

# ULTRASPURENBESTIMMUNG VON FLUORBENZOESÄUREN IN HOCHSALINEN MATRIZES MITTELS MASSENSPEKTROMETRISCHER ISOTOPENVERDÜNNUNGSANALYSE

## Kumulative Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

dem  
Fachbereich Chemie  
der Philipps-Universität Marburg  
vorgelegt von

Dipl.-Chem. Karsten Müller  
aus Höxter

Marburg an der Lahn 2013

Vom Fachbereich Chemie der Philipps-Universität Marburg (Hochschulkenziffer: 1180)  
als Dissertation am 01.11.2013 angenommen.

Erstgutachter: Prof. Dr. A. Seubert  
Zweitgutachter: Prof. Dr. U. Tallarek

Tag der mündlichen Prüfung: 16. Dezember 2013

Bei der vorliegenden kumulativen Dissertation handelt es sich um eine gekürzte Fassung, die die wesentlichen Ergebnisse zusammenfasst. Die ausführlichen Ergebnisse der Dissertation sind wie folgt veröffentlicht:

Müller, K.; Seubert, A., Ultra trace determination of fluorobenzoic acids in tap and reservoir water using solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chrom. A*, 1260, (2012) 9-15.

doi: 10.1016/j.chroma.2012.08.050

Müller, K.; Seubert, A., Separation and determination of fluorobenzoic acids using ion chromatography – electrospray mass spectrometry. *J. Chrom. A*, 1270, (2012) 96-103.

doi: 10.1016/j.chroma.2012.10.046

Müller, K.; Seubert, A., Synthesis of stable deuterium labeled fluorobenzoic acids to be used as internal standards in isotope dilution mass spectrometry. *Isotopes in Environmental and Health Studies* (2013), in press.

doi: 10.1080/10256016.2013.830612

Müller, K.; Seubert, A., Ultra trace determination of fluorobenzoic acids in reservoir water using isotope dilution gas chromatography mass spectrometry. *Isotopes in Environmental and Health Studies* (2013), accepted for publication 15.12.2013.

*„Wer nichts als Chemie versteht, versteht auch die nicht recht.“*

GEORG CHRISTOPH LICHTENBERG

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>3</b>
1.1	Motivation . . . . .	3
1.2	Zielsetzung und Konzept . . . . .	5
1.3	Theoretischer Hintergrund und Stand der Forschung . . . . .	5
1.3.1	Allgemeines . . . . .	5
1.3.2	Probenvorbereitung . . . . .	8
1.3.3	Trennung und Nachweis . . . . .	8
	GC-EI-MS . . . . .	8
	IC-ESI-MS . . . . .	11
1.3.4	Isotopenverdünnungsanalyse . . . . .	14
	Organische Isotopenverdünnungsanalyse . . . . .	16
	Isotopenmarkierung . . . . .	17
1.3.5	Stand der Forschung . . . . .	18
<b>2</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>21</b>
<b>3</b>	<b>Summary</b>	<b>23</b>
<b>4</b>	<b>Kumulativer Teil der Dissertation</b>	<b>25</b>
4.1	Ultraspurenbestimmung von Fluorbenzoesäuren in Leitungs- und Reservoirwasser mittels Festphasenextraktion und Gaschromatographie-Massenspektrometrie . . . . .	25
4.1.1	Zusammenfassung und Diskussion . . . . .	25
4.1.2	Erklärung der Eigenleistung . . . . .	28
4.2	Trennung und Nachweis von Fluorbenzoesäuren mittels Ionenchromatographie-Elektrospray Massenspektrometrie . . . . .	29
4.2.1	Zusammenfassung und Diskussion . . . . .	29
4.2.2	Erklärung der Eigenleistung . . . . .	33
4.3	Synthese von stabilen, deuteriummarkierten Fluorbenzoesäuren als interne Standards in der Isotopenverdünnungsanalyse . . . . .	34
4.3.1	Zusammenfassung und Diskussion . . . . .	34

4.3.2	Erklärung der Eigenleistung . . . . .	37
4.4	Ultrapurenbestimmung von Fluorbenzoesäuren in Reservoirwasser mittels Isotopenverdünnungsanalyse und Gaschromatographie-Massenspektrometrie	37
4.4.1	Zusammenfassung und Diskussion . . . . .	37
4.4.2	Erklärung der Eigenleistung . . . . .	40
<b>5</b>	<b>Ausblick</b>	<b>41</b>
<b>6</b>	<b>Anhang</b>	<b>44</b>
<b>7</b>	<b>Danksagung</b>	<b>52</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>53</b>

# Abkürzungsverzeichnis

2-FBA / 2-FBAME	2-Fluorbenzoesäure / -methylester
2-TFMBA / 2-TFMBAME	2-Trifluormethylbenzoesäure / -methylester
2,3,4-TFBA / 2,3,4-TFBAME	2,3,4-Trifluorbenzoesäure / -methylester
2,4-DFBA / 2,4-DFBAME	2,4-Difluorbenzoesäure / -methylester
2,4,5-TFBA / 2,4,5-TFBAME	2,4,5-Trifluorbenzoesäure / -methylester
2,5-DFBA / 2,5-DFBAME	2,5-Difluorbenzoesäure / -methylester
2,6-DFBA / 2,6-DFBAME	2,6-Difluorbenzoesäure / -methylester
3-FBA / 3-FBAME	3-Fluorbenzoesäure / -methylester
3-TFMBA / 3-TFMBAME	3-Trifluormethylbenzoesäure / -methylester
3,4-DFBA / 3,4-DFBAME	3,4-Difluorbenzoesäure / -methylester
3,5-BTFMBA / 3,5-BTFMBAME	3,5-Bis-Trifluormethylbenzoesäure / -methylester
4-FBA / 4-FBAME	4-Fluorbenzoesäure / -methylester
4-TFMBA / 4-TFMBAME	4-Trifluormethylbenzoesäure / -methylester
A <sup>-</sup>	Analytion
Abb.	Abbildung
ACN	Acetonitril
APCI	<i>atmospheric pressure chemical ionisation</i>
bzw.	beziehungsweise
BSTFA	Bistrimethylsilyltrifluoracetamid
dFBA	deuterierte FBA
D	Verteilungskoeffizient
DAD	Diodenarray-Detektor
DCM	Dichlormethan
DVB	Divinylbenzol
E <sup>-</sup>	Elution
eff.	effektiv
EI	<i>electron impact ionisation</i>
ESI	<i>electrospray ionisation</i>
FBA	Fluorbenzoesäure
FBAME	Fluorbenzoesäuremethylester

FIA	Fließinjektionsanalyse, <i>flow injection analysis</i>
GC	Gaschromatographie
GC-MS	Gaschromatographie – Massenspektrometrie
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
IC	Ionenchromatographie
IS	Interner Standard
k'	Retentionsfaktor
$K_{A^-}$	Gleichgewichtskonstante von $A^-$
LC-MS-MS	Flüssigkeitschromatographie-Tandem-Massenspektrometrie
M	Molekülmasse
$M^+$	Molekülionenmasse
mmol	Millimol
mV	Millivolt
MSIVA	Massenspektrometrische Isotopenverdünnungsanalyse
m/z	Masse-zu-Ladungs-Verhältnis
Me	Methyl
MeI	Methyliodid
MeOH	Methanol
MHz	Megahertz
MS	Massenspektrometrie
n.b.	nicht bestimmbar
NICI	<i>negative ion chemical ionisation</i>
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
p.a.	pro analysis
PEEK	Polyetheretherketon
penta-FBA	2,3,4,5,6-Pentafluorbenzoesäure
ppm	<i>parts per million</i>
PS	Polystyrol
PS/DVB	Polystyrol-Divinylbenzol-Copolymer
RP	<i>reversed phase</i>
RT	Raumtemperatur
SIM	<i>single ion monitoring</i>
SPE	<i>solid phase extraction</i>
TIC	<i>total ion count</i>
UV	Ultraviolett
Vis	Visuell
VWD	Variabler Wellenlängendetektor
Wfr	Wiederfindungsrate



# 1 Einleitung

## 1.1 Motivation

Die Entwicklung der menschlichen Zivilisation ist bis heute durch nichts so stark beeinflusst worden wie durch Erdöl.

Ein großes wirtschaftliches Interesse liegt in der maximalen Förderung aus einem erschlossenen Reservoir. Zur Zeit sind durch Primärförderung, in welcher der Lagerstättendruck zur Förderung ausreicht, 10 %-15 % des Vorkommens direkt förderbar. Danach reicht der Eigendruck des Reservoirs nicht mehr aus, um das Öl an die Erdoberfläche zu transportieren. Bei der anschließenden Sekundärförderung sind 30 %-60 % des vorhandenen Öls förderbar. Der nötige Lagerstättendruck wird hierbei über nachgepumptes Wasser erreicht. Das verbleibende, meist zähe und dichte Öl erschwert eine weitere Förderung. Verbleibendes Restöl kann durch die angewandten Verfahren nicht vom Speichergestein gelöst werden und ist nur durch die sehr aufwändigen und kostenintensiven Verfahren der Tertiärförderung zugänglich. In Deutschland wird durchschnittlich durch Primärförderung 18 % des vorhandenen Öls gewonnen. Die Anwendung von Sekundärverfahren erhöht den Entölungsgrad schließlich auf 32 %<sup>[1]</sup>.

Die genaue Kenntnis der Größe und der geologischen Eigenschaften von Lagerstätten haben in den vergangenen Jahrzehnten an Bedeutung gewonnen. Gründe hierfür sind der Rückgang der Zahl neuentdeckter bedeutender Ölfelder seit den siebziger Jahren des 20. Jahrhunderts<sup>[2]</sup> und einer technologischen Zurückhaltung in staatlich kontrollierten Ölförderländern angesichts mangelnder Investitionssicherheit.

Seit der modernen Ölförderung sind eine Vielzahl von physikalischen und chemischen Methoden zur Charakterisierung von Lagerstätten entwickelt und verfeinert worden. In diesem Zusammenhang ist der Einsatz von Markierungssubstanzen (Tracern, von engl. *to trace* = etwas verfolgen) eine weltweit angewandte, vielfach erprobte Methode, die zu den Standardverfahren zählt<sup>[3]</sup>.

Als hydrologische Tracer werden Fluorbenzoesäuren (FBAs) bereits seit über 30 Jahren eingesetzt<sup>[4-9]</sup>. Ihre Verwendung und Eignung als Tracer in hydrologischen Studien wurde erstmals 1982 durch Stetzenbach<sup>[10]</sup> vorgeschlagen und bestätigt. Anfangs noch als Tracer

in Grundwasser gedacht, zeigte sich ihre Eignung auch bei Bodenwasserstudien, zur Aufklärung der Bodenbeschaffenheit über das Sickerverhalten von Wasser, zur Erstellung hydrologischer Modelle zur Beschreibung von Fließwegen<sup>[11–15]</sup> und in jüngerer Zeit in Ölreservoirstudien<sup>[9]</sup>. Neben des erfolgreichen Einsatzes von FBAs in Erdölreservoirstudien ist ihr Anwendungsgebiet nicht auf wässrige oder Öl-Wasser-Systeme beschränkt. Sie dienen ebenfalls als Tracer in Studien, die sich auf künstliche oder biologische (Speicher)systeme beziehen. Beispielhaft seien hier aktuelle Studien zur Sequestrierung von  $CO_2$  (*Carbon Capture and Storage, CCS*)<sup>[16]</sup> genannt. Über ihren Einsatz als geologische und hydrologische Tracer hinaus, können FBAs durch ihre Fähigkeit zur Überwindung der Blut-Hirn-Schranke ebenfalls als *in vivo* Tracer dienen<sup>[17]</sup>. Desweiteren finden sie Einsatz als Intermediate bei der Herstellung von Pharmazeutika (u.a. Anti-Tumor Mittel). Ihr Nachweis als Metabolit in biologischen Systemen<sup>[18]</sup> ist somit ebenfalls von Bedeutung und verdeutlicht neben dem weiten Anwendungsspektrum von FBAs den großen Bereich komplexer Matrices. Um die Einsatzmenge des Tracers in makroskopischen Studien möglichst klein zu halten, ist ihr genauer Nachweis in kleinsten Mengen von großem Interesse.

Fluorbenzoesäuren kommen in der Natur nicht vor, werden nicht signifikant vom Erdreich sorbiert<sup>[19]</sup>, können allerdings von Pflanzen aufgenommen werden<sup>[20]</sup> und unterliegen im Erdreich keiner Biodegradation<sup>[19,21,22]</sup>, obgleich unter speziellen Umständen für 2- und 4-Fluorbenzoesäure eine Metabolisierung beschrieben wurde<sup>[19,21,23,24]</sup>. Sie besitzen keine nachgewiesene Toxizität bei hoher thermischer Stabilität<sup>[25]</sup> und können ohne eine Unterbrechung der Förderung eingesetzt werden. Sie sind daher für hydrologische Studien eine äußerst wertvolle Informationsquelle und stellen in Öl-Wasser-Systemen beinahe ideale Tracer dar.

## 1.2 Zielsetzung und Konzept

Ziel dieser Arbeit ist der gleichzeitige Nachweis möglichst vieler der 23 kommerziell verfügbaren Fluorbenzoesäuren im Ultraspurenbereich in komplexen, wässrigen Proben mit höchster Genauigkeit bei geringem finanziellen Aufwand mittels Standardmethoden der instrumentellen Analytik.

Zur Probenvorbereitung ist die Entwicklung und anschließende Optimierung einer Methode vorgesehen, welche den unerwünschten Matrixeffekt durch möglichst quantitative Abtrennung der Analyten minimiert und gleichzeitig möglichst alle 23 Fluorbenzoesäuren (FBAs) aufkonzentriert. Für den qualitativen und quantitativen Nachweis ist die Entwicklung einer gaschromatographischen Trennmethode und einer flüssigchromatographischen Trennmethode aus dem Bereich der Anionenaustauschchromatographie nötig, welche die Trennung möglichst aller FBAs bei massenspektrometrischer Detektion gewährleistet. Für die bei einer gaschromatographischen Trennung nötige Überführung der mittelflüchtigen, polaren Säuren in ihre leichtflüchtigen Methylester ist die Bereitstellung einer entsprechenden Synthese erforderlich, welche im Mikromaßstab reproduzierbar eine quantitative Veresterung möglichst aller FBAs sicherstellt. Für den Nachweis von FBAs in komplexen Matrices mit höchstmöglicher Präzision wurde die Isotopenverdünnungsanalyse gewählt. Um Fluorbenzoesäuren erfolgreich in dieser Absolutmethode einzusetzen, ist zusätzlich die Entwicklung und Optimierung einer einfachen und kostengünstigen Synthese zur Isotopenmarkierung von FBAs und eine anschließende Prüfung der markierten Säuren im Bezug auf ihre Eignung in den entwickelten Anreicherungs-, Trenn-, Veresterungs- und Ionisationsmethoden geplant.

## 1.3 Theoretischer Hintergrund und Stand der Forschung

### 1.3.1 Allgemeines

Bei Fluorbenzoesäuren (FBAs) handelt es sich um einfach oder mehrfach fluorierte Derivate der Benzoesäure. Der Begriff der Fluorbenzoesäuren schließt in dieser Arbeit ebenfalls fünf Varianten von Trifluormethylbenzoesäure ein, welche ebenfalls in Tracerstudien Verwendung finden und kommerziell erhältlich sind. Aus dieser Definition ergeben sich 23 FBAs welche als Analyten Gegenstand dieser Arbeit sind (vgl. Abbildung 1.1). Je nach Kontext hat es sich als sinnvoll erwiesen, die Säuren anhand der Zahl der Fluoratome in Mono-, Di-, Tri-, und Tetrafluorbenzoesäuren zu unterscheiden. Hinzu kommen fünf verschiedene Säuren mit Trifluormethylgruppe und Pentafluorbenzoesäure. Je nach Variationsmöglichkeit des Substitutionsmusters und kommerzieller Verfügbarkeit enthalten die

einzelnen Gruppen unterschiedlich viele Säuren. Die größten Gruppen mit jeweils sechs Isomeren stellen die Difluorbenzoesäuren (DFBAs) und Trifluorbenzoesäuren (TFBAs) dar. Gefolgt von jeweils drei Isomeren bei den Monofluorbenzoesäuren (monoFBAs) und Trifluormethylbenzoesäuren (TFMBAs) und zwei Isomeren der Tetrafluorbenzoesäuren (TetraFBAs) und Bistrifluormethylbenzoesäuren (BTFMBAs). Eine Übersicht der Säuren ist in Abbildung 1.1 und Tabelle 6.1 im Anhang dargestellt.

Im Gegensatz zur Benzoesäure zeigen die Fluorbenzoesäuren eine deutlich schlechtere Wasserlöslichkeit. Ihre  $pK_s$ -Werte liegen zwischen 2,71 und 4,13<sup>[13,26,27]</sup>. Sie weisen damit eine teilweise deutlich höhere Acidität als Benzoesäure ( $pK_s$ -Wert 4,2<sup>[28]</sup>) auf, was auf den  $-I$ -Effekt des Fluors zurückzuführen ist. Allgemein gilt, je mehr Fluoratome die Säure besitzt und je näher sie an der Säurefunktion sind, umso niedriger ist ihr  $pK_s$ -Wert. Die niedrigsten Werte weisen penta- und 2,3,5,6-TetraFBA (2,72 bzw. 2,71) auf, der höchste Wert wurde mit 4,14<sup>[29]</sup> bei 4-FBA ermittelt.

Durch ihre molekularen Eigenschaften können FBAs über sehr verschiedene analytische Methoden getrennt und detektiert werden. Dieser Umstand gestattet aus wissenschaftlicher Sicht ebenfalls den Einsatz von FBAs als Modellsubstanzen zum Vergleich verschiedener Analysemethoden und kann ebenfalls zur Aufklärung von Retentionsmechanismen dienen. Die Trennung der Säuren kann in flüssigchromatographischen Systemen über einen *Reversed-phase*-Mechanismus wie auch einen Ionenaustausch und auch elektromigrative Trenntechniken erfolgen. Für eine gaschromatografische Trennung liefert eine Veresterung der Säuren leichtflüchtige Produkte mit ausreichend hohem Dampfdruck für eine Trennung. Zur Detektion bietet der Aromat eine optische Absorption bei ca. 222 nm, die Fluorierung gestattet die Detektion mittels Elektroneneinfangdetektor (ECD); die Carbonsäurefunktion liefert bei hohen pH-Werten ein geladenes Molekül, welches wiederum eine Leitfähigkeitsdetektion ermöglicht.

Im Bezug auf die für diese Arbeit nötige massenselektive Detektion stellt die hohe Acidität der Säuren die ideale Voraussetzung für eine Elektrosprayionisation oder chemische Ionisation bei Atmosphärendruck nach einer flüssigchromatographischen Trennung beziehungsweise die Flüchtigkeit ihrer Ester eine Elektronenstoßionisation nach einer gaschromatographischen Trennung dar.

Die Vielfalt der analytischen Methoden, welche zur Trennung und zum Nachweis von FBAs zum Einsatz kommen können, erhöht ihren Wert und ihr Einsatzspektrum als Tracer deutlich, da mit allen gängigen analytischen Verfahren die Bestimmung von FBAs möglich ist.

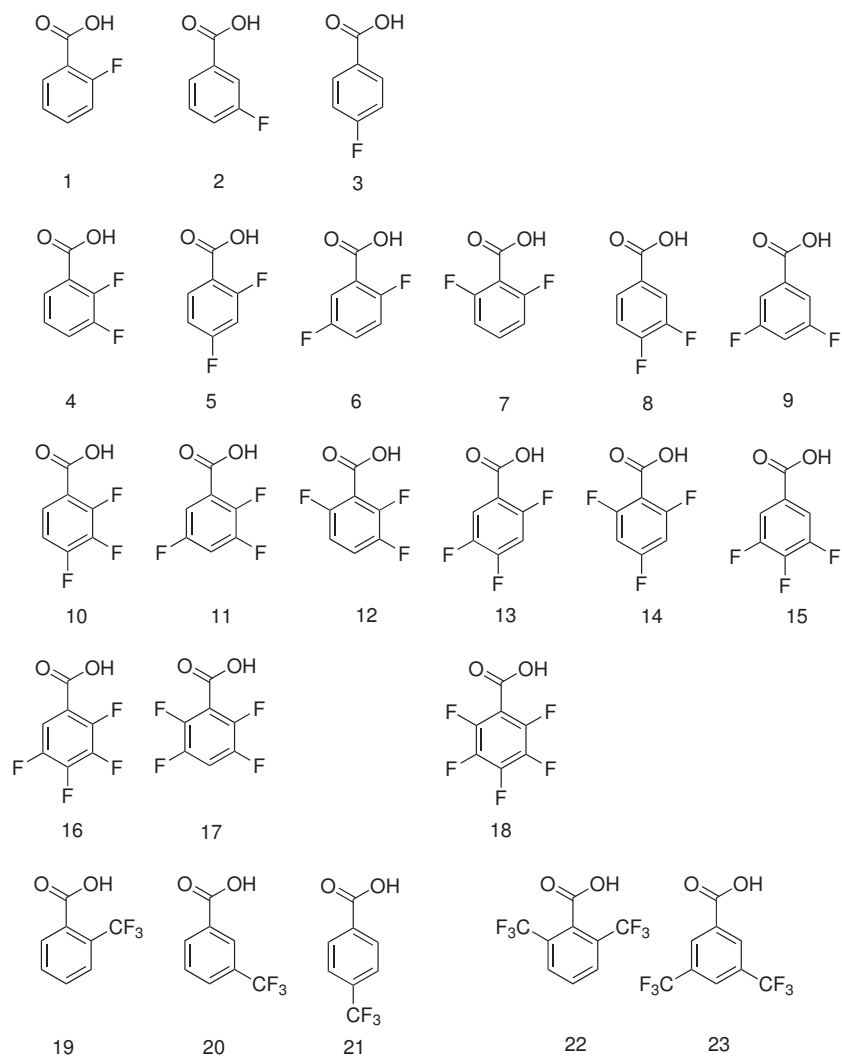


Abb. 1.1: Strukturen der 23 kommerziell verfügbaren Fluorobenzoensäuren. Nummerierung entsprechend Tabelle 6.1.

### 1.3.2 Probenvorbereitung

Die dieser Arbeit zugrundeliegende Probenvorbereitung basiert auf zwei Schritten. Im ersten Schritt wird der pH-Wert der Probe mit Salpetersäure oder Natronlauge auf den gewünschten Wert gebracht und im zweiten Schritt eine Festphasenextraktion (vgl. Abbildung 1.2) durchgeführt.

Die Festphasenextraktion (engl. *solid phase extraction*, SPE) hat die Aufgabe unerwünschte Bestandteile der Probenmatrix (organische und anorganische Verunreinigungen, Lösungsmittel) möglichst quantitativ abzutrennen. Je nach Methode ist die Wertfraktion entweder das Eluat oder der immobilisierte Teil, welcher auf dem SPE-Material zurückgehalten wird. Ist das Ziel eine Immobilisierung mit anschließender Elution durch ein geeignetes Lösungsmittel, geht mit der Aufreinigung eine Anreicherung der Analyten einher. In Abhängigkeit von Anreicherungs- und Elutionsvolumen ergibt sich ein maximal erreichbarer Anreicherungsfaktor. Werden beispielsweise 100 mL Probe auf einem SPE-Material immobilisiert und anschließend mit 1 mL Lösungsmittel eluiert, ergibt sich eine 100fache Anreicherung. Durch Eindampfen des Eluates kann eine weitere Anreicherung erreicht werden.

Für den Erfolg einer SPE ist neben der Kenntnis über die Zusammensetzung der Probenmatrix, dem Verhalten der Analyten und die Wahl des richtigen SPE-Materials auch die Entwicklung und Optimierung der einzelnen Extraktionsschritte (Punkte 2-5 in Abbildung 1.2) von großer Bedeutung. Es gilt die optimalen Bedingungen für das Vorkonditionieren der Kartusche (Punkt 2), den Anreicherungsprozess (Punkt 3), das Waschen (Punkt 4) und das Eluieren der Analyten (Punkt 5) zu finden. Ist auch nur ein Schritt dieses Prozesses unzureichend, werden keine reproduzierbaren Ergebnisse erzielt.

### 1.3.3 Trennung und Nachweis

#### GC-EI-MS

Um Fluorbenzoesäuren mittels Gaschromatographie trennen zu können, müssen sie über einen Injektor in die Gasphase überführt werden. Da die Säuren vergleichsweise hohe Dampfdrücke aufweisen, ist eine Veresterung zur Erhöhung ihrer Flüchtigkeit notwendig. Ziel ist es, eine schnelle und quantitative Veresterung im Mikromaßstab zu erreichen, um den Aufwand bei der Probenvorbereitung gering zu halten.

Zur Derivatisierung in der Gaschromatographie werden heute eine Vielzahl von kommerziell erhältlichen Derivatisierungsreagenzien verwendet. Ihre Auswahl richtet sich nach der funktionellen Gruppe des Analyten und den Anforderungen des Reagenzes und der

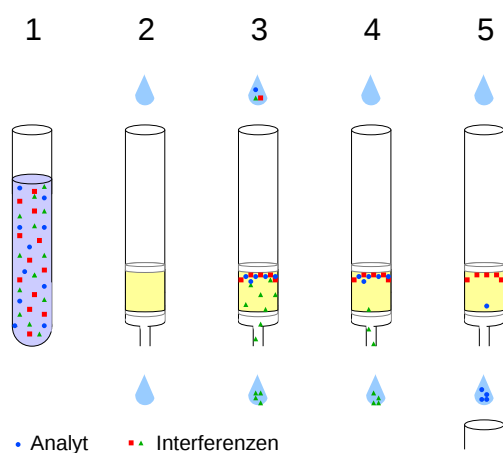


Abb. 1.2: Schematischer Ablauf einer Festphasenextraktion.

Probe im Hinblick auf das vorhandene Lösungsmittel, die Toleranz von Wasser, thermische Stabilität des Analyten, vorhandene Probenkomponenten die eine Derivatisierung beeinflussen könnten, Reaktionsbedingungen und die Lagerfähigkeit und Sicherheit des Reagenzes. Im Falle von Carbonsäuren stellen die Silylierung und die Alkylierung die am häufigsten verwendeten Derivatisierungsreaktionen dar. Im Falle der Silylierung wird mit einem siliziumhaltigen Reagenz unter Austausch eines aktiven Wasserstoffs durch eine Trimethylsilylgruppe (TMS) eine stabile, leichter flüchtige Verbindung erhalten. Da Silylierungsreagenzien bevorzugt mit Wasser und Alkoholen reagieren, muss sichergestellt sein, dass sowohl Probe als auch Lösungsmittel trocken sind. Die Reaktion läuft häufig unter Erwärmung bei Anwesenheit einer Base statt. Im Fall der FBAs wurden Versuche zur Derivatisierung mittels Bistrimethylsilyltrifluoracetamid (BSTFA) durchgeführt. Eine akzeptable Derivatisierung im Mikromaßstab konnte allerdings nicht erreicht werden. Die Restfeuchte in der Probe und die Bildung vieler Nebenkomponenten aufgrund der bevorzugten Silylierung aliphatischer und aromatischer Alkohole aus der Probe und die in diesem Zusammenhang auftretenden Störsignale auch in der SIM-Methode erwiesen sich als zu hoch, um eine Silylierung als praktikable Derivatisierungsmethode einzusetzen.

Bei der Alkylierung wird ein saures Wasserstoffatom durch eine Alkylgruppe ausgetauscht. Die Alkylierung wird allgemein angewandt um organische Säuren in Ester zu verwandeln. Ester besitzen eine sehr hohe Stabilität und können bei Bedarf aus der Probe isoliert und für lange Zeit gelagert werden. Wie auch im Falle der Silylierung sind eine Vielzahl unterschiedlicher Reagenzien kommerziell erhältlich. Die Nachteile der Alkylierung sind die Limitierung auf Aminosäuren und Carbonsäuren, häufig heftige Reaktionsbedingungen und oftmals toxische Reagenzien. Ihr Vorteil ist die Selektivität, da Alkohole nicht

reagieren, die Vielzahl kommerziell erhältlicher Reagenzien, teilweise Toleranz gegenüber Wasser und ein weiter Bereich an Reaktionsbedingungen von stark sauer bis stark basisch. Da Fluorbenzoesäuren auch unter extremen Reaktionsbedingungen keiner Degradation unterliegen und die Probe neben den FBAs auch Alkohole und geringe Mengen Wasser als Kontaminanten enthalten kann, ist eine Alkylierung als Derivatisierungsreaktion die Methode der Wahl. Die Details der in dieser Arbeit erfolgreich angewendeten Derivatisierung mittels  $BF_3 \cdot MeOH$  sind in den Kapiteln 2 und 4.1 beschrieben.

Sind die Ester durch Derivatisierung erzeugt, erfolgt ihre Trennung mittels Gaschromatographie auf einer Kapillarsäule. Aufgrund unterschiedlicher Dampfdrücke und unterschiedlich ausgeprägten Verteilungsgleichgewichten zwischen stationärer und mobiler Phase werden die Fluorbenzoesäuremethylester verschieden stark auf der stationären Phase zurückgehalten und somit aufgetrennt. Einen wichtigen Beitrag zur Trennung der Ester liefert die Art der stationären Phase. Je nach Analyteigenschaften werden unterschiedlich funktionalisierte Chromatographiesäulen verwendet. Da die Fluorbenzoesäuremethylester über einen aromatischen Ring verfügen, bietet sich die Verwendung einer aromatischen Funktionalisierung der Trennsäule für eine bestmögliche Trennung der Analyten an. Die Kombination aus Phenyl- und Methylderivatisierung des Polysiloxangrundgerüsts in kommerziell erhältlichen GC-Säulen wird bereits seit längerem erfolgreich angewendet. Je nach Probe können GC-Säulen mit unterschiedlichen Anteilen aus Phenyl-Methyl-Polysiloxan genutzt werden. Der Phenylanteil kann im Bezug auf das Analytgemisch beinahe beliebig gewählt werden, da Säulen mit einem Phenylanteil von beispielsweise 5 %, 35 %, 50 und 65 % als Standardphasen bei verschiedenen Herstellern verfügbar sind. In der vorliegenden Arbeit wurde eine Funktionalisierung mit 50 % Diphenyl- und 50 % Dimethylpolysiloxan von zwei unterschiedlichen Herstellern erfolgreich eingesetzt (vgl. 4.1).

Wurden die Ester durch die Kapillarsäule aufgetrennt, erfolgt anschließend ihre Ionisation an einem glühenden Rheniumdraht (Elektronenstoßionisation). Durch die hohe Ionisationsenergie (70 eV) werden die Ester in geladene Fragmente überführt (vgl. Abbildung 1.3), welche durch einen Massensfilter getrennt und mit einem Elektronenmultiplier als Detektor nachgewiesen werden. Das erhaltene Fragmentmuster charakterisiert die jeweiligen Isomere (mono-FBAs, DFBAs, ...). Durch die zuvor erfolgte chromatographische Auftrennung der Isomere ist in Kombination mit ihrer Retentionszeit eine eindeutige Zuordnung möglich. Die Hauptfragmente dienen zur Quantifizierung.



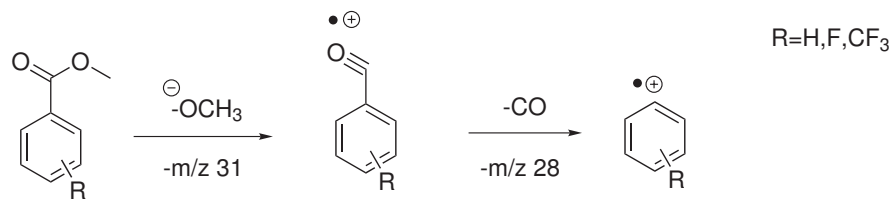


Abb. 1.3: Fragmentierungsreaktion von Fluorbenzoesäuremethylestern durch Elektronenstoßionisation.

## IC-ESI-MS

Aufgrund der Carbonsäurefunktion liegen Fluorbenzoesäuren bei höheren pH-Werten als Fluorbenzoate vor und können über ionenchromatographische Mechanismen aufgetrennt werden. Bei der Ionenaustauschchromatographie basiert der Retentionsmechanismus auf der Ausbildung eines stöchiometrischen Gleichgewichts, das sich aufgrund elektrostatischer Kräfte zwischen Ionen in Lösung und einer funktionalisierten Festphase einstellt. Es erfolgt ein Ionenaustausch. Durch das kompetitive Verhalten zwischen Analyt- und Eluentionen an der stationären Phase wird eine Retention des Analyten erreicht. Die Lage des Gleichgewichts beruht auf der Affinität der Analyt- und Eluentionen zur stationären Phase.

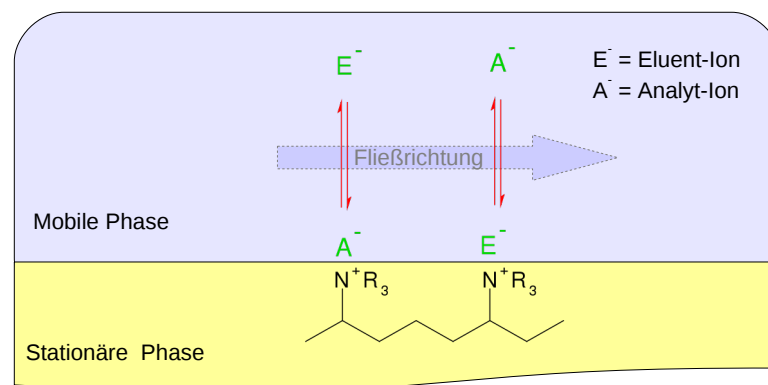


Abb. 1.4: Schematische Darstellung des Anionenaustauschprozesses als Retentionsmechanismus in der Ionenchromatographie.

Die stationäre Phase besteht überwiegend aus einer festen, polymeren Grundstruktur mit Ionentauscherfunktionen an der Oberfläche. Zur Erfüllung der Elektroneutralität findet sich in der Nähe der geladenen Ionentauscherfunktion immer ein gegensätzlich geladenes Ion. Da es in der Regel aus dem Laufmittel stammt, wird es als Elution bezeichnet.

Im Fall einer aufgebrauchten Probe wird kurzzeitig ein Elution  $E^-$  durch ein Analyt  $A^-$  verdrängt und an der gegensätzlich Ladung der stationären Phase elektrostatisch fixiert, bevor sie durch erneute Verdrängung mit weiteren Elutionen ausgetauscht werden.



Bedingt durch unterschiedliche Affinitäten der Analytione gelingt eine Trennung mehrerer Komponenten. Die als Selektivitätskoeffizient bezeichnete Gleichgewichtskonstante für das Analyt  $A^-$  ergibt sich aus dem Massenwirkungsgesetz:

$$K_{A^-} = \frac{[Polymer - N^+R_3A^-] \cdot [E^-]}{[Polymer - N^+R_3E^-] \cdot [A^-]} = \frac{[A^-]_S \cdot [E^-]_M}{[E^-]_S \cdot [A^-]_M} \quad (1.2)$$

Da die Konzentration der Elutionen in der stationären ( $[E^-]_S$ ) und mobilen Phase ( $[E^-]_M$ ) um ein Vielfaches höher ist als die des Analyten, kann sie näherungsweise als konstant betrachtet werden. Durch diese Annahme kann der Verteilungskoeffizient  $D_A$  und der Retentionsfaktor  $k'$  bestimmt werden.

Die Bestimmung der Gleichgewichtskonstante setzt allerdings nicht Konzentrationen sondern Aktivitäten voraus. Gleichung 1.2 ist also unter strengen Gesichtspunkten nur gültig, wenn die eingesetzten Konzentrationen den Aktivitäten entsprechen. Dies gilt nur bei unendlicher Verdünnung. Bei Ionenaustauschern mit geringer Kapazität und sehr schwach konzentrierten Eluenten wird zur Näherung die Aktivität mit der Konzentration gleichgesetzt. Bei hochkapazitiven Trennsäulen ( $> 200$  mmol/g Trägermaterial) und konzentrierten Laufmitteln verliert diese Näherung jedoch ihre Rechtfertigung. Mitunter deutliche Abweichungen vom idealen Verhalten sind die Folge.

Bei der Trennung organischer Ionen kann es, je nach Analyt und Wahl der stationären Phase, neben den beschriebenen ionischen Wechselwirkungen auch zu nichtionischen Wechselwirkungen kommen. Letztere werden in der Normalphasen- und Umkehrphasenchromatographie zur Trennung ausgenutzt und beruhen auf Adsorptions- und/oder Verteilungsgleichgewichten. Liegen der Retention eines Analyten mehrere dieser Retentionsmechanismen zugrunde, liegt ein *mixed mode* - ein gemischter Modus - vor. Je nach Anteil der einzelnen am *mixed mode* beteiligten Mechanismen lässt sich die Retention beeinflussen oder durch unterschiedliche Beeinflussung ein gemischter Modus unterdrücken oder verstärken. Im Falle der FBAs bewirkt das Fluorbenzoatanion mit seiner negativen Ladung als Analytanion eine Retention an den positiv geladenen funktionellen Gruppen (häufig substituierte Amine) der stationären Phase. Ist die stationären Phase so aufgebaut, dass ebenfalls nichtionische Wechselwirkungen möglich sind, kann eine Retention der FBAs zusätzlich über diese sekundären Wechselwirkungen erfolgen. Viele der stationären

Phasen, die in der Ionenchromatographie Einsatz finden, bestehen aus polymerbasierten Grundgerüsten und ermöglichen daher zusätzliche hydrophobe oder bei Anwesenheit von Polymeren mit aromatischen Einheiten  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen. Stationäre Phasen die mehr als eine starke Wechselwirkung mit dem Analyt eingehen, können daher als *mixed mode* Phasen bezeichnet werden. Diese Eigenschaft ist nicht generell unerwünscht. Je nach Trennproblem kann sie vorteilhaft eingesetzt werden, um eine Auftrennung von Substanzgemischen mit unterschiedlichen Eigenschaften (gleichzeitige Anwesenheit ionisch und nichtionischer oder polarer und unpolarer Analyten) zu ermöglichen. Durch Veränderung von Elutionenkonzentration, pH-Wert, Art und Anteil des organischen Modifiers und der Temperatur kann der gemischte Modus beeinflusst werden. Beispielsweise unterdrückt Acetonitril  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen zwischen FBA und stationärer Phase.

Wurden die Fluorbenzoate durch die Trennsäule aufgetrennt, erfolgt ihre Ionisation in einem Elektrospray. Hierbei wird die mobile Phase unter Atmosphärendruck durch eine Metallkapillare versprüht, an deren Ende eine Spannung angelegt ist (vgl. Abbildung 1.5). Die angelegte negative Spannung bestimmt die Bildung negativer Ionen. Das durch die Spannung erzeugte elektrische Feld zwischen Kapillare und Massensfilter als Gegenelektrode durchdringt die Lösung und bewirkt eine elektrophoretische Bewegung der Ionen hin zur Gegenelektrode. Hierdurch bildet sich an der Kapillarspitze ein Überschuss gleichgeladener Ionen. Durch die Abstoßung der gleichgeladenen Ionen treten sie über die Bildung des TAYLOR-Kegels als Spray aus der Kapillare aus. Durch den Einsatz eines geheizten Trägergases wird die Vernebelung und Verdampfung von Lösungsmittel zusätzlich unterstützt. Die durch Verdampfung sich verkleinernden Tropfen erreichen das RAYLEIGH-Limit durch die gleichzeitige Erhöhung der Dichte des elektrischen Feldes auf ihrer Oberfläche und zerfallen in noch kleinere Tröpfchen (COULOMB-Explosion). Zur Bildung freier Ionen in der Gasphase existieren unterschiedliche Modelle. Entscheidend ist, dass die erzeugten Ionen durch eine Potentialdifferenz zwischen Kapillare und beheizter Transferkapillare in das MS gelenkt werden. Da die Elektrosprayionisation eine sanfte Ionisationsmethode ist, erfolgt im Gegensatz zur Elektronenstoßionisation keine oder nur eine geringe Fragmentierung (vgl. Abbildung 4.4). Die Auftrennung der Fragmente nach ihrem Masse-zu-Ladung-Verhältnis und ihre Detektion erfolgt in gleicher Weise wie bei der GC-MS.

Durch die Kopplung von Ionenchromatographie und Elektrosprayionisation werden, im Gegensatz zur Kopplung mit der klassischen Umkehrphasenchromatographie, über das Elektrospray zusätzlich zum Lösungsmittel auch gelöste Elutionen in die Sprühkammer eingetragen. Um nach dem Verdampfen der Lösungsmittel das Auskristallisieren in der Sprühkapillare, in der Sprühkammer und auch in der Transferkapillare und die damit verbundenen Störungen der Messung und Beschädigungen am Gerät zu verhindern, ist eine Suppression der Elutionen zwischen Trennsäule und Sprühkammer nötig. Bei

der Suppression wird der Eluent über einen Ionentauscher so verändert, dass aus den Ionen in der Lösung flüchtige oder neutrale Produkte entstehen. Wird beispielsweise eine Natriumcarbonatlösung als Eluent verwendet, entsteht durch einen Austausch des Natrium-Kations mit einem Proton Kohlensäure, welche wiederum in  $CO_2$  und Wasser dissoziiert. Die Suppression kann elektrochemisch oder chemisch in kontinuierlicher oder diskontinuierlicher Weise erfolgen. In der vorliegenden Arbeit wurde die Suppression über einen Dreikammer-Suppressor auf chemischem Wege erzielt.

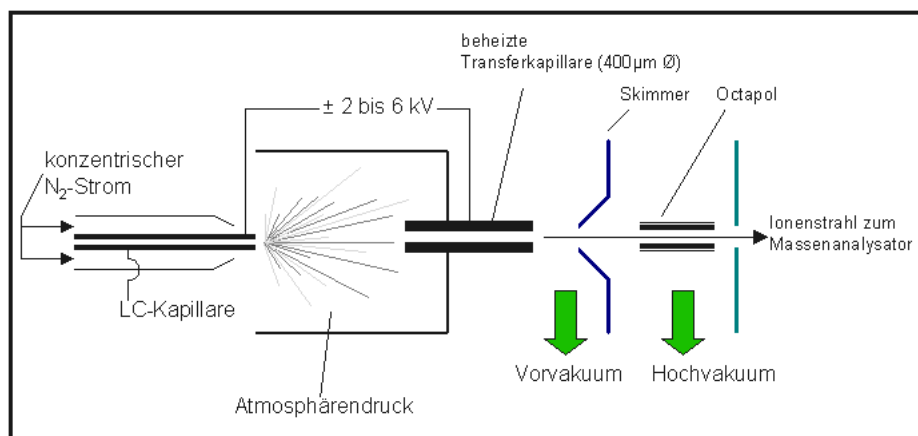


Abb. 1.5: Schematischer Aufbau der ESI-Quelle<sup>[30]</sup>.

### 1.3.4 Isotopenverdünnungsanalyse

Bereits seit über hundert Jahren werden Markierungsstoffe im Grundwasser<sup>[6]</sup> eingesetzt. Durch den Einsatz radioaktiver Tracer erschloss sich ein weiterer Forschungsbereich<sup>[31]</sup>, welcher jedoch bei Feldversuchen auf eine deutlich geringere Akzeptanz stieß. Aufgrund von umwelt- und sicherheitstechnischen Aspekten möchte man radioaktive Tracer generell vermeiden. Als Konsequenz daraus wurden natürliche Isotope verstärkt für hydrologische Fragestellungen herangezogen. Durch die in den letzten Jahren verschärften rechtlichen Rahmenbedingungen im Trinkwasserschutz und bei der Abgrenzung von Trinkwasserschutzgebieten haben sich die Anforderungen an die instrumentellen Techniken der analytischen Chemie deutlich erhöht. Durch massenspektrometrische Isotopenverdünnungsanalyse (MSIVA, engl.: *Isotope Dilution Mass Spectrometry (IDMS)*) kann diesem Umstand Rechnung getragen werden.

Die MSIVA berücksichtigt den Matrixeinfluss, da für die Analyse der isotonenangereicherte Indikator direkt in die Probe gegeben wird. Sie gilt als eine der zuverlässigsten und genauesten Methoden in der Spurenanalytik<sup>[32-34]</sup>. Die Grenzen der Methode liegen im Vorkommen natürlicher Isotope mit ausreichend langer Halbwertszeit. Nicht von allen Elementen im Periodensystem existieren mehrere, ausreichend langlebige, natürliche Isotope.

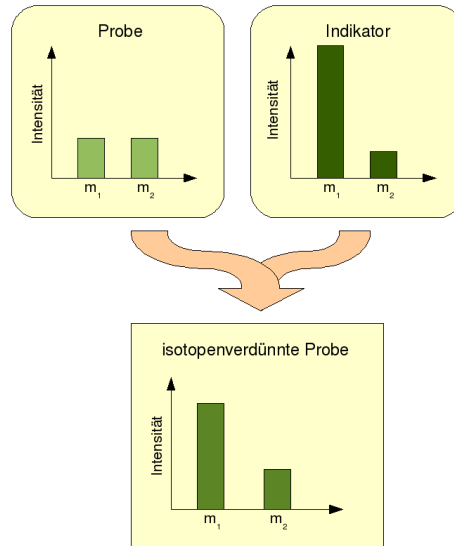


Abb. 1.6: Schema der allgemeinen Isotopenverdünnungsanalyse.

Monoisotopische Reinelemente wie z.B. Arsen, Kupfer, Kobalt oder Ruthenium sind daher mit der MSIVA nicht bestimmbar.

Bei der Isotopenverdünnungsanalyse<sup>[34,35]</sup> wird zu einer Probe mit natürlicher Isotopenzusammensetzung ein Indikator (engl. *"spike"*) mit bekannter Konzentration und Isotopenzusammensetzung gegeben (vgl. Abbildung 1.6). Der Indikator ist gegenüber der natürlichen Isotopenzusammensetzung deutlich verändert und so durch eine massenspektrometrische Analyse in seinem Masse-zu-Ladung-Verhältnis vom Analyt unterscheidbar. Die Empfindlichkeit der Analyse steigt, je stärker sich die Isotopenhäufigkeiten von Probe und Indikator unterscheiden. Im gleichen Maße sinkt die einzusetzende Indikatormenge. Über das Isotopenverhältnis der gespikten Mischung läßt sich auf den ursprünglichen Gehalt an Analyt schließen<sup>[33,36]</sup>.

Für das Isotopenverhältnis  $R_B$  der Probe nach Zugabe des Indikators gilt:

$$R_B = \frac{n_B(^1\text{Isotop})}{n_B(^2\text{Isotop})} = \frac{n_x(^1\text{Isotop}) + n_y(^1\text{Isotop})}{n_x(^2\text{Isotop}) + n_y(^2\text{Isotop})} \quad (1.3)$$

$n_B$  : Stoffmenge in der Probe nach Zugabe des Indikators [mol]

$n_x$  : Stoffmenge in der Probe [mol]

$n_y$  : Stoffmenge im Indikator [mol]

Um den Gehalt an Analyt in der Probe zu ermitteln, wird von der Stoffmenge auf die Konzentration umgestellt:

$$\frac{n_x}{n_y} = \frac{c_x \cdot m_x}{c_y \cdot m_y} = \frac{n_x(^1\text{Isotop}) + n_x(^2\text{Isotop})}{n_y(^1\text{Isotop}) + n_y(^2\text{Isotop})} = \frac{(R_x + 1) \cdot n_x(^2\text{Isotop})}{(R_y + 1) \cdot n_y(^2\text{Isotop})} \quad (1.4)$$

$n_x, n_y$  : Stoffmenge in der Probe bzw. dem Indikator [mol]

$c_x, c_y$  : Konzentration in der Probe bzw. im Indikator [mol/g]

$m_x, m_y$  : Masse in der Probe bzw. im Indikator [g]

$R_x, R_y$  : Isotopenverhältnis in der Probe bzw. im Indikator

Nach Kombination von Gleichung 1.3 und 1.4 und Umstellen folgt die MSIVA-Gleichung:

$$\frac{n_x}{n_y} = \frac{R_y - R_B}{R_B - R_x} \cdot \frac{R_x + 1}{R_y + 1} \text{ bzw. } c_x = c_y \cdot \frac{m_y}{m_x} \cdot \frac{R_y - R_B}{R_B - R_x} \cdot \frac{R_x + 1}{R_y + 1} \quad (1.5)$$

## Organische Isotopenverdünnungsanalyse

Die allgemein gültige Berechnung in Gleichung 1.5 findet in der Regel Anwendung bei der anorganischen Isotopenverdünnungsanalyse, da in ihr der Indikator durch Isotopenanreicherung gewonnen wird und im Allgemeinen noch in nicht vernachlässigbaren Anteilen das zu bestimmende Isotop enthält. Die Berechnung des Probengehaltes vereinfacht sich deutlich, wenn davon ausgegangen werden kann, dass im Indikator das Isotop der Probe und *vice versa* in der Probe das Isotop des Indikators nicht enthalten ist (vgl. Abbildung 1.8). Dieser Umstand vereinfacht die Analyse und Auswertung deutlich und kann durch adäquate Isotopenmarkierung in der organischen Isotopenverdünnungsanalyse genutzt werden. Wird bei der Markierung der Analyten sichergestellt, dass kein unmarkierter Anteil im Indikator verbleibt und ist der erreichte Massenshift groß genug, um ebenfalls zu gewährleisten, dass das Masse-zu-Ladung-Verhältnis nicht aufgrund der natürlichen Isotopenverteilung in der Probe vorkommt (vgl. Abschnitt Isotopenmarkierung und Kapitel 4.3), vereinfacht sich die Berechnung von  $c_x$  deutlich.

Es kann für die Stoffmengenverhältnisse in der Probe angenommen werden:

$$\frac{n_x}{n_y} \approx \lim_{R_x \rightarrow \infty, R_y \rightarrow 0} \left[ \frac{R_y - R_B}{R_B - R_x} \cdot \frac{R_x + 1}{R_y + 1} \right] = R_B \quad (1.6)$$

Daraus folgt:

$$c_x = c_y \cdot \frac{m_y}{m_x} \cdot R_B \quad (1.7)$$

Dieses Prinzip wird in umgekehrter Weise verwendet, um die Konzentration des Indikators anhand von gespikten Standardlösungen des unmarkierten Analyten zu bestimmen (*reverse MSIVA*).

Da die massenspektrometrische Messung ausschließlich Isotopenverhältnisse bestimmt, ergeben sich folgende Vorteile:

- keine externe Kalibration mit verschiedenen konzentrierten Standards nötig
- Intensitätsschwankungen haben keinen Einfluss auf das Messergebnis
- Empfindlichkeitssteigerung des Verfahrens durch die Indikatorzugabe
- ein nachträglicher Substanzverlust verfälscht das Ergebnis nicht
- geringer Materialverbrauch
- hochpräzise Methode mit sehr guten Nachweisgrenzen
- äquivalenter Matrixeinfluss auf Analyt und Indikator

Voraussetzung für eine Isotopenverdünnungsanalyse ist eine vollständige Isotopenequilibration zwischen Indikator und Probe, die Verwendung eines massenselektiven Detektors sowie ein chemisches Gleichgewicht zwischen Indikator und Probe. Bis heute wurde die MSIVA in vielen Fällen erfolgreich eingesetzt<sup>[37–40]</sup>. Durch neue Synthesewege zur Isotopenmarkierung ist der Bereich der organischen MSIVA von zunehmend hohem Interesse. Ein Einsatz zur präzisen Ultraspurenbestimmung von Fluorbenzoesäuren mit dieser Methode und eine Syntheseroute zur Isotopenmarkierung dieser Analyten wurde bisher nicht beschrieben.

## Isotopenmarkierung

Für die in den Fluorbenzoesäuren enthaltenen Atome Kohlenstoff, Wasserstoff, Sauerstoff und Fluor sind natürliche Isotope mit ausreichend langer Halbwertszeit in Tabelle 1.1 aufgeführt.

Tab. 1.1: Isotope der in FBAs auftretenden Elemente.

Element	langlebiges Isotop
Kohlenstoff	$^{12}\text{C}$ , $^{13}\text{C}$ , $^{14}\text{C}$
Wasserstoff	$^1\text{H}$ , $^2\text{H}$ , $^3\text{H}$
Sauerstoff	$^{16}\text{O}$ , $^{17}\text{O}$ , $^{18}\text{O}$
Fluor	$^{19}\text{F}$

Zur Markierung bieten sich die Isotope  $^{13}\text{C}$  (natürliche Häufigkeit 1,1%) und  $^2\text{H}$  (natürliche Häufigkeit 0,0115%) an<sup>[41]</sup>. Das  $^{18}\text{F}$ -Isotop ist mit einer Halbwertszeit von 110 Minuten zu kurzlebig für eine Verwendung. Eine Isotopenmarkierung von Fluorbenzoesäuren ist daher nur auf die Elemente Kohlenstoff und Wasserstoff anwendbar und bisher in der Literatur

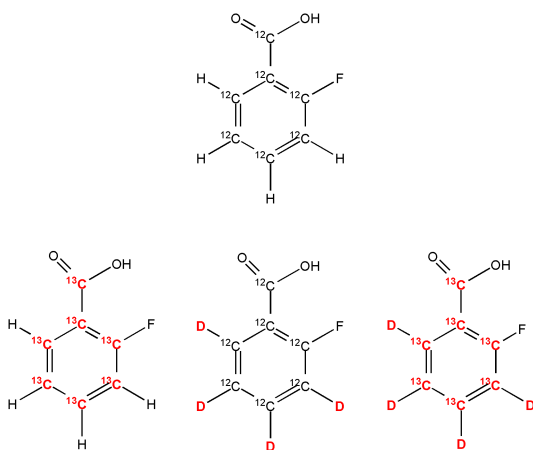


Abb. 1.7: Optionen einer Isotopenmarkierung am Beispiel von 2-FBA (*oben*: 2-FBA mit natürlichem Isotopenmuster, *unten*: Beispiele für mögliche Isotopenmarkierungen).

nicht bekannt. Das Fragmentierungsmuster muss bei der Planung der Isotopenmarkierung beachtet werden, da sich der markierte Molekülteil durch Fragmentierungen verändern oder ganz entfernt werden kann. Da bei der Fragmentierung kleinere Ionen und Moleküle das ursprüngliche Molekül verlassen (vgl. Abbildung 4.4), ist im Fall der Fluorbenzoesäuren die Markierung des aromatischen Rings zielführend. Die alleinige Markierung des Kohlenstoffatoms der Säurefunktion ist für eine Unterscheidung von der natürlichen Isotopenverteilung aufgrund des vergleichsweise hohen natürlichen  $^{13}\text{C}$ -Anteils und in einigen Fällen aufgrund des Austritts der Säuregruppe durch Fragmentierung unzureichend. Ein Austausch der Wasserstoffatome des aromatischen Rings gegen Deuterium ist eine Option, welche separat oder in Ergänzung zur Markierung der aromatischen Kohlenstoffatome eine einfache und kostengünstige Syntheseoption darstellt. Abbildung 1.7 veranschaulicht am Beispiel von 2-Fluorbenzoesäure die Möglichkeiten einer Isotopenmarkierung.

Synthesen isotopenmarkierter aromatischer Verbindungen sind in der Literatur bekannt<sup>[42–45]</sup>. Die Übertragung einer Isotopenmarkierung auf Fluorbenzoesäuren und eine Optimierung der Ausbeuten und Reinheiten der Isotopenstandards ist bisher nicht beschrieben und ein Kernbestandteil dieser Arbeit.

### 1.3.5 Stand der Forschung

STETZENBACH beschreibt 1982 den Nachweis von penta-FBA und 3-TFMBA mittels HPLC und vorgeschalteter Probenanreicherung bei optischer Detektion<sup>[10]</sup>. Auch BOWMAN verwendet 1984 zur Trennung von vier FBAs aus Bodenproben HPLC mit optischer Detektion im UV<sup>[11,46]</sup>. 1992 berichtet ADAMS über die thermische Stabilität 39 aromatischer Säuren, darunter 8 FBAs als geothermale Tracer, welche er ebenfalls mittels HPLC-UV bestimmt<sup>[26]</sup>.



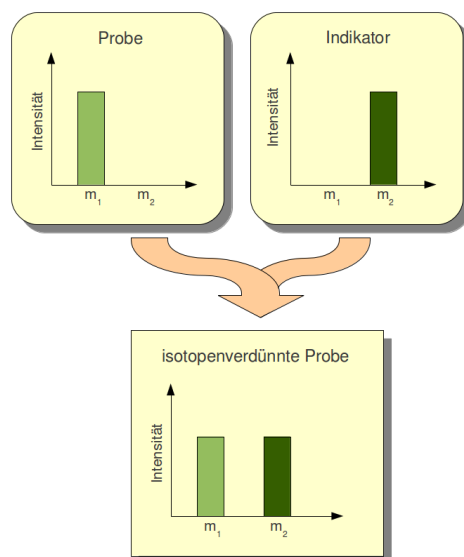


Abb. 1.8: Schema der organischen Isotopenverdünnungsanalyse.

Im selben Jahr zeigt PEARSON die Trennung von 3 FBAs mittels Ionenchromatographie und ihren Nachweis über Leitfähigkeitsdetektion<sup>[12]</sup>. Einige Jahre später zeigt GALDIGA eine Probenvorbereitung mittels SPE und erstmals eine gaschromatographische Trennung und eine massenselektive Detektion. Er erzeugt Fluorbenzoesäureester durch Einsatz von Diazomethan<sup>[47]</sup> und mittels Pentafluorbenzylbromid<sup>[48]</sup>. 2001 berichtet DAHAN über die Trennung von sieben FBAs per HPLC mit UV-Detektion<sup>[49]</sup>. Ein Jahr später zeigen JUHLER und MORTENSEN die Trennung von 15 FBAs per HPLC und ihren Nachweis per Tandem-MS aus Grundwasserproben<sup>[15]</sup>. Ihr Vergleich zwischen Elektrosprayionisation (ESI) und chemischer Ionisation bei Atmosphärendruck (APCI) zeigt für ESI eine durchschnittlich 20fach bessere Nachweisgrenze. 2005 beschreiben HU und MORAN die Trennung von bis zu sieben FBAs mittels IC-UV/Vis und zusätzlicher Leitfähigkeitsdetektion<sup>[50]</sup>. Die erste und bisher einzige Anwendung elektromigrativer Techniken zur Trennung von FBAs beschreiben ISEMURA und KITAGAWA in 2009. Ihnen gelingt die Trennung von 11 FBAs mittels Kapillarelektrophorese. Der Nachweis erfolgte ebenfalls durch Einsatz der UV-Detektion<sup>[51]</sup>. 2011 schließlich berichtet SERRES-PIOLE über den direkten Nachweis von FBAs in Ölreservoirwässern mittels UHPLC und Tandem-MS. Ihnen gelingt die Trennung und der Nachweis von 16 FBAs durch Kombination von UHPLC mit *Multiple Reaction Monitoring* (MRM) MS und der Verwendung einer neuartigen „*travelling-wave collision cell*“ Technologie, bei der selektierte Ionen im Massenfilter auf einer Spannungswelle surfen. Mit dieser Technik ist eine Verkürzung der Analysenzeit bei gleichzeitiger Erhöhung der Empfindlichkeit möglich<sup>[52]</sup>.

Die Verwendung von Ionenchromatographie in Verbindung mit massenselektiver Detektion sowie die Anwendung einer Isotopenverdünnungsanalyse und auch eine Synthese zur

Darstellung isotope-markierter FBAs sind bisher in der Literatur unbekannt und werden erstmals in dieser Arbeit vorgestellt.

## 2 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Dissertation wurde eine Methode zum Nachweis von Fluorbenzoesäuren im Ultraspurenbereich in komplexen, wässrigen Probenmatrizes unter Verwendung der Isotopenverdünnungsanalyse bei Einsatz von Gaschromatographie oder Ionenchromatographie mit massenselektiver Detektion entwickelt.

Um mögliche Störeinflüsse der Probenmatrix zu minimieren und die Analyten gleichzeitig anzureichern, wurde eine zuvor von mir entwickelte Festphasenextraktion weiter optimiert und charakterisiert.

Für die notwendige Auftrennung des Analytgemisches, welches aus der Festphasenextraktion erhalten wurde, wurden zwei chromatographische Methoden entwickelt.

Im Fall der Gaschromatographie wurde eine Synthese entwickelt und optimiert, welche die quantitative Bildung der Methylester nach der SPE im Mikromaßstab durch Verwendung von  $BF_3 \cdot MeOH$  direkt im GC-Vial bei  $64^\circ C$  innerhalb von 24 Stunden ermöglicht. Erst die leichtflüchtigen Ester eignen sich für den Einsatz in der Gaschromatographie. Für ihre Trennung wurde eine GC-Säule mit Dimethylpolysiloxanfunktionalisierung mit 50 % Phenylanteil gewählt und ein Temperaturgradient zur bestmöglichen Trennung bei minimaler Laufzeit ausgearbeitet. Eine Charakterisierung der Fragmentierungsmuster nach Elektronenstoßionisation verhalf bei der anschließenden Erstellung einer SIM-Methode, um die instrumentelle Nachweisgrenze zu verbessern und den Matrixeinfluss weiter zu minimieren.

Im Fall der Ionenchromatographie wurde nach einem Screening unterschiedlicher Trennsäulentypen mit verschiedenen Funktionalisierungen und einem Vergleich verschiedener Elutionen und -konzentrationen und Variation des Modifieranteil und der Trenntemperatur die optimale, isokratische Trennmethode ausgearbeitet. Der Einsatz einer 250 mm langen Trennsäule des Latex-Typs in Kombination mit einem 0,63 mM Natriumcarbonat eluent und 18 % Acetonitril als organischem Modifier bei einer Säulentemperatur von  $45^\circ C$  ergab unter isokratischen Bedingungen die bestmögliche Trennung. Bei der zur massenselektiven Detektion nötigen Bildung von Ionen wurde die Elektrosprayionisation eingesetzt. Zur Charakterisierung des Ionisationsverhaltens der Säuren im Elektrospray und darauf aufbauend zur Verbesserung der instrumentellen Nachweisgrenze durch einen

höchstmöglichen Ionisationsgrad wurden die Bedingungen hinsichtlich Kapillar- und Fragmentorspannung und Sprayzusammensetzung untersucht. Die abschließende Entwicklung einer SIM-Methode analog zur Gaschromatographie komplettierte die Methodenentwicklung und ergab eine höchstmögliche Empfindlichkeit bei simultaner Minimierung von Störeinflüssen.

Zur Isotopenmarkierung von Fluorbenzoesäuren wurde eine kostengünstige und schnelle H/D-Austauschreaktion realisiert, die auf den Einsatz eines Katalysator verzichtet. Allein durch eine im Ölbad, Trockenschrank oder in der Synthesemikrowelle thermisch induzierte, elektrophile aromatische Substitution in konzentrierter  $D_2SO_4$  gelang ein Austausch der aromatischen Protonen durch Deuterium. Am Beispiel von sechs Fluorbenzoesäuren wurden die Parameter Reaktionszeit und Reaktionstemperatur optimiert, um eine höchstmögliche Reinheit in einer Einzelreaktion bei einem minimalen Massenshift von +2 g/mol zu erreichen.

Zum Abschluss wurde die Eignung der isotopenmarkierten Fluorbenzoesäuren in den einzelnen Methodenteilen SPE, Veresterung mit  $BF_3 \cdot MeOH$ , gaschromatographische Trennung, Elektronenstoßionisation, ionenchromatographische Trennung und Elektrosprayionisation geprüft und eine Isotopenverdünnungsanalyse in Realproben durchgeführt.

## 3 Summary

Within this dissertation, a method for the ultra trace determination of fluorobenzoic acids in complex aqueous sample matrices using isotope dilution mass spectrometry (IDMS) with gas chromatography or ion chromatography with mass selective detection is presented.

To minimize possible interferences of the sample matrix and to enrich the analytes simultaneously, a previously developed solid-phase extraction method was optimized and characterized.

The necessary separation of the analyte mixture obtained after solid-phase extraction, has been achieved by the development of two chromatographic methods.

Since only the volatile esters are suitable for use in gas chromatography, a synthesis was developed and optimized, which permits the quantitative formation of the methyl esters by using  $BF_3 \cdot MeOH$  on a micro scale, directly in a GC vial at 64 °C within 24 hours. For their separation a GC column functionalized with polydimethylsiloxane containing 50 % phenyl was chosen and a temperature gradient to give the best separation at a minimal runtime was developed. A characterization of the fragmentation pattern after electron impact ionization was necessary in the subsequent creation of a selected ion method (single ion monitoring, SIM) to enhance the instrumental detection limit and further minimization of the matrix influence.

In case of ion chromatography, after a screening of different types of separation columns with different functionalization and a comparison of different eluent ions and concentrations, varying the modifier percentage and the separation temperature, the method that worked out best was developed. The use of a 250 mm column of the latex type in combination with a 0,63 mM sodium carbonate eluent and 18 % acetonitrile as the organic modifier at 45 °C resulted in the best possible separation at minimum runtime under isocratic conditions. For the required mass-selective detection electrospray ionization was used. To characterize the ionization behavior of the acids in the electrospray, with the aim to improve the instrumental detection limit by a maximum degree of ionization, the influence of capillary voltage, fragmentor voltage and spray composition was studied. The final development of a selected ion method analogous to gas chromatography, completed the method development and yielded in a maximum of sensitivity with a simultaneous minimization of interferences.

For stable isotopic labeling of fluorobenzoic acids, an inexpensive and quick H/D exchange reaction without the use of catalyst was realized. Solely by an oil bath, drying oven or in a synthesis microwave a thermally induced electrophilic aromatic substitution in concentrated  $D_2SO_4$  managed an exchange of the aromatic protons with deuterium. By the example of six FBAs, the reaction time and reaction temperature has been optimized to the highest possible purity in a single reaction to achieve a minimum mass shift of +2 g/mol.

In conclusion, the suitability of the isotopically labeled fluorobenzoic acids in the single steps of the analysis method SPE, esterification using  $BF_3 \cdot MeOH$ , gaschromatographic separation, electron impact ionization, ionchromatographic separation and electrospray ionization were controlled and an isotope dilution analysis in real samples was carried out.

## 4 Kumulativer Teil der Dissertation

### 4.1 Ultraspurenbestimmung von Fluorbenzoesäuren in Leitungs- und Reservoirwasser mittels Festphasenextraktion und Gaschromatographie-Massenspektrometrie

Der Inhalt dieses Kapitels wurde veröffentlicht in:

Karsten Müller, Andreas Seubert, „*Ultra trace determination of fluorobenzoic acids in tap and reservoir water using solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry*“, *Journal of Chromatography A*, **2012**, 1260, 9-15.

doi: 10.1016/j.chroma.2012.08.050

#### 4.1.1 Zusammenfassung und Diskussion

In diesem Kapitel wird die Anreicherung von Fluorbenzoesäuren aus Leitungs-, Grund- und Reservoirwasser mittels Festphasenextraktion (SPE), ihre Trennung mittels Gaschromatographie (GC) und ihr Nachweis mittels Elektronenstoßionisations-Massenspektrometrie (EI-MS) beschrieben.

Die von GALDIGA<sup>[47]</sup> beschriebene Bildung der Methylester durch den Einsatz von Diazomethan hat die Vorteile, dass sie schnell und quantitativ erfolgt und die Reaktionsmischung direkt in das GC injiziert werden kann. Nachteilig sind jedoch die schwierige Erzeugung des explosiven und gasförmigen Diazomethans bei gleichzeitig sehr kurzer Haltbarkeit und schlechter Lagerfähigkeit und die Notwendigkeit einer absolut wasserfreien Probe, um die Veresterungsreaktion gewährleisten zu können. Um diesen essentiellen Schritt in der Probenvorbereitung zu vereinfachen, wurde eine Veresterungsreaktion mit  $BF_3 \cdot MeOH$  zur Bildung der Fluorbenzoesäuremethylester durchgeführt. Es zeigte sich, dass diese Reaktion innerhalb von 24 Stunden bei 64 °C im Trockenschrank quantitativ und reproduzierbar auch bei Anwesenheit von Wasserspuren direkt im GC-Vial im Mikromaßstab verläuft (vgl.

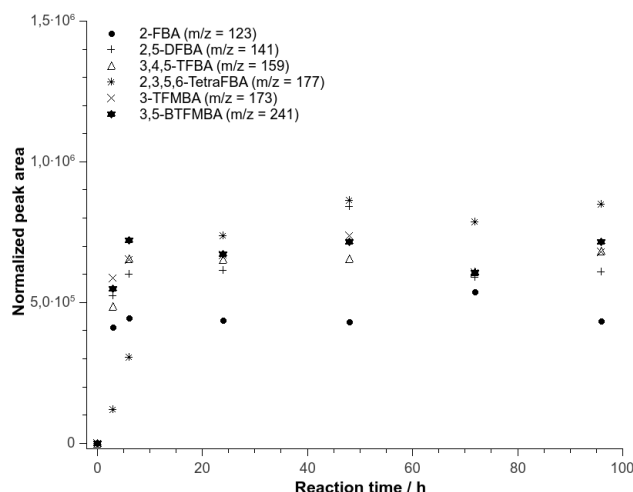


Abb. 4.1: Normierte Peakflächen von sechs FBAMEs (125 µg/L) im Vergleich zur Reaktionszeit in  $BF_3 \cdot MeOH$ . Nach 24 Stunden wird keine weitere Vergrößerung der Peakflächen beobachtet.

Abbildung 4.1). Nach der Veresterungsreaktion wird das Reaktionsgemisch mit Wasser versetzt und mit Hexan extrahiert. Ein 1 µL Aliquot der Lösung wird anschließend per GC-MS gemessen. Bei der beschriebenen Reaktion ist die Verwendung von getrockneten Lösungsmitteln nicht notwendig. Durch Verwendung von  $BF_3 \cdot MeOH$  konnten 22 Fluorbenzoesäuremethylester (FBAMEs) gebildet werden. Einzig 2,6-BTFMBA zeigte keine Veresterung, vermutlich aufgrund sterischer Hinderung. Eine Veresterung mit  $MeI/K_2CO_3$  war bei allen 23 FBAs erfolgreich, allerdings nur unter Idealbedingungen (Leitungswasser als Probematrix oder FBAs in ACN ohne zuvorige SPE) reproduzierbar. Bei Anwendung von SPE-Extrakten aus Realproben zeigte sich keine ausreichende Reproduzierbarkeit in einer angemessenen Zeit. Aufgrund dieses literaturbekannten Nachteils<sup>[53]</sup> wurden alle Veresterungen mit  $BF_3 \cdot MeOH$  durchgeführt.

Zur Anreicherung von Fluorbenzoesäuren aus komplexen, wässrigen Probenmatrizes wie Grund- oder Ölförderwasser ist die richtige Wahl des SPE-Materials und die richtige Konditionierung des Probe und Kartusche von entscheidender Bedeutung. GALDIGA beschreibt die Verwendung eines hydroxylierten PS-DVB-Copolymers (Isolute ENV+), welches bei einem pH-Wert der Probe von 1.5 die besten Ergebnisse zeigt<sup>[47]</sup>. Durch ein Screening von fünf unterschiedlichen SPE-Materialien bei sechs verschiedenen pH-Werten der Probenmatrix konnte gezeigt werden, dass das von GALDIGA beschriebene Material bei pH 1.5 und ein weiteres, bisher zu diesem Zweck nicht verwendetes Copolymer aus Divinylbenzol und N-Pyrrolidon (Oasis HLB) bei pH 3.4 für die selektive Anreicherung von FBAs sehr gut geeignet ist (vgl. Abbildung 4.2).

Beide Materialien zeigten sich hinsichtlich ihrer Selektivität als äquivalent. Da die Oasis HLB-Kartuschen mit einem höheren Polymergehalt (200, 225 und 500 mg pro Kartusche)



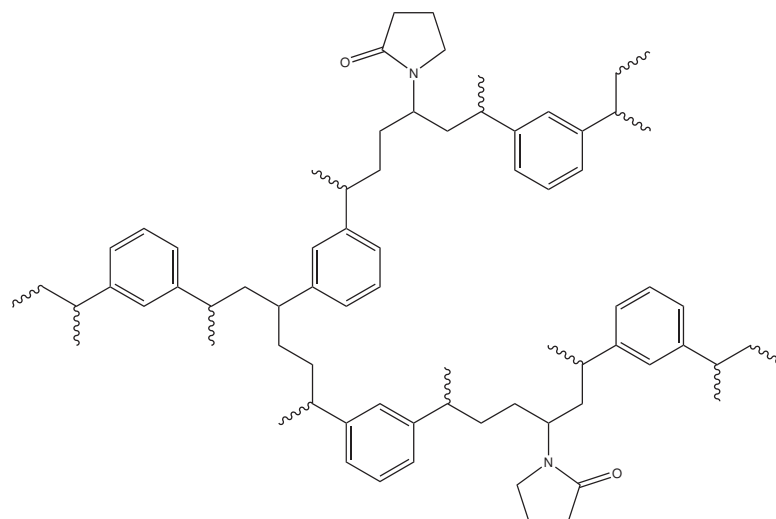


Abb. 4.2: Struktur des verwendeten Polymers der Festphasenextraktion.

erhältlich, und die Anreicherung bei höherem pH-Wert möglich ist, wurden alle weiteren Anreicherungen mit diesem Kartuschentyp durchgeführt. Bei Verwendung von 100 mL Probe und einem Extraktionsvolumen von 400  $\mu$ L Hexan nach der Veresterungsreaktion ergibt sich ein theoretischer Anreicherungsfaktor von 250. Um die Leistungsfähigkeit der Extraktion zu bestimmen, wurden für 21 FBAs die Anreicherungs-effizienz aus 100 mL Leitungswasser bestimmt. Für die Extraktion aus 100 mL Leitungswasser mit einem FBA-Gehalt von 1  $\mu$ g/L ( $n=3$ ) wurden Extraktionseffizienzen zwischen 71% (2,5-DFBA) und 94 % (3-FBA) bei Standardabweichungen von 3,0 % (2,3-DFBA) bis 8,6 % (3,5-DFBA) erhalten. Da die Extraktionseffizienz neben der SPE auch die Veresterungsrate und die flüssig-flüssig-Extraktion einschließt, sind für die reine SPE etwas bessere Werte zu erwarten (vgl. hierzu Abschnitt 4.2.1).

Die Trennung der FBAMEs erfolgte auf einer Kapillarsäule mit einer Funktionalisierung bestehend aus 50 % Polydimethylsiloxan und 50 % Polydiphenylsiloxan und einem Temperaturgradient. Abbildung 4.3 zeigt die Trennung anhand der jeweiligen Massenspuren durch die verwendete SIM-Methode. Eine vollständige Trennung auf einer reinen Polydimethylsiloxanphase gelang nicht, da die Trennphase vermutlich zu hydrophob ist und ebenfalls  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen ausgeschlossen sind.

Bei der Elektronenstoßionisation zeigte sich für alle FBAMEs die Fragmentierungsreaktion wie in Abbildung 1.3 dargestellt. Die Häufigkeitsverteilung der Massenfragmente zeigte die stärkste Bildung des  $[M - OCH_3]^+$ - Fragmentes gefolgt vom  $[M - CO_2CH_3]^+$ - Fragment (vgl. Abbildung 4.3).

Für die entwickelte Trennmethode ergab sich für 21 FBAs bei einer 250fachen Anreicherung eine mittlere Nachweisgrenze von 19 ng/L mit einer Varianz zwischen 6 ng/L für

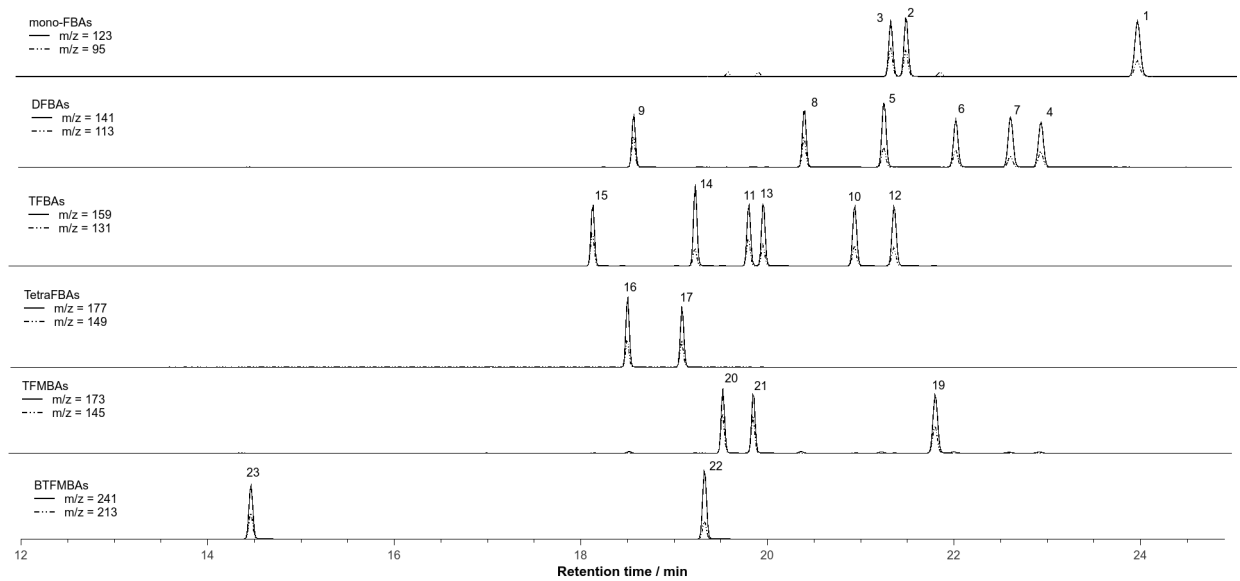


Abb. 4.3: SIM-Chromatogramm zur Trennung von 22 Fluorbenzoesäuremethylestern (FBAMEs, 1 mg/L in Acetonitril) nach Veresterung durch  $\text{MeI}/\text{K}_2\text{CO}_3$  auf einer Zorbax ZB-50 Säule. Es ist das Masse-Ladung-Verhältnis als Funktion der Retentionszeit dargestellt (Nummerierung entsprechend Tabelle 6.1).

3-TFMBA und 44 ng/L für 2,5-DFBA (Signal-zu-Rausch-Verhältnis=3,  $n=2$ , 50 ng/L in Leitungswasser).

#### 4.1.2 Erklärung der Eigenleistung

Alle präsentierten Arbeiten zur Festphasenextraktion, Veresterung der Fluorbenzoesäuren, Trennung und massenspektrometrischen Detektion wurden von mir ausgeführt.

In dieser Veröffentlichung sind Ergebnisse verarbeitet, die bereits Teil meiner Diplomarbeit waren und demzufolge nicht für die Dissertation herangezogen werden dürfen. Dabei handelt es sich um die Festphasenextraktion mittels Oasis HLB, die Trennung auf einer Varian VF17-ms Trennsäule und massenspektrometrische Detektion mittels EI-MS.

Der Hauptteil der Arbeit wurde von mir im Rahmen meiner Promotion angefertigt. Dabei handelt es sich explizit um die Veresterung der Fluorbenzoesäuren mittels  $\text{BF}_3 \cdot \text{MeOH}$  und die zugehörige Aufarbeitung per flüssig-flüssig-Extraktion, die Optimierung der Trennung der Fluorbenzoesäuren auf der Zorbax ZB-50 Trennsäule, die Extraktion der Fluorbenzoesäuren aus Reservoirwasserproben, die Bestimmung der Anreicherungs-effizienz, Wiederfindungsraten, Nachweisgrenzen und der Standardabweichungen der Methode.

## 4.2 Trennung und Nachweis von Fluorbenzoesäuren mittels Ionenchromatographie-Elektrospray Massenspektrometrie

Der Inhalt dieses Kapitels wurde veröffentlicht in:

Karsten Müller, Andreas Seubert, „*Separation and determination of fluorobenzoic acids using ion chromatography – electrospray mass spectrometry*“, *Journal of Chromatography A*, **2012**, 1270, 96-103.

doi: 10.1016/j.chroma.2012.10.046

### 4.2.1 Zusammenfassung und Diskussion

In diesem Kapitel wird die Trennung von Fluorbenzoesäuren mittels Ionenaustauschchromatographie (IC) und ihr Nachweis mittels Elektrosprayionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS) beschrieben.

Da Fluorbenzoesäuren ab einem pH-Wert von 6 (je nach FBA) als organische Anionen vorliegen, ist neben der bereits beschriebenen Trennung per Gaschromatographie auch eine Trennung mittels Anionenaustauschchromatographie möglich. Ihr Vorteil liegt in der direkten Trennung der Säuren durch direkte Injektion entweder der wässrigen Probe bei ausreichend hoher Konzentration, oder des Eluates der SPE und ihre Detektion nach Elektrosprayionisation, ohne dass eine Veresterungsreaktion nötig ist. Es kann also auf mindestens zwei Schritte (Veresterungsreaktion und flüssig-flüssig-Extraktion) in der Probenvorbereitung verzichtet werden. Durch das Vorliegen der Fluorbenzoate bereits vor Beginn der Ionisation ergibt sich zusätzlich ein verbessertes Instrumentennachweislimit, da die Ionenausbeute erhöht ist.

Für die Verbindung von Ionenchromatographie mit massenselektiver Detektion ist die Vermeidung oder Unterdrückung nichtflüchtiger Eluentkomponenten notwendig. Wenn kein leichtflüchtiges Eluent anwendbar ist, findet eine chemische oder elektrochemische Suppression nach der Trennung statt. In dieser Arbeit wurde zur Trennung ein Gemisch aus einer 0,63 mM Natriumcarbonatlösung mit 18 % Acetonitril als organischem Modifier eingesetzt, welches zwischen Trennung und Ionisation mittels chemischer Suppression vom Natriumcarbonat befreit wurde. Die mit der beschriebenen Eluentzusammensetzung erhaltene Trennung auf der favorisierten Trennsäule AS10 (250x4 mm) der Firma Dionex ist in Abbildung 4.6 dargestellt. Die Darstellung der einzelnen Massenspuren befindet sich im Anhang in den Abbildungen 6.1 bis 6.3. Anfängliche Versuche durch Einsatz von

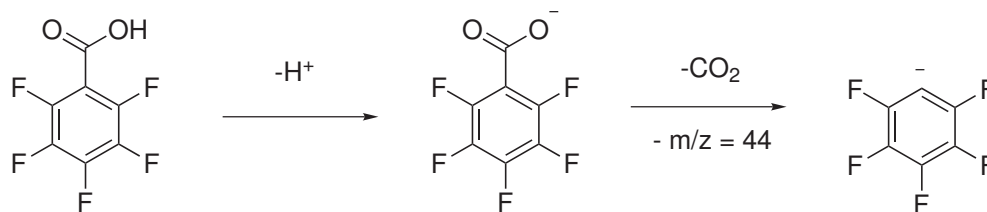


Abb. 4.4: Fragmentierungsreaktion von penta-FBA durch Elektrosprayionisation.

ammoniakalischem Eluent eine Suppression zu umgehen, zeigten zum einen eine zu geringe Elutionswirkung auch bei Konzentrationen über 100 mmol/L und zum anderen aufgrund der hohen Flüchtigkeit des Ammoniak eine schwankende Eluentkonzentration.

Bei der Elektrosprayionisation zeigten die Fluorbenzoesäuren nur ein bedingt einheitliches Verhalten. Es zeigte sich das unter den gewählten Bedingungen je nach Substitutionsmuster eine unterschiedlich stark ausgeprägte Decarboxylierungsreaktion stattfindet. Diese Eigenschaft ist am stärksten bei penta-FBA, 2,6-BTFMBA, 2,3,5,6-TetraFBA, 2,3,4,5-TetraFBA, 2,4,6-TFBA und 2,3,6-TFBA ausgeprägt. In genannten Fällen übersteigt das  $[M - COOH]^-$ -Fragment die Häufigkeit des  $[M - H]^-$ -Fragmentes deutlich bis teilweise vollständig. Im Gegenzug konnte beispielsweise bei allen drei Mono-FBAs das  $[M - COOH]^-$ -Fragment unter den gewählten Bedingungen nicht nachgewiesen werden. Die Tendenz einiger FBAs zur Decarboxylierung läßt sich auf die elektronenziehende Wirkung des Fluors zurückführen und korreliert erwartungsgemäß sehr gut mit der Zahl der Fluoratome und ihrer Nähe zur Säurefunktion. Eine Variation von Kapillar- und Fragmentorspannung konnte kein vollständig einheitliches Ionisationsverhalten herbeiführen. Da aber in jedem Fall mindestens ein Fragmention identifiziert werden konnte, ist ein Nachweis möglich, auch wenn für die Sicherheit der Qualifizierung und bei der Quantifizierung die Möglichkeit der Detektion von mindestens zwei Fragmenten bevorzugt ist.

Neben den intramolekularen Bedingungen für eine Ionisation ist ebenfalls die Sprayzusammensetzung ein einflussreicher Parameter. Während bei der klassischen Ionenchromatographie mit optischer oder Leitfähigkeitsdetektion in der Regel auf organische Modifier verzichtet wird, stellt seine Anwesenheit bei Elektrosprayionisation eine notwendige Bedingung dar. Durch die herabgesetzte Oberflächenspannung wird ein konstantes und deutlich verbessertes Sprayverhalten erreicht. Versuche ohne Modifier zeigten demzufolge keine reproduzierbaren Signalfächen. Ein zu großer Modifizieranteil bewirkt allerdings neben seinem Einfluss auf die Trennung eine geringere Übertragung der Kapillarspannung auf den Eluent und die darin enthaltenen Analyten, was deren Ionisationsgrad verringert. Einen ebenfalls negativen Einfluss auf die Ionisation hat die chemische Suppression. Der durch sie erhaltene suppressierte Eluent weist eine geringe Leitfähigkeit auf, was eben-

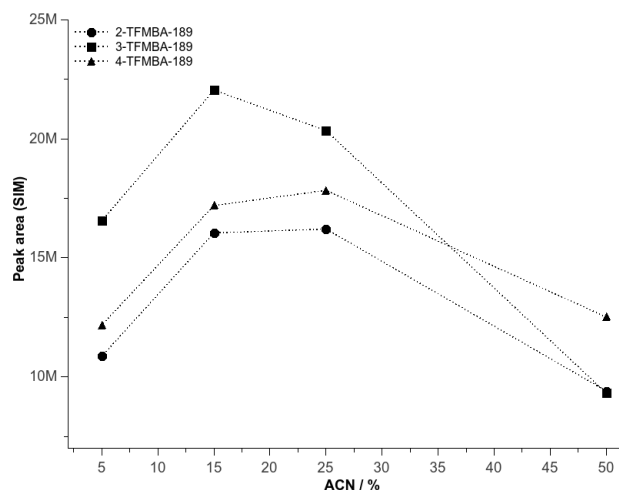


Abb. 4.5: Vergleich der Peakflächen der  $[M - H]^-$ -Fragmente der TFMBAs in Abhängigkeit zum Acetonitrilanteil im Elektrospray.

falls eine verschlechterte Übertragung der Kapillarspannung auf die Analyten und somit eine geringere Ionenausbeute zur Folge hat. Ein Vergleich zwischen den Peakflächen der  $[M - H]^-$ -Fragmente der TFMBAs und dem Acetonitrilanteil (ACN) im Spray ist in Abbildung 4.5 gezeigt. Der Wert der höchsten Ionenausbeute liegt bei 15 %-25 % ACN und hat sich glücklicherweise ebenfalls als optimaler Wert bei der chromatographischen Trennung erwiesen, so daß auf die Zugabe von zusätzlichem Modifier nach der Suppression zur Sprayoptimierung verzichtet werden konnte.

Neben dem Einfluss der Sprayzusammensetzung wurde in FIA-Analysen der Einfluss von Kapillarspannung und Fragmentorspannung untersucht. Aufgrund der leichten Ionisierbarkeit der FBAs wurde bei einer Kapillarspannung von 3250 V ionisiert. Die Werte zur Fragmentorspannung wurde für jede FBA separat ermittelt und in der Messmethode hinterlegt. Ihre Werte liegen im Bereich zwischen 60 und 140 V. Eine Korrelation zur Fragmentmasse ist nicht erkennbar. Es zeigt sich aber, dass eine höhere Spannung nötig ist, wenn die Ladung abgeschirmt ist bzw. aufgrund der elektronenziehenden Natur des Fluors verringert wird. So liegt die optimale Fragmentorspannung für 3,5-BTFMBA bei 95 V und bei 2,6-BTFMBA bei 140 V und bei 2,3,6- und 2,4,6-TFBA bei 80 V und bei 2,3,4-, 2,3,5-, 2,4,5- und 3,4,5-TFBA bei 60 V. Der Einfluss des Substitutionsmuster ist also auch hier erkennbar.

Für die Trennung der Säuren wurden verschiedene Trennsäulendimensionen, -typen und -funktionalisierungen getestet. Prinzipiell hat sich die Verwendung von Trennsäulen des Latex-Typen im Vergleich zu PS-DVB basierten Säulen als bevorzugt herausgestellt. Letztere zeigten vermutlich aufgrund starker  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen zwischen Trägermaterial und Aromaten deutlich höhere Retentionszeiten. Diese Vermutung wird durch einen deutlich

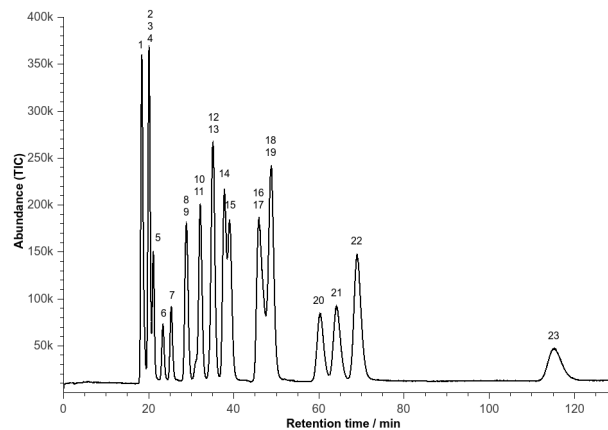


Abb. 4.6: Trennung von 23 Fluorbenzoesäuren mittels isokratischer Anionenaustauschchromatographie und massenselektiver Detektion nach Elektrosprayionisation (TIC, Nummerierung entsprechend Tabelle 6.1, SIM im Anhang).

stärkeren Einfluss des Modifiers gegenüber dem Einfluss der Eluentenkonzentration auf die Retentionszeit verstärkt. Bei Säulen des Latex-Types konnte dieses Verhalten nicht beobachtet werden. Da die PS-DVB basierte Säulen allerdings bei hohem Modifieranteil zum Quellen neigten, überstieg ihr Staudruck bereits bei geringer Erhöhung des Acetonitrilgehaltes (>15 %) die Betriebsmöglichkeiten. Als Folge ist die Unterdrückung von RP-Wechselwirkungen durch eine Erhöhung des Modifieranteils nicht möglich.

Die erreichte Trennung der 23 FBAs mittels Anionenaustauschchromatographie ist in Abbildung 4.6 gezeigt. Die durch die massenselektive Detektion erhaltene zusätzliche Dimension gestattet die Trennung unter isokratischen Bedingungen innerhalb von 120 Minuten, wobei 22 Säuren bereits nach 75 Minuten eluieren. Die zugehörigen Chromatogramme sind in den Abbildungen 6.1, 6.2 und 6.3 im Anhang gezeigt.

Da in der Probenvorbereitung die Abtrennung anorganischer Ionen nicht vollständig erfolgt, wurde ebenfalls untersucht, ob eine Koelution mit den FBAs stattfindet und welche Auswirkungen dies auf die Detektion hat. Abbildung 4.7 zeigt die Überlagerung von Leitfähigkeitsdetektion und massenselektiver Detektion. Hierzu wurde vor der Sprühkammer ein Leitfähigkeitsdetektor in die Messanordnung integriert und die Chromatogramme überlagert. Es zeigte sich, dass drei Anionen (Chlorid, Nitrit und Bromid) mit insgesamt fünf FBAs (2,3,6-TFBA, 2,4,5-TFBA, 2,3-DFBA, 3-FBA und 3,5-BTFMBA) koeluierten.

Durch den Einsatz der Elektrosprayionisation konnten für die zuvor beschriebene SPE Wiederfindungsraten für 22 FBAs bestimmt werden. Bei einer mittleren Wiederfindungsrate von 85 % zeigte 3,5-BTFMBA vermutlich aufgrund seines stark ausgeprägten Dipolmomentes und der damit verbundenen hohen Wasserlöslichkeit mit 28 % die geringste und 2,3,4,5-TetraFBA mit 98 % die höchste Wiederfindung. Ein Vergleich der SPE-Kartuschen Oasis HLB und Isolute ENV+ zeigt bei gleicher mittlerer Wiederfindungsrate eine etwas

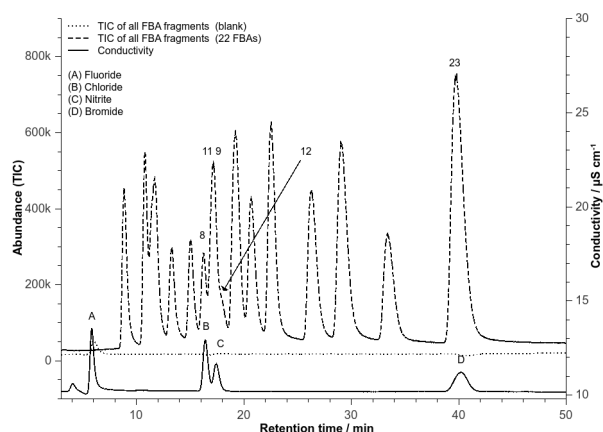


Abb. 4.7: Vergleich zwischen massenselektiver Detektion und Leitfähigkeitdetektion zur Bestimmung des Einflusses anorganischer Ionen (SIM, Nummerierung entsprechend Tabelle 6.1).

geringere mittlere Standardabweichung ( $n=3$ ,  $1 \mu\text{g/L}$  in Leitungswasser) von 2,3 % bei Oasis HLB gegenüber 4,8 % bei Isolute ENV+.

Wird zur Anreicherung der FBAs die bereits beschriebene SPE verwendet, wurde unter Verwendung von 100 mL Probe und einem Elutionsvolumen von 200  $\mu\text{L}$  ein Anreicherungsfaktor von 500 erreicht. Durch den Einsatz einer 2 mm-Trennsäule bei einem Eluentfluss von 0,25 mL/min wurde Nachweisgrenzen in Leitungswasser ( $n=2$ , 500 ng/L,  $\text{SNR}=3$ , Inj. 5  $\mu\text{L}$ ) zwischen 16 ng/L (3,5-BTFMBA) und 210 ng/L (2,5-DFBA) bei einem Mittelwert von 79 ng/L erreicht. Durch die Extraktion größerer Probenmengen oder der Injektion größerer Volumina ist noch eine weitere Verbesserung diese Werte auf einfache Weise möglich.

## 4.2.2 Erklärung der Eigenleistung

Alle präsentierten Arbeiten zur Charakterisierung der SPE, Ionenaustauschchromatographie, Elektrosprayionisation und massenspektrometrischen Detektion der Fluorbenzoesäuren wurden von mir ausgeführt. Die Optimierung der Trennung der Fluorbenzoesäuren hinsichtlich Eluentkonzentration, Modifizieranteil und Temperatur wurde von mir und unter meiner Anleitung durch die Forschungspraktikanten Simone Korstian und Sebastian Krämer durchgeführt.

## 4.3 Synthese von stabilen, deuteriummarkierten Fluorbenzoesäuren als interne Standards in der Isotopenverdünnungsanalyse

Der Inhalt dieses Kapitels wurde veröffentlicht in:

Karsten Müller, Andreas Seubert, „*Synthesis of stable deuterium labeled fluorobenzoic acids to be used as internal standards in isotope dilution mass spectrometry*“, *Isotopes in Environmental and Health Studies*, **2013**.

doi: 10.1080/10256016.2013.830612

### 4.3.1 Zusammenfassung und Diskussion

In diesem Kapitel wird die Synthese von isotopenmarkierten Fluorbenzoesäuren für den Einsatz als interne Standards in der Isotopenverdünnungsanalyse beschrieben.

Wie bereits in Abschnitt 1.3.4 unter Isotopenmarkierung erwähnt, ist eine Isotopenmarkierung an Fluorbenzoesäuren prinzipiell sowohl durch Verwendung von  $^{13}\text{C}$ -Atomen im aromatischen Ring als auch über einen H/D-Austausch der aromatischen Protonen möglich (vgl. Abbildung 4.8). Um eine stabile, schnelle und kostengünstigen Markierung zu erreichen, wurden H/D-Austauschreaktionen an allen 23 Fluorbenzoesäuren durchgeführt. Aufgrund der hohen thermischen und chemischen Stabilität der Säuren und ihrer Löslichkeit in konzentrierter Schwefelsäure bietet sich ein Austausch der aromatischen Wasserstoffatome mittels elektrophiler aromatischer Substitution direkt in der konzentrierten Säure an. Das hat den Vorteil, dass auf den Einsatz von Katalysatoren verzichtet werden kann und sich durch den hohen Siedepunkt der Schwefelsäure (ca. 330 °C) ein großer Temperaturbereich für die Synthese ergibt. Darüber hinaus ist Deuterioschwefelsäure als Isotopenquelle in hoher Reinheit, mit hohem Isotopengehalt, preisgünstig und in großer Menge verfügbar. Die Austauschreaktion wurde je nach Fluorbenzoesäuren optimiert, um bei entsprechender Temperatur in möglichst kurzer Zeit die höchstmögliche Ausbeute einer deuterierten Variante der FBA zu erhalten. Prinzipiell ist ein quantitativer Austausch aller Wasserstoffatome gewünscht. Durch den Einsatz der Fließinjektionsanalyse in Kombination mit ESI-MS kann der Reaktionsfortschritt sehr einfach verfolgt und eine Optimierung der Reaktionstemperatur und -zeit durchgeführt werden. Für die Synthese wurden von der FBA 100 mg in 1,5 mL  $D_2SO_4$  gelöst und die Lösung in Ölbad, Trockenschrank oder Synthesemikrowelle erhitzt. Nach 5 Minuten (2-FBA) bis 180 Minuten (2,3,4-TFBA) wurde das Reaktionsgemisch mit 5 mL Reinstwasser versetzt und drei mal mit je 5 mL Diethylether extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurde über Natriumsulfat



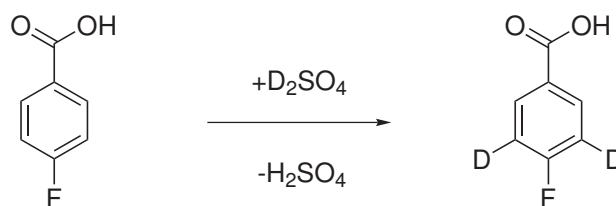


Abb. 4.8: H/D-Austauschreaktion zur Isotopenmarkierung von Fluorbenzoesäuren am Beispiel von 4-FBA.

getrocknet und anschließend bis zur Trockene eingengt. Die dFBA wurden als weißer, kristalliner Feststoff erhalten und ohne weitere Aufreinigung in der MSIVA eingesetzt. Werden weitere Austauschzyklen durchgeführt, kann ein Deuterierungsgrad bis hin zum vollständig deuterierten Produkt erreicht werden. Von den synthetisierten dFBAs wurden sechs ausgewählt und ihre Eignung als Indikator in der MSIVA bestätigt (vgl. Abschnitt 4.4).

Für den genannten Syntheseweg zeigten sich die Fluorbenzoesäuren Nr. 1-17 aus Tabelle 6.1 zugänglich. Eine Isotopenmarkierung von penta-FBA ist in Ermangelung an aromatischen Wasserstoffatomen auf dem hier beschriebenen Weg nicht möglich. Desweiteren zeigten alle FBAs, die eine Trifluormethylgruppe enthielten, unter den gewählten Bedingungen keinen H/D-Austausch und zusätzlich eine, auch bei geringen Temperaturen schnell und quantitativ ablaufende, Oxidation der  $CF_3$ -Gruppe zur Carbonsäure mit teilweise anschließender Decarboxylierung zur Benzoesäure.

Um die optimalen Synthesebedingungen zu ermitteln, wurde die Austauschreaktion bei verschiedenen Temperaturen (130 °C, 150 °C und 200 °C) durchgeführt und nach bestimmten Zeitintervallen ein Aliquot des Reaktionsgemisches mit Wasser verdünnt und per FIA am ESI-MS gemessen. Der Anteil an der Summe der Peakflächen der jeweiligen Spezies entspricht dem Gehalt der jeweiligen dFBA. Eine graphische Auswertung zum H/D-Austausch der sechs in dieser Arbeit verwendeten FBAs findet sich im Anhang in den Abbildungen 6.6, 6.7 und 6.8.

Für die sechs in dieser Arbeit eingesetzten dFBAs sind die verwendeten Synthesebedingungen und die zugehörigen Ausbeuten nach einfacher Reaktion ohne weitere Aufreinigung in Tabelle 4.1 aufgeführt. Die Bestimmungen der einzelnen Produkte erfolgte mittels FIA-ESI-MS über die Peakflächenverhältnisse. Bei der hohen Verdünnung der dFBAs in wässrigen Proben gestattet der geringe (max. 0,42%) bis teilweise nicht mehr nachweisbare Gehalt an undeuterierter FBA ( $d_0$ ) die zuvor erwähnte, angestrebte Vereinfachung der Berechnung (vgl. Gleichung 1.7).

Da aufgrund der natürlichen Isotopenverteilung ca. 1 % der Kohlenstoffatome ein  $^{13}C$ -Isotop sind und die Kohlenstoffatome im Molekül während der massenselektiven Detektion

Tab. 4.1: Synthesebedingungen zur Darstellung stabiler, deuteriummarkierter Fluorbenzoesäuren und die Ausbeute nach einer einstufigen Austauschreaktion.

Nr.	Säure	Temp. /°C	Zeit /min	Ausbeute / %				
				d0 (m/z)	d1 (m/z)	d2 (m/z)	d3 (m/z)	d4 (m/z)
1	2-FBA	150	5	0,00 (139)	0,54 (140)	96,49 (141)	2,66 (142)	0,30 (143)
2	4-FBA	150	120	0,37 (139)	9,83 (140)	77,24 (141)	11,61 (142)	0,90 (143)
3	2,4-DFBA	150	120	0,42 (157)	9,02 (158)	83,80 (159)	6,10 (160)	
4	3,5-DFBA	150	60	0,10 (157)	9,33 (158)	66,43 (159)	22,49 (160)	
5	2,3,4-TFBA	200	180	0,00 (175)	29,15 (176)	65,67 (177)		
6	2,4,6-TFBA	150	60	0,00 (131)	10,41 (132)	84,01 (133)		

nicht unterscheidbar sind, da das Molekülion detektiert wird, verursacht das natürlich vorkommende  $^{13}\text{C}$ -Isotop bereits durch den Massenshift von +1 ein Isotopenmuster. Wird eine unmarkierte FBA am ESI-MS gemessen, ergeben sich also bereits zwei Signale. Eines für das Molekülion  $[M - H]^-$  welches ausschließlich  $^{12}\text{C}$  enthält mit einer relativen natürlichen Häufigkeit von 100 % und ein weiteres mit einem Massenshift von +1 mit einer relativen Häufigkeit von 7,6 % im Falle der FBAs ohne  $\text{CF}_3$ -Gruppen. Durch die Erhöhung der Kohlenstoffzahl ergibt sich für die TFMBA's eine natürliche relative Häufigkeit des M+1-Signals von 8,7 % und für die BTFMBA's von 9,73 %. Das natürliche Vorkommen des  $^{13}\text{C}$ -Isotop macht also eine Unterscheidung zwischen einer einfach deuterierten FBA und dem Molekül mit M+1 aufgrund des  $^{13}\text{C}$ -Isotop je nach Massenauflösung des MS schwer bis unmöglich. Da aufgrund des Massendefektes des  $^{13}\text{C}$ -Isotops der Massenshift allerdings nicht exakt +1 ist, sondern +1,00336 und der Massenshift verursacht durch den Einbau eines Deuteriumatom mit +1,00627 etwas höher ausfällt, ist eine Unterscheidung anhand der Masse bei hohen Massenaufösungen möglich. Hierzu bedarf es aber aufgrund der geringen Massendifferenz von 0,00291 eines Massenspektrometers mit einer deutlich höheren Massenauflösung (ab 100 000) als im Regelfall in den Laborgeräten zu finden ist (Auflösung eines Quadrupol ca. 1 000 bis 4 000). Diese Anforderung an die Massenauflösung entfällt aber vollständig, sobald durch einen H/D-Austausch zwei oder mehr Deuteriumatome in der FBA ausgetauscht werden. Die natürliche Häufigkeit eines FBA-Moleküls welches gleichzeitig zwei  $^{13}\text{C}$ -Isotope enthält liegt bei maximal 0,6 %. Dieser Gehalt kann mit durchschnittlichen Massenspektrometern (Quadrupol) nur bei sehr hohen Konzentrationen (mehrere hundert bis tausend Milligramm pro Kilogramm) gemessen werden. Da dieser Konzentrationsbereich nicht mehr dem in dieser Arbeit verwendeten Ultraspurenbereich entspricht, kann also von einer unbeeinträchtigten Messung ausgegangen werden. Solange als Indikator in der MSIVA mindestens eine  $d_2$ -FBA eingesetzt wird oder auf ein hochauflösendes Massenspektrometer zurückgegriffen werden kann, ist also die Vereinfachung aus Gleichung 1.6 gestattet. Ist der Einsatz isotoopenmarkierter tetra-FBA's im Rahmen einer MSIVA gewünscht, so ist die Vereinfachung in Gleichung 1.6 nicht möglich, wenn nicht ein hochauflösendes MS zur

Unterscheidung zwischen  $d_1$ -TetraFBA und Tetra- $^{13}C$ -FBA verwendet wird. Dennoch sind die beiden  $d_1$ -TetraFBAs in der MSIVA als Indikator einsetzbar und können auch mit durchschnittlichem Laborequipment bestimmt werden, da natürlich auch eine Berechnung ohne die genannte Vereinfachung möglich ist. Hier ergibt sich die Situation, die bei der Bestimmung von Elementen in der anorganischen MSIVA den Regelfall darstellt.

### 4.3.2 Erklärung der Eigenleistung

Die Entwicklung und Optimierung der Synthese zur Darstellung isotope markierten Fluorbenzoesäuren mittels H/D-Austausch wurde von mir und unter meiner Anleitung von den Forschungspraktikanten Jonathan Tripp und Sven Hiestermann durchgeführt.

## 4.4 Ultraspurenbestimmung von Fluorbenzoesäuren in Reservoirwasser mittels Isotopenverdünnungsanalyse und Gaschromatographie-Massenspektrometrie

Der Inhalt dieses Kapitels wurde zur Veröffentlichung eingereicht.

Müller, K.; Seubert, A., „*Ultra trace determination of fluorobenzoic acids in reservoir water using isotope dilution gas chromatography mass spectrometry*“, **2013**.

### 4.4.1 Zusammenfassung und Diskussion

In diesem Kapitel wird die Trennung isotope markierter Fluorbenzoesäuren mittels Gaschromatographie (GC), ihre Detektion per Elektronenstoßionisations-Massenspektrometrie (EI-MS) und ihre Anwendung in der massenspektrometrischen Isotopenverdünnungsanalyse (MSIVA) beschrieben.

Wie bereits in Kapitel 1.3.4 beschrieben, ist die Grundlage für jede organische Isotopenverdünnungsanalyse die Verwendung isotope markierter Verbindungen. In der vorliegenden Arbeit wurden sechs Fluorbenzoesäuren (vgl. Tabelle 4.2) durch die in Abschnitt 4.3 beschriebene Austauschreaktion isotope markiert und ihre Eignung als Indikator in der Isotopenverdünnungsanalyse zur Ultraspurenbestimmung in komplexen wässrigen Proben bestätigt.

Zum Nachweis mittels MSIVA wurden zunächst Standardlösungen der dFBAs erstellt und mittels inverser MSIVA über die „Approximate Signal Matching Method“<sup>[34]</sup> quantifiziert. Bei dieser Methode wird ein Standard bekannter Konzentration mit der isotope markierten

Tab. 4.2: In dieser Arbeit in einer MSIVA eingesetzte Fluorbenzoesäuren und isoto-  
markierte Fluorbenzoesäuren.

Nr.	Fluorbenzoesäure; Reinheit	Abkürzung	Retentionszeit	$[M - 31]^+$	$[M - 59]^+$
1	2-Fluorbenzoesäure; >98 %	2-FBA	23.93 min	123	95
2	4-Fluorbenzoesäure; >99 %	4-FBA	21.46 min	123	95
3	2,4-Difluorbenzoesäure; 99 %	2,4-DFBA	18.57 min	141	113
4	3,5-Difluorbenzoesäure; >98 %	3,5-DFBA	21.26 min	141	113
5	2,3,4-Trifluorbenzoesäure; >98 %	2,3,4-TFBA	20.98 min	159	131
6	2,4,6-Trifluorbenzoesäure; >98 %	2,4,6-TFBA	19.28 min	159	131
d1	2-Fluorbenzoesäure-d2; >96 %	2-FBA-d2	23.87 min	125	97
d2	4-Fluorbenzoesäure-d2; >77 %	4-FBA-d2	21.42 min	125	97
d3	2,4-Difluorbenzoesäure-d2; >83 %	24-DFBA-d2	18.51 min	143	115
d4	3,5-Difluorbenzoesäure-d2; >66 %	35-DFBA-d2	21.21 min	143	115
d5	2,3,4-Trifluorbenzoesäure-d2; >65 %	234-TFBA-d2	20.94 min	161	133
d6	2,4,6-Trifluorbenzoesäure-d2; >84 %	246-TFBA-d2	19.24 min	161	133

Verbindung versetzt und am MS gemessen (hier mittels FIA-ESI-MS). Durch iteratives Verändern der Mengenverhältnisse wird solange Probe und Indikator gemischt, bis sich für beide Analyten (markiert und unmarkiert) nahezu identische Peakflächen (Toleranz  $\pm 5\%$ ) ergeben. Auf diese Weise kann auf den Gehalt an isoto-  
markierter Substanz, welche für ihr unmarkiertes Pendant die gemessenen Peakfläche liefert, geschlossen werden. Da solange Standard und Indikator gravimetrisch variiert werden, bis  $R_B = 1$  gilt, vereinfacht sich somit Gleichung (1.7) zu:

$$c_x = c_y \cdot \frac{m_y}{m_x} \quad (4.1)$$

Da  $m_y$ ,  $m_x$  (Masse der eingewogenen Lösungen von Standard und Probe) und  $c_y$  (Konzentration der FBA im Standard) bekannt sind, kann  $c_x$  berechnet werden. Die nun in ihrer Konzentration bekannten isoto-  
markierten Standardlösungen können zur Probe gegeben und über das Isotopenverhältnis aus dFBA und FBA und den zuvor eingewogenen Massen der Standardlösungen auf den Gehalt der jeweiligen Fluorbenzoesäure geschlossen werden. Dieses Verfahren bietet die in Abschnitt 1.3.4 genannten Vorteile. Aufgrund der wässrigen Probenmatrix kann eine homogene Durchmischung von Probe und Indikator leicht erreicht werden.

Die in dieser Arbeit synthetisierten und erfolgreich bei einer MSIVA eingesetzten FBAs sind in Tabelle 4.2 aufgeführt.

Um die Eignung der dFBAs in der MSIVA zu bestätigen, wurden äquivalente Konzentrationen der markierten und unmarkierten FBAs in einen 100 mL Messkolben eingewogen, mit einer Realprobe bis zu einer Konzentration von ca. 1  $\mu\text{g/L}$  verdünnt und anschließend mit der o.a. GC-MS Methode simultan angereichert, verestert, getrennt und detektiert. Die erhaltenen Signale nach Zugabe äquivalenter Mengen markierter und unmarkierter FBAs

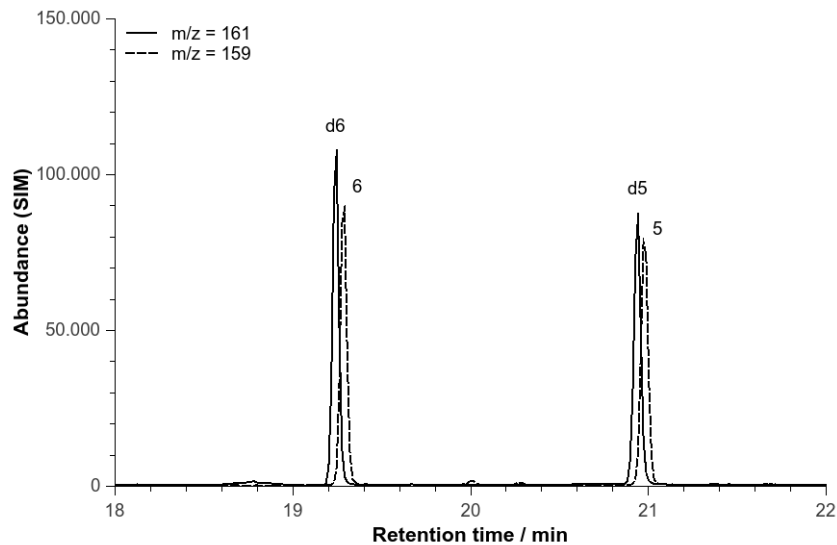


Abb. 4.9: Massenspuren der in dieser Arbeit eingesetzten TFBA's und dTFBA's nach Festphasenextraktion aus 100 mL Grundwasserprobe bei einer Konzentration von 1 µg/L und anschließender Veresterung (Benennung lt. Tabelle 4.2) im Vergleich.

in eine Grundwasserprobe (1 µg/L, 100 mL Probevolumen) am Beispiel der TFBA's zeigt Abbildung 4.9. Die Chromatogramme der monoFBA's und DFBA's zeigen die Abbildungen 6.4 und 6.5 im Anhang. Neben dem erfolgreichen Nachweis aller Spezies mit äquivalenten Signalfächchen zeigt sich durchgängig eine kürzere Retentionszeit bei den markierten FBA's. Prinzipiell verkürzt sich die Retentionszeit stärker, je mehr Deuterium im Molekül enthalten ist. Dieser auf unterschiedlichen Dampfdrücken basierende Deuteriumeffekt ist bekannt und wurde unter anderem 1964 von GRANT am Beispiel isotoopenmarkierter Methanspezies und 1968 durch SCHOMBURG am Beispiel verschiedener Alkane und einfacher Aromaten beschrieben<sup>[54,55]</sup>.

Die abschließend erhaltenen Peakflächenverhältnisse zwischen markierter und unmarkierter FBA zeigen keine Diskriminierung der deuterierten Verbindungen im Verlauf der Methode. Ein Vergleich zwischen bekanntem Gehalt der unmarkierten FBA's und dem ermittelten Gehalt der MSIVA zeigen sich Abweichungen zwischen 4,6 % bei 2,4,6-TFBA und 31,7 % bei 3,5-DFBA. Erneut zeigen die TFBA's die besten Ergebnisse und auch 2-FBA weist mit 7,7 % eine nur geringe Abweichung vom wahren Wert auf. Die starke Abweichung bei 4-FBA (126,8 %) ist auf die Realprobe zurückzuführen. Sie enthielt bereits 4-FBA aus einer Tracer-Studie und kann daher für eine Beurteilung von 4-FBA-d2 nicht herangezogen werden.

Insgesamt konnte in dieser Arbeit erstmals gezeigt werden, dass sich deuterierte FBA's als Indikatoren in einer massenspektrometrischen Isotopenverdünnungsanalyse zur Bestimmung

von FBAs in komplexen wässrigen Proben wie Grund-, Leitungs- und Reservoirwasser eignen.

#### **4.4.2 Erklärung der Eigenleistung**

Alle präsentierten Arbeiten zum Einsatz von isotopenmarkierten Fluorbenzoesäuren in der Isotopenverdünnungsanalyse in komplexen, wässrigen Matrices wurden von mir entwickelt und durchgeführt.

## 5 Ausblick

Für den Nachweis von Fluorbenzoesäuren in wässrigen Probenmatrizes bei komplexer Zusammensetzung stellen die Ergebnisse diese Arbeit eine breite Grundlage bei gleichzeitig großer Flexibilität dar. Die gezeigten Methoden ermöglichen jedem Labor mit einer durchschnittlichen Ausstattung an Analysengeräten mit geringem Arbeits- und Finanzaufwand den sehr empfindlichen Nachweis von FBAs bis in den Ultraspurenbereich durch den Einsatz der Isotopenverdünnungsanalyse.

Um die Leistungsfähigkeit der vorgestellten Methodenteile eingehender zu charakterisieren, sind weitere Untersuchungen möglich. Beispielsweise können die Methoden auf zusätzliche Probenmatrizes ausgedehnt und deren Einfluss auf Anreicherung und Nachweis ermittelt werden. Zur Minimierung von Arbeitsaufwand und Analysekosten bei gleichzeitiger Verbesserung der Reproduzierbarkeit, bietet sich in der Probenvorbereitung die Entwicklung einer Automatisierungslösung an. Durch die hohe Retention der Fluorbenzoesäuren auf PS/DVB-basierten IC-Säulen ist auch eine Erweiterung der SPE denkbar. Um zusätzlich Probenmatrix abzutrennen, wird im ersten Schritt die FBA durch ihre ionischen Eigenschaften auf dem SPE-Material immobilisiert und von ungeladenen Probenbestandteilen befreit um in einem anschließenden zweiten Schritt durch Retention mittels *reversed phase* auf einem PS/DVB-Material von restlichen ionischen Störeinflüssen befreit zu werden. Auf diese Weise könnte die Selektivität der Probenvorbereitung und die Reinheit des Eluates erhöht werden. Auch die Verwendung eines *column-switching* bei dem zunächst die Probe über eine PS/DVB-Säule gespült und anschließend eluiert wird, ist ein denkbare Erweiterung der Methode (vgl. hierzu<sup>[10]</sup>). Sie ist mit geringem Aufwand zu realisieren, automatisierbar, könnte die SPE ersetzen und böte aufgrund der hohen Säulenkapazität die Möglichkeit bei ausreichender Probenmenge einen sehr hohen Anreicherungsfaktor zu erreichen. Durch Einsatz einer weiteren Anreicherungssäule ist darüberhinaus eine Parallelisierung möglich. In diesem Szenario wird eine Anreicherungssäule eluiert und das Eluat chromatographisch getrennt und detektiert, während auf der zweiten Säule der Anreicherungsschritt durchgeführt wird. Neben dem höheren Probendurchsatz ergibt sich eine Verkürzung der Analysenzeit. Zur weiteren Verkürzung der Analysenzeit in der Ionenchromatographie ist es denkbar einen Eluentgradienten zu verwenden. Die in dieser Arbeit verwendete Dionex-Säule zeigte eine schnelle Anpassung an eine Veränderung sowohl

des Modifizieranteils als auch der Eluentenkonzentration. So ist je nach Einfluss auf das Elektrospray auch die Verwendung eines Gradienten denkbar. Darüberhinaus könnte durch Zugabe des Natriumsalzes einer organischen Säure wie beispielsweise Natriumacetat oder Natriumformiat die Leitfähigkeit des Eluenten nach der chemischen Suppression erhöht werden, ohne dass ein Feststoff in die Sprühkammer eingetragen wird. Die Acetation hat auf den Retentionsmechanismus in der Ionenchromatographie nur geringfügige Auswirkungen, bewirkt aber nach der chemischen Suppression die Bildung von Essigsäure, welche durch Erhöhung der Leitfähigkeit des Elektrosprays eine Verbesserung in der Ionisation der FBAs nach sich zieht. Eine Erhöhung der Empfindlichkeit und die Verbesserung der Nachweisgrenzen wären somit möglich.

Ebenfalls steht noch die Überprüfung der Trennleistung der AS10 in der Dimension 250 mm x 2 mm aus und ein Vergleich der hier gezeigten isokratischen Elution mit einer zu entwickelnden Gradientenmethode. Der kleinere Säulendurchmesser erlaubt bei geringerer Flussrate (0,2 ml/min statt 1 ml/min) eine deutlich bessere Spraybildung in der Sprühkammer und eine damit einhergehende Verbesserung von Empfindlichkeit und Nachweisgrenze um bis zu drei Größenordnungen. In dieser Arbeit nicht erwähnt und in der Literatur ebenfalls nicht bekannt ist die Trennung von 23 FBAs per RP-HPLC-MS. Aktuelle Trennsäulen zeigen hohe Trennleistungen bei geringem Eluentfluss, was die schnelle Entwicklung einer RP-HPLC-Methode zusätzlich vereinfacht. Erste Vorarbeiten mit einer 150 mm x 2 mm  $C_{18}$ -Trennsäule mit 2  $\mu\text{m}$  Silikapartikel und isokratischem, essigsauerm Eluent wurde hierzu bereits durchgeführt und zeigten sehr gute Ergebnisse.

Mit Fokus auf statistische Kennzahlen bietet sich im Nachgang der vorgestellten Arbeiten noch die Möglichkeit, den linearen Bereich und die Varianz der vorgestellten Methoden zu ermitteln. Auch genauere Untersuchungen zur Präzision der MSIVA sind möglich.

Bei der Isotopenverdünnungsanalyse bieten sich weitere Untersuchungen mit unterschiedlichen Probenmatrizes und der Vergleich hinsichtlich Empfindlichkeit, Präzision und Linearität mit herkömmlichen Kalibrationsmethoden (externe Kalibration, Standardaddition) an. Die Übertragung der MSIVA auf die IC-MS Methode oder eine RP-LC-MS-Methode und der Einfluss der Probenmatrix auf Trennung, Empfindlichkeit, Nachweisgrenzen und Ionisation sind weitere Forschungsbereiche.

Zur Synthese isotopenmarkierter Standards bietet sich eine weitere Verbesserung der Ausbeuten durch wiederholten Austausch an. Auch die Durchführung der Reaktion in einer Synthesemikrowelle könnte eine Verbesserung der Ausbeuten oder die Verkürzung der Syntheszeit bewirken. Desweiteren kann durch zeitaufgelöste  $^1\text{H}$ -NMR und auch  $^2\text{H}$ -NMR bei hohen Temperaturen die Regioselektivität des H/D-Austausches aufgeklärt werden. Erste Vorarbeiten zur Mikrowellensynthese und der Reaktionsaufklärung per  $^1\text{H}$ -NMR wurde hierzu bereits durchgeführt. Aufgrund der Oxidation der Trifluormethylgruppen



ist der in dieser Arbeit gezeigte Syntheseweg für die Isotopenmarkierung von TFMBAs und BTFMBAs per H/D-Austausch nicht geeignet. Versuche, die Schwefelsäure durch Verdünnung mit ionischen Flüssigkeiten in ihrem Redoxpotential zu mindern, zeigten, dass bei einer Verdünnung um den Faktor 10 keine Oxidation der Trifluormethylgruppen bei Temperaturen bis 150°C eintritt. Bei den hierzu durchgeführten Vorarbeiten ergab sich, dass die verwendete ionische Flüssigkeit [EMIM][TFSI] selbst einen H/D-Austausch eingeht. Der Einsatz von deuteriertem [EMIM][TFSI] als Lösungsmittel in einer H/D-Austauschreaktion zur Isotopenmarkierung von TFMBAs und BTFMBAs stellt also einen weiteren, vielversprechenden Ausgangspunkt zukünftiger Arbeiten dar.

## 6 Anhang

Tab. 6.1: Namen, Reinheiten, Abkürzungen und CAS-Nummern der verwendeten Fluorbenzoesäuren.

Nr.	Fluorbenzoesäure; Reinheit	Abk.	CAS-Nr.
1	2-Fluorbenzoesäure; >98%	2-FBA	[445-29-4]
2	3-Fluorbenzoesäure; 97%	3-FBA	[455-38-9]
3	4-Fluorbenzoesäure; >99%	4-FBA	[456-22-4]
4	2,3-Difluorbenzoesäure; >97%	2,3-DFBA	[4519-39-5]
5	2,4-Difluorbenzoesäure; 99%	2,4-DFBA	[1583-58-0]
6	2,5-Difluorbenzoesäure; 98%	2,5-DFBA	[2991-28-8]
7	2,6-Difluorbenzoesäure; >98%	2,6-DFBA	[385-00-2]
8	3,4-Difluorbenzoesäure; >98%	3,4-DFBA	[455-86-7]
9	3,5-Difluorbenzoesäure; >98%	3,5-DFBA	[455-40-3]
10	2,3,4-Trifluorbenzoesäure; >98%	2,3,4-TFBA	[61079-72-9]
11	2,3,5-Trifluorbenzoesäure; >98%	2,3,5-TFBA	[654-87-5]
12	2,3,6-Trifluorbenzoesäure; >98%	2,3,6-TFBA	[2358-29-4]
13	2,4,5-Trifluorbenzoesäure; >97%	2,4,5-TFBA	[446-17-3]
14	2,4,6-Trifluorbenzoesäure; >98%	2,4,6-TFBA	[28314-80-9]
15	3,4,5-Trifluorbenzoesäure; >98%	3,4,5-TFBA	[121602-93-5]
16	2,3,4,5-Tetrafluorbenzoesäure; >98%	2,3,4,5-TetraFBA	[1201-31-6]
17	2,3,5,6-Tetrafluorbenzoesäure; >97%	2,3,5,6-TetraFBA	[652-18-6]
18	2,3,4,5,6-Pentafluorbenzoesäure; 99%	penta-FBA	[602-94-8]
19	2-Trifluoromethylbenzoesäure; 98%	2-TFMBA	[433-97-6]
20	3-Trifluoromethylbenzoesäure; >98%	3-TFMBA	[454-92-2]
21	4-Trifluoromethylbenzoesäure; 98%	4-TFMBA	[455-24-3]
22	2,6-Bistrifluoromethylbenzoesäure; 98%	2,6-BTFMBA	[24821-22-5]
23	3,5-Bistrifluoromethylbenzoesäure; 98%	3,5-BTFMBA	[725-89-3]

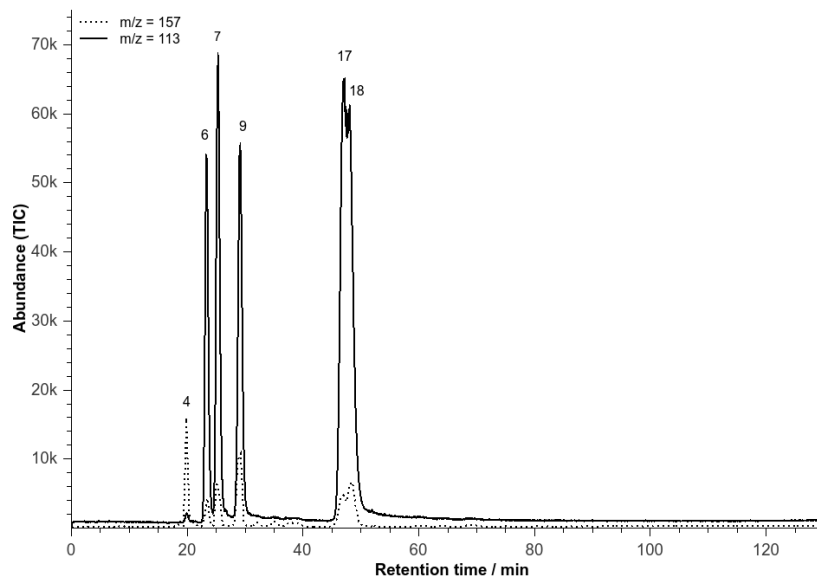
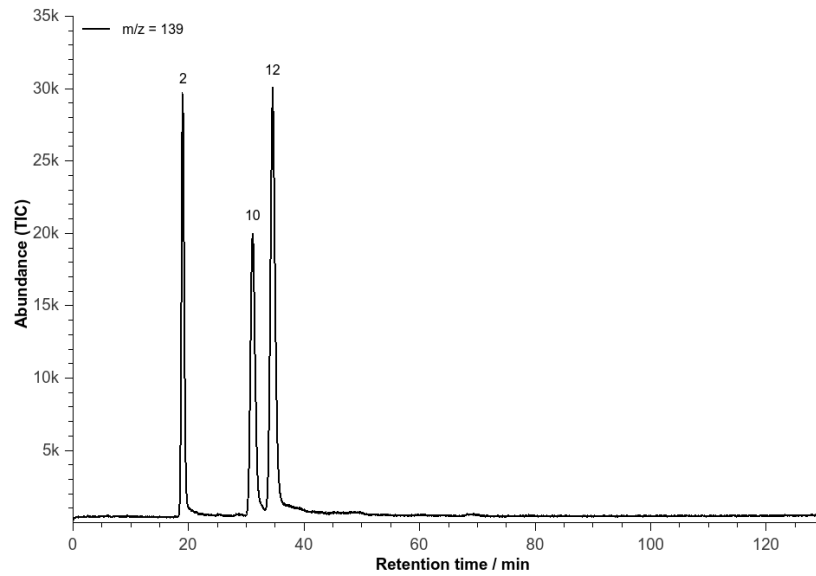


Abb. 6.1: Trennung und Nachweis der Mono-FBAs (oben) und DFBAs (unten) per Anionenaustauschchromatographie und massenselektiver Detektion nach Elektrosprayionisation (Nummerierung entsprechend Tabelle 6.1).

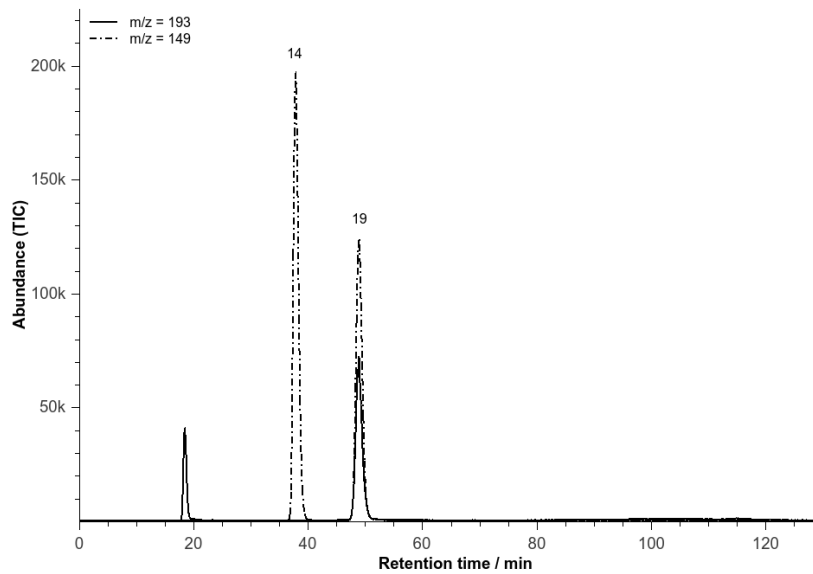
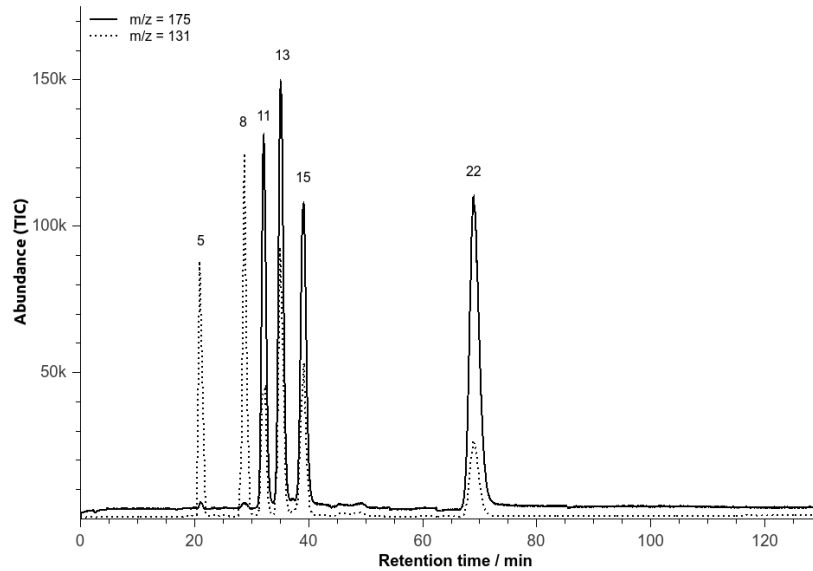


Abb. 6.2: Trennung und Nachweise der TFBA's (oben) und TetraFBA's (unten) per Anionenaustauschchromatographie und massenselektiver Detektion nach Elektrosprayionisation (Nummerierung entsprechend Tabelle 6.1).

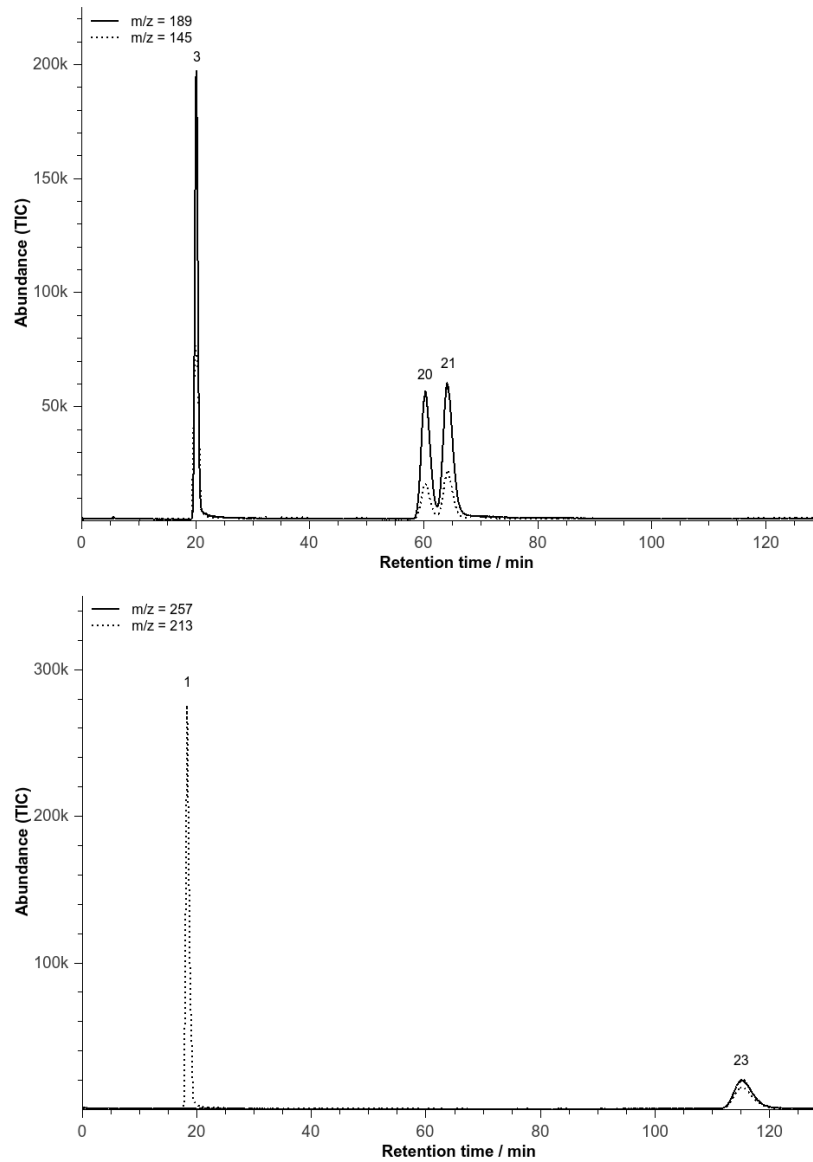


Abb. 6.3: Trennung und Nachweis der TFMBAs (oben) und BTFMBAs (unten) per Anionenaustauschchromatographie und massenselektiver Detektion nach Elektrosprayionisation (Nummerierung entsprechend Tabelle 6.1).

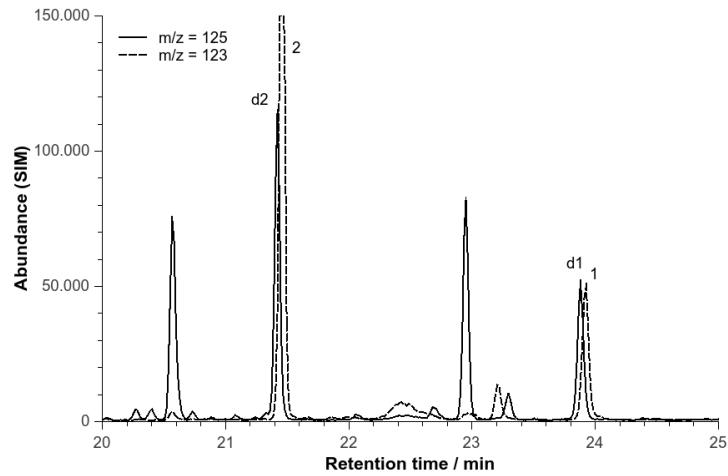


Abb. 6.4: SIM-Chromatogramme der in dieser Arbeit eingesetzten isotonenmarkierten und natürlichen monoFBAs nach Festphasenextraktion aus 100 mL Grundwasserprobe bei einer Konzentration von 1  $\mu\text{g/L}$  und anschließender Veresterung (Benennung lt. Tabelle 4.2).

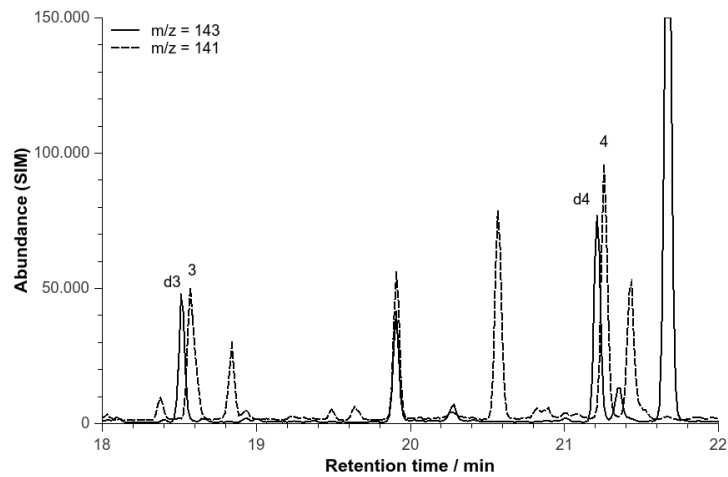


Abb. 6.5: SIM-Chromatogramme der in dieser Arbeit eingesetzten DFBA und dDFBA nach Festphasenextraktion aus 100 mL Grundwasserprobe bei einer Konzentration von 1  $\mu\text{g/L}$  und anschließender Veresterung (Benennung lt. Tabelle 4.2).

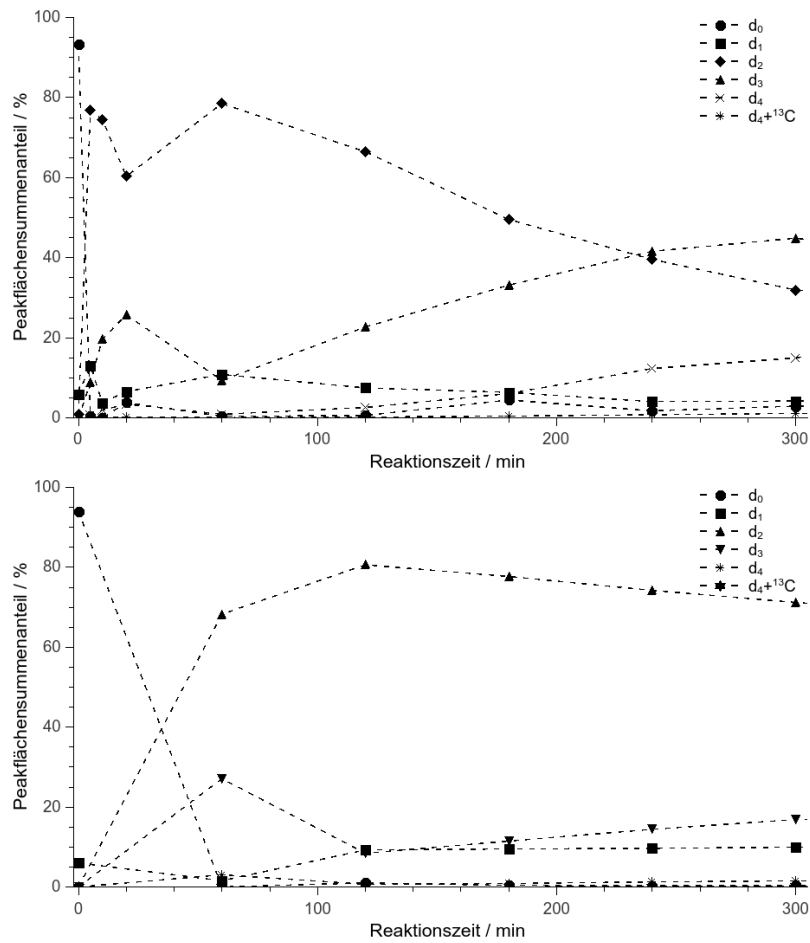


Abb. 6.6: Anteil der isotopenmarkierten Spezies in Abhängigkeit zur Reaktionszeit bei einem H/D-Austausch von 2-FBA (oben) und 4-FBA (unten) in  $D_2SO_4$  bei 150 °C im Ölbad.

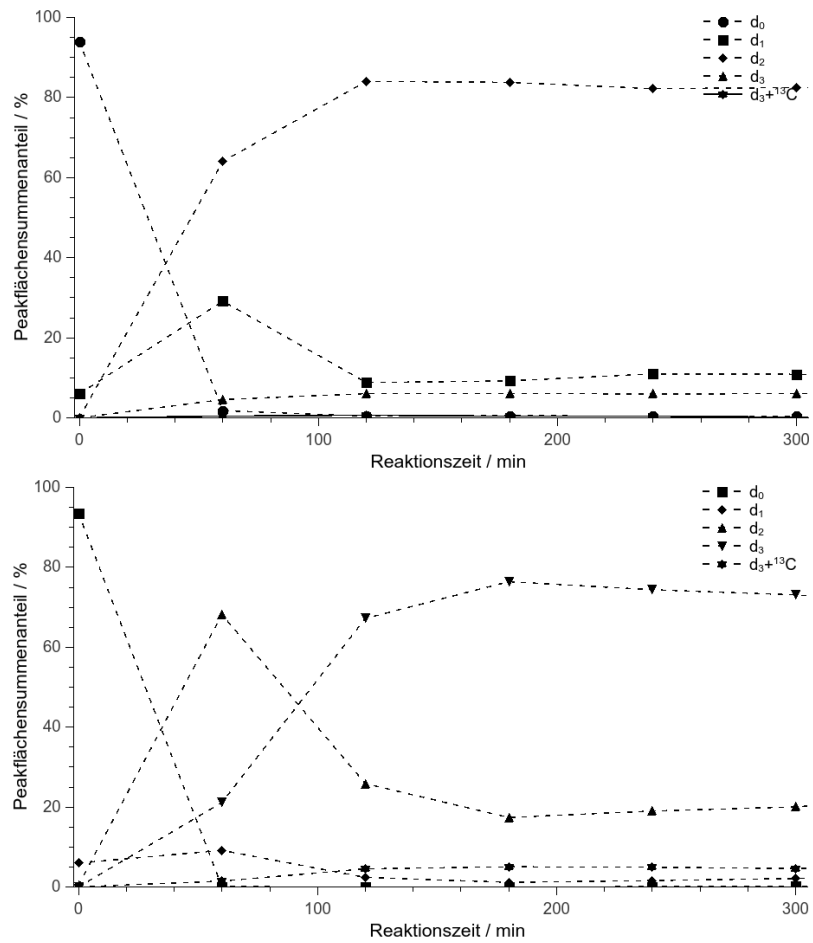


Abb. 6.7: Anteil der isotopenmarkierten Spezies in Abhängigkeit zur Reaktionszeit bei einem H/D-Austausch von 2,4-DFBA (oben) und 3,5-DFBA (unten) in  $D_2SO_4$  bei 150 °C im Ölbad.



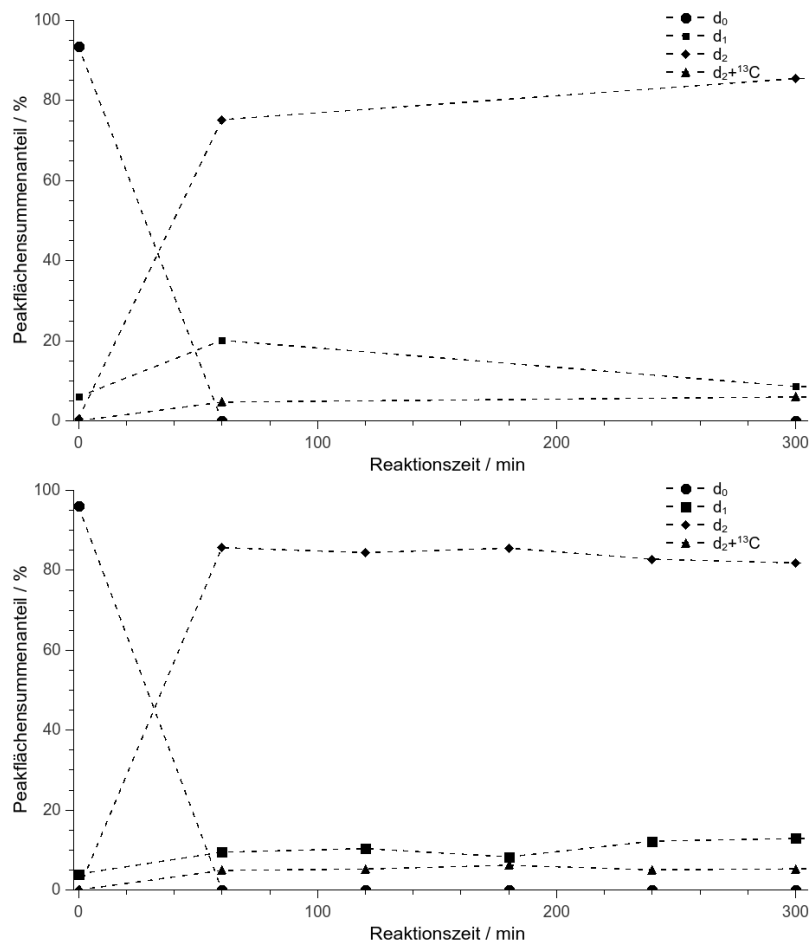


Abb. 6.8: Anteil der isotopenmarkierten Spezies in Abhängigkeit zur Reaktionszeit bei einem H/D-Austausch von 2,3,4-TFBA (oben) bei 200°C und 2,4,6-TFBA (unten) bei 150 °C in  $D_2SO_4$  im Ölbad.

## 7 Danksagung

Prof. Dr. Andreas Seubert danke ich herzlich für die Überlassung des Themas sowie die freundliche und konstruktive Unterstützung beim Zustandekommen der Ergebnisse für diese Arbeit.

Für die freundliche Übernahme des Koreferates danke ich Prof. Dr. Ulrich Tallarek.

Den Mitgliedern der Arbeitskreises Seubert danke ich sehr für das freundschaftliche Arbeitsklima, die stets offenen Ohren und die beispiellose Hilfsbereitschaft in allen Situationen.

Meinen Vertiefungsstudenten Sylvia Mrugalla, Jonathan Tripp, Tibor Müllner, Simone Korstian, Sebastian Krämer und Sven Hiestermann danke ich für das Engagement und ihre Beiträge zu dieser Arbeit.

Den Serviceabteilungen Massenspektrometrie und Kernresonanzspektroskopie und der Elektronikwerkstatt danke ich für ihren außergewöhnlichen Einsatz im Zusammenhang mit meinen ungewöhnlichen Anfragen.

Der Hans-Böckler-Stiftung möchte ich meinen besonderen Dank aussprechen. Ohne die ideelle und finanzielle Unterstützung durch die Stiftung und die sehr gute persönliche Betreuung durch Irmgard Kucharzewski und Dagmar Jans wäre mir die Promotion nicht möglich gewesen.

Linus Torvalds, Richard Stallman, Mark Shuttleworth, Donald E. Knuth, Leslie Lamport, Matthias Ettrich und den unzähligen Open-Source-Entwicklern und Verfechtern danke ich herzlich für ihre Arbeit und ihr Engagement.

Der wohl größte Dank gilt meiner Freundin Julia, meinen Eltern, meinem Bruder Bastian und meinen Freunden für ihre Unterstützung während meiner Promotion - ohne Euch hätte ich es nicht geschafft.

## 8 Literaturverzeichnis

- [1] <http://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Erd%C3%B6lgewinnung&oldid=110272972>, Abrufdatum 10.11.2012.
- [2] P. Mann; Emerging trends from 69 giant oil and gas fields discovered from 2000-2006; In *Jahrestreffen der American Association of Petroleum Geologists*, 2007.
- [3] O. Dugstad, *SPE-56427*, **2000**.
- [4] K. J. Stetzenbach, S. L. Jensen, M. G. Thompson, *Env Sci Tech*, **1982**, *16*, 250–254.
- [5] C. Galdiga, T. Greibrokk, *J Chromatogr*, **1998**, *793*, 297–306.
- [6] S. Wohnlich, *Grundwasser*, **1997**, *2*, 59.
- [7] O. Dahan, Z. Ronen, *Ground Water*, **2001**, *39*, 366–370.
- [8] R. Juhler, A. P. Mortensen, *J Chromatogr*, **2002**, *957*, 11–16.
- [9] Th. Gieles, H.-C. Beuthan, *Erdgas Erdöl Kohle*, **2004**, *120*, 26–29.
- [10] K.J. Stetzenbach, S.L. Jensen, G.M. Thompson, *Environ. Sci. Technol.*, **1982**, *16*, 250.
- [11] R.S. Bowman, *Soil Sci. Soc. Am. J.*, **1984**, *48(5) Sep*, 987.
- [12] R.J. Pearson, W.P. Inskeep, *Soil Sci. Soc. Am. J.*, **1992**, *56*, 1794.
- [13] C.F. Benson, R. S. Bowman, *Soil Sci. Soc. Am. J.*, **1994**, *58*, 1123.
- [14] D. B. Jaynes, *Ground Water*, **1994**, *32*, 532.
- [15] R. Juhler, A.P. Mortensen, *J. Chromatogr. A*, **2002**, *957*, 11.
- [16] K. Z. House, D. P. Schrag, C. F. Harvey, K. S. Lackner, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **2006**, *103*, 12291.
- [17] R. E. Carson, Y. Wu, L. Lang, Y. Ma, M. G. Der, P. Herscovitch, W. C. Eckelman, *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, **2002**, *23*, 249.
- [18] H. Pan, H. Zhou, S. Zeng, X. Xu, H. An, H. Jiang, *J. Chromatogr. B*, **2009**, *877*, 1553.

- [19] C. Creaser, L. F. dos Santos, D. G. Lamarca, A. New, J.C. Wolff, *Anal Chim Acta*, **2002**, *454*, 137–145.
- [20] R. S. Bowman, J. Schroeder, R. Bulusu, M. Remmenga, R. Heightman, *J. Env. Quality*, **1997**, *26*, 1292.
- [21] M. Emanuelsson, I. S. Henriques, R. M. Ferreira Jorge, P. Castro, *J Chem Tech Biotech*, **2006**, *81*, 1577–1585.
- [22] F. G. Hidde Boersma, W. McRoberts, S. L. Cobb, C. D. Murphy, *FEMS Microbiol Lett*, **2004**, *237*, 355–361.
- [23] G. W. A. Milne, P. Goldman, J. L. Holtzman, *J. Biol. Chem.*, **1968**, *20*, 5374.
- [24] A. Schreiber, M. Hellwig, E. Dorn, W. Reineke, H.-J. Knackmuss, *Appl. Environ. Microbiol.*, **1980**, *39*, 58.
- [25] M. C. Adams, J. N. Moore, L. G. Fabry, J.-H. Ahn, *Geothermics*, **1992**, *21*, 323 – 339.
- [26] M.C. Adams, J.N. Moore, L.G. Fabry, J.-H. Ahn, *Geothermics*, **1992**, *21(3) June*, 323.
- [27] R.S. Bowman, J.F. Gibbens, *Ground Water*, **1992**, *30(1) Jan*, 8.
- [28] C. E. Mortimer, *Das Basiswissen der Chemie*; Thieme, **2003**.
- [29] Third Edition, Eds., *Handbook of Tables for Organic Compound Identification*; CRC Press, **1987**.
- [30] <http://www.oc.uni-koeln.de/ms-oc/esi.htm>, Abrufdatum: 28.10.2012.
- [31] Tracer techniques in hydrology; Vol. 202, Seiten 1254–1255. International Atomic Energy Agency, 1963.
- [32] P. de Bièvre, *Fresenius J Anal Chem*, **1990**, *337*, 766–771.
- [33] K. G. Heumann, *Analytiker Taschenbuch*; Springer Verlag, Heidelberg, **1990**.
- [34] M. Sargent, C. Harrington, R. Harte, *Guidelines for Achieving High Accuracy in Isotope Dilution Mass Spectrometry (IDMS)*, 1 Auflage; 6 , **2002**.
- [35] K. G. Heumann, *Mass Spectrometry Reviews*, **1992**, *11*, 41–67.
- [36] K. G. Heumann, *Inorganic Mass Spectrometry*; John Wiley & Sons, New York, **1988**.
- [37] M. Woudneh, *J Chromatogr A*, **2006**, *1133*, 293–299.
- [38] S. Jönsson, L. Gustavsson, B. van Bavel, *J Chromatogr A*, **2007**, *1164*, 65–73.
- [39] W. C. Chau, *Chemosphere*, **2008**, *73*, S13–S17.

- [40] U. Kuepper, *J Mass Spectrom*, **2008**, *43*, 1344–1352.
- [41] *Handbook of Chemistry and Physics*; Vol. 84; CRC Press, **2003/04**.
- [42] J. R. Heys, A. Y. L. Shu, S. G. Senderoff, N. M. Phillips, *J Lab Comp Radiopharm*, **1993**, *33*, 431–438.
- [43] K. L. Tuck, H.-W. Tan, P. J. Hayball, *J Lab Comp Radiopharm*, **2000**, *43*, 817–823.
- [44] M. Tanabe, *J Lab Comp Radiopharm*, **1970**, *13*, 30–32.
- [45] D. J. Sardella, *J Lab Comp Radiopharm*, **1979**, *16*, 633–643.
- [46] R.S. Bowman, *J. Chromatogr.*, **1984**, *285*, 467.
- [47] C.U. Galdiga, T. Greibrokk, *J. Chromatogr. A*, **1998**, *793*, 297.
- [48] C. Galdiga, T. Greibrokk, *J Anal Chem*, **1998**, *361*, 797–802.
- [49] O. Dahan, Z. Ronen, *Ground Water*, **2001**, *39*, 366.
- [50] Q. Hu, J.E. Moran, *Hydrol. Process.*, **2005**, *19*, 2671.
- [51] T. Isemura, F. Kitagawa, K. Otsuka, *J. Sep. Sci*, **2009**, *32*, 381.
- [52] C. Serres-Piole, N. Moradi-Tehrani, R. Lobinski, H. Preud'homme, *J. Chromatogr. A*, **2011**, *1218*, 5872.
- [53] R.H. Greeley, *J. Chromatogr. A*, **1974**, *88*, 229.
- [54] P. L. Grant, K. Yang, *J. Am. Chem. Soc.*, **1964**, *86*, 5063.
- [55] G. Schomburg, D. Henneberg, *Chromatographia*, **1968**, *1*, 23.



# Erklärung

Wir sind einverstanden, dass die von Herrn Dipl.-Chem. Karsten Müller verfasste und von Prof. Dr. Andreas Seubert betreute Dissertation mit dem Titel

## ULTRASPURENBESTIMMUNG VON FLUORBENZOESÄUREN IN HOCHSALINEN MATRIZES MITTELS MASSENSPEKTROMETRISCHER ISOTOPENVERDÜNNUNGSANALYSE

dem Vorsitzenden des Promotionsschusses des Fachbereichs Chemie der Philipps-Universität Marburg vorgelegt am . .2013, in einem Exemplar der Universitätsbibliothek (UB) Marburg zur Verfügung gestellt wird. Wir sind insbesondere damit einverstanden, dass die Dissertation

- in die "Marburger Bibliographie" aufgenommen wird;
- von der UB zur Benutzung in der Bibliothek Chemie Marburg bereitgehalten und im Bedarfsfall auch für Fernleihzwecke genutzt wird;
- im Rahmen der urheberrechtlichen Bestimmungen für Kopierzwecke zur Verfügung steht.

<sup>1</sup> Die Dissertation kann sofort nach Abschluss des Promotionsexamens an die UB weitergeleitet werden.

<sup>1</sup> Die Dissertation soll erst nach Ablauf einer Sperrfrist von \_\_\_\_ Monaten an die UB weitergegeben werden.

Marburg, am \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
(Karsten Müller)

\_\_\_\_\_  
(Prof. Dr. Andreas Seubert)

<sup>1</sup> Zutreffendes bitte ankreuzen