akkumulation bewirken, sorgen aquatische HS für deren Mobilität. Verändern sich die physikalischen Eigenschaften des Ökosystems, z.B. eine pH-Wertänderung durch sauren Regen, wird der Gleichgewichtszustand gestört und Schwermetalle können freigesetzt werden. Eine Voraussage der genauen Vorgänge ist sehr schwer, jedoch für viele toxische Elemente notwendig.

Genannt seien hier beispielsweise radiochemische Elemente, wie Neptunium, das eine wichtige Komponente radioaktiven Abfalls unter Langzeitbetrachtung darstellt [14]. Bei der Auswahl einer Endlagerstätte für diese Abfälle sind alle möglichen Veränderungen in Betracht zu ziehen, um eine mögliche Mobilisierung auszuschließen. Aber nicht nur die anthropogen eingetragenen, sondern auch die natürlich vorkommenden Elemente sind von Interesse. Hier sind nicht nur die zu den Schadstoffen zählenden Elemente zu betrachten, sondern auch die für Pflanzen und Lebewesen essentiellen. So wurden viele Untersuchungen über Cd, Cr, Cu, Ni, Pb und Zn [15, 16] und auch Al, Ca, Fe, K, Mg, Mn und Ti [17, 18] durchgeführt. Neben der Bindungskapazität und thermodynamischen Stabilität der Metall-Komplexe, ist auch die kinetische Stabilität wichtig. Sie gibt Aufschluß darüber, ob die Komplexe, einmal gebildet, eventuell auch bei thermodynamisch ungünstigen Bedingungen stabil bleiben, da ein Austausch nur sehr langsam stattfindet. Hierzu stehen die Untersuchungen von HS-Komplexen noch aus. Da HS, abhängig von ihrer Genese, unterschiedliche Eigenschaften haben, sogar innerhalb eines Ökosystems durch die Vielzahl unterschiedlicher Moleküle mit einem mannigfaltigem Verhalten zu rechnen ist, sollte eine Analytik diesem komplexen System Rechnung tragen. Im allgemeinen geht der Analytik von Schwermetallen ein Aufschluß der Probe voraus. Hierbei geht jegliche Information über die vorliegenden Spezies verloren, die jedoch für das Verständnis der Stoffkreisläufe von großer Bedeutung ist.

1.2. Problemstellung

Die Erforschung der ubiquitär vorkommenden HS erwies sich aufgrund der strukturellen und funktionellen Vielfalt als schwierig. Bedingt durch die große Rolle der HS in ökologischen Prozessen ist sie jedoch äußerst wichtig. HS sind durch Komplexierung von Schwermetallen in der Lage die Eigenschaften, wie Bioverfügbarkeit, Mobilität und Toxizität, dieser Elemente zu kontrollieren. Im Rahmen dieser Arbeit sollen daher die strukturellen Merkmale von aquatischen HS in Verbindung mit elementspezifischen Wechselwirkungen untersucht werden. Hierbei sollen Methoden angewendet und ggf. entwickelt werden, um diese Wechselwirkungen unter möglichst natürlichen Bedingungen zu untersuchen. Der Schwerpunkt liegt dabei auf den aquatischen HS, da diese bisher wenig betrachtet wurden. Hierbei sollen bevorzugt die im Rahmen des Schwerpunktprojektes der Deutschen Forschungsgemeinschaft „Refraktäre organische Säuren in Gewässern, ROSIG“ bereitgestellten Proben untersucht werden.

Durch die Kopplung einer HPLC mit einem ICP-MS (*inductively coupled plasma mass spectrometer*) können die geforderte, schonende Probenbehandlung sowie die Detektion von Wechselwirkungen in natürlichen Konzentrationen erreicht werden [19]. Neben der Analyse von Gesamt-Gehalten sollen die mit HPLC erhaltenen HS-Fraktionen untersucht werden, um das Bindungsverhalten von aquatischen HS aufzuzeigen. Zur Untersuchung von HS-Fraktionen eignet sich die SEC (*size exclusion chromatography*) als eine schonende Trennmethode, die auch ohne den Einsatz von organischen Lösungsmitteln oder Puffersystemen unter natürlichen Bedingungen eine Fraktionierung nach der Größe (näherungsweise auch dem Molekulargewicht) erlaubt. Der Einsatz von reinem Wasser hat sich als sinnvoll erwiesen, da es nur einen geringen Einfluß auf das Quellungsvermögen der HS hat und die Elementspurenbestimmung in den HS-Fraktionen zuläßt [20, 21]. Hierzu zählt beispielsweise das Quecksilber, das in natürlichen Gewässern im Bereich von wenigen ng Hg/g DOC (*dissolved organic carbon*) vorkommt.

Eine mögliche Korrelation von Hg in spezifischen Fraktionen von HS, insbesondere die Wechselwirkung mit schwefelhaltigen Fraktionen, soll überprüft werden. Hierzu ist eine Bestimmung der HS-Fraktionen, der Schwefel-Anteile und der Quecksilbergehalte in Echtzeit notwendig. Die für die HS-Detektion bisher verwendete UV-Absorption bei 254 nm zeigt vorwiegend aromatische und konjugiert aliphatische Verbindungen an, so daß die unkonjugierten aliphatischen Anteile von HS nicht erkannt werden. Zur Detektion von HS-Fraktionen soll daher Kohlenstoff mit dem Massenspektrometer bestimmt werden und zur Quantifizierung eine online MSIVA (massenspektrometrische Isotopenverdünnungsanalyse) zum Einsatz kommen [22]. Für die Quantifizierung des Schwefels und Quecksilbers in HS-Fraktionen muß eine entsprechende Methode noch ausgearbeitet werden, wobei wegen der Sauerstoffmolekülinterferenz $^{16}\text{O}_2^+$ (und anderer) ein hochauflösendes Massenspektrometer zur Messung von Schwefel benötigt wird. Eine Übertragbarkeit der im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Methoden auf andere Problemstellungen und Kopplungsmethoden ist zu überprüfen.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung der kinetischen Stabilität von Schwermetall-HS-Komplexen in Fraktionen nach SEC. Hierzu eignen sich die Schwermetallionen Cr(III), Co(III), Co(II) sowie Cu(II), die auch in bisher bekannten Komplexen unterschiedliche kinetische Stabilität zeigten, das auf die unterschiedlichen Ligandenfeldstabilisierungsenergien der Übergangszustände Zurückzuführen ist.

1.3. Zusammenfassung der Ergebnisse

Es wurden im Rahmen dieser Arbeit elementspezifische Wechselwirkungen von Huminstoffen (HS) untersucht. Grundlage war hierbei die Kopplung eines ICP-MS mit einer HPLC unter Verwendung der Size Exclusion Chromatography (SEC). Durch die Kopplung des empfindlichen und elementspezifischen Massenspektrometers als Detektor mit einer HPLC als chromatographisches Trennverfahren von HS-Spezies konnten Gehalte im natürlichen Konzentrationsbereich und Wechselwirkungen einzelner HS-Fractionen bestimmt werden.

Zur Gehaltsbestimmung in Echtzeit wurde die online MSIVA (massenspektrometrische Isotopenverdünnungsanalyse) für C angewendet und für die simultane Bestimmung von S und Hg modifiziert. Hierzu wurde ein auf ^{34}S bzw. ^{201}Hg angereicherter Spike verwendet. Mit Hilfe der entwickelten online MSIVA für die simultane Detektion von C, S und Hg konnten Gehalte in chromatographischen Fractionen mit einer Nachweisgrenze von 3 ng C/s, 0.1 ng S/s und 2 pg Hg/s bestimmt werden.

Um die Nachweisstärke und Richtigkeit der Methode zu überprüfen, wurden die C- und S-Gesamtgehalte von HS-Proben bestimmt und mit den elementaranalytischen Daten anderer Arbeitsgruppen verglichen. Weiterhin wurde an einer internationalen Laborstudie (IMEP-9) als zertifizierendes Labor teilgenommen. Die in dieser Arbeit erhaltenen Werte für Cr, Pb und U wurden zur Ermittlung der zertifizierten Werte herangezogen und zeigten eine große Übereinstimmung mit den Werten anderer Arbeitsgruppen.

Nach der Analyse von Gesamtgehalten wurden auch die C- und S-Gehalte in einzelnen Fractionen von HS nach SEC ermittelt. Hierdurch konnte im Vergleich zur bisher angewendeten Elementaranalyse der Gesamtprobe eine Verbesserung bei der Bestimmung des S-Anteils in HS erreicht werden. So ergeben sich Fehler bei der Bestimmung des C/S-Verhältnisses durch anorganisches Sulfat (S-Überbestimmung) sowie durch niedermolekulare Anteile, die nicht zu den HS gerechnet werden (C-Überbestimmung).

Durch die simultane Detektion von Hg konnten die Wechselwirkungen mit HS aufgezeigt werden. Als Bindungsstellen wurden in erster Linie schwefelhaltige Fractionen identifiziert, wobei S in reduzierter Form (-2) eine weitaus höhere Affinität zu Hg hat. Jedoch konnte auch die Bindung an schwefelfreie Fractionen nachgewiesen

werden. Dies ist für die Untersuchung der Mobilität und Bioverfügbarkeit von Hg in der Umwelt eine wichtige Erkenntnis.

Die entwickelte online MSIVA für Schwefel wurde in Zusammenarbeit mit [REDACTED] und D. [REDACTED] auf die CE/ICP-MS-Kopplung übertragen. Hierbei musste ein neues Konzept für die Zuführung des isotonenangereicherten Spikes und der Kalibration des Systems entwickelt werden. Mit Hilfe der online MSIVA konnten erstmalig mit CE fraktionierte Metallothioneine aus Leber-Cytosol quantifiziert werden, indem über den S-Gehalt und den Cysteinanteil der Proteingehalt ermittelt wurde.

Weiterhin wurde durch Isotopenaustauschversuche erstmalig die kinetische Stabilität von Cr(III)- und Co(III)-Komplexen in mit SEC getrennten Fraktionen nachgewiesen. Analoge Cu(II)- und Co(II)-Komplexe sind hingegen kinetisch labil. Dies ist mit Hilfe der Ligandenfeldstabilisierungsenergie des Übergangszustandes zu erklären. Bei d^3 - und d^6 -Spinsystemen, wie den Cr(III)- und Co(III)-Komplexen, liegt diese Energie deutlich höher als die der d^7 - und d^9 -Spinsysteme, wie Cu(II)- und Co(II)-Komplexe. Die höhere Energiebarriere des Übergangszustandes verlangsamt daher die Austauschgeschwindigkeit, wodurch kinetisch stabile Komplexe entstehen.

1.4. Summary

The element specific interactions of humic substances (HS) were evaluated by coupling an ICP-MS as a sensitive and elementspecific detector with a HPLC using a size exclusion chromatography (SEC) column for the chromatographic fractionation of HS species. This combination enabled the detection of interactions of specific HS fractions and the determination of compounds in natural concentrations.

For real time determinations an online IDMS method for carbon was used and for the simultaneous determination of sulfur and mercury modified. For this purpose a spike, enriched in ^{34}S and ^{201}Hg , respectively, was applied. The detection limit of the developed online IDMS method for simultaneous determination of C, S and Hg in chromatographic fractions was 3 ng C/s, 0.1 ng S/s and 2 pg Hg/s.

To proof the methods accuracy the total amounts of C and S in HS samples were determined and compared with the results by elemental analysis of other groups. Furthermore it was participated in the international certification round IMEP-9 as a

reference laboratory. The results of Cr, Pb and U agree very well with the results of other groups and were selected to investigate the certified values.

After the determination of total C and S, the amounts in HS fractions after SEC were investigated. The determination of the S/C ratio in HS compared to elemental analysis was improved, because the amount of non HS (overestimation of C) and inorganic sulfur (overestimation of S) has to be taken into account.

By simultaneous detection of mercury the interactions with HS had been shown. As primary binding sites sulfur containing fractions were identified. Especially reduced sulfur in the oxidation state -2 has a high affinity to Hg. But also the binding to sulfur free fractions was detected, which is important for the understanding of the mobility and bioavailability of mercury in the environment.

The developed online IDMS method for sulfur was converted for a coupled CE/ICP-MS system. By that reason the principle of system calibration and continuous addition of isotopic enriched spike solution had to be modified. For the first time metallothioneines fractionated by CE could be quantified by online sulfur IDMS. For this determination the protein amount was calculated by the part of sulfur in the metallothionein and the sulfur amount (in the fraction).

Furthermore the kinetic stability of HS complexes with Cr(III) and Co(III) in SEC fractions have been proved, whereas the analogous Cu(II) and Co(II) complexes were indicated as kinetic unstable. The energy of the transition state during the ligand exchange of d^3 and d^6 spin systems, e.g. Cr(III) and Co(III) complexes, is higher than the energy of d^7 and d^9 spin systems, e.g. Cu(II) and Co(II) complexes. The higher energy barrier decreases the speed of ligand exchange, hence, the complexes are kinetic stable.

2. Grundlagen

2.1. Massenspektrometrische Grundlagen

2.1.1. Induktiv gekoppelte Plasma-Massenspektrometrie

Massenspektrometer sind im allgemeinen aus fünf Baugruppen aufgebaut (siehe Abb. 4). Je nach Art und Hersteller der Geräte unterscheiden sich diese Baugruppen in der Ausführung, aber nicht in ihrer Aufgabe. Die Probe muß, nachdem sie eingetragen wurde, zuerst ionisiert werden. Anschließend wird sie im Massenseparator aufgetrennt und die Signale nach erfolgter Detektion ausgewertet.

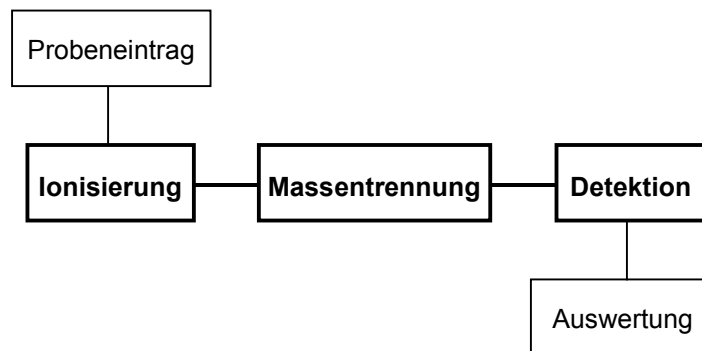


Abb. 4: Baugruppen eines Massenspektrometers

Für die Ionisierung gibt es diverse Möglichkeiten, wie z.B. die thermische Oberflächenionisation an einem heißen Metallband (Thermionisation, TI-MS, [23]), Glimmentladung (*glow discharge*, GD-MS, [24]) oder Ionisation in einem Argon-Plasma (*inductively coupled plasma*, ICP-MS). Die Auftrennung der Isotope wird durch ein Quadrupol- oder Magnetsektor-Feld, durch doppelfokussierende MS (Kombination aus elektrischem und magnetischem Feld) oder einem Flugzeit-MS (*time of flight*, TOF-MS) erreicht. Die Ionen werden anschließend mit einem Sekundärelektronenvervielfacher (SEV) oder einem Faraday-Käfig detektiert.

Das ICP wird seit den sechziger Jahren als Anregungsquelle in der optischen Emissionsspektroskopie verwendet [25]. Auf die analytische Bedeutung in der Massenspektrometrie wiesen Houk et. al. 1980 hin [26]. Die ICP-MS ist eine Multi-elementmethode, bei der die Ionisation der Probenelemente in einem unter Normaldruck betriebenen Plasma stattfindet. Nach Zündung durch einen elektrischen Funken wird in einem hochfrequenten, elektromagnetischen Feld mit 600-2000 W Leistung das Plasma erzeugt. Die Energie wird durch einen Wechselstromgenerator

mit 27.12 MHz oder 40.68 MHz über eine Induktionsspule (*load coil*) eingekoppelt. Bei matrixbedingter Änderung der Plasmacharakteristik sind leichte Frequenzanpassungen zur Stabilisierung möglich. Das Argon wird üblicherweise über drei konzentrische Quarzrohre (*torch*) zugeführt (siehe Abb. 5). Das äußere Rohr liefert den Kühlgasstrom, der mit ca. 15 L/min der Hauptbestandteil des Plasmas ist und weiter die Funktion hat, das Glas vor dem Schmelzen zu schützen. Der mittlere Gasstrom, Hilfgas (*auxiliary*), beträgt etwa 0.7-1.3 L/min und formt den Innenkegel des Plasmas. Über das Injektorrohr wird mit Hilfe des Zerstäubergases (0.6-1.8 L/min) die Probe eingetragen.

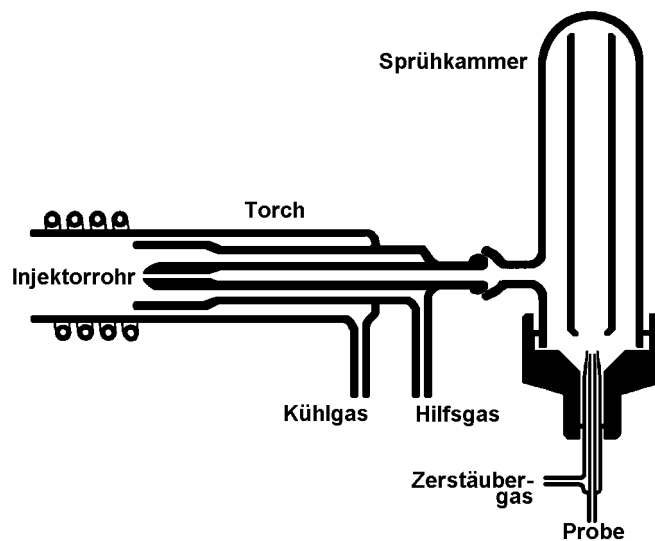


Abb. 5: Schematischer Aufbau des Probenzufuhrsystems [27]

Da das Plasma unter Normaldruck arbeitet, ist die kontinuierliche Zufuhr der Probe möglich. Flüssige Proben werden hierzu mit einem *Cross-Flow*-Zerstäuber oder einem MCN (*micro concentric nebulizer*) zerstäubt. Jedoch beträgt die Aerosolausbeute bei 0.5-1 mL/min nur etwa 1 % [28]. Durch Verwendung eines Ultraschallzerstäubers lassen sich Ausbeuten von bis zu 10 % erreichen. Eine Sensitivitätsverbesserung bewirkt die anschließende Trocknung des Aerosols durch eine semipermeable Membran, wodurch Oxidinterferenzen verringert werden können. Die effizienteste Methode ist die direkte Injektion (DIN, *direct injection nebulization*), bei der die Probe direkt in das Plasma gebracht wird. Jedoch ist hier der Probeneintrag mit 10-85 $\mu\text{L}/\text{min}$ limitiert. Gasförmige Proben können gleichfalls direkt dem Plasmagas zugegeben werden, während Feststoffproben beispielsweise vor dem Probeneintrag durch einen Laser ablatiert (LA-MS, [29]) werden können.

Die Probe wird über das Injektorrohr in das Argon-Plasma eingebracht, welches bei 8000-10000 K eine hohe Ar⁺-Ionen- und Elektronen-Dichte ($3 \times 10^{15} \text{ cm}^{-3}$) hat. Dort werden die Probenmoleküle atomisiert und überwiegend einfach positiv ionisiert [30]. Gray et. al. berechneten die Ionenausbeute der Probe (siehe Tab. 1) aufgrund der Ionisierungspotentiale nach der Saha-Gleichung [31]. Hierbei wurde eine Plasmatemperatur von 8000 K und eine Elektronendichte von $3 \times 10^{15} \text{ cm}^{-3}$ zugrunde gelegt.

Tab. 1: Ionenausbeute bei 8000 K in Abhängigkeit vom Ionisationspotential

Ionisationspotential [eV]	< 7	8	9	10	11	12	13
Ionenausbeute [%]	98	91	71	36	12	3	1

In der Praxis findet man etwas abweichende Ionenausbeuten. Diese sind für einige ausgewählte Elemente in Tab. 2 den berechneten Werten gegenüber gestellt. Die elementspezifischen Unterschiede in der Ionisierung sind deutlich an den dargestellten Ionenausbeuten zu erkennen. Metalle werden im allgemeinen besser ionisiert als Nichtmetalle, worauf die hohe Empfindlichkeit der Massenspektrometrie für die Metallspurenanalytik beruht.

Tab. 2: Die ersten Ionisierungspotentiale [32] sowie theoretische [30] und experimentelle [33] Ionenausbeuten ausgewählter Elemente

Element	Ionisierungspotential [eV]	theoretische Ionenausbeute [%]	experimentelle Ionenausbeute [%]
C	11.260	3-12	35
S	10.360	12-36	15
Hg	10.438	12-36	40
Co	7.881	91-98	> 90
In	5.786	98	> 95

Die gebildeten Ionen werden durch die kegelförmigen Lochblenden (*cones*) des Interfaces, in dem ein Druck von wenigen hundert Pascal herrscht, durch die Ionenoptik (ca. 10 mPa) ins Hochvakuum (< 1 mPa) von Massenseparator und Detektor extrahiert.

Die Massentrennung erfolgt durch einen Quadrupol (siehe Kap.2.1.3) oder ein doppelfokussierendes System (siehe Kap.2.1.4). Weniger häufig werden zur Massenseparation TOF und IT (*ion trap*) verwendet.

2.1.2. Massenspektrometrische Interferenzen

Ein Problem in der ICP-MS sind Interferenzen im Massenspektrum. Man unterscheidet zwischen isobaren Interferenzen, Interferenzen durch doppelt geladene Ionen und Molekülion-Interferenzen. Isobare Interferenzen entstehen durch Isotope der gleichen Massenzahl aber eines anderen Elements. Zur Korrektur wird ein anderes Isotope des interferierenden Elements gemessen und anhand der natürlichen Häufigkeit der Beitrag des interferierenden Isotopes mathematisch berechnet und subtrahiert. Die Korrektur von doppelt geladenen Ionen erweist sich wegen variierender Ionisierungswahrscheinlichkeiten als schwierig, da der Anteil der doppelt geladenen Ionen stark von der Matrix und den Plasmabedingungen abhängt. Molekülion-Interferenzen sind noch stärker von der Matrix beeinflusst und können daher nicht mathematisch korrigiert werden. In Tab. 3 sind einige Molekülionen-Interferenzen, die die in dieser Arbeit gemessenen Elemente stören können, aufgeführt.

Tab. 3: Ausgewählte Isotope und interferierende Molekülionen

Interferiertes Isotop	Molekülion	Interferiertes Isotop	Molekülion
$^{32}\text{S}^+$	$^{16}\text{O}_2^+$	$^{59}\text{Co}^+$	$^{40}\text{Ar}^{19}\text{F}^+$
$^{33}\text{S}^+$	$^{32}\text{S}^1\text{H}^+$	$^{63}\text{Cu}^+$	$^{40}\text{Ar}^{23}\text{Na}^+$
$^{34}\text{S}^+$	$^{33}\text{S}^1\text{H}^+$, $^{17}\text{O}_2^+$	$^{65}\text{Cu}^+$	$^{49}\text{Ti}^{16}\text{O}^+$
$^{36}\text{S}^+$	$^{35}\text{Cl}^1\text{H}^+$	$^{201}\text{Hg}^+$	$^{185}\text{Re}^{16}\text{O}^+$
$^{52}\text{Cr}^+$	$^{40}\text{Ar}^{12}\text{C}^+$	$^{202}\text{Hg}^+$	$^{186}\text{W}^{16}\text{O}^+$
$^{53}\text{Cr}^+$	$^{37}\text{Cl}^{16}\text{O}^+$		

Um Interferenzen zu minimieren, gibt es unterschiedliche Ansätze. Wenn es möglich ist, werden störende Elemente oder Matrices während der Probenaufbereitung entfernt. Dies stellt die effektivste Möglichkeit dar. Jedoch können die im Plasma gebildeten Argon-Interferenzen so nicht verringert werden. Stattdessen wird durch Zugabe von Hilfsgasen [34] und Verwendung von Mischgasplasmen [35] versucht, die Interferenzen zu reduzieren. Andere Anstrengungen wurden im Bereich von Stoßzellen [36-37] und modifizierten Plasmabedingungen wie „*cold plasma*“ [38] und „*shielded torch*“ [39] unternommen. Interferenzen in wässrigen Proben durch Oxide und Hydride lassen sich durch Trocknung des Aerosols mit Desolvatisierungseinheiten unterdrücken [40]. Jedoch sind diese Methoden auf jeweils bestimmte

Problemfälle beschränkt, wobei die Multi-Element-Fähigkeit der ICP-MS oftmals verloren geht.

Eine weitere Lösung des Interferenz-Problems stellt die Verwendung von hochauflösenden Massenspektrometern dar. Bei einer Auflösung bis zu 12000 ist eine Abtrennung vieler Molekülionen-Interferenzen möglich, aber gleichzeitig wird die Transmission auf 1-2 % vermindert. Nachteilig wirkt sich die Verwendung eines Magneten (im Vergleich zum Quadrupol) auf die Scan-Geschwindigkeit aus, die sich besonders bei Messung transienter Signale bemerkbar macht. Daher stellt die hochauflösende Massenspektrometrie eine wichtige Alternative dar, kann aber nicht in allen Fällen sinnvoll eingesetzt werden.

2.1.3. Massentrennung mit einem Quadrupol-Massenfilter

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei ICP-MS verwendet. Zum einen das Elan 5000 (Perkin-Elmer SCIEX), welches ein Quadrupol-Massenspektrometer ist, und das Element 2 (Finnigan MAT), welches ein magnetisches und ein elektrisches Sektorfeld verwendet (siehe Kap. 2.1.4). In Abb. 6 ist der schematische Aufbau des Elan 5000 dargestellt. Nach Zerstäubung der Probe werden die Analyten im Plasma ionisiert, durch elektrische Linsen fokussiert und durch einen Quadrupol-Massenfilter aufgetrennt. Die Detektion erfolgt über einen Channeltron.

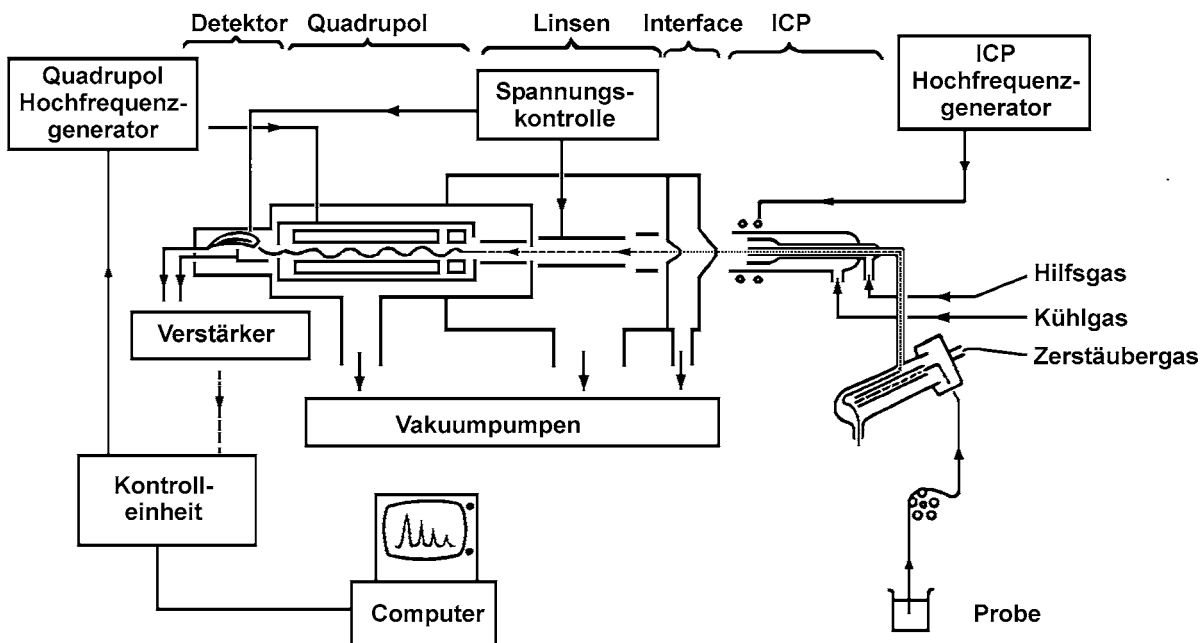


Abb. 6: Schematischer Aufbau eines ICP-MS mit Quadrupol-Massenfilter [41]

Ein Quadrupol-Massenfilter besteht aus vier zylindrischen, parallelen Metallstäben (siehe Abb. 7), wobei jeweils zwei gegenüberliegende Stäbe elektrisch verbunden sind. An diesen Paaren ist eine Spannung $U(t)$ angelegt, die sich aus einer Gleichspannung U_0 sowie einer um 180° phasenverschobenen Hochfrequenz-Wechselspannung $V(t)$ zusammensetzt.

$$(1) \quad U(t) = U_0 + V_0 \cos\{\omega t\}$$

Mittels angelegter elektrischer Gleich- und Wechselspannung wird im Innenraum eines Quadrupol-Massenfilters ein elektrisches Feld produziert, daß nur von Ionen durchfliegen werden kann, die ein bestimmtes Masse-Ladungs-Verhältnis haben. Alle anderen Ionen folgen einer instabilen Bahn und werden an den Quadrupol-Stäben entladen, wodurch sie nicht mehr am Detektor ankommen.

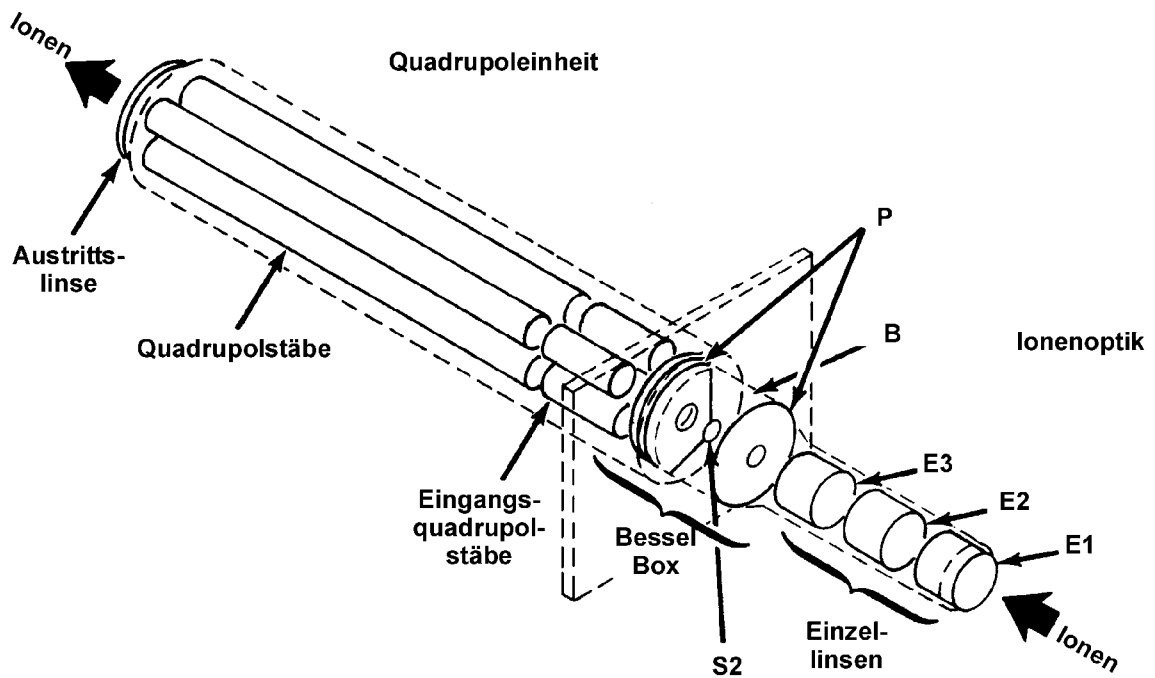


Abb. 7: Skizze der Ionenoptik und Quadrupoleinheit des Elan 5000 [42]

Idealerweise sollte man parabolisch geformte Stäbe verwenden, die jedoch in der Herstellung und Montage zu aufwendig sind. Haben sie einen Abstand r_0 vom Zentrum erhält man das Potential Φ in Abhängigkeit von Ort (x, y) und Zeit (t) :

$$(2) \quad \phi(x, y, t) = \frac{U(t)}{2r_0^2}(x^2 + y^2)$$

Für ein Ion der Masse m und der Ladung q ergibt sich folgende Bewegungsgleichung mit dem Ortsvektor r :

$$(3) \quad \ddot{r} = \frac{q}{mr_0^2} (U_0 + V_0 \cos\{\omega t\})r$$

Zur Vereinfachung führt man die Variablen a , b und τ ein

$$(4) \quad a = -\frac{8qU}{mr_0^2\omega^2} \quad b = \frac{4qV}{mr_0^2\omega^2} \quad \tau = \frac{\omega t}{2}$$

und erhält die Mathieu-Differential-Gleichungen:

$$(5) \quad \ddot{r} = (2b \cos\{2\tau\} - a)r$$

Aus der Mathieu-Gleichung ergeben sich für bestimmte a - und b -Werte Lösungen (siehe Abb. 8), die stabilen Ionenbahnen entsprechen. Wenn sich die Stabilitätsbereiche in x - und y -Richtung überlappen, kann das Ion den Detektor erreichen.

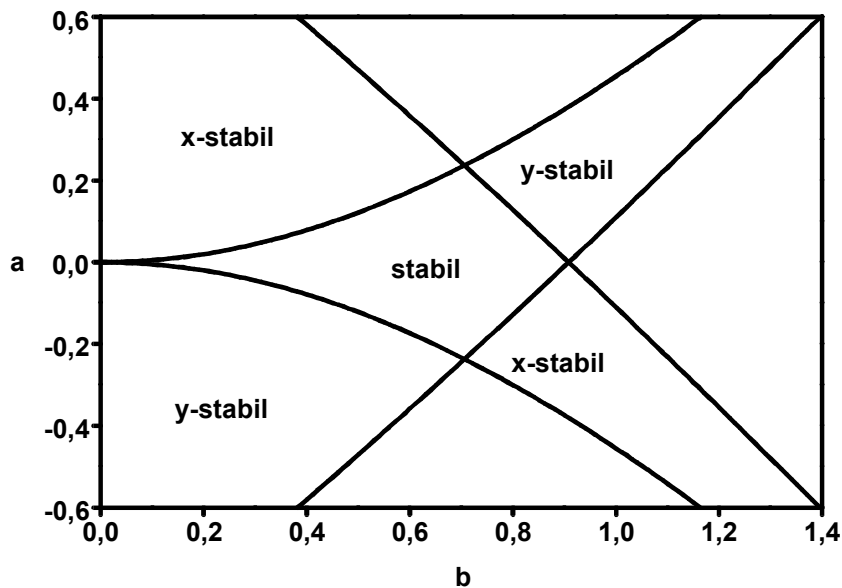


Abb. 8: Stabilitätsdiagramm eines Ions nach der Mathieu-Gleichung [43]

Werden U und V verändert (somit auch a und b), wandern jeweils Ionen mit einem bestimmten Massen-Ladungs-Verhältnis (m/q bzw. m/z mit $z=q/e_0$) in den Stabilitätsbereich. Auf diese Weise lässt sich ein Massenspektrum aufnehmen. Da sich U und V sehr schnell einstellen lassen, ist ein schnelles Scannen oder das Springen zu bestimmten Massen (m/z) möglich. Da der Quadrupol zudem billiger und kleiner als ein Magnetsektor ist, hat er bei kommerziellen Geräten eine weite Verbreitung.

2.1.4. Massentrennung mit einem doppelfokussierenden Gerät

Das zweite in dieser Arbeit verwendete Gerät (Element 2, Finnigan MAT) ist ein doppelfokussierendes ICP-MS. Doppelfokussierende Geräte bestehen aus einem magnetischen und einem elektrischen Sektorfeld. Folgt das magnetische Sektorfeld dem elektrischen, spricht man von einer Nier-Johnson-Geometrie und im umgekehrten Fall von einer inversen Nier-Johnson-Geometrie (siehe Abb. 9). Ein besonderer Fall liegt vor, wenn dem elektrischen Sektorfeld (31.5°) ein magnetisches mit 45° -Winkel folgt. Man bezeichnet diese Anordnung als Mattauch-Herzog-Geometrie. Hierbei werden die Ionen auf einer Brennebene fokussiert, so daß zur Detektion auch Fotoplatten verwendet werden können. Die Benutzung von fotografischen Detektoren ist fast vollständig durch Einsatz von elektronischen Detektoren verdrängt worden, so daß man die Mattauch-Herzog-Geometrie seltener findet. Jedoch könnte die fortschreitende Entwicklung von Dioden-Array-Detektoren eine Renaissance dieser Geometrie einleiten.

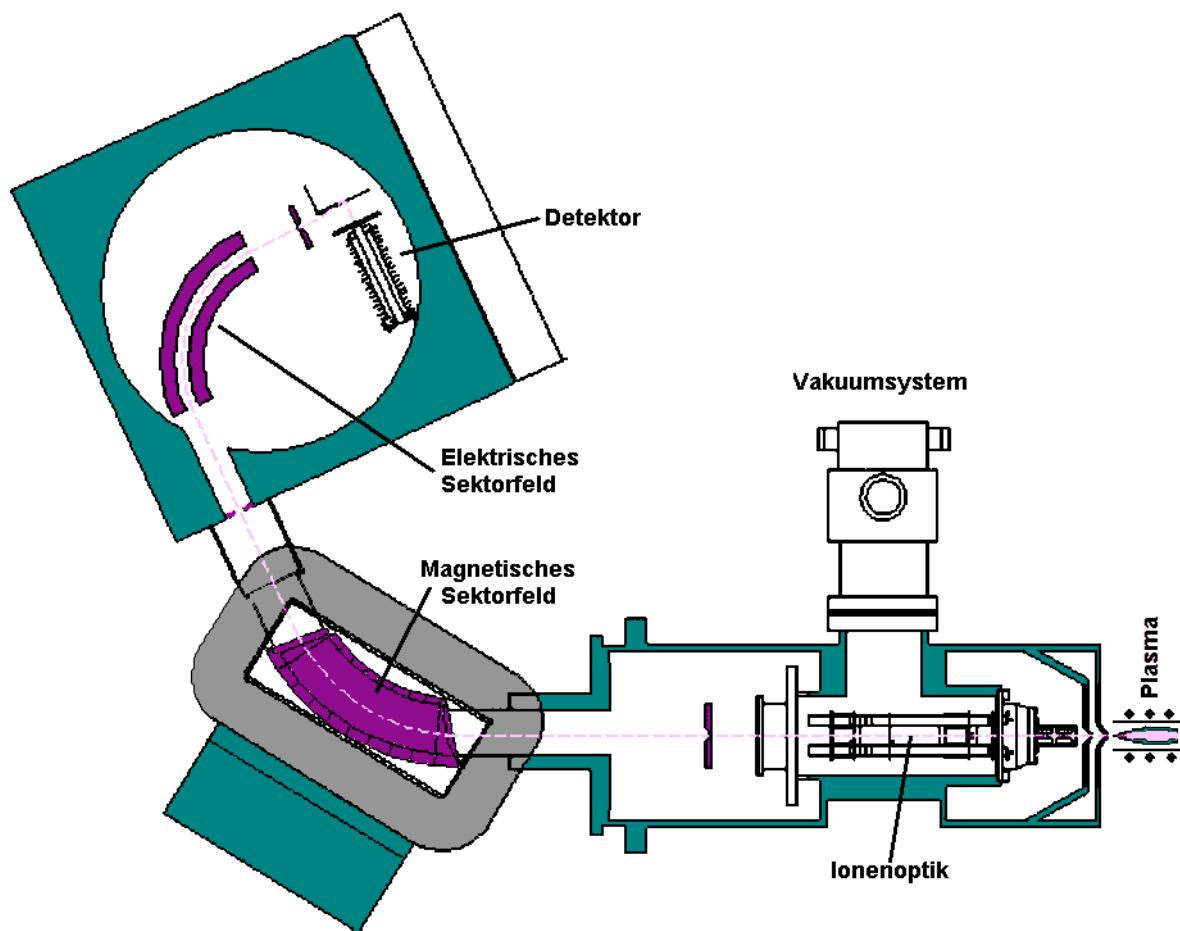


Abb. 9: Schematischer Aufbau des doppelfokussierenden ICP-MS Element 2 [44]

Wenn Ionen mit der Geschwindigkeit v durch ein Magnetfeld B fliegen, werden sie der Zentripetal- und der Zentrifugal-Kraft ausgesetzt, die in entgegengesetzter Richtung wirken. Setzt man diese Kräfte gleich, erhält man den Bahnradius R_B des Ions der Masse m und der Ladung q .

$$(6) \quad R_B = \frac{m \cdot v}{q \cdot B}$$

In einem Massenspektrometer werden die Ionen durch eine angelegte Spannung U beschleunigt ($E_{\text{kin}}=U \cdot q$), so daß man Gl. (6) wie in Gl. (7) darstellen kann. Im Idealfall haben alle Teilchen eines Masse-Ladungs-Verhältnisses (m/q bzw. m/z) die gleiche Geschwindigkeit und man erkennt, daß bei konstanter Beschleunigungsspannung U und Magnetfeld B nur das Masse-Ladungs-Verhältnis Einfluß auf den Bahnradius hat.

$$(7) \quad R_B = \sqrt{\frac{m \cdot 2U}{q \cdot B^2}}$$

Aufgrund von unterschiedlichem Ionisierungsort und -zeitpunkt haben die Ionen gleichen Massen-Ladungsverhältnisses nicht die gleiche kinetische Energie (also Geschwindigkeit) und unterscheiden sich daher etwas in ihren Bahnradien R_B (Signalverbreiterung). Ein elektrisches Sektorfeld trennt die Ionen daher aufgrund ihrer kinetischen Energie, aber massenunabhängig.

$$(8) \quad R_E = \frac{2}{q \cdot E_{\text{el. Sektorfeld}}} \cdot E_{\text{kin}}$$

Ziel der Doppelfokussierung ist es, die Dispersion der Ionen in ihrer Richtung zu fokussieren und zusätzlich die Energieinhomogenität zu korrigieren. Abb. 10 zeigt eine inverse Nier-Johnson-Geometrie und die Ionenbahnen von Teilchen mit gleichem Masse-Ladungs-Verhältnis, aber unterschiedlicher Richtungs- und Energieverteilung. Das Magnetsektorfeld bewirkt eine Richtungsfokussierung (schwarze Linien), jedoch werden Ionen mit unterschiedlicher Energie an unterschiedlichen Orten abgebildet (graue Linien) Dies hat eine Unschärfe bei einfach fokussierenden Geräten zur Folge. Das nachgeschaltete elektrische Sektorfeld führt nun auch die energetisch unterschiedlichen Ionen wieder in einem Punkt zusammen. Diese Technik wird daher für hochauflösende Massenspektrometer verwendet, weil eine höhere Peak-Schärfe und Signal-Intensität erreicht werden kann. Zusätzlich eingebaute Spalte für die Hochauflösung zur Begrenzung des Ionenbündels führen

jedoch zu einem Intensitätsverlust. So beträgt die Signal-Intensität beim Element 2 in Mittelauflösung noch 10 % und bei Hochauflösung 2 % der Intensität in Niedrigauflösung.

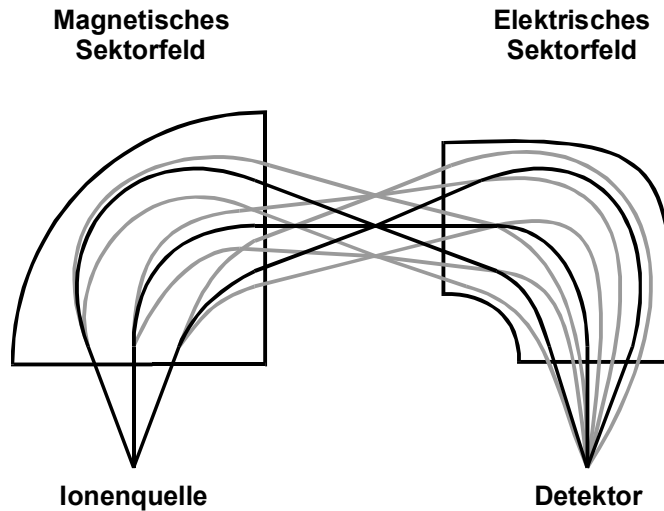


Abb. 10: Ionenbahnen für Teilchen mit gleichem Masse-Ladungs-Verhältnis, aber unterschiedlicher Richtungs- und Energieverteilung in einem magnetischen und elektrischen Sektorfeld

2.1.5. Massenspektrometrische Isotopenverdünnungsanalyse

Die massenspektrometrische Isotopenverdünnungsanalyse (MSIVA) gilt heute als eines der zuverlässigsten Verfahren in der Elementspurenanalyse. Es ist eine definitive Methode, die zu vergleichsweise richtigen Ergebnissen führt [45]. Sie wird daher oft als Referenzmethode zur Validierung von Routinemethoden verwendet, da sie keiner externen Kalibrierung bedarf. Diese Vorteile spielen bei der Zertifizierung von Standard-Referenzmaterialien, bei denen die MSIVA unter anderem eingesetzt wird, eine wichtige Rolle. Zur Konzentrationsbestimmung gibt man zu einer Probe mit natürlicher Isotopenverteilung eine genau bekannte Menge einer an einem Isotop angereicherten Lösung (Spike). Die Mischung hat ein Isotopenverhältnis, das zwischen dem natürlichen und dem des Spikes liegt. Anschließende Substanzverluste wirken sich nicht mehr auf das Analyseergebnis aus, da sich das Isotopenverhältnis hierbei nicht mehr ändert. Dieses wird massenspektrometrisch bestimmt und mit einem R-Wert (Ratio) angegeben. Voraussetzungen für die MSIVA sind eine vollständige Mischung von Probe und Spike sowie die Existenz von mindestens zwei stabilen oder quasistabilen Isotopen. Es gibt daher etwa 15 Elemente, die nur mit Hilfe radioaktiver Isotope gemessen werden können. Die

Isotopenverhältnisse bei Mischung einer Probe mit einem Spike sind am Beispiel von Kohlenstoff in Abb. 11 dargestellt.

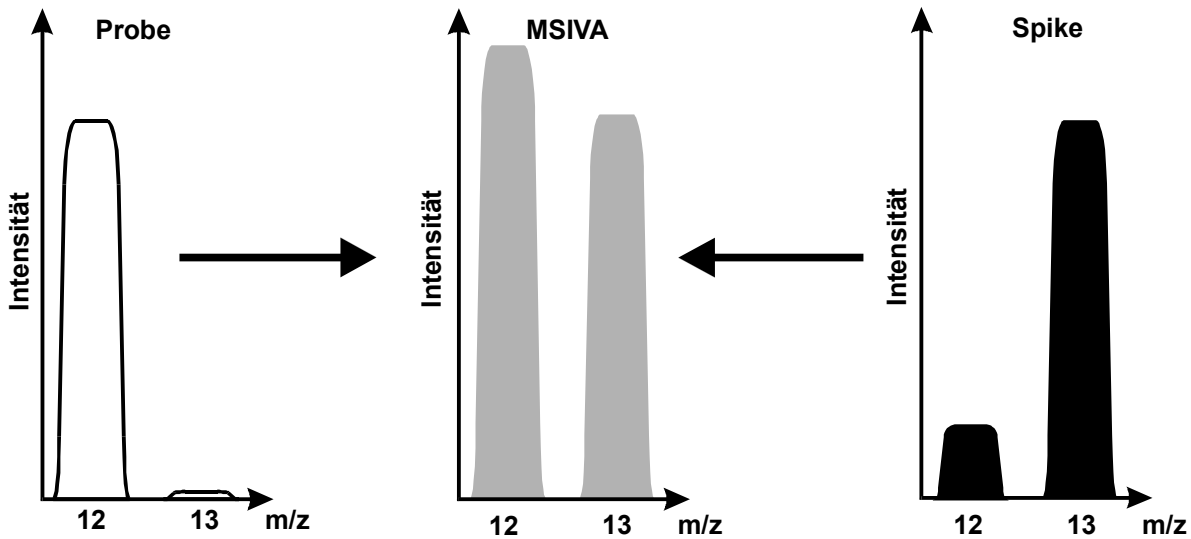


Abb. 11: Schematische Darstellung der Isotopenverhältnisse bei der MSIVA am Beispiel von Kohlenstoff

Das Mischungs-Isotopenverhältnis R setzt sich aus den Häufigkeiten der Isotope von Probe und Spike zusammen und lässt sich nach Gl. (9) berechnen.

$$(9) \quad R = \frac{h_S^{12} \cdot N_S + h_{Pr}^{12} \cdot N_{Pr}}{h_S^{13} \cdot N_S + h_{Pr}^{13} \cdot N_{Pr}}$$

h_S^{12}, h_S^{13} Häufigkeiten der Isotope ^{12}C und ^{13}C des Spikes [%]

h_{Pr}^{12}, h_{Pr}^{13} Häufigkeiten der Isotope ^{12}C und ^{13}C in der Probe [%]

N_S, N_{Pr} Zahl der zugegebenen Atome des Spikes bzw. Probe

Zur Bestimmung der Probenkonzentration mittels MSIVA wird Gl. (9) umgeformt und man erhält Gl. (10).

$$(10) \quad c_{Pr} = c_{Ind} \cdot \frac{E_S \cdot M_{Pr}}{E_{Pr} \cdot M_S} \cdot \frac{h_S^{12} - h_S^{13} \cdot R}{h_{Pr}^{13} \cdot R - h_{Pr}^{12}}$$

c_S, c_{Pr}	Konzentration des Spikes bzw. der Probe	[g/g]
E_S, E_{Pr}	Einwaage des Spikes bzw. der Probe	[g]
M_S, M_{Pr}	Atommasse des Kohlenstoffs im Spike bzw. der Probe	[g/mol]

Unter Berücksichtigung des Blindwertes erhält man Gl. (11).

$$(11) \quad c_{Pr} = c_S \cdot \frac{E_S \cdot M_{Pr}}{E_{Pr} \cdot M_S} \cdot \frac{h_S^{12} - h_S^{13} \cdot R}{h_{Pr}^{13} \cdot R - h_{Pr}^{12}} - \frac{BL}{E_{Pr}}$$

BL	Blindwert der Probenaufbereitung	[g]
----	----------------------------------	-----

Zur Charakterisierung der eingesetzten Spikes wird die »inverse« MSIVA verwendet. Hierzu wird der Spike mit einem Standard bekannter Konzentration gemischt und der Gehalt nach Gl. (12) berechnet.

$$(12) \quad c_S = c_{Std} \cdot \frac{E_{Std} \cdot M_S}{E_S \cdot M_{Std}} \cdot \frac{h_{Std}^{12} - h_{Std}^{13} \cdot R}{h_S^{13} \cdot R - h_S^{12}}$$

c_{Std}	Konzentration des Standards	[g/g]
E_{Std}	Einwaage des Standards	[g]
M_{Std}	Atommasse des Kohlenstoffs im Standard	[g/mol]
$h_{Std}^{12}, h_{Std}^{13}$	Häufigkeiten der Isotope ^{12}C und ^{13}C im Standard	[%]
N_{Std}	Zahl der zugegebenen Atome des Standards	

Bei der MSIVA wirkt sich der statistische Fehler des Isotopenverhältnisses R am stärksten aus. Um diesen möglichst gering zu halten, werden Spike-Zugabe und Spike-Häufigkeit optimiert. Die Fehlerfortpflanzung der MSIVA zeigt Gl. (13).

$$(13) \quad S_{N_{Pr}}^2 = S_{N_S}^2 + F_R^2 \cdot S_R^2$$

$S_{N_{Pr}}, S_{N_S}$	Relativer stat. Fehler der Probenmenge N_{Pr} bzw. Spike-Menge N_S
S_R	Relativer stat. Fehler des Isotopenverhältnisses bei MSIVA
F_R	Fehlerübertragungsfaktor für S_R

Wie Gl. (14) für Kohlenstoff zeigt, ist der Betrag des Fehlerübertragungsfaktors von den Häufigkeiten von Probe und Spike sowie dem Mischungsisotopenverhältnis der MSIVA abhängig.

$$(14) \quad |F_R| = \frac{\left(\frac{h_{Pr}^{12}}{h_{Pr}^{13}} - \frac{h_S^{12}}{h_S^{13}} \right) \cdot R}{\left(R - \frac{h_{Pr}^{12}}{h_{Pr}^{13}} \right) \cdot \left(\frac{h_S^{12}}{h_S^{13}} - R \right)}$$

Abb. 12 stellt den Betrag des Fehlerübertragungsfaktors in Abhängigkeit der Spike-Häufigkeiten und des Mischungsisotopenverhältnisses R graphisch dar (das natürliche Isotopenverhältnis der Probe ist nicht beinflußbar). Je höher der Spike an ¹³C angereichert ist, desto breiter wird der Bereich, in dem der Fehler von R nur einen kleinen Einfluß auf das Analysenergebnis hat. Daher sollte im allgemeinen bei Spikes das Isotop mit der geringsten natürlichen Häufigkeit möglichst hoch angereichert werden.

Des weiteren leidet die Reproduzierbarkeit bei Messung von extremen Isotopenverhältnissen aufgrund von Blindwertschwankungen. Daher sollte die Spike-Zugabe so optimiert sein, daß einerseits der Fehlerübertragungsfaktor gering, andererseits das Isotopenverhältnis nahe 1 liegt.

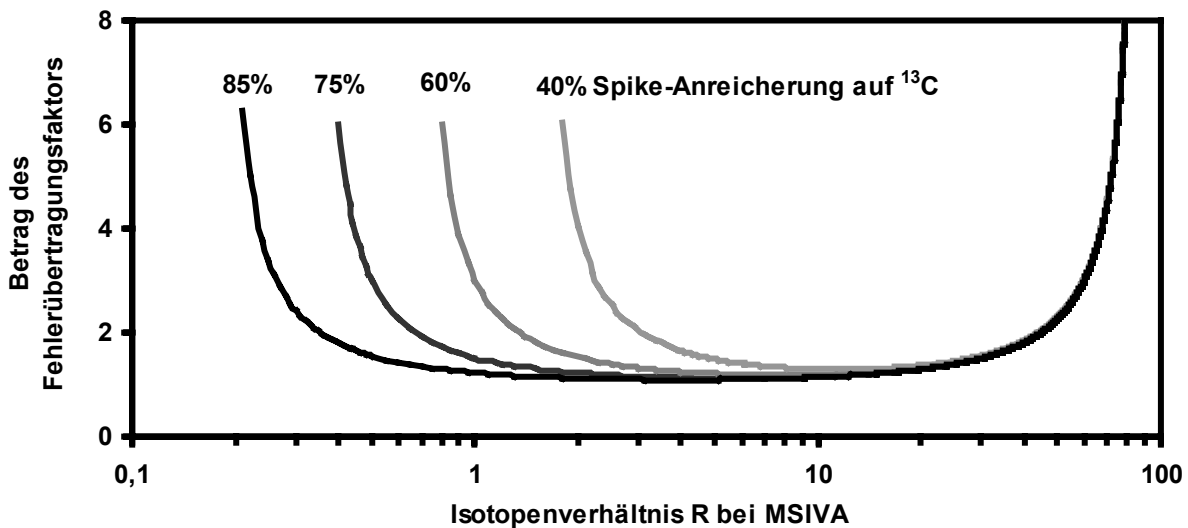


Abb. 12: Darstellung des Fehlerübertragungsfaktors in Abhängigkeit des R-Wertes und Spike-Anreicherungen von 40 % - 85 % am Beispiel von Kohlenstoff

2.2. Angewandte chromatographische Trennverfahren

2.2.1. Grundlagen der Größenausschlußchromatographie

Die Separation mit Größenausschlußchromatographie (*size exclusion chromatography*, SEC) basiert auf der Permeation der molekularen Spezies in definierte Poren des Säulenmaterials (siehe Abb. 13). Kleine Moleküle (C) wandern stärker in die Poren als große (B), wodurch sich die Durchflußgeschwindigkeit für die kleinen Moleküle verringert (Retardation). Moleküle, die die Porengröße überschreiten (A), sind völlig ausgeschlossen und eluieren mit der Lösungsmittelfront. Große Moleküle erscheinen daher am Anfang des Chromatogramms (kurze Retentionszeit) und kleine Moleküle am Ende (lange Retentionszeit).

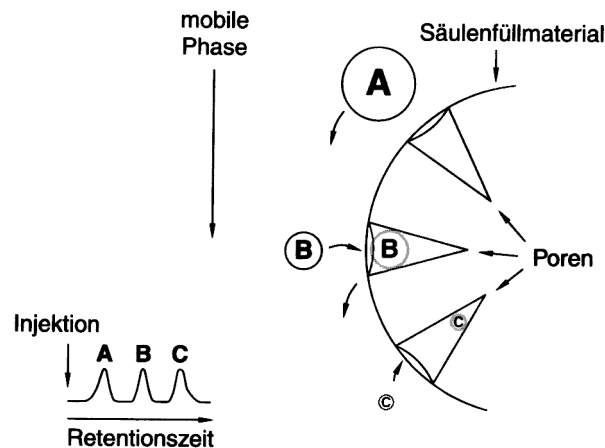


Abb. 13: Darstellung des Trennungsmechanismus der SEC [46]

Mit der SEC ist also eine Trennung nach Molekülgröße möglich. Geht man von strukturell ähnlichen Molekülen aus, ist die Elutionsreihenfolge eine Funktion des Molekulargewichts, d.h. die höher molekularen Verbindungen eluieren zuerst, die niederen später. Sofern Molekülstandards existieren, kann die SEC zur Molekulargewichtsbestimmung verwendet werden (siehe auch Kap.3.3.3). Ein großer Vorteil der SEC ist, daß die Probe nur geringe Wechselwirkungen mit dem Säulenmaterial eingeht. Dies ermöglicht eine hohe Wiederfindungsrate auch bei Molekülen mit einer hohen Dichte an funktionellen Gruppen wie z.B. Huminstoffen (siehe auch Kap. 3.6.3). Ein weiterer Vorteil dieser Trennmethode ist die definierte Länge des Chromatogramms. Das Zwischenkornvolumen (V_z) bestimmt die Retentionszeit von großen, ausgeschlossenen Molekülen und das Porenvolumen (V_p) ist ein Maß für die Retentionszeit kleiner, retardierter Moleküle. Unter Berücksichtigung der Fluß-

geschwindigkeit (ρ_{SEC}) läßt sich nach Gl. (17) die Dauer des Chromatogramms berechnen.

$$(17) \quad t = \frac{V_z + V_p}{\rho_{SEC}}$$

Die Separation von Biomolekülen in aquatischen Systemen wird oft als Gel-filtrationschromatographie (GFC) bezeichnet, während sich für die Trennung von organischen Polymeren in nicht-aquatischen Systemen der Begriff Gelpermeationschromatographie (GPC) durchgesetzt hat.

Die oft verwendete Kalibrierung einer SEC-Säule mit Polystyrol-Standards ist selbst mit Korrekturfaktoren nicht für Huminstoffe geeignet. Wegen ihrer hohen Funktionalität und strukturellen Vielfalt lassen sich keine geeigneten Standardverbindungen finden oder darstellen. Veränderungen des pH-Wertes, der Ionenstärke und die Konzentration der HS selbst haben großen Einfluß auf die Größe der Moleküle. Es können daher nur relative Aussagen über die mit SEC erhaltenen Huminstoff-Fractionen gemacht werden. Moleküle in Fractionen, die nach kurzer Retentionszeit eluieren, sind größer als die retardierten Moleküle. Unter gleichen Bedingungen können jedoch Fractionen unterschiedlicher Chromatogramme verglichen werden und damit Unterschiede oder Parallelen aufgezeigt werden.

2.2.2. Kapillarelektrophorese

Die Kapillarelektrophorese (*capillary electrophoresis*, CE) ist ein Vorgang, bei dem geladene Teilchen aufgrund unterschiedlicher Wanderungsgeschwindigkeiten in einem elektrischen Feld getrennt werden. Sie spielt eine zentrale Rolle in vielen Forschungsbereichen der Biochemie und Molekularbiologie bei der Trennung, Isolierung und Analyse von Proteinen, Polynucleotiden und anderen Biopolymeren [47]. In der Literatur findet man auch die Bezeichnungen Kapillarzonenelektrophorese (CZE) oder Hochleistungs-Kapillarelektrophorese (HPCE), wobei zu beachten ist, daß es sich bei der CE um eine Trennung aufgrund elektrischer Eigenschaften handelt und die Separation nicht durch ein unterschiedliches Verhalten zwischen mobiler und stationärer Phase (vergl. HPLC) bedingt ist [48]. Der Aufbau einer CE ist in Abb. 14 dargestellt.

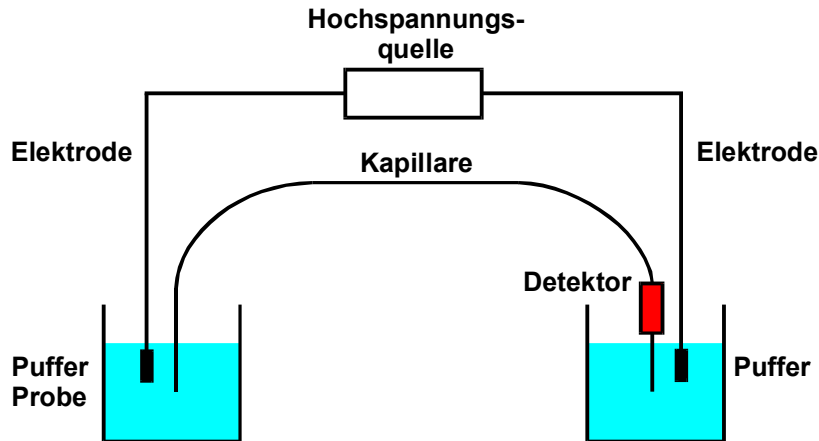


Abb. 14: Aufbau einer Kapillarelektrophorese (CE)

Eine mit Puffer gefüllte Kapillare taucht mit beiden Enden in jeweils ein Puffergefäß. In der Regel handelt es sich um eine Quarzkapillare, wie sie auch in der Kapillar-Gaschromatographie Verwendung findet. Sie ist 50-100 cm lang und hat einen Innendurchmesser von 25-100 μm . Die beiden eintauchenden Elektroden sind mit einer Hochspannungsquelle verbunden, an der Spannungen von 20-30 kV erzeugt werden [47]. Die Probeninjektion kann durch die Schwerkraft erfolgen. Hierbei wird das Kapillarende in die Probenlösung getaucht und anschließend etwa 10 cm über das Pufferniveau gehoben. Eine andere Möglichkeit bietet das Anlegen eines Gasdrucks auf das Probengefäß, so daß die Probe in die Kapillare eindringen kann. Zur Detektion der Ionen direkt auf der Säule werden UV-, Diodenarray- und Fluoreszenz- sowie miniaturisierte elektrochemische Detektoren eingesetzt [49]. Eine Besonderheit der CE ist der elektroosmotische Fluß (EOF). Er entsteht durch die Ausbildung einer Doppelschicht zwischen der Lösung und der Oberfläche der Kapillarwand. Die Innenwand einer *Fused-Silica*-Kapillare ist aufgrund dissoziiert vorliegender Silanolgruppen negativ geladen. Diese negative Schicht zieht positive Ionen aus der Flüssigkeit an, so daß eine positiv geladene Flüssigkeitssäule entsteht. Die beweglichen positiven Ionen werden von der negativen Elektrode angezogen und reißen die anderen Flüssigkeitsmoleküle mit. Hierdurch wird das Fließprofil annähernd flach und nicht parabolisch wie im Falle eines hydrodynamischen Drucks (Abb. 15). Während in der Säulenchromatographie (HPLC) der hydrodynamische Druck zur Bandenverbreiterung beiträgt, ist dies durch das flache Fließprofil bei der CE nicht von Bedeutung.

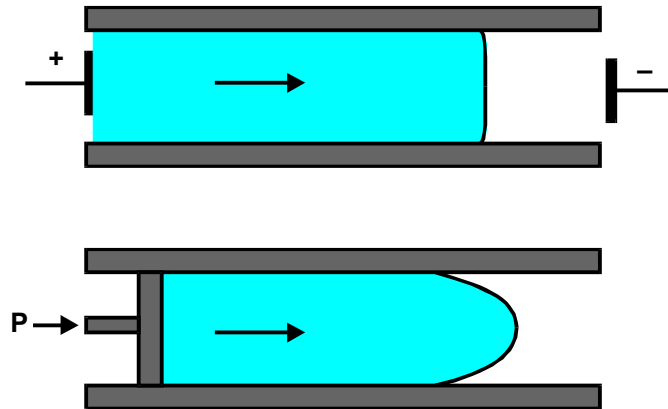


Abb. 15: Fließprofile von Flüssigkeiten unter elektroosmotischem (oben) und hydrodynamischem (unten) Druck [47]

Die Trennung gelöster Teilchen ist durch ihre unterschiedliche elektrophoretische Beweglichkeit gegeben, die proportional zur Ladung und umgekehrt proportional zur Größe und Form des Analyten ist. Weiterhin haben die Lösungsmitelegenschaften wie Ionenstärke, pH-Wert und Dielektrizitätskonstante einen großen Einfluß. Kationen erfahren eine Beschleunigung und bewegen sich daher schneller als der elektroosmotische Fluß, der der Geschwindigkeit von neutralen Teilchen entspricht. Negative Teilchen bewegen sich langsamer, da sie von der Kathode abgestoßen werden und können unter bestimmten Voraussetzungen sogar in die entgegengesetzte Richtung wandern. Auf diese Weise werden geladene Teilchen aufgetrennt, während dies für ungeladene nicht möglich ist. Möchte man auch ungeladene Teilchen trennen, wird die mizellare elektrokinetische Kapillarchromatographie (MECC) angewendet [50]. Hierbei werden dem Puffer oberflächenaktive Substanzen zugefügt, z.B. Natriumdodecylsulfat, so daß sich mit den ungeladenen Teilchen Mizellen ausbilden, die durch ihre Ladung eine Auftrennung bewirken.

2.3. Huminstoffe

2.3.1. Klassifizierung und Isolierung

Der größte Teil der im Boden, Sedimenten und Gewässern vorkommenden organischen Substanzen wird den Huminstoffen (HS) zugeordnet. Als kennzeichnende Größe für gelöste organische Stoffe wird meist der DOC-Gehalt (dissolved organic carbon) angegeben. Dieser beträgt in nicht gefärbten Oberflächengewässern im Durchschnitt ca. 2 mg Kohlenstoff pro Liter, kann aber in gefärbten Wässern bis zu 50 mg/L und mehr betragen [51]. Daneben besteht noch immer eine Einteilung der HS, die zum Teil bis auf Berzelius (1839) zurückgeht. Sie erfolgt aufgrund der Löslichkeit der HS in die vier Hauptfraktionen Fulvinsäuren, Hymatomelansäuren, Huminsäuren und Humine und ist in Tab. 4 dargestellt. Die Fraktionen werden durch Auslaugen von Böden mit den entsprechenden Solventien oder durch Ausfällung erhalten.

Tab. 4: Einteilung der HS aufgrund ihrer Löslichkeit [52]

Fraktion	Löslichkeit		
	in Basen	in Alkohol	in Säuren
Fulvinsäuren	löslich	löslich	löslich
Hymatomelansäuren	löslich	löslich	unlöslich
Huminsäuren	löslich	unlöslich	unlöslich
Humine	unlöslich	unlöslich	unlöslich

Da die Konzentration aquatischer HS vergleichbar gering ist, wurden einige unterschiedliche Isolierungs- und Konzentrierungsmethoden entwickelt. Die Wahl einer bestimmten Methode muß jedoch in Zusammenhang mit der nachfolgenden Analyse gesehen werden, da keine Methode universell einsetzbar ist. Die Vor- und Nachteile sind daher in Tab. 5 zusammengefaßt. In der letzten Zeit werden hauptsächlich synthetische Polymere, wie XAD-Harze eingesetzt [53-55]. Sie gewährleisten bei leichter Anwendbarkeit eine hohe Sorptionsfähigkeit und Reproduzierbarkeit. Besonders das XAD-8-Verfahren ist für die Isolierung aus großen Volumina geeignet [56]. Auch viele der in dieser Arbeit verwendeten Proben wurden mit dem XAD-8-Verfahren im Rahmen des DFG-Schwerpunktprojektes „Refraktäre organische Säuren in Gewässern“ angereichert.

Tab. 5: Gebräuchliche Methoden zur Isolierung von HS [57]

Methode	Vorteile	Nachteile
Gefriertrocknung	geringe Denaturierung hoher Konzentrierungsfaktor	langsame Methode anorganische Ionen werden nicht abgetrennt
Eindampfen	geringe Denaturierung bei niedriger Temperatur	anorganische Ionen werden nicht abgetrennt
Extraktion	Fraktionierung der HS	limitierte Löslichkeit
Umkehrosmose	große Volumina schnelle Methode keine Artefakte	Membranfäule gemeinsame Konzentrierung der meisten Soluten
Ultrafiltration	schnelle Methode keine Artefakte Fraktionierung der HS	Membranfäule undefinierte Fraktionierung nach Größe und Ladung
Sorption/ Desorption	leicht kontrollierbar große Volumina Regenerierung der Säulen	Säulenbluten irreversible Sorption Artefakte bei hohem pH

2.3.2. Genese und Struktur

Schon seit Beginn der chemischen Evolution spielen HS eine bedeutende Rolle in den Stoffkreisläufen der aquatischen und terrestrischen Systeme und sind daher in allen Biotopen zu finden. Elementaranalytische Untersuchungen ergeben als Hauptkomponenten C, H, N und O sowie im Spurenbereich S, P, Si und Metalle. Es wurden Proben mit höchst unterschiedlichem Stickstoff- und Schwefelgehalt gefunden, so daß wohl nur C, O und H essentiell sind. HS entstehen aus postmortalen Materialien über unzählige Reaktionen und erreichen ein Molekulargewicht von 0.8 - 10 kD. Durch die Vielzahl der Ausgangsmaterialien und Reaktionen unter den unterschiedlichsten Bedingungen entstehen Moleküle mit einer großen Verteilung des Molekulargewichts, der Struktur und Funktionalität (siehe Tab. 6). Daher ist es fast auszuschließen, in einer Probe zwei gleiche Moleküle zu finden. Durch Agglomeration werden Partikelgewichte bis 100 kD erreicht. Die sehr unterschiedlichen ineinandergreifenden Prozesse der Huminstoffgenese werden von Ziehmann [1] in charakteristische Phasen eingeteilt. So ist die vorangehende Biosynthese der Aromaten heute weitgehend aufgeklärt und kann auch als isolierter Prozeß betrachtet werden. Jedoch werden die Vorstufen der HS nicht

direkt aus den biologischen Grundsubstanzen gebildet, sondern auch aus den mikrobiell abgebauten aromatischen und nicht-aromatischen Fragmenten. Die aromatischen Fragmente unterliegen elektrophilen Angriffen, wobei unter Elektronenabgabe eine Radikalbildung erfolgt. Diese sind reaktiv genug, um in der Huminstoffmatrix fixiert zu werden und verhindern einen weiteren Abbau. Die Humifizierung kann daher als Konservierung betrachtet werden. In der Konformationsphase entstehen nun aus den unterschiedlichen aromatischen und nicht-aromatischen Verbindungen und Abbauprodukten die Vorstufen der HS. Aus diesen Vorstufen und komplexierten Nicht-Huminstoffen bildet sich letztendlich ein Huminstoffsystem aus. Die Mesomeriemöglichkeiten nehmen hierbei zu und Radikale stabilisieren sich. Mit zunehmender Größe sinkt die Wahrscheinlichkeit, daß zwei funktionelle Gruppen zusammentreffen, wodurch das Huminstoffsystem einen Gleichgewichtszustand erreicht.

Tab. 6: Funktionelle Gruppen in HS [58]

Funktionelle Gruppe	Bezeichnung
-OH	Hydroxy-Gruppe in Phenolen (Alkoholen)
-COOH	Carboxyl-Gruppe
R ₂ CO	Carbonyl-Gruppe (zumeist in Chinonen)
R-O-R	Etherbrücke
-OCH ₃	Methoxy-Gruppe
-SH	Mercapto-Gruppe
R-S-R	Thioetherbrücke
R ₂ SO	Sulfoxid-Gruppe
-SO ₃ H	Sulfonsäure-Gruppe
-NH ₂	Amino-Gruppe
>N-	heterocyclischer Stickstoff

Wie Tab. 7 zeigt, kann etwa die Hälfte des organischen Kohlenstoffs den HS zugeordnet werden. Eine Strukturaussage läßt sich jedoch aus der Klassifizierung über die Löslichkeit (vergl. Tab. 4) nicht treffen. Probleme der Strukturaufklärung entstehen durch die große Vielfalt der Moleküle. Man bedient sich daher einer Kombination von Methoden wie z.B. Elementaranalysen, IR- und NMR-Spektroskopie [59]. Auf diese Weise kann man zumindest die Funktionalität der HS abschätzen und Aussagen über die Anteile aromatischer und aliphatischer Strukturen treffen [60]. Weiterhin werden Pyrolyseverfahren angewandt, die in

Kombination mit *Molecular-Modeling*-Software zu Strukturvorschlägen fähig sind [61]. Jedoch ist zu betonen, daß es sich hierbei nicht um die Struktur eines realen Moleküls handelt, das man isoliert und charakterisiert hat, sondern eine Visualisierung von charakteristischen Eigenschaften der Molekül-Gesamtheit. So ist die Vielzahl der erarbeiteten möglichen Strukturen von HS als Arbeitsmodell für die Untersuchung von Reaktionen und Eigenschaften zu verstehen. Ein Beispiel für einen auf der Basis vieler massenspektrometrischer Untersuchungen beruhenden Strukturvorschlag zeigt Abb. 16.

Tab. 7: Zusammensetzung des gelösten organischen Kohlenstoffs in Oberflächengewässern [51]

Bestandteil	Anteil [%]
Fulvinsäuren	45
Huminsäuren	5
niedermolekulare Säuren	25
Kontaminationen	5
Basen	5
Neutralteilchen	15

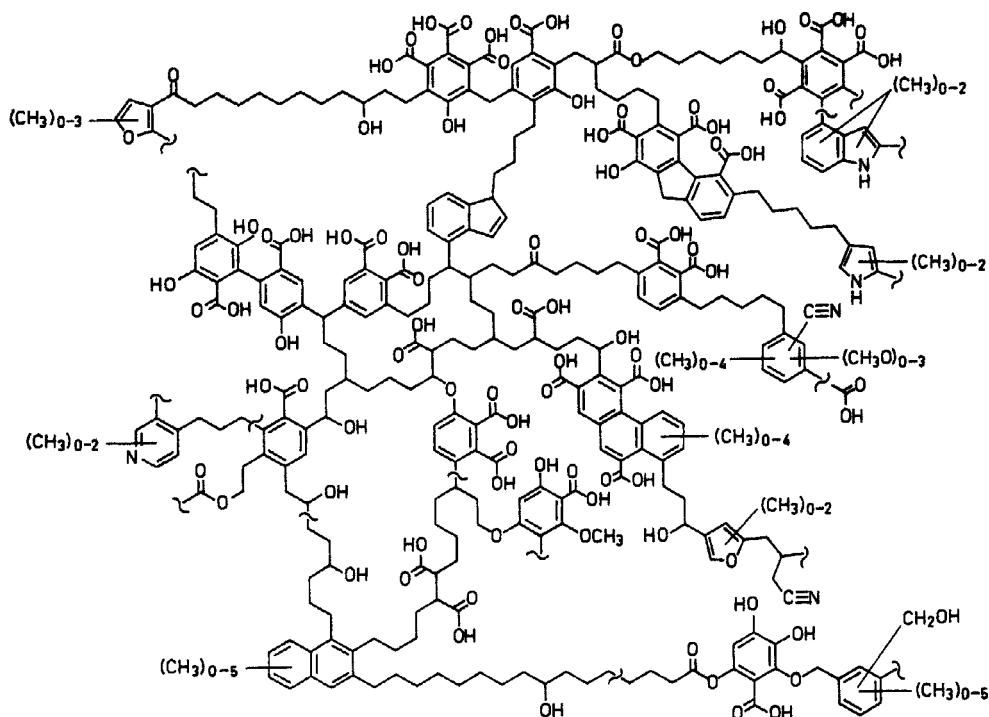


Abb. 16: Strukturvorschlag eines Huminstoff-Moleküls [62]

2.3.3. Wechselwirkungen mit Metallionen

Wegen der hohen Funktionalität von HS bilden sie eine besondere Klasse von Liganden mit einer hohen Metall-Bindungs­kapazität. Diese wird meist auf Kupfer bezogen und als CC_{Cu} (*complexing capacity*) bezeichnet und liegt im Bereich von 1-3 mmol Metall pro Gramm DOC [63]. Zur Bestimmung können ionenselektive Elektroden, voltammetrische Methoden [64, 65], spektrophotometrische Titrations­en [66], Ionenaustauscher [67] sowie die Ultrafiltration verwendet werden. Jin et. al. [68] haben umfangreiche Untersuchungen zu Komplexierungs­raten unterschiedlicher Metallionen durchgeführt. Wenn verschiedene Metallionen die gleichen Bindungsstellen benutzen, kommt es zu Konkurrenz- und Verdrängungsreaktionen. Wie Abb. 17 zeigt werden Chrom(III)-Ionen stärker als andere gebunden. Dies ist auf die hohe kinetische Stabilität der entstandenen Huminstoff-Komplexe (siehe Kap. 2.3.4) zurückzuführen [69].

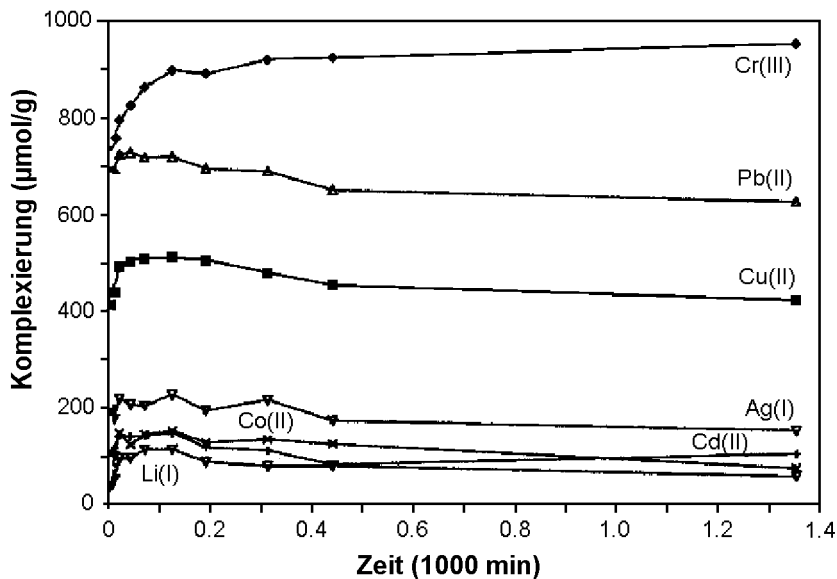


Abb. 17: Komplexierungsrate verschiedener Metallionen mit HS über einen Zeitraum von 24 h [68]

Auf diese Weise lassen sich für HS unterschiedlicher Herkunft charakteristische Reihen der Komplexierungs­raten aufstellen. Für einige in dieser Arbeit verwendeten HS sind die Metallaffinitätsreihenfolgen in Tab. 8 angegeben. Nachteilig ist, daß diese Untersuchungen meist an konzentrierten Huminstofflösungen durchgeführt werden, wodurch eine Übertragbarkeit auf HS natürlicher Konzentration und die Bindung zu Metallionen in geringerer, natürlicher Konzentration fraglich ist. Unter-

suchungen von Huminstoffwechselwirkungen sollten daher möglichst im natürlichen Konzentrationsbereich durchgeführt werden.

Tab. 8: Metallaffinitätsreihenfolge für HS verschiedener Herkunft bei pH 10 [70]

Probenbezeichnung	Gewässerart	Affinitätsreihenfolge
HO16 FA	Braunwasser	Cu > Ni > Pb > Zn > Cd
BS1 FA	Bodensickerwasser	Cu ≈ Ni > Pb > Zn > Cd
SV1 FA	Braunkohlepyrolyseabwasser	Cu > Ni > Zn > Pb > Cd
FG1	Grundwasser	Ni > Cu > Zn > Pb ≈ Cd
ABV2	Kläranlagenablauf	Ni > Cu > Zn ≈ Cd > Pb

Die unterschiedlich starke Bindung der verschiedenen Metalle ist auf die spezifische Struktur der HS zurückzuführen. So variieren die Anteile der in Tab. 6 angegebenen funktionellen Gruppen und somit auch die Art und Anzahl der Bindungsstellen für die entsprechenden Metallionen. Beispielsweise ist Kupfer primär an Carboxylgruppen und Chrom zusätzlich noch an anderen Gruppen (z.B. Phenol, -NH und -SH) gebunden [71]. Jedoch spielt der jeweilige pH-Wert des Huminstoffsystems eine wichtige Rolle. Bei einer Erhöhung des pH-Wertes wird ein größerer Anteil an Metallionen gebunden, da die Verfügbarkeit der Gruppen zunimmt. In Tab. 9 sind einige pK_s -Werte für funktionelle Gruppen, die in HS zu finden sind, aufgeführt. Abweichungen, die durch den Einfluß der HS-Moleküle auf die Gruppe auftreten können, sind nicht berücksichtigt.

Tab. 9: Allgemeine pK_s -Werte von in Huminstoffen vorkommenden funktionellen Gruppen [72]

Gruppe	Formel	pK_s -Wert
Alkohole	R-OH	16
Phenole	Ar-OH	10
Carboxylgruppen	R-COOH	4-5
Aminogruppen	R-NH ₂	35
Mercaptogruppen	R-SH	11

Weiterhin ist die Dichte der funktionellen Gruppen für die Ausbildung von Chelat-Komplexen von Bedeutung. Betrachtet man neben den rein aquatischen HS noch Konkurrenzreaktionen mit den Sedimenten, muß auch dem Einfluß von Tonmineralien und Oxidpartikeln Rechnung getragen werden.

2.3.4. Kinetische Stabilität von Huminstoff-Komplexen

Aber nicht nur die funktionellen Gruppen der HS bestimmen die Eigenschaften der HS-Komplexe als Liganden, sondern auch die elektronischen Zustände der betreffenden Metallionen als Zentralionen. Diese bestimmen in hohem Maße die Stabilität der Komplexe. Hierzu wurden bereits einige Untersuchungen durchgeführt, wobei jedoch der Augenmerk auf die thermodynamische Stabilität gelegt wurde. Unter ökologischen Gesichtspunkten spielt aber gleichfalls die kinetische Stabilität eine wichtige Rolle, da kinetisch stabile Komplexe selbst unter thermodynamisch ungünstigen Bedingungen vorliegen können. Für klassische Komplexe ist bekannt, daß Elemente der Übergangsreihe mit d^3 oder d^6 (*low spin*) Elektronenkonfiguration fähig sind, kinetisch stabile Komplexe zu bilden. Insbesondere sind hier Cr(III)- und Co(III)-Komplexe mit Chloro- bzw. Ammino-Liganden zu nennen, während die entsprechenden Cu(II)- und Co(II)-Komplexe (d^9 bzw. d^7) kinetisch labil sind. Taube hat 1952 angeregt, Komplexe, die bei 25°C innerhalb einer Minute Liganden vollständig austauschen, als labil zu bezeichnen. Komplexe, die längere Zeit brauchen, sollen als inert gelten [73].

Die Ligandenfeld-Theorie stellt eine Grundlage dar, die über die Berechnung von Ligandenfeld-Stabilisierungsenergien (LFSE) und –Aktivierungsenergien Aussagen über die energetischen Verhältnisse eines Ligandenaustauschs treffen kann, welche einen Einfluß auf die Austauschgeschwindigkeit haben [74]. Man definiert die LFSE als die Energie, um die ein Spinsystem stabiler als ϵ_0 ist, wobei ϵ_0 die Energie des Spinsystems im Ligandenfeld vor der Aufspaltung der d-Orbitale ist. Energieniveaus unter ϵ_0 haben negative Vorzeichen und stellen eine Stabilisierung dar.

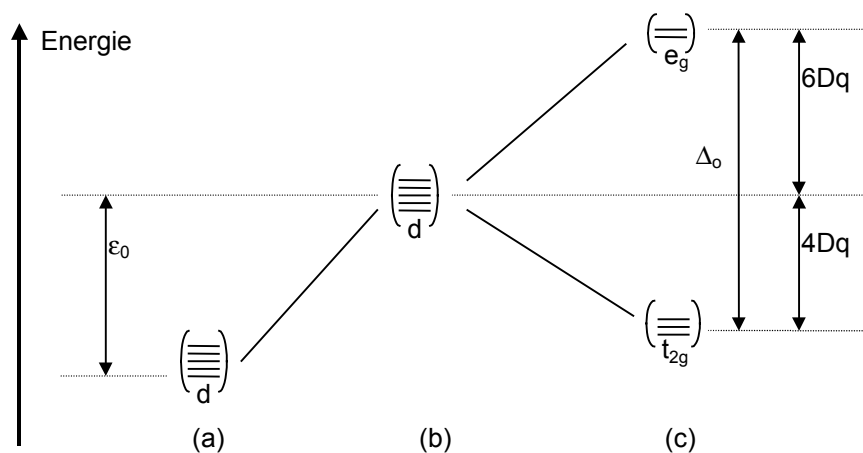


Abb. 18: Energieniveaus des freien Ions (a), des Ions im Ligandenfeld (b) und die Aufspaltung im Falle eines oktaedrischen Feldes (c)

Die LFSE errechnet sich für ein $(t_{2g})^n(e_g)^m$ -System nach Gl. (18) aus dem Produkt der Anzahl der Elektronen (n und m) und deren relativen Energie zu ϵ_0 .

$$(18) \quad \text{LFSE} = n \cdot (-4Dq) + m \cdot (6Dq)$$

Cr(III) ist ein d^3 -Spinsystem. Bei einer Aufspaltung im oktaedrischen Ligandenfeld besetzen die drei Elektronen die energieärmeren d_{xy} -, d_{xz} - und d_{yz} -Orbitale. Man bezeichnet daher das Spinsystem als $(t_{2g})^3$. Co(III) hat ein d^6 -System und kann als *low spin*- oder *high spin*-Komplex vorliegen, wobei sich je nach Stärke des Ligandenfelds ein $(t_{2g})^6$ - oder $(t_{2g})^4(e_g)^2$ -System bildet. Gleiches gilt für das d^7 -System von Co(II), welches ein $(t_{2g})^6(e_g)^1$ oder ein $(t_{2g})^5(e_g)^2$ -System bilden kann. Im Falle des Cu(II) liegt ein d^9 -Spinsystem vor, das bei oktaedrisch unverzerrter Aufspaltung ein $(t_{2g})^6(e_g)^3$ -System bildet. Die errechneten Werte für Cr(III), Co(III), Co(II) und Cu(II) sind in Tab. 10 angegeben.

Tab. 10: Ligandenfeldstabilisierungsenergien für Spinsysteme im starken Ligandenfeld mit unterschiedlicher Geometrie [75]

Spin-System	Oktaeder	quadratische Pyramide	pentagonale Bipyramide
Cr(III) - d^3	-12.00 Dq	-10.00 Dq	-7.74 Dq
Co(III) - d^6	-24.00 Dq	-20.00 Dq	-15.48 Dq
Co(II) - d^7	-18.00 Dq	-19.14 Dq	-12.66 Dq
Cu(II) - d^9	-6.00 Dq	-9.14 Dq	-4.93 Dq

Zur kinetischen Untersuchung von Komplexen ist auch der Mechanismus eines Ligandenaustausches von Interesse. Hierbei ist zu beachten, daß sich ein Ligandenaustausch bei aquatischen Komplexen immer erst mit einem Wassermolekül vollzieht [74]. Erst in einem weiteren Austausch wird das Wassermolekül gegen den neuen Liganden ausgetauscht. Grundsätzlich sind zwei Mechanismen für diese Austauschreaktionen möglich. Ein synchroner Mechanismus, bei dem der eintretende Ligand assoziativ gebunden wird und ein asynchroner, bei dem der dissoziative Austritt eines Liganden vorausgeht. Trägt man die Energie des Systems gegen den Reaktionsverlauf auf, erhält man für beide Mechanismen ein charakteristisches Profil (siehe Abb. 19). Bei synchronem Verlauf muß während der Substitution die Koordinationszahl des Komplexes erhöht werden. Geht man von einem oktaedrischen Komplex aus, bildet sich eine pentagonale Bipyramide. Dies ist gerade bei sterisch anspruchsvollen Liganden, wie den HS, energetisch

ungünstig, so daß eine hohe Aktivierungsenergie aufgebracht werden muß. Der asynchrone Prozeß läuft über eine Zwischenverbindung mit geringerer Koordinationszahl. Geht man wiederum von einem Oktaeder aus, hat die Zwischenstufe eine quadratisch pyramidale Struktur. Der erste (dissoziative) Schritt verläuft langsam und ist geschwindigkeitsbestimmend.

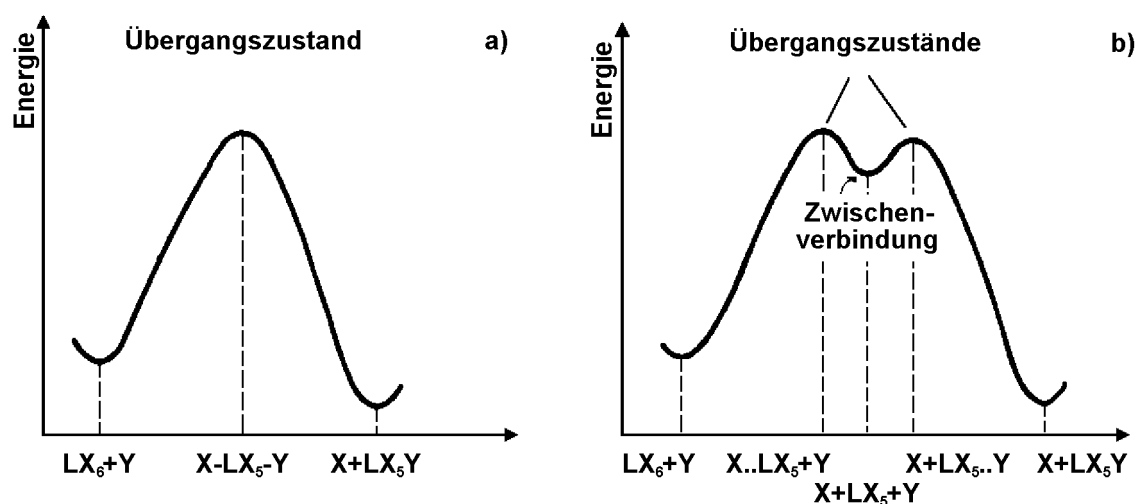


Abb. 19: Energieprofil bei synchronem (a) und asynchronem (b) Ligandenaustausch

Eine Aussage über die Geschwindigkeit der Substitution läßt sich unter Berücksichtigung des Reaktionsverlaufes mit Hilfe der LFSE treffen. Aus der Differenz der LFSE des Komplexes und des Übergangszustandes (siehe Tab. 10) berechnet man die Ligandenfeld-Aktivierungsenergie ΔE_a (siehe Tab. 11).

$$(19) \quad \Delta E_a = LFSE_{\text{Übergangszustand}} - LFSE_{\text{Oktaeder}}$$

Ein hoher positiver Wert für ΔE_a bedeutet eine Erhöhung der gesamten Aktivierungsenergie. Die Reaktion verläuft langsamer. Ist die Ligandenfeld-Aktivierungsenergie jedoch klein oder sogar negativ, wird die Aktivierungsenergie dadurch herabgesetzt und es kann ein schneller Ligandenaustausch stattfinden.

Tab. 11: Ligandenfeldaktivierungsenergie ΔE_a für synchronen und asynchronen Verlauf [75]

Spin-System	Oktaeder \Rightarrow Pentagonale Bipyramide (synchron)	Oktaeder \Rightarrow Tetragonale Pyramide (asynchron)
d^3	4.26 Dq	2.00 Dq
d^6	8.52 Dq	4.00 Dq
d^7	5.34 Dq	-1.14 Dq
d^9	1.07 Dq	-3.14 Dq

Die Substitutionsgeschwindigkeit ist selten sehr stark von der Natur der eintretenden Gruppe abhängig. Wenn Effekte mitberücksichtigt werden, die auf vorgelagerte Ionenassoziationsgleichgewichten, Protonenübertragungen und anderen Phänomenen beruhen, ist die Substitutionsgeschwindigkeit nicht sehr von der Konzentration der eintretenden Gruppe abhängig. Dies würde bedeuten, daß ein dissoziativer (asynchroner) Mechanismus wesentlich wahrscheinlicher als ein assoziativer (synchroner) ist [74]. Dies trifft vor allem auf sterisch anspruchsvolle Liganden, wie z.B. die Huminstoffe, zu. Für Cr(III) und Co(III) ergeben sich deutlich höhere Ligandenfeldaktivierungsenergien (2 Dq bzw. 4 Dq) als das für Co(II) und Cu(II) der Fall ist (-1.14 Dq und -3.14 Dq). Dies erklärt die höhere kinetische Stabilität von Cr(III) und Co(III) *low spin* Komplexen.

3. Experimenteller Teil

3.1. Eingesetzte Geräte und Chemikalien

3.1.1. Geräte

Die verwendeten Massenspektrometer für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen sind in Tab. 12 aufgeführt. Hierbei handelt es sich zum einen um ein Quadrupol-Gerät (Elan 5000, Perkin Elmer/Sciex) und zum anderen um ein doppelfokussierendes Gerät (Element 2, Finnigan MAT). In beiden Fällen wurden Ionen aus Platin verwendet, da mit diesen höhere Signalintensitäten festgestellt werden konnten. Ionen aus Nickel wurden wegen der Interferenz auf ^{32}S durch doppelt geladene Ionen nicht verwendet. Die Reinigung erfolgte im Ultraschallbad mit Salpetersäure (5 %) und bei hartnäckigen Verunreinigungen mechanisch mit Aluminiumoxidpaste oder einem Glasfaserpinsel. Das verwendete Argon für die ICP-Quelle und Zerstäubung der Probe beider Massenspektrometer entsprach der Reinheitsstufe 4.6 (99.996 % Argon). Die Reinheit des Argons war bis auf einen teilweise hohen Kohlenstoffuntergrund die Messungen ausreichend. Wenn der Untergrund zu hoch war, konnte Kohlenstoff nicht bestimmt werden (siehe 3.2.3).

Tab. 12: Verwendete Massenspektrometer

ICP-Massenspektrometer		Hersteller
Elan 5000		Perkin Elmer/Sciex,
Trennsystem:	Quadrupol	Perkin Elmer/Sciex
Zerstäuber:	<i>Cross-Flow</i> , Platin	AHF Feuerbacher
Sprühkammer:	Scott-Typ, Quarz	AHF Feuerbacher
Konen:	Platin	AHF Feuerbacher
Detektionssystem:	Channeltron (<i>pulse counting</i>)	Galileo Electro-Optics Corp.
Element 2		Finnigan MAT
Trennsystem:	Magnetsektorfeld	Finnigan MAT
Zerstäuber:	MCN (100 μL), PFA	Cetac
Sprühkammer:	Scott-Typ, Quarz	Finnigan MAT
Konen:	Platin	Finnigan MAT
Detektionssystem:	Channeltron (<i>dual mode</i>)	Finnigan MAT

Die für die HPLC/ICP-MS-Kopplung verwendeten Komponenten sind in Tab. 13 aufgeführt. Weiterhin wurden Schläuche aus PTFE (Teflon) und einem modifizierten Teflon, PFA (Perfluoralkoxy), sowie Pumpschläuche aus Viton verwendet. Schlauchverbindungen wurden über Fittinge (Polypropylen), Ferrules (Tefzel) und Verbindungsstücke (Nylon) hergestellt. Im Hochdruckbereich der HPLC wurden nur Teile aus PEEK (Polyethyletherketon) verwendet (alle Teile von Alltech).

Tab. 13: Weitere verwendete Analysengeräte

Gerät	Typ und Hersteller
HPLC	
HPLC Pumpe	S1121, SYKAM
Probeninjektionsventil	9725i, Rheodyne
Schutzsäule	TSK Gel 3000PW _{XL} 40 mm, 6 mm ID, TosoHaas
Trennsäule	TSK Gel 3000PW _{XL} 300 mm, 7.8 mm ID, TosoHaas
FIAS-Ventil	5020, ERC
UV-Detektor	UVIS 204, Linear mit 8 μ L KEL-F Meßzelle
Leitfähigkeits-Detektor	Conductometer E518, Metrohm Herisau
Peristaltische Pumpen	Minipuls 3, Gilson

Es wurden ausschließlich Gefäße aus PE (Polyethylen) oder PFA eingesetzt, die vorher gereinigt wurden. PE-Flaschen, PE-Zentrifugenröhrchen, und Pipettenspitzen wurden hierzu einmal mit verdünnter Salpetersäure und anschließend zweimal mit Wasser für jeweils 8 h geschüttelt. PFA-Gefäße wurden mit verdünnter Salpetersäure und anschließend zweimal mit Wasser je 1 h ausgekocht.

3.1.2. Chemikalien

Um eine Kontamination der untersuchten Proben zu vermeiden, wurden nur Chemikalien mit hoher Reinheit verwendet (siehe Tab. 14). Grundsätzlich wurde nur entionisiertes Wasser, das anschließend noch mit einer Reinstwasseranlage (Milli-Q, Millipore) gereinigt wurde, benutzt. Die Milliporeanlage besteht aus vier Reinigungsstufen, die einen Aktivkohlefilter, zwei Mischbett-Ionentauscher und einen abschließenden Organikfänger enthalten. Das gewonnene Wasser hat eine Leitfähigkeit kleiner als 18 μ S. Lösungen und Säuren wurden durch Verdünnen mit Wasser (Milli-Q) hergestellt. Die verwendete Salpetersäure wurde durch Oberflächendestillation aus HNO₃ (p.a., 60 %) erhalten. Die Multielement-Standards zur

Optimierung und Kalibration der Massenspektrometer wurden käuflich erworben (Merck) oder aus den entsprechenden Salzen selbst hergestellt. Die für die Isotopenaustausch-Experimente und die inverse MSIVA verwendeten Standards wurden käuflich (Merck) erworben (Sulfat, Kupfer, Chrom und Kobalt) oder selbst hergestellt. Hierzu wurde Quecksilber mit Salpetersäure bzw. Kaliumhydrogenphthalat mit Milli-Q-Wasser (Kohlenstoff-Standard) aufgelöst

Tab. 14: Verwendete Chemikalien und ihre Reinheit

Verbindung	Reinheitsstufe	Hersteller
Salpetersäure	p.a.	Merck
Kaliumhydroxid	Suprapure	Merck
Quecksilber	Suprapure	Merck
Kaliumhydrogenphthalat	p.a.	Merck
Polyethylenglycol 20000	p.a.	Merck
Ethylenglycol	p.a.	Merck
β -Cyclodextrin	p.a.	Merck
Methionin	p.a.	Merck
Borsäure	Suprapure	Merck
Aluminiumoxid	o.A.	Sparte Chemie

3.1.3. Isotopenangereicherte Spikes

Die in dieser Arbeit verwendeten isotopenangereicherten Spikes für Isotopenmarkierungsversuche und die Isotopenverdünnungsanalyse sind in Tab. 15 aufgeführt. Als Kohlenstoff-Spike wurde ^{13}C -ringsubstituierte Benzoesäure verwendet, die durch Auflösen in Milli-Q-Wasser und Ansäuern mit Salpetersäure hergestellt wurde. Der Schwefel-Spike wurde aus elementarem und auf Isotop ^{34}S angereichertem Schwefel durch Aufschluß in der Mikrowelle erhalten. Hierzu wurden 10 mg Schwefel mit 3 mL konzentrierter Salpetersäure (100%) in ein Teflon-Gefäß gegeben und nach in Abb. 20 dargestelltem Mikrowellenprogramm aufgeschlossen.

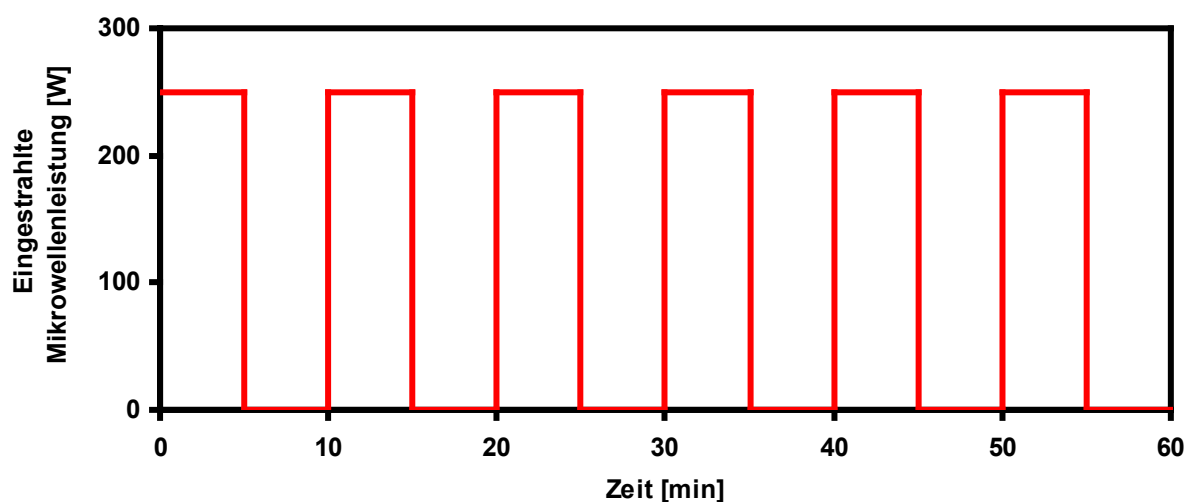


Abb. 20: Mikrowellenprogramm zum Aufschluß elementaren Schwefels

Zur Herstellung der Quecksilber-, Chrom-, Kupfer- und Blei-Spikes wurden Quecksilberoxid sowie elementares Chrom, Kupfer und Blei jeweils mit Salpetersäure aufgelöst. Der Uran-Spike wurde als salpetersaure Lösung gekauft, während der ^{57}Co -Spike freundlicherweise vom Institut für Kernchemie der Universität Mainz gleichfalls als Lösung zur Verfügung gestellt wurde.

Tab. 15: Isotopenangereicherte Spikes

Spike	Angereichertes Isotop	Anreicherung [%]	Hersteller
Kohlenstoff	^{13}C	84.86	Cambridge Isotope Laboratories, USA
Schwefel	^{34}S	85.89	IRE Diagnostic GmbH, Düsseldorf
Chrom	^{53}Cr	97.90	Chemotrade, Düsseldorf
Kobalt	^{57}Co	99.94	DAMRI, Frankreich
Kupfer	^{65}Cu	99.67	Chemotrade, Düsseldorf
Quecksilber	^{201}Hg	92.21	Euroisotop, Saarbrücken
Blei	^{206}Pb	91.05	Chemotrade, Düsseldorf
Uran	^{235}U	66.37	New Brunswick Laboratory, Argonne, Illinois, USA

3.2. Optimierung der massenspektrometrischen Meßparameter und Qualitätssicherung der Meßmethoden

3.2.1. Optimierung der Linsenpotentiale, Gasflüsse und Plasmaleistung

Um auch bei niedrigen, natürlichen Konzentrationen ein auswertbares Meßsignal zu erhalten, müssen die Meßparameter der Massenspektrometer auf die entsprechenden Problemstellungen abgestimmt werden. Dies trifft besonders auf die Linsenpotentiale zu, die Ionen unterschiedlicher Masse nicht in gleicher Weise beeinflussen. So kann die Signalintensität leichter Ionen gesteigert werden, jedoch verringert sich gleichzeitig die Intensität der schweren Ionen oder umgekehrt. Bei Messungen in dieser Arbeit wurde auf ^{115}In optimiert, das im mittleren Massenbereich liegt. Weiterhin wurde darauf geachtet, daß das Kohlenstoffsignal den meßbaren Bereich nicht überschritt. Die verwendeten Linsenpotentiale sind in Tab. 16 aufgeführt.

Tab. 16: Verwendete Linsenpotentiale zur Messung von C, S und Hg

Elan 5000		Element 2	
Linse	Potential [V]	Linse	Potential [V]
P	45	Rotation Quad 1	-3.0
B	60	Rotation Quad 2	-1.0
S2	25	Focus Quad 1	11.5
E1	35	Focus Quad 2	10.0

Die Optimierung der Plasmaleistung wirkt sich elementspezifisch aus, d.h. die Ionisierungswahrscheinlichkeit des entsprechenden Elements hängt von der Plasmaleistung ab. Kohlenstoff und Schwefel haben eine geringe Ionisierungswahrscheinlichkeit, die sich bei höherer Plasmaleistung erhöhen läßt. Hingegen beeinflußt die Optimierung der Gasflüsse die Signal-Stabilität. Dies ist besonders bei der Messung transienter Signale wichtig und wirkt sich direkt auf die Nachweisgrenze der verwendeten HPLC/ICP-MS-Kopplung aus. Die Nachweisgrenze errechnet sich aus der dreifachen Standardabweichung des Massenflusses des Untergrunds (siehe Kap. 3.6.4). Die Einstellungen für Plasmaleistung und Gasflüsse sind in Tab. 17 aufgeführt.

Tab. 17: Verwendete Plasmaleistung und Gasflüsse

Parameter	Elan 5000	Element 2
Plasmaleistung	1200 W	1300 W
Kühlgasfluß	15.5 L/min	15.5 L/min
Hilfsgasfluß	0.8 L/min	0.8 L/min
Zerstäubergasfluß	1.2 L/min	0.9 L/min

3.2.2. Korrektur der Detektor-Totzeit

Bei der Bestimmung von Isotopenverhältnissen mit einem ICP-MS wird ein Channeltron Elektron Multiplier (CEM) verwendet. Bei hohen Zählraten werden jedoch weniger Ereignisse registriert als tatsächlich auftreten, was durch die Detektor-Totzeit begründet ist. Diese entspricht der Zeit, die der Detektor benötigt, um nach einem Signal von > 10 % des Vollausschlags wieder entladen bzw. ansprechbar zu sein [76]. Findet während dieser Totzeit ein Ereignis statt, kann es nicht registriert werden und das Ergebnis wird verfälscht. Bei Messungen mit externer Kalibrierung ist dies weniger wichtig, da nur ein Isotop gemessen wird und die Totzeit in die Kalibrierung mit eingeht. Werden jedoch Isotopenverhältnisse gemessen, sind diese fehlerbehaftet. Der auf der Totzeit basierende Fehler der Isotopenverhältnisbestimmung hängt nicht von der Masse der Isotope ab, sondern nur von den entsprechenden Häufigkeiten. Der Effekt verstärkt sich, je größer der Intensitätsunterschied der Isotope (Isotopenverhältnis) ist, kann aber mathematisch korrigiert werden, wenn die exakte Totzeit bekannt ist. Diese Korrektur wird bei den verwendeten Massenspektrometern nach Bestimmung der Detektor-Totzeit automatisch durchgeführt.

$$(20) \quad I_{\text{korrigiert}} = \frac{I_{\text{Messung}}}{(1 - I_{\text{Messung}} \cdot \tau_{\text{Totzeit}})}$$

Man erhält die korrigierte Signalintensität ($I_{\text{korrigiert}}$) nach Gl. (20) aus der gemessenen Signalintensität (I_{Messung}) und der Detektor-Totzeit (τ_{Totzeit}). Zur Bestimmung der Totzeitkorrektur am Element 2 wurde ein an ${}^7\text{Li}$ angereicherter Spike verwendet. Es wurde jeweils das Isotopenverhältnis ${}^6\text{Li}/{}^7\text{Li}$ bei unterschiedlichen Konzentrationen und Totzeitkorrekturen bestimmt (siehe Tab. 18). Hierzu wurden Lösungen der Konzentration 2.5 ng/g, 5 ng/g, 25 ng/g und 50 ng/g hergestellt,

sowie Messungen mit jeweils 0 ns, 10 ns, 15 ns, 20 ns, 25 ns und 30 ns Totzeitkorrektur durchgeführt.

Tab. 18: Abhängigkeit des gemessenen Isotopenverhältnises ${}^6\text{Li}/{}^7\text{Li}$ eines an ${}^7\text{Li}$ angereicherten Spikes von der Konzentration und der Totzeitkorrektur

Konzentration [ng/g]	Isotopenverhältnis ${}^6\text{Li}/{}^7\text{Li}$ für unterschiedliche Totzeitkorrekturen					
	0 ns	10 ns	15 ns	20 ns	25 ns	30 ns
2.5	0.0168	0.0166	0.0169	0.0168	0.0166	0.0171
5.0	0.0170	0.0169	0.0169	0.0169	0.0168	0.0169
25.0	0.0172	0.0168	0.0168	0.0166	0.0165	0.0166
50.0	0.0179	0.0171	0.0168	0.0166	0.0164	0.0165

Die detektorspezifische (und gerätespezifische) Totzeit entspricht der Totzeit, bei der das Isotopenverhältnis bei allen Konzentrationen gleich ist. Abb. 21 zeigt die Abhängigkeit des Isotopenverhältnisses ${}^6\text{Li}/{}^7\text{Li}$ eines an ${}^7\text{Li}$ angereicherten Spikes von der Totzeitkorrektur und der Konzentration. Es zeigt sich, daß der Detektor des Element 2 eine Totzeit von 15 ns aufweist (dicke Linie).

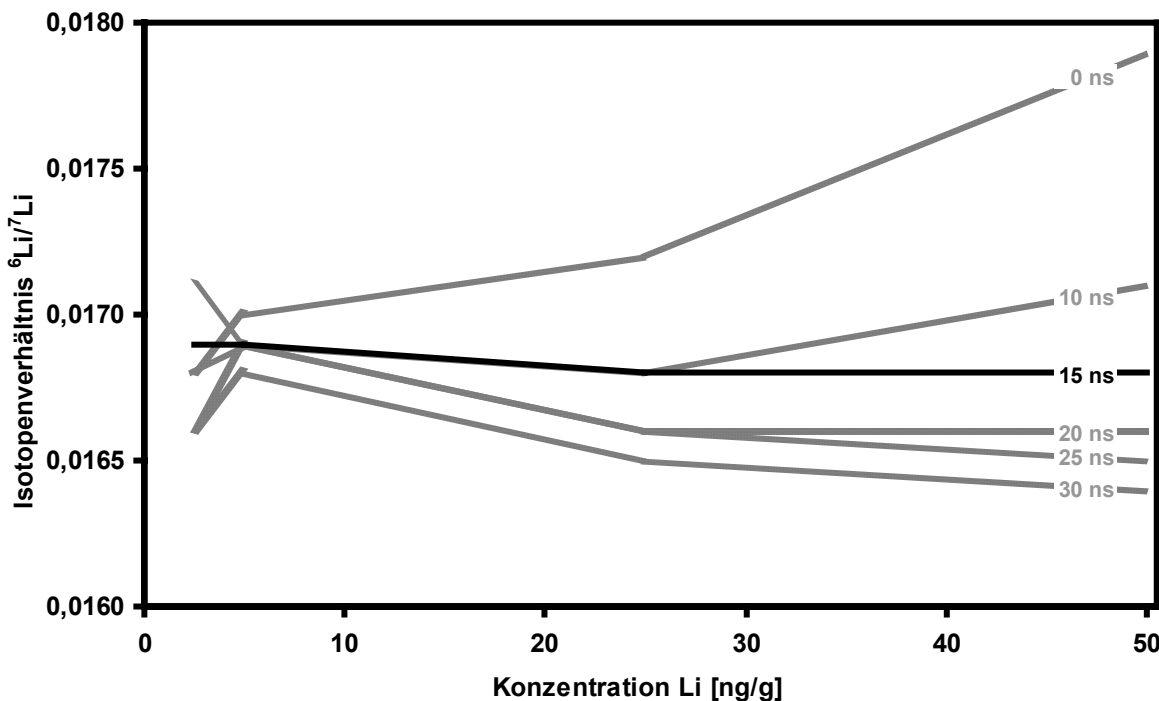


Abb. 21: Abhängigkeit des Isotopenverhältnisses ${}^6\text{Li}/{}^7\text{Li}$ eines an ${}^7\text{Li}$ angereicherten Spikes von der Totzeitkorrektur und der Konzentration am Element 2

Die Detektor-Totzeit des Elan 5000 wurde durch Messung des $^{204}\text{Pb}/^{208}\text{Pb}$ -Isotopenverhältnisses bestimmt und beträgt 80 ns. Die Detektortotzeiten wurden alle 1-2 Jahre überprüft. Bei den eingesetzten Detektoren blieben die Totzeitkorrekturen über den Zeitraum dieser Arbeit konstant.

3.2.3. Einfluß des verwendeten Argons auf den Kohlenstoffuntergrund

Bei der Messung von Isotopen mit einem Massenspektrometer spielen neben Interferenzen und Ionisierungswahrscheinlichkeiten (siehe Kap.2.1) auch der Signaluntergrund eine wichtige Rolle. Man reduziert diesen Untergrund (Blindwert) durch Verwendung gereinigter Materialien und Chemikalien (siehe Kap.3.1). Da mit einem ICP-MS meist Metallionen gemessen werden, die im verwendeten Argon nicht enthalten sind, wurde der diesbezügliche Einfluß des Plasmagases bisher nicht beachtet. Bei der Messung von Kohlenstoff mit einem ICP-MS muß man jedoch auf den Einfluß des Argons achten, da dieser deutlichen Schwankungen unterliegt und einen wesentlichen Anteil am Untergrund hat. In Abb. 22 ist die Signalintensität von ^{12}C und ^{13}C dargestellt, während zwischen zwei Argonquellen, einem Flaschenbündel und einer Einzelflasche, gewechselt wurde. Der Kohlenstoffuntergrund ändert sich in diesem Fall um den Faktor 2. Je nach Herkunft und Produktionscharge der Argonflaschen ergeben sich Unterschiede bis zu einem Faktor 350! Hierbei hat sich gezeigt, daß es keinen grundsätzlichen Unterschied zwischen Einzelflaschen und Flaschenbündeln gibt, sondern allein die Produktionscharge ausschlaggebend ist. Wird bei sehr hohem Untergrund der Meßbereich des Detektors überschritten, ist eine Messung unmöglich. Aber auch bei weniger verunreinigten Flaschen treten Probleme auf, da sich die Nachweisgrenze (siehe Kap. 3.6.4) verschlechtert. Die meisten Flaschen wiesen einen Untergrund von $1\text{-}5 \times 10^6$ Impulsen pro Sekunde (*counts per second*, cps) auf, der für die Messungen niedrig genug war.

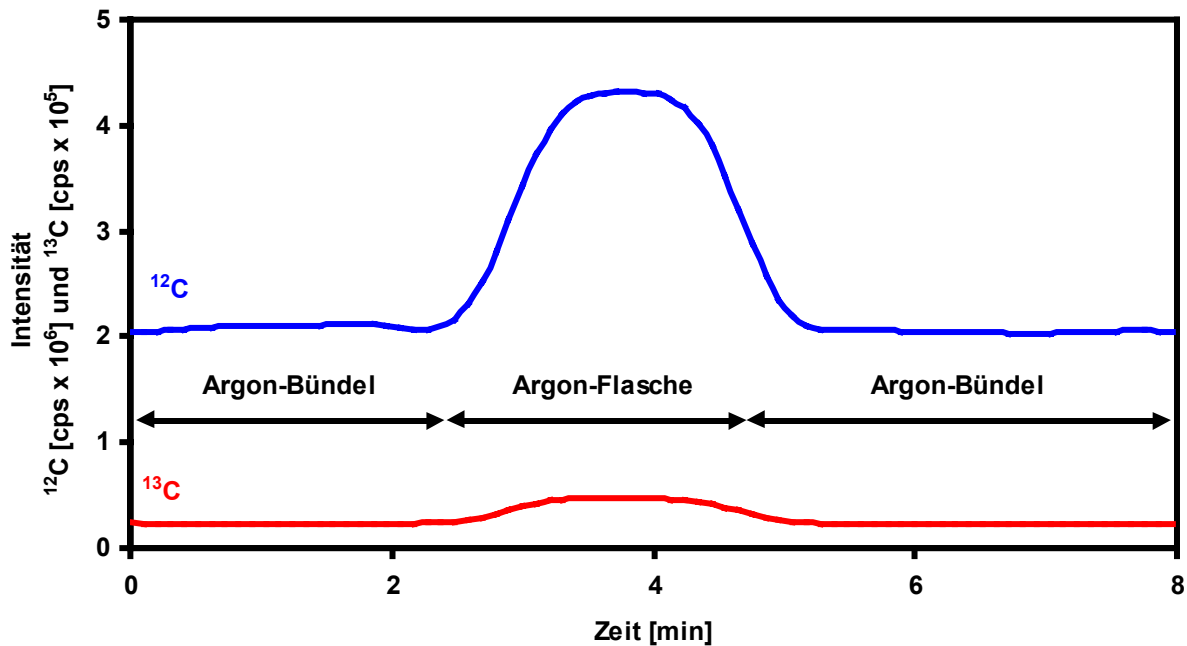


Abb. 22: Einfluß des verwendeten Argongases auf den Kohlenstoffuntergrund

3.2.4. Teilnahme an der Interlaborstudie IMEP-9

Das IRMM (*Institute for Reference Materials and Measurements*) der Europäischen Kommission organisiert internationale Zertifizierungsrunden, IMEP (*International Measurement Evaluation Program*), zur Überprüfung des heutigen *state of the art* in der analytischen Chemie. Bisherige IMEP-Zertifizierungsrunden bezogen sich auf Spurenelemente in Humanserum, Wasserproben und Polyethylen. Die teilnehmenden Labors haben die Möglichkeit, die Qualität ihrer Ergebnisse anhand der Referenzwerte und der Ergebnisse der anderen Teilnehmer zu vergleichen. Am Projekt IMEP-6 nahmen beispielsweise 200 Labors aus 26 Nationen teil.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde am Projekt IMEP-9, der Zertifizierung von Spurenelementen in Wasser, teilgenommen. Hierzu wurden neben dem IRMM internationale Labors um Mithilfe gebeten (siehe Tab. 19), um in einer Vorrunde Referenzwerte für 15 Elemente (B, Ca, Cd, Cr, Cu, Fe, K, Li, Mg, Ni, Pb, Rb, Sr, U und Zn) zu bestimmen. Großer Wert wurde auf die Verwendung von analytischen Primärmethoden, wie z.B. die massenspektrometrische Isotopenverdünnungstechnik, gelegt. Die untersuchte Wasserprobe wurde vom USGS (*United States Geological Survey*, Colorado, USA) aus dem Clear Creek Fluß (Colorado, USA) genommen und später vom NIST (*National Institute for Standards and Technology*) behandelt. Das Wasser wurde nach der Probennahme durch Ultrafiltration

sterilisiert und zur Stabilisierung mit Salpetersäure auf pH 1 angesäuert. Anschließend wurden die Proben in vorgereinigte Polyethylen-Flaschen abgefüllt. Für die zertifizierenden Labors standen 100 mL zur Verfügung, während den anderen Teilnehmern 60 mL zugesandt wurden.

Tab. 19 Zertifizierende Laboratorien des Projektes IMEP-9

Institution	Gemessene Elemente
IRMM (Europäische Union) Institute for Reference Materials and Measurements	10
NRC (Kanada) National Research Council of Canada	9
KRISS (Süd Korea) Korean Research Institute of Standard and Science	4
CIEMAT (Spanien) Centro de Investigaciones Energeticas Medioambientales y Tecnologicas	3
Universität Mainz (Deutschland) Institut für Anorganische Chemie und Analytische Chemie	3
NIES (Japan) National Institute for Environmental Studies	2
NRCCRM (China) National Research Centre for Certified Reference Materials	2

Von den 15 zu zertifizierenden Elementen wurden im Rahmen dieser Arbeit 4 (Cr, Cu, Pb und U) ausgewählt. Die Ergebnisse der mit MSIVA bestimmten Gehalte der IMEP-9-Probe sind in Tab. 20 aufgeführt. Chrom wurde hierbei mit einem Thermionen-Massenspektrometer (MAT 261) bestimmt (Mess-technik siehe [77]), während für die anderen Elemente das Elan 5000 verwendet wurde. Aufgrund des hohen Natriumgehalts der Probe konnte Kupfer nicht bestimmt werden, da die Molekülinterferenz von $^{40}\text{Ar}^{23}\text{Na}$ auf dem ^{63}Cu -Isotop zu hoch war.

Tab. 20: Gehalte an Cr, Pb und U der IMEP-9-Probe

Element	Gehalt [$\mu\text{g/g}$]
Cr	15.7 ± 0.6
Pb	12.95 ± 0.03
U	1.06 ± 0.04

3.3. Kopplung der Größenausschlußchromatographie (SEC) mit einem induktiv gekoppelten Plasma Massenspektrometer (ICP-MS)

3.3.1. Aufbau der HPLC/ICP-MS-Kopplung

Die HPLC/ICP-MS-Kopplung ist aus handelsüblichen Komponenten aufgebaut und in Abb. 23 schematisch dargestellt. Der Eluent (Milli-Q Wasser) wird mit Hilfe von Helium ausgegast und steht danach der HPLC-Pumpe mit einem Überdruck von 10^5 Pa zur Verfügung. Über eine Probenschleife (100 μ L) mit Injektionsventil wird die Probe auf die Säule aufgebracht und aufgetrennt. In dieser Arbeit wurde eine Größenausschlußchromatographiesäule (TSK Gel 3000PW_{XL}) benutzt, wobei die Kopplungstechnik nicht auf diesen Säulentyp beschränkt ist. Um Ablagerungen auf der Trennsäule zu vermeiden, ist eine Schutzsäule vorgeschaltet. Der nachgeschaltete UV-Detektor ist auf eine in der Wasseranalytik übliche Wellenlänge von 254 nm eingestellt. Insbesondere aromatische und konjugierte aliphatische Systeme (π -Systeme) werden auf diese Weise detektiert. Das Massenspektrometer hingegen dient als elementspezifischer Detektor. In dieser Arbeit wurden ein Elan 5000 und ein Element 2 verwendet, wobei prinzipiell jedes ICP-MS eingesetzt werden kann. Mit diesem HPLC/ICP-MS System erhält man einen zeitaufgelösten Verlauf sowohl der UV-Absorption, der Leitfähigkeit als auch der Signalintensität der detektierten Isotope.

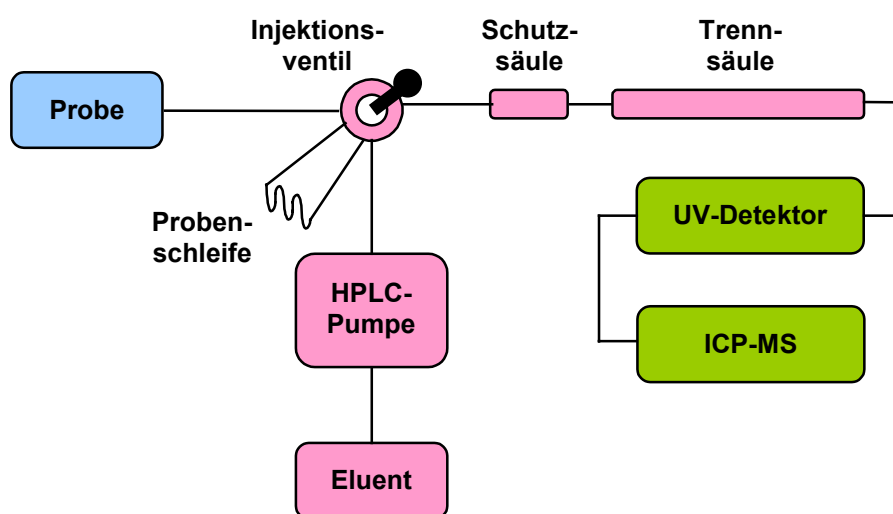


Abb. 23: Schematische Darstellung der HPLC/ICP-MS-Kopplung

3.3.2. Meßtechnik für transiente Signale

Die Detektion transienter Signale mit einem Massenspektrometer bedarf einer Optimierung der Meßparameter im Vergleich zu konventionellen Messungen einer Bulk-Lösung. Idealerweise werden bei der Kopplung chromatographischer Methoden mit einem Massenspektrometer alle Isotope gleichzeitig und mit großer Zeitauflösung gemessen. Die simultane Messung der Isotope ist bei einem Gerät mit nur einem Detektor jedoch nicht möglich, so daß die Detektion mit einer kleinen Zeitverzögerung nacheinander erfolgt (zur simultanen Messung wird ein Gerät mit Multi-Kollektor benötigt). Damit Isotopenverhältnisse richtig berechnet werden, muß die zeitliche Verzögerung deutlich kleiner als das transiente Signal sein. Sie muß besonders bei der Kopplung eines Gaschromatographen beachtet werden, da hier die erhaltenen Peaks in der Regel sehr scharf und kurz sind. Die in dieser Arbeit verwendete SEC erzeugt Peaks mit einer Halbwertsbreite von mindestens 1 min, während ein Meßzyklus bei den verwendeten Meßparametern 1-2 s dauert, wobei die Messung zweier benachbarter Isotope um 60-200 ms verzögert ist.

Die für Kohlenstoff, Schwefel und Quecksilber verwendeten Meßparameter sind in den folgenden Tabellen wiedergegeben. Das Quadrupol-Gerät (Elan 5000) kann schnell die entsprechenden Isotopenmassen (m/z) ansteuern (siehe Tab. 21). Es werden daher 4 Meßzyklen zu einem Replikat gemittelt, d.h. jedes Isotop wird viermal gemessen. Für ein Chromatogramm von 30 min Länge werden 1200 Replikate à 1.5 s aufgenommen.

Tab. 21: Meßparameter für transiente C-, S- und Hg-Signale am Elan 5000

Isotop	Messpunkte pro Isotop	Messungen pro Replikat	Meßzeit [ms]
^{12}C	1	4	59
^{13}C	1	4	59
^{33}S	1	4	59
^{34}S	1	4	59
^{201}Hg	1	4	59
^{202}Hg	1	4	59

Die Massentrennung beim Element 2 wird durch ein Magnetfeld erreicht, wobei durch die Remanenz-Magnetisierung ein exaktes Magnetfeld erst nach einer gewissen Einschwingzeit (settling time) realisierbar ist. Daher können die einzelnen

Isotope nicht beliebig schnell angesteuert werden. In Tab. 22 sind die Meßparameter für das Element 2 angegeben. Da die Massenklibrierung über den Zeitraum der Messung nicht stabil ist, wird jeweils ein Massenfenster größer 100 % der Peakbreite gescannt und 20 Punkte pro Isotop detektiert. Hierdurch kann jedesmal die genaue Position des Isotops und die Intensität durch Integration bestimmt werden.

Tab. 22: Meßparameter für transiente C-, S- und Hg-Signale am Element 2 (Mittel-Auflösung = 4500)

Isotop	Massenbereich [%]	Messpunkte pro Isotop	settling time [ms]	Meßzeit [ms]
^{12}C	150	20	300	240
^{13}C	150	20	1	240
^{33}S	120	20	107	192
^{34}S	120	20	1	192
^{201}Hg	150	20	200	240
^{202}Hg	150	20	1	240

Die Untersuchung der kinetischen Stabilität von Huminstoff-Komplexen wurde am Elan 5000 durchgeführt. Die hierbei verwendeten Meßparameter für Chrom- und Kupfer-Isotope sind in Tab. 23 aufgeführt. Die Messung von ^{59}Co erfolgte bei gleichen Bedingungen.

Tab. 23: Meßparameter für transiente C-, Cr- und Cu-Signale am Elan 5000

Isotop	Messpunkte pro Isotop	Messungen pro Replikat	Meßzeit [ms]
^{12}C	1	3	80
^{13}C	1	3	80
^{52}Cr	1	3	80
^{53}Cr	1	3	80
^{63}Cu	1	3	80
^{65}Cu	1	3	80

3.3.3. Huminstoff-Fraktionierung mit SEC im Vergleich zur Ultrafiltration

Zur Untersuchung von Huminstoffen (HS) und ihrer Wechselwirkungen mit anderen Elementen wurde eine Fraktionierung der HS mit SEC, deren Funktionsweise bereits in Kap. 2.2 beschrieben wurde, durchgeführt. Vielfach wird auch die Trennung mit Hilfe von Ultrafiltrations-Membranen erreicht [78], weshalb eine vergleichende Untersuchung durchgeführt wurde (eine Beschreibung der Ultrafiltrationseinheit ist in [77] zu finden). In Abb. 24 ist das Kohlenstoff-Intensitäts-Chromatogramm einer Originalwasserprobe (SV1) sowie das des Ultrafiltrations-Permeats nach SEC-Trennung dargestellt. Die obere Kurve zeigt deutlich die zwei Hauptfraktionen (F1 und F2) der Originalprobe. Darunter ist das Chromatogramm des Ultrafiltrations-Permeats nach Trennung mit einer Ultrafiltrations-Membran gezeichnet. Bei diesem Permeat handelt es sich nur um die Huminstoffe, die die Ausschlußgrenze der Ultrafiltrations-Membran von 500 Da unterschreiten und durch die Membran wandern konnten. Im Chromatogramm zeigt sich daher nur die Fraktion F2, während die Fraktion F1 von der Ultrafiltrations-Membran zurückgehalten wurde. Bezogen auf die Angaben der Ultrafiltrations-Membran entspricht daher eine Retentionszeit der SEC von etwa 15 min der Ausschlußgröße von 500 Da bei Ultrafiltration.

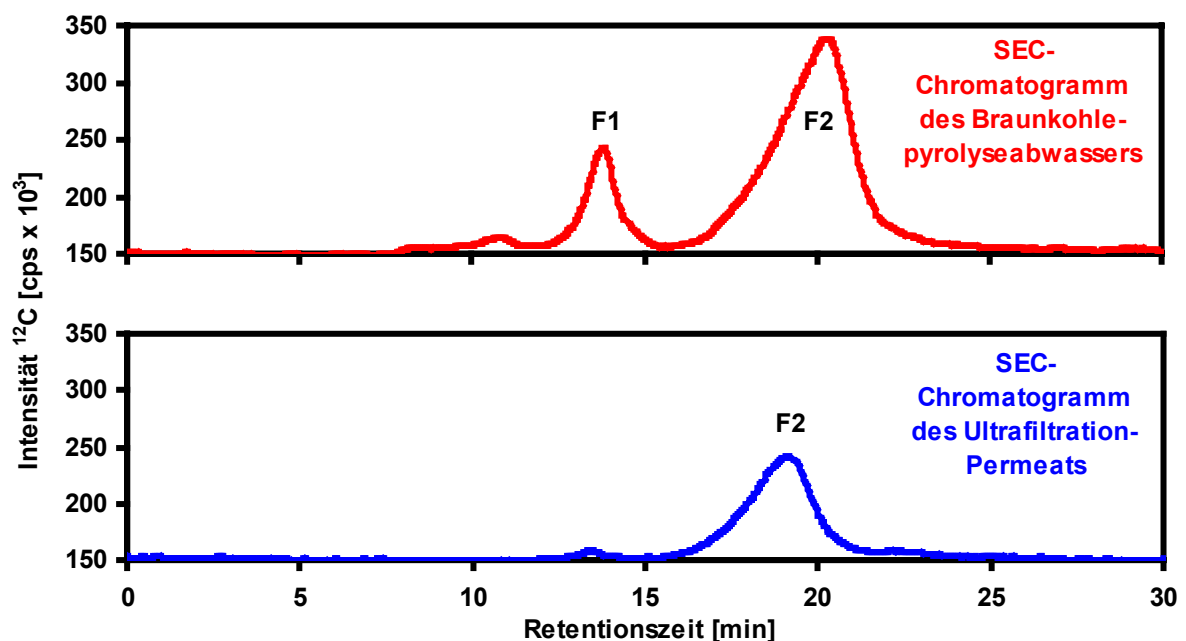


Abb. 24: Kohlenstoff-Intensitäts-Chromatogramme einer Originalwasserprobe sowie des Ultrafiltrations-Permeats nach SEC-Trennung

Beide Verfahren, Ultrafiltration und SEC, trennen Moleküle aufgrund ihrer Größe, jedoch werden im allgemeinen statt der Molekülgrößen die Molekulargewichte angegeben. Daher ist es wichtig, neben dem Molekulargewicht der aufgetrennten Moleküle auch die zugrundeliegenden Bezugsverbindungen der Kalibrierung zu nennen. Für die Ultrafiltrations-Membranen sind dies meist Proteine und im Fall der hier verwendeten Membran mit einer Ausschlußgrenze von 500 Da ist es Saccharose. Bei der SEC werden je nach Anwendung Polystyrole, Dextrane oder Polystyrolsulfonate verwendet. Molekulargewicht-Standards für Huminstoffe gibt es nicht, so daß nur relative Aussagen gemacht werden können. Abb. 25 zeigt verschiedene Molekulargewicht-Standards (siehe Tab. 24) nach Auftrennung mit der in dieser Arbeit verwendeten Chromatographie-Säule. Vergleicht man die Dextran-Standards (7-9) untereinander, läßt sich eine Abhängigkeit der Retentionszeit vom Molekulargewicht erkennen. Das Cyclodextrin (12) jedoch eluiert deutlich später, obwohl sein Molekulargewicht dem des Dextrans (9) entspricht. Dies ist durch die Ringform und damit kleinere Molekülgröße erklärbar. Weiterhin eluiert das Polystyrolsulfonat (1 und 5) trotz seiner 8 kDa noch vor den Dextranen 7 und 8 mit 44 kDa bzw. 10 kDa. Auch eluiert das Glycol (11) trotz niedrigerem Molekulargewicht vor dem Methionin (4 und 6). Aufgrund dieser Schwierigkeiten müssen stets die verwendeten Standards zur Molekulargewichts-Kalibrierung aufgeführt werden. Werden Untersuchungen an Molekülen gleicher Verbindungsklassen durchgeführt, so können mit SEC verläßliche Aussagen über das Molekulargewicht gemacht werden, während für HS nur relative Aussagen möglich sind.

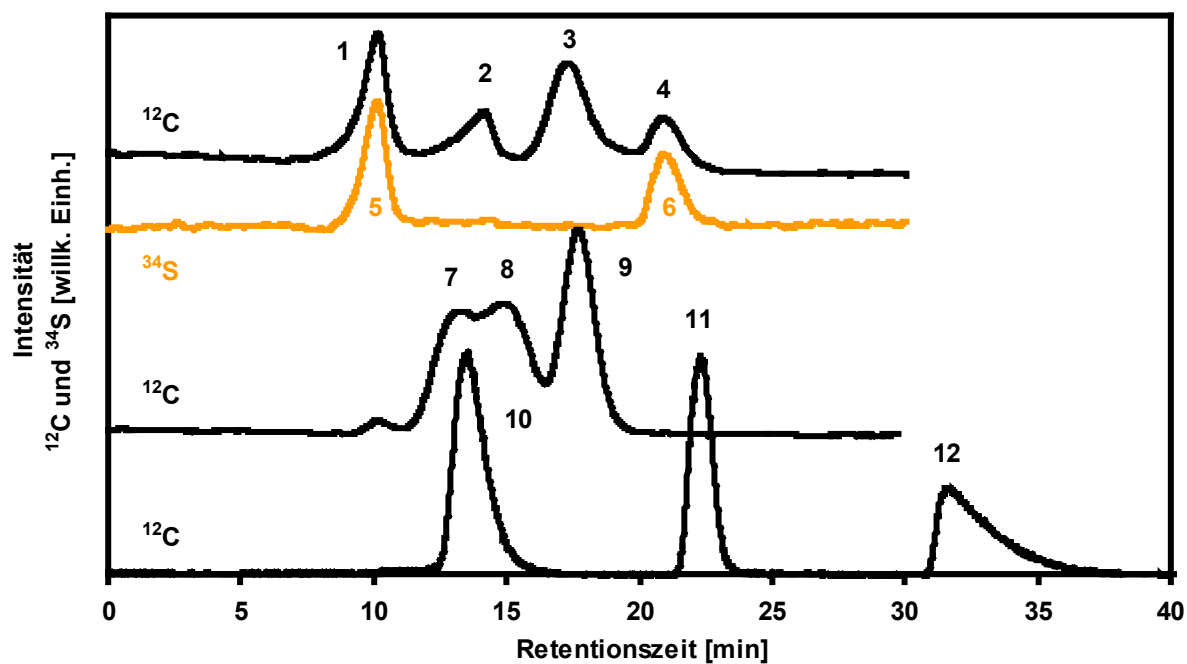


Abb. 25: ICP-MS-Chromatogramm von SEC-Standards nach HPLC-SEC-Trennung (Standards siehe Tab. 24)

Tab. 24: Angabe der Standards der in Abb. 25 dargestellten Fraktionen

Fraktion	Standard	Molekulargewicht [Da]
1	Polystyrolsulfonat	6780
2	Kaliumhydrogenphthalat	165 (ohne K ⁺)
3	Dextran	1000
4	Methionin	149
5	Polystyrolsulfonat	6780
6	Methionin	149
7	Dextran	44000
8	Dextran	10000
9	Dextran	1000
10	Polyethylenglycol	20000
11	Ethylenglycol	62
12	β-Cyclodextrin	1134

3.4. Untersuchte Huminstoffe

3.4.1. Probenherkunft

Da HS ein weites Spektrum von Eigenschaften aufweisen, wurden Proben an verschiedenen Orten genommen, wobei bei der Auswahl auch unterschiedliche Gewässerarten eine Rolle spielten. Die meisten Untersuchungen wurden an HS durchgeführt, die im Rahmen des Schwerpunktprogramms „Refraktäre organische Säuren in Gewässern, ROSIG“ der DFG als Bezugssubstanzen vom Engler-Bunte-Institut der Universität Karlsruhe (██████████) zur Verfügung gestellt wurden (siehe Tab. 25). Durch die einheitliche Probennahme und Vorbehandlung konnte die Vergleichbarkeit von Ergebnissen unterschiedlicher Arbeitsgruppen gewährleistet werden. Die Wasserproben zeigten aufgrund der natürlichen Gegebenheiten charakteristische Eigenschaften, z.B. aerobes Braunwasser (HO), anaerobes Grundwasser (FG), Abwasser einer Kläranlage (ABV), Abwasser einer Braunkohlepyrolyse (SV) und Bodensickerwasser eines Waldbodens (BS). Aus den genannten Originalwasserproben wurden zusätzlich Humin- (HA) und Fulvinsäuren (FA) isoliert (siehe Kap. 3.4.2), welche gefriergetrocknet verschickt wurden. Um mögliche Veränderungen bei der Gefrier Trocknung zu untersuchen, wurden auch Proben direkt nach der Anreicherung, d.h. in Lösung, verschickt (Flüssig-Proben). Sie sind im folgenden mit dem Index „fl“ kenntlichgemacht. Im Rahmen des gleichen Projektes wurden auch künstliche Modellsubstanzen hergestellt (██████████), um unterschiedlich hohe Schwefelgehalte einstellen zu können (siehe Tab. 28). Hierzu wurden Hydrochinon und unterschiedliche Mengen Natriumsulfid bzw. L-Cystein unter Zugabe von Natriumcarbonat mit Luft oxidiert. Diese Modellsubstanzen haben eine polymere Struktur mit vielfältigen funktionellen Gruppen, aber man darf diese Modellsubstanzen nicht mit natürlichen HS gleichsetzen. Da die Übertragbarkeit der mit diesen Modellsubstanzen ermittelten Ergebnisse fraglich ist, wurden sie nur zur Schwefel- und Kohlenstoff-Gesamtgehaltsbestimmung herangezogen. Untersuchungen mit SEC wurden nur an Proben natürlicher Herkunft durchgeführt. Zusätzlich wurden Gewässer in den Everglades in Florida, USA, selbst beprobt (siehe Tab. 26). Vom U.S. Geological Survey (USGS) wurden im Rahmen einer Kooperation (██████████) weitere gefriergetrocknete Proben zur Verfügung gestellt (siehe Tab. 27). Bei letztgenannten Proben wurde auch auf eine hohe Streuung der Probenherkunft geachtet, die mehrere Flüsse, den Pazifischen Ozean und die Everglades beinhalteten.

Tab. 25: Bezeichnung und Herkunft der analysierten Gewässerproben, die im Rahmen des ROSIG-Projektes zur Verfügung gestellt wurden

Bezeichnung	Herkunft
SV	Braunkohle Pyrolyseabwasser, Schwellvollert, Leipzig
SV1	Originalwasser, Probennahme 1, 6/95
SV1 FA _{fl}	aus SV1 isolierte Fulvinsäuren, flüssig
SV1 HA	aus SV1 isolierte Huminsäuren, gefriergetrocknet
BS	Bodensickerwasser, Bayreuth
BS1	Originalwasser, Probennahme 1, 11/95
BS1 FA _{fl}	aus BS1 isolierte Fulvinsäuren, flüssig
BS1 HA	aus BS1 isolierte Huminsäuren, gefriergetrocknet
FG	Grundwasser, Fuhrberger Feld, Hannover
FG1	Originalwasser, Probennahme 1, 1/96
FG1 FA	aus FG1 isolierte Fulvinsäuren, gefriergetrocknet
HO	Braunwasser, Hohlohsee, Schwarzwald
HO10 FA	aus HO10 isolierte Fulvinsäuren, gefriergetrocknet
HO10 FA _{fl}	aus HO10 isolierte Fulvinsäuren, flüssig
HO10 HA _{Okt}	aus HO10 isolierte Huminsäuren, gefriergetrocknet (10/95)
HO10 HA _{Nov}	aus HO10 isolierte Huminsäuren, gefriergetrocknet (11/95)
HO12 K	Ultrafiltrat von HO12 (cut-off 4 kDa), gefriergetrocknet
HO13	Originalwasser, Probennahme 13, 9/96
HO13 FA	aus HO13 isolierte Fulvinsäuren, gefriergetrocknet
HO13 FA _{fl}	aus HO13 isolierte Fulvinsäuren, flüssig
HO13 HA	aus HO13 isolierte Huminsäuren, gefriergetrocknet
HO14	Originalwasser, Probennahme 14, 7/97
HO14 FA _{fl}	aus HO14 isolierte Fulvinsäuren, flüssig
HO16	Originalwasser, Probennahme 16, 7/98
HO16 G	gefriergetrocknetes Originalwasser, Probennahme 16
HO16 FA _{fl}	aus HO16 isolierte Fulvinsäuren, flüssig
ABV	kommunales Abwasser, Vorfluter, Kläranlage Neureuth
ABV2 FA _{fl}	aus ABV2 isolierte Fulvinsäuren, flüssig
ABV3	Originalwasser, Probennahme 3, 7/97
ABV3 FA	aus ABV3 isolierte Fulvinsäuren, gefriergetrocknet
ABV3 K	Ultrafiltrat von ABV3 (cut-off 4 kDa), gefriergetrocknet

Tab. 26: Bezeichnung und Herkunft der analysierten Gewässerproben aus den Everglades, Florida, USA

Bezeichnung	Herkunft
WCA1	Originalwasser-Probe, Florida, USA
WCA1	Loxahatchee Nationalpark, Water Conservation Area 1, 1/00
EN	Originalwasser-Proben, Everglades Nationalpark, Florida, USA
EN1	Coot Bay Pond, 1/00
EN2	Pahayokee Overlook, 1/00

Tab. 27: Bezeichnung und Herkunft der analysierten Gewässerproben der vom U.S. Geological Survey zur Verfügung gestellten Proben

Bezeichnung	Herkunft
WCA2	Water Conservation Area 2BS, Florida, USA
WCA2FA	aus WCA2 isolierte Fulvinsäuren, gefriergetrocknet
WCA2HPIA	aus WCA2 isolierter hydrophiler Säureanteil, gefriergetrocknet
WCA2HPOA	aus WCA2 isolierter hydrophober Säureanteil, gefriergetr.
F1	Water Conservation Area 2A, Probenpunkt F1, Florida, USA
F1FA	aus F1 isolierte Fulvinsäuren, gefriergetrocknet
F1HA	aus F1 isolierte Huminsäuren, gefriergetrocknet
F1HPIA	aus F1 isolierter hydrophiler Säureanteil, gefriergetrocknet
F1HPOA	aus F1 isolierter hydrophober Säureanteil, gefriergetrocknet
SR	IHSS Referenzmaterial, Suwannee River, Georgia, USA
SRFA	aus SR isolierte Fulvinsäuren, gefriergetrocknet
SRHA	aus SR isolierte Huminsäuren, gefriergetrocknet
OR	Ogeechee River, Georgia, USA
ORFA	aus OR isolierte Fulvinsäuren, gefriergetrocknet
ORHA	aus OR isolierte Huminsäuren, gefriergetrocknet
MR	Missouri River, Missouri, USA
MRFA	aus MR isolierte Fulvinsäuren, gefriergetrocknet
MRHA	aus MR isolierte Huminsäuren, gefriergetrocknet
CC	Coal Creek, Colorado, USA
CCFA	aus CC isolierte Fulvinsäuren, gefriergetrocknet
PO	Pazifischer Ozean, 800 m Tiefe
POFA	aus PO isolierte Fulvinsäuren, gefriergetrocknet

Tab. 28: Bezeichnung und Herkunft der analysierten Modellsubstanzen, die im Rahmen des ROSIG-Projektes zur Verfügung gestellt wurden

Bezeichnung	Herkunft
Schwefelhaltige Modellsubstanzen aus Na ₂ S	
HS108	isolierte Huminsäuren aus Modellsubstanz (0.7 g Na ₂ S)
HS110	isolierte Huminsäuren aus Modellsubstanz (1.4 g Na ₂ S)
HS112	isolierte Huminsäuren aus Modellsubstanz (2.8 g Na ₂ S)
FS109	isolierte Fulvinsäuren aus Modellsubstanz (0.7 g Na ₂ S)
FS111	isolierte Fulvinsäuren aus Modellsubstanz (1.4 g Na ₂ S)
FS113	isolierte Fulvinsäuren aus Modellsubstanz (2.8 g Na ₂ S)
Schwefelhaltige Modellsubstanzen aus L-Cystin	
HS20	isolierte Huminsäuren aus Modellsubstanz (0.5 g L-Cystin)
HS06	isolierte Huminsäuren aus Modellsubstanz (2.7 g L-Cystin)
HS17	isolierte Huminsäuren aus Modellsubstanz (4.5 g L-Cystin)
FS21	isolierte Fulvinsäuren aus Modellsubstanz (0.5 g L-Cystin)
FS19	isolierte Fulvinsäuren aus Modellsubstanz (2.7 g L-Cystin)
FS18	isolierte Fulvinsäuren aus Modellsubstanz (4.5 g L-Cystin)

3.4.2. Probennahme und Probenvorbereitung

Für die Proben des ROSIG-Projektes wurden übliche Förderpumpen verwendet. Die selbst genommenen Proben der Florida Everglades wurden direkt (ohne Pumpe) in vorgereinigte PE-Flaschen geschöpft. Die Proben wurden anschließend bei 5 °C im Dunkeln aufbewahrt. Die Fulvin- und Huminsäuren (FA bzw. HA) wurden durch das XAD-8-Verfahren gewonnen und teils flüssig, teils gefriergetrocknet an die teilnehmenden Labors verschickt. Beim XAD-8-Verfahren wird das Originalwasser bei pH 2 über das XAD-8-Harz gegeben und anschließend die HS mit 0.1 M Natronlauge eluiert. Durch Ansäuern des Eluates fallen die HA aus, und können so von den FA abgetrennt werden. Die hydrophile Säure-Fraktion (HPIA) wurde mit dem XAD-4-Harz gewonnen, während die hydrophobe Säure-Fraktion (HPOA) das gesamte XAD-8-Eluat enthält. Bei der Anreicherung mit Ultrafiltration wurde eine Membran mit 4 kDa Ausschlußgrenze (*cut-off*) verwendet. Zur Untersuchung gefriergetrockneter Proben wurden diese mit Milli-Q-Wasser gelöst und mindestens für 48 h geschüttelt. Zur Untersuchung der Proben mit SEC wurden die Proben direkt vor der Analyse durch eine 0.45 µm PVDF-Membran filtriert.

3.5. Untersuchung der kinetischen Stabilität von Huminstoff-Komplexen

3.5.1. Allgemeines

Die Bindung von Metallionen an HS hat einen großen Einfluß auf die Bioverfügbarkeit und Mobilität dieser Ionen in der Umwelt. Die meisten Arbeiten, die bisher die Komplexbildung von Metallionen durch HS untersucht haben, bezogen sich hierbei lediglich auf die thermodynamische Stabilität dieser Komplexe. Jedoch spielt in bezug auf die Bioverfügbarkeit dieser Ionen die kinetische Stabilität eine große Rolle, da kinetisch stabile Komplexe auch unter thermodynamischen Bedingungen existieren können. Die thermodynamische und kinetische Stabilität ist in der „klassischen“ Komplexchemie gut erforscht. Man erwartet daher für Elemente der Übergangsreihe mit d^3 oder d^6 (low spin) Elektronenkonfiguration, wie z.B. Cr(III) und Co(III), kinetisch stabile Komplexe, während entsprechende Cu(II)- und Co(II)-Komplexe mit d^9 bzw. d^7 Elektronenkonfiguration kinetisch labil sein sollten. Erste Hinweise für die kinetische Stabilität von Chrom-Huminstoff-Komplexen fanden Götz und Heumann [79] bei der elektrolytischen Abscheidung von Chrom aus Gewässerproben mit hohem Huminstoffanteil. Im Rahmen dieser Arbeit wurden daher Chrom, Kupfer und Kobalt-Komplexe untersucht. Grundgedanke der Untersuchung der kinetischen Stabilität von Huminstoff-Komplexen ist, daß bei Zugabe einer isotonenangereicherten Spike-Lösung ein Austausch der Metallionen stattfindet und sich ein Gleichgewicht einstellt. In früheren Arbeiten wurde mittels Ultrafiltration das Gleichgewicht zwischen der Lösung und Huminstoffen untersucht, während in dieser Arbeit mit SEC getrennte HS-Komplexe der genannten Elemente auf ihre kinetische Stabilität hin überprüft werden sollten. Findet man nach Spike-Zugabe in allen Fraktionen das gleiche Isotopenverhältnis, so hat ein Metallionen-Austausch der (kinetisch labilen) HS-Komplexe stattgefunden. Findet man dagegen unterschiedliche Isotopenverhältnisse, müssen kinetisch stabile Komplexe vorliegen. Voraussetzung für diese Schlußfolgerung ist, daß vor der Spike-Zugabe alle Bindungsstellen mit den entsprechenden Metallionen natürlicher Isotopenzusammensetzung abgesättigt wurden. Um dies zu gewährleisten, wurde ein Überschuß an Standard-Lösung, im Vergleich zur Bindungskapazität, zugegeben. Da aquatische HS eine Kupfer-Komplexierungskapazität von 1-3 mmol/g DOC aufweisen, wurden durch Zugabe von 3-6 mmol/g DOC der Standard-Lösung alle Bindungsstellen abgesättigt. Um eine Gleichgewichtseinstellung des Systems zu erlauben, wurde zwischen Standard- und Spike-Zugabe eine Equilibrierungszeit von 48 h eingehalten.

3.5.2. Kupfer-Huminstoff-Komplexe

Vier Originalwasserproben des ROSIG-Projektes (HO14, FG1, BS1 und SV1) wurden mit Milli-Q-Wasser verdünnt und jeweils 20 g mit einer Cu(II)-Lösung natürlicher Isotopenzusammensetzung (Cu-Standard) versetzt. Nach 48 h Equilibrierungszeit wurde eine an ^{65}Cu angereicherte Cu(II)-Lösung (^{65}Cu -Spike) zugesetzt und nach 1 h mittels SEC fraktioniert. Die UV-Absorption sowie die ICP-MS-Chromatogramme von Kupfer nach SEC-Trennung sind in Abb. 26 bis Abb. 29 dargestellt. Die zugesetzten Kupfermengen sowie die Verdünnung der Huminstoff-Lösungen sind Tab. 29 zu entnehmen.

Tab. 29: Verdünnung der Originalproben, Zusatz an Cu-Standard und daraus resultierender Cu-Gehalt sowie zugegebene ^{65}Cu -Spikemenge

Probe	Verdünnung	Cu-Standard [μg]	Cu-Gehalt [mmol Cu/g C]	^{65}Cu -Spike [μg]
HO14	1:5	40	5.4	9
FG1	1:5	16	5.4	7
BS1	1:10	52	5.6	23
SV1	1:10	160	5.3	70

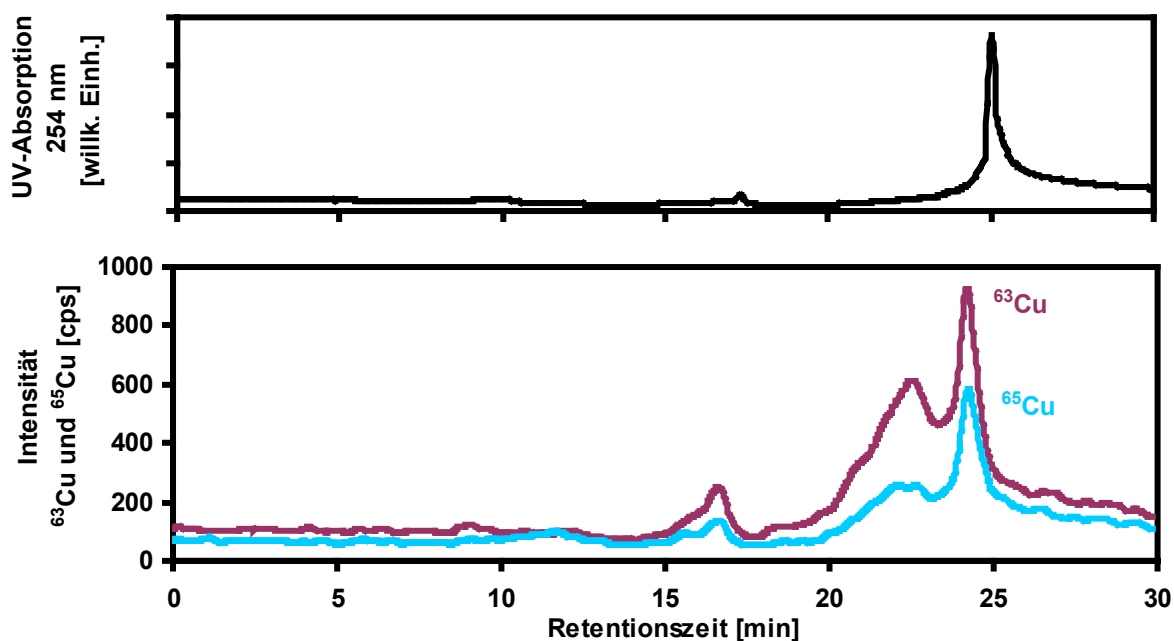


Abb. 26: ICP-MS- und UV-Chromatogramm der mit Cu-Standard und ^{65}Cu -Spike versetzten Braunwasserlösung HO14 nach SEC-Trennung

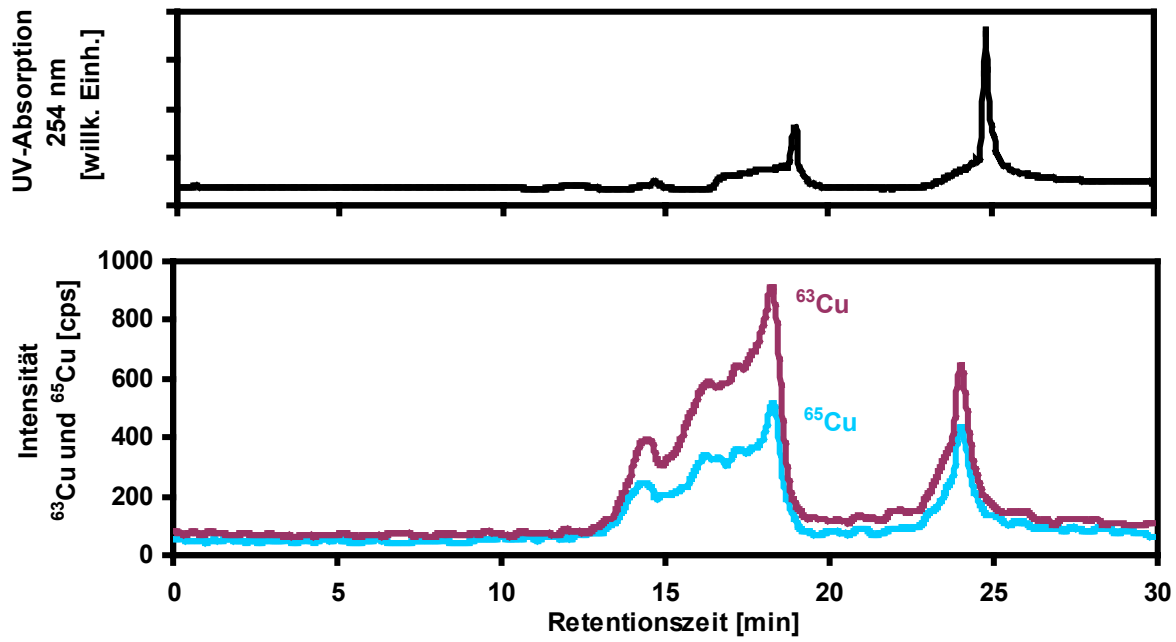


Abb. 27: ICP-MS- und UV-Chromatogramm der mit Cu-Standard und ^{65}Cu -Spike versetzten Grundwasserlösung FG1 nach SEC-Trennung

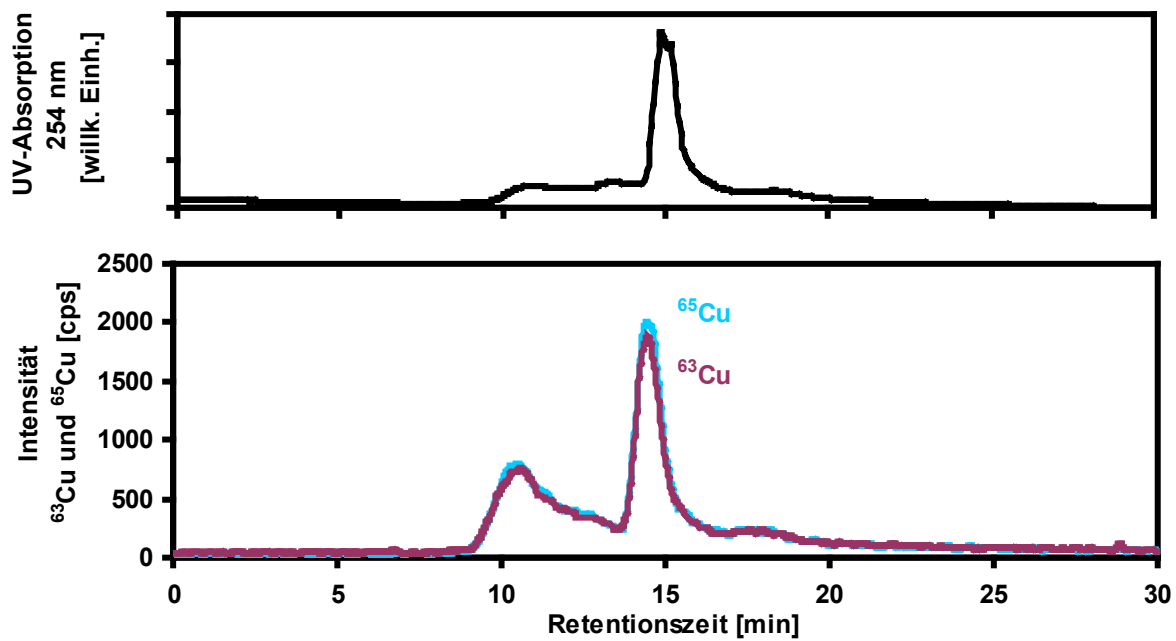


Abb. 28: ICP-MS- und UV-Chromatogramm der mit Cu-Standard und ^{65}Cu -Spike versetzten Bodensickerwasserlösung BS1 nach SEC-Trennung

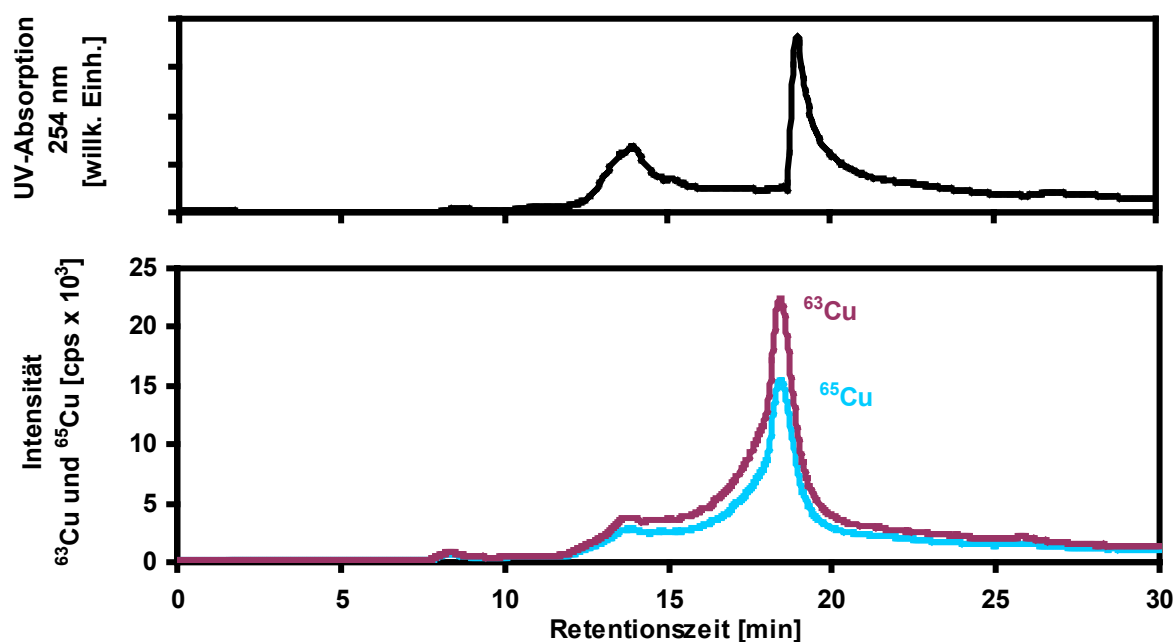


Abb. 29: ICP-MS- und UV-Chromatogramm der mit Cu-Standard und ^{65}Cu -Spike versetzten Braunkohlepyrolyseabwasserlösung SV1 nach SEC-Trennung

Um das Langzeitverhalten (Alterung) von Kupfer-HS-Komplexen zu untersuchen, wurden Huminstoff-Lösungen wie beschrieben mit Kupfer-Standard versetzt und nach der ^{65}Cu -Spike-Zugabe bei Raumtemperatur und Dunkelheit für ein Jahr aufbewahrt. Die zugesetzten Kupfermengen sowie die Verdünnung der Huminstoff-Lösungen sind Tab. 30 zu entnehmen. Die UV-Absorption sowie die ICP-MS-Chromatogramme von Kupfer nach SEC-Trennung sind in Abb. 30 und Abb. 31 dargestellt.

Tab. 30: Verdünnung der Originalproben, Zusatz an Cu-Standard und daraus resultierender Cu-Gehalt sowie zugegebene ^{65}Cu -Spikemenge

Probe	Verdünnung	Cu-Standard [μg]	Cu-Gehalt [mmol Cu/g C]	^{65}Cu -Spike [μg]
HO13	1:10	20	5.9	11
SV1	1:100	12	4.0	10

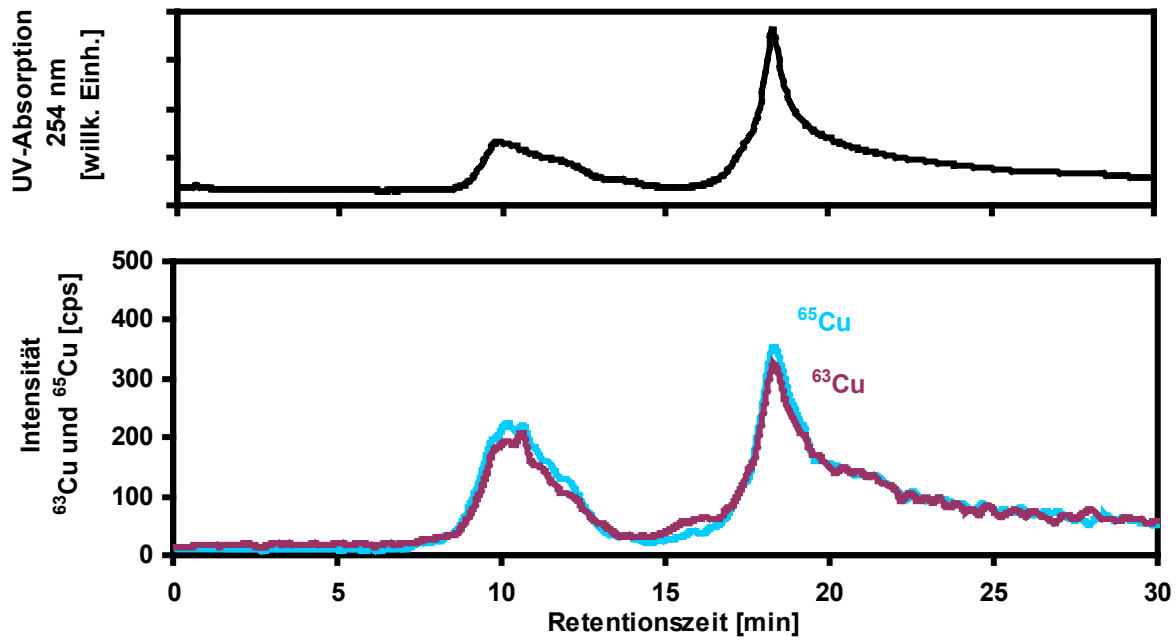


Abb. 30: ICP-MS- und UV-Chromatogramm der mit Cu-Standard und ^{65}Cu -Spike versetzten Braunwasserlösung HO13 nach SEC-Trennung (nach 1 Jahr)

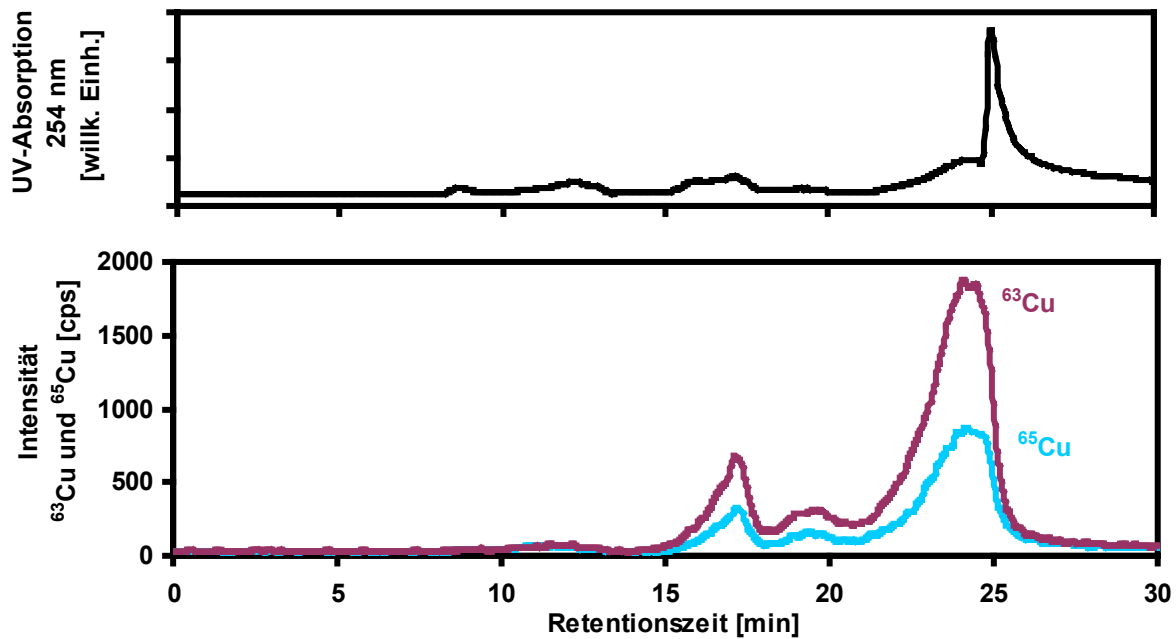


Abb. 31: ICP-MS- und UV-Chromatogramm der mit Cu-Standard und ^{65}Cu -Spike versetzten Braunkohlepyrolyseabwasserlösung SV1 nach SEC-Trennung (nach 1 Jahr)

3.5.3. Chrom-Huminstoff-Komplexe

Analog zu den Versuchen mit Kupfer-HS-Komplexen wurden vier Originalwasserproben (HO14, FG1, BS1 und SV1) mit Milli-Q-Wasser verdünnt und jeweils 20 g mit einer Cr(III)-Lösung natürlicher Isotopenzusammensetzung (Cr-Standard) versetzt. Nach 48 h Equilibrierungszeit wurde diese Lösung mit einer auf ^{53}Cr angereicherten Cr(III)-Lösung (^{53}Cr -Spike) versetzt und nach 1 h mittels SEC fraktioniert. Die UV-Absorption sowie die ICP-MS-Chromatogramme von Chrom nach SEC-Trennung sind in Abb. 32 bis Abb. 35 dargestellt. Die zugesetzten Chrommengen sowie die Verdünnung der Huminstoff-Lösungen sind Tab. 31 zu entnehmen.

Tab. 31: Verdünnung der Originalproben, Zusatz an Cr-Standard und daraus resultierender Cr-Gehalt sowie zugegebene ^{53}Cr -Spikemenge

Probe	Verdünnung	Cr-Standard [μg]	Cr-Gehalt [mmol Cr/g C]	^{53}Cr -Spike [μg]
HO14	1:5	16	2.6	3
FG1	1:5	13	5.4	3
BS1	1:10	42	5.5	9
SV1	1:10	150	6.1	63

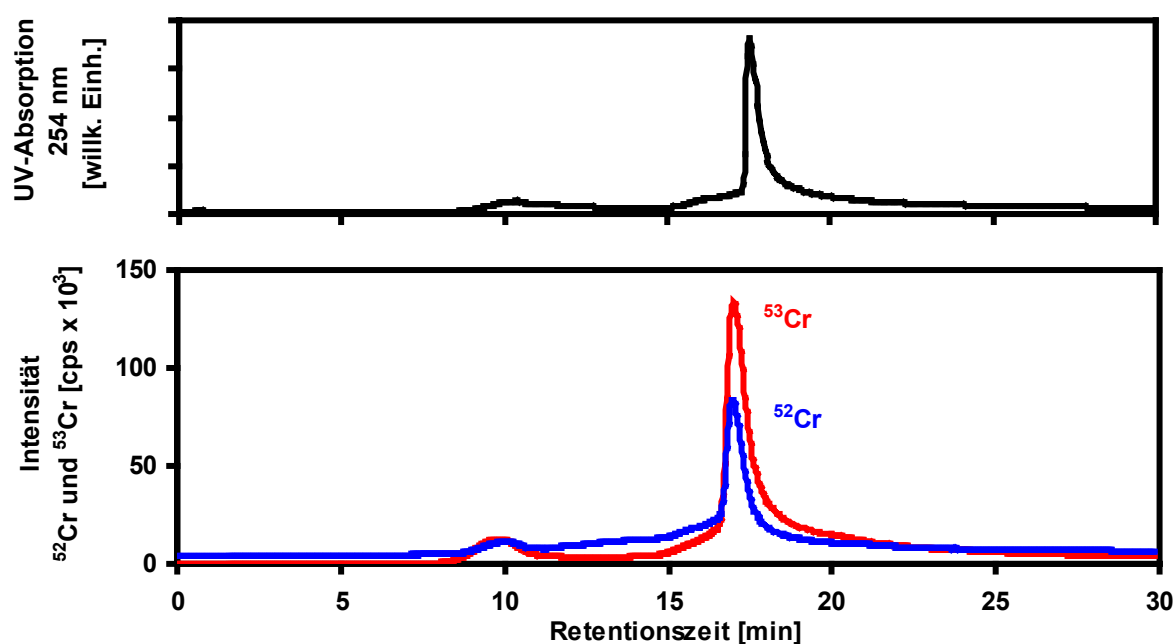


Abb. 32: ICP-MS- und UV-Chromatogramm der mit Cr-Standard und ^{53}Cr -Spike versetzten Braunwasserlösung HO14 nach SEC-Trennung

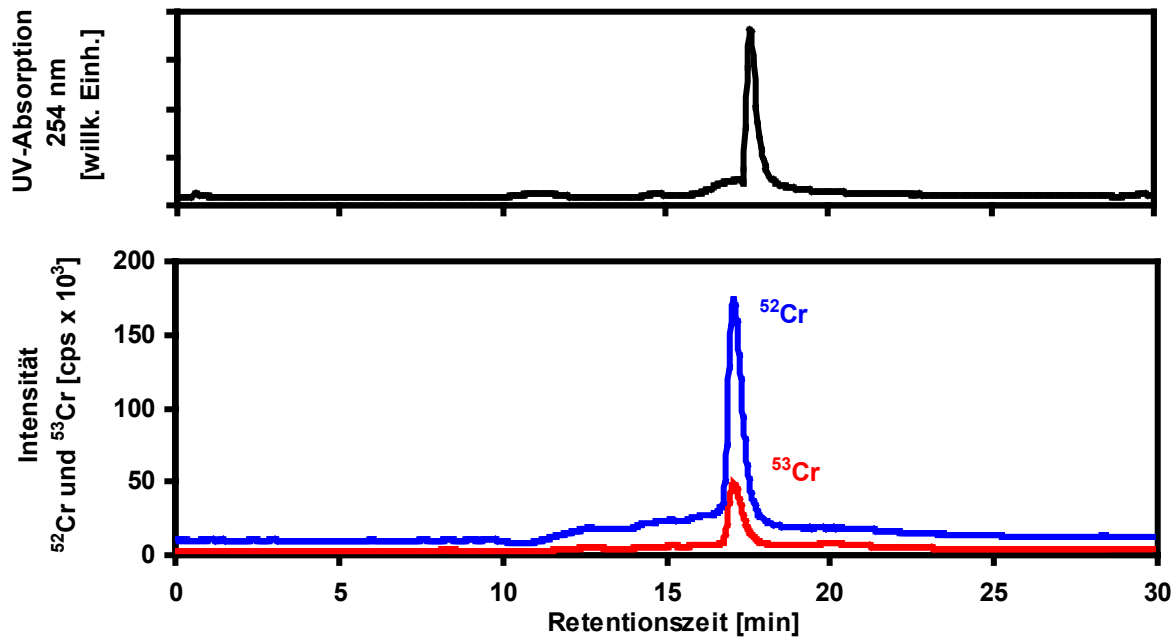


Abb. 33: ICP-MS- und UV-Chromatogramm der mit Cr-Standard und ^{53}Cr -Spike versetzten Grundwasserlösung FG1 nach SEC-Trennung

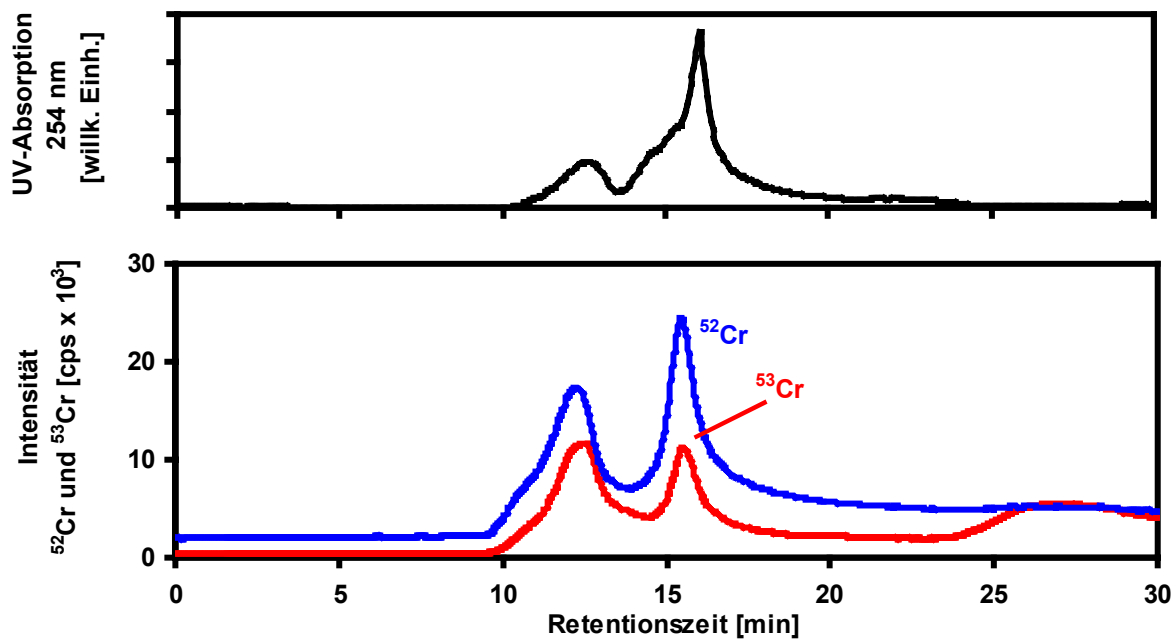


Abb. 34: ICP-MS- und UV-Chromatogramm der mit Cr-Standard und ^{53}Cr -Spike versetzten Bodensickerwasserlösung BS1 nach SEC-Trennung

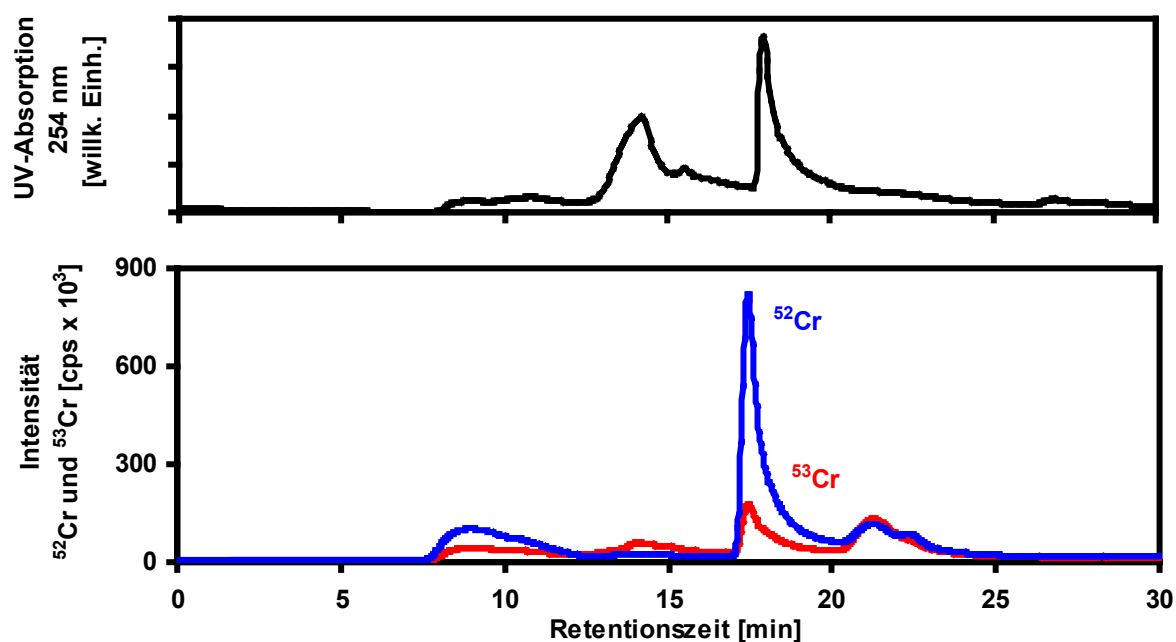


Abb. 35: ICP-MS- und UV-Chromatogramm der mit Cr-Standard und ^{53}Cr -Spike versetzten Braunkohlepyrolyseabwasserlösung SV1 nach SEC-Trennung

Um die kinetische Langzeitstabilität der Chrom-Huminstoff-Komplexe zu untersuchen, wurden Huminstoff-Lösungen wie beschrieben erst mit Chrom-Standard versetzt und nach der ^{53}Cr -Spike-Zugabe bei Raumtemperatur und Dunkelheit für ein Jahr aufbewahrt. Die zugesetzten Chrommengen sowie die Verdünnung der Huminstoff-Lösungen sind Tab. 32 zu entnehmen. Die UV-Absorption sowie die ICP-MS-Chromatogramme von Chrom nach SEC-Trennung sind in Abb. 36 bis Abb. 39 dargestellt.

Tab. 32: Verdünnung der Originalproben, Zusatz an Cr-Standard und daraus resultierender Cr-Gehalt sowie zugegebene ^{53}Cr -Spikemenge

Probe	Verdünnung	Cr-Standard [μg]	Cr-Gehalt [mmol Cr/g C]	^{53}Cr -Spike [μg]
HO13	1:10	16	5.8	14
FG1	1:4	16	5.3	14
BS1	1:25	16	5.3	14
SV1	1:100	16	6.5	14

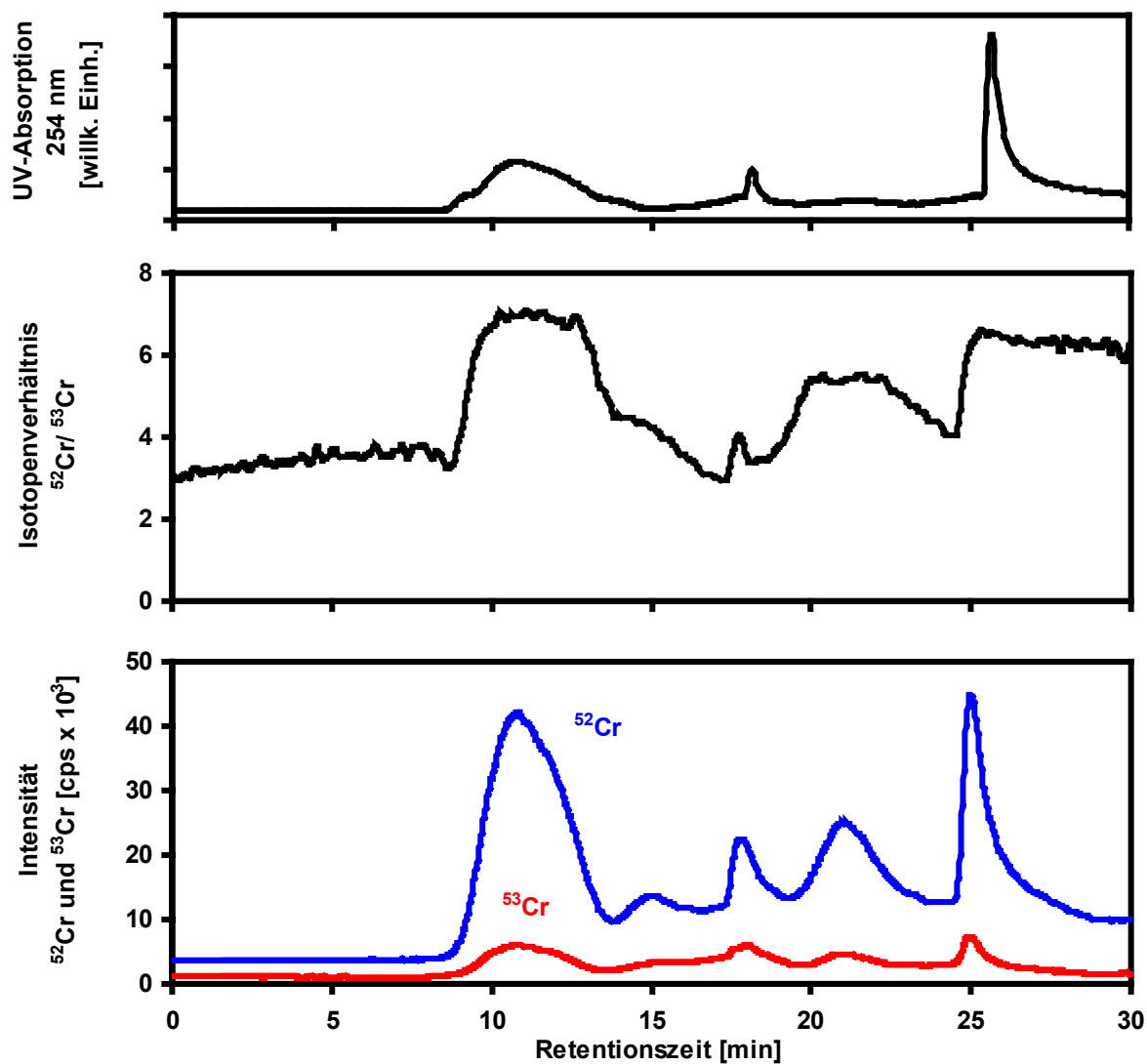


Abb. 36: ICP-MS- und UV-Chromatogramm der mit Cr-Standard und ^{53}Cr -Spike versetzten Braunwasserlösung HO13 nach SEC-Trennung sowie das aus der Chrom-Signalintensität berechnete Isotopenverhältnis $^{52}\text{Cr}/^{53}\text{Cr}$ nach einem Jahr

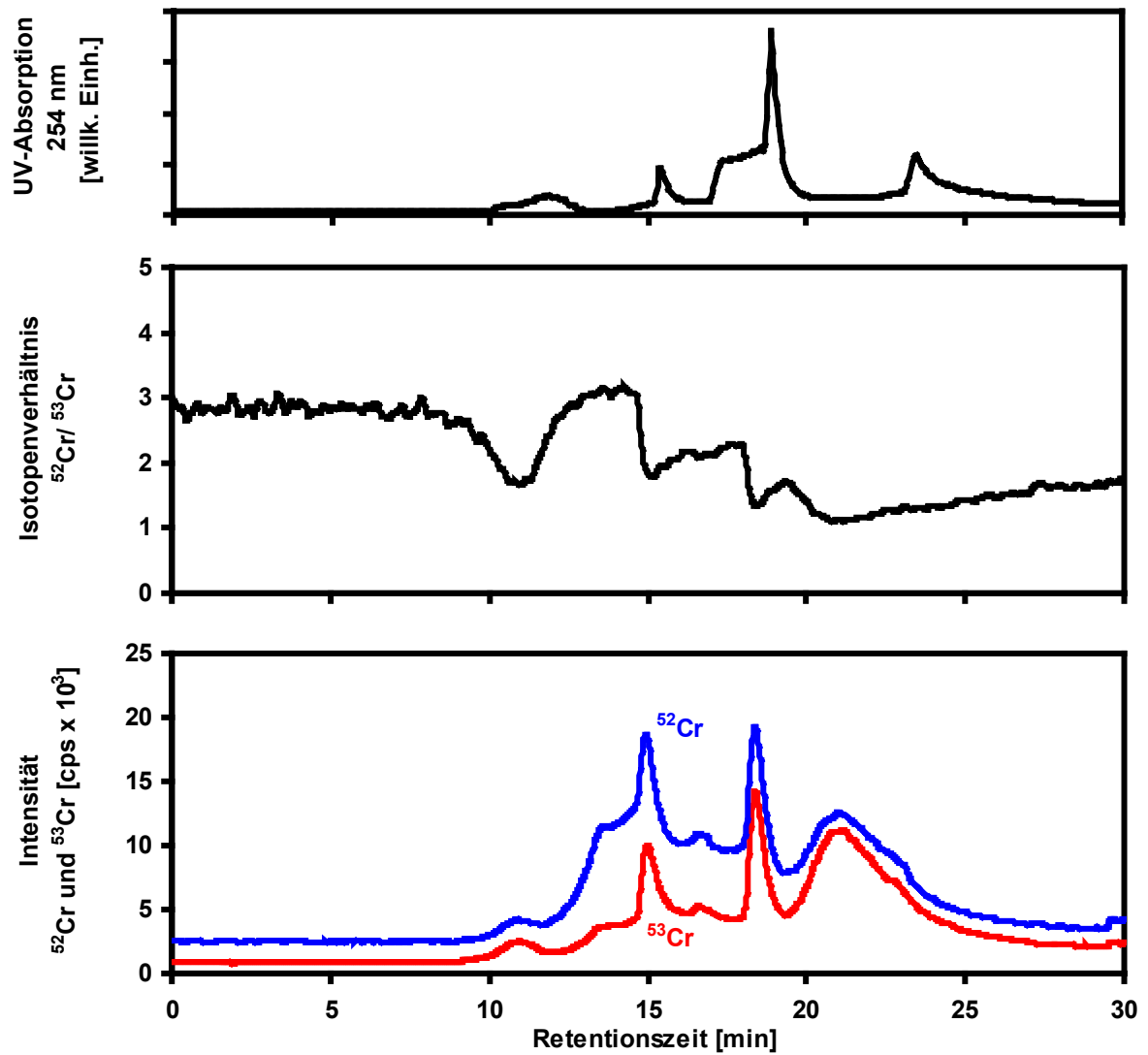


Abb. 37: ICP-MS- und UV-Chromatogramm der mit Cr-Standard und ^{53}Cr -Spike versetzten Grundwasserlösung FG1 nach SEC-Trennung sowie das aus der Chrom-Signalintensität berechnete Isotopenverhältnis $^{52}\text{Cr}/^{53}\text{Cr}$ nach einem Jahr

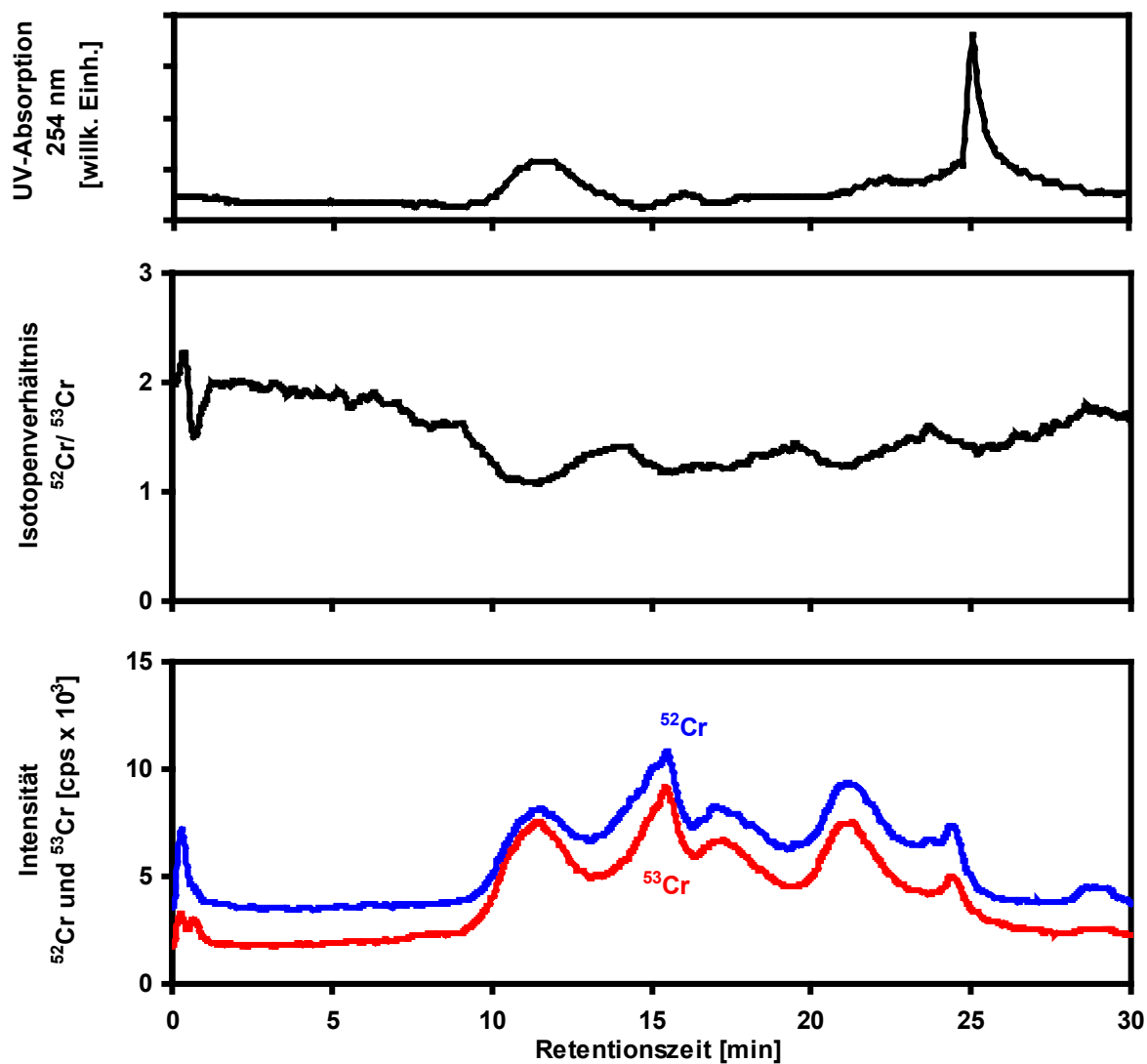


Abb. 38: ICP-MS- und UV-Chromatogramm der mit Cr-Standard und ^{53}Cr -Spike versetzten Bodensickerwasserlösung BS1 nach SEC-Trennung sowie das aus der Chrom-Signalintensität berechnete Isotopenverhältnis $^{52}\text{Cr}/^{53}\text{Cr}$ nach einem Jahr

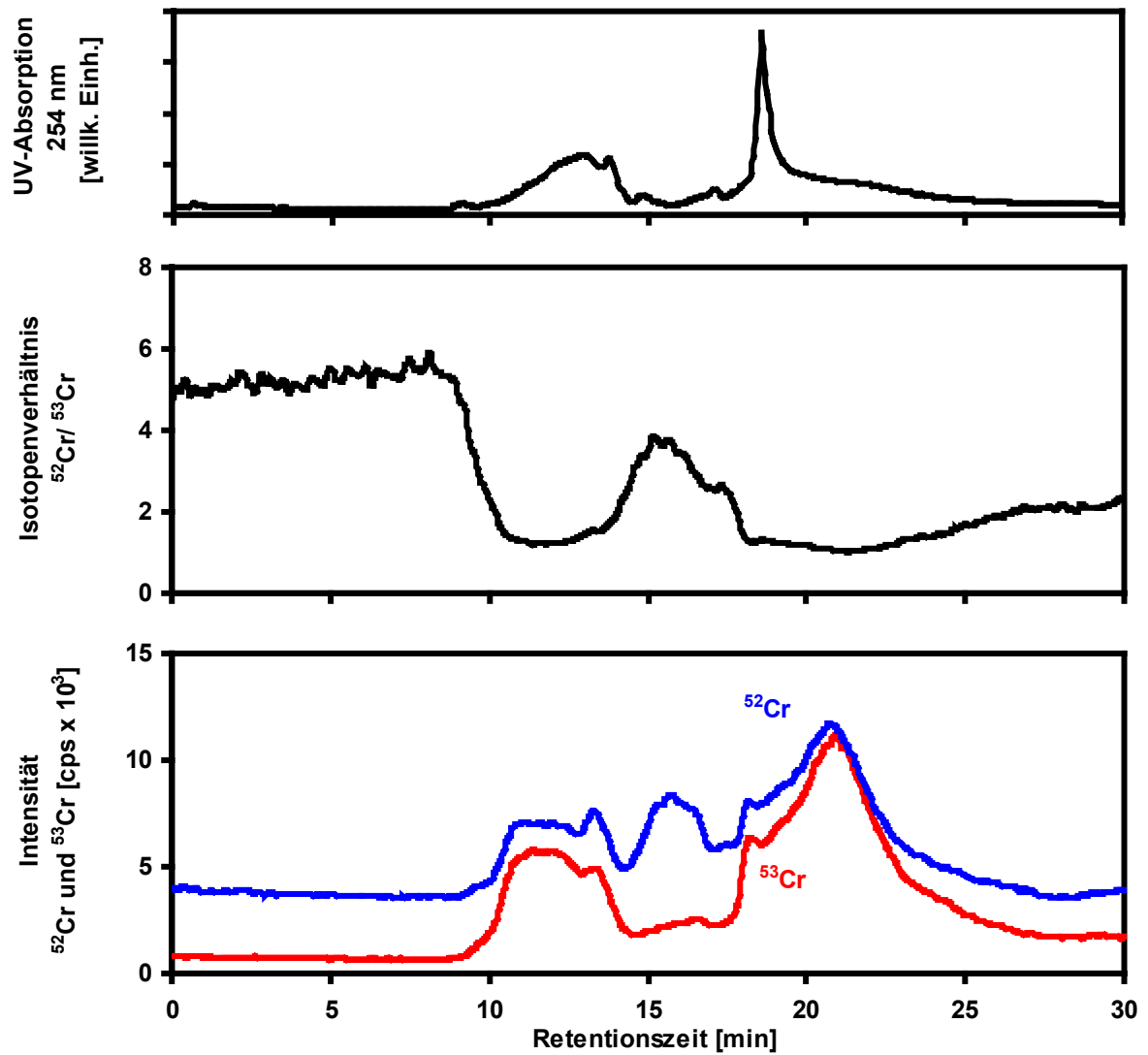


Abb. 39: ICP-MS- und UV-Chromatogramm der mit Cr-Standard und ^{53}Cr -Spike versetzten Braunkohlepyrolyseabwasserlösung SV1 nach SEC-Trennung sowie das aus der Chrom-Signalintensität berechnete Isotopenverhältnis $^{52}\text{Cr}/^{53}\text{Cr}$ nach einem Jahr

3.5.4. Kobalt-Huminstoff-Komplexe

Nachdem Chrom-HS-Komplexe im Gegensatz zu Kupfer-HS-Komplexe kinetische Stabilität zeigten, wurden Untersuchungen an Co(II)- und Co(III)-HS-Komplexen durchgeführt. Man erwartet aufgrund der Ligandenfeldstabilisierungsenergie für Co(II) kinetisch labile Komplexe, die einen schnellen Austausch der Co(II)-Ionen gestatten, während Co(III)-Komplexe als kinetisch stabil gelten. Entsprechend der Versuche mit Chrom und Kupfer wurden Huminstofflösungen hergestellt und mit einer Co-Standard-Lösung abgesättigt. Da die Kobalt-Bindungskapazität (0.2 mmol Co/g DOC) geringer als die des Chroms ist [80, 81], wurde bezogen auf den DOC-Gehalt, weniger Kobalt als Chrom zugegeben. Nach einer Equilibrierungszeit von 48 h wurde radioaktives ^{57}Co (^{57}Co -Spike) hinzugegeben. Die DOC-Gehalte der Lösungen, die zugegebenen Kobaltmengen sowie der resultierende Co-Gehalt sind für Co(II) und Co(III) in Tab. 33 aufgeführt. Aufgrund der Radioaktivität durfte die mit ^{57}Co versetzte Lösung nicht mit dem Massenspektrometer gemessen werden. Es wurde daher ein Äquivalent der Lösung vor ^{57}Co -Zugabe mittels SEC fraktioniert und die ^{59}Co -Intensität mit ICP-MS detektiert. Nach der ^{57}Co -Zugabe zu einem zweiten Äquivalent der Huminstofflösung (1 h) wurde gleichfalls mittels SEC fraktioniert, jedoch ohne die HPLC/ICP-MS-Kopplung zu verwenden. Jeweils 0.5 g des radioaktiven Eluats (\approx 1 min Retentionszeit) wurden mit einem Fraktions-sammler direkt in 15 mL Zentrifugenröhrchen gefüllt und mit einem Schraubdeckel verschlossen. Die Aktivität der Fraktionen wurde anschließend vom Kernchemischen Institut der Universität Mainz (N. Trautmann und A. Seibert) bestimmt. Die SEC-Säule wurde anschließend mehrmals mit EDTA und KOH gespült, um auf der Säule verbliebene Reste zu entfernen. Bei der Untersuchung der Co(III)-Komplexstabilität wurde gleichfalls der Co(II)-Standard zugegeben, jedoch während der Equilibrierungszeit unter Luftzugabe oxidiert. Die Zugabe als Co(III)-Standard ist nicht möglich, da Co(III) nur komplexiert stabil vorliegt und z.B. Kobalt(III)nitrat schnell zu Co(II) reduziert werden würde.

Tab. 33: DOC-Gehalt, Zusatz an Co-Standard und daraus resultierender Co-Gehalt sowie zugegebene ^{57}Co -Spikemenge für Co(II) und Co(III)

Probe	DOC-Gehalt [$\mu\text{g C/g}$]	Co-Standard [$\mu\text{g/g Lsg}$]	Co-Gehalt [mmol Co/g C]	^{57}Co -Spike [Bq/g Lsg]
SV1	236	50	3.6	2×10^5
HO16 G	537	100	3.2	1×10^5

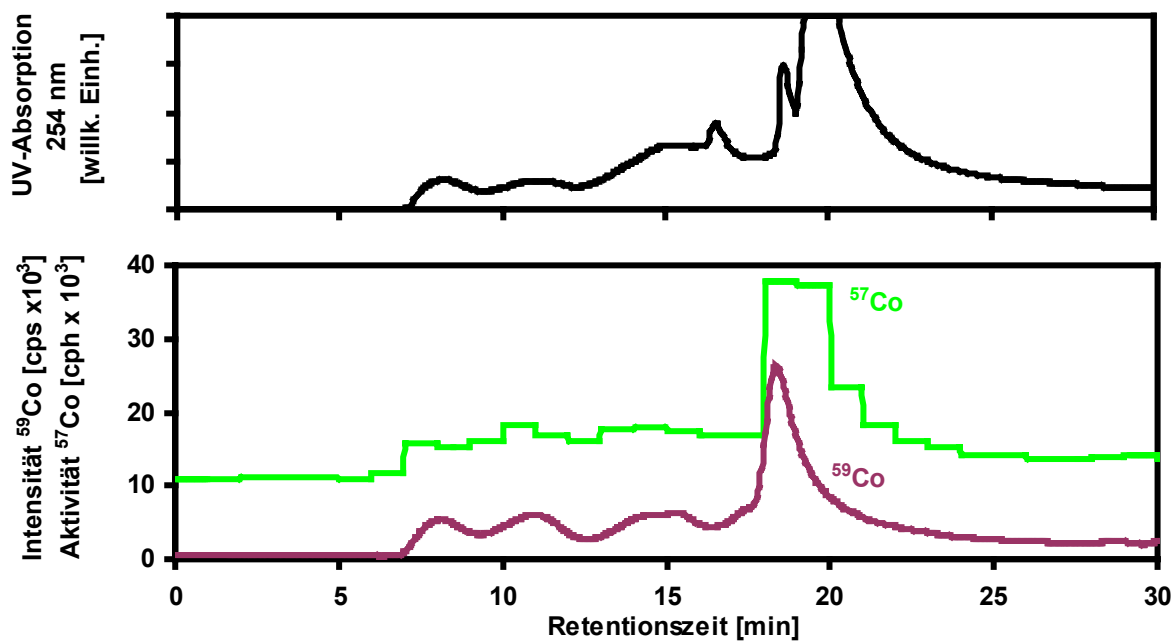


Abb. 40: ICP-MS- und UV-Chromatogramm des mit Co(II)-Standard und ⁵⁷Co(II)-Spike versetzten Braunkohlepyrolyseabwassers SV1 sowie Aktivität von ⁵⁷Co in Fraktionen nach SEC-Trennung.

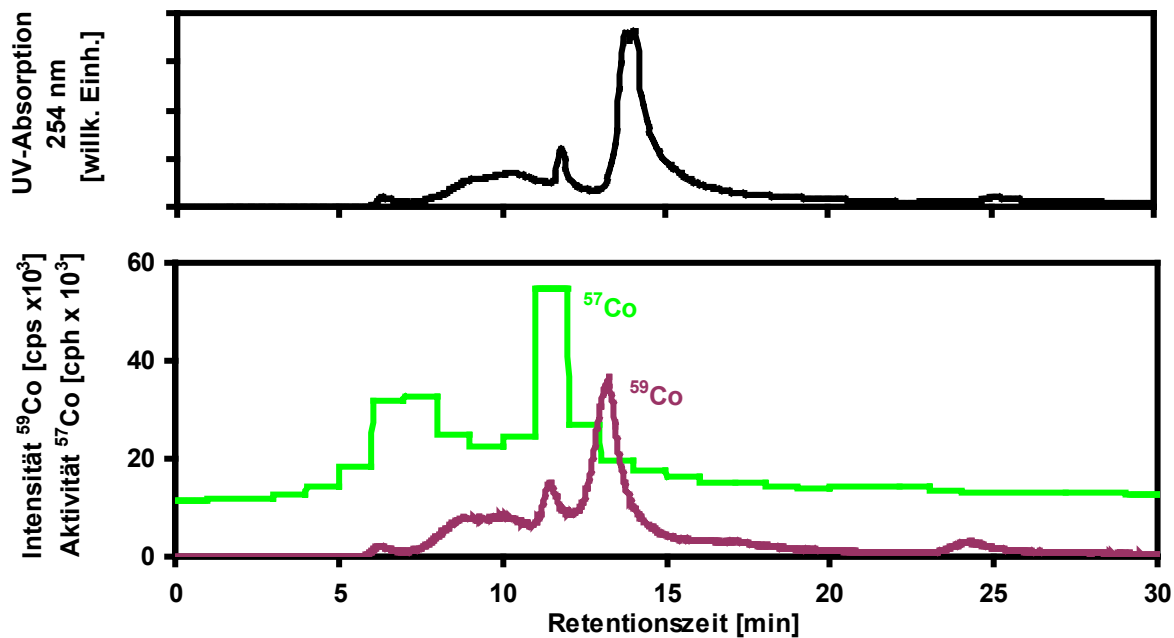


Abb. 41: ICP-MS- und UV-Chromatogramm des mit Co(III)-Standard und ⁵⁷Co(III)-Spike versetzten Braunkohlepyrolyseabwassers SV1 sowie Aktivität von ⁵⁷Co in Fraktionen nach SEC-Trennung.

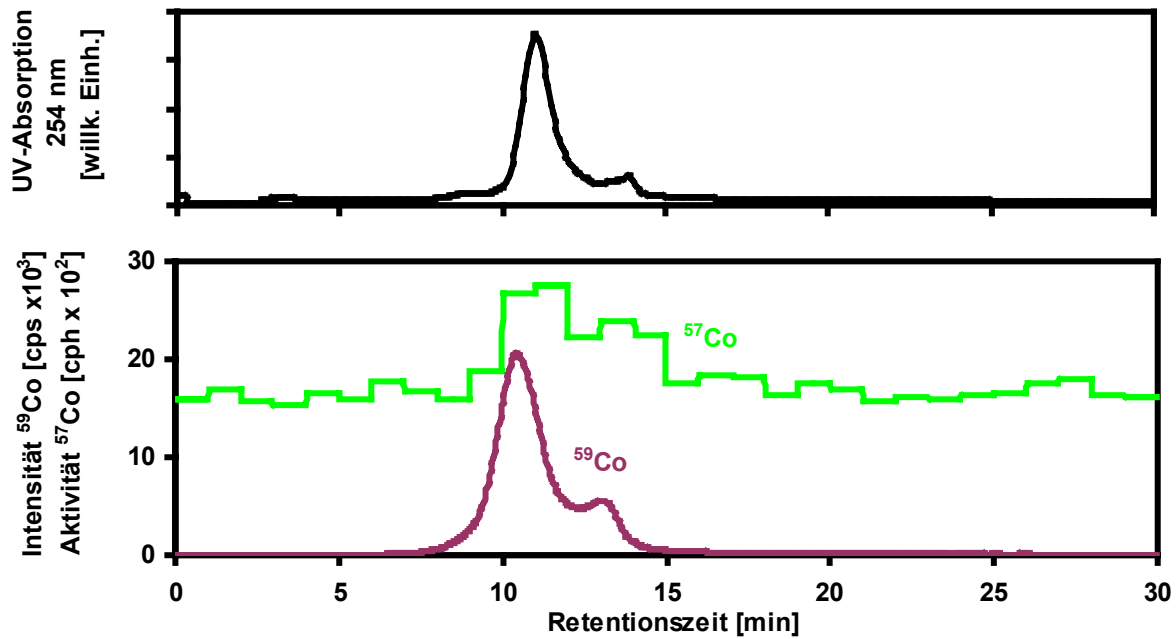


Abb. 42: ICP-MS- und UV-Chromatogramm der mit Co(II)-Standard und ⁵⁷Co(II)-Spike versetzten Braunwasserlösung HO16 G sowie Aktivität von ⁵⁷Co in Fraktionen nach SEC-Trennung.

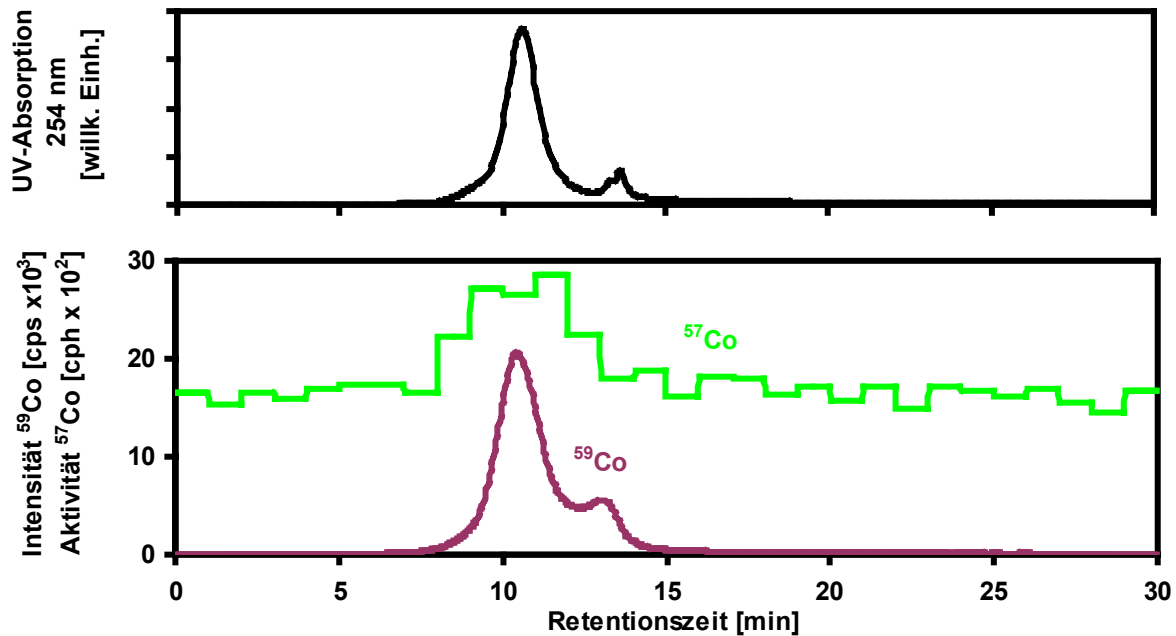


Abb. 43: ICP-MS- und UV-Chromatogramm der mit Co(III)-Standard und ⁵⁷Co(III)-Spike versetzten Braunwasserlösung HO16 G sowie Aktivität von ⁵⁷Co in Fraktionen nach SEC-Trennung.

3.6. Entwicklung einer online Isotopenverdünnungsanalyse für Kohlenstoff, Schwefel und Quecksilber bei HPLC/ICP-MS-Kopplung

3.6.1. Aufbau der HPLC/ICP-MS-Kopplung zur online MSIVA

Die in Kap. 3.3.1 beschriebene HPLC/ICP-MS-Kopplung ermöglicht die Detektion der HPLC-Fractionen in Echtzeit. Jedoch ist mit dem dort gezeigten Aufbau nur die Messung von Intensitäten möglich, d.h. eine Aussage über die Analytgehalte in den Fractionen ist nur über eine externe Kalibration möglich. Bei einer solchen externen Kalibration können jedoch Intensitätsschwankungen des Plasmas und Einflüsse der Matrix das Ergebnis erheblich beeinflussen. Daher wurde zur internen Kalibration, die in Kap. 2.1.5 erläuterte massenspektrometrische Isotopenverdünnungsanalyse (MSIVA) im online-Verfahren verwendet. Die MSIVA ist eine ideale Technik, um Massenflüsse chromatographischer Fractionen in Echtzeit zu bestimmen [82]. Die in Abb. 23 dargestellte Kopplung wurde den Anforderungen der Fragestellung dieser Arbeit angepaßt. Eine schematische Darstellung dieser modifizierten Kopplung zeigt Abb. 44.

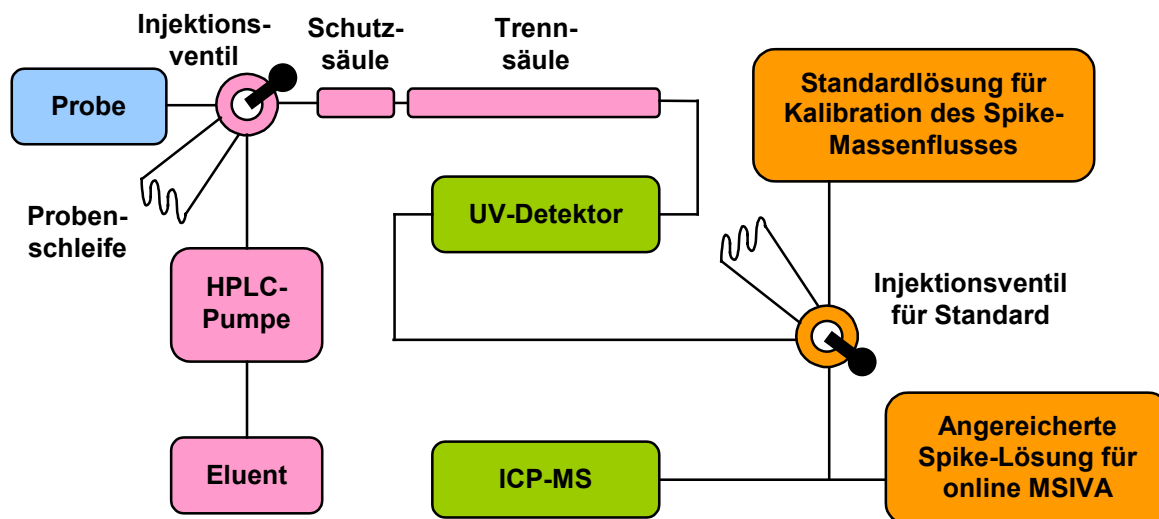


Abb. 44: Schematische Darstellung der HPLC/ICP-MS-Kopplung zur online MSIVA

Während der Messung wird kontinuierlich eine angereicherte Spike-Lösung mit Hilfe einer peristaltischen Pumpe dem Eluat der Chromatographie beigemischt. Dies wird durch ein einfaches T-Mischungsstück erreicht, das vor dem ICP-MS eingebaut wurde. Um den Massenfluß der kontinuierlich beigemischten Spike-Lösung zu bestimmen, muß eine inverse MSIVA durchgeführt werden. Dieser Vorgang

entspricht der Konzentrationsbestimmung der angereicherten Spike-Lösung bei MSIVA im offline Betrieb. Zur Bestimmung des Massenflusses wird eine Probenschleife mit einer Standardlösung bekannter Konzentration gefüllt und zur Kalibrierung (inverse MSIVA) in das System eingebracht. Diese zweite Probenschleife ist nach der Trennsäule aber vor dem Mischungsstück angebracht. Sollen mehrere Elemente mit online MSIVA bestimmt werden, muß eine Multi-Spike-Lösung durch Mischung aus Einzel-Spikes (entsprechend der zu messenden Elemente) hergestellt werden. In dieser Arbeit sollten Kohlenstoff, Schwefel und Quecksilber simultan bestimmt werden. Daher wurde eine Spike-Lösung aus an ^{13}C angereicherter Benzoesäure, an ^{34}S angereicherter Schwefelsäure und an ^{201}Hg angereicherterem Quecksilbernitrat hergestellt. Zur Stabilisierung des Quecksilbers wurden Salpetersäure und Goldchlorid zugegeben [83, 84]. Es ist zu beachten, daß die Kalibrierung des Massenflusses der angereicherten Spike-Lösung für jeden Meßtag neu durchgeführt werden muß, da die zur Beimischung der Spike-Lösung verwendete peristaltische Pumpe gewissen Schwankungen unterliegt (Dehnung der verwendeten Pumpschläuche). Eine Verbesserung würde die Verwendung einer HPLC-Pumpe darstellen, jedoch liegen die Kosten für eine solche Pumpe um den Faktor 4 höher.

3.6.2. Funktionsweise der online MSIVA am Beispiel von Schwefel-Standardverbindungen

Ein Mischstandard, bestehend aus Polystyrolsulfonat und Methionin, wurde über die SEC-Säule getrennt und mit Hilfe des ICP-MS ein Schwefel-Isotopenverhältnis-Chromatogramm ($^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$) aufgenommen (siehe Abb. 45). Durch die kontinuierliche Mischung mit der angereicherten Spike-Lösung mißt man, wenn keine schwefelhaltige Fraktion eluiert, ein Isotopenverhältnis von ca. 3. Wenn nun eine solche Fraktion von der SEC-Säule eluiert, wird das gemessene Isotopenverhältnis in Richtung des natürlichen $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ -Isotopenverhältnisses (0.044) verschoben. Wie in Kap. 2.1.5 beschrieben, errechnet sich nach Gl. (16) aus dem Isotopenverhältnis der Massenfluß der chromatographischen Fraktionen (siehe Abb. 46). Durch Integration der Peaks erhält man den Gehalt der injizierten Standards. Für Methionin stimmt der gemessene Gehalt von 317 ng gut mit dem aus der Einwaage errechneten Wert von 322 ng überein. Geht man bei Polystyrolsulfonat von einer stöchiometrischen Verteilung des Schwefels aus, entspricht der gemessene Wert von 1.8 µg gut dem zu erwartenden von 1.6 µg.

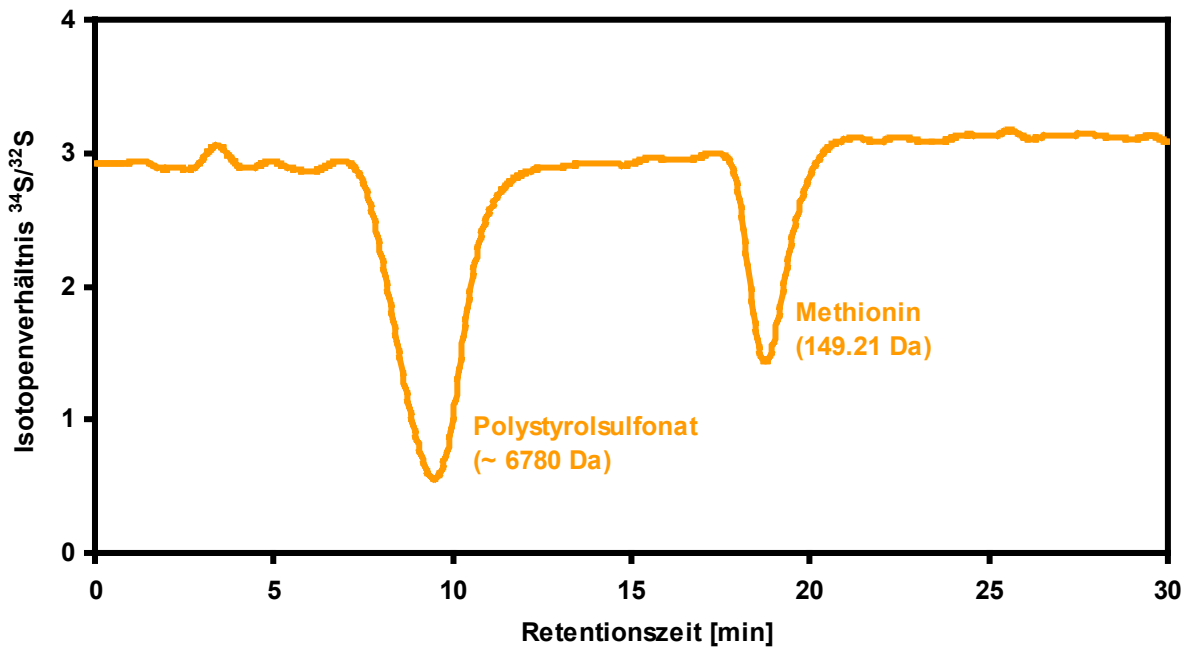


Abb. 45: Schwefel-Isotopenverhältnis-Chromatogramm eines Mischstandards aus Polystyrolsulfonat und Methionin nach SEC-Trennung

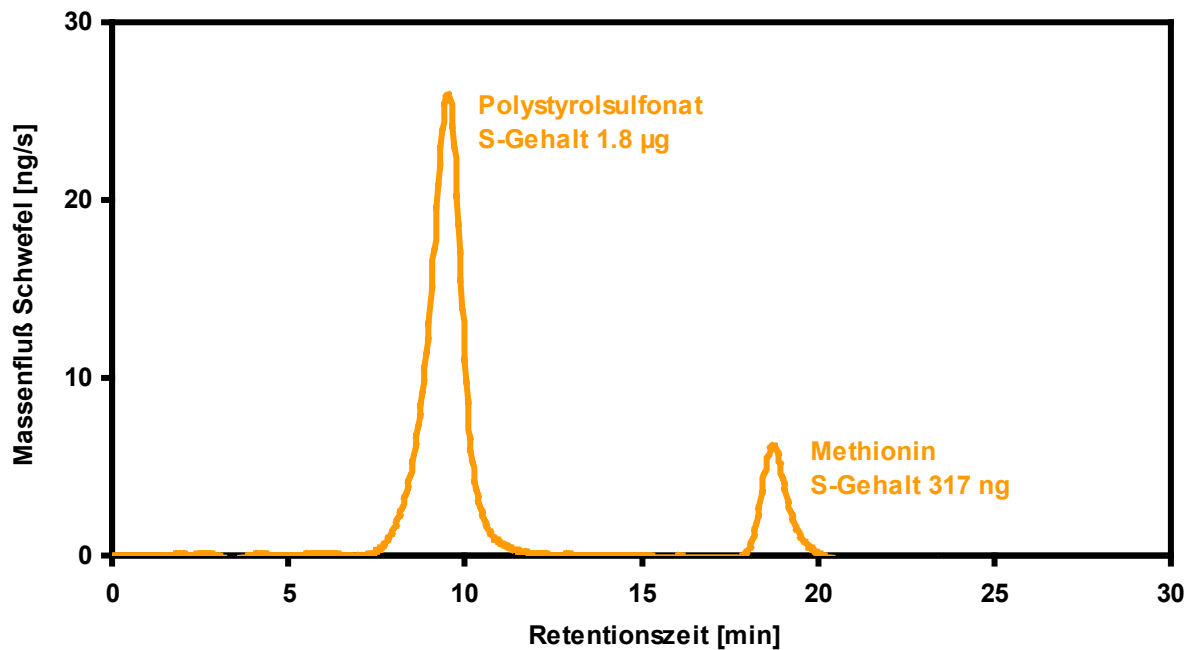


Abb. 46: Schwefel-Massenfluß-Chromatogramm eines Mischstandards aus Polystyrolsulfonat und Methionin nach SEC-Trennung

3.6.3. Anwendung der online MSIVA auf natürliche Wasserproben

Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Messungen von natürlichen Wasserproben brauchen keine Modifikationen der bisher beschriebenen HPLC/ICP-MS-Kopplung durchgeführt werden. Alle Huminstofftrennungen wurden mit Milli-Q-Wasser als Eluent durchgeführt, da sich die Molekülgröße der Huminstoffe bei Variation der Ionenstärke oder des pH-Wertes ändert. Die Verwendung von Milli-Q-Wasser an Stelle einer Pufferlösung hatte zudem einen positiven Einfluß auf den Signal-Untergrund von Kohlenstoff und Schwefel, so daß dadurch eine vergleichsweise niedrige Nachweisgrenze (siehe Kap. 3.6.4) erreicht werden konnte.

Werden HS mit SEC getrennt und der Massenfluß mit MSIVA ermittelt, ist bei der Berechnung der Gehalte darauf zu achten, inwieweit die HS am Säulenmaterial adsorbiert werden. Dieses grundsätzliche, in der HS-Forschung bekannte, Problem spiegelt sich in den Wiederfindungsraten bei chromatographischer Trennung wider. Prinzipiell geht man bei der SEC davon aus, daß die Probe keine Wechselwirkung mit dem Säulenmaterial eingeht. In der Praxis findet man aber eine Adsorption von HS auf der Säule, die stark vom Säulenmaterial und den untersuchten HS abhängt. Die verwendete Säule (TSK Gel 3000PW_{XL}, Tosohaas) zeigte bei den untersuchten HS eine durchschnittliche Wiederfindungsrate von über 83% (siehe Abb. 47).

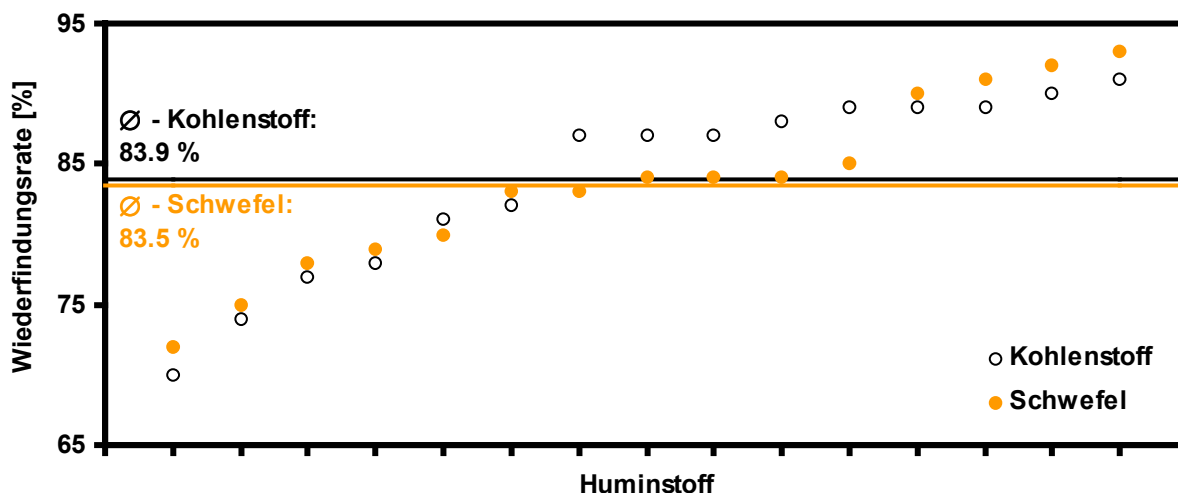


Abb. 47: Wiederfindungsraten in Prozent von Kohlenstoff und Schwefel unterschiedlicher Huminstoffe mit SEC und deren Mittelwert

Zur Bestimmung wurden 15 unterschiedliche HS-Lösungen des ROSIG-Projektes über die SEC-Säule fraktioniert. Anschließend wurde das Integral der Kohlenstoff- und Schwefel-Massenflüsse über alle Fraktionen mit dem über einen Bypass

ermittelten Gesamtgehalt verglichen. Dieser Wert liegt im Rahmen der üblichen Wiederfindung für Huminstoff-Trennungen mit SEC-Säulen, die für eine TSK-Gel-Säule mit Werten zwischen 73 % und 96 % angegeben wurde [21]. Eine Reinigung der Säule erfolgt durch mehrmalige Injektion von 0.01 M KOH über die Proben-schleife und anschließendem Spülen (1 h) mit Milli-Q-Wasser.

Die Untersuchung natürlicher Proben mit hohem Sulfatgehalt, stellte sich als schwierig heraus, da bei den beschriebenen Bedingungen Sulfat zusammen mit den zu untersuchenden HS eluiert. Abb. 48 zeigt das Chromatogramm der Huminsäure SV1 HA im Vergleich zu einer separat injizierten Sulfat-Standard-Lösung. Das Sulfat eluiert bei 10 min und liegt damit im Bereich der Retentionszeiten der HS. Um zu untersuchen, ob es sich bei den Schwefel-Fractionen der Probe um Sulfat handeln kann, wurde in einer weiteren Untersuchung zur Probe Sulfat hinzugeben. Die Chromatogramme der Probe nach Zugabe steigender Mengen Sulfat sind in Abb. 49 dargestellt. Es muß davon ausgegangen werden, daß die erste Fraktion der Probe SV1 HA Sulfat enthält. Es wurden daher Versuche unternommen, durch Variation des Eluenten und der Trennsäulen die Abtrennung des Sulfats von den HS-Fractionen zu verbessern. Überprüft wurde hierbei die Verwendung von NaCl- und NaNO₃-Lösungen unterschiedlicher Konzentration. Es konnten zwar die charakteristischen Verschiebungen der HS im Chromatogramm aufgrund veränderter Ionenstärke beobachtet werden, jedoch wurde Sulfat in gleicher Weise beeinflusst, so daß keine Trennung von HS und Sulfat erfolgte. Weiterhin wurde eine SEC-Säule mit geringerer Porengröße (TosoHaas, TSK Gel 2500PW_{XL}) getestet sowie die Kopplung beider Säulen in Reihe, um eine möglichst hohe Trennleistung zu erreichen. Um als Ursache eine Wechselwirkung mit dem Säulenmaterial auszuschließen, wurden Trennsäulen eines anderen Herstellers (Polymer Standard Service, PSS Gel MCX) mit anderem Säulenmaterial und unterschiedlichen Porengrößen (10³ Å und 10⁶ Å) untersucht. Als eine alternative Trennmethode für HS wurde der Einsatz der RP-Chromatographie (*reversed phase*) überprüft, jedoch ist hier die Bestimmung des Schwefels in den chromatographischen Fractionen durch die Überlagerung des schwefelhaltigen Ionenpaar-Reagenzes unmöglich. Bei keinem der durchgeführten Versuche konnte eine Trennung erreicht werden, so daß bei der Quantifizierung von Schwefel in chromatographischen Fractionen der Sulfatgehalt berücksichtigt werden muß. Dies gilt besonders für Originalproben, während bei den isolierten Huminsäure- und Fulvinsäure-Proben davon auszugehen ist, daß Sulfat während der Aufarbeitung weitgehend entfernt wurde.

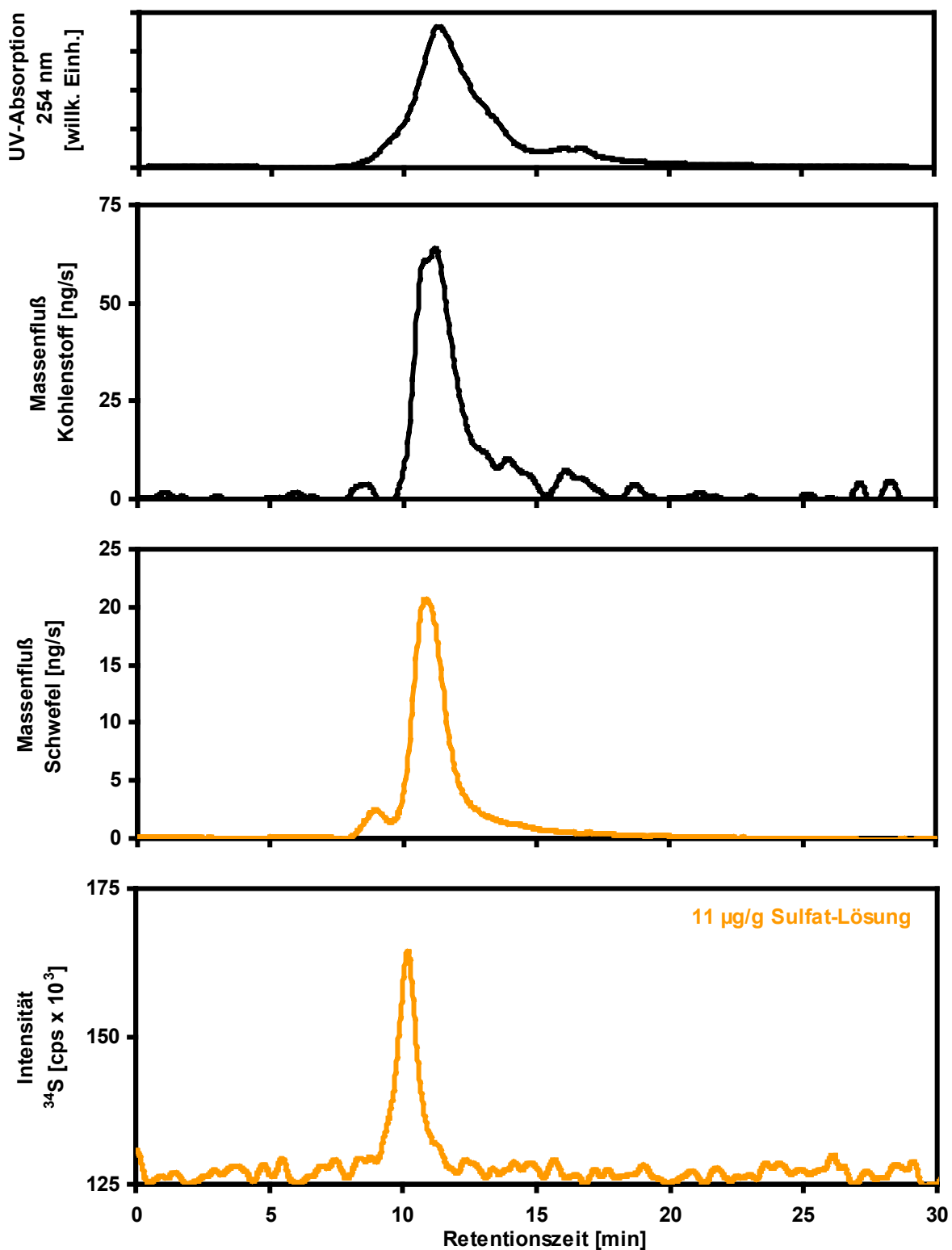


Abb. 48: UV-Absorption, Kohlenstoff- und Schwefel-Massenfluß-Chromatogramme der Huminsäure SV1 HA des Braunkohlepyrolyseabwassers sowie ³⁴S-Intensitäts-Chromatogramm eines Sulfat-Standards nach SEC-Trennung

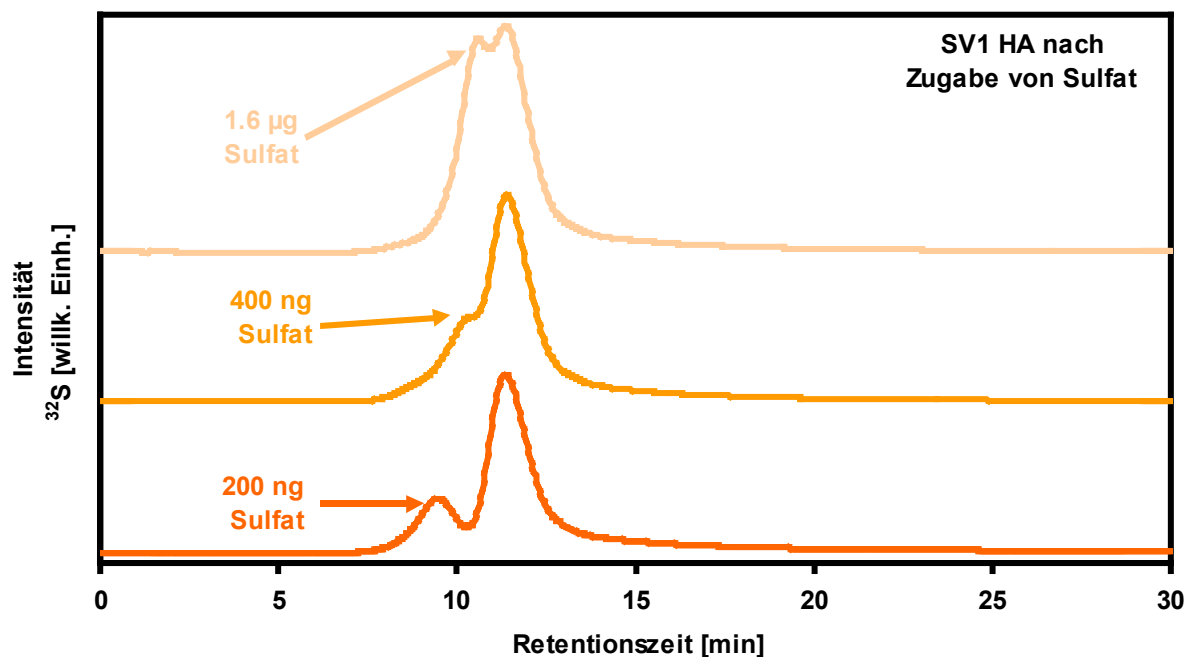


Abb. 49: Schwefel-Intensitäts-Chromatogramm der Huminsäure SV1 HA des Braunkohlepyrolyseabwassers nach Zugabe von Sulfat nach SEC-Trennung

3.6.4. Nachweisgrenzen der online MSIVA

Die Nachweisgrenzen der online MSIVA sind durch die Präzision der Isotopenverhältnismessung limitiert. Der aus dem Isotopenverhältnis berechnete Massenfluß ergibt nach Integration des Peaks eine Gesamtmenge. Wird diese durch das Probenvolumen dividiert, erhält man den Gehalt. Da bei der HPLC/ICP-MS-Kopplung das Probenvolumen je nach Anwendung variiert werden kann und die Peakbreite abhängig von der Problemstellung ist, wird die Nachweisgrenze als dreifache Standardabweichung für 60 s des Untergrund-Massenflusses angegeben (siehe Tab. 34). Zur besseren Vergleichbarkeit wurde weiterhin die Nachweisgrenze bezogen auf eine Peakhalbwertsbreite von 60 s und einem Probenvolumen von 100 mL angegeben.

Tab. 34: Nachweisgrenzen für C, S, und Hg mit online MSIVA

Element	Nachweisgrenze [pg/s]	Nachweisgrenze [ng/mL]
C	3000	1800
S	100	60
Hg	2	1.2

3.7. Quantifizierung der Kohlenstoff-, Schwefel- und Quecksilbergehalte in Huminstoffen mit MSIVA

3.7.1. Gesamtgehaltsbestimmung von C, S und Hg in Huminstoffen

Zur Gesamtgehaltsbestimmung von Kohlenstoff, Schwefel und Quecksilber wurde das in Kap. 3.6.1 beschriebene System verwendet. Jedoch wurde die chromatographische Trennsäule über einen Bypass umgangen, da Gesamtgehalte bestimmt werden sollten. Das somit erhaltene Fließinjektionsanalysensystem (FIAS) wurde so betrieben, daß über eine 50 µL-Probenschleife mehrmals innerhalb von 30 min die Probe injiziert werden konnte. Auf diese Weise war eine Anpassung der für die SEC/ICP-MS-Kopplung entwickelten Meßprogramme und Optimierungsparameter nicht notwendig. Nach Auswertung der Meßsignale und Berechnung des Massenflusses wurden die Peaks integriert und ein Mittelwert gebildet. Gefriergetrocknete Proben wurden vor der Messung mit Milli-Q-Wasser versetzt und mindestens 48 h unter Schütteln gelöst. Die Gehaltsangaben der folgenden Tabellen beziehen sich für flüssige Proben auf ein Gramm Lösung und für gefriergetrocknete auf ein Gramm der eingewogenen Substanz.

Tab. 35: Kohlenstoff- und Schwefel-Gehalte (n=3) in gefriergetrockneten Fulvin- und Huminsäuren der Modellsubstanzen des ROSIG-Projektes bezogen auf 1 g Trockensubstanz

Probe	C-Gehalt [mg/g]	S-Gehalt [mg/g]
HS06	397 ± 2	59.7 ± 0.7
HS17	343 ± 3	68 ± 3
HS20	563 ± 11	23.5 ± 0.3
HS108	610 ± 10	6.48 ± 0.08
HS110	621 ± 17	16.9 ± 0.4
HS112	666 ± 26	28.5 ± 0.8
FS18	413 ± 9	113 ± 9
FS19	460 ± 12	68.1 ± 0.6
FS21	529 ± 8	20.5 ± 0.3
FS109	571 ± 12	9.64 ± 0.18
FS111	547 ± 5	18.6 ± 0.2
FS113	552 ± 33	36.9 ± 0.5

Tab. 36: Kohlenstoff-, Schwefel- und Quecksilber-Gehalte (n=6) in gefriergetrockneten Fulvin- und Huminsäuren des ROSIG-Projektes bezogen auf 1 g Trockensubstanz

Probe	C-Gehalt [mg/g]	S-Gehalt [mg/g]	Hg-Gehalt [$\mu\text{g/g}$]
SV1 HA	317 \pm 10	43.1 \pm 1.0	28.1 \pm 1.1
BS1 HA	528 \pm 19	3.33 \pm 0.13	< 1.5 ^{*)}
FG1 FA	566 \pm 34	8.8 \pm 0.3	< 4.0 ^{*)}
HO10 FA	522 \pm 14	5.62 \pm 0.14	3.4 \pm 0.6
HO10 HA _{Nov}	531 \pm 9	6.03 \pm 0.02	17.8 \pm 1.4
HO10 HA _{Okt}	568 \pm 20	6.64 \pm 0.15	7.8 \pm 0.7
HO12 K	486 \pm 8	10.9 \pm 0.2	< 1.0 ^{*)}
HO13 FA	563 \pm 6	6.6 \pm 0.2	< 2.1 ^{*)}
HO13 HA	321 \pm 7	4.14 \pm 0.09	7.8 \pm 0.6
ABV3 FA	606 \pm 10	23.8 \pm 1.0	< 1.6 ^{*)}
ABV3 K	705 \pm 10	60.5 \pm 1.9	< 1.5 ^{*)}

^{*)} Gehalte konnten nicht bestimmt werden, da der Massenfluß der injizierten Huminstofflösungen unter 2 pg/s lag. Für die Angabe der entsprechenden Nachweisgrenzen wurde eine Peakbreite von 60 s und das Probenvolumen von 50 μL eingesetzt und anschließend auf 1 g Trockensubstanz bezogen.

Tab. 37: Kohlenstoff-, Schwefel- und Quecksilber-Gehalte (n=6) in Fulvinsäuren (Flüssig-Proben) des ROSIG-Projektes bezogen auf 1 mL Lösung

Probe	C-Gehalt [$\mu\text{g/mL}$]	S-Gehalt [$\mu\text{g/mL}$]	Hg-Gehalt [ng/mL]
SV1 FA _{fl}	974 \pm 26	152 \pm 8	28 \pm 4
BS1 FA _{fl}	1220 \pm 41	7.7 \pm 0.3	33 \pm 5
HO10 FA _{fl}	976 \pm 11	16.3 \pm 0.3	180 \pm 3
HO13 FA _{fl}	734 \pm 5	12.6 \pm 0.3	553 \pm 10
HO14 FA _{fl}	35 \pm 3	1 \pm 0.05	49 \pm 7
HO16 FA _{fl}	1410 \pm 33	15.4 \pm 0.2	26 \pm 2
ABV2 FA _{fl}	160 \pm 8	6.04 \pm 0.13	185 \pm 38

Tab. 38: Kohlenstoff-, Schwefel- und Quecksilber-Gehalte (n=6) in Originalwasserproben aus den Florida Everglades bezogen auf 1 mL Originalwasser

Probe	C-Gehalt [$\mu\text{g/mL}$]	S-Gehalt [$\mu\text{g/mL}$]	Hg-Gehalt [ng/mL]
WCA1	1540 \pm 72	8.0 \pm 0.2	7 \pm 2
EN1	1602 \pm 28	0.40 \pm 0.02	212 \pm 8
EN2	2565 \pm 31	155 \pm 4	208 \pm 8

Tab. 39: Kohlenstoff-, Schwefel- und Quecksilber-Gehalte (n=1) in gefriergetrockneten Fulvin- und Huminsäuren der vom USGS zur Verfügung gestellten Proben, bezogen auf 1 g Trockensubstanz

Probe	C-Gehalt [mg/g]	S-Gehalt [mg/g]	Hg-Gehalt [$\mu\text{g/g}$]
WCA2FA	537	11.3	23
WCA2HPIA	449	12.9	6
WCA2HPOA	607	10.1	14
F1FA	598	14.5	< 8.7*)
F1HA	646	18.1	43
F1HPIA	434	12.7	13
F1HPOA	609	15.4	36
SRFA	541	4.2	< 4.3*)
SRHA	666	6.5	55
ORFA	521	5.1	6
ORHA	317	4.8	68
MRFA	606	7.0	< 6.8*)
MRHA	559	12.0	42
CCFA	492	3.7	13
POFA	586	3.7	15

^{*)} Gehalte konnten nicht bestimmt werden, da der Massenfluß der injizierten Huminstofflösungen unter 2 $\mu\text{g/s}$ lag. Für die Angabe der entsprechenden Nachweisgrenzen wurde eine Peakbreite von 60 s und das Probenvolumen von 50 μL eingesetzt und anschließend auf 1 g Trockensubstanz bezogen.

3.7.2. Gehaltsbestimmung von C, S und Hg in Huminstoffen mit SEC

Nach der Bestimmung von Kohlenstoff-, Schwefel- und Quecksilber-Gesamtgehalten wurde unter Verwendung der SEC-Trennsäule (TSK Gel 3000PW_{XL}) und dem in Kap. 3.6.1 beschriebenen System der Massenfluß von Kohlenstoff, Schwefel und Quecksilber in chromatographischen Fraktionen mit online MSIVA bestimmt (siehe Abb. 50 bis Abb. 84). Hierzu wurden Lösungen aus den gefriergetrockneten Proben mit Milli-Q-Wasser hergestellt (siehe Tab. 40), während die Bestimmung der Flüssigproben ohne Verdünnung erfolgte. Das Probenvolumen betrug 100 µL, wobei alle Proben vor der Injektion mit einer 0.45 µm PVDF-Membran filtriert wurden.

Tab. 40: Einwaagen der gefriergetrockneten Proben bezogen auf 1 g der mit Milli-Q-Wasser hergestellten Huminstofflösungen

Probe	Gehalt [µg/g]	Probe	Gehalt [µg/g]
SV1 HA	1963.1	WCA2HPOA	493.1
BS1 HA	1611.8	F1FA	275.3
FG1 FA	603.3	F1HA	94.4
HO10 FA	1609.9	F1HPIA	337.0
HO10 HA _{Nov}	1602.5	F1HPOA	106.5
HO10 HA _{Okt}	1829.5	SRFA	564.4
HO12 K	2318.3	SRHA	138.5
HO13 FA	1168.5	ORFA	563.5
HO13 HA	1092.9	ORHA	477.1
HO16 G	1145.6	MRFA	424.1
ABV3 FA	1526.6	MRHA	353.2
ABV3 K	1596.5	CCFA	494.4
WCA2FA	489.1	POFA	464.6
WCA2HPIA	502.6		

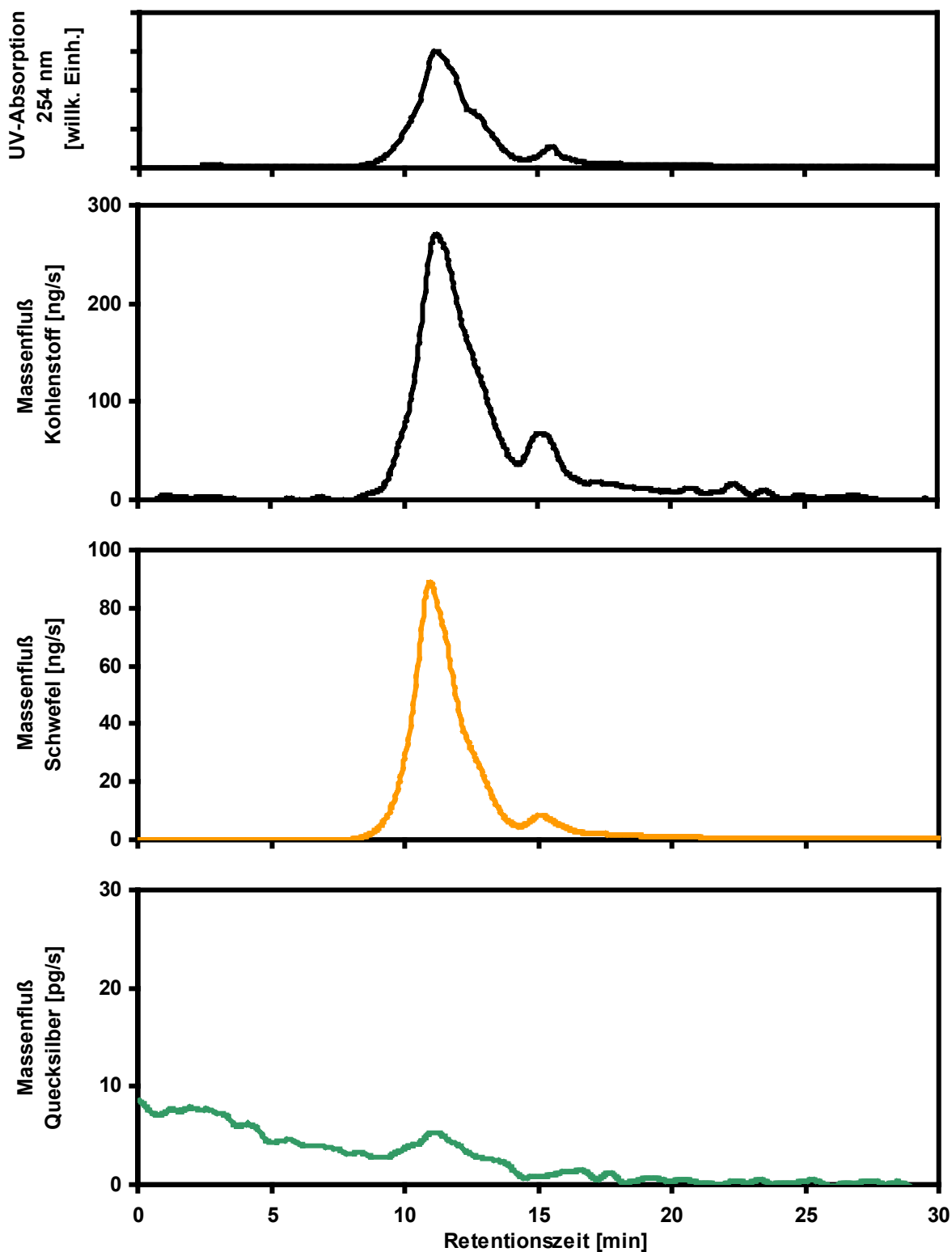


Abb. 50: UV-Absorption sowie Kohlenstoff-, Schwefel- und Quecksilber-Massenfluß-Chromatogramme der Fulvinsäuren SV1 FA_{II} des Braunkohlepyrolyseabwassers nach SEC-Trennung

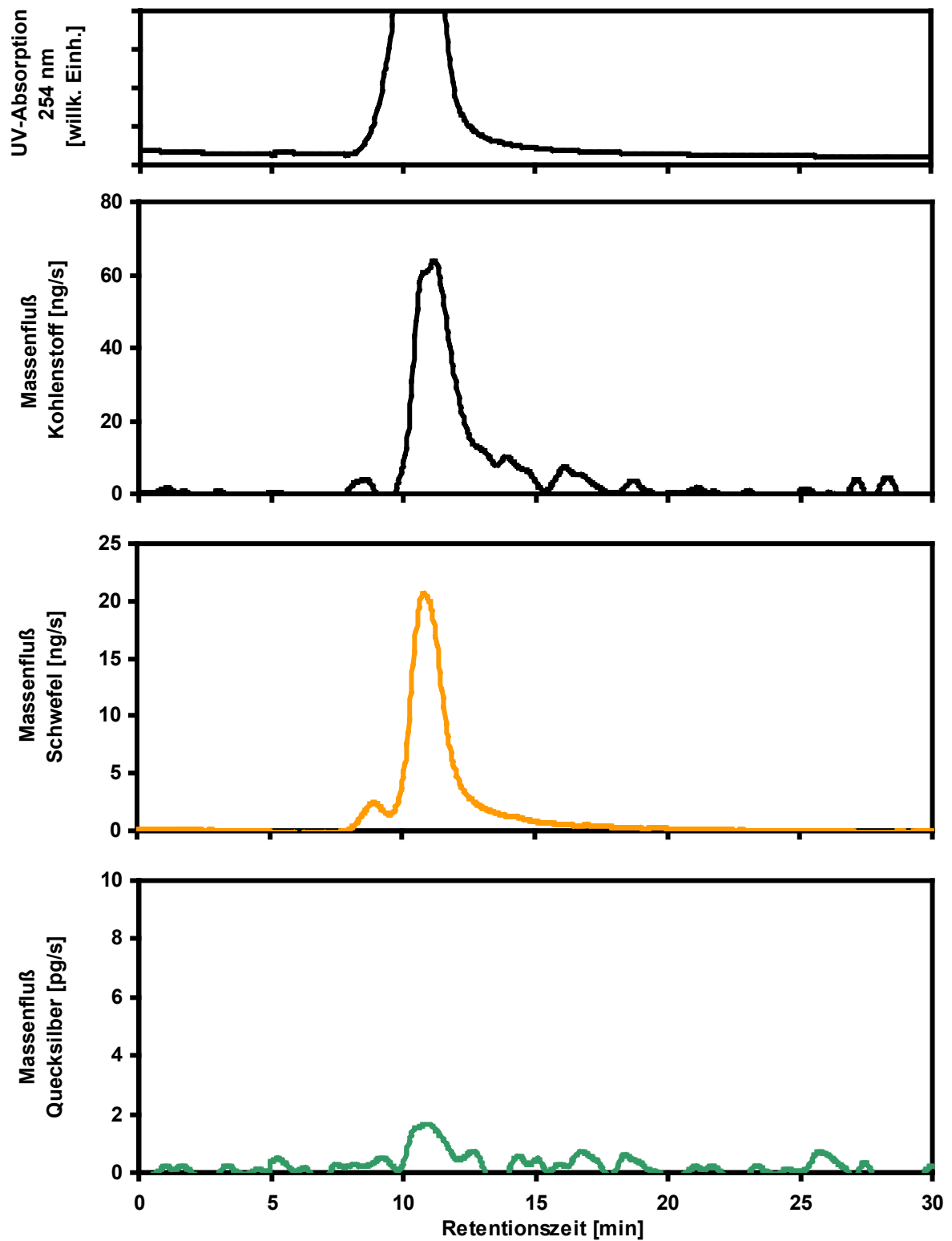


Abb. 51: UV-Absorption sowie Kohlenstoff-, Schwefel- und Quecksilber-Massenfluß-Chromatogramme der Huminsäuren SV1 HA des Braunkohlepyrolyseabwassers nach SEC-Trennung

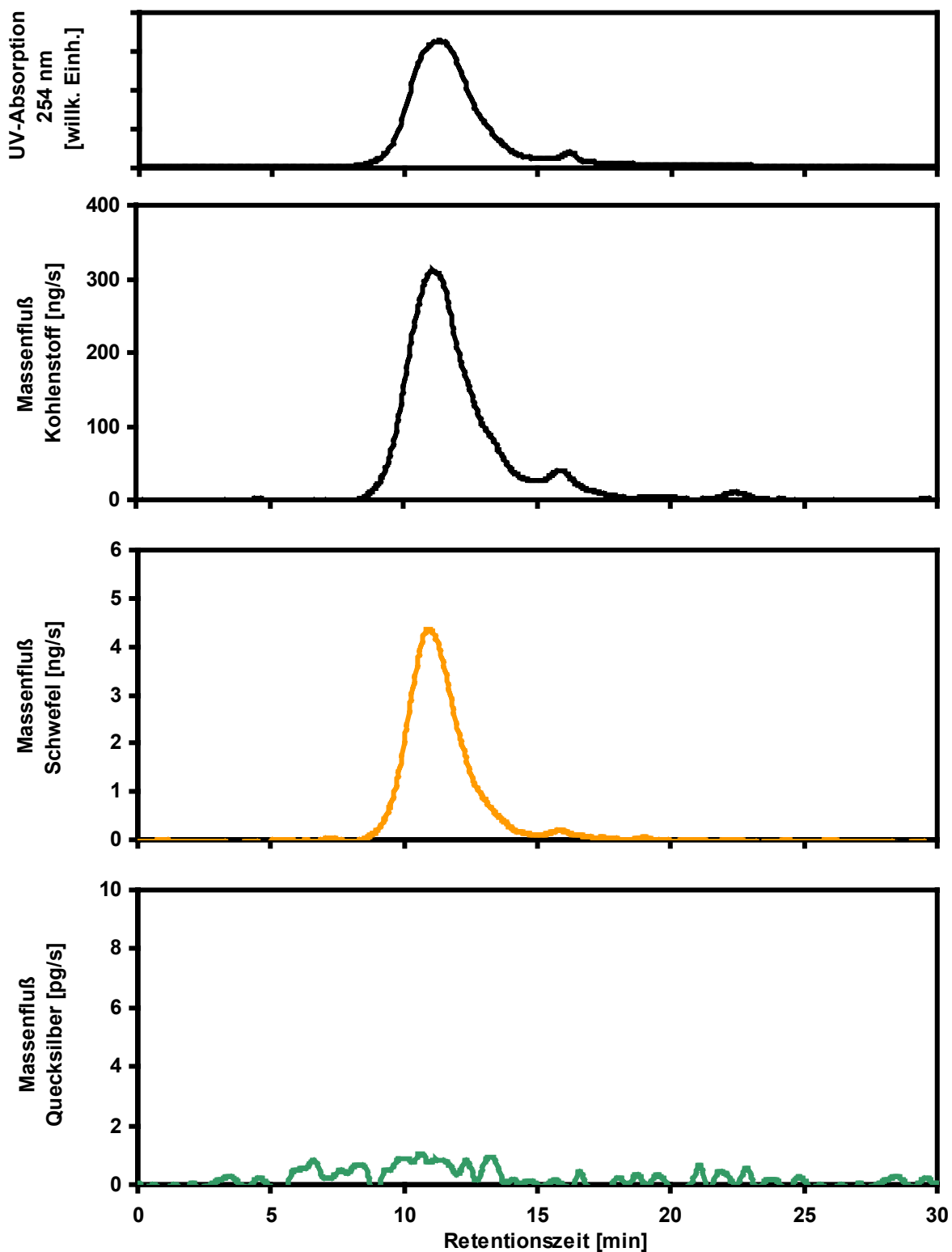


Abb. 52: UV-Absorption sowie Kohlenstoff-, Schwefel- und Quecksilber-Massenfluß-Chromatogramme der Fulvinsäuren BS1 FA_{fl} des Bodensickerwassers nach SEC-Trennung

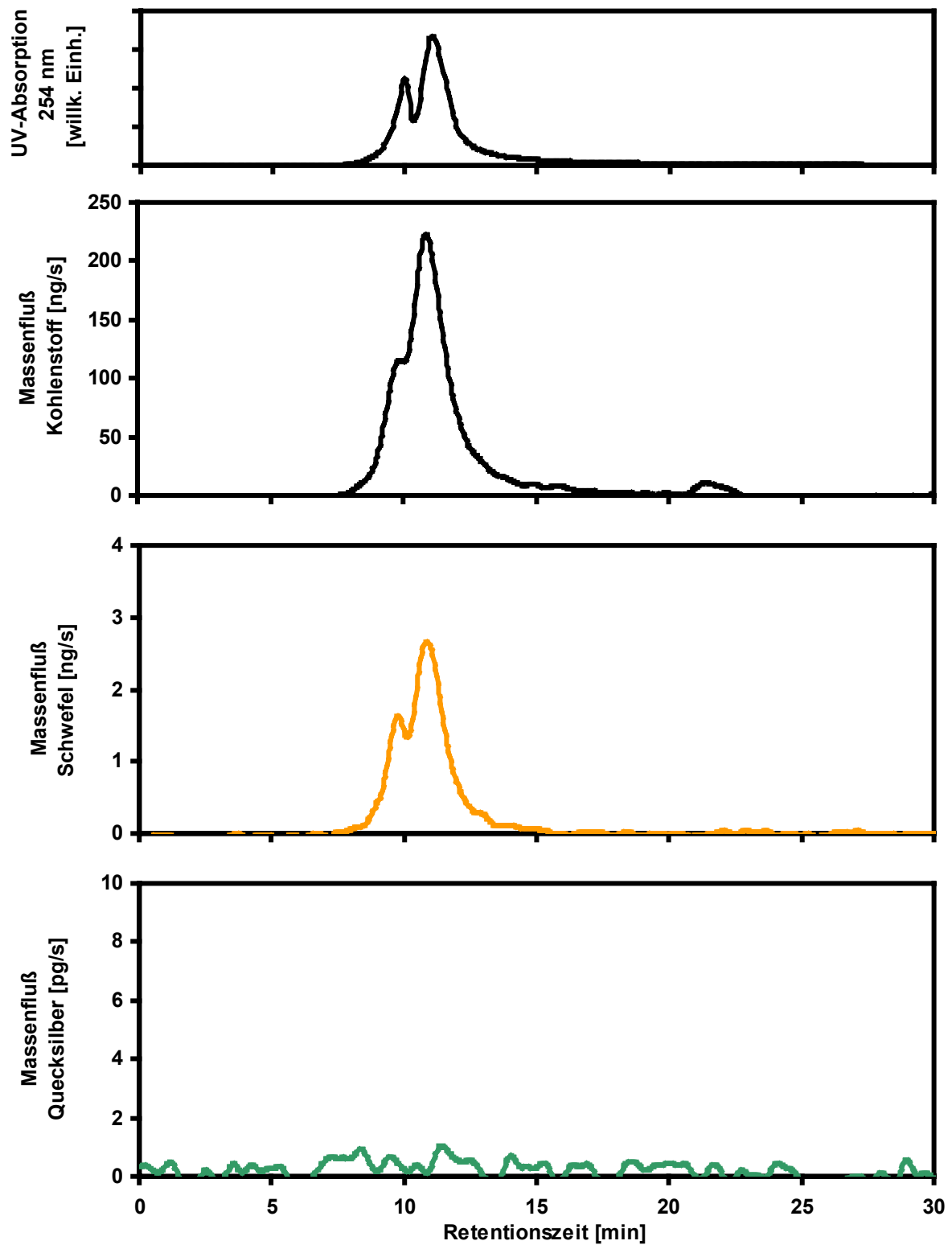


Abb. 53: UV-Absorption sowie Kohlenstoff-, Schwefel- und Quecksilber-Massenfluß-Chromatogramme der Huminsäuren BS1 HA des Bodensickerwassers nach SEC-Trennung

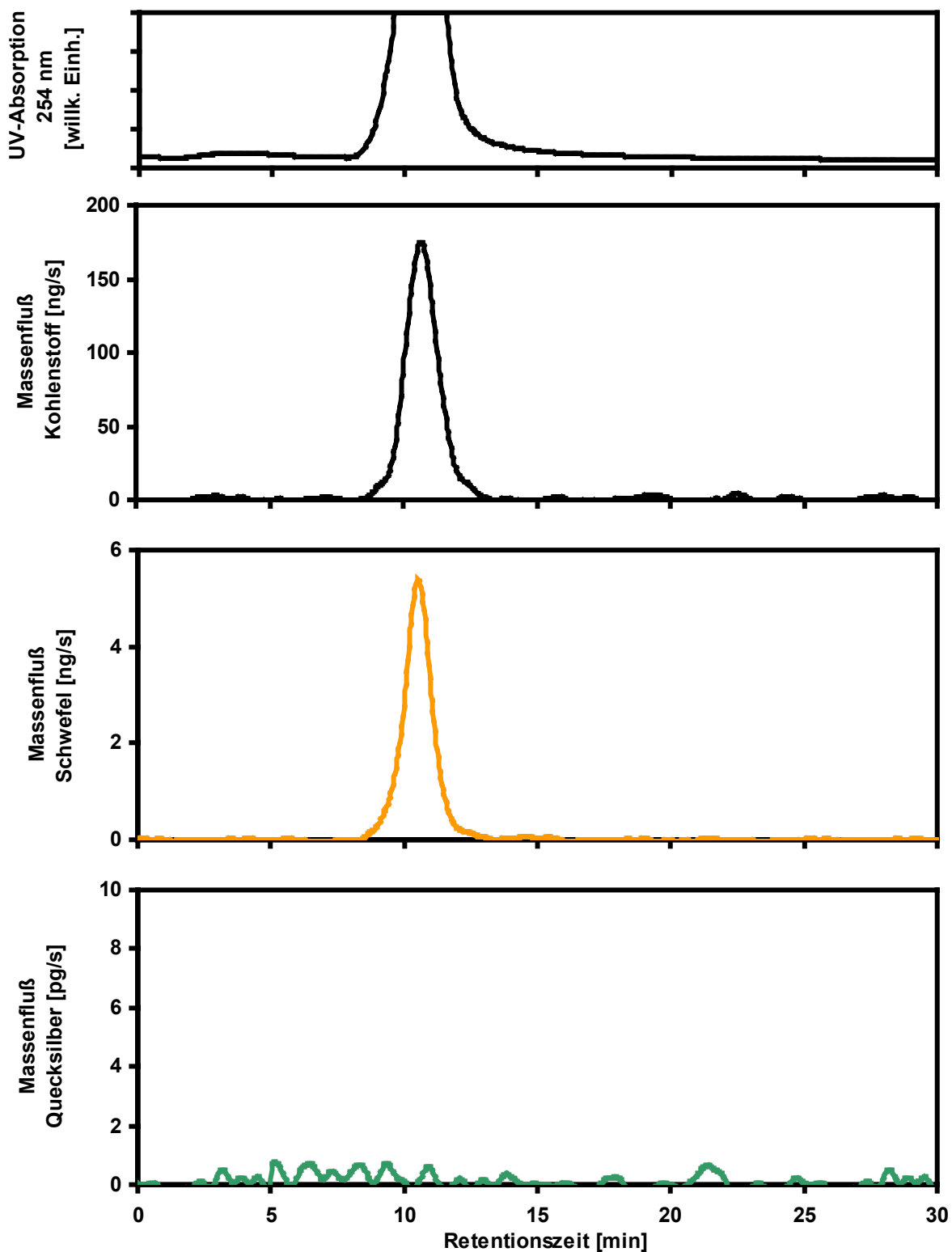


Abb. 54: UV-Absorption sowie Kohlenstoff-, Schwefel- und Quecksilber-Massenfluß-Chromatogramme der Fulvinsäuren FG1 FA des Grundwassers nach SEC-Trennung

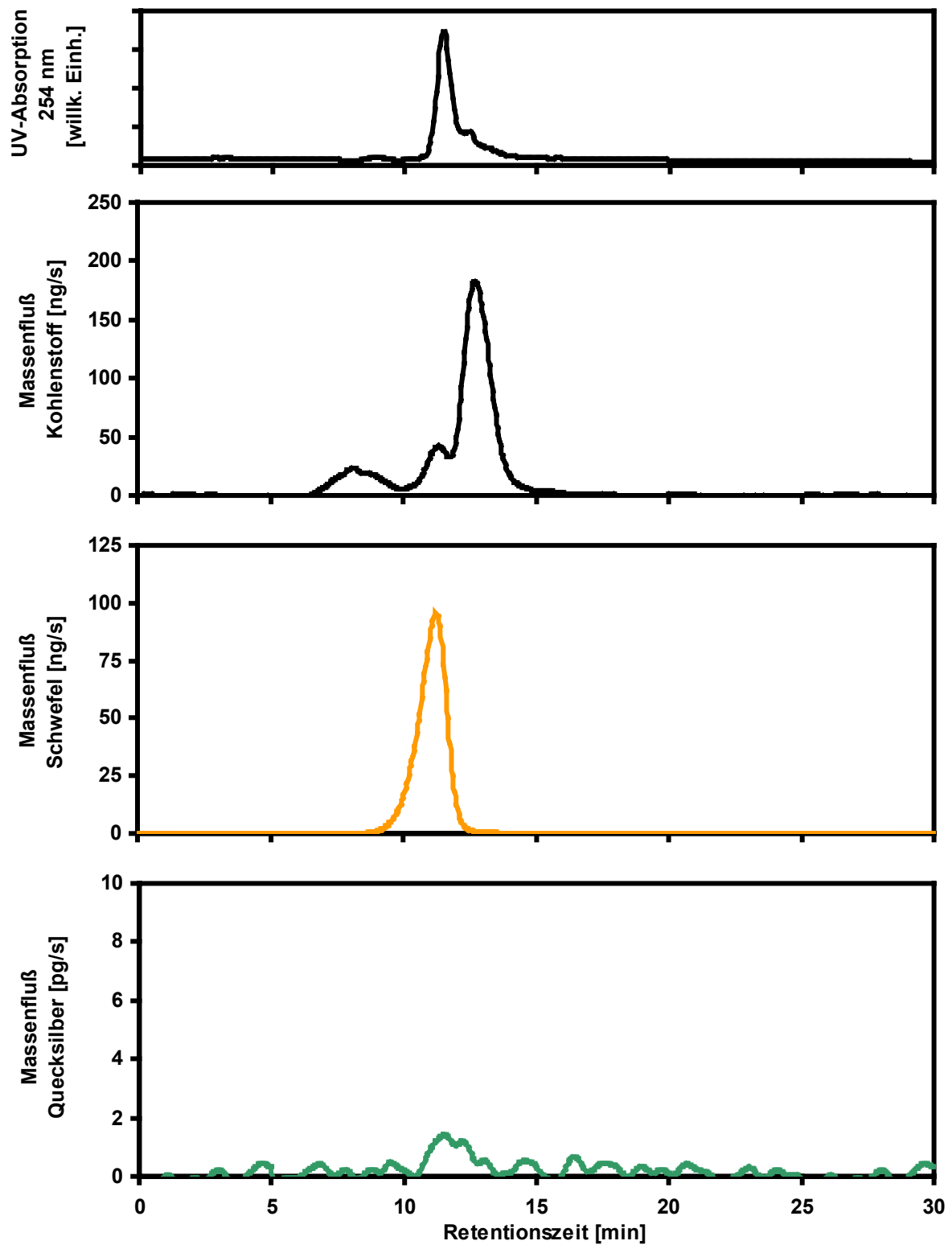


Abb. 55: UV-Absorption sowie Kohlenstoff-, Schwefel- und Quecksilber-Massenfluß-Chromatogramme des Ultrafiltrationskonzentrates ABV3 K des Abwassers nach SEC-Trennung

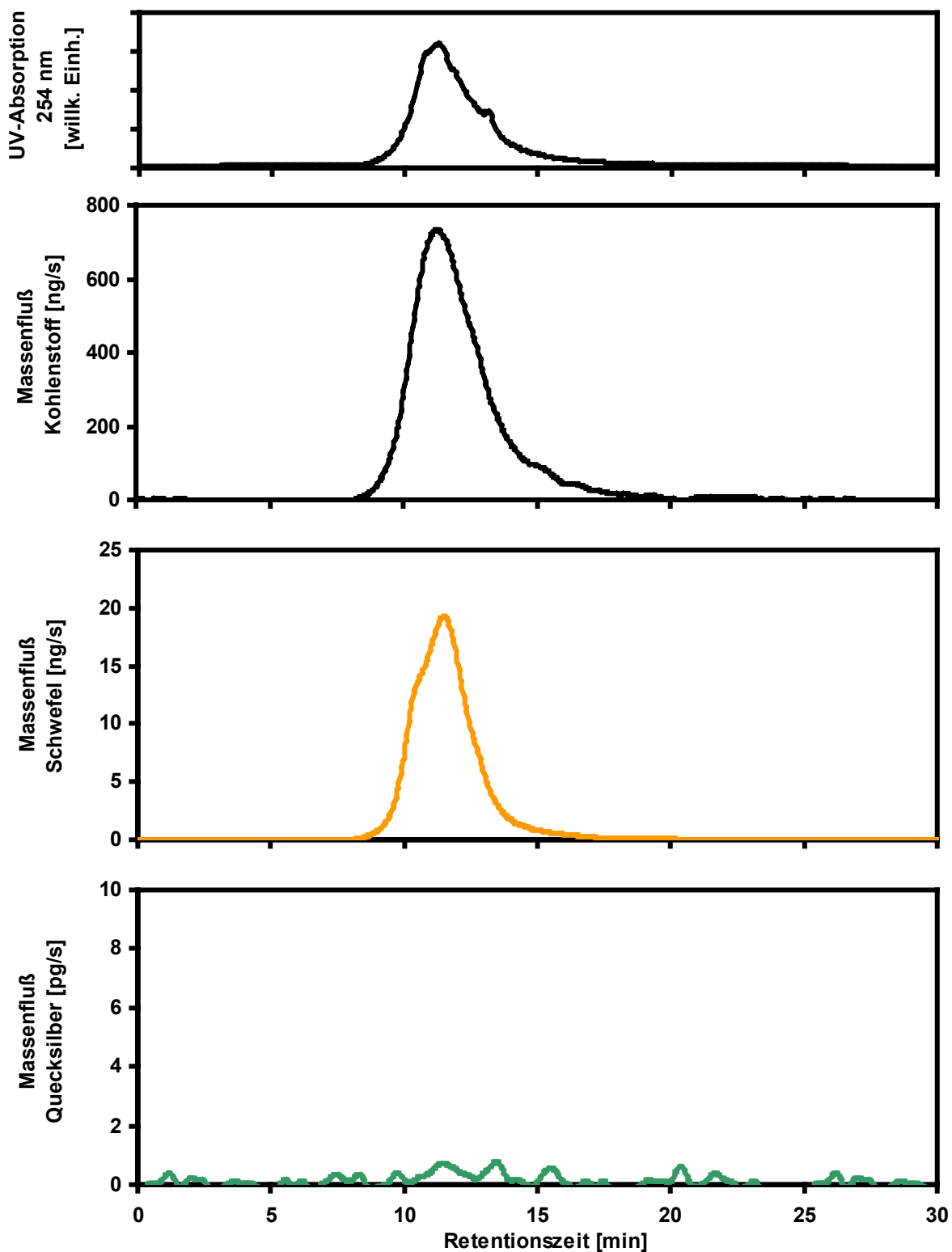


Abb. 56: UV-Absorption sowie Kohlenstoff-, Schwefel- und Quecksilber-Massenfluß-Chromatogramme der Fulvinsäuren ABV3 FA des Abwassers nach SEC-Trennung

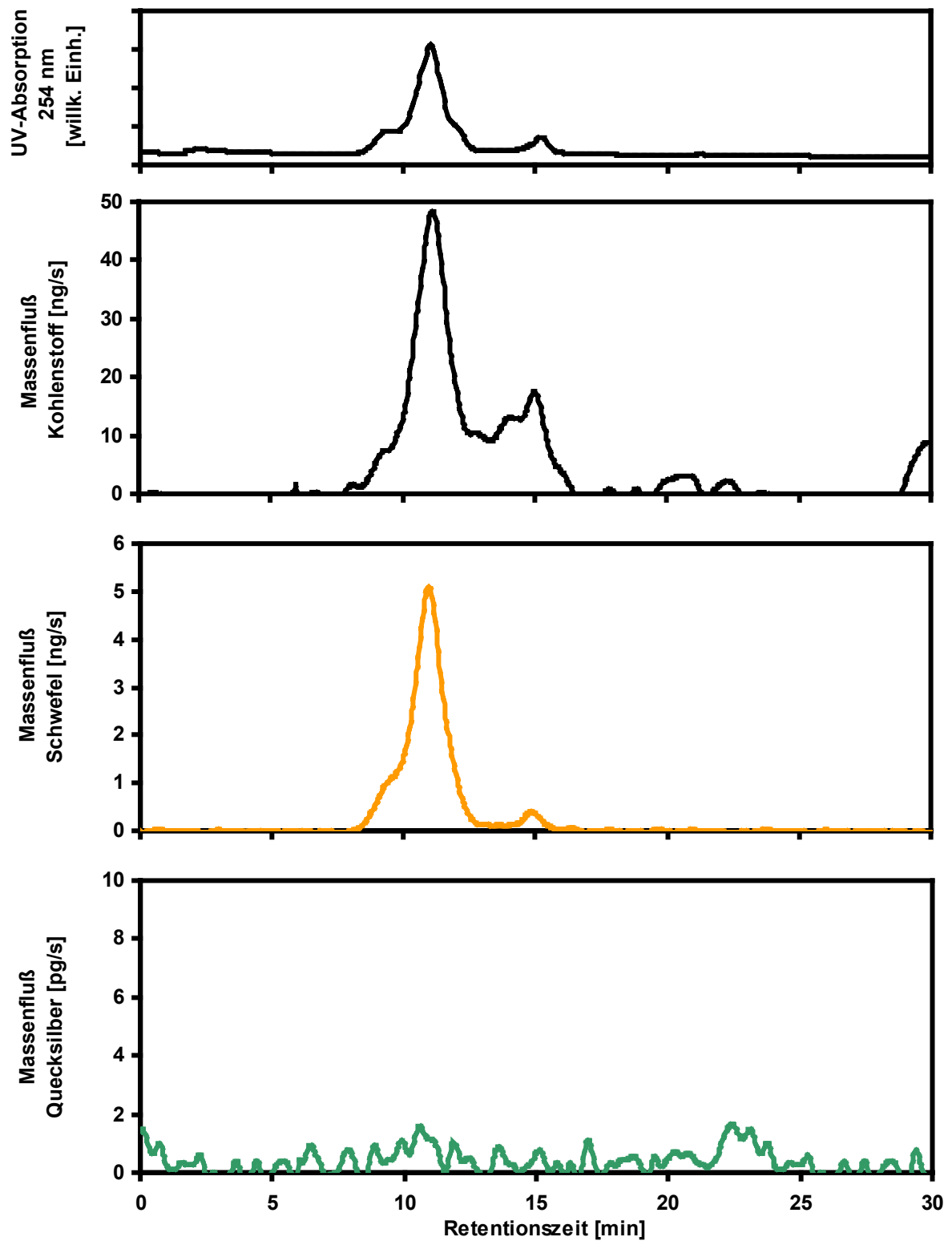


Abb. 57: UV-Absorption sowie Kohlenstoff-, Schwefel- und Quecksilber-Massenfluß-Chromatogramme der Fulvinsäuren ABV2 FA des Abwassers nach SEC-Trennung

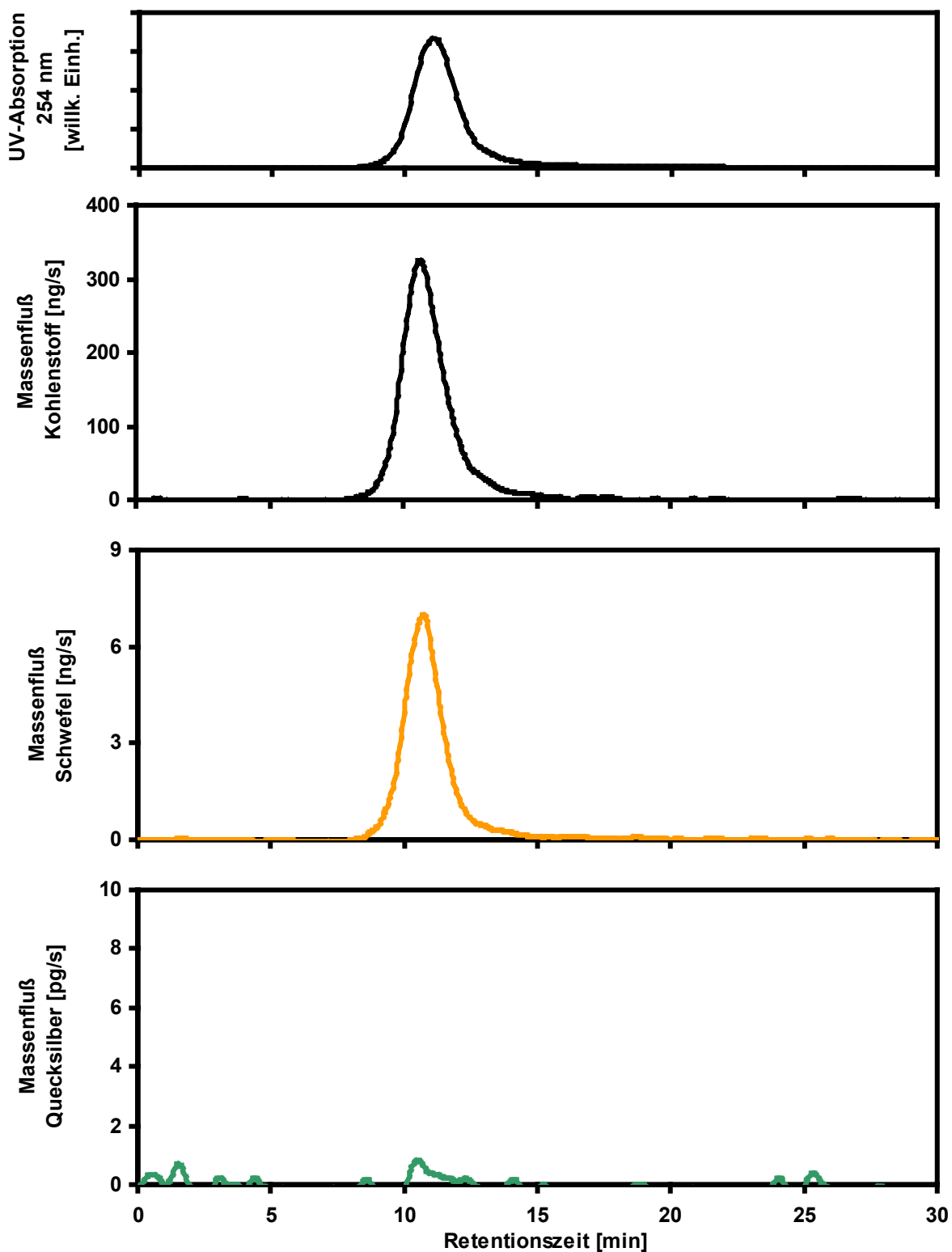


Abb. 58: UV-Absorption sowie Kohlenstoff-, Schwefel- und Quecksilber-Massenfluß-Chromatogramme der Fulvinsäuren HO10 FA des Braunwassers nach SEC-Trennung

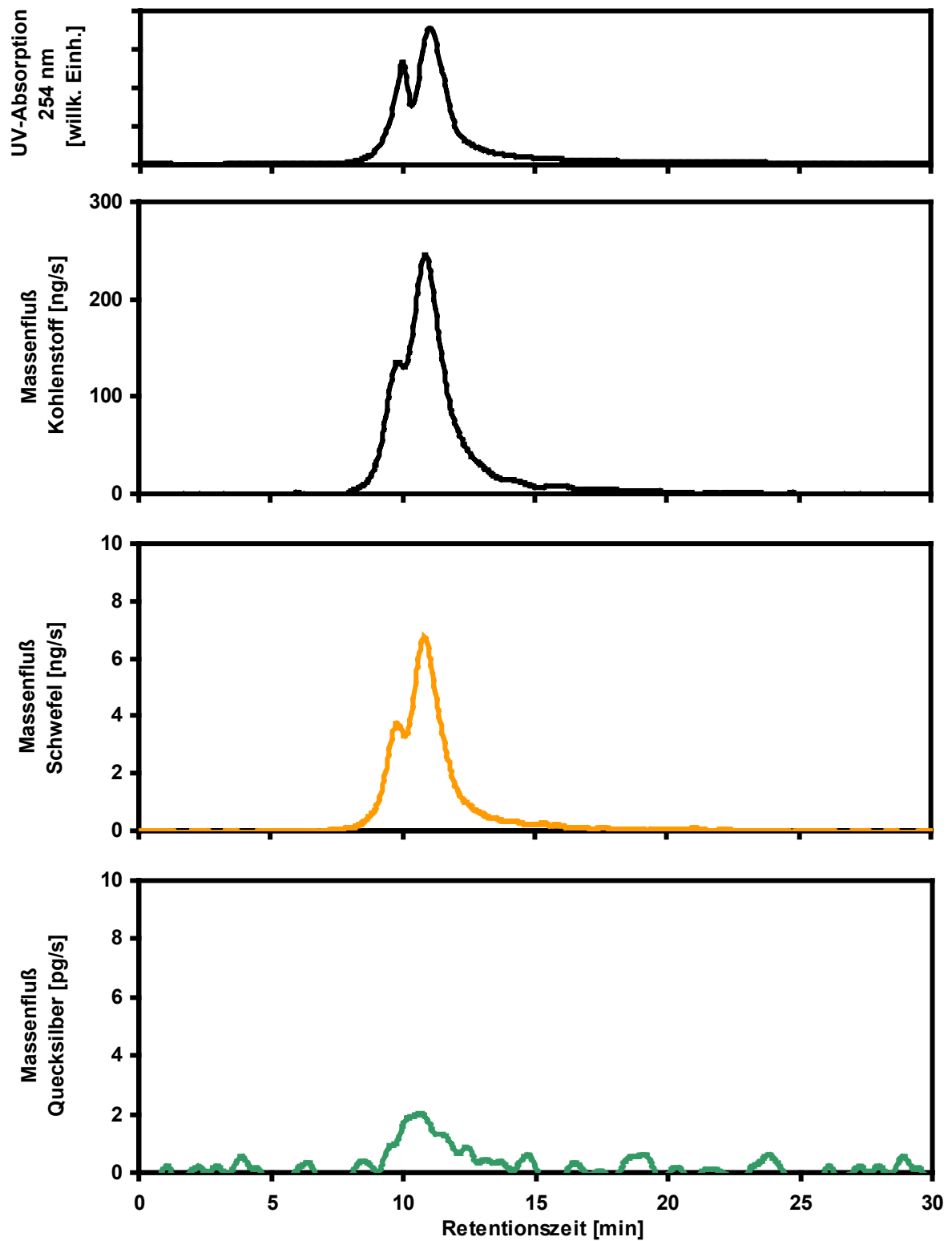


Abb. 59: UV-Absorption sowie Kohlenstoff-, Schwefel- und Quecksilber-Massenfluß-Chromatogramme der Huminsäuren HO10 HA_{Okt} des Braunwassers nach SEC-Trennung

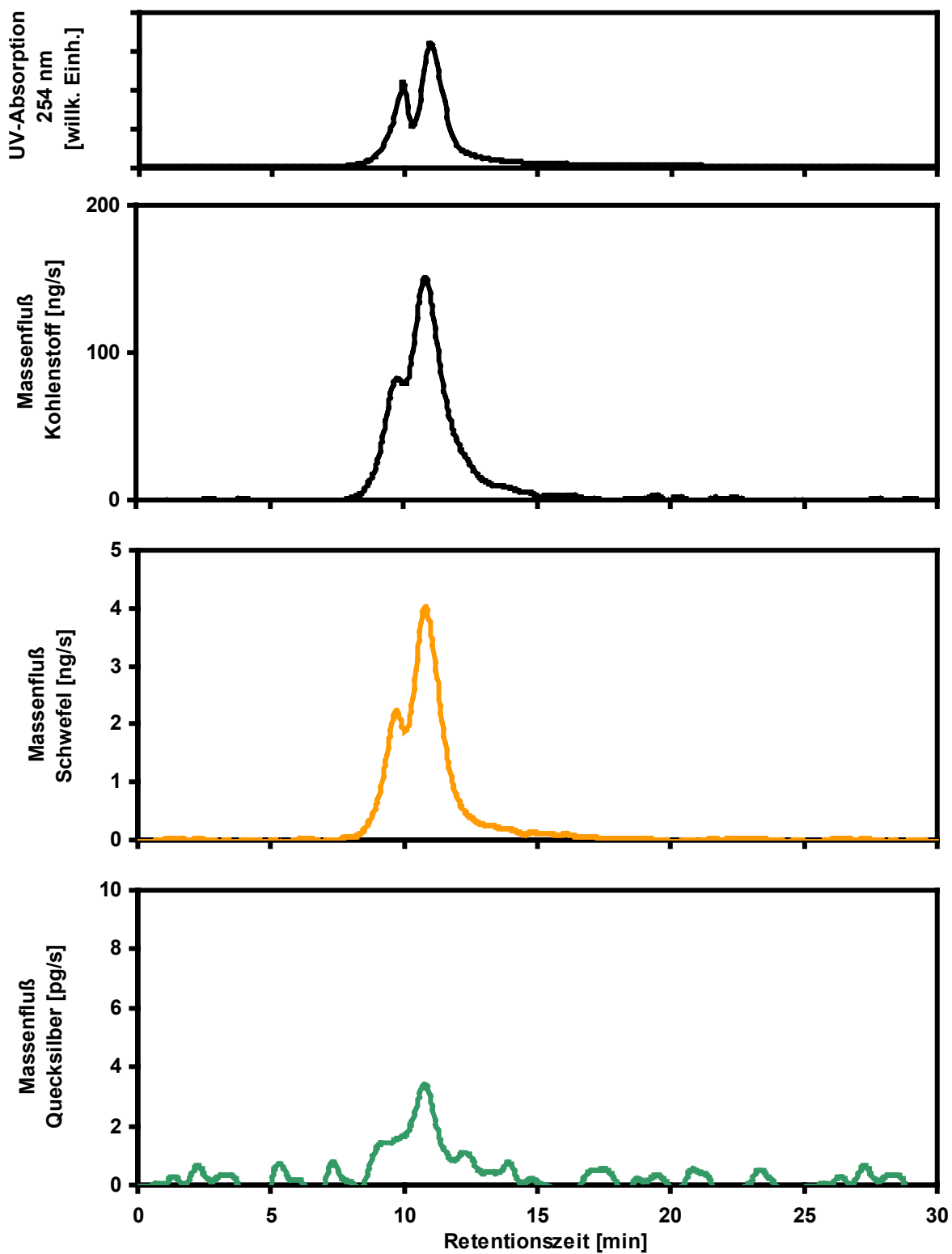


Abb. 60: UV-Absorption sowie Kohlenstoff-, Schwefel- und Quecksilber-Massenfluß-Chromatogramme der Huminsäuren HO10 HA_{Nov} des Braunwassers nach SEC-Trennung

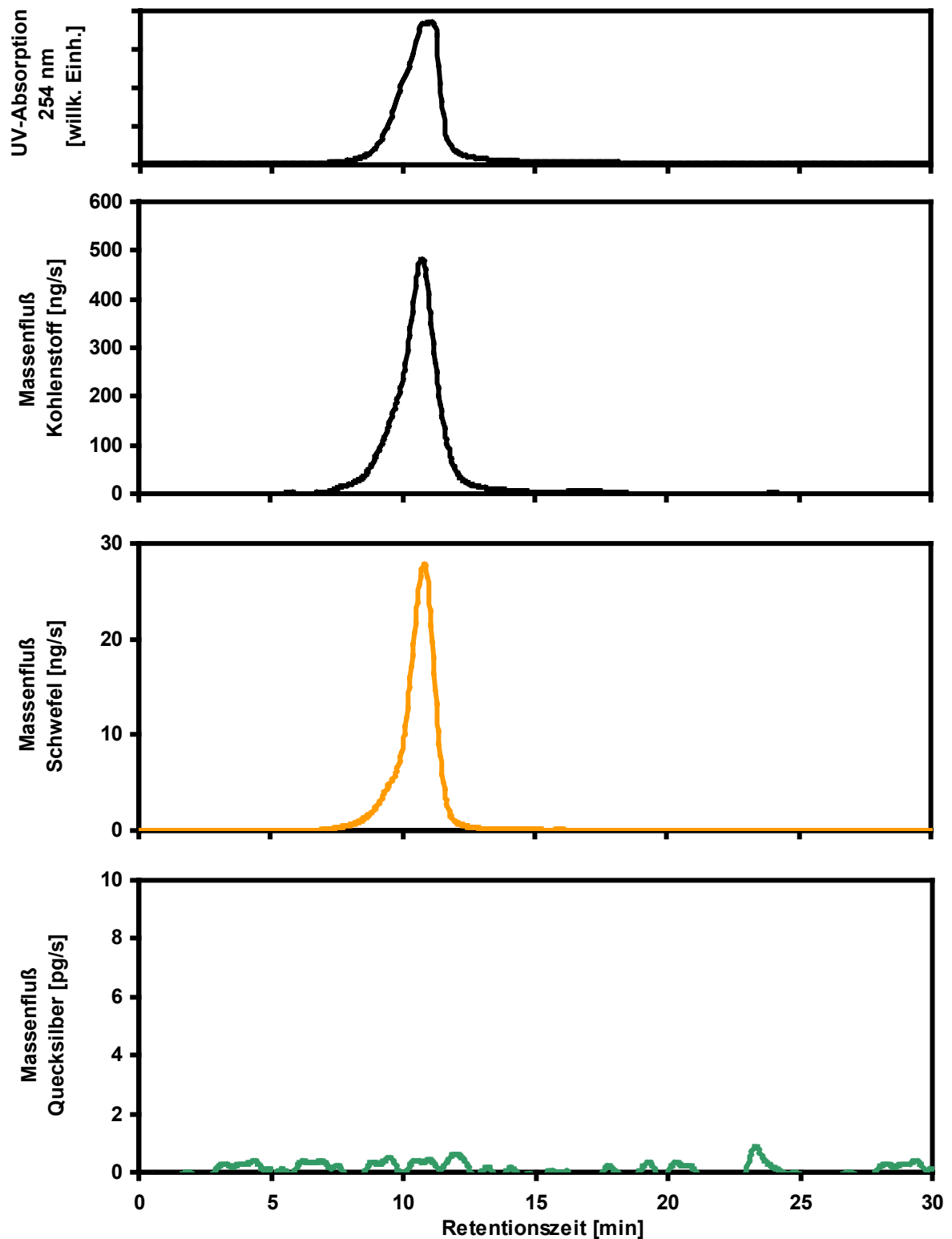


Abb. 61: UV-Absorption sowie Kohlenstoff-, Schwefel- und Quecksilber-Massenfluß-Chromatogramme des Ultrafiltrationskonzentrates HO12 K des Braunwassers nach SEC-Trennung

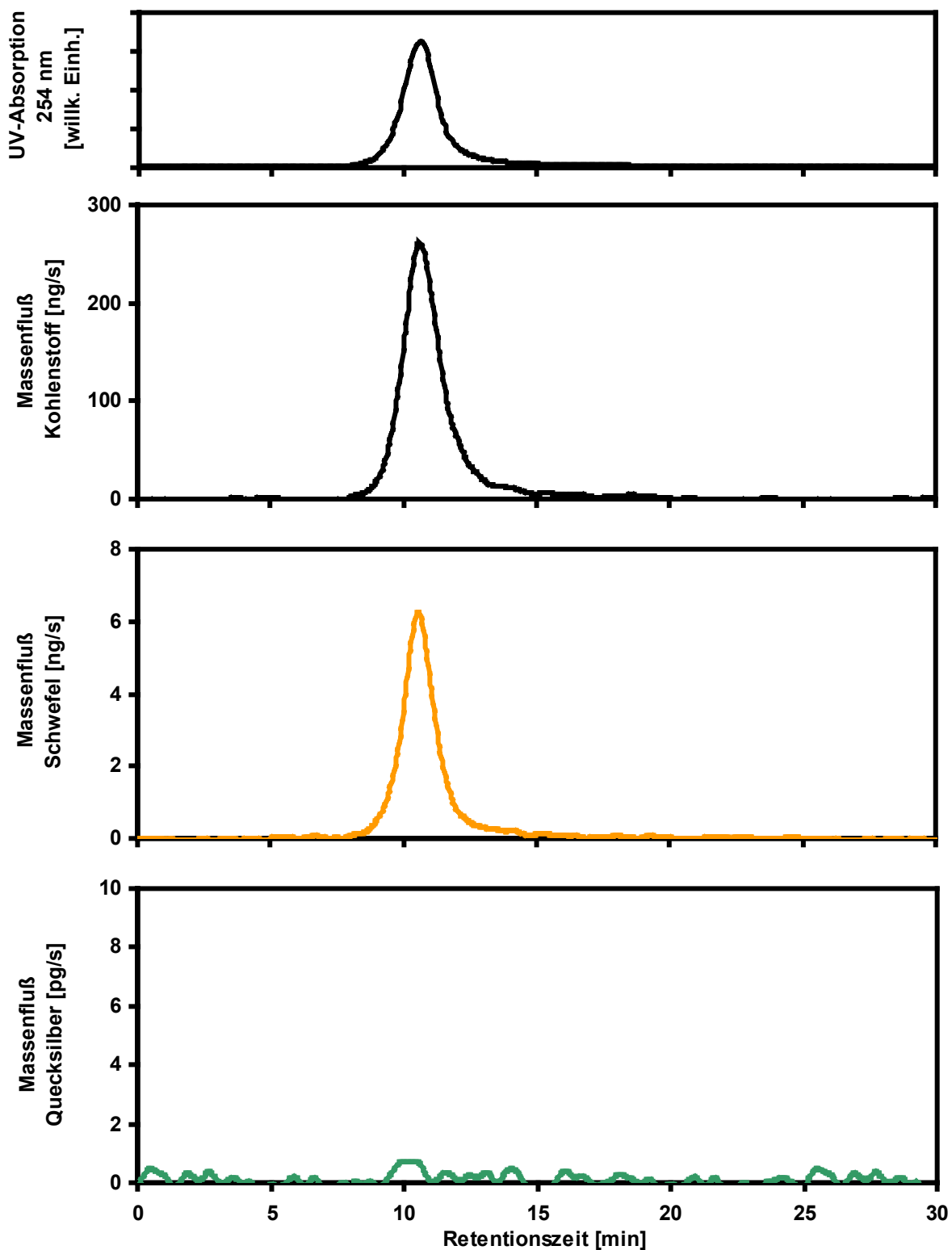


Abb. 62: UV-Absorption sowie Kohlenstoff-, Schwefel- und Quecksilber-Massenfluß-Chromatogramme der Fulvinsäuren HO13 FA des Braunwassers nach SEC-Trennung

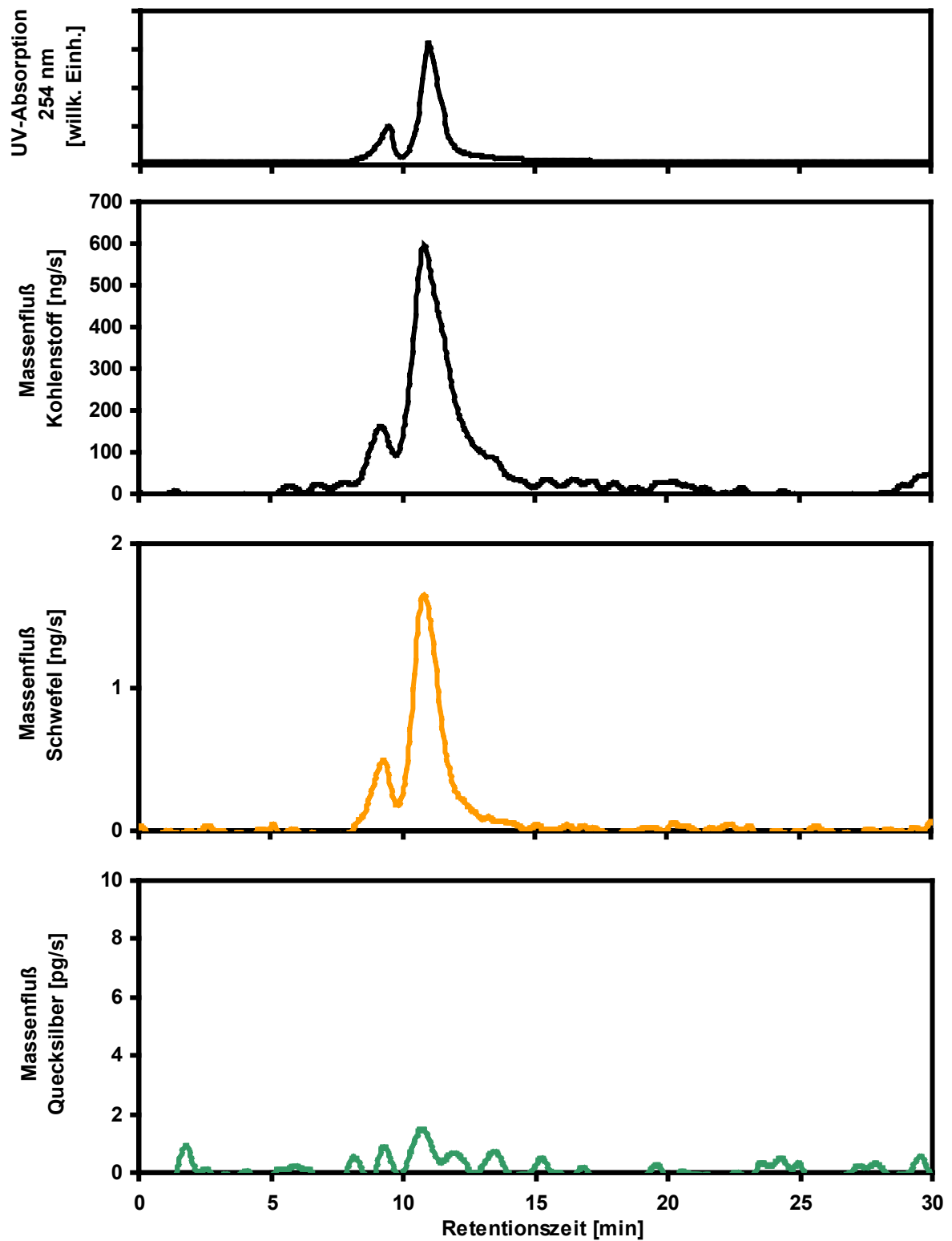


Abb. 63: UV-Absorption sowie Kohlenstoff-, Schwefel- und Quecksilber-Massenfluß-Chromatogramme der Huminsäuren HO13 HA des Braunwassers nach SEC-Trennung

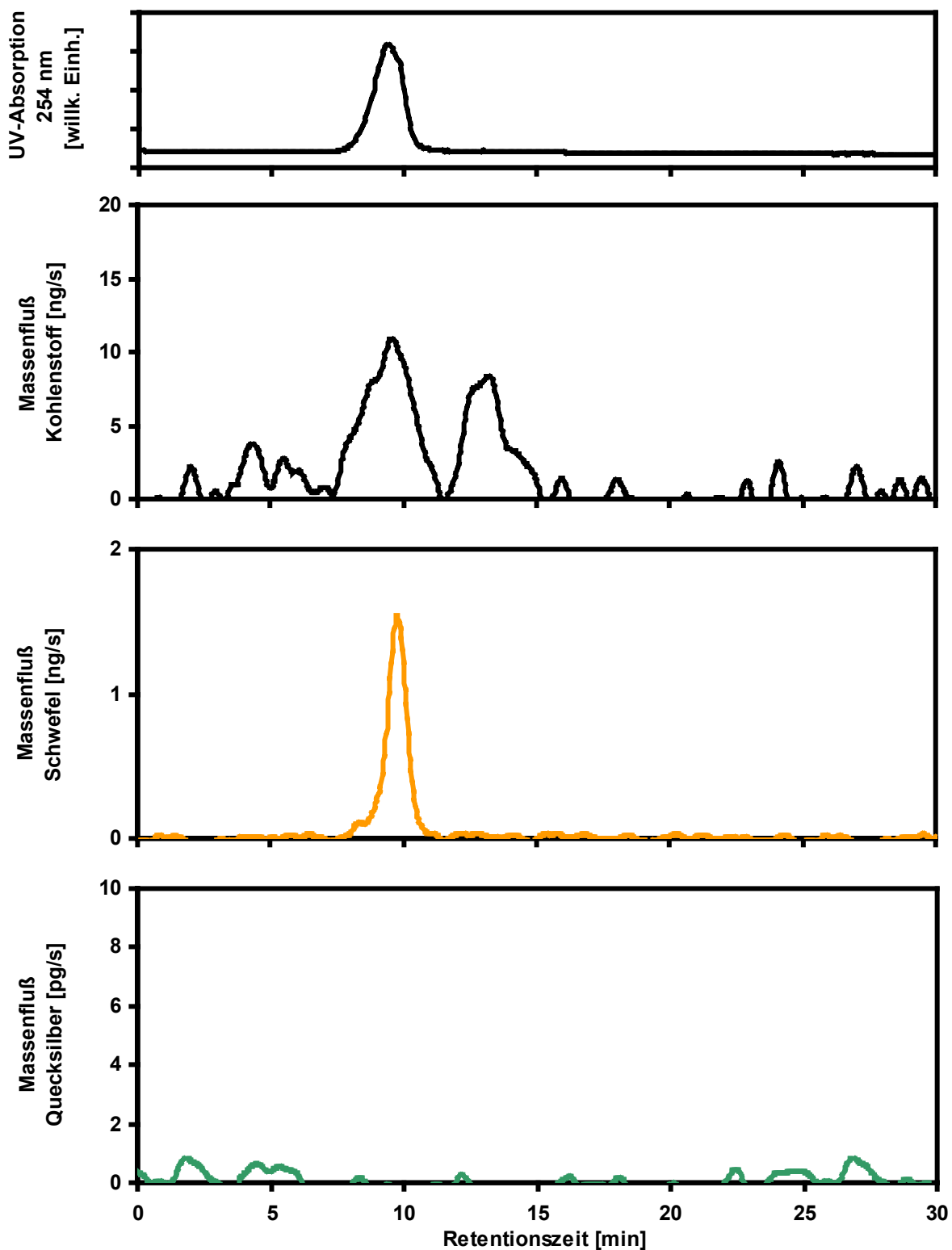


Abb. 64: UV-Absorption sowie Kohlenstoff-, Schwefel- und Quecksilber-Massenfluß-Chromatogramme der Fulvinsäuren HO14 FA_H des Braunwassers nach SEC-Trennung

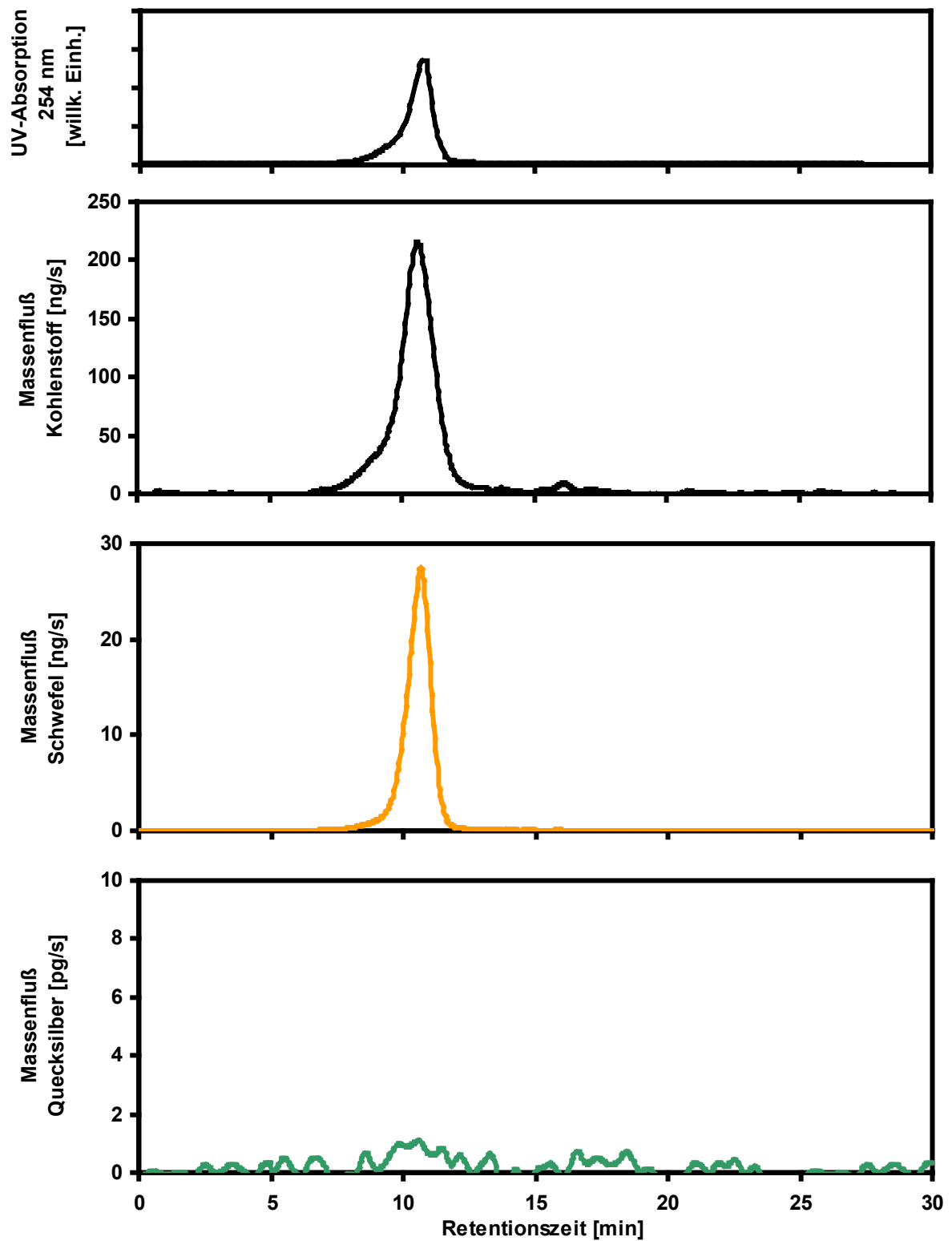


Abb. 65: UV-Absorption sowie Kohlenstoff-, Schwefel- und Quecksilber-Massenfluß-Chromatogramme der gefriergetrockneten Originalwasserprobe HO16 G nach SEC-Trennung

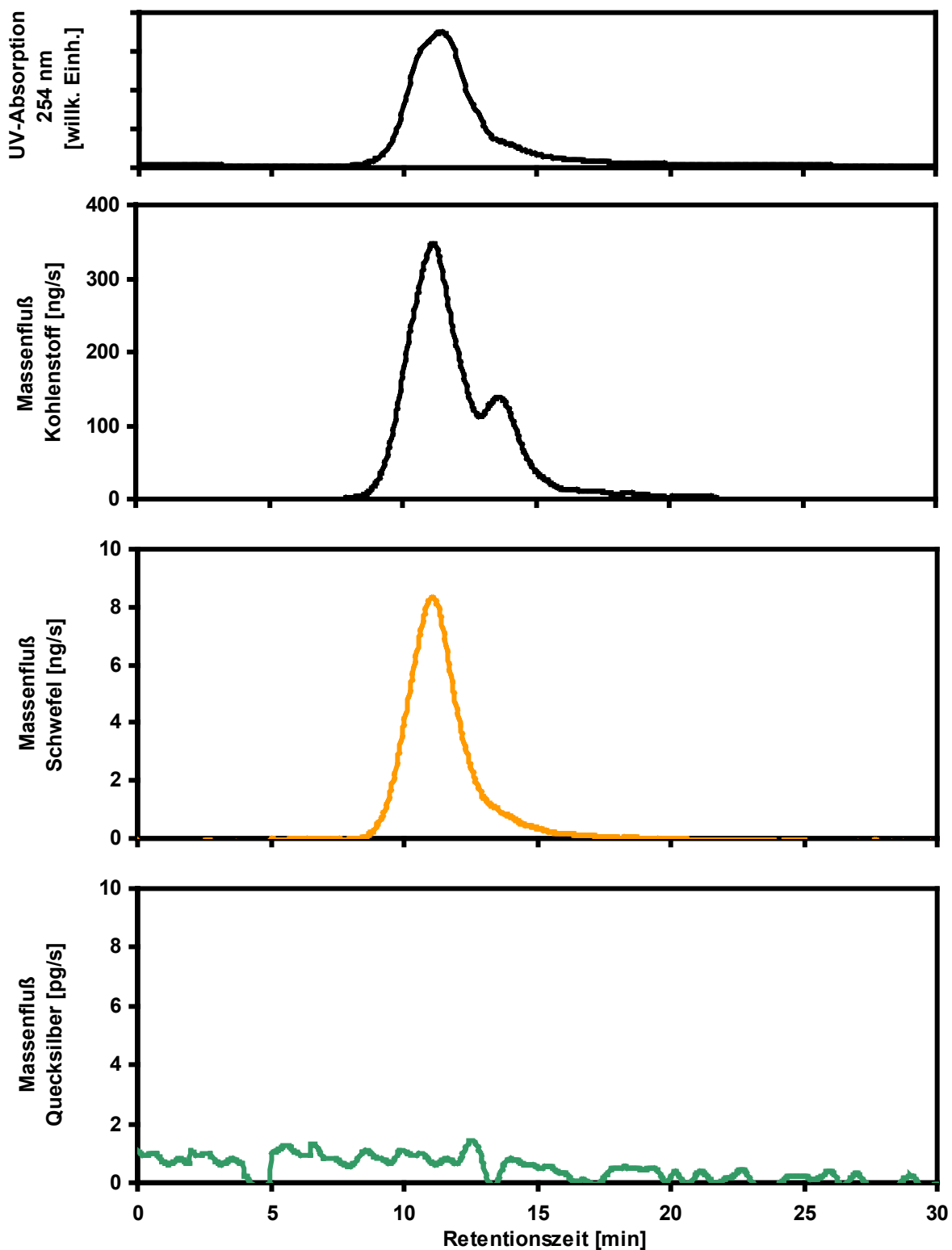


Abb. 66: UV-Absorption sowie Kohlenstoff-, Schwefel- und Quecksilber-Massenfluß-Chromatogramme der Fulvinsäuren HO16 FA_{fl} des Braunwassers nach SEC-Trennung

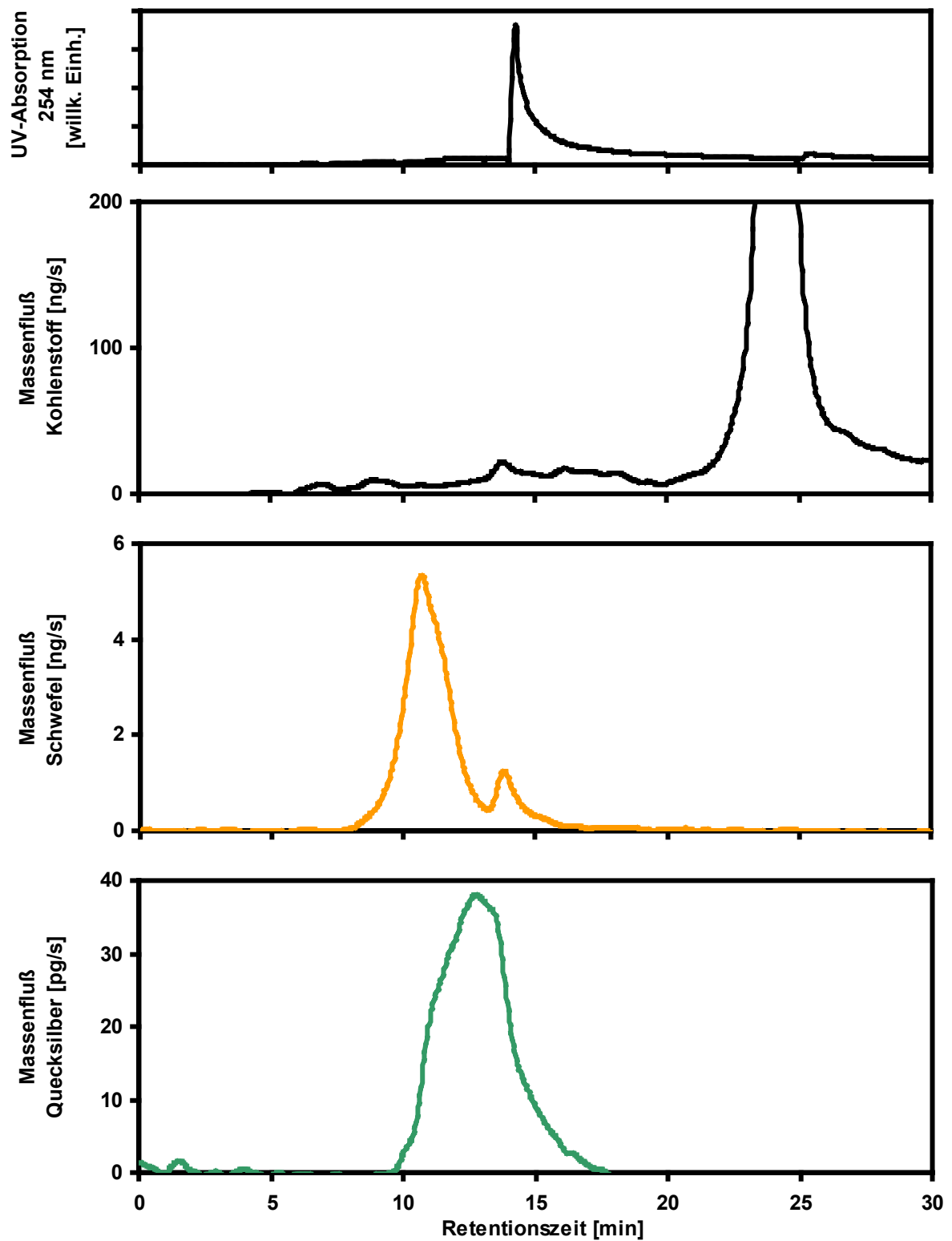


Abb. 67: UV-Absorption sowie Kohlenstoff-, Schwefel- und Quecksilber-Massenfluß-Chromatogramme der Originalwasserprobe WCA1 nach SEC-Trennung

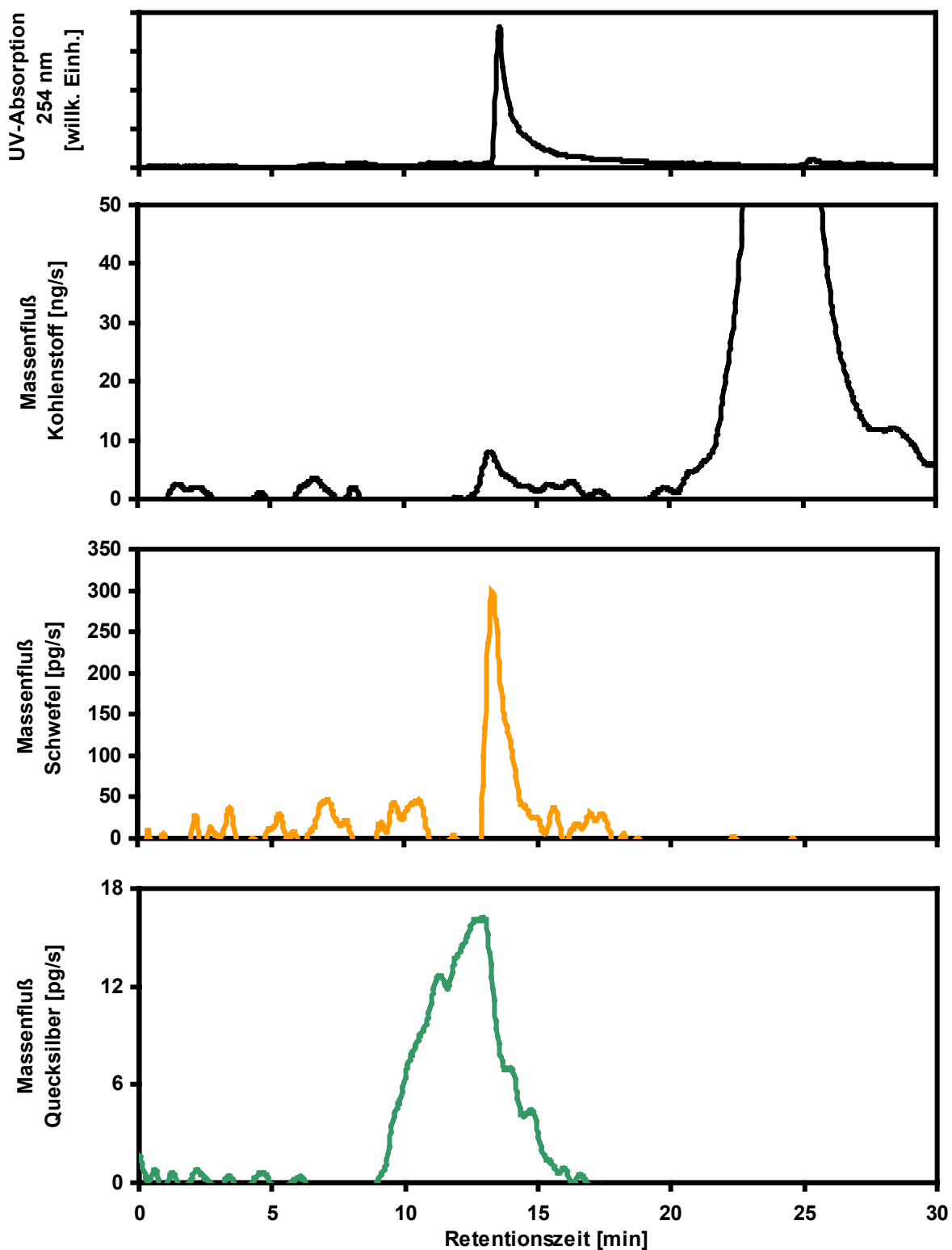


Abb. 68: UV-Absorption sowie Kohlenstoff-, Schwefel- und Quecksilber-Massenfluß-Chromatogramme der Originalwasserprobe EN1 nach SEC-Trennung

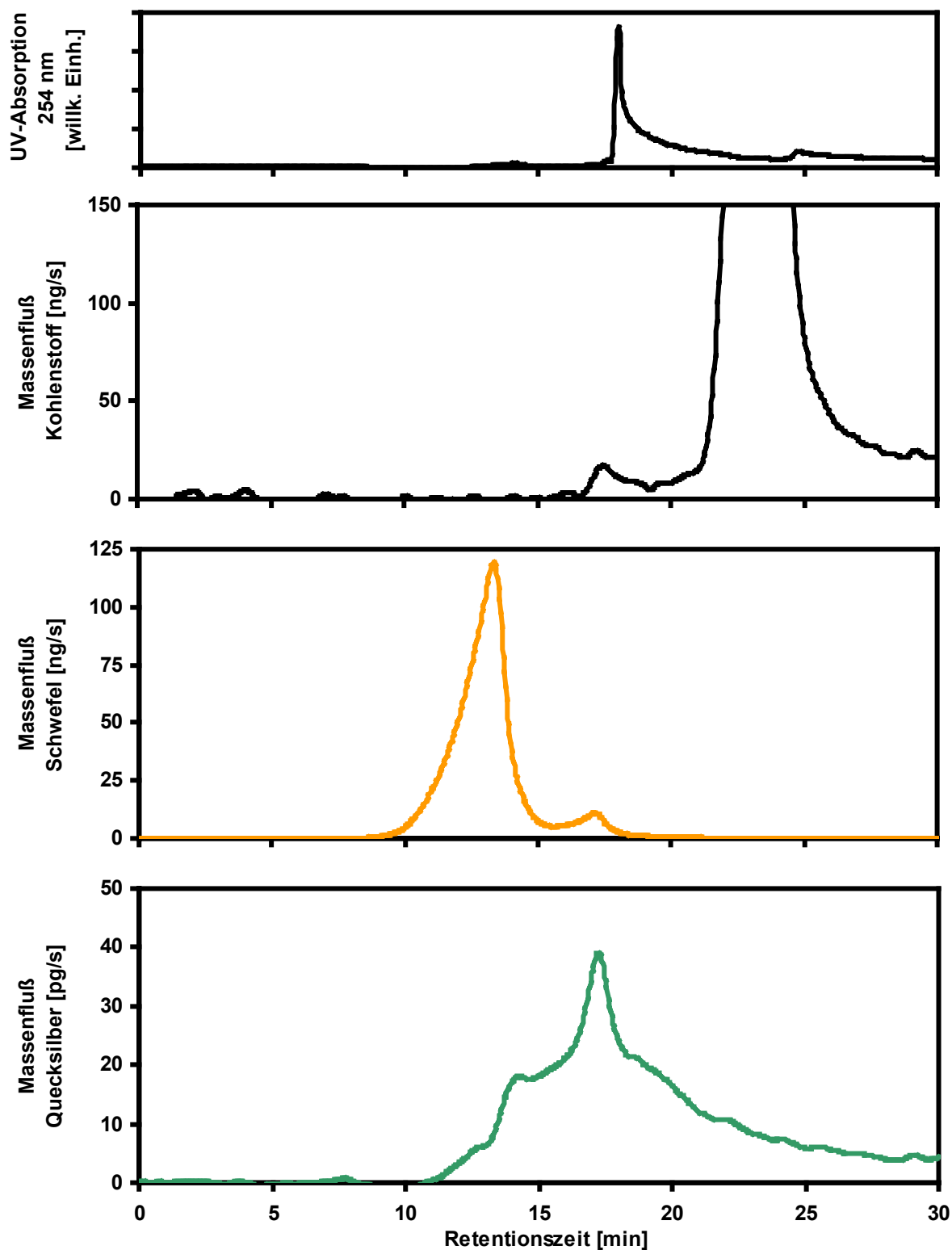


Abb. 69: UV-Absorption sowie Kohlenstoff-, Schwefel- und Quecksilber-Massenfluß-Chromatogramme der Originalwasserprobe EN2 nach SEC-Trennung

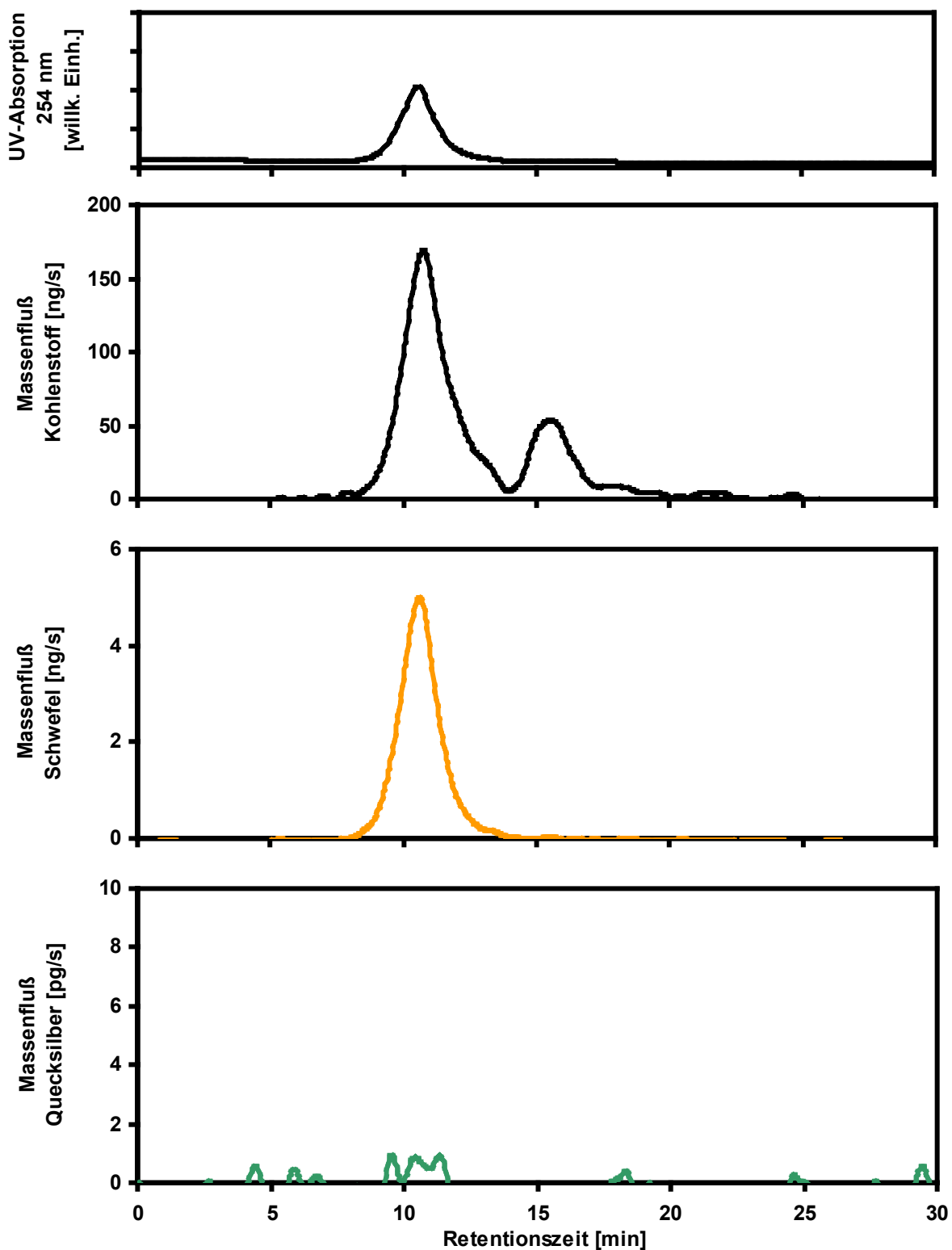


Abb. 70: UV-Absorption sowie Kohlenstoff-, Schwefel- und Quecksilber-Massenfluß-Chromatogramme des Fulvinsäurenisolates WCA2FA nach SEC-Trennung

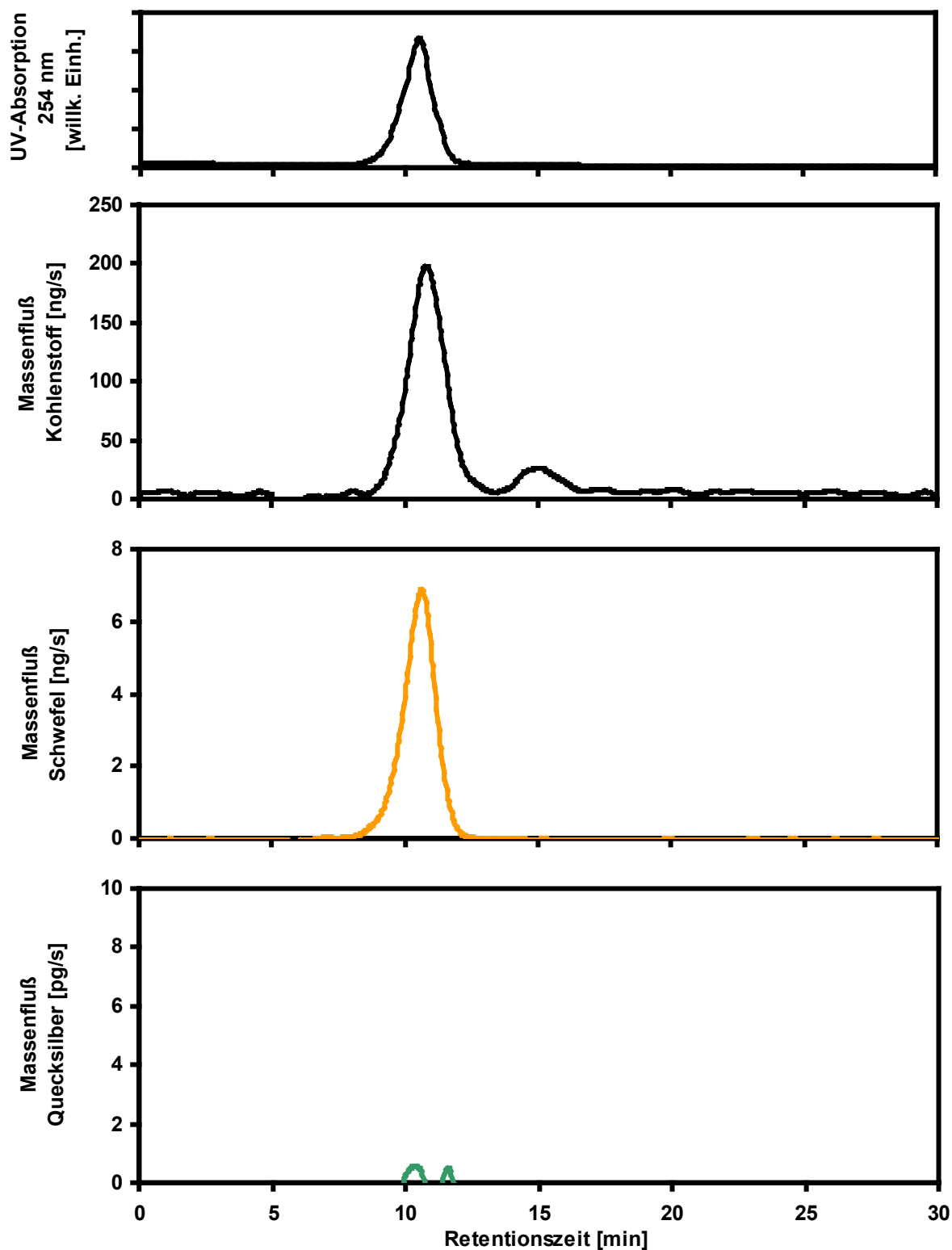


Abb. 71: UV-Absorption sowie Kohlenstoff-, Schwefel- und Quecksilber-Massenfluß-Chromatogramme des hydrophilen Säureanteils WCA2HPIA nach SEC-Trennung

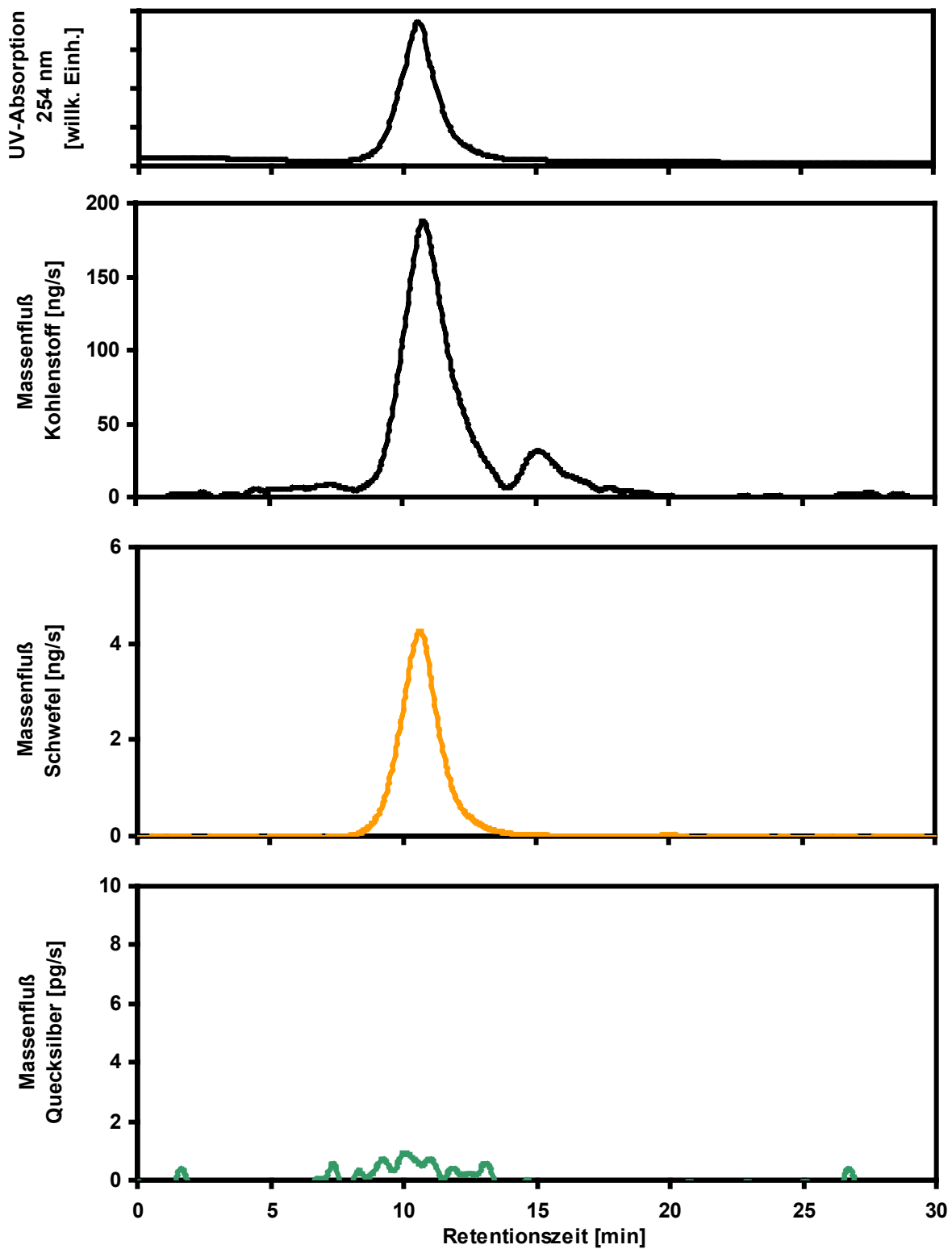


Abb. 72: UV-Absorption sowie Kohlenstoff-, Schwefel- und Quecksilber-Massenfluß-Chromatogramme des hydrophoben Säureanteils WCA2HPOA nach SEC-Trennung

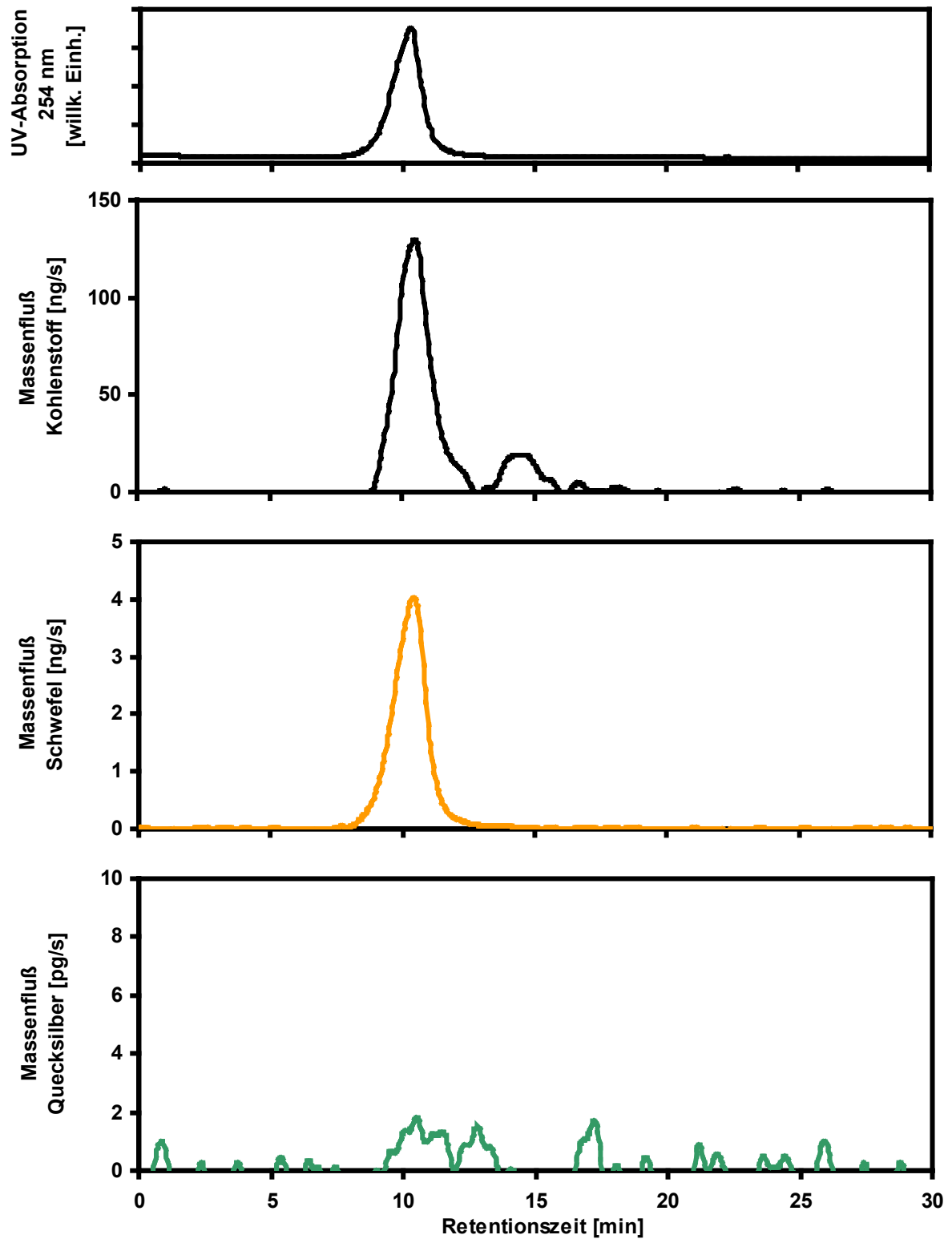


Abb. 73: UV-Absorption sowie Kohlenstoff-, Schwefel- und Quecksilber-Massenfluß-Chromatogramme des Fulvinsäurenisolates F1FA nach SEC-Trennung

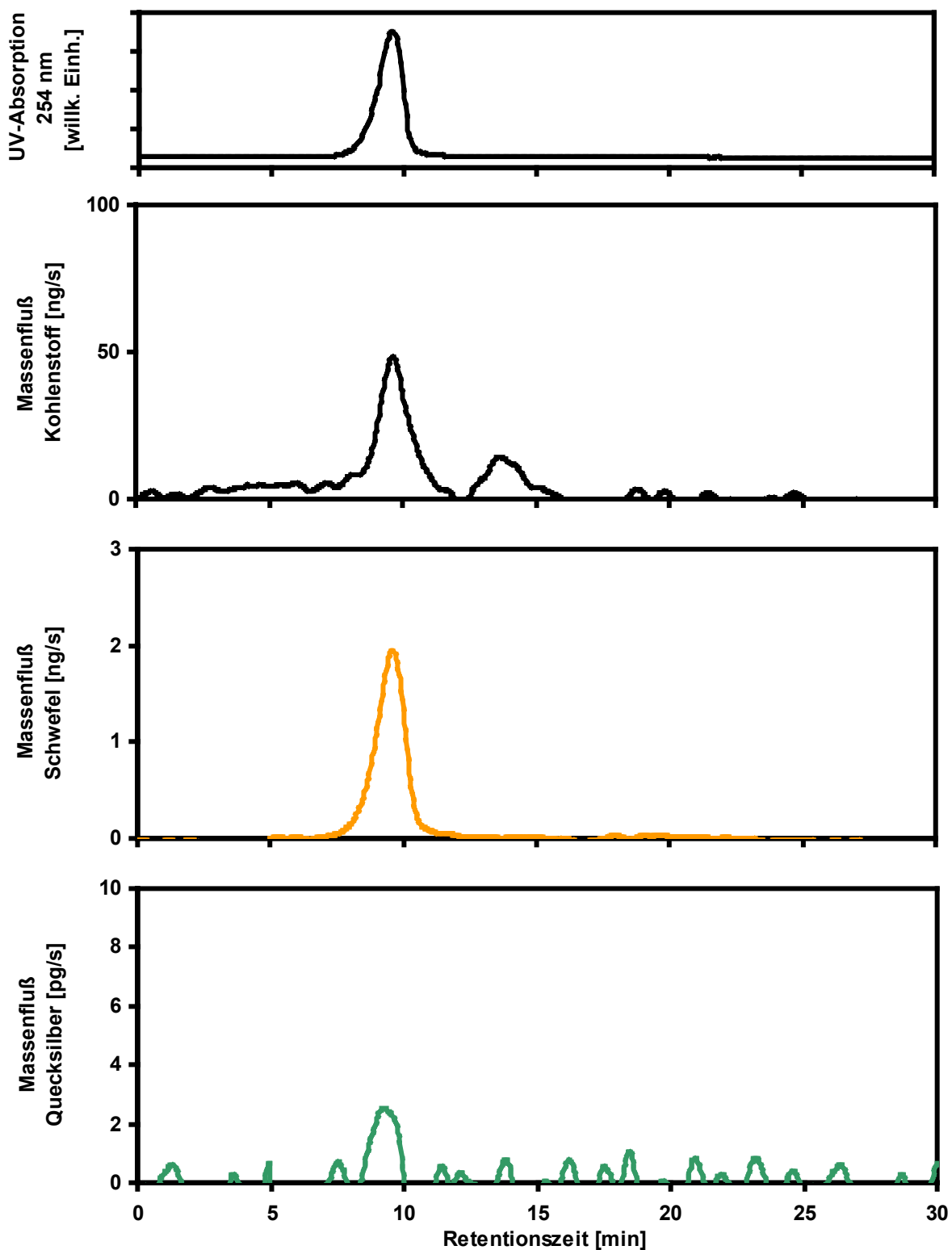


Abb. 74: UV-Absorption sowie Kohlenstoff-, Schwefel- und Quecksilber-Massenfluß-Chromatogramme des Huminsäurenisolates F1HA nach SEC-Trennung

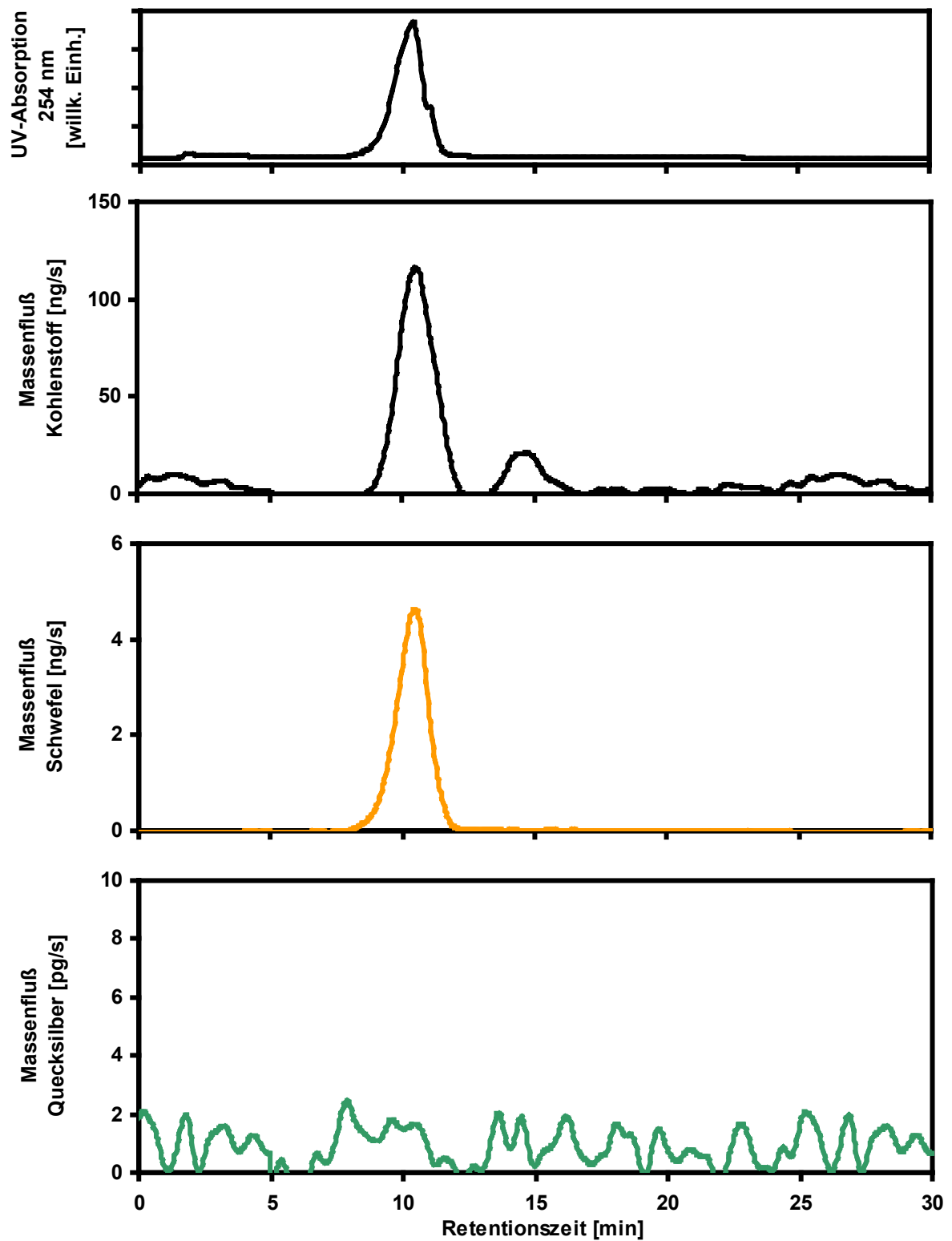


Abb. 75: UV-Absorption sowie Kohlenstoff-, Schwefel- und Quecksilber-Massenfluß-Chromatogramme des hydrophilen Säureanteils F1HPIA nach SEC-Trennung

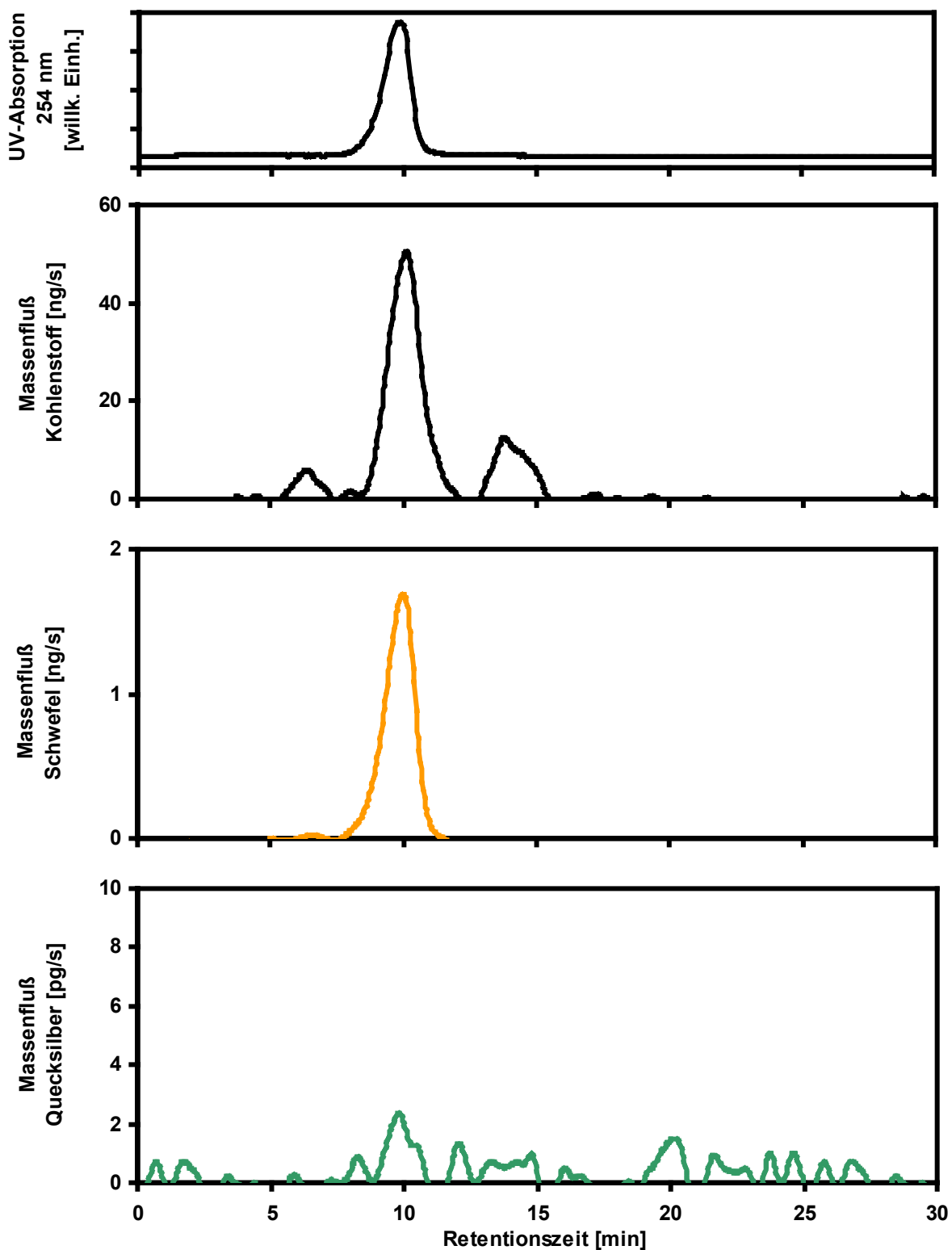


Abb. 76: UV-Absorption sowie Kohlenstoff-, Schwefel- und Quecksilber-Massenfluß-Chromatogramme des hydrophoben Säureanteils F1HPOA nach SEC-Trennung

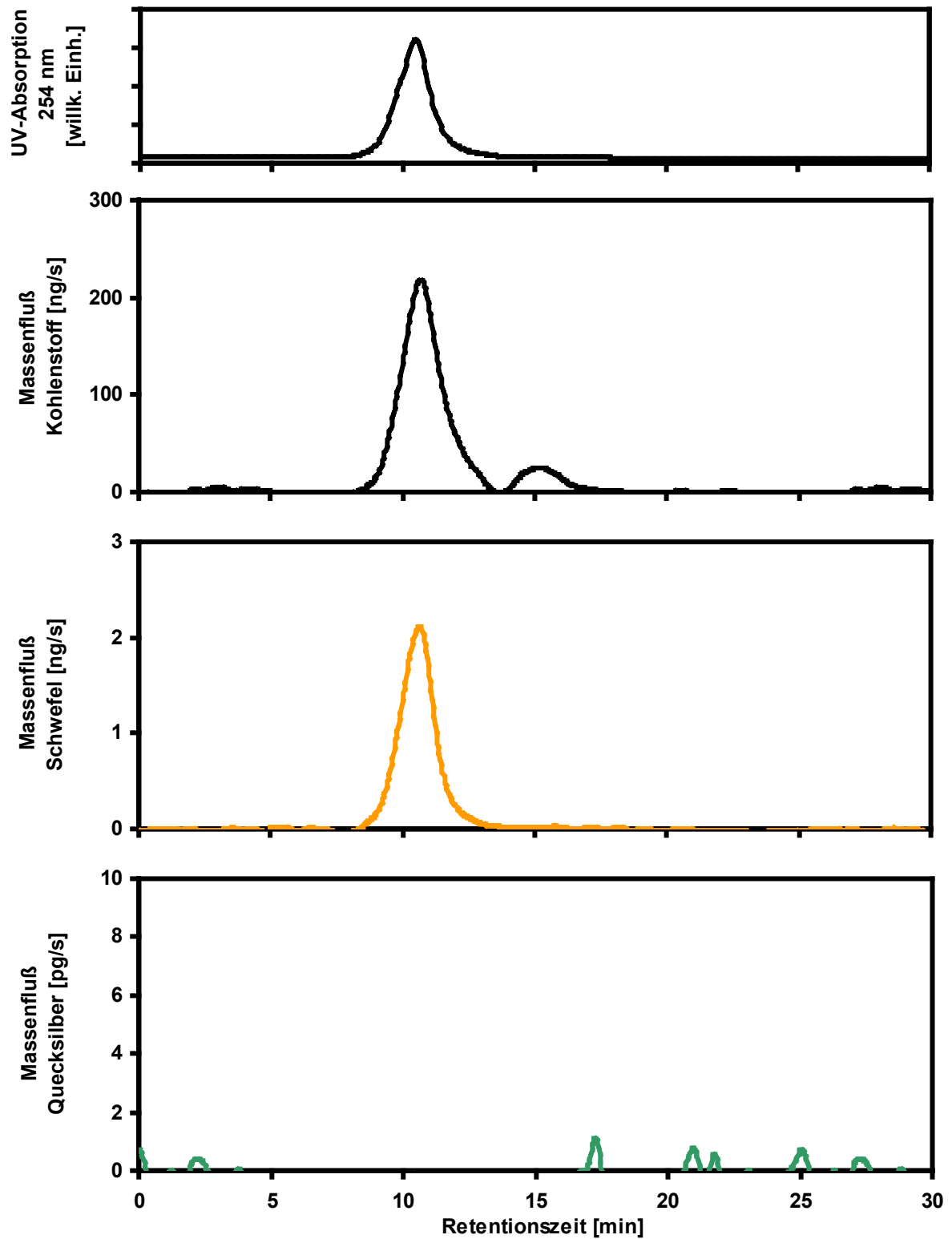


Abb. 77: UV-Absorption sowie Kohlenstoff-, Schwefel- und Quecksilber-Massenfluß-Chromatogramme des Fulvinsäurenisolates SRFA nach SEC-Trennung

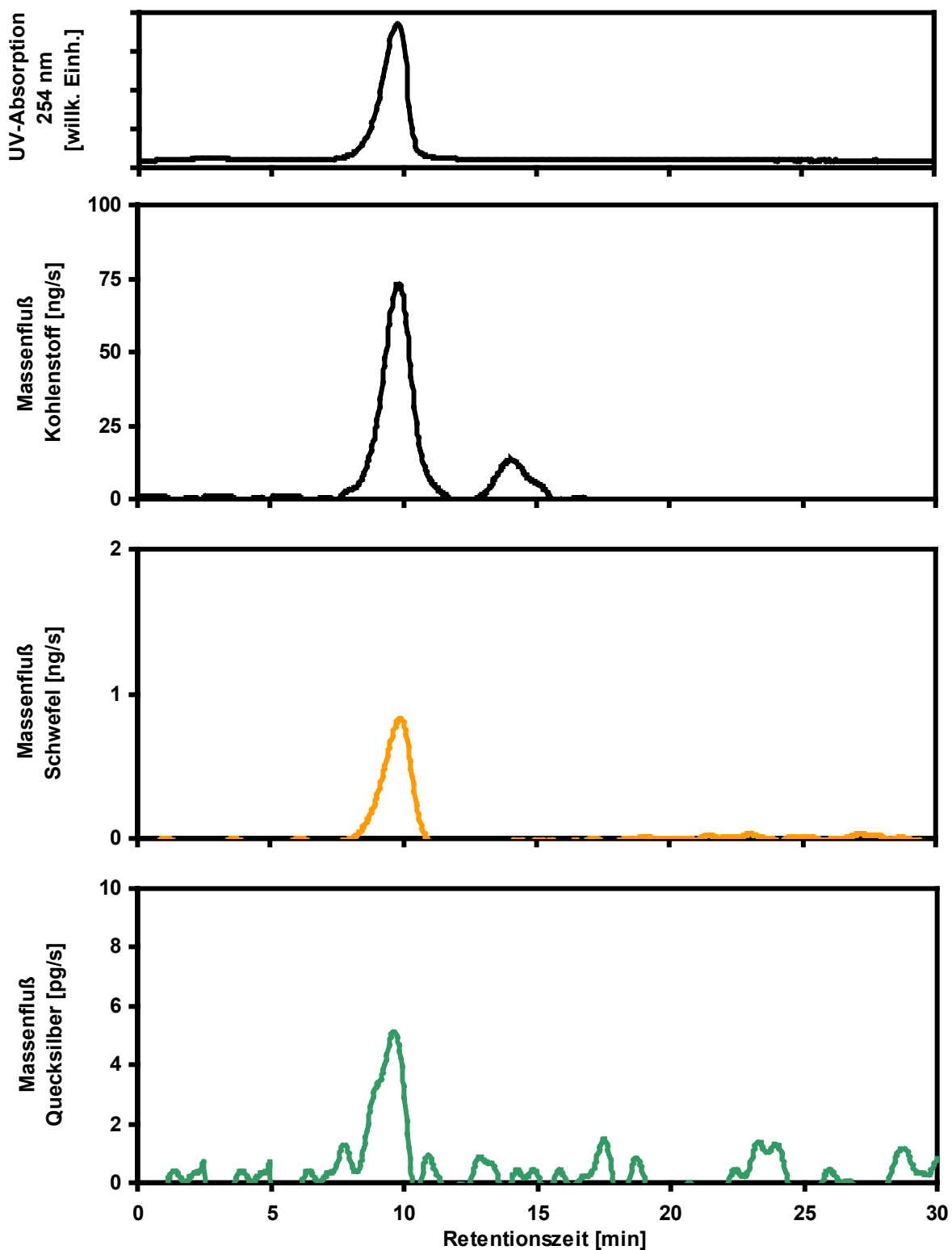


Abb. 78: UV-Absorption sowie Kohlenstoff-, Schwefel- und Quecksilber-Massenfluß-Chromatogramme des Huminsäurenisolates SRHA nach SEC-Trennung

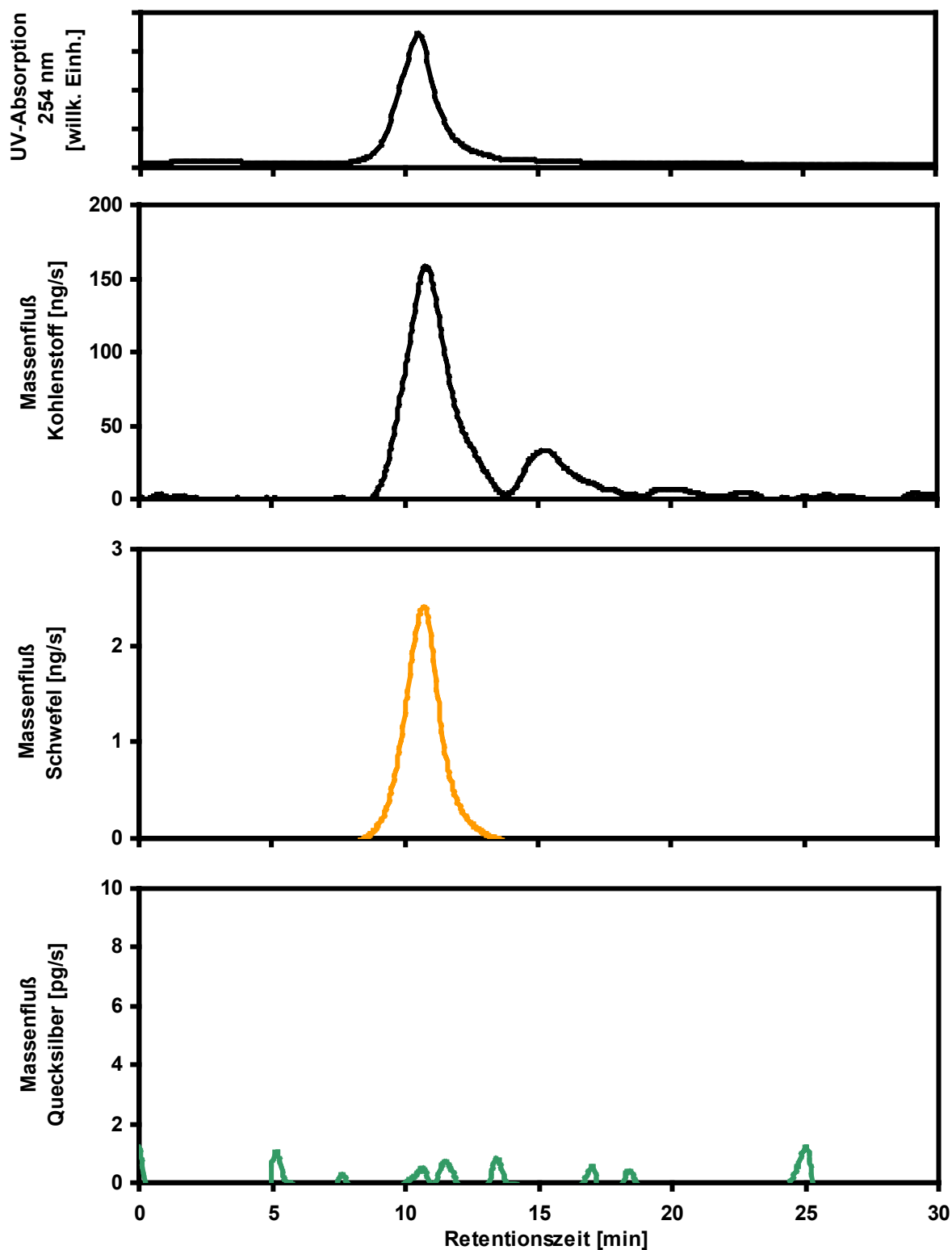


Abb. 79: UV-Absorption sowie Kohlenstoff-, Schwefel- und Quecksilber-Massenfluß-Chromatogramme des Fulvinsäurenisolates ORFA nach SEC-Trennung

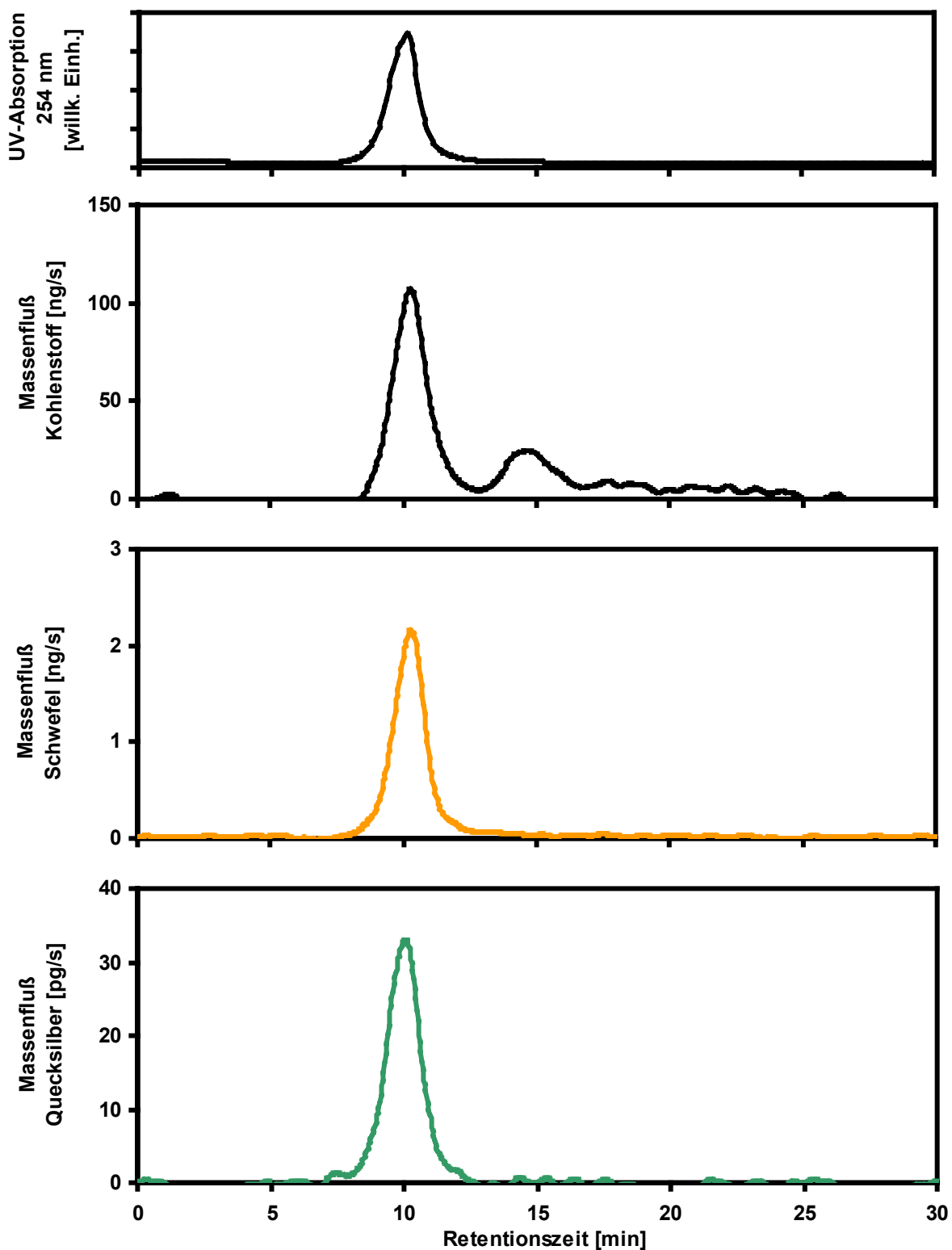


Abb. 80: UV-Absorption sowie Kohlenstoff-, Schwefel- und Quecksilber-Massenfluß-Chromatogramme des Huminsäurenisolates ORHA nach SEC-Trennung

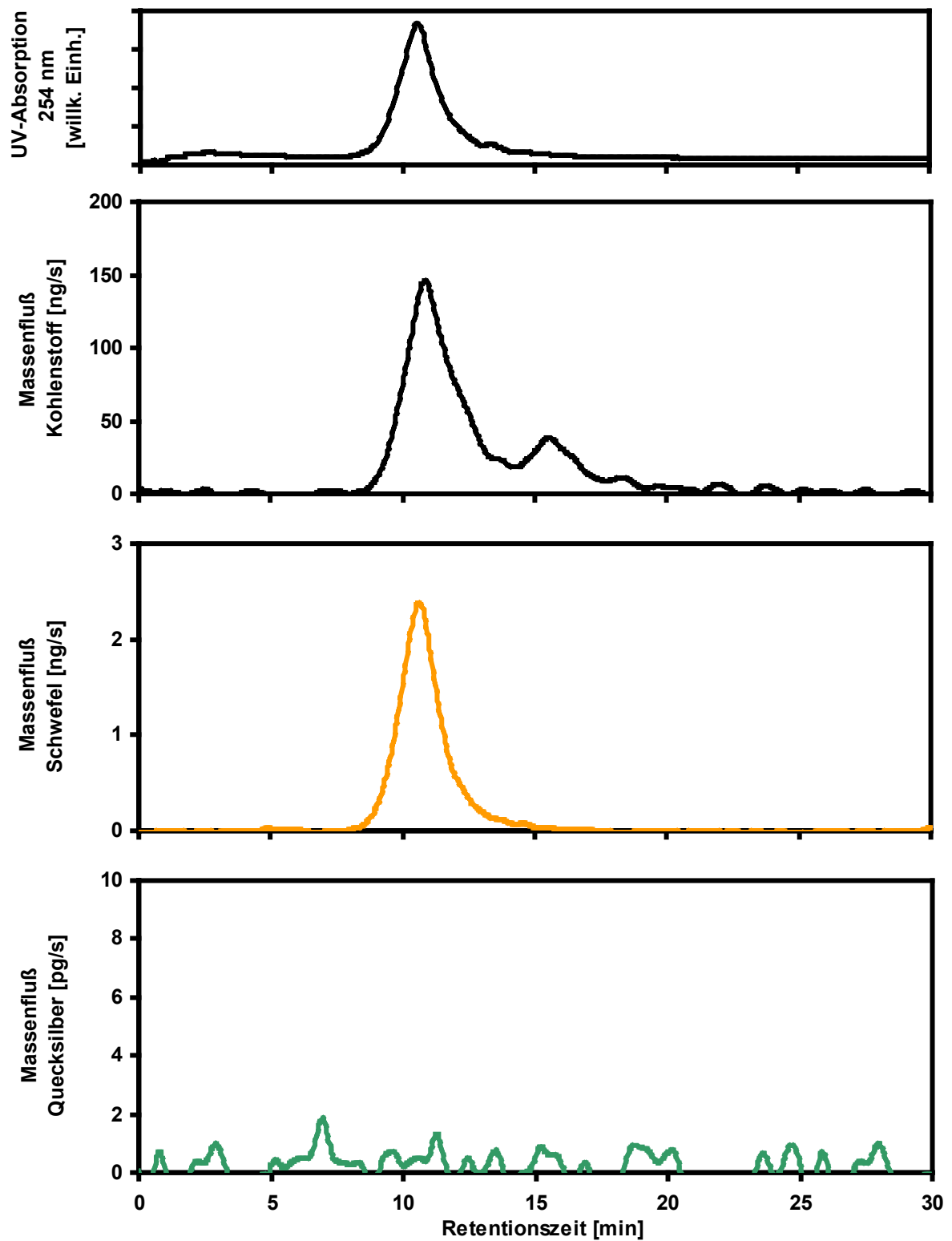


Abb. 81: UV-Absorption sowie Kohlenstoff-, Schwefel- und Quecksilber-Massenfluß-Chromatogramme des Fulvinsäurenisolates MRFA nach SEC-Trennung

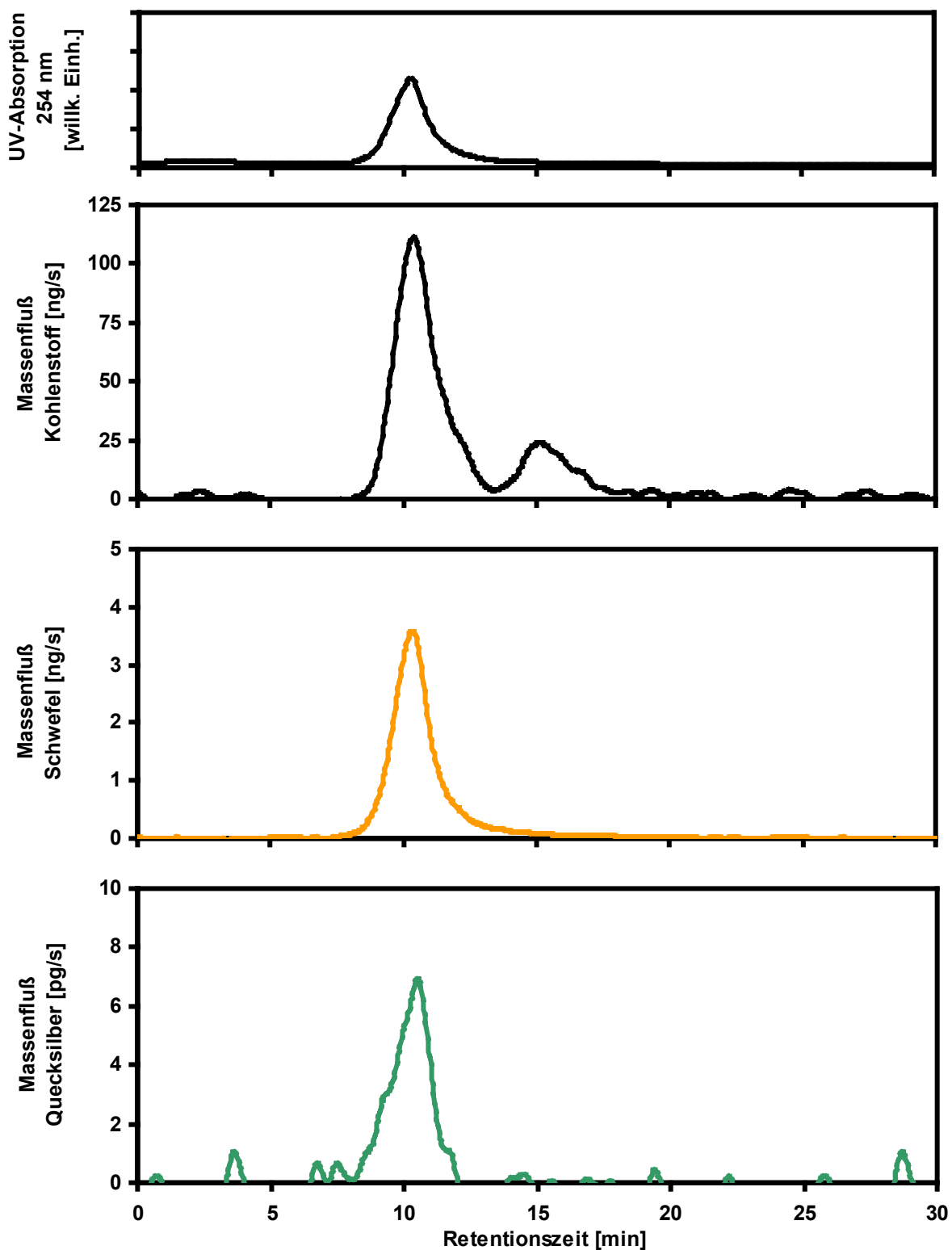


Abb. 82: UV-Absorption sowie Kohlenstoff-, Schwefel- und Quecksilber-Massenfluß-Chromatogramme des Huminsäurenisolates MRHA nach SEC-Trennung

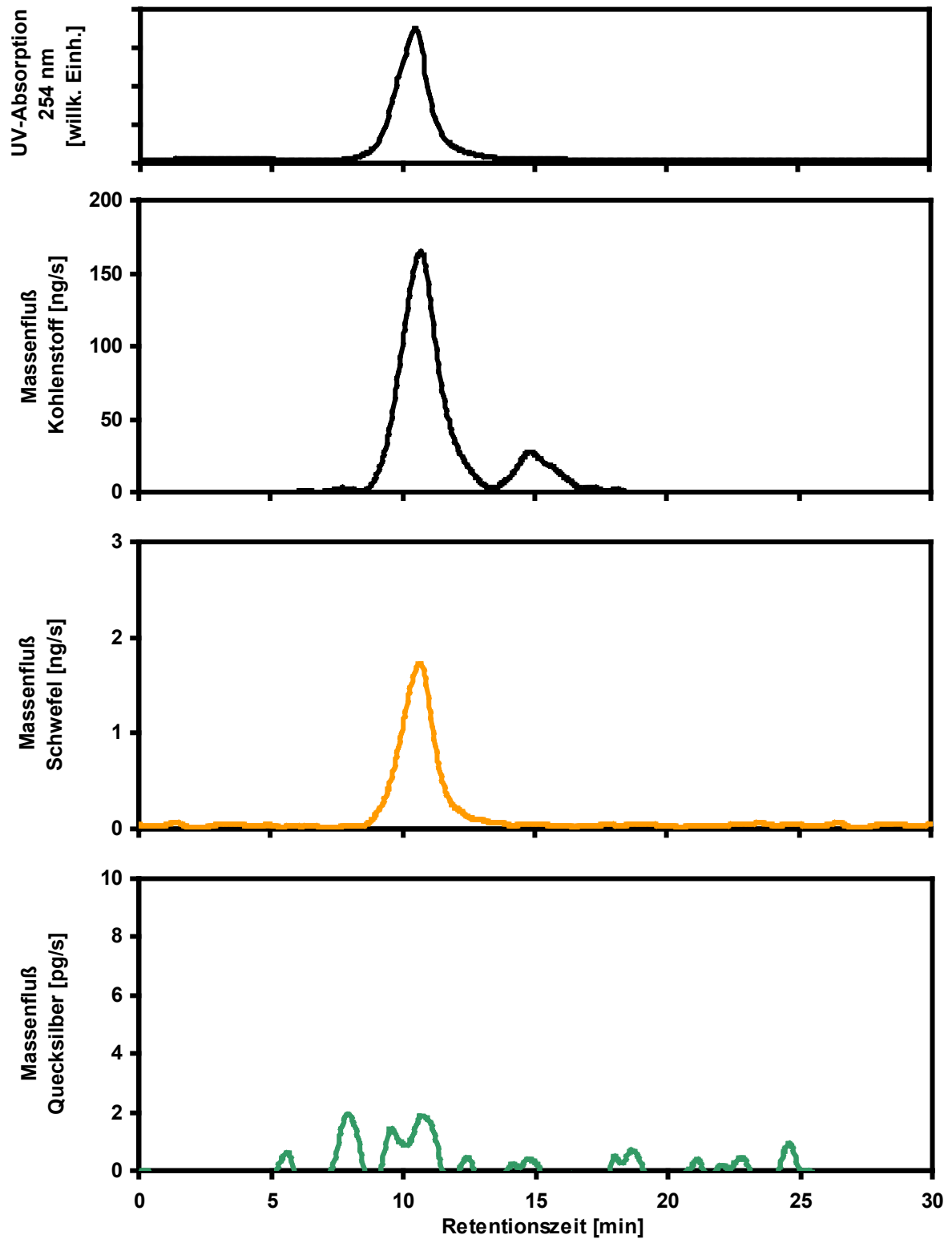


Abb. 83: UV-Absorption sowie Kohlenstoff-, Schwefel- und Quecksilber-Massenfluß-Chromatogramme des Fulvinsäurenisolates CCFA nach SEC-Trennung

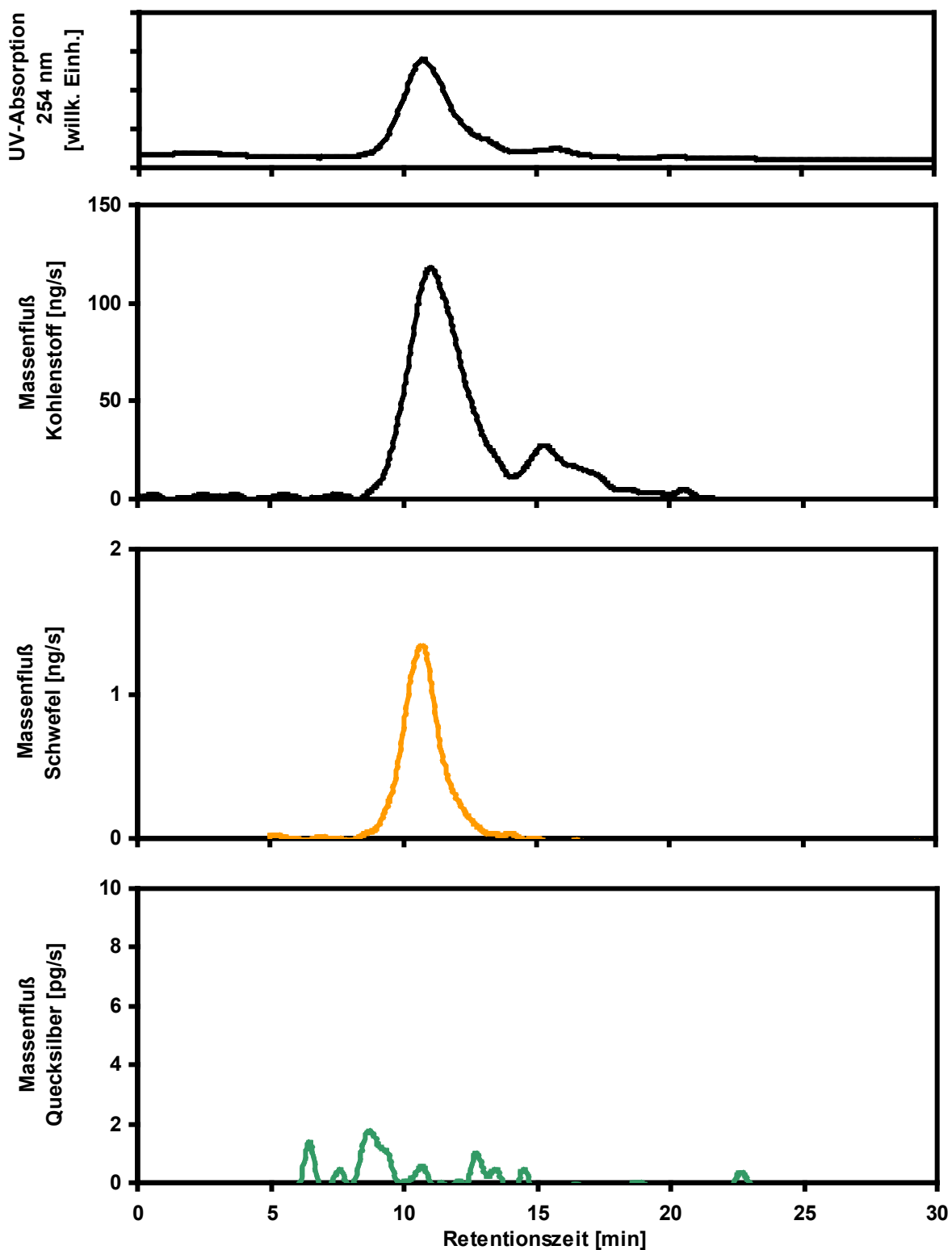


Abb. 84: UV-Absorption sowie Kohlenstoff-, Schwefel- und Quecksilber-Massenfluß-Chromatogramme des Fulvinsäurenisolates POFA nach SEC-Trennung

3.8. Untersuchung der Wechselwirkung von Huminstoffen mit Quecksilber

Quecksilberverbindungen haben wegen ihrer Toxizität große Aufmerksamkeit erlangt. In elementarer Form hat es einen im Vergleich zu anderen Metallen hohen Dampfdruck (0.16 Pa). Die in geschlossenen Räumen relevante Dampfsättigung beträgt 15 mg/m³ und löst bei langfristiger Inhalation chronische Vergiftungen beim Menschen aus [85]. In der Umwelt stellt es für den Menschen keine Gefahr dar, da Hg⁰ relativ flüchtig und wasserunlöslich ist. Anorganische Quecksilbersalze hingegen sind wasserlöslich und werden nur von organischen Quecksilberverbindungen in ihrer Toxizität übertroffen. Für das Transportverhalten und den Einfluß auf die Umwelt ist es also entscheidend, in welcher Speziesform Quecksilber vorliegt. Es wurden schon einige Untersuchungen der Stoffkreisläufe von Quecksilber in der Umwelt durchgeführt [86-89], jedoch wurde bisher der Einfluß der Huminstoffe nicht näher betrachtet. Durch die Bindung des Quecksilbers an Huminstoffe ist dessen Mobilität stark von der Mobilität des HS-Komplexes abhängig [13, 90, 91]. Es wurden daher im Rahmen dieser Arbeit Untersuchungen mit der SEC/ICP-MS-Kopplung zur Bindung von Quecksilber an Huminstoffe durchgeführt. In Abb. 85 bis Abb. 94 sind die Chromatogramme einiger Huminstoffe (SV1, SV1 FA_{fl}, BS1 FA_{fl}, ABV2 FA_{fl} und ABV3) vor und nach Zugabe von Hg(II) dargestellt. Die zugegebenen Mengen an Hg(II) sind Tab. 41 zu entnehmen. Die chromatographische Trennung erfolgte etwa 15 min nach Hg(II)-Zugabe.

Tab. 41: DOC-Gehalt, Zusatz an Hg(II)-Standard und daraus resultierende Hg(II)-Gehalt der Huminstoffe

Probe	DOC-Gehalt [µg C/g Lsg]	Hg(II)-Zugabe [ng Hg/g Lsg]	Hg(II)-Gehalt [nmol Hg/g C]
SV1	236	30	634
SV1 FA _{fl}	730	100	683
BS1 FA _{fl}	1000	10	50
ABV2 FA _{fl}	140	50	1780
ABV3	11	50	22660

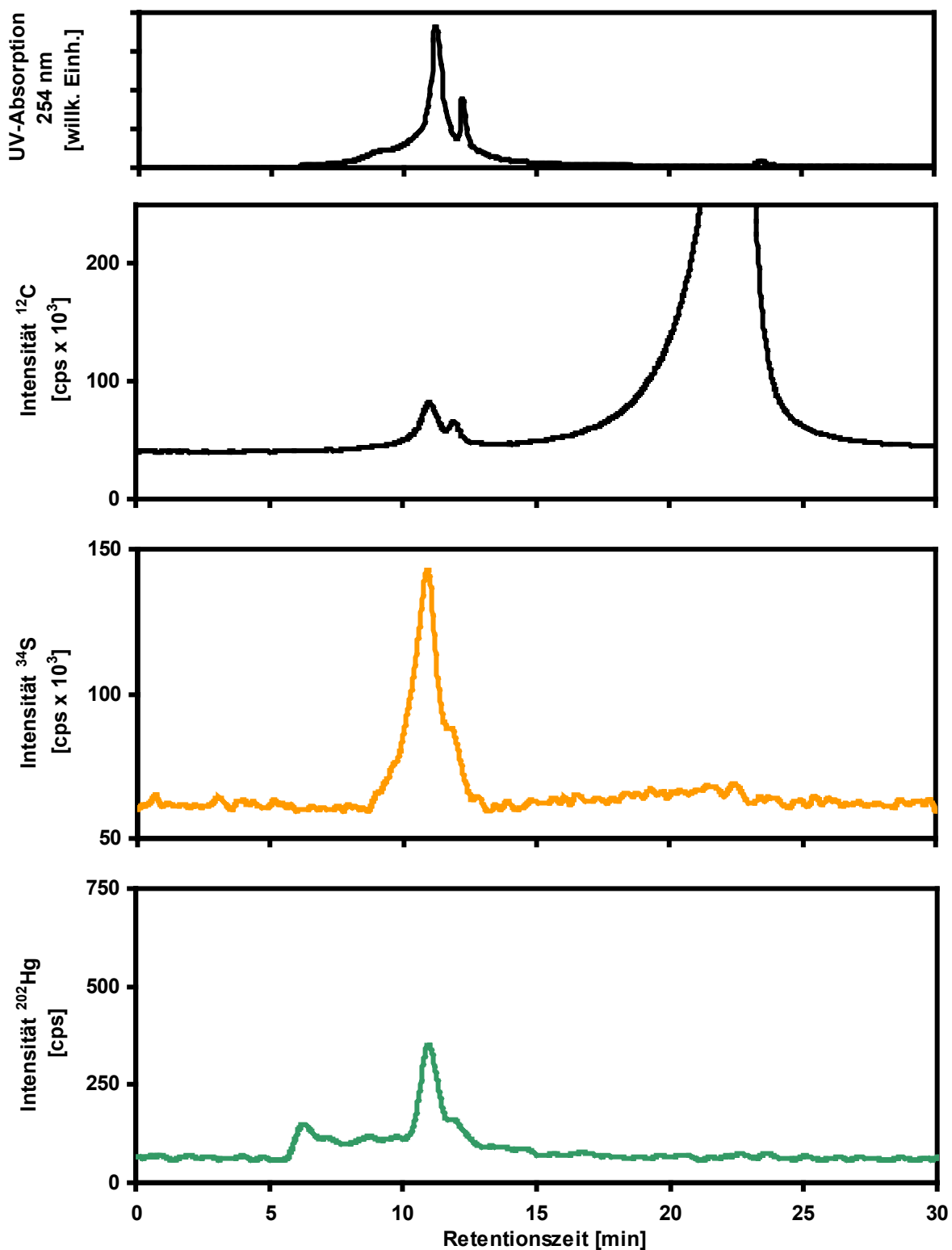


Abb. 85: UV-Absorption sowie Kohlenstoff-, Schwefel- und Quecksilber-Intensitäts-Chromatogramme des Braunkohlepyrolyseabwasser SV1 nach SEC-Trennung (ohne Hg(II)-Zugabe)

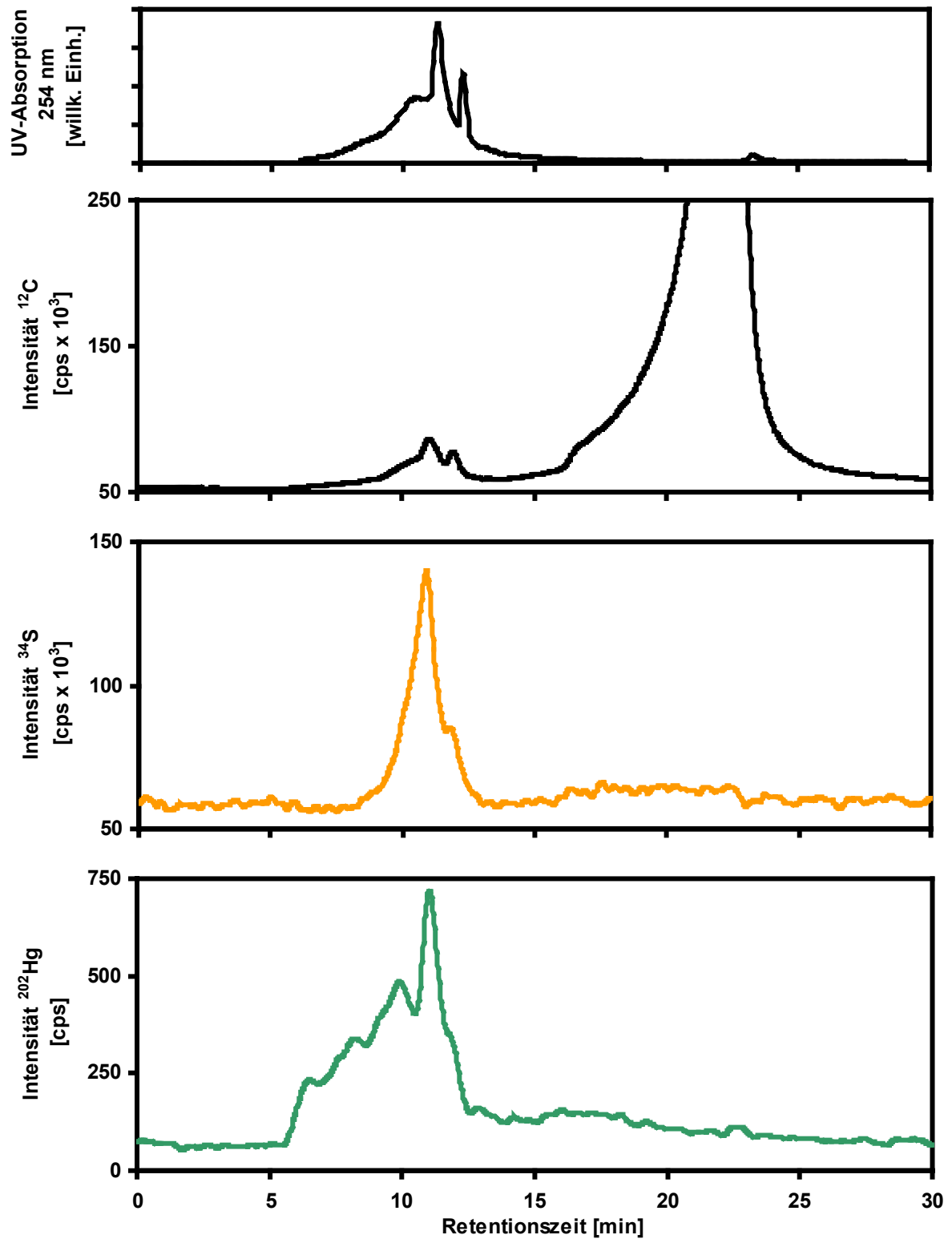


Abb. 86: UV-Absorption sowie Kohlenstoff-, Schwefel- und Quecksilber-Intensitäts-Chromatogramme des Braunkohlepyrolyseabwasser SV1 mit Hg(II)-Zugabe nach SEC-Trennung

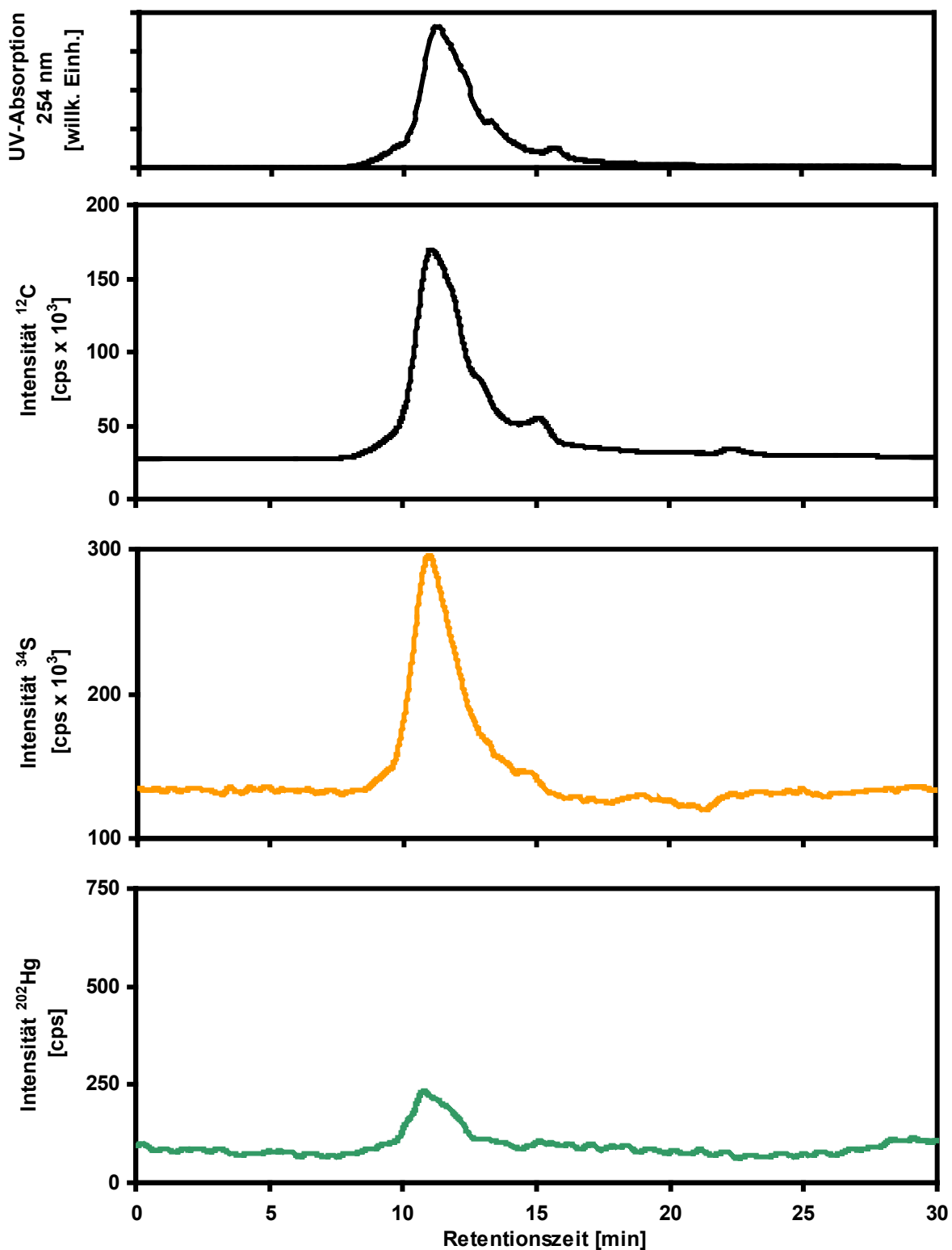


Abb. 87: UV-Absorption sowie Kohlenstoff-, Schwefel- und Quecksilber-Intensitäts-Chromatogramme der Fulvinsäuren SV1 FA_{fl} des Braunkohlepyrolyseabwassers nach SEC-Trennung (ohne Hg(II)-Zugabe)

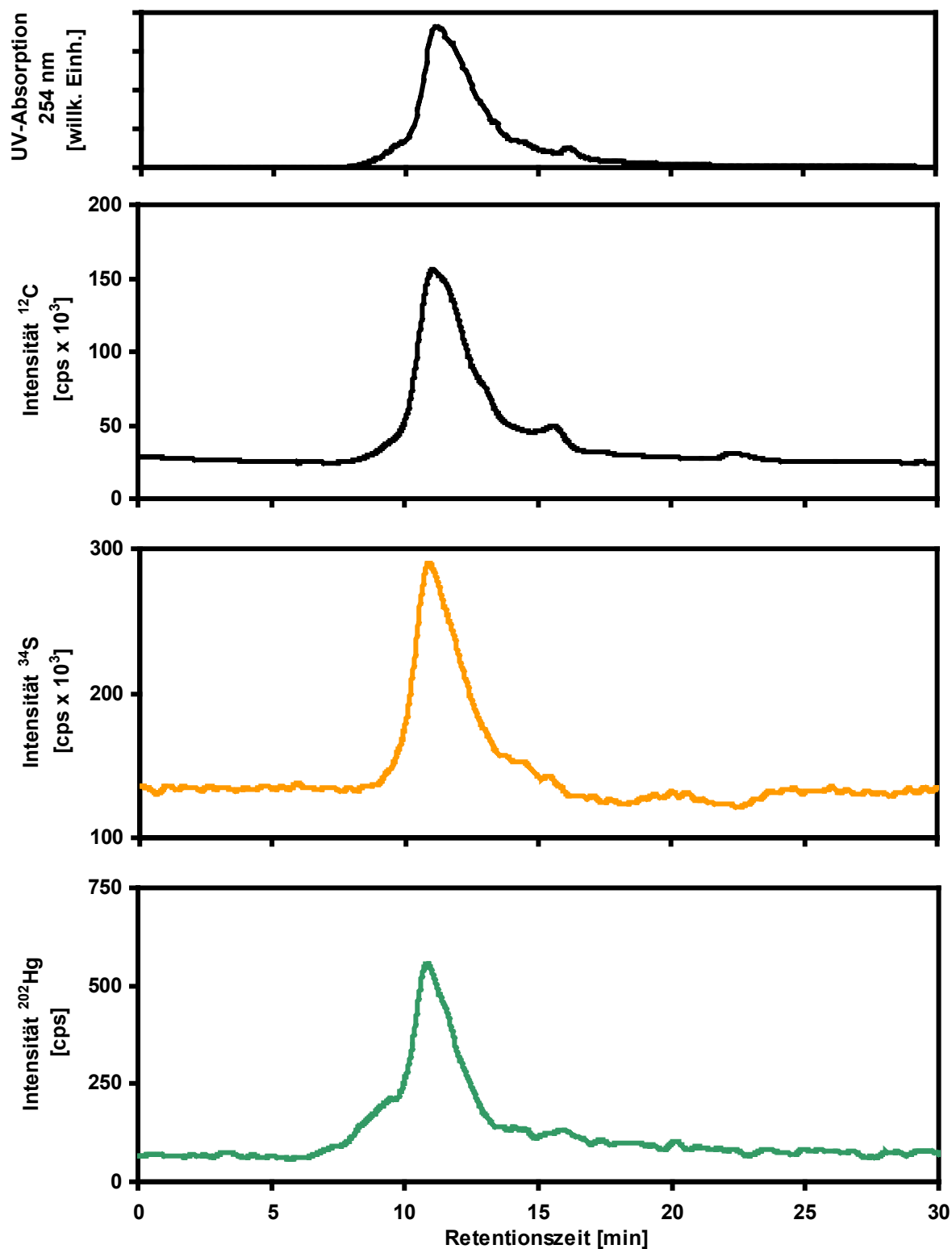


Abb. 88: UV-Absorption sowie Kohlenstoff-, Schwefel- und Quecksilber-Intensitäts-Chromatogramme der Fulvinsäuren SV1 FA_{fl} des Braunkohlepyrolyseabwassers mit Hg(II)-Zugabe nach SEC-Trennung

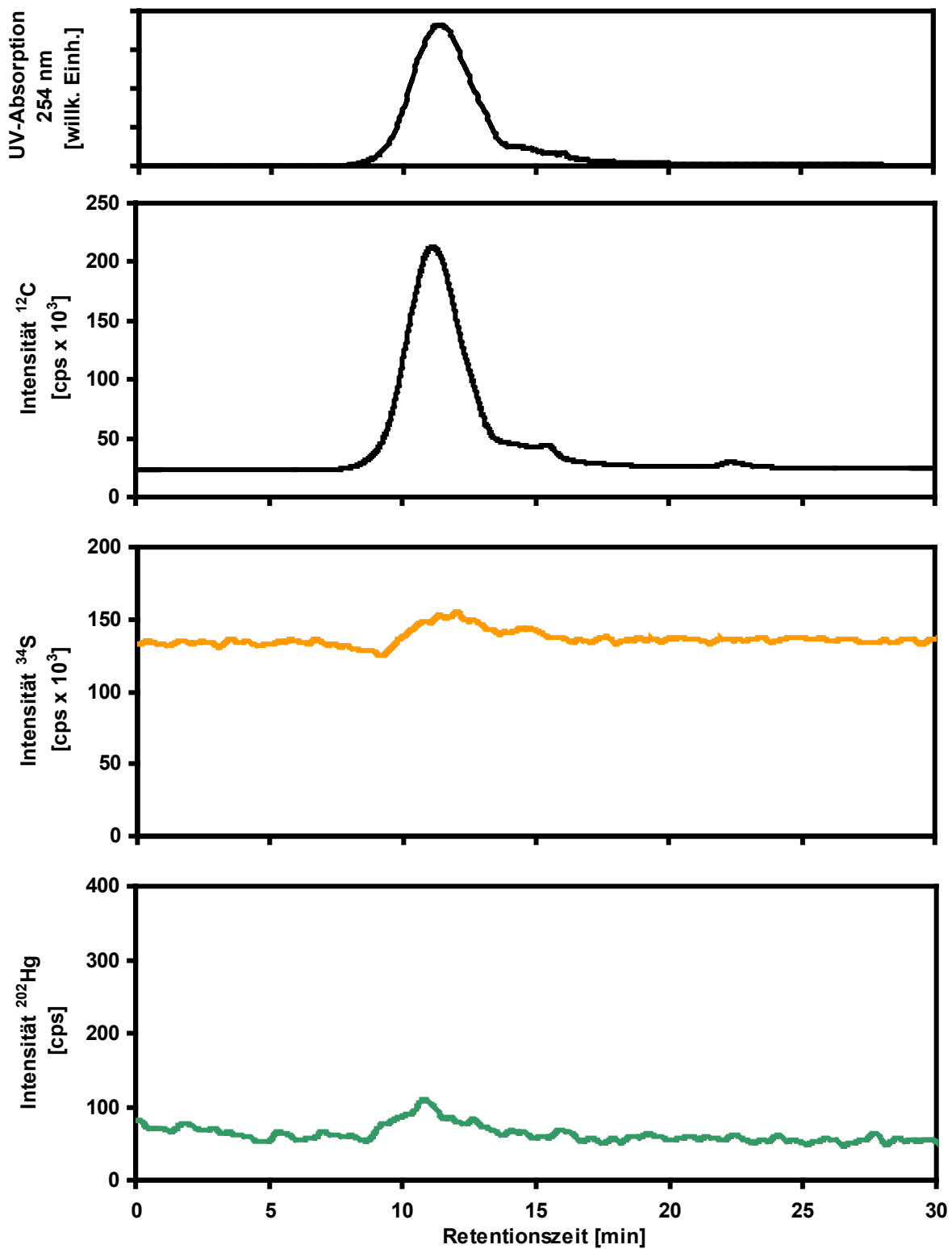


Abb. 89: UV-Absorption sowie Kohlenstoff-, Schwefel- und Quecksilber-Intensitäts-Chromatogramme der Fulvinsäuren BS1 FA_{fl} des Bodensickerwassers nach SEC-Trennung (ohne Hg(II)-Zugabe)

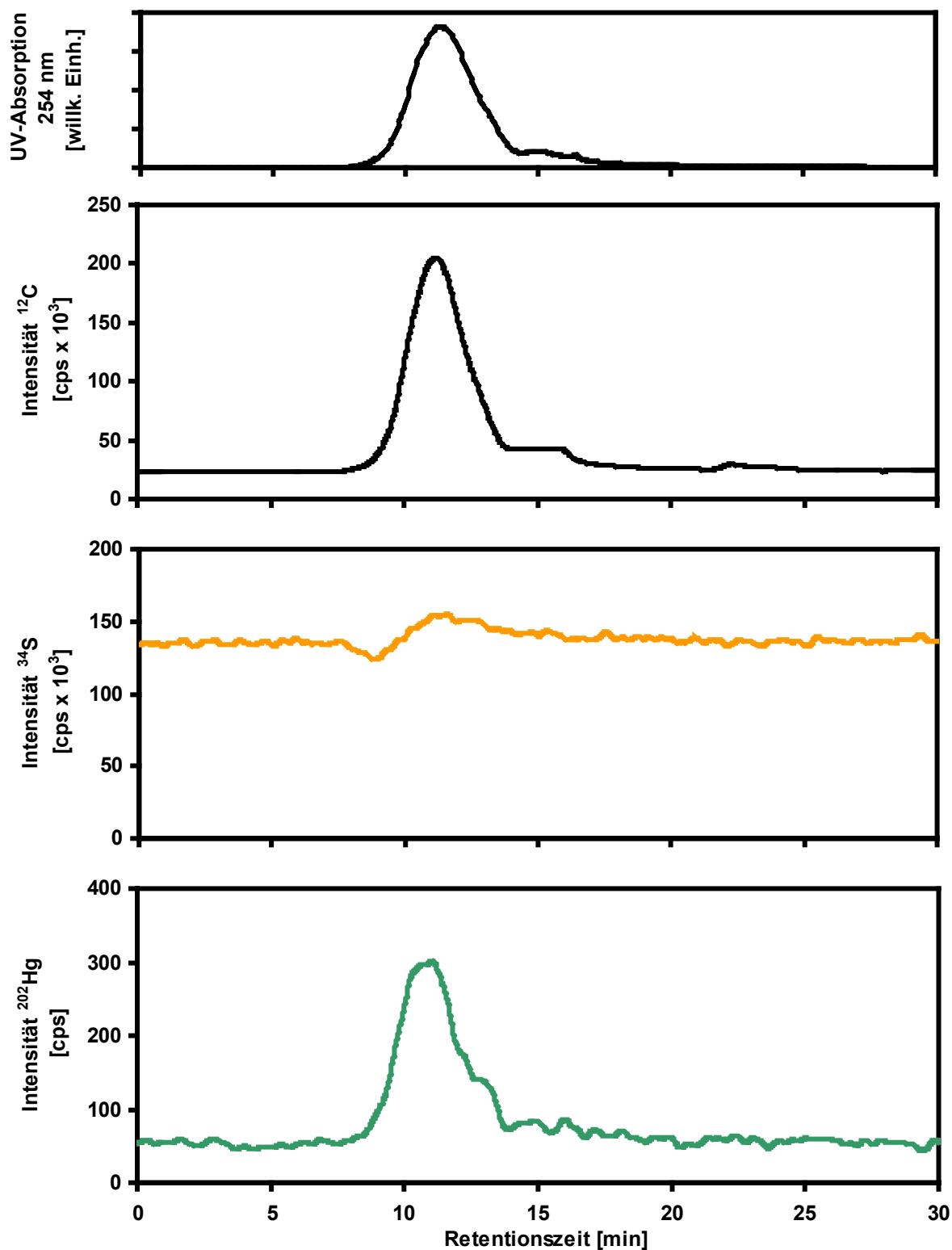


Abb. 90: UV-Absorption sowie Kohlenstoff-, Schwefel- und Quecksilber-Intensitäts-Chromatogramme der Fulvinsäuren BS1 FA_{fl} des Bodensickerwassers mit Hg(II)-Zugabe nach SEC-Trennung

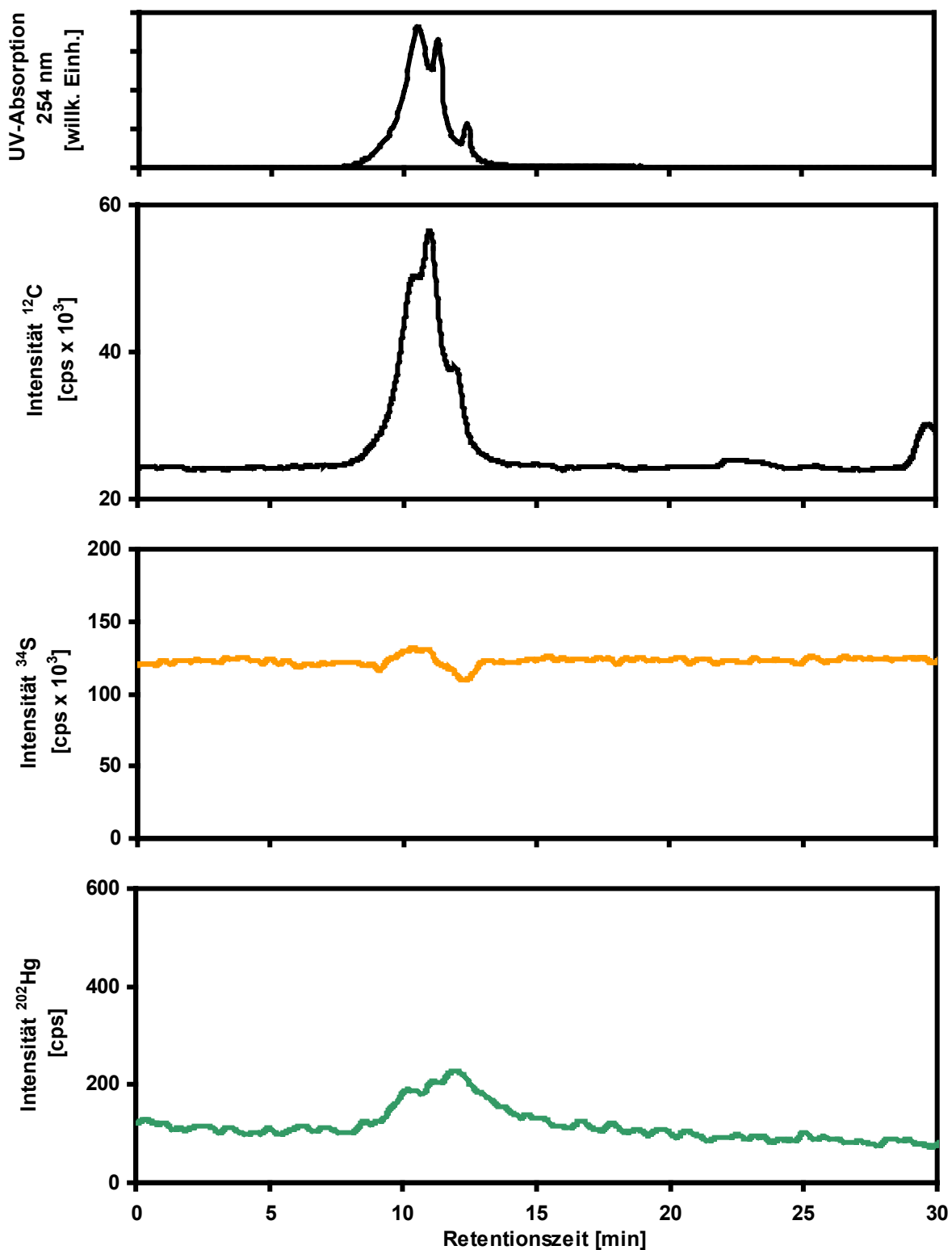


Abb. 91: UV-Absorption sowie Kohlenstoff-, Schwefel- und Quecksilber-Intensitäts-Chromatogramme der Fulvinsäuren ABV2 FA_{fl} des Abwassers nach SEC-Trennung (ohne Hg(II)-Zugabe)

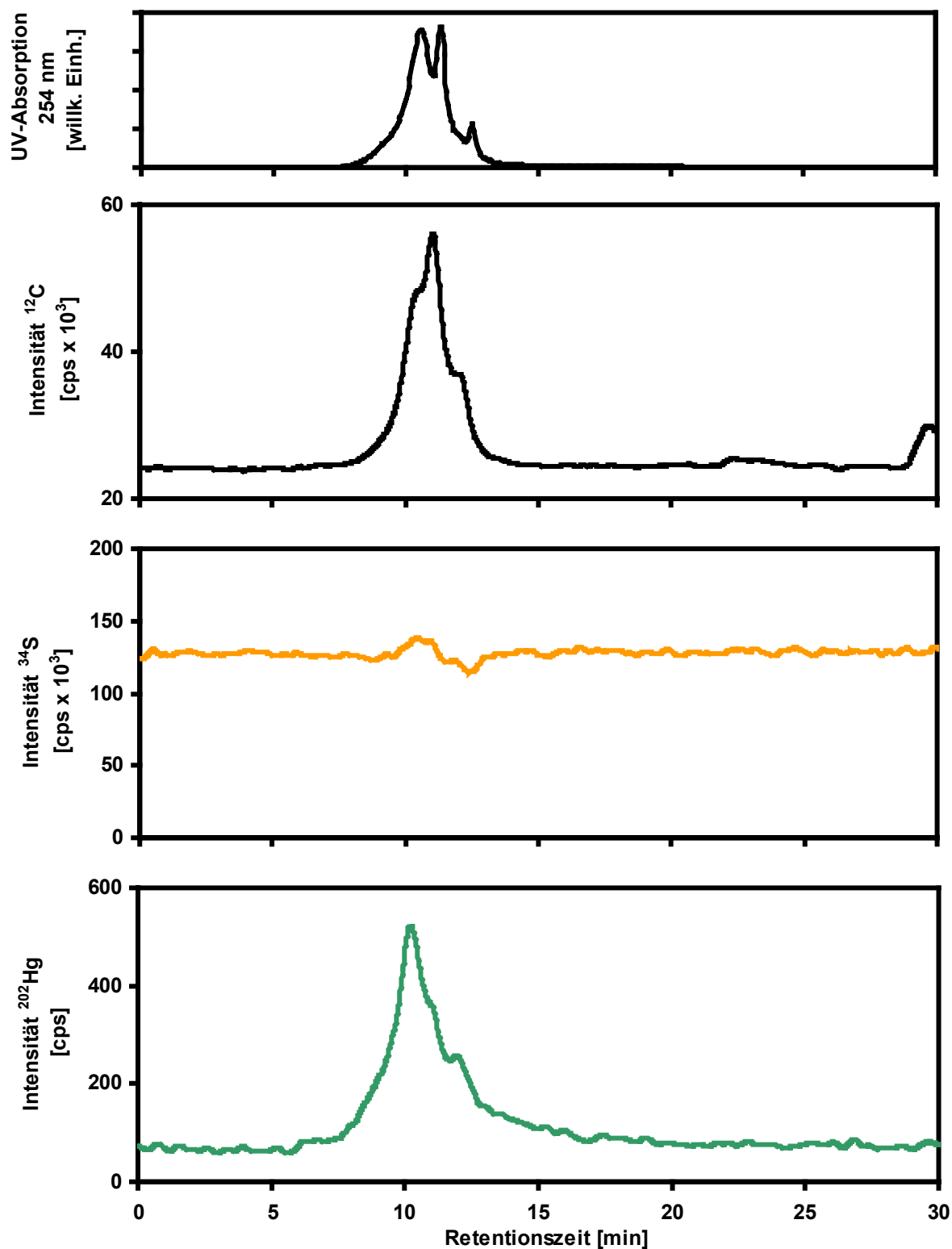


Abb. 92: UV-Absorption sowie Kohlenstoff-, Schwefel- und Quecksilber-Intensitäts-Chromatogramme der Fulvinsäuren ABV2 FA_n des Abwassers mit Hg(II)-Zugabe nach SEC-Trennung

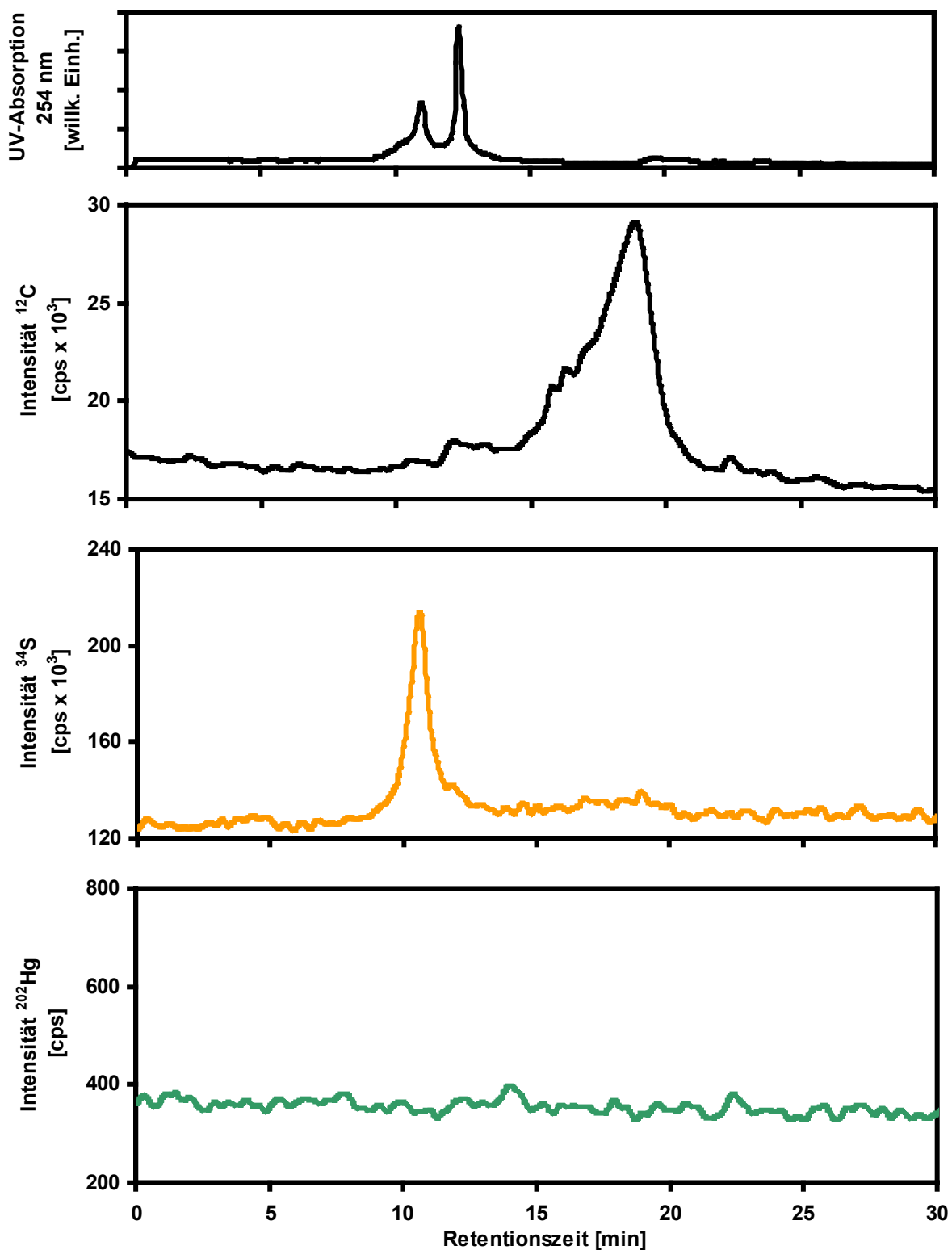


Abb. 93: UV-Absorption sowie Kohlenstoff-, Schwefel- und Quecksilber-Intensitäts-Chromatogramme des Abwassers ABV3 nach SEC-Trennung (ohne Hg(II)-Zugabe)

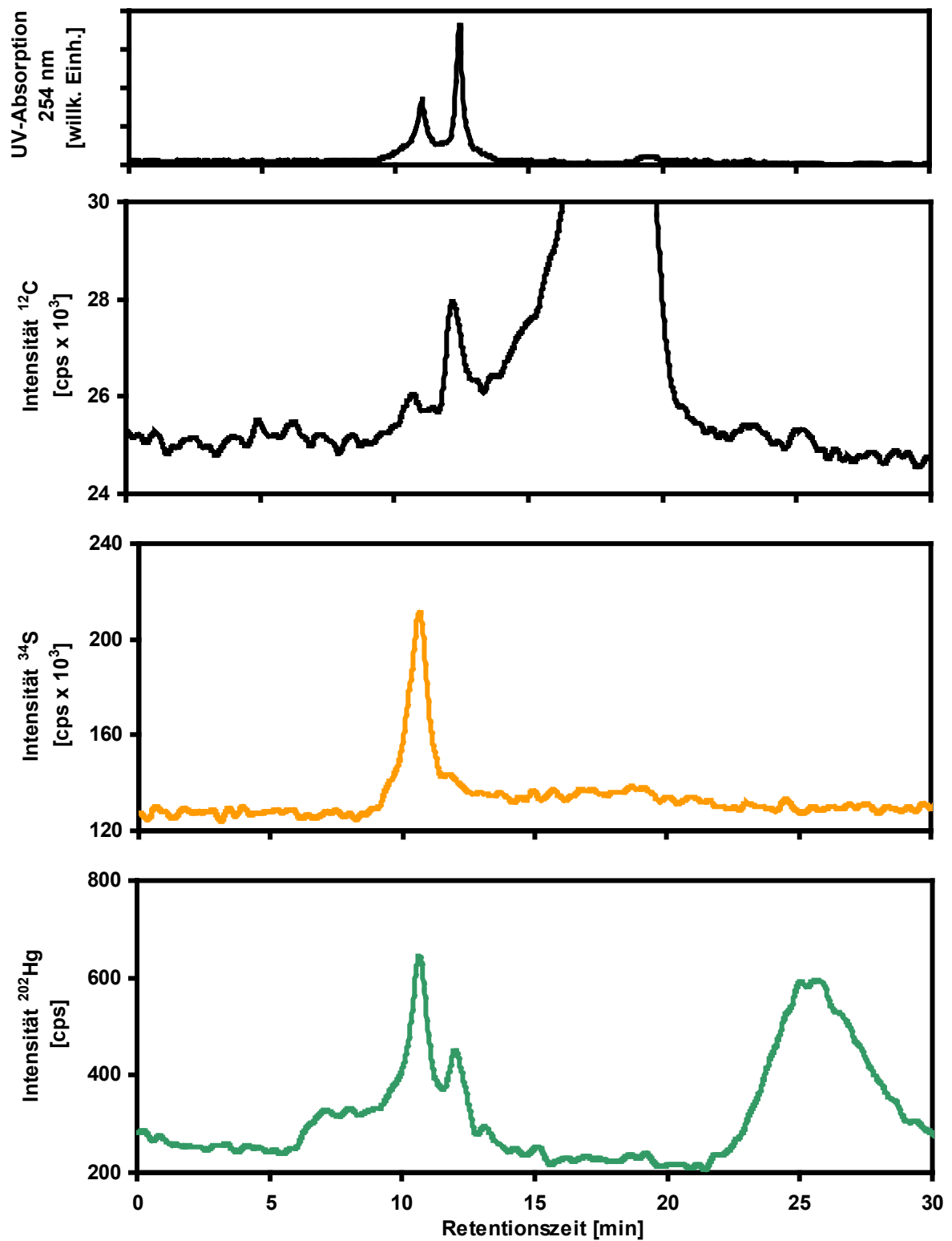


Abb. 94: UV-Absorption sowie Kohlenstoff-, Schwefel- und Quecksilber-Intensitäts-Chromatogramme des Abwassers ABV3 mit Hg(II)-Zugabe nach SEC-Trennung

3.9. Entwicklung einer online Isotopenverdünnungsanalyse für Schwefel bei CE/ICP-MS-Kopplung

3.9.1. Aufbau der CE/ICP-MS-Kopplung zur online MSIVA

Nach der Entwicklung und erfolgreichen Anwendung der online Schwefel-Isotopenverdünnungsanalyse für HPLC/ICP-MS-Kopplung, sollte die Übertragbarkeit auf andere chromatographische Methoden überprüft werden. Neben der schon seit längerem verwendeten GC/ICP-MS-Kopplung wurde in letzter Zeit auch die Kapillarelektrophorese (siehe 2.2.2) mit einem ICP-MS gekoppelt (CE/ICP-MS). Hierzu müssen spezielle Kopplungsstücke verwendet werden [92], die einerseits das Anlegen der benötigten Spannung zulassen, andererseits druckneutral arbeiten, um einen Einfluß auf die elektrophoretische Trennung auszuschließen. Auch die bisher verwendeten Zerstäuber mußten modifiziert werden, da die CE nur einen Fluß von 0.1-0.9 $\mu\text{L}/\text{min}$ aufweist, während normalerweise die Zerstäuber mit 10-1000 $\mu\text{L}/\text{min}$ betrieben werden. Das in dieser Arbeit verwendete Kopplungsstück ist in Abb. 95 dargestellt.

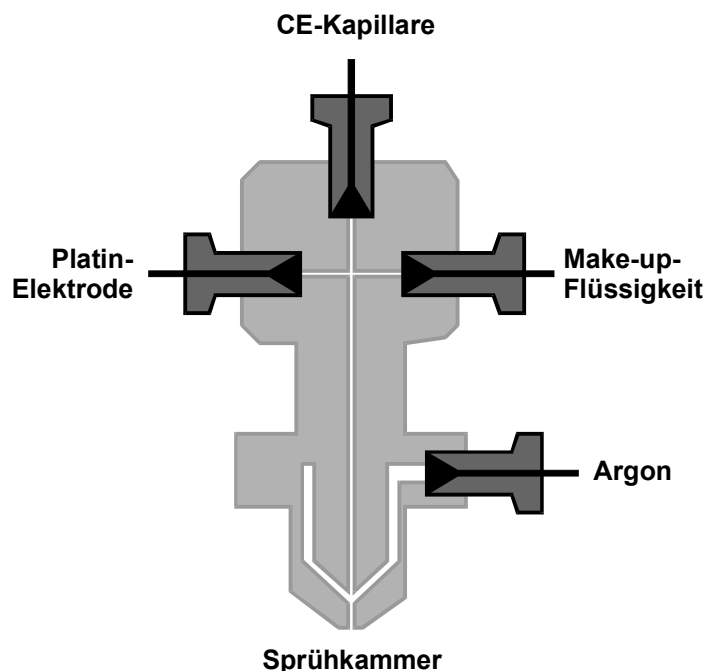


Abb. 95: Schematische Darstellung des CE/ICP-MS-Kopplungsstücks

Soll die online MSIVA für Schwefel bei CE/ICP-MS-Kopplung angewendet werden, muß ein konstanter Fluß des auf ^{34}S angereicherten Isotopenspikes gewährleistet sein. Dies ist bei der CE am besten dadurch zu realisieren, wenn man den ^{34}S -Spike der Make-up-Flüssigkeit (siehe Abb. 96) beimischt.

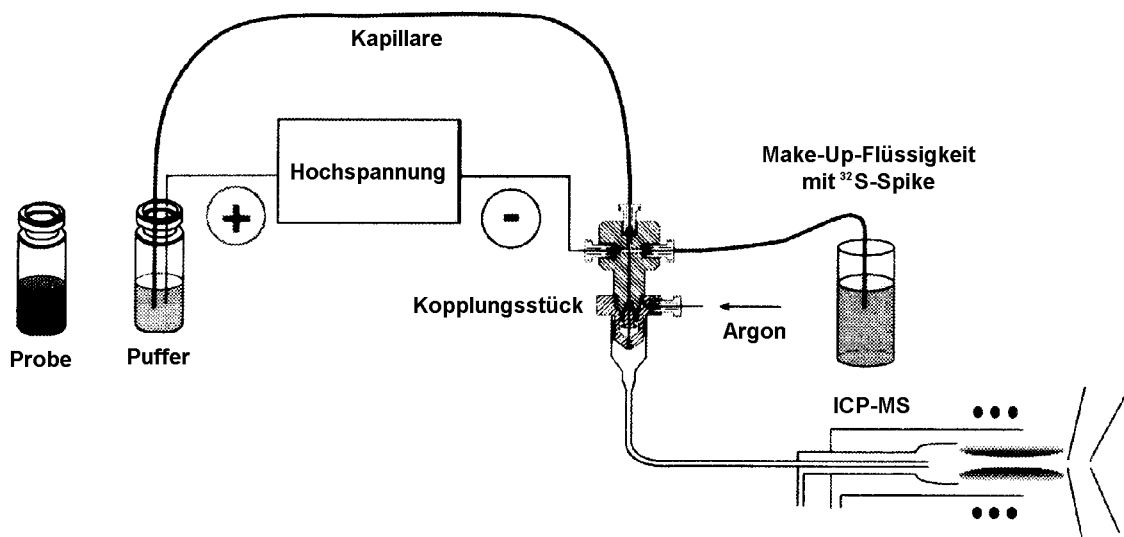


Abb. 96: Schematische Darstellung der CE/ICP-MS-Kopplung [93]

Da der Fluß der *Make-up*-Flüssigkeit, und somit auch der Massenfluß des ^{34}S -Spikes, von der jeweiligen Optimierung der Geräte abhängt, ist dieser Massenfluß bei jeder Meßreihe durch inverse MSIVA neu zu bestimmen. Hierzu ist es notwendig bei gleichen Bedingungen, wie sie auch bei der Messung herrschen, einen Schwefel-Standard genau bekannten Gehalts zuzugeben. Bei der HPLC/ICP-MS-Kopplung geschieht dies durch die Verwendung einer zusätzlichen Probenschleife, die mit dem Standard gefüllt wird und bei inverser MSIVA zugeschaltet wird. Dies ist bei der CE/ICP-MS-Kopplung nicht möglich, da eine Probenschleife die Meßbedingungen verändern würde. Man muß daher den Standard über die Kapillarsäule zuführen. Versuche, die Kapillare vollständig mit einem Standard zu füllen, führten nicht zum Erfolg, da durch die Trennwirkung der Elektrophorese im Verlauf der Messung eine An- bzw. Abreicherung auftrat. Hingegen führte die Beladung der Säule mit einer kleinen Menge Standard (entsprechend der später aufgegebenen Probenmenge) zu auswertbaren Ergebnissen. In Abb. 97 sind die Signalintensitäten von ^{32}S und ^{34}S sowie das entsprechende Isotopenverhältnis aufgetragen. Integriert man über den erhaltenen Peak, läßt sich nach Gl. (15) der Massenfluß des angereicherten ^{34}S -Spikes in der *Make-up*-Flüssigkeit berechnen. Wird nun eine Probe unter gleichen Bedingungen gemessen, kann nach Gl. (16) der Massenfluß an Schwefel bei CE/ICP-MS-Kopplung berechnet werden.

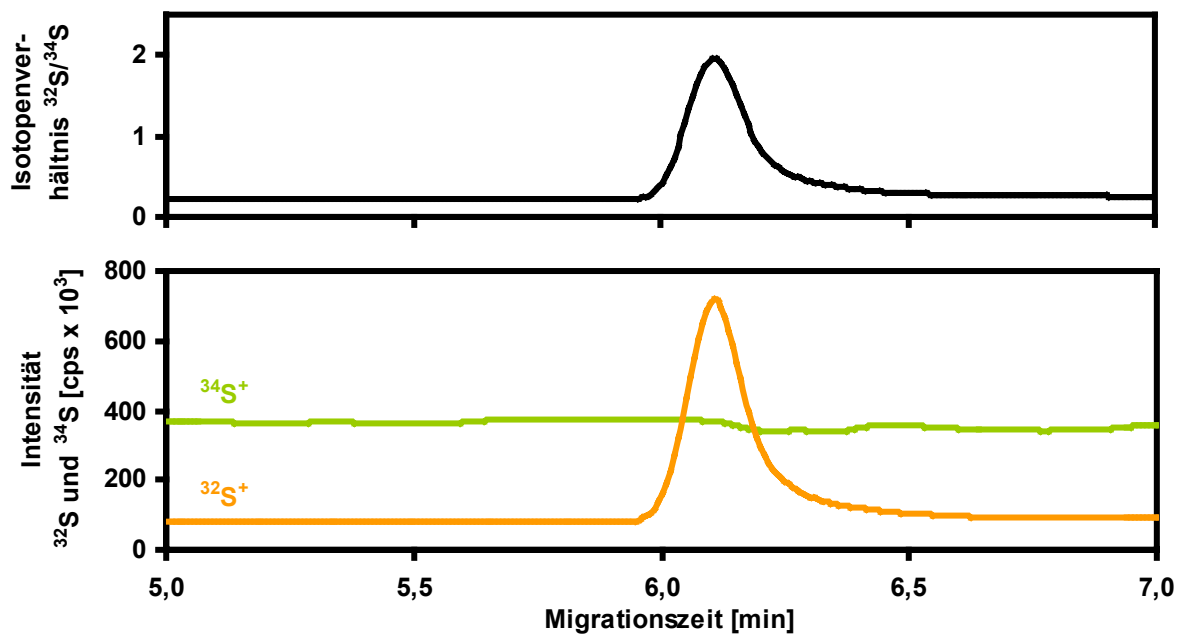


Abb. 97: Schwefel-Intensitäts-Chromatogramm sowie das aus den Intensitäten berechnete $^{32}\text{S}/^{34}\text{S}$ -Isotopenverhältnis des Schwefel-Standards bei inverser Isotopenverdünnung zur Berechnung des Spike-Massenflusses

3.9.2. Bestimmung von Schwefel in Metallothioneinen mit online MSIVA nach CE-Trennung

Metallothioneine sind Proteine mit einem Cysteingehalt von etwa 30% und hohen Metallbindungseigenschaften. Sie haben ein Molekulargewicht von 6-7 kDa und vermögen 7, 12 oder sogar 18 Metallionen - meist Cd(II), Cu(I), Hg(II) und Zn(II) – in Metall-Thiolat-Clustern zu binden, wodurch die Tertiärstruktur geprägt wird [94]. In tierischen und menschlichen Organismen haben Metallothioneine vielfältige Funktionen, z.B. beim Transport von Metallen im Organismus. Eine empfindliche und spezifische Bestimmung von Metallothioneinen aus kleinen Volumina menschlicher Cytosole ist eine wichtige Voraussetzung für die Erweiterung medizinisch-diagnostischer Vorgehensweisen. So stehen die Metallothioneine in Verdacht, bei der Alzheimer-Krankheit beteiligt zu sein [95]. Während man die Speziesbestimmung von Metallothioneinen mit CE mit Erfolg durchführt [50, 96, 97], ist bisher die Quantifizierung ein Problem gewesen. Hier bietet die online MSIVA eine gute Möglichkeit, über die Quantifizierung des Schwefel auch die Metallothioneine zu bestimmen. Weiterhin besteht durch die Multielementfähigkeit des ICP-MS auch

die Möglichkeit andere Elemente mittels MSIVA zu untersuchen, z.B. die an die Metallothioneine gebundenen Metallionen. Mit Hilfe der online MSIVA, die in Kooperation mit [REDACTED] und [REDACTED] (GKSS, Geesthacht) entwickelt wurde, konnte Schwefel in Metallothioneinen bestimmt werden. Hierzu wurde ein gereinigter Metallothionein-Standard aus Kaninchenleber verwendet, der eine Mischung mehrerer Metallothioneine enthält. Das erhaltene Massenflußdiagramm von Schwefel ist in Abb. 98 abgebildet.

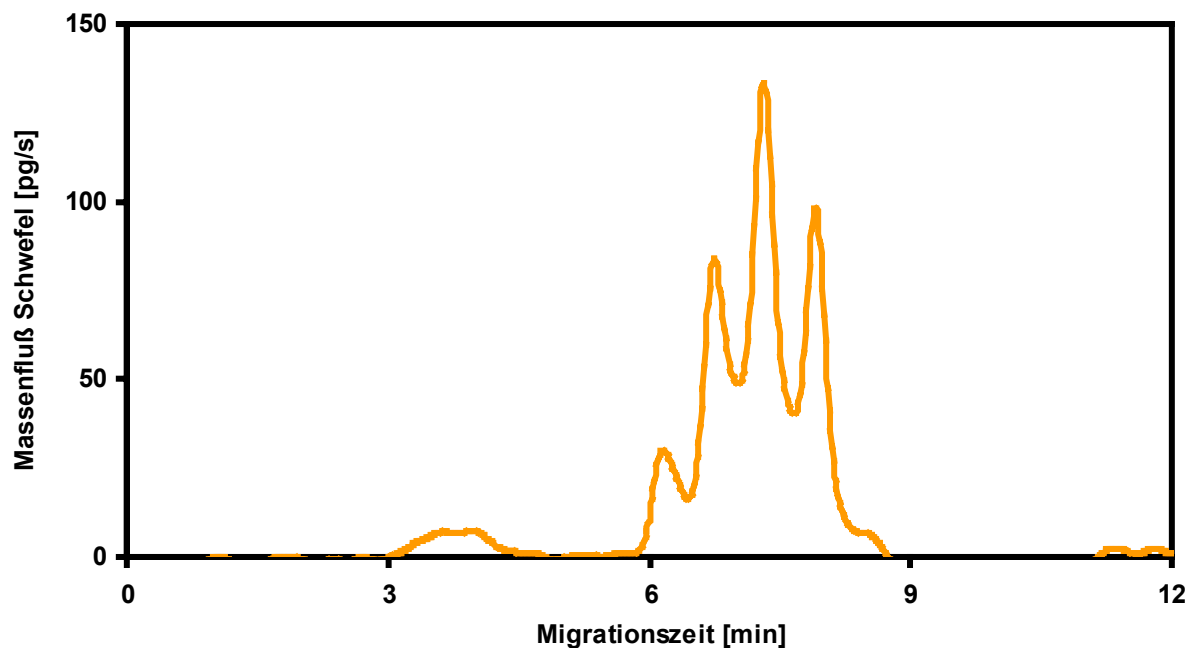


Abb. 98: Schwefel-Massenfluß-Chromatogramm eines mit CE getrennten Metallothionin-Mischstandards aus Kaninchenleber

Weiterhin wurden die Intensitäten der Isotope ^{63}Cu , ^{64}Zn , ^{85}Rb und ^{114}Cd (ohne MSIVA) bestimmt. Rubidium wurde als interner Standard in die Make-up-Flüssigkeit gegeben, um systembedingte Signalschwankungen aufzuzeigen. Die unterschiedliche Verteilung der Metalle Kupfer, Zink und Cadmium in den untersuchten Metallothioneinen ist in Abb. 99 dargestellt.

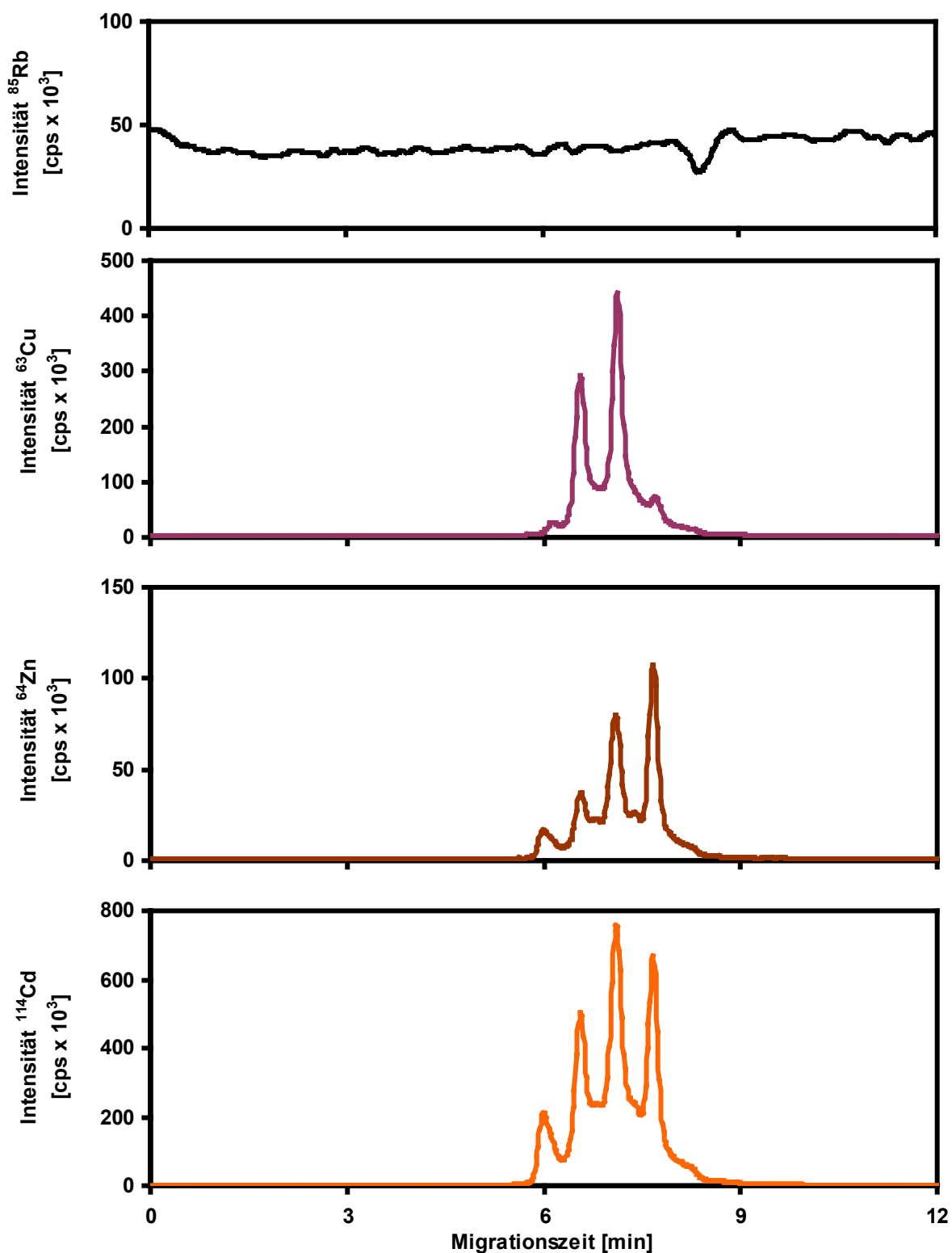


Abb. 99: Rubidium-, Kupfer-, Zink- und Cadmium-Intensitäts-Chromatogramme eines mit CE getrennten Metallothionin-Mischstandards aus Kaninchenleber

4. Diskussion der Ergebnisse

4.1. Entwicklung einer online MSIVA für Schwefel mit HR-ICP-MS

4.1.1. Quantifizierung von Schwefel mit online MSIVA in chromatographischen Fraktionen bei HPLC/ICP-MS-Kopplung

Die Bestimmung von Schwefel wird oft durch die geringe Nachweisstärke oder der aufwendigen Probenpräparation der entsprechenden Methode erschwert. Im allgemeinen werden in Feststoffen Nachweisgrenzen von 0.1-1.0 % erreicht [98]. Durch Verbrennung der Probe im Sauerstoffstrom konnte Schwefel in Mineralölproben im Bereich von 0.05-1.25 mg S/g spektroskopisch bestimmt werden [99]. Schwefel in wässrigen Proben (Bodensickerwässer) wurde nach Oxidation mit NaBrO mittels ICP-OES mit einer Nachweisgrenze von 1 µg S/g bestimmt [100], während der Einsatz der MSIVA (massenspektrometrischen Isotopenverdünnungsanalyse) mittels TIMS (Thermionen Massenspektrometrie) Nachweisgrenzen von 50 ng S/g ermöglichte [101]. Die Bestimmung von Schwefel in chromatographischen Fraktionen ist mit den erwähnten Methoden jedoch nicht möglich.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher eine Methode entwickelt, die Schwefel mit hoher Nachweisstärke in Echtzeit bestimmen kann. In Anlehnung an eine online MSIVA für Kohlenstoff wurde diese für Schwefel modifiziert. Für die MSIVA wurde ein isotopenangereicherter ^{34}S -Spike (als Sulfat) verwendet. Da bei Verwendung eines ICP-MS alle Schwefelisotope interferiert sind, wurde eine Massenauflösung von > 1800 benötigt. Daher wurde ein hochauflösendes Gerät (HR-ICP-MS) mit einer Aufklösung von 4500 verwendet. Ein ICP-MS mit Quadrupol-Massenseparator konnte nicht eingesetzt werden, da die indirekte Isotopenverhältnismessung über Schwefeloxide wegen nicht reproduzierbarer Oxidbildungsraten nicht möglich war. Der Experimentelle Aufbau ist in Kap. 3.6 dokumentiert. Es konnte eine Nachweisgrenze 100 pg S/s erreicht werden. Bezogen auf ein Probenvolumen von 100 µL und einer Peakbreite von 60 s ergibt sich eine Nachweisgrenze von 60 ng S/mL. Für die simultane Bestimmung der Kohlenstoff- und Quecksilber-Gehalte wurde eine Nachweisgrenze von 1.8 µg C/mL bzw. 1.2 ng Hg/mL erreicht.

Da die Konzeption der online MSIVA unabhängig vom Typ der chromatographischen Trennung ist, sind die mit SEC/ICP-MS erhaltenen Erfahrungen direkt auf andere Verfahren (z.B. Ionenchromatographie) anwendbar (siehe auch Kap. 4.1.2).

4.1.2. Quantifizierung von Metallothioneinen mittels online MSIVA von Schwefel bei CE/ICP-MS-Kopplung

Metallothioneine spielen im tierischen und menschlichen Organismus eine wichtige Rolle beim Transport von Metallen. Die cysteininhaltigen Proteine bilden mit vielen Metallionen Thiolat-Cluster, die die Tertiärstruktur prägen. In cerebralen Vorgängen spielen sie eine zentrale Rolle und sollen auch im Zusammenhang mit der Alzheimer-Krankheit stehen [95]. Im allgemeinen steht für die Analyse nur wenig Probenmaterial (z.B. menschliche Cytosole) zur Verfügung, so daß eine sehr leistungstarke Analytik gefordert ist. Da die CE mit sehr wenig Probenmaterial auskommt, ist sie in diesem Bereich eine der wichtigen Trennmethode. Die Kopplung mit einem ICP-MS als nachweisstarkem Detektor ermöglichte die Echtzeitdetektion der separierten Metallothionein-Spezies. Jedoch konnten diese bisher nicht quantifiziert werden. Deshalb wurde im Rahmen dieser Arbeit die online MSIVA für Schwefel (Kooperation mit ██████████ und ██████████, GKSS, Geesthacht) angewendet. Über die Quantifizierung des Schwefels und des Anteils des Cysteins im Protein läßt sich über das Molekulargewicht auch der Gehalt der Metallothioneine bestimmen. Die Metallothioneine MT1 und MT2 enthalten jeweils 20 Cysteine (siehe Abb. 100) und haben ein mittleres Molekulargewicht von 6850 g/mol, wobei die geringfügigen Molekulargewichtsabweichungen der einzelnen Isoformen hier nicht berücksichtigt wurden.

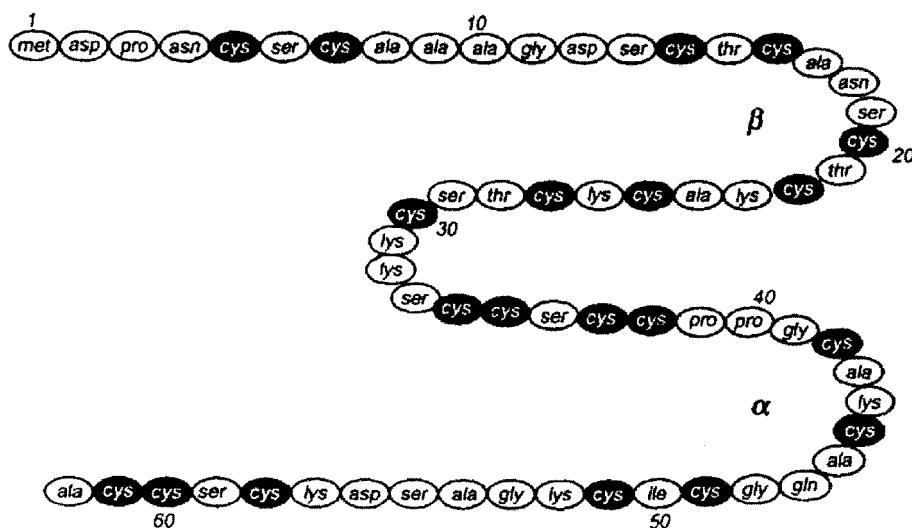


Abb. 100: Aminosäuresequenz der Metallothioneinisoform MT2a aus Kaninchenleber nach Daten aus [102]. Die 11 bzw. 9 Cysteine der α- und β-Region sind schwarz hervorgehoben.

Das aus dem Schwefel-Massenfluß (siehe Abb. 98, Seite 133) berechnete Metallothionein-Massenfluß-Chromatogramm einer Metallothionein-Mischung aus Kaninchenleber ist in Abb. 101 abgebildet. Werden die Massenflüsse der entsprechenden Fraktionen integriert, erhält man die Proteinmenge. Diese beträgt in diesem Fall für MT1 13.9 ng und für MT2 10.7 ng. Die Fraktionen F1 und F2 enthalten zwei nicht näher charakterisierte Metallothioneine, so daß eine Quantifizierung über die Schwefelmenge nicht möglich ist. Der breite Peak zwischen 3 und 4.5 min enthält keine Metallothioneine und ist auf Matrixreste zurückzuführen.

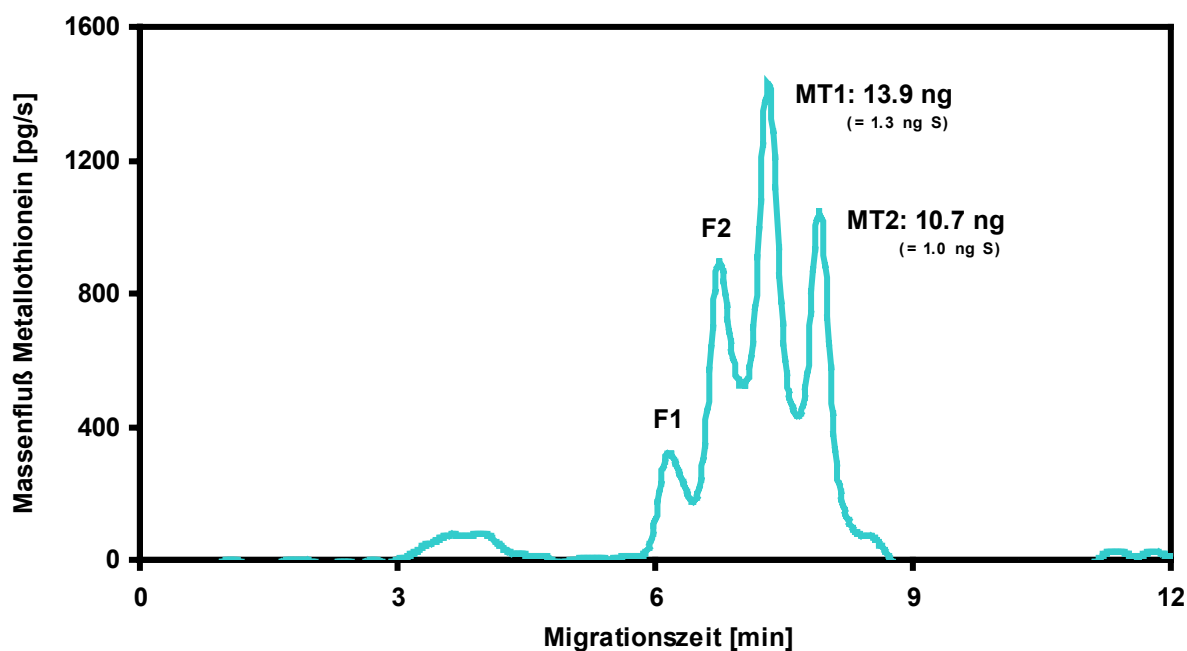


Abb. 101: Aus dem Schwefel-Massenfluß berechnetes Massenfluß-Chromatogramm für Metallothioneine bei einem Molekulargewicht von 6850 Da

Für die an die Metallothioneine gebundenen Metallionen gibt es bei der CE/ICP-MS-Kopplung zur Zeit noch keine online MSIVA. Die Schwierigkeit besteht in der Wahl eines geeigneten Komplexes für die entsprechenden Metallionen zur Kalibration des Spike-Massenflusses. Die weitere Verfahrensweise entspricht dann analog der online MSIVA für Schwefel. Daher können bisher nur die Intensitäten angegeben werden (siehe Abb. 99, Seite 134). Jedoch können unter Berücksichtigung der Isotopenhäufigkeiten und Annahme gleicher Ionisierungswahrscheinlichkeiten sowie Integration der einzelnen Peaks die Verhältnisse der Metalle untereinander angegeben werden. Diese sind für MT1 und MT2 (7.1 min bzw. 7.7 min Migrationszeit) sowie für die zwei weiteren, jedoch nicht näher spezifizierten, Metallothionein-Fraktionen F1 und F2 (6.1 min bzw. 6.6 min) in Tab. 42 angegeben. Die Werte

wurden jeweils auf Zink bezogen. Bei allen Metallothioneinen ist der gebundene Anteil von Cadmium am größten und übertrifft die Anteile von Kupfer und Zink um etwa eine Größenordnung. Die Affinität von Kupfer und Zink hingegen ist von der Metallothionein-Fraktion abhängig. Die Fraktionen F1 und MT2 binden mehr Zink, während die anderen beiden mehr Kupfer enthalten.

Tab. 42: Auf Zink bezogene Verhältnisse der ICP-MS-Intensitäten von Kupfer, Zink und Cadmium in Metallothioneinen eines Mischstandards aus Kaninchenleber (Migrationszeiten vergl. Abb. 101)

Metall	Metallothionein-Fraktion			
	F1	F2	MT1	MT2
Kupfer	0.4	6.6	4.1	0.2
Zink	1.0	1.0	1.0	1.0
Cadmium	23.2	21.4	14.3	9.1

4.2. Methodenvalidierung im Rahmen von Interlaborstudien

4.2.1. IMEP-9 Zertifizierungsrunde zur Qualitätssicherung der Analyse von Spurenelementen in Wasser

Die Zertifizierungsrunde IMEP-9 (*International Measurement Evaluation Program*) wurde durchgeführt, um Labors in aller Welt die Gelegenheit zu bieten, ihre eigenen Meßmethoden für Spurenelemente in Wasser zu überprüfen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde als Referenzlabor teilgenommen, d.h. es bestand die Aufgabe, mit 6 weiteren Labors Referenzwerte für die anderen teilnehmenden Labors zu bestimmen. Nach Beendigung der primären Zertifizierungsrunde wurden die Ergebnisse der 7 Referenzlabors vom IRMM (*Institute for Reference Materials and Measurements*) zusammengestellt und bewertet. Die endgültigen Referenzwerte wurden als „zertifizierter Wert“ oder „Richtwert“ charakterisiert, je nachdem ob primäre Methoden wie die MSIVA (massenspektrometrische Isotopenverdünnungsanalyse) oder auch andere Verfahren verwendet wurden. Die MSIVA gilt als sehr präzise Methode, die vergleichsweise richtige Ergebnisse liefert, so daß die mit MSIVA erhaltenen Ergebnisse bevorzugt wurden. Es wurden daher im Rahmen dieser Arbeit die Gehalte von Cr, Pb und U mit MSIVA bestimmt (siehe Kap. 3.2.4). Die ausgewählten Spurenelemente wurden möglichst von mehreren Labors untersucht, um eine statistische Sicherheit zu gewährleisten. Bei divergierenden Ergebnissen wurden nach Rücksprache mit einzelnen Labors gegebenenfalls Werte zurückgezogen. Die Unsicherheit der Werte wurden nach einem Ansatz von Pauwels et al. [103] berechnet, der auch die Richtlinien des ISO/BIMP [104] berücksichtigt.

Nach Abschluß der primären Zertifizierungsrunde wurde die Probe an alle teilnehmenden Labors versandt. Ergebnisse wurden von 201 Labors aus 35 Ländern erhalten. Die in dieser Arbeit durchgeführten Analysen sind mit „D“ gekennzeichnet. In Abb. 102 sind die Ergebnisse der 2 zertifizierenden Labors für Chrom angegeben. Da die Bestimmung von Chrom mit ICP-MS Probleme bereiten kann (Kohlenstoff-Argon-Molekülinterferenzen auf den Massen 52 und 53), wurde der Chromgehalt allein aufgrund der TIMS-Messung (diese Arbeit) als „zertifiziert“ bewertet. Bei der TIMS (Thermionen Massenspektrometrie) wurde Chrom vor der Analyse durch Elektrolyse isoliert, so daß keine Matrixeinflüsse zu beobachten waren. Die Ergebnisse aller teilnehmenden Labors sind in Abb. 103 dargestellt. Es sind deutlich die teilweise großen Abweichungen vom zertifizierten Wert zu erkennen. 13 Arbeitsgruppen lagen außerhalb des ± 50 %-Bereichs.

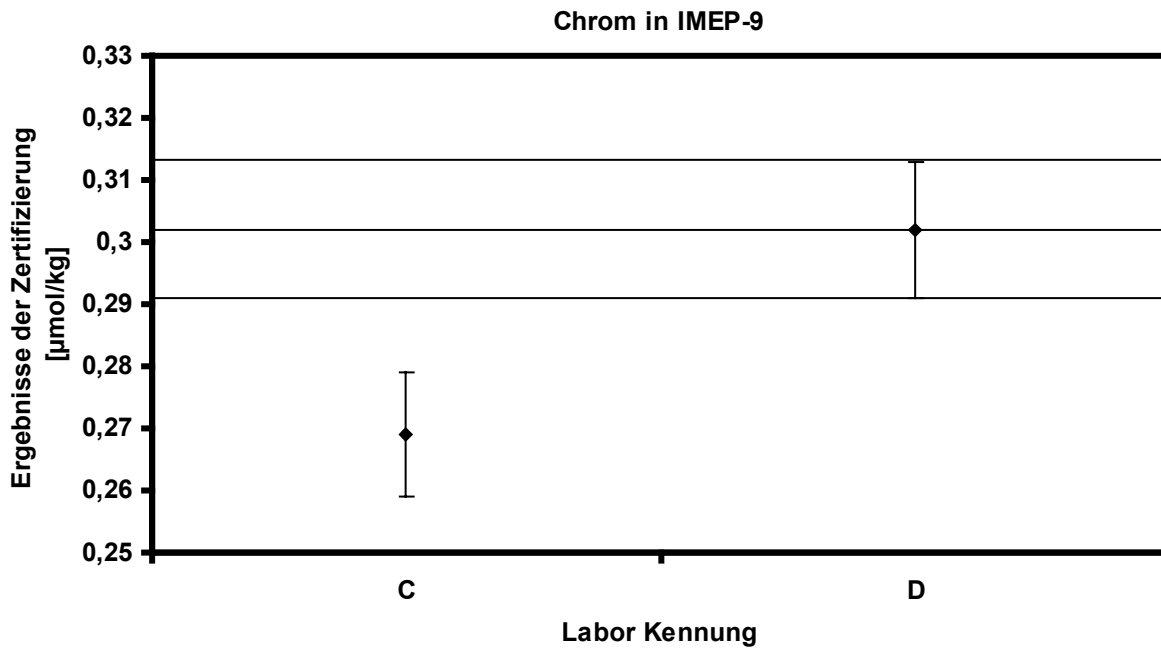


Abb. 102: Graphische Darstellung der Chrom-Gehalte sowie der zertifizierte Wert ($0.302 \pm 0.011 \mu\text{mol/kg}$)

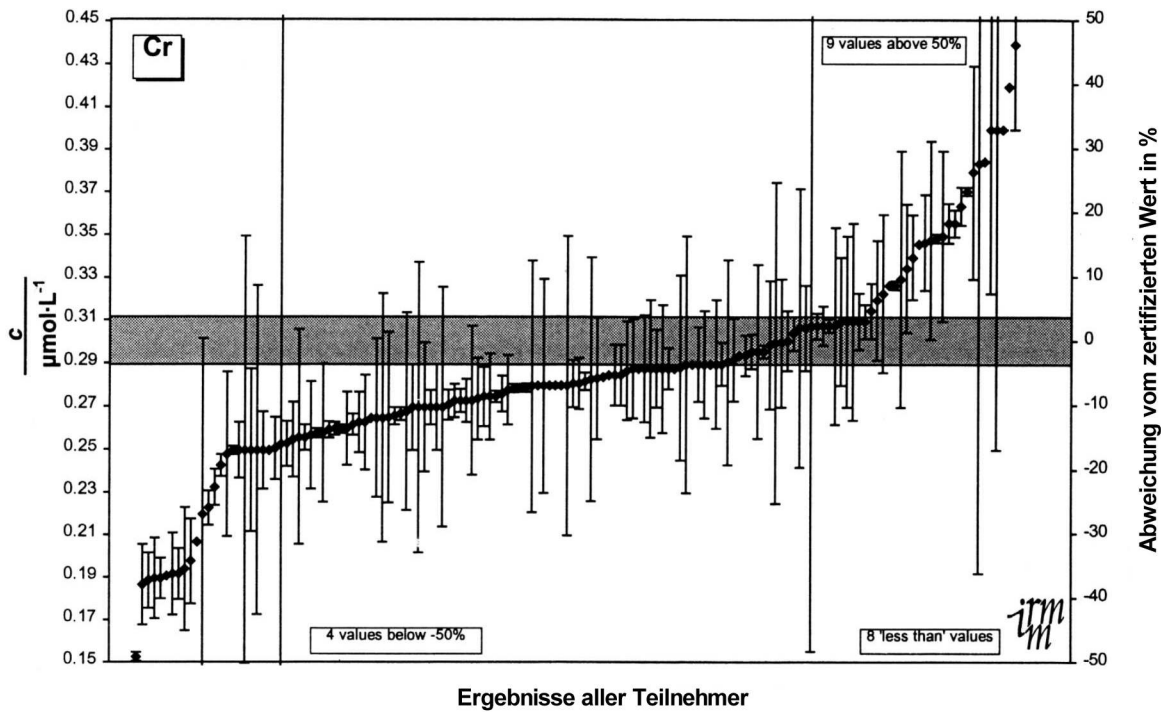


Abb. 103: Graphische Darstellung der Chrom-Gehalte aller teilnehmenden Labors

Für Blei fanden 6 zertifizierende Labors Werte mit zufriedenstellender Übereinstimmung (Abb. 104). Der in dieser Arbeit erhaltene Blei-Gehalt liegt genau im Bereich des zertifizierten (mittel) Werts, wobei die Präzision der Messung deutlich über der der anderen Labors liegt. Die Ergebnisse aller teilnehmenden Labors sind in Abb. 105 dargestellt. Wiederum streuen die abgegebenen Werte deutlich um den zertifizierten Wert, wobei 22 außerhalb des $\pm 50\%$ -Bereichs lagen.

Der Uran-Gehalt wurde von 3 zertifizierenden Labors ermittelt (Abb. 106). Da die Werte keinen Ausreißer aufweisen, wurde der Mittelwert bestimmt. Der in dieser Arbeit bestimmte Uran-Gehalt weicht etwas vom zertifizierten Wert ab, liegt jedoch dennoch im Fehlerbereich. Die Ergebnisse aller teilnehmenden Labors sind in Abb. 107 dargestellt, jedoch konnten nur wenige Teilnehmer den Uran-Gehalt bestimmen. 6 Ergebnisse lagen außerhalb des $\pm 50\%$ -Bereichs.

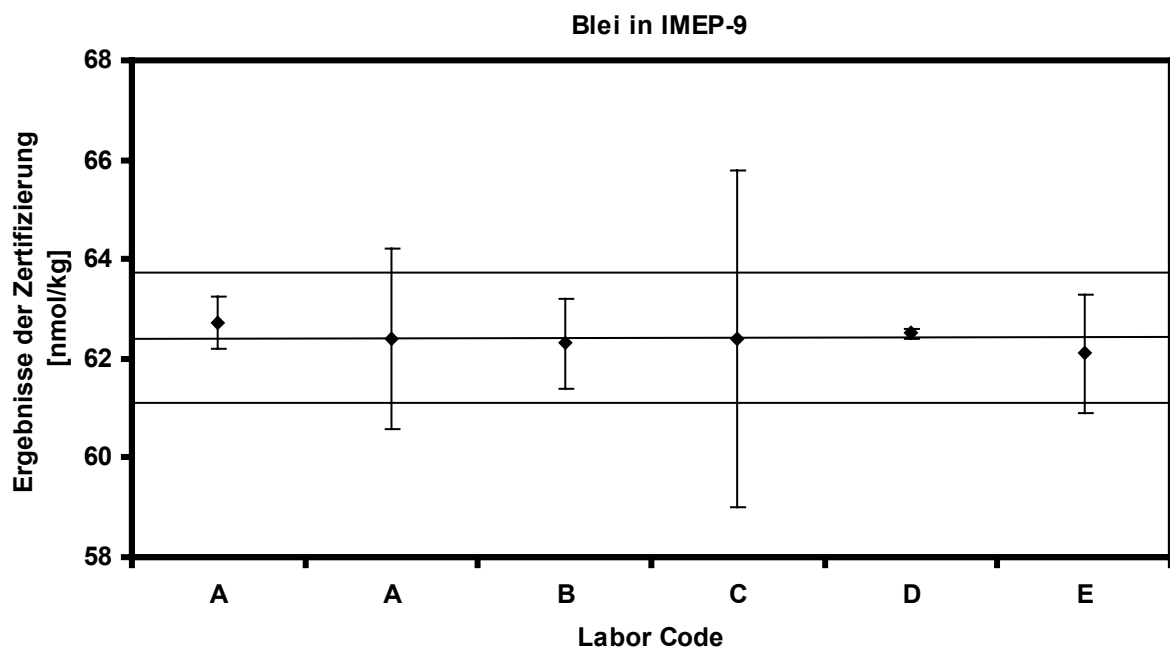


Abb. 104: Graphische Darstellung der Blei-Gehalte sowie der zertifizierte Wert (62.4 ± 1.3 nmol/kg)

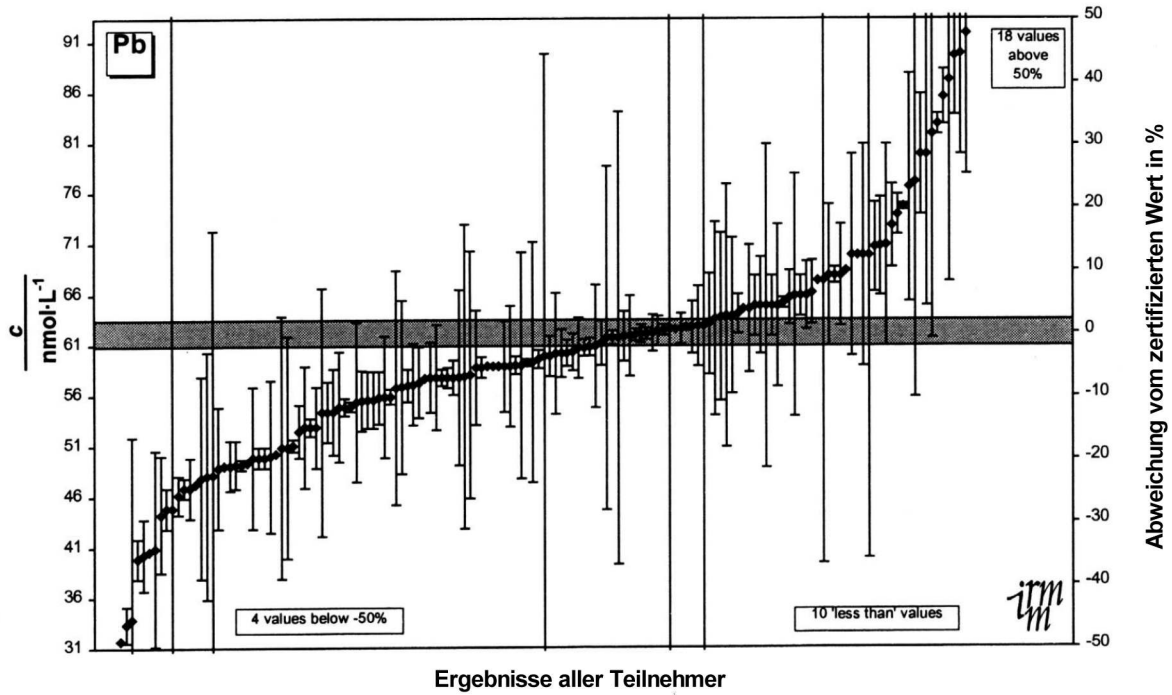


Abb. 105: Graphische Darstellung der Blei-Ergebnisse aller teilnehmenden Labors [105]

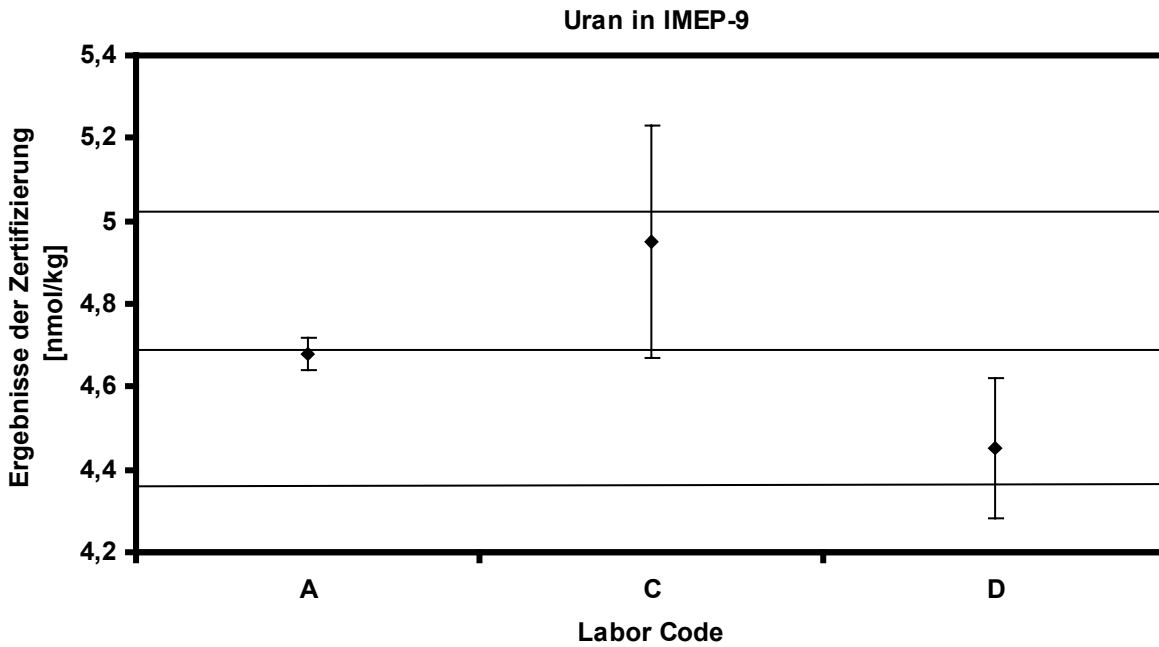


Abb. 106: Graphische Darstellung der Uran-Gehalte sowie der zertifizierte Wert (4.69 ± 0.33 nmol/kg)

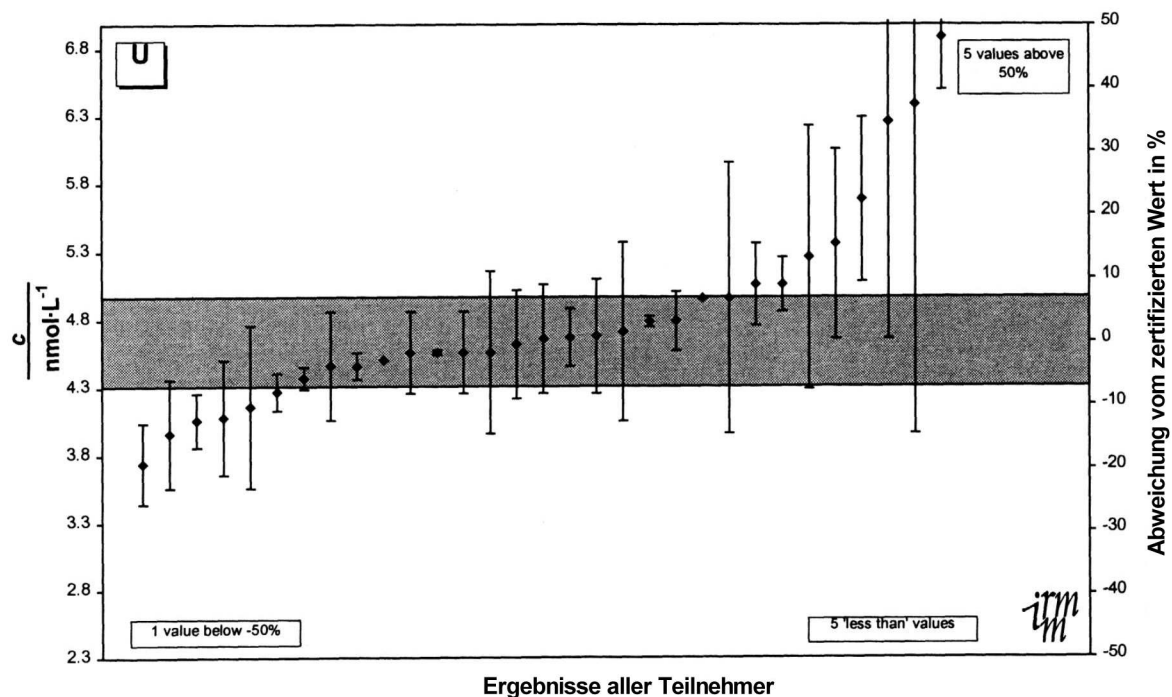


Abb. 107: Graphische Darstellung der Uran-Ergebnisse aller teilnehmenden Labors [105]

4.2.2. Interlaborvergleich der Ergebnisse für Kohlenstoff- und Schwefel-Gesamtgehalte in Huminstoffen

In Kap. 3.7.1 sind die Ergebnisse der mit MSIVA erhaltenen Gesamtgehaltsbestimmung von Kohlenstoff und Schwefel in den untersuchten HS-Proben aufgeführt. Da die MSIVA als eine sehr präzise Methode gilt, die zudem vergleichsweise richtige Werte liefert, sollen im folgenden die Ergebnisse mit MSIVA mit denjenigen anderer Arbeitsgruppen und Methoden verglichen werden. Abb. 108 zeigt die mit Elementaranalyse () und MSIVA (diese Arbeit) ermittelten Kohlenstoff-Gehalte der Humin- und Fulvinsäuren der Modellsubstanzen des ROSIG-Projektes. Die Standardabweichungen der MSIVA ($n=3$) sind jeweils eingezeichnet, während die Werte der Elementaranalyse nur einfach bestimmt wurden ($n=1$). Es ergaben sich Unterschiede der Kohlenstoff-Gehalte zwischen 0.2 % (FS18) und 30 % (HS17). Da sich die Proben HS06 und HS17 nicht vollständig lösten, ist die große Abweichung erklärbar. Bei einer mittleren Abweichung von 8.7 % und unter Berücksichtigung, daß die Elementaranalysenwerte keine Mehrfachmessungen aufweisen, kann von einer guten Übereinstimmung der Werte gesprochen werden. Die entsprechenden Schwefel-Gehalte der Proben sind in Abb. 109 dargestellt.

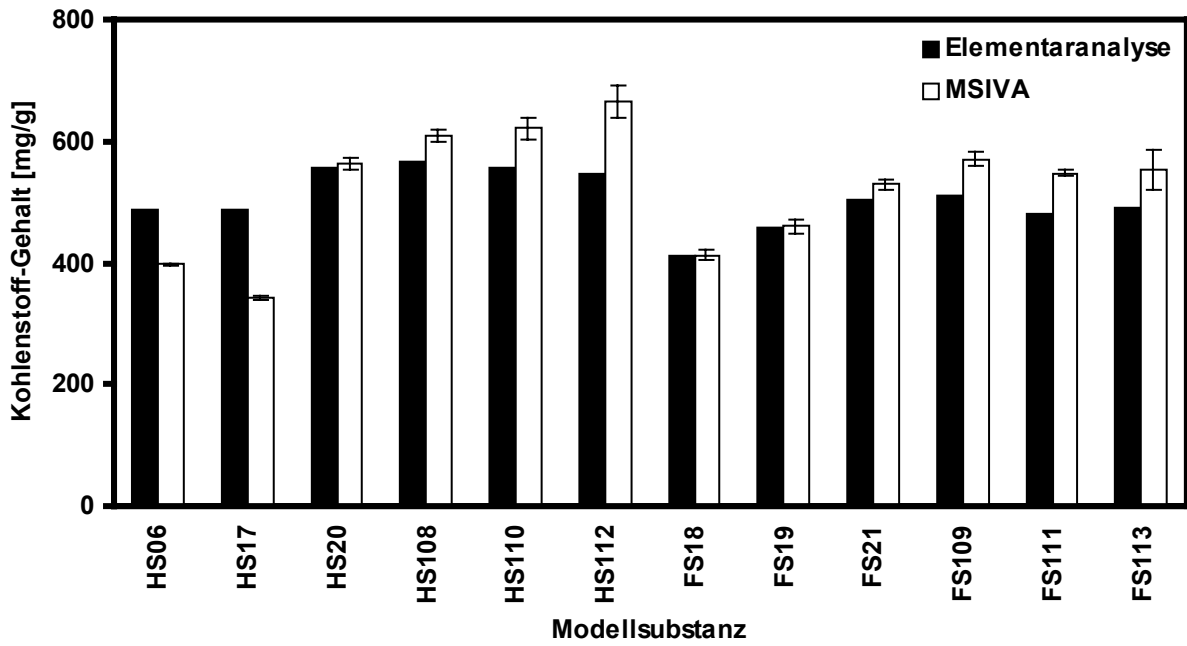


Abb. 108: Vergleich der mit Elementaranalyse und MSIVA erhaltenen Kohlenstoff-Gehalte der Humin- und Fulvinsäuren der Modellsubstanzen des ROSIG-Projektes

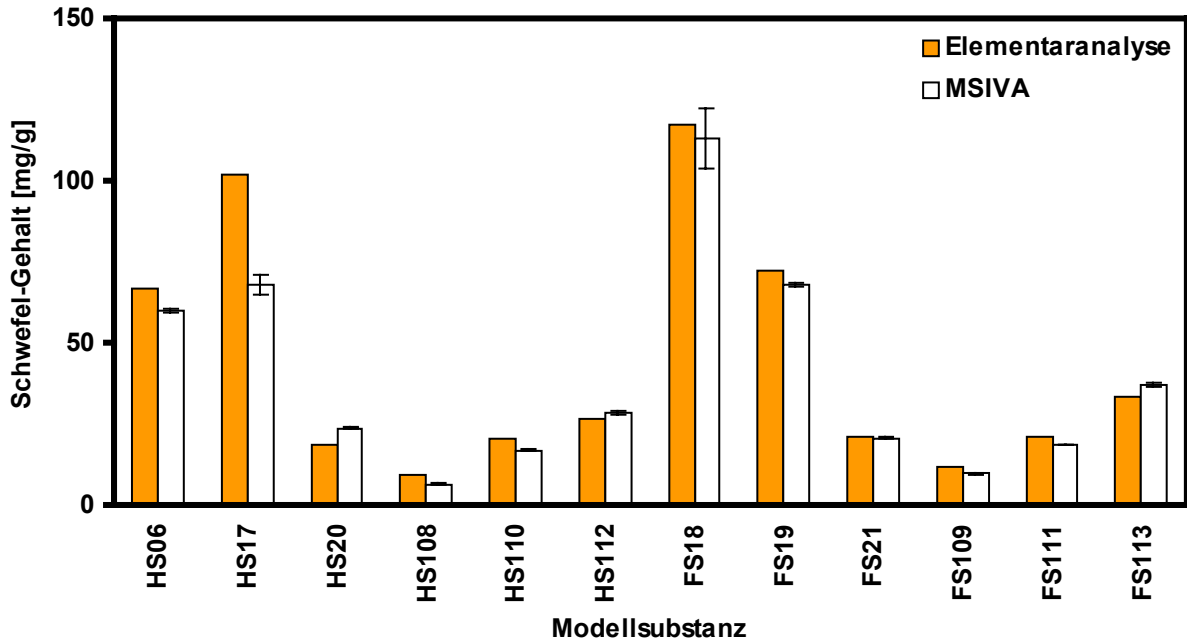


Abb. 109: Vergleich der mit Elementaranalyse und MSIVA erhaltenen Schwefel-Gehalte der Humin- und Fulvinsäuren der Modellsubstanzen des ROSIG-Projektes

Eine Zielsetzung der Modellsubstanzen war es, den Einfluß des Schwefel-Gehalts in HS gezielt untersuchen zu können. In Abb. 109 sind deutlich die beabsichtigten, unterschiedlichen Schwefel-Gehalte der Proben zu erkennen. Jedoch weichen die Ergebnisse der Elementaranalyse teilweise erheblich von den mit MSIVA erhaltenen Werten ab. Die Unterschiede der Schwefelgehalte betragen zwischen 1.4 % (FS21) bis zu 33 % (HS17). Bei einer mittleren Abweichung von 13 % (ohne HS06 und HS17) kann nur noch von einer mäßig guten Übereinstimmung gesprochen werden. Hier zeigt sich die besondere Stärke der MSIVA, die bei vollständiger Vermischung von Probe und Spike, verlust- und matrixunabhängig korrekte Ergebnisse liefert.

Der Vergleich der Kohlenstoff-Gehalte der ROSIG-Bezugssubstanzen ist in Abb. 110 graphisch dargestellt. Die prozentualen Unterschiede weisen eine Spanne von 1 % (HO12 K) bis 163 % (ABV3 K) auf. Auch bei den Bezugssubstanzen ließen sich zwei Proben nicht vollständig lösen. Es handelt sich um die Proben HO13 HA und SV1 HA, was den dort gefundenen niedrigeren Gehalt erklärt. Die Probe ABV3 K ist das Ultrafiltrat eines kommunalen Abwassers. Die Elementaranalyse zeigt bei dieser Probe einen deutlich geringeren Kohlenstoff-Gehalt, der bei der entsprechenden Fulvinsäure (ABV3 FA) nicht zu beobachten ist. Betrachtet man diese Werte als Ausreißer, ergibt sich eine mittlere Abweichung von 5 %, die eine gute Übereinstimmung der beiden Methoden zeigt.

In Abb. 111 sind die entsprechenden Schwefel-Gehalte der Proben des ROSIG-Projektes gezeigt. Die Schwefel-Gesamtgehalte liegen im allgemeinen unter 1 % und somit niedriger als die der Modellsubstanzen. Die Abweichungen der Elementaranalyse betragen im Vergleich zur MSIVA 5 % (BS1 HA) bis 66 % (ABV3 K).

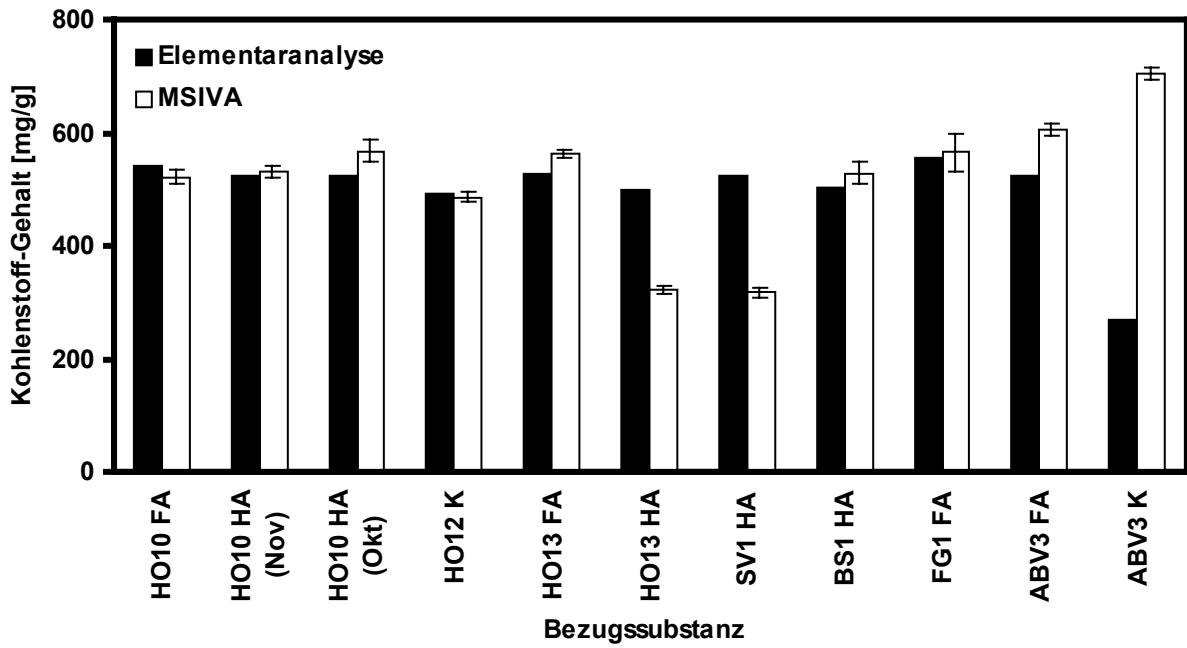


Abb. 110: Vergleich der mit Elementaranalyse und MSIVA erhaltenen Kohlenstoff-Gehalte der Bezugssubstanzen des ROSIG-Projektes

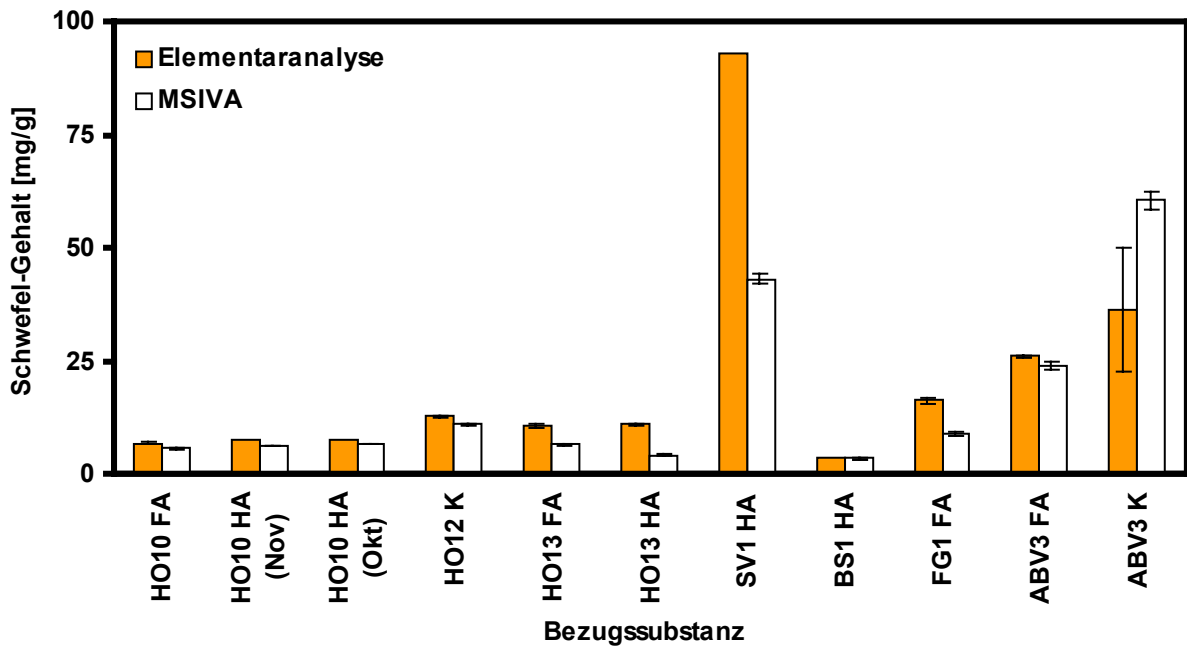


Abb. 111: Vergleich der mit Elementaranalyse und MSIVA erhaltenen Schwefel-Gehalte der Bezugssubstanzen des ROSIG-Projektes

Der in Abb. 112 dargestellte Vergleich der Kohlenstoff-Gehalte der Proben des USGS zeigt eine gute Übereinstimmung. Für die Proben F1HA und MRHA liegen keine elementaranalytischen Daten vor. Die Abweichungen der anderen Proben betragen 1.1 % (SRFA) bis 41.9 % (ORFA) sowie die mittlere Abweichung 11.7 %.

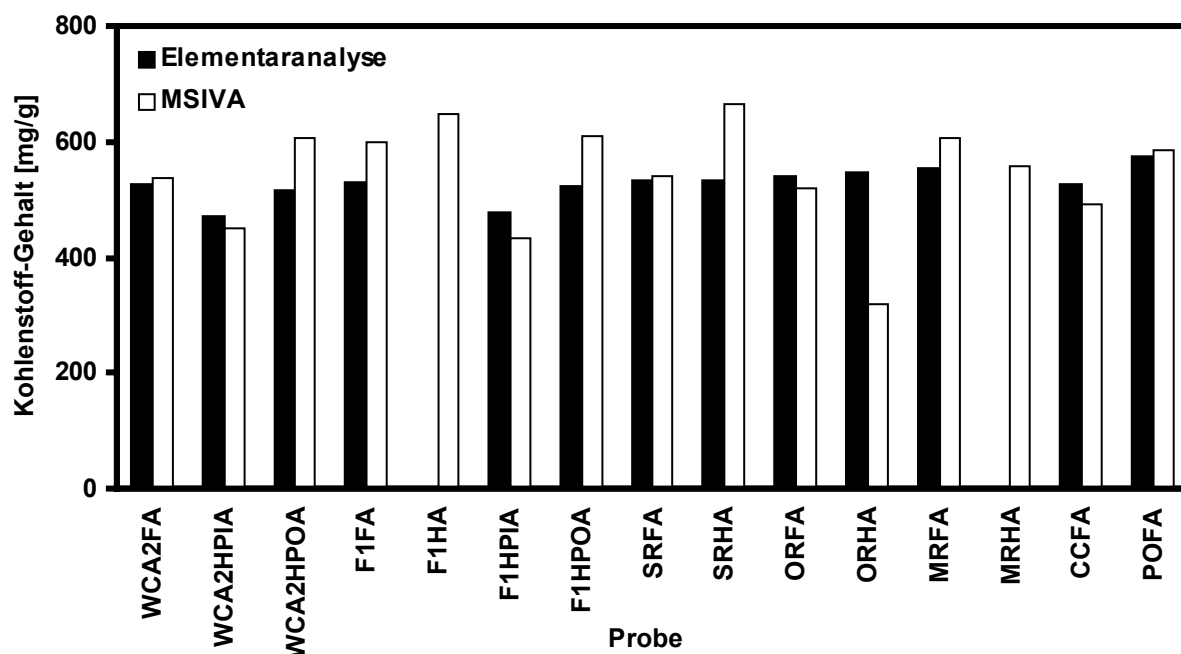


Abb. 112: Vergleich der mit Elementaranalyse und MSIVA erhaltenen Kohlenstoff-Gehalte der Proben des USGS

Die entsprechenden Werte für Schwefel (Abb. 113) zeigen eine größere mittlere Abweichung (26.4 %) und eine Spanne von 7.1 % (SRHA) bis 73.3 % (ORHA). Um den Einfluß von Wägeungenauigkeiten auszuschließen, sind im folgenden die Verhältnisse von Kohlenstoff und Schwefel der Modellsubstanzen (Abb. 114) und Bezugssubstanzen des ROSIG-Projektes (Abb. 115) sowie der Proben des USGS (Abb. 116) dargestellt. Auffällig ist, daß bei der Untersuchung der Proben mit MSIVA ein höheres Kohlenstoff/Schwefel-Verhältnis gefunden wird. Dies kann in einem Minderbefund des Kohlenstoff-Gehalts oder einem zu hoch bestimmten Schwefel-Gehalt bei der Elementaranalyse im Vergleich zur MSIVA begründet sein.

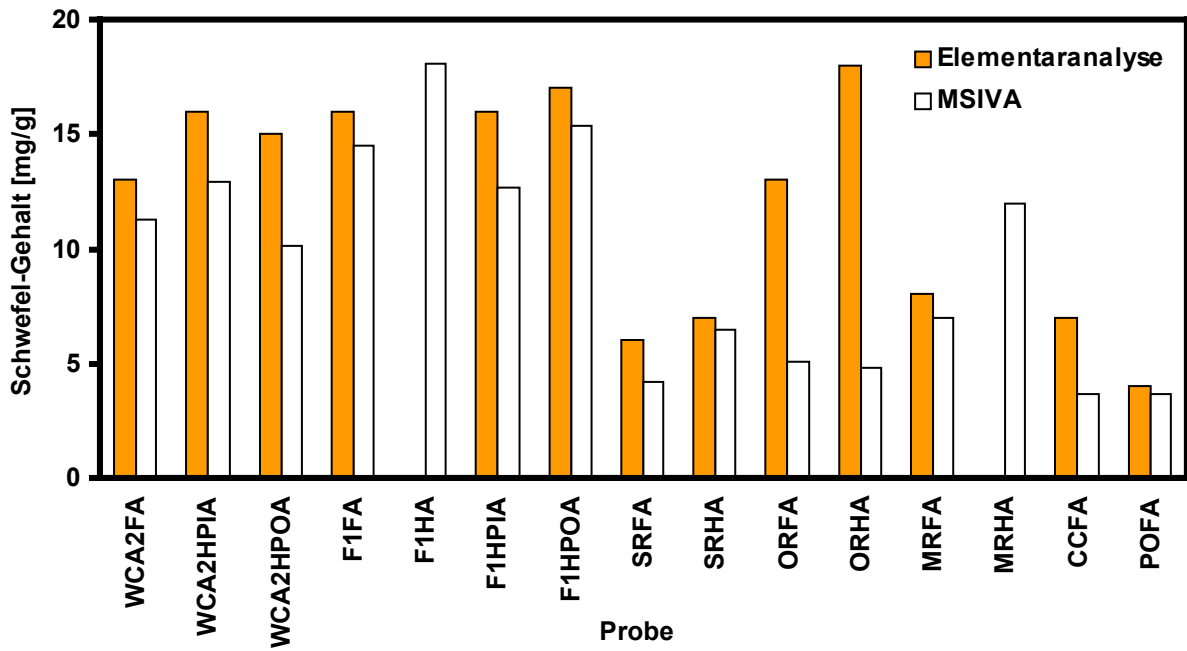


Abb. 113: Vergleich der mit Elementaranalyse und MSIVA erhaltenen Schwefel-Gehalte der Proben des USGS

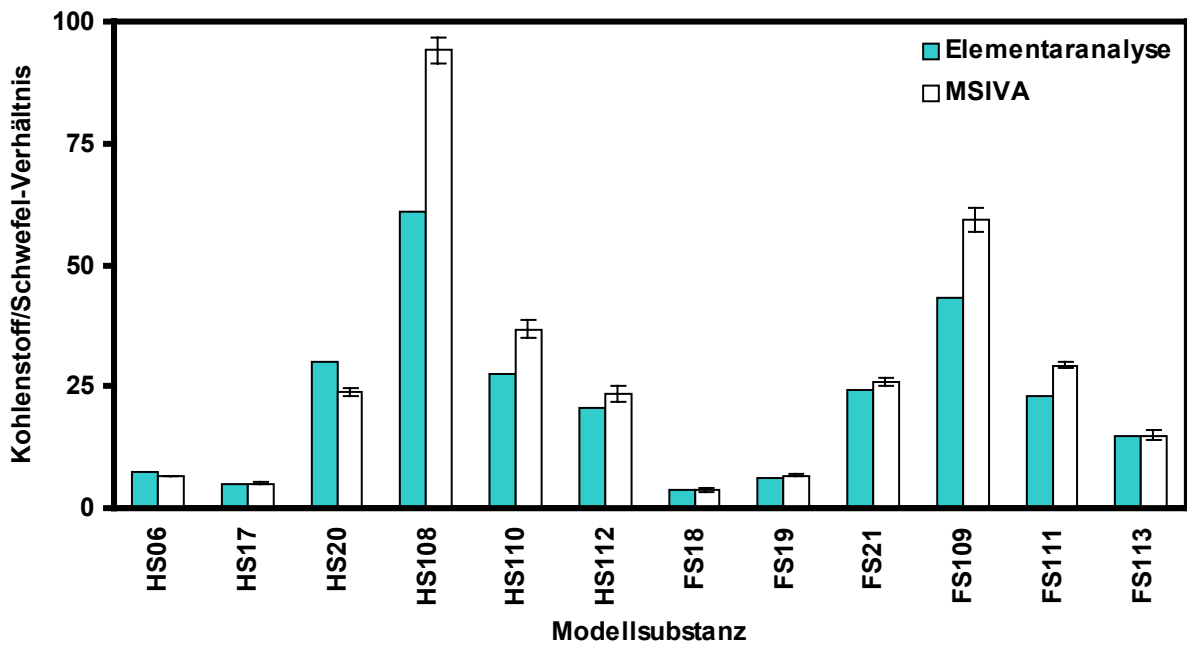


Abb. 114: Vergleich der mit Elementaranalyse und MSIVA erhaltenen Kohlenstoff/Schwefel-Verhältnisse der Modellsubstanzen des ROSIG-Projektes

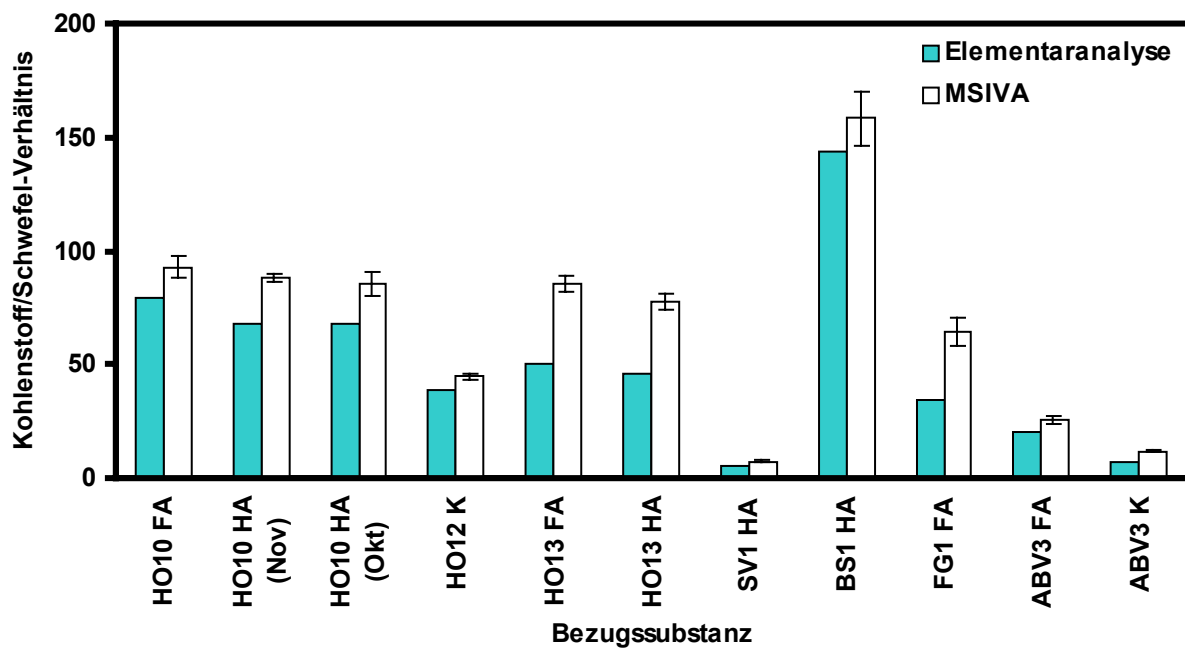


Abb. 115: Vergleich der mit Elementaranalyse und MSIVA erhaltenen Kohlenstoff/Schwefel-Verhältnisse der Bezugssubstanzen des ROSIG-Projektes

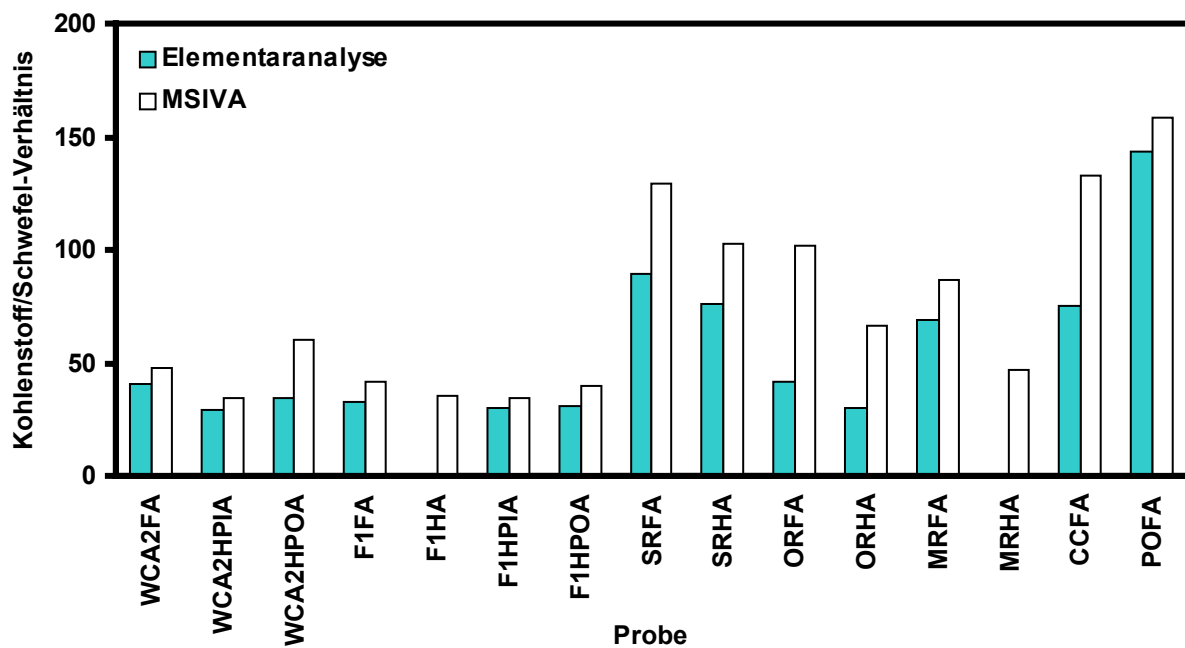


Abb. 116: Vergleich der mit Elementaranalyse und MSIVA erhaltenen Kohlenstoff/Schwefel-Verhältnisse der Proben des USGS

4.3. Fraktionierung von Huminstoffen mit SEC

4.3.1. Retentionszeiten von Original-, Fulvin- und Huminsäureproben

Die SEC hat sich als leistungsstarke Methode zur Charakterisierung von HS erwiesen. Sie bietet im Vergleich zur oftmals angewendeten Ultrafiltration (siehe Kap. 3.3.3) viel detailliertere Informationen über die Größenverteilung von HS und ist als sehr schonendes Trennverfahren sogar in den niedrigen, natürlichen Konzentrationsbereichen einsetzbar. Die Berechnung des Molekulargewichts von HS über die Retentionszeit (bzw. Größenverteilung) ist wegen des Fehlens von HS-Molekulargewichts-Standards weiterhin ein Problem. Abb. 25 (Seite 53) zeigt eindrucksvoll, daß die Korrelation von Retentionszeit und Molekulargewicht nur unter Berücksichtigung der entsprechenden Stoffklassen geschehen kann.

Die durchschnittliche Retentionszeit der Kohlenstoff-Hauptfraktion der untersuchten Huminstoffe ist in Abb. 117 gezeigt. In die Betrachtung wurden 17 Fulvinsäuren, 11 Huminsäuren und 7 Originalwasserproben einbezogen. Die Kugel repräsentiert den Mittelwert der Retentionszeiten mit entsprechender Standardabweichung und die schwarzen Linien jeweils die längste bzw. kürzeste gemessene Retentionszeit. Anzumerken ist, daß bei den Originalwasserproben jeweils ein hoher Anteil niedermolekularer Verbindungen (bei ca. 25 min Retentionszeit) gefunden wurde. Dieser ist nicht in die Betrachtung einbezogen worden, da es sich nicht um Huminstoffe im eigentlichen Sinne handelt. Es ist davon auszugehen, daß diese Fraktionen aus monomeren oder höchstens oligomeren Kohlenhydraten, Aminosäuren oder Lignine gebildet werden. Auch ohne diese Fraktion unterscheiden sich die Originalwasserproben (13.1 min) deutlich in den Retentionszeiten von den isolierten Proben, während der Unterschied zwischen den Humin- (10.6 min) und Fulvinsäuren (10.9 min) nicht signifikant ist. Im Mittel eluieren Huminsäuren vor den Fulvinsäuren und sollten daher laut SEC etwas größer sein. Dies ist vielleicht auf die höhere Funktionalität der Fulvinsäuren zurückzuführen, die durch die polaren Anziehungskräfte ein stärkeres Zusammenballen bewirkt. Auch die Nebenfraktionen der Fulvinsäuren eluieren *nach* der Hauptfraktion, sind also noch kleiner, während die Nebenfraktionen der meisten Huminsäuren *vor* der Hauptfraktion eluieren, also noch größer sind. Unter Berücksichtigung der schlechten Kalibrierbarkeit der SEC für HS lassen sich die Humin- und Fulvinsäuren nur grob in einen Massenbereich über 10 kDa und die Huminstoffe der Originalwasserproben in einen solchen unter 10 kDa einteilen.

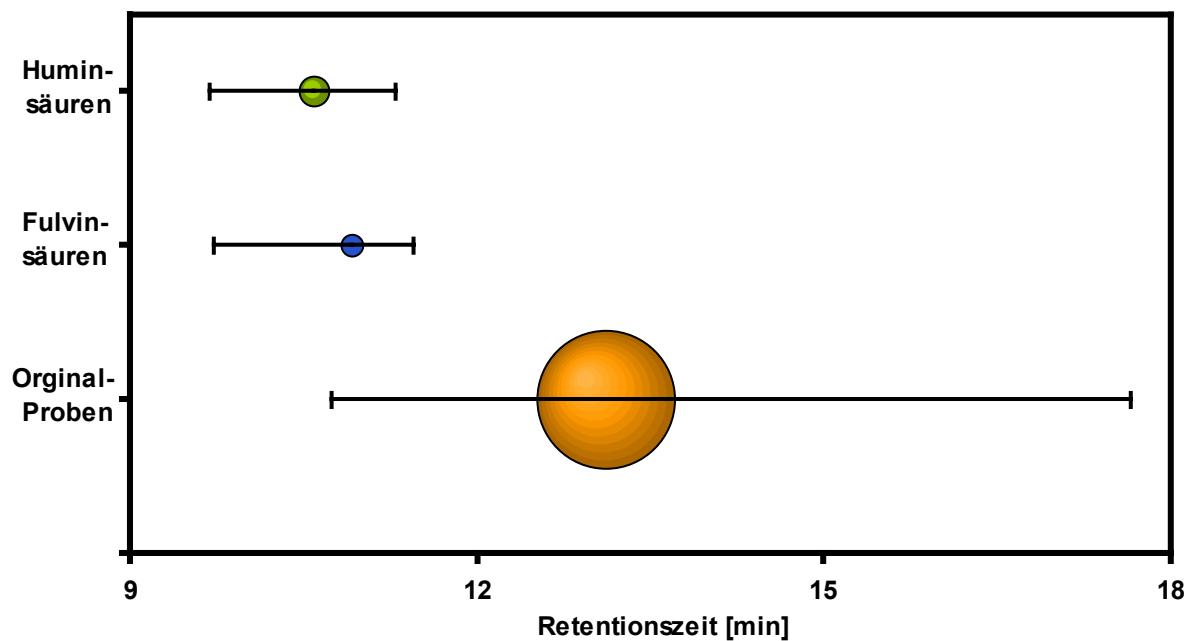


Abb. 117: Vergleich der durchschnittlichen Retentionszeit mit Standardabweichung (Kugeln) und minimalen sowie maximalen Retentionszeit der Kohlenstoff-Hauptfraktionen (Linien) von Original-, Fulvin- und Huminsäureproben

4.3.2. Charakteristische Fraktionierung von Proben unterschiedlicher Herkunft mit SEC

Um die charakteristischen Eigenschaften der unterschiedlichen Proben bei SEC-Trennung aufzuzeigen, wurden die jeweiligen UV-Absorptions-Chromatogramme von 5 Originalwasserproben (Abb. 118) den entsprechenden Fulvinsäureproben (Abb. 119) gegenüber gestellt. Vergleicht man die Original- mit den Fulvinsäureproben, erkennt man den in Kap. 4.3.1 diskutierten Unterschied der Retentionszeiten der Hauptfraktionen. (In diesem Fall können die Fraktionen im UV-Absorptions-Chromatogramm mit den Kohlenstoff-Fraktionen verglichen werden, da die Retentionszeiten übereinstimmen, jedoch nicht deren Intensität !) Die Fraktionen der Originalproben eluieren später als die entsprechenden Fraktionen der Fulvinsäureproben, d.h. Originalproben haben einen höheren Anteil kleinerer, niedermolekularer Verbindungen, welche offensichtlich bei der Isolierung mit dem XAD-8-Verfahren (siehe Kap. 3.4.2) nicht mit angereichert werden. Weiterhin fallen die breiten Peaks auf, die im Vergleich zu den Originalproben wenig charakteristische Aussagen zulassen. Inwieweit die Isolierung nur bestimmte Fraktionen anzureichern vermag oder durch den Einfluß der Säuren und Laugen eine Poly-

merisation oder allgemeiner eine Umwandlung stattfand, konnte bisher noch nicht geklärt werden. Gleiches gilt für die Huminsäuren, die hier nicht aufgeführt wurden.

Aber es gibt nicht nur Unterschiede zwischen den originalen und isolierten Proben, sondern auch bezüglich der charakteristischen Auftrennung der Proben unterschiedlicher Herkunft. Die Grundwasserprobe FG1 zeigt eine breite Verteilung von 7-25 min Retentionszeit mit einer stark UV absorbierenden Fraktion bei 17 min (im Bereich 1 kDa). Die großen, bei kurzen Retentionszeiten eluierenden Verbindungen wurden offensichtlich bei der Wanderung durch die geologischen Schichten herausgefiltert. Dies erklärt auch den sehr niedrigen DOC-Gehalt von Grundwässern (FG1: 11.6 µg DOC/g). Bodensickerwässer haben hingegen einen sehr hohen DOC-Gehalt (BS1: 73 µg DOC/g), und ihre Fraktionen eluieren bei kürzeren Retentionszeiten. Die Fraktion der Probe BS1 bei 14.2 min entspricht einem Molekulargewicht von 40 kDa (bezogen auf Dextrane). Das UV-Absorptions-Chromatogramm der Braunwasserprobe HO16 ähnelt dem des Bodensickerwassers BS1, wenngleich die Auftrennung der Fraktionen etwas stärker ist. Es ist wiederum eine Fraktion bei 14.4 min und eine weitere bei kürzerer Retentionszeit zu erkennen (BS1: 11.1 min; HO16: 10.5 min). Die Ähnlichkeit der Chromatogramme ist durch die ähnlich verlaufende Genese zu erklären, jedoch sind die DOC-Gehalte der Braunwasserproben etwas niedriger (HO16: 26.4 µg DOC/g). Die Probe SV1 hat mit 231 µg DOC/g den höchsten DOC-Gehalt der untersuchten Originalwasserproben. Es handelt sich hierbei um ein Braunkohlepyrolyseabwasser, das in ein Becken geleitet wurde. Es kann hier nicht von einer natürlichen Probe gesprochen werden, auch wenn die Braunkohle natürlichen Ursprungs war. Es sind zwei schmale UV absorbierende Fraktionen bei 10.7 und 12.0 min Retentionszeit sowie eine breite Verteilung hochmolekularer Verbindungen (7-10 min) zu erkennen. Im Laufe der Braunkohle-Genese haben sich durch Kondensationsreaktionen hochmolekulare Verbindungen gebildet, die auch in dem Abwasser wiederzufinden sind. Die schmalen Peaks des Braunkohlepyrolyseabwassers entsprechen denen des zweiten Abwassers, das im Rahmen des ROSIG-Projektes untersucht wurde und aus einer kommunalen Kläranlage stammt. Während die in vielen Jahren entstandenen Huminstoffe der natürlichen Proben breite Peaks aufweisen, deuten die schmalen Banden der Abwässer auf eine noch junge Genese mit einer geringeren strukturellen Vielfalt hin.

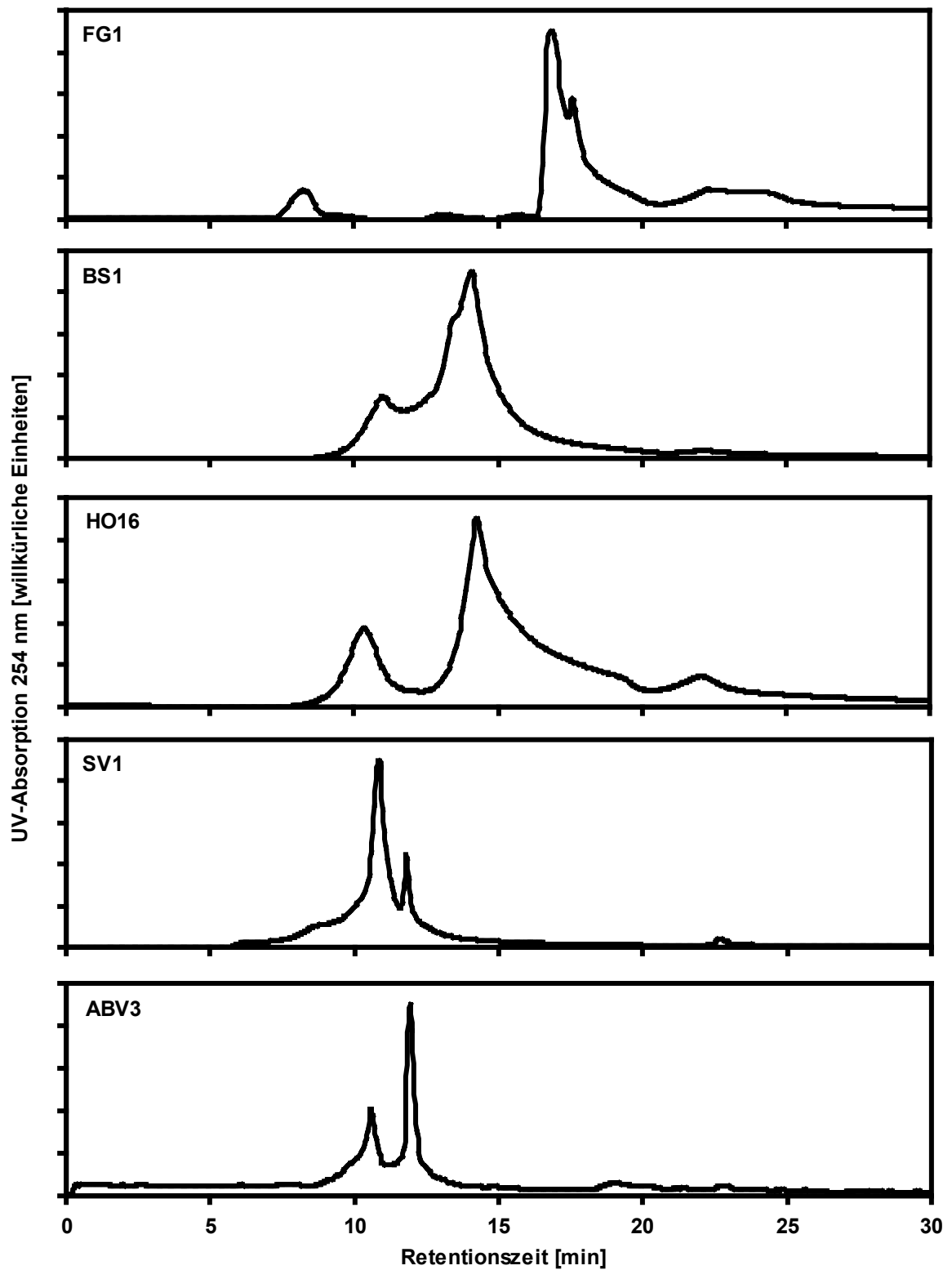


Abb. 118: Vergleich der UV-Absorptions-Chromatogramme von Originalwasserproben des ROSIG-Projektes

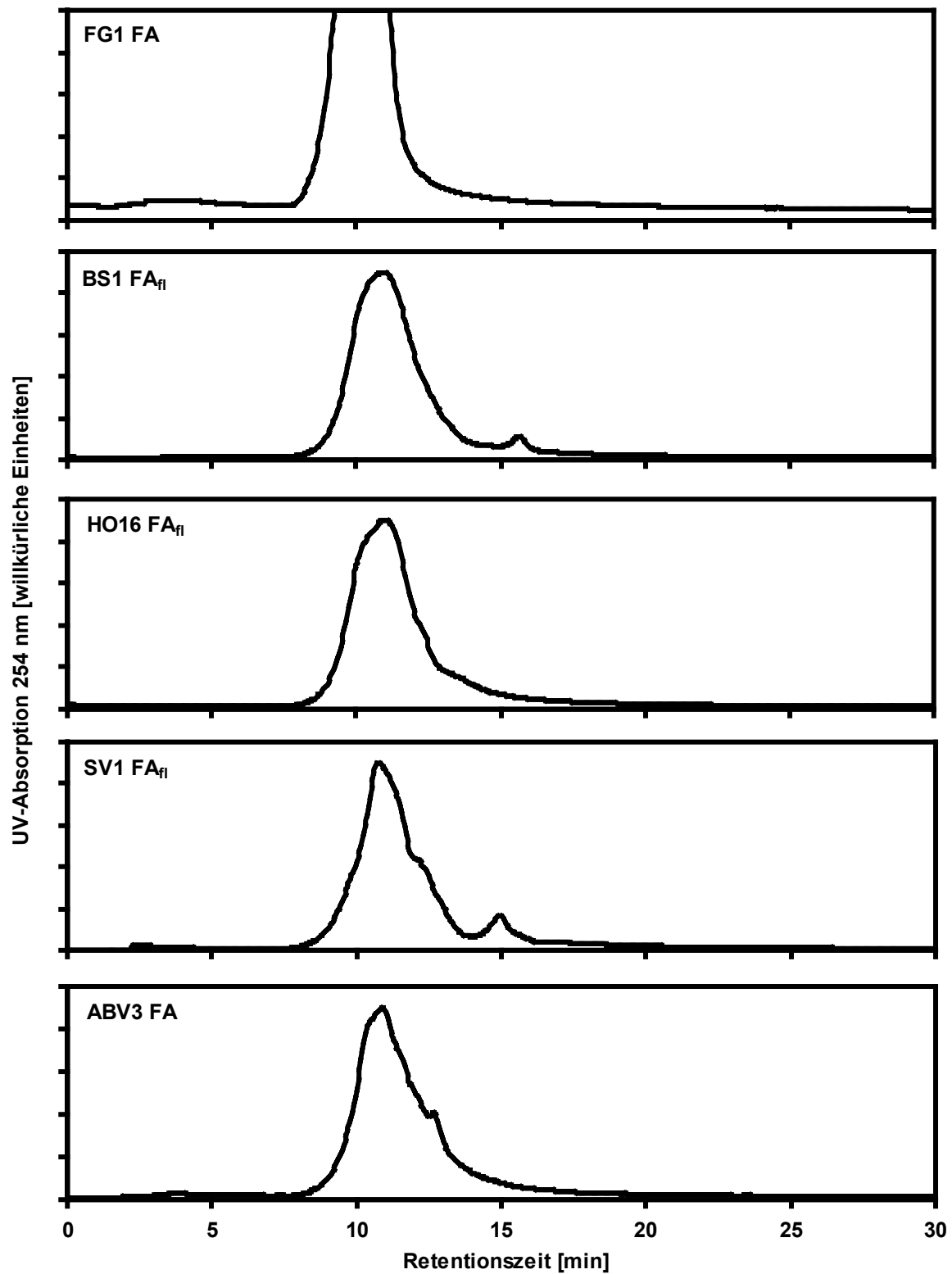


Abb. 119: Vergleich der UV-Absorptions-Chromatogramme von Fulvinsäuren aus Wasserproben des ROSIG-Projektes

4.3.3. Kohlenstoff- und Schwefel-Gehalte in Huminstoff-Fractionen

Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte online MSIVA für Schwefel (siehe Kap. 3.6) ist bisher die einzige Methode, um Schwefel-Gehalte chromatographischer Fraktionen in Echtzeit zu bestimmen. Diese Methode wurde in Verbindung mit der schon früher entwickelten online MSIVA für Kohlenstoff [41] angewendet. Auf diese Weise ließen sich die Schwefel-Anteile in den mit SEC getrennten Fraktionen bestimmen, während dies bisher nur für den Schwefel der Gesamtprobe möglich war. Hierdurch konnten detaillierte Kenntnisse über die Verteilung von Schwefel in HS-Fractionen gewonnen werden. So ist zu beobachten, daß Schwefel hauptsächlich in der Hauptfraktion (HF) zu finden ist und die Schwefel-Massenfluß-Chromatogramme ausgezeichnet mit denen der UV-Absorption korrelieren. D.h. Schwefel findet sich primär in höhermolekularen Fraktionen (kurze Retentionszeit) mit aromatischem Charakter oder konjugierten Doppelbindungen (π -System). Die später eluierenden, niedermolekularen Fraktionen, die einen großen Anteil des DOC in Originalwasserproben bilden, enthalten keinen meßbaren Anteil an Schwefel (Nachweisgrenzen siehe Kap. 3.6.4, Seite 79). Eine Berechnung des Schwefel-Anteils in HS über die Kohlenstoff- und Schwefel-Gesamtgehalte würde die vorliegenden Verhältnisse nicht richtig wiedergeben. Die online MSIVA für Kohlenstoff und Schwefel stellt daher eine exaktere Methode zur Bestimmung des Schwefel-Anteils dar.

In den folgenden Tabellen sind die Kohlenstoff- und Schwefel-Gehalte der einzelnen Fraktionen der in Kap. 3.7.2 abgebildeten Chromatogramme aufgeführt. Die Gehalte konnten nicht auf 1 g der Trockensubstanz bezogen werden, da der SEC eine Filtration mit einem 0.45 μm PVDF-Filter voraus ging. Zum Vergleich der Gehalte unterschiedlicher Proben sollten daher die HS-Konzentration der eingesetzten Lösungen (siehe Kap. 3.7.2) mit berücksichtigt werden. Es ist jedoch zu beachten, daß der PVDF-Filter je nach Zusammensetzung der Lösung unterschiedlich große Anteile zurückhält. Zur Berechnung der Gehalte aus den Chromatogrammen wurden die entsprechenden Peaks der Massenfluß-Chromatogramme integriert und auf das Probenvolumen bezogen. In den Fällen einer nicht vollständigen Basislinientrennung benachbarter Fraktionen wurden durch ein Peak-Fitting-Programm die zugrundeliegenden Einzelfraktionen ermittelt. Es ist an erster Stelle jeweils die Hauptfraktion (HF) aufgeführt, auch wenn diese nicht die zeitlich erste Fraktion im Chromatogramm ist. Die Nebenfraktionen (NF1 und NF2) wurden entsprechend ihrer Retentionszeit (kurze zuerst) in die Tabellen aufgenommen. Um die Schwefel-

Fraktionen mit denen des Kohlenstoffs vergleichen zu können, wurde die Bezeichnung der Kohlenstoff-Fraktionen (HF, NF1 und NF2) übernommen.

In Tab. 43 sind die Gehalte der gefriergetrockneten Proben des ROSIG-Projektes aufgeführt. Aufgrund der differenzierten Bestimmung mit online MSIVA nach SEC ergeben sich für die einzelnen Fraktionen im Vergleich zur Gesamtanalyse etwas höhere Schwefel-Gehalte. Interessante Unterschiede ergeben sich, wenn mehrere Schwefel-Fraktionen erhalten wurden, da hier die Schwefel-Anteile variieren und der Einfluß von Schwefel auf die Komplexierung von Metallionen (z.B. Quecksilber) untersucht werden kann. In Tab. 44 sind die im Rahmen des ROSIG-Projektes ausgegebenen Fulvinsäuren (Flüssig-Proben), in Tab. 45 die vom USGS zur Verfügung gestellten Proben und in Tab. 46 die Werte für die Originalwasserproben aus den Everglades aufgeführt. Bei den Proben vom USGS fanden sich nach SEC-Trennung jeweils nur 2 Kohlenstoff-Fraktionen (HF und NF), wobei ausschließlich die Hauptfraktionen Schwefel enthielten. Die Verhältnisse der C und S-Gehalte der einzelnen Fraktionen sind in den entsprechenden Tabellen mit angegeben.

Tab. 43: C- und S-Gehalte in Haupt- (HF) und Nebenfraktionen (NF1 und NF2) von Lösungen aus gefriergetrockneten Original-, Fulvin- und Huminsäuren des ROSIG-Projektes nach SEC-Trennung sowie die C/S-Verhältnisse in HF und NF1 bezogen auf 1 mL der hergestellten Lösung

Probe	C-Gehalt [$\mu\text{g}/\text{mL Lsg}$]			S-Gehalt [$\mu\text{g}/\text{mL Lsg}$]			C/S-Verhältnis		
	HF	NF1	NF2	HF	NF1	NF2	HF	NF1	NF2
SV1 HA	146.0	7.0		35.4	2.0		4.1	3.5	
BS1 HA	652.4	37.6	19.6	6.8	1.0		95.9	37.6	
FG1 FA	321.0			8.4			38.2		
HO10 FA	731.4			14.4			50.8		
HO10 HA _{Okt}	661.8	59.8		15.4	0.8		43.0	74.8	
HO10 HA _{Nov}	394.4	33.6		8.6	1.4		45.9	24.0	
HO12 K	903.2			41.2			21.9		
HO13 FA	563.6			10.8			52.2		
HO13 HA	541.0	131.8		2.4	0.4		225.4	329.5	
HO16 G	391.2	3.6		34.8			11.2		
ABV3 FA	2696.0			65.6			41.1		
ABV3 K	316.2	30.0	49.4		142.6			0.2	

Tab. 44: C- und S-Gehalte in Haupt- (HF) und Nebenfraktionen (NF1 und NF2) von Fulvinsäuren des ROSIG-Projektes (Flüssig-Proben) nach SEC-Trennung sowie die C/S -Verhältnisse in HF, NF1 und NF2 bezogen auf 1 mL

Probe	C-Gehalt [$\mu\text{g}/\text{mL}$ Lsg]			S-Gehalt [$\mu\text{g}/\text{mL}$ Lsg]			C/S-Verhältnis		
	HF	NF1	NF2	HF	NF1	NF2	HF	NF1	NF2
SV1 FA _{fl}	711.0	227.4		211.0	15.2		3.4	15.0	
BS1 FA _{fl}	1009.8	83.2		13.4	0.2		75.4	416.0	
HO14 FA _{fl}	27.6	19.4		1.6			17.3		
HO16 FA _{fl}	860.4	436.0		22.6			38.1		
ABV2 FA _{fl}	134.0	2.1	35.2	9.9	0.6	0.4	13.5	3.5	88.0

Tab. 45: C- und S-Gehalte in Haupt- und Nebenfraktionen (HF und NF) von Lösungen aus gefriergetrockneten Fulvin- und Huminsäuren des USGS nach SEC-Trennung sowie die C/S -Verhältnisse in HF

Probe	C-Gehalt [$\mu\text{g}/\text{mL}$ Lsg]		S-Gehalt [$\mu\text{g}/\text{mL}$ Lsg]		C/S-Verhältnis	
	HF	NF	HF	NF	HF	NF
WCA2FA	19.1	4.4	0.49		39.0	
WCA2HPIA	19.1	1.9	0.59		32.4	
WCA2HPOA	21.6	2.3	0.44		49,1	
F1FA	13.2	1.9	0.35		37.7	
F1HA	3.7	1.3	0.15		24.7	
F1HPIA	11.6	2.3	0.40		29.0	
F1HPOA	4.7	1.3	0.14		33.6	
SRFA	24.1	2.2	0.20		120.5	
SRHA	5.7	1.1	0.07		81.4	
ORFA	18.5	3.0	0.25		74.0	
ORHA	10.2	2.2	0.18		56.7	
MRFA	17.4	1.8	0.26		66.9	
MRHA	12.3	2.1	0.34		36.2	
CCFA	16.7	2.3	0.16		104.4	
POFA	15.2	1.4	0.12		123.7	

Tab. 46: C- und S-Gehalte in Haupt- (HF) und Nebenfraktionen (NF1 und NF2) von Originalwasserproben aus den Florida Everglades nach SEC-Trennung sowie die C/S -Verhältnisse in NF1 und NF2 bezogen auf 1 mL

Probe	C-Gehalt [$\mu\text{g}/\text{mL}$ Lsg]			S-Gehalt [$\mu\text{g}/\text{mL}$ Lsg]			C/S-Verhältnis		
	HF	NF1	NF2	HF	NF1	NF2	HF	NF1	NF2
WCA1	1006.0	12.6	8.6		13.2	1.8		1.0	4.8
EN1	1038.8	14.6			0.4			36.5	
EN2	1596.8		9.6		331.6	6.6		n.b.*)	1.5

*) nicht bestimmbar, da keine Kohlenstoff-Fraktion

Eine graphische Darstellung der Korrelation von C- und S-Gehalten in den Hauptfraktionen der untersuchten Proben ist in Abb. 120 gegeben. Die Gehalte lassen sich nahezu linear ($y=0.0191x^{1.065}$) korrelieren, wobei das Bestimmtheitsmaß für natürliche Proben mit $R=0.8507$ hoch ist.

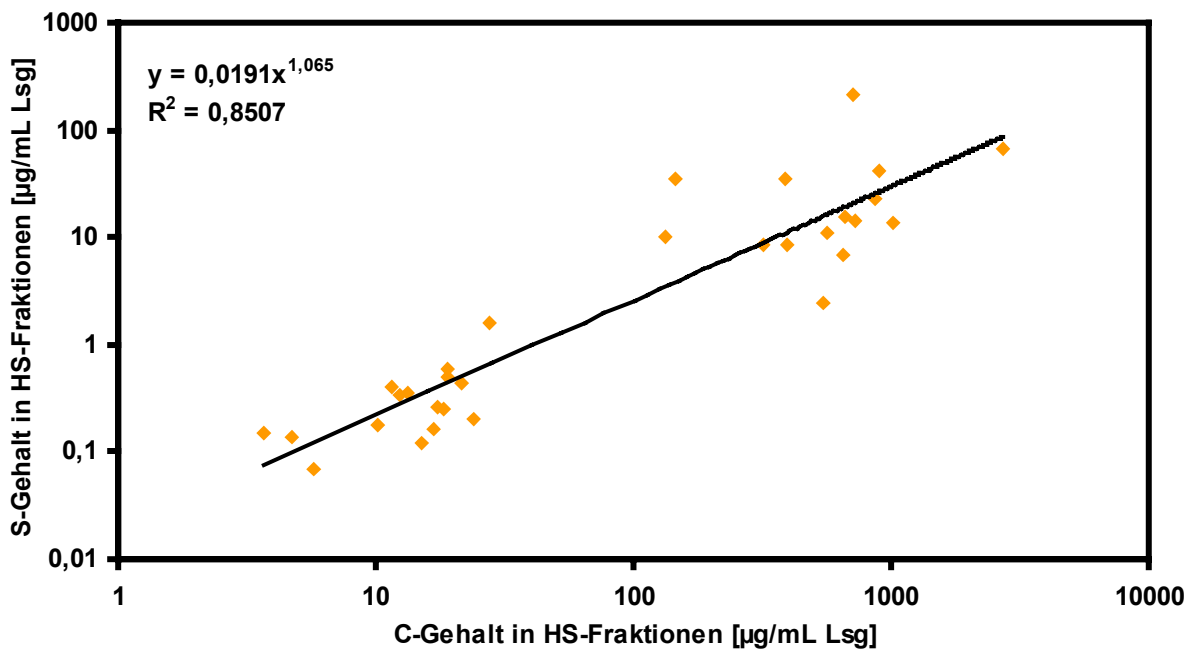


Abb. 120: Darstellung der C- und S-Gehalte in den Hauptfraktionen der untersuchten HS sowie Angabe des Bestimmtheitsmaßes bei nahezu linearer Korrelation

4.4. Wechselwirkungen von Huminstoffen mit Quecksilber

Wie die Ergebnisse dieser Arbeit (Kap. 3.7 und 3.8) zeigen, besteht eine Wechselwirkung von HS mit Quecksilber. Durch die Bindung an HS ist die Mobilität und Bioverfügbarkeit gegenüber nicht gebundenem Hg verändert. So kann Hg auf der einen Seite durch terrestrische HS fixiert und auf der anderen Seite durch aquatische HS mobilisiert werden. Weiterhin ist die Bioverfügbarkeit des gebundenen Quecksilbers herabgesetzt. Letztere wurde im Rahmen des ROSIG-Projektes von der Arbeitsgruppe U. Obst, WFM Wasserforschung Mainz, untersucht [106]. Es wurde dabei die Enzymaktivität von Mikroorganismen nach Quecksilber-Zugabe in Gegenwart und Abwesenheit von HS betrachtet. Während bei Abwesenheit von HS die Enzymaktivität gesteigert wurde, ist dieser Effekt in Gegenwart von HS vollständig maskiert worden. Dies wird durch die Wechselwirkung der HS mit dem Quecksilber hervorgerufen, da dadurch die Bioverfügbarkeit des Quecksilbers abnahm. Der Verbleib des Quecksilbers während des Kontakts zu den Mikroorganismen wurde im Rahmen dieser Arbeit mit MSIVA geklärt (siehe Abb. 121). So wurden in Abwesenheit von HS (links) 87 % des im Wasser enthaltenen Hg durch die Mikroorganismen absorbiert, während in Gegenwart von HS nur 64 % aufgenommen werden konnten. Dies ist dadurch zu erklären, daß Quecksilber durch HS gebunden wurde und dadurch vor einer Aufnahme der Mikroorganismen geschützt war.

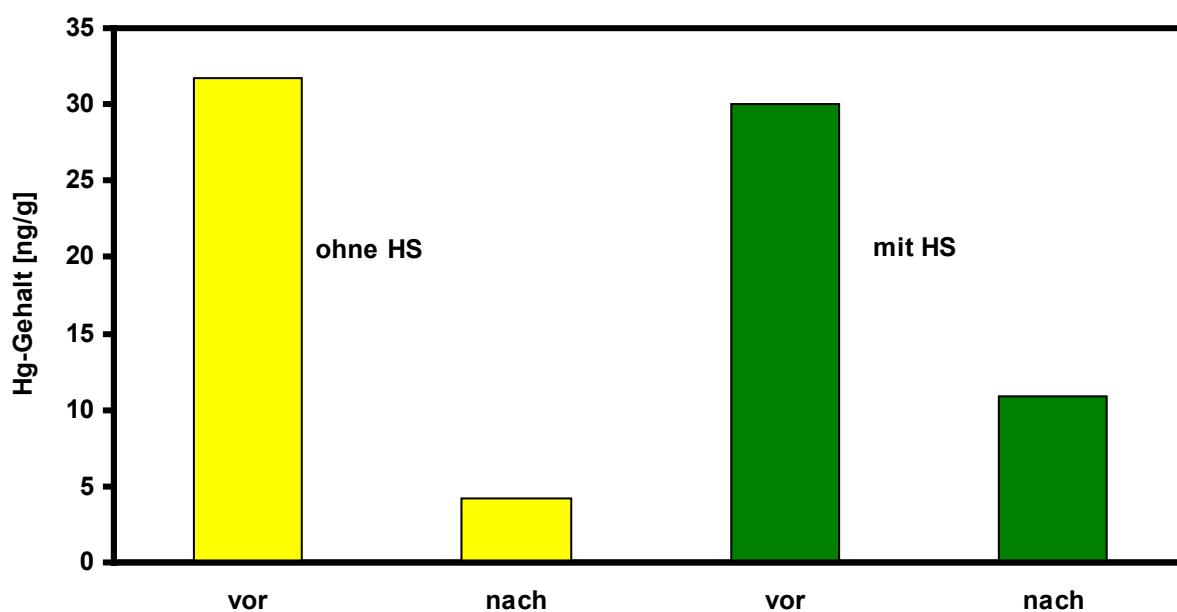


Abb. 121: Hg-Gehalte in Wasser mit und ohne Huminstoff-Zusatz sowie vor und nach dem Kontakt zu Mikroorganismen

Um die spezifischen Wechselwirkungen von HS mit Quecksilber näher zu untersuchen, wurden HS mittels SEC fraktioniert und durch online MSIVA quantifiziert. Die im Rahmen dieser Arbeit angewendete online MSIVA (siehe Kap. 3.6) für Quecksilber hat unter den beschriebenen Bedingungen eine Nachweisgrenze von 1.2 ng Hg/mL. Während in Kap. 3.7.1 die Hg-Gesamtgehalte aufgeführt wurden, sollen hier Hg-Gehalte von HS-Fractionen der Chromatogramme aus Kap. 3.7.2 diskutiert werden. Hg-Gehalte in natürlichen Gewässern liegen im Bereich von wenigen ng Hg/mL. Die Bestimmung von Quecksilber in natürlichen Gewässerproben liegt daher im Bereich der Nachweisgrenze, was die Aussagen über element-spezifische Wechselwirkungen erschwert. Zur Berechnung der Hg-Gehalte in HS-Fractionen wurde der jeweilige Massenfluß über die Zeit des Peaks integriert. Die Werte für die gefriergetrockneten Proben des USGS und des ROSIG-Projektes sowie die Flüssig-Probe SV1FA_{fl} sind in Tab. 47 angegeben. Die Hg-Gehalte der Originalwasserproben aus den Florida Everglades finden sich in Tab. 48. Alle weiteren hier nicht aufgeführten Proben hatten in den Fractionen einen Hg-Gehalt unterhalb der Nachweisgrenze. Wiederum ist zu beachten, daß ein direkter Vergleich der Quecksilber-Gehalte unterschiedlicher Proben nur unter Berücksichtigung der HS-Konzentrationen (Kap. 3.7.2) möglich ist. Zum besseren Vergleich wurden die Bezeichnungen der Fractionen aus Kap. 4.3.3 übernommen. Jedoch kann der Hg-Gehalt einer Fraction mit den C- (Abb. 122) und S-Gehalten (Abb. 123) der gleichen Fraction in Beziehung gesetzt werden.

Tab. 47: Hg-Gehalte der Lösungen aus gefriergetrockneten Proben des ROSIG-Projektes und des USGS sowie der Flüssig-Probe SV1 FA_{fl} nach SEC-Trennung bezogen auf 1 mL

Probe	Hg-Gehalt [ng/mL Lsg]	HF	NF bzw. NF1
ABV3 K	2.7		x
SV1 HA	3.6	x	
HO10 HA _{Okt}	4.5	x	x
HO10 HA _{Nov}	8.8	x	x
SV1 FA _{fl}	9.2	x	
F1HA	2.3	x	
MRHA	15.1	x	
SRHA	6.6	x	
ORHA	60.3	x	

Während sich bei den meisten Proben nach SEC-Trennung jeweils nur eine Hg-HS-Fraktion findet, zeigt die Originalwasserprobe EN2 eine breite Verteilung von Quecksilber. Nach dem Peak-Fitting über 8 Einzelpeaks wurde der Gehalt aller Fraktionen in Tab. 48 angegeben. Die niedermolekulare Fraktion bei 25 min Retentionszeit, die nur in Originalproben zu finden ist, enthielt in keinem Fall Hg.

Tab. 48: Hg-Gehalte in Originalwasserproben aus den Florida Everglades nach SEC-Trennung bezogen auf 1 mL

Probe	Hg-Gehalt [ng/mL Lsg]	NF1	NF2
WCA1	164.1	x	x
EN1	76.3	x	x
EN2	262.0	x	x

Eine Korrelation der Hg-Gehalte mit den entsprechenden C- oder S-Gehalten der HS-Fractionen ist nur bei ausreichenden Mengen an natürlichen Quecksilbers möglich. Dies ist für die Proben des ROSIG-Projektes nicht möglich. Zur Veranschaulichung sind dennoch die C-, S- und Hg-Gehalte der mit SEC separierten HS-Fractionen in Abb. 122 und Abb. 123 graphisch dargestellt und eine Korrelation für die Proben des USGS angegeben.

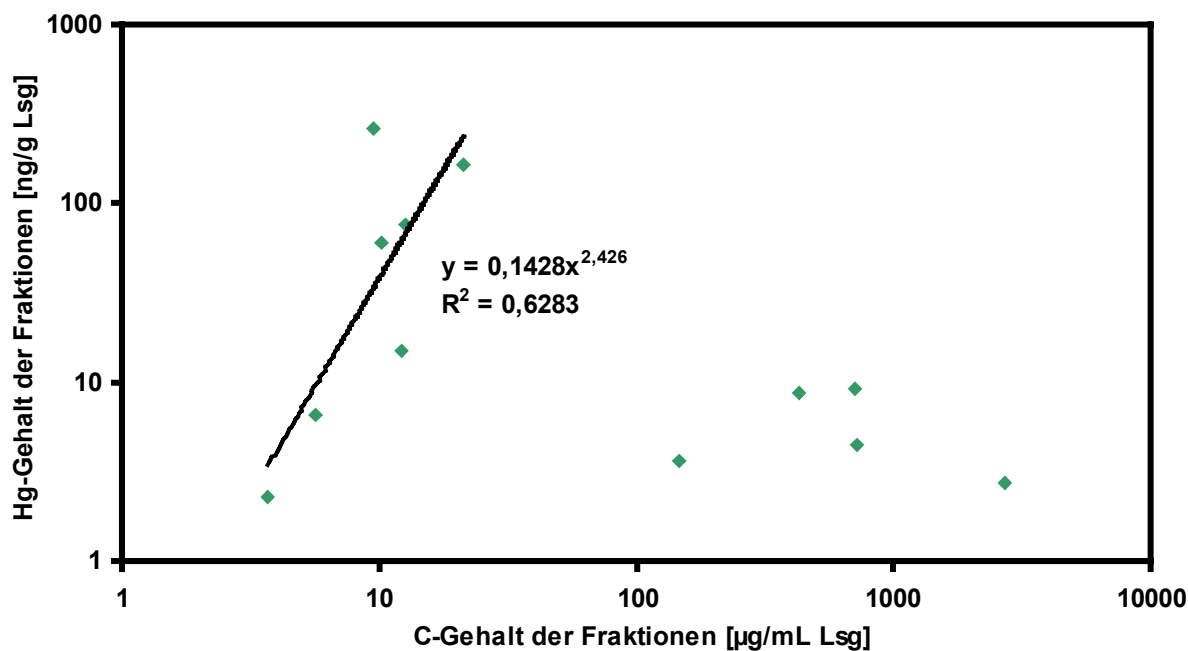


Abb. 122: Darstellung der C- und Hg-Gehalte sowie Angabe des Bestimmtheitsmaßes bei nicht linearer Regression der Werte mit niedrigem C-Gehalt

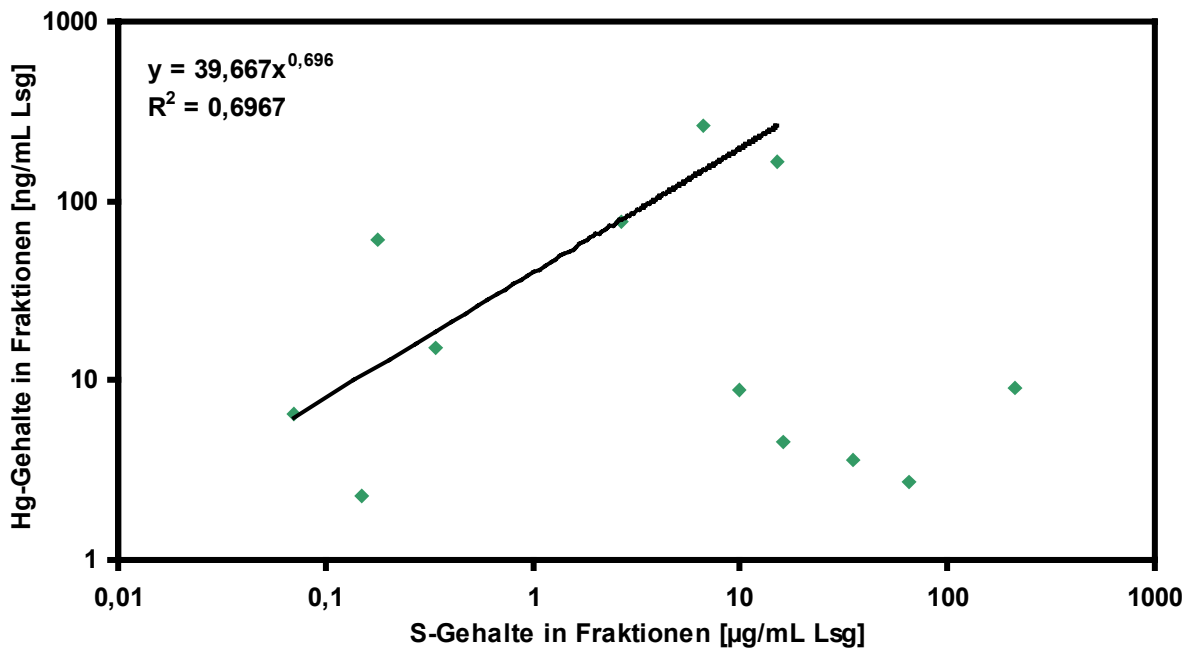


Abb. 123: Darstellung der S- und Hg-Gehalte sowie Angabe des Bestimmtheitsmaßes bei nicht linearer Regression der Proben vom USGS und aus den Florida Everglades

Um die Wechselwirkung von Hg und HS auch an Proben des ROSIG-Projektes mit niedrigerem, natürlichem Hg-Gehalt untersuchen zu können, wurden weitere Experimente mit Zugabe von Quecksilber durchgeführt (siehe Kap. 3.8). Hierzu wurden Proben jeweils vor und nach der Zugabe von HgCl_2 -Lösung mit SEC fraktioniert und die Intensitäts-Chromatogramme von Kohlenstoff, Schwefel und Quecksilber sowie die UV-Absorption bei 254 nm detektiert. Abb. 124 zeigt die Probe SV1 nach Hg(II) -Zugabe. Die Fraktionen F3-F5 enthalten Schwefel, zeigen zudem UV-Absorption und enthalten jeweils Quecksilber, während die Fraktionen F1 und F2 keinen Schwefel enthalten. Die anderen untersuchten Proben enthalten meist weniger Fraktionen. Jedoch findet sich in den schwefelhaltigen Fraktionen immer Quecksilber.

Bei allen Proben konnte die Wechselwirkung von HS mit Quecksilber gezeigt werden. Bevorzugt wurden hierbei schwefelhaltige Fraktionen, jedoch findet sich Quecksilber auch in anderen Fraktionen. Dies läßt darauf schließen, daß Quecksilber zwar eine hohe Affinität zu den schwefelhaltigen funktionellen Gruppen der HS hat, jedoch auch die Komplexierung durch andere Gruppen möglich ist.

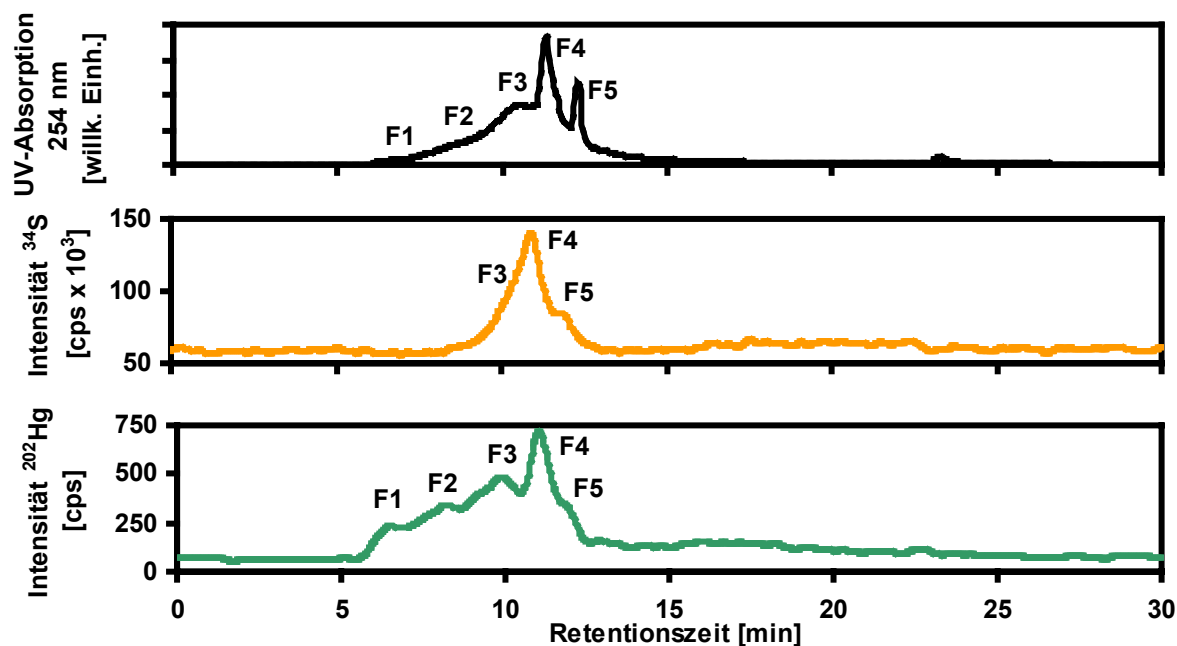


Abb. 124: UV-Absorption sowie Schwefel- und Quecksilber-Intensitäts-Chromatogramme des Braunkohlepyrolyseabwassers SV1 mit Hg(II)-Zugabe nach SEC-Trennung

Weiterhin ist zu beachten, daß die Menge des gebundenen Quecksilbers nicht in allen Fällen mit der Menge des Schwefels korreliert. Dies ist auf die unterschiedlichen Bindungs- und Oxidationsstufen des Schwefels in HS zurückzuführen. Sulfidischer Schwefel in der Oxidationsstufe -2 hat eine besonders hohe Affinität zu Quecksilber, während Sulfonsäuren (Oxidationsstufe $+6$) diese nicht aufweisen. Informationen über die Oxidationsstufen von Schwefel in HS können durch XANES-Spektroskopie (*X-ray absorption near-edge structure spectroscopy*) erhalten werden. Wegen der geringen Menge konnten diese Untersuchungen jedoch nicht an einzelnen mit SEC getrennten Fraktionen durchgeführt werden. Die folgenden Angaben beziehen sich daher wieder auf die Gesamtprobe. Bei der XANES-Spektroskopie wird die Absorption der eingesetzten Röntgenstrahlung in Abhängigkeit ihrer Energie dargestellt. Wenn die eingestrahle Energie ausreicht, um ein Elektron der inneren Schalen herauszuschlagen, erhält man eine Kante im Absorptionsspektrum. Entsprechend der Schale ergeben sich die K-, L- oder M-Kanten. Betrachtet man den Nahbereich der Kanten, zeigen sich weitere Aufspaltungen, die Rückschlüsse auf die Bindungsform der Atome zulassen. Je nach Oxidationsform und chemischer Umgebung des Schwefels unterscheiden sich die Energien der Maxima. Je höher die Oxidationsstufe ist, desto mehr Energie muß

aufgewandt werden. Da der Schwefel in HS immer in unterschiedlichen Oxidationsstufen vorliegt, werden die mit XANES erhaltenen Peaks ausgewertet und die entsprechenden Anteile der unterschiedlichen Oxidationsstufen angegeben. In Tab. 49 sind die Anteile von reduziertem Schwefel, S_{Red} (Sulfide), mit denen des oxidierten Schwefels, S_{Ox} (Sulfone, Sulfoxide), von Humin- und Fulvinsäuren des USGS verglichen worden [107]. Bis auf die Proben des Ogeechee Flusses (OR) haben jeweils die Huminsäuren einen höheren Anteil an reduziertem Schwefel.

Tab. 49: Mit XANES-Spektroskopie bestimmte Anteile von reduziertem (S_{Red}) und oxidiertem (S_{Ox}) Schwefel in Humin- (HA) und Fulvinsäuren (FA) des USGS

Probe	Anteil S_{Red} [%]		Anteil S_{Ox} [%]	
	FA	HA	FA	HA
F1	57	69	43	31
MR	41	51	59	49
SR	48	55	52	45
OR	44	37	56	63

Die Anteile an reduziertem Schwefel, S_{Red} der hydrophilen und hydrophoben Säureanteile (HPIA bzw. HPOA) der Proben WCA2 und F1 sind in Tab. 50 angegeben. Die hydrophoben Säureanteile haben in beiden Fällen einen höheren Anteil an reduziertem Schwefel.

Tab. 50: Mit XANES-Spektroskopie bestimmte Anteile von reduziertem (S_{Red}) und oxidiertem (S_{Ox}) Schwefel in hydrophilen (HPIA) und hydrophoben (HPOA) Säureanteilen von Proben des USGS

Probe	Anteil S_{Red} [%]		Anteil S_{Ox} [%]	
	HPIA	HPOA	HPIA	HPOA
WCA	21	51	79	49
F1	28	61	72	39

Zur besseren Übersicht sind in Abb. 125 die S_{Red} -Gesamtgehalte der Proben des USGS berechnet und den Hg-Gesamtgehalten gegenübergestellt (Gesamtgehalte siehe Tab. 39, Seite 82). Die S_{Red} -Gesamtgehalte wurden durch Multiplikation der S-Gesamtgehalte mit dem Anteil an reduziertem Schwefel, S_{Red} , erhalten. Wurde für

den Hg-Gesamtgehalt nur ein Wert kleiner der Nachweisgrenze gefunden, ist die Nachweisgrenze in der Abbildung verzeichnet. Bis auf die Probe des Ogeechee Flusses (grau dargestellt) korrelieren alle Hg-Gesamtgehalte mit den Gesamtgehalten an reduziertem Schwefel.

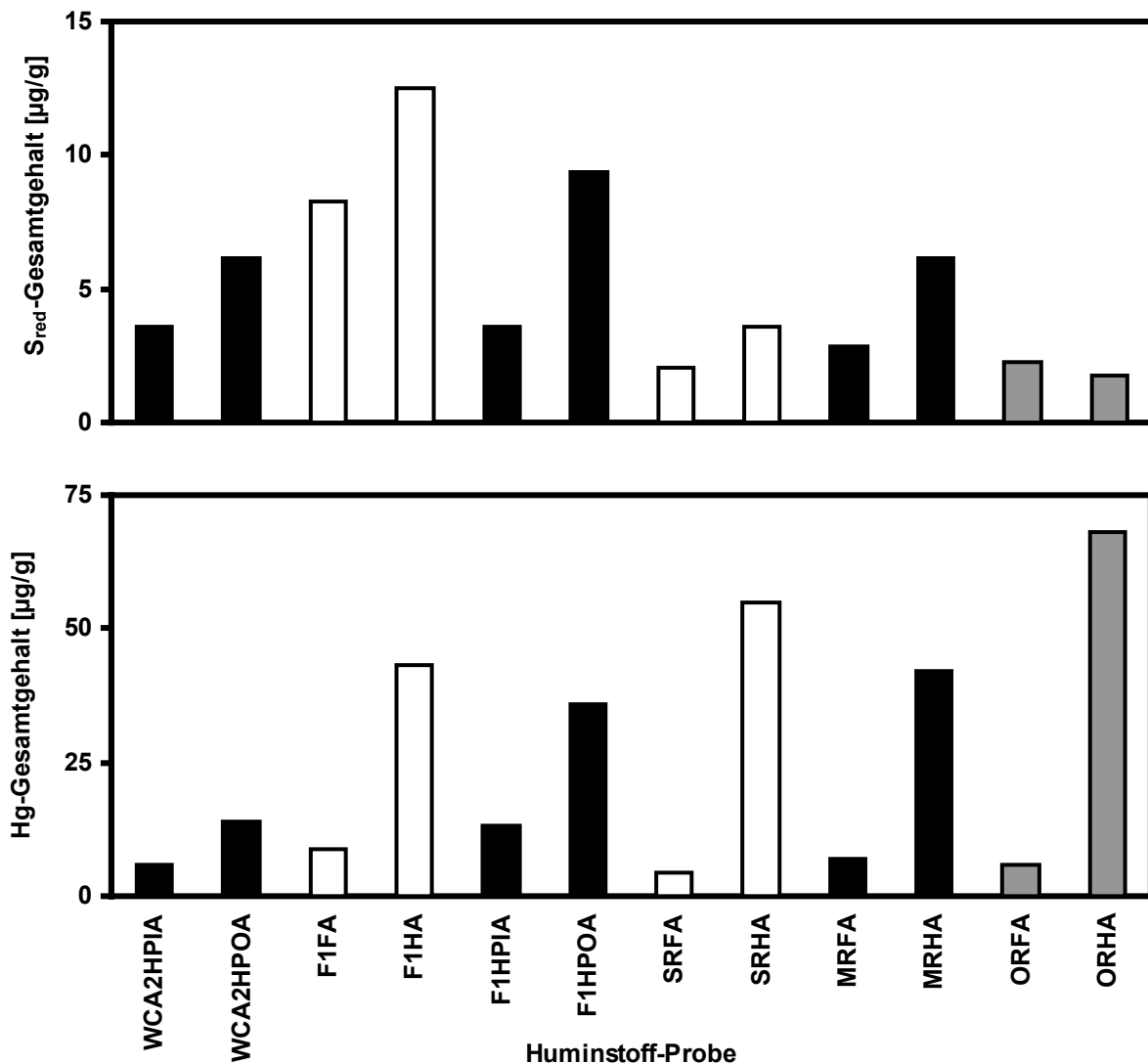


Abb. 125: Vergleich von Hg-Gesamtgehalten mit den Gesamtgehalten an reduziertem Schwefel der Proben des USGS

Zusammenfassend lässt sich feststellen, daß HS mit Quecksilber starke Wechselwirkungen eingehen, wobei Quecksilber nicht ausschließlich an schwefelhaltige Fraktionen gebunden ist. Jedoch hat die Oxidationsstufe des vorliegenden Schwefels einen großen Einfluß auf die Bindung des Quecksilbers, da HS mit einem hohen Anteil an reduziertem Schwefel mehr Quecksilber binden.

4.5. Kinetische Stabilität von Huminstoff-Komplexen

HS haben eine hohe Bindungskapazität für Schwermetalle. In vielen Untersuchungen wurde auf den großen Einfluß der HS auf die Bioverfügbarkeit und die Mobilität dieser Ionen in der Umwelt hingewiesen. So haben Bodenhuminstoffe die Funktion eines Filters bzw. Puffers, der verunreinigte Wässer von Schwermetallen befreien kann. Dieses System ist meist statisch betrachtet worden, ohne mögliche Veränderungen von Umwelteinflüssen zu berücksichtigen. So kann z.B. durch den Einfluß von saurem Regen der pH-Wert eines Bodens sinken und dadurch die Freisetzung von Schwermetallen ermöglicht werden. Auch bei einer Erhöhung des pH-Wertes kommt es zu einer indirekten Mobilisierung von Schwermetallen, da sich die Löslichkeit von HS und somit auch der komplexierten Schwermetalle erhöht. Aquatische HS spielen daher eine wichtige Rolle im Schwermetallkreislauf in der Umwelt. Inwieweit jedoch terrestrische und aquatische HS die Bioverfügbarkeit von Schwermetallen beeinflussen, hängt neben der Bindungskapazität auch stark von der kinetischen Stabilität der HS-Komplexe ab. Gerade im Bereich der kinetischen Stabilität von HS-Komplexen besteht noch großer Aufklärungsbedarf, weshalb hierzu Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden.

In Kap. 3.5 sind die Untersuchungsergebnisse der kinetischen Stabilität von HS-Komplexen der Schwermetallionen Cr(III), Cu(II), Co(II) und Co(III) aufgeführt. Es wurden hierbei HS-Lösungen mit den entsprechenden Schwermetallionen natürlicher Isotopenzusammensetzung versetzt. Es wurde darauf geachtet, daß die Zugabe so bemessen war, daß die Bindungskapazität der HS überschritten wurde und somit eine vollständige Sättigung der Bindungsstellen gewährleistet war. Dazu wurden 3-6 mmol Schwermetall pro Gramm DOC zugegeben, während die Bindungskapazität von HS für Schwermetalle lediglich 1-3 mmol pro Gramm DOC beträgt. Zur Einstellung des chemischen Gleichgewichts wurde eine Equilibrierungszeit von 2 d eingehalten, nach der dann ein isotopenangereicherter Spike des gleichen Metallions zugegeben wurde. Anschließend wurde die HS-Lösung nach 1 h Wartezeit über die SEC-Säule fraktioniert.

Im folgenden werden die in Kap. 3.5 vorgestellten Chromatogramme diskutiert. Zur Verdeutlichung sind jedoch die repräsentativen Chromatogramme des Braunkohlepyrolyseabwassers für Cu, Cr und Co nochmals in Abb. 126 zusammengestellt. Finden sich in den mit SEC erhaltenen HS-Fraktionen unterschiedliche Isotopenzusammensetzungen der zugegebenen Schwermetallionen, müssen kinetisch stabile

Komplexe vorliegen, da diese den vollständigen Austausch der Metallionen verhinderten. D.h. die zuvor komplexierten Ionen mit natürlicher Isotopenzusammensetzung wurden innerhalb 1 h nicht durch die später zugegebenen Ionen der isotonenangereicherten Spike-Lösung ausgetauscht. Findet man hingegen in allen Fraktionen das gleiche Isotopenverhältnis, muß ein Austausch stattgefunden haben. Hieraus folgt, daß kinetisch labile Komplexe (bzgl. 1 h Wartezeit) vorliegen.

In Kap. 3.5.2 sind die Chromatogramme von Kupfer-HS-Lösungen dargestellt. Die Isotope ^{63}Cu und ^{65}Cu zeigen einen völlig identischen Verlauf, d.h. alle Fraktionen haben das gleiche Isotopenverhältnis (vergl. Abb. 126). Unter Berücksichtigung der Wartezeit von 1 h kann also von kinetisch labilen Kupfer-HS-Komplexen gesprochen werden. Die Untersuchung der kinetischen Stabilität/Labilität mit kürzeren Wartezeiten konnte aufgrund der langen chromatographischen Trennung der SEC (30 min Retentionszeit) nicht durchgeführt werden. Jedoch zeigte sich, daß im Fall von Chrom die HS-Komplexe kinetisch stabil genug sind, um unter den gegebenen Bedingungen untersucht zu werden.

In Kap. 3.5.3 sind die Chromatogramme nach Chrom-Zugabe aufgeführt. Abb. 32 zeigt 3 Fraktionen der Braunwasserlösung HO14. Die Fraktion bei 9.9 min Retentionszeit hat ein $^{52}\text{Cr}/^{53}\text{Cr}$ -Isotopenverhältnis von 1.00, die Fraktion bei 15.8 min ein Verhältnis von 1.63 und die Fraktion bei 17.0 min eines von 0.62. Es müssen folglich kinetisch stabile HS-Komplexe vorliegen. Die Interpretation des Chromatogramms der Grundwasserlösung FG1 (Abb. 33) ist nicht eindeutig, da es nur *eine* Fraktion bei 17.1 min enthält. Sie hat ein Isotopenverhältnis von 3.66, während die zugegebenen Mengen an Cr-Standard und Cr-Spike bei vollständigem Austausch ein Isotopenverhältnis von 2.62 ergeben. Der natürliche Chromgehalt der Originalwasserprobe beträgt $0.6 \mu\text{g/L}$ [108] und ist im Vergleich zu den zugegebenen Mengen vernachlässigbar. Da das Isotopenverhältnis der Fraktion dem natürlichen Isotopenverhältnis ($^{52}\text{Cr}/^{53}\text{Cr}$: 8.82) näher als das aus den zugegebenen Standard und Spike Mengen resultierende ist, ist davon auszugehen, daß wiederum kein vollständiger Austausch stattgefunden hat. D.h. zumindest teilweise kinetisch stabile Chrom-HS-Komplexe vorliegen müssen. Das Chromatogramm der Bodensickerwasserlösung BS1 (Abb. 34) weist ebenfalls 3 Fraktionen auf. Die Isotopenverhältnisse sind 1.48 bei 12.5 min, 2.24 bei 15.6 min und 0.93 bei 27.3 min. Die Lösung des Braunkohlepyrolyseabwassers SV1 (Abb. 35 bzw. Abb. 126) weist sogar 5 Fraktionen auf. Die Isotopenverhältnisse betragen im Einzelnen: 2.40 bei 8.9 min, 0.43 bei 14.1 min, 4.76 bei 17.5 min, 0.89 bei 21.3 min und 1.3 bei 22.5 min.

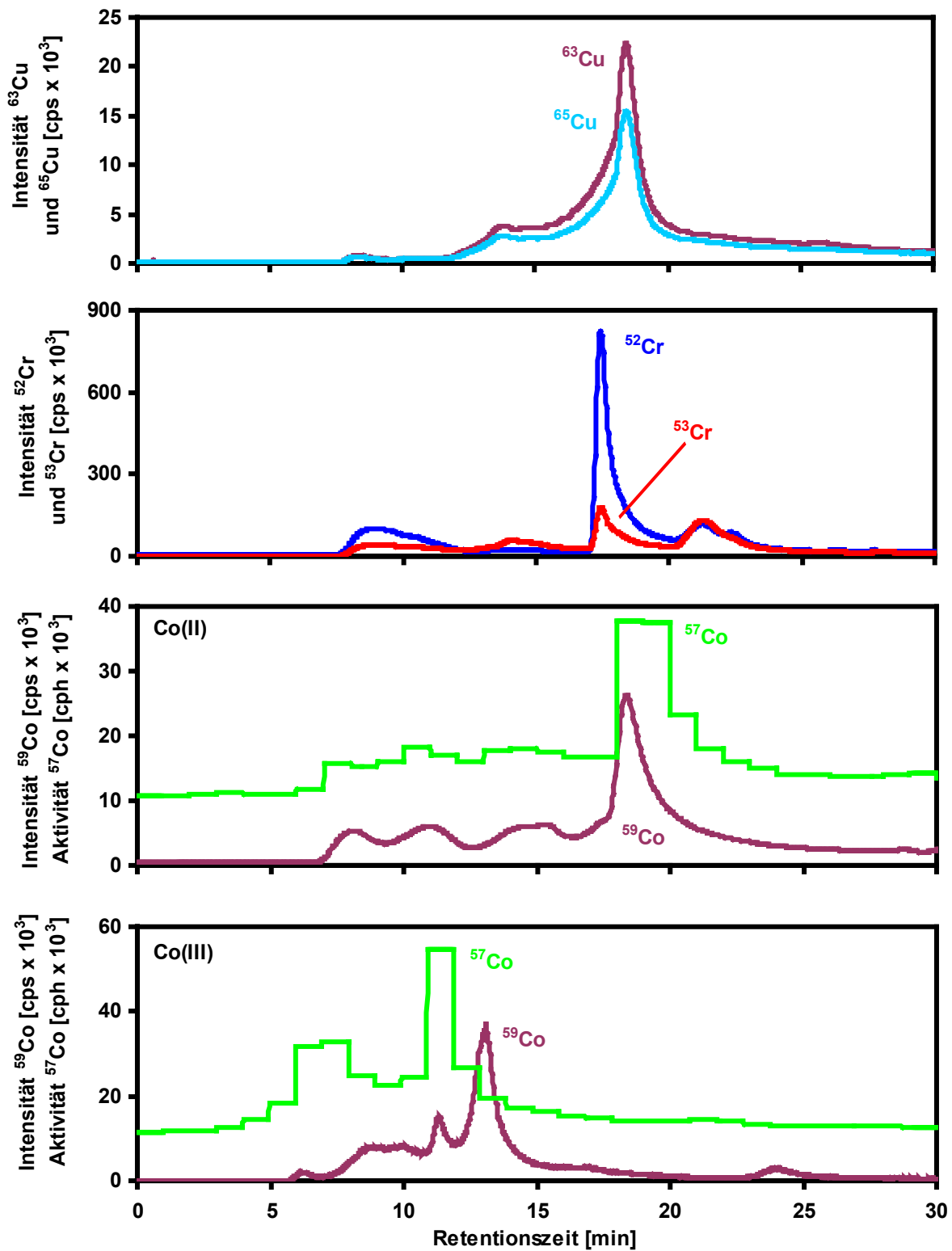


Abb. 126: ICP-MS-Intensitäts- sowie ^{57}Co -Aktivitäts-Chromatogramme des Braunkohlepyrolyseabwassers nach Standard- und Spike-Zugabe der entsprechenden Metallionen

Nachdem für alle untersuchten Proben kinetisch stabile Cr(III)-HS-Komplexe (Wartezeit 1 h) gefunden werden konnten, wurden weitere Untersuchungen nach 1 a Wartezeit durchgeführt (siehe Seiten 62 und 66-69). Die Unterschiede im Isotopenverhältnis der einzelnen Fraktionen nahm im Laufe des Jahres ab, jedoch sind noch immer Unterschiede festzustellen. Da die Chromatogramme durch Alterung der HS bei Raumtemperatur ihr Aussehen stark änderten, wurden gleichfalls Kupfer-HS-Komplexe nach 1 a untersucht, um Unterschiede im Isotopenverhältnis durch Alterung auszuschließen. Erwartungsgemäß zeigten jedoch die mit Kupfer versetzten Lösungen noch immer eine Gleichverteilung beider Isotope.

Die Untersuchungen von Co(II)- und Co(III)-HS-Komplexen konnten nicht auf die gleiche Weise durchgeführt werden, da Kobalt nur ein stabiles Isotop (^{59}Co) aufweist und daher als Co-Spike das radioaktive ^{57}Co verwendet werden mußte (siehe Kap. 3.5.4, Seite 70). Im folgenden wird daher nicht von Isotopenverhältnissen, sondern nur vom Verhältnis von Aktivität des ^{57}Co zur ICP-MS-Intensität des ^{59}Co gesprochen. Untersucht wurden jeweils zwei HS-Lösungen (SV1 und HO16 G), wobei jeweils eine Untersuchung mit Co(II) und eine weitere mit Co(III) (durch Luftoxidation erhalten) durchgeführt wurde. Abb. 40 zeigt die Braunkohlepyrolyseabwasserprobe SV1 nach Zugabe des Co(II)-Standards und -Spikes. Das gemessene Aktivitäts-Chromatogramm entspricht weitgehend dem mit ICP-MS gemessenen Kobalt-Intensitäts-Chromatogramm. Die entsprechenden Chromatogramme der Probe nach Co(III)-Zugabe (Abb. 41) zeigen hingegen deutliche Unterschiede (siehe auch Abb. 126). Die Hauptfraktion bei 13.2 min Retentionszeit enthält fast ausschließlich das natürliche ^{59}Co . Das später zugegebene ^{57}Co konnte aufgrund der kinetisch stabilen Komplexe nicht mit dem ^{59}Co im HS-Komplex austauschen. Die Fraktion bei 11.5 min hingegen enthält wohl überwiegend kinetisch labile Komplexe, da hier ^{57}Co austauschen konnte. Auch die Probe HO16 G zeigt, daß Co(III) mit HS kinetisch stabile Komplexe bildet (Abb. 43), während dies für Co(II) nicht der Fall ist (Abb. 42). Die Unterschiede sind jedoch aufgrund der geringen Menge des zugegebenen radioaktiven ^{57}Co nicht so deutlich zu erkennen. Die Fraktion bei 13.1 min Retentionszeit zeigt im Fall von Co(II) den Austausch mit ^{57}Co , während dies bei Co(III) nicht zu beobachten ist, das wiederum kinetisch stabile Co(III)-HS-Komplexe bestätigt.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten erstmals kinetisch stabile HS-Komplexe nachgewiesen werden. Durch die systematische Untersuchung von HS unterschiedlicher Herkunft und mehrerer Zentralionen der Übergangsreihe mit unterschiedlicher Elektronenkonfiguration konnten die Voraussagen der Ligandenfeldtheorie (siehe Kap. 2.3.4) bestätigt werden. HS sind sterisch anspruchsvolle Liganden, die nur einen asynchronen Ligandenaustausch über einen Übergangszustand (tetragonale Pyramide) erlauben. Dieser Übergangszustand ist bei dem d^3 -Spinsystem Cr(III) und dem d^6 -Spinsystem Co(III) (*low spin*) energetisch ungünstig, daher sind diese Komplexe kinetisch stabil (siehe Tab. 51). Bei den d^9 - und d^7 -Spinsystemen Cu(II) und Co(II) liegt diese Barriere deutlich niedriger, so daß diese Komplexe kinetisch labil sind.

Tab. 51: Ligandenfeldaktivierungsenergie ΔE_a für asynchronen Verlauf [75]

Spinsystem	Oktaeder \Rightarrow Tetragonale Pyramide (asynchron)
d^3	2.00 Dq
d^6	4.00 Dq
d^7	-1.14 Dq
d^9	-3.14 Dq

5. Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine online MSIVA zur Bestimmung von Kohlenstoff in chromatographisch getrennten Fraktionen verwendet und für die simultane Messung von Schwefel und Quecksilber modifiziert. Die Nachweisgrenzen ergeben sich in erster Linie aus der Untergrundschwankung des Isotopenverhältnisses. Hierbei spielen zum einen die sich zeitlich ändernden Plasmaeigenschaften und zum anderen die Pulsation der peristaltischen Pumpe zur Beimischung des isotopenangereicherten Spikes eine entscheidende Rolle. Während die Pulsation der peristaltischen Pumpe durch Verwendung einer HPLC-Pumpe verringert werden kann, könnten die Einflüsse des Plasmas nur durch die simultane (Multikollektor) oder quasisimultane (TOF, *time of flight*) Detektion aller Isotope ausgeschlossen werden. Wenngleich die Anwendung eines Multikollektorgehäuses durch technische Randbedingungen begrenzt ist (zu großer Massenbereich von ^{12}C bis ^{202}Hg), ließe sich jedoch ohne weiteres ein Flugzeit-Massenspektrometer (ICP-TOF-MS) einsetzen. Dieses hätte den Vorteil, durch die schnelle Detektion auch schmale Fraktionen messen zu können. Durch Erhöhung der HPLC-Flußgeschwindigkeit ließe sich dadurch die Zeit der chromatographischen Trennung verkürzen.

Ein Problem der Quecksilberanalytik ist der Memory-Effekt des Quecksilbers. Dieser wurde durch Verwendung von PFA-Schläuchen und eines PFA-Zerstäubers reduziert, jedoch läßt das Ausspülverhalten der Sprühkammer noch zu wünschen übrig. Es bietet sich daher die direkte Zerstäubung des HPLC-Eluates im Plasma (also ohne Sprühkammer) an. Hierzu könnte ein handelsüblicher DIHEN-Zerstäuber (*direct injection high efficiency nebulizer*) verwendet werden.

Wie die Untersuchungen der HS-Quecksilber-Wechselwirkungen zeigten, besteht eine hohe Affinität von Quecksilber zu schwefelhaltigen HS-Fraktionen. Die bisherigen Untersuchungen der Schwefelspezies waren jedoch wegen der geringen Substanzmengen der Fraktionen auf die Analyse der Gesamtproben beschränkt. Durch Einsatz einer präparativen SEC könnten die Substanzmengen der einzelnen HS-Fraktionen gesteigert werden, so daß beispielsweise XANES- und NMR-Untersuchungen bestimmter HS-Fraktionen möglich wäre.

Zur Bestimmung von Molekulargewichten und der Charakterisierung der HS-Strukturen selbst bieten sich sanfte Ionisierungsmethoden wie MALDI-TOF-MS (*matrix assisted laser desorption ionisation*) und ESI-MS (*electro spray ionisation*) an. Bei der erstgenannten Methode müssen einzelne Fraktionen separiert und in eine

entsprechende Matrix gebracht werden. Durch Mehrfachionisation lassen sich anschließend Moleküle bis 10^6 Da detektieren, wobei die Auswertung durch eine Vielzahl von Signalen schwierig ist. Bestimmungen mit ESI-MS haben den Vorteil, daß eine Kopplung mit chromatographischen Methoden möglich ist. Unter Verwendung der Tandemmassenspektrometrie (MS-MS) lassen sich zusätzlich Strukturinformationen durch die Beziehung von Tocher- und Mutterionen erhalten [109].

Weiterhin bieten sich auch viele Einsatzmöglichkeiten der online MSIVA bei anderen chromatographischen Methoden an. Die Anwendung der MSIVA für Schwefel bei CE/ICP-MS-Kopplung konnte bereits gezeigt werden, während die Quantifizierung der an die Metallothioneine gebundenen Metalle in Kürze folgen wird.

6. Literaturverzeichnis

- [1] W. Ziechmann, Humic Substances, BI Wissenschaftsverlag, Weinheim (1994) 7-51
- [2] G. R. Aiken, D. M. McKnight, R. L. Wershaw und P. MacCathy, An introduction to humic substances in soil, sediment and water, in: G. R. Aiken, D. M. McKnight, R. L. Wershaw und P. MacCathy (Hrsg.), Humic substances in soil, sediment and water, Wiley, New York (1985) 1-12
- [3] C. W. Carter und I. H. Suffet, Binding of DDT to dissolved humic materials, Environ. Sci. Technol. **16** (1982) 735-740
- [4] Prisma Wissenschaft, Wiederkehr eines Alptraums, Der Spiegel **6**, Spiegel Verlag, Hamburg (1999) 169
- [5] B. Matuschak, Quecksilber in der grünen Hölle, Die Zeit, **42** (1998) 62
- [6] J. Lebel, D. Mergler, F. Branches, M. Lucotte, M. Ammorim, F. Larribe und J. Dolbec, Neurotoxic effects of low-level methylmercury contamination in the Amazonian Basin, Environ. Res. **A 79** (1998) 20-32
- [7] A. C. Barbosa, S. R. L. Silva und J. G. Dòrea, Concentration of mercury in hair of indigenous mothers and infants from the Amazon Basin, Arch. Environ. Contam. Toxicol. **34** (1998) 100-105
- [8] H. A. Kehrig, O. Malm, H. Akagi, J. R. D. Guimarães und J. P. M. Torres, Methylmercury in fish and hair samples from the Balbina reservoir, Brazilian Amazon, Environ. Res. **A 77** (1998) 84-90
- [9] L. D. Lacerda, Global mercury emissions from gold and silver mining, Water, Air and Soil Pollut. **97** (1997) 209-221

-
- [10] M. Roulet, M. Lucotte, A. Saint-Aubin, S. Tran, I. Rhèault, N. Farella, E. De Jesus Da Silva, J. Dezencourt, C.-J. Sousa Passos, G. Santos Soares, J.-R. D. Guimarães, D. Mergler und M. Amorim, The geochemistry of mercury in central Amazonian soils developed on the Alter-do-Chão formation of the lower Tapajós River Valley, Pará state, Brazil, *Sci. Total Environ.* **223** (1998) 1-24
- [11] V. K. Zeidemann, B. R. Forsberg, M. Roulet, M. Lucotte und W. F. Jardim, The geochemistry of mercury in soils of the Negro River Basin (Brazilian Amazon) and its role in the regional mercury cycle, Vortrag auf der 5th International conference – Mercury as a global pollutant, Rio de Janeiro (1999)
- [12] K. Kannan, R. G. Smith, R. F. Lee, H. L. Windom, P. T. Heitmuller, J. M. Macauley und J. Summers, Distribution of total mercury and methyl mercury in water, sediment, and fish from south Florida Estuaries, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **34** (1998) 109-118
- [13] Y. Cai, R. Jaffé und R. D. Jones, Interactions between dissolved organic carbon and mercury species in surface water of the Florida Everglades, *Appl. Geochem.* **14** (1999) 395-407
- [14] C. Marquardt, G. Herrman und N. Trautmann, Complexation of neptunium(V) with humic acids at very low metal concentrations, *Radiochim. Acta* **73** (1996) 119-125
- [15] H.-E. Gäbler, A. Bahr und B. Mieke, Determination of the interchangeable heavy-metal fraction in soils by isotope dilution mass spectrometry, *Fresenius J. Anal. Chem.* **365** (1999) 409-414
- [16] J. P. Pinheiro, A. M. Mota und M. L. Simões Gonçalves, Complexation study of humic acids with cadmium(II) and lead(II), *Anal. Chim. Acta* **284** (1994) 525-537

-
- [17] I. L. K uchler, N. Miekeley und B. R. Forsberg, Molecular mass distribution of dissolved organic carbon and associated metals in waters from Rio Negro and Rio Solmi es, *Sci. Total Environ.* **156** (1994) 207-216
- [18] P. Cambier, Contamination of soils by heavy metals and other trace elements: a chemical perspective, *Analisis* **22** (1994) M21-M24
- [19] L. Rottmann, Entwicklung und Anwendung einer online Isotopenverdünnungstechnik für die HPLC/ICP-MS Kopplung zur Bestimmung von Schwermetall-Wechselwirkungen mit organischen Wasserinhaltsstoffen in natürlichen aquatischen Systemen, Dissertation, Universität Regensburg (1994)
- [20] O. Lehto, J. Aho und E. V ah sarja, Elution patterns of aquatic humus in size exclusion chromatography based on different eluants, *Aqua Fennica* **16** (1986) 47-55
- [21] J. Knuutinen, L. Virkki, P. Mannila, P. Mikkelson, J. Paasivirta und S. Herve, High performance liquid chromatographic study of dissolved organic matter in natural waters, *Wat. Res.* **22** (1988) 985-990
- [22] J. Vogl und K. G. Heumann, Development of an ICP-IDMS method for dissolved organic carbon determinations and its application to chromatographic fractions of heavy metal complexes with humic substances, *Anal. Chem.* **70** (1998) 2038-2043
- [23] K. G. Heumann, S. Eisenhut, S. Gallus, E. H. Hebeda, R. Nusko, A. Vengosh und T. Walczyk, Recent developments in thermal ionization mass spectrometric techniques for isotope analysis, *Analyst* **120** (1995) 1291-1299
- [24] C. M. Barshick, Glow discharge mass spectrometry, in: C. M. Barshick, D. C. Duckworth und D. H. Smith (Hrsg.), *Inorganic mass spectrometry*, Marcel Dekker, New York (2000) 31-66

-
- [25] J. A. C. Broekaert, ICP-Massenspektrometrie, in: H. Günzler, R. Borsdorf, W. Fresenius, W. Huber, H. Kelker, I. Lüderwald, G. Tölg und H. Wisser (Hrsg.), Analytiker Taschenbuch, Bd. 9, Springer, Heidelberg (1990) 127-163
- [26] R. S. Houk, V. A. Fassel, G. D. Flesh, H. J. Scev, A. L. Gray und C. E. Taylor, Inductively coupled argon plasma for mass spectrometric determination of trace elements, *Anal. Chem.* **52** (1980) 2283-2289
- [27] K. E. Jarvis, A. L. Gray, I. Jarvis und J. Williams, Plasma source mass spectrometry, Special publication 85, Royal Society of Chemistry (1990) 26
- [28] K. E. Jarvis, A. L. Gray, R. S. Houk, Instrumentation for inductively coupled plasma mass spectrometry, in: Handbook of inductively coupled plasma mass spectrometry, Blackie, London (1992) 10-57
- [29] S. F. Durrant, Laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry: achievements, problems, prospects, *J. Anal. At. Spectrom.* **14** (1999) 1385-1403
- [30] A. R. Date und A. L. Gray, Applications of inductively coupled plasma mass spectrometry, Blackie, Glasgow (1989) 17-36
- [31] A. L. Gray, in: F. Adams, R. Gijbels und R. Van Grieken (Hrsg.), Inorganic mass spectrometry, Chem. Anal. Ser., Bd. 95, Wiley, New York (1988) 259-266
- [32] D. R. Lide und H. P. R. Frederikese (Hrsg.), Handbook of Chemistry and Physics, 78. Aufl., CRC Press, Boca Raton (1997) 10.214-10.215
- [33] ICP-MS Data base, Element information, HP4500 Software Paket (1998)
- [34] T. van der Velde-Koerts und J. L. M. de Boer, Minimization of spectral interferences in inductively coupled plasma mass spectrometry by simplex optimization and nitrogen addition to the aerosol carrier gas for multi-element environmental analysis, *J. Anal. At. Spectrom.* **9** (1994) 1093-1098

-
- [35] N. N. Sesi, A. Mac Kenzie, K. E. Shanks, P. Y. Yang und G. M. Hieftje, Fundamental studies of mixed-gas inductively coupled plasmas, *Spectrochim. Acta* **B 49** (1994) 12-14
- [36] I. Feldmann, N. Jakubowski und D. Stuewer, Application of a hexapole collision and reaction cell in ICP-MS; Part I: Instrumental aspects and operational optimization, *Fresenius J. Anal. Chem.* **365** (1999) 415-421
- [37] I. Feldmann, N. Jakubowski, C. Thomas und D. Stuewer, Application of a hexapole collision and reaction cell in ICP-MS; Part II: Analytical figures of merit and first applications, *Fresenius J. Anal. Chem.* **365** (1999) 422-428
- [38] S. D. Tanner, Characterization of ionisation and matrix suppression in inductively coupled `cold` plasma mass spectrometry, *J. Anal. At. Spectrom.* **10** (1995) 905-921
- [39] K. Sakata und K. Kawabata, Reduction of fundamental polyatomic ions in inductively coupled plasma mass spectrometry, *Spectrochim. Acta* **B 49** (1994) 1027-1038
- [40] R. Tsukahara und M. Kubota, Studies with desolvation in inductively coupled plasma mass spectrometry, *Spectrochim. Acta* **B 45** (1990) 581-589
- [41] J. Vogl, Charakterisierung und Quantifizierung von Schwermetall/Huminstoff-Species durch HPLC/ICP-MS, Dissertation, Universität Regensburg (1997) 15
- [42] ELAN 5000 Induktiv gekoppeltes Plasma-Massenspektrometer, Referenz-Handbuch, Ausgabe 2.0, Perkin Elmer, Überlingen (1994) 3.11
- [43] W. Alt, Experimente an lasergekühlten Kalzium-Ionenkristallen in einer linearen Paulfalle, Diplomarbeit, Johannes Gutenberg-Universität Mainz (1998) 13
- [44] Element 2, Firmenprospekt 1125880, Finnigan MAT GmbH, Bremen (1998) 2

-
- [45] K.G. Heumann, Elementspurenbestimmung mit der massenspektrometrischen Isotopenverdünnungsanalyse, in: H. Günzler, R. Borsdorf, W. Fresenius, W. Huber, H. Kelker, I. Lüdewald, G. Tölg und H. Wisser (Hrsg.), Analytiker Taschenbuch, Bd. 9, Springer Verlag, Heidelberg (1990) 192-224
- [46] HPLC Flüssigkeits Chromatographie, Macherley-Nagel, Düren (1996) 9
- [47] D. A. Skook und J. J. Leary, Instrumentelle Analytik, Springer, Berlin (1996) 728-731
- [48] A. G. Ewing, R. A. Wallingford und T. M. Olefirowicz, Capillary Electrophoresis, Anal. Chem. **61** (1989) 292A-303A
- [49] M. Otto, Analytische Chemie, VCH, Weinheim (1995) 502-506
- [50] M. P. Richards und J. H. Beattie, Comparison of different techniques for the analysis of metallothionein isoformes by capillary electrophoresis, J. Chrom. **B 669** (1995) 27-37
- [51] R. L. Malcolm, Geochemistry of stream fulvic and humic substances, in: G. R. Aiken, D. M. McKnight, R. L. Wershaw und P. MacCarthy (Hrsg.), Humic substances in soil, sediment and water, Wiley, New York (1985) 181-209
- [52] W. Ziechmann, Huminstoffe, VCH, Weinheim (1980) 7-51
- [53] C. Zwiener, M. U. Kumke, G. Abbt-Braun und F. H. Frimmel, Adsorbed and bound residues in fulvic acid fractions of a contaminated groundwater – isolation, chromatographic and spectroscopic characterization, Acta Hydrochim. Hydrobiol. **27** (1999) 208-213
- [54] R. L. Malcolm, Quantitative evaluation of XAD-8 and XAD-4 resins used in tandem for removing organic solutes from water, Environ. Int. **18** (1982) 597-607

-
- [55] G. R. Aiken, E. M. Thurman und R. L. Malcolm, Comparison of XAD macroporous resins for the concentration of fulvic acid from aqueous solution, *Anal. Chem.* **51** (1979) 1799-1803
- [56] E. M. Thurman und R. L. Malcolm, Preparative isolation of aquatic humic substances, *Environ. Sci. Technol.* **15** (1981) 463-466
- [57] G. Abbt-Braun, F. H. Frimmel und P. Lipp, Isolation of organic substances from aquatic and terrestrial systems – comparison of some methods, *Z. Wasser-Abwasser-Forsch.* **24** (1991) 285-292
- [58] F. H. Frimmel und J. Geywitz, Zur koordinativen Bindung von Metallen an Gewässerhuminstoffe, *Fresenius Z. Anal. Chem.* **316** (1983) 582-588
- [59] J. I. Kim, G. Buckau, G. H. Li, H. Duschner und N. Psarros, Characterization of humic and fulvic acids from Gorleben groundwater, *Fresenius J. Anal. Chem.* **338** (1990) 245-252
- [60] D. Fabbri, M. Mongardi, L. Montanari, G. C. Galletti, G. Chiavari und R. Scotti, Comparison between CP/MAS ¹³C-NMR and pyrolysis-GC/MS in the structural characterisation of humins and humic acids of soil and sediments, *Fresenius J. Anal. Chem.* **362** (1998) 299-306
- [61] H.-R. Schulten und M. Schnitzer, The chemistry of soil organic nitrogen: a review, *Biol. Fertil. Soils* **26** (1998) 1-15
- [62] H.-R. Schulten, The three-dimensional structure of humic substances and soil organic matter studied by computational analytical chemistry, *Fresenius J. Anal. Chem.* **351** (1995) 62-73
- [63] F. H. Frimmel und G. Abbt-Braun, Comparison of aquatic humic substances of different origin, in: B. Allard, H. Boren und A. Grimmvall (Hrsg.), *Humic substances in the aquatic and terrestrial environment*, Springer, Berlin (1991) 37-46

-
- [64] J. P. Pinheiro, A. M. Mota und M. L. Simões Gonçalves, Complexation study of humic acids with cadmium(II) and lead(II), *Anal. Chim. Acta* **284** (1994) 525-537
- [65] M. R. Hoffmann, E. C. Yost, S. J. Eisenreich und W. J. Maier, Characterization of soluble and colloidal-phase metal complexes in river water by ultrafiltration. A mass-Balance approach, *Environ. Sci. Technol.* **15** (1981) 655-661
- [66] W. Susetyo, L. A. Carreira, L. V. Azarraga und D. M. Grimm, Fluorescence techniques for metal-humic interaction, *Fresenius J. Anal. Chem.* **339** (1991) 624-635
- [67] P. Burba, Labile/inert metal species in aquatic humic substances: an ion-exchange study, *Fresenius J. Anal. Chem.* **348** (1994) 301-311
- [68] X. Jin, G. W. Bailey, Y. S. Yu und A. T. Lynch, Kinetics of single and multiple metal ion sorption processes on humic substances, *Soil Sci.* **316** (1996) 509-520
- [69] G. Marx und K. G. Heumann, Mass spectrometric investigations of the kinetic stability of chromium and copper complexes with humic substances by isotope-labelling experiments, *Fresenius J. Anal. Chem.* **364** (1999) 489-494
- [70] K. Küllmer, Bestimmung der Reaktivität von Schwermetall/Huminstoff-komplexen durch Kopplung chromatographischer Methoden mit ICP-MS, Diplomarbeit, Johannes Gutenberg-Universität Mainz (1999) 80
- [71] M. Krajnc, J. Štupar und S. Milicev, Characterisation of chromium and copper complexes with fulvic acids isolated from soil in Slovenia, *Sci. Total Environ.* **159** (1995) 23-31
- [72] Organikum, 18. Aufl., Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin (1990) 138

-
- [73] H. Taube, Rates and mechanisms of substitution in inorganic complexes in solution, *Chem. Rev.* **50** (1952) 69-126
- [74] M. L. Tobe, Reaktionsmechanismen der anorganischen Chemie, 1. Aufl., VCH, Weinheim (1976) 101-106
- [75] I. Fitz, Reaktionstypen in der anorganischen Chemie, 2., Aufl., Akademie Verlag, Berlin (1981) 230-242
- [76] Channeltron electron multipliers – Handbook for mass spectrometry applications, Galileo Electro-Optics Corporation, Strubridge (1991)
- [77] G. Marx, Massenspektrometrische Untersuchungen zum Nachweis kinetisch stabiler Chrom-Huminstoff-Komplexe im Vergleich mit kupferanalogen Komplexen, Diplomarbeit, Johannes Gutenberg-Universität Mainz (1997) 19-23
- [78] B. Aster, P. Burba und J. A. C. Broekaert, Analytical fractionation of aquatic humic substances and their metal species by means of multistage ultrafiltration, *Fresenius J. Anal. Chem.* **354** (1995) 1291-1299
- [79] A. Götz und K. G. Heumann, Chromspurenbestimmung in anorganischen, organischen und wäßrigen Proben mit der massenspektrometrischen Isotopenverdünnungsanalyse, *Fresenius Z. Anal. Chem.* **331** (1988) 123-128
- [80] P. Burba, Persönliche Mitteilung, ISAS, Dortmund (1998)
- [81] H. Kerndorff und M. Schnitzer, Sorption of metals on humic acid, *Geochim. Cosmochim. Acta* **44** (1980) 1701-1708
- [82] L. Rottmann und K. G. Heumann, Development of an on-line isotope dilution technique with HPLC/ICP-MS for the accurate determination of elemental species, *Fresenius J. Anal. Chem.* **350** (1994) 221-227

-
- [83] M. Leermakers, P. Lansens und W. Baeyens, Storage and stability of inorganic and methylmercury solutions, *Fresenius J. Anal. Chem* **336** (1990) 655-662
- [84] J. Allibone, E. Fatemian und P. J. Walker, Determination of mercury in potable water by ICP-MS using gold as a stabilising agent, *J. Anal. At. Spectrom.* **14** (1999) 235-239
- [85] W. Forth, D. Henschler, W. Rummer und K. Starke, *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*, 6. Aufl., BI Wissenschaftsverlag, Mannheim (1992) 774-777
- [86] R. J. Lantzky und F. T. Mackenzie, Atmospheric trace metals: Global cycles and assesment on mans´ s impact, *Geochim. Cosmochim. Acta* **43** (1979) 511-525
- [87] W. Salomons und P. Baccini, Chemical species and metal transport in lakes, in: M. Bernhard, F. E. Brinckman und P. J. Sadler (Hrsg), *The importance of chemical „speciation“ in environmental processes*, Springer-Verlag, Berlin (1984) 193-216
- [88] R. Ebinghaus, H. Hintelmann und R. D. Wilken, Mercury-cycling in surface waters and in the atmosphere – species analysis for the investigation of transformation and transport properties of mercury, *Fresenius J. Anal. Chem.* **350** (1994) 21-29
- [89] J. P. Hurley, D. P. Krabbenhoft, C. L. Babiarz und A. W. Andren, Cycling of mercury across the sediment-water interface in seepage lakes, in: L. A. Baker (Hrsg), *Environmental chemistry of lakes and reservoirs*, Amer. Chem. Soc., Washington (1994) 425-449
- [90] D. Y. Wang, C. L. Qing, T. Y. Guo und Y. J. Guo, Effects of humic acid on transport and transformation of mercury in soil-plant systems, *Water, Air and Soil Pollut.* **95** (1997) 35-43

-
- [91] D. Wallschläger, M. V. M. Desai und R. D. Wilken, The role of humic substances in the aqueous mobilization of mercury from contaminated floodplain soils, *Water, Air and Soil Pollut.* **90** (1996) 507-520
- [92] D. Schaumlöffel und A. Prange, A new interface for combining capillary electrophoresis with inductively coupled plasma-mass spectrometry, *Fresenius J. Anal. Chem.* **364** (1999) 452-456
- [93] A. Prange und D. Schaumlöffel, Determination of element species at trace levels using capillary electrophoresis-inductively coupled plasma sector field mass spectrometry, *J. Anal. At. Spectrom.* **14** (1999) 1329-1332
- [94] M. J. Stillman, Metallothioneins, *Coord. Chem. Rev.* **144** (1995) 461-511
- [95] A. Prange, Speziesanalyse von Metallothioneinen in menschlichen Cytosolen mit Hilfe chromatographischer und massenspektrometrischer Methoden, Vortrag auf dem 5. Symposium Massenspektrometrischer Verfahren der Elementspurenanalyse und 16. ICP-MS Anwendertreffen, Jülich (2000)
- [96] R. Lobinski, H. Chassaigne und J. Szpunar, Analysis of metallothioneins using coupled techniques, *Talanta* **46** (1998) 271-289
- [97] J. H. Beattie, M. P. Richards und R. Self, Separation of metallothionein isoforms by capillary zone electrophoresis, *J. Chrom.* **632** (1993) 127-135
- [98] V. Šprta, B. Knob und P. Janoš, X-ray fluorescence determination of total sulfur in fly ash, *Fresenius J. Anal. Chem.* **364** (1999) 705-708
- [99] W. Mroczkowski und A. Cyganski, Spectrophotometric determination of microgram amount of Sulfur: Thermo-spectrophotometric method for total sulfur determination in mineral oils, *Chemia Analityczna* **40** (1995) 641-647
- [100] J. Prietzel, H. Cronauer und C. Strehl, Determination of dissolved total sulfur in aqueous extracts and seepage water of forest soils, *Int. J. Environ. Anal. Chem.* **64** (1996) 193-203

-
- [101] P. J. Paulsen und W. R. Kelly, Determination of sulfur as arsenic monosulfide by isotope dilution thermal ionisation mass spectrometry, *Anal. Chem.* **56** (1984) 708
- [102] J. H. R. Kagi, in: K. T. Suzuki, N. Imura und M. Kimura (Hrsg.), *Metallothionein III*, Birkhauser, Basel (1993) 29-55
- [103] J. Pauwels, A. Lamberty und H. Schimmel, The determination of the uncertainty of reference materials certified by laboratory comparison, *Accred. Qual. Assur.* **3** (1998) 180-184
- [104] *Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement*, ISBN 92-67-10188-9, International Organisation for Standardisation (1993)
- [105] I. Papadakis, E. Poulsen, P. Taylor, L. Van Nevel und P. De Bièvre, IMEP-9 - Trace elements in water, Report to Participants GR/R/IM/15/1999, Institute of Reference Materials and Measurements (IRMM), European Commission – JRC (1999) 1-46
- [106] I. Heiber und U. Obst, Einfluß ausgewählter Huminstoffe auf Stoffwechsel und Erbgutveränderungen aquatischer Mikroorganismen, Abschlußbericht des DFG-Forschungsvorhabens OB 83/4-1 im Rahmen des DFG-Forschungsschwerpunktes „Refraktäre organische Säuren in Gewässern“, WFM Wasserforschung Mainz (1998)
- [107] G. R. Aiken, Persönliche Mitteilung, US Geological Survey, USA (2000)
- [108] Unveröffentlichte Ergebnisse der Untergruppe „Methoden - Elementanalytik“, DFG-Schwerpunktprogramm „Refraktäre organische Säuren in Gewässern, ROSIG“ (2000)
- [109] C. McIntyre, B. D. Batts und D. R. Jardine, Electrospray mass spectrometry of groundwater organic acids, *J. Mass. Spectrom.* **32** (1997) 328-330