
Auf dem Weg zur massenspektrometrischen
Bildgebung von Pflanzenteilen:
Erste Messungen mit einer Desorptions
Elektrospray Ionisationsquelle (DESI) an einem
Orbitrap-Massenspektrometer

Masterarbeit

Eingereicht von

Julia Stadler

Institut für Radioökologie und Strahlenschutz
Fakultät für Mathematik und Physik
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

Erstprüfer: Prof. Dr. Clemens Walther
Zweitprüferin: Prof. Dr. Carla Vogt
Betreuer: Dr. Michael Steppert
Datum der Abgabe: 23.10.2017

Danksagung

Ein großer Dank geht an Prof. Dr. CLEMENS WALTHER für die Möglichkeit meine Masterarbeit am Institut für Radioökologie und Strahlenschutz über die Methodenentwicklung der neuen Desorptions-Elektrospray-Ionisations-Quelle schreiben zu können.

Prof. Dr. CARLA VOGT danke ich, dass sie mir das Studium der Analytik ermöglicht und die Aufgaben der Zweitprüferin übernommen hat.

Dr. MICHAEL STEPPERT bin ich für die gute Betreuung und die Hilfe in meiner Arbeit sowie die kostenlose Ernährungsberatung sehr dankbar.

Ein weiterer Dank geht an SEBASTIAN BÜCHNER für das Anschließen der DESI-Quelle und die Beratung bei Problemen.

Daneben gilt mein Dank MANUEL RAIWA, welcher die Geräteeinweisung durchgeführt hat und immer bei Problemen zur Verfügung stand.

Außerdem möchte ich mich bei VIVIEN SCHULTE bedanken, da sie mir immer mit Rat, Tat und Kaffee zur Seite stand.

Bei dem ganzen Institut bedanke ich mich für die tatkräftige Unterstützung und die freundliche Aufnahme in die Kreise des Fußballs.

Zuletzt gilt mein Dank meinem Freund RUSLAN DAUTKULOW und meiner Familie für den seelischen und finanziellen Beistand über mein gesamtes Studium hinweg.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
2. Theoretischer Hintergrund	3
2.1. Eigenschaften von Arsen	3
2.2. Eigenschaften von Europium	5
2.3. Physiologie der Pflanzen	6
2.4. Wassertransport und Stoffaufnahme	7
2.5. Pflanzenaufnahme und Wirkung von Arsen und Europium . .	8
2.6. Massenspektrometrie	11
2.6.1. Elektrospray-Ionisation	12
2.6.2. Desorptions-Elektrospray-Ionisation	13
2.6.3. Orbitrap-Massenanalysator	16
2.7. Zeitaufgelöste Laser-Fluoreszenz-Spektroskopie von Europium	18
3. Experimentelle Arbeit	23
3.1. Erste Untersuchungen mit der DESI-MS	23
3.1.1. Optimierung der Messparameter der DESI-Quelle . . .	23
3.1.2. Kopplungsversuche von DC-DESI-MS	25
3.2. Pflanzenexperimente	25
3.2.1. Aufzucht von <i>Pisum sativum</i> L. und <i>Secale cereale</i> L. .	25
3.2.2. Analyse der Kontaminationslösungen	27
3.2.3. Untersuchung von Arsen in <i>Epipremnum aureum</i> L. und <i>Pisum sativum</i> L.	27
3.2.4. Versuchsaufbau von Europium und <i>Secale cereale</i> L. . .	29
3.3. Analyse der Pflanzenteile	29
3.3.1. Untersuchungen mit DESI-MS	30
3.3.2. Probenaufarbeitung für die Konzentrationsbestimmung	30
3.3.3. Analyse von Arsen mit ICP-OES	31
3.3.4. Untersuchung von Europium mit ICP-MS	31

3.3.5. Charakterisierung der Europiumspezies mit TRLFS . . .	32
4. Ergebnisse und Diskussion	33
4.1. Parameteroptimierung der DESI-MS	33
4.2. Kopplungsversuche mit DC-DESI-MS	35
4.3. Erste Messungen von Arsen in <i>Epipremnum aureum</i> L.	37
4.3.1. Pflanzenaufnahme von Dimethylarsenat mit DESI-MS	37
4.3.2. Konzentrationsbestimmung von Arsen	40
4.4. Analyse von Arsen und <i>Pisum sativum</i> L.	42
4.4.1. Untersuchung der Nährlösungen und Arsenspezies . . .	42
4.4.2. Pflanzenaufnahme der Arsenspezies mit DESI-MS . . .	43
4.4.3. Konzentrationsbestimmung von Arsen	46
4.5. Analyse von Europium und <i>Secale cereale</i> L.	49
4.5.1. Untersuchung der Nährlösung und Europium mit nESI- MS	49
4.5.2. Pflanzenaufnahme von Europium mit DESI-MS und TRLFS	52
4.5.3. Konzentrationsbestimmung von Europium	58
5. Zusammenfassung und Ausblick	61
6. Literaturverzeichnis	65
Abbildungsverzeichnis	73
Tabellenverzeichnis	75
Abkürzungsverzeichnis	78
A. Anhang	79
Liste der verwendeten Chemikalien	79
B. Selbstständigkeitserklärung	89

1 | Einleitung

Die Aufnahme von Radionukliden aus der Umwelt in Pflanzen stellt ein vielseitiges Themengebiet dar. Diese wurden bei Kernwaffentests und nuklearen Unfällen, wie Tschernobyl oder Fukushima freigesetzt. Bisherige Erkenntnisse stützen sich meist auf die Bestimmung der Elementkonzentration im Organismus, aber nicht auf die vorliegenden Verbindungen.^[1]

Mithilfe der Elektrospray-Ionisation (ESI) gekoppelt mit Massenspektrometrie wurden bisher viele Spezies in Lösung identifiziert. Durch die sanfte Ionisationsmethode konnten sowohl große, unpolare als auch kleine, polare Moleküle analysiert werden. Allerdings müssen Pflanzen für diese Analyse-methode aufgeschlossen werden und verlieren so ihre Bindungspartner nahezu vollständig.^[2;3]

Eine Weiterentwicklung ist die Desorptions-Elektrospray-Ionisationsmethode (DESI). Sie kann für die orts aufgelöste Speziation von Substanzen in Pflanzenproben genutzt werden. Durch die unter Atmosphärendruck stattfindende Ionisation und eine geschickte Überführung des Analyten in den Massenanalysator wird ohne große Probenvorbereitung ein schnelles Analysenergebnis erhalten. Demnach ist es möglich, Proben direkt und ohne chemische oder physikalische Veränderungen den Analyten in seiner natürlichen Umgebung zu untersuchen.^[2;4]

Derzeitige Forschungen stützen sich meist auf die Analyse von Metaboliten in Pflanzen oder der Auswirkung toxischer Verbindungen auf den Organismus. Aufgrund dessen soll in dieser Arbeit zunächst versucht werden, eine organische und zwei anorganische Arsen-Spezies in Pflanzenteilen zu identifizieren, um das Arbeiten mit dem Gerät zu erproben.^[5]

Des Weiteren liefert die Speziation von Europium in Pflanzen einen guten Anhaltspunkt, da dessen Aufnahme bereits mit Zeitaufgelöster Laser-Fluoreszenz-Spektroskopie (TRLFS, engl. *time-resolved laser fluorescence spectroscopy*) nachgewiesen wurde. Vom Verhalten des Europiums könnten

nachfolgend Rückschlüsse auf das homologe, radioaktive Actinid Americium gezogen werden.^[6]

In dieser Arbeit soll eine Methode zur Analyse von Arsen und Europium in Pflanzenteilen durch DESI-MS entwickelt werden. Weitere Analysemethoden, wie die Konzentrationsbestimmung der Elemente, mittels ICP-OES und ICP-MS, und TRLFS, sollen zusätzliche Informationen über die mögliche Aufnahme und den Pflanzenmetabolismus geben.

2 | Theoretischer Hintergrund

Im Folgenden werden die benötigten wissenschaftlichen Grundlagen für die Arbeit dargestellt. Dabei werden die chemischen Eigenschaften von Arsen und Europium erläutert und deren Aufnahme in Pflanzen dargelegt. Darauf folgt die Erklärung des verwendeten Massenspektrometers mit einem Orbitrap-Massenanalysator und dem Prozess der Elektrospray- und Desorptions-Elektrospray-Ionisation.

2.1. Eigenschaften von Arsen

Arsen ist allgemein ein ubiquitäres Element auf der Erde. Es kommt natürlich sowohl in der Atmosphäre, Lithospäre, Pedosphäre, Hydrosphäre und Biosphäre vor. Gediegenes Arsen ist eher selten zu finden, da es bevorzugt kationische, aber auch anionische Verbindungen, wie z.B. Arsenchalkogenide oder Metallarsenide bildet. Neben dem natürlichen Vorkommen, wurde Arsen außerdem anthropogen durch die Verbrennung von fossilen Brennstoffen, Minenarbeit, den Gebrauch von arsenhaltigen Pestiziden und Herbiziden, aber auch durch noch heute verwendetes Holzschutzmittel in die Umwelt eingetragen.^[7]

Das monoisotopische Element liegt meist in den Oxidationsstufen -3, 0, +3 oder +5 vor, wobei dessen Löslichkeit von dem pH- und Eh-Wert der Lösung abhängt (Abbildung 2.1). Unter oxidierenden Bedingungen liegt Arsen fünfwertig und unter reduzierenden dreiwertig vor. Während das Element ungefährlich ist, sind dessen Verbindungen toxisch und führen u.a. zur Schädigung der DNA (Desoxiribonukleinsäure, engl. *desoxiribonucleic acid*).^[7;8]

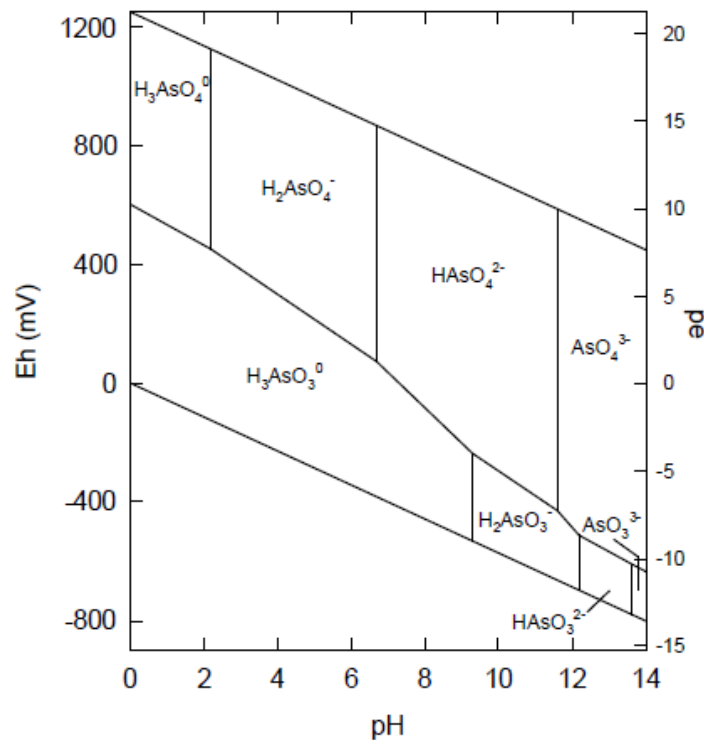


Abbildung 2.1.: POURBAIX-Diagramm von wässrigen Arsenspezies in dem System As-O₂-H₂O bei 25 °C und 1 bar.^[9]

Natürlich sind neben dem anorganischen Arsenat und Arsenit auch organische Verbindungen, wie Monomethylarsenat (MMA) und Dimethylarsenat (DMA) vertreten, welche zum größten Teil von Mikroorganismen im Boden gebildet werden. DMA kann weitergehend über zwei Prozesse im Boden weiterreagieren: Zum einen über die reduktive Umwandlung zu organo-Arsin unter anaeroben Bedingungen und zum anderen über die Demethylierung zu CO₂ und Arsenat unter aeroben Bedingungen. Es entsteht ein Kreislauf im Boden, in dem die genannten Arsen-Spezies vertreten sind.^[10;11]

Die Bioverfügbarkeit der Spezies hängt somit stark von den pH- und Redoxbedingungen im vorliegenden Boden ab. In der Rhizosphäre herrschen meist oxidierende Bedingungen, wodurch Eisen als Hydroxid oder Oxyhydroxid gefällt wird und an den Wurzeln der Pflanze anlagert. Diese gebildete *Eisenplaque* hat einen hemmenden Einfluss auf die Arsen-Aufnahme in die Pflanze und besitzt zudem eine hohe Adsorptions-Affinität gegenüber Arsenat-Verbindungen.^[10;11]

2.2. Eigenschaften von Europium

Das Element Europium zählt zu den Lanthaniden des Periodensystems und ist daher in der 3. Nebengruppe zu finden. Es besitzt die Elektronenkonfiguration $[\text{Xe}]4f^7 6s^2$ und die zwei stabilen Isotope ^{151}Eu (47,8 %) und ^{153}Eu (52,2 %). Natürlich kommt Europium meist mit den weiteren Seltenen Erden als Phosphate, Carbonate, Fluoride oder Silicatminerale in metamorphen und magmatischen Gesteinen vor. In der Erdkruste ist Europium mit $0,99 \cdot 10^{-5}$ % sehr selten vertreten.^[8;12]

Weitergehend wird Europium in der Forschung häufig als Analog zu dem toxischen Radionuklid Americium mit der Elektronenkonfiguration $[\text{Rn}]5f^7 7s^2$ eingesetzt. Gründe dafür sind die Ähnlichkeiten der Elektronenkonfiguration von der Valenzschale, der Elektronegativität, der dreiwertigen Oxidationsstufe, des Ionenradius und der Koordinationszahl von Neun. Aus diesen Eigenschaften resultiert ein analoges Verhalten in vielen Matrices und Organismen.^[13;14]

Für die Radioökologie ist die Auswirkung von Americium-241 ein wichtiges Themegebiet. Es kommt nicht natürlich vor, entsteht meist über β^- -Zerfall von Plutonium-241 in Brennstoffstäben von Kernreaktoren und besitzt eine Halbwertszeit von 432,6 a. Nach dem Unfall in Chernobyl wurde eine erhebliche Menge Pu-241 freigesetzt, wodurch das Am-241 in der Exklusions-Zone einen großen Einfluss auf die Umwelt ausübt. Europium kann demnach als nicht-radioaktiver Vertreter des Americiums genutzt werden, um zunächst in einem inaktiven Versuch Eigenschaften des Americiums näherungsweise vorherzusagen.^[15]

Das Europium-Ion existiert in wässriger Lösung vorzugsweise dreiwertig, kann aber als zweiwertiges Ion unter reduzierenden Bedingungen vorliegen. Eu^{3+} ist aufgrund seines geringen Ionenradius und seiner hohen Ladung eine starke Lewis-Säure. Nach dem *HSAB*-Prinzip (engl. *Hard and Soft Acids and Bases*) ist daher eine Wechselwirkung mit harten Donor-Liganden bevorzugt. Dementsprechend ist bei Anwesenheit von Phosphat-, Carbonat-, und Carboxylatliganden eine starke Komplexbildung des Europiums wahrscheinlich. Wird die Pflanzenaufnahme von Europium betrachtet, sind pH-Werte nahe dem neutralen Bereich ebenso zu erwarten, wie das Auftreten von Carbonat- und Phosphatliganden. In Pflanzennähe können außerdem kleine organische Carboxylatliganden aus Pflanzenexsudaten in Böden vorliegen.

All diese Liganden können das Europium komplexieren und sein Verhalten damit beeinflussen. ZHA *et al.* erforschten die Auswirkung von Europium in wässriger, carbonat-, phosphat- und citrathaltiger Lösung bei verschiedenen pH-Werten. Es ergab sich, dass in wässriger (pH = 5), carbonat- (pH = 4) und citrathaltiger (pH = 4) Umgebung Europium von den Pflanzen aufgenommen wurde. Außer beim Citrat lag bei diesen pH-Werten das freie, dreiwertige Ion Eu^{3+} vor. Darüber hinaus wird das Verhalten des Ions über den anthropogenen Liganden EDTA beeinflusst. Fe(III)-, Cu(II)- und Zn(II)-EDTA-Verbindungen werden als Dünger eingesetzt und somit in Böden eingebracht.^[13;16]

Die Aufnahme und Translokation von Europium in Pflanzen wurden in der Veröffentlichung von FELLOWS *et al.* aus dem Jahre 2003 beschrieben. Dabei wurden der *Avena sativa* zwei verschiedene Europiumkonzentrationen von 1 mmol/L und 10 mmol/L angeboten und mittels Zeitaufgelöster Laser-Fluoreszenz-Spektroskopie untersucht. Diese Literatur soll in dieser Arbeit als Grundlage für die Aufnahme von Europium in Pflanzen dienen.^[6]

2.3. Physiologie der Pflanzen

Die Physiologie der Pflanze beschäftigt sich mit den Lebensvorgängen der Pflanzen bzw. mit der Analyse und Erklärung von Regulations- und Kontrollprozessen in der Pflanze. Um diese nachzuvollziehen, ist der Aufbau von Pflanzen und dessen Zellen von Bedeutung.^[17]

Eine embryonale Pflanzenzelle befindet sich in jedem Spross und in jeder Wurzel einer Pflanze (Abbildung 2.2). Die wichtigsten Bestandteile sind das Cytoplasma und der Zellkern (Nucleus). Das Cytoplasma wird in das Cytosol, die Zellflüssigkeit und alle darin enthaltenen gelösten Substanzen, und das Cytoskelett, welches die Zelle mechanisch stabilisiert, unterteilt. Der Zellkern enthält das genetische Material der Pflanze und kommt nur bei eukaryotischen Zellen vor.^[17;18]

Weitergehend grenzen sich das endoplasmatische Reticulum, die Vacuole, die Mitochondrien, der Golgi-Apparat und die Chloroplasten von dem Cytoplasma ab. Wichtig an dieser Stelle ist die Aufgabe der Mitochondrien. In diesem Organell wird der Energielieferant Adenosintriphosphat (ATP) gebildet, wel-

cher u.a. im Pflanzenstoffwechsel eine entscheidende Rolle spielt. Außerdem stellen Mitochondrien und Zellkern die einzigen DNA-haltigen Organellen in einer Pflanze dar.^[17;18]

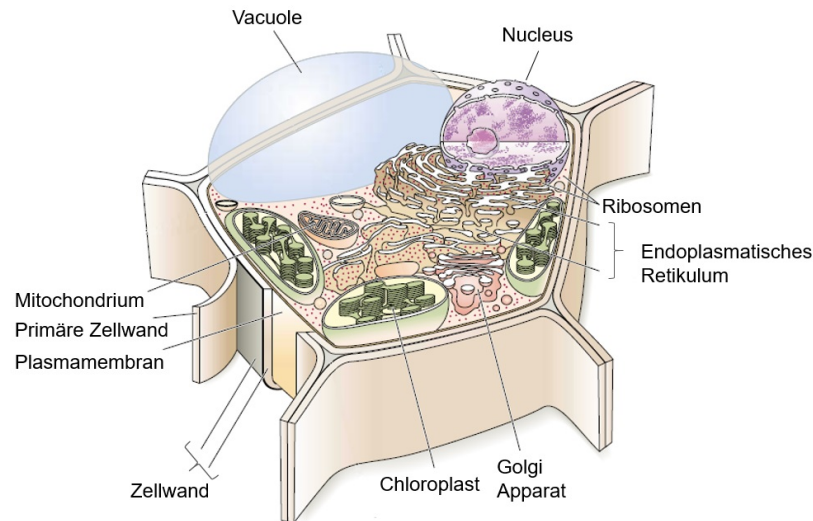


Abbildung 2.2.: Struktureller Aufbau einer embryonalen Pflanzenzelle.^[18]

2.4. Wassertransport und Stoffaufnahme

Der Weg des Wassers vom Boden zum Blatt einer Pflanze ist wichtig zu verstehen, da auch im Wasser gelöste Substanzen gleichzeitig transportiert werden und in den Organismus gelangen. Dabei sind das Xylem als Leitbahn und das Phloem als Leitbündel für den Transport verantwortlich und verbinden die Wurzel- mit der Blattregion.^[19]

Drei verschiedene Komponenten sorgen für die Aufnahme von Wasser und gelösten Substanzen durch die Wurzeln: Die Transpiration des Wassers durch die Blätter, die Aufnahme aus dem Medium und die Leitung durch das Xylem. Die Transpiration stellt die treibende Kraft der Wasseraufnahme dar, wobei Wasser durch die Pflanzenporen (Stomata) und zu einem geringen Teil durch die Cuticula diffundiert.^[18;19]

Weitergehend gelangt das Wasser und gelöste Substanz durch drei Transportwege in das Pflanzeninnere: Der symplastische Transportweg durch die Zellen, der apoplastische Weg durch die Zellwände und der transmembrane

Weg durch die Membranen (Abbildung 2.3). An der Endodermis angelangt reguliert der Casparische Streifen die weitere Aufnahme in das Xylem. Über die Leitbahn gelangt das Wasser schließlich in das Pflanzenblatt, wobei Adhäsion, Cohäsion und der Sog der Transpiration eine wichtige Rolle spielen.^[18;19]

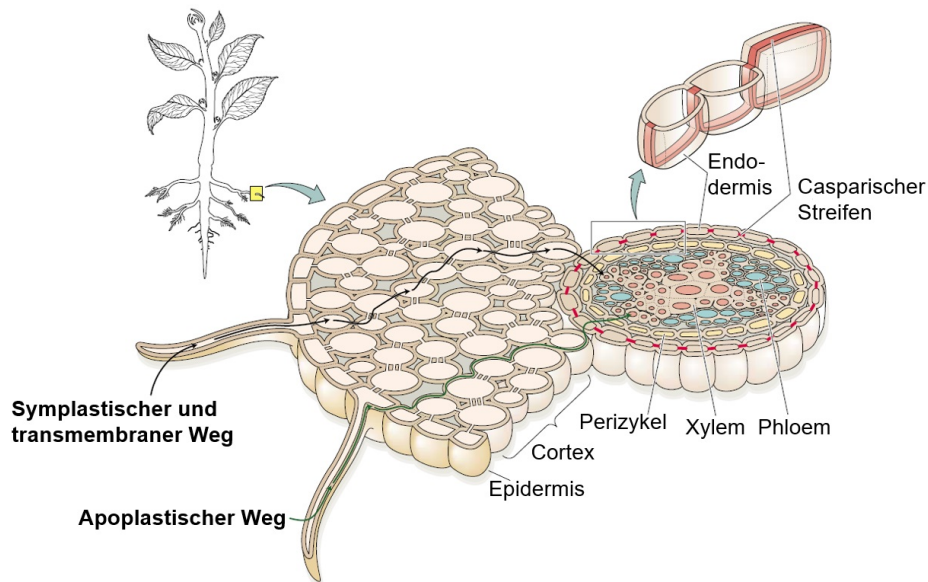


Abbildung 2.3.: Darstellung der Transportwege einer Pflanze (apoplastisch, symplastisch und transmembran) von Wasser durch die Wurzeln bis zur Endodermis.^[18]

2.5. Pflanzenaufnahme und Wirkung von Arsen und Europium

Die Pflanzenaufnahme von Substanzen aus einem Nähmedium oder Boden ist für jede Verbindung individuell und verläuft über unterschiedliche Transportwege.

Jede Pflanze nimmt Arsen unterschiedlich stark auf. Dieser Prozess kann über den Transferfaktor (TF) bestimmt werden, welcher sich definiert als Verhältnis von Arsenkonzentration in der Pflanze zu dieser im Boden. Pflanzen mit geringem TF werden als *Excluders* und jene mit hohem TF als Hyperakkumulatoren bezeichnet. Letztere sind z.B. Farn-Spezies aus der Familie der *Pteridaceae*.^[10;20]

Arsenat liegt im Boden meist als H_2AsO_4^- oder HAsO_4^{2-} vor und besitzt ein

chemisch analoges Verhalten zum Phosphat-Ion PO_4^{3-} . Die Arsenat-Ionen können über den Phosphattransport in die Pflanze aufgenommen werden, woraus eine starke Hemmung des Phosphats resultiert (Abbildung 2.4). Dabei gibt es verschiedene Arten des Phosphattransports je nach Pflanze, wodurch unterschiedlich ausgeprägte Arsenat-Affinitäten entstehen.^[10;21]

Arsenit dagegen kommt im Boden meist undissoziiert als neutrales $\text{As}(\text{OH})_3$ vor ($\text{pH} < 8$) und kann über Aquaporin-Kanäle in die Pflanze transportiert werden (Abbildung 2.4). Diese sind für die Aufnahme von kleinen, neutralen Molekülen, wie Ammoniak, Kieselsäure oder Urea verantwortlich und unterliegen der Diffusion durch Konzentrationsgradienten. Die neutralen Moleküle interagieren durch Wasserstoffbrückenbindungen mit den Kanälen und gelangen so in die Pflanzenzelle.^[10]

MMA und DMA sind ebenfalls in geringen Anteilen im Boden vorhanden. Dessen Pflanzenaufnahme ist sehr stark vom pH-Wert abhängig und verläuft ebenfalls über die Aquaporin-Kanäle (Abbildung 2.4). Aufgrund der geringeren Anzahl von Hydroxy-Gruppen erfolgt der Transport allerdings langsamer als beim Arsenit. Die nachfolgende Weiterleitung in das Xylem erfolgt jedoch nicht über die Aquaporin-Kanäle, da vermutlich das meiste der organischen Arsenverbindungen im Cytoplasma der Wurzelzelle dissoziiert.^[10]

Im Organismus der Pflanze können schließlich verschiedene Metabolite entstehen. Oft werden fünfwertige Arsenverbindungen durch die Arsenat-Reduktase zu dreiwertigem As umgewandelt. Aus diesem wiederum kann über Methylierung Monomethylarsenat oder Dimethylarsenat intrazellulär gebildet. Durch die Phosphattransporter ($\text{As}(\text{V})$) und die Aquaporin-Kanäle ($\text{As}(\text{III})$) gelangen die Spezies anschließend in das Xylem der Pflanze und werden bis zum Blatt transportiert.^[10]

2. Theoretischer Hintergrund

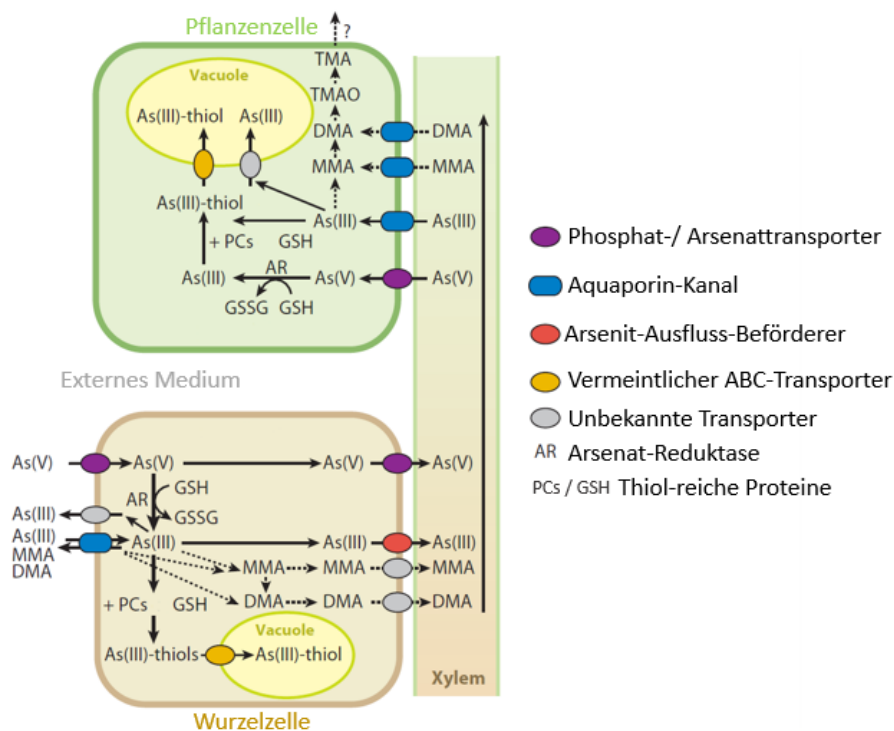


Abbildung 2.4.: Schematische Darstellung der Aufnahme von Arsen(III), Arsen(V), Monomethylarsenat und Dimethylarsenat in die Pflanze.^[10]

Die Toxizität der Arsenverbindungen unterscheidet sich je nach Spezies. Die toxische Wirkung von As(III) beruht auf der Affinität zu Thiol-Gruppen. Diese sind in Proteinen, wie z.B. Glutathion (GSH) oder Phytochelatrin (PCs) zu finden, deren Funktion durch die Anbindung von Arsenit gehemmt wird. Des Weiteren können Phosphate im Organismus durch As(V) ausgetauscht oder gebunden werden und so die ATP-Synthese in den Mitochondrien und die oxidative Phosphorylierung hemmen. MMA und DMA entsprechen, je nach Oxidationsstufe, dessen toxischer Wirkung, sind allerdings weniger membran-gängig durch die o.g. Gründe als die anorganischen Verbindungen. Insgesamt führt eine Arsenvergiftung letzten Endes zur Schädigung der DNA-Synthese und zur Bildung von Tumor-Zellen.^[10;22;23]

Weitergehend kann durch diese Schädigungen eine Stressreaktion der Pflanze ausgelöst werden, wobei reaktive Sauerstoffspezies (engl.: *reactive oxygen species*), kurz ROS, gebildet werden. Dazu zählen z.B. verschiedene Sauerstoff-/Wasserstoffradikale, aber auch Peroxide. Diese beeinflussen Proteine, Fette und DNA, wodurch es u.a. zur Enzyminaktivierung oder Membranzerstörung kommen kann.^[23;24]

Anders als Arsen besitzt Europium bisher keine bekannte Toxizität. Seine Ionen bzw. die der Seltenen Erden im Allgemeinen, werden eingesetzt, um die Pflanzenaktivität und das Wachstum zu verbessern.^[12]

In der Forschung wird es oft als Ersatz für Calcium(II)-Ionen eingesetzt. Beide besitzen, trotz verschiedener Oxidationsstufe, einen ähnlichen Ionenradius und Koordinationszahl, haben eine Affinität zu Sauerstoff und anderen Liganden wie Amino-, oder Carboxylsäuren. Ein Beispiel ist die Erforschung von Ca^{2+} -Bindungsstellen im Photosystem II der *Nicotiana tabacums* (Virginscher Tabak). Dabei wurde keine Beeinflussung der physiologischen Funktion durch Europium festgestellt. Eu^{3+} lässt sich aufgrund seiner Fluoreszenzeigenschaften gut in einem Organismus verfolgen und kann so Aufschluss über den Einbau von Calcium-Ionen geben.^[12;25-27]

Veröffentlichungen über die Aufnahme von Europium in Pflanzen ergaben, dass das Ion durch Carboxylsäuren in den Wurzeln intrazellulär aufgenommen wird. Außerdem wurde eine größere Menge der Seltenen Erden, somit auch Europium, in der Eisenplaque der Wurzeloberfläche und besonders an den Wurzelhaaren ermittelt.^[12;28]

Weitergehend wurde neben der Absorption und Adsorption von Pflanzenwurzeln die Translokation der Seltenen Erden von Blatt zum Stamm beobachtet. Dazu wurde eine Europium-Lösung aufgesprüht und der Weg durch den Organismus untersucht. Es ergab sich, dass die Absorption der Wurzeln eine deutlich größere Menge der Seltenen Erden in die Pflanze bringt als die Translokation von Blatt zu Stamm. Letztlich wurde die folgende Reihenfolge mit absinkender Konzentration der Seltenen Erden ermittelt: Wurzel, Blatt, Stamm.^[12;28]

2.6. Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie ist heute eine sehr wichtige Methode der Analytik und wird sowohl in der Elementaranalytik als auch in der Speziation durch den Einsatz verschiedener Ionisationsmethoden angewendet. Dabei werden Molekül-Ionen, oder erzeugte Fragment-Ionen, anhand ihrer Masse und Ladung (m/z -Verhältnis) identifiziert. In dieser Arbeit wurde ein Hybridmassenspektrometer mit einer Orbitrap und Ionenfalle als Massenanalysatoren

genutzt. Die verwendeten Ionisationsmethoden waren die nano-Elektrospray-Ionisation (nESI) und die Desorption-Elektrospray-Ionisation (DESI), welche zusammen mit der Orbitrap im folgenden Kapitel erläutert werden.^[2]

2.6.1. Elektrospray-Ionisation

Die Elektrospray-Ionisation wurde 1968 von DOLE *et al.* entwickelt und ist heute eine weit verbreitete Ionisationsmethode für die Massenspektrometrie. Dabei befindet sich der Analyt in einem meist flüchtigen Lösungsmittel und wird durch eine Sprühkapillare mit angelegtem elektrischen Feld in feine Tröpfchen überführt. Durch die angelegte Spannung bildet sich ein TAYLOR-Konus aus, welcher nach Überschreitung der elektrostatischen Kräfte durch die Oberflächenspannung in die Bildung geladener Tropfen resultiert. Diese bestehen aus mehreren geladenen Analyt-Ionen und dem verwendeten Lösungsmittel. Durch Verdampfung des Lösungsmittel werden die Tropfen kleiner bis das sogenannte RAYLEIGH-Limit erreicht ist. Nun befinden sich viele gleich geladene Ionen auf geringer Dichte, wodurch es zur COULOMB-Explosion kommt und somit zur Bildung von geladenen Mikrotröpfchen. Demnach entstehen immer kleinere Tröpfchen, welche am Ende fast nur noch aus dem Analyt-Ion bestehen und als Elektrospray bezeichnet werden (Abbildung 2.5).^[2;3;29]

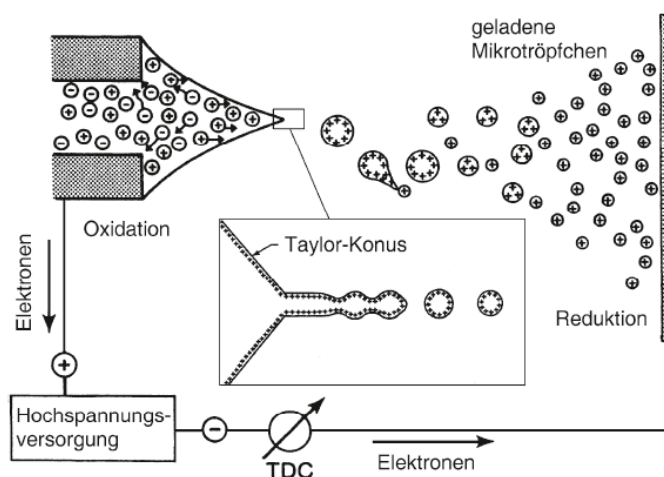


Abbildung 2.5.: Vorgang der Elektrospray-Ionisation.^[2]

Dieser sehr sanfte Ionisationsvorgang findet unter Atmosphärendruck statt.

Die bei der ESI entstehenden Ionen gelangen über eine beheizte Kapillare in das Hochvakuum des Massenspektrometers. Der Vorteil ist, dass sogar sehr große Moleküle durch Mehrfachladung mit einem Massenanalysator erfasst werden können. Trotzdem ist die Methode auch für kleine, polare bzw. anorganische Moleküle geeignet. Liegen schon ionische Spezies in Lösung vor, können diese durch die Methode sanft ins Vakuum überführt werden.^[2;30]

Eine Weiterentwicklung der ESI ist die nano-Elektrospray-Ionisation (nESI). Dabei besteht die Sprühkapillare aus einer kleinen Borosilikatglas-Nadel mit einem Innendurchmesser im μm -Bereich. Daraus resultieren geringere Flussraten (nL/min) und kleinere Tröpfchen mit bis zu 200 nm Durchmesser. Außerdem wird das Arbeiten mit hochpolarem Lösungsmittel, wie Reinstwasser, ermöglicht. Ein weiterer Vorteil ist der geringere Probenverbrauch von etwa 10 μL und der Möglichkeit, höhere Salzfrachten zu analysieren. Aufgrund dessen wurde in dieser Arbeit mit der nESI gearbeitet und die sich in Lösung befindenden Spezies ermittelt.^[2;31–34]

2.6.2. Desorptions-Elektrospray-Ionisation

Die Desorptions-Elektrospray-Ionisation wurde 2004 von TAKATÁS eingeführt. Es handelt sich um eine Ionisationsmethode, die unter Atmosphärendruck und ohne große Probenvorbereitung funktioniert. Durch eine Sprühkapillare, die der der Elektrospray-Ionisation nachempfunden ist, wird ein Lösungsmittel geleitet. Dieses wird pneumatisch durch einen Inertgasstrom unterstützt, sodass hohe Drücke bis 15 bar erhalten werden können. Durch eine angelegte Hochspannung wird das Lösungsmittel in der Sprühkapillare analog zu dem ESI-Prozess ionisiert und auf die Probe unter einem Auftreffwinkel α geleitet. Durch den hohen Druck besitzen die Ionen des Lösungsmittels eine ausreichende kinetische Energie, um selbst unter Umgebungsbedingungen zur Probe zu gelangen. Dort findet das Anlösen des Probenmaterials und die Desorption von Analyt-Ionen durch die entstehende elektrostatische Aufladung statt. Mithilfe des beheizten Ionentransferröhrchen und dem dahinter anliegenden Vakuum werden die Analyt-Ionen mit einem Austrittswinkel β von der Probe zum Massenspektrometer geführt (Abbildung 2.6). Im Vergleich zu der ESI ist dieses Ionentransferröhrchen deutlich länger, wodurch einerseits die Probenpositionierung vereinfacht wird und andererseits die De-

2. Theoretischer Hintergrund

solvatisierung der Analyt-Ionen wegen der erhöhten Temperatur verbessert wird.^[2;4;35;36]

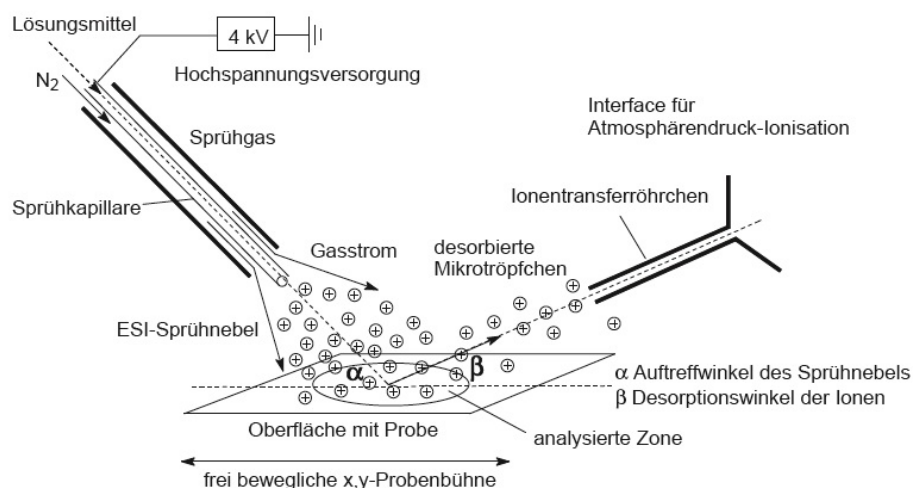


Abbildung 2.6.: Schematischer Aufbau einer Desorptions-Elektrospray-Ionisations-Quelle.^[2]

Der Ionisationsvorgang der Analyt-Moleküle kann mithilfe von drei Prozessen beschrieben werden. Der erste ist die Aufnahme des Analyten in die geladenen Lösungsmitteltröpfchen (engl.: *droplet pickup*). Demnach treffen letztere auf die Probenoberfläche auf, lösen den Analyten an der Oberfläche und nehmen ihn auf.

Der zweite Prozess ist der Ladungstransfer in die kondensierte Phase. Durch die Übertragung von Protonen, Elektronen oder kleinen Ionen aus dem geladenen Lösungsmitteltröpfchen in die Probenoberfläche lädt sich diese auf. Das weitere Aufschlagen von geladenen Tröpfchen bewirkt einen Impuls, der die Analyt-Ionen herausschlägt. Dieser Vorgang ist auch als *Sputter-Prozess* bekannt. Über den Gasdruck an der Sprühkapillare kann die kinetische Energie der Lösungsmittel-Ionen eingestellt und so verschiedenste Reaktionen begünstigt werden.

Der dritte Ionisationsvorgang ist der Ladungstransfer in der Gasphase, wobei der Analyt zuvor durch Verdampfung oder Desorption in diese Phase übergeht und anschließend durch den Übertrag von Elektronen, Protonen oder andere Reaktionen ionisiert wird. Der Dampfdruck des Analyten lässt sich über die Variation von Lösungsmittel oder pH-Wert der Probe beeinflussen.^[2;37;38]

Die Besonderheiten der Ionisationsmethode liegt nicht nur allein in dem Prozess, sondern auch in der simplen und schnellen Probenpräparation. Dadurch können beispielsweise Hochdurchsatzanalysen effizient durchgeführt werden. Allerdings gibt es gewisse Anforderungen an die Probe selbst. Zum einen ist es wichtig, dass leitfähige Proben isoliert oder auf einem Potential gleich bzw. kleiner der Sprühkapillarenspannung gehalten werden, um Spannungsüberschläge zu vermeiden. Zum anderen können die Oberflächentextur der Probe und dessen chemische Zusammensetzung einen Einfluss auf das Analyseergebnis haben. Demnach sind raue Oberflächen besser für die Analyse geeignet als glatte. Außerdem sollte eine hohe Affinität vom Analyten zur Probenoberfläche vermieden werden.^[2;35;36]

Eine wichtige Rolle spielt die Optimierung der einstellbaren DESI-Parameter, da diese über die Effizienz der Ionenbildung entscheiden. Die wichtigsten Parameter sind die Spannung der Sprühkapillare, die Flussrate des Lösungsmittels, der Auftreffwinkel α , der Druck der Lösungsmittel-Ionen, der Abstand zwischen Probe und Sprühkapillare, zwischen Sprühkapillare und Ionentransferröhrchen, sowie zwischen Ionentransferröhrchen und Probe. Auch die Temperatur des Ionentransferröhrchens kann die Effizienz des Transfers beeinflussen.^[2;4]

Bisher wird die DESI-MS in einigen Bereichen verwendet. Beispiele sind die schon erwähnte Hochdurchsatzanalytik meist von pharmazeutischen Substanzen, die Naturstoffanalytik von Pflanzen oder die Untersuchung von Medikamentenmetaboliten direkt aus dem Blut.^[2;4;36;39;40]

Eine weitere Anwendung von DE ABREU *et al.* aus dem Jahre 2013 ist die Analyse von Arsen-Spezies auf einer Pflanzenoberfläche. Dabei wurde *Pteris vittata* in die Lösungen der Spezies Arsenat, Arsenit, Monomethylarsenat und Dimethylarsenat für 24 h eingetaucht und anschließend mit DESI-MS analysiert. Des Weiteren kann durch Pflanzenabdrücke auf DC-Kieselgel-Platten ein orts aufgelöstes Massenspektrum der Pflanze aufgenommen werden, wie bei der Veröffentlichung von HEMALATHA *et al.* 2013. Die Kenntnisse aus diesen beiden Literaturstellen sollen in dieser Arbeit nachvollzogen werden und dienen als Grundlage der Methodenentwicklung für die DESI-MS.^[5;41]

2.6.3. Orbitrap-Massenanalysator

Die Orbitrap als Massenanalysator wurde im Jahre 2000 von ALEXANDER MAKAROV entwickelt und stellt eine Weiterentwicklung der *idealen Kingdon-Ionenfalle* dar. Sie zeichnet sich durch eine exakte Massenbestimmung und ein hohes Auflösungsvermögen aus. Eine ähnlich hohe Auflösung wird bei Ionencyclotronresonanz-Massenanalysatoren erhalten, diese Geräte benötigen jedoch aufgrund des verwendeten Magnetfeldes deutlich mehr Platz als ein Orbitrap-Massenanalysator.^[2;42;43]

Durch eine zweiteilige fassförmige Außenelektrode und eine spindelförmige Zentralelektrode entsteht ein quadrologarithmisches Feld, welches die zu analysierenden Ionen zur Rotation um die Zentralachse (z-Achse) und zur gleichzeitigen, axialen Schwingung zwingt (Abbildung 2.7). Die dadurch entstehende Frequenz ω_z (Gleichung 2.1) ist umgekehrt proportional zu dem Masse-zu-Ladungsverhältnis der Ionen (m/z -Verhältnis):

$$\omega_z = \sqrt{k \left(\frac{z}{m} \right)} \quad (2.1)$$

Dabei entspricht k der Feldkrümmung des quadrologarithmischen Feldes. Alle Ionen besitzen die selbe Schwingungsamplitude, aber eine unterschiedliche Frequenz ω_z . Über Bildstromdetektion und Fourier-Transformation wird die exakte Masse bestimmt.^[2;44]

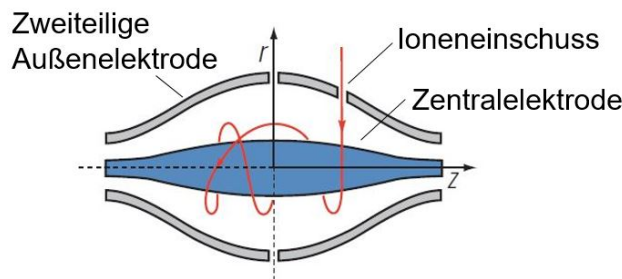


Abbildung 2.7.: Schematischer Aufbau des Orbitrap-Massenanalysators.^[45]

Durch Einsetzen der Frequenz ω_z in die allgemeine Formel der Massenauflösung R und Umformen von Gleichung 2.1 kann diese wie folgt definiert werden:

$$R = \frac{m}{\Delta m} = \frac{1}{2\Delta\omega_z} \sqrt{\frac{kz}{m}} \quad (2.2)$$

Somit ist die Massenauflösung proportional zu der Wurzel aus Ladung geteilt durch die Masse des zu analysierenden Ions.^[2;44;46]

Weitergehend ist der richtige Ioneneinschuss für eine exakte Massenbestimmung wichtig, d.h., dass die Anforderungen an die Geometrie, Energie, Geschwindigkeit und Injektion erfüllt sein müssen. Dazu wird vor die Orbitrap die sogenannte *C-Trap* geschaltet, welche die Ionen bündelt, sammelt, thermalisiert und letztlich injiziert. Außerdem benötigt der Massenanalysator ein Ultrahochvakuum, damit keine Hinderungen der Ionen während der Rotations-schwingungen vorherrschen.^[2;44]

Das vollständige, verwendete Massenspektrometer ist schematisch in Abbildung 2.8 dargestellt. Die Ionen werden durch eine ESI- oder DESI-Quelle ionisiert, gelangen in die S-Linsen und werden dort fokussiert. Durch den darauffolgenden Quadrupol werden Neutralteilchen entfernt und die weiter transportierten Ionen mithilfe des Oktopols erneut fokussiert. Die Hoch- und Niederdruckzelle dienen als lineare Ionenfalle (*LIT*, engl. *linear iontrap*) zur Analyse der Ionen oder als Kollisionszelle zur Fragmentierung (*CID*, engl. *collision induced dissociation*). Anschließend folgt ein weiterer Quadrupol für den Ionentransfer in die *C-Trap* und schließlich zur Orbitrap. Die nachfolgende *HCD*-Zelle (engl. *higher-energy collisional dissociation*) dient der Kollision von Ionen mit höherer Energie als jene, die in der *CID* möglich ist.

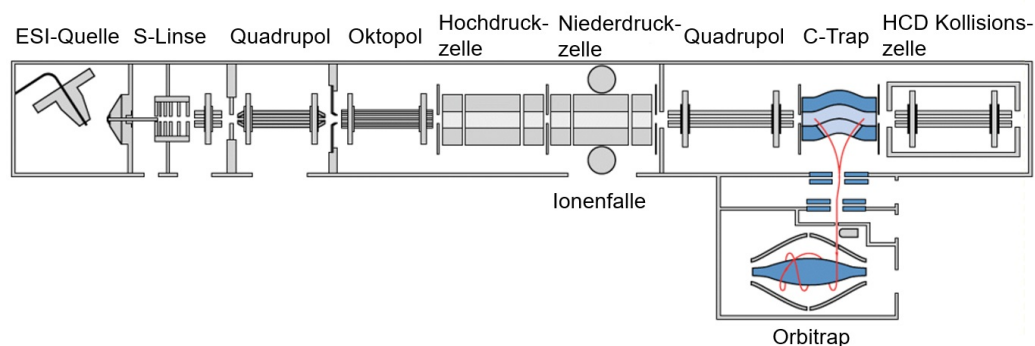


Abbildung 2.8.: Schematischer Aufbau eines Orbitrap-Massenspektrometers mit Elektrospray-Ionisation.^[45]

2.7. Zeitaufgelöste

Laser-Fluoreszenz-Spektroskopie von Europium

Die Fluoreszenz ist allgemein eine spontane Emission von Photonen aus einem zuvor angeregtem S_1 -Zustand in den S_0 -Grundzustand (Abbildung 2.9). Europium zählt zu den Lanthaniden und somit zu dem sogenannten f -Block des Periodensystems. Dessen Elemente besitzen aufgrund ihrer Elektronenkonfiguration spezielle spektroskopische Eigenschaften: In der Oxidationsstufe +3 existieren zum einen breite Absorptionsbanden im UV-Bereich durch paritätserlaubte f - d -Übergänge und zum anderen scharfe, weniger intensive Banden im sichtbaren Bereich der elektromagnetischen Strahlung, welche von f - f -Übergängen herrühren. Das Eu^{3+} kann mit einer Wellenlänge von 394 nm angeregt werden, wodurch der ${}^7F_0 \rightarrow {}^5L_6$ -Übergang stattfinden kann (Abbildung 2.10). Die Fluoreszenz erfolgt aus dem 5D_0 -Niveau in die 7F_J -Zustände, wobei Banden im sichtbaren Bereich entstehen. Anhand der Übergänge in die 7F_0 -, 7F_1 - und 7F_2 -Zustände können Rückschlüsse auf die chemische Umgebung des Eu^{3+} -Ions gezogen und somit dessen Spezies bestimmt werden (Abbildung 2.11).^[47–49]

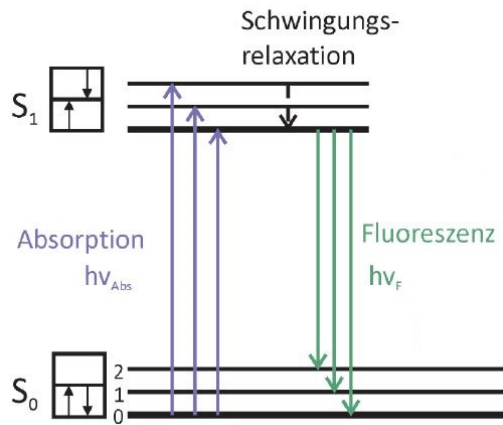


Abbildung 2.9.: Schematische Darstellung der Anregung eines Elektrons von dem S_0 -Grundzustand in den angeregten S_1 -Zustand mit anschließender Emission von Photonen bei der Relaxation des Elektrons (Fluoreszenz).^[50]

Die 7F_0 -Bande unterliegt dem Paritätsverbot, nimmt die Symmetrie des ge-

bildeten Komplexes ab, steigt die Intensität der Bande. Für jede Eu(III)-Spezies existiert eine 7F_0 -Bande, welche sich in Fluoreszenzspektren überlagern. Letztlich können aus diesen Emissionsbanden Aussagen über die Koordinationssymmetrie der vorliegenden Verbindung getroffen werden.

Der Übergang in das 7F_1 -Niveau wird kaum durch das Ligandenfeld des Eu^{3+} beeinflusst, da dieser durch magnetische Dipolübergänge bestimmt wird. Bei einem reinen Aquo-Komplex stellt diese Bande die intensivste der drei dar und wird oft zur Normierung der Daten verwendet.

Der dagegen hypersensitive ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_2$ -Übergang wird von dem Ligandenfeld beeinflusst und durch die Komplexbildung der Spezies bestimmt. Des Weiteren kann das Maß der Komplexbildung über das Verhältnis von 7F_1 - und 7F_2 -Bande ermittelt werden.^[47;48]

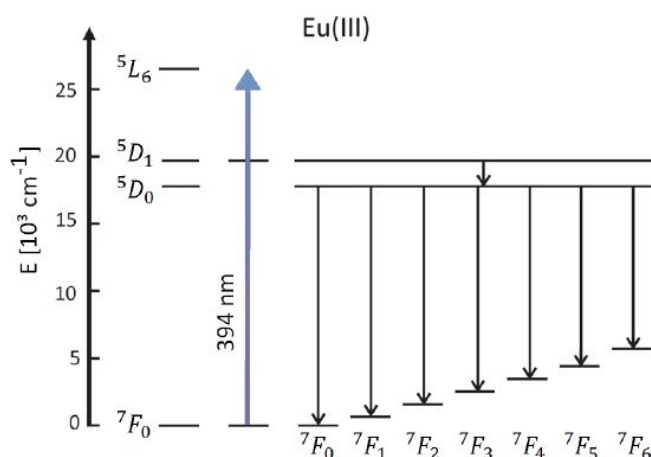


Abbildung 2.10.: Schema der Europiumfluoreszenz: Die Übergänge in die 7F_J -Niveaus nach der Anregung mit 394 nm.^[50]

Für jeden Fluoreszenz-Prozess existiert außerdem eine Lebensdauer, d.h. die Intensität dessen nimmt mit der Zeit exponentiell ab wenn keine weitere Anregung erfolgt. Mithilfe der Auftragung von Signalintensität gegen die *Delayzeit* kann die Lebensdauer τ einer oder mehrerer Spezies bestimmt werden. Weitergehend besitzt ein Europium-Aquo-Komplex in der Regel Neun Wasser-Moleküle um das Eu(III)-Ion. Das umgebende Wasser führt zu einem *Quenching* der Emissionsbanden, da ein Energietransfer auf die Wasserstoffmoleküle möglich ist. Die dabei entstehende Schwingungsanregung unterdrückt die Bandenintensität dadurch, dass ein ähnlicher Energiebereich der vierten

2. Theoretischer Hintergrund

OH-Oberschwingung des Wassers und 5D_0 -Niveau des Eu(III)-Ions vorliegt und so ein weiterer Relaxationsweg geschaffen wird. Daraus resultiert eine Abnahme der Lebensdauer, welche mit der Koordinationszahl von Wassermolekülen um das Metall-Ion korreliert. Dieser Zusammenhang wird mit der HORROCKS-Gleichung beschrieben:

$$n(\text{H}_2\text{O}) \pm 0,5 = 1,07 \cdot k_{\text{obs}} - 0,62 \quad (2.3)$$

Mit $k_{\text{obs}} = \frac{1}{\tau}$ [ms^{-1}] wird die Anzahl koordinierter Wassermoleküle berechnet, wodurch Rückschlüsse auf die chemische Umgebung des Eu(III) gezogen und vorhandene Spezies identifiziert werden können.^[51]

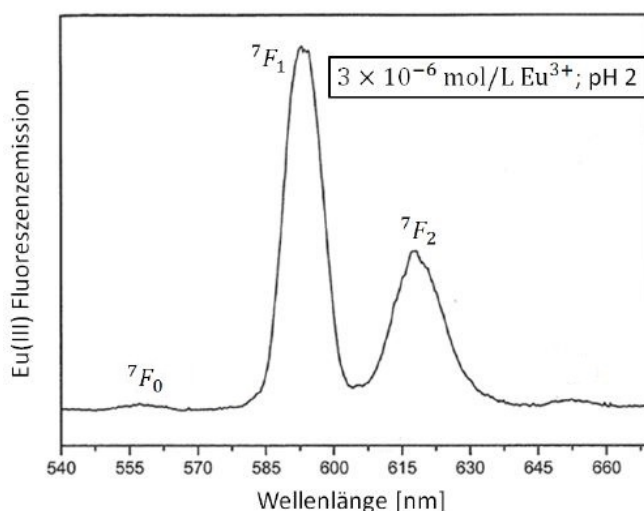


Abbildung 2.11.: Fluoreszenzspektrum von Europium mit seinen drei charakteristischen Banden.^[50]

Die Zeitaufgelöste Laser-Fluoreszenz-Spektroskopie (TRLFS) dient sowohl der Bestimmung des Fluoreszenzspektrums als auch der Aufnahme von Fluoreszenz-Lebensdauern mithilfe eines *Delay*-Generators. Dabei wird ein monochromatische Nd:YAG-Laser mit einer Wellenlänge von 266 nm auf die Probe gerichtet, die Fluoreszenz in einem 90 °-Winkel aufgenommen und über eine Glasfaser in einen Spektrographen geleitet (Abbildung 2.12). Dieser zerlegt das Emissionsspektrum in einzelne Wellenlängen, welche mit einer CCD-Kamera detektiert werden.

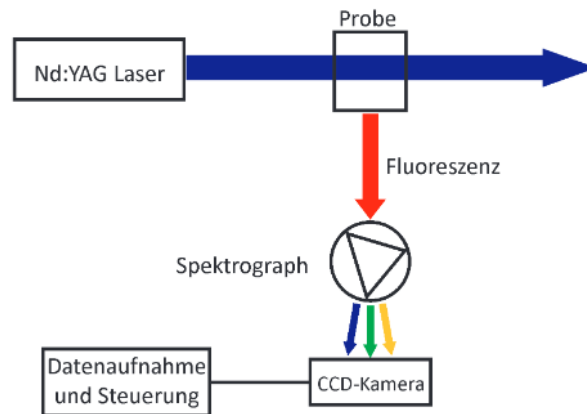


Abbildung 2.12.: Schematischer Aufbau eines TRLFS-Experiments.^[50]

3 | Experimentelle Arbeit

Dieses Kapitel handelt von der Durchführung und den verwendeten Parameter der jeweiligen Analysemethoden. Die Kontamination der jeweiligen Pflanzen mit Arsen und Europium wird erläutert. Des Weiteren bedarf es einer kurzen Probenaufarbeitung für die DESI-MS-Analyse und die Konzentrationsbestimmung der Elemente. Für Letztere wurde die Arsen-Quantifizierung mit einem Emissionspektrometer und induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-OES) durchgeführt und für Europium ein Massenspektrometer mit der gleichen Ionisationstechnik (ICP-MS) verwendet.

3.1. Erste Untersuchungen mit der DESI-MS

Zur Vorbereitung auf die Pflanzenexperimente wurden zunächst Vorversuche durchgeführt, um die Handhabung und die DESI-MS besser zu verstehen. Dafür wurden als erstes die Parameter der Quelle optimiert und erste Kopplungsversuche der Dünnschichtchromatographie mit DESI-MS unternommen.

3.1.1. Optimierung der Messparameter der DESI-Quelle

Die in Kapitel 2.6.2 genannten Parameter wurden zur Optimierung des Messsignals im positiven Ionenmodus auf einem Glaträger verwendet. Zunächst wurde ein Lösungsmittelgemisch aus Wasser und Methanol (Verhältnis 1:1) und eine konstante Temperatur der Sammelkapillare von 200 °C genutzt. In Tabelle 3.1 sind die Bereiche der weiteren, verwendeten Messparameter zusammengefasst.

Tabelle 3.1.: Zusammenfassung der geprüften Messbereiche von den jeweiligen Parametern zur Optimierung der DESI-Quelle

Parameter	Messbereich
Nadelspannung / kV	1 - 6
Flussrate / $\mu\text{L}/\text{min}$	1 - 12
Druck / bar	4 - 15
Winkel (α) / °	40 - 85
Abstand Sprühkapillare - Probe / mm	1 - 10
Abstand Sprühkapillare - Transferröhrchen / mm	1 - 10
Abstand Transferröhrchen - Probe / mm	1 - 10

Die Optimierung erfolgte jeweils mit einem festgehaltenen Parameter, während die anderen variiert wurden. Der Parameter dessen MS-Spektrum die höchste Ionenanzahl ergab wurde notiert und weitergehend festgehalten bis alle Optionen optimiert wurden. Zum Schluss fand eine Überprüfung der ermittelten Parameter statt.

Um die Ergebnisse für die jeweiligen Kontaminationslösungen zu testen, wurden diese auf eine PROSOLIA-Glasplatte mit hydrophoben Teflon-Spots getropft. Es wurden 4 μL von einer Dimethylarsenat-, Kaliumhydrogenarsenat-, Natriumarsenit- und Europiumnitrat-Lösung auf jeweils einen hydrophoben Spot gegeben. Die Konzentrationen der wässrigen Arsen-Lösungen betrugen jeweils 50 $\mu\text{mol/L}$ und 100 $\mu\text{mol/L}$ und die der wässrigen Europium-Lösung 1 mmol/L und 10 mmol/L . Die aufgetragenen Tropfen wurden bis zur vollständigen Verdampfung des Wassers gelagert, anschließend mit der DESI-MS vermessen und die optimalen Parameter notiert. Die genannten Verbindungen wurden für die nachfolgend beschriebenen Pflanzenexperimente eingesetzt.

Vor jedem Experiment mit der DESI-MS wurden nESI-MS-Spektren der Verbindungen im positiven Ionenmodus aufgenommen, um die charakteristischen m/z -Signale zu erhalten. Für die Messungen wurde eine *DESI 2D* der Firma PROSOLIA INC verwendet und mit der *Orbitrap Elite* von THERMO FISHER SCIENTIFIC gekoppelt. Die nESI-MS-Analysen wurden ebenfalls mit diesem Massenspektrometer durchgeführt. Die Auswertung der erhaltenen Spektren erfolgte mit der Software *Xcalibur* der selbigen Firma. Für jede Probe wurde dabei ein MS-Spektrum über 30 Sekunden aufgenommen und die Intensitäten anschließend über die Zeit gemittelt. Eine Normierung der

Spektren erfolgte auf das m/z -Signal mit der höchsten Ionenanzahl.

3.1.2. Kopplungsversuche von DC-DESI-MS

Zunächst wurde eine Kieselgel-60-DC-Platte auf Aluminium verwendet, welche auf den Probenträger zugeschnitten wurde (76 x 26 mm) und 10 μ L einer 100 μ mol/L Dimethylarsenat-Lösung aufgebracht. Für die Desorption wurden Lösemittelgemische aus Wasser und Methanol (Verhältnisse 1:1 und 1:3) verwendet, die zuvor ermittelten optimalen Messparameter des positiven Ionenmodus geprüft und gegebenenfalls geändert. Es wurden sowohl DESI-MS-Spektren von der DC-Platte als auch von der Probe aufgenommen.

Weitergehend wurde eine Normalphasen-DC-Platte aus Kieselgel 60 auf einem Glasträger untersucht.

3.2. Pflanzenexperimente

Dieses Kapitel erläutert die Vorbereitungen und Durchführung der Pflanzenexperimente von der Kontamination der Pflanzen *Epipremnum aureum* L., *Pisum sativum* L. und *Secale cereale* L. mit verschiedenen Arsen-Spezies und Europium. Die zuerst genannte Pflanze diente dabei als Vorversuch, um die Handhabung der DESI-MS mit Pflanzenteilen zu testen. Daher wurde diese nicht unter Idealbedingungen aufgezogen, sondern direkt aus einer bereits bestehenden Pflanze in herkömmlicher Blumenerde geerntet.

3.2.1. Aufzucht von *Pisum sativum* L. und *Secale cereale* L.

Für die Aufzucht der Pflanzen *Pisum sativum* L. und *Secale cereale* L. wurde ein HOAGLAND-Medium verwendet, dessen Zusammensetzung in Tabelle 3.2 dargestellt ist.^[23]

3. Experimentelle Arbeit

Tabelle 3.2.: Zusammensetzung des verwendeten HOAGLAND-Mediums zur Aufzucht von Pflanzen^[23]

Substanz	$c(\text{Substanz}) / \mu\text{mol/L}$
KNO_3	2000
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	500
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	200
NH_4NO_3	100
KCl	50
KH_2PO_4	25
Fe-EDTA	20
H_3BO_3	12
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	2
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,5
$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	0,2
Na_2MoO_4	0,1
NiSO_4	0,1

Die Samen der *Pisum sativum* L. stammen von N. L. CHRESTENSEN aus Erfurt in Deutschland. Zuerst wurden diese in destilliertem Wasser für zwölf Stunden getränkt und in feuchtem Löschpapier für 48 Stunden gelagert. Gesunde und gleich große Setzlinge wurden in Plastikbehältnissen mit 1 L HOAGLAND-Medium überführt und in einer Wachstumskammer für zwei Wochen gelagert (Abbildung 3.1). Es herrschten $22 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ während eines 16/8 Tag/Nacht-Zyklus mit $120 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ Bestrahlungsstärke einer Kalt-Fluoreszenz-Lampe. Außerdem wurde Sauerstoff durch Schläuche in das Nährmedium geleitet.

Die Samen der *Secale cereale* L. stammen aus Kiev in der Ukraine. Die Aufzucht der Pflanzen ist analog zu der der *Pisum sativum* L.

Die beschriebene experimentelle Arbeit erfolgte durch DHARMENDRA GUPTA.

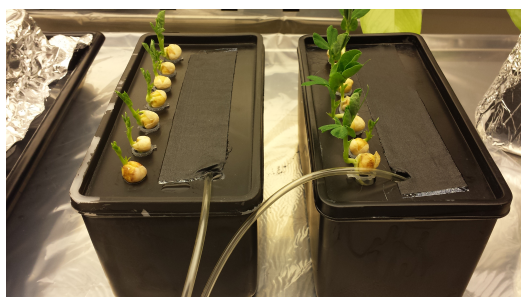


Abbildung 3.1.: Aufzucht von *Pisum sativum* L. in abgedunkelten Plastikbehältnissen und HOAGLAND-Medium.

3.2.2. Analyse der Kontaminationslösungen

Um die Arsen- und Europiumspezies identifizieren zu können, wurden nESI-MS-Messungen der verwendeten Arsen- bzw. Europium-HOAGLAND-Lösungen durchgeführt, die jeweiligen Nadelspannungen optimiert und in Tabelle 3.3 zusammengefasst. Alle MS-Spektren wurden, aufgrund der aufwändigen DESI-MS Parameteroptimierung, im positiven Ionenmodus aufgenommen.

Tabelle 3.3.: Zusammenfassung der gemessenen Arsen- und Europium-HOAGLAND-Lösungen mit nESI-MS und den dabei verwendeten Nadelspannungen

Lösung	Verwendete Nadelspannung / kV
DMA	1,3
As(V)	1,7
As(III)	1,8
Eu(III)	1,2

3.2.3. Untersuchung von Arsen in *Epipremnum aureum* L. und *Pisum sativum* L.

Epipremnum aureum L. wurde direkt aus einer bereits bestehenden Pflanze in herkömmlicher Blumenerde geerntet. Dazu wurden zwei Stämme mit jeweils drei Blättern von der restlichen Pflanze getrennt und in HOAGLAND-Medium gelagert. Eine der beiden Aufzuchtlösungen wurde mit 1,2 mL einer 50 mmol/L Dimethylarsenat-Lösung versetzt, sodass eine Endkonzentration von 200 μ mol/L erreicht wurde (Abbildung 3.2).

Die *Epipremnum aureum* L. wurden nach 24 h, 72 h und 144 h mit der DESI-MS untersucht.

Dieser Versuchsaufbau diente lediglich als Vorversuch, um das Arbeiten mit Pflanzen kennenzulernen und die Aufnahme von Dimethylarsenat abzuschätzen.



Abbildung 3.2.: Versuchsaufbau der Vorversuche mit *Epipremnum aureum* L.; Links: Kontrollpflanze; Rechts: Kontamination der Pflanze mit Dimethylarsenat.

Die *Pisum sativum* L. wurde mit drei verschiedenen Arsenspezies kontaminiert. Dabei handelt es sich um die Ausgangsverbindungen Dimethylarsenat (DMA), Kaliumhydrogenarsenat (As(V)) und Natriumarsenit (As(III)). Diese wurden jeweils mit einer Konzentration von 0,1 mol/L in Wasser gelöst und anschließend der Pflanze in je zwei verschiedenen Konzentrationen von 50 $\mu\text{mol/L}$ und 100 $\mu\text{mol/L}$ angeboten. Dazu wurden je 250 μL und 500 μL der Ausgangslösungen abgenommen und zum HOAGLAND-Medium zugegeben. Pro Konzentration und Arsenspezies wurden je zwei Parallelproben untersucht, was in einer Gesamtanzahl von 14 Pflanzen resultierte (Abbildung 3.3). Die Kontamination der *Pisum sativum* L. erfolgte über fünf Tage.



Abbildung 3.3.: Versuchsaufbau der Kontamination von *Pisum sativum* L. mit den Arsenspezies Dimethylarsenat, Kaliumhydrogenarsenat und Natriumarsenit in den Konzentrationen von 50 $\mu\text{mol/L}$ und 100 $\mu\text{mol/L}$ in HOAGLAND-Medium.

3.2.4. Versuchsaufbau von Europium und *Secale cereale* L.

Für die Kontamination von *Secale cereale* L. diente als Ausgangssubstanz Europiumnitrat Pentahydrat. Dieses wurde den Pflanzen in zwei unterschiedlichen Konzentrationen von 1 mmol/L und 10 mmol/L angeboten. Die dafür verwendeten Lösungen wurden direkt aus der Ausgangssubstanz unter Lösen in HOAGLAND-Medium hergestellt, in die Aufzuchtbehälter überführt und die Pflanzen hineingesetzt (Abbildung 3.4). Die Kontamination erfolgte mit zwölf Pflanzen pro Konzentration und Kontrollmedium. Eine Zwischenüberprüfung der Aufnahme von Europium wurde nach fünf Tagen durchgeführt und die restlichen Proben nach sieben Tagen analysiert.

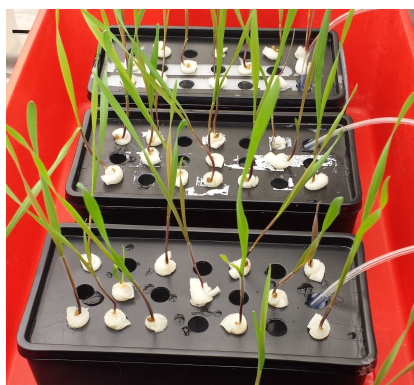


Abbildung 3.4.: Versuchsaufbau der Kontamination von *Secale cereale* L. mit Europium in den Konzentrationen 1 mmol/L und 10 mmol/L in HOAGLAND-Medium.

3.3. Analyse der Pflanzenteile

Die Speziation der angebotenen Arsen- und Europiumspezies erfolgte mit DESI-MS. Nach anschließender Probenaufarbeitung der Pflanzen wurden Konzentrationsbestimmungen der jeweiligen Elemente durchgeführt. Zuletzt dienten TRLFS-Messungen der Aufnahme von Fluoreszenzspektren und Lebensdauern der mit Europium kontaminierten Pflanze, um die Speziation zu unterstützen.

3.3.1. Untersuchungen mit DESI-MS

Für die Analyse der kontaminierten Pflanzen mit DESI-MS wurden die Proben kurz aufbereitet, um eine Qualifizierung des Inneren der jeweiligen Pflanze zu ermöglichen.

Von der *Epipremnum aureum* L. aus dem Vorversuch wurden Blatt und Stamm analysiert. Dazu wurde von dem Blatt die oberste Wachsschicht (Cuticula) abgetrennt und auf einer PROSOLIA-Glasplatte mit doppelseitigem Klebeband fixiert. Der Stamm wurde quer aufgeschnitten und ebenfalls befestigt.

Weitergehend wurden Blatt, Stamm und Wurzel von der *Pisum sativum* L. und *Secale cereale* L. analysiert (Abbildung 3.5). Die Blätter wurden analog zu den Vorversuchen aufgearbeitet, wohingegen die Stämme und Wurzeln längs aufgeschnitten und befestigt wurden.

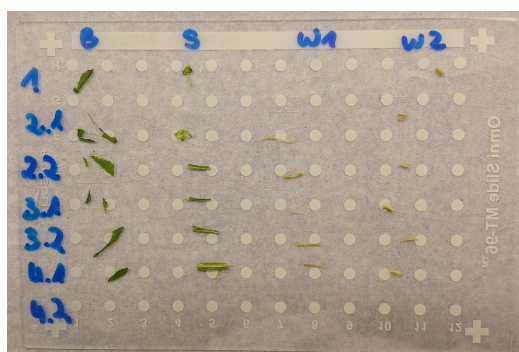


Abbildung 3.5.: Beispielhafter Aufbau einer PROSOLIA-Glasplatte mit Pflanzenproben auf doppelseitigem Klebeband für die DESI-MS-Analyse; B: Blatt, S: Stamm, W: Wurzel.

3.3.2. Probenaufarbeitung für die Konzentrationsbestimmung

Um die Konzentration der Elemente Arsen, Phosphor und Europium in *Epipremnum aureum* L., *Pisum sativum* L. und *Secale cereale* L. bestimmen zu können, mussten deren Pflanzenteile zunächst bis zur Gewichtskonstanz getrocknet werden. Danach erfolgte das Mörsern der Proben zu einem homogenen Feststoff und ein Säureaufschluss. Es wurden etwa 1 - 30 mg der getrockneten Proben eingewogen und mit 2 - 5 mL Salpetersäure (69 %) versetzt (Tabelle A.1). Der Aufschluss erfolgte für etwa 21 h bei 130 °C in einem

Sandbad.^[1]

Anschließend wurden die aufgeschlossenen Proben in 15 mL- bzw. 50 mL-Plastikgefäße überführt und das Aufschlussgefäß drei mal mit Mili-Q-Wasser gewaschen. Zuletzt erfolgte je nach Messmethode die Verdünnung der Proben (Tabelle A.1).

3.3.3. Analyse von Arsen mit ICP-OES

Arsen und Phosphor wurden mit ICP-OES analysiert. Für die Analyse des Arsengehaltes der *Epipremnum aureum* L. wurden Standards mit Arsen von 0,05 mg/L bis 0,45 mg/L und mit Phosphor von 5 mg/L bis 45 mg/L in äquidistanten Abständen mit 2 %iger Salpetersäure aus 1000 mg/L-ICP-Standards hergestellt. Die Einwaagen wurden notiert und die genauen Konzentrationen bestimmt.

Des Weiteren wurde der Arsen- und Phosphorgehalt in der *Pisum sativum* L. bestimmt, ebenso wie die genauen Konzentrationen der Kontaminationslösungen. Letztere Standards wurden mit Arsen und Phosphat in den Konzentrationen von 1 mg/L bis 20 mg/L in äquidistanten Abständen mit 2 %iger Salpetersäure hergestellt. Für die Messung der Pflanzenteile musste die Standard-Reihe deutlich geringer angesetzt werden. Die Arsen-Standards wurden von 1 µg/L bis 1 mg/L und die Phosphor-Standards von 1 µg/L bis 10 mg/L in ebenfalls äquidistanten Abständen und mit 2 %iger Salpetersäure hergestellt.

Die Messungen wurden mit einem *iCAP 6200 dual-view ICP emission spectrometer* der Firmer THERMO SCIENTIFIC durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit den axial gemessenen Emissionslinien 189,0 nm (As) und 213,6 nm (P) nach *DIN 38402 Teil 51*. Die Berechnung der Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze, sowie die Fehlerberechnung wurden nach *DIN 32645* durchgeführt.

3.3.4. Untersuchung von Europium mit ICP-MS

Die Elementkonzentration des Europiums wurde mit ICP-MS ermittelt. Es wurden die Europium-Kontaminationslösung und die aufgeschlossenen *Secale cereale* L.-Proben in einer Messung untersucht. Dafür wurden die Kontamina-

tionslösungen bis unter 1 µg/L verdünnt und eine Standardreihe von 1,5 ng/l bis 1 µg/L in äquidistanten Abständen mit 2 %iger Salpetersäure hergestellt. Die Proben wurden mit dem *iCAP Q* ICP-MS der Firma THERMO FISHER SCIENTIFIC vermessen. Die Auswertung erfolgte nach *DIN 38402 Teil 51* und die Berechnung der Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze, sowie die Fehlerberechnung nach *DIN 32645*.

3.3.5. Charakterisierung der Europiumspezies mit TRLFS

Mit der TRLFS sollte die Speziesermittlung des Europium(III)-Ions in der Pflanze erleichtert werden. Dazu wurden zunächst die Fluoreszenz-Spektren der Europium-HOAGLAND-Lösung vor und nach der Kontamination untersucht. Anschließend wurde ein Fluoreszenz-Spektrum des inneren Wurzelquerschnitts der kontaminierten *Secale cereale* L. aufgenommen und mit den restlichen Spektren verglichen. Für die Speziesbestimmung wurden abschließend von den genannten Proben Lebensdauer-Messungen durchgeführt.

Für diese Messungen wurde der gepulster Nd:YAG-Laser *PS6100 series* der Firma EKSPLA verwendet. Die untersuchten Lösungen wurden mit einer Laserleistung von 7 mW und die Pflanzenwurzel mit 1 mW vermessen. Der Spektrograph *Shamrock 303i* der Firma ANDOR TECHNOLOGY LTD. mit polychromatischen Gitter (300 Linien/mm, 10 µm Schlitzweite) und die CCD-Kamera *Andor iStar 743* wurden für die Untersuchung genutzt.

Die Fluoreszenz-Messungen erfolgten mit einer Belichtungszeit von 0,1 s, einer Gate-Breite von 1 ms und einem *Delay* von 1 µs. Die Einstellungen der Lebensdauer-Messungen wurde je nach Probe variiert. Die erhaltenen Fluoreszenz-Spektren wurden jeweils auf die 7F_1 -Fluoreszenzbande normiert. Außerdem erfolgte die Auswertung der Lebensdauer-messungen mit einer bi-exponentiellen Anpassung.

4 | Ergebnisse und Diskussion

4.1. Parameteroptimierung der DESI-MS

Die Parameteroptimierung der DESI-MS ist ein sehr wichtiger Teil der Analyse und hängt sowohl von der Probe, als auch dem Analyten ab. Dazu wurden die in Kapitel 3.1.1 genannten Parameter anhand der Ionenanzahl (IA) des größten m/z -Signals optimiert (Abbildung 2.6). Eine ausreichend hohe Ionenanzahl ist wichtig für eine genaue Interpretation der MS-Spektren.

Für die Einarbeitung in das Gerät wurde zunächst ein Lösungsmittelgemisch aus Methanol und Wasser (1:1-Verhältnis) untersucht. Zu Beginn zeigte sich eine Korrelation zwischen angelegter Nadelspannung und Ionenanzahl: Je höher die angelegte Spannung, desto höher die Gesamtionenanzahl. Daher wurde zunächst die weitere Optimierung mit 3 kV durchgeführt. Es ergaben sich die in Tabelle 4.1 aufgeführten optimalen Parameter.

Tabelle 4.1.: Optimale Parameter für die DESI-MS eines Methanol-Wasser-Gemisches (1:1) auf einer PROSOLIA-Glasplatte bei 3 kV Nadelspannung

Parameter	Optimum
Flussrate / $\mu\text{L}/\text{min}$	5
Druck / bar	8
Winkel (α) / $^\circ$	55
Abstand Sprühkapillare - Probe / mm	2
Abstand Sprühkapillare - Transferröhrchen / mm	10
Abstand Transferröhrchen - Probe / mm	1

Beispielhaft sind in Abbildung 4.1 Spektren der Optimierung dargestellt, wobei die Winkel zwischen 50° , 55° und 60° variiert wurden. Es zeigen sich Unterschiede in der Ionenanzahl und in den Intensitätsverhältnissen der Signale.

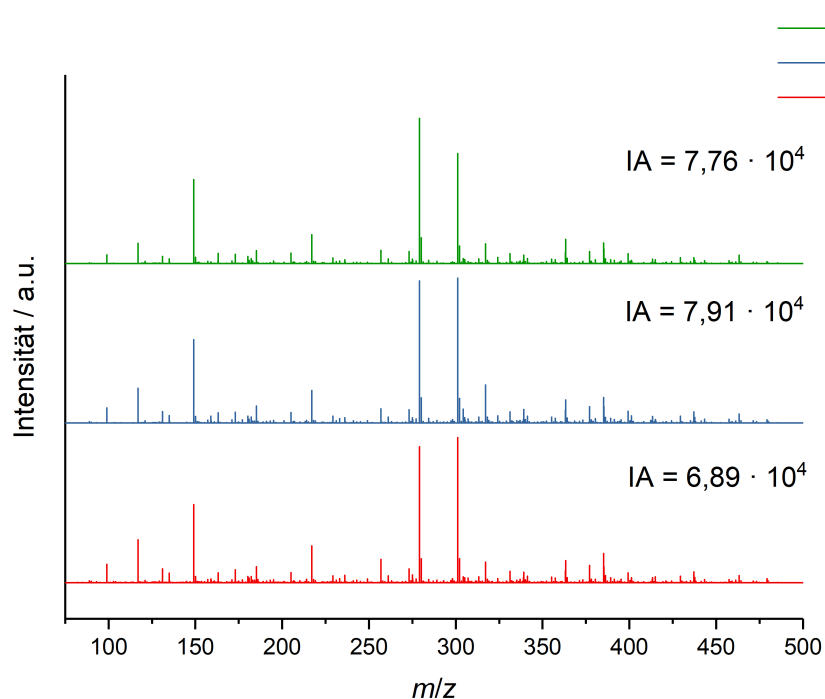


Abbildung 4.1.: Vergleich von MS-Spektren und Ionenanzahl (IA) eines Methanol-Wasser-Gemisches (1:1-Verhältnis) auf einer PROSOLIA-Glasplatte bei einer Nadelspannung von 3 kV, einer Flussrate von 3 $\mu\text{L}/\text{min}$ und einem Druck von 8 bar und verschiedenen Auftreffwinkeln (α).

Ähnliches gilt für die in Abbildung 4.2 und Abbildung A.1 verglichenen Drücke von 8 bar und 11 bar und den Flussraten von 3 $\mu\text{L}/\text{min}$ und 5 $\mu\text{L}/\text{min}$. Der Grund für die Intensitätsunterschiede sind vermutlich Ionen mit m/z -Verhältnissen in den Bereichen 149,02 - 279,16 (Bereich A) bzw. 301,14 - 317,11 (Bereich B), welche verschiedene Desorptionseigenschaften besitzen. Es wird deutlich, dass die Signale aus Bereich A bei einem Druck von 8 bar größer sind als bei 11 bar. Die Signale aus Bereich B dagegen zeigen ein entgegengesetztes Verhalten. Daraus kann geschlossen werden, dass die Ionen von A zu dem Lösungsmittelgemisch und B zu dem Glaträger gehören, da bei einem höheren Druck mehr adsorbierte Substanzen der Glasplatte desorbieren könnten. Somit handelt es sich bei den Ionen dieses Spektrums vermutlich um Lösungsmittel-Cluster, welche teilweise adsorbierte Moleküle des Glaträgers ionisiert und desorbiert haben.

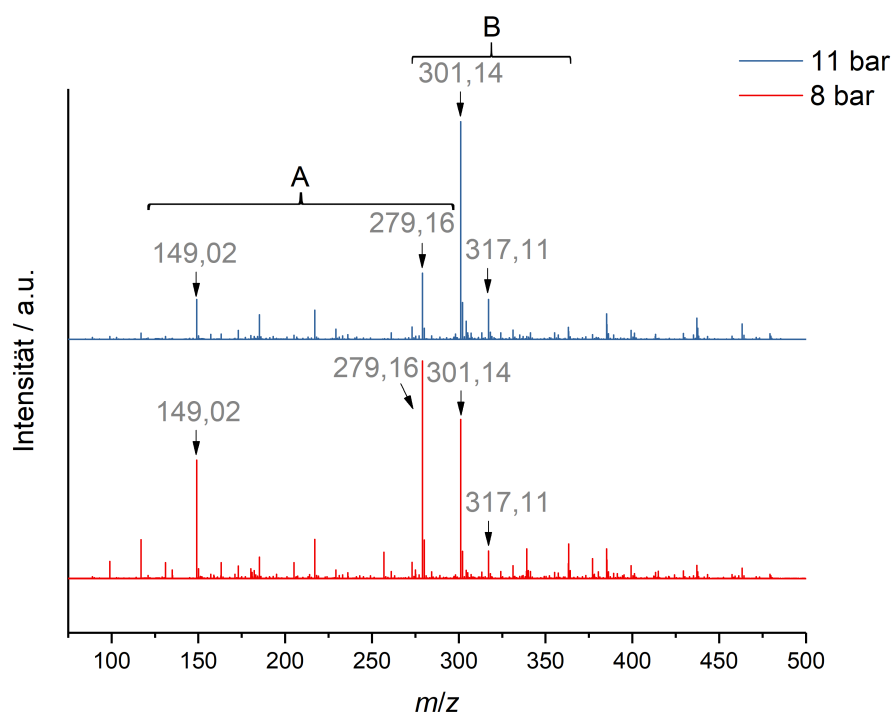


Abbildung 4.2.: Vergleich von MS-Spektren und Ionenanzahl (IA) eines Methanol-Wasser-Gemisches (1:1-Verhältnis) auf einer prosolia-Glasplatte mit einer Nadelspannung von 3 kV, einem Winkel $\alpha = 55^\circ$, einer Flussrate von 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ bei verschiedenen Drücken.

Eine weitere, wichtige Rolle bei den DESI-MS-Spektren spielt die umgebende Raumluft, da die Quelle unter Atmosphärendruck arbeitet. Aufgrund dessen gestaltet sich die Interpretation der m/z -Signale als äußerst komplex. Da dieses Ionisationsverfahren noch recht neu ist, existieren bisher keine ausreichenden Datenbanken.

Die Parameteroptimierung sollte für jede Probe und jeden Analyten durchgeführt werden. Für die nachfolgenden Proben werden die optimalen Einstellungen in den jeweiligen Kapiteln beschrieben.

4.2. Kopplungsversuche mit DC-DESI-MS

Um eine Pflanze und deren Bestandteile orts aufgelöst analysieren zu können, eignet sich die Analyse eines Pflanzenabdruckes auf einer DC-Platte (engl. *Bioimaging*). Dazu wurde zunächst versucht, Dimethylarsenat (DMA) von einer Kieselgel-60-Platte mit Aluminiumträger zu desorbieren. Die an der DESI-Quelle einstellbaren Parameter wurden unterschiedlich variiert, aller-

dings konnte kein DMA detektiert werden. Zudem war eine sichtbare Spannungsentladung zu erkennen, sobald das Ionentransferröhrchen weniger als 5 mm von der Probe entfernt platziert wurde. Die Leitfähigkeit des Trägers ist somit ein entscheidender Grund, weshalb die Analyse des DMA nicht möglich war.

Daraufhin wurde eine DC-Kieselgel-60-Platte mit Glasträger getestet. Die DESI-Parameter wurden über weite Bereiche variiert, dennoch konnte kein DMA im MS-Spektrum gefunden werden.

Entscheidend für die Desorption ist zunächst das zu ionisierende Lösungsmittel. In diesem Fall wurde Wasser, aufgrund der hohen Löslichkeit des DMAs von 2000 g/L^[52], und Methanol eingesetzt, um die Desorption zu erleichtern und eine erhöhte Benetzung der DC-Platte zu vermeiden. Auch bei verschiedenen Verhältnissen des Gemisches wurde kein DMA detektiert.

Eine weitere, wichtige Rolle spielt die Beschichtung der Kieselgel-Platte. Hier wurde eine polare NP-Kieselgel-60-Platte verwendet, wodurch der Analyt eventuell starken Adsorptionskräften unterliegt und nicht desorbiert werden kann. Wird die Struktur des Dimethylarsenats betrachtet, zeigen sich zwei Methyl-Gruppen, eine Hydroxy- und Oxo-Gruppe (Abbildung 4.3). Letztere könnten beispielsweise durch Wasserstoffbrücken-Bindungen oder Dipol-Dipol-Wechselwirkungen an der Kieselgel-Platte haften. Allerdings ist auch ein unpolarer Charakter durch die Methyl-Gruppen gegeben, welche ebenfalls einen Einfluss auf die Adsorption bzw. Desorption bei unpolaren RP-DC-Platten haben können.

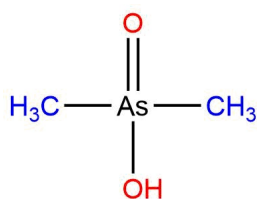


Abbildung 4.3.: Strukturformel des Dimethylarsenats: In blau die unpolaren Methylgruppen und in rot die polare Hydroxy- und Oxo-Gruppe.

Durch die somit erhaltenen Kenntnisse wurde im Folgenden nicht mit der Analyse von Pflanzenabdrücken fortgefahren, sondern eine andere Probenaufarbeitungstechnik verwendet.

4.3. Erste Messungen von Arsen in *Epipremnum aureum* L.

Dieses Kapitel behandelt die Ergebnisse der durchgeführten Vorversuche mit Arsen in *Epipremnum aureum* L. (Efeutute), welche weiterführend als Grundlage für die Analyse der *Pisum sativum* L. (Erbsen) genutzt werden.

4.3.1. Pflanzenaufnahme von Dimethylarsenat mit DESI-MS

Die Nährlösung der *Epipremnum aureum* L. wurde mit Dimethylarsenat kontaminiert und Blatt und Stamm mit DESI-MS untersucht. Um die genauen m/z -Signale des DMA zu kennen, wurde die Kontaminationslösung aus HOAGLAND-Medium und DMA zuvor mit nESI-MS untersucht und in Abbildung 4.4 dargestellt.

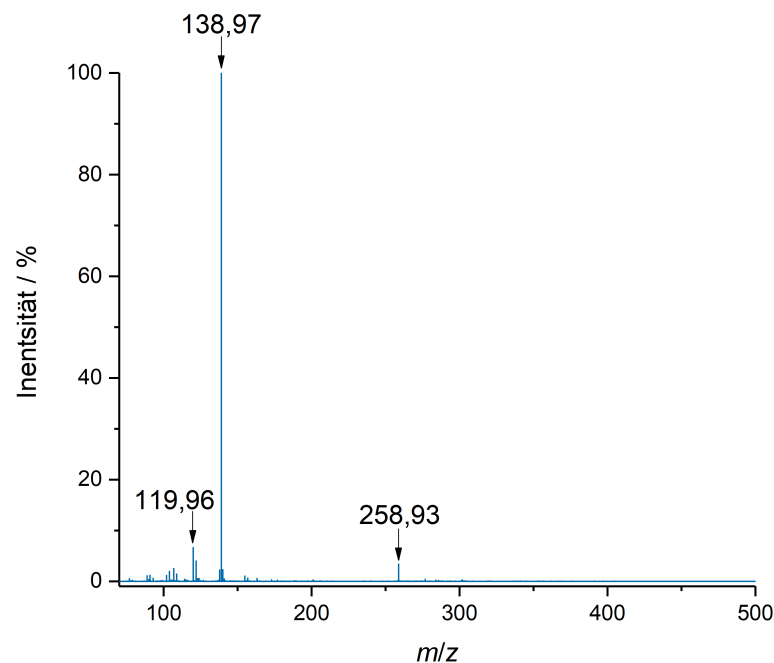


Abbildung 4.4.: nESI-MS-Spektrum von Dimethylarsenat in HOAGLAND-Medium ($c = 100 \mu\text{M}$) mit Markierungen der Ionen $[\text{AsO}(\text{CH}_3)_2\text{OH} + \text{H}]^+$ (m/z 138,97), $[\text{As}_2\text{O}_3(\text{CH}_3)_2 + \text{H}]^+$ (m/z 258,93) und $[\text{CaNO}_3 + \text{H}_2\text{O}]^+$ (m/z 119,96).

Die Signale bei m/z 138,97 und 258,93 sind den Ionen des DMAs zuzu-

ordnen. Dabei handelt es sich um die Ionen $[\text{AsO}(\text{CH}_3)_2\text{OH} + \text{H}]^+$ und $[\text{As}_2\text{O}_3(\text{CH}_3)_2 + \text{H}]^+$ und somit um ein protoniertes Monomer und Dimer des Dimethylarsenats. Das m/z -Signal bei 119,96 gehört zu einem Ion des HOAGLAND-Mediums $[\text{CaNO}_3 + \text{H}_2\text{O}]^+$. Alle weiteren HOAGLAND-Ionen sind in Tabelle A.2 zu finden.

Anschließend erfolgte die Optimierung der DESI-Quelle durch einen eingetrockneten Tropfen DMA auf einer PROSOLIA-Glasplatte. Dabei ergaben sich die in Tabelle A.3 angegebenen optimalen Bedingungen.

Bei einer Betrachtung der äußeren Erscheinung der Pflanze werden deutliche Unterschiede sichtbar (Abbildung 4.5). Die Blätter und der Stamm der mit Arsen kontaminierten Pflanze weisen dunkle Verfärbungen an den Schnittstellen auf, welche auf eine Schadstoffaufnahme hindeuten.



Abbildung 4.5.: Pflanzenversuche mit *Epipremnum aureum* L. (A) und Vergleich vom Stamm ohne Arsenzugabe (B) und mit Arsenzugabe (C).

Die darauf folgende Analyse der Pflanzenbestandteile mit DESI-MS wiesen kein m/z -Signal bei 138,97 von DMA auf (Abbildung 4.6). Grund dafür kann eine feste Einbindung des Dimethylarsenats in die Pflanze oder die Dissoziation im Cytoplasma der Wurzelzellen sein, wodurch die Desorption des DMAs unmöglich wird. Demnach spielt die Pflanzenphysiologie eine sehr entscheidende Rolle.

Außerdem wurde die Parameteroptimierung an einem DMA-Tropfen durchgeführt, da die Analyse der Pflanze schneller erfolgen sollte als die Variation der Einstellungen zulässt. Demnach wurde unter Idealbedingungen optimiert und die Probenbeschaffenheit nicht berücksichtigt.

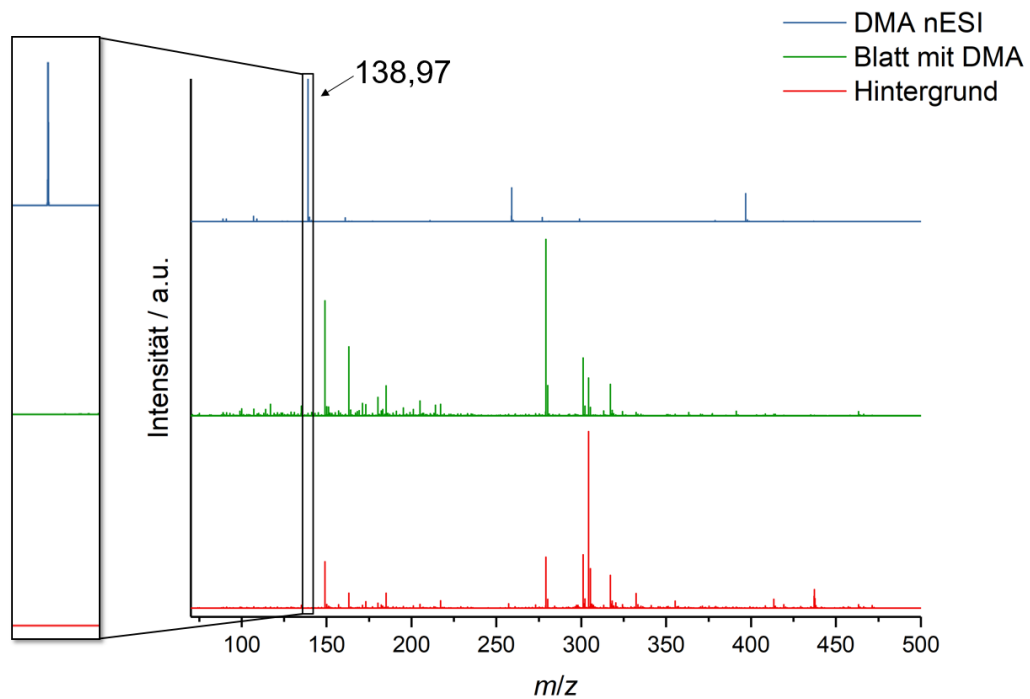


Abbildung 4.6.: DESI-MS-Spektren der *Epipremnum aureum* L.-Blatt mit Zugabe von Arsen und Vergleich mit dem Hintergrund (Doppelseitiges Klebeband auf PROSOLIA-Glasplatte) und Dimethylarsenat-nESI-Spektrum.

Des Weiteren können die DESI-MS-Spektren von Hintergrund und Blatt verglichen werden. Dabei zeigen sich unterschiedliche Intensitäten der gleichen m/z -Signale, welche auf der verschiedenen Probenoberfläche bzw. Beschaffenheiten der Probe beruhen. Dennoch sind alle Messsignale des Hintergrundes in dem Spektrum des Blattes wieder zu erkennen.

Weitere Ionen des Blattes wurden nicht gefunden, wodurch die Vermutung nahe liegt, dass trotz Lösen der Cuticula keine merkliche Desorption von der *Epipremnum aureum* L. möglich war. Dies wird durch die Beschaffenheit der Pflanze unterstützt, da diese eine sehr feste Struktur besaß.

Analog zu dem Blatt der *Epipremnum aureum* L. verhält sich der Stamm (Abbildung A.2). Auch dort wurde kein m/z -Signal des Dimethylarsenats und kein weiteres der Pflanze gefunden.

Schlussfolgernd konnte kein DMA in der *Epipremnum aureum* L. mit DESI-MS nachgewiesen werden. Aufgrund dessen wurde eine Konzentrationsbestimmung von Arsen in der Pflanze durchgeführt.

4.3.2. Konzentrationsbestimmung von Arsen

Nach Trocknung und Aufschluss von *Epipremnum aureum* L. sowohl mit als auch ohne Arsen-Zugabe, wurden ICP-OES-Messungen durchgeführt und die Arsen-Gehalte von kontaminierter und Kontrollpflanze berechnet (Tabelle 4.2). Die erhaltenen Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenzen sind in Tabelle 4.3 aufgeführt. Die zu Vergleichszwecken notwendigen Ergebnisse sind in Tabelle A.4 zu finden. Neben Arsen wurde Phosphor analysiert, um eine Korrelation zwischen Arsenaufnahme und Phosphat-Transport herstellen zu können.

Tabelle 4.2.: Ergebnisse der Massenanteile w_x von kontaminierter und Kontrollpflanze der Elemente Arsen und Phosphor in *Epipremnum aureum* L. nach unterschiedlichen Inkubationszeiten t gemessen mit ICP-OES; N.N.: Nicht nachgewiesen, N.: Nachgewiesen

Pflanzenteil	$t(\text{Zugabe})$ / d	w_{As} / $\mu\text{g} \cdot (\text{mg Probe})^{-1}$	w_{P} / $\mu\text{g} \cdot (\text{mg Probe})^{-1}$
Kontrolle Blatt	3	N.N.	N.N.
Blatt	3	$0,121 \pm 0,0227$	$18,0 \pm 1,45$
Kontrolle Stamm	3	N.	$30,7 \pm 3,78$
Stamm	3	$0,193 \pm 0,0445$	N.N.
Kontrolle Blatt	4	N.	$6,62 \pm 1,36$
Blatt	4	$0,113 \pm 0,0210$	$6,911 \pm 1,37$
Kontrolle Stamm	4	N.N.	N.
Stamm	4	$0,0993 \pm 0,0210$	N.

Tabelle 4.3.: Berechnete Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze (NG, EG, BG) für die ICP-OES-Messung von Arsen und Phosphor in *Epipremnum aureum* L.

Grenze	As / ng/mg	P / ng/mg
NG	0,00588	0,411
EG	0,0118	0,822
BG	0,0176	1,23

Dabei liegen die mit N.N. gekennzeichneten Ergebnisse (Tabelle 4.2) unterhalb der berechneten Nachweisgrenze und wurden somit nicht nachgewiesen. Die mit N. deklarierten Werte sind größer als die Nachweisgrenze und wurden eindeutig nachgewiesen, liegen jedoch unter der Erfassungsgrenze. Die Daten mit Unsicherheiten sind größer als die Bestimmungsgrenze und wurden mit

einer Sicherheit von 95 % bestimmt.

Dieses Ergebnis reicht nicht aus, um die konkreten Arsen-Gehalte der Pflanzenteile zu vergleichen. Tendenzen zeigen allerdings, dass mehr Arsen in der kontaminierten Pflanze vorhanden ist. Außerdem ist zu erkennen, dass sich der Phosphor-Gehalt bei Blättern mit Arsen steigert, während dieser im Stamm sinkt. DMA wird nicht über den Phosphattransport aufgenommen, sondern durch die Aquaporin-Kanäle der Pflanze. Durch die vermehrte Aufnahme der toxischen Verbindung, versucht die Pflanze vermutlich durch Reparaturmechanismen diesen Effekt zu kompensieren und nimmt daher mehr Phosphat zur Herstellung von ATP als Energielieferant auf. Des Weiteren akkumuliert der Schadstoff in den Blättern, da keine Möglichkeit besteht ihn erneut abzugeben.

Weitergehend ist in der Pflanze deutlich weniger Arsen als Phosphor vorhanden, da es sich bei letzterem um ein essentielles Element handelt, welches z.B. im Stoffwechsel und in der DNA-Synthese unerlässlich ist.

Letztlich konnten aus diesen Ergebnissen Tendenzen erhalten werden. Die ICP-OES besitzt bei Arsen und der Linie 189,0 nm eine Nachweisgrenze von 0,005 ng/mg und ist damit relativ nachweisstark.^[53] Allerdings hat die Matrix der aufgeschlossenen Pflanze einen großen Einfluss auf das Messsignal. Zudem wurde ein Gewichtsverlust der Pflanze um etwa das Zehnfache an Wasser nach der Trocknung festgestellt, wodurch nur wenig Probe für den Aufschluss gewonnen werden konnte. Die Analyse mittels OES erforderte außerdem ein Mindestvolumen von 15 mL, welches die schon geringe Arsen-Konzentration in der Pflanze nochmals verdünnte.

Da mit der DESI-MS kein Dimethylarsenat in der Pflanze detektiert wurde, scheint die Nachweisgrenze dessen über dem höchsten bestimmten Gehalt von $0,193 \text{ } \mu\text{g} \cdot (\text{mg Probe})^{-1}$ bezogen auf die *Epipremnum aureum* L. zu liegen. Eine weitere Möglichkeit ist, dass die Arsen-Verbindung bereits in andere Spezies, wie Dimethylarsenit, Trimethylarsinioxid oder Trimethylarsin umgewandelt wurden (Abbildung 2.4) und deshalb nicht mehr in dem MS-Spektrum gefunden werden kann.

4.4. Analyse von Arsen und *Pisum sativum* L.

Für die Analyse der Pflanzenaufnahme von Arsenspezies wurde eine weitere Pflanzengattung verwendet, welche ein schnelles Wachstum und damit verbunden eine vermutlich schnelle Aufnahme von Schadstoffen aufweist. Die Ergebnisse der Analysen und dessen Bedeutung sind in diesem Kapitel zusammengefasst.

4.4.1. Untersuchung der Nährlösungen und Arsenspezies

Nachfolgend werden die Ergebnisse von nESI-MS-Messungen der Nährlösungen, kontaminiert mit DMA, Arsenat und Arsenit, für die *Pisum sativum* L. erläutert. Es wurde die gleiche DMA-Kontaminationslösung wie in Kapitel 4.3.1 verwendet und die m/z -Signale von DMA und HOAGLAND-Medium bereits erläutert (Abbildung 4.4). Weitergehend wurde je ein charakteristisches Messsignal der Arsenit- und Arsenat-Spezies detektiert (Abbildung 4.7). Bei m/z 148,92 handelt es sich um das As(III)-Ion $[\text{As}(\text{OH})_3 + \text{Na}]^+$ und bei m/z 218,84 um das As(V)-Ion $[\text{AsO}(\text{OH})_2(\text{OK}) + \text{K}]^+$. Natürlich sind auch dessen Strukturisomere denkbar.

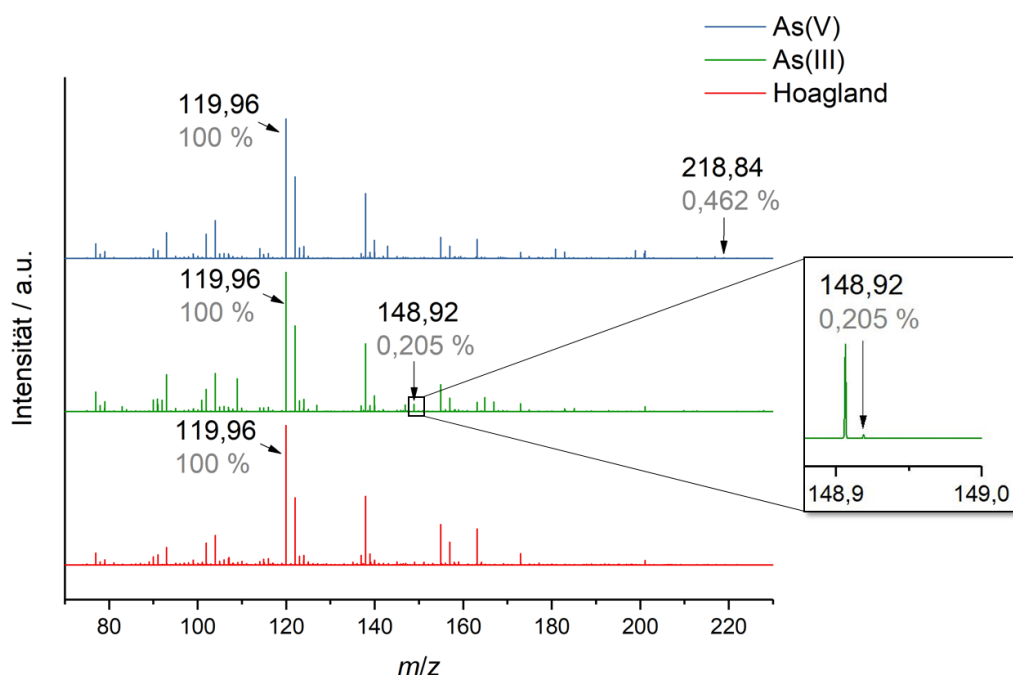


Abbildung 4.7.: Vergleich der nESI-MS-Spektren von dem reinen HOAGLAND-Medium und diesem mit Natriumarsenit (As(III)) und Kaliumhydrogenarsenat (As(V)) mit je $c = 100 \mu\text{mol/L}$ und Kennzeichnung der wichtigsten m/z -Signale und relativen Intensitäten.

Werden die nESI-MS-Spektren in HOAGLAND-Medium von DMA, As(V) und As(III) verglichen, zeigt sich deutlich, dass die anorganischen Verbindungen weniger Intensität aufweisen. Grund dafür könnte eine bevorzugte Bildung negativer Ionen der anorganischen Spezies sein. Dimethylarsenat dagegen lässt sich leicht in positive Ionen überführen. Trotz dieser Ergebnisse wurde die *Pisum sativum* L. in alle drei Arsen-HOAGLAND-Medien inkubiert.

4.4.2. Pflanzenaufnahme der Arsenspezies mit DESI-MS

Es wurde versucht, in den DESI-MS-Spektren die m/z -Signale der bekannten HOAGLAND und Arsenspezies zu identifizieren. Die Blätter, Stämme und Wurzeln wurden dabei sowohl in Bezug auf ihre inkubierten Spezies, als auch eventueller Metabolite der anderen zwei Spezies untersucht. Diese Ergebnisse sind in Tabelle 4.4 zusammengefasst und die optimalen DESI-Parameter in Tabelle A.3 aufgeführt. Zusätzlich wurde in jedem Pflanzenteil das m/z -Signal bei 119,96 des HOAGLAND-Mediums detektiert, welches auf einen in-

4. Ergebnisse und Diskussion

takten Metabolismus der Pflanze hindeutet.

Tabelle 4.4.: Ergebnisse der DESI-MS-Spektren des Pflanzenversuchs von *Pisum sativum* L. mit Dimethylarsenat, Kaliumhydrogenarsenat und Natriumarsenit; B: Blatt, S: Stamm, W: Wurzel, ✓: Signal vorhanden, X: Signal nicht vorhanden

Lösung	$c(\text{As})$ / $\mu\text{mol/L}$	Probe	m/z -Signale		
			DMA (m/z 138,97)	As(V) (m/z 218,84)	As(III) (m/z 148,92)
Kontrolle	-	B	X	X	X
Kontrolle	-	S	X	X	X
Kontrolle	-	W	X	X	X
DMA	50	B	X	X	X
DMA	50	S	X	X	X
DMA	50	W	✓	X	X
DMA	100	B	✓	X	X
DMA	100	S	X	X	X
DMA	100	W	✓	X	X
As(V)	50	B	X	X	X
As(V)	50	S	X	X	X
As(V)	50	W	X	X	X
As(V)	100	B	X	X	X
As(V)	100	S	X	✓	X
As(V)	100	W	X	X	X
As(III)	50	B	X	X	X
As(III)	50	S	X	X	X
As(III)	50	W	X	X	X
As(III)	100	B	X	X	X
As(III)	100	S	X	X	X
As(III)	100	W	X	X	X

Das Arsenat konnte nur in dem Stamm des 100 $\mu\text{mol/L}$ -Mediums identifiziert werden. Das Dimethylarsenat-Signal wurde sowohl bei einer Konzentration von 50 $\mu\text{mol/L}$, als auch 100 $\mu\text{mol/L}$ in der Wurzel detektiert. Daneben reicht letztere Konzentration aus, um das Ion ebenfalls in dem Blatt nachzuweisen. Ein Vergleich des Hintergrund-, Kontrollpflanzen- und DMA-Spektrums der Pflanze (50 μM) ist in Abbildung 4.8 dargestellt. Die m/z -Signale des Hintergrundes sind in den DESI-MS-Spektren der Proben zu erkennen, allerdings mit sehr stark schwankenden Intensitäten. Grund dafür ist vermutlich die veränderte Probenoberfläche, wodurch unterschiedliche Winkel des ein-

treffenden Lösemittel-Sprays entstehen. Außerdem nehmen die Pflanzenteile wahrscheinlich einen Teil des Methanol-Wasser-Gemisches auf. Daraus würde die Aufladung der Probe resultieren. Aus diesen Erkenntnissen wird deutlich, dass die DESI-Quelle zum jetzigen Zeitpunkt nur als qualitative Analyse-methode Verwendung finden kann.

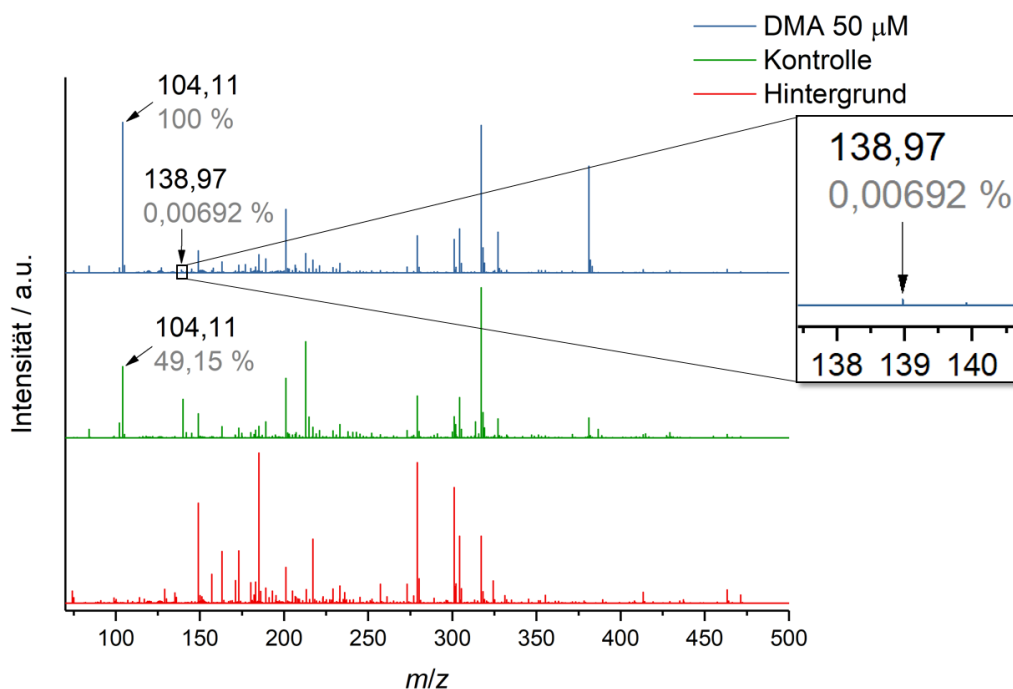


Abbildung 4.8.: Vergleich der DESI-MS-Spektren von dem Hintergrund (Glas-träger mit doppelseitigem Klebeband), der Wurzel der Kontrollpflanze (Kontrolle) und der Wurzel mit Dimethylarsenat (DMA) inkubiert ($c = 50 \mu\text{mol/L}$).

Des Weiteren erscheint in Abbildung 4.8 ein neues m/z -Signal bei 104,11. Dieses ist auf eine Verbindung aus der Pflanze zurückzuführen, da es nicht im Hintergrund und in jedem Pflanzen-DESI-Spektrum auftaucht. Dabei könnte es sich um das Ion des Cholins mit der Formel $[(\text{CH})_3\text{N}(\text{CH}_2)_2\text{OH}]^+$ handeln. Diese Verbindung ist in verschiedensten Formen im Pflanzengewebe zu finden. Das freie Cholin kommt mit einem Gehalt von $11,73 - 188,5 \text{ ng} \cdot (\text{mg Pflanze, frisch})^{-1}$ in verschiedensten Pflanzengattungen und auch in *Pisum sativum* L. vor.^[54]

Nachfolgend werden die Gehalte von Arsen und Phosphor in der Pflanze bestimmt und mit den DESI-MS-Ergebnissen verglichen.

4.4.3. Konzentrationsbestimmung von Arsen

Die Arsen- und Phosphor-Gehalte wurden nach Trocknung und Aufschluss mittels ICP-OES bestimmt. Dabei ergaben sich die in Tabelle 4.5 dargestellten Ergebnisse und die Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenzen in Tabelle 4.6. Da die Endergebnisse unter Verwendung von variierenden Einwaagen der Pflanzenteile erhalten wurden, mussten die bestimmten Grenzen mit den in Tabelle A.5 dargestellten Ergebnissen ohne Einbezug der Einwaagen verglichen werden.

Tabelle 4.5.: Ergebnisse der Gehalte von Arsen und Phosphor in *Pisum sativum* L. gemessen mit ICP-OES; B: Blatt, S: Stamm, W: Wurzel, N.N.: Nicht nachgewiesen, N.: Nachgewiesen, Erfassungsgrenze > Werte ohne Unsicherheit < Bestimmungsgrenze, Werte mit Unsicherheit > Bestimmungsgrenze

Lösung	$c(\text{As}) / \mu\text{mol/L}$	Probe	$w_{\text{As}} / \mu\text{g} \cdot (\text{mg Probe})^{-1}$	$w_{\text{P}} / \mu\text{g} \cdot (\text{mg Probe})^{-1}$
Kontrolle	-	B	N.N.	$4,58 \pm 0,000830$
Kontrolle	-	S	N.N.	N.
Kontrolle	-	W	N.N.	$8,47 \pm 0,274$
DMA	50	B	N.	$3,05 \pm 0,000819$
DMA	50	S	N.N.	N.
DMA	50	W	N.	$5,60 \pm 0,156$
DMA	100	B	N.	$3,85 \pm 0,0449$
DMA	100	S	N.N.	N.
DMA	100	W	0,278	$9,68 \pm 0,268$
As(V)	50	B	N.N.	$1,97 \pm 0,0568$
As(V)	50	S	N.N.	$3,97 \pm 0,168$
As(V)	50	W	0,588	$6,13 \pm 0,00184$
As(V)	100	B	N.N.	$3,46 \pm 0,000838$
As(V)	100	S	N.	$4,01 \pm 0,120$
As(V)	100	W	0,452	$5,52 \pm 0,00134$
As(III)	50	B	N.N.	$3,12 \pm 0,00814$
As(III)	50	S	N.N.	$5,32 \pm 0,149$
As(III)	50	W	$0,486 \pm 0,0748$	N.
As(III)	100	B	N.N.	$0,0826 \pm 0,0491$
As(III)	100	S	N.	$0,298 \pm 0,123$
As(III)	100	W	0,353	$5,95 \pm 0,00141$

Tabelle 4.6.: Berechnete Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze (NG, EG, BG) für die ICP-OES-Messung von Arsen und Phosphor in *Pisum sativum* L.

Grenze	As / ng/mg	P / ng/mg
NG	0,109	1,69
EG	0,217	3,39
BG	0,326	5,08

Aufgrund der Tatsache, dass nur wenig Probenmaterial gewonnen werden konnte und die ICP-OES-Analyse ein relativ hohes Probenvolumen benötigt, wurden nicht alle Arsen- und Phosphor-Gehalte eindeutig bestimmt. Trotzdem zeigen sich Tendenzen der erhaltenen Werte. In den Kontrollpflanzen konnte kein Arsen nachgewiesen werden, da der Gehalt unter 0,109 ng/mg lag. Zudem zeigt sich, dass meist in dem Stamm der *Pisum sativum* L. weniger Arsen und Phosphor enthalten ist. Dies kann zum einen eine Folge von geringer Probenausbeute sein. Zum anderen dient der Stamm nur als Transportweg von den Wurzeln zum Blatt der Pflanze und es werden keine bedeutenden Mengen gelagert oder metabolisiert.

Die Bestimmungsgrenze des Arsens wurde von den Wurzeln der Pflanze mit den Kontaminationslösungen von DMA, As(V) und As(III) überschritten und Gehalte von $0,278 \mu\text{g} \cdot (\text{mg Probe})^{-1}$ bis $0,588 \mu\text{g} \cdot (\text{mg Probe})^{-1}$ erhalten. Zudem wurde im Blatt der Kontaminationslösung von Dimethylarsenat ($c = 100 \mu\text{M}$) ein ungefährender Gehalt von $0,128 \mu\text{g} \cdot (\text{mg Probe})^{-1}$ erhalten. Generell war erneut eine größere Menge Phosphor als Arsen in den Pflanzenteilen vorhanden. Außerdem ist eine Korrelation zwischen den Messwerten zu erkennen. Mit steigender DMA-Konzentration sinkt der Phosphor-Gehalt im Blatt leicht und steigt bei den Wurzeln. Der Grund hierfür ist analog zu Kapitel 4.3.2. Bei Arsenat dagegen sinken Phosphor-Gehalt in Wurzel und Blatt mit steigender Arsenkonzentration. Dieser Zusammenhang lässt sich durch die Konkurrenz von Phosphat und Arsenat bei der Pflanzenaufnahme durch den Phosphattransport erklären. Ähnliches ist beim Arsenit zu erkennen, welches eigentlich durch die Aquaporin-Kanäle aufgenommen wird. Allerdings könnte durch oxidierende Bedingungen an der Wurzeloberfläche das Arsenit zum Arsenat teilweise umgewandelt werden, wodurch erneut eine Konkurrenz zwischen Arsenat und Phosphat entsteht.

Die Ergebnisse der DESI-MS zeigten, dass Dimethylarsenat in der Wurzel bei $c = 50 \mu\text{mol/L}$ und in dem Blatt und der Wurzel bei $c = 100 \mu\text{mol/L}$ detektiert wurde. Wird dies mit den erhaltenen Konzentrationen von Arsen verglichen, ist eine ähnliche Tendenz beim Dimethylarsenat zu erkennen. Demnach sollte die Nachweisgrenze dessen bei etwa $0,109 \text{ ng/mg}$ liegen. Dieser Wert wurde auch vom Blatt bei beiden DMA-Konzentrationen überschritten, aber nicht mittels DESI-MS gefunden. Da sich jede untersuchte Pflanze vermutlich in ihrem Metabolismus, z.B. die Aufnahme- und Umwandlungszeit von Substanzen, unterscheidet und für die ICP-OES-Messung deutlich mehr Probe entnommen wurde, können die erhaltenen Ergebnisse von Massenspektrometrie und Atomspektroskopie leicht verschieden ausfallen. Außerdem könnte DMA in der *Pisum sativum* L. metabolisiert worden sein und so nicht in dem MS-Spektrum bei den o.g. m/z -Signalen auftauchen. Weitere Metabolite zu finden bedeutet eine sehr zeitaufwändige Arbeit mit genauesten biologisch-physiologischen Kenntnissen.

Des Weiteren wurde fünfwertiges Arsen bei $c = 100 \mu\text{mol/L}$ im Stamm mit DESI-MS detektiert. Das Element wurde zwar in diesem Stamm nachgewiesen, aber die Wurzel enthielt deutlich mehr Arsen, welches nicht durch MS gefunden wurde. Auch hier könnten weitere Metabolite bei verschiedenen m/z -Signalen in der Wurzel entstanden und in den Stamm transportiert worden sein.

Im Verhältnis zu den generell hohen Konzentrationen der anorganischen Arsenspezies und der geringer vorhandenen organischen ist DMA weniger membranfähig als As(V) und As(III) . Dennoch wurde die organische Spezies eher mit DESI-MS detektiert. Vermutlich ist DMA mit dem Lösungsmittel-Gemisch Methanol und Wasser leichter zu desorbieren oder besser löslich als die anorganischen Spezies. Außerdem wurden die anorganischen Ionen im positiven Ionenmodus der nESI bereits schlechter gebildet. Außerdem besitzt Arsenit eine sehr hohe Affinität zu Thiol-Gruppen von Proteinen und Arsenat wird häufig in As(III) -Spezies umgewandelt. Dies könnte ein weiterer Grund für die geringe Desorption von den anorganischen Spezies im Vergleich zu der organischen sein.

Zusammenfassend konnten die DESI-MS und ICP-OES-Messung in Einklang gebracht und neue Erkenntnisse über den Desorptionsprozess von organi-

schen und anorganischen Arsenspezies von der *Pisum sativum* L. erhalten werden. Die Nachweisgrenze der DESI-MS-Analyse von DMA und As(V) in *Pisum sativum* L. liegt vermutlich zwischen 0,109 ng/mg und 0,217 ng/mg, da in diesem Bereich Arsen durch ICP-OES detektiert wurde und in dem MS-Spektrum erkennbar ist. Es sind möglicherweise aber auch andere Metabolite durch die Konzentrationsbestimmung mit einbezogen worden, wodurch weniger der Ausgangssubstanzen in der Pflanze vorhanden sein könnte.

Da Arsen ein monoisotopisches Element darstellt, ist es schwierig, weitere Metabolite in der Pflanze mithilfe von DESI-MS zu detektieren.

4.5. Analyse von Europium und *Secale cereale* L.

Die Untersuchung des monoisotopischen Arsens hat neue Erkenntnisse zu der Analyse von Pflanzenteilen mit DESI-MS gebracht. Die Radioökologie ist hingegen weniger an Schwermetallen generell sondern an den Auswirkungen von Radionukliden auf Pflanzen interessiert. Europium dient als Homolog zu Americium und besitzt zwei stabile Isotope, wodurch die MS-Spektren-Analyse nach weiteren Metaboliten vereinfacht werden könnte.

4.5.1. Untersuchung der Nährlösung und Europium mit nESI-MS

Die Analyse von Europiumnitrat in HOAGLAND-Medium ergibt das in Abbildung 4.9 abgebildete nESI-MS-Spektrum. Die charakteristischen m/z -Signale sind markiert und in Tabelle 4.7 erläutert.

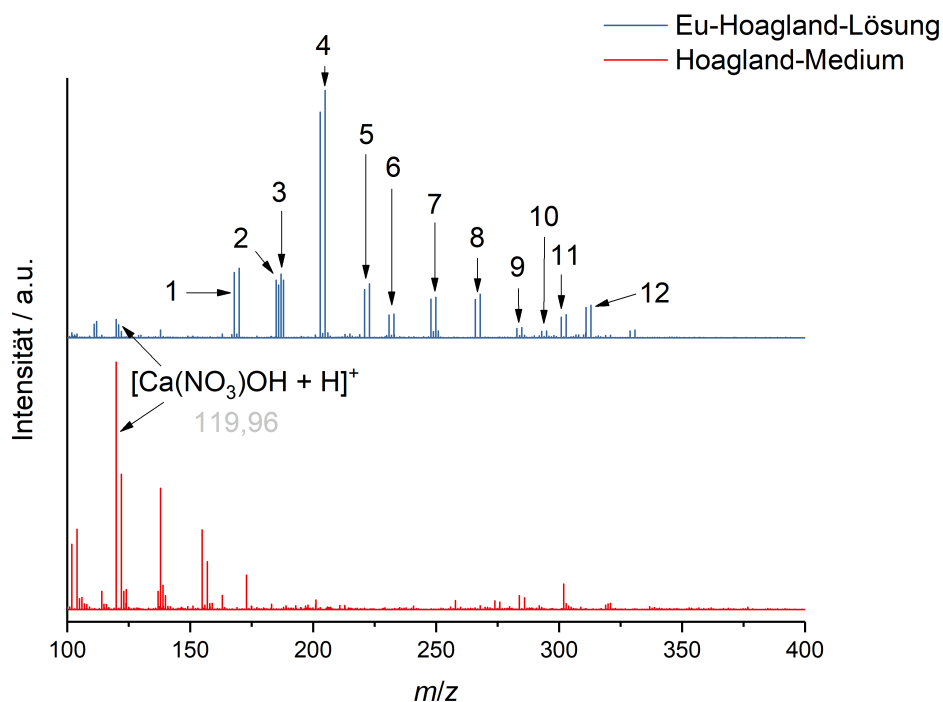


Abbildung 4.9.: nESI-MS-Spektrum von Europiumnitrat in HOAGLAND-Medium mit den wichtigsten, markierten m/z -Signalen.

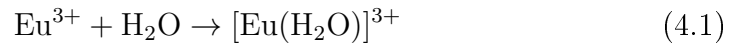
Tabelle 4.7.: Charakteristische m/z -Signale der nESI-MS von Europiumnitrat in HOAGLAND-Medium

Nummer	m/z -Signal		Ionen-Summenformel
	^{151}Eu	^{153}Eu	
1	167,92	169,92	$[\text{Eu}(\text{OH})]^+$
2	184,92	186,93	$[\text{Eu}(\text{OH})_2]^+$
3	185,93	187,93	$[\text{Eu}(\text{OH}) + \text{H}_2\text{O}]^+$
4	202,94	204,94	$[\text{Eu}(\text{OH})_2 + \text{H}_2\text{O}]^+$
5	220,95	222,95	$[\text{Eu}(\text{OH})_2 + 2 \text{H}_2\text{O}]^+$
6	230,92	232,92	$[\text{Eu}(\text{NO}_3) + \text{H}_2\text{O}]^+$
7	247,92	249,92	$[\text{Eu}(\text{OH})(\text{NO}_3) + \text{H}_2\text{O}]^+$
8	265,93	267,93	$[\text{Eu}(\text{OH})(\text{NO}_3) + 2 \text{H}_2\text{O}]^+$
9	282,89	284,89	$[\text{Eu}(\text{HPO}_4) + 2 \text{H}_2\text{O}]^+$
10	292,91	294,91	$[\text{Eu}(\text{NO}_3)_2 + \text{H}_2\text{O}]^+$
11	300,90	302,90	$[\text{Eu}(\text{HPO}_4) + 3 \text{H}_2\text{O}]^+$
12	310,92	312,92	$[\text{Eu}(\text{NO}_3)_2 + 2 \text{H}_2\text{O}]^+$

In dem Spektrum konnten keine Europium-EDTA-Komplex-Ionen festgestellt werden, welche die Aufnahme des Europium-Ions in die Pflanze hemmen.

Neben den ermittelten Europiumspezies mit Hydroxid-, Nitrat- und Hydrogenphosphat-Ionen ist auch das $[\text{Ca}(\text{NO}_3)\text{OH} + \text{H}]^+$ bei m/z 119,96 des HOAGLAND-Mediums zu erkennen. Trotzdem liegen die Intensitäten der Europiumspezies deutlich über denen der HOAGLAND-Ionen. Außerdem ist Europium anhand seines Isotopenmusters mit einer Differenz von $m/z = 2$ leicht zu identifizieren.

Bei den Hydroxid-Spezies handelt es sich meist um Messartefakte, welche während des ESI-Prozesses durch die Reaktion in Gleichung 4.1 und 4.2 entstehen.



Diese Hydrolyse-Reaktion steigt dabei mit der Ladung des Kations. Demnach liegt in der Lösung vermutlich das freie Eu^{3+} -Ion anstelle der Hydroxide vor.^[55;56]

Des Weiteren sind m/z -Signale des zweiwertigen Europium-Ions zu erkennen. Diese sind durch Messartefakte zu erklären, welche aus einem Ladungstransfer durch Stöße mit Restgas auf dem Weg zum Massenspektrometer resultieren. Daher liegt das Eu^{2+} nicht in Lösung vor und ist unter den Bedingungen des Nährmediums nicht stabil.^[55;56]

Diese Messsignale werden im Folgenden zur Identifikation von Europium in *Secale cereale* L. (Winterroggen) genutzt und eventuelle Metabolite anhand des Isotopenmusters untersucht.

4.5.2. Pflanzenaufnahme von Europium mit DESI-MS und TRLFS

Die Untersuchung von *Secale cereale* L. ergab die in Tabelle 4.8 dargestellten Ergebnisse, welche mit den optimalen DESI-Parametern aus Tabelle A.6 erhalten wurden. Es wurde zunächst versucht, das größte m/z -Signal der Eu-HOAGLAND-Lösung bei 202,94 (^{151}Eu) bzw. 204,94 (^{153}Eu) zu identifizieren.

Tabelle 4.8.: Ergebnisse der DESI-MS von Europium in *Secale cereale* L. nach fünf und sieben Tagen und Analyse der m/z -Signale bei 202,94 und 204,94; ✓ : Signal vorhanden, X: Signal nicht vorhanden

$c(\text{Eu})$ / mmol/L	Probe	Eu-Zugabe / d	m/z -Signal 202,94, 204,94
0	Blatt	5	X
0	Wurzel	5	X
1	Blatt	5	X
1	Wurzel	5	X
10	Blatt	5	X
10	Wurzel	5	✓
0	Blatt	7	X
0	Stamm	7	X
0	Wurzel	7	X
1	Blatt	7	X
1	Stamm	7	X
1	Wurzel	7	X
10	Blatt	7	X
10	Stamm	7	X
10	Wurzel	7	X

Nur in der Wurzel bei einer Konzentration des Europiums von 10 mmol/L- wurde nach fünf Tagen die Spezies $[\text{Eu}(\text{OH})_2 + \text{H}_2\text{O}]^+$ detektiert (Abbildung 4.10). Auch alle anderen in Tabelle 4.7 dargestellten Spezies sind nicht erkennbar.

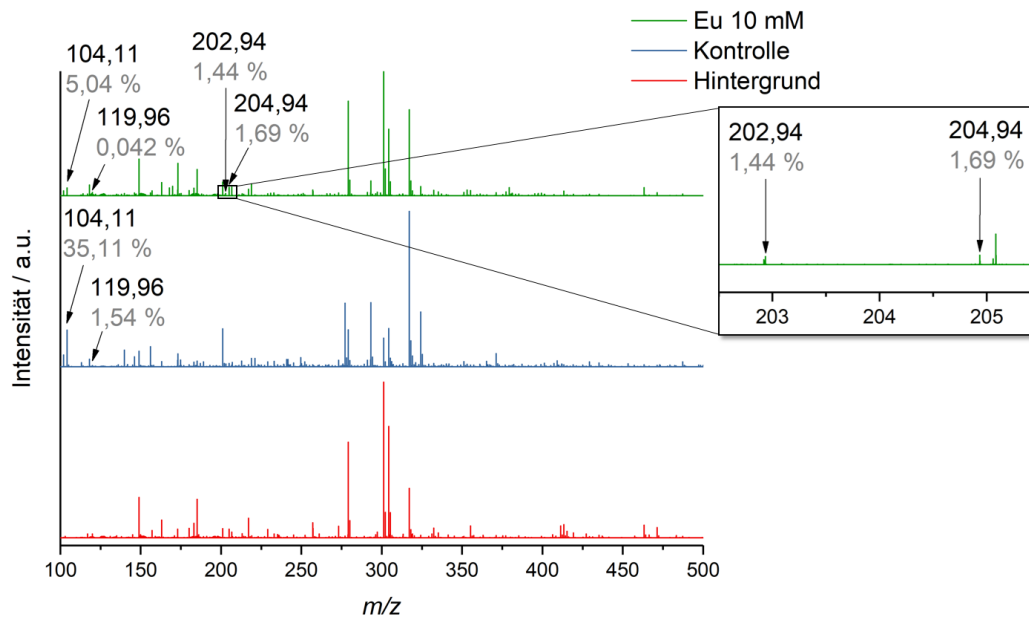


Abbildung 4.10.: Vergleich der DESI-MS-Spektren des Hintergrundes (PROSOLIA-Glasträger mit doppelseitigem Klebeband), der Wurzel der Kontrollpflanze und der Wurzel mit Europium (10 mmol/L) und Markierung der wichtigsten m/z -Signale und dessen relative Intensitäten.

Um weitere Erkenntnisse über die möglichen Europiumspezies zu erhalten, wurden sowohl Fluoreszenzspektren als auch Lebensdauer-Messungen mithilfe von TRLFS durchgeführt. Es erfolgte zum einen die Analyse der Europium-HOAGLAND-Medien vor und nach dem Pflanzenversuch und zum anderen die eines Wurzelquerschnitts der *Secale cereale* L. aus der Kontaminationslösung mit $c = 10$ mmol/L nach sieben Tagen Inkubationszeit. Dabei ergaben sich die Emissionsspektren in Abbildung 4.11, die Lebensdauern und dessen berechnete Wassermolekül-Anzahl in Tabelle 4.9. Die verwendeten biexponentiellen Anpassungen und Einstellungen der Lebensdauer-messungen sind in den Abbildungen A.3 - A.5 zu finden.

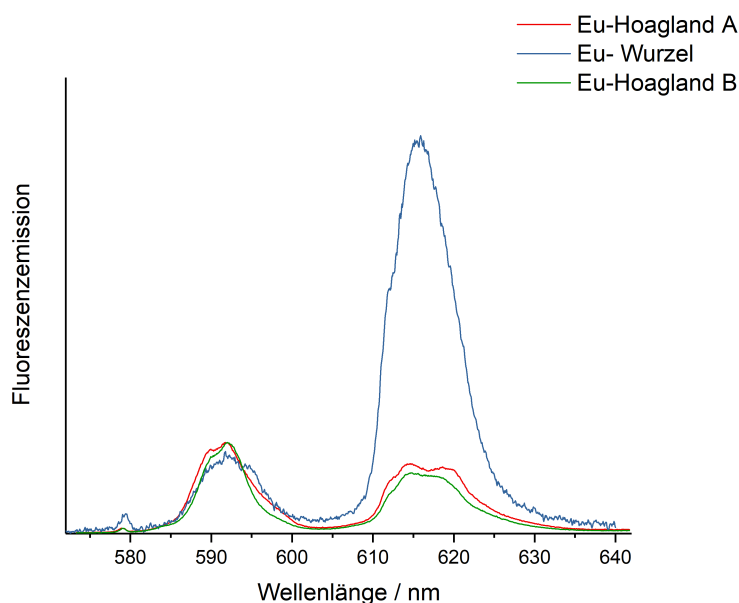


Abbildung 4.11.: Vergleich der Emissionsspektren von Eu-HOAGLAND vor (A) und nach (B) dem Pflanzenversuch, sowie einem Wurzelquerschnitt der *Secale cereale* L. der Konzentrationen von 10 mmol/L, entnommen nach sieben Tagen.

Tabelle 4.9.: Ergebnisse der Lebensdauermessungen (biexponentielle Anpassung) von Europium in HOAGLAND-Medium (A) vor und nach (B) dem Pflanzenversuch, sowie in der Wurzel (7 d, $c = 10$ mmol/L) mit angegebener und ausgewerteter Fluoreszenzbande

Probe	Emissionsbande	Lebensdauer / μs	$n(\text{H}_2\text{O})$
Eu-HOAGLAND A	7F_1	149	$6,6 \pm 0,5$
		405	$2,0 \pm 0,5$
Eu-Wurzel	7F_2	457	$1,7 \pm 0,5$
		1709	$0,0 \pm 0,5$
Eu-HOAGLAND B	7F_1	117	$8,5 \pm 0,5$
		352	$2,4 \pm 0,5$

Alle Fluoreszenz-Spektren weisen eine 7F_0 -Bande auf, welche auf unsymmetrische Komplexierung des Europiums hindeutet. Wird das 7F_1 - 7F_2 -Verhältnis verglichen, zeigen sich unterschiedliche Ergebnisse. Anhand der Emissionsspektren und Lebensdauern ist zu erkennen, dass sich die Speziation des Eu-HOAGLAND-Mediums vor und nach der Inkubation kaum verändert haben kann. Kleinere Schwankungen der Lebensdauern entstehen durch die Auswertung mit einer biexponentiellen Anpassung. Demnach sind mindestens zwei Spezies enthalten mit der umgebenden Wassermolekül-Anzahl von etwa

zwei und sieben bis neun. Werden diese Zahlen von der Gesamtkoordinationszahl des Europium-Ions von neun subtrahiert, sind sieben (Spezies 1) bzw. null bis drei (Spezies 2) Koordinationsplätze von anderen Liganden besetzt. Folgende Spezies in Lösung wären mit den detektierten Fluoreszenzlebensdauern in Einklang zu bringen: $[\text{Eu}(\text{H}_2\text{O})_9]^{3+}$, $[\text{EuH}_2\text{PO}_4]^{2+}$, $[\text{Eu}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2]^+$ und $[\text{Eu}(\text{EDTA})]^-$. Diese Komplexe könnten aufgrund des im HOAGLAND-Medium vorhandenen Phosphats und EDTAs in der Lösung vorliegen. Wie in Kapitel 2.2 beschrieben, besitzt Europium eine große Affinität zu Phosphat und EDTA. Die umgebende Wassermolekül-Anzahl kann in dem MS-Spektrum aufgrund des ESI-Prozesses von den berechneten Werten abweichen.

Der Wurzelquerschnitt der *Secale cereale* L. dagegen weist eine deutlich höhere 7F_2 -Bande auf, welche auf eine erhöhte Komplexierung hindeutet. Außerdem existiert eine Spezies mit etwa zwei und eine ohne koordinierte Wassermoleküle. Demnach sind sieben bzw. neun Koordinationsplätze von anderen Liganden besetzt. Aufgrund dessen liegt die Vermutung einer starken Komplexbildung, wie z.B. mit in der Pflanze vorkommenden Carboxylat- oder Organophosphatliganden nahe.^[6] In einer Pflanze sind allgemein viele verschiedene Carboxylate vorhanden, welche mit Europium(III) komplexieren könnten. Aufgrund dessen wurde versucht, die typischen Europium-Carboxylate in dem DESI-MS-Spektrum der Pflanzenwurzel ($c = 10 \text{ mmol/L}$, Sieben Tage) zu identifizieren (Tabelle 4.10). Eine ähnlich hohe Affinität von Eu(III)-Ionen wie zu den Carboxylaten existiert zu Phosphaten. Die Untersuchung der möglichen Spezies wurde ebenfalls durchgeführt (Tabelle 4.11).

4. Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 4.10.: Eu³⁺-Speziessuche der Carboxylate im DESI-MS-Spektrum nach sieben Tagen Inkubationszeit und $c(\text{Eu}) = 10 \text{ mmol/L}$; ✓: Vorhanden, X: Nicht vorhanden

Eu ³⁺ - Spezies	Strukturformel	m/z -Signale		Vor- handen?
		¹⁵¹ Eu	¹⁵³ Eu	
Formiate	$[\text{Eu}(\text{HCOO}) + \text{H}_2\text{O}]^{2+}$	106,96	107,96	X
	$[\text{Eu}(\text{HCOO}) + 2 \text{H}_2\text{O}]^{2+}$	115,97	116,97	X
	$[\text{Eu}(\text{HCOO})_2]^+$	240,91	242,92	X
	$[\text{Eu}(\text{HCOO})_2 + \text{H}_2\text{O}]^+$	258,93	260,93	X
	$[\text{Eu}(\text{HCOO})_2 + 2 \text{H}_2\text{O}]^+$	276,94	278,94	X
Acetat	$[\text{Eu}(\text{HCOO})_2 + 2 \text{H}_2\text{O}]^+$	276,94	278,94	X
	$[\text{Eu}(\text{CH}_3\text{COO})]^{2+}$	104,97	105,97	X
	$[\text{Eu}(\text{CH}_3\text{COO}) + \text{H}_2\text{O}]^{2+}$	113,97	114,97	X
	$[\text{Eu}(\text{CH}_3\text{COO}) + 2 \text{H}_2\text{O}]^{2+}$	122,98	123,98	X
	$[\text{Eu}(\text{CH}_3\text{COO})_2]^+$	268,95	270,95	X
	$[\text{Eu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 + \text{H}_2\text{O}]^+$	286,96	288,96	X
Propionat	$[\text{Eu}(\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COO})]^{2+}$	111,97	112,97	X
	$[\text{Eu}(\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COO}) + \text{H}_2\text{O}]^{2+}$	120,98	121,98	X
	$[\text{Eu}(\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COO}) + 2 \text{H}_2\text{O}]^{2+}$	129,98	130,99	X
	$[\text{Eu}(\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COO})_2]^+$	296,98	298,98	X
	$[\text{Eu}(\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COO})_2 + \text{H}_2\text{O}]^+$	314,99	316,99	X
	$[\text{Eu}(\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COO})_2 + 2 \text{H}_2\text{O}]^+$	333,00	335,00	X
Citrat	$[\text{Eu}(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7) + \text{H}]^+$	240,93	342,93	X
	$[\text{Eu}(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7) + \text{H}_2\text{O} + \text{H}]^+$	358,94	360,94	X
	$[\text{Eu}(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7) + 2 \text{H}_2\text{O} + \text{H}]^+$	376,95	378,95	X
Oxalat	$[\text{Eu}(\text{COO})_2]^+$	194,91	196,91	X
	$[\text{Eu}(\text{COO})_2 + \text{H}_2\text{O}]^+$	212,92	214,92	X
	$[\text{Eu}(\text{COO})_2 + 2 \text{H}_2\text{O}]^+$	230,93	232,93	X
Malonat	$[\text{Eu}(\text{CH}_2(\text{COO})_2)]^+$	252,92	254,92	X
	$[\text{Eu}(\text{CH}_2(\text{COO})_2) + \text{H}_2\text{O}]^+$	270,93	272,93	X
	$[\text{Eu}(\text{CH}_2(\text{COO})_2) + 2 \text{H}_2\text{O}]^+$	288,94	290,94	X
Lactat	$[\text{Eu}(\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{COO})]^{2+}$	119,97	120,97	X
	$[\text{Eu}(\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{COO}) + \text{H}_2\text{O}]^{2+}$	128,98	129,98	X
	$[\text{Eu}(\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{COO}) + 2 \text{H}_2\text{O}]^{2+}$	137,98	138,98	X
	$[\text{Eu}(\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{COO})_2]^+$	328,97	330,97	X
	$[\text{Eu}(\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{COO})_2 + \text{H}_2\text{O}]^+$	346,98	348,98	X
	$[\text{Eu}(\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{COO})_2 + 2 \text{H}_2\text{O}]^+$	364,99	366,99	X

Tabelle 4.11.: Eu^{3+} -Speziessuche der Phosphate im DESI-MS-Spektrum nach sieben Tagen Inkubationszeit und $c(\text{Eu}) = 10 \text{ mmol/L}$; ✓: Vorhanden, X: Nicht vorhanden

Eu^{3+} -Spezies	Strukturformel	m/z -Signale		Vorhanden?
		^{151}Eu	^{153}Eu	
Phosphat	$[\text{Eu}(\text{PO}_4) + \text{H}]^+$	246,88	248,88	X
	$[\text{Eu}(\text{PO}_4) + \text{H}_2\text{O} + \text{H}]^+$	264,98	266,98	X
	$[\text{Eu}(\text{PO}_4) + 2 \text{H}_2\text{O} + \text{H}]^+$	282,90	284,90	X
	$[\text{Eu}(\text{HPO}_4)]^+$	246,88	248,88	X
	$[\text{Eu}(\text{HPO}_4) + \text{H}_2\text{O}]^+$	264,89	266,89	X
	$[\text{Eu}(\text{HPO}_4) + 2 \text{H}_2\text{O}]^+$	282,90	284,90	X
	$[\text{Eu}(\text{H}_2\text{PO}_4)]^{2+}$	123,94	124,94	X
	$[\text{Eu}(\text{H}_2\text{PO}_4) + \text{H}_2\text{O}]^{2+}$	132,95	133,95	X
	$[\text{Eu}(\text{H}_2\text{PO}_4) + 2 \text{H}_2\text{O}]^{2+}$	141,95	142,96	X

Keine der genannten m/z -Signale aus den Tabellen sind in den DESI-MS-Spektren zu finden. Besonders das Citrat-Ion ist ein beliebter Bindungspartner für das $\text{Eu}(\text{III})$ -Ion und ist bei pH 5 bis 8 mit dem $(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7)^{3-}$ -Ion vertreten. Alle weiteren Carboxylate sind ebenfalls bekannte Vertreter in einer Pflanze.^[57]

Dieses Ergebnis kann mehrere Ursachen haben. Zum einen spielt die Pflanzenphysiologie eine große Rolle, da das Europium in verschiedenen Stoffwechselvorgängen eingebaut werden kann und meist wie ein Ca^{2+} -Ion interagiert. Bisher ist z.B. bekannt, dass Eu^{3+} Ca^{2+} als Botenstoff ersetzen, oder durch eine Reduktion zum $\text{Eu}(\text{II})$ -Ion zur Beeinflussungen von Bindungsproteinen durch das abgefangene Elektron führen kann.^[58] Viele Metabolismen von Europium in Pflanzen sind allerdings bis heute noch nicht geklärt. Demnach könnte das Ion in die Pflanze eingebaut werden, wodurch eine Desorption mittels DESI-MS eher unwahrscheinlich wäre. Nur in der Pflanzenwurzel nach einer Inkubationszeit von fünf Tagen wurden die Signale bei m/z 202,94 und 204,94 identifiziert, welches in der Eu -HOAGLAND-Lösung vorhanden ist. Entweder wurde das Eu^{3+} nach sieben Tagen bereits metabolisiert und weiter transportiert, oder aber als Carboxylsäure wieder in das Kontaminationsmedium abgegeben.^[6;59] Da die Konzentrationen der Eu -Lösungen relativ hoch angesetzt wurden, kann letzteres durchaus in Frage kommen. Außerdem konnte pro Pflanze und Pflanzenteil nur eine Probe untersucht werden. Dies beeinflusst die Repräsentativität der Ergebnissen, da durchaus lokale Verteilungsunterschiede in einer Pflanze vorkommen können.

Des Weiteren wurde nur eine endliche Anzahl an möglichen Komplexbildungen des Europium-Ions getestet. Durch die Vielzahl an Carboxylaten und anorganischen oder organischen Phosphaten sind weitaus mehr Verbindungen denkbar und schwierig zu identifizieren. In den Spektren sind noch weitere unaufgeklärte Peaks vorhanden, welche von weiteren, bisher noch nicht identifizierten Europium-Komplexen herrühren könnten.

Alles in allem konnte bisher eine Europiumspezies in der Pflanze identifiziert werden, welche allerdings nur in einer Probe vorkam. Die m/z -Signalidentifikation erwies sich generell als sehr komplex, da der Metabolismus des Europiums in der Pflanze vielfältig sein kann. Trotzdem konnte gezeigt werden, dass das Europium vermutlich als freies Eu^{3+} -Ion in der Pflanzenwurzel vorliegt (m/z 202,94 bzw. 204,94) und dort als Carboxylat oder Phosphat weitergeleitet und metabolisiert wird. Außerdem liegt es wahrscheinlich fest gebunden vor, da es sich nicht mittels DESI-MS desorbieren lässt. Diese Erkenntnisse decken sich mit denen von KELLEY *et al.*, dass Europium von Carboxylatgruppen hydratisiert, adsorbiert und intrazellulär gebunden wird.^[28] Um eine Konzentrationsverteilung von Europium in der Pflanze zu erhalten, wurden die Pflanzenteile weitergehend mittels ICP-MS untersucht.

4.5.3. Konzentrationsbestimmung von Europium

Die Europium-Gehalte in den Pflanzenteilen der *Secale cereale* L. wurden mithilfe von ICP-MS bestimmt und die Ergebnisse in Tabelle 4.12 aufgelistet. Die Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze wurden berechnet und in Tabelle 4.13 zusammengefasst. Die dafür notwendigen Vergleichswerte der Konzentrationsbestimmung des Europiums sind in Tabelle A.7 aufgeführt. Aufgrund von sehr unterschiedlichen Gehalten, wurde drei Kalibrationen verwendet und dementsprechend drei Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenzen erhalten.

Tabelle 4.12.: Ergebnisse der Gehalte von Europium in *Secale cereale* L. gemessen mit ICP-MS; B: Blatt, S: Stamm, W: Wurzel, K: Verwendete Kalibration N.: Nachgewiesen, Werte mit Unsicherheit > Bestimmungsgrenze

Lösung	$t(\text{Zugabe}) /$ d	$c(\text{Eu}) /$ mmol/L	Probe	$w_{\text{Eu}} /$ $\mu\text{g} \cdot (\text{mg Probe})^{-1}$	K
Kontrolle	5	-	B	$0,0480 \pm 0,00190$	1
Kontrolle	5	-	W	N.	1
Eu	5	1	B	$0,563 \pm 0,00170$	1
Eu	5	1	W	$32,14 \pm 4,123$	3
Eu	5	10	B	$1,04 \pm 0,00188$	1
Eu	5	10	W	$24,181 \pm 3,24$	3
Kontrolle	7	-	B	$0,0257 \pm 0,0134$	1
Kontrolle	7	-	S	$0,106 \pm 0,00184$	1
Kontrolle	7	-	W	$0,0808 \pm 0,00169$	1
Eu	7	1	B	$0,315 \pm 0,00175$	1
Eu	7	1	S	$3,73 \pm 0,0981$	2
Eu	7	1	W	$17,6 \pm 1,76$	3
Eu	7	10	B	$46,7 \pm 3,09$	3
Eu	7	10	S	$43,7 \pm 0,939$	3
Eu	7	10	W	$106 \pm 6,72$	3

Tabelle 4.13.: Berechnete Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenzen (NG, EG, BG) für die ICP-MS-Messung von Europium in *Secale cereale* L.; K1-3: Kalibration 1-3

Grenze	K1(Eu) / ng/mL	K2(Eu) / ng/g	K3(Eu) / ng/g
NG	0,00134	0,202	0,224
EG	0,00268	0,404	0,447
BG	0,00403	0,606	0,671

Es ist zu erkennen, dass die Europium-Gehalte der Pflanze wie erwartet mit steigender Konzentration in der Kontaminationslösung zunehmen. Mit der Ausnahme von den Gehalten nach sieben Tagen Inkubationszeit in dem Medium mit $c = 10$ mmol/L kann folgende Reihenfolge der inkubierten Proben mit absteigenden Eu-Gehalten definiert werden: Wurzel, Stamm, Blatt. Diese deckt sich nicht mit der in der Literatur beschriebenen Reihenfolge: Wurzel, Blatt, Stamm, wird aber durch die angesprochene Ausnahme bestätigt.^[12] Daher gilt letztere eventuell nur bei erhöhten Europium-Konzentrationen. Das Ergebnis nach fünf Tagen Inkubationszeit bei $c = 1$ mmol/L weist einen

etwas höheren Wert auf als bei $c = 10$ mmol/L. Dies kann in der Pflanzenphysiologie begründet werden, da jede Pflanze der gleichen Gattung unterschiedlich schnell auf Umweltereignisse reagiert. Demnach haben diese in 1 mmol/L-Eu-Lösung das Europium vermutlich schneller aufgenommen als jene in 10 mmol/L-Lösung. Ein ähnliches Ergebnis zeigt sich auch bei einem Vergleich der Gehalte nach fünf und sieben Tagen Inkubationszeit.

Werden die Ergebnisse der ICP-MS-Messung mit denen der DESI-MS verglichen, zeigt sich, dass bei der Wurzel-Probe nach fünf Tagen Inkubationszeit und einer Konzentration der Kontaminationslösung von 10 mmol/L ein Europium-Gehalt von $24,181 \pm 3,24 \mu\text{g} \cdot (\text{mg Probe})^{-1}$ erhalten wurde. Dieser muss nicht dem freien, gefundenen Eu(III)-Ion entsprechen, welches vermutlich bereits metabolisiert wurde und womöglich als Carboxylat oder Phosphat vorliegt. Aufgrund der hohen erhaltenen Gehalte ist es wahrscheinlich, dass das Europium bereits fest in die Pflanze eingebunden wurde und keine Desorption stattfinden konnte. Natürlich spielen auch die verwendeten Parametereinstellungen der DESI-MS eine große Rolle, welche allerdings vorher auf das Europium(III)-Ion optimiert wurden. Dennoch können Desorptionswinkel, Druck und Abstand des ionisierten Lösungsmittels von Probenoberfläche zu Probenoberfläche variieren und somit eine schlechtere Desorption zur Folge haben. Eine Parameteroptimierung während der Probenmessung gestaltete sich als schwierig, da das Pflanzenmaterial durch das Methanol sehr schnell austrocknete und somit die Oberfläche verändert wurde.

5 | Zusammenfassung und Ausblick

Ziel dieser Arbeit war die erstmalige Inbetriebnahme und Einarbeitung in die Desorptions-Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie (DESI-MS) für die Untersuchung von aufgenommenen Arsen- und Europiumspezies in Pflanzen. Nach Anschluss und Testen der DESI-Quelle wurde zunächst eine Parameteroptimierung für die Ausgangssubstanzen Dimethylarsenat, Kaliumhydrogenarsenat, Natriumarsenit und Europiumnitrat in Lösung auf einem PROSOLIA-Glasträger mit hydrophoben Teflon-Spots durchgeführt. Die Flussrate, der Druck und der Auftreffwinkel α des ionisierten Lösungsmittels (Methanol, Wasser 1:1), sowie der Abstand von Sprühkapillare zu Probe, von Sprühkapillare zu Transferröhrchen und von Transferröhrchen zu Probe wurden dabei optimiert.

Anschließend wurden erste Kopplungsversuche von Dünnschichtchromatographie und DESI-MS mit einer NP-Kieselgel-60-Platte und Aluminium- bzw. Glasträger unternommen. Unter Variation der DESI-Parameter und des Lösungsmittels konnte keine Desorption des verwendeten Dimethylarsenats festgestellt werden. Grund dafür sind wahrscheinliche Wasserstoffbrückenbindungen oder Dipol-Dipol-Wechselwirkungen von DMA mit der stationären Phase der DC-Platte. Folglich wurden Feststoffproben mit doppelseitigem Klebeband auf einem PROSOLIA-Glasträger fixiert und so mit DESI-MS untersucht.

Die Vorversuche von Dimethylarsenat in *Epipremnum aureum* L. dienten dem Erlernen und Erproben der Analyse von Pflanzenteilen mittels DESI-MS. Die verwendete Kontaminationslösung von DMA und HOAGLAND-Medium wurde vorab mit nESI-MS analysiert und die charakteristischen m/z -Signale mit den DESI-MS-Spektren verglichen. Für die Desorptions-Untersuchungen wurden Pflanzenblätter von ihrer Cuticula befreit und untersucht. Von dem

Pflanzenstamm wurde ein Querschnitt analysiert. Weder im Blatt noch im Stamm wurde das DMA-Signal nachgewiesen. Mit nachfolgender ICP-OES-Analyse von Arsen und Phosphor konnte eine wahrscheinliche Nachweisgrenze der DESI-MS bei *Epipremnum aureum* L. und Dimethylarsenat von $0,193 \mu\text{g} \cdot (\text{mg Probe})^{-1}$ ermittelt werden. Außerdem wurde durch die Atomemissionsanalyse dargestellt, dass vermutlich der Phosphattransport durch die Schädigung der Pflanze wegen des steigenden Arsen-Gehalts zunahm.

Des Weiteren konnten aus der Analyse von den Arsenspezies DMA, Arsenat und Arsenit in *Pisum sativum* L. weitere Erkenntnisse über die DESI-MS gewonnen werden. Auch hier wurden die m/z -Signale der zuvor mit nESI-MS untersuchten Kontaminationslösungen mit den erhaltenen DESI-MS-Spektren der Pflanzenteile Blatt, Stamm und Wurzel verglichen. Es wurden DMA in der Wurzel der $50 \mu\text{mol/L}$ -Lösung und im Blatt und Wurzel der $100 \mu\text{M}$ -Lösung detektiert. Außerdem wurde das Arsenat-Signal im Stamm der $100 \mu\text{mol/L}$ -Kontaminationslösung und ein neues, der Pflanze zugehöriges Signal des Cholins nachgewiesen. Nach einer Konzentrationsbestimmung von Arsen mittels ICP-OES ergaben sich für die gefundenen m/z -Signale Gehaltsbereiche von $0,109 \text{ ng/mg}$ und $0,217 \text{ ng/mg}$ in denen DMA und As(V) detektiert werden können. Allerdings könnten diese Werte überschätzt worden sein, da durch ICP-OES alle Arsenspezies bestimmt wurden. Die Gehalte der verschiedenen Spezies konnten mit denen des Phosphors durch die Aufnahme und den Metabolismus der Pflanze in Einklang gebracht werden.

In einem weiteren Teil dieser Arbeit wurde die Aufnahme von Europium in *Secale cereale* L. nach fünf und sieben Tagen Inkubationszeit mithilfe von DESI-MS und ICP-MS untersucht. Die durch nESI-MS analysierte Eu-Hogland-Lösung ergab ein breites Spektrum an m/z -Signalen von Europiumhydroxid-, -nitrat- und -phosphat-Spezies. Diese wurden nur in der Pflanzenwurzel nach einer Inkubationszeit von fünf Tagen und einer Konzentration der Kontaminationslösung von $c = 10 \text{ mmol/L}$ detektiert und in selbiger nach sieben Tagen nicht gefunden. Um weitere Spezies identifizieren zu können wurden Fluoreszenzspektren und Lebensdauermessungen mittels TRIFS von Pflanzenwurzel und Kontaminationslösungen aufgenommen und ausgewertet. Daraus ergab sich, dass in der Wurzel unsymmetrische und stark komplexierte Europiumspezies, vermutlich mit Carboxylat- oder Or-

ganophosphatliganden existieren, welche die 7F_2 -Fluoreszenzbande deutlich erhöhten. Außerdem wurden Lebensdauern von zwei Spezies ermittelt, welche auf eine Wassermolekül-Anzahl um das Eu(III)-Ion von $1,7 \pm 0,5$ bzw. $0,0 \pm 0,5$ hinweisen. Typische Carboxylat- sowie Phosphat-Spezies konnten allerdings nicht im DESI-MS-Spektrum identifiziert werden.

Die Konzentrationsbestimmung mit ICP-MS zeigte bei geringeren Inkubationszeiten oder Eu-Kontaminationskonzentrationen die absteigende Gehaltsreihenfolge von Wurzel, Stamm, Blatt. Bei längerer Inkubationszeit und höherer Konzentration ergab sich dagegen die Reihenfolge Wurzel, Blatt, Stamm, wie in der Literatur beschrieben.^[12] Zudem wurden relativ hohe Europium-Gehalte im Vergleich zu den Kontrollpflanzen erhalten, wodurch die Vermutung nahe lag, dass das Ion gebunden in der Pflanze vorliegt und nur schwer desorbiert werden kann. Dies wird auch durch die Tatsache unterstützt, dass Eu(III)-Ionen als Ca(II)-Ionenersatz zur Analyse des Pflanzenmetabolismus eingesetzt werden.^[26] Auch durch KELLEY *et al.* wurde festgestellt, dass Europium-Ionen von Carboxylaten aufgenommen und intrazellulär gebunden werden.^[28] Somit gestaltete sich die Analyse von aufgenommenem Europium als schwierig und konnte nur in einem Pflanzenteil detektiert werden.

Insgesamt wurden mit DESI-MS erfolgreich eine organische und anorganische Arsenspezies, sowie eine Eu^{3+} -Spezies nach der Pflanzenaufnahme detektiert und Rückschlüsse auf die Pflanzenphysiologie gewonnen.

Weiterblickend ist die Analyse von Europium in Pflanzen mit DESI-MS ein vielversprechender Ansatz. Durch den Einsatz von organischen Europiumverbindungen, wie z.B. Europiumacetat, könnte getestet werden, ob das Ion wirklich fest in die Pflanze eingebaut wird. Organische Verbindungen erschienen während der DESI-MS-Analyse leichter zu desorbieren als anorganische. Dadurch könnte gesagt werden, ob das Fehlen der zuvor ermittelten m/z -Signale in der Desorption oder dem Metabolismus der Pflanze begründet liegt.

Des Weiteren könnten die Ergebnisse der Konzentrationsbestimmungen von Arsen und Europium überprüft werden. Dazu kann die aufgeschlossene Pflanze des jeweiligen Elements mit nESI-MS untersucht werden. Es würde sich zeigen, ob der Aufschluss vollständig verlaufen ist. Falls ja, wären vermutlich

nur noch freie Ionen zu finden.

Weiterhin ist das *Bioimaging* einer Pflanze ein interessantes Themengebiet. Für die Kopplung von DC-DESI-MS könnten weitere Experimente mit RP-DC-Platten auf Glaträgern unternommen werden, um einen Pflanzenabdruck zu generieren. Dies ist vor allem für das Pflanzenblatt rentabel, da die Cuticula dessen vor der Analyse entfernt werden muss und dies meist nur an einer kleinen Stelle gelingt. Durch einen Abdruck könnte die Wachsschicht im Nachhinein vollständig entfernt werden. In diesem Zusammenhang ist auch die Einstellung der Flussrate des Lösungsmittels wichtig, anhand dessen die Breite des ionisierten Sprays auf der Probe variiert werden kann. In dieser Arbeit war eine Flussrate von 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ nötig, da sonst das erhaltene Spektrum eine zu geringe Ionenanzahl aufwies. Dieser könnte nach Verändern der Probenoberfläche, durch z.B. einen Pflanzenabdruck, verringert und so eine höhere Auflösung des *Imagings* erhalten werden.

6 | Literaturverzeichnis

- [1] Dharmendra K. Gupta, Frank Tawussi, Alex Hölzer, Linda Hamann, and Clemens Walther. Investigation of low-level ^{242}Pu contamination on nutrition disturbance and oxidative stress in *Solanum tuberosum* L. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(19):16050–16061, 2017.
- [2] Jürgen H. Gross. *Massenspektrometrie*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 2011.
- [3] Malcolm Dole, L.L. Mack, R.L. Hines, R.C. Mobley, L.D. Ferguson, and M.B. Alice. Molecular Beams of Macroions. *The Journal of Chemical Physics*, 45(5):2240–2249, 1968.
- [4] Zoltán Takáts, Justin M. Wiseman, Bogdan Gologan, and R. Graham Cooks. Mass Spectrometry Sampling Under Ambient Conditions with Desorption Electrospray Ionization. *Science*, 306(5695):741–473, 2004.
- [5] Livia Botelho de Abreu, Rodinei Augusti, Lucas Schmidt, Valderi Luiz Dressler, Erico Marlon de Moraes Flores, and Clesia Cristina Nascentes. Desorption electrospray ionization mass spectrometry (DESI-MS) applied to the speciation of arsenic compounds from fern leaves. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405(24):7643–7651, 2013.
- [6] Robert J. Fellows, Zheming Wang, and Calvin C. Ainsworth. Europium Uptake and Partitioning in Oat (*Avena sativa*) Roots as Studied by Laser-Induced Fluorescence Spectroscopy and Confocal Microscopy Profiling Technique. *Environmental Science and Technology*, 37(22):5247–5253, 2003.
- [7] Pauline L. Smedley and David G. Kinniburgh. Source and behaviour of arsenic in natural waters. *British Geological Survey*, page 61, 2000.

- [8] A. F. Hollemann, Egon Wiberg, and Nils Wiberg. *Lehrbuch der Anorganischen Chemie*. Walter de Gruyter & Co, Berlin, 2007.
- [9] P. L. Smedley and D. G. Kinniburgh. A review of the source, behaviour and distribution of arsenic in natural waters. *Applied Geochemistry*, 17(5):517–568, 2002.
- [10] Fang-Jie Zhao, Steve P. McGrath, and Andrew A. Meharg. Arsenic as a Food Chain Contaminant: Mechanisms of Plant Uptake and Metabolism and Mitigation Strategies. *Annual Review of Plant Biology*, 61(1):535–559, 2010.
- [11] Jen H. Huang, Kan Nian Hu, and Berryinne Decker. Organic arsenic in the soil environment: Speciation, occurrence, transformation, and adsorption behavior. *Water, Air, and Soil Pollution*, 219(1-4):401–415, 2011.
- [12] Germund Tyler. Rare earth elements in soil and plant systems - A review. *Plant and Soil*, 267(1):191–206, 2004.
- [13] Zhongyong Zha, Dingna Wang, Wei Hong, Li Liu, Sai Zhou, Xiaojie Feng, Bing Qin, Jianmei Wang, Yi Yang, Liang Du, Dong Zhang, Zhen-dong Fang, and Chuanqin Xia. Influence of Europium speciation on its accumulation in Brassica napus and over-expressing BnTR1 lines. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 301(1):257–262, 2014.
- [14] Karsten Nowotka. Untersuchungen zur Migration von Europium und Gadolinium in Kaolinit als Modellmineral für eine Endlagerstätte. 2007.
- [15] Nucleonica. Americium-241, URL: www.nucleonica.com, Zugriff: 23.09.2017.
- [16] M. Binnewies, M. Jäckel, Helge Willner, and G. Rayner-Canham. Allgemeine und Anorganische Chemie. page 152, 2004.
- [17] Peter Schopfer and Axel Brennicke. *Pflanzenphysiologie*. Springer Spektrum, Berlin Heidelberg, 2010.
- [18] Lincoln Taiz and Eduardo Zeiger. *Plant Physiology*. Sinauer Associates, 2002.

-
- [19] Estelle Levetin and Karen McMahon. *Plants and Society*. McGrawHill, New York, 2008.
 - [20] F J Zhao, J F Ma, A A Meharg, and S P McGrath. Arsenic uptake and metabolism in plants. *The New phytologist*, 181(4):777–94, 2009.
 - [21] L. Q. Lou, Z. H. Ye, A. J. Lin, and M. H. Wong. Interaction of arsenic and phosphate on their uptake and accumulation in Chinese brake fern. *International Journal of Phytoremediation*, 12(5):487–502, 2010.
 - [22] Lorraine Irvine, Ivan J. Boyer, and John M. DeSesso. Monomethylarsonic Acid and Dimethylarsinic Acid: Developmental Toxicity Studies With Risk Assessment. *Birth Defects Research (Part B)*, 77:53–68, 2006.
 - [23] D. K. Gupta, M. Inouhe, M. Rodríguez-Serrano, M. C. Romero-Puertas, and L. M. Sandalio. Oxidative stress and arsenic toxicity: Role of NADPH oxidases. *Chemosphere*, 90(6):1987–1996, 2013.
 - [24] Swaran J.S. Flora. Arsenic-induced oxidative stress and its reversibility. *Free Radical Biology and Medicine*, 51(2):257–281, 2011.
 - [25] B.T. Amann, P. Malqueen, and W.D. Jr. Horrocks. A continuous spectrophotometric assay for the activation of plant NAD kinase by calmodulin, calcium(II), and europium(III) ions. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 25:207–217, 1992.
 - [26] K. Burda, K Strzalka, and G. H. Schmid. Europium- and Dysprosium-Ions as Probes for the Study of Calcium Binding Sites in Photosystem II. *Zeitschrift der Naturforschung*, 50c:220–230, 1995.
 - [27] A.J. Palmer. Emissive europium complexes that stain the cell walls of healthy plant cells, pollen tubes and roots. *The Royal Society of Chemistry*, pages 0–22, 2014.
 - [28] Colleen Kelley, Randall E. Mielke, Darryl Dimaquibo, Abigale J. Curtis, and Jane G. DeWitt. Adsorption of Eu (III) onto roots of water hyacinth. *Environmental science & technology*, 33(9):1439–1443, 1999.
 - [29] Sir Geoffrey Taylor and F.R.S. Disintegration of water drops in an electric field. *Royal Society*, 280:383–397, 1964.

- [30] Grace K Poon, Graham M F Bisset, and Prakash Mistry. Electrospray Ionization Mass Spectrometry for Analysis of Low-Molecular-Weight Anticancer Drugs and Their Analogues. *Journal of American Society for Mass Spectrometry*, 4:588–595, 1993.
- [31] Andries P. Bruins, Thomas R. Covey, and Jack D. Henion. Ion spray interface for combined liquid chromatography/atmospheric pressure ionization mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 59(22):2642–2646, 1987.
- [32] R. Juraschek, T. Dülcks, and M. Karas. Nanoelectrospray - More than just a minimized-flow electrospray ionization source. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 10(4):300–308, 1999.
- [33] Matthias S. Wilm and Matthias Mann. Electrospray and Taylor-Cone theory, Dole’s beam of macromolecules at last? *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes*, 136(2-3):167–180, 1994.
- [34] Matthias Wilm, Andrej Shevchenko, Tony Houthaeve, Stephen Breit, Lothar Schweigerer, Theodore Fotsis, and Matthias Mann. Femtomole sequencing of proteins from polyacrylamide gels by nano-electrospray mass spectrometry. *Nature*, 379:466–469, 1996.
- [35] Zoltán Takáts, Justin M. Wiseman, and R. Graham Cooks. Ambient mass spectrometry using desorption electrospray ionization (DESI): Instrumentation, mechanisms and applications in forensics, chemistry, and biology. *Journal of Mass Spectrometry*, 40(10):1261–1275, 2005.
- [36] Nari Talaty, Zoltán Takáts, and R. Graham Cooks. Rapid in situ detection of alkaloids in plant tissue under ambient conditions using desorption electrospray ionization. *The Analyst*, 130(12):1624, 2005.
- [37] Ismael Cotte-Rodríguez, Zoltán Takáts, Nari Talaty, Huanwen Chen, and Rg Cooks. Desorption electrospray ionization of explosives on surfaces: sensitivity and selectivity enhancement by reactive desorption electrospray ionization.1. Cotte-Rodríguez I, Takáts Z, Talaty N, Chen H, Cooks R. Desorption electrospray ionization of explosive. *Analytical chemistry*, 77(21):6755–64, 2005.

-
- [38] Zoltán Takáts, Ismael Cotte-Rodriguez, Nari Talaty, Huanwen Chen, and R Graham Cooks. Direct, trace level detection of explosives on ambient surfaces by desorption electrospray ionization mass spectrometry. *Chemical communications (Cambridge, England)*, (15):1950–2, 2005.
- [39] David Calligaris, Isaiah Norton, Daniel R Feldman, Jennifer L Ide, Ian F Dunn, Livia S Eberlin, R Graham Cooks, Ferenc A Jolesz, Alexandra J Golby, and Nathalie Y Agar. Mass Spectrometry Imaging as a Tool for Surgical Decision- Making. 48(11):1178–1187, 2014.
- [40] Z. Takáts, V. Koblíha, K. Sevcik, P. Novak, G. Kruppa, K. Lemr, and V. Havlicek. Characterization of DESI-FTICR mass spectrometry - from ECD to accurate mass tissue analysis. *Journal of Mass Spectrometry*, 43(2):196–203, 2008.
- [41] R.G. Hemalatha and T. Pradeep. Understanding the molecular signatures in leaves and flowers by desorption electrospray ionization mass spectrometry (DESI MS) imaging. *Journal of agricultural and food chemistry*, 61:7477–7487, 2013.
- [42] Qizhi Hu, Robert J. Noll, Hongyan Li, Alexander Makarov, Mark Hardman, and R. Graham Cooks. The Orbitrap: A new mass spectrometer. *Journal of Mass Spectrometry*, 40(4):430–443, 2005.
- [43] Alexander Makarov. Electrostatic axially harmonic orbital trapping: A high-performance technique of mass analysis. *Analytical Chemistry*, 72(6):1156–1162, 2000.
- [44] Richard H. Perry, Graham Cooks, and Robert J. Noll. Orbitrap Mass Spectrometry: Instrumentation, Ion Motion and Applications. *Mass Spectrometry Reviews*, 27:661–699, 2008.
- [45] Thermo Fisher Scientific. Orbitrap Elite Hardware Manual. 2011.
- [46] Mark Hardman and Alexander A. Makarov. Interfacing the orbitrap mass analyzer to an electrospray ion source. *Analytical Chemistry*, 75(7):1699–1705, 2003.

- [47] W.T. Carnall, P.R. Fields, and K. Rajnak. Electronic Energy Levels of the Trivalent Lanthanide Aquo Ions. IV. Eu(III). *Journal of Chemical Physics*, 49(10):4450–4455, 1968.
- [48] W.T. Carnall. *The Absorption and Fluorescence Spectra of Rare Earth Ions in Solution*, volume 3. Amsterdam, 1979.
- [49] Anne Heller. *Spektroskopische Untersuchungen zur Komplexbildung von Cm(III) und Eu(III) mit organischen Modellliganden sowie ihrer chemischen Bindungsform in menschlichem Urin*. Dissertation, Helmholtz-Zentrum Dresden Rossendorf, 2011.
- [50] Annika Wunnenberg. *Physikalische Bestimmung der Aufnahme von Am-241 in Zellen*. Masterarbeit, Leibniz Universität Hannover, 2017.
- [51] William DeW Jr. Horrocks and Daniel R. Sudnick. Lanthanide Ion Probes of Structure in Biology. Laser-Induced Luminescence Decay Constants Provide a Direct Measure of the Number of Metal-Coordinated Water Molecules. *Journal of the American Chemical Society*, 101(2):334–340, 1979.
- [52] GESTIS-Stoffdatenbank. Dimethylarsinsäure, URL: <http://gestis.itrust.de>, abgerufen am 22.09.2017.
- [53] Inorganic Ventures. Arsenic, URL: <https://www.inorganicventures.com>, abgerufen am 22.09.2017.
- [54] George A. Miura and Tsung Ming M. Shih. Cholinergic constituents in plants: Characterization and distribution of acetylcholine and choline. *Physiologia Plantarum*, 61(3):417–421, 1984.
- [55] Martin Beyer, Evan R. Williams, and Vladimir E. Bondybey. Unimolecular Reactions of Dihydrated Alkaline Earth Metal Dications $M^{2+}(H_2O)_2$, $M = Be, Mg, Ca, Sr$ and Ba : Salt Bridge Mechanism in the Proton-Transfer-Reaction $M^{2+}(H_2O)_2 \rightarrow MOH^+ + H_3O^+$. *Journal of the American Chemical Society*, 121:1565–1573, 1998.
- [56] Manuel Raiwa. *Modifikation der Orbitrap Ionenoptik zur Unterdrückung von Messartefakten*. Masterarbeit, Leibniz Universität Hannover, 2017.

-
- [57] Anne Heller, Astrid Barkleit, Harald Foerstendorf, Satoru Tsushima, Karsten Heim, and Gert Bernhard. Curium(iii) citrate speciation in biological systems: a europium(iii) assisted spectroscopic and quantum chemical study. *Dalton Transactions*, 41(45):13969, 2012.
- [58] Hong Er Tian, Yong Sheng Gao, Feng Min Li, and Fuli Zeng. Effects of europium ions (Eu^{3+}) on the distribution and related biological activities of elements in *Lathyrus sativus* L roots. *Biological Trace Element Research*, 93(1-3):257–270, 2002.
- [59] Horst Marschner. *Mineral Nutrition of Higher Plants*. Academic Press, San Diego, London, 1995.

Abbildungsverzeichnis

2.1. POURBAIX-Diagramm von wässrigen Arsenspezies.	4
2.2. Struktureller Aufbau einer Pflanzenzelle.	7
2.3. Transportwege einer Pflanze.	8
2.4. Darstellung der Pflanzenaufnahme von Arsen-Spezies.	10
2.5. Vorgang der Elektrospray-Ionisation.	12
2.6. Schematischer Aufbau einer DESI-Quelle.	14
2.7. Schematischer Aufbau der Orbitrap.	16
2.8. Schematischer Aufbau des Massenspektrometers.	17
2.9. Schematische Darstellung der Fluoreszenz.	18
2.10. Fluoreszenzübergänge des Europiums.	19
2.11. Fluoreszenzspektrum von Europium.	20
2.12. Schematischer Aufbau von TRLFS.	21
3.1. Aufzucht von <i>Pisum sativum</i> L.	26
3.2. Kontaminationsexperiment von <i>Epipremnum aureum</i> L.	28
3.3. Kontaminationsexperiment von <i>Pisum sativum</i> L.	28
3.4. Kontaminationsexperiment von <i>Secale cereale</i> L.	29
3.5. PROSOLIA-Glasplatte mit Pflanzenproben.	30
4.1. DESI-MS-Spektren bei verschiedenen Auftreffwinkeln.	34
4.2. DESI-MS-Spektren bei verschiedenen Drücken.	35
4.3. Strukturformel von Dimethylarsenat.	36
4.4. nESI-Spektrum von Dimethylarsenat in HOAGLAND-Medium.	37
4.5. Pflanzenversuche mit <i>Epipremnum aureum</i> L.	38
4.6. DESI-MS-Spektren von DMA im <i>Epipremnum aureum</i> L.-Blatt.	39
4.7. nESI-MS-Spektren von Arsenat und Arsenit in HOAGLAND-Medium.	43
4.8. DESI-MS-Spektren von DMA in <i>Pisum sativum</i> L.-Wurzel.	45
4.9. nESI-MS-Spektren von Europiumnitrat in HOAGLAND-Medium.	50

4.10. DESI-MS-Spektren von Europium in <i>Secale cereale</i> L.	53
4.11. Fluoreszenzspektren von Europium in HOAGLAND-Medium und <i>Secale cereale</i> L.	54
A.1. DESI-MS-Spektren bei verschiedenen Flussraten.	85
A.2. DESI-MS-Spektren von <i>Epipremnum aureum</i> L.-Stamm. . . .	86
A.3. Biexponentielle Anpassungen von Eu-HOAGLAND-Medium vor Pflanzenversuch.	87
A.4. Biexponentielle Anpassungen von Eu in <i>Secale cereale</i> L. . . .	87
A.5. Biexponentielle Anpassungen von Eu-HOAGLAND-Medium nach Pflanzenversuch.	88

Tabellenverzeichnis

3.1. Geprüfte Messbereiche der DESI-Parameter	24
3.2. Zusammensetzung des HOAGLAND-Mediums	26
3.3. Verwendete Nadelspannungen der nESI-MS-Analyse	27
4.1. Optimale DESI-Parameter für Methanol-Wasser-Gemisch. . .	33
4.2. Ergebnisse der ICP-OES-Messung von Arsen und Phosphor in <i>Epipremnum aureum</i> L.	40
4.3. Nachweis- Erfassungs- und Bestimmungsgrenze von Arsen und Phosphor in <i>Epipremnum aureum</i> L.	40
4.4. Ergebnisse der DESI-MS von Arsen-Spezies in <i>Pisum sativum</i> L.	44
4.5. Ergebnisse der ICP-OES-Messung von Arsen und Phosphor in <i>Pisum sativum</i> L.	46
4.6. Berechnete Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze von Arsen und Phosphor in <i>Pisum sativum</i> L.	47
4.7. m/z -Signale der nESI-MS von Europiumnitrat in HOAGLAND- Medium	50
4.8. Ergebnisse der DESI-MS von Europium in <i>Secale cereale</i> L. . .	52
4.9. Lebensdauern von Europium in HOAGLAND-Medium und <i>Se-</i> <i>cale cereale</i> L.	54
4.10. Speziessuche von Europiumcarboxylaten	56
4.11. Speziessuche von Europiumphosphaten	57
4.12. Ergebnisse der ICP-MS-Messung von Europium in <i>Secale ce-</i> <i>reale</i> L.	59
4.13. Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenzen von Europi- um in <i>Secale cereale</i> L.	59
A.1. Einwaagen, Verdünnung und Volumina des Säureaufschlusses.	80
A.1. Einwaagen, Verdünnung und Volumina des Säureaufschlusses.	81

A.1. Einwaagen, Verdünnung und Volumina des Säureaufschlusses.	82
A.2. m/z -Signale von HOAGLAND-Medium	82
A.3. Optimale DESI-Paramter von DMA, Arsenat und Arsenit . . .	83
A.4. Ergebnisse ICP-OES ohne Verdünnung in <i>Epipremnum aure-</i> <i>um</i> L.	83
A.6. Optimale DESI-Parameter von Europium	83
A.5. Messergebnisse ICP-OES ohne Einwaage in <i>Pisum sativum</i> L.	84
A.7. Messergebnisse ICP-MS ohne Einwaage in <i>Secale cereale</i> L. . .	85

Abkürzungsverzeichnis

α	Auftreffwinkel
As(III)	Arsenit
As(V)	Arsenat
ATP	Adenosintriphosphat
β	Austrittswinkel
Bsp.	Beispiel
bzw.	Beziehungsweise
CCD	Ladungsgekoppeltes Gerät (engl. <i>charge coupled device</i>)
<i>CID</i>	Kollisionsinduzierte Dissoziation (engl. <i>collision induced dissociation</i>)
d.h.	das heißt
DC	Dünnschichtchromatographie
Δm	Differenz von zwei Massen
DESI	Desorptions-Elektrospray-Ionisation
DMA	Dimethylarsenat
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. <i>desoxyribonucleic acid</i>)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (engl. <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
ESI	Elektrospray-Ionisation
<i>HCD</i>	Höherenergetische kollisionsinduzierte Dissoziation (engl. <i>higher-energy collisional dissociation</i>)
ICP	Induktiv gekoppeltes Plasma (engl. <i>inductively coupled plasma</i>)
k	Feldkrümmung
<i>LIT</i>	Lineare Ionenfalle (engl. <i>linear iontrap</i>)
m	Masse
MMA	Monomethylarsenat
MS	Massenspektrometrie

nESI	Nano-Elektrspray-Ionisation
NMR	Kernresonanzspektroskopie (engl. <i>nuclear magnetic resonance</i>)
NP	Normalphase
OES	Optische Emissionsspektroskopie
o.g.	Oben genannt
R	Massenauflösung
RP	Umkehrphase (engl. <i>reversed phase</i>)
s.	Siehe
TF	Trenaferfaktor
TMA	Trimethylarsin
TMAO	Trimethylarsinoxid
TRLFS	Zeitaufgelöste Laser-Fluoreszenz-Spektroskopie (engl. <i>time-resolved laser fluorescence spectroscopy</i>)
u.a.	Unter anderem
ω_z	Frequenz der axialen Schwingung
z	Ladung
z.B.	Zum Beispiel

A | Anhang

Liste der verwendeten Chemikalien

- Arsenic (SIGMA ALDRICH, *Standard for ICP*)
- Cacodylic acid (SIGMA ALDRICH, *>99 %*)
- Disodium methyl arsonate hexahydrate (SIGMA ALDRICH, *98,60 %*)
- Europium (ALFA AESAR, *plasma standard solution*)
- Europium(III) nitrate pentahydrate (SIGMA ALDRICH, *99,9 % trace metals basis*)
- Methanol (VWR CHEMICALS, *HPLC Grade*)
- Nitric acid (VWR CHEMICALS, *69 %*)
- Phosphorous (SIGMA ALDRICH, *standard for AAS*)
- Potassium arsenate monobasic (SIGMA ALDRICH, *99,995 %*)
- Sodium (meta) arsenite (SIGMA ALDRICH, *>90 %*)

Tabellen

Tabelle A.1.: Verwendete Einwaagen, Verdünnungen und Volumen von Salpetersäure für den Säureaufschluss der Pflanzenteile; Verd.: Verdünnungsfaktor, K: Kontrollpflanze, B: Blatt, S: Stamm, W: Wurzel

Pflanze	Probe	t / d	c / mmol/L	m_{Probe} / mg	Verd.	$V(\text{HNO}_3)$ / L
<i>Epi- premnun aureum</i> L.	K B	3	-	9,93	50	0,001
	B	3	0,2	9,75	50	0,001
	K S	3	-	3,79	50	0,001
	S	3	0,2	5,01	50	0,001
	K B	4	-	10,69	50	0,001
	B	4	0,2	10,55	50	0,001
	K S	4	-	10,76	50	0,001
	S	4	0,2	10,6	50	0,001
<i>Pisum sativum</i> L.	K B	5	-	26,93	3	0,005
	K S	5	-	2,38	7,5	0,002
	K W	5	-	3,64	7,5	0,002
	DMA B	5	0,05	28,66	3	0,005
	DMA S	5	0,05	5,17	7,5	0,002
	DMA W	5	0,05	10,87	7,5	0,002
	DMA B	5	0,05	25,78	3	0,005
	DMA S	5	0,05	2,54	7,5	0,002
	DMA W	5	0,05	8,73	7,5	0,002
	DMA B	5	0,1	26,95	3	0,005
	DMA S	5	0,1	5,14	7,5	0,002
	DMA W	5	0,1	10,45	7,5	0,002
	DMA B	5	0,1	26,11	3	0,005
	DMA S	5	0,1	1,05	7,5	0,002
	DMA W	5	0,1	4,26	7,5	0,002
	As(V) B	5	0,05	27,38	3	0,005
	As(V) S	5	0,05	6,87	7,5	0,002
	As(V) W	5	0,05	12,33	7,5	0,002
	As(V) B	5	0,05	20,7	3	0,005

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Tabelle A.1.: Verwendete Einwaagen, Verdünnungen und Volumen von Salpetersäure für den Säureaufschluss der Pflanzenteile; Verd.: Verdünnungsfaktor, K: Kontrollpflanze, B: Blatt, S: Stamm, W: Wurzel

Pflanze	Probe	t / d	c / mmol/L	m_{Probe} / mg	Verd.	$V(\text{HNO}_3)$ / L
	As(V) S	5	0,05	3,92	7,5	0,002
	As(V) W	5	0,05	11,84	7,5	0,002
	As(V) B	5	0,1	28,4	3	0,005
	As(V) S	5	0,1	9,74	7,5	0,002
	As(V) W	5	0,1	16,25	7,5	0,002
	As(V) B	5	0,1	24,94	3	0,005
	As(V) S	5	0,1	9,88	7,5	0,002
	As(V) W	5	0,1	17,03	7,5	0,002
	As(III) B	5	0,05	28,38	3	0,005
	As(III) S	5	0,05	11,65	7,5	0,002
	As(III) W	5	0,05	18,22	7,5	0,002
	As(III) B	5	0,05	26,37	3	0,005
	As(III) S	5	0,05	8,85	7,5	0,002
	As(III) W	5	0,05	16,67	7,5	0,002
	As(III) B	5	0,1	29,03	3	0,005
	As(III) S	5	0,1	11,17	7,5	0,002
	As(III) W	5	0,1	16,16	7,5	0,002
	As(III) B	5	0,1	28,05	3	0,005
	As(III) S	5	0,1	12,63	7,5	0,002
	As(III) W	5	0,1	15,4	7,5	0,002
<i>Secale cereale</i> L.	K B	5	-	5,86	3765,6524	0,002
	K W	5	-	5,57	3515,913	0,002
	Eu B	5	1	5,23	3724,2336	0,002
	Eu W	5	1	5,94	38808,1491	0,002
	Eu B	5	10	6,02	3669,4158	0,002
	Eu W	5	10	5,2	36369,0488	0,002
	K B	7	-	5,72	3684,4454	0,002
	K S	7	-	5,15	3745,7301	0,002
Fortsetzung auf der nächsten Seite						

Tabelle A.1.: Verwendete Einwaagen, Verdünnungen und Volumen von Salpetersäure für den Säureaufschluss der Pflanzenteile; Verd.: Verdünnungsfaktor, K: Kontrollpflanze, B: Blatt, S: Stamm, W: Wurzel

Pflanze	Probe	t / d	c / mmol/L	m_{Probe} / mg	Verd.	$V(\text{HNO}_3)$ / L
	K W	7	-	5,64	3584,504	0,002
	K B	7	-	5,33	3584,836	0,002
	K S	7	-	5,33	3551,9022	0,002
	K W	7	-	5,58	3496,5378	0,002
	Eu B	7	1	5,65	3592,2711	0,002
	Eu S	7	1	5,21	3752,8249	0,002
	Eu W	7	1	5,74	38093,5468	0,002
	Eu B	7	1	5,5	3661,7729	0,002
	Eu S	7	1	5,47	3622,74	0,002
	Eu W	7	1	5,8	3751,1643	0,002
	Eu B	7	10	6,06	3593,9124	0,002
	Eu S	7	10	2,17	3827,6673	0,002
	Eu W	7	10	5,15	37378,6163	0,002
	Eu B	7	10	5,29	38165,3696	0,002
	Eu S	7	10	2,19	3996,748	0,002
	Eu W	7	10	3,79	37105,2182	0,002

Tabelle A.2.: m/z -Signale von HOAGLAND-Medium bis zu einer relativen Intensität von 15 % gemessen mit ESI-MS

m/z -Signal	Intensität / %	Summenformel Ion
119,96	100,0	$[\text{CaNO}_3 + \text{H}_2\text{O}]^+$
137,97	49,05	$[\text{CaNO}_3 + 2 \text{H}_2\text{O}]^+$
121,99	47,95	$[\text{MgNO}_3 + 2 \text{H}_2\text{O}]^+$
154,94	28,47	$[\text{CaH}_2\text{PO}_4 + \text{H}_2\text{O}]^+$
163,13	25,58	$[\text{C}_8\text{H}_{19}\text{O}_8]^+$ (Raumluft)
103,98	20,67	$[\text{MgNO}_3 + \text{H}_2\text{O}]^+$
101,95	15,66	$[\text{CaNO}_3]^+$

Tabelle A.3.: Optimale Parameter für die DESI-MS von Dimethylarsenat, Kaliumhydrogenarsenat und Natriumarsenit auf einer PROSOLIA-Glasplatte bei 4,5 kV Nadelspannung

Parameter	Optimum
Flussrate / $\mu\text{L}/\text{min}$	5
Druck / bar	11
Winkel (α) / $^\circ$	55
Abstand Sprühkapillare - Probe / mm	4
Abstand Sprühkapillare - Transferröhrchen / mm	10
Abstand Transferröhrchen - Probe / mm	1

Tabelle A.4.: Ergebnisse der ICP-OES-Messung von *Epipremnum aureum* L. vor Einberechnung der Verdünnung

Pflanzenteil	$t(\text{As-Zugabe}) / \text{d}$	$c_{\text{As}} / \mu\text{g}/\text{mL}$	$c_{\text{P}} / \mu\text{g}/\text{mL}$
Kontrolle Blatt	3	0,00526	0,311
Blatt	3	0,0235	3,51
Kontrolle Stamm	3	0,00862	2,33
Stamm	3	0,0194	0,321
Kontrolle Blatt	4	0,00993	1,42
Blatt	4	0,0238	1,46
Kontrolle Stamm	4	0,00567	0,557
Stamm	4	0,0211	0,502

Tabelle A.6.: Optimale Parameter für die DESI-MS von Europium auf einer PROSOLIA-Glasplatte bei 4,5 kV Nadelspannung

Parameter	Optimum
Flussrate / $\mu\text{L}/\text{min}$	5
Druck / bar	10
Winkel (α) / $^\circ$	55
Abstand Sprühkapillare - Probe / mm	5
Abstand Sprühkapillare - Transferröhrchen / mm	9
Abstand Transferröhrchen - Probe / mm	1

Tabelle A.5.: Messergebnisse der Gehalte von Arsen und Phosphor ohne Einbezug der Verdünnung und Einwaage in *Pisum sativum* L. gemessen mit ICP-OES; B: Blatt, S: Stamm, W: Wurzel

Lösung	Konzentration / μmol/L	Probe	c_{As} / μg/mL	c_{P} / μg/mL
Kontrolle	-	B	0,0619	8,03
Kontrolle	-	S	0,0655	1,10
Kontrolle	-	W	0,0501	2,28
DMA	50	B	0,189	5,67
DMA	50	S	0,0585	0,845
DMA	50	W	0,163	3,84
DMA	100	B	0,227	7,00
DMA	100	S	0,0596	1,14
DMA	100	W	0,120	4,47
As(V)	50	B	0,112	3,39
As(V)	50	S	0,0863	1,755
As(V)	50	W	0,469	5,09
As(V)	100	B	0,149	6,27
As(V)	100	S	0,138	2,86
As(V)	100	W	0,501	6,25
As(III)	50	B	0,122	5,81
As(III)	50	S	0,111	3,84
As(III)	50	W	0,586	3,04
As(III)	100	B	0,158	3,52
As(III)	100	S	0,240	3,71
As(III)	100	W	0,374	6,41

Tabelle A.7.: Messergebnisse der Gehalte von Europium in *Secale cereale* L. ohne Einbezug der Verdünnung und Einwaage gemessen mit ICP-MS; B: Blatt, S: Stamm, W: Wurzel

Lösung	$t(\text{Eu-Zugabe}) / \text{d}$	Konzentration / mmol/L	Probe	$c_{\text{Eu}} /$ ng/mL
Kontrolle	5	-	B	0,454
Kontrolle	5	-	W	0,00206
Eu	5	1	B	0,348
Eu	5	1	W	1,60
Eu	5	10	B	0,876
Eu	5	10	W	1,00
Kontrolle	7	-	B	0,252
Kontrolle	7	-	S	0,0754
Kontrolle	7	-	W	0,00650
Eu	7	1	B	0,0197
Eu	7	1	S	2,97
Eu	7	1	W	5,13
Eu	7	10	B	1,62
Eu	7	10	S	4,80
Eu	7	10	W	3,36

Abbildungen

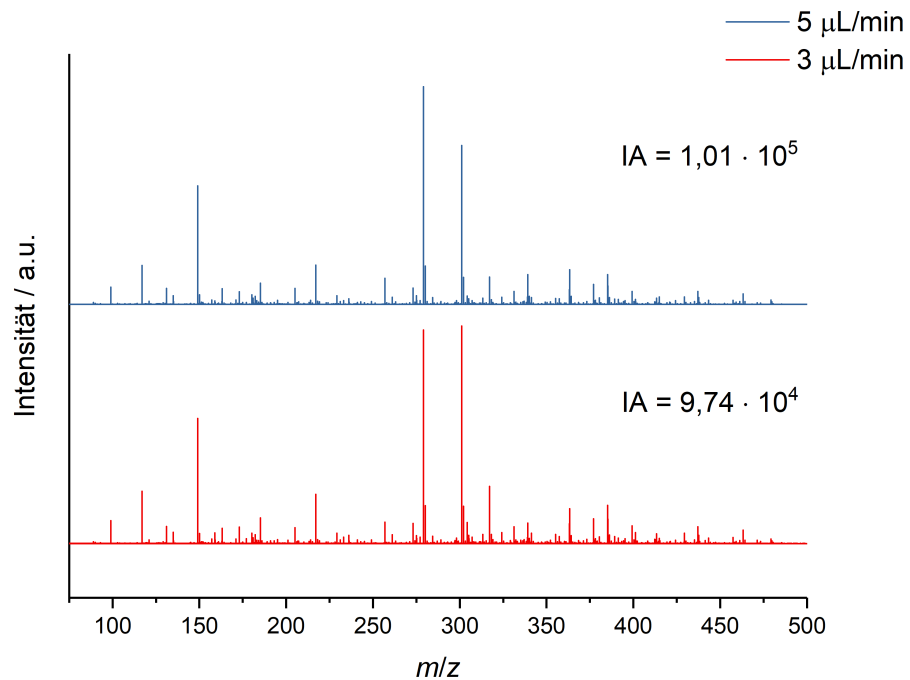


Abbildung A.1.: Vergleich von MS-Spektren und Ionenanzahl (IA) eines Methanol-Wasser-Gemisches (1:1-Verhältnis) auf einer PROSOLIA-Glasplatte mit einer Nadelspannung von 3 kV, einem Winkel $\alpha = 55^\circ$ und einem Druck von 8 bar bei verschiedenen Flussraten.

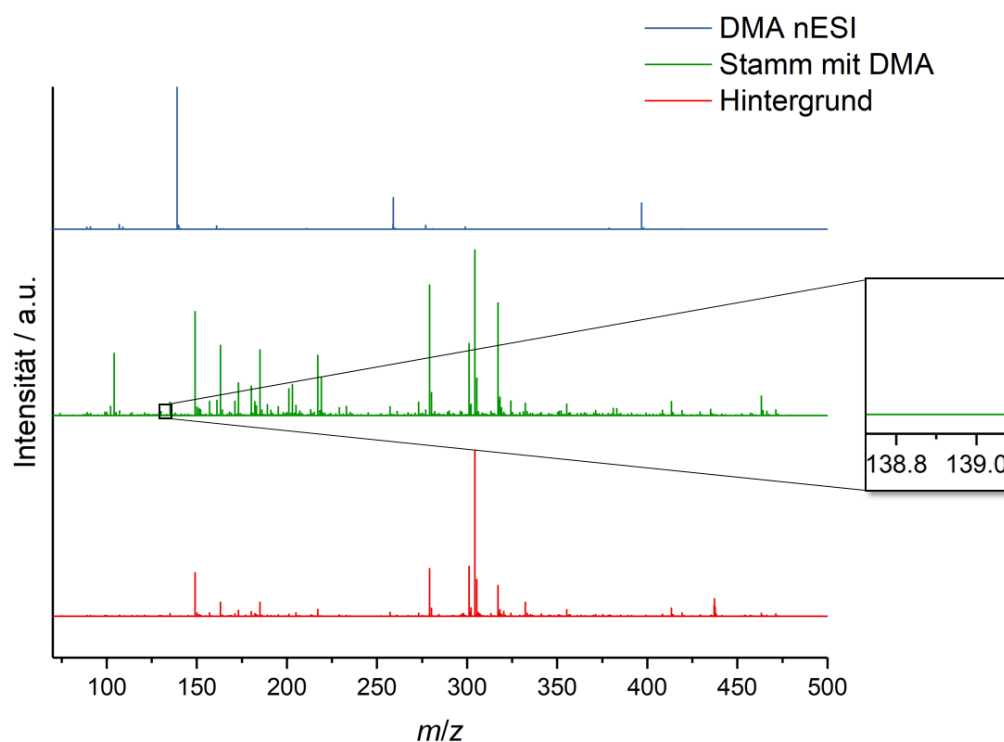


Abbildung A.2.: DESI-MS-Spektren der *Epipremnum aureum* L.-Stamm mit und ohne Zugabe von Arsen und Vergleich mit dem Hintergrund (Doppelseitiges Klebeband auf PROSOLIA-Glasplatte) und Dimethylarsenat.

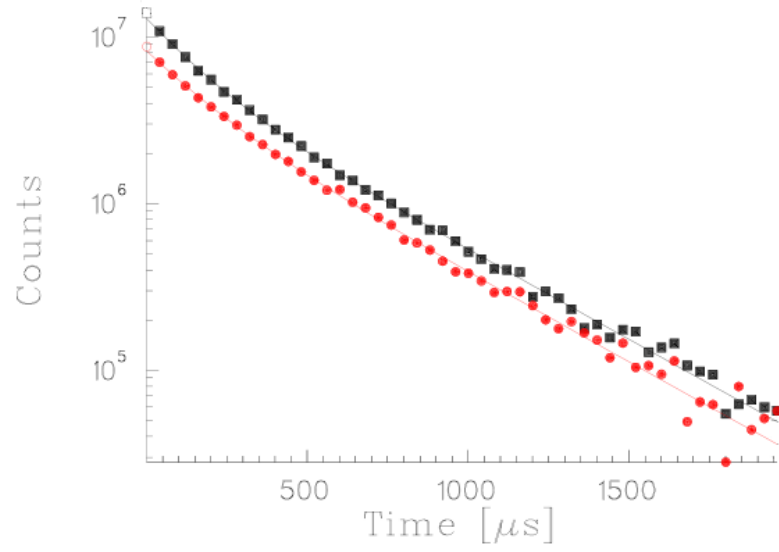


Abbildung A.3.: Biexponentielle Anpassungen von 7F_1 - (schwarz) und 7F_2 -Bande (rot) der Lebensdauermessungen von Eu-HOAGLAND-Medium vor dem Pflanzenversuch; Zahl der Akkumulationen 163 mit 50 Schritten, Gate Width 1 ms, Delay 1 μs , Delay Step 40 μs .

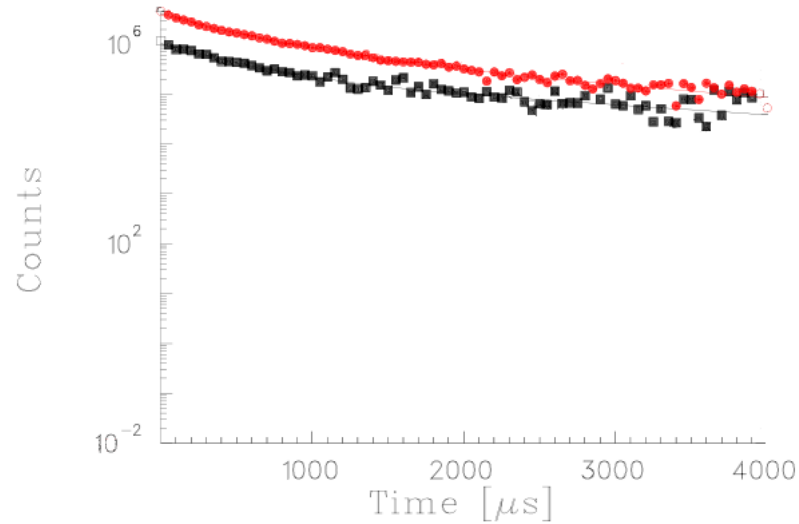


Abbildung A.4.: Biexponentielle Anpassungen von 7F_1 - (schwarz) und 7F_2 -Bande (rot) der Lebensdauermessungen von einem Wurzelquerschnitt der *Secale cereale* L. nach einer Inkubationszeit von Sieben Tagen in $c = 10$ mmol/L Eu-HOAGLAND; Zahl der Akkumulationen 163 mit 81 Schritten, Gate Width 10 ms, Delay 1 μs , Delay Step 50 μs .

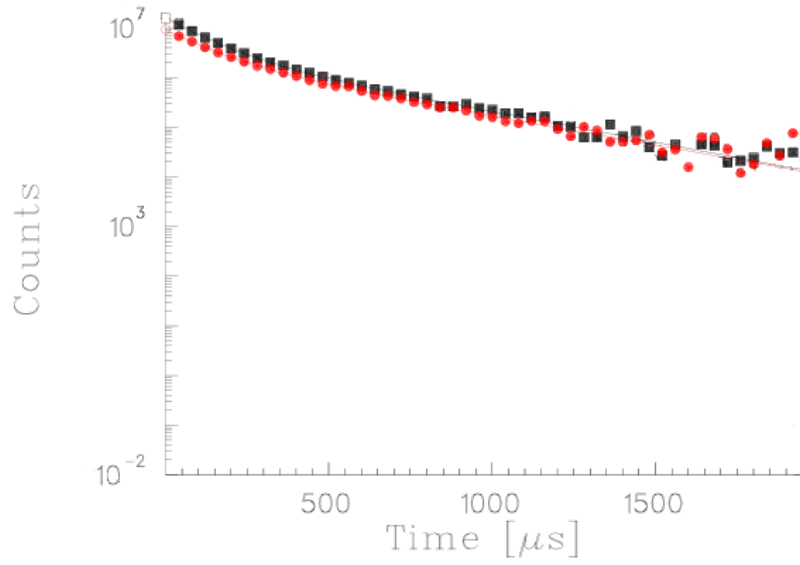


Abbildung A.5.: Biexponentielle Anpassungen von 7F_1 - (schwarz) und 7F_2 -Bande (rot) der Lebensdauer-messungen von Eu-HOAGLAND-Medium nach dem Pflanzenversuch; Zahl der Akkumulationen 163 mit 50 Schritten, Gate Width 1 ms, Delay 1 μ s, Delay Step 40 μ s.

B | Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst und keine anderen Hilfsmittel als angegeben verwendet habe. Die vorliegende Arbeit ist frei von Plagiaten. Alle Ausführungen, die wörtlich oder inhaltlich aus anderen Werken entnommen sind, habe ich als solche kenntlich gemacht.

Diese Arbeit wurde in gleicher oder ähnlicher Form noch bei keinem anderen Prüfer als Prüfungsleistung eingereicht und ist auch noch nicht veröffentlicht.

Hannover, 23. Oktober 2017

Julia Stadler