

Lebensmittelchemie

**Methode zur Rückstandsanalyse von
elf Organozinn-Verbindungen in
Fischen und Muscheln mit GC-AED**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften

im Fachbereich Chemie und Pharmazie

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von

Claudia Dyballa

aus Aurich

- 2002 -

Dekan:	Prof. Dr. J. Leker
Erster Gutachter:	Prof. Dr. H.-P. Thier
Zweiter Gutachter:	Prof. Dr. K. Eichner
Tag der mündlichen Prüfung:	28. Januar, 30. Januar und 05. Februar 2003
Tag der Promotion:	07. Februar 2003

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	VI
Abkürzungsverzeichnis	VIII
1 Einleitung	1
1.1 Organozinn-Verbindungen	1
1.2 Anwendungsgebiete.....	1
1.3 Eintrag in die Umwelt.....	2
1.4 Verhalten in der Umwelt.....	2
1.5 Toxizität.....	3
1.6 Rechtliche Regelungen	5
1.7 Analysenverfahren	7
1.7.1 Aufschluss und Extraktion	7
1.7.2 Derivatisierung und Extraktreinigung.....	8
1.7.3 Detektion	9
1.8 Zielsetzung.....	9
2 Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie/Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS) ...	11
2.1 Grundlagen.....	11
2.2 Berechnung von Massen-Fragmenten und Addukten verschiedener OZV	13
2.3 Untersuchte OZV	15
2.4 Optimierung von Geräteparametern	15
2.5 Ergebnisse.....	18
3 Gaschromatographie mit Atomemissionsdetektion	19
3.1 Derivatisierung.....	19
3.2 Gaschromatographie	20
3.3 Atomemissionsdetektion.....	22
3.4 Optimierung des AED	25
3.4.1 Temperaturen.....	26
3.4.2 Wasserstoff und Sauerstoff	27

3.4.3 Helium	28
3.5 Auswertung der Ergebnisse	28
4 Festphasen-Mikroextraktion (solid phase microextraction, SPME).....	31
4.1 Prinzip.....	31
4.2 Vorbereitung und Verwahrung der SPME-Faser.....	33
4.3 Optimierung von SPME-Parametern zur Bestimmung von OZV in wässriger Phase	34
4.3.1 Extraktionszeit.....	35
4.3.2 Temperatur	36
4.3.3 PH-Wert.....	36
4.4 Übertragung der optimierten Parameter auf die Bestimmung in Fischgewebe	37
5 Aufarbeitung von Fisch- und Muschelgewebe	38
5.1 Untersuchte OZV und Referenzmaterial	38
5.2 Komplexierung	38
5.3 Vorversuche	39
5.3.1 Aufarbeitung der OZV-Standardlösung	40
5.3.2 Aufarbeitung des Referenzmaterials CRM 477	41
5.4 Blindwerte.....	43
5.5 Untersuchung verschiedener Aufschlussverfahren.....	44
5.5.1 Übersicht über frühere Verfahren.....	44
5.5.2 Aufschluss mit Säure und Ultraschall	46
5.5.3 Alkalischer und enzymatischer Aufschluss.....	46
5.6 Desaktivierung von Florisil	48
5.7 Abtrennen störender Begleitstoffe	50
5.7.1 Überprüfung der Enzyme	50
5.7.2 Identifizierung der Begleitstoffe durch Gaschromatographie/Massenspektrometrie...	51
5.7.3 Abtrennen von Fettsäuren und Fettbegleitstoffen	53
5.8 Untersuchungen zur Wiederfindung der Phenylzinn-Verbindungen.....	56
5.8.1 Überprüfung der Pufferlösung alleine	56
5.8.2 Überprüfung der Pufferlösung während der enzymatischen Hydrolyse	57
5.8.3 Identifizierung zusätzlicher Signale auf der Zinn-Linie 271 nm durch GC-MS.....	58
5.8.4 Überprüfung der Hydrolysezeit und Temperatur	61
5.9 Zusammenfassung und Bewertung der Ergebnisse	62
5.9.1 Enzymatische Hydrolyse	62

5.9.2 Extraktion der OZV und Reinigung des Extraktes durch SC.....	63
5.9.3 Wiederfindung der Phenylzinn-Verbindungen	63
5.9.4 Blindwerte	64
5.10 Endgültige Arbeitsweise	64
6 Statistische Beurteilung des Analysenverfahrens	66
6.1 Linearität des Analysenverfahrens.....	66
6.2 Wiederholpräzision und Wiederfindungsrate	68
6.3 Nachweis- und Bestimmungsgrenze.....	69
6.4 Richtigkeit.....	70
7 Untersuchung von Fischen, Schalen- und Weichtieren.....	71
8 Zusammenfassung.....	73
9 Experimenteller Teil	76
9.1 Häufig verwendete Chemikalien, Lösungsmittel und Geräte.....	76
9.2 Untersuchungsmaterial	78
9.3 OZV 79	
9.3.1 Standardsubstanzen	79
9.3.2 Herstellung der Vergleichslösungen	79
9.3.3 Kalibrierung.....	80
9.3.3.1 Standardlösungen zur Kalibrierung.....	80
9.3.3.2 Kalibrierlösungen	81
9.4 Versuche zur HPLC mit Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS)	81
9.5 Gaschromatographie mit dem Atomemissionsdetektor (GC-AED)	83
9.6 Gaschromatographie mit Massenspektrometrie.....	88
9.7 Versuche zur Festphasen-Mikroextraktion (solid phase microextraction, SPME).....	89
9.7.1 Konditionierung der SPME-Faser und Faser-Blindwert.....	89
9.7.2 Anreicherung mit der SPME-Faser	90
9.8 Aufarbeitung von Fisch- und Muschelgewebe	91
9.8.1 Probenvorbereitung	91
9.8.2 Arbeitsweise	91
Literaturverzeichnis	93

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Mögliche Quellen für den Eintrag von OZV in die Umwelt.....	2
Abb. 2:	Schematische Darstellung der ESI-Quelle des Gerätes Quattro II	12
Abb. 3:	Schematische Darstellung der APCI-Quelle des Gerätes Quattro II.....	13
Abb. 4:	Isotopencluster von Zinn und vom Tributylzinn-Kation	14
Abb. 5:	Mutterionen-Spektrum von Bu_3SnCl , gelöst in Methanol/Wasser (1 + 1, v/v) mit 0,1 % Ameisensäure, nach Optimierung von m/z 291,06 mit 30 V Spannung des Eintrittskonus in ESI positiv	17
Abb. 6:	Tochterionen-Spektrum von m/z 291,06 in Methanol/Wasser (1 + 1, v/v) mit 0,1 % Ameisensäure nach Optimierung von m/z 234,96 mit 30 V Spannung des Eintrittskonus und 9 V Stoßenergie für das Kollisionsgas in ESI positiv	17
Abb. 7:	GC-AED-Chromatogramm einer Standardlösung von OZV nach Derivatisierung mit Natriumtetraethylborat	21
Abb. 8:	Lichtweg durch das Spektrometer	22
Abb. 9:	Schema des Hohlraumresonators nach Beenakker	23
Abb. 10:	Umkehr des Gasflusses (solvent venting).....	24
Abb. 11:	Solvent venting ausgeschaltet.....	25
Abb. 12:	Peakflächen für Pe_4Sn bei verschiedenen Flussraten für das Spülgas Helium.....	28
Abb. 13:	Beispiel einer Kalibrierfunktion für Ph_3SnEt	30
Abb. 14:	Faserhalter mit SPME-Faser zur manuellen Injektion, Ausschnitt aus dem unteren Teil des Faserhalters mit darin befestigter SPME-Faser, Aufbau der SPME-Faser, Faser ausgefahren.....	32
Abb. 15:	Gaschromatogramme bei Reinigung des Referenzmaterials mit Cyclohexan/Ethylacetat (1 + 1) an Kieselgel 60 und Florisil, darunter jeweils ein vergrößerter Ausschnitt von 20 – 25 min und dem Messbereich von nur 0 – 90 Flächeneinheiten.....	42
Abb. 16:	GC-MS-Chromatogramm der nach Abschnitt 5.6 aufgearbeiteten Analysenlösung aus Aalfilet im Scan-Modus	52
Abb. 17:	GC-MS-Spektrum von 12,98 bis 13,30 min aus dem Chromatogramm in Abbildung 16 und Vergleichsspektrum von Palmitinsäure mit 97 % Übereinstimmung aus der Spektrenbibliothek	52
Abb. 18:	Ausschnitt aus dem GC-AED-Chromatogramm der Analysenlösung aus Aalfilet; Extraktion und Elution der OZV-Derivate mit Cyclohexan/Ethylacetat (1 + 1).....	54
Abb. 19:	GC-AED-Chromatogramm der Analysenlösung aus Aalfilet nach Extraktion aus der wässrigen Phase mit Cyclohexan und Elution der Florisilsäule (0 % Wasser) mit Cyclohexan/Toluol (1 + 1)	55
Abb. 20:	GC-MS-Chromatogramm (full-scan) der Analysenlösung aus Aalfilet, aufgearbeitet nach Abschnitt 5.8.2 in Phosphat-Pufferlösung (B).	59

Abb. 21:	GC-MS-Spektrum von Bu_2SnEt_2	59
Abb. 22:	GC-MS-Spektrum von BuPhSnEt_2 nach Subtraktion von Bu_4Sn	60
Abb. 23:	Optimiertes Analysenverfahren zur Bestimmung von OZV in Fischen und Muscheln.....	65
Abb. 24:	Beispiel des Zusammenhangs zwischen Signal und Konzentration bei Dotierung von Forellenfilet mit 3 - 400 $\mu\text{g}/\text{kg}$ Sn für Ph_3SnEt	67

Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Größte toxische Wirkung einiger Trialkylzinn- und Triarylzinn-Verbindungen auf Organismen	3
Tab. 2:	Akute LD ₅₀ -Werte für einige OZV bei oraler Verabreichung an Ratten.....	4
Tab. 3:	Natürliche Verteilung der zehn Zinn-Isotope	13
Tab. 4:	Relative Peakflächen von vier Tetraalkyl-OZV bei Cavity-Temperaturen zwischen 240 °C und 360 °C (oben) und zwischen 310 °C und 340 °C (unten).....	26
Tab. 5:	Peakflächen für Pe ₄ Sn bei verschiedenen Vordrucken für Wasserstoff und Sauerstoff.....	27
Tab. 6:	Zunahme der relativen Peakflächen (%) der OZV mit zunehmender Extraktionsdauer	35
Tab. 7:	Zunahme der relativen Peakflächen (%) der OZV mit steigender Temperatur.....	36
Tab. 8:	Zunahme der relativen Peakflächen (%) der OZV mit steigendem pH-Wert.....	37
Tab. 9:	Prozentuale Wiederfindung der OZV bei der Aufarbeitung der Standardlösung mit n-Hexan oder Cyclohexan/Ethylacetat (1 + 1) und mit Florisil oder Kieselgel 60	40
Tab. 10:	Blindwerte (ng Sn) von Glasgeräten, des Acetat-Puffers mit entionisiertem Wasser, von Leitungswasser und des Acetat-Puffers mit Leitungswasser.....	44
Tab. 11:	Wiederfindungsrate (WFR) und Variationskoeffizient (VK), beide in %, für BuSn ³⁺ , Bu ₂ Sn ²⁺ und Bu ₃ Sn ⁺ bei der Hydrolyse mit Lipase/Protease bzw. TEAH im Referenzmaterial CRM 477 sowie Variationskoeffizient für nicht zertifizierte Phenylzinn-Verbindungen	47
Tab. 12:	Prozentuale Wiederfindung der OZV bei der SC an Florisil ohne Wasserzusatz, mit 1 % Wasser und mit 3 % Wasser und ohne Wasserzusatz mit zusätzlicher Komplexierung	49
Tab. 13:	Lösungsmittel und Lösungsmittelgemische zur Extraktion und zur Elution von 3 g Florisil (0 % Wasser) bei der Aufarbeitung von Aalfilet nach enzymatischer Hydrolyse sowie gefundene Gehalte an OZV und störenden Begleitstoffen.....	53
Tab. 14:	Prozentuale Wiederfindung der Phenylzinn-Verbindungen beim Ausschütteln aus wässriger Lösung mit Cyclohexan	56
Tab. 15:	Prozentuale Wiederfindung der Phenylzinn-Verbindungen nach enzymatischer Hydrolyse ohne Substrat, von Aal und von Forelle; Extraktion mit Cyclohexan und Elution von Florisil mit Cyclohexan/Toluol (1 + 1).....	57
Tab. 16:	Prozentuale Wiederfindung der Phenylzinn-Verbindungen aus einer Standardlösung nach Inkubieren mit Enzymen in einer Ammoniumdihydrogenphosphat-Lösung während 1 – 16 h bei 37 °C und Ausschütteln mit Cyclohexan.....	61
Tab. 17:	Prozentuale Wiederfindung einzelner Phenylzinn-Verbindungen aus einer Standardlösung nach Inkubieren mit Enzymen in einer Ammoniumdihydrogenphosphat-Lösung während 1 und 4 h bei 37 °C und Ausschütteln mit Cyclohexan	62

Tab. 18:	Korrelationskoeffizienten und Regressionsgleichung bei neunfacher Dotierung von Forellenfilet (3 - 400 µg/kg Sn) und aus der entsprechenden Kalibrierung.....	67
Tab. 19:	Geringste und höchste Konzentration der Dotierung von Forellenfilet mit elf OZV, gefundene Gehalte, relative Wiederholstandardabweichung und Wiederfindungsrate bei achtfacher Aufarbeitung.....	68
Tab. 20:	Nachweisgrenzen (NG) und Bestimmungsgrenzen (BG), berechnet aus dem Verhältnis des Rauschens (0,21 Einheiten) und der Peakhöhe für etwa 3 µg/kg Sn einer OZV im Forellenfilet.....	69
Tab. 21:	Überprüfung der Richtigkeit durch Aufarbeitung des zertifizierten Referenzmaterials CRM 477.....	70
Tab. 22:	Butylzinn-Verbindungen in Fischen und Bu_3Sn^+ in Muscheln verschiedener Jahre; Angabe jeweils in µg/kg Frischgewicht.....	71
Tab. 23:	Rückstände an elf OZV im Gewebe von Seefischen, Süßwasserfischen und Schalentieren, in µg/kg Frischgewicht (berechnet als Sn und als Kation).....	72
Tab. 24:	Beispiele für die relativen Konzentrationen y_K der OZV in den acht Kalibrierlösungen, bezogen auf 0,5 µg/ml Sn der inneren Standards HeSn^{3+} , $\text{He}_2\text{Sn}^{2+}$ bzw. Pr_3Sn^+ mit zugehöriger Gleichung und Korrelationskoeffizient.....	86

Abkürzungsverzeichnis

AAS	Atomabsorptionsspektrometrie
AED	Atomemissionsdetektor
APCI	atmospheric pressure chemical ionization
API	atmospheric pressure ionization
ASE	accelerated solvent extraction
BG	Bestimmungsgrenze
BgVV	Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin
CI	chemische Ionisation
DEA-DDC	Diethylammonium-diethyldithiocarbamat
DDC	Diethyldithiocarbamat
EG	Europäische Gemeinschaft
ESI	electrospray ionization
GC	Gaschromatographie
GC-AED	Gaschromatographie mit Atomemissionsdetektor
GC-MS	Gaschromatographie mit Massenspektrometrie
GC-QFAAS	gas chromatography- quartz furnace atomic absorption spectrometry
HPLC	Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie
ICP-AES	induktiv gekoppeltes Plasma mit Atomemissionspektrometrie
ICP-MS	induktiv gekoppeltes Plasma mit Massenspektrometrie
i.D.	innerer Durchmesser
kV	Kilo-Volt
LC	Flüssigkeitschromatographie
LC-MS	Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie mit Massenspektrometrie
LC-MS/MS	Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie mit Tandem-Massenspektrometrie
MAK	maximale Arbeitsplatz-Konzentration
min ⁻¹	Schwingungen oder Umdrehungen pro Minute
MS	Massenspektrometrie
MSD	massenselektiver Detektor
NG	Nachweisgrenze
PDA	Photodiodenarray-Detektor
PDMS	Polydimethylsiloxan
OZV	Organozinn-Verbindungen
PVC	Polyvinylchlorid

RL	Richtlinie
SC	Säulenchromatographie
SFE	supercritical fluid extraction
SML	specific migration limit in foods or in food simulant
SPME	solid phase microextraction
TDI	tolerable daily intake
TEAH	Tetraethylammoniumhydroxid
THF	Tetrahydrofuran
TMAH	Tetramethylammoniumhydroxid
V	Volt
VK	Variationskoeffizient
WF	Wiederfindung
WFR	Wiederfindungsrate

1 Einleitung

1.1 Organozinn-Verbindungen

Organozinn-Verbindungen (OZV) sind Stoffe mit einer oder mehreren Zinn-Kohlenstoff-Bindungen, die sich fast ausschließlich vom vierwertigen Zinn ableiten [1]. Sie haben die allgemeine Formel $\mathbf{R}_{(4-n)} \mathbf{Sn} \mathbf{X}_{(n)}$ ($n = 0 - 3$) und werden in die vier Klassen $\mathbf{R}_4\mathbf{Sn}$, $\mathbf{R}_3\mathbf{SnX}$, $\mathbf{R}_2\mathbf{SnX}_2$ und \mathbf{RSnX}_3 unterteilt. R steht für einen kovalent gebundenen Aryl- oder Alkyl-Rest und X für eine anionische Gruppe (z.B. -Cl, -Br, -I, -OH, -OR', -SH, -SR', -OOCR', -OSnR₃, -NR₂') [2].

1.2 Anwendungsgebiete

OZV werden weltweit in zahlreichen Industriezweigen eingesetzt, am häufigsten bei der Herstellung von Kunststoffen. Etwa 70 % der Gesamtproduktion an OZV, hauptsächlich mono- und di-substituierte Verbindungen, dienen als Stabilisatoren für hartes und mittelhartes PVC, dem 0,5 bis 2,0 % OZV zugesetzt werden [3]. Beispiele sind Dibutylzinn-Verbindungen sowie Dioctylzinn-Verbindungen in Gegenständen aus PVC, die für den Kontakt mit Lebensmitteln vorgesehen sind [4].

Das zweite größte Einsatzgebiet, das etwa 30 % der Gesamtproduktion ausmacht, beruht auf der bioziden Wirkung von OZV. Hier werden in der Regel Triorganozinn-Verbindungen verwendet, die schon in geringen Konzentrationen wirksam sind und deshalb die stärksten Auswirkungen auf die Umwelt haben [2, 4]. Vor allem Tributylzinn-Derivate werden z.B. in ein- bis dreiprozentiger Lösung als fungizide und insektizide Holzschutzmittel verwendet [4] oder werden Schiffsanstrichfarben als Antifouling-Mittel gegen den Bewuchs der Schiffsrümpfe mit Algen, Seepocken und Muscheln zugesetzt [3]. Außerdem werden die fungiziden und akariziden Eigenschaften einiger Triphenylzinn- und Tricyclohexylzinn-Derivate in der Landwirtschaft genutzt [3, 4]. Tetraorganozinn-Verbindungen besitzen dagegen nur wenig biologische Aktivität und dienen hauptsächlich zur Herstellung anderer OZV.

Eine nur untergeordnete Rolle spielen die OZV als Katalysatoren, in einer Konzentration von 0,02 % z.B. zur Produktion von Polyurethanschaum [4] oder für Veresterungsreaktionen [5], außerdem zur Vernetzung von Silikonen [4], zur Herstellung von transparenten, kratzfesten Überzügen aus SnO₂ auf Glas [5], als Desinfektionsmittel und als Wurmbehandlungsmittel (Anthelminthikum) für Geflügel [4]. Zusätzlich können sie als wasserabweisende Beschichtungen für Baustoffe (Gips, Ziegelsteine, Beton) und Material aus Zellulose (Baumwolle, Papier, Holz) [4] sowie als Flammschutzmittel für Gewebe aus Wolle [5] zum Einsatz kommen.

1.3 Eintrag in die Umwelt

Fast alle in der Umwelt nachweisbaren OZV sind anthropogenen Ursprungs [3]. Die einzige Ausnahme sind Methylzinn-Verbindungen, die durch Methylierung von Zinn-Ionen durch Bakterien entstehen können. **Abbildung 1** gibt einen Überblick, auf welchen Wegen OZV als Verunreinigungen in die Umwelt gelangen.

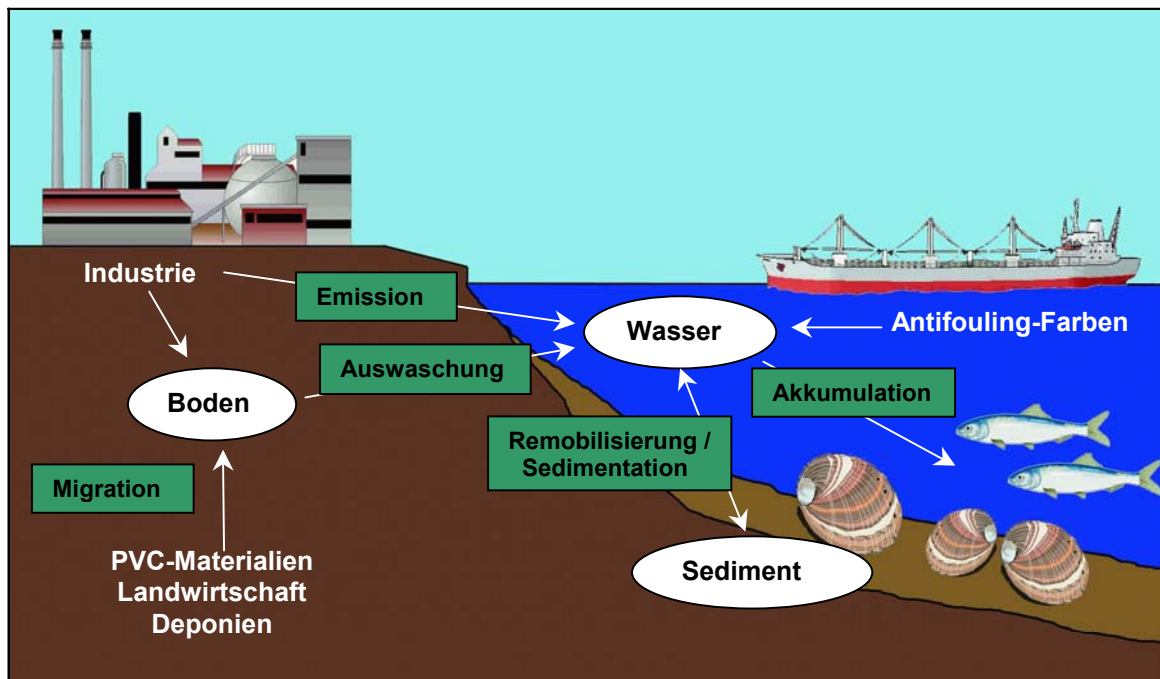


Abb. 1: Mögliche Quellen für den Eintrag von OZV in die Umwelt

Die stärkste Belastung entsteht durch die Einleitung OZV-haltiger Abwässer aus der PVC-Herstellung in die Flüsse und durch die Verwendung als Fungizide in der Landwirtschaft und in Antifouling-Farben für Schiffe, denn dabei gelangen die OZV direkt in aquatische Lebensräume. Zusätzlich verbleiben durch die Anwendung in der Landwirtschaft Rückstände auf den behandelten Pflanzen; beim Ausbringen können bewirtschaftete Böden und nahe gelegene Gewässer kontaminiert oder die OZV ins Grundwasser ausgewaschen werden [3, 4]. Eine weitere Quelle ist die Zersetzung von Kunststoffen auf Mülldeponien.

Bei der Beseitigung von Müll in Verbrennungsanlagen entsteht dagegen aus OZV größtenteils anorganisches Zinn, so dass die Umweltbelastung nur gering ist. Auch die Migration von OZV aus PVC ist zu vernachlässigen. Das gleiche gilt für den Eintrag aus der Anwendung als Holzschutzmittel oder als Katalysator u.ä. in technischen Prozessen [4].

1.4 Verhalten in der Umwelt

In der Umwelt werden OZV in vielfältiger Weise um- und abgebaut. So kann eine der organischen Gruppen in R_4Sn bereits bei 0 °C gegen eine anorganische ausgetauscht werden, z.B. nach der

Gleichung: $R_4Sn + SnX_4 \rightleftharpoons R_3SnX + RSnX_3$ [6]. Zum Austausch weiterer Gruppen sind höhere Temperaturen notwendig [6]. Der Abbau kann durch Licht und höhere Temperatur oder durch Mikroorganismen induziert werden und hängt von Klimazone, Jahreszeit und anderen Umweltbedingungen ab. Dabei werden die Alkyl- und Arylgruppen schrittweise bis hin zu anorganischen Zinn-Salzen abgespalten und zwar in der Reihenfolge $R_4Sn \rightarrow R_3SnX \rightarrow R_2SnX_2 \rightarrow RSnX_3 \rightarrow SnX_4$ [4]; aromatische Gruppen reagieren rascher als aliphatische [6].

UV-Licht führt meist zu einem sehr schnellen Abbau, bei dem Butyl-Verbindungen langsamer reagieren als Phenyl- oder Cyclohexyl-Zinnverbindungen [6]. In Gegenwart von Sauerstoff verläuft der Abbau wesentlich schneller als unter anaeroben Bedingungen [4, 7], ebenso bei höheren Temperaturen [7]. Im günstigsten Fall beträgt z.B. die Halbwertszeit von Tributylzinn (Bu_3Sn^+) nur 1 bis 3 Wochen, unter anaeroben Bedingungen und ohne Licht dagegen 7 Jahre [7]. Viele OZV haben nur einen geringen Dampfdruck und sind deshalb aus Gewässern schwer flüchtig, so dass man mit keiner nennenswerten Belastung der Luft rechnen muss [4, 7].

Mono-, di- und trisubstituierte, aber nicht tetrasubstituierte OZV bilden sehr leicht Komplexe mit Elektronendonatoren wie z.B. Phenol-, Carboxyl- [8], Hydroxyl- und Silanol-Gruppen, die in Lebensmitteln, Sedimenten, Glas und Zellulose vorhanden sind [6]. Ihre Stabilität nimmt in der Reihenfolge Mono- > Di- > Triorganozinn ab [6]. Aus diesem Grund und wegen des langsameren Abbaus unter anaeroben Bedingungen wirken Sedimente und Schlämme als Speicher, aus denen die OZV remobilisiert werden können und dann auch in aquatische Organismen und in die Nahrungskette gelangen.

1.5 Toxizität

Die Toxizität einer OZV hängt im wesentlichen von der Art und Anzahl der an Zinn gebundenen organischen Gruppen ab. Die stärksten Auswirkungen auf Lebewesen haben trisubstituierte OZV (R_3SnX) [2]; dabei bestimmt die Art des organischen Restes, welcher Organismus am meisten betroffen ist. Einige Beispiele sind in **Tabelle 1** aufgeführt.

Tab. 1: Größte toxische Wirkung einiger Trialkylzinn- und Triarylzinn-Verbindungen auf Organismen [4]

Tri-	Organismen
Methylzinn	Insekten
Ethylzinn	Säugetiere
n-Propylzinn	gram-negative Bakterien
n-Butylzinn	gram-positive Bakterien, Weichtiere, Pilze, Fische
Phenylzinn	Weichtiere, Pilze, Fische
Cyclohexylzinn	Milben

Trisubstituierte OZV mit linearen Alkylresten wirken stark phytotoxisch und kommen daher nicht für Anwendungen in der Landwirtschaft in Frage [2]. Im allgemeinen nimmt die akute Toxizität ab, wenn der Alkylrest länger wird. Die Trimethylzinn- und Triethylzinn-Verbindungen sind also am toxischsten für Säugetiere; Trioctylzinn-Verbindungen sind dagegen nicht mehr toxisch [2, 3]. Kurzkettige trisubstituierte OZV werden deshalb nicht kommerziell genutzt [3]. Im Vergleich dazu sind mono- und disubstituierte OZV weniger akut toxisch für Säugetiere; auch hier spielt die Länge der Alkylkette eine wichtige Rolle [2, 4].

Tetrasubstituierte OZV sind schließlich kaum noch akut toxisch. Erst nach einer langen Expositionszeit entwickeln sich langsam Symptome, die ähnlich sind wie bei einer Vergiftung mit trisubstituierten OZV; bis zum Tod der Versuchstiere dauert es ebenfalls sehr lange. Experimentell wurde bestätigt, dass die tetrasubstituierten OZV im Organismus der Versuchstiere zu den giftigeren trisubstituierten abgebaut werden, und zwar mit zunehmender Kettenlänge langsamer [4].

Tab. 2: Akute LD₅₀-Werte für einige OZV bei oraler Verabreichung an Ratten [2, 4]

Typ	Name	Formel	LD ₅₀ (mg/kg Körpergewicht)
Monosubstituiert	Methylzintrichlorid	MeSnCl ₃	575-1370
	Butylzintrichlorid	BuSnCl ₃	2200
	Octylzintrichlorid	OcSnCl ₃	2400-3800
Disubstituiert	Dibutylzinndiacetat	Bu ₂ Sn(OAc) ₂	109,7 ^a
	Dibutylzinndilaurat	Bu ₂ Sn(Lau) ₂	175-1600
Trisubstituiert	Trimethylzinnacetat	Me ₃ SnOAc	9,1
	Triethylzinnacetat	Et ₃ SnOAc	4
	Tripropylzinnacetat	Pr ₃ SnOAc	118,3
	Tributylzinnacetat	Bu ₃ SnOAc	125-380,2
	Triphenylzinnacetat	Ph ₃ SnOAc	125-491
	Triphenylzinnchlorid	Ph ₃ SnCl	118-135
	Triphenylzinnhydroxid	Ph ₃ SnOH	108-360
	Tricyclohexylzinnhydroxid	Hex ₃ SnOH	235-540
Tetrasubstituiert	Tetrabutylzinn	Bu ₄ Sn	> 4000
	Tetraoctylzinn	Oc ₄ Sn	50000

^a Versuchstier Maus

Trisubstituierte OZV werden beim Säuger auch weiter zu den entsprechenden di- und mono-substituierten OZV abgebaut [9]. Trotzdem führte Bistributylzinnoxid ($\text{Bu}_3\text{Sn-O-SnBu}_3$) an Ratten zu Störungen der Leberfunktion, des Blutbildes sowie des Hormon- und Immunsystems. Schon 0,07 – 1,8 mg/l Tributylzinn-chlorid (Bu_3SnCl) induziert den Zelltod (Apoptose) in menschlichen Zellen des Immunsystems (Thymozyten) [9, 10, 11]. Ein kanzerogenes und teratogenes Potential war nicht nachweisbar [2, 4].

OZV sind besonders toxisch für Organismen aus dem aquatischen Lebensraum, also Bakterien, Protozoen, Algen, Wirbellose und Fische [4, 7]. Eier und Kaulquappen von Fröschen und Larven von Fischen sind besonders empfindlich [7]. Weibliche Schnecken werden durch gehemmte Östrogen- und erhöhte Testosteronproduktion vermännlicht (Imposex-Phänomen); die Population wird steril und stirbt aus [9, 12]. Muscheln akkumulieren beträchtliche Mengen an OZV [9], die zu Schalendeformationen und Wachstumshemmung führen [4, 7, 12]. Aber auch andere Weichtiere oder Fische können OZV anreichern [4], die dann vom Menschen als letztem Glied der Nahrungskette verzehrt werden.

Die orale Aufnahme einer hohen OZV-Dosis führt beim Menschen zu neuralen und renalen Schäden [9]; die Symptome dabei sind Erbrechen, Kopfschmerzen, Sehstörungen und Verwirrtheit. Bei der Inhalation von OZV treten Atembeschwerden und bei kurzzeitiger Berührung Hautreizungen auf. Todesfälle sind nur vereinzelt beschrieben [2, 4]. Eine akute Vergiftung ist jedoch selten und geht meist auf einen Unfall oder auf eine Exposition am Arbeitsplatz ohne geeignete Schutzmaßnahmen zurück. Der allgemeine MAK-Wert für OZV ist $0,1 \text{ mg/m}^3 \text{ Sn}$ [1]. Die duldbare tägliche Aufnahme (tolerable daily intake, TDI-Wert) für den Menschen beträgt $0,25 \text{ } \mu\text{g/kg}$ Körpergewicht (bezogen auf Bu_3Sn^+); der Wert basiert auf Kurz- und Langzeitstudien an Tieren mit Tributylzinn-Verbindungen ($\text{Bu}_3\text{Sn-O-SnBu}_3$, Bu_3SnCl) und enthält einen Sicherheitsfaktor von 100 [9, 12]. Ein Erwachsener (70 kg Körpergewicht) dürfte danach täglich $18 \text{ } \mu\text{g}$ Bu_3Sn^+ verzehren, die z.B. 200 g Fisch mit der sehr hohen Belastung von $100 \text{ } \mu\text{g/kg}$ entsprechen. Diese Berechnung macht deutlich, dass durchschnittlich kontaminierte Lebensmittel zu keiner signifikanten Belastung führen [9]. In vitro-Studien mit menschlichem Gewebe haben zwar schon bei sehr geringen Mengen eine hormonelle Wirkung nachgewiesen [12], doch ist dies in vivo noch nicht ausreichend belegt ist [9]. Die Berechnung berücksichtigt auch nicht die mögliche Aufnahme anderer OZV, z.B. aus Bedarfsgegenständen aus PVC [9].

1.6 Rechtliche Regelungen

Frankreich hat bereits 1982 die Anwendung von OZV in Antifouling-Anstrichen für Schiffe verboten, nachdem erstmals die Auswirkungen von Bu_3Sn^+ auf Muscheln an der französischen Küste

nachgewiesen worden waren. England, Kanada, die USA, Japan und andere Länder folgten rasch diesem Beispiel [13]. Inzwischen fordert sogar die internationale Seeschiffahrtsorganisation (IMO), die Verwendung von OZV in Antifouling-Anstrichen bis zum Beginn 2003 weltweit einzustellen [14].

Die Verwendung von OZV ist in der EG und damit auch in Deutschland Gegenstand zahlreicher Rechtsvorschriften. Die **Richtlinie 75/769/EWG** vom 27. Juli 1976, die die Verwendung, das Inverkehrbringen und die Kennzeichnung gefährlicher Stoffe und Zubereitungen regelt, gilt inzwischen auch für die OZV (**RL 89/677/EWG** vom 21.12.1989 und **RL 1999/51/EWG** vom 26.05.1999). OZV dürfen danach als Bestandteile von Antifouling-Farben nur in den Verkehr kommen, wenn sie so gebunden sind, dass sie langsamer freigesetzt werden. Verboten sind die OZV für Zubereitungen, die den Bewuchs durch Mikroorganismen, Pflanzen oder Tiere z.B. an Booten der Binnenschiffahrt oder an Anlagen für die Fisch- und Muschelzucht verhindern. Die EG-Bestimmungen wurden in der **Gefahrstoff-Verordnung** [15] und der **Chemikalienverbots-Verordnung** [16] in deutsches Recht umgesetzt.

Die **Rückstands-Höchstmengenverordnung** [17] enthält Höchstmengen, die in oder auf Lebensmitteln nicht überschritten werden dürfen. Genannt sind Gehalte von 0,02 – 4 mg/kg für Triphenylzinn- und Tricyclohexylzinn-Verbindungen und für Fenbutatinoxid. Sie sind größtenteils aus den **Richtlinien 96/32/EWG** und **2000/42/EWG** für Obst und Gemüse und aus der **Richtlinie 96/33/EWG** für Lebensmittel tierischen Ursprungs übernommen.

Die **Empfehlungen der Kunststoffkommission** des Bundesinstituts für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (BgVV) stellen Reinheitsanforderungen an OZV-Stabilisatoren in Bedarfsgegenständen für Lebensmittel und geben Hinweise für ihre Verwendung und Einsatzmengen [18]. Die Empfehlungen sind zwar keine Rechtsnormen, gewährleisten aber nach dem aktuellen Kenntnisstand, dass ein Bedarfsgegenstand den Anforderungen des Lebensmittel- und Bedarfsgegenständegesetzes entspricht. Danach sind OZV in weichmacherhaltigen Kunststoffen nicht zulässig (Empfehlung I), wohl aber in weichmacherfreiem PVC (Empfehlung II) und Silikonen (Empfehlung XV). Aus Lebensmittelverpackungen aus Hart-PVC dürfen allerdings höchstens 5 µg pro dm² Sn in wässrige Lebensmittel und höchstens 10 µg pro dm² Sn in Fette migrieren [18]. Das **Synoptic Document** der EG enthält in einer Liste zulässiger Additive und Monomere für Bedarfsgegenstände mit Lebensmittel-Kontakt auch die OZV. Dort sind SML-Werte (specific migration limit in foods or in food simulant) angegeben, die toxikologisch begründet sind und in der Regel höher liegen als in den Empfehlungen der Kunststoffkommission. Außerdem sind TDI-Werte angegeben, für Dioctylzinn-Derivate z.B. ein TDI-Wert von 0,6 µg Sn pro kg Körpergewicht [19].

1.7 Analysenverfahren

In den letzten Jahren sind zahlreiche Methoden erarbeitet worden, um die OZV in den unterschiedlichsten Substraten zu bestimmen. Untersucht wurden Sedimente, Wasser und Klärschlamm, aber auch tierische Gewebe wie Fisch- und Muschelfleisch, Rattenleber oder Blut und Urin. Alle Methoden bestehen aus dem Aufschluss und der Extraktion der OZV, aus der Bildung flüchtiger Derivate und deren Reinigung und schließlich aus der quantitativen Bestimmung nach einer gas- oder flüssigkeitschromatographischen Trennung.

1.7.1 Aufschluss und Extraktion

Der Aufschluss komplexer Substrate und die Extraktion der OZV daraus machen große Probleme, denn die OZV sind teilweise sehr fest an natürliche Matrix-Bestandteile gebunden. Dies trifft besonders dann zu, wenn möglichst viele OZV nebeneinander bestimmt werden sollen [20]. Hier ist es schwierig, alle Komponenten gleichzeitig zu extrahieren, denn sie unterscheiden sich je nach der Art und Anzahl der Substituenten stark in ihrer Polarität. Je polarer aber das Extraktionsmittel ist, desto mehr störende Begleitstoffe werden mitextrahiert, die später wieder mit viel Aufwand entfernt werden müssen.

In älteren Arbeitsweisen sind die OZV meist ohne vorherigen Aufschluss extrahiert worden. Sie wurden dazu in der Regel mit n-Hexan, Toluol, Benzol oder Dichlormethan aus Wasser ausgeschüttelt; feste Substrate wurden damit unter Rückfluss in einer Soxhlet-Apparatur extrahiert [20]. Die Ergebnisse aus solchen Verfahren lagen jedoch häufig viel zu niedrig. Bessere Ergebnisse wurden durch die Behandlung mit Ultraschall [21], durch die beschleunigte Lösemittel-Extraktion (accelerated solvent extraction, ASE) [22] und durch die Extraktion mit überkritischem Kohlendioxid (supercritical fluid extraction, SFE) erzielt [20]. Bei der ASE und der SFE wird festes Material getrocknet und in mehreren Zyklen unter Druck extrahiert, wobei Druck und Temperatur variiert werden können. Verschiedene Zyklen können dabei unterschiedlich polare Analyten erfassen, und das Lösungsvermögen des Kohlendioxids kann bei der SFE durch den Zusatz eines Lösungsmittels (Modifier) erhöht werden [20, 22, 23].

Zum Aufschluss der Matrix vor der Extraktion dienten vor allem Salzsäure, Bromwasserstoff, Essigsäure oder Gemische daraus in unterschiedlicher Konzentrationen bei Raumtemperatur. Variiert wurden die Dauer und die Durchmischung während des Aufschlusses (Schütteln, Rühren, Ultraschall) [20]. Die recht aggressive Arbeitsweise begünstigte allerdings in einigen Fällen den Abbau der OZV und führte zu niedrigen Ergebnissen. Zur anschließenden Extraktion sind zahlreiche Lösungsmittel (z.B. Pentan, n-Hexan, Isooctan, Diethylether, Dichlormethan, Isobutylacetat, Ethyl-

acetat) oder Mischungen daraus vorgeschlagen worden [20]; n-Hexan eignete sich dabei besonders zur Extraktion mehrerer OZV nebeneinander [20].

Die Extraktionsausbeute ließ sich durch Zugabe von Natriumchlorid und von Komplexmitteln (Tropolon, Diethyldithiocarbamate, Dithizon) erhöhen [20], denn die mit OZV gebildeten Komplexe sind besser in organischen Lösungsmitteln löslich und gehen leichter in die organische Phase über. Bei der Verwendung von Komplexmitteln werden allerdings störende Begleitstoffe ebenfalls zu höheren Anteilen extrahiert.

Milder ist eine basische Hydrolyse, bei der z.B. pflanzliches oder tierisches Gewebe mit ethanolscher Kali- oder Natronlauge oder mit Tetramethylammoniumhydroxid (TMAH) bei Raumtemperatur oder bei höherer Temperatur (bis zu 60 °C) zersetzt wird. Die Hydrolysedauer von mehreren Stunden wurde auch durch Bestrahlung mit Mikrowellen auf einige Minuten verkürzt. Die Dauer der Hydrolyse beeinträchtigt jedoch ebenfalls die Stabilität von Mono- und Diorganozinnverbindungen [20]. Vereinzelt sind auch Verfahren zur enzymatischen Hydrolyse mit einem Gemisch aus einer Protease und einer Lipase während 24 h bei 37 °C beschrieben worden [20].

1.7.2 Derivatisierung und Extraktreinigung

Zur Bestimmung durch Gaschromatographie (GC) müssen die nicht-flüchtigen polaren OZV in unpolare, flüchtige und hitzestabile Derivate überführt werden; zur Bestimmung durch Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (HPLC) ist dagegen in der Regel keine Derivatisierung notwendig. Derivatisiert wird überwiegend durch Alkylierung mit Grignard-Reagenzien oder Natriumtetraethylborat. Weniger gebräuchlich ist die Reduktion mit Natriumborhydrid, denn die gebildeten Hydride sind nur wenig stabil und sehr flüchtig; sie können in einem U-Rohr unter Kühlung mit flüssigem Stickstoff angereichert und von dort z.B. bei der Atomabsorptionsspektrometrie direkt zum Detektor geleitet werden. Alkyl-Derivate sind dagegen stabiler und müssen nicht sofort nach der Umsetzung zur GC eingespritzt werden [20].

Beim Alkylieren mit einem Grignard-Reagenz ist nachteilig, dass die Lösung gekühlt und der Reagenz-Überschuss vor der Extraktion neutralisiert werden muss. Außerdem darf weder Wasser noch Methanol oder Dichlormethan vorhanden sein. Natriumtetraethylborat erfordert dagegen keine besonderen Vorsichtsmaßnahmen und kann so verwendet werden, dass Extraktion und Derivatisierung gleichzeitig stattfinden [20].

Vor der Bestimmung durch GC ist in der Regel ein Reinigungsschritt (Clean up) notwendig, der sich an die Derivatisierung anschließt. Dazu wird meist die Säulenchromatographie (SC) an Kieselgel, Florisil oder Aluminiumoxid herangezogen, aber auch Amino- oder C₁₈-Phasen sind möglich. Die Aktivität der Säulenfüllung muss genau eingestellt sein, damit die Ergebnisse reproduzierbar werden. Die Reinigung an Florisil wurde für biologisches Gewebe mit hohem Fettgehalt

bevorzugt, reichte aber, je nach Aufschluss und Extraktion, für Extrakte aus Walfleisch, Muscheln oder Fisch nicht aus und musste durch eine weitere Reinigung ergänzt werden. Extrakte aus Sedimenten müssen zusätzlich entschwefelt werden, z.B. mit Kupferpulver [20]. Die Reinigung könnte im Prinzip auch vor der Derivatisierung stattfinden, doch eignet sich dafür die SC nicht, denn die polaren OZV müssten mit einem polaren Lösungsmittel eluiert werden, das auch viele störende Begleitstoffe desorbiert. Mögliche Alternativen sind die Gelpermeationschromatographie und eine Ionenaustauscher-Säule [20].

1.7.3 Detektion

Zur quantitativen Bestimmung der OZV-Derivate sind mehrere Detektoren geeignet. In der HPLC waren die Atomabsorptionsspektrometrie (AAS) und die Fluoreszenzmessung mit Nachsäulenderivatisierung üblich, aber nur wenig empfindlich. Sie sind inzwischen von anderen Detektionssystemen abgelöst worden, darunter die Kopplung von Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie mit Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS), die Kopplung von induktiv erzeugtem Plasma mit der Massenspektrometrie (ICP-MS) oder mit der Atomemissionsspektrometrie (ICP-AES).

In der GC sind die AAS, der Atomemissionsdetektor (AED), der flammenphotometrische Detektor mit einem Interferenz-Filter bei 610 nm und der massenselektive Detektor (MSD) üblich. Die einfache Messung durch AAS eignet sich nicht, denn sie würde nur den Gesamtzinn-Gehalt der Messlösung bestimmen und nicht zwischen anorganischen und organischen Zinn-Verbindungen unterscheiden. Eine Weiterentwicklung war die Kopplung der GC mit der Quarz-Ofen-AAS (GC-QFAAS).

Der MSD und der AED, die noch wenige Picogramm Zinn nachweisen können, bieten die besten Voraussetzungen zur routinemäßigen Bestimmung von OZV-Spuren; der AED ist sogar etwas selektiver.

1.8 Zielsetzung

Die umfangreiche und vielseitige Anwendung der OZV hat zu einer weiten Verbreitung in der Umwelt geführt. Belastet sind insbesondere Gewässer und darin lebende Organismen, die die OZV teilweise stark in ihrem Gewebe anreichern. Der Verzehr von Fischen und Muscheln aus stark kontaminierten Gewässern kann schließlich auch die Gesundheit des Verbrauchers beeinträchtigen. Die Analyse der betreffenden Rückstände im Spurenbereich ist deshalb ein besonders aktuelles Anliegen der Lebensmittelanalytik.

In der Literatur sind bereits zahlreiche Verfahren zur Bestimmung von OZV in Fisch- und Muschelgewebe beschrieben worden. Dabei wurden die unterschiedlichsten Techniken zur Probenauf-

arbeitung und zur anschließenden Messung angewendet. Alle bisher erarbeiteten Verfahren erfassen jedoch nur einzelne OZV oder kleine Gruppen ähnlicher Polarität; sie waren sehr zeitintensiv und ergaben oft durch ungenügenden Aufschluss der Matrix zu niedrige Messwerte oder führten sogar teilweise zur Zersetzung einiger Stoffe.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war deshalb, die bisherigen Ansätze weiter zu entwickeln und nach einer Arbeitsweise zu suchen, mit der möglichst viele OZV nebeneinander mit geringem Arbeitsaufwand und gleichzeitig möglichst empfindlich, selektiv und zuverlässig bestimmt werden können.

Einbezogen werden sollten vor allem solche OZV, die große wirtschaftliche Bedeutung haben und dabei in der Umwelt verbreitet werden, die aber auch toxisch für den Menschen sind. Ausgewählt wurden dazu mono- bis tetrasubstituierte Butylzinn- und Phenylzinn-Verbindungen sowie mono- bis trisubstituierte Octylzinn-Verbindungen. Für diese Stoffe mussten zunächst geeignete innere Standards gefunden werden, die unentbehrlich sind, um die Richtigkeit der Ergebnisse aus solchen Spurenanalysen sicherzustellen.

Ein zentrales Problem war das Auffinden einer Arbeitsweise, die einerseits so schonend ist, dass sie die Analyten nicht zersetzt, die aber auch so wirksam ist, dass sie die gesuchten Rückstände aus ihrer Bindung an die Matrixbestandteile freisetzt und davon abtrennt. Aussichtsreich für diese Abtrennung war unter anderem die Festphasen-Mikroextraktion (solid phase microextraction, SPME), die Arbeitsschritte einspart und kein Lösungsmittel benötigt.

Außerdem sollte ein geeignetes System zur Auftrennung und Detektion der OZV gefunden werden, das die Rückstände besonders selektiv anzeigt und nach Optimierung der Geräteparameter die notwendige Empfindlichkeit der Anzeige gewährleistet. Vielversprechend war hier die Kombination der Kapillargaschromatographie mit dem Atomemissionsdetektor und der Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie mit einem Tandem-Massenspektrometer.

Schließlich sollten die statistischen Kenndaten absichern, dass das erarbeitete Analyseverfahren zuverlässig ist und sich zur Bestimmung der OZV vor allem in Fisch- und Muschelgewebe eignet. Dazu sollten dotierte Proben mit zertifiziertem Referenzmaterial verglichen und eine größere Anzahl von Proben aus der Umwelt untersucht werden.

2 Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie mit Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS)

2.1 Grundlagen

Die Kopplung der HPLC mit der MS ist eine gute Möglichkeit zur Bestimmung der OZV. Sie erfordert keine aufwendige Derivatisierung, und die MS liefert Informationen über die Strukturen der untersuchten Stoffe. Bei einem Tandem-Massenspektrometer kommt als Identifizierungsmerkmal das Intensitätsverhältnis der Ionen hinzu, die durch mehrfache, aufeinander folgende Fragmentierung gebildet werden. Dabei passieren die zunächst gebildeten Ionen ein Massenfilter, und einzelne Ionen aus dem Spektrum werden durch Stoß mit einem Kollisionsgas in einer Kollisionszelle erneut fragmentiert.

Zur Kopplung der HPLC mit einem Massenspektrometer gibt es Techniken zur Ionisation im Vakuum (z.B. Thermospray-, Plasmaspray- und Particle Beam-Interface) und unter Atmosphärendruck (atmospheric pressure ionization, API-Interface) [24, 25]. Beim hier verwendeten Gerät Quattro II war die HPLC-Anlage über ein API-Interface mit einem Tandem-Quadrupolmassenspektrometer gekoppelt. Dieses Interface ermöglicht durch einen wenig zeitaufwendigen Umbau zwei unterschiedliche Formen der Ionisation: die Electrospray ionization (ESI) und die Atmospheric pressure chemical ionization (APCI). Beide machen zahlreiche Stoffe der Analyse zugänglich. Das System war außerdem ausgestattet mit binärer Gradientenmischung, Flussprogrammierung, Lösungsmittelentgasung, Säulenthmostatisierung und einem Autosampler mit stufenlos variablem Injektionsvolumen.

Bei der **ESI** wird das Eluat aus der HPLC durch eine Edelstahlkapillare zu einem Zerstäuber geleitet, der mit mehreren kV positiv oder negativ geladen ist. Das starke elektrische Feld zerstäubt, unterstützt von einem Stickstoffstrom (nebulizer gas), das Eluat in feine hochgeladene Tröpfchen. Ein zweiter Stickstoffstrom (drying gas) verdampft das Lösungsmittel dieser Tröpfchen, so dass die Oberfläche kleiner wird und die Ladungsdichte zunimmt. Schließlich wird ein kritischer Punkt erreicht, bei dem die Ionen kinetisch und energetisch in die Gasphase übergehen können. Um dies zu unterstützen, erfolgt die Zerstäubung auf eine Elektrode hin. Die Ionen passieren einen Eintrittskonus, an dem sie durch eine Spannung zwischen 10 und 120 V fragmentiert werden. Die Signalintensität ausgewählter Fragmente kann durch Verändern dieser Spannung intensiviert oder verringert werden. Geleitet von einem Spannungsgefälle und fokussiert durch einen Hexapol und verschiedene Linsen gelangen die Fragmente schließlich in das erste Massenfilter [24].

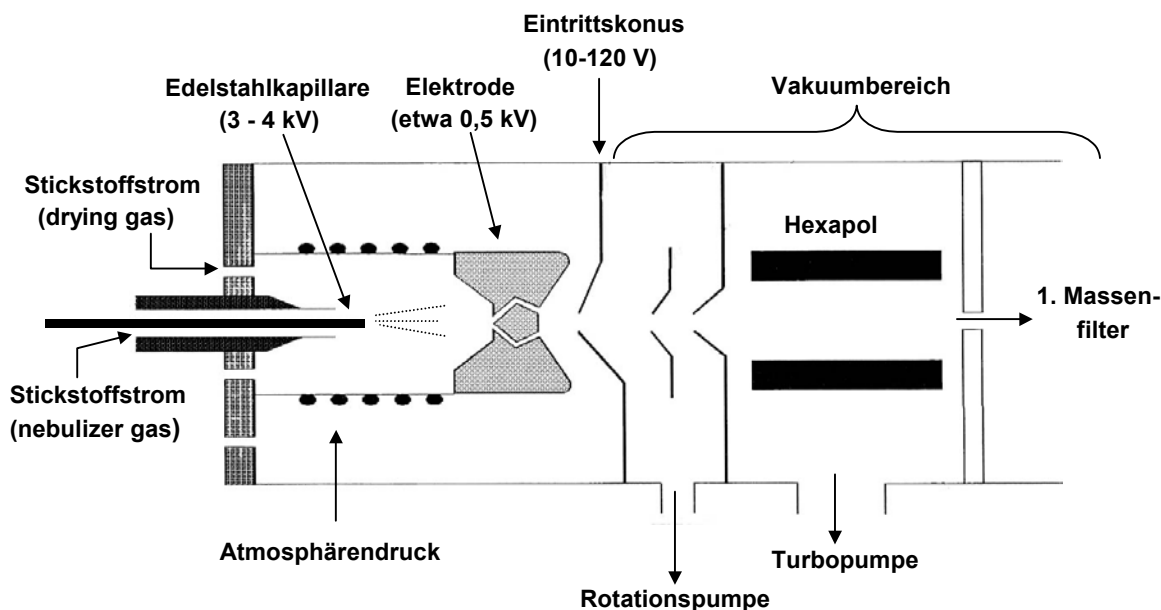


Abb. 2: Schematische Darstellung der ESI-Quelle des Gerätes Quattro II [24]

Bei der LC-MS ist das Signal proportional zur Konzentration des Analyten im Strom des Eluenten. Voraussetzung bei einem geringen Injektionsvolumen ist daher ein kleiner, bei einem großen Injektionsvolumen ein großer Fluss. Zur ESI eignen sich eine geringe bis sehr geringe LC-Flussrate (etwa 1 - 200 $\mu\text{l}/\text{min}$) und eine Trennsäule mit geringem i.D. von etwa 2 mm und weniger [24, 26]. Die Stoffe müssen in der Analysenlösung bereits ionisiert vorliegen (solvent ionization), da kaum eine aktive Ionisierung stattfindet. Daher ist der pH-Wert des Eluenten entscheidend für die Art und Menge der gebildeten Ionen. Gelegentlich treten auch Addukte der Analyten mit Bestandteilen des Eluenten auf. Mit dieser Technik werden hauptsächlich ionische und hochmolekulare Stoffe in wässriger Lösung, die mit einem flüchtigen Puffer eingestellt ist, gemessen [24].

Bei der APCI sind die LC-Flussraten höher (etwa 0,2 bis 2,0 ml/min), und die Trennsäule kann daher einen größeren i.D. von etwa 4 mm haben [24, 26]. Im Gegensatz zur ESI werden Stoffe, die nicht ionisch vorliegen, aktiv ionisiert; deshalb eignet sich die APCI hauptsächlich für niedermolekulare Stoffe aus unpolarer Lösung. Das Eluat aus der HPLC wird thermisch (bis zu 600 $^{\circ}\text{C}$) an einer spannungslosen Austrittskapillare aus Quarz zerstäubt, wie bei der ESI-Technik unterstützt von einem Stickstoffstrom (nebulizer gas). Ein zweiter Stickstoffstrom (sheath gas), der die Austrittskapillare in einem Rohr umgibt, leitet das Aerosol zum Eintrittskonus. Im Aerosol werden die Analyten und das Elutionsmittel durch eine Koronarentladung an einer Entladungsnadel ionisiert. Die Ionen können, ähnlich wie bei der chemischen Ionisation (CI) in der GC-MS, die Analyten in einem Sekundärprozess chemisch unter Adduktbildung ionisieren. Der Übergang der Ionen bzw. Moleküle in die Gasphase, die Fragmentierung und die Weiterleitung in das erste Massenfilter erfolgen auf die gleiche Weise wie bei der ESI [24].

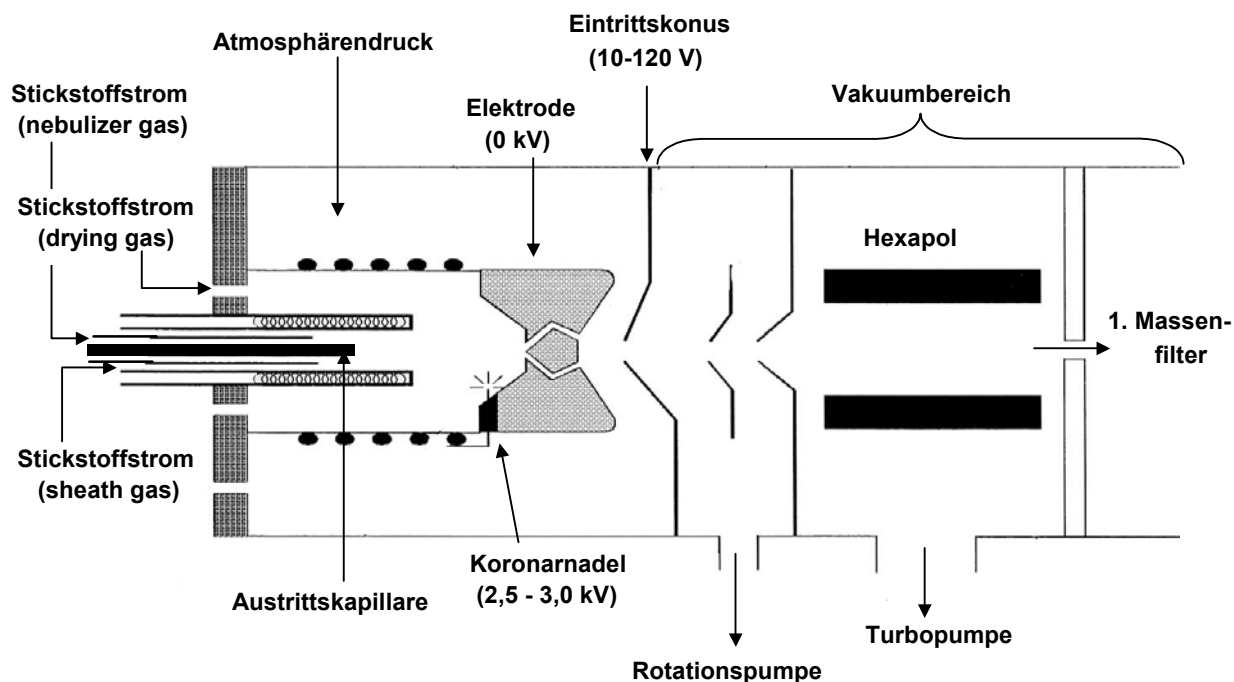


Abb. 3: Schematische Darstellung der APCI-Quelle des Gerätes Quattro II [24]

2.2 Berechnung von Massen-Fragmenten und Addukten verschiedener OZV

Zinn besitzt zehn stabile Isotope, die in einem konstanten Verhältnis zueinander stehen. **Tabelle 3** zeigt die Verteilung, die in der Natur vorkommt. ^{120}Sn ist mit einem Anteil von 32,4 % am häufigsten, und ^{115}Sn ist mit nur 0,4 % am wenigsten vertreten.

Tab. 3: Natürliche Verteilung der zehn Zinn-Isotope

Isotop	Masse	natürliche Verteilung (%)
^{112}Sn	111,9	1,0
^{114}Sn	113,9	0,7
^{115}Sn	114,9	0,4
^{116}Sn	115,9	14,7
^{117}Sn	116,9	7,7
^{118}Sn	117,9	24,3
^{119}Sn	118,9	8,6
^{120}Sn	119,9	32,4
^{122}Sn	121,9	4,6
^{124}Sn	123,9	5,6

Verbindungen, die Zinn enthalten, ergeben deshalb bei der MS spezifische Muster (Isotopencluster). Um die Fragmente von OZV in einem Spektrum leicht zuordnen zu können, wurde zunächst das Muster mit Hilfe eines Computerprogramms (Opus 3.1, Bestandteil einer Mas-

senspektrometer-Software) berechnet. **Abbildung 4a** zeigt z.B. das berechnete Isotopencluster für Zinn, bezogen auf das häufigste Isotop ^{120}Sn .

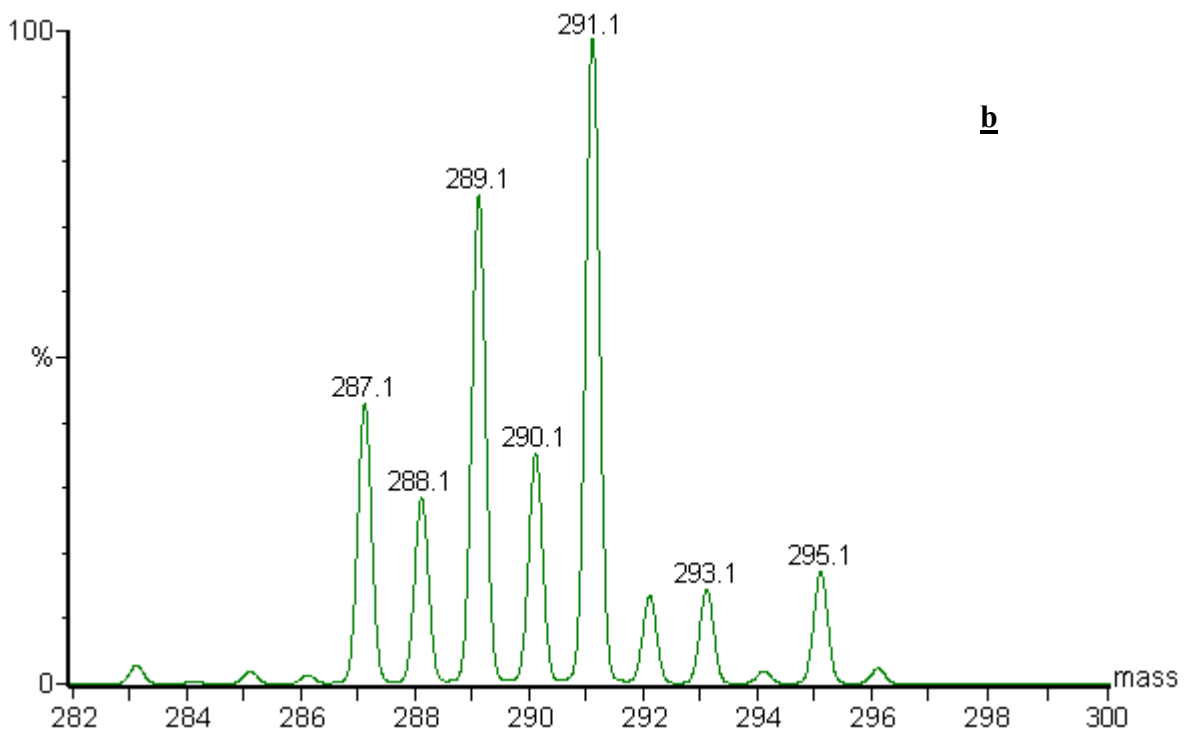
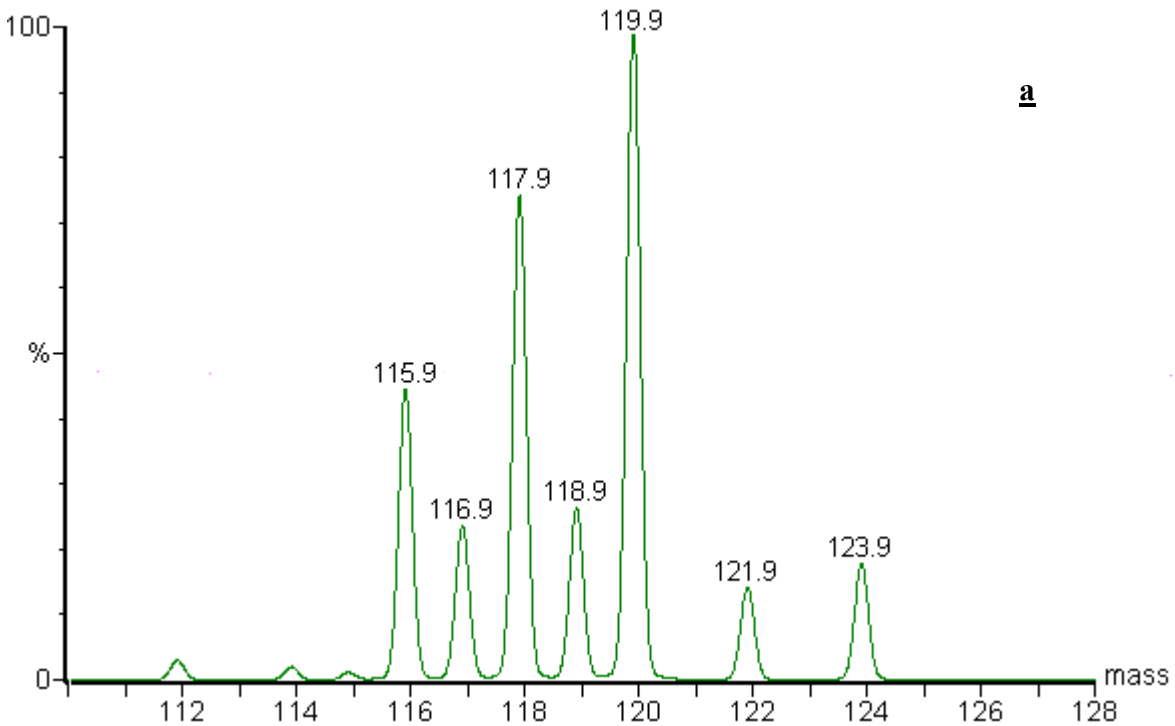


Abb. 4: Isotopencluster von Zinn (a) und vom Tributylzinn-Kation (b)

In **Abbildung 4b** ist für das Tributylzinn-Kation ebenfalls das typische Muster der Isotope zu erkennen. Außerdem enthalten die Peaks aber auch die Isotope der weiteren beteiligten Elemente. Dies sind bei Kohlenstoff ^{12}C und ^{13}C (98,90 % bzw. 1,10 %) [27] und bei Wasserstoff ^1H und ^2H (99,99 % bzw. 0,01 %) [28]. Beispielsweise besteht zwar der größte Peak mit m/z 291,1 hauptsäch-

lich aus den häufigsten Isotopen ($^{12}\text{C}_{12}^{1}\text{H}_{27}^{120}\text{Sn}$), hat aber auch geringe Anteile an anderen Mischungen (z.B. $^{12}\text{C}_{11}^{13}\text{C}_1^1\text{H}_{27}^{119}\text{Sn}$ oder $^{12}\text{C}_{11}^{13}\text{C}_1^1\text{H}_{26}^2\text{H}_1^{118}\text{Sn}$). Daneben enthält das Cluster des Tributylzinn-Kations weitere Peaks (z.B. m/z 292,1 aus $^{12}\text{C}_{11}^{13}\text{C}_1^1\text{H}_{27}^{120}\text{Sn}$).

Das Massenspektrum kann zusätzlich die Peaks von Addukten enthalten, die durch Reaktion der OZV-Fragmente mit Ionen und Molekülen (z.B. Methylat, Wasser, Formiat) aus dem Lösungsmittel entstehen, in dem die OZV bei der Optimierung der Geräteparameter eingespritzt werden oder mit dem die Trennsäule eluiert wird. Auch für solche Addukte wurden Isotopencluster berechnet, um sie leichter identifizieren zu können.

2.3 Untersuchte OZV

Da in der Praxis vor allem Butylzinn- und Phenylzinn-Verbindungen angewendet werden, wurden sie in allen Alkylierungsstufen untersucht, außerdem Dioctylzinn-dichlorid (Oc_2SnCl_2) als Vertreter eines Stabilisators von Kunststoffen. Monoheptylzinn-trichlorid (HeSnCl_3), Diheptylzinn-dichlorid (He_2SnCl_2) und Tetrapentylzinn (Pe_4Sn), die nicht angewendet werden, wurden auf ihre Eignung als innere Standards geprüft.

2.4 Optimierung von Geräteparametern

Bei der LC-MS/MS beeinflussen mehrere Geräteparameter die Bildung von Ionen und Massenfragmenten. Sie mussten zunächst optimiert werden, um möglichst empfindliche Signale für die einzelnen OZV zu erhalten. Bei einigen dieser Parameter reicht es aus, sie beispielhaft mit einer einzigen OZV zu optimieren. Dazu gehören die Temperaturen der Quelle und der Austrittskapillare (bei APCI) und die Spannungen an der Elektrode, den Linsen und den Filtern, die nur geringen Einfluss auf die Intensität der Massensignale haben. Bei den Untersuchungen wurden sowohl die ESI als auch die APCI, beide mit positiver und mit negativer Ionisation, überprüft. Weil aus OZV vorwiegend positive Ionen entstehen sollten, war zu erwarten, dass sich die positive Ionisation besser eignet als die negative. Außerdem sollte sich die ESI für die mono- bis trisubstituierten OZV besser eignen als die APCI, da die OZV nicht erst ionisiert werden müssen.

Zur Optimierung wurde 1 ml einer Lösung von Bu_3SnCl , die etwa $1 \mu\text{g/ml}$ Sn enthielt, mit einer Spritzenpumpe direkt in die ESI- oder APCI-Quelle eingespritzt und zwar mit einem Fluss von $20 \mu\text{l/min}$ (ESI) während etwa 20 min oder mit $200 \mu\text{l/min}$ (APCI) während etwa 5 min. Das Lösungsmittel für Bu_3SnCl und seine Flussrate sollten dabei möglichst die gleichen sein wie bei dem späteren Eluenten für die HPLC. Weil dieser Eluent genügend flüchtig sein muss, wurde das Gemisch Methanol/ionisiertes Wasser (1 + 1) verwendet. Es wurde in einem weiteren Versuch mit 0,1 % Ameisensäure angesäuert; der alkalische Bereich wurde nicht berücksichtigt, denn die

meisten HPLC-Trennsäulen sind dafür nicht geeignet. Die Temperaturen und Spannungen wurden während des Einspritzens nacheinander so verändert, dass ein vorher ausgewähltes, besonders großes Massensignal im ersten Massenfilter am stärksten wurde. Für Bu_3SnCl war dies die Masse m/z 291,1 aus dem Isotopencluster des Tributylzinn-Kations. Danach wurde das gesamte Spektrum registriert, um zu sehen, welche Massen unter diesen Bedingungen entstanden. Das Gerät nahm dafür innerhalb von 30 s nacheinander zehn Spektren auf, glättete und addierte sie (scan).

Da es noch keine Spektrenbibliothek für die LC-MS/MS der OZV gibt, wurde unter den optimierten Bedingungen bei jeder OZV nach einem großen Ion gesucht, das besonders spezifisch war, möglichst Teil des Isotopenclusters von Zinn war und deshalb auch in einer komplexen Matrix eine sichere Identifizierung ermöglichen sollte. Addukte wurden nicht berücksichtigt, denn ihre Bildung hängt vom Lösungsmittel, vom pH-Wert und auch von der Zusammensetzung der Probe ab.

Das ausgewählte Ion wurde nun als Mutterion in der Kollisionszelle vor dem zweiten Massenfilter durch Argon (99,998 %) in Tochterionen fragmentiert. Dazu wurde das erste Massenfilter so eingestellt, dass nur das Mutterion die Kollisionszelle erreichte, das Argon zugeschaltet und die Stoßenergie so verändert, dass die Tochterionen im zweiten Massenfilter maximale Intensität zeigten. Schließlich wurden auch die Spektren der Tochterionen aufgenommen und die Massen darin ermittelt. Die bei der Optimierung erhaltenen Temperaturen und Spannungen (Kapitel 9.4) wurden für alle anderen OZV überprüft; dabei gab es nur Abweichungen zwischen positivem und negativem Modus sowie zwischen ESI und APCI.

Weitere Geräteparameter müssen für jede OZV getrennt optimiert werden. Dazu gehören die Spannung des Eintrittskonus und die Stoßenergie des Kollisionsgases, die den größten Einfluss auf die Intensität von Mutter- und Tochterionen haben. Sie wurden für jede OZV ebenfalls in Methanol/Wasser (1 + 1) mit und ohne 0,1 % Ameisensäure bestimmt. Die Spektren der Mutterionen wurden aufgenommen und außerdem einzelne Signale zu Tochterionen fragmentiert. **Abbildung 5** zeigt beispielhaft das Spektrum von Bu_3SnCl im ersten Massenfilter. Das Signal bei m/z 291,06, das durch Abspaltung von Chlor aus Bu_3SnCl entstanden ist, war hier auf maximale Intensität optimiert und diente als Mutterion. Die Vergrößerung (Pfeil) zeigt das zugehörige Isotopencluster.

Abbildung 6 zeigt das Tochterionen-Spektrum von m/z 291,06, aufgenommen mit 9 V Stoßenergie für das Kollisionsgas. Die Fragmente m/z 234,96 und 178,76 sind durch einfache bzw. durch zweifache Abspaltung einer Butylgruppe entstanden. Das Mutterion selbst ist bei dieser Energiezufuhr nicht vollständig fragmentiert.

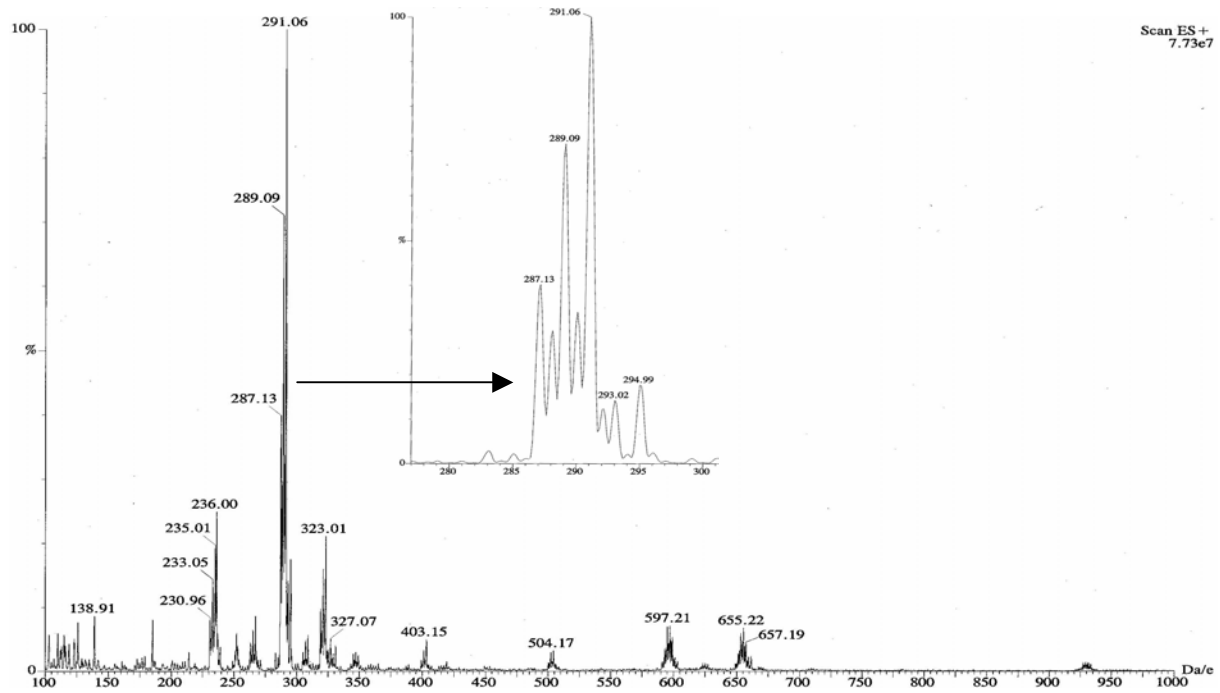


Abb. 5: Mutterionen-Spektrum von Bu_3SnCl , gelöst in Methanol/Wasser (1 + 1, v/v) mit 0,1 % Ameisensäure, nach Optimierung von m/z 291,06 mit 30 V Spannung des Eintrittskonus in ESI positiv

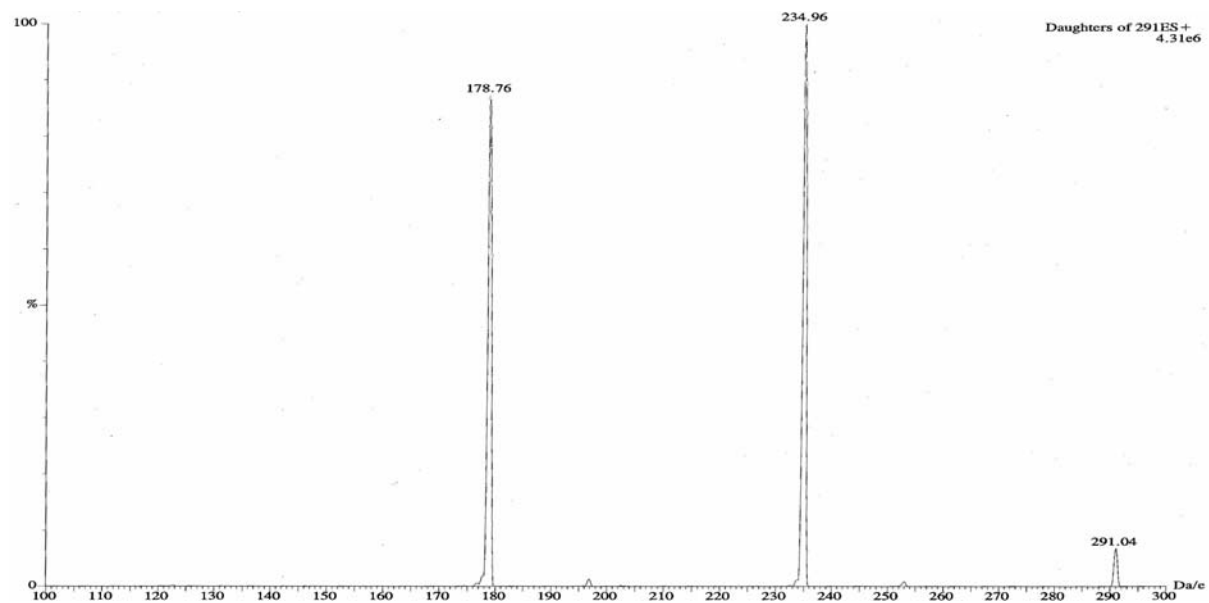


Abb. 6: Tochterionen-Spektrum von m/z 291,06 in Methanol/Wasser (1 + 1, v/v) mit 0,1 % Ameisensäure nach Optimierung von m/z 234,96 mit 30 V Spannung des Eintrittskonus und 9 V Stoßenergie für das Kollisionsgas in ESI positiv

2.5 Ergebnisse

Schon nach dem Aufnehmen der Spektren wurde klar, dass die einzelnen OZV-Gruppen zu unterschiedlich waren und dass es deshalb aussichtslos war, sie gleichzeitig nebeneinander zu bestimmen. Wie erwartet, eignete sich die positive Ionisation besser als die negative und die ESI besser als die APCI.

Am schlechtesten war APCI negativ. Die wenigen zinnhaltigen Isotopencluster, die auswertbar waren, stammten hauptsächlich von Addukten, z.B. mit Wasser, Methylat oder Formiat. Der Zusatz von Ameisensäure zum Methanol/Wasser-Gemisch ergab zwar bei einigen OZV geeignete Signale, die jedoch wesentlich schwächer waren als bei den anderen Techniken. Schwierigkeiten gab es auch bei PhSnCl_3 und BuSnCl_3 sowie bei HeSnCl_3 und Pe_4Sn , die als innere Standards hätten dienen sollen und keine geeigneten Signale ergaben. Für die restlichen OZV waren ESI positiv und APCI positiv besser geeignet als ESI negativ; dabei wurden in ESI positiv die Signale etwas empfindlicher angezeigt. Bei den dialkylierten OZV hing die Optimierung außerdem vom Lösungsmittel ab, He_2SnCl_2 und Oc_2SnCl_2 konnten nur in saurer Lösung und Ph_2SnCl_2 nur ohne Säurezusatz optimiert werden. Sehr intensiv wurden in ESI positiv nur Bu_3SnCl und Ph_3SnCl angezeigt.

Weil die optimalen Bedingungen für die einzelnen OZV sich zu stark unterschieden und die Nachweisempfindlichkeit teilweise zu gering war, eignete sich die LC-MS nicht zur Entwicklung einer Methode, mit der Spuren möglichst vieler OZV bestimmt werden können. Daher wurden die Versuche mit der LC nicht weitergeführt. Wenn jedoch nur die besonders umweltrelevanten und toxischen Abkömmlinge von Tributylzinn und Triphenylzinn alleine erfasst werden sollen, bieten die gefundenen Ergebnisse gute Voraussetzungen zur Weiterentwicklung einer Methode auf der Grundlage der LC-MS.

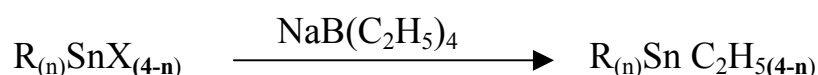
3 Gaschromatographie mit Atomemissionsdetektion

Die Gaschromatographie (GC) ist wegen der hohen Trennleistung der Kapillarsäulen und der niedrigen Nachweisgrenzen, die sich dabei ergeben, eines der leistungsfähigsten Verfahren zur Bestimmung von Spuren organischer Stoffe. Der Atomemissionsdetektor (AED) liefert ein elementspezifisches Spektrum von Stoffen, die Heteroatome enthalten, und zeigt selbst Stoffe mit gleicher Retentionszeit besonders selektiv und empfindlich im Hinblick auf diese Elemente an. Die Kopplung der Kapillar-GC mit dem AED nutzt die Vorteile beider Techniken. Bei den eigenen Untersuchungen wurden zwei verschiedene Bauarten des AED (HP 5921 A und HP 2350 A) verwendet. Sie unterscheiden sich u.a. im Aufbau des Spektrometers, in der Verwendung von Restriktoren im Gassystem, in den Bestimmungsgrenzen und in der Selektivität bei einigen Elementen. Im größten Teil der Untersuchungen wurde mit dem Modell HP 2350 A gearbeitet.

3.1 Derivatisierung

Voraussetzung für eine gaschromatographische Trennung ist, dass sich die zu bestimmenden Stoffe unzersetzt verdampfen lassen. Wenn dies nicht der Fall ist, können ihre Eigenschaften durch eine Derivatisierung gezielt verändert werden, z.B. durch Silylierung oder Alkylierung funktioneller Gruppen oder durch Hydrierung.

Um die polaren, nicht flüchtigen OZV zur GC in unpolare, flüchtige Derivate zu überführen, ist die Alkylierung mit Natriumtetraethylborat oder einem Grignard-Reagenz am meisten gebräuchlich. Bei den eigenen Untersuchungen wurde Natriumtetraethylborat verwendet, weil es auch in Gegenwart von Wasser angewendet werden kann. Die Reaktion verläuft schon bei Raumtemperatur, und der Überschuss an Reagenz muss nicht entfernt werden. Außerdem können Derivatisierung und Extraktion gleichzeitig stattfinden, was einen Aufarbeitungsschritt einspart. Die nur teilweise substituierten OZV ergeben mit Natriumtetraethylborat unpolare Tetraorganozinn-Verbindungen, die mit einem organischen Lösungsmittel aus der Matrix extrahiert und nach Reinigung des Extraktes gaschromatographisch getrennt werden können:



Trockenes Natriumtetraethylborat ist sehr hygroskopisch, kann sich an der Luft entzünden und muss daher unter Inertgas aufbewahrt werden. Zu Beginn der Untersuchungen wurde täglich eine einprozentige Lösung davon in Aceton hergestellt. Dazu wurden etwa 50 bis 150 mg in 1 ml Aceton gelöst; das Vorratsgefäß wurde zurückgewogen und die Lösung mit so viel Aceton ver-

dünnt, dass sie 0,01 g/ml Natriumtetraethylborat enthält. Später wurde der gesamte Inhalt eines Fläschchens mit 1 g Natriumtetraethylborat in 5,0 ml Tetrahydrofuran gelöst, die Lösung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt und innerhalb von 4 bis 6 Wochen verbraucht. Bei Bedarf wurde daraus das benötigte Volumen mit einer gasdichten 100- μl -Spritze entnommen.

3.2 Gaschromatographie

Der verwendete Gaschromatograph war mit einem split-/splitlos-Injektor ausgestattet sowie mit einem automatischen Probengeber, der aus einem Probensteller mit Greifarm, einem Steuergerät und dem Injektor bestand. Der Injektor enthielt eine herausnehmbare Spritze und Fläschchen für das Lösungsmittel zum Spülen der Spritze; sie wurde sowohl mit n-Hexan als auch mit Ethylacetat gespült, denn mit n-Hexan allein verblieben Rückstände, so dass sich der Stempel nach etwa 100 Injektionen nur noch schwer bewegen ließ. Verwendet wurden ausschließlich 10- μl -Spritzen, mit denen Volumina in Abständen von 1 μl dosierbar waren, und Probenfläschchen von 1,5 ml Inhalt mit 100 μl Glaseinsatz, Septum und Bördelkappe. Der Vordruck des Trägergases Helium, die Splitöffnungszeit und die Temperatur des Aufgabesystems ließen sich über die Software kontrollieren; dagegen war die Splitflussrate nur manuell einstellbar. Der Fluss der Septumspülung von 1 ml/min war nicht variabel. Eine Programmierung der Gasströme über den Druck oder die Flussrate oder die automatische Messung aller Flussraten waren nicht vorgesehen. Eingespritzt wurde ausschließlich splitlos, denn auf diese Weise wird die Analysenlösung quantitativ auf die Säule gebracht.

Als Verdampfeinsatz im Injektor diente ein silanisieretes Borosilikatglasröhrchen (4 mm i.D., 80 mm lang), das auf etwa ein Drittel der Höhe einen lockeren Pfropf aus silanisierter Quarzwatte enthielt. Das Röhrchen wurde nach 20 – 50 Injektionen gereinigt und die Quarzwatte erneuert, aber nach einigen 100 Injektionen ausgetauscht. Bei der Reinigung wurden auch das Silikonseptum und der obere Silikondichtring erneuert.

Die Trennsäule war mit einer Graphitdichtung und einem Überstand von etwa 5 mm an den Injektor angeschlossen. Zur Bestimmung der überwiegend unpolaren OZV-Derivate ist in den meisten Fällen eine Trennsäule mit einer unpolaren Silikonphase wie DB-1 (100 % Methyl) oder DB-5 (5 % Phenyl, 95 % Methyl) verwendet worden [20], seltener mit einer mittelpolaren Silikonphase wie DB-17 (50% Phenyl, 50 % Methyl) oder DB-1701 (14% Cyanopropylphenyl, 86% Methyl) [20]. In den eigenen Untersuchungen wurden die Trennsäulen DB-5 und DB-1701 erprobt, beide 60 m lang, mit 0,32 mm i.D. und 0,25 μm Filmdicke. Die Trennung war an beiden Säulen sehr gut. DB-5 wurde jedoch vorgezogen, denn es ermöglicht höhere Temperaturen, so dass schwer flüchtige Verunreinigungen der Analysenlösung bei $350\text{ }^{\circ}\text{C}$ ausgeheizt werden können.

Die Literaturangaben über die beste Temperaturführung waren unterschiedlich, je nach der Art des Aufgabesystems und der Anzahl der zu bestimmenden OZV. Die Trennung mit dem AED ist z.B. bei 45 °C [29], 55 °C [30] oder 80 °C [31, 32] begonnen worden und die Temperatur dann linear [30 - 32] oder in zwei Stufen [32] bis auf 230 °C [31], 260 °C [30] 280 °C [29] oder 300 °C [32] erhöht worden. Die Analysenlösung wurde dabei direkt auf die Trennsäule (on-column) [30, 32] oder splitlos [29, 31] aufgegeben.

Die eigene Arbeit verwendete 1,5 ml/min Helium als Trägergas und zwei Temperaturprogramme. Anfangs wurde nach splitloser Aufgabe (2 min bei 40 °C, Split 20:1) die Temperatur mit 30 °C/min auf 140 °C erhöht, dann mit 1 °C/min auf 160 °C und weiter mit 15 °C/min auf 300 °C. Als die OZV später in Toluol eingespritzt wurden, begann das Programm schon mit 2 min bei 70 °C und Erhöhungen mit 30 °C/min auf 150 °C, dann mit 2 °C/min auf 180 °C und schließlich mit 30 °C/min auf 300 °C.

Abbildung 7 zeigt ein Chromatogramm unter diesen Bedingungen, bei dem alle 15 in Frage kommenden OZV innerhalb von 30 min eluiert wurden. Die eingespritzte Standardlösung enthielt die OZV jeweils in einer Konzentration von 0,5 µg/ml Sn. Wie daraus hervorgeht, wurden die einzelnen OZV und ihre Ethylderivate sehr gut voneinander getrennt.

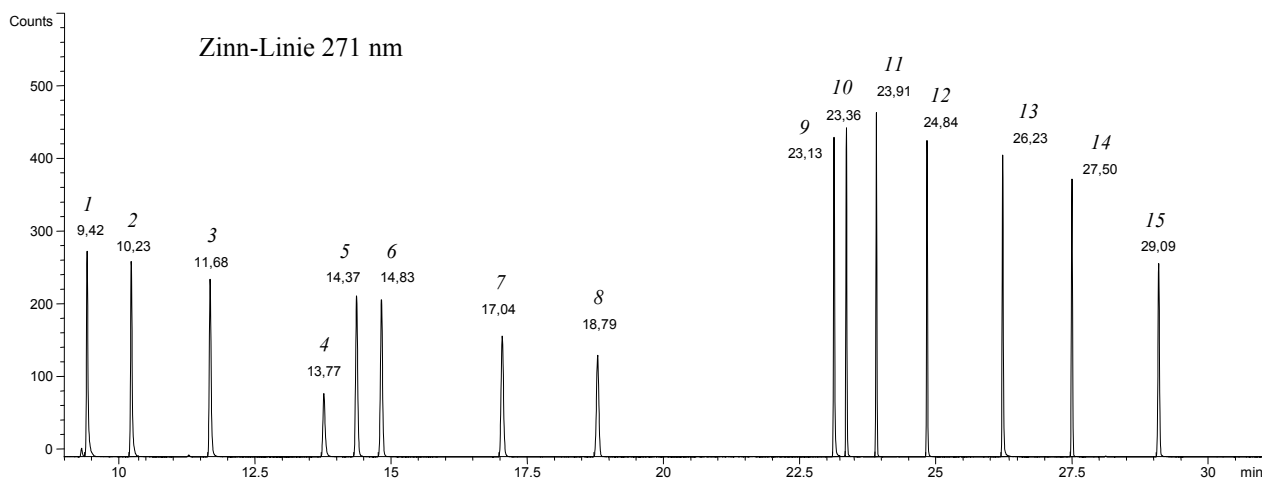


Abb. 7: GC-AED-Chromatogramm einer Standardlösung von OZV nach Derivatisierung mit Natriumtetraethylborat

1: BuSnEt₃; 2: Pr₃SnEt (i.Std.); 3: Bu₂SnEt₂; 4: PhSnEt₃; 5: HeSnEt₃ (i.Std.); 6: Bu₃SnEt; 7: OcSnEt₃; 8: Bu₄Sn; 9: Ph₂SnEt₂; 10: He₂SnEt₂ (i.Std.); 11: Pe₄Sn (i.Std.); 12: Oc₂SnEt₂; 13: Ph₃SnEt; 14: Oc₃SnEt; 15: Ph₄Sn

Trennsäule DB-5 (60 m lang, i.D. 0,32 mm, Filmdicke 0,25 µm), Temperaturprogramm 2 min 70 °C, mit 30 °C /min auf 150 °C, 2 °C/min auf 180 °C und 30 °C/min auf 300 °C, 8 min isotherm

3.3 Atomemissionsdetektion

Bei der Atomemissionsdetektion werden die gaschromatographisch getrennten Stoffe in einem Plasma aus Helium, das in einem Plasmaröhrchen durch Mikrowellen induziert wird, vollständig atomisiert. Die Atome werden durch die hohe Temperatur des Plasmas ($> 3000\text{ °C}$) angeregt und senden bei der Rückkehr in einen energieärmeren Zustand ein charakteristisches Linienspektrum aus. Das emittierte Licht wird von einer Linse gebündelt und im Spektrometer von einem Spiegel auf ein bewegliches Gitter reflektiert, welches das Licht in einzelne Wellenlängen zerlegt und diese in einer Ebene fokussiert. Von dort wird ein bestimmter Wellenlängenbereich durch einen weiteren Spiegel auf einen Photodiodenarray-Detektor (PDA) reflektiert. Er besteht beim Modell HP 2350 A aus 512 photo-sensitiven Dioden, die jeweils die Intensität des Lichtes registrieren und die Signale nach Verstärkung der Software übermitteln. Dieser Detektor erfasst Wellenlängen von 160 bis 800 nm und tastet jeweils einen Bereich von 20 - 26 nm gleichzeitig ab. Durch das bewegliche Gitter kann der gesamte Bereich registriert werden [33, 34, 35].

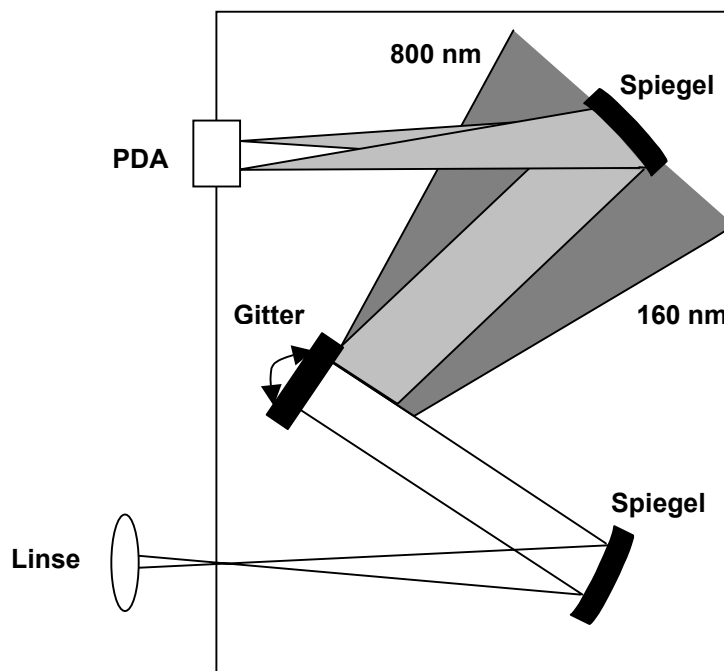


Abb. 8: Lichtweg durch das Spektrometer

Bei beiden AED-Typen können drei Emissionslinien des Zinns bei 271 nm, 301 nm und 303 nm detektiert werden, mit dem HP 2350 A zusätzlich eine vierte bei 326 nm. Die Zinn-Linie 271 nm kann gleichzeitig mit einer Kohlenstoff-Linie (248 nm beim HP 5921 A, 264 nm beim HP 2350 A) gemessen werden und wurde bei den eigenen Untersuchungen genutzt, um eine Verunreinigung rasch zu erkennen. Die Zinn-Linien 301 nm und 303 nm werden ebenfalls gleichzeitig erfasst; ihr Intensitätsverhältnis kann die Identifizierung eines Stoffes absichern und die Zuordnung

von Peaks bestätigen. Am empfindlichsten ist die Messung bei 326 nm: das Signal ist etwa doppelt so intensiv wie bei den anderen Wellenlängen und weit weniger anfällig als die Zinn-Linie 271 nm gegen Störungen durch andere Komponenten in der Messlösung. Die Zinn-Linie 326 nm ergab deshalb die niedrigste Bestimmungsgrenze und wurde bevorzugt zur Bestimmung der OZV in Lebensmitteln genutzt.

Das aus der Kapillarsäule austretende Trägergas gelangt durch eine beheizte Überführungsleitung (transferline) in das Plasmaröhrchen, das sich in einem ebenfalls beheizten Hohlraumresonator (cavity) befindet. In dieser von Beenakker [34] entwickelten Anordnung wird in dem Plasmaröhrchen mit nur geringem Energieaufwand unter Atmosphärendruck ein stabiles Heliumplasma erzeugt und das entstehende Licht durch ein Spektrometerfenster aus Quarzglas emittiert. Das Plasmaröhrchen wird im Hohlraumresonator durch Kühlwasser aus einem geschlossenen Kreislauf umspült.

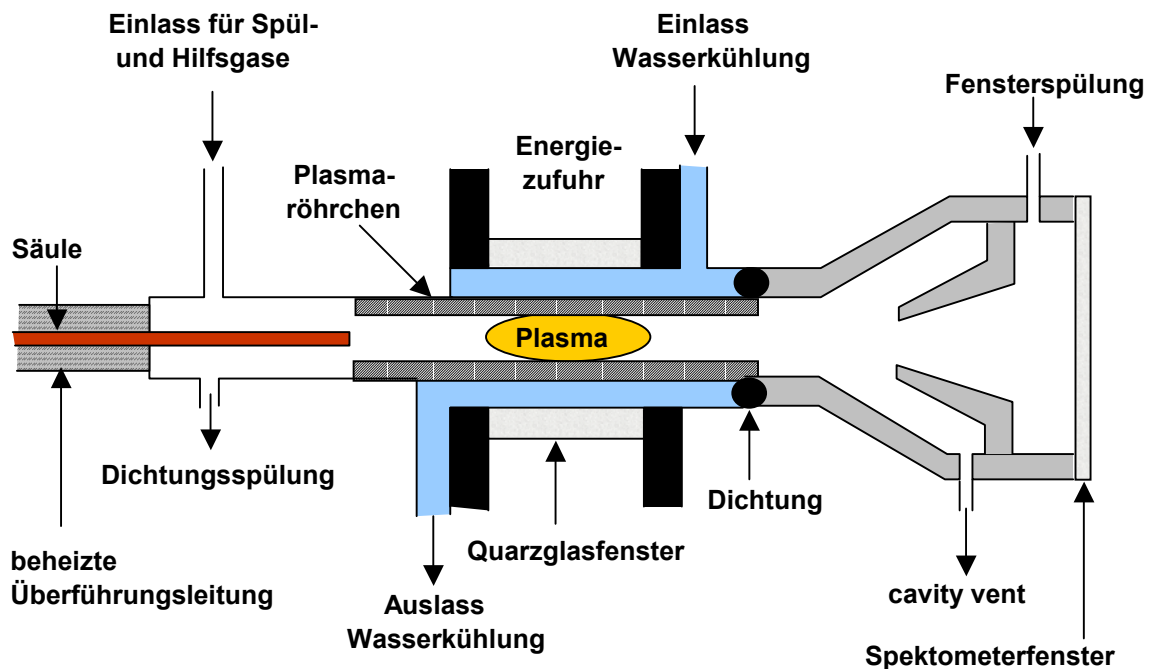


Abb. 9: Schema des Hohlraumresonators nach Beenakker

Beim AED beeinflussen mehrere Gasströme die Empfindlichkeit der Messung. Helium dient nicht nur als Trägergas, sondern auch als Spülgas. Ein Teil davon spült das Spektrometerfenster (spectrometer lens purge) mit einem konstanten Fluss von 25 ml/min. Der andere Teil (make-up gas) strömt mit variablem Fluss in den Hohlraumresonator und wird mit weiteren Hilfsgasen (reagent gases, scavenger gases) vermischt. Bevor dieses Gemisch in das Plasma gelangt, werden 20 ml/min davon abgetrennt und als Dichtungsspülung (ferrule purge vent) umgeleitet. Dieser Anteil sorgt dafür, dass keine Verunreinigungen (z.B. durch Graphitpartikel aus den Dichtungen von Kapillarsäule und Plasmaröhrchen) in das Plasma gelangen. Bis auf die Dichtungsspülung werden

alle Gase zum Ausgang des Hohlraumresonators (cavity vent) geleitet [36]. Dabei erhöht der Teil des Heliums, der als Make-up Gas dient, den Gasfluss durch das Plasmaröhrchen, verhindert Totvolumina und Rückdiffusion der getrennten Stoffe, verringert die Ablagerung von Metalloxiden und Graphit an der Wand des Röhrchens und erhält das Plasma stabil.

Mit den Hilfsgasen lassen sich die Selektivität, Peakform und Nachweisgrenze einzelner Elemente optimieren. Zur Bestimmung von Zinn werden Sauerstoff und Wasserstoff verwendet. Sie tragen ebenfalls dazu bei, Ablagerungen an der Wand des Plasmaröhrchens zu verhindern: Sauerstoff oxidiert Kohlenstoff zu CO und CO₂ und Wasserstoff bildet flüchtige Metallhydride. Damit das Untergrundrauschen möglichst gering bleibt, müssen Helium und Wasserstoff eine Reinheit von 5.0 (99,999 %) haben. Die Reinheit des Heliums wurde außerdem beim HP 2350 A durch eine wasserbindende Kartusche und einen Edelgasreiniger (Getter), der Spuren von Verunreinigungen durch Chemisorption an einer Metalloberfläche entfernt [37], von 4.6 (99,996 %) auf etwa 6.5 (99,99995 %) erhöht. Der verwendete medizinische Sauerstoff mit einer Reinheit von 2.5 (99,5 %), war für die Untersuchungen ausreichend. Wasserstoff und Sauerstoff wurden extern durch fein regulierbare Druckminderer in Schritten von 0,02 bar geregelt.

Das Innere des Spektrometers wird mit Stickstoff gespült, denn geringste Spuren von Sauerstoff würden die Messungen durch Absorptionen unter 280 nm stören [33, 36].

Das Plasma ist empfindlich gegen große Lösungsmittelmengen, die von der Kapillarsäule kommen, denn ihre Atomisierung verbraucht so viel Energie, dass es sofort erlischt [34]. Dies kann durch eine Umkehr der Gasflüsse (solvent venting) verhindert werden. Dabei wird das Ventil am Ausgang des Hohlraumresonators (cavity vent) geschlossen, so dass Trägergas, Spül- und Hilfsgase die Cavity durch den Ausgang der Dichtungsspülung verlassen. Auf diese Weise gelangt nur der Teil des Heliums in das Plasmaröhrchen, der das Spektrometerfenster spült und keinen Einfluss auf die Stabilität des Plasmas hat (**Abbildung 10**).

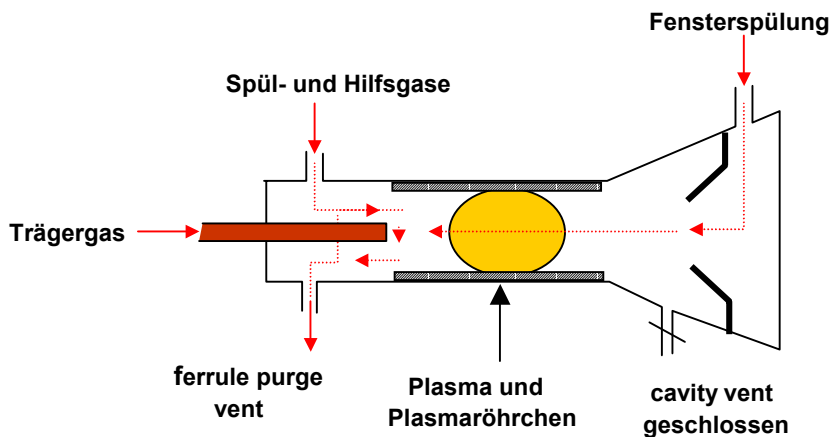


Abb. 10: Umkehr des Gasflusses (solvent venting)

Kurz bevor die ersten Stoffe von der Trennsäule eluiert werden, wird die Umkehr des Gasflusses wieder ausgeschaltet (**Abbildung 11**). Dann strömen Trägergas, Spül- und Hilfsgase wieder in das Plasma, vereinigen sich hinter dem Plasmaröhrchen mit dem Spülgas für das Spektrometerfenster und verlassen den Hohlraumresonator durch den Ausgang (cavity vent). Bei den Untersuchungen wurde der Gasfluss je nach dem eingespritzten Lösungsmittel 5 bis 8,5 min lang umgekehrt, so dass das Eluat etwa 0,5 – 1,5 min vor der Elution des ersten Stoff-Peaks wieder in das Plasma gelangte.

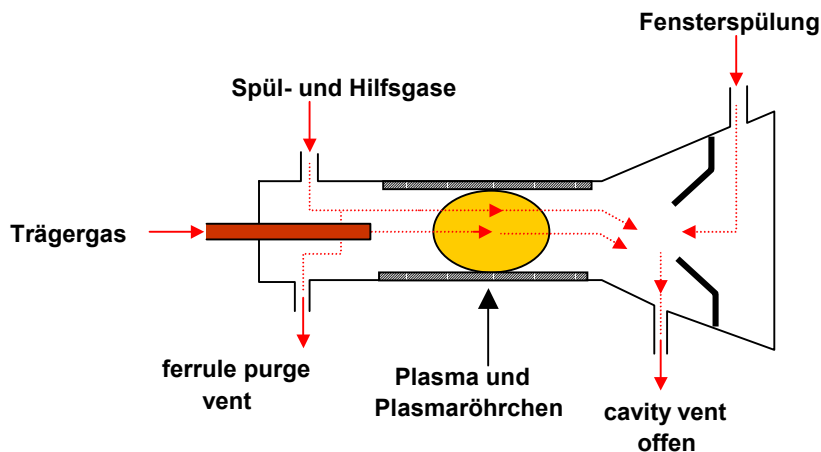


Abb. 11: Solvent venting ausgeschaltet

3.4 Optimierung des AED

Zur empfindlichen Bestimmung von OZV müssen die Temperaturen von Cavity und Transferline sowie die Vordrücke von Helium und Hilfsgasen optimiert werden, denn die optimalen Werte hängen unter anderem auch von den Restriktoren, dem Gasdruck und der Mikrowellenleistung ab. Bei den Messungen mit dem HP 5921 A wurden die Einstellungen aus den Empfehlungen des Herstellers und Literaturangaben übernommen. Die Temperaturen waren bei der Cavity 230 °C und bei der Transferline 270 °C; die Vordrücke waren für Wasserstoff 5 bar und für Sauerstoff 1,5 bar und der Fluss von Helium 200 ml/min.

Beim Arbeiten mit dem HP 2350 A wurden die Einstellungen für den verwendeten Geräteaufbau optimiert. Orientierungshilfe gaben die Empfehlungen des Herstellers, die 180 ml/min Helium, 1,7 bar Sauerstoff-Vordruck und 1,0 bar Wasserstoff-Vordruck vorsahen. Da die eingespritzten Standard-Lösungen (0,1 µg/ml oder 10 µg/ml) ausreichend hoch konzentriert waren, wurden die Zinn-Linien 301 und 303 nm gemessen, aber nur die Linie 303 nm ausgewertet.

3.4.1 Temperaturen

Weil alle Temperaturprogramme zur GC-Trennung bei 300 °C endeten, wurde die Transferline ebenfalls auf 300°C erhitzt, um alle getrennten Stoffe in den Detektor zu bringen. Die Temperatur der Cavity wurde mit folgenden Gasströmungen optimiert: 1,5 ml/min Trägergas Helium, 0,5 bar Wasserstoff-Vordruck, 1,4 bar Sauerstoff-Vordruck und 180 ml/min Spülgas Helium.

Dazu wurde 1 µl einer Lösung der vier Tetraalkyl-OZV Trimethylphenylzinn (Me₃PhSn), Tetrabutylzinn (Bu₄Sn), Tetrapentylzinn (Pe₄Sn) und Tetraphenylzinn (Ph₄Sn) in Aceton (jeweils etwa 0,1 ng/µl Sn) ohne Derivatisierung zur GC eingespritzt und an der Kapillarsäule DB-5 getrennt; das Eluat wurde in den AED geleitet. Die Trenntemperatur wurde nach 2 min bei 40 °C mit 30 °C/min auf 140 °C, dann mit 1 °C/min auf 160 °C und weiter mit 15 °C/min auf 300 °C erhöht. Die ersten 2 min wurde splitlos gemessen, danach mit einem Split-Fluss von 20:1.

In Vorversuchen wurde der Einfluss der Temperatur der Cavity zwischen 240 °C bis 360 °C in Schritten von 30 °C untersucht. Die Peakflächen können an verschiedenen Tagen je nach dem Verschmutzungsgrad des Injektors, der Säule und des Plasmaröhrchens bis zu 30 % voneinander abweichen. Um solche Schwankungen auszuschalten, wurden in drei Messreihen die Peakflächen für jeden Stoff bei den fünf Temperaturen summiert und die Summe gleich 100 % gesetzt; dann wurde für jeden Stoff der prozentuale Anteil der Peakflächen berechnet. Die Mittelwerte sind in der oberen Hälfte von **Tabelle 4** wiedergegeben.

Tab. 4: Relative Peakflächen von vier Tetraalkyl-OZV bei Cavity-Temperaturen zwischen 240 °C und 360 °C (oben) und zwischen 310 °C und 340 °C (unten)

Cavity- Temperatur (°C)	relative Peakfläche (%)			
	Me ₃ PhSn	Bu ₄ Sn	Pe ₄ Sn	Ph ₄ Sn
240	14,7	14,3	14,0	13,4
270	17,2	15,5	15,7	17,7
300	21,5	22,5	22,8	22,2
330	25,0	25,5	25,5	24,0
360	21,7	22,3	22,1	22,7
310	14,7	13,6	13,9	14,0
315	15,5	15,0	15,3	15,0
320	15,4	15,7	15,6	15,7
325	15,0	15,1	15,0	14,8
330	13,6	14,1	13,9	13,9
335	12,8	13,1	13,1	13,4
340	13,1	13,4	13,2	13,3

Danach lag die größte Signalintensität für alle vier OZV im Bereich von 330 °C. Zur weiteren Eingrenzung wurde daraufhin der Bereich zwischen 310 °C und 340 °C in Schritten von 5 °C untersucht. Wie die untere Hälfte von **Tabelle 4** zeigt, lag das Maximum bei 320 °C. Die Werte liegen hier niedriger, da sie sich aus der Summe der relativen Peakflächen von sieben Temperaturen errechnen.

3.4.2 Wasserstoff und Sauerstoff

Zur Optimierung der Strömung der Detektorgase Wasserstoff und Sauerstoff wurde die DB-5-Säule bei 250 °C isotherm betrieben. Als Modell diente das mittelflüchtige Tetrapentylzinn (Pe_4Sn), das unter diesen Bedingungen schon nach 5 min eluiert wurde. Um zu vermeiden, dass das Lösungsmittel den Peak überdeckt, wurde nur 1 μl einer Pe_4Sn -Lösung in Aceton (etwa 10 ng/ μl Sn) bei einem Splitverhältnis von 100:1 eingespritzt, so dass nur ein sehr geringer Anteil in den Detektor gelangte. Die Temperatur der Cavity war 320 °C, die Flussrate des Spülgases Helium 180 $\mu\text{l}/\text{min}$. Für Sauerstoff wurden 1,4 bis 2,8 bar Vordruck und für Wasserstoff 0,5 bis 1,3 bar, jeweils in Schritten von 0,2 bar, untersucht. Alle Messungen wurden am selben Tag durchgeführt, um Veränderungen im System gering zu halten. Wie aus dem oberen Teil von **Tabelle 5** hervorgeht, ergab sich die größte Signalintensität von Pe_4Sn bei 2,0 bar Sauerstoff und 0,9 bar Wasserstoff. Daraufhin wurde der Bereich auf 1,88 bis 2,08 bar Sauerstoff und 0,78 bis 0,98 bar Wasserstoff eingegrenzt. Die dort erhaltenen Signalintensitäten sind im unteren Teil von **Tabelle 5** aufgetragen. Das Optimum lag bei 1,92 bar Sauerstoff und bei 0,94 bar Wasserstoff.

Tab. 5: Peakflächen für Pe_4Sn bei verschiedenen Vordrucken für Wasserstoff und Sauerstoff

H₂-Druck (bar)	O₂-Druck (bar)							
	1,4	1,6	1,8	2,0	2,2	2,4	2,6	2,8
0,5	66,2	65,5	85,1	91,9	101,7	107,5	110,5	102,8
0,7	70,7	93,2	102,8	117,0	113,8	122,2	125,1	127,4
0,9	87,9	97,4	91,9	135,5	130,9	131,8	131,6	125,3
1,1	81,5	105,5	114,9	110,1	130,0	130,0	128,3	114,9
1,3	81,1	85,8	97,4	109,4	111,3	120,6	105,1	110,1
		1,88	1,92	1,96	2,00	2,04	2,08	
0,78		126,0	130,1	132,0	137,6	136,6	132,1	
0,82		132,5	133,2	132,6	129,5	126,1	123,8	
0,86		137,3	137,7	144,2	147,2	130,8	131,8	
0,90		122,0	135,4	134,4	135,5	132,3	129,7	
0,94		151,2	154,6	145,1	143,0	140,6	139,1	
0,98		143,7	137,5	135,8	136,6	135,0	133,7	

3.4.3 Helium

In der Bedienungsanleitung des Gerätes werden zur Bestimmung von Zinn mindestens 180 ml/min Helium als Make-up Gas empfohlen. Bis auf die Dichtungsspülung wird die Flussrate aller Gase am Ausgang des Hohlraumresonators mit einem Blasenähler bestimmt. Zur Messung des tatsächlichen Flusses von Helium muss deshalb die Zufuhr an Wasserstoff und Sauerstoff abgestellt werden. Untersucht wurde der Bereich zwischen 180 und 260 ml/min in Schritten von 20 ml/min. Die Cavity-Temperatur war 320 °C, der Vordruck an Wasserstoff 0,94 bar und an Sauerstoff 1,92 bar. Die Mittelwerte der relativen Peakflächen für Pe_4Sn aus 3 Messreihen sind in **Abbildung 12** dargestellt. Danach lag das Optimum bei 220 ml/min.

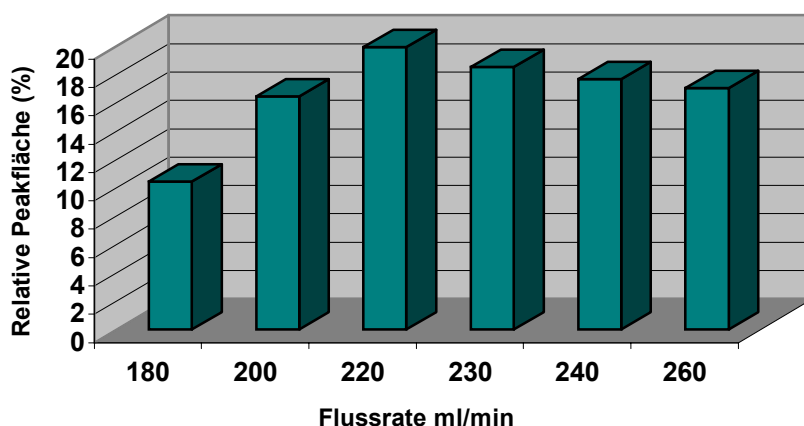


Abb. 12: Peakflächen für Pe_4Sn bei verschiedenen Flussraten für das Spülgas Helium

3.5 Auswertung der Ergebnisse

Wie bereits in Abschnitt 3.2 erwähnt, wurden die OZV-Derivate am besten an der Kapillarsäule DB-5 getrennt. Das Eluat wurde durch die Transferline (300 °C) in den AED 2350 A geleitet, der mit 320 °C Cavity-Temperatur, einem Wasserstoff- und Sauerstoff-Vordruck von 0,94 bar bzw. 1,92 bar und 220 ml/min Helium betrieben wurde.

Zur Kalibrierung wurden acht Kalibrierlösungen hergestellt, in denen die je vier mono- bis tetrasubstituierten Butylzinn- und Phenylzinn-Verbindungen sowie die mono- bis trisubstituierten Octylzinn-Verbindungen jeweils die gleiche Konzentration von etwa 0,01, 0,02, 0,05, 0,1, 0,2, 0,5, 1 und 2 $\mu\text{g/ml}$ Sn hatten. Jede Kalibrierlösung enthielt außerdem etwa 0,5 $\mu\text{g/ml}$ Sn der inneren Standards HeSnCl_3 , He_2SnCl_2 , Pr_3SnCl und des Wiederfindungsstandards Pe_4Sn .

Zur Messung wurde jeweils eine Messreihe zusammengestellt, die aus den acht Kalibrierlösungen, den Analysenlösungen, einer Standardlösung zur Kontrolle der Geräteempfindlichkeit und n-Hexan bestand. Dieser Standard zur Gerätekontrolle enthielt je etwa 0,1 $\mu\text{g/ml}$ Sn von Me_3PhSn , Bu_4Sn , Ph_4Sn und Pe_4Sn ; er wurde am Anfang und am Ende der Messreihe eingespritzt und stellte

sicher, dass die Empfindlichkeit (insbesondere nach mehr als 30 Einspritzungen) nicht abgenommen hatte. Die acht Kalibrierlösungen waren in aufsteigender Konzentration (beginnend mit der geringsten) gleichmäßig über die Messreihe verteilt. Dabei wurden jeweils zwei oder drei Kalibrierlösungen nacheinander eingespritzt, dann einmal n-Hexan, gefolgt von höchstens sechs Analysenlösungen und wieder n-Hexan. Das n-Hexan war erforderlich, weil mehr als $0,5 \mu\text{g/ml Sn}$, insbesondere bei Ph_4Sn , leicht verschleppt wurden und weil sonst Begleitstoffe aus den Analysenlösungen möglicherweise die folgende Messung beeinträchtigten.

Da einige OZV im Messbereich von $0,01$ bis $2 \mu\text{g/ml Sn}$ nicht linear angezeigt wurden, wurden die Peaks mit einer Kalibrierfunktion 2. Ordnung ohne Achsenabschnitt ausgewertet. Als innerer Standard diente HeSnCl_3 für die monosubstituierten OZV, He_2SnCl_2 für die disubstituierten und Pr_3SnCl für die tri- und tetrasubstituierten OZV.

Die Auswertung über einen inneren Standard mit einer Kalibrierfunktion, die man durch Regressionsanalyse erhält, lässt sich aus einer Kalibration ohne inneren Standard (externe Kalibration) ableiten. Bei der externen Kalibration wird der Response des zu bestimmenden Stoffes (Größe der y-Achse) gegen seine Konzentration (Größe der x-Achse) aufgetragen und aus der Lage der Punkte eine Kalibrierfunktion ermittelt. Der Response eines Stoffes wird jedoch durch mehrere Faktoren beeinflusst und kann stark schwanken. Dazu gehören z.B. Derivatisierungsreaktionen, Verluste bei der Aufarbeitung oder Schwankungen des Systems während der Messung. Bei der Kalibration ist der Einfluss noch vergleichsweise gering, weil dabei meist eine verkürzte Arbeitsweise angewandt wird, bei der Aufarbeitung und Messung von Substraten mit einer schwierigen Matrix kann das Ergebnis aber erheblich beeinträchtigt werden.

Bei der Kalibration mit einem innerem Standard wird dagegen der Quotient aus dem Response von Stoff und Standard gebildet, der im Idealfall stets im gleichen Verhältnis proportional zur Konzentration des Stoffes ist. Diese Proportionalität bleibt auch bei Störungen in der Analysenlösung erhalten und ermöglicht damit eine sehr gute Fehlerkorrektur. Als weitere Größe muss die Konzentration des inneren Standards bei der Auswertung mit einbezogen werden, denn erst wenn dem Quotient aus dem Response von Stoff und Standard ein bestimmtes Verhältnis der Konzentration von Stoff und Standard zugeordnet werden kann, ist eine eindeutige Gehaltsbestimmung möglich. Meist wird dabei der Quotient $\text{Response}_{\text{Analyt}}/\text{Response}_{\text{IS}}$ gegen den Quotienten $\text{Konzentration}_{\text{Analyt}}/\text{Konzentration}_{\text{IS}}$ graphisch aufgetragen. Eine solche Zuordnung hat aber den Nachteil, dass die Achsen mit zwei dimensionslosen Größen bezeichnet werden. Erst die Multiplikation beider Quotienten mit der Konzentration des inneren Standards führt zu einem anschaulichem Diagramm, bei dem die x-Achse wie bei der externen Kalibration die Dimension einer Konzentration erhält. Die y-Achse mit dem Quotient $\text{Response}/\text{Response}$ erhält dadurch ebenfalls die Dimension einer Konzentration, wird dann aber als relative Konzentration definiert.

Bei der Auswertung wurde zunächst die relative Konzentration y_K einer OZV in jeder der acht Kalibrierlösungen im Vergleich zum inneren Standard berechnet. Diese Werte wurden für jede OZV graphisch gegen die zugehörigen Konzentrationen in den Kalibrierlösungen aufgetragen und der quadratische und lineare Koeffizient der Kalibrierfunktion durch Regressionsanalyse ermittelt.

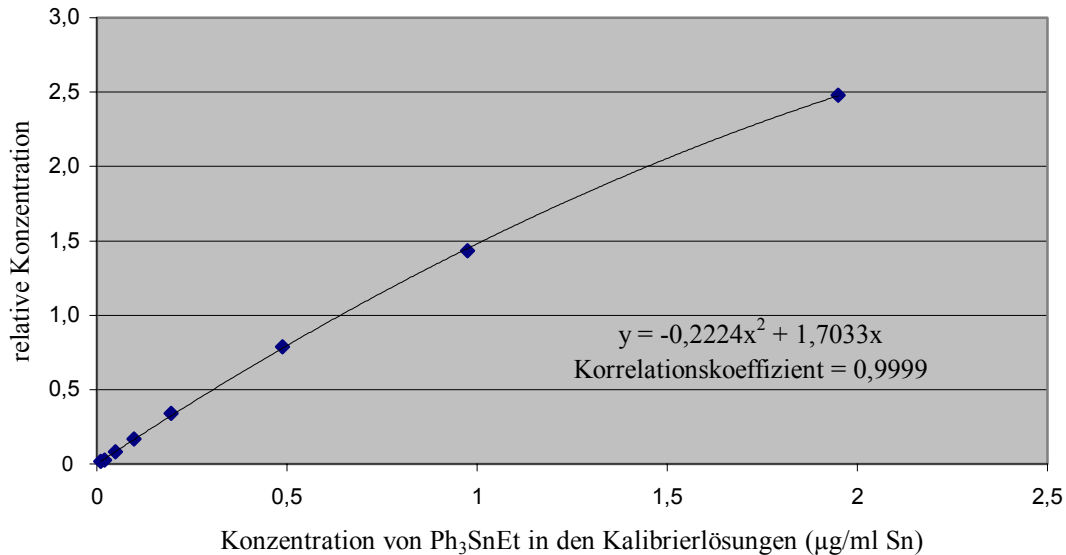


Abb. 13: Beispiel einer Kalibrierfunktion für Ph_3SnEt

Abbildung 13 zeigt beispielhaft die Kalibrierfunktion für Ph_3SnEt . Der quadratische Koeffizient (a) hat darin einen Wert von $-0,2224$, der lineare (b) einen von $1,7033$.

Zur Berechnung des Gehaltes einer OZV in einer Analysenlösung wurde darin ebenfalls zunächst die relative Konzentration y_A mit den zugehörigen Werten aus der Messung ermittelt. Indem die Werte für y_A , a und b in die nach x aufgelöste Formel der Kalibrierfunktion 2. Ordnung einsetzt wurden und das Ergebnis durch die Einwaage (g) geteilt wurde, ergab sich daraus der Gehalt der OZV (in ng/g Sn) in der untersuchten Analysenprobe (Abschnitt 9.5).

Zusätzlich wurde die Wiederfindung der drei inneren Standards über Pe_4Sn berechnet und bei der Erarbeitung der Methode immer dann zur Beurteilung der Ergebnisse herangezogen, wenn sich große Abweichungen bei deren Wiederfindung ergaben. In vielen Fällen waren damit die Abweichungen als Störung des inneren Standards erkennbar.

4 Festphasen-Mikroextraktion (solid phase microextraction, SPME)

Methoden zur Bestimmung von OZV bestehen meist aus zahlreichen Arbeitsschritten und die dabei erforderlichen Arbeitsweisen sind oft sehr aufwendig. Um den Arbeitsaufwand so gering wie möglich zu halten, besteht daher bei der Erarbeitung neuer Methoden eine starke Tendenz, einzelne Schritte zu kombinieren. Die Festphasen-Mikroextraktion (solid phase microextraction, SPME) bietet diese Möglichkeit, denn Extraktion und Derivatisierung können nebeneinander stattfinden und die Reinigung des Extraktes entfällt durch gleichzeitige Sorption der zu bestimmenden Stoffe an einer Festphase. Da lösungsmittelfrei gearbeitet werden kann und keine Analysenlösung eingespritzt wird, werden außerdem die Kapillartrennsäulen bei der GC und die Detektoren geschont.

Die Bestimmung von Organometall-Verbindungen durch Extraktion mit SPME [38] ist schon häufiger durchgeführt worden. OZV wurden dabei hauptsächlich in Wasser [39, 40] und Sedimenten [39, 41] untersucht, in Fischgewebe dagegen eher Organoquecksilber-Verbindungen [42]. Bei den OZV beschränkte sich die Bestimmung außerdem meist auf eine kleinere Auswahl an Stoffen dieser Klasse. In der eigenen Arbeit sollte daher die Extraktion einer breiten Auswahl an OZV durch SPME aus Fisch- und Muschelgewebe erprobt werden. In die Untersuchungen wurden die mono- bis tetrasubstituierten Butylzinn- und Phenylzinn-Verbindungen, Dioctylzinn-dichlorid (Oc_2SnCl_2) sowie als mögliche innere Standards Monoheptylzinn-trichlorid (HeSnCl_3), Diheptylzinn-dichlorid (He_2SnCl_2) und Tetrapentylzinn (Pe_4Sn) einbezogen. Gemessen wurde nach gaschromatographischer Trennung ausschließlich mit dem AED Modell HP 5921 A (Kohlenstoff-Linie 248 nm, Zinn-Linie 271 nm).

4.1 Prinzip

Die SPME-Technik verwendet eine wenige Zentimeter lange, chemisch inerte und thermisch stabile Quarzglas-Faser (SPME-Faser), die mit verschiedenen Sorbentien unterschiedlicher Filmdicke beschichtet sein kann (z.B. Polydimethylsiloxan, Polyacrylat, Carbowax). Die Faser ist auf der Spitze eines dünnen Stahlstiftes angebracht, der wiederum in einer farbigen Kunststoffverschraubung befestigt ist. Die Farbe dieser Verschraubung gibt an, mit welchem Sorbens die Quarzglas-Faser beschichtet ist. Der untere Teil des Stahlstiftes wird zum Schutz der Faser von einer Injektionsnadel umgeben, die stark genug ist, ein Septum zu durchstoßen. Sie ist an einer Messinghalterung befestigt und schließt zum Stahlstift hin durch eine Dichtung gasdicht ab. Die Messinghalterung ist wiederum durch eine Drahtfeder an der Kunststoffverschraubung befestigt, die dafür sorgt, dass die ausgefahrene Faser wieder elastisch in die Injektionsnadel zurückgleitet. **Abbildung 14 c** zeigt diese spezielle Konstruktion mit ausgefahrener SPME-Faser.

Die SPME-Faser wird in einen speziellen Faserhalter eingebaut, der die Handhabung vereinfacht und sie korrekt positioniert. Er kann dabei wie eine gewöhnliche GC-Spritze verwendet werden. **Abbildung 14 a** zeigt den Aufbau des Faserhalters zur manuellen Injektion in einen Gaschromatographen und **14 b**, wie die SPME-Faser darin befestigt ist. Der Halter besteht aus einem Stahlgehäuse, einem schwarzen Kunststoffkolben, einer verstellbaren, nadelführenden Tiefeneinstellung und einer Rückhalteschraube. Mit dem Kolben wird die Drahtfeder bewegt, die SPME-Faser ausgefahren und durch die Rückhalteschraube in einer bestimmten Position (Z-Schlitz) fixiert. Durch das Drehen der Tiefeneinstellung auf- oder abwärts wird die optimale Eintauchtiefe auf einer Skala von 1 - 5 am Gehäuse des Faserhalters festgelegt, mit der die ausgefahrene Faser z.B. in die Probe eintaucht.

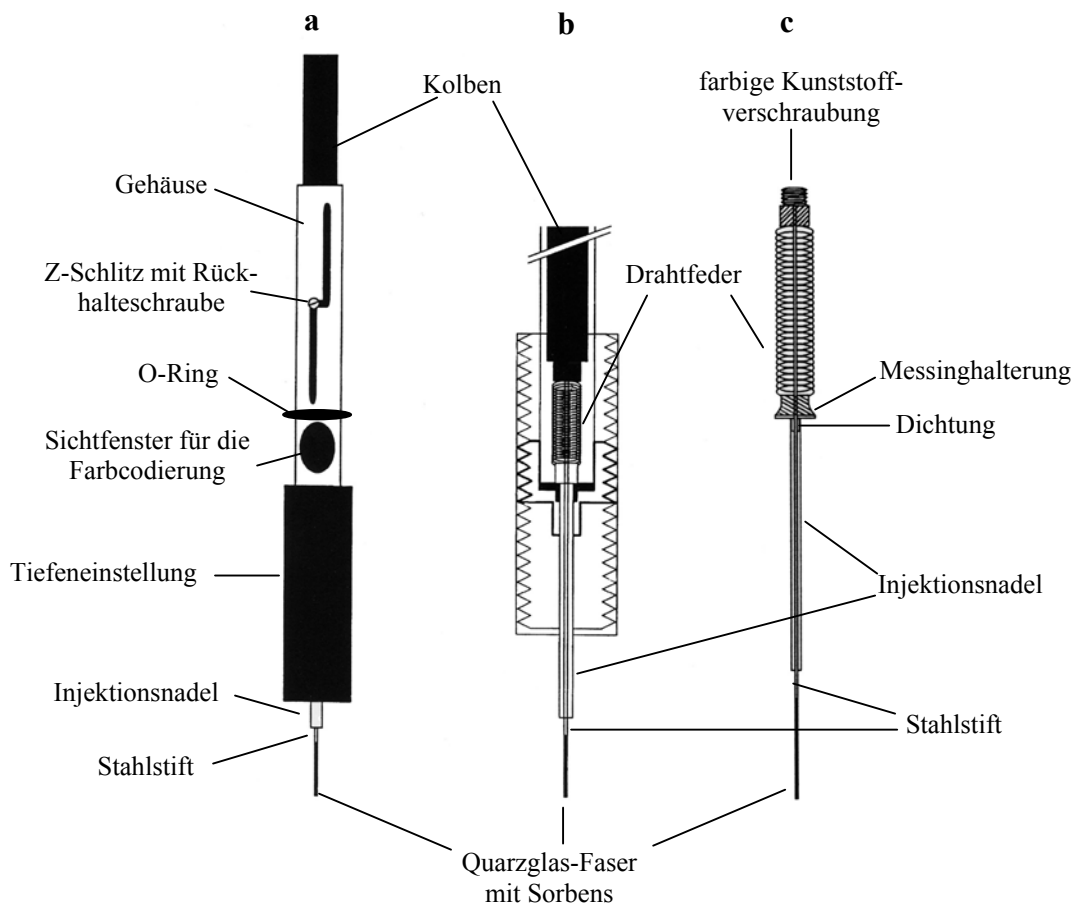


Abb. 14: Faserhalter mit SPME-Faser zur manuellen Injektion (a), Ausschnitt aus dem unteren Teil des Faserhalters mit darin befestigter SPME-Faser (b), Aufbau der SPME-Faser, Faser ausgefahren (c)

Die SPME besteht im wesentlichen aus zwei Schritten: der Extraktion und der thermischen Desorption der extrahierten Stoffe im Messsystem. Beim ersten Schritt werden die Stoffe entweder durch direkten Kontakt mit der flüssigen oder suspendierten Probe (Immersion-SPME) oder durch Eintauchen in die gasförmige Phase darüber (Headspace-SPME) extrahiert. In beiden Fällen durch-

sticht man mit der Injektionsnadel das Septum des Probengefäßes, fährt die Nadel durch eine Abwärtsbewegung des Kolbens am Faserhalter aus und optimiert mit der Tiefeneinstellung die Eintauchtiefe. Für spätere Messungen kann die optimierte Tiefe mit einem O-Ring markiert werden. Die Stoffe werden bei der SPME jedoch nicht vollständig extrahiert, sondern es stellt sich ein Verteilungsgleichgewicht zwischen dem gelösten und dem sorbierten Anteil nach folgender Formel ein [43]:

$$n = \frac{K \cdot V_1 \cdot V_2 \cdot c}{K \cdot V_1 + V_2} \quad (\text{Gleichung 1})$$

Darin bedeuten:

n : Anzahl der an der Faser sorbierten Moleküle

K : Verteilungskoeffizient (Sorbens/Probe)

V_1 : Volumen des Sorbens

V_2 : Volumen der Probe

c : Konzentration des Stoffes in der Probe vor der Extraktion

Ist das Volumen V_2 viel größer als das Produkt aus $K \cdot V_1$, kann Gleichung 1 vereinfacht werden. In diesem Fall hängt die sorbierte Menge des Stoffes nicht mehr vom Volumen der Probe ab [43]:

$$n = K \cdot V_1 \cdot c \quad (\text{Gleichung 2})$$

Beim zweiten Schritt wird die Faser in die Injektionsnadel eingezogen, der Faserhalter aus dem Probengefäß entfernt und direkt in den heißen Injektor des Gaschromatographen eingeführt. Dort werden die extrahierten Stoffe von der SPME-Faser desorbiert und auf die Trennsäule überführt.

4.2 Vorbereitung und Verwahrung der SPME-Faser

Jede SPME-Faser muss vor dem ersten Gebrauch konditioniert werden, um mögliche Rückstände zu entfernen. Diese können z.B. vom Klebstoff stammen, mit dem die Faser am Stahlstift befestigt ist. Die vom Hersteller empfohlenen Konditionierungsbedingungen liegen der Faser in der Gebrauchsanleitung bei. Für eine Faser, die mit Polydimethylsiloxan (PDMS), 100 µm Filmdicke, beschichtet ist, werden z.B. 1 h bei 250 °C angegeben, wobei längere Konditionierungszeit die Fasereigenschaften nicht beeinträchtigen [44].

In der eigenen Arbeit wurde eine 1 cm lange PDMS-Faser (100 µm Filmdicke) verwendet und jede neue Faser vor dem ersten Gebrauch über Nacht bei geöffnetem Split und eingeschaltetem

Solvent venting (Abschnitt 3.3) konditioniert. Dazu wurde der Faserhalter mit der SPME-Faser in den 250°C heißen Injektor des Gaschromatographen eingeführt und die Faser mit einer Eintauchtiefe von 2,6 Skalenteilen ausgefahren. Der Faserhalter wurde dabei von einem speziellen Injektor-Aufsatz (SPME Inlet Guide) gesichert. Nach der Konditionierung wurde die Faser aus dem Injektor entfernt und die Trennsäule weitere 30 min bei 300 °C ausgeheizt.

Um zu überprüfen, ob die Faser frei von Rückständen war, wurde auf jeden Fall nach der Konditionierung und danach vor jeder Versuchsreihe ein Faser-Blindwert aufgenommen. Dazu wurde der Faserhalter in den Injektor des Gaschromatographen eingeführt, die Faser ausgefahren und das GC-AED-Programm gestartet, mit dem auch die OZV bestimmt wurden (Abschnitt 3.2: GC-Trennbedingungen, Anfangstemperatur 40 °C, Abschnitt 3.4: Bedingungen für den AED 5921 A). Waren keine Peaks zu sehen, wurde die erste Extraktion durchgeführt, ansonsten wurde die Faser weitere 30 min konditioniert.

Wenn die Faser nicht gebraucht wurde, wurde sie unter Stickstoff aufbewahrt, um die Sorption von Stoffen aus der Raumluft zu vermeiden.

4.3 Optimierung von SPME-Parametern zur Bestimmung von OZV in wässriger Phase

Einige der OZV sind aufgrund ihres hohen Molekulargewichtes und den dadurch bedingten hohen Siedepunkten nur wenig flüchtig; Ph_4Sn ($M = 427,1 \text{ g/mol}$) hat z.B. einen Siedepunkt von $> 420^\circ\text{C}$. Daher wurde nicht erwartet, dass sich alle OZV mit der Headspace-SPME bestimmen lassen, und die Untersuchungen beschränkten sich auf die Immersions-SPME.

Die Verteilung der Stoffe zwischen Sorbens und Probe wird durch mehrere Parameter beeinflusst. Dazu gehören z.B. Extraktionszeit, Temperatur, pH-Wert, Geschwindigkeit des Rührvorganges beim Durchmischen der Probe und die Ionenkonzentration. Von diesen Parametern wurden Extraktionszeit, Temperatur und pH-Wert näher untersucht. Bei der dabei angewandten Arbeitsweise wurden 5,0 ml entionisiertes Wasser, 3,0 ml Acetat-Pufferlösung (pH 5,0), 1,0 ml gesättigte Natriumsulfat-Lösung, 0,1 ml SPME-Standardlösung, 0,2 ml Natriumtetraethylborat-Lösung (0,01 g/ml in Wasser) und ein mit Teflon beschichtetes Magnetührstäbchen in das Probengefäß gegeben und sofort mit einer Bördelkappe verschlossen. Das Gefäß mit dieser Extraktionslösung wurde in einen Metallblock gestellt, der auf der Heizplatte eines Magnetührers stand. Die Geschwindigkeit des Rührvorganges wurde immer auf Stufe 6 des Magnetührers (635 min^{-1}) eingestellt. Die Natriumsulfat-Lösung wurde zugegeben, weil sich die Löslichkeit von Stoffen in wässriger Phase in der Regel durch die Zugabe von Salzen verringert (Aussalz-Effekt), so dass sie schließlich besser von der SPME-Faser sorbiert werden können [43], die Acetat-Pufferlösung, um den für die Derivatisierung notwendigen pH-Wert einzustellen. Bevor die SPME-Faser in die Ex-

traktionslösung eingetaucht wurde, wurde für die Derivatisierung eine Reaktionszeit von 5 min eingehalten.

Für die Desorption der Faser im Injektor des Gaschromatographen hat sich in der Literatur für OZV bei der Extraktion mit SPME aus Wasser und Sedimenten 1 min bei 250°C als geeignet erwiesen [39]. In der eigenen Arbeit wurde die Faser 10 min bei 270 °C desorbiert, um zu vermeiden, dass Rückstände an OZV durch unvollständige Desorption an der Faser blieben (Carryover-Effekt) [43].

4.3.1 Extraktionszeit

Um die notwendige Extraktionszeit zu ermitteln, wurden die OZV bei Raumtemperatur über einen Zeitraum von 10 bis 90 min in 10 min-Abständen extrahiert. Um Schwankungen durch Messung an verschiedenen Tagen auszuschließen (vgl. Abschnitt 3.4.1), wurden die Peakflächen in einer Messreihe von 10 bis 90 min für jede OZV summiert und gleich 100 % gesetzt. Dann wurde der prozentuale Anteil der Peakflächen (relative Peakfläche) für jede Zeit berechnet. Wie **Tabelle 6** zeigt, wird für die meisten der OZV das Verteilungsgleichgewicht etwa nach 60 min erreicht, denn danach nimmt die relative Peakfläche nicht mehr stark zu oder sie bleibt auf dem gleichen Niveau. Bei den weiteren Untersuchungen wird daher eine Extraktionszeit von 60 min zu Grunde gelegt.

Tab. 6: Zunahme der relativen Peakflächen (%) der OZV mit zunehmender Extraktionsdauer; Mittelwerte aus Mehrfachbestimmungen

OZV	relative Peakflächen (%)								
	10 min	20 min	30 min	40 min	50 min	60 min	70 min	80 min	90 min
BuSn ³⁺	7,7	8,4	8,9	13,7	13,3	13,6	13,0	10,3	11,2
HeSn ³⁺	8,1	8,6	8,7	10,6	11,8	11,8	13,6	11,4	13,3
PhSn ³⁺	3,1	4,4	6,6	9,9	13,3	13,8	15,3	15,8	17,9
Bu ₂ Sn ²⁺	5,4	6,8	8,1	12,5	13,4	12,7	13,6	12,4	15,2
He ₂ Sn ²⁺	7,8	7,9	9,5	10,5	10,5	12,9	14,1	13,1	13,6
Oc ₂ Sn ²⁺	7,8	7,7	9,3	10,4	10,3	13,3	14,6	13,2	13,4
Ph ₂ Sn ²⁺	4,6	6,1	8,1	9,6	13,3	14,4	14,2	14,7	15,0
Bu ₃ Sn ⁺	3,9	5,0	6,9	9,5	12,9	13,8	14,1	15,1	18,9
Ph ₃ Sn ⁺	3,0	4,7	7,8	8,9	12,9	15,4	15,0	15,6	16,8
Bu ₄ Sn	7,6	7,5	8,6	11,5	11,4	12,7	14,4	11,9	14,5
Pe ₄ Sn	7,8	7,9	9,4	10,5	10,4	13,2	14,5	13,0	13,3
Ph ₄ Sn	7,9	7,6	10,1	10,0	9,7	13,1	15,3	12,0	14,3

4.3.2 Temperatur

Die optimale Temperatur wurde über einen Bereich von 25 – 85 °C in Abschnitten von 15 °C ermittelt. Sie wurde durch ein digitales Kontaktthermometer mit Messfühler, das mit der Heizung des Magnetrührers verbunden war, reguliert. Die Temperatur, die überprüft werden sollte, konnte am Thermometer manuell eingegeben werden, und die Heizung des Magnetrührers heizte automatisch bis zu diesem Wert auf. Der Messfühler tauchte dabei in eine Lösung, die genauso zusammengesetzt war wie die Extraktionslösung und ebenfalls in dem Metallblock stand.

Die Werte für die relativen Peakflächen in **Tabelle 7** zeigen, dass sich die OZV bei den verschiedenen Temperaturen teilweise sehr unterschiedlich verhalten. Während für BuSn^{3+} , $\text{Ph}_2\text{Sn}^{2+}$, Ph_3Sn^+ und Ph_4Sn z.B. ein stetiger Anstieg zu verzeichnen ist, nimmt bei HeSn^{3+} und Bu_4Sn die relative Peakfläche mit steigender Temperatur ab; alle anderen OZV haben ein Maximum bei 40 oder 55 °C. Ein Mittelweg schien die Messung bei 55°C zu sein, daher wurden die folgenden Untersuchungen bei dieser Temperatur weitergeführt.

Tab. 7: Zunahme der relativen Peakflächen (%) der OZV mit steigender Temperatur; Mittelwerte aus Mehrfachbestimmungen

OZV	relative Peakflächen (%)				
	25 °C	40 °C	55 °C	70 °C	85 °C
BuSn^{3+}	15,0	15,9	19,1	22,7	27,4
HeSn^{3+}	27,2	23,4	21,1	15,0	13,3
PhSn^{3+}	13,3	21,1	24,9	23,1	17,6
$\text{Bu}_2\text{Sn}^{2+}$	19,7	18,8	19,6	18,7	23,1
$\text{He}_2\text{Sn}^{2+}$	19,7	22,8	20,0	17,6	19,9
$\text{Oc}_2\text{Sn}^{2+}$	16,7	21,7	23,5	17,6	20,5
$\text{Ph}_2\text{Sn}^{2+}$	11,5	17,1	20,9	24,8	25,8
Bu_3Sn^+	19,7	21,4	20,9	18,7	19,4
Ph_3Sn^+	7,8	13,6	19,3	27,0	32,4
Bu_4Sn	23,4	22,5	21,3	16,8	16,0
Pe_4Sn	17,4	22,9	20,8	17,9	21,1
Ph_4Sn	18,8	17,9	19,4	20,0	24,0

4.3.3 PH-Wert

Der pH-Wert beeinflusst die Sorption bei der SPME in der Weise, dass neutrale Stoffe besser von der nichtionischen, polymeren Faserbelegung extrahiert werden als ionische [43]. Da die OZV aber durch die Derivatisierung mit der Natriumtetraethylborat-Lösung bereits neutral vorliegen, gilt die

Überprüfung des pH-Wertes hier eher als Optimierung der Derivatisierungsbedingungen. Er wurde im Bereich von 3,0 bis 5,0 in Schritten von 0,5 variiert. Aus den Ergebnissen der **Tabelle 8** geht hervor, dass der günstigste pH-Wert bei 5,0 liegt.

Tab. 8: Zunahme der relativen Peakflächen (%) der OZV mit steigendem pH-Wert; Mittelwerte aus Mehrfachbestimmungen

OZV	relative Peakflächen (%)				
	pH 3,0	pH 3,5	pH 4,0	pH 4,5	pH 5,0
BuSn ³⁺	19,3	19,5	20,8	20,3	20,1
HeSn ³⁺	13,3	17,4	19,5	24,1	25,7
PhSn ³⁺	4,3	12,6	22,6	29,2	31,3
Bu ₂ Sn ²⁺	14,3	15,3	18,8	24,0	27,6
He ₂ Sn ²⁺	17,5	18,8	19,4	22,2	22,2
Oc ₂ Sn ²⁺	17,3	19,0	19,8	22,0	22,0
Ph ₂ Sn ²⁺	14,9	19,3	21,0	22,0	22,9
Bu ₃ Sn ⁺	18,6	18,0	18,5	20,0	25,0
Ph ₃ Sn ⁺	19,4	19,6	19,7	20,0	21,4
Bu ₄ Sn	22,3	18,3	17,5	20,9	21,0
Pe ₄ Sn	21,4	18,7	19,2	20,4	20,3
Ph ₄ Sn	23,3	19,3	17,8	19,1	20,6

4.4 Übertragung der optimierten Parameter auf die Bestimmung in Fischgewebe

Je etwa 1g homogenisiertes Forellenfilet wurde in einem Erlenmeyerkolben (50 ml) mit 10 ml Kaliumhydroxid-Lösung (25g/100g), methanolischer Kaliumhydroxid-Lösung (25g/100g) oder Salzsäure (37g/100g) versetzt, 15 min im Ultraschallbad und dann über Nacht stehen gelassen. 1 ml davon wurde mit 7 ml Acetat-Pufferlösung (pH 5,0), 1,0 ml gesättigte Natriumsulfat-Lösung, 0,1 ml SPME-Standardlösung, 0,2 ml Natriumtetraethylborat-Lösung (0,01 g/ml in Wasser) versetzt und die OZV mit der PDMS-Faser (100 µm Filmdicke) bei einer Rührrate von 635 min⁻¹ bei 55°C 60 min lang extrahiert. Obwohl die Versuche mehrmals durchgeführt wurden und die Standardlösung erst nach dem Aufschluss des Fischgewebes zugesetzt worden war, schwankten die Ergebnisse sehr stark. Vermutlich wurde die Sorption der OZV durch Begleitstoffe aus dem Forellenfilet so stark beeinträchtigt. Da es nicht sinnvoll ist, bei dem SPME-Verfahren einen Reinigungsschritt zu integrieren, wurden die Untersuchungen dazu auch mit schonenderen Aufschlussmethoden nicht weitergeführt.

5 Aufarbeitung von Fisch- und Muschelgewebe

5.1 Untersuchte OZV und Referenzmaterial

Zur Bestimmung von OZV in tierischem Gewebe, insbesondere in Fisch- und Muschelfleisch, müssen die gesuchten Stoffe zunächst aus der Matrix extrahiert und die Extrakte gereinigt werden. In diese Untersuchungen wurden die Butylzinn- und die Phenylzinn-Verbindungen in allen Alkylierungsstufen einbezogen, außerdem Monooctylzinn-trichlorid (OcSnCl_3), Dioctylzinn-dichlorid (Oc_2SnCl_2) und Trioctylzinn-chlorid (Oc_3SnCl). Als innere Standards dienten Monoheptylzinn-trichlorid (HeSnCl_3), Diheptylzinn-dichlorid (He_2SnCl_2) und Tripropylzinn-chlorid (Pr_3SnCl), als Wiederfindungsstandard Tetrapentylzinn (Pe_4Sn).

Als Untersuchungsmaterial mit natürlich gewachsenen Gehalten an OZV wurde das Referenzmaterial CRM 477 (gefriergetrocknetes Muschelgewebe) verwendet. Die darin enthaltenen Miesmuscheln stammten aus dem Hafen von La Spezia in Ligurien (Italien) und waren durch den starken Schiffsverkehr und durch Werftarbeiten mit OZV belastet [45]. Das Pulver enthält mono-, di- und trisubstituierte Butylzinn- und Phenylzinn-Verbindungen, von denen aber nur die Gehalte für Monobutylzinn (BuSn^{3+}), Dibutylzinn ($\text{Bu}_2\text{Sn}^{2+}$) und Tributylzinn (Bu_3Sn^+) zertifiziert sind.

5.2 Komplexierung

Die meisten OZV liegen in tierischem Gewebe weitgehend in ionischer Form als R_3Sn^+ , R_2Sn^{2+} oder RSn^{3+} vor. Beim einfachen Extrahieren mit einem organischen Lösungsmittel erhält man daher oft zu niedrige Ergebnisse, vor allem für mono- und disubstituierte OZV. Die Extraktionsausbeute wird jedoch höher, wenn ein Komplexierungsmittel zugesetzt wird. Die OZV bilden damit neutrale Komplexe, die in organischen Lösungsmitteln besser löslich sind [20, 30, 46].

Am häufigsten sind Tropolon und Diethyldithiocarbamate (DDC) verwendet worden, selten auch Dithizon [20, 47]. So ließ sich z.B. der Response von BuSn^{3+} auf der Zinn-Linie 271 nm beim AED durch Komplexierung mit Diethylammonium-diethyldithiocarbamat (DEA-DDC) um 120 %, bei di- und trisubstituierten OZV im Durchschnitt um 10 – 20 % steigern [30]. DDC war zwar in organischen Lösungsmitteln weniger stabil als Tropolon [31, 46], Tropolon extrahierte jedoch Begleitstoffe, die nach der Derivatisierung mit Natriumtetraethylborat die Detektion auf der Zinn-Linie 303 nm beim AED störten [46].

In den eigenen Versuchen wurden die OZV daher mit DEA-DDC komplexiert. Die Lösung, die 1,5 mg/ml oder 15 mg/ml DEA-DDC in Aceton enthielt, wurde täglich frisch hergestellt.

5.3 Vorversuche

Zur Bestimmung von OZV in Fisch- und Muschelgewebe sind bereits zahlreiche Verfahren erarbeitet worden. In allen Fällen wurde das frische oder getrocknete Substrat mit einem organischen Lösungsmittel extrahiert. Dafür sind vor allem n-Hexan, Benzol oder Dichlormethan, seltener auch Toluol, Ethylacetat/n-Hexan (3 + 2), Ethylacetat, Methanol oder andere Lösungsmittel herangezogen worden [20].

Da auch störende Begleitstoffe mitextrahiert werden, ist es üblich, den Extrakt zu reinigen und zwar in der Regel durch Säulenchromatographie (SC) an Kieselgel, Florisil oder Aluminiumoxid. Bei der Derivatisierung mit Natriumborhydrid, bei der flüchtige Hydride der OZV entstehen, wurde dagegen keine SC durchgeführt [20]. Auch bei einem Verfahren, in dem das Substrat mit einer Protease und einer Lipase während 24 h bei 37 °C teilweise hydrolysiert wurde, war der Extrakt nach Derivatisierung mit Methylmagnesiumchlorid rein genug zur Analyse [47].

In den eigenen Vorversuchen wurde die Eignung von Lösungsmitteln zur Extraktion der OZV überprüft. n-Hexan soll sich besonders gut für mehrere OZV nebeneinander eignen. Cyclohexan/Ethylacetat (1 + 1) ist noch nicht beschrieben worden; möglicherweise werden durch die höhere Polarität die mono- und disubstituierten OZV besser extrahiert. In den Vorversuchen wurde das gleiche Lösungsmittel, mit dem die OZV extrahiert wurden, auch zur Elution der Säule bei der Reinigung verwendet. Außerdem wurde untersucht, wie viel Lösungsmittel zur Extraktion und zur Elution einer Säule aus Florisil oder Kieselgel 60 notwendig sind. Florisil adsorbiert Lipide besonders gut [48] und eignet sich deshalb zur Entfernung restlicher Fette aus dem Extrakt.

Die Grundlage für die Untersuchungen der Vorversuche war das Referenzmaterial CRM 477. Außerdem wurde eine OZV-Standardlösung analysiert, die jeweils etwa 10 µg/ml Sn an mono- bis tetrasubstituierten Butylzinn- und Phenylzinn-Verbindungen und mono- bis trisubstituierten Octylzinn-Verbindungen enthielt. Sie sollte das Verhalten derjenigen OZV bei der Extraktion und der Reinigung überprüfen, die nicht in dem Referenzmaterial enthalten waren.

In allen folgenden Versuchen, die in Kapitel 5 beschrieben sind, wurde das Analysenmaterial mit 100 µl Lösung der inneren Standards versetzt, die je etwa 10 µg/ml Sn (ab Abschnitt 5.6 je 4 µg/ml Sn) von HeSnCl₃, He₂SnCl₂ und Pr₃SnCl in Aceton enthielt. Nach der Aufarbeitung wurden den Messlösungen vor der GC 100 µl Pe₄Sn-Lösung (10 µg/ml Sn in Aceton, 4 µg/ml Sn ab Abschnitt 5.6) als Wiederfindungsstandard zugegeben. Eingespritzt wurden jeweils 1 – 2 µl; die Signale wurden immer mit dem AED gemessen. Dotierungen wurden mit 50 µl oder 100 µl der OZV-Standardlösung vorgenommen (je 10 µg/ml Sn in Aceton).

5.3.1 Aufarbeitung der OZV-Standardlösung

Zunächst wurden 100 µl Standardlösung in Aceton zu 15 ml Acetat-Pufferlösung (pH 5,0) gegeben, um den optimalen pH-Wert zur Derivatisierung einzustellen. Die Mischung wurde mit 1 ml DEA-DDC-Lösung (1,5 mg/ml) versetzt, um die OZV zu komplexieren, und 15 min im Ultraschallbad stehen gelassen. Zur Derivatisierung der OZV wurden 0,2 ml Natriumtetraethylborat-Lösung in Aceton zugefügt. Die damit entstandenen Ethylderivate der OZV wurden zweimal mit 15 ml n-Hexan jeweils 15 min im Ultraschallbad ausgeschüttelt. Die vereinigten Hexanphasen wurden über Natriumsulfat getrocknet, im Rotationsverdampfer auf etwa 1 ml eingengt und auf eine Säule gebracht, die mit 3 g Florisil in n-Hexan gefüllt war. Die Derivate wurden in zwei Fraktionen jeweils zu 20 ml n-Hexan (Eluat 1 und 2) eluiert und beide Eluate auf 0,5 ml eingengt. Das Eindampfen zur Trockene wurde vermieden, weil dabei Verluste an den flüchtigen Derivaten zu befürchten sind [20].

Als zweites wurde die Standardlösung auf die gleiche Weise an Kieselgel 60 aufgearbeitet. In zwei weiteren Ansätzen wurden die OZV jeweils mit Cyclohexan/Ethylacetat (1 + 1) ausgeschüttelt und von der Säule aus Florisil oder Kieselgel mit Cyclohexan/Ethylacetat (1 + 1) eluiert. Nach der GC wurde mit dem AED die Kohlenstoff-Linie 264 nm und die Zinn-Linie 271 nm gemessen; die Ergebnisse für das Eluat 1 wurden um den zugehörigen Blindwert korrigiert.

Tab. 9: Prozentuale Wiederfindung der OZV bei der Aufarbeitung der Standardlösung mit n-Hexan oder Cyclohexan/Ethylacetat (1 + 1) und mit Florisil oder Kieselgel 60 (Eluat 1)

OZV	n-Hexan, Florisil	n-Hexan, Kieselgel	Cycloh./Ethylacetat, Florisil	Cycloh./Ethylacetat, Kieselgel
BuSn ³⁺	39	48	69	60
OcSn ³⁺	74	69	64	66
PhSn ³⁺	< 1	96	106	102
Bu ₂ Sn ²⁺	60	93	84	73
Oc ₂ Sn ²⁺	90	92	82	81
Ph ₂ Sn ²⁺	< 1	< 1	83	78
Bu ₃ Sn ⁺	128	111	85	94
Ph ₃ Sn ⁺	< 1	< 1	87	112
Oc ₃ Sn ⁺	237	102	82	105
Bu ₄ Sn	148	108	87	100
Ph ₄ Sn	< 1	< 1	101	127

Wie aus **Tabelle 9** hervorgeht, wurde in allen Fällen der größte Anteil der OZV-Derivate mit den ersten 20 ml Elutionsmittel eluiert. In den zweiten 20 ml waren nur noch 0 – 0,6 % zu finden, ausgenommen 13 % bei $\text{Ph}_2\text{Sn}^{2+}$ (n-Hexan, Kieselgel). Zur Elution der OZV von der Säule reichten also 20 ml Elutionsmittel aus.

Zur Bestimmung aller OZV war Cyclohexan/Ethylacetat (1 + 1) besser geeignet als n-Hexan. Mit n-Hexan wurde sowohl an Florisil als auch an Kieselgel kein $\text{Ph}_2\text{Sn}^{2+}$, Ph_3Sn^+ und Ph_4Sn wiedergefunden, bei n-Hexan/Kieselgel auch kein PhSn^{3+} . Außerdem waren die Ergebnisse mit n-Hexan/Florisil für Bu_3Sn^+ (128 %), für Bu_4Sn (148 %) und Oc_3Sn^+ (237 %) wesentlich zu hoch.

Um die Vollständigkeit des Ausschüttelns zu überprüfen, wurde jeweils die wässrige Phase noch ein drittes Mal mit 15 ml n-Hexan bzw. Cyclohexan/Ethylacetat (1 + 1) ausgeschüttelt, die organische Phase getrocknet und auf 0,5 ml eingengt. Darin fanden sich nur noch 0 - 1,9 % OZV, so dass das Ausschütteln mit zweimal 15 ml ausreichte.

5.3.2 Aufarbeitung des Referenzmaterials CRM 477

Etwa 0,5 g des Referenzmaterials wurden in einem Zentrifugenglas wie die OZV-Standardlösung mit 15 ml Acetat-Pufferlösung (pH 5,0) und 1 ml DEA-DDC-Lösung (1,5 mg/ml) versetzt; die Mischung blieb 15 min im Ultraschallbad stehen. Ein solcher Aufschluss von Muschelpulver durch Ultraschall, allerdings in Methanol und mit Tropolon als Komplexbildner, ist bereits erfolgreich für BuSn^{3+} , $\text{Bu}_2\text{Sn}^{2+}$ und Bu_3Sn^+ angewendet worden [21]. Derivatisierung, Ausschütteln mit n-Hexan oder Cyclohexan/Ethylacetat, SC an Florisil oder Kieselgel und Bestimmung durch GC-AED waren die gleichen wie bei der OZV-Standardlösung.

In allen Fällen lag die Wiederfindung für BuSn^{3+} nur bei 10 - 20 %, für $\text{Bu}_2\text{Sn}^{2+}$ bei 23 - 40 % und für Bu_3Sn^+ bei 53 - 75 %. Die OZV wurden also durch die Behandlung mit Ultraschall allein nicht ausreichend extrahiert. Die Wirksamkeit der Reinigung des Extraktes an Florisil und Kieselgel konnte aber sehr gut verglichen werden.

Abbildung 15 zeigt Chromatogramme für das Arbeiten mit Cyclohexan/Ethylacetat und zwar an Kieselgel (a) und Florisil (b), beide von 7 – 35 min Retentionszeit. Dargestellt ist jeweils die Intensität der Kohlenstoff-Linie 264 nm (Messbereich 250 – 550 Flächeneinheiten) und der Zinn-Linie 271 nm (Messbereich 0 – 1600 Flächeneinheiten). Darunter ist jeweils das Chromatogramm der Zinn-Linie von 20 – 25 min auf den Messbereich 0 – 90 Flächeneinheiten vergrößert.

Die Kohlenstoff-Linie zeigte bei Kieselgel sehr große und breite Peaks bis zu 260 Einheiten, bei Florisil dagegen nur kleine von etwa 20 Einheiten. Die mitextrahierten Begleitstoffe, die das Kieselgel passiert haben, sind also durch Florisil entfernt worden. Wie die Ausschnitte von 20 – 25 min außerdem zeigen, wurde der Response auf der Zinn-Linie durch diese erheblich beeinträchtigt.

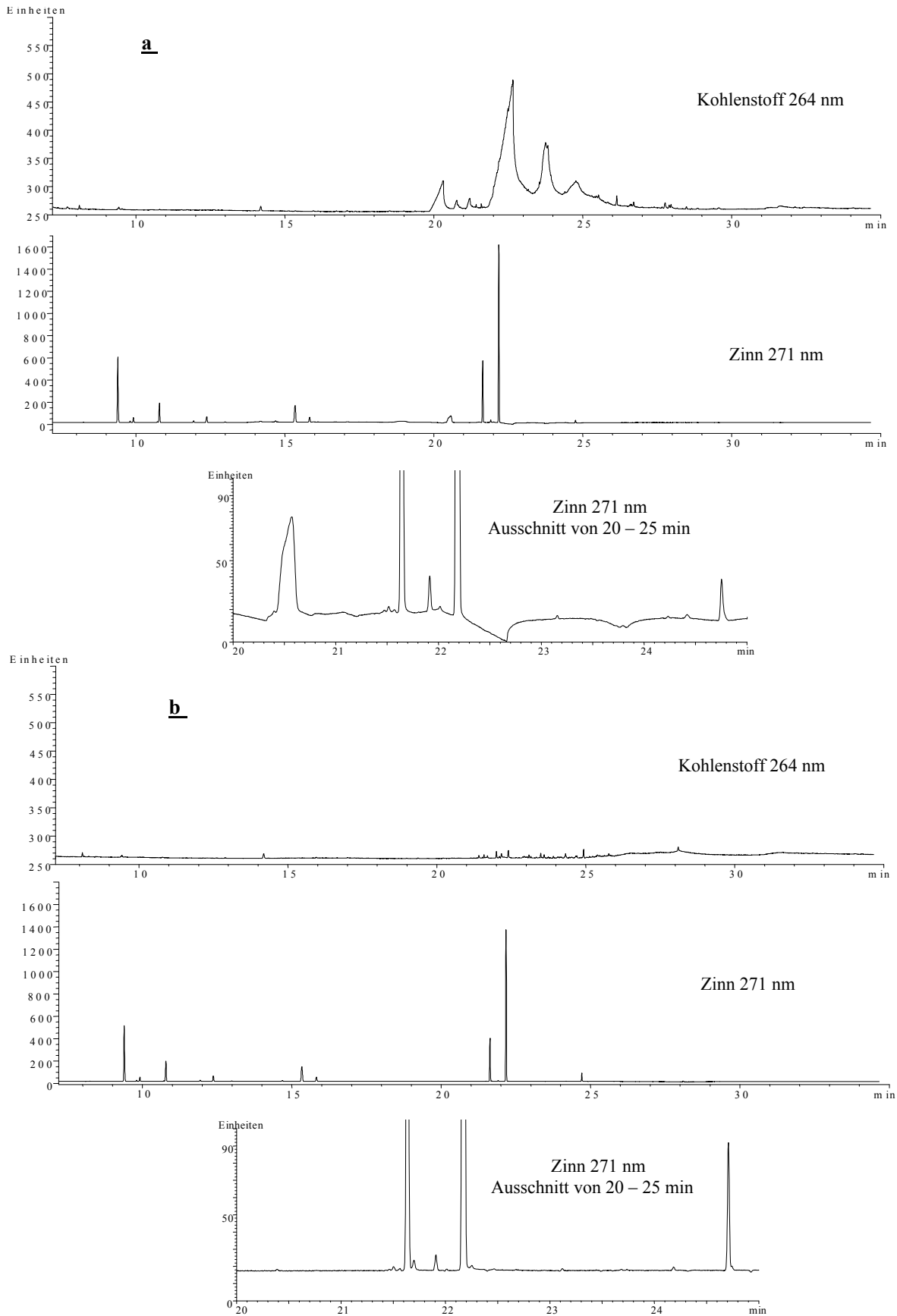


Abb. 15: Gaschromatogramme bei Reinigung des Referenzmaterials mit Cyclohexan/Ethylacetat (1 + 1) an Kieselgel 60 (a) und Florisil (b), darunter jeweils ein vergrößerter Ausschnitt von 20 – 25 min und dem Messbereich von nur 0 – 90 Flächeneinheiten.

Trennsäule DB-5 (60 m lang, i.D. 0,32 mm, Filmdicke 0,25 μ m), Temperaturprogramm 2 min 40 $^{\circ}$ C, mit 30 $^{\circ}$ C /min auf 140 $^{\circ}$ C, 1 $^{\circ}$ C/min auf 160 $^{\circ}$ C und 15 $^{\circ}$ C/min auf 300 $^{\circ}$ C, 10 min isotherm

Da schon die Untersuchungen an der OZV-Standardlösung ergeben hatten, dass zweimaliges Ausschütteln des wässrigen Extraktes ausreicht, wurde dies hier nicht nochmals überprüft.

Insgesamt erschien also Cyclohexan/Ethylacetat (1 + 1) gut geeignet, um die Ethylderivate aller OZV aus wässriger Lösung auszuschütteln und den Extrakt an einer Florisilsäule zu reinigen. Allerdings war eine Behandlung mit Ultraschall nicht ausreichend, um OZV-Rückstände aus Muschelgewebe freizusetzen.

5.4 Blindwerte

Die Blindwerte der Vorversuche hatten signifikante Signale der Ethyl-Derivate von BuSn^{3+} und $\text{Bu}_2\text{Sn}^{2+}$ ergeben. Sie lagen beim Arbeiten mit n-Hexan bei 5 ng bzw. 53 ng Sn, mit Cyclohexan/Ethylacetat (1 + 1) bei 11 ng bzw. 76 ng Sn. Sie konnten nur aus den Chemikalien oder von verschleppten OZV stammen, die an den Glasgeräten adsorbiert waren.

Zunächst wurden die Lösungsmittel und das Natriumtetraethylborat zur Derivatisierung überprüft. Dazu wurden 50 ml Aceton, n-Hexan oder Cyclohexan/Ethylacetat (1 + 1) jeweils mit 0,2 ml Natriumtetraethylborat-Lösung in Aceton, n-Hexan bzw. Cyclohexan/Ethylacetat (1 + 1) versetzt und im Rotationsverdampfer auf etwa 0,5 ml eingeeengt. Dies entsprach den Volumina, die bei der Aufarbeitung von Analysenlösungen verwendet wurden. Selbst wenn 2 μl davon eingespritzt wurden, waren in keiner Lösung OZV zu finden.

Als nächstes wurde die Acetat-Pufferlösung überprüft. 50 ml davon wurden mit 0,2 ml Natriumtetraethylborat-Lösung versetzt und zweimal 15 ml Cyclohexan/Ethylacetat (1 + 1) 15 min auf der Schüttelmaschine bei 300 min^{-1} geschüttelt. Die organischen Phasen wurden durch Natriumsulfat, in einem Glastrichter mit Glaswatte in einen Spitzkolben filtriert und auf 0,5 ml eingeeengt. Auf ähnliche Weise wurden außerdem nur die Oberflächen der verwendeten Glasgeräte abgespült.

Spalte A und B der **Tabelle 10** zeigen die Ergebnisse. Die hohen Werte für BuSn^{3+} (34,8 ng) und $\text{Bu}_2\text{Sn}^{2+}$ (334 ng) stammen demnach aus der Acetat-Pufferlösung. Da sie aus Natriumacetat p.a. und Essigsäure suprapur hergestellt worden war, wurde vermutet, dass der Blindwert aus dem entionisierten Wasser stammte. Es wird in einer Anlage hergestellt, zu der viele Behälter und Schläuche aus Kunststoffen gehören, die möglicherweise BuSn^{3+} und $\text{Bu}_2\text{Sn}^{2+}$ als Stabilisatoren enthalten.

In weiteren Versuchen wurde deshalb die Pufferlösung mit Leitungswasser hergestellt, das erst 15 min nach Öffnen des Hahns aus der Wasserleitung des Labors entnommen wurde. 50 ml davon wurden wiederum mit 0,2 ml Natriumtetraethylborat-Lösung versetzt und wie oben zweimal mit je 15 ml Cyclohexan/Ethylacetat (1 + 1) ausgeschüttelt; die getrockneten Phasen wurden wie-

derum auf 0,5 ml eingengt. Die Gehalte im Leitungswasser und in der daraus hergestellten Pufferlösung (Spalten C und D von **Tabelle 10**) waren sehr gering.

Tab. 10: Blindwerte (ng Sn) von Glasgeräten (A), des Acetat-Puffers mit entionisiertem Wasser (B), von Leitungswasser (C) und des Acetat-Puffers mit Leitungswasser (D) (Mittelwerte aus Doppelbestimmungen)

OZV	A	B	C	D
BuSn ³⁺	1,1	34,8	-	-
OcSn ³⁺	-	0,3	-	-
PhSn ³⁺	-	-	-	-
Bu ₂ Sn ²⁺	2,8	334,0	2,5	1,9
Oc ₂ Sn ²⁺	0,5	0,3	0,9	0,4
Ph ₂ Sn ²⁺	-	-	0,4	-
Bu ₃ Sn ⁺	-	-	-	-
Oc ₃ Sn ⁺	-	-	0,1	-
Ph ₃ Sn ⁺	0,5	0,5	0,5	0,5
Bu ₄ Sn	-	-	-	-
Ph ₄ Sn	-	-	0,2	-

- : < 0,1 ng Sn

Die geringen Mengen an OZV von 0,1 bis 2,8 ng Sn an den Glasgeräten (A) stammten wahrscheinlich von Adsorptionen aus früheren Analysen. Die Glasgeräte wurden daraufhin nur noch mit Leitungswasser, Aceton und Cyclohexan/Ethylacetat (1 + 1) gespült und bei 280 °C etwa 12 h ausgeheizt. Geeichte Glasgeräte wie Messkolben wurden über Nacht mit konzentrierter Salpetersäure stehen gelassen und mit Leitungswasser und Aceton gespült.

Später ergaben sich in einem anderen Zusammenhang auch hohe Blindwerte für PhSn³⁺ und Ph₂Sn²⁺, wenn die Pufferlösungen durch ein Faltenfilter (mit Pentan extrahiert) filtriert worden waren. Die Höhe der Blindwerte hing davon ab, wie viel Lösung durch das Filter filtriert oder wie hoch dieses benetzt wurde. Die OZV-Mengen darin wurden nicht näher untersucht, doch wurde daraufhin das Filtrieren vermieden und eine Pufferlösung nur noch zentrifugiert.

5.5 Untersuchung verschiedener Aufschlussverfahren

5.5.1 Übersicht über frühere Verfahren

Bevor Rückstände an OZV vollständig aus Fisch- und Muschelgewebe extrahiert werden können, müssen zunächst eventuelle Bindungen an Bestandteile des Substrates gespalten werden. Bei älteren

Arbeitsweisen, in denen kein solcher Aufschluss vorgesehen war, fielen daher die Ergebnisse meist zu niedrig aus. Wenn z.B. gefriergetrocknetes Muschelgewebe lediglich mit Pentylmagnesiumbromid in Diethylether mehrere Stunden unter Rückfluss gekocht und der Extrakt an Florisil gereinigt wurde, lag die Wiederfindung für BuSn^{3+} bei nur 28 - 29 %, für $\text{Bu}_2\text{Sn}^{2+}$ bei 20 - 27 % und für Bu_3Sn^+ bei 42 - 53 % [21].

Eine Aufschlussmöglichkeit besteht darin, das Untersuchungsmaterial mit konzentrierter Säure (Salzsäure, Bromwasserstoff) zwei Stunden [20, 49] oder länger [20, 21] zu erhitzen. Dabei wurde jedoch je nach den Reaktionsbedingungen ein Teil der OZV abgebaut [21, 29] oder die Derivatisierung mit Natriumtetraethylborat beeinträchtigt [29]. So konnten zwar mono- bis trisubstituierte Butylzinn- und Phenylzinn-Verbindungen nach Aufschluss von Muschelgewebe mit Bromwasserstoff (19 - 24 %) schon gut mit Dichlormethan extrahiert werden. Die Extraktion mit Pentan erforderte dagegen mehr als 34 % Bromwasserstoff, wodurch Triphenylzinn teilweise abgebaut wurde [49]. Auch mit konzentrierter Salzsäure wurde der Abbau von Tributyl- und Triphenylzinn zu den di- und monosubstituierten Derivaten beobachtet.

Der Einsatz von Ultraschall verkürzte den Aufschluss auf 15 bis 60 min [21] und konnte sogar die Säurebehandlung ersetzen. Dazu blieb z.B. gefriergetrocknetes Muschelgewebe mit einer Tropolon-Lösung (0,08 % in Methanol) 15 min im Ultraschallbad stehen und wurde mehrmals mit Methanol extrahiert. Der Extrakt wurde auf 1 ml eingeeengt, mit 10 ml n-Hexan versetzt, nochmals auf 1 ml eingeeengt, zum Derivatisieren mit Pentylmagnesiumbromid versetzt und an einer Florisilsäule gereinigt [21]. Die Ergebnisse waren vergleichbar mit einem Aufschluss mit Bromwasserstoff (1 h bei Raumtemperatur) [21].

Weniger gebräuchlich ist dagegen die alkalische Hydrolyse, meist mit ethanolischer Natron- oder Kalilauge (z.B. 1,8 oder 5 mol/l) [20] oder mit Tetramethylammoniumhydroxid (TMAH) 10, 20 oder 25 % [20].

Eine weitere Möglichkeit ist die enzymatische Hydrolyse mit einer Protease und einer Lipase bei 37 °C [20]. Sie ist z.B. an zertifiziertem Fisch- und dotiertem Muschelgewebe mit dem Aufschluss durch 5 ml TMAH (4 h, 60 °C) verglichen worden [29]. Dazu blieb 0,1 g Gewebe mit je 0,01 g Protease und Lipase 4 h bei 37 °C und pH 7,5 stehen. In beiden Fällen wurde mit Natriumtetraethylborat derivatisiert, mit n-Hexan extrahiert und der Extrakt an Aluminiumoxid gereinigt [29]. Wiedergefunden wurden enzymatisch 89 % $\text{Bu}_2\text{Sn}^{2+}$ und 93 % Bu_3Sn^+ , mit TMAH 91 % bzw. 94 %; mit TMAH waren die Ergebnisse für BuSn^{3+} (84 %) und Ph_3Sn^+ (72 %) etwas besser als enzymatisch (73 % bzw. 60 %). Beide Aufschlüsse ergaben jedoch weniger als 20 % PhSn^{3+} und $\text{Ph}_2\text{Sn}^{2+}$ [29].

Es ist offenbar schwierig, ein Aufschlussverfahren zu finden, das die unterschiedlich polaren OZV einheitlich aus einem Substrat herauslöst. Vorversuche hatten bereits gezeigt, dass gefrierge-

trocknetes Muschelgewebe mit Ultraschall allein nicht ausreichend aufgeschlossen wird und zu niedrige Werte ergibt. Deshalb wurden drei aussichtsreiche Aufschlussverfahren erprobt: die Behandlung mit Ultraschall in Gegenwart von Säure, die alkalische Hydrolyse mit Tetraethylammoniumhydroxid (TEAH), das bisher selten für Fisch- und Muschelgewebe verwendet worden ist, und die enzymatische Hydrolyse mit je einer Protease und Lipase als besonders schonendes Verfahren.

Wenn in der Literatur die Wiederfindungsraten für OZV aus Fischen oder Muscheln einfach so bestimmt wurden, dass man eine Standardlösung zu rückstandsfreiem Gewebe zugab, so war dies wenig realistisch, denn die OZV kommen auf diese Weise nur oberflächlich mit dem Substrat in Kontakt. Die Eignung einer Arbeitsweise für OZV-Rückstände lässt sich nur mit einem Untersuchungsmaterial feststellen, das natürlich gewachsene Gehalte an OZV besitzt. Für die eigenen Untersuchungen wurde daher ausschließlich das zertifizierte Referenzmaterial CRM 477 verwendet.

5.5.2 Aufschluss mit Säure und Ultraschall

Da Bromwasserstoff oder Salzsäure die OZV teilweise abbauen und die Derivatisierung mit Natriumtetraethylborat beeinträchtigen, wurde in der eigenen Arbeit Essigsäure (pKs: 4,75) erprobt. Dazu wurden etwa 0,5 g Referenzmaterial mit 10 ml Essigsäure (100 %) 15 min im Ultraschallbad stehen gelassen, das Gemisch mit 1 ml DEA-DDC-Lösung (1,5 mg/ml) versetzt und nochmals ins Ultraschallbad (15 min) gestellt. Die Suspension wurde mit Natronlauge auf pH 5,0 eingestellt, mit 0,2 ml Natriumtetraethylborat-Lösung versetzt und mit zweimal je 15 ml Cyclohexan/Ethylacetat (1 + 1) ausgeschüttelt. Die Mischung wurde jeweils 5 min bei 2500 min⁻¹ zentrifugiert. Die vereinigten und getrockneten organischen Phasen wurden auf 1 ml eingengt, auf eine Säule mit 3 g Florisil gegeben und mit zweimal 10 ml Cyclohexan/Ethylacetat eluiert; das Eluat wurde auf 0,5 ml eingengt. Gemessen wurden die Kohlenstoff-Linie 264 nm und die Zinn-Linie 271 nm.

Die Chromatogramme konnten jedoch nicht ausgewertet werden, denn die Signale der Zinn-Linie waren durch große Mengen an Begleitstoffen überlagert, die durch große Peaks im Chromatogramm der Kohlenstoff-Linie angezeigt wurden. Da ein Analysenverfahren angestrebt wurde, das möglichst wenig Arbeitsschritte umfasst, wurden keine weiteren Versuche unternommen, die Begleitstoffe durch weitere Reinigungsschritte zu entfernen.

5.5.3 Alkalischer und enzymatischer Aufschluss

Zur alkalischen Hydrolyse wurden etwa 0,5 g Referenzmaterial mit 2,5 ml TEAH-Lösung (25 % in Methanol) mit dem Vibrationsmischer gemischt und über Nacht bei Raumtemperatur stehen gelassen. Das Gemisch wurde mit 15 ml Acetatpuffer-Lösung (pH 5,0) verdünnt, mit 1 ml DEA-DDC-Lösung (1,5 mg/ml) versetzt und 15 min geschüttelt. Die Lösung wurde bei pH 5,0 mit 0,2 ml Na-

triumtetraethylborat-Lösung versetzt und mit zweimal je 15 ml Cyclohexan/Ethylacetat (1 + 1) jeweils 15 min ausgeschüttelt. Die organischen Phasen wurden getrocknet, auf etwa 1 ml eingengt und wie in Abschnitt 5.5.2 an Florisil gereinigt. Das Eluat wurde wiederum auf 0,5 ml eingengt.

Zur enzymatischen Hydrolyse wurden 0,5 g Referenzmaterial mit je 10 mg Protease (pH-Optimum 7,5) und Lipase (pH-Optimum 7,2) versetzt. Das Gemisch wurde wie in [20, 29] durch 10 ml Citronensäure/Phosphat-Pufferlösung auf pH 7,5 eingestellt und über Nacht bei 37 °C, dem Temperaturoptimum beider Enzyme, stehen gelassen. Die Komplexbildung mit DEA-DDC-Lösung und die weiteren Arbeitsschritte waren die gleichen wie bei der Hydrolyse mit TEAH.

Auf die gleiche Weise wurde jeweils ein Reagenzien-Blindwert aufgearbeitet, dessen Ergebnisse von den Werten für das Referenzmaterial abgezogen wurden. Gemessen wurde die Kohlenstoff-Linie 264 nm und die Zinn-Linie 271 nm.

Tab. 11: Wiederfindungsrate (WFR) und Variationskoeffizient (VK), beide in %, für BuSn^{3+} , $\text{Bu}_2\text{Sn}^{2+}$ und Bu_3Sn^+ bei der Hydrolyse mit Lipase/Protease bzw. TEAH im Referenzmaterial CRM 477 sowie Variationskoeffizient für nicht zertifizierte Phenylzinn-Verbindungen (Mittelwerte aus Mehrfachbestimmungen)

OZV	enzymatischer Aufschluss		Aufschluss mit TEAH	
	WFR	VK	WFR	VK
BuSn^{3+}	80	6	40	5
$\text{Bu}_2\text{Sn}^{2+}$	78	2	81	31
Bu_3Sn^+	77	5	106	5
PhSn^{3+}	n.b.	1	n.b.	30
$\text{Ph}_2\text{Sn}^{2+}$	n.b.	3	n.b.	21
Ph_3Sn^+	n.b.	8	n.b.	36

n.b.: wegen fehlender Zertifizierung nicht bekannt

Tabelle 11 zeigt die Wiederfindung für die drei zertifizierten OZV BuSn^{3+} , $\text{Bu}_2\text{Sn}^{2+}$ und Bu_3Sn^+ für beide Verfahren. Die enzymatische Hydrolyse ergab konstante Werte um 78 %, die Hydrolyse mit TEAH dagegen sehr unterschiedliche Werte von 40 % für BuSn^{3+} bis 106 % für Bu_3Sn^+ .

Der Variationskoeffizient als Maß für die Streubreite lag bei der enzymatischen Hydrolyse nur bei 2 – 6 %, mit TEAH bei $\text{Bu}_2\text{Sn}^{2+}$ jedoch bei 31 %. Ein ähnliches Bild zeigen die drei Phenylzinn-Verbindungen, deren Gehalte nicht zertifiziert waren. Hier waren die Variationskoeffizienten bei der enzymatischen Arbeitsweise ebenfalls gering und beim Arbeiten mit TEAH mit 21 % bis 36 % wesentlich höher.

Ein weiteres Kriterium zum Vergleich beider Arbeitsweisen ist der Prozentsatz, zu dem die inneren Standards HeSn^{3+} , $\text{He}_2\text{Sn}^{2+}$ und Pr_3Sn^+ wiedergefunden wurden. Er wurde jeweils über Pe_4Sn berechnet, das erst nach der Aufarbeitung zugegeben wird. Sie ergab enzymatisch 82 % (HeSn^{3+}), 65 % ($\text{He}_2\text{Sn}^{2+}$) und 61 % (Pr_3Sn^+), mit TEAH jedoch 219 %, 156 % bzw. 104 %. Wenn zu viel eines inneren Standards wiedergefunden wird, fallen die Ergebnisse anderer OZV, die über diesen Standard berechnet werden, zu niedrig aus. Dies ist wohl auch der Grund für die streuenden Ergebnisse mit TEAH in **Tabelle 11**, da BuSn^{3+} (40 %) über HeSn^{3+} (219 %), $\text{Bu}_2\text{Sn}^{2+}$ (81 %) über $\text{He}_2\text{Sn}^{2+}$ (156 %) und für Bu_3Sn^+ (106 %) über Pr_3Sn^+ (104 %) berechnet wurde.

Die Ursache für die zu hohe Wiederfindung kann z.B. eine Verstärkung des Signals durch störende Begleitstoffe sein, wenn sich dadurch das Ionengleichgewicht im Plasma des AED verändert. Erreicht eine OZV aus der GC-Säule das Plasma, wird sie darin atomisiert; die Zinn-Atome werden durch die hohe Temperatur des Plasmas angeregt und kehren wieder in einen energieärmeren Zustand zurück. Dabei entstehen auch Zinn-Ionen; sie stehen mit den Zinn-Atomen in einem Gleichgewicht, das durch Fremdionen, die gleichzeitig von der Trennsäule eluiert werden, gestört wird. Dadurch werden entweder mehr oder weniger Zinn-Atome angeregt, so dass das Signal stärker oder schwächer wird.

Insgesamt eignete sich also die enzymatische Hydrolyse besser als der Aufschluss mit TEAH, weil die zertifizierten OZV und die inneren Standards zu einem hohen und konstanten Anteil und mit größerer Präzision wiedergefunden wurden.

5.6 Desaktivierung von Florisil

Bei der SC kann die Aktivität des verwendeten Adsorbens die Wiederfindung der zu bestimmenden Stoffe beeinflussen. Sie hängt von den funktionellen Gruppen, vom Gitterbau oder von Gitterfehlstellen ebenso ab wie von der Korngröße, dem Porenvolumen oder der spezifischen Oberfläche [50]. Sehr wesentlich ist der Wassergehalt; je höher er ist, desto geringer wird die Aktivität [50]. Bei ihrer Einstellung muss sehr genau gearbeitet werden, denn schon geringe Abweichungen beeinträchtigen die Reproduzierbarkeit der Aufarbeitung [20].

In der vorliegenden Arbeit wurde Florisil zur SC verwendet, ein Magnesiumsilicat mit etwa 84 % Siliciumdioxid, 15,5 % Magnesiumoxid und 0,5 % Natriumsulfat [51]. Untersucht wurden drei Aktivitätsstufen (0 %, 1 % und 3 % Wasser), um für alle OZV eine möglichst hohe Wiederfindung zu erreichen und störende Begleitstoffe möglichst weitgehend abzutrennen.

Da im Zuge der Aufarbeitung die OZV als Ethyl-Derivate auf die Säule gelangen, wurde zunächst eine entsprechende Standardlösung (A) hergestellt. Dazu wurden 2 ml OZV-Standardlösung (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Sn) und 5 ml Lösung des inneren Standards (4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Sn) mit dem großen Überschuss

von 2 ml Natriumtetraethylborat-Lösung derivatisiert, mit 10 ml Leitungswasser versetzt und dreimal mit 20 ml Cyclohexan/Ethylacetat (1 + 1) 15 min maschinell geschüttelt. Die getrockneten organischen Phasen wurden auf etwa 1 ml eingengt und in einem Messkolben (10 ml) mit Cyclohexan/Ethylacetat zur Marke aufgefüllt (entsprechend jeweils 2 µg/ml Sn). Als Blindwert wurde ebenso eine zweite Standardlösung (B) hergestellt, die nur die Ethyl-Derivate der drei inneren Standards HeSnCl_3 , He_2SnCl_2 und Pr_3SnCl enthielt.

200 µl der Standardlösung A wurden auf eine Säule gegeben, die 3 g Florisil (0 % Wasser) in Cyclohexan/Ethylacetat (1 + 1) enthielt. Die OZV-Derivate wurden davon zweimal mit je 10 ml Cyclohexan/Ethylacetat eluiert und das Eluat auf etwa 0,5 ml eingengt. Als Blindwert wurden 200 µl der Standardlösung B auf die gleiche Weise aufgearbeitet und die Ergebnisse von denen der Lösung A abgezogen.

Tab. 12: Prozentuale Wiederfindung der OZV bei der SC an Florisil ohne Wasserzusatz (A), mit 1 % Wasser (B) und mit 3 % Wasser (C) und ohne Wasserzusatz mit zusätzlicher Komplexbildung (D)

OZV	A	B	C	D
BuSn^{3+}	63	58	56	69
OcSn^{3+}	63	65	67	64
PhSn^{3+}	39	39	39	107
$\text{Bu}_2\text{Sn}^{2+}$	87	85	86	84
$\text{Oc}_2\text{Sn}^{2+}$	82	84	84	82
$\text{Ph}_2\text{Sn}^{2+}$	85	84	84	83
Bu_3Sn^+	71	77	79	85
Oc_3Sn^+	76	88	93	82
Ph_3Sn^+	75	86	92	87
Bu_4Sn	74	81	85	87
Ph_4Sn	74	86	92	101

Wenn die Ethyl-Derivate nicht ausgeschüttelt, sondern direkt aus der Natriumtetraethylborat-Lösung eingespritzt wurden, wurde der AED rasch weniger empfindlich und musste gereinigt werden. Das Ausschütteln mit Cyclohexan/Ethylacetat aus wässriger Lösung trennte vermutlich polare Begleitstoffe ab, die im gesamten Messsystem zu Ablagerungen führten.

In weiteren Versuchen wurden jeweils 200 µl der Standardlösungen A und B von 3 g Florisil mit 1 % und 3 % Wasser durch zweimal 10 ml Cyclohexan/Ethylacetat eluiert. Gemessen wurde jeweils die Zinn-Linie 326 nm, da keine Störungen zu erwarten waren.

Tabelle 12 zeigt die prozentuale Wiederfindung der OZV an Florisil mit den drei Wassergehalten, Spalte D zusätzlich Werte aus den Vorversuchen in Abschnitt 5.3.1, bei denen die OZV vor der Extraktion mit DEA-DDC-Lösung komplexiert worden waren. Bei D waren die Werte häufig etwas höher, denn die Komplexbildung überführt ionische OZV in neutrale Komplexe, die mit Cyclohexan/Ethylacetat wohl besser extrahiert wurden. Die Desaktivierung des Florisils erhöhte die Wiederfindung teils nicht oder nur geringfügig, teils aber auch bis zu etwa 20 % bei Ph_3Sn^+ , Oc_3Sn^+ und Ph_4Sn .

Die Reinigungswirkung von Florisil wurde mit dotiertem Fischgewebe erprobt. Das Substrat war frisches Aalfilet, das keine OZV-Rückstände enthielt und mit dem Ultra-Turrax homogenisiert wurde. 0,5 g davon wurden mit je 10 mg Protease und Lipase und 10 ml Citronensäure/Phosphat-Pufferlösung (pH 7,5) versetzt und über Nacht bei 37 °C hydrolysiert. Das Gemisch wurde mit 1 ml DEA-DDC-Lösung (1,5 mg/ml) versetzt, 15 min geschüttelt, auf pH 5,0 eingestellt, mit 0,2 ml Natriumtetraethylborat-Lösung versetzt, zweimal mit 15 ml Cyclohexan/Ethylacetat (1 + 1) ausgeschüttelt und zentrifugiert. Die vereinigten, getrockneten organischen Phasen wurden auf etwa 1 ml eingengt und auf eine Säule mit 3 g Florisil ohne Wasserzusatz gegeben. Die Säule wurde mit zweimal 10 ml Cyclohexan/Ethylacetat eluiert und das Eluat auf 0,5 ml eingengt. Die gleichen Versuche wurden mit Florisil (1 % und 3 % Wasser) durchgeführt. Gemessen wurde jeweils die Zinn-Linie 271 nm und die Kohlenstoff-Linie 264 nm.

Wie in Abschnitt 5.5.2 konnten die Chromatogramme nicht ausgewertet werden, denn die Signale der Zinn-Linie wurden gestört durch Signale, die auf der Kohlenstoff-Linie durch große Peaks auffielen.

5.7 Abtrennen störender Begleitstoffe

5.7.1 Überprüfung der Enzyme

Um die störenden Signale auf der Zinn-Linie zu verringern, wurde zunächst überprüft, ob und inwieweit die Enzyme einen Einfluss darauf haben, weil sie störende Begleitstoffe nicht ausreichend abbauen. Möglicherweise wurde die Aktivität der Enzyme beeinträchtigt, oder die verwendeten 10 mg Enzym reichten noch nicht aus. Der Verdacht fiel vor allem auf Lipide, denn Proteine lassen sich nicht unzersetzt verdampfen und sollten deshalb auch nicht die GC-AED beeinträchtigen. Trotzdem wurden beide Enzyme überprüft.

Dazu wurde bei der Aufarbeitung des Aalfilets nach Abschnitt 5.6 mit je 10 mg Lipase und Protease jeweils die Menge eines der Enzyme auf 20 mg und 50 mg erhöht. Beide Enzyme wurden dabei sowohl in fester Form als auch als Suspension in Citronensäure/Phosphat-Pufferlösung (pH 7,5) zugegeben.

Da Enzyme leicht durch Lösungsmittel denaturiert werden, wurde außerdem untersucht, ob das Lösungsmittel für die Standardlösungen ihre Aktivität reduziert. Dazu wurden verschiedene Volumina der Standardlösungen unterschiedlicher Konzentration zur Suspension aus Substrat (Aalfilet) und Pufferlösung gegeben, aber so, dass die zugegebenen Mengen an Zinn immer gleich blieben. Ein Beispiel ist 10 μl OZV-Standardlösung (40 $\mu\text{g/ml}$ Sn) und 10 μl Lösung der inneren Standards (40 $\mu\text{g/ml}$ Sn) oder 50 μl OZV-Standardlösung (8 $\mu\text{g/ml}$ Sn) und 100 μl Lösung der inneren Standards (4 $\mu\text{g/ml}$ Sn). Die Standardlösungen wurden außerdem sowohl während der Hydrolyse als auch danach zugegeben. Gemessen wurde jeweils die Zinn-Linie 271 nm und die Kohlenstoff-Linie 264 nm.

Die Störung wurde in keinem Fall geringer; es erwies sich jedoch als günstiger, die Enzyme als Suspension in der Pufferlösung zum Substrat zu geben. Bei allen folgenden Untersuchungen wurde daher stets 1 ml der frisch hergestellten Suspension (je 10 mg/ml) der Protease und der Lipase in der Pufferlösung zum Substrat gegeben.

5.7.2 Identifizierung der Begleitstoffe durch Gaschromatographie mit Massenspektrometrie (GC-MS)

Da die bisherige Aufarbeitung keine Abhilfe gebracht hatte, wurde versucht, die störenden Begleitstoffe durch GC-MS zu identifizieren. Dort ergibt die Messung über einen größeren Massenbereich hinweg (full-scan) häufig Hinweise auf die Molekülgröße unbekannter Stoffe und Massenfragmente, die auf ihre Struktur schließen lassen.

Das verwendete System bestand aus einem Gaschromatographen mit automatischem Flüssigprobengeber, split-splitlos-Injektor und elektronischer Drucksteuerung sowie einem Massenspektrometer mit Elektronenstoßionisation, Quadrupolmassenfilter und Turbomolekularpumpen-Vakuumsystem. Die Datenanalyse und Identifizierung wurde erleichtert durch eine im Datensystem integrierte Spektrenbibliothek, die etwa 275.000 Elektronenstoß-Ionisations-Spektren (70eV) enthielt.

Zur Trennung diente eine Kapillarsäule (30 m lang, 0,32 mm i.D., 0,25 μm Filmdicke) mit der schwach polaren Silikonphase HP-5 (5 % Phenyl, 95 % Methyl); Trägergas war Helium (26,7 ml/min). 1 μl der nach Abschnitt 5.6 aufgearbeiteten Analysenlösung aus Aalfilet wurde splitlos aufgegeben und nach 2 min bei 50 °C (Split 3:1) mit 20 °C/min auf 150 °C, dann mit 10 °C/min auf 200 °C und mit 20 °C/min auf 300 °C getrennt. Die Stoffe wurden durch eine Transferline von 300 °C in den MSD geleitet. Gemessen wurde von m/z 33 bis 550.

Das zugehörige Chromatogramm in **Abbildung 16** ließ sich nur qualitativ auswerten, denn die Signale waren sehr breit und ergaben kaum einzelne Peaks. Mit Hilfe der Software wurden in jedem Signal Zeitfenster von etwa 10 bis 20 s markiert und die Scans in jedem Fenster vom Datensystem automatisch gemittelt (2 Scans pro s). Von dem Spektrum daraus wurde jeweils zur Korrek-

tur das Spektrum des Untergrundes unter den gleichen Bedingungen abgezogen. Die Spektrenbibliothek wurde nun nach ähnlichen Spektren bekannter Stoffe durchsucht; dabei wurden nur Vorschläge mit einer Übereinstimmung über 95 % berücksichtigt. Die meisten Signale wurden als Fettsäuren und Fettsäureethylester identifiziert; ein weiteres war Cholesterin.

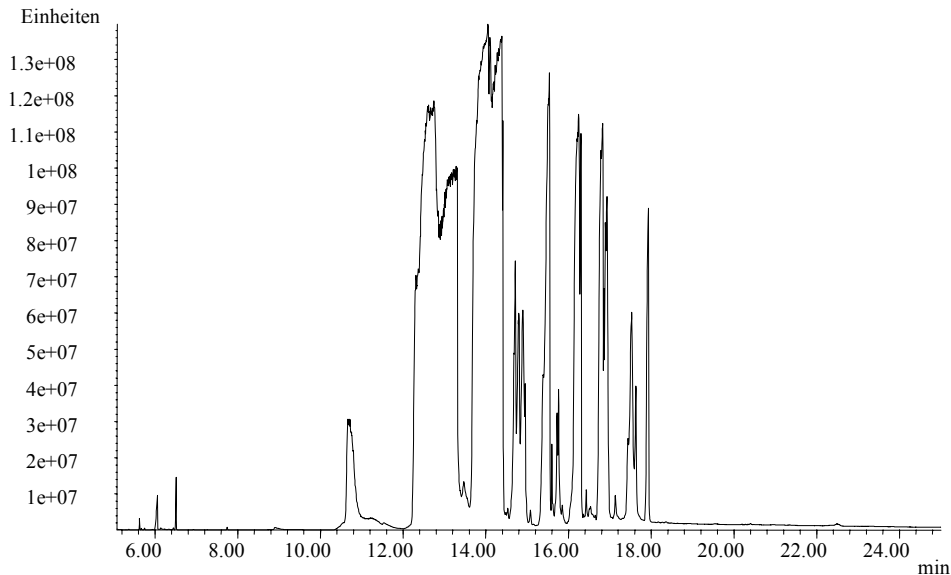


Abb. 16: GC-MS-Chromatogramm der nach Abschnitt 5.6 aufgearbeiteten Analysenlösung aus Aalfilet im Scan-Modus

Trennsäule HP-5 (30 m lang, i.D. 0,32 mm, Filmdicke 0,25 μm), Temperaturprogramm 2 min 50 $^{\circ}\text{C}$, mit 20 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ auf 150 $^{\circ}\text{C}$, 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ auf 200 $^{\circ}\text{C}$ und 20 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ auf 300 $^{\circ}\text{C}$, 8 min isotherm

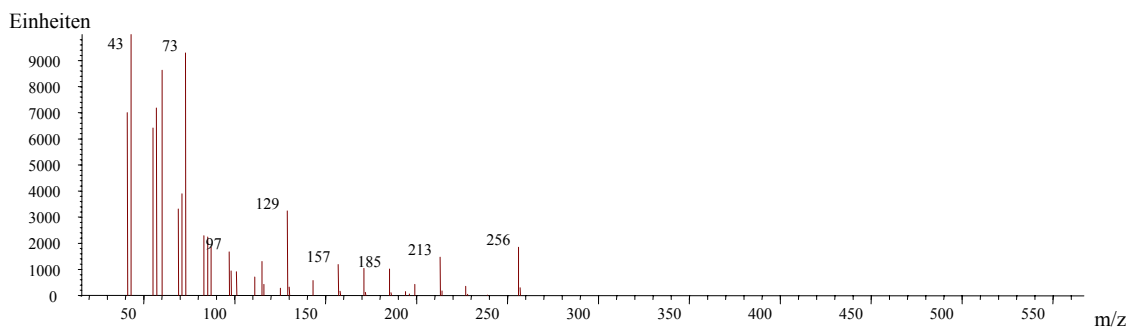
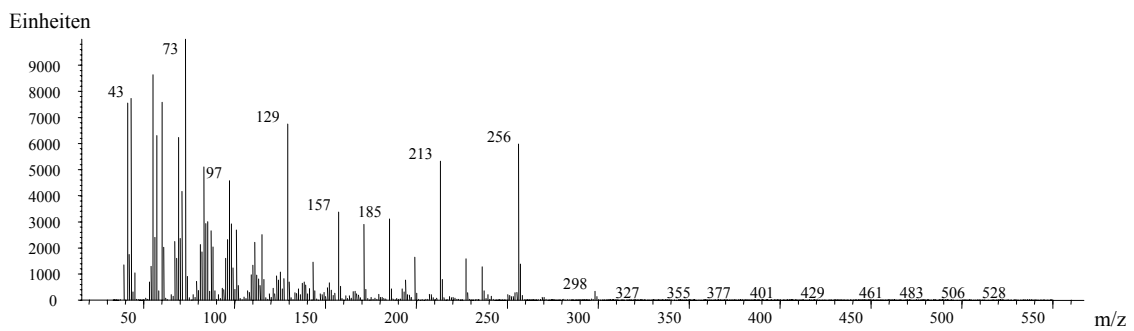


Abb. 17: GC-MS-Spektrum von 12,98 bis 13,30 min aus dem Chromatogramm in Abbildung 16 (oben) und Vergleichsspektrum von Palmitinsäure mit 97 % Übereinstimmung aus der Spektrenbibliothek (unten)

Der obere Teil von **Abbildung 17** zeigt das Spektrum der Analysenlösung von 12,98 – 13,30 min und darunter das Spektrum von Palmitinsäure aus der Spektrenbibliothek, das zu 97 % übereinstimmte.

Die außerdem identifizierten Fettsäureethylester waren wohl nach der enzymatischen Hydrolyse während der Derivatisierung der OZV mit Natriumtetraethylborat entstanden. Damit dieses Reagenz nicht schon durch die Ethylierung der Fettsäuren verbraucht wird, wurde in allen folgenden Versuchen wesentlich mehr davon (1 ml) zugesetzt.

5.7.3 Abtrennen von Fettsäuren und Fettbegleitstoffen

Zunächst wurde versucht, die Fettsäuren als Alkalisalze abzutrennen. Das dotierte Aalfilet wurde wie schon in Abschnitt 5.6 mit je 1 ml Protease- und Lipase-Suspension (je 10 mg/ml) bei 37 °C in Puffer-Lösung (pH 7,5) hydrolysiert und das Gemisch mit 1 ml DEA-DDC-Lösung (1,5 mg/ml) und bei pH 5,0 mit 1 ml Natriumtetraethylborat-Lösung versetzt. Dazu wurden 2,5 ml gesättigte Natronlauge oder Kalilauge gegeben. Die dadurch gebildeten Alkaliseifen langkettiger Fettsäuren sollten wasserlöslich sein und sich nicht mit Cyclohexan/Ethylacetat (1 + 1) ausschütteln lassen. Der entstandene gelartige Rückstand ließ sich jedoch nicht durch SC weiterreinigen.

Tab. 13: Lösungsmittel und Lösungsmittelgemische zur Extraktion (A) und zur Elution von 3 g Florisil (0 % Wasser) (B) bei der Aufarbeitung von Aalfilet nach enzymatischer Hydrolyse sowie gefundene Gehalte an OZV (C) und störenden Begleitstoffen (D)

(C/E = Cyclohexan/Ethylacetat)

Versuch	A	B	C	D
1	C/E 1 + 1	C/E 1 + 1	+++	+++
2	C/E 1 + 1	C/E 8 + 2	+++	+++
3	C/E 1 + 1	C/E 95 + 5	+++	+++
4	C/E 1 + 1	Toluol/Aceton 95 + 5	+++	+++
5	C/E 1 + 1	Toluol	+++	+++
6	C/E 95 + 5	C/E 1 + 1	+++	+++
7	C/E 95 + 5	C/E 95 + 5	+++	+++
8	Cyclohexan	Cyclohexan	-	-
9	Cyclohexan	C/E 1 + 1	+++	+++
10	Cyclohexan	C/E 95 + 5	+++	+++
11	Cyclohexan	Cyclohexan/Toluol 1 + 1	+++	-
12	C/E 1 + 1	Cyclohexan/Toluol 1 + 1	+++	+++

Weitere Versuche sollten Fettsäuren, Fettsäureethylester und Fettbegleitstoffe durch andere Lösungsmittel beim Extrahieren und Eluieren abtrennen. Dazu wurde das Aalfilet wie oben beschrieben aufgearbeitet. Die OZV-Derivate wurden zweimal mit je 15 ml eines Gemisches aus **Ta-**

belle 13 Spalte A ausgeschüttelt, die vereinigten organischen Phasen getrocknet und auf etwa 1 ml eingengt. Das Konzentrat wurde auf eine Säule mit 3 g Florisil (0 % Wasser) gegeben, die Säule mit zweimal je 10 ml eines Lösungsmittelgemisches in Spalte B eluiert und das Eluat auf 0,5 ml eingengt. Gemessen wurde jeweils die Zinn-Linie 271 nm und die Kohlenstoff-Linie 264 nm.

Wie die Vorversuche in Abschnitt 5.3.1 gezeigt hatten, wurde der größte Anteil der OZV-Derivate von 3 g Florisil (0 % Wasser) mit zweimal 10 ml Cyclohexan/Ethylacetat (1 + 1) eluiert. Versuche mit 3 g Florisil (0 % Wasser) bestätigten, dass dies auch mit Cyclohexan/Ethylacetat (8 + 2) und (95 + 5) sowie mit Toluol/Aceton (95 + 5) und Toluol möglich war.

Die meisten Chromatogramme ließen sich nur qualitativ auswerten, denn die Zinn-Linie war durch die störenden Begleitstoffe, die zu großen Signalen auf der Kohlenstoff-Linie 264 nm führten, erheblich beeinflusst. Dadurch konnte vor allem der Bereich von 23 bis 33 min, in dem $\text{Ph}_2\text{Sn}^{2+}$, Ph_3Sn^+ , $\text{Oc}_2\text{Sn}^{2+}$ und Oc_3Sn^+ sowie die Standards $\text{He}_2\text{Sn}^{2+}$ und Pe_4Sn eluiert wurden, nicht ausgewertet werden. Beispielhaft zeigt **Abbildung 18** diesen Ausschnitt aus dem Chromatogramm (Extraktion und Elution mit Cyclohexan/Ethylacetat 1 + 1).

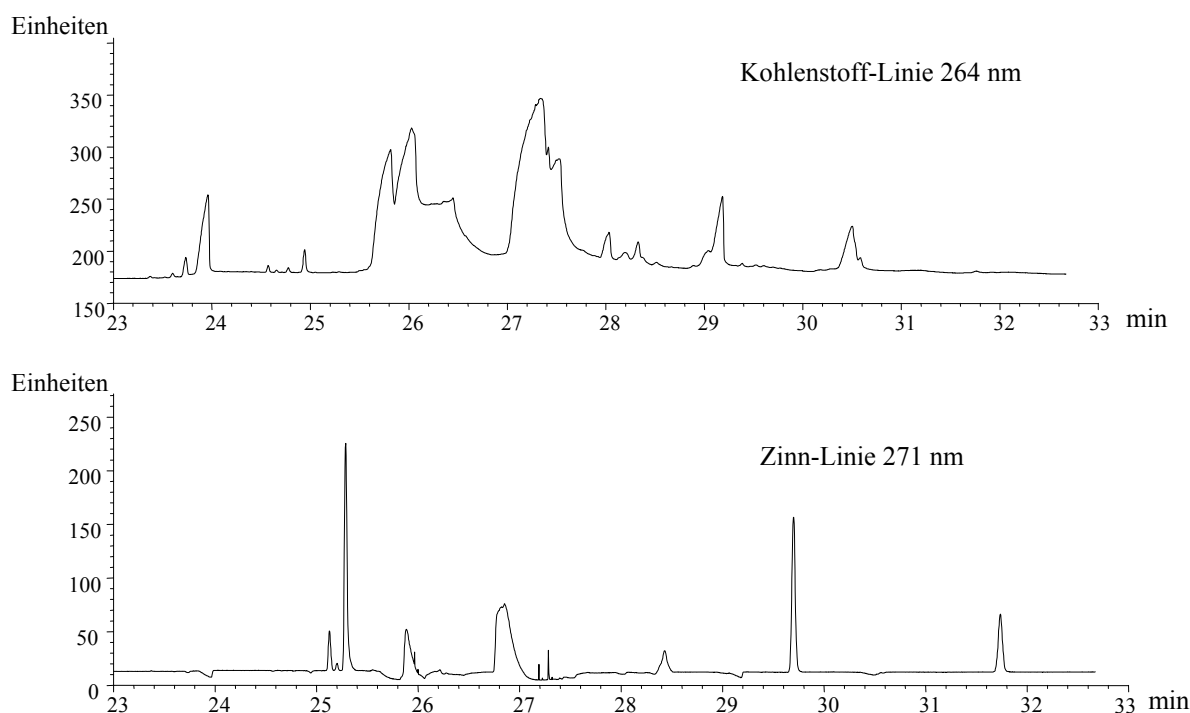


Abb. 18: Ausschnitt aus dem GC-AED-Chromatogramm der Analysenlösung aus Aalfilet; Extraktion und Elution der OZV-Derivate mit Cyclohexan/Ethylacetat (1 + 1)

Wenn die OZV-Derivate jeweils mit Cyclohexan aus der wässrigen Phase extrahiert und von Florisil eluiert wurden (Versuch 8), traten keine störenden Peaks, aber auch keine Signale mehr für die Phenylzinn-Verbindungen auf. Um zu klären, ob sie nicht extrahiert oder erst auf der Florisilsäule zurückgehalten wurden, wurde der wässrige Extraktionsrückstand noch zweimal mit je 20 ml

Cyclohexan/Ethylacetat (1 + 1) ausgeschüttelt, das ja Phenylzinn-Verbindungen aus Wasser extrahieren kann. In den getrockneten organischen Phasen war der Befund aber negativ. Daraufhin wurde die wässrige Suspension des Aalfilets zweimal mit 15 ml Cyclohexan ausgeschüttelt. Wenn die vereinigten Cyclohexan-Phasen getrocknet, eingengt und zur GC eingespritzt wurden, enthielt das Chromatogramm alle OZV, aber auch wieder alle Störungen. Begleitstoffe und Phenylzinn-Verbindungen waren also beide beim Arbeiten mit Cyclohexan an der Florisilsäule zurückgehalten worden.

In weiteren Versuchen wurde mit Cyclohexan extrahiert und versucht, die OZV auf der Säule von den Begleitstoffen zu trennen. Dies gelang am besten beim Eluieren mit Cyclohexan/Toluol (1 + 1) und dann auch nur, wenn vorher mit Cyclohexan extrahiert wurde; **Abbildung 19** zeigt das zugehörige Chromatogramm.

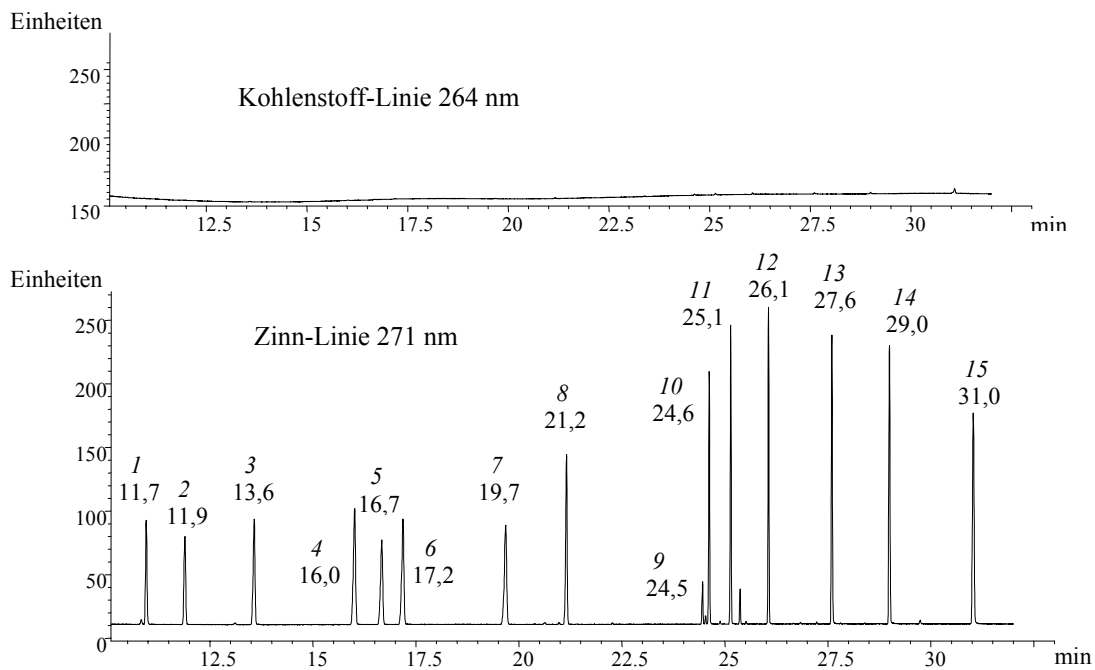


Abb. 19: GC-AED-Chromatogramm der Analysenlösung aus Aalfilet nach Extraktion der wässrigen Phase mit Cyclohexan und Elution der Florisilsäule (0 % Wasser) mit Cyclohexan/Toluol (1 + 1)

Trennsäule DB-5 (60 m lang, i.D. 0,32 mm, Filmdicke 0,25 μ m), Temperaturprogramm 2 min 70 $^{\circ}$ C, mit 30 $^{\circ}$ C/min auf 150 $^{\circ}$ C, 2 $^{\circ}$ C/min auf 180 $^{\circ}$ C und 30 $^{\circ}$ C/min auf 300 $^{\circ}$ C, 8 min isotherm

1: BuSnEt_3 , 2: Pr_3SnEt (i.Std.), 3: Bu_2SnEt_2 , 4: PhSnEt_3 , 5: HeSnEt_3 (i.Std.), 6: Bu_3SnEt , 7: OcSnEt_3 , 8: Bu_4Sn , 9: Ph_2SnEt_2 , 10: He_2SnEt_2 (i.Std.), 11: Pe_4Sn (i.Std.), 12: Oc_2SnEt_2 , 13: Ph_3SnEt , 14: Oc_3SnEt , 15: Ph_4Sn

Ph_4Sn wurde darin zu einem hohen Anteil wiedergefunden (108 %); für PhSn^{3+} ergab sich allerdings 218 %, für Ph_3Sn^+ nur 49 % und für $\text{Ph}_2\text{Sn}^{2+}$ weniger als 10 %. Wie die weitere Elution der Florisilsäule zeigte, wurden Ph_3Sn^+ und $\text{Ph}_2\text{Sn}^{2+}$ nicht darauf zurückgehalten.

5.8 Untersuchungen zur Wiederfindung der Phenylzinn-Verbindungen

Diese Ergebnisse aus Abschnitt 5.7 ließen vermuten, dass $\text{Ph}_2\text{Sn}^{2+}$ und Ph_3Sn^+ zu PhSn^{3+} abgebaut wurden. Ein solcher Abbau während der Extraktion oder Elution war allerdings unwahrscheinlich, denn beim Arbeiten mit einer OZV-Standardlösung trat er nicht auf. Daher wurde der Einfluss der Reagenzien und der Bedingungen bei der enzymatischen Hydrolyse überprüft.

5.8.1 Überprüfung der Pufferlösung alleine

Zunächst wurde die Citronensäure/Phosphat-Pufferlösung überprüft, die Ammoniumdihydrogenphosphat, Ammoniak, Citronensäure und Ethanol enthält. Sie wurde dazu unverändert sowie ohne Ethanol, ohne Citronensäure und ohne beide mit Leitungswasser hergestellt (der Niederschlag in der Lösung ohne Citronensäure wurde abzentrifugiert).

Jeweils 10 ml Pufferlösung (pH 7,5) oder 10 ml Leitungswasser (pH 7,3) wurden mit der OZV-Standardlösung versetzt und die OZV wie üblich komplexiert, derivatisiert und zweimal mit je 15 ml Cyclohexan ausgeschüttelt. Die vereinigten Cyclohexan-Phasen wurden getrocknet, eingengt und zur GC-AED (Zinn-Linie 271 nm, Kohlenstoff-Linie 264 nm) eingespritzt. Von den Ergebnissen wurden die Blindwerte abgezogen.

Tab. 14: Prozentuale Wiederfindung der Phenylzinn-Verbindungen beim Ausschütteln aus wässriger Lösung mit Cyclohexan

Citronensäure/Phosphat-Pufferlösung (A), ohne Ethanol (B), ohne Citronensäure (C) sowie ohne Ethanol und Citronensäure (D); Leitungswasser (E), Kaliumdihydrogenphosphat/Dinatriumhydrogenphosphat-Pufferlösung (F), Tris(hydroxymethyl)aminomethan/Salzsäure-Pufferlösung (G)

OZV	A	B	C	D	E	F	G
PhSn^{3+}	222	252	73	71	93	56	95
$\text{Ph}_2\text{Sn}^{2+}$	3	5	71	78	86	61	73
Ph_3Sn^+	47	39	70	60	82	43	60
Ph_4Sn	91	94	71	63	96	70	75

Wie aus den Spalten A und B von **Tabelle 14** hervorgeht, war anscheinend die Citronensäure in der Pufferlösung für die stark abweichenden Ergebnisse bei PhSn^{3+} , $\text{Ph}_2\text{Sn}^{2+}$ und Ph_3Sn^+ verantwortlich, denn ohne sie waren die Wiederfindungsraten gut. Ethanol beeinflusste die Werte nicht. Deshalb wurde nach einem anderen geeigneten Puffergemisch gesucht. Dazu wurden zwei Pufferlösungen für pH 7,5 geprüft, die eine aus Tris(hydroxymethyl)aminomethan (0,05 mol/l) und Salzsäure (0,04 mol/l) und die andere aus Kaliumdihydrogenphosphat (0,01 mol/l) und Dinatriumhydrogenphosphat (0,06 mol/l), beide hergestellt mit Leitungswasser.

Jeweils 10 ml davon wurden wie oben beschrieben dotiert und mit Cyclohexan ausgeschüttelt. Die Werte finden sich in den Spalten F und G von **Tabelle 14**; sie waren für PhSn^{3+} und $\text{Ph}_2\text{Sn}^{2+}$ ebenfalls nicht ungewöhnlich. Vergleicht man die mittlere Wiederfindungsrate aller Phenylzinn-Verbindungen in den Spalten C bis G von Tabelle 14, so war offenbar die Tris/HCl-Pufferlösung zur Bestimmung am besten geeignet.

5.8.2 Überprüfung der Pufferlösung während der enzymatischen Hydrolyse

Die Pufferlösungen wurden zusätzlich unter den Bedingungen der enzymatischen Hydrolyse untersucht. Dafür wurden 10 ml mit der OZV-Standardlösung dotiert, mit je 1 ml Lipase- und Protease-Suspension (10 mg/ml in Leitungswasser) versetzt und über Nacht bei 37 °C stehen gelassen. Der ausgeschüttelte und getrocknete Cyclohexanextrakt wurde eingeeengt und auf eine Säule mit 3 g Florisil ohne Wasserzusatz gegeben. Die Säule wurde mit zweimal 10 ml Cyclohexan/Toluol (1 + 1) eluiert und das eingeeengte Eluat zur GC/AED (Zinn-Linie 271 nm, Kohlenstoff-Linie 264 nm) eingespritzt.

Auf gleiche Weise wurden zwei Fischgewebe aufgearbeitet, die sich stark in ihrer Zusammensetzung unterschieden. Dies waren wiederum das Aalfilet (59,3 % Wasser, 15,0 % Protein, 24,5 % Fett) [52] und außerdem frisches Forellenfilet (76,3 % Wasser, 19,5 % Protein, 2,73 % Fett) [52], das keine OZV-Rückstände enthielt. Jeweils 0,5 g der Homogenate wurden mit 10 ml der verschiedenen Pufferlösungen aufgearbeitet. Unmittelbar nach der Hydrolyse wurde der pH-Wert der Suspension kontrolliert, um festzustellen, ob die verschiedenen Pufferlösungen den pH-Wert ausreichend stabilisiert hatten.

Tab. 15: Prozentuale Wiederfindung der Phenylzinn-Verbindungen nach enzymatischer Hydrolyse ohne Substrat, von Aal und von Forelle; Extraktion mit Cyclohexan und Elution von Florisil mit Cyclohexan/Toluol (1 + 1).

Citronensäure/Phosphat-Pufferlösung (A), Kaliumdihydrogenphosphat/Dinatriumhydrogenphosphat-Pufferlösung (B), Tris(hydroxymethyl)aminomethan/Salzsäure-Pufferlösung (C)

OZV	ohne Substrat			Aal			Forelle		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C
PhSn^{3+}	181	233	230	218	240	237	202	247	233
$\text{Ph}_2\text{Sn}^{2+}$	< 10	< 10	33	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
Ph_3Sn^+	81	91	93	50	54	51	75	72	73
Ph_4Sn	104	84	95	104	87	172	95	79	90

Tabelle 15 zeigt die um den Blindwert korrigierten Ergebnisse. Wie daraus hervorgeht, wurde die Wiederfindung stark durch die enzymatische Hydrolyse beeinflusst, denn sie lag mit allen drei Pufferlösungen (A, B, C) für PhSn^{3+} unter 10 % und für $\text{Ph}_2\text{Sn}^{2+}$ bei 230 %.

Nach der Hydrolyse hatte der pH-Wert von 7,5 auf 7,4 (A), 7,1 (B) bzw. 6,1 (C) abgenommen. Wenn also die Tris/HCl-Pufferlösung verwendet wird, ist zu erwarten, dass Lipase und Protease das Substrat nicht vollständig hydrolysieren, denn sie benötigen einen pH-Wert von 7,2 bzw. 7,5.

5.8.3 Identifizierung zusätzlicher Signale auf der Zinn-Linie 271 nm durch GC-MS

Bei den Untersuchungen in Abschnitt 5.8.2 waren auf der Zinn-Linie 271 nm außer den Butylzinn-, Phenylzinn- und Octylzinn-Verbindungen und den Standards auch zusätzliche Signale bei 20,3 min, 24,3 min und 25,2 min angezeigt worden. Sie waren größer, wenn das Aalfilet in der Phosphat-Pufferlösung (B) und in der Tris/HCl-Pufferlösung (C) enzymatisch hydrolysiert wurde. Da 271 nm zinnspezifisch anzeigt, musste es sich um Zinn-Verbindungen handeln. Zur Identifizierung der unbekanntenen Signale wurde ein GC-MS-Chromatogramm der Analysenlösung aus Aalfilet aufgenommen, das nach Abschnitt 5.8.2 mit Phosphat-Pufferlösung (B) aufgearbeitet worden war.

GC und MSD waren dieselben wie in Abschnitt 5.7.2. Getrennt wurde aber an der unpolaren Silikonphase DB-XLB (60 m lang, 0,25 mm i.D., 0,25 μm Filmdicke) mit 24,1 ml/min Helium als Trägergas. Nach splitloser Aufgabe von 1 μl (3 min bei 80 °C, danach mit einem Splitfluss von 5:1) wurde die Säule mit 30 °C/min auf 140 °C und mit 3 °C/min auf 275 °C aufgeheizt. Die Stoffe wurden durch die Transferline (300 °C) in den MSD geleitet. Gemessen wurde von m/z 100 bis m/z 550. **Abbildung 20** zeigt das Chromatogramm, bei dem nun die drei unbekanntenen Signale bei 23,8 min (zusammen mit Bu_4Sn), 33,8 min und 37,2 min eluiert wurden.

Unter den gleichen Bedingungen wurde das Chromatogramm einer derivatisierten OZV-Standardlösung aufgenommen. Die Signale darin wurden den OZV über ihre Massenspektren zugeordnet. Die Spektrenbibliothek war dabei nur wenig hilfreich, denn sie enthielt nur wenige Ethyl-derivate von OZV. Jedes Spektrum zeigte das charakteristische Isotopenmuster von Zinn (vgl. Abschnitt 2.2, **Abbildung 4a**) und Fragmente mit dem gleichen Muster. Die Fragmente lagen jeweils um Massendifferenzen auseinander, die den Substituenten der OZV entsprachen. Das Isotopenmuster der Molekülmasse trat bei keiner OZV auf.

Abbildung 21 zeigt dies am Beispiel von Peak 3, der von Bu_2SnEt_2 ($M = 292$ g/mol) stammt. Das Fragment m/z 263 ist durch Abspaltung einer Ethylgruppe entstanden, m/z 235 durch Abspaltung einer Butylgruppe oder zwei Ethylgruppen, m/z 179 durch Abspaltung von zwei Butylgruppen usw. Das Muster mit dem größten Peak bei m/z 121 gehört zu elementarem Zinn und ist im Spektrum jeder OZV vorhanden.

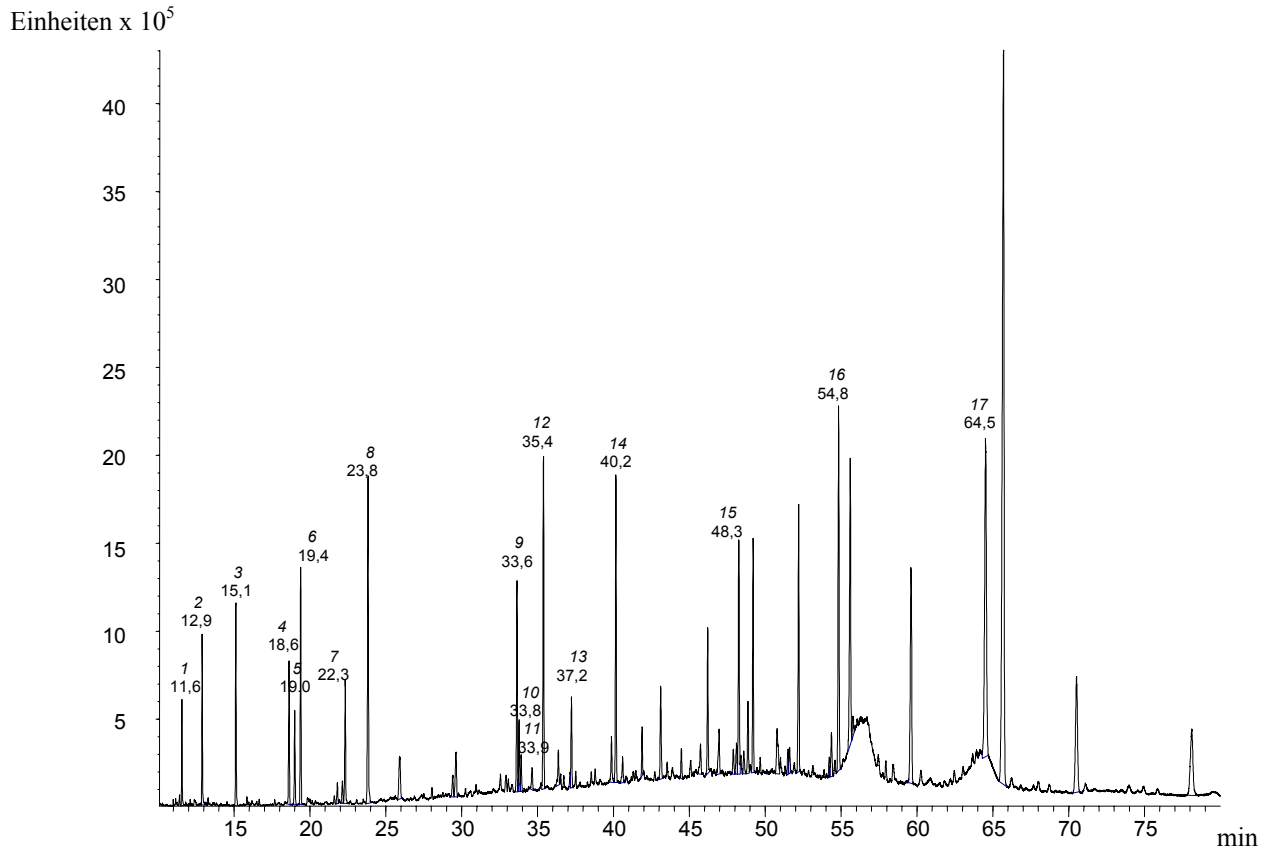


Abb. 20: GC-MS-Chromatogramm (full-scan) der Analysenlösung aus Aalfilet, aufgearbeitet nach Abschnitt 5.8.2 in Phosphat-Pufferlösung (B).

Trennsäule DB-XLB (60 m lang, i.D. 0,32 mm, Filmdicke 0,25 μ m), Temperaturprogramm 3 min 80 °C, mit 30 °C/min auf 140 °C, 3 °C/min auf 275 °C, 30 min isotherm

1: BuSnEt₃, 2: Pr₃SnEt (i.Std.), 3: Bu₂SnEt₂, 4: PhSnEt₃, 5: HeSnEt₃ (i.Std.), 6: Bu₃SnEt, 7: OcSnEt₃, 8: Bu₄Sn + unbekannt, 9: He₂SnEt₂, 10: unbekannt, 11: Ph₂SnEt₂ (i.Std.), 12: Pe₄Sn (i.Std.), 13: unbekannt, 14: Oc₂SnEt₂, 15: Ph₃SnEt, 16: Oc₃SnEt, 17: Ph₄Sn

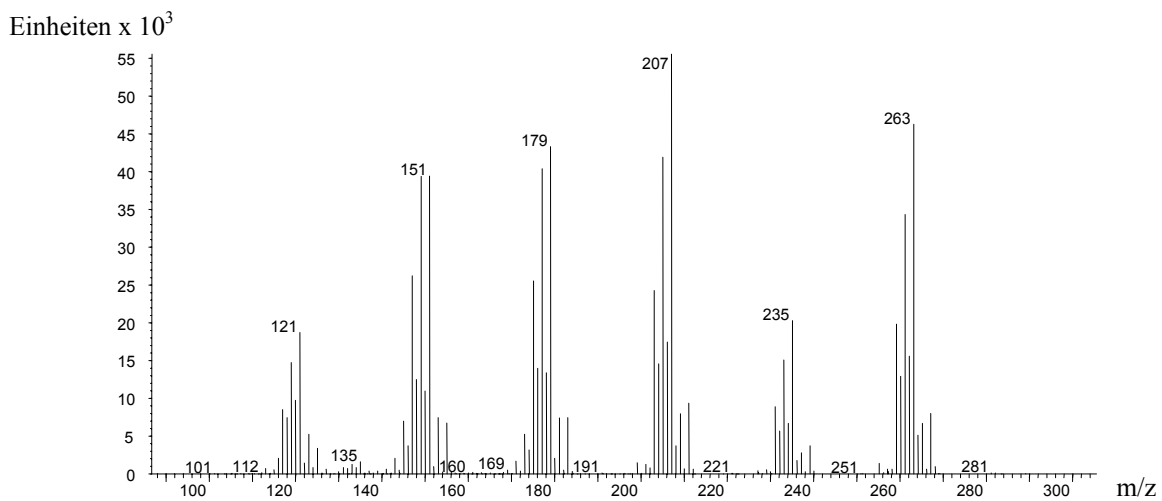


Abb. 21: GC-MS-Spektrum von Bu₂SnEt₂ (Peak 3 in Abbildung 20)

Die Spektren der unbekannt Signale wiesen die gleichen Isotopenmuster des Zinns und Massendifferenzen zwischen den einzelnen Fragmenten auf. Deshalb wurde vermutet, dass sich die zugehörigen Stoffe aus den vorhandenen OZV durch den Austausch von Substituenten gebildet hatten. Da der Wiederfindungsstandard Pe_4Sn dem Eluat erst am Ende der Aufarbeitung zugesetzt wurde, war er daran wohl nicht beteiligt. Eher wurde vermutet, dass OZV mit geringer Wiederfindungsrate Substituenten verloren hatten.

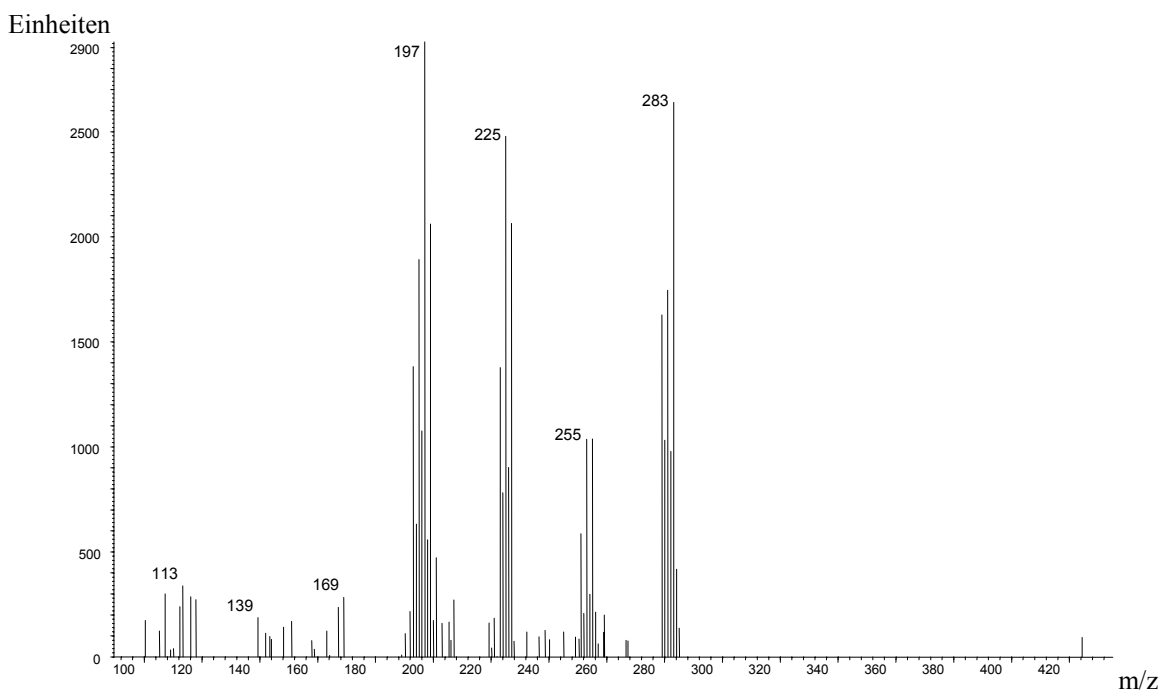


Abb. 22: GC-MS-Spektrum von BuPhSnEt_2 nach Subtraktion von Bu_4Sn (Peak 10 in Abbildung 20)

Der erste der drei fraglichen Peaks wurde gleichzeitig mit Bu_4Sn bei 23,8 min eluiert. Vom dort aufgenommenen Massenspektrum wurde sowohl das Untergrundrauschen subtrahiert als auch das Spektrum von Bu_4Sn , so dass das Isotopenmuster des elementaren Zinns (m/z 121) im Spektrum des unbekanntes Stoffes verschwand. Die verbleibenden Fragmente passten jedoch zu einer OZV mit der möglichen Formel BuPhSnEt_2 ($M = 312$ g/mol) mit dem Spektrum in **Abbildung 22**. Das Fragment m/z 283 darin ist durch Abspaltung einer Ethylgruppe entstanden, m/z 255 durch Abspaltung einer Butyl- oder zwei Ethylgruppen, m/z 225 durch je eine Abspaltung einer Ethyl- und Butylgruppe usw. Die Massendifferenz zwischen dem gelöschten Isotopenmuster von Zinn (m/z 121) und m/z 197 entspricht einer Phenylgruppe.

In ähnlicher Weise wurden die Signale bei 33,8 min und bei 37,3 min als HePhSnEt_2 und OcPhSnEt_2 identifiziert. Zur Absicherung müssten die Massenspektren der authentischen Substanzen vorliegen, die aber nicht erhältlich sind. Offenbar stammen die drei Peaks von BuSn^{3+} , HeSn^{3+} und OcSn^{3+} , die je eine Phenylgruppe angelagert haben. Dies würde die Beobachtung aus Ab-

schnitt 5.7.3 unterstützen, dass die Wiederfindungsrate von $\text{Ph}_2\text{Sn}^{2+}$ und Ph_3Sn^+ abnimmt und gleichzeitig die von PhSn^{3+} zunimmt.

5.8.4 Überprüfung der Hydrolysezeit und Temperatur

Wie aus Abschnitt 5.8.2 hervorging, sind möglicherweise auch die Bedingungen während der enzymatischen Hydrolyse für den Abbau von Phenylzinn-Verbindungen verantwortlich. Daraufhin wurden die Dauer und die Temperatur der Hydrolyse variiert. Da die Tris/HCl-Pufferlösung den pH-Wert bei der Aufarbeitung von Fischgewebe nicht genügend stabilisiert hatte, wurde die Citronensäure/Phosphat-Pufferlösung ohne Citronensäure (Lösung C in Tabelle 14) verwendet, in der die Phenylzinn-Verbindungen nicht abgebaut worden waren. 10 ml davon wurden mit der OZV-Standardlösung und den Enzymsuspensionen versetzt und 1 h, 2 h, 4 h, 8 h oder 16 h bei 37 °C stehen gelassen. Zur Derivatisierung wurden hier erstmals (wie auch in den folgenden Untersuchungen) 50 µl Natriumtetraethylborat-Lösung in Tetrahydrofuran (0,2 g/ml) zugesetzt. Die OZV-Derivate wurden mit Cyclohexan ausgeschüttelt, die organischen Phasen getrocknet, eingengt und zur GC-AED (Zinn-Linie 271 nm, der Kohlenstoff-Linie 264 nm) eingespritzt.

Wie die Ergebnisse in **Tabelle 16** zeigen, wurde $\text{Ph}_2\text{Sn}^{2+}$ mit zunehmender Reaktionszeit stärker abgebaut. Die früher beobachtete geringe Wiederfindung für Ph_3Sn^+ bestätigte sich hier allerdings nicht. Ob Ph_3Sn^+ ebenfalls teilweise abgebaut wird, lässt sich nicht erkennen, denn die geringen Abweichungen können auch zufällig entstanden sein. Ein Abbau von Ph_4Sn ist jedoch auszuschließen.

Tab. 16: Prozentuale Wiederfindung der Phenylzinn-Verbindungen aus einer Standardlösung nach Inkubieren mit Enzymen in einer Ammoniumdihydrogenphosphat-Lösung während 1 – 16 h bei 37 °C und Ausschütteln mit Cyclohexan

OZV	1 h	2 h	4 h	8 h	16 h
PhSn^{3+}	151	177	181	216	258
$\text{Ph}_2\text{Sn}^{2+}$	73	38	10	< 10	< 10
Ph_3Sn^+	94	90	91	88	86
Ph_4Sn	92	91	90	92	93

Bei Raumtemperatur ergaben sich die gleichen Werte wie bei 37 °C. Bei höherer Temperatur war nur zu erwarten, dass $\text{Ph}_2\text{Sn}^{2+}$ noch schneller abgebaut wird.

In weiteren Versuchen wurde jede OZV einzeln aus einer Standardlösung mit je 10 µg/ml Sn aufgearbeitet. Da $\text{Ph}_2\text{Sn}^{2+}$ schon nach 4 h völlig abgebaut war, wurden 50 µl davon zur Pufferlösung gegeben und mit den Enzymsuspensionen nur 1 h und 4 h bei 37 °C stehen gelassen.

Die Ergebnisse in **Tabelle 17** bestätigen, dass nur $\text{Ph}_2\text{Sn}^{2+}$ zu PhSn^{3+} abgebaut wird, während Ph_3Sn^+ und Ph_4Sn nicht reagieren.

Tab. 17: Prozentuale Wiederfindung einzelner Phenylzinn-Verbindungen aus einer Standardlösung nach Inkubieren mit Enzymen in einer Ammoniumdihydrogenphosphat-Lösung während 1 h und 4 h bei 37 °C und Ausschütteln mit Cyclohexan

OZV	1 h				4 h			
	PhSn^{3+}	$\text{Ph}_2\text{Sn}^{2+}$	Ph_3Sn^+	Ph_4Sn	PhSn^{3+}	$\text{Ph}_2\text{Sn}^{2+}$	Ph_3Sn^+	Ph_4Sn
PhSn^{3+}	91	-	-	-	92	-	-	-
$\text{Ph}_2\text{Sn}^{2+}$	41	79	-	-	102	15	-	-
Ph_3Sn^+	-	-	91	-	-	-	89	-
Ph_4Sn	-	-	-	90	-	-	-	96

5.9 Zusammenfassung und Bewertung der Ergebnisse

Die Untersuchungen in Kapitel 5 haben zu einer Arbeitsweise geführt, die zur Bestimmung zahlreicher OZV in Fisch- und Muschelgewebe auch bei sehr fetthaltigen Substraten (z.B. Aal) geeignet ist. Nach dem Aufschluss der Matrix wurden störende Begleitstoffe erfolgreich abgetrennt; die Analysenlösungen ergaben mit dem AED Gaschromatogramme, die problemlos ausgewertet werden konnten. Die meisten OZV zeigten gute Wiederfindungsraten. $\text{Ph}_2\text{Sn}^{2+}$ wurde allerdings unter verschiedenen Bedingungen abgebaut und beeinflusste dadurch auch die Wiederfindung von PhSn^{3+} . Die Bestimmung kann sehr leicht durch Blindwerte beeinträchtigt werden, wie sie vor allem durch BuSn^{3+} und $\text{Bu}_2\text{Sn}^{2+}$ in Wasser aus Wasseraufbereitungsanlagen und aus Filterpapier beobachtet wurden.

5.9.1 Enzymatische Hydrolyse

Als Untersuchungsmaterial wurde ausschließlich das zertifizierte Referenzmaterial CRM 477 (gefriergetrocknetes Muschelgewebe) verwendet, denn nur an einem Substrat mit natürlich gewachsenen Gehalten ist es sinnvoll, ein Aufschlussverfahren zu erproben.

Am günstigsten war die enzymatische Hydrolyse mit einer Lipase und einer Protease. Sie ergab konstante Wiederfindungsraten um 78 % für die zertifizierten Rückstände BuSn^{3+} , $\text{Bu}_2\text{Sn}^{2+}$ und Bu_3Sn^+ . Die Variationskoeffizienten waren dabei sehr gering (2 – 6 %), ebenso für die nicht zertifizierten Gehalte an PhSn^{3+} , $\text{Ph}_2\text{Sn}^{2+}$ und Ph_3Sn^+ (1 – 8 %). Eine Hydrolyse mit TEAH-Lösung führte dagegen zu teilweise geringen Wiederfindungsraten (40 – 106 %) und hohen Variationskoeffizienten (21 – 36 %). Nicht geeignet war der Aufschluss im Ultraschallbad: Er ergab nur sehr geringe

Werte (z.B. 10 – 20 % BuSn^{3+} , 23 – 40 % $\text{Bu}_2\text{Sn}^{2+}$, 53 – 75 % Bu_3Sn^+); bei Zusatz von Essigsäure war keine Auswertung mehr möglich.

In der endgültigen Arbeitsweise wird das Fisch- oder Muschelgewebe in einer geeigneten Pufferlösung (pH 7,5) suspendiert und mit je 1 ml einer Lipase- und Protease-Suspension (jeweils 10 mg/ml) in der gleichen Pufferlösung versetzt. Diese Suspensionen wurden stets frisch hergestellt und sofort verwendet.

5.9.2 Extraktion der OZV und Reinigung des Extraktes durch SC

Vorversuche mit Standardlösungen hatten zunächst gezeigt, dass die OZV mit zweimal 15 ml Cyclohexan/Ethylacetat (1 + 1) aus wässriger Lösung extrahiert und mit zweimal 10 ml des gleichen Gemisches von einer Säule mit 3 g aktiviertem Florisil eluiert werden können. Die Reinigungswirkung von Florisil war besser als die von Kieselgel, das störende Begleitstoffe nicht genügend aus dem Extrakt entfernte. n-Hexan reichte dagegen nicht zur Extraktion und Elution aus. Für Florisil, das mit 3 % Wasser deaktiviert wurde, waren die Wiederfindungsraten teilweise besser.

Diese Arbeitsweise trennte jedoch bei der Aufarbeitung von Aalfilet die störenden Begleitstoffe nicht im erforderlichen Umfang ab. Wie die nähere Untersuchung der Analysenlösung durch GC-MS ergab, handelte es sich bei den Begleitstoffen vornehmlich um Fettsäuren, Fettsäureethylester und Cholesterin. Da die Abtrennung der Fettsäuren als wasserlösliche Alkaliseifen nicht gelang, wurden die Extraktion aus wässriger Phase und die Elution von der Florisilsäule systematisch optimiert. Die beste Lösung war schließlich, die wässrige Lösung mit Cyclohexan auszuschütteln und die Florisilsäule mit Cyclohexan/Toluol (1 + 1) zu eluieren.

Außerdem wurde die Menge an Natriumtetraethylborat-Lösung zur Derivatisierung erhöht, damit diese nicht zur Ethylierung von Fettsäuren verbraucht wird.

5.9.3 Wiederfindung der Phenylzinn-Verbindungen

Aber auch nach der Abtrennung von Begleitstoffen waren die Wiederfindungsraten von PhSn^{3+} , $\text{Ph}_2\text{Sn}^{2+}$ und Ph_3Sn^+ aus Aalfilet teilweise gering und deuteten auf einen Abbau von $\text{Ph}_2\text{Sn}^{2+}$ und Ph_3Sn^+ zu PhSn^{3+} hin. Wie die nähere Untersuchung ergab, wurde der Abbau sowohl durch die Citronensäure in der Pufferlösung als auch durch die Hydrolysezeit ausgelöst. Er begann schon nach 1 h bei 37 °C, betraf aber nur die Umwandlung von $\text{Ph}_2\text{Sn}^{2+}$ zu PhSn^{3+} . Zwei weitere Puffersysteme stabilisierten den pH-Wert während der Hydrolyse nicht ausreichend und führten nur zu geringen Wiederfindungsraten. Am besten geeignet war schließlich eine Ammoniumdihydrogenphosphat-Lösung.

Nach 16-stündiger Hydrolyse einer Standardlösung mit allen OZV wurden zusätzliche Signale auf der Zinn-Linie 271 nm angezeigt. Sie wurden durch GC-MS mit großer Wahrscheinlichkeit als BuPhSnEt_2 , HePhSnEt_2 und OcPhSnEt_2 identifiziert. Der von $\text{Ph}_2\text{Sn}^{2+}$ abgespaltene Phenylrest lagert sich wohl auch, aber nur zu einem geringen Anteil, an andere OZV an, wobei er anscheinend monosubstituierte OZV bevorzugt. Das Komplexmierungsmittel wurde deshalb bei der endgültigen Arbeitsweise vor der Hydrolyse zugesetzt, denn es verhindert möglicherweise eine Übertragung von Phenylgruppen durch die frühzeitige Komplexierung der OZV oder durch die Komplexierung der abgespaltenen Phenylgruppen selbst.

Der Abbau von $\text{Ph}_2\text{Sn}^{2+}$ ist offenbar trotz der schonenden Bedingungen bei der enzymatischen Hydrolyse unvermeidlich. Er beginnt schon nach 1 h, während zum ausreichenden Aufschluss der Substrate mehrere Stunden erforderlich sind. $\text{Ph}_2\text{Sn}^{2+}$ und PhSn^{3+} als Summe zu bestimmen, war kein Ausweg, denn der zuviel gefundene Anteil an PhSn^{3+} war teilweise höher als der abgebaute Anteil an $\text{Ph}_2\text{Sn}^{2+}$. Möglicherweise lag hier noch eine andere Störung vor. Diese beiden OZV lassen sich deshalb als einzige mit dem erarbeiteten Verfahren nicht zufriedenstellend bestimmen.

5.9.4 Blindwerte

Da entionisiertes Wasser größere Mengen an BuSn^{3+} und $\text{Bu}_2\text{Sn}^{2+}$ enthielt, wurde es durch das blindwertfreie Wasser aus der Wasserleitung des Labors ersetzt. Auch ein Faltenfilter, das mit Pentan vorextrahiert war, gab größere Mengen BuSn^{3+} und $\text{Bu}_2\text{Sn}^{2+}$ an eine wässrige Lösung ab. Daher wurden Filterpapiere und Gegenstände aus Cellulose bei der Bestimmung von OZV nicht verwendet und die Pufferlösung z.B. zentrifugiert.

Um Blindwerte durch Adsorption von OZV zu vermeiden, wurden Glasgeräte mit Leitungswasser, Aceton und Cyclohexan/Ethylacetat (1 + 1) gewaschen und bei 280 °C etwa 12 h ausgeheizt oder mit konzentrierter Salpetersäure über Nacht stehen lassen.

5.10 Endgültige Arbeitsweise

Aus all diesen Versuchen ergab sich die folgende optimale Arbeitsweise zur Bestimmung von OZV in Fischen und Muscheln:

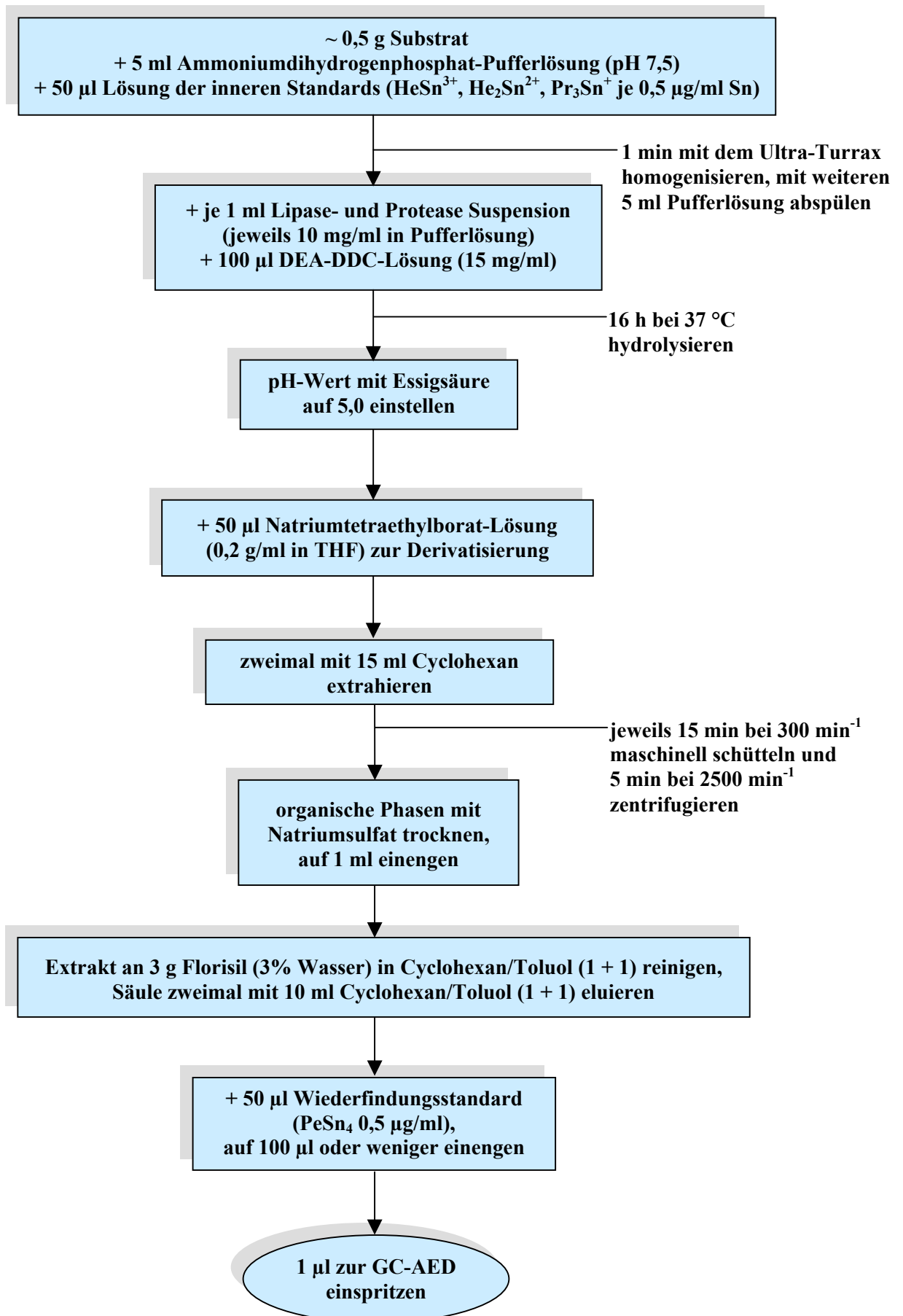


Abb. 23: Optimiertes Analysenverfahren zur Bestimmung von OZV in Fischen und Muscheln

6 Statistische Beurteilung des Analysenverfahrens

Von einem neuen Analysenverfahren verlangt das heutige Qualitätsmanagement statistische Kenndaten, die die Zuverlässigkeit des Verfahrens belegen und seine Eignung für den beabsichtigten Zweck absichern. Wie umfangreich solche Daten sein müssen, ist nicht festgelegt. Dies richtet sich nach der analytischen Fragestellung (z.B. Einzel- oder Multimethode), dem Konzentrationsbereich, den Eigenschaften der Analyten und der Komplexizität des Untersuchungsmaterials.

In der eigenen Arbeit wurden die folgenden Kriterien herangezogen: die Linearität des Analysenverfahrens als Maß für die Proportionalität von Signal und Konzentration, die Wiederholpräzision als Maß für die Streuung der Analyseergebnisse, die Wiederfindungsrate als Maß für die Verluste bei der Aufarbeitung, die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen und die Richtigkeit als Maß für die Übereinstimmung des Mittelwertes mit dem tatsächlich richtigen Wert [53].

Die Untersuchungen wurden mit rückstandsfreiem Forellenfilet, das mit OZV dotiert wurde, und mit dem zertifizierten Referenzmaterial CRM 477 durchgeführt. Das Forellenfilet wurde dazu je achtmal am unteren (etwa 3 µg/kg Sn) und am oberen Ende des Arbeitsbereiches (etwa 400 µg/kg Sn) sowie in sieben Stufen dazwischen mit allen elf OZV dotiert und nach dem optimierten Verfahren (Abschnitt 5.10) aufgearbeitet. Das zertifizierte Muschelpulver wurde siebenmal aufgearbeitet. Zur GC wurde 1 µl aus 100 µl Analysenlösung eingespritzt und das Signal der Zinn-Linie 326 nm des AED gemessen.

6.1 Linearität des Analysenverfahrens

Die Linearität kennzeichnet eine Methode danach, in wieweit sie innerhalb eines bestimmten Konzentrationsbereiches Ergebnisse liefert, die der Konzentration des Analyten proportional sind [53]. Der Begriff beschreibt ganz allgemein den Zusammenhang zwischen Signal und Konzentration, der aber durchaus nicht linear sein muss, wie dies z.B. bei Immunoassays oder bei der Röntgenfluoreszenz der Fall ist [53].

Auch bei der eigenen Analysenmethode war der Zusammenhang zwischen 3 und 400 µg/kg Sn nicht linear, sondern folgte einer quadratischen Abhängigkeit von Signal und Konzentration. Als Maß wurde der Korrelationskoeffizient der Funktion berechnet, die sich aus der neunfachen Dotierung des Forellenfilets mit 3, 10, 20, 30, 40, 100, 200, 300 und 400 µg/kg Sn ergab. Wie aus **Tabelle 18** hervorgeht, waren die Korrelationskoeffizienten mit Werten zwischen 0,9992 und 0,9999 für diesen Spurenbereich sehr gut und nur für $\text{Ph}_2\text{Sn}^{2+}$ mit 0,9942 etwas geringer. Die Tabelle zeigt daneben auch die Korrelationskoeffizienten aus der Kalibrierung, also beim Arbeiten ohne Matrix.

Tab. 18: Korrelationskoeffizienten und Regressionsgleichungen bei neunfacher Dotierung von Forellenfilet (3 - 400 µg/kg Sn) und aus der entsprechenden Kalibrierung

OZV bzw. Ethyl-Derivat	Gesamtes Analysenverfahren		Kalibrierung ohne Matrix	
	Regressions- Gleichung	Korrelations- koeffizient	Regressions- Gleichung	Korrelations- koeffizient
BuSnEt ₃	$y = -0,0005 x^2 + 1,160 x$	0,9993	$y = -0,00004 x^2 + 1,177 x$	0,9996
OcSnEt ₃	$y = 0,0007 x^2 + 0,977 x$	0,9999	$y = 0,00006 x^2 + 0,961 x$	0,9997
PhSnEt ₃	$y = 0,0038 x^2 + 0,925 x$	0,9994	$y = 0,00004 x^2 + 0,433 x$	0,9998
Bu ₂ SnEt ₂	$y = -0,0006 x^2 + 0,834 x$	0,9999	$y = 0,00004 x^2 + 0,931 x$	0,9999
Oc ₂ SnEt ₂	$y = -0,0015 x^2 + 1,327 x$	0,9996	$y = -0,00003 x^2 + 1,008 x$	0,9997
Ph ₂ SnEt ₂	$y = -0,0015 x^2 + 0,538 x$	0,9942	$y = -0,00003 x^2 + 1,141 x$	0,9997
Bu ₃ SnEt	$y = -0,0002 x^2 + 0,865 x$	0,9999	$y = 0,00006 x^2 + 0,961 x$	0,9999
Oc ₃ SnEt	$y = -0,0028 x^2 + 1,740 x$	0,9995	$y = -0,00003 x^2 + 1,167 x$	0,9993
Ph ₃ SnEt	$y = -0,0017 x^2 + 1,403 x$	0,9998	$y = -0,00022 x^2 + 1,703 x$	0,9999
Bu ₄ Sn	$y = -0,0002 x^2 + 0,869 x$	0,9992	$y = 0,00007 x^2 + 0,738 x$	0,9999
Ph ₄ Sn	$y = -0,0044 x^2 + 2,345 x$	0,9993	$y = -0,000002 x^2 + 1,011x$	0,9993

Abbildung 24 zeigt beispielhaft die Funktion für Ph₃SnEt, die sich bei Dotierung von Forellenfilet mit verschiedenen Konzentrationen ergab.

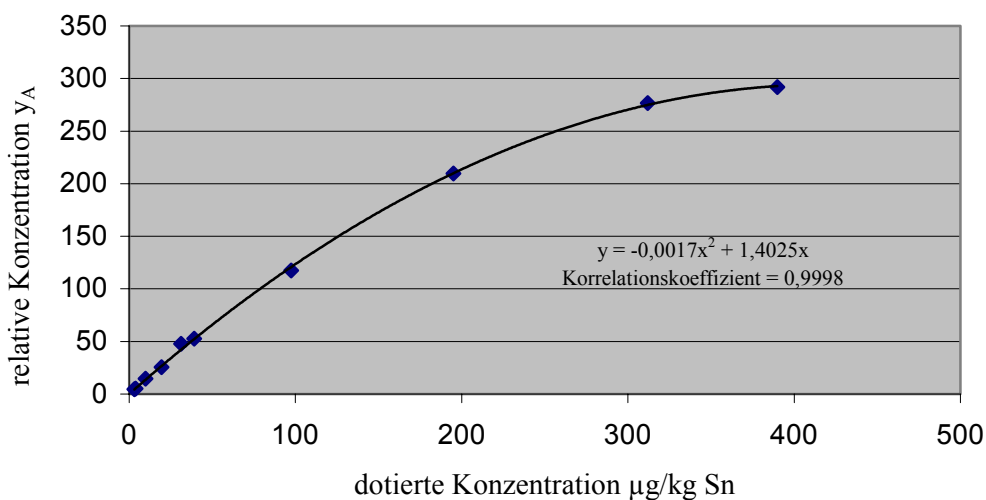


Abb. 24: Beispiel des Zusammenhangs zwischen Signal und Konzentration bei Dotierung von Forellenfilet mit 3 – 400 µg/kg Sn für Ph₃SnEt

6.2 Wiederholpräzision und Wiederfindungsrate

Als Maß für die Wiederholpräzision wurde die relative Wiederholstandardabweichung RSD_r aus den Dotierungen in **Tabelle 19** bestimmt. Wiederholbedingungen beziehen sich auf die Ergebnisse aus einem Verfahren, die ein einzelner Bearbeiter an identischem Untersuchungsmaterial mit denselben Geräten innerhalb der kürzesten möglichen Zeitspanne erhält [53].

Tab. 19: Geringste und höchste Konzentration der Dotierung von Forellenfilet mit elf OZV, gefundene Gehalte, relative Wiederholstandardabweichung und Wiederfindungsrate bei achtfacher Aufarbeitung

OZV	Zusatz µg/kg Sn	gefunden µg/kg	WFR %	RSD_r %	Zusatz µg/kg Sn	gefunden µg/kg	WFR %	RSD_r %
BuSn ³⁺	3,2	2,7	84	10	405	408	101	8
OcSn ³⁺	3,2	3,3	104	4	402	463	115	2
PhSn ³⁺	3,5	4,8	137	15	441	1544	350	11
Bu ₂ Sn ²⁺	3,3	2,5	79	9	403	318	79	5
Oc ₂ Sn ²⁺	3,2	3,2	100	6	410	371	91	9
Ph ₂ Sn ²⁺	3,3	1,2	34	18	426	124	29	15
Bu ₃ Sn ⁺	3,4	3,0	92	9	410	347	85	7
Oc ₃ Sn ⁺	3,3	2,9	92	14	391	325	83	10
Ph ₃ Sn ⁺	3,1	3,6	116	15	390	373	96	11
Bu ₄ Sn	3,1	3,2	98	15	411	474	115	11
Ph ₄ Sn	3,2	4,0	125	20	405	485	120	18

Als Grundlage für die Beurteilung der RSD_r diene die empirisch gewonnene Gleichung von Horwitz. Dieser Autor hatte aus Tausenden von Ringversuchen über viele Jahre hinweg einen Zusammenhang abgeleitet, nach dem heute allgemein die akzeptierbare relative Standardabweichung unter Vergleichsbedingungen (RSD_R) je nach der Konzentration des Analyten abgeschätzt wird [54]. Außerdem leitete er aus Erfahrung ab, dass die Grenzen für die RSD_r unter Wiederholbedingungen meist um den Faktor 0,5 bis 0,75 enger sind als die entsprechenden Werte für die RSD_R . Im Mittelwert ergibt sich daraus: $RSD_r = RSD_R \cdot 0,67$ [53]. Für 1 µg/kg Sn wäre nach der Horwitz-Gleichung eine RSD_R von 45 % tolerierbar und damit eine RSD_r von 30 %. 10 µg/kg Sn ergäben höchstens 21 % RSD_r und 100 µg/kg Sn 15 %. **Tabelle 19** zeigt auch die gefundenen Werte für RSD_r nach achtmaliger Aufarbeitung des Forellenfilets. Sie liegen alle nach Horwitz in dem Bereich, der bei solchen Spurenanalysen zu erwarten ist; nur der Wert für Ph₄Sn ist mit 18 % bei 400 µg/kg Sn etwas größer.

Die Wiederfindungsrate, die die Verluste bei der Aufarbeitung wiedergibt, ist die Differenz aus dem gefundenen Gehalt und der Dotierung. Sie liegt bei 3 µg/kg Sn für die meisten OZV zwischen 79 % und 125 %, bei 400 µg/kg Sn zwischen 79 % und 120 %. Sie war zwar für $\text{Ph}_2\text{Sn}^{2+}$, das zu PhSn^{3+} abgebaut wird, mit 34 % bzw. 29 % sehr gering, wurde aber recht präzise gefunden (RSD_r 18 % bzw. 15 %). Ähnlich war es bei der zu hohen Wiederfindungsrate für PhSn^{3+} (RSD_r 15 % bzw. 11 %). Diese hohen und unterschiedlichen Wiederfindungsraten lassen sich jedoch nicht allein aus dem Abbau von $\text{Ph}_2\text{Sn}^{2+}$ erklären und werden anscheinend noch durch andere Faktoren beeinflusst.

6.3 Nachweis- und Bestimmungsgrenze

Die Nachweisgrenzen (NG) und die Bestimmungsgrenzen (BG) der OZV wurden jeweils aus dem Verhältnis der Peakhöhe zum Rauschen des Gerätes berechnet. Das Rauschen wurde jeweils ermittelt während 1 min des Chromatogramms, das keine OZV enthält. Als Nachweisgrenze definiert DIN 32645 ein Signal-Rausch-Verhältnis von 3:1 und als Bestimmungsgrenze von 9:1 [55].

Wie die Werte in **Tabelle 20** zeigen, lagen die meisten Nachweisgrenzen der OZV unter 1 µg/kg Sn und bei den monosubstituierten OZV mit 1,1 bis 1,6 µg/kg Sn geringfügig höher.

Tab. 20: Nachweisgrenzen (NG) und Bestimmungsgrenzen (BG), berechnet aus dem Verhältnis des Rauschens (0,21 Einheiten) und der Peakhöhe für etwa 3 µg/kg Sn einer OZV im Forellenfilet

OZV	Dotierung µg/kg Sn	Peakhöhe Einheiten	NG µg/kg Sn	BG µg/kg Sn
BuSn^{3+}	3,2	1,7	1,2	3,6
OcSn^{3+}	3,2	1,3	1,6	4,7
PhSn^{3+}	3,5	1,0	1,1	3,3
$\text{Bu}_2\text{Sn}^{2+}$	3,3	3,0	0,7	2,0
$\text{Oc}_2\text{Sn}^{2+}$	3,2	4,3	0,5	1,4
$\text{Ph}_2\text{Sn}^{2+}$	3,3	3,3	0,6	1,9
Bu_3Sn^+	3,4	3,5	0,6	1,8
Oc_3Sn^+	3,3	4,0	0,5	1,6
Ph_3Sn^+	3,1	8,0	0,2	0,7
Bu_4Sn	3,1	2,3	0,8	2,5
Ph_4Sn	3,2	9,0	0,2	0,7

6.4 Richtigkeit

Zur Überprüfung der Richtigkeit wurde das Referenzmaterial CRM 477 siebenmal aufgearbeitet. Sein zertifizierter Gehalt an den drei Butylzinn-Verbindungen war auf die Trockensubstanz bezogen; es entwickelt aber 5 % Wasser [45] und wurde ohne Trocknung aufgearbeitet. Deshalb wurde der Gehalt zunächst auf 5 % Wasser umgerechnet und die eigene Wiederfindungsrate mit diesem Wert verglichen.

Wie **Tabelle 21** zeigt, lagen die Wiederfindungsraten zwischen 80 bis 93 % und damit sehr gut für eine solche Spurenanalyse.

Tab. 21: Überprüfung der Richtigkeit durch Aufarbeitung des zertifizierten Referenzmaterials CRM 477

OZV	eigene Werte			CRM 477		WFR %
	\bar{x} µg/kg Sn	s µg/kg Sn	RSD _r %	\bar{x} (TM) µg/kg Sn	\bar{x} (5 % H ₂ O) µg/kg Sn	
BuSn ³⁺	817	36	4	1010	964	85
Bu ₂ Sn ²⁺	594	56	9	790	747	80
Bu ₃ Sn ⁺	798	23	3	900	858	93

7 Untersuchung von Fischen, Schalen- und Weichtieren

Mit dem eigenen Analysenverfahren wurden 40 Proben untersucht; davon waren 20 Seefische, 14 Süßwasserfische und 6 Schalentiere. Die meisten Süßwasserfische wurden von Hobbyanglern im Juni und Juli 2002 in einem Seitenarm der Ems bei Gittrup und in der Wersen bei Angelnmodde (beide nahe Münster) gefangen. Die weiteren Proben waren im Rahmen der amtlichen Lebensmittelüberwachung aus dem Handel entnommen worden. Die meisten Proben ließen nur eine geringe Belastung durch OZV erwarten und sollten die hohe Nachweisempfindlichkeit der Methode belegen. **Tabelle 23** zeigt die gefundenen Gehalte.

Wie daraus hervorgeht, enthielten die meisten Seefische sowohl Bu_3Sn^+ als auch Ph_3Sn^+ , die Süßwasserfische aus Ems und Wersen aber nur Ph_3Sn^+ . Wie erwartet, waren die Gehalte gering und demonstrierten die Leistungsfähigkeit der Methode. Der höchste gefundene Gehalt waren $6,4 \mu\text{g}/\text{kg}$ Bu_3Sn^+ in einem Dorsch. Legt man zur Beurteilung den TDI-Wert von $0,25 \mu\text{g}/\text{kg}$ Körpergewicht zu Grunde, könnte ein 70 kg schwerer Erwachsener täglich $2,7 \text{ kg}$ davon ohne jegliches Risiko verzehren. Die derzeit gemessenen Rückstände haben also nur geringe Bedeutung für die menschliche Gesundheit. Sie müssen aber weiterhin sorgfältig überwacht werden, denn die Gehalte in Fischen und Muscheln aus Gewässern, die stärker mit OZV belastet sind, können wesentlich höhere Werte erreichen. **Tabelle 22** zeigt dazu beispielhaft einige Daten aus der Literatur. Danach waren Fische teilweise bis zu $3300 \mu\text{g}/\text{kg}$ mit Butylzinn-Verbindungen und Muscheln bis zu $2700 \mu\text{g}/\text{kg}$ mit Bu_3Sn^+ belastet.

Tab. 22: Butylzinn-Verbindungen in Fischen und Bu_3Sn^+ in Muscheln verschiedener Jahre; Angabe jeweils in $\mu\text{g}/\text{kg}$ Frischgewicht [12]

Ort	Jahr	\sum Butylzinn-Verbindungen in Fisch
Danziger Bucht	1990	14 - 455
Solomon Inseln	1990 - 1994	0,2 - 1,4
Papua Neuginea	1990 - 1994	0,13 - 9
Australien	1990 - 1994	1,5 - 40
Indien	1990 - 1994	7 - 56
Bangladesh	1990 - 1994	0,47 - 190
Taiwan	1990 - 1994	0,49 - 18
Indonesien	1990 - 1994	0,41 - 19
Thailand	1990 - 1994	2,9 - 16
Vietnam	1990 - 1994	0,23 - 0,93
Golf von Mexiko	1994	158 - 289
südliche Ostsee	1997	44 - 3300
Bu_3Sn^+ in Muscheln		
Portugal	1986	2 - 17
Italien	1991 - 1994	114 - 2724
Schweden	1997	22
England	1997	43

Tab. 23: Rückstände an elf OZV im Gewebe von Seefischen, Süßwasserfischen und Schalentieren, in µg/kg Frischgewicht (berechnet als Sn und als Kation)

Nr.	Fisch / Schalentier	Herkunft	Bu ₃ Sn ⁺		Ph ₃ Sn ⁺		weitere 9 OZV
			Sn	Kation	Sn	Kation	
1	Seelachs	Nordostatlantik	1,1	2,7	-	-	-
2	Seelachs	Nordatlantik	1,0	2,4	-	-	-
3	Seelachs	unbekannt	1,4	3,4	-	-	-
4	Seelachs	unbekannt	1,6	3,9	0,2	0,6	-
5	Seelachs	unbekannt	0,6	1,5	-	-	-
6	Seelachs	unbekannt	2,0	4,9	0,2	0,6	-
7	Rotbarsch	Nordostatlantik	-	-	-	-	-
8	Rotbarsch	unbekannt	-	-	-	-	-
9	Kabeljau	unbekannt	0,8	2,0	-	-	-
10	Kabeljau	unbekannt	-	-	-	-	-
11	Dorsch	unbekannt	2,6	6,4	0,2	0,6	-
12	Scholle	unbekannt	-	-	0,5	1,5	-
13	Scholle	Niederlande	0,7	1,7	2,0	5,9	-
14	Scholle	Niederlande	-	-	0,7	2,1	-
15	Scholle	Nordostatlantik	-	-	0,8	2,4	-
16	Makrele	Niederlande	0,6	1,5	0,4	1,2	-
17	Makrele	Niederlande	2,4	5,9	1,0	2,9	-
18	Lachs	Norwegen	-	-	-	-	-
19	Schwertfisch	unbekannt	1,4	3,4	1,5	4,4	-
20	Seeteufel	unbekannt	2,1	5,1	1,9	5,6	-
21	Viktoriabarsch	Viktoriasee, Afrika	-	-	-	-	-
22	Forelle	Italien	-	-	-	-	-
23	Forelle	Italien	-	-	-	-	-
24	Döbel	Ems	-	-	0,7	2,1	-
25	Döbel	Werse	-	-	-	-	-
26	Brasse	Werse	-	-	0,7	2,1	-
27	Barsch	Werse	-	-	0,4	1,2	-
28	Rotauge	Werse	-	-	0,9	2,6	-
29	Rotauge	Werse	-	-	-	-	-
30	Rotauge	Werse	-	-	-	-	-
31	Rotauge	Werse	-	-	-	-	-
32	Rotauge	Werse	-	-	-	-	-
33	Ukelei	Werse	-	-	-	-	-
34	Rotfeder	unbekannt	-	-	-	-	-
35	Shrimps, gekocht	unbekannt	-	-	-	-	-
36	Shrimps, gekocht	Thailand	-	-	-	-	-
37	Garnelen, gekocht	unbekannt	-	-	-	-	-
38	Black Tiger Riesengarnelen, roh	Indonesien	-	-	-	-	-
39	Flusskrebse, gekocht	unbekannt	-	-	-	-	-
40	Grünschalenmuscheln	Neuseeland	-	-	-	-	-

- : < NG (BuSn³⁺ 1,2, OcSn³⁺ 1,6, PhSn³⁺ 1,1, Bu₂Sn²⁺ 0,7, Oc₂Sn²⁺ 0,5, Ph₂Sn²⁺ 0,6, Oc₃Sn⁺ 0,5, Bu₄Sn 0,8 und Ph₄Sn 0,2 µg/kg Sn)

8 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Analysenverfahren entwickelt, mit dem die Rückstände von elf Organozinn-Verbindungen (OZV) nebeneinander in fettarmen und fetthaltigen Fischen sowie in Muscheln selektiv, empfindlich und zuverlässig bestimmt werden können. OZV gelangen auf unterschiedlichen Wegen in die Umwelt; sie sind besonders toxisch gegenüber aquatischen Organismen und werden vor allem von Muscheln aus Gewässern angereichert. Als duldbare tägliche Aufnahme für den Menschen gelten $0,25 \mu\text{g}/\text{kg}$ Körpergewicht (bezogen auf Bu_3Sn^+).

In das Analysenverfahren wurden alle vier Alkylierungsstufen der wirtschaftlich und toxikologisch bedeutenden Butylzinn- und Phenylzinn-Verbindungen und die mono- bis trisubstituierten Octylzinn-Verbindungen einbezogen. Als innere Standards dienten Monoheptylzinn-trichlorid für monosubstituierte, Diheptylzinn-dichlorid für disubstituierte und Tripropylzinn-chlorid für tri- und tetrasubstituierte OZV. Tetrapentylzinn wurde als Wiederfindungsstandard am Ende der Aufarbeitung zugesetzt.

Auf der Suche nach einem geeigneten Detektionssystem wurden Kombinationen der Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie mit Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS) und der Gaschromatographie mit dem Atomemissionsdetektor (GC-AED) erprobt. Bei der LC-MS/MS, die die Analyten durch mehrfache, aufeinander folgende Fragmentierung sehr selektiv anzeigt, wurde die Detektion nach Electrospray ionization (ESI) und Atmospheric pressure chemical ionization (APCI) untersucht. Wie die Optimierung der Geräteparameter mit Lösungen in Methanol/Wasser (1 + 1) und Methanol/Wasser/Ameisensäure (50 + 49,9 + 0,1) zeigte, waren die optimalen Bedingungen und Nachweisempfindlichkeiten für die einzelnen OZV sehr unterschiedlich, so dass diese Technik nicht zur Spurenanalyse aller OZV im Rahmen einer Multimethode geeignet war. Sie ließe sich allenfalls als Einzelmethode für die besonders umweltrelevanten Bu_3Sn^+ und Ph_3Sn^+ nutzen.

Die GC-AED war dagegen wegen der hohen Trennleistung der Kapillarsäulen und der elementspezifischen Anzeige besonders selektiv. Bei dem überwiegend genutzten AED 2350 A führte das Optimieren der Cavity-Temperatur ($320 \text{ }^\circ\text{C}$), des Sauerstoff- und Wasserstoff-Vordrucks (1,92 bzw. 0,94 bar) und der Flussrate für das Make-up Gas Helium (220 ml/min) zu höchster Empfindlichkeit bei der Messung auf den verschiedenen Zinn-Linien, insbesondere bei 326 nm. Um die OZV genügend flüchtig zur GC zu machen, wurden sie mit Natriumtetraethylborat derivatisiert, das anders als ein Grignard-Reagenz auch in Gegenwart von Wasser anwendbar ist und dessen Überschuss nicht entfernt werden muss. Auf diese Weise ließen sich die OZV in einem einzigen Arbeitsschritt gleichzeitig derivatisieren und aus wässriger Matrix extrahieren. Die Derivate wurden durch GC an der mittelpolaren Kapillarsäule DB-1701 vollständig getrennt, aber auch an der unpolaren Kapillarsäule DB-5, die höhere Temperaturen erlaubt, um Verunreinigungen auszuheizen.

Bevor OZV-Rückstände quantitativ aus Fisch- und Muschelgewebe extrahiert werden können, müssen sie vollständig aus den Bindungen an Substratbestandteile gelöst werden. Die Möglichkeiten dazu wurden an Muschelpulver mit zertifizierten Gehalten an OZV erprobt. Die Extraktion durch Ultraschall mit und ohne Zusatz von Essigsäure und die alkalische Hydrolyse mit Tetraethylammoniumhydroxid-Lösung waren dabei weniger wirksam als die Hydrolyse mit einer Lipase und einer Protease. Diese enzymatische Hydrolyse während 16 h bei 37 °C erbrachte konstante Wiederfindungsraten um 78 % mit schmalen Variationskoeffizienten von 2 – 6 % für die zertifizierten BuSn^{3+} , $\text{Bu}_2\text{Sn}^{2+}$ und Bu_3Sn^+ und ebenfalls geringe Variationskoeffizienten (1 – 8 %) für die nicht zertifizierten PhSn^{3+} , $\text{Ph}_2\text{Sn}^{2+}$ und Ph_3Sn^+ . Bei der Aufarbeitung des Referenzmaterials trennte Florisil störende Begleitstoffe wesentlich besser ab als Kieselgel 60, und Cyclohexan/Ethylacetat (1 + 1) erschien zunächst am besten geeignet, um die Lösung zu extrahieren.

Zur schnellen und einfachen Extraktion der OZV-Derivate ohne zusätzliche Reinigung wurde außerdem die Festphasen-Mikroextraktion (solid phase microextraction, SPME) erprobt. Mit einer 1 cm langen Polydimethylsiloxan-Faser (PDMS, 100 µm Filmdicke), die in die wässrige Lösung eintauchte, wurde der Einfluss von Extraktionszeit, Temperatur und pH-Wert bei konstanter Ionenkonzentration und Rührrate untersucht. Wenn die optimierten Bedingungen (60 min, 55 °C und pH 5,0) auf die Bestimmung in Fischgewebe übertragen wurden, beeinträchtigten jedoch die Begleitstoffe die Bestimmung der OZV so stark, dass weitere aufwendige Reinigungsschritte erforderlich gewesen wären.

Sobald die OZV aus der Matrix freigesetzt waren, wurden sie mit Diethylammoniumdiethyldithiocarbamat-Lösung komplexiert, damit die gebildeten neutralen Komplexe in organischen Lösungsmitteln besser löslich werden.

Um die Aufarbeitung auch für eine fettreiche Matrix wie Aalfilet zu optimieren, mussten auch störende Lipide abgetrennt werden, die durch große Peaks auf der Kohlenstoff-Linie 264 nm des AED sichtbar waren und die Anzeige auf der Zinn-Linie 271 nm erheblich beeinträchtigten. Sie stammten nach ihren Massenspektren vor allem von Fettsäuren, Fettsäureethylestern und Cholesterin. Der Versuch die Fettsäuren als wasserlösliche Alkaliseifen abzutrennen, schlug fehl. Der beste Ausweg war schließlich, die OZV-Derivate aus der wässrigen Substratlösung mit Cyclohexan zu extrahieren und den Extrakt mit Cyclohexan/Toluol (1 + 1) von einer Säule aus 3 g Florisil (desaktiviert mit 3 % Wasser) zu eluieren.

Die Messung auf der Zinn-Linie 271 nm war daraufhin nicht mehr durch Begleitstoffe beeinträchtigt und ergab gute Wiederfindungsraten. Sie war nur für PhSn^{3+} viel zu hoch und für $\text{Ph}_2\text{Sn}^{2+}$ und Ph_3Sn^+ zu niedrig, was den Abbau von $\text{Ph}_2\text{Sn}^{2+}$ und Ph_3Sn^+ zu PhSn^{3+} wahrscheinlich machte. Außerdem deuteten zusätzliche kleine Signale auf der Zinn-Linie auf Artefakte hin, die nach ihren Massenspektren wahrscheinlich von BuPhSnEt_2 , HePhSnEt_2 und OcPhSnEt_2 stammten und durch

Übertragung einer Phenylgruppe auf BuSn^{3+} , HeSn^{3+} und OcSn^{3+} entstanden waren. Da dies nur während der enzymatischen Hydrolyse stattfinden konnte, wurde systematisch der Einfluss aller verwendeten Bedingungen untersucht. Dabei wurde bewiesen, dass nur $\text{Ph}_2\text{Sn}^{2+}$, nicht aber Ph_3Sn^+ zu PhSn^{3+} abgebaut wird, ausgelöst durch die Citronensäure in der Puffer-Lösung und durch zu lange Hydrolyse. Andere Pufferlösungen führten nur zu geringen Wiederfindungsraten oder stabilisierten den pH-Wert während der Hydrolyse von Fischgewebe nicht ausreichend. Daraufhin wurde nur noch eine Ammoniumdihydrogenphosphat-Pufferlösung verwendet. In Kauf genommen wurde, dass $\text{Ph}_2\text{Sn}^{2+}$ bereits nach 1 h teilweise abgebaut wird, der Aufschluss der Matrix aber mindestens 16 h benötigt.

Die Kalibrierfunktionen des Verfahrens (2. Ordnung ohne Achsenabschnitt) hatten für alle OZV von 0,01 bis 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Sn Korrelationskoeffizienten von mindestens 0,9993. Die statistischen Kenndaten ergaben für dotiertes Forellenfilet mit 3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ Sn sehr gute Variationskoeffizienten (VK) von 4 bis 20 %, und bei 400 $\mu\text{g}/\text{kg}$ Sn von 2 bis 18 %. Auch PhSn^{3+} und $\text{Ph}_2\text{Sn}^{2+}$ wurden mit großer Präzision wiedergefunden (VK = 15% und 11 % bzw. VK = 18 % und 15 %). Die Wiederfindungsraten lagen bei der niedrigen Konzentration für neun von elf OZV zwischen 79 und 125 %, bei der hohen zwischen 79 und 120 %. Die Dotierung von Forellenfilet mit neun Konzentrationsstufen von 3 bis 400 $\mu\text{g}/\text{kg}$ Sn ergab Korrelationskoeffizienten von 0,9992 bis 0,9999 und nur für $\text{Ph}_2\text{Sn}^{2+}$ 0,9942. Die Nachweisgrenzen lagen von 0,2 bis 1,6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ Sn, die Bestimmungsgrenzen von 0,7 bis 4,7 $\mu\text{g}/\text{kg}$ Sn. Die Richtigkeit wurde durch Analyse des Referenzmaterials CRM 477 überprüft und ergab für die zertifizierten Mono- bis Tributylzinn-Verbindungen Wiederfindungsraten von 80 bis 93 % bei Variationskoeffizienten von 3 bis 9 %.

Mit dem Verfahren wurden schließlich 40 Proben See- und Süßwasserfische sowie Schalentiere untersucht. In den Fischen wurden ausschließlich Bu_3Sn^+ und Ph_3Sn^+ mit Gehalten von 1,2 - 6,4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ Kation bzw. 0,6 - 5,9 $\mu\text{g}/\text{kg}$ Kation gefunden.

Das erarbeitete Analysenverfahren hat sich damit als sehr leistungsfähig erwiesen, wenn zahlreiche OZV nebeneinander auch in fettreicher Matrix und ohne großen Arbeitsaufwand bestimmt werden sollen. Im gereinigten Extrakt können dann die Rückstände der OZV durch GC-AED sehr selektiv, empfindlich und genau selbst im Spurenbereich bestimmt werden.

9 Experimenteller Teil

9.1 Häufig verwendete Chemikalien, Lösungsmittel und Geräte

Chemikalien

Ameisensäure, p.a. (Fa. Merck, Darmstadt, Nr. 100264)

Essigsäure, 100 %, suprapur (Merck Nr. 100066)

Essigsäure, halbkonzentriert: Essigsäure/Leitungswasser (1 + 1, v/v)

Florisil, 100 – 200 mesh (Fa. Promochem, Wesel, Nr. 41883), 6 h bei 600 °C geblüht

Florisil (3% Wasser): In einem Jodzahl-Kolben (250 ml) werden 97 g Florisil mit 3 g Leitungswasser versetzt und so lange geschüttelt, bis sich das Wasser vollständig mit dem Florisil vermischt hat (etwa 30 min). Der Kolben wird mit einem Glasstopfen und Parafilm luftdicht verschlossen. Das desaktivierte Florisil wird nach zwei Wochen frisch hergestellt

Glaswatte, silanisiert, research grade (Fa. Serva Electrophoresis, Heidelberg, Nr. 22367)

Lipase, Typ VII from *Candida rugosa* (Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim, Nr. L 1754)

Protease, Typ XIV bacterial, from *Streptomyces griseus* (Sigma-Aldrich Nr. P 5147)

Enzymsuspension (10 mg/ml): Je etwa 50 bis 150 mg Protease und Lipase werden getrennt in verschließbare Zentrifugengläser (50 ml) eingewogen und jeweils mit so viel Ammoniumdihydrogenphosphat-Pufferlösung (pH 7,5) versetzt, dass jede Suspension 10 mg/ml Enzym enthält. Man lässt die Zentrifugengläser 10 min im Ultraschallbad stehen und durchmischt vor der Entnahme erneut mit dem Vibrationsmischer. Die Suspensionen werden vor der Analyse frisch hergestellt

Natriumsulfat, p.a., wasserfrei (Merck Nr. 106649), über Nacht bei 600 °C geblüht

Natronlauge, 1 mol/l (Merck Nr. 109137)

Natronlauge, gesättigt: Zu etwa 20 g Natriumhydroxid-Plätzchen (p.a., Merck Nr. 106498) wird unter Kühlung mit Eiswasser so viel Leitungswasser gegeben, dass ein ständiger Bodensatz an Natriumhydroxid-Plätzchen in der Lösung bleibt

Salpetersäure, 65 %, p.a. (Merck Nr. 100452)

Stickstoff 5.0 (Fa. Westfalen, Münster, Reinheit 99,999 %)

DEA-DDC-Lösung: 1,5 mg/ml oder 15 mg/ml Diethylammonium-diethyldithiocarbamat (Fa. Chemos, Regenstauf, Nr. D0488) in Aceton, täglich frisch hergestellt

Natriumtetraethylborat (Fa. ABCR GmbH, Karlsruhe, Nr. S11-0575)

Natriumtetraethylborat-Lösung in Aceton (0,01 g/ml): Aus dem gewogenen Gefäß mit Natriumtetraethylborat werden mit einem Hornspatel etwa 50 bis 150 mg entnommen und sofort in etwa 1 ml Aceton gelöst, das sich in einem verschlossenen Reagenzglas befindet. Die genaue Einwaage wird durch Zurückwiegen des Gefäßes ermittelt, in das schließlich noch 2 min lang Argon als Schutzgas eingeleitet wird. Die Lösung wird mit so viel Aceton verdünnt, dass sie 0,01 g/ml Natriumtetraethylborat enthält. Sie wird täglich frisch hergestellt

Natriumtetraethylborat-Lösung in Tetrahydrofuran (0,2 g/ml): Zu 1 g Natriumtetraethylborat werden 5,0 ml Tetrahydrofuran gegeben. Wenn die Gas- und Wärmeentwicklung abgeklungen ist, wird das Gefäß mit einer Bördelkappe verschlossen. Die Lösung wird bei – 20 °C aufbewahrt und innerhalb von 4 - 6 Wochen verbraucht

Acetat-Pufferlösung (pH 5,0): In einem Messkolben (1 l) werden 8 g Natriumacetat (p.a., wasserfrei, Merck Nr. 106268) und 2 g Essigsäure in 900 ml Leitungswasser gelöst. Durch weitere Zugabe von Natriumacetat wird der pH-Wert auf 5,0 (pH-Meter) eingestellt und die Lösung mit Wasser zur Marke aufgefüllt

Citronensäure/Phosphat-Pufferlösung (pH 7,5): In einem Messkolben (1 l) werden 21 g Citronensäure-monohydrat (p.a., Merck Nr. 100244), 11,5 g Ammoniumdihydrogenphosphat (p.a., Merck Nr. 101126) in 900 ml Leitungswasser gelöst. Man gibt 64 ml Ethanol (destilliert) zu, lässt den Messkolben einige Minuten im Ultraschallbad stehen, stellt den pH-Wert durch Zugabe von Ammoniaklösung (25 %, p.a., Merck Nr. 105432) auf 7,5 ein und füllt die Lösung mit Wasser zur Marke auf

Ammoniumdihydrogenphosphat-Pufferlösung (pH 7,5): In einem Messkolben (1 l) werden 11,5 g Ammoniumdihydrogenphosphat in 900 ml Leitungswasser gelöst. Man gibt 64 ml Ethanol (destilliert) zu, lässt den Messkolben einige Minuten im Ultraschallbad stehen, stellt den pH-Wert durch Zugabe von Ammoniaklösung (25 %, p.a., Merck Nr. 105432) auf 7,5 ein und füllt die Lösung mit Wasser zur Marke auf. Vor der Verwendung wird der gebildete Niederschlag 10 min bei 3000 min^{-1} abzentrifugiert

Lösungsmittel

Aceton, picograde (Promochem Nr. 1142)

Cyclohexan, picograde (Promochem Nr. 1179)

Ethylacetat, picograde (Promochem Nr. 1191)

Methanol, picograde (Promochem Nr. 1263)

n-Hexan, picograde (Promochem Nr. 1244)

Tetrahydrofuran für die HPLC (Promochem Nr. 2858)

Toluol, picograde (Promochem Nr. 1350)

Gemisch N: Methanol/Wasser (1 + 1, v/v)

Gemisch S: Methanol/Wasser/Ameisensäure (50 + 49,9 + 0,1, v/v)

Cyclohexan/Ethylacetat (1 + 1, v/v)

Elutionsgemisch: Cyclohexan/Toluol (1 + 1, v/v)

Geräte

Analysenwaage (Fa. Heinrich Faust, Köln, Modell FA 210-4iCE, Nr. 60808466)

Laborwaage (Fa. Sartorius, Göttingen, Modell LC 4800 P, Nr. 40110037)

Mikroanalysenwaage, Wägebereich 0,1 bis 5100 mg (Sartorius Modell KC BA 100, Nr. 80706617)

Bechergläser, 50 ml, 250 ml, 400 ml und 600 ml

Mikrobecherglas, 10 mm hoch, i.D. 6 mm (Fa. Burdich, Limburg/Lahn, Sonderanfertigung)

Chromatographie-Säule mit Lösungsmittelreservoir, 30 cm lang, i.D. 1 cm

Enzypipetten, 100 μl , 200 μl , 500 μl , 1 ml und 2 ml

Vollpipetten, 2 ml, 2,5 ml, 3 ml, 5 ml und 10 ml

Mikroliterpipetten, Einstellbereich 10 µl – 100 µl (Nr. 354580), 200 µl – 1000 µl (Nr. 361130) und 500 µl – 5000 µl (Nr. 268627) (Fa. Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg)

GC-Gläschen, 0,1 ml Inhalt (Fa. Agilent Technologies, Waldbronn, Nr. 9301-0977) und 1,5 ml Inhalt (Fa. Machery & Nagel, Düren, Modell N11-1HP, Nr. 70201HP) mit Bördelkappe (Machery & Nagel Modell N11TB/oA-0.9, Nr. 70256)

Jodzahl-Kolben, 250 ml

Messkolben, 10 ml, 20 ml, 25 ml, 50 ml, 100 ml und 1000 ml

Spitzkolben, 50 ml und 100 ml

Spritze, 100 µl, gasdicht (Fa. Hamilton, Reno, NV, USA, Modell 1710N, Nr. 81075)

Labor-pH-Meter (Fa. Knick, Berlin, Modell 765 Calimatic, Nr. 1010699) mit Einstabmesskette

Laborzentrifuge (Fa. Heraeus Instruments, Hanau, Modell Labofuge 400, Nr. 277853)

Zentrifugenglas, 50 ml, verschließbar (Burdich, Sonderanfertigung)

Vakuum-Rotationsverdampfer (Fa. Büchi, Buchs/Schweiz, Modell Rotavapor RE 111, Nr. 1044335) mit Vakuum Controller (Büchi Modell 168, Nr. 1238146), Wasserbad (Büchi Modell 461, Nr. 1126357) und Vakuumpumpe (Fa. KNF Neuberger, Freiburg, Modell PM 8954-726.3, Nr. 989168)

Schüttelmaschine (Fa. IKA Labortechnik, Staufen, Modell KS 501 digital, Nr. 2476000)

Trockenschrank mit digitaler Temperaturanzeige (Fa. WTB Binder, Tuttlingen, Modell 1505330002020, Nr. 930455)

Ultraschallbad Sonorex (Fa. Bandelin Electronic, Berlin, Modell RK 255, Nr. 315084050)

Ultra-Turrax (IKA Labortechnik Modell T25, Nr. 752191)

Vibrationsmischer (Fa. Heidolph Instruments, Schwabach, Modell Reax 1 DR, Nr. 54117)

9.2 Untersuchungsmaterial

Zertifiziertes Referenzmaterial: Gefriergetrocknetes Muschelgewebe (Promochem Nr. CRM 477), bei – 20 °C aufbewahrt, mit den folgenden zertifizierten Daten für den Gehalt und die Unsicherheit, jeweils bezogen auf die Trockensubstanz:

OZV	mg/kg Kation	mg/kg Sn
Monobutylzinn	1,50 ± 0,27	1,01 ± 0,19
Dibutylzinn	1,54 ± 0,12	0,79 ± 0,06
Tributylzinn	2,20 ± 0,19	0,90 ± 0,08

9.3 OZV

9.3.1 Standardsubstanzen

Monobutylzinn-trichlorid, Reinheit > 98 % (Promochem Nr. TF 03437) [BuSnCl₃]

Dibutylzinn-dichlorid, Reinheit > 98 % (Promochem Nr. TF 03438) [Bu₂SnCl₂]

Tributylzinn-chlorid, Reinheit > 98 % (Promochem Nr. TF 03439) [Bu₃SnCl]

Tetrabutylzinn, Reinheit > 98 % (Promochem Nr. TF 03440) [Bu₄Sn]

Monophenylzinn-trichlorid, Reinheit 98 % (Sigma-Aldrich Nr. 27,723-1) [PhSnCl₃]

Diphenylzinn-dichlorid, Reinheit > 99 % (Fa. Acima, Buchs/Schweiz, Nr. OFC 2157-E) [Ph₂SnCl₂]

Triphenylzinn-chlorid, Reinheit > 98 % (Promochem Nr. TF 03448) [Ph₃SnCl]

Tetraphenylzinn, Reinheit 97 % (Sigma-Aldrich Nr. T2,672-7) [Ph₄Sn]

Monooctylzinn-trichlorid, Reinheit > 99 % (Promochem Nr. TF 03443) [OcSnCl₃]

Dioctylzinn-dichlorid, Reinheit 97 % (Fa. Lancaster Synthesis, Frankfurt/Main, Nr. 3261) [Oc₂SnCl₂]

Trioctylzinn-chlorid, Reinheit > 98 % (Promochem Nr. TF 03445) [Oc₃SnCl]

Monoheptylzinn-trichlorid, Reinheit > 99 % (Acima Nr. OFC 1932-E) [HeSnCl₃]

Diheptylzinn-dichlorid, Reinheit > 99 % (Acima Nr. OFC 1737-E) [He₂SnCl₂]

Tripropylzinn-chlorid, Reinheit > 98 % (Merck Nr. 8.087.350.005) [Pr₃SnCl]

Tetrapentylzinn, Reinheit 97 % (Sigma-Aldrich Nr. 36,667-6) [Pe₄Sn]

Trimethylphenylzinn, Reinheit 98 % (Sigma-Aldrich Nr. 36,633-1) [Me₃PhSn]

9.3.2 Herstellung der Vergleichslösungen

Alle Lösungen werden bei 4 °C im Dunkeln aufbewahrt und alle 6 Monate frisch hergestellt. Nach jeder Entnahme einer Lösung wird der betreffende Messkolben mit Stopfen gewogen. Vor einer späteren Entnahme wird er wieder gewogen und die Gewichts Differenz, die z.B. durch verdunstetes Lösungsmittel entstanden ist, ausgeglichen.

Stammlösungen (etwa 1 mg/ml Sn)

Für jede OZV wird ein Messkolben (50 ml) zur Marke mit Aceton gefüllt (nur für Ph₄Sn mit Tetrahydrofuran). Je nach OZV werden 110 bis 210 mg in ein Mikrobecherglas auf der Mikroanalysewaage eingewogen. Das Mikrobecherglas wird in den Messkolben gegeben; dieser bleibt 10 min im Ultraschallbad stehen und wird nochmals umgeschüttelt.

Standardlösungen für die HPLC

Jede Stammlösung der je vier Butyl- und Phenyl-OZV sowie von Oc₂SnCl₂, HeSnCl₃, He₂SnCl₂ und Pe₄Sn wird sowohl mit Gemisch N als auch mit Gemisch S auf jeweils 1 µg/ml Sn verdünnt.

Standardlösungen für die GC

SPME-Standardlösung (1 bzw. 5 µg/ml Sn): Die Stammlösungen der OZV werden so mit Aceton verdünnt, dass die Standardlösung die vier Butyl-OZV, HeSn³⁺, PhSn³⁺ und Ph₂Sn²⁺ zu je 1 µg/ml Sn sowie He₂Sn²⁺, Oc₂Sn²⁺, Pe₄Sn, Ph₃Sn⁺ und Ph₄Sn zu je 5 µg/ml Sn enthält.

Standardlösung zur Detektorkontrolle: Die Stammlösungen von Me_3PhSn , Bu_4Sn , Ph_4Sn und Pe_4Sn werden gemeinsam mit Aceton auf jeweils $0,1 \mu\text{g/ml Sn}$ verdünnt.

OZV-Standardlösung ($10 \mu\text{g/ml Sn}$): Die Stammlösungen der je vier Butyl- und Phenyl-OZV sowie der drei Octyl-OZV werden gemeinsam mit Aceton auf jeweils $10 \mu\text{g/ml Sn}$ verdünnt.

Lösung des inneren Standards ($0,5$, 4 und $10 \mu\text{g/ml Sn}$): Die Stammlösungen von HeSnCl_3 , He_2SnCl_2 und Pr_3SnCl werden gemeinsam mit Aceton auf $0,5 \mu\text{g/ml Sn}$, $4 \mu\text{g/ml Sn}$ bzw. $10 \mu\text{g/ml Sn}$ verdünnt.

Wiederfindungsstandard ($0,5$, 4 und $10 \mu\text{g/ml Sn}$): Die Stammlösung von Pe_4Sn wird mit Aceton auf $0,5 \mu\text{g/ml Sn}$, $4 \mu\text{g/ml Sn}$ bzw. $10 \mu\text{g/ml Sn}$ verdünnt.

Standardlösungen zur statistischen Beurteilung des Analysenverfahrens: Die Stammlösungen der je vier Butyl- und Phenyl-OZV sowie der drei Octyl-OZV werden gemeinsam mit Aceton auf jeweils $10 \mu\text{g/ml Sn}$ verdünnt (Standardlösung A). Ebenso werden die Stammlösungen von HeSnCl_3 , He_2SnCl_2 und Pr_3SnCl gemeinsam mit Aceton auf $10 \mu\text{g/ml Sn}$ verdünnt (Standardlösung B). Die Stammlösung von Pe_4Sn wird mit Aceton auf $0,5 \mu\text{g/ml Sn}$ verdünnt (Standardlösung C).

In elf Messkolben (25 ml) werden die in den Spalten 2 und 4 der Tabelle angegebenen Volumina der Standardlösungen A und B gegeben und mit Aceton zur Marke aufgefüllt. Die Spalten 3 und 5 geben die Konzentration der OZV in den Messkolben in $\mu\text{g/ml Sn}$ an.

Standardlösung	Standardlösung A [ml]	OZV [$\mu\text{g/ml Sn}$]	Standardlösung B [ml]	innerer Standard [$\mu\text{g/ml Sn}$]
1	10,0	4,00	1,25	0,50
2	8,00	3,20	1,25	0,50
3	5,00	2,00	1,25	0,50
4	2,50	1,00	1,25	0,50
5	1,00	0,40	1,25	0,50
6	0,80	0,32	1,25	0,50
7	0,50	0,20	1,25	0,50
8	0,25	0,10	1,25	0,50
9	0,10	0,04	1,25	0,50
10	0,08	0,03	1,25	0,50
11	0,05	0,02	1,25	0,50

Bei den Untersuchungen werden $0,5 \text{ g}$ Analysenmaterial mit jeweils $50 \mu\text{l}$ der Standardlösungen 1 – 11 versetzt und aufgearbeitet, wie in Abschnitt 9.8.2 beschrieben. Als Wiederfindungsstandard werden $50 \mu\text{l}$ Standardlösung C zugegeben.

9.3.3 Kalibrierung

9.3.3.1 Standardlösungen zur Kalibrierung

Standardlösung K1 (etwa $100 \mu\text{g/ml Sn}$): Je 5 ml der Stammlösungen der neun teilalkylierten OZV werden in einem Messkolben (50 ml) mit Aceton zur Marke aufgefüllt.

Standardlösung K2 (etwa $100 \mu\text{g/ml Sn}$): Je 5 ml der Stammlösungen von Bu_4Sn und Ph_4Sn werden in einem Messkolben (50 ml) mit Aceton zur Marke aufgefüllt.

Derivat-Standardlösung K3 (etwa 10 µg/ml Sn): In einen Messkolben (25 ml), der 0,75 ml Natriumtetraethylborat-Lösung in Tetrahydrofuran enthält, werden je 2,5 ml der Standardlösungen K1 und K2 gegeben und mit Toluol zur Marke aufgefüllt. Die Lösung wird wöchentlich frisch hergestellt.

Standardlösung K4 (etwa 100 µg/ml Sn): Je 5 ml der Stammlösungen der inneren Standards HeSnCl_3 , He_2SnCl_2 und Pr_3SnCl werden in einem Messkolben (50 ml) mit Aceton zur Marke aufgefüllt.

Standardlösung K5 (etwa 100 µg/ml Sn): 5 ml der Stammlösung von Pe_4Sn werden in einem Messkolben (50 ml) mit Aceton zur Marke aufgefüllt.

Derivat-Standardlösung K6 (etwa 10 µg/ml Sn): In einen Messkolben (25 ml), der 0,75 ml Natriumtetraethylborat-Lösung in Aceton enthält, werden je 2,5 ml der Standardlösungen K4 und K5 gegeben und mit Toluol zur Marke aufgefüllt. Die Lösung wird wöchentlich frisch hergestellt.

9.3.3.2 Kalibrierlösungen

In acht Messkolben (25 ml) werden die in den Spalten 2 und 4 der Tabelle angegebenen Volumina der Standardlösungen K3 und K6 gegeben und mit Toluol zur Marke aufgefüllt. Je 1 ml jeder Mischung wird zur gaschromatographischen Analyse in ein GC-Gläschen gefüllt. Die Mischungen werden wöchentlich frisch hergestellt. Die Spalten 3 und 5 geben die Konzentration der OZV in den Messkolben in µg/ml Sn an.

Kalibrierlösung	Derivat- Standardlösung K3 [ml]	OZV [µg/ml Sn]	Derivat- Standardlösung K6 [ml]	IS und WDF- Standard [µg/ml Sn]
1	5,00	2,00	1,25	0,50
2	2,50	1,00	1,25	0,50
3	1,25	0,50	1,25	0,50
4	0,50	0,20	1,25	0,50
5	0,25	0,10	1,25	0,50
6	0,125	0,05	1,25	0,50
7	0,05	0,02	1,25	0,50
8	0,025	0,01	1,25	0,50

9.4 Versuche zur HPLC mit Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS)

Geräte

HPLC-Anlage (Fa. Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, USA, Serie 1100) mit Säulentermostat (Modell HP G1316 A, Nr. DE 53400999), automatischem Probengeber (Modell HP G1313 A, Nr. DE 54901551), binärer Gradientenpumpe (Modell HP G1312 A, Nr. DE 53500493) und Lösungsmittelgaser (Modell HP G1322 A, Nr. JP 63202029)

Tandem-Massenspektrometer mit ESI- und APCI-Ionenquelle (Fa. Micromass UK, Altrincham, England, Modell Quatro II, Nr. 6317) mit Vorvakuumpumpe (Fa. BOC Edwards, Crawley, England, Modell E2M28, Nr. 96-2050134) und Wasserkühlung (Fa. Neslab Instruments, Newington, CT, USA, Modell RTE-101, Nr. 166106200707)

Spritzenpumpe (Fa. Harvard Apparatus, South Natick, MA, USA, Nr. A-50796)

Stickstoffgenerator (Fa. Whatman, Haverhill, MA, USA, Modell 75-72, Nr. 75720159A6) mit flussabhängiger Reinheit bei der Stickstoffaufbereitung (99,5 % bei 7 bar und einem Fluss von 6,2 l/min)

Bedingungen für den positiven und negativen Betrieb

	Drying gas	Nebulizer gas	Sheath gas	Collision gas
ESI	400 l/h Stickstoff (99,5 %)	10 l/h Stickstoff (99,5 %)		
APCI	400 l/h Stickstoff (99,5 %)	ca. 90 l/h Stickstoff (99,5 %)	50 l/h Stickstoff (99,5 %)	1,7 x 10 ⁻³ mbar Argon (99,998 %)

		ESI positiv	ESI negativ	APCI positiv	APCI negativ
Source	Capillary	3,5 V	3,0 V	-	-
	Corona	-	-	3,2 V	1,8 V
	HV lens	0,50 kV	0,50 kV	0 kV	0 kV
	Cone	variabel	variabel	variabel	variabel
	Skimmer lens offset	5 V	5 V	5 V	5 V
	Skimmer	1,5 V	1,5 V	1,5 V	1,5 V
	Rf lens	0,2 V	0,2 V	0,2 V	0,2 V
	Source temperature	80 °C	80 °C	120 °C	120 °C
Massenfilter 1	LM resolution	14	13	15,0	15,0
	HM resolution	15,0	14,5	15,0	15,0
	Ion energy	1,0 V	1,5 V	1,0 V	2,0 V
	Ion energy ramp	0 V	2,0 V	0,7 V	0 V
	Lens 6	0 V	2 V	3 V	5 V
	Multiplier	650 V	650 V	-	-
Massenfilter 2	LM resolution	14	14	15,0	15,0
	HM resolution	14	14	15,0	15,0
	Collision	variabel	variabel	variabel	variabel
	Ion energy	1,0 V	3,3 V	1,2 V	1,2 V
	Ion energy ramp	0 V	1,2 V	4,5 V	4,5 V
	Lens 8	35 V	40 V	34 V	34 V
	Lens 9	0 V	0 V	0 V	0 V
Multiplier	650 V	650 V	-	-	

Arbeitsweise

Jede der 24 Standardlösungen für die HPLC wurde sowohl in ESI positiv und negativ als auch in APCI positiv und negativ untersucht. Die Lösung wurde dazu mit einer Spritze (1 ml) aufgezogen, diese in die Spritzenpumpe eingespannt und die Lösung mit einem Fluss von 20 µl/min (ESI) bzw. von 200 µl/min (APCI) in die Quelle eingespritzt. Während dieser Zeit, die bei der ESI 20 min und

bei der APCI 5 min dauerte, wurden die Geräteparameter für die LC-MS/MS optimiert und anschließend die Spektren für das Mutterion und die Tochterionen aufgenommen.

9.5 Gaschromatographie mit dem Atomemissionsdetektor (GC-AED)

Geräte

Gaschromatograph (Fa. Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, USA, Modell HP 5890 A Serie II, Nr. 3310A48214) mit split-splitlos Injektor (Serie HP 7673) und Injektorturm, bestehend aus automatischem Probengeber (Modell 18593B, Nr. 3315G08237), Probenteller (Nr. 3302G07731) und Con-troller (Nr. 3609G01798)

Atomemissionsdetektor (Hewlett-Packard Modell HP 5921 A, Nr. 3113A00507, und HP 2350 A, Nr. US03000385)

Labor-Gasnachreiniger (Fa. Messer Griesheim, Duisburg, Modell Megasorb E, Nr. 118619) mit Oxisorb-W-Kartusche

Betriebsbedingungen für den Gaschromatographen

Zur Optimierung der AED-Gase:

Injektor-Temperatur	270 °C
Injektor:	Split 100:1
Trennsäule:	Quarzkapillarsäule DB-5, 60 m lang, 0,32 mm i.D., 0,25 µm Filmdicke (Fa. Agilent, Waldbronn, Nr. 0760612)
Druckprogramm:	konstanter Druck
Ofenprogramm:	5 min isotherm 250 °C
Trärgas	Helium, 1,5 ml/min, Vordruck 1,61 bar
Einspritzvolumen:	1 µl

Zur Optimierung der AED-Temperatur und zur Untersuchung von Fisch- und Muschelgewebe:

Injektor-Temperatur	270 °C
Injektor	Split 1:20, 2 min splitlos
Trennsäule	Quarzkapillarsäule DB-5, 60 m lang, 0,32 mm i.D., 0,25 µm Filmdicke (Agilent Nr. 0760612)
Druckprogramm	automatische Steigerung des Drucks mit dem Anstieg der GC-Ofen-Temperatur, so dass der Fluss konstant bleibt (constant flow)
Temperaturprogramm	2 min isotherm 40 °C, von 40 °C bis 140 °C mit 30 °C/min, von 140 °C bis 160 °C mit 1 °C/min, von 160 °C bis 300°C mit 15 °C/min, 10 min isotherm
Trärgas	Helium, 1,5 ml/min, Vordruck 0,86 bar bei 40 °C
Einspritzvolumen	1 µl, 2 µl

Zur Untersuchung von Fisch- und Muschelgewebe beim Einspritzen aus Toluol:

Injektor-Temperatur	270 °C
Injektor	Split 1:20, 2 min splitlos
Trennsäule	Quarzkapillarsäule DB-5, 60 m lang, 0,32 mm i.D., 0,25 µm Filmdicke (Agilent Nr. 0760612)
Druckprogramm	automatische Steigerung des Drucks mit dem Anstieg der GC-Ofen-Temperatur, so dass der Fluss konstant bleibt (constant flow)
Temperaturprogramm	2 min isotherm 70 °C, von 70 °C bis 150 °C mit 30 °C/min, von 150 °C bis 180 °C mit 2 °C/min, von 180 °C bis 300°C mit 30 °C/min, 8 min isotherm
Trägergas	Helium, 1,5 ml/min, Vordruck 0,95 bar bei 70 °C
Einspritzvolumen	1 µl

Betriebsbedingungen für den AED

	5921 A	2350 A
Transferline	270 °C	300 °C
Cavity	230 °C	320°C
Make-up-Gas (He)	200 ml/min	220 ml/min
Wasserstoff	5 bar	0,94 bar
Sauerstoff	1,5 bar	1,92 bar
Stickstoff	2,4 bar	2,4 bar

Reinheit der Gase

Helium	4.6 (99.996 %), beim AED 2350 A (nicht beim AED 5921 A) mit einem Gasnachreiniger weiter gereinigt auf etwa 6.5 (99,99995 %)
Wasserstoff	5.0 (99,999 %)
Sauerstoff	2.5 (99,5 %), medizinisch
Stickstoff	5.0 (99,999 %)

Auswertung*Erstellung der Kalibrierfunktion*

Der Gehalt einer OZV in einer Analysenlösung wird über eine Kalibrierfunktion 2. Ordnung ohne Achsenabschnitt ermittelt. Zunächst wird dazu die relative Konzentration y_K der OZV in jeder der acht Kalibrierlösungen im Vergleich zum inneren Standard nach folgender Formel berechnet:

$$y_K = (C_1 \cdot F_2) / F_1 \quad (\text{Gleichung 1})$$

Darin bedeuten:

y_K : relative Konzentration der OZV in der Kalibrierlösung ($\mu\text{g/ml Sn}$)

C_1 : Konzentration des inneren Standards in der Kalibrierlösung ($\mu\text{g/ml Sn}$)

F_2 : Peakfläche der OZV in der Kalibrierlösung (Integratoreinheiten)

F_1 : Peakfläche des inneren Standards in der Kalibrierlösung (Integratoreinheiten)

Für jede OZV wird nun die Kalibrierfunktion mit dem Rechenprogramm Microsoft Excel graphisch dargestellt, indem die Werte für die relative Konzentration y_K (y-Achse) gegen die zugehörigen Konzentrationen in den Kalibrierlösungen (x-Achse) aufgetragen werden. Automatisch wird der quadratische (a) und lineare (b) Koeffizient der Kalibrierfunktion durch Regressionsanalyse ermittelt. Dabei werden die Koeffizienten a und b aus der Konzentration x_i einer OZV und der relativen Konzentration y_i in jeder der acht Kalibrierlösungen von $i = \{1..n\}$ für $n = 8$ mit der folgenden Formel berechnet:

$$a = \frac{\left(\sum x_i^2 \cdot \sum x_i^2 \cdot y_i \right) - \left(\sum x_i^3 \cdot \sum x_i \cdot y_i \right)}{\left(\sum x_i^2 \cdot \sum x_i^4 \right) - \left(\sum x_i^3 \right)^2} \quad (\text{Gleichung 2})$$

$$b = \frac{\left(\sum x_i^4 \cdot \sum x_i \cdot y_i \right) - \left(\sum x_i^3 \cdot \sum x_i^2 \cdot y_i \right)}{\left(\sum x_i^2 \cdot \sum x_i^4 \right) - \left(\sum x_i^3 \right)^2} \quad (\text{Gleichung 3})$$

Darin bedeuten:

a: quadratischer Koeffizient

b: linearer Koeffizient

x_i : Konzentration ($\mu\text{g/ml Sn}$) einer OZV in der Kalibrierlösung i

y_i : relative Konzentration ($\mu\text{g/ml Sn}$) einer OZV in der Kalibrierlösung i

Tabelle 24 zeigt beispielhaft die Werte für die relative Konzentration y_K der OZV, für die durch Regressionsanalyse ermittelten Koeffizienten a und b der quadratischen Kalibrierfunktion und für die Korrelationskoeffizienten, die sich in einer Kalibrierung ergeben hatten.

Tab. 24: Beispiele für die relativen Konzentrationen y_K der OZV in den acht Kalibrierlösungen, bezogen auf 0,5 $\mu\text{g/ml}$ Sn der inneren Standards HeSn^{3+} , $\text{He}_2\text{Sn}^{2+}$ bzw. Pr_3Sn^+ mit zugehöriger Gleichung und Korrelationskoeffizient

OZV bzw. Ethyl-Derivat	Konzentration der OZV in den Kalibrierlösungen ($\mu\text{g/ml}$ Sn)								Regressions- Gleichung	Korrelations- koeffizient
	0,01	0,02	0,05	0,10	0,20	0,50	1,00	2,00		
BuSnEt ₃	0,010	0,017	0,051	0,102	0,230	0,557	1,109	2,016	$y = -0,00008 x^2 + 1,165 x$	0,9999
OcSnEt ₃	0,007	0,013	0,038	0,084	0,187	0,509	1,050	2,099	$y = 0,00002 x^2 + 1,014 x$	0,9999
PhSnEt ₃	0,006	0,010	0,028	0,058	0,126	0,345	0,722	1,463	$y = 0,00002 x^2 + 0,625 x$	0,9999
Bu ₂ SnEt ₂	0,007	0,013	0,030	0,072	0,150	0,409	0,754	1,592	$y = 0,00002 x^2 + 0,745 x$	0,9997
Oc ₂ SnEt ₂	0,012	0,020	0,052	0,116	0,228	0,545	0,938	1,735	$y = -0,0001 x^2 + 1,052 x$	0,9995
Ph ₂ SnEt ₂	0,011	0,018	0,050	0,111	0,230	0,551	1,012	1,798	$y = -0,00011 x^2 + 1,074 x$	0,9999
Bu ₃ SnEt	0,008	0,015	0,040	0,089	0,190	0,535	1,060	2,236	$y = 0,00005 x^2 + 0,983 x$	0,9999
Oc ₃ SnEt	0,016	0,026	0,081	0,161	0,316	0,765	1,377	2,453	$y = -0,00018 x^2 + 1,605 x$	0,9999
Ph ₃ SnEt	0,016	0,025	0,083	0,167	0,339	0,789	1,434	2,478	$y = -0,00022 x^2 + 1,703 x$	0,9999
Bu ₄ Sn	0,008	0,013	0,038	0,085	0,183	0,516	1,032	2,198	$y = 0,00006 x^2 + 0,944 x$	0,9999
Ph ₄ Sn	0,017	0,027	0,087	0,172	0,341	0,814	1,492	2,692	$y = -0,00016 x^2 + 1,657 x$	0,9999

Berechnung des Gehaltes einer OZV

Nun wird die relative Konzentration y_A einer OZV in der Analysenlösung nach folgender Formel berechnet.

$$y_A = (M_3 \cdot F_4) / F_3 \quad (\text{Gleichung 4})$$

Darin bedeuten:

y_A : relative Konzentration der OZV in der Analysenlösung (ng Sn absolut)

M_3 : Menge des inneren Standards in der Analysenlösung (ng Sn absolut)

F_4 : Peakfläche der OZV in der Analysenlösung (Integriereinheiten)

F_3 : Peakfläche des inneren Standards in der Analysenlösung (Integriereinheiten)

Die Menge der OZV in der Analysenlösung (x) wird berechnet, indem für jede OZV die Werte der Koeffizienten a und b aus der zugehörigen Kalibrierfunktion sowie y_A in Gleichung 6:

$$y_A = ax^2 + bx \quad (\text{Gleichung 5})$$

$$x = -\frac{b}{2a} - \sqrt{\left(\frac{b}{2a}\right)^2 + \frac{y_A}{a}} \quad (\text{Gleichung 6})$$

Darin bedeutet zusätzlich:

x : Menge der OZV in der Analysenlösung (ng Sn absolut)

Dieser Wert wird noch durch die Einwaage geteilt und man erhält den Gehalt (G) der OZV in der untersuchten Analysenprobe:

$$G = \frac{x}{EW} \quad (\text{Gleichung 7})$$

Darin bedeuten:

G: Gehalt der OZV in der Probe (ng/g Sn)

x: Menge der OZV in der Analysenlösung (ng Sn absolut)

EW: Einwaage (g)

Berechnung der Wiederfindung der inneren Standards

Die Wiederfindung der drei inneren Standards HeSnCl_3 , He_2SnCl_2 und Pr_3SnCl in der Analysenlösung wird über den Wiederfindungsstandard Pe_4Sn ermittelt. Dazu berechnet man zunächst die Menge des inneren Standards in der Analysenlösung (M_{ISA}):

$$M_{ISA} = \frac{F_{IS} \cdot M_{WF}}{F_{WF}} \quad (\text{Gleichung 8})$$

Darin bedeuten:

M_{WF} : Menge des Wiederfindungsstandards in der Analysenlösung (ng Sn absolut)

F_{WF} : Peakfläche des Wiederfindungsstandards in der Analysenlösung (Integratoreinheiten)

F_{IS} : Peakfläche des inneren Standards in der Analysenlösung (Integratoreinheiten)

M_{ISA} : Menge des Wiederfindungsstandards in der Analysenlösung (ng Sn absolut)

Mit dem Wert für M_{ISA} und der tatsächlich zugegebenen Menge (M_{IS}) wird die Wiederfindung berechnet:

$$WF = \frac{M_{ISA} \cdot 100}{M_{IS}} \quad (\text{Gleichung 9})$$

Darin bedeutet zusätzlich:

M_{IS} : tatsächliche Menge des inneren Standards (ng Sn absolut)

WF: Wiederfindung (%)

9.6 Gaschromatographie mit Massenspektrometrie

Geräte

Gaschromatograph (Agilent Modell HP 6890, Nr. US00043154) mit split-splitlos-Injektor und Injektorturm (Serie HP 7683) bestehend aus automatischem Probengeber (Modell G2614A, Nr. US12411881) und Probenhalter (Modell G2613A, Nr. CN12420568)

Massenselektiver Detektor (Agilent Modell 5973, Nr. US10460896) mit Ion-Gauge Vakuummess-einrichtung (Nr. 59864B), Vorvakuumpumpe (Fa. BOC Edwards, Crawley, England, Modell G1099-80024, Nr. 017003334) und Turbopumpe (Modell G2589-80062, Nr. 016995290)

Betriebsbedingungen des Gaschromatographen

Zur Identifizierung störender Begleitstoffe

Injektor-Temperatur	270 °C
Injektor	Split 3:1, 2 min splitlos
Trennsäule	Quarzkapillarsäule HP-5, 30 m lang, 0,32 mm i.D., 0,25 µm Filmdicke (Agilent Nr. US1424426H)
Druckprogramm	automatische Steigerung des Drucks mit dem Anstieg der GC-Ofen-Temperatur, so dass der Fluss konstant bleibt (constant flow)
Temperaturprogramm	2 min isotherm 50 °C, von 50 °C bis 150 °C mit 20 °C/min, von 150 °C bis 200 °C mit 10 °C/min, von 200 °C bis 300 °C mit 20 °C/min, 8 min isotherm
Trägergas	Helium, 26,7 ml/min, Vordruck 0,86 bar bei 50 °C
Einspritzvolumen	1 µl

Zur Identifizierung unbekannter Zinn-Verbindungen

Injektor-Temperatur	270 °C
Injektor	Split 5:1, 2 min splitlos
Trennsäule	Quarzkapillarsäule DB-XLB, 60 m lang, 0,25 mm i.D., 0,25 µm Filmdicke (Agilent Nr. US1372517H)
Druckprogramm	automatische Steigerung des Drucks mit dem Anstieg der GC-Ofen-Temperatur, so dass der Fluss konstant bleibt (constant flow)
Temperaturprogramm	3 min isotherm 80 °C, von 80 °C bis 140 °C mit 30 °C/min, von 140 °C bis 275 °C mit 3 °C/min, 30 min isotherm
Trägergas	Helium, 24,1 ml/min, Vordruck 1,3 bar bei 80 °C
Einspritzvolumen	1 µl

Betriebsbedingungen des massenselektiven Detektors

Transferline	300 °C
Ionisationsart	Elektronenstoßionisation (70 eV)
Quelle	230 °C
Quadrupol	150 °C
Massenbereich (Scan-Modus)	m/z 33 bis m/z 550 und m/z 100 bis m/z 550

9.7 Versuche zur Festphasen-Mikroextraktion (solid phase microextraction, SPME)**Zusätzliche Geräte**

Magnetrührer, heizbar (IKA Modell Ikamag RCT basic, Nr. 00.037151)

Magnetrührstäbchen, 8 x 3 mm, teflonbeschichtet (Fa. neo-Lab, Heidelberg, Nr. 6-2176)

Kontaktthermometer (IKA Modell Ikatron ETS-D4 fuzzy, Nr. 00.070910) mit Messfühler (Modell H 62), Stativhalterung (Modell R 380), Stativstab (Modell H 16 V), Haltestange (Modell H 36) und Kreuzmuffe (Modell H 44)

Probengefäß (10 ml), 24,5 x 50 mm (Fa. Supelco, Bellefonte, PA, USA, Nr. 33102-U) mit Bördelkappe aus Aluminium (nr. 27200) und PTFE-beschichtetem Silikonseptum, 3 mm Dicke, 20 mm Durchmesser (Nr. 27236)

Metallblock mit Vertiefungen passend für die Probengefäße (10 ml), Eigenanfertigung

SPME-Faserhalter für den manuellen Gebrauch (Supelco Nr. 57330)

SPME Inlet Guide zur Sicherung des Faserhalters am GC-Injektor (Supelco Nr. 57356-U)

SPME-Fasern für die manuelle Probennahme, 100 µm Polydimethylsiloxan (Supelco, 1 cm lang, Nr. 57300)

9.7.1 Konditionierung der SPME-Faser und Faser-Blindwert

Die SPME-Faser (PDMS, 100 µm Filmdicke) wurde in den Faserhalter eingebaut, auf dessen Gehäuse eine Skala von 1 – 5 aufgebracht ist. Die obere Kante der regulierbaren Tiefeneinstellung wurde auf 2,6 Skalenteile eingestellt. Die Injektionsnadel wurde in den 250 °C heißen Injektor des Gaschromatographen eingeführt, durch eine Drehbewegung des Kolbens abwärts ausgefahren, mit Hilfe der Rückhalteschraube in der horizontalen Ebene des z-förmigen Schlitzes arretiert und über Nacht oder mindestens 1 h konditioniert. Der Faserhalter wurde dabei von einem speziellen Aufsatz (SPME Inlet Guide), der mit dem Injektor verschraubt war, gesichert. Während der Konditionierung wurde beim Gaschromatographen der Split geöffnet, damit nur wenige Rückstände auf die Trennsäule gelangten, und beim AED das Solvent venting (Abschnitt 3.3) eingeschaltet, wodurch das Eluat nicht durch das Plasmaröhrchen geleitet wurde. Danach wurde die SPME-Faser durch eine Drehbewegung des Kolbens aufwärts wieder in die Injektionsnadel zurückgezogen, aus dem

Injektor entfernt und bis zum weiteren Gebrauch unter Stickstoff aufbewahrt. Dazu wurde die Injektionsnadel in ein Probengefäß, das mit Stickstoff gefüllt und mit Bördelkappe und Septum verschlossen war, eingeführt, aber die Faser nicht ausgefahren. Schließlich wurde noch die Trennsäule 30 min bei 300 °C ausgeheizt.

Nach dem Ausheizen und vor jeder Versuchsreihe wurde ein Faser-Blindwert aufgenommen. Die Temperatur des Injektors wurde auf die zur Bestimmung der OZV notwendigen 270 °C erhöht, die Injektionsnadel eingeführt und das GC-AED-Programm gestartet, mit dem auch die OZV bestimmt wurden. Wenn in dem Chromatogramm, das dabei erhalten wurde, Peaks zu sehen waren, wurde die Konditionierung für 1 h bei 250 °C Injektortemperatur wiederholt. Ansonsten wurde die Faser unter Stickstoff aufbewahrt.

9.7.2 Anreicherung mit der SPME-Faser

Etwa 1 g homogenisiertes Forellenfilet wurde in einem Jodzahl-Kolben (50 ml) mit 10 ml Kaliumhydroxid-Lösung (25g/100g) versetzt und 15 min im Ultraschallbad und über Nacht bei Raumtemperatur stehen gelassen. In zwei weiteren Versuchen wurde je 1 g Forellenfilet auf die gleiche Weise mit 10 ml methanolischer Kaliumhydroxid-Lösung (25g/100g) und 10 ml Salzsäure (37g/100g) versetzt.

Je 1,0 ml dieser Fischlösungen wurde in einem Probengefäß (10 ml), in dem sich bereits ein Magnetrührstäbchen befand, mit 7,0 ml Acetat-Pufferlösung (pH 5,0), 1,0 ml gesättigter Natriumsulfat-Lösung, 0,1 ml SPME-Standardlösung und 0,2 ml Natriumtetraethylborat-Lösung (0,01 g/ml in Wasser) versetzt. Das Gefäß wurde sofort verschlossen, in eine Vertiefung des Metallblocks gestellt und der Magnetrührer auf Stufe 6 (635 min^{-1}) eingestellt. Der Faserhalter mit der SPME-Faser (PDMS, 100 μm Filmdicke) wurde aus dem Gefäß mit Stickstoff gezogen und mit einer Klemme genau über dem Probengefäß befestigt. Das Septum des Probengefäßes wurde 5 min nach Zugabe der Natriumtetraethylborat-Lösung (Stoppuhr) mit der Injektionsnadel durchstoßen und die SPME-Faser soweit ausgefahren, dass sie vollständig in die Lösung eintauchte, aber das Magnetrührstäbchen nicht berührte. Nach genau 60 min (Stoppuhr) bei 55 °C wurde die Faser eingezogen und der Faserhalter aus dem Probengefäß entfernt, indem die Klemme gelöst wurde. Die Injektionsnadel wurde unmittelbar danach in den Injektor des Gaschromatographen eingeführt, auf dem der SPME Inlet Guide befestigt war. Die Faser wurde ausgefahren und mit Hilfe der Rückhalteschraube arretiert, das GC-AED-Programm gestartet und die Faser 10 min (Stoppuhr) bei 270 °C desorbiert.

Um abzusichern, dass die Temperatur in der Lösung 55 °C betrug, wurde der Messfühler des Kontaktthermometers in ein zweites Probengefäß mit Bördelkappe eingeführt, in dem sich eine Vergleichslösung befand. Sie hatte etwa die gleiche Zusammensetzung wie die Analysenlösung und stand ebenfalls in dem Metallblock.

9.8 Aufarbeitung von Fisch- und Muschelgewebe

9.8.1 Probenvorbereitung

Die Fische werden ausgenommen und filetiert. Bei Fischen mit großen Schuppen werden diese zunächst mit einem Messer gegen den Strich abgestreift. Das Muskelfleisch wird mit einem scharfen Messer an der Gräte entlang abgetrennt. Kopf, Schwanz und Gräten werden verworfen. Wenn die Innereien (z.B. Leber) nicht untersucht werden sollen, werden sie ebenfalls verworfen. Bei Fischen, deren Haut nicht zum Verzehr bestimmt ist (z.B. Aal), wird außerdem die Haut entfernt. Das Muskelfleisch wird in Stücke geschnitten und mit dem Ultra-Turrax homogenisiert.

Muscheln und Schalentiere werden von der Schale befreit; das Muskelfleisch wird ebenfalls mit dem Ultra-Turrax homogenisiert.

Die Homogenate werden bis zur Untersuchung bei -20 °C aufbewahrt.

9.8.2 Arbeitsweise

Etwa 0,5 g Substrat werden genau in ein verschließbares Zentrifugenglas (50 ml) eingewogen, mit 5 ml Ammoniumdihydrogenphosphat-Pufferlösung (pH 7,5) und 50 μl der Lösung der inneren Standards (0,5 $\mu\text{g/ml}$ Sn) versetzt und 1 min mit dem Ultra-Turrax homogenisiert. Der Stab wird mit weiteren 5 ml Pufferlösung in das Zentrifugenglas abgespült. Die Suspension wird mit 100 μl DEA-DDC-Lösung (15 mg/ml) und je 1 ml Lipase- und Protease-Suspension (10 mg/ml in Ammoniumdihydrogenphosphat-Pufferlösung) versetzt und das verschlossene Zentrifugenglas 16 h bei 37 °C stehen gelassen. Der pH-Wert wird mit Essigsäure (zunächst 100 %, dann halbkonzentriert) auf pH 5,0 eingestellt (pH-Meter) und die Mischung mit 50 μl Natriumtetraethylborat-Lösung in THF versetzt. Dann wird sie mit 15 ml Cyclohexan versetzt, 15 min auf der Schüttelmaschine bei 300 min^{-1} geschüttelt und 5 min bei 2500 min^{-1} zentrifugiert. Die obere Cyclohexan-Phase wird mit einer Pasteurpipette abgenommen und durch etwa 1 g mit Cyclohexan befeuchtetes Natriumsulfat, das sich in einem Trichter mit Glaswatte befindet, in einen Spitzkolben (100 ml) filtriert. Die Extraktion wird mit weiteren 15 ml Cyclohexan wiederholt; das Natriumsulfat wird zweimal mit 5 ml Cyclohexan und der Trichterhals einmal mit 2 ml Cyclohexan nachgespült. Die vereinigten Cyclohexan-Phasen werden im Rotationsverdampfer auf etwa 1 ml eingeengt.

In die Chromatographiesäule, die einen Pfropf aus Glaswatte enthält, werden etwa 20 ml Elutionsgemisch gegeben. In das Gemisch lässt man langsam etwa 3 g Florisil (3 % Wasser) einrieseln und die Füllung 30 min absitzen; das überstehende Gemisch wird bis auf 5 mm über der Oberkante abgelassen. Der gesamte Cyclohexanextrakt (1 ml) wird mit einer Pasteurpipette unter Nachspülen mit zweimal je 1 ml Cyclohexan auf die Säule gegeben. Wenn Extrakt und Spülflüssigkeit eingesickert sind, wird die Säule mit 10 ml Elutionsgemisch eluiert. Wenn die Flüssigkeit vollständig in

die Füllung eingezogen ist, wird die Säule mit weiteren 10 ml Elutionsgemisch eluiert. Das Eluat wird in einem Spitzkolben (50 ml) aufgefangen und der Säulenauslass mit 1 ml Elutionsgemisch in den Spitzkolben abgespült. Das Eluat wird mit 50 µl Wiederfindungsstandard (0,5 µg/ml Sn) versetzt, im Rotationsverdampfer auf weniger als 1 ml und dann mit einem schwachen Stickstoffstrom auf etwa 100 µl eingeeengt. 1 µl dieser Lösung wird zur Bestimmung mit GC-AED eingespritzt.

Auf die gleiche Weise wird ein Blindwert ohne Einwaage von Substrat aufgearbeitet.

Literaturverzeichnis

- [1] J. Falbe, M. Regnitz (Hrsg.): Römpp's Chemie Lexikon CD-ROM, 9. Auflage, Version 1.0. Thieme Verlag Stuttgart, 1995, Stichwort „Zinn-organische Verbindungen“
- [2] E. J. Bulten, H.A. Meinema: Tin. In: E. Merian (Hrsg.): Metals and their Compounds in the Environment. Verlag Chemie Weinheim, 1991, S. 1243-1258
- [3] K. Fent: Organotin compounds in municipal wastewater and sewage sludge: Contamination, fate in treatment process and ecotoxicological consequences. *Sci. Total Environ.* **185** (1996), 151-159
- [4] S.J. Blunden, C.J. Evans: Organotin Compounds. In: O. Hutzinger (Hrsg.): The Handbook of Environmental Chemistry, Volume 3, Part E: Anthropogenic Compounds. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, 1990, S. 1-44
- [5] L. A. Hopps, P. J. Smith: Industrielle Anwendungen von Mono-Organozinn-Verbindungen. *Zinn und seine Verwendung* **131** (1982), 10-13
- [6] E. J. Bulten: Zinn. In: E. Merian (Hrsg.): Metalle in der Umwelt. Verlag Chemie Weinheim, 1984, S. 631-644
- [7] M.D. Müller, L. Renberg, G. Rippen: Tributyltin in the environment – Sources, fate and determination. *Chemosphere* **18** (1989), 2015-2042
- [8] C. G. Arnold: Triorganotin compounds in natural waters and sediments: Aqueous speciation and sorption mechanisms. Dissertation, Eidgenössische Technische Hochschule. Zürich 1998
- [9] K.E. Appel, C. Böhme, T. Platzek, E. Schmidt, S. Stinchcombe: Organozinn-Verbindungen in verbrauchernahen Produkten und Lebensmitteln. *Umweltmed. Forsch. Prax.* **5** (2000), 67-77
- [10] F. Zaucke, H. Zöltzer, H.F. Krug: Dose-dependent induction of apoptosis or nekrosis in human cells by organotin compounds. *Fresenius J. Anal. Chem.* **361** (1998), 386-392
- [11] H.F. Krug: Todessignale durch Umweltchemikalien. *FZK-Nachrichten* **1** (2002), 61-68 (Forschungszentrum Karlsruhe)
- [12] P. Cameron, T. Locher: Organozinnbelastung von Meeressäugern, Seevögeln und Speisefischen. Eine Studie der Umweltstiftung WWF-Deutschland, Bremen 1999
- [13] R.J. Maguire: Environmental aspects of tributyltin. *Appl. Organomet. Chem.* **1** (1987), 475-498
- [14] Richtlinie 1999/51/EWG vom 26.5.1999 (ABl. L142 S. 22-25) zur fünften Anpassung des Anhangs I der Richtlinie 76/769/EWG des Rates zur Angleichung der Rechts- und Verwaltungsvorschriften der Mitgliedstaaten für Beschränkungen des Inverkehrbringens und der Verwendung gewisser gefährlicher Stoffe und Zubereitungen (Zinn, PCP und Cadmium) an den technischen Fortschritt
- [15] Gefahrstoffverordnung in der Fassung der Bekanntmachung vom 15.11.1999 (BGBl. I S. 2233), zuletzt geändert am 20.7.2000 (BGBl. I S. 1045)
- [16] Chemikalien-Verbotsverordnung vom 19.7.1996 (BGBl. I S. 1151), zuletzt geändert am 26.6.2000 (BGBl. I S. 932)

-
- [17] Rückstands-Höchstmengenverordnung in der Fassung der Bekanntmachung vom 21.10.1999 (BGBl. I S. 2082), zuletzt geändert am 16.1.2002 (BGBl. I S. 425)
- [18] H. Wiczorek (Hrsg.): Kunststoffe im Lebensmittelverkehr. Empfehlungen der Kunststoffkommission des BgVV, Textsammlung. Carl Heymanns Verlag KG München, 2001, 50. Lieferung, Stand November 2000
- [19] European Commission (Hrsg.): Synoptic Document: Provisional lists of monomers and additives notified to European Commission as substances which may be used in the manufacture of plastics intended to come into contact with foodstuffs. <http://cpf.jrc.it/webpack> Brüssel, 15.1.2002, S. 220-223
- [20] M. Abalos, J.M. Bayona, R. Compano, M. Granados, C. Leal, M.D. Prat: Analytical procedures for the determination of organotin compounds in sediment and biota: A critical review. *J. Chromatogr. A* **788** (1997), 1-49
- [21] J.L. Gomez-Ariza, E. Morales, R. Beltran, I. Giraldez, M. Ruiz-Benitez: Ultrasonic treatment of molluscan tissue for organotin speciation. *Analyst* **120** (1995), 1171-1174
- [22] F. Höfler: Beschleunigte Lösemittelextraktion (ASE). Dionex GmbH, Idstein 2000, S. 54
- [23] C.G. Arnold, M. Berg, S.R. Müller, U. Dommann, R.P. Schwarzenbach: Determination of organotin compounds in water, sediments and sewage sludge using perdeuterated internal standards, accelerated solvent extraction and large-volume-injection GC/MS. *Anal. Chem.* **70** (1998), 3094-3101
- [24] Anonym: Fa. Micromass UK Limited, Manchester, Handbuch zum "Quattro II Operator Training Course", Code No. 5280011
- [25] W.M.A. Niessen, A.P. Tinke: Liquid chromatography-mass spectrometry - General principles and instrumentation. *J. Chromatogr. A* **703** (1995), 37-57
- [26] M. Herderich, P. Schreier: HPLC-MS/MS in der Naturstoff- und Lebensmittelanalytik. *GIT Fachz. Lab.* **9** (1996), 841-845
- [27] Lit. [1], Stichwort „Kohlenstoff“
- [28] Lit. [1], Stichwort „Deuterium“
- [29] M. Ceulemans, C. Witte, R. Lobinski, F.C. Adams: Simplified sample preparation for GC speciation analysis of organotin in marine biomaterials. *Appl. Organomet. Chem.* **8** (1994), 451-461
- [30] Y. Liu, V. Lopez-Avila, M. Alcaraz: Off-line complexation/supercritical fluid extraction and gas chromatography with atomic emission detection for the determination and speciation of organotin compounds in soil and sediments. *Anal. Chem.* **66** (1994), 3788-3796
- [31] R. Lobinski, W.M.R. Dirkx, M. Ceulemans, F.C. Adams: Optimization of comprehensive speciation of organotin compounds in environmental samples by capillary gas chromatography helium microwave-induced plasma emission spectrometry. *Anal. Chem.* **64** (1992), 159-165
- [32] A. Sadiki, D.T. Williams: Speciation of organotin and organolead compounds in drinking water by gas chromatography-atomic emission spectrometry. *Chemosphere* **32** (1996), 1983-1992

-
- [33] Hewlett-Packard Company (Hrsg.): Optical assembly – Theory of operation. In: HP 2350 A Atomic Emission Detector Service Information CD-ROM. Little Falls (USA) März 1998
- [34] J. Rolfes: Möglichkeiten zur Reduktion des Tailings am Atomemissionsdetektor HP 5921 A. Diplomarbeit, Westfälische Wilhelms-Universität Münster. Münster 1993, S. 17-25
- [35] E. Weber, R. Weber (Hrsg.): Buch der Umweltanalytik. GIT Verlag, Darmstadt 1992, Band 4, S. 58-59
- [36] Hewlett-Packard Company (Hrsg.): Gas flow system – Theory of operation. In: HP 2350 A Atomic Emission Detector Service Information CD-ROM. Little Falls (USA) März 1998
- [37] Lit. [1], Stichwort „Getter“
- [38] S. Mothes, R. Wennrich: Coupling of SPME and GC-AED for the determination of organometallic compounds. *Mikrochim. Acta* **135** (2000), 91-95
- [39] S. Aguerre, C. Bancon-Montigny, G. Lespes, M. Potin-Gautier: Solid phase microextraction (SPME) : a new procedure for the control of butyl- and phenyltin pollution in the environment by GC-FPD. *Analyst* **125** (2000), 263-268
- [40] M. Guidotti, M. Vitali: Determination of organotin compounds in water samples by solid phase microextraction (SPME) and GC/MS. *Annali di Chimica* **87** (1997), 497-504
- [41] N. Cardellicchio, S. Giandomenico, A. Decataldo, A. Di Leo: Speciation of butyltin compounds in marine sediments with headspace solid phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Fresenius J. Anal. Chem.* **369** (2001), 510-515
- [42] Y. Cai, J.M. Bayona: Determination of methylmercury in fish and river water samples using in situ sodium tetraethylborate derivatisation following by solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **696** (1995) 113-122
- [43] Z. Zhang, M.J. Yang, J. Pawliszyn: Solid-phase microextraction. *Anal. Chem.* **66** (1994), 844-853
- [44] Informationsbroschüre zum SPME-Faser-Set der Firma Supelco
- [45] European Commission, bcr Information, Reference Materials: The certification of the contents (mass fractions) of monobutyltin, dibutyltin and tributyltin in mussel tissue (CRM 477). Report EUR 17921 EN (1997), ISSN 1018-5593
- [46] M. Ceulemans, F.C. Adams: Evaluation of sample preparation methods for organotin speciation analysis in sediments - focus on monobutyltin extraction. *Anal. Chim. Acta* **317** (1995), 161-170
- [47] D.S. Forsyth, C. Cleroux: Determination of butyltin, methyltin and tetraalkyltin in marine food products with gas chromatography-atomic absorption spectrometry. *Talanta* **38** (1991), 951-957
- [48] H.-P. Thier, H. Frehse: Rückstandsanalytik von Pflanzenschutzmitteln. Georg Thieme Verlag Stuttgart New York, 1986, S. 150
- [49] J.L. Gomez-Ariza, E. Morales, I. Giraldez, R. Beltran, J.A. Pozas Escobar: Acid/extraction treatment of bivalves for organotin speciation. *Fresenius J. Anal. Chem.* **357** (1997), 1007-1009

-
- [50] G. Schwedt: Chromatographische Trennmethoden. Georg Thieme Verlag Stuttgart, 1979, S. 35-39
- [51] Lit. [1], Stichwort „Florisol“
- [52] H. Scherz, S. Sener (Hrsg.): Die Zusammensetzung der Lebensmittel, Nährwert-Tabellen. Medpharm GmbH Scientific Publishers Stuttgart, 1994, S. 431 und 436
- [53] S. Kromidas: Validierung in der Analytik. Wiley-VCH Verlag Weinheim, 1999
- [54] W. Horwitz: Evaluation of analytical methods for regulation of foods and drugs. *Anal. Chem.* **54** (1982), 67A-76A
- [55] DIN 32645 Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze, Ermittlung unter Wiederholbedingungen, Begriffe, Verfahren, Auswertung. Berlin (Mai 1994)