

# **Beiträge zur Bestimmung von lokalen Verteilungen ausgewählter toxischer Elemente**

---

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

**genehmigte Dissertation**

von

**Jan Pascal Thieleke, M. Sc.**

geboren am 05.04.1988 in Bergisch Gladbach

**[2017]**

---

Referentin: Prof. Dr. rer. nat. Carla Vogt

Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. Ulrich Giese

Tag der Promotion: 21.03.2017

Suche nicht nach Fehlern, suche nach Lösungen.

*Henry Ford*



In Erinnerung an meinen Bruder

David Ben Thieleke

# Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all jenen bedanken, die mich während der dreijährigen Forschungsarbeit und der Anfertigung dieser Dissertation begleitet und unterstützt haben.

An erster Stelle gilt mein Dank Frau Prof. Dr. Carla Vogt für ihre wissenschaftliche und fachliche Unterstützung während der gesamten Bearbeitungsphase meiner Dissertation sowie die Möglichkeit, in ihrem Arbeitskreis tätig sein und meine Doktorarbeit zu diesem hochinteressanten und spannenden Thema anfertigen zu dürfen. Neben der wertvollen fachlichen Betreuung vor Ort gilt mein Dank auch für die zahlreichen Weiterbildungsmöglichkeiten auf Fachkonferenzen.

Herrn Prof. Dr. Ulrich Giese danke ich für die freundliche Übernahme des Koreferates und des Vorsitzes der Promotionskommission. Außerdem möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Clemens Walther für seine Einsatzbereitschaft zur Übernahme der Funktion des Drittprüfers bedanken.

Weiterhin gilt mein Dank Frau Prof. Dr. Ute Krämer, Frau Dr. Camille Larue, Herrn Prof. Dr. Frank Witte und Frau Marie Rinne für die freundliche Überlassung der in dieser Dissertation untersuchten Proben.

Frau Dr. Anja Dreyer, Herrn Fabian Zimmermann, Frau Marie Schulze und Frau Marie Rinne danke ich für die zahlreichen und unermüdlichen fachlichen Gespräche, Ratschläge und Anmerkungen, die mich auf dem Weg zur fertigen Arbeit immer wieder neue Aspekte und Ansätze entdecken ließen. Auch die vielen nichtwissenschaftlichen und motivierenden Gespräche haben meine Arbeit sehr unterstützt.

Bei den aktuellen und ehemaligen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Arbeitskreises Analytik bedanke ich mich für die entgegengebrachte Kollegialität, Hilfsbereitschaft und die freundliche Zusammenarbeit.

Des Weiteren gilt mein Dank allen Studenten, die Ihre Bachelor- oder Masterarbeiten bzw. Forschungspraktika unter meiner Betreuung angefertigt haben, für die konstruktive und angenehme Zusammenarbeit: Julia Bode, Nicola Boyer, Xi Chen, Jan-Ole Kühn und Anica Weller.

## Danksagung

---

Frau Claudia Schulze danke ich für die Hilfsbereitschaft bei den Messungen an dem Elementaranalysator.

Großer Dank gilt meiner Freundin, Julia Wegelin, für ihre unglaublich hilfreiche Unterstützung und ihr Verständnis bei der Anfertigung dieser Doktorarbeit.

Besonders möchte ich an dieser Stelle herzlichst bei meiner Familie für die unermüdliche Stärkung, Motivation und Unterstützung während der gesamten Bearbeitungsphase dieser Dissertation sowie während des vorangegangenen Studiums bedanken.

Alle, die bisher nicht namentlich genannt wurden und doch zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen haben, können sicher sein, dass auch ihnen meine aufrichtige Dankbarkeit gilt.

Hannover, im April 2017

Jan Pascal Thieleke

# Kurzzusammenfassung

Die orts aufgelöste Analyse von Elementverteilungen in biologischen Proben kann Aufschluss über Aufnahmewege, Anreicherung und deren Verteilung geben und ist daher von großem wissenschaftlichen Interesse. Die LA-ICP-MS ist eine weit verbreitete und leistungsfähige analytische Methode, welche sich für die hochempfindliche Element- und Isotopenanalyse sowie deren Lokalisierung eignet. Jedoch stellt die genaue Quantifizierung von Spurenelementen in Biomaterialien mittels LA-ICP-MS eine Herausforderung dar, da die Probenmatrix Einfluss auf den Prozess der Erzeugung des analytischen Signals nimmt.

Für die Kalibrierung des Massenanteils in Biomaterialien von sowohl toxischen als auch essentiellen Elementen im Spurenbereich mittels LA-ICP-MS sind in der Literatur unterschiedliche Kalibrationsstrategien beschrieben, zum Beispiel interne Standardisierung, externe Kalibrierung, matrixangepasste Standards, Lösung-basierte Isotopenverdünnung und Filmbeschichtung. Die Ergebnisse der Analysen unterscheiden sich in der Genauigkeit der Quantifizierung in Abhängigkeit von dem verwendeten Kalibrierungsverfahren. Weiterhin sind die verschiedenen Kalibrationsstrategien häufig nur für einen Probentyp geeignet. In Folge dessen ist die Analyse von variierenden Proben mit einem hohen Präparationsaufwand verbunden.

Daher wurden im Rahmen dieser Dissertation zwei Kalibrationsstrategien entwickelt und überprüft, mittels derer eine Leistungssteigerung der LA-ICP-MS, durch die die Erhöhung der Richtigkeit bzw. der universellen Einsetzbarkeit für verschiedene biologische Proben erreicht werden konnte. Die matrixunabhängige Kalibrationsstrategie konnte das Potential zur universellen Einsetzbarkeit für eine Vielzahl an verschiedenen kohlenstoffhaltigen Matrices unter Beweis stellen. Weiterhin konnte durch die in dieser Arbeit entwickelte und erstmalig eingesetzte Vorgehensweise der festkörperbasierten Isotopenverdünnungsanalyse die Richtigkeit bei der orts aufgelösten Analyse von Elementverteilungen in biologischen Proben auf  $\approx 97\%$  erhöht, sowie die erweiterte Unsicherheit auf 6 - 10 % reduziert werden. Die Methode der festkörperbasierten Isotopenverdünnungsanalyse mittels LA-ICP-MS ermöglicht die Korrektur von Änderungen in der Ablationsrate, Schwankungen des Messsystems sowie lokaler Variationen der Probenmatrix.

Schlagworte: Laserablation, Isotopenverdünnungsanalyse, Elementverteilung



## Abstract

Elemental analysis with high lateral resolution in biomaterials is important to gain information about biochemical pathways, nutrition status, enrichment or depletion of certain elements in biological samples. The LA-ICP-MS is a frequently used and powerful analytical method that enables spatially resolved, highly sensitive elemental and isotopic analysis. However, the accurate quantification of trace elements in biomaterials via LA-ICP-MS is a challenge, since the sample matrix has an enormous influence on the process of generation of the analytical signal.

Different calibration strategies are published in literature for the calibration of trace metal concentrations in biological samples by LA-ICP-MS, for example internal standardization, external calibration, matrix matched standards, solution based isotope dilution and film coating. The results of quantification differ in the trueness depending on the used calibration method. Furthermore, the different calibration strategies are often limited in their application for one type of sample and the analysis of varying samples is associated with a high preparation effort.

Therefore this work deals with the investigation of two calibration strategies for their capability to enhance the performance of the LA-ICP-MS by means of increasing the trueness and the universal applicability for different biological samples.

The matrix-independent calibration strategy demonstrated the potential for universal applicability for a variety of different carbonaceous matrices. The application of the developed solid-based isotope dilution method resulted in an increase of the trueness ( $\approx 97\%$ ) and a reduction of the expanded uncertainty to 6 - 10 %. The method of solid-based isotope dilution analysis using LA-ICP-MS allows the correction of changes in the ablation rate, fluctuations in the measurement system and local variations of the sample matrix.

Keywords: laser ablation, isotope dilution analysis, elemental mapping



# Inhaltsverzeichnis

Danksagung .....	IV
Kurzzusammenfassung .....	VI
Abstract.....	VII
Inhaltsverzeichnis .....	IX
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
<b>2 Theoretische Grundlagen .....</b>	<b>5</b>
2.1 LA-ICP-MS .....	6
2.1.1 Interferenzen in der LA-ICP-MS .....	12
2.1.2 Mass-Bias-Korrektur .....	13
2.2 Stand der Forschung.....	15
2.2.1 Zertifizierte Referenzmaterialien .....	16
2.2.2 Interne Standardisierung.....	19
2.2.3 Kalibration mit Flüssigstandards.....	21
2.2.4 Gedopte Biomaterialien .....	23
2.2.5 Matrixangepasste Standards .....	25
2.2.6 Matrixunabhängige Kalibrationsstrategie .....	27
2.2.7 Kalibration mit Dünnschichtstandards .....	29
2.2.8 Isotopenverdünnungsanalyse mittels Laserablation.....	31
2.3 Theorie zur Isotopenverdünnungsanalyse mittels ICP-MS .....	35
2.4 Festkörperbasierte Isotopenverdünnungsanalyse.....	40
<b>3 Matrixunabhängige Kalibrationsstrategie .....</b>	<b>47</b>
3.1 Einleitung.....	48
3.2 Präparation der Einzelementstandards.....	52
3.2.1 Einzelementstandards auf Basis synthetischer Polymere .....	52

3.2.2	Matrixangepasste Einzelementstandards .....	57
3.3	Charakterisierung der Einzelementstandards .....	59
3.3.1	Quantifizierung der Elementgehalte .....	59
3.3.2	Homogenitätsbestimmungen der Elementverteilung.....	64
3.4	Überprüfung der matrixunabhängigen Kalibrationsstrategie.....	79
3.5	Unsicherheitsberechnung .....	92
<b>4</b>	<b>Festkörperbasierte Isotopenverdünnungsanalyse von Blei .....</b>	<b>95</b>
4.1	Einleitung.....	96
4.2	Präparation der Schichtsysteme .....	99
4.2.1	Isotopenanreicherung des Einzelementstandards auf Ölbasis .....	99
4.2.2	Anfertigung der Lackmischungen .....	100
4.2.3	Applikation mittels Rakeltechnik.....	104
4.3	Charakterisierung der Schichtsysteme .....	106
4.3.1	Quantifizierung der Elementgehalte .....	106
4.3.2	Schichtdickenbestimmungen.....	108
4.3.3	Homogenitätsbestimmungen der Elementverteilung.....	110
4.3.4	Homogenitätsbestimmung der Isotopenverhältnisse .....	113
4.4	Überprüfung der Methode .....	115
4.4.1	Messung des zertifizierten Referenzmaterials NIST SRM 981 .....	116
4.4.2	Erprobung der Methode.....	118
4.4.3	Messung des zertifizierten Referenzmaterials BAM-H010 .....	122
4.4.4	Unsicherheitsberechnung.....	128
4.5	Anwendungsbeispiel .....	131
<b>5</b>	<b>Festkörperbasierte Isotopenverdünnungsanalyse von Silber .....</b>	<b>137</b>
5.1	Einleitung.....	138
5.2	Präparation der Schichtsysteme .....	142

5.2.1	Isotopenanreicherung des Einzelelementstandards auf Ölbasis .....	142
5.2.2	Anfertigung der Lackmischungen .....	143
5.2.3	Applikation mittels Rakeltechnik .....	147
5.3	Charakterisierung der Schichtsysteme .....	149
5.3.1	Quantifizierung der Elementgehalte .....	149
5.3.2	Schichtdickenbestimmungen .....	153
5.3.3	Homogenitätsbestimmungen .....	155
5.3.4	Homogenitätsbestimmung der Isotopenverhältnisse .....	159
5.4	Überprüfung der Methode .....	160
5.4.1	Messung des zertifizierten Referenzmaterials NIST SRM 978a .....	161
5.4.2	Erprobung der Methode .....	162
5.4.3	Unsicherheitsberechnung .....	166
5.5	Anwendungsbeispiel .....	168
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick .....</b>	<b>175</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>183</b>
<b>8</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>201</b>
8.1	Symbol- und Abkürzungsverzeichnis .....	204
8.2	Abbildungsverzeichnis .....	207
8.3	Tabellenverzeichnis .....	212
8.4	Gleichungsverzeichnis .....	217
	<b>Publikationen und Konferenzbeiträge .....</b>	<b>218</b>
	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>221</b>



# 1

---

## Einleitung

---

Die orts aufgelöste Bestimmung von Verteilungen sowohl toxischer als auch essentieller Spurenelemente in biologischen Proben ist von bedeutendem wissenschaftlichen Interesse. Durch die Lokalisierung und Quantifizierung von Spurenelementen in biologischem Gewebe können wertvolle Informationen über die Aufnahmewege und Anreicherungen von sowohl toxischen als auch essentiellen Spurenelementen sowie deren Verteilung im Gewebe gewonnen werden. Dies ist von Interesse, weil sowohl zu hohe als auch zu niedrige Massenanteile bestimmter Elemente einen negativen Einfluss auf das lokal umliegende Gewebe sowie auch global betrachtet auf den gesamten Organismus ausüben können. Ein zu niedriger Massenanteil von essentiellen Spurenelementen (z. B. Chrom, Cobalt, Eisen und Selen) äußert sich unter anderem in einem verminderten Zellwachstum sowie in weitreichenden bis fatalen Folgen für den gesamten Stoffwechsel des Organismus (KASPER ET AL., 2014). Ein zu hohes Vorkommen einiger Elemente wie Arsen, Blei, Cadmium, Nickel und Quecksilber kann hingegen toxisch wirken. Diese Wirkung äußert sich unter anderem in der Hemmung von am Stoffwechsel des Organismus beteiligten Enzymen und Proteinen. Bei menschlichen und tierischen Organismen zählen auch Schädigungen des Nerven-, Herz-Kreislauf-Systems sowie der Organe zu den durch ein zu hohes Vorkommen toxischer Elemente verursachten negativen Folgen (REICHL ET AL., 2000; LLOBET ET AL., 2003). Weiterhin können einige Spurenelemente als Indikator für Krankheiten oder Mangelerscheinungen fungieren (PATTBERG ET AL., 1999; BOGAERTS ET AL., 2003; BECKER ET AL., 2008; SIEBOLD ET AL., 2012).

Heutzutage stehen verschiedenste analytische Methoden und bildgebende Verfahren für die orts aufgelöste Analyse von Elementverteilungen im Mikrometerbereich zur Verfügung. Hauptsächlich werden röntgenbasierte Verfahren (DELFINO ET AL., 2011; FIGUEROA ET AL., 2013; LEVEQUE ET AL., 2013; WEST ET AL., 2014; HACHMÖLLER ET AL., 2016), wie z. B. die Rasterelektronenmikroskopie mit energiedispersiver Röntgenspektroskopie (REM-EDX) und die Mikro-Röntgenfluoreszenzanalyse ( $\mu$ RFA), sowie massenspektrometrische Verfahren (BECKER, 2010; PASSARELLI ET AL., 2011; MOORE ET AL., 2012; BECKER ET AL., 2014; HARE ET AL., 2015; VICKERMAN ET AL., 2015), wie die Laserablationsmassenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (LA-ICP-MS) und die Sekundärionen-Massenspektrometrie (SIMS), zur orts aufgelösten Analyse eingesetzt. Im Vergleich zwischen den verschiedenen analytischen Methoden und bildgebenden Verfahren verfügt die LA-ICP-MS über einige Vorteile, wie die hochempfindliche Element- und Isotopenanalyse, das Arbeiten unter Atmosphärendruck und im Allgemeinen die relativ schnelle Quantifizierung im Vergleich zu SIMS. Daher wird die



LA-ICP-MS für die orts aufgelöste Analyse von Elementverteilungen in biologischen Proben vergleichsweise häufig eingesetzt.

Allerdings stellt die Quantifizierung der Spurenelementgehalte in Biomaterialien mittels LA-ICP-MS eine große Herausforderung dar, da die Zusammensetzung der Probenmatrix und die daraus resultierenden Matrixeffekte innerhalb weniger Mikrometer signifikant variieren können und so den Prozess bei der Erzeugung des analytischen Signals beeinflussen. Der Einfluss der lokal variierenden Probenmatrix schränkt die Verwendung der ohnehin kommerziell kaum erhältlichen zertifizierten Referenzmaterialien drastisch ein. Aus diesem Grund wurden zahlreiche verschiedene Kalibrationsstrategien, wie unter anderem die interne Standardisierung, die Verwendung von gedopten Biomaterialien und matrixangepassten Standards, sowie die Kalibration mit Flüssigstandards und die Isotopenverdünnungsanalyse mittels Laserablation entwickelt. Dennoch lassen sich nicht alle Matrixeffekte der äußerst vielfältigen zu untersuchenden biologischen Proben korrigieren. Einige Kalibrationsstrategien sind nur für einen Probentyp geeignet oder in der Einsetzbarkeit eingeschränkt, da bestimmte Grundvoraussetzungen in den biologischen Proben nicht gegeben sind. In der Folge unterscheiden sich die Ergebnisse in ihrer Richtigkeit in Abhängigkeit von der gewählten Kalibrationsstrategie. In den meisten Fällen wird für die verschiedenen Quantifizierungsverfahren eine Richtigkeit von 80 - 90 % und eine Unsicherheit von 10 – 15 %, welche auch für andere festkörperspektroskopische Techniken typisch sind, erreicht.

Für bestimmte Anwendungen sind jedoch eine höhere Richtigkeit und geringere Unsicherheit gefordert, etwa wenn vorliegende Grenz- oder Schwellenwerte überwacht, geringe Veränderungen des Analytgehalts untersucht und Quantifizierungs- oder Referenzmaterialien charakterisiert werden sollen. In der Regel werden in solchen Fällen die Proben aufgeschlossen und in Lösung quantifiziert. Die erreichbare Richtigkeit liegt in der Regel bei  $\geq 95\%$ . Der Aufschluss der Proben führt allerdings zu einem vollständigen Informationsverlust der Ortsauflösung. Daher sind Kalibrationsstrategien für die orts aufgelöste Analyse von Elementverteilungen mit einer erhöhten Richtigkeit und verringerten Unsicherheit notwendig. Weiterhin werden Kalibrationsstrategien benötigt, die für eine Vielzahl an verschiedenen biologischen Proben einsetzbar sind, um den Präparationsaufwand der Standards zu verringern und die Ergebnisse verschiedener Studien

vergleichbarer zu machen. In einer Vielzahl an Anwendungen reicht die in der Regel typischerweise erreichbare Richtigkeit und Unsicherheit der LA-ICP-MS für die Analyse aus. Daher werden im Rahmen dieser Arbeit zwei verschiedene Methoden betrachtet.

In Kapitel 2 werden zunächst die notwendigen theoretischen Grundlagen zum Verständnis dieser Arbeit erläutert. Dazu zählen die Methode der LA-ICP-MS sowie der derzeitige Stand der Forschung bezüglich der verschiedenen Kalibrationsstrategien bei der LA-ICP-MS. Weiterhin wird in diesem Kapitel der theoretische Hintergrund der festkörperbasierten Isotopenverdünnungsanalyse beschrieben.

Aus den oben erwähnten Gründen befasst sich die vorliegende Arbeit in Kapitel 3 mit der ausführlichen Validierung einer universell einsetzbaren matrixunabhängigen Kalibrationsstrategie (THIELEKE, 2013). Dazu werden aus verschiedenen kohlenstoffhaltigen Matrices Kalibrationsreihen hergestellt und anhand dieser die Methode auf Richtigkeit und Unsicherheit überprüft. Der Prozess der Validierung umfasst die Charakterisierung der präparierten Standards in Bezug auf die Quantifizierung der Elementgehalte und Homogenitätsbestimmungen der Elementverteilung.

Die Kapitel 4 und 5 befassen sich mit der Entwicklung der festkörperbasierten Isotopenverdünnungsanalyse mittels Laserablation für die Elemente Blei und Silber zur Erhöhung der Richtigkeit und Verringerung der Unsicherheit bei der Quantifizierung mittels LA-ICP-MS. Dazu werden die Präparationsverfahren der polymeren Schichtsysteme und deren Charakterisierung sowie die Isotopenanreicherung beschrieben. Die Charakterisierung der Schichtsysteme umfasst die Quantifizierung der Elementgehalte, die Bestimmung der Schichtdicke sowie die Homogenitätsbestimmungen der Elementverteilung und der Isotopenverhältnisse. Die Validierung der Methode wurde anhand von hausintern präparierten und charakterisierten sowie zertifizierten Referenzmaterialien durchgeführt. Weiterhin werden die Unsicherheitsberechnung und Anwendungsbeispiele dargestellt.

Abschließend werden im Kapitel 6 die Ergebnisse der vorliegenden Dissertation zusammengefasst und ein Ausblick auf weitere Forschungstätigkeiten auf diesem Gebiet gegeben.

# 2

---

## Theoretische Grundlagen

---

Das vorliegende Kapitel befasst sich mit den theoretischen Grundlagen, welche zum Verständnis dieser Arbeit benötigt werden. Im Folgenden wird zunächst der theoretische Hintergrund der LA-ICP-MS erläutert, um die Basis für die folgenden Abschnitte zu legen. Die Grundlagen der Röntgenfluoreszenzanalyse (RFA), der optischen Emissionsspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-OES) sowie der Rasterelektronenmikroskopie (REM) werden als bekannt vorausgesetzt und daher nicht erläutert. Nachfolgend werden der Stand der Forschung skizziert sowie eine kurze Einführung in die Isotopenverdünnungsanalyse gegeben. Weiterhin wird die Methode der festkörperbasierten Isotopenverdünnungsanalyse beschrieben.

### 2.1 LA-ICP-MS

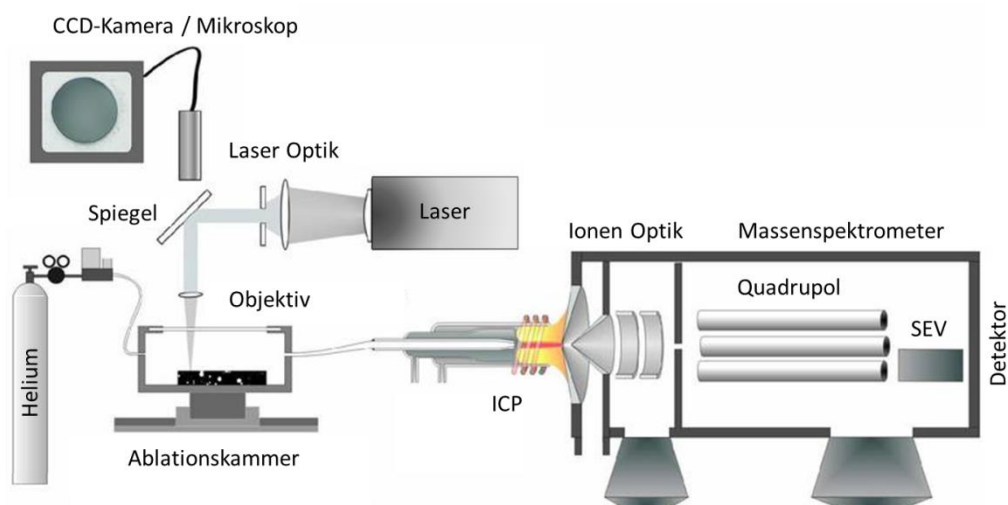
Die Massenspektrometrie stellt eine vielseitige und etablierte Technik in der chemischen Analytik dar. Die Grundlage dieser Technik beruht auf der Trennung von Ionen nach ihrem Masse-Ladungs-Verhältnis ( $m/z$ ) durch verschiedene physikalische Verfahren. Der zugrunde liegende Aufbau eines Massenspektrometers (MS) lässt sich in drei Baugruppen unterteilen. Die erste Baugruppe bildet die Ionenquelle, dort werden die Ionen aus der zugeführten Probe erzeugt. Als zweites Bauelement folgt der Massenanalysator. Die in der Ionenquelle erzeugten Ionen werden im Massenanalysator durch verschiedene Techniken nach den Masse-Ladungs-Verhältnissen getrennt. Die Trennung wird durch das Anlegen von elektrischen und magnetischen Feldern erreicht. Im letzten Bauelement, dem Detektor, werden die getrennten Ionen detektiert (SKOOG ET AL., 1996; CAMMANN, 2001).

Der erste Einsatz eines Massenspektrometers für quantitative Anwendungen wurde bereits im Jahre 1913 von SIR J. J. THOMPSON publiziert. Thompson erkannte den Zusammenhang zwischen Masse, Geschwindigkeit und Bahnradius verschiedener Ionen, als er diese bei seinen Versuchen durch elektromagnetische Felder ablenkte und mittels Fotoplatte detektierte (THOMPSON, 1913). Im Jahre 1922 wurde THOMPSONS Protegé F. W. ASTON für die Entdeckung einer Vielzahl an Isotopen mit dem Nobelpreis für Chemie geehrt (ASTON, 1922). Diese Leistung beruhte auf der Weiterentwicklung des von THOMPSON entwickelten ersten Massenspektrometers, sodass Aston bereits die Massen von 200 der 287 natürlich vorkommenden Isotope bestimmen konnte. 1918 wurde das erste moderne Massenspektrometer durch A. J. DEMPSTER entwickelt. Durch die Verwendung eines Magnetfeld-Ablenkungsgeräts mit Richtungsfokussierung wurde die Genauigkeit bei der

Bestimmung der Masse-Ladungs-Verhältnisse um zwei Größenordnungen erhöht (DEMPSTER, 1918). Auf dem Gebiet der Massenspektrometrie folgte eine Vielzahl an weiteren Entwicklungen, wie Ionisationsmethoden (EI, ICP, CI, ESI, APCI usw.), Kopplungen (LC-MS, GC-MS usw.), Analysatoren (Sektorfeld, Quadrupol, Ionenfallen und TOF), Detektoren (SEV, MCP und Faraday-Auffänger) und Zuführungssysteme für feste, flüssige und gasförmige Proben. Begründet durch diese Innovationen, wurde die Massenspektrometrie zu einer der leistungsfähigsten Techniken sowohl für die Elementanalytik als auch für die Molekülanalytik. Die enorme Leistungsfähigkeit der Massenspektrometrie zeigt sich vor allem in dem hohen Nachweisvermögen, dem großen dynamischen Messbereich und der Fähigkeit für den Multielementnachweis.

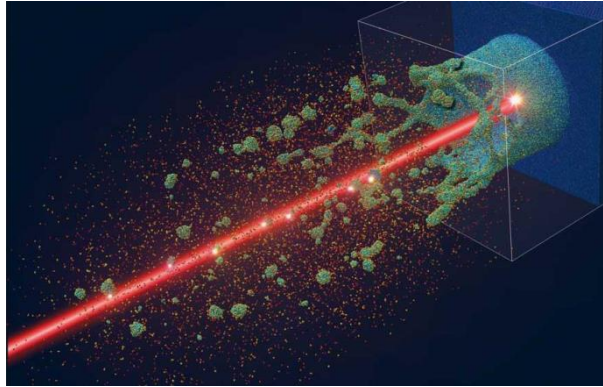
Im Jahre 1985 gelang A. GRAY die erstmalige Kopplung eines Massenspektrometers mit induktiv gekoppeltem Plasma und Laserablation. Damit wurde der Grundstein für die orts aufgelöste Analyse von Feststoffen mittels Massenspektrometern gelegt (GRAY, 1985). Die Einsatzgebiete der LA-ICP-MS bilden seither die qualitative und quantitative Elementanalytik sowie die Isotopenanalytik. Die Anwendungsbereiche der Methode umfassen unter anderem die Geologie zur Bestimmung von Gesteinen, Meteoriten und insbesondere deren Einschlüsse (GEBEL, 2000; HORN ET AL., 2000), die Quantifizierung von lokalen Verunreinigungen in hochreinen Materialien (PATTBERG ET AL., 1999; PICKHARDT ET AL., 2001; CHI ET AL., 2002), die Archäometrie unter anderem zur Klärung der Herkunft historischer Proben (GIUSSANI ET AL., 2009; LEHMANN, 2011) sowie forensische Untersuchungen (WATLING ET AL., 1997; DECONINCK ET AL., 2006). Weiterhin wird die LA-ICP-MS auch für medizinische und biologische Fragestellungen häufig eingesetzt. Die Anwendungen umfassen dort vor allem die Klärung von Krankheiten durch die Lokalisierung und Quantifizierung von Metallen in Gewebeschnitten (BECKER ET AL., 2005; HSIEH ET AL., 2009). Ferner bilden Untersuchungen des Aufnahmeverhaltens von Metallen durch Organismen einen weiteren Anwendungsbereich (BECKER ET AL., 2008; SANTOS ET AL., 2009; GALIOVÁ ET AL., 2013). Die Kopplung der Laserablation mit der ICP-MS erlaubt sensitive und orts aufgelöste Analysen mit einer lateralen Auflösung im  $\mu\text{m}$ -Bereich bei geringem Probenverbrauch. Beim Vorhandensein von geeigneten Referenzmaterialien stellt die geringe Probenvorbereitung einen weiteren Vorteil der Methode dar.

Die schematische Darstellung der Kopplung eines Lasers mit einem Quadrupolmassenspektrometer mit induktiv gekoppeltem Plasma ist in Abb. 2. 1 abgebildet.



**Abb. 2. 1: Schematischer Aufbau der LA-ICP-MS nach GÜNTHER ET AL., 2005.**

Um Kontaminationen der zu analysierenden Probe zu vermeiden, wird die Probe in einer von der Umgebungsluft abgeschlossenen und mit einem Trägergas gespülten Ablationskammer platziert. Auf der Oberseite der Ablationskammer befindet sich ein Fenster aus einem Material, welches bei der Wellenlänge des Laserstrahles diesen nicht absorbiert. Durch dieses Fenster trifft der Laserstrahl auf die Probe. Ein Teil der Photonen des Laserstrahles wird beim Auftreffen des Laserstrahles auf die Probenoberfläche von dem Festkörper absorbiert. Beim Nanosekunden-Laser – wie in dieser Arbeit verwendet – erhitzt sich die Oberfläche der Probe durch Energieübertragung während der Laserpulse und es kann zur Ausbildung eines Plasmas kommen. Die Wärmeleitung in das Volumen des Materials findet im Vergleich zu der Pulsdauer des Lasers relativ langsam statt und es kommt zu einer lokal begrenzten, sehr stark erhitzten Fläche im Mikrometerbereich. Die lokalen sehr hohen Temperaturen von bis zu 10.000 K resultieren in einem schlagartigen Schmelzen und Verdampfen des Probenmaterials. Durch diesen Vorgang werden sowohl feste als auch geschmolzene Partikel von der Oberfläche weggeschleudert (siehe Abb. 2. 2) (BOGAERTS ET AL., 2003). Dieser Prozess ist eine Quelle für Fraktionierungseffekte bei der Laserablation und wird im Englischen als *hydrodynamic sputtering* bezeichnet (HERGENRÖDER, 2006). Die flüchtigen Elemente werden in dem gebildeten Aerosol angereichert und die weniger flüchtigen Elemente in der zurückbleibenden Schmelzschicht aufkonzentriert. Dies hat zur Folge, dass das gebildete Aerosol in der stöchiometrischen Elementzusammensetzung vom ursprünglichen Feststoff abweicht (CROMWELL ET AL., 1995).



**Abb. 2. 2: Teilchenwolken einer simulierten Laserablation an einem Metall nach ITAP, 2010.**

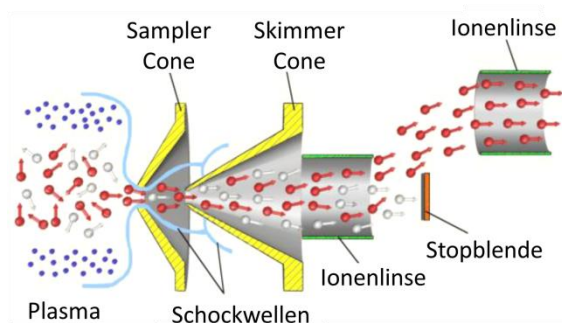
Die bei der Laserablation gebildeten primären Ablationsprodukte erreichen eine Partikelgröße zwischen 1 bis 100 nm. Durch Agglomeration der Kondensationsprodukte erreichen die sekundären Ablationsprodukte, welche das ICP erreichen, eine Partikelgröße von bis zu 10  $\mu\text{m}$  und können unter Umständen daher nicht vollständig atomisiert und ionisiert werden (HOUK ET AL., 1997). Durch die Wahl eines geeigneten Trägergases, wie z. B. Helium mit einer im Vergleich zu Argon höheren Wärmeleitfähigkeit, kann die Größenverteilung der Ablationsprodukte zu einer geringeren Partikelgröße und homogeneren Verteilung hin beeinflusst werden (HORN ET AL., 2003). Durch den geringeren Unterschied in der Partikelgröße wird die Fraktionierung vermindert, da die Ionisierung im ICP wesentlich gleichmäßiger erfolgt. Partikel mit einer Größe  $\leq 0,01 \mu\text{m}$  und  $\geq 1 \mu\text{m}$  werden zusätzlich beim Transport von der Ablationskammer zum Massenspektrometer fraktioniert, da durch Diffusion und Gravitation keine vollständige Überführung stattfindet (HOUK ET AL., 1997). Neben der Ionisierung wird auch die Ablation durch die Menge des gebildeten Aerosols und die Partikelgröße beeinflusst. Durch die Partikel wird der Laserstrahl gestreut und defokussiert. Außerdem wird durch das Plasma auch ein Teil der ablatierten Atome ionisiert und in der Folge der Energieeintrag in die Probe verringert. Im Englischen wird dieser Effekt *plasma shielding* genannt und ist von der Frequenz des Lasers sowie der Flussrate des Trägergases abhängig (TOKAREV ET AL., 1994; HORN ET AL., 2003; POVITSKY, 2007). Dieser Effekt wird bei höheren Schussfrequenzen verstärkt, da der Dampf über der Probe übersättigt (VADILLO ET AL., 1999; ZHANG ET AL., 2005). Weiterhin kommt es bei der Laserablation auch zum Niederschlag von Kondensationsprodukten der ablatierten Partikel in einiger Entfernung zum Ablationsort. Dieses Phänomen wird im Englischen unter dem Begriff *surface resampling* beschrieben (WOODHEAD ET AL., 2007). Bei der nanosekunden (ns) - Laserablation handelt es sich durch die verschiedenen Effekte nicht um einen idealen

Vorgang, sondern zahlreiche Phänomene müssen berücksichtigt werden. Zum Großteil können diese Effekte jedoch durch die Optimierung und Messung bei konstanten Laserparametern minimiert werden. Allerdings können spezifische Effekte der Probenmatrix, wie z. B. Unterschiede im Ablationsverhalten zwischen Standard und Probe, durch die Optimierung der Laser- oder MS-Parameter nicht vollständig überwunden werden. Zwar minimiert der Einsatz von Femtosekunden (fs) -Lasern die Matrixeffekte deutlich, da es bei den zeitlich extrem kurzen Pulsen zu keiner Ausbildung einer Schmelzschicht kommt und das gesamte ablatierte Material weitestgehend ohne Fraktionierung ins Massenspektrometer überführt werden kann (KOCH ET AL., 2004). Dennoch können nicht alle Effekte der Probenmatrix vollständig reduziert werden. Daher muss zur Quantifizierung auf die in Abschnitt 2.2 beschriebenen Kalibrationsstrategien zurückgegriffen werden.

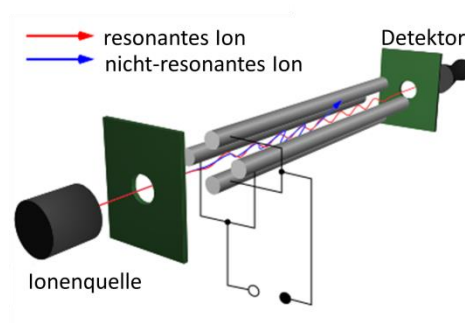
Die durch die Laserablation erzeugten Partikel werden im Trägergasstrom zur Ionenquelle transportiert. Eine geringe und gerade Transportstrecke minimiert ebenfalls Fraktionierungseffekte, da durch die Zentrifugalkraft bedingtes Ausfallen der Partikel durch eine geradlinige Transportstrecke reduziert wird (GARCIA ET AL., 2009). Als Ionenquelle dient in dieser Arbeit ein induktiv gekoppeltes Plasma (ICP), im Englischen *inductively coupled plasma* genannt, welches bei Atmosphärendruck betrieben wird. Die Plasmafackel besteht aus drei konzentrischen Quarzrohren und wird mit Argon betrieben. Der obere Teil der Plasmafackel ist von einer wassergekühlten Induktionsspule umwickelt, welche von einem Hochfrequenzgenerator versorgt wird. Mittels Funken einer Teslaspule wird die Anfangsionisierung des Argongasstroms erreicht. Durch den Funken werden Ionen und die dazugehörenden Elektronen gebildet, welche mit dem fluktuierenden Magnetfeld in Wechselwirkung treten. Durch diese Wechselwirkung nehmen die Ionen und Elektronen Energie auf. Durch Stoßionisation werden lawinenartig weitere Elektronen, Ionen und metastabile Argonatome erzeugt, welche ein ringförmiges Plasma erzeugen. Durch die Induktionsspule werden die Elektronen, Ionen und metastabilen Argonatome auf geschlossene Kreisbahnen gedrängt. Es kommt zu ohmscher Aufheizung, da die einzelnen Teilchen dieser Bewegung einen Widerstand entgegensetzen. Dabei werden Temperaturen von bis zu 10.000 K erreicht. Durch energieübertragende Stöße mit den Plasmateilchen wird das eingeleitete Probenaerosol atomisiert und ionisiert. Durch die Zuleitung von Argon in den Heliumträgergasstrom vor der Plasmafackel können eine Sensitivitätssteigerung und eine stabilere Ionisierungsrate erreicht werden (GÜNTHER ET AL., 1999; HORN ET AL., 2003).



Über das Interface gelangen die erzeugten Ionen von der Ionenquelle in den unter Hochvakuum liegenden Massenanalysator (siehe Abb. 2. 3). Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Massenanalysator handelt es sich um einen Quadrupolmassenfilter, welcher aus zwei Paaren von zylinderförmigen Edelstahlstäben besteht (siehe Abb. 2. 4).



**Abb. 2. 3: Schematische Darstellung des Interfaces am ICP-MS nach LEHMANN, 2011.**

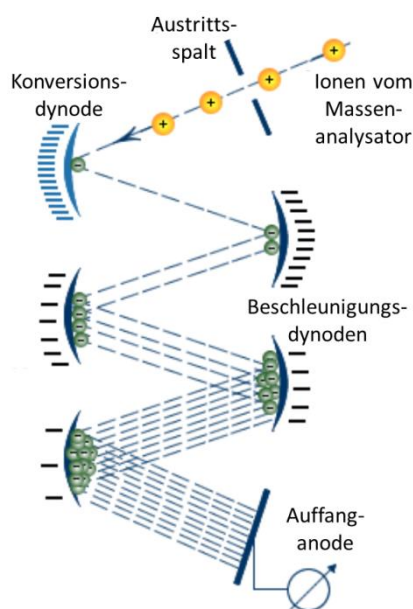


**Abb. 2. 4: Darstellung der Funktionsweise eines Quadrupolmassenfilters nach LP, 2014.**

Jeweils ein Paar der Stäbe weist ein positives und das andere ein negatives Potential auf. Durch die Kombination einer Gleichspannung mit einer überlagerten Wechselspannung mit konstanter Frequenz werden für bestimmte Ionen stabile Spiralbahnen zwischen den Stäben ermöglicht. Über das Verhältnis zwischen Gleich- und Wechselspannung und deren Variation kann bestimmt werden, welche Ionen den Massenfilter durchqueren und detektiert werden können und welche Ionen mit den Stäben kollidieren oder aus dem Quadrupolfeld herausgetragen werden. Dabei werden die angelegten Spannungen so gewählt, dass jeweils nur Ionen mit einem bestimmten  $m/z$ -Verhältnis den Analysator durchqueren können. Bauartbedingt kann der Quadrupol-Massenfilter nur ein  $m/z$ -Verhältnis pro Zeiteinheit durchlassen, wird also sequentiell betrieben. Ein solcher Scan einer Masse dauert nur wenige Millisekunden. Die Vorteile eines Quadrupolmassenseparators sind seine große Robustheit, Kompaktheit und die geringen Anschaffungskosten. Als Nachteil ist vor allem die geringe Auflösung des Quadrupol-Massenspektrometers im Vergleich zu den Sektorfeld-, Flugzeit- und Ionenfallen-Massenspektrometern zu nennen (SKOOG ET AL., 1996; CAMMANN, 2001).

Nach dem Massenanalysator erfolgt die Detektion der nach dem  $m/z$ -Verhältnis getrennten Ionen. In dieser Arbeit wird dazu ein Sekundärelektronenvervielfacher (SEV) verwendet (siehe Abb. 2. 5). Die Ionen treffen nach Verlassen des Massenanalysators auf eine Konversionsdynode, an welche ein negatives Potential angelegt ist. Aus der Konversionsdynode werden durch den Aufprall der Ionen Sekundärelektronen herausgeschlagen, welche

durch ein elektrisches Feld zur nächsten Dynode beschleunigt werden und beim Auftreffen weitere Sekundärelektronen erzeugen. Die kaskadenartig erzeugte Elektronenlawine trifft letztlich auf eine Auffanganode, welche ein positives Potential aufweist, und wird detektiert. Die kaskadenartige Erzeugung der Elektronen ermöglicht eine Signalverstärkung von bis zu  $10^7$  (SKOOG ET AL., 1996; CAMMANN, 2001).



**Abb. 2. 5: Funktionsprinzip des Sekundärelektronenvervielfachers nach WILEY-VCH, 2016.**

### 2.1.1 Interferenzen in der LA-ICP-MS

Bei der LA-ICP-MS können Störungen durch Interferenzen auftreten, welche die Richtigkeit der Analyse beeinflussen. Die isobaren Interferenzen bezeichnen die Überlagerung eines gemessenen Isotops durch ein Isotop eines anderen Elements mit gleichem bzw. ähnlichem  $m/z$ -Verhältnis und können bei Elementen mit mehreren Isotopen nachvollzogen und korrigiert werden.

Unter dem Begriff polyatomare Interferenzen werden alle Interferenzen zusammengefasst, welche eine Überlagerung des zu analysierenden Isotops durch Moleküle mit einem gleichem bzw. ähnlichem  $m/z$ -Verhältnis hervorrufen. Diese Moleküle können aus dem Analyten und/oder Gas-, Lösungsmittel- oder Matrixbestandteilen zusammengesetzt sein. Auch die Oxidbildung, Addukte von Analyt oder Gas-, Lösungsmittel- oder Matrixbestandteilen mit Sauerstoff, wird in dieser Arbeit zu den polyatomaren Interferenzen gezählt. Polyatomare Interferenzen können zum einen durch den Einsatz einer Kollisions-

bzw. Reaktionszelle und zum anderen durch Optimierung der ICP-MS-Parameter deutlich verringert werden.

Die Bildung von Dikationen im ICP stellt eine weitere Interferenz dar und tritt bei Elementen mit einer niedrigen zweiten Ionisierungsenergie auf. Die doppeltgeladenen Ionen verhalten sich im Massenspektrometer wie einfachgeladene Ionen mit der halbierten Masse und können dadurch mit deutlich leichteren Analyten interferieren. Durch die Optimierung der ICP-MS-Parameter kann die Bildung von Dikationen auf ein Minimum reduziert werden.

Unter dem Begriff Matrixeffekt werden im Rahmen dieser Arbeit alle weiteren Störungen, welche die Richtigkeit der ICP-MS-Analyse beeinflussen, zusammengefasst. Dazu zählen unter anderem Effekte, welche eine mit der Zeit variierende Signaldrift oder eine konstante Signalverringerng oder Erhöhung durch Matrixbestandteile hervorrufen. Diese Effekte können durch Prozesse im Plasma, den Niederschlag von Salzen an den Cones des Interfaces und der Probenzuführung, die Ionenextraktion sowie Raumladungs-, Transport- und Fraktionierungseffekte entstehen. Eine detaillierte Zusammenfassung der Matrixeffekte der ICP-MS und der LA-ICP-MS ist in den Publikationen von CHEN, 1995 und AGATEMOR ET AL., 2011 bzw. SYLVESTER, 2008 zu finden.

### 2.1.2 Mass-Bias-Korrektur

Die mittels ICP-MS bestimmten Isotopenverhältnisse weisen eine Abweichung von ihrem tatsächlichen Wert auf, welcher als Mass-Bias bezeichnet wird. Diese ist vermutlich in den Effekten der Überschallbeschleunigung der Ionen beim Durchtritt durch das Vakuuminterface, im Englischen als *nozzle effect* bezeichnet, und den Raumladungseffekten, im Englischen unter dem Begriff „*space charge effect*“ beschrieben, begründet (FREEDMAN, 2002; ANDRÉN ET AL., 2004; PONZEVERA ET AL., 2006; GARCIA ALONSO ET AL., 2013). Die genauen Vorgänge sind allerdings noch nicht vollständig aufgeklärt.

Der *nozzle effect* beschreibt die bei der Überschallbeschleunigung der Ionen nach dem *Sampler Cone* ins Hochvakuum stattfindende Massendiskriminierung der leichteren Ionen aufgrund der kinetischen Energie. Durch die niedrigere kinetische Energie der leichteren Isotope steigt die Wahrscheinlichkeit, den zentralen Ionenstrahl zu verlassen. Der *space charge effect* beschreibt die Coulomb-Abstoßung der gleich geladenen und gleich schnell nebeneinander fliegenden Ionen und tritt im Ionenstrahl auf. Dabei werden die leichteren Ionen im Vergleich zu den schwereren stärker abgelenkt, was in einer verringerten

Transmission leichterer Ionen resultiert. In der Folge werden durch beide Effekte die schwereren Ionen bzw. Isotope angereichert und die Isotopenverhältnisse daher mit einer Abweichung zum tatsächlichen Wert gemessen (VANHAECKE ET AL., 2012; GARCIA ALONSO ET AL., 2013).

Zur Korrektur des Mass-Bias wurden verschiedene Vorgehensweisen und Modelle entwickelt, welche in der Publikation von GARCIA ALONSO ET AL., 2013 zusammengefasst und beschrieben sind. Im Rahmen dieser Arbeit wird die Mass-Bias-Korrektur mittels Exponentialgesetz bei simultaner Messung eines Referenzmaterials mit bekanntem Isotopenverhältnis und einer ähnlichen Masse durchgeführt. Die im Folgenden verwendeten Formeln stammen aus der Publikation von GARCIA ALONSO ET AL., 2013.

Dazu wird zunächst das Isotopenverhältnis ( $R$ ) des Referenzmaterials (Mass-Bias-Korrekturstandard) nach Gl. 1 aus den gemessenen Intensitäten ( $I$ ) bestimmt. Mit dem gemessenen und dem bekannten/zertifizierten Isotopenverhältnis des Mass-Bias-Korrekturstandards, sowie des Massenunterschiedes ( $\Delta M$ ) der betrachteten Isotope des Korrekturstandards wird zunächst der  $K$ -Faktor für die Mass-Bias-Korrektur Gl. 2 bestimmt. Nachfolgend wird durch Einsetzen des gemessenen Isotopenverhältnisses des zu analysierenden Elements (nach Gl. 1), und des vorherig bestimmten  $K$ -Faktors (Mass-Bias-Korrekturstandard), sowie des Massenunterschiedes ( $\Delta M$ ), der Isotope des zu analysierenden Elements, in Gl. 3 das korrigierte Isotopenverhältnis ( $R_{korr.}$ ) bestimmt.

$$R = \frac{I_a}{I_b} \quad \text{Gl. 1}$$

$$K = \frac{\ln\left(\frac{R_{\text{zertifiziert}}}{R_{\text{gemessen}}}\right)}{\Delta M} \quad \text{Gl. 2}$$

$$R_{korr.} = R_{\text{gemessen}} \cdot e^{K \cdot \Delta M} \quad \text{Gl. 3}$$

Mittels Gl. 4 und Gl. 5 erfolgt die Berechnung der korrigierten Intensitäten bzw. der korrigierten Isotopenhäufigkeiten ( $a$ ) der zu analysierenden Isotope, welche für die Isotopenverdünnungsanalyse benötigt werden.

$$I_{korr.}^i = I_{\text{gemessen}}^i e^{K \cdot \Delta M_i} \quad \text{Gl. 4}$$

$$a^i = \frac{I_{korr.}^i}{\sum I_{korr.}^i} \quad \text{Gl. 5}$$

### 2.2 Stand der Forschung

In den folgenden Abschnitten wird der Stand der Forschung der derzeit angewendeten Vorgehensweisen für die quantifizierte Lokalisierung der Elementverteilung bei der Analyse von biologischen Proben mittels LA-ICP-MS skizziert. Dazu werden die Methoden mit der häufigsten Anwendung in der Wissenschaftsgemeinde in verschiedenen Gruppen zusammengefasst und deren Vor- und Nachteile diskutiert. Neben den gängigsten Methoden werden auch weniger verbreitete Vorgehensweisen mit dem Potential zur Leistungssteigerung bezüglich der Richtigkeit sowie der Verringerung der Unsicherheit beschrieben. Da der Übergang zwischen den einzelnen Gruppen teilweise fließend ist, wird in Übersichtspublikationen unter Umständen abweichend klassifiziert (HARE ET AL., 2012; BECKER ET AL., 2014; POZEBON ET AL., 2014; LIMBECK ET AL., 2015). Weiterhin werden in einer Vielzahl von Publikationen Mischformen aus den einzelnen Gruppen eingesetzt. Aufgrund der Vielzahl an unterschiedlichen Vorgehensweisen wird kein Anspruch auf Vollständigkeit erhoben.

Um Richtigkeit und Unsicherheit der unterschiedlichen Methoden zu vergleichen, wurde die Richtigkeit aus den in den einzelnen Abschnitten zitierten Publikationen bestimmt, dazu wurde aus dem ermittelten Ergebnis und dem zertifizierten Wert der Bias nach KROMIDAS, 2011 und REICHENBÄCHER, 2011 berechnet. Die Berechnung der Unsicherheit der einzelnen Methoden gestaltete sich schwieriger, da keine einheitliche Vorgehensweise hierfür in den betreffenden Publikationen angewendet wurde. Daher wurden die angegebenen Fehler bei der Quantifizierung, wie z. B. die Standardabweichung, der Vertrauensbereich und die absolute Unsicherheit für die Berechnung der relativen Unsicherheit genutzt. In Publikationen, in denen keine Fehler angegeben wurden, wurde die Abweichung zum zertifizierten Wert als relative Unsicherheit gewertet. Da in den Publikationen weder zertifizierte Referenzmaterialien noch hausinterne Standards mit einer lokalen Änderung des Massenanteiles des Analyten zur Verfügung standen, wurde die Validierung der Methoden anhand homogener Referenzmaterialien durchgeführt. Daher gelten die ermittelte Richtigkeit und Unsicherheit nicht für Elementverteilungsbilder, da diese in der Regel einem abweichenden Auswertungsverfahren unterliegen und z. B. keine Mittelwertbildung aus Mehrfachmessungen möglich ist. Grundsätzlich sollte bei der Bestimmung der Richtigkeit einer Methode ein zertifiziertes Referenzmaterial verwendet und der Bias berechnet werden.

Aus einem Großteil der Publikationen konnten weder Richtigkeit noch Unsicherheit der Methoden abgeschätzt werden, da keine Validierung stattfand. In den betreffenden Publikationen wurden meist nur die Bestimmtheitsmaße ( $R^2$ ) der verwendeten Kalibrationen mit verschiedensten Referenzmaterialien als Gütekriterium herangezogen. Da das Bestimmtheitsmaß jedoch nur die Güte der Kalibration und nicht die Richtigkeit der Methode widerspiegelt, konnten die betreffenden Publikationen nicht für die Ermittlung der Richtigkeit und Unsicherheit herangezogen werden. Daher werden in den folgenden Abschnitten teilweise Veröffentlichungen als Anwendungsbeispiel zitiert, ohne für die Ermittlung der Richtigkeit und Unsicherheit verwendet worden zu sein. Insgesamt wurden folglich die Richtigkeit und Unsicherheit der einzelnen Methoden aus einer geringen Anzahl an Publikationen ermittelt, da es die Datenlage nicht anders zuließ.

### **2.2.1 Zertifizierte Referenzmaterialien**

Die einfachste und eleganteste Vorgehensweise für die Quantifizierung biologischer Proben mittels LA-ICP-MS liegt in der Verwendung einer externen Kalibration mit zertifizierten Referenzmaterialien. Als zertifizierte Referenzmaterialien werden nach ISO-LEITFADEN 30, 2015 Materialien oder Substanzen bezeichnet, welche sich durch eine ausreichende Homogenität und mindestens ein präzise bestimmtes Merkmal auszeichnen, welches zur Kalibration von Messgeräten verwendet werden kann. Im Rahmen dieser Arbeit wird der Terminus „zertifiziertes Referenzmaterial“ allerdings für die durch metrologische Institutionen und Organisationen, wie beispielsweise die Physikalisch-Technische Bundesanstalt (PTB) oder das Nationale Institut für Standards und Technologie (NIST), sowie Teilnehmer des europäischen Referenzmaterialien Konsortiums, wie der Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung (BAM) und des Instituts für Referenzmaterialien und Messungen (IRMM), zertifizierte Referenzmaterialien verwendet.

Das Hauptproblem bei der Verwendung von zertifizierten Referenzmaterialien liegt in der schlechten Verfügbarkeit. Für viele biologische Matrices von wissenschaftlichem Interesse existieren schlichtweg keine zertifizierten Referenzmaterialien (siehe Tab. 2. 1); und auch die zu analysierenden Elemente schränken die Verfügbarkeit weiter ein. In der Regel verfügen diese zertifizierten Referenzmaterialien lediglich über ein Gehaltsniveau und erlauben damit nur eine 1-Punkt-Kalibration, welche als semiquantitativ anzusehen ist. Diese semiquantitativen Analysen weisen nach LABORDA ET AL., 2016 eine Unsicherheit von im Mittel

30 – 50 % auf und führten zu Über- oder Unterbestimmungen von 20 – 65 % für die untersuchten Elemente. Für Anwendungen, in denen zertifizierte Referenzmaterialien mit der gleichen Zusammensetzung wie die Probe und die betreffenden Elemente in mindestens drei Kalibrationsniveaus im Gehaltbereich des Analyten zur Verfügung standen, wurden die zuverlässigsten Ergebnisse mit einer hohen mittleren Richtigkeit von  $\approx 95\%$  und einer Unsicherheit von 5 – 10 % erreicht (KOCH ET AL., 2011; KONZ ET AL., 2012; HARE ET AL., 2012; LIMBECK ET AL., 2015). Typischerweise werden Bestimmtheitsmaße von  $\geq 0,99$  erreicht. Neben den zertifizierten Referenzmaterialien sind in der Literatur weitere Standardmaterialien mit hausintern zertifizierten Gehalten veröffentlicht (JOCHUM ET AL., 2005), welche den Mangel an zertifizierten Referenzmaterialien geringfügig schmälern.

Ein weiteres Problem bei der Verwendung von zertifizierten Referenzmaterialien liegt in der Homogenisierung jener Materialien begründet. Durch das für den Zertifizierungsprozess notwendige Homogenisierungsverfahren der Referenzmaterialien wird eine gleichmäßige, aber mittlere Zusammensetzung der Matrix erreicht, welche für die Analyse von homogenisierten Proben unter Umständen gut geeignet ist. Für die orts aufgelöste Messung biologischer Proben ist durch dieses Vorgehen keine vollständige Anpassung an die lokal variierende Probenmatrix möglich und die Verwendung von zertifizierten Referenzmaterialien potenziell fehlerbehaftet, da lokal auftretende Änderungen der Ablationsrate oder des für die interne Standardisierung (siehe Abschnitt 2.2.2) verwendeten Isotops nicht korrigiert werden können. Denn nur bei einer vollständigen Matrixanpassung zwischen Standard und Probe können Ablation, Transport, Atomisierung und Ionisierung als nahezu identisch angenommen werden (LIMBECK ET AL., 2015). Aus den oben genannten Gründen sind alternative Strategien zwingend erforderlich, um ein weiteres Feld an Proben für die Anwendung der LA-ICP-MS für die quantifizierte Lokalisierung der Elementverteilung in biologischen Proben zu ermöglichen.

Tab. 2. 1: Kommerziell verfügbare biologische zertifizierte Referenzmaterialien nach HARE ET AL., 2012

SRM	Typ	zertifizierte Elemente
ERM-BB384	Schweinemuskel	Ca, Mg, Na
BCR-273	Einzellerprotein	Ca, Fe, K, N, P, Mg <sup>a</sup> , Na <sup>a</sup> , S <sup>a</sup>
BCR-274	Einzellerprotein	As, Cd, Co, Cu, Mn, Pb, Se, Zn, Ni <sup>a</sup>
BCR-185R	Rinderleber	As, Cd, Cu, Mn, Pb, Se, Zn
BCR-278	Muschelgewebe	Hg, Cd, Cr, Se, Pb, As, Mn, Zn, Cu
NCS ZC71001	Rinderleber	Ca, Cl, Co, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Mo, Na, P, Rb, Se, Sr, Al <sup>a</sup> , Ba <sup>a</sup> , Br <sup>a</sup> , Cd <sup>a</sup> , F <sup>a</sup> , Hg <sup>a</sup> , Rb <sup>a</sup> , Pb <sup>a</sup> , S <sup>a</sup> , Ti <sup>a</sup>
NCS ZC73016	Hühnchen	Ag, As, B, Ba, Bi, Br, Ca, Ce, Cl, Cr, Cs, Cu, Dy, Fe, Hg, K, La, Li, Mg, Mn, Mo, N, Na, Nd, Ni, P, Rb, Pr, Rb, S, Se, Sm, Sr, Y, Zn
RM 8414	Rindermuskel	Al, As, B, Br, Ca, Cd, Cl, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, I, K, Mg, Mn, N, Na, Ni, P, Pb, Rb, S, Se, Sr, Zn, Ba <sup>a</sup> , Cs <sup>a</sup> , F <sup>a</sup> , Sb <sup>a</sup> , V <sup>a</sup>
NIST-1546	Homogenisiertes Fleisch	Ca, Fe, Na
NCS ZC81001	Schweinemuskel	Br, Ca, Cl, Cu, Fe, K, Mg, Mn, N, Na, P, Rb, Se, Zn, Ba <sup>a</sup> , Co <sup>a</sup> , Cr <sup>a</sup> , Cs <sup>a</sup> , Hg <sup>a</sup> , Mo <sup>a</sup> , Pb <sup>a</sup> , Sr <sup>a</sup>
ERM-CE278	Muschelgewebe	As, Cd, Cr, Cu, Hg, Mn, Pb, Se, Zn
BCR-668	Muschelgewebe	Ce, Dy, Er, Eu, Gd, La, Lu, Nd, Pr, Sm, Tb, Th, Tm, U, Y, As <sup>a</sup> , Cd <sup>a</sup> , Co <sup>a</sup> , Cr <sup>a</sup> , Cs <sup>a</sup> , Ho <sup>a</sup> , Fe <sup>a</sup> , Mo <sup>a</sup> , Sc <sup>a</sup> , Yb <sup>a</sup> , Zn <sup>a</sup>
NIST-2977	Muschelgewebe	Cd, Cu, Pb, Mn, Ni, Sr
NIST-1946	Fischgewebe	As, Cu, Fe, Hg, Mn, Rb, Se, Zn
NIST-1947	Fischgewebe	As, Cu, Fe, Hg, Mn, Rb, Se, Zn
NIST-1566b	Austergewebe	Ca, Cl, Mg, K, Na, S, Al, As, Cd, Co, Cu, Fe, Pb, Mn, Hg, Ni, Rb, Se, Ag, Th, V, Zn
IAEA-407	Fisch	Al, As, Br, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, K, Li, Mg, Mn, Na, Ni, Pb, Rb, Sb, Se, Sr, V, Zn
DORM-3	Fischprotein	As, Cd, Co, Cr, Fe, Hg, Ni, Pb, Sn, Zn
NIST 1515	Apfelblätter	Al, As, Ba, Bo, Ca, Cd, Cl, Cu, Fe, Hg, K, Mg, Mn, Mo, N, Na, Ni, P, Rb, Se, Sr, V, Zn
NIST-1575a	Tannennadeln	Al, Ba, Ca, Cd, Cl, Cu, Fe, Hg, K, P, Rb, Zn, As <sup>a</sup> , Ba, Ce <sup>a</sup> , Co <sup>a</sup> , Cr <sup>a</sup> , Cs <sup>a</sup> , Mn <sup>a</sup> , Na <sup>a</sup> , Ni <sup>a</sup> , Sc <sup>a</sup> , Se <sup>a</sup>
NIST-1570a	Spinatblätter	Al, As, B, Ca, Cd, Co, Cu, Hg, K, Mn, Ni, P, Sr, Th, V, Zn
NIST-1573a	Tomatenblätter	Al, As, B, Ca, Cd, Cr, Co, Cu, Fe, Hg, K, Mn, N, Na, Ni, P, Rb, Sb, Se, V, Zn, Ag <sup>a</sup> , Ba <sup>a</sup> , Br <sup>a</sup> , Ce <sup>a</sup> , Cs <sup>a</sup> , Cl <sup>a</sup> , Gd <sup>a</sup> , Hf <sup>a</sup> , I <sup>a</sup> , La <sup>a</sup> , Mo <sup>a</sup> , Sm <sup>a</sup> , Sc <sup>a</sup> , Sr <sup>a</sup> , Th <sup>a</sup> , U <sup>a</sup>
NIST-1547	Pfirsichblätter	Al, As, B, Ba, Bra, Ca, Cd, Ce <sup>a</sup> , Cl, Co <sup>a</sup> , Cr <sup>a</sup> , Cu, Eu <sup>a</sup> , Fe, Ga <sup>a</sup> , Hg, Ia, K, La <sup>a</sup> , Mg, Mn, Mo, N, Na, Nd <sup>a</sup> , Ni, P, Pb, Rb, S <sup>a</sup> , Sm <sup>a</sup> , Sb <sup>a</sup> , Se, Sn <sup>a</sup> , Sr, Tb <sup>a</sup> , U <sup>a</sup> , V, Yb <sup>a</sup> , Zn
NIST-1598a	Tierserum	Cd, Co, Cs, Cu, Fe, Mn, Ni, Rb, Sb, Se, V, Zn, Al <sup>a</sup> , Ca <sup>a</sup> , Cr <sup>a</sup> , Hg <sup>a</sup> , Mo <sup>a</sup>
NIST-1486	Knochenmehl	Ca, Fe, K, Mg, P, Pb, Sr, Zn, Al <sup>a</sup> , As <sup>a</sup> , Ca, Cd <sup>a</sup> , Cu <sup>a</sup> , F <sup>a</sup> , Mn <sup>a</sup> , Se <sup>a</sup>
NIST-1400	Knochenasche	Ca, Fe, K, Mg, P, Pb, Sr, Zn
FEBS-1	Fisch-Otolithen	Ba, Ca, Li, Mg, Mn, Na, Sr, Cd <sup>a</sup> , Cu <sup>a</sup> , Ni <sup>a</sup> , Pb <sup>a</sup> , Zn <sup>a</sup>
DOLT-4	Dornhaileber	Ag, As, Cd, Cu, Fe, Hg, Pb, Ni, Se, Zn, Al <sup>a</sup> , Ca <sup>a</sup> , Co <sup>a</sup> , Cr <sup>a</sup> , K <sup>a</sup> , Mg <sup>a</sup> , Mo <sup>a</sup> , Na <sup>a</sup> , Sn <sup>a</sup> , Sr <sup>a</sup>
LUTS-1	Hummer Hepatopankreas	Ag, As, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Pb, Mg, Mn, Ni, K, Se, Sr, Zn
TORT-2	Hummer Hepatopankreas	As, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, Pb, Mn, Mo, Ni, Se, Sr, Vm Zn, Sb <sup>a</sup>

<sup>a</sup> nicht zertifizierte Elemente



### 2.2.2 Interne Standardisierung

Die interne Standardisierung stellt eine der meist eingesetzten Vorgehensweisen für die Quantifizierung bei der LA-ICP-MS dar und wird in der Regel mit anderen Strategien, wie z. B. dem Einsatz von gedopten Biomaterialien (siehe Abschnitt 2.2.4) oder matrixangepassten Standards (siehe Abschnitt 2.2.5), durchgeführt. Die Grundlage dieser Strategie bildet die Normalisierung der gemessenen Analytintensitäten über ein Isotop eines homogen verteilten internen Standards. Durch die Normalisierung mit dem internen Standard können Fluktuationen in der Laserfluenz, Unterschiede in der Probendicke, Ablationsrate und des Transports sowie der Drift des Messsystems kompensiert werden (POZEBON ET AL., 2014). Eine Grundvoraussetzung bildet daher die natürliche homogene Verteilung des internen Standards in Probe und Referenzmaterial. In der Regel kommen in biologischen Proben hauptsächlich Matrixelemente wie Kohlenstoff oder Schwefel in Frage, wobei deren Verteilung meist auch nicht vollständig homogen vorliegt. Prinzipiell sind jedoch alle homogen verteilt vorkommenden Isotope einsetzbar, solange sie in Probe und Referenzmaterial gleichermaßen vorliegen. Die homogene Verteilung des internen Standards ist deshalb entscheidend, da bei inhomogenem Vorliegen über- und unterkorrigiert wird und somit auch der quantifizierte Elementgehalt zu hoch oder niedrig ausfällt.

Die Normalisierung über Kohlenstoff wird in der Wissenschaftsgemeinde jedoch kontrovers diskutiert. TODOLÍ ET AL., 1998 vermuteten in ihrer Publikation das Vorliegen von Kohlenstoff in einer Gas- und Partikelphase. Daher läge Kohlenstoff, je nach Sauerstoffgehalt der Probenmatrix, in Form eines variierenden Anteils der Gasspezies, hauptsächlich als CO und CO<sub>2</sub>, und Partikelspezies vor. Durch die unterschiedliche Diffusion der beiden Spezies während des Transportes und im Plasma der LA-ICP-MS treten nach FRICK ET AL., 2012 nur unvollständig korrigierbare Verluste und deutlich unterschiedliche Transport- und Ionisierungseffizienzen der gasförmigen Spezies im Vergleich zur partikulären Spezies auf, welche sich auf die Richtigkeit und Präzision der Ergebnisse auswirken. Weiterhin stellen FRICK ET AL., 2012 Kohlenstoff aufgrund des sehr hohen ersten Ionisierungspotentials von 1086,5 kJ·mol<sup>-1</sup> als internen Standard in Frage. Im Gegensatz dazu wurden in der Arbeit von AUSTIN ET AL., 2011 verschiedene Elemente zur internen Standardisierung eingesetzt und <sup>13</sup>C erwies sich als geeignet. Weiterhin werden auch für Schwefel die oben genannten Probleme erwartet (LIMBECK ET AL., 2015).

Bei der Wahl des internen Standards gelten die in den Publikationen von VANHAECKE ET AL. 1992, FINLEY-JONES ET AL. 2008 und FRICK ET AL., 2012 geforderten Kriterien für einen idealen internen Standard. In den Publikationen wird eine ähnliche Masse des internen Standards im Vergleich zu dem zu analysierenden Element gefordert. Weiterhin sollten Analyt und interner Standard ein ähnliches erstes Ionisierungspotential besitzen. Außerdem wird in der Publikation von LONGERICH ET AL., 1996 eine ähnliche Ablationscharakteristik für den internen Standard im Vergleich zum Analyten gefordert. Weiterhin sollten interner Standard und Analyt Intensitäten in ähnlichen Größenordnungen aufweisen, um gegen Null oder Unendlich tendierende Konzentrationen zu vermeiden (HOFFMANN ET AL., 1994). Diese Kriterien reduzieren die Auswahl an geeigneten Elementen drastisch. Mangels geeigneter Alternativen werden daher die beiden Elemente Kohlenstoff oder Schwefel in den meisten Anwendungen eingesetzt, da sie die größtmögliche Homogenität der Elementverteilung in biologischen Proben besitzen.

In den Publikationen von WU A ET AL., 2009; WU B ET AL., 2009 und BECKER ET AL., 2008 wurde  $^{13}\text{C}$  zur Normalisierung eingesetzt, um den Effekt des abweichenden Wasseranteils und mögliche Inhomogenitäten zwischen Probe und Standards zu korrigieren. In den Arbeiten von SELTZER ET AL., 2005; SELA ET AL., 2007 und POZEBON ET AL., 2008 wurden Schwefelisotope zur Normalisierung für die Analyse von Schildkrötenpanzern und Haaren eingesetzt. Für die Analyse von Knochen (BELLIS ET AL., 2006; RANALDI ET AL., 2009; CASTRO ET AL., 2010) und Zähnen (HOFFMANN ET AL., 2000; KANG ET AL., 2004; FARELL ET AL., 2013) wurden hingegen die Isotope  $^{43}\text{Ca}$  und  $^{44}\text{Ca}$  verwendet. Bei der Anwendung der Normalisierung und der Verwendung von gedopten Biomaterialien (siehe Abschnitt 2.2.4) oder matrixangepassten Standards (siehe Abschnitt 2.2.5) wurde im Mittel eine Richtigkeit von 82 – 97 % und eine Unsicherheit im Bereich von 10 – 25 % erreicht.

Ein weiterer Ansatz für die interne Standardisierung wurde in den Arbeiten von KONZ ET AL., 2013 und BONTA ET AL., 2014 beschrieben. Auf Proben und Referenzmaterial wird eine gleichmäßige wenige Nanometer dicke Goldschicht aufgesputtert. Das Goldsignal dient als pseudointerner Standard, da es nicht ursprünglich in der Probe vorhanden war. In Verbindung mit gedopten Biomaterialien oder matrixangepassten Standards können so Matrixeffekte, Änderungen der Ablationsrate, Transport des ablatierten Aerosols, Ionisierung und die Drift durch Instrumenteninstabilitäten ausgeglichen werden. Die Studien

zeigen Kalibrationsgeraden mit einem Bestimmtheitsmaß von  $\geq 0,99$ . Die Richtigkeit lag im Mittel bei  $\approx 95\%$  mit einer Unsicherheit von  $15 - 20\%$ . Einen kritischen Faktor stellt die Goldverteilung auf Probe und Standards dar. Diese muss homogen vorliegen und reproduzierbar aufgebracht werden können, um eine verwertbare Analyse zu ermöglichen. In der Arbeit von BONTA ET AL., 2014 wurden diese Kriterien erfüllt; im Gegensatz dazu zeigten eigene Versuche Probleme in der Reproduzierbarkeit. Weiterhin stellt die relativ hohe Intensität des  $^{197}\text{Au}$  Isotops, im Vergleich zu den möglichen Analyten, eine potentielle Fehlerquelle dar. Denn das monoisotope Gold liegt im Prozentbereich und die Analyten in der Regel im  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  Bereich vor, dies kann unter Umständen die Richtigkeit und Präzision der internen Standardisierung verringern. Jedoch könnte statt Gold auch beinahe jedes andere Element als quasi idealer interner Standard eingesetzt und auf die Proben gesputtert werden. Dies könnte möglicherweise die Richtigkeit und Unsicherheit der Vorgehensweise weiter reduzieren.

### **2.2.3 Kalibration mit Flüssigstandards**

Die Kalibration mit Flüssigstandards stellt eine weitere Gruppe der Kalibrationsstrategien dar und wurde ebenfalls für die Quantifizierung von biologischen Proben mittels LA-ICP-MS entwickelt. Die Grundlage dieser Vorgehensweise bildet die Einleitung eines Aerosols aus flüssigen Standardlösungen in die Ablationskammer (PICKHARDT ET AL., 2006) oder die Zusammenführung und Vermischung der zerstäubten Standardlösung mit dem ablatierten Material vor dem ICP (POZEBON ET AL., 2010; DRESSLER ET AL., 2010). Zur Vermischung werden meist einfache T-Verbindungsstücke eingesetzt, um das trockene ablatierte Aerosol der Probe mit der zerstäubten Standardlösung homogen zu vermischen. Das wässrige Aerosol der Standardlösung erhöht die Plasmastabilität und Empfindlichkeit (O' CONNOR ET AL., 2006; POZEBON ET AL., 2010).

Die Anpassung der Standardlösung an die Probe wird durch die simultane Laserablation eines Standards aus homogenisiertem Probenmaterial mit zeitgleicher Einleitung der verschiedenen Kalibrationsstandardlösungen erreicht. Darauf wird die Probe während der parallel stattfindenden Zerstäubung verdünnter Salpetersäure (2 Gew.-%) ablatiert und gemessen. Um die unterschiedlichen Empfindlichkeiten der ICP-MS von flüssigen Proben mit der Laserablation fester Proben zu korrigieren, wird eine Kalibrationsreihe aus Festkörperstandards auf Basis des homogenisierten Probenmaterials hergestellt und mit den

betreffenden Analyten in bekannten Konzentrationsniveaus dotiert. Das Verhältnis der Empfindlichkeit der Kalibration mittels Festkörperstandards zu den Kalibrationsstandardlösungen wird als Faktor zur Korrektur verwendet (POZEBON ET AL., 2014). Mit diesem Vorgehen sind neben der externen Kalibration auch die Standardaddition und die Isotopenverdünnungsanalyse (siehe Abschnitt 2.2.8) möglich (SELA ET AL., 2007). Die publizierten Bestimmtheitsmaße der externen Kalibration lagen im Mittel oberhalb von 0,99 und es wurde eine Richtigkeit von  $\geq 90\%$  publiziert. Die mittlere Unsicherheit lag bei  $\approx 10\%$ . Eine Modifikation dieser Vorgehensweise liegt in der Trocknung des Aerosols der Standardlösungen durch spezielle Zerstäuber, um die Atomisierung und Ionisation der Standards an das ablatierte Probenmaterial anzupassen (SELA ET AL., 2007). Ein weiterer Vorteil liegt in der Verringerung von Inferenzen, wie Oxiden und Hydroxiden.

Anwendungsbeispiele sind in den Publikationen von BECKER ET AL., 2005 und POZEBON ET AL., 2010 für die Analyse von Th und U in menschlichem Gehirngewebe bzw. für die Quantifizierung und Analyse der Elementverteilung in Dünnschnitten eines Mausgehirns sowie in der Arbeit von SELA ET AL., 2007 zur Bestimmung von Uran in Haaren beschrieben.

Die Vorteile der Kalibration mit Flüssigstandards liegen in der breiten Anwendbarkeit der Vorgehensweise für Proben, bei denen kein zertifiziertes Referenzmaterial vorhanden ist. Allerdings wird Blindwertmaterial der Probe für die Präparation der Festkörperstandards zur Korrektur der im Vergleich niedrigeren Empfindlichkeit bei der LA-ICP-MS benötigt. Dadurch wird die Vorbereitung relativ zeitaufwendig. Weiterhin könnten auch die ohnehin präparierten Festkörperstandards für die Quantifizierung genutzt werden. Eine mögliche Fehlerquelle stellt die abweichende Atomisierung und Ionisierung der Standardlösungen im Vergleich zur Probe dar, welche nicht durch die Korrektur der unterschiedlichen Empfindlichkeiten korrigiert wird. Bei dem ablatierten Probenmaterial handelt es sich um trockene Partikel mit einer Größe zwischen einigen Nanometern bis zu einigen Mikrometern (GUILLONG ET AL., 2002; GUILLONG ET AL., 2003; MOSES ET AL., 2015), welche im Plasma atomisiert und ionisiert werden. Dabei unterscheiden sich diese Prozesse deutlich von den im Plasma auftretenden Prozessen, wie der Verdampfung des Lösungsmittels sowie der Atomisierung und Ionisierung des Aerosols aus den Flüssigstandards. Während das ins ICP gelangende Aerosol vollständig ionisiert wird, werden die größeren Partikel der Probe zum Teil nur unvollständig ionisiert (GUILLONG ET AL., 2003). Dieses abweichende Verhalten zwischen Probe

und den flüssigen Standards kann auch durch die Trocknung des Aerosols nicht vollständig angeglichen werden, da das getrocknete Aerosol eine wesentlich geringere Partikelgröße aufweist als das ablatierte Probenmaterial. Dieses unterschiedliche Verhalten von Probe und Standard im ICP kann sich in einer verringerten Richtigkeit der Methode äußern.

### **2.2.4 Gedopte Biomaterialien**

Die Verwendung von gedopten Biomaterialien mit bekannten Analytgehalten stellt eine der beiden am weitesten verbreiteten Quantifizierungsstrategien für die LA-ICP-MS dar. Im Englischen wird diese Form der Referenzmaterialien als „*matrix-matched Standards*“, also der vollständigen Anpassung der Standards an die Probenmatrix, bezeichnet (POZEBON ET AL., 2014; LIMBECK ET AL., 2015). Diese Vorgehensweise beruht auf der Verwendung von homogenisiertem Probenmaterial der zu analysierenden Probe, als Basis für die Präparation der verschiedenen Kalibrationsstandards. Als Matrix werden zertifizierte Referenzmaterialien (siehe Abschnitt 2.2.1), Blindwertmaterial der zu analysierenden Probe oder ein der Probenmatrix ähnliches Material eingesetzt. Diese Matrixmaterialien werden zunächst aufwendig homogenisiert und im Anschluss daran mit bekannten Gehalten der zu untersuchenden Analyten gedopt (ZORIY ET AL., 2006; ZORIY A ET AL., 2007; ZORIY B ET AL., 2007; DOBROWOLSKA ET AL., 2008; ZORIY ET AL., 2008; GRUHL ET AL., 2009; MATUSCH ET AL., 2011; MORENO-GORDALIZA ET AL., 2011). Daraufhin wird das gedopte und homogenisierte Matrixmaterial erneut aufwendig homogenisiert und für die Analyse vorbereitet. Genaue und ausführliche Beschreibungen der Vorgehensweise für die Präparation der gedopten Biomaterialien sind in den Veröffentlichungen von LEAR ET AL., 2012; HARE ET AL., 2013 und BECKER ET AL., 2014 zu finden. Die präparierten Referenzmaterialien werden vor der Analyse der Probe zunächst charakterisiert. Die Charakterisierung umfasst dabei in der Regel die Quantifizierung der Elementgehalte nach Aufschluss mittels ICP-MS oder ICP-OES sowie die Homogenitätsbestimmung der Verteilung der hinzudotierten Elemente mittels LA-ICP-MS. Damit kann die Präparation der Standards als relativ zeitaufwendig betrachtet werden.

Die Anwendung der gedopten Biomaterialien schließt in der Regel die interne Standardisierung (siehe Abschnitt 2.2.2) über einen homogen verteilten internen Standard mit ein. Das Einsatzgebiet dieser Kalibrationsstrategie ist äußerst vielfältig und breit aufgestellt, so wurde diese Vorgehensweise in einer Vielzahl von Publikationen für viele unterschiedliche Anwendungen eingesetzt. Beispielsweise wurden in der Publikation von

SANTOS ET AL., 2009 gedopte Referenzmaterialien aus Muschelgewebe zur Lokalisierung und Quantifizierung von Cd, Cu, Hg, Pb und Zn in Meeresschnecken eingesetzt. Die Elemente B, Cu, K, Mg, Mn, P und S wurden in Studien der Elementverteilung in Blättern von Pflanzen untersucht. Die Kalibrationsstandards wurden aus zertifizierten Referenzmaterialien (NIST 1515) hergestellt (WU A ET AL., 2009; WU B ET AL., 2009). Ebenfalls auf Grundlage eines zertifizierten Referenzmaterials (NIST 1486) wurden Referenzmaterialien aus Knochenmehl für die Analyse calciumhaltiger Proben wie Knochen und Zähne verwendet (HARE ET AL., 2011). In den Publikationen von BECKER, 2002; BECKER, 2010 und BECKER ET AL., 2014 wurde hingegen homogenisiertes Blindwertmaterial als Grundlage der Referenzmaterialien für Studien der Elementverteilung in Rattengehirnen verwendet. In den Arbeiten von GRUHL, 2006; GRUHL ET AL., 2009 und STADLBAUER ET AL., 2007 wurden vollständig der Probenmatrix angepasste Referenzmaterialien aus Hydroxylapatit für die Quantifizierung von Gradienten des Massenanteils in Knochen bzw. Zähnen eingesetzt. Dazu wurde selbst synthetisiertes Hydroxylapatit in  $\text{HNO}_3$  aufgelöst und mit einer Multielementstandardlösung versetzt. Im Anschluss daran erfolgten die Trocknung, die Homogenisierung und das In-Form-Pressen zu Pellets. In den Publikationen wurden Bestimmtheitsmaße der Kalibrationsgeraden von  $\geq 0,9$  erreicht. Die Richtigkeit der Vorgehensweise lag im Mittel bei 85 – 95 % und eine Unsicherheit von 10 – 25 % wurde angegeben.

Die Vorteile in der Verwendung von gedopten Biomaterialien zur Kalibration für die Analyse von Elementverteilungen in biologischen Proben liegen im variablen Einsatzbereich der Methode. Da keine zertifizierten Referenzmaterialien benötigt werden und stattdessen homogenisiertes Probenmaterial verwendet werden kann, kann dieses Verfahren im Prinzip für sämtliche Probentypen eingesetzt werden. Allerdings gestaltet sich für einige Anwendungen die Beschaffung von Blindwertmaterial als äußerst schwierig bis unmöglich, sodass auf ein der Probenmatrix ähnliches Material zurückgegriffen wird, womit die ohnehin fragliche vollständige Anpassung zwischen Probe und Standard nicht mehr gewährleistet ist. In solchen Fällen ist der Terminus „matrixangepasste Standards“ (siehe Abschnitt 2.2.5) eher zutreffend. Die vollständige Matrixanpassung ist bei der orts aufgelösten Analyse von biologischen Proben und der quantitativen Bestimmung der Elementverteilung deshalb fraglich, weil in biologischen Proben in der Regel kein Element als homogen verteilt angesehen werden kann. Somit ändert sich lokal die Matrixzusammensetzung der Probe, während die Referenzmaterialien eine gemittelte, bestenfalls homogen verteilte,

Zusammensetzung aufweisen. Daher lassen sich mit diesen Referenzmaterialien nicht alle Effekte der Probe, wie z. B. der lokale Anstieg eines mit dem Analyten interferierenden Elements oder eines leicht ionisierbaren Elements, welches Einfluss auf das Ionisierungsgleichgewicht nimmt (AGATEMOR ET AL., 2011), korrigieren. Ferner wird durch diesen Ansatz der Mangel an einem geeigneten internen Standard, wie in Abschnitt 2.2.2 bereits diskutiert, nicht gelöst, wodurch unter Umständen eine beachtliche Fehlerquelle bei den quantifizierten Elementverteilungsbildern entsteht. Weiterhin ist die Präparation der Referenzmaterialien zeitaufwendig und komplex. Auch die ausreichende Homogenität der Elementverteilung in den präparierten Standards (vgl. Abschnitt 3.3.2) ist schwierig zu erreichen und in einigen Fällen unzureichend (THIELEKE, 2013; CHEN, 2015). Außerdem sind die gedopten Biomaterialien nur für einen Typ von Proben einsetzbar, was bei verschiedenen Proben einen enormen Mehraufwand in der Präparation bedeutet. Dennoch hat sich die Verwendung von Referenzmaterialien aus gedopten Biomaterialien in der Wissenschaftsgemeinde etabliert.

### **2.2.5 Matrixangepasste Standards**

Die matrixangepassten Standards bilden mit den gedopten Biomaterialien (siehe Abschnitt 2.2.4) die am häufigsten angewendeten Kalibrationsstrategien bei der Analyse von Elementverteilungen und deren Quantifizierung in biologischen Proben mittels LA-ICP-MS. Unter dem Begriff „matrixangepasste Standards“ werden im Rahmen dieser Arbeit alle Kalibrationsstrategien mit Referenzmaterialien, welche bezüglich einiger weniger Parameter an die Probenmatrix angepasst sind, zusammengefasst. Da die Anpassung der Referenzmaterialien an die Probenmatrix lediglich anhand einiger weniger Parameter durchgeführt wird, liegt nur eine teilweise Matrixanpassung vor. Im Englischen werden diese Referenzmaterialien unter anderem mit dem Terminus „*matrix-adapted standards*“ bezeichnet (POZEBON ET AL., 2014). Auch diese Form der Kalibrationsstrategie wird mit der internen Standardisierung zusammen angewendet.

Wie bereits oben erwähnt, erfolgt die teilweise Matrixanpassung lediglich anhand einiger Parameter, dazu gehört z. B. die Anpassung des Kohlenstoffanteils der Standards an die Probe. Diese Anpassung kann durch die Verwendung einer kohlenstoffhaltigen Matrix, wie z. B. Agarose, Cystein, Oxalsäure, Paraffin oder durch Polymere, erreicht werden. Weiterhin können auch mehrere Parameter, wie z. B. der Kohlenstoffgehalt und der Wasseranteil, an

die zu analysierende Probe angepasst werden. Im Grunde bilden die matrixangepassten Standards eine vereinfachte Version der gedopten Biomaterialien, da sich die Anpassung auf einige wenige Parameter reduziert.

Ein Anwendungsbeispiel aus der Literatur bildet die Publikation von KLUG ET AL., 2011. In dieser Arbeit wurden Referenzmaterialien auf Agarosebasis mit angepasstem Kohlenstoff- und Wassergehalt für die Lokalisierung von Aluminium in Pflanzenwurzeln verwendet. Auch STÄRK ET AL., 2011 verwendeten Agarose, allerdings in Form einer Lösung, als Basis für die Präparation der Referenzmaterialien für die Analyse von Zellkulturen. BELLIS ET AL., 2010 entwickelten ein Tintenstrahldruckverfahren zur Herstellung von Referenzmaterialien für die Analyse von Kupfer in biologischen Proben. Die Matrixanpassung beruhte auf der Verwendung eines kohlenstoffhaltigen Substrats für den Druck. Dieses Verfahren wurde unter anderem von HOESL ET AL., 2014 weiterentwickelt und umfasste den Druck eines „quasi internen Standards“ zur Normalisierung auf die zu analysierenden Elektrophoresemembrane und Gewebeproben. Als Referenzmaterialien wurden ebenfalls mit verschiedenen Kalibrationsniveaus der zu analysierenden Elemente bedruckte Membranplatten verwendet. Damit stellt diese Vorgehensweise eine Mischform zwischen teilweiser und vollständiger Matrixanpassung mit Anwendung der internen Standardisierung dar und zeigt die starke Verknüpfung der verschiedenen Kalibrationsstrategien untereinander auf. Diese Überlappungen zwischen den einzelnen Gruppen machen eine feste Einteilung der verschiedenen Verfahren unmöglich. Die in der Literatur veröffentlichten Bestimmtheitsmaße lagen im Mittel bei  $\geq 0,9$ . Eine mittlere Richtigkeit von  $\geq 85\%$  und eine Unsicherheit im Bereich von 10 – 20 % wurden erreicht.

Die Vorteile dieser Kalibrationsstrategie liegen in der Verfügbarkeit einer relativ reinen Matrix für die Herstellung der Standards. Es wird kein unter Umständen schwer zu beschaffendes Blindwertmaterial der Probe benötigt, und es können Kalibrationsniveaus unterhalb der mittleren Massenanteile der Analyten im Probenblindwert hergestellt werden. Weiterhin ist die Präparation der Referenzmaterialien weniger komplex und zeitaufwendig. Außerdem sind die Standards im Vergleich zu den gedopten Biomaterialien vielfältiger für verschiedene biologische Proben einsetzbar. Die Nachteile dieser Vorgehensweise liegen in der nur teilweisen Übereinstimmung der Matrix von Standard und Probe, wodurch die Richtigkeit verringert werden kann. Denn bei der Ablation der Probe auftretende



Matrixeffekte können durch die nur teilweise angepasste Matrix der Standards nicht vollständig korrigiert werden. Ähnlich wie bei den gedopten Biomaterialien ist auch die Homogenität der Elementverteilung gelegentlich problematisch und unzureichend (THIELEKE, 2013; CHEN, 2015). Auch die teilweise Matrixanpassung der Referenzmaterialien an die Probe hat in der Wissenschaftsgemeinde einen breiten Anwenderkreis, bedingt durch die weniger komplexe Durchführbarkeit und die vielfältige Anwendbarkeit dieser Kalibrationsstrategie.

### 2.2.6 Matrixunabhängige Kalibrationsstrategie

Eine weitere Vorgehensweise stellt die matrixunabhängige Kalibrationsstrategie dar. Diese Methode wurde in der Arbeit von THIELEKE, 2013 entwickelt. Die Grundlage dieser Kalibrationsstrategie bildet die Verwendung von Referenzmaterialien, welche an die Probematrix teilweise angepasst sind. Die Anpassung der Standards beruht auf der Verwendung einer kohlenstoffhaltigen Matrix. In der zitierten Arbeit stellte sich der Einsatz einer Acrylatlackmatrix (siehe Abschnitt 3.2.1) als am vielversprechendsten heraus.

Die Vorgehensweise der matrixunabhängigen Kalibrationsstrategie umfasst eine externe Kalibration mit den oben erwähnten Standards auf Basis der Acrylatlackmatrix. Proben und Standards werden unter identischen Bedingungen mittels LA-ICP-MS gemessen. Die so erhaltenen Signalverläufe von Probe und Standards werden untergrundkorrigiert und über das  $^{13}\text{C}$  Signal normalisiert. Durch die Normalisierung werden Fluktuationen in der Laserfluenz und damit einhergehende Änderungen der Ablationsrate sowie teilweise Matrixeffekte und der Drift des Messsystems kompensiert. Als weiterer Schritt wurden die normalisierten Intensitäten der Analyten mit dem mittleren Massenanteil von Kohlenstoff nach Gl. 6 verrechnet und so der von Probe und Standard abweichende Kohlenstoffgehalt korrigiert.

$$\Psi_{\frac{\text{Analyt}}{^{13}\text{C}}} = \frac{I_{\text{Analyt}}}{I_{^{13}\text{C}}} \cdot \omega_{\text{C}} \quad \text{Gl. 6}$$

$$\omega_{\text{Analyt}} = \frac{\left( \Psi_{\frac{\text{Analyt}}{^{13}\text{C}}} - A \right)}{E} \quad \text{Gl. 7}$$

Anhand der Empfindlichkeit  $E$  und des Achsenabschnittes  $A$  aus der externen Kalibration der Referenzmaterialien auf Basis der Acrylatlackmatrix kann mit dem korrigierten Intensitätsverhältnis ( $\Psi$ ) der Massenanteil ( $\omega$ ) des Analyten in der Probe nach Gl. 7

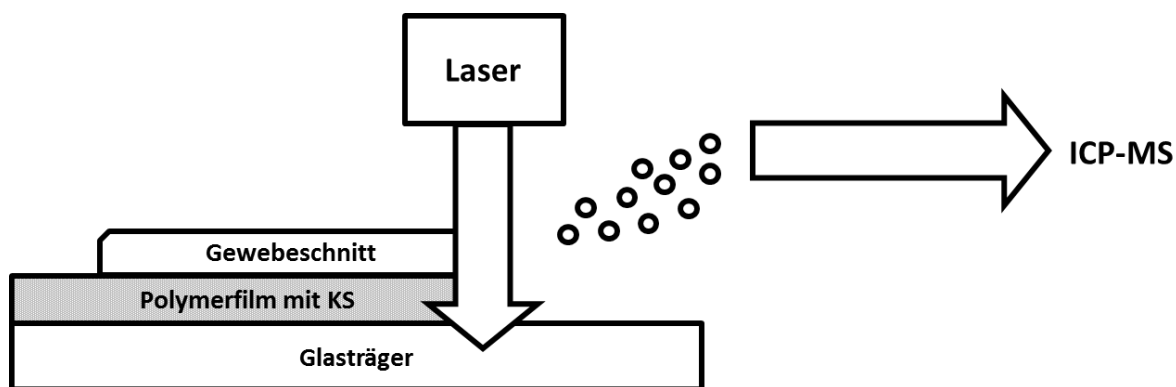
bestimmt werden. Der mittlere Kohlenstoffgehalt von Probe und Standard wurde mittels Elementaranalyse aus homogenisiertem Material bestimmt.

In der Arbeit von THIELEKE, 2013 wurde diese Kalibrationsstrategie anhand vier verschiedener Matrices (Agarosegel, Chitosan, gemahlene Pflanzenmaterial und Polyacrylat) für den Analyten Nickel getestet und zur Lokalisierung und Quantifizierung von Beryllium in einer Maiswurzel eingesetzt. Für die Validierung der Vorgehensweise wurde eine Probe aus homogenisiertem Material der berylliumhaltigen Wurzel hergestellt und die Analyseergebnisse der LA-ICP-MS mit dem mittels ICP-OES nach Mikrowellendruckaufschluss hausinternen zertifizierten Wert verglichen. Die Richtigkeit betrug dabei  $\approx 93\%$  und die Unsicherheit lag bei  $\leq 15\%$ . Die von FRICK ET AL., 2012 beschriebene Untauglichkeit von Kohlenstoff zur internen Standardisierung, begründet in dem Effekt des matrixabhängigen Vorliegens von Kohlenstoff in einer gasförmigen und partikulären Spezies, konnte in der Arbeit nicht bestätigt werden.

Ähnlich wie in den anderen Kalibrationsstrategien ist die Verwendung von Kohlenstoff als interner Standard fehlerbehaftet, denn in den meisten biologischen Proben liegt das Matrixelement Kohlenstoff, wie auch kein anderes Element, nicht vollständig homogen verteilt vor. Bei lokal abweichendem Kohlenstoffgehalt in der Probe würde das zu analysierende Element über- oder unterbestimmt. Auch lokale Matrixeffekte der Probe, wie z. B. der lokale Anstieg eines mit dem Analyten interferierenden Elements oder eines leicht ionisierbaren Elements, welches Einfluss auf das Ionisierungsgleichgewicht nimmt (AGATEMOR ET AL., 2011), werden nicht korrigiert. Diese genannten Effekte können die Richtigkeit der Methode stark verringern. In Anbetracht der für die Normalisierung zur Verfügung stehenden Elemente stellt Kohlenstoff dennoch die beste Alternative dar. Denn Kohlenstoff, als Hauptbestandteil und Matrixelement in biologischen Proben, zeigt die homogenste Verteilung mit den geringsten lokalen Abweichungen auf. Ein Vorteil dieser Kalibrationsstrategie liegt in der äußerst homogenen Elementverteilung der Analyten in den Referenzmaterialien auf Basis der Acrylatlackmatrix. Weiterhin stellt die Wiederverwendbarkeit und breite Anwendbarkeit für eine Vielzahl an verschiedenen biologischen Proben einen weiteren Vorteil der Methode dar.

### 2.2.7 Kalibration mit Dünnschichtstandards

Die Verfahrensweise der Quantifizierung von Elementverteilungen in biologischen Proben mittels LA-ICP-MS durch Kalibration mit Dünnschichtstandards bildet eine weitere Kalibrationsstrategie. Die Methode wurde in der Veröffentlichung von AUSTIN ET AL., 2010 erstmalig beschrieben. Die Grundlage dieser Methode bildet die simultane Laserablation eines Probendünnschnittes und eines dünnen Polymerfilms (siehe Abb. 2. 6), welcher mit einem geeigneten Element zur internen Standardisierung gedopt ist. Die Polymerfilme wurden aus Polymethylmethacrylat (PMMA) durch Rotationsbeschichtung hergestellt. Die Dotierung der Polymerlösung erfolgte mit Einzelelementstandards auf Ölbasis. Um die gleichzeitige Laserablation zu ermöglichen, wird der Probendünnschnitt mit einer Dicke von 10 – 30  $\mu\text{m}$  auf dem dotierten Polymerfilm aufgebracht. Der Polymerfilm wiederum ist auch nur einige zehn  $\mu\text{m}$  dick und auf einem Glasträger als Substrat aufgebracht. In der Veröffentlichung wird der Begriff „interner Standard“ verwendet, welcher jedoch genau betrachtet nicht korrekt ist, da das Element zur internen Standardisierung nicht in der Probe vorliegt, sondern durch die simultane Laserablation des Polymerfilms mit der Probe gleichzeitig gemessen wird. Daher wird in dieser Arbeit der Terminus „Korrekturstandard“ (KS) verwendet.



**Abb. 2. 6:** Darstellung der schematischen Vorgehensweise bei der simultanen Laserablation von Probe und Korrekturstandard nach AUSTIN ET AL., 2010.

Durch diese Vorgehensweise kann beinahe jedes beliebige Element als Korrekturstandard eingesetzt werden, welches die Kriterien nach VANHAECKE ET AL. 1992, LONGERICH ET AL., 1996, FINLEY-JONES ET AL. 2008 und FRICK ET AL. 2012 für einen internen Standard erfüllt. Zur Kalibration werden statt des Gewebeschnittes Dünnschnitte polymerer Kalibrationsstandards verwendet. Für eine präzise Quantifizierung müssen sowohl Probe als auch Standard über die gleiche Schichtdicke verfügen. Auch die Schichtdicke des

Polymerfilms, welcher als Korrekturstandard eingesetzt wird, darf zwischen der Probe und den Kalibrationsstandards nicht variieren. Ein weiteres wichtiges Kriterium stellt die vollständige Ablation beider Schichten dar, um den Einfluss des matrixabhängigen Ablationsverhaltens korrigieren zu können. Dieses Verfahren ermöglicht durch die homogene Verteilung des Korrekturstandards die Korrektur von Schwankungen in der Ablationsrate durch den Laser sowie Signalschwankungen durch das Messsystem. Weiterhin werden bei idealer Wahl des Korrekturstandards auch die Variation zwischen Probe und Standard beim Transport des ablatierten Aerosols und der Ionisierung im Plasma teilweise korrigierbar. Das Ausmaß der Korrektur hängt von der Ähnlichkeit im Ablationsverhalten von Probe und Standard ab. Denn vollkommen unterschiedliche Partikelgrößen des ablatierten Materials resultieren in signifikanten Unterschieden bei dem Grad der Vollständigkeit bei der Ionisierung. Daher ist zumindest eine teilweise Matrixanpassung der Standards an die Probe unumgänglich. Auch lokale Effekte der Probenmatrix können durch einen geeigneten Standard zur Normalisierung korrigiert werden.

In der Publikation wurden Bestimmtheitsmaße von  $\geq 0,999$  bei Verwendung von  $^{89}\text{Y}$  oder  $^{101}\text{Ru}$  als Korrekturstandard beschrieben. Für die Validierung der Methode wurden Gewebestandards aus homogenisierten Hühnerbrüsten, welche mit Kupfer und Zink gedopt waren, hergestellt. Die mittels Laserablation ermittelten Massenanteile wurden mit dem intern zertifizierten Wert der ICP-MS-Analyse nach Aufschluss verglichen. Bei der Validierung wurden verschiedene Korrekturstandards ( $^{13}\text{C}$ ,  $^{89}\text{Y}$  und  $^{101}\text{Ru}$ ) getestet, um den Einfluss der Elemente als Korrekturstandard zu untersuchen. Die Normalisierung über  $^{89}\text{Y}$  und  $^{101}\text{Ru}$  führte zu ähnlichen Ergebnissen und zeigte eine mittlere Richtigkeit von  $\geq 70\%$ . Die Normalisierung über  $^{13}\text{C}$  zeigte eine geringere mittlere Abweichung zum zertifizierten Wert, und eine Richtigkeit von  $\approx 80\%$  wurde erreicht. Die Unsicherheit lag bei  $\approx 12\%$  für die Normalisierung über  $^{13}\text{C}$  und bei  $\approx 25\%$  bei  $^{89}\text{Y}$  und  $^{101}\text{Ru}$ . Die hohe Unsicherheit der LA-ICP-MS Analyse sowie auch bei der Quantifizierung mittels ICP-MS nach Aufschluss ( $\approx 25\%$ ) lässt Inhomogenitäten im homogenisierten Gewebestandard, ein stark abweichendes Ablationsverhalten zwischen Standard und Probe oder eine schlechte Wahl des Kalibrationsbereiches vermuten. Denn die Kalibration scheint mit dem  $R^2 \geq 0,999$  nicht die Fehlerquelle darzustellen. Aus den Ergebnissen wird die Wichtigkeit der Validierung der LA-ICP-MS Ergebnisse deutlich, da eine zufriedenstellende Kalibration trotzdem zu falschen

Ergebnissen führen kann. Von der Vorgehensweise der Methode her betrachtet, wäre eine höhere Richtigkeit zu erwarten gewesen.

Die eigentlichen Vorteile dieser Methode liegen in der Einsetzbarkeit von beinahe jedem Element für die Normalisierung je nach Fragestellung und die damit verbundene mögliche Korrektur von lokalen Matrixeffekten in der Probe. Bei der Verwendung polymerer Referenzmaterialien für die Kalibration stellt das breite Anwendungsgebiet für eine Vielzahl an biologischen Proben einen weiteren Vorteil dar. Ein Nachteil dieser Methode ist die relativ zeitintensive und komplexe Herstellung der Dünnschichtstandards und deren Charakterisierung sowie das Aufbringen des Probendünnschnitts.

### **2.2.8 Isotopenverdünnungsanalyse mittels Laserablation**

Wie bereits im Abschnitt 2.2.3 erwähnt, stellt auch die Isotopenverdünnungsanalyse mittels Laserablation eine Auswertestrategie für die Quantifizierung von biologischen Proben dar. Die Vorgehensweisen bei der Isotopenverdünnungsanalyse sind dabei äußerst vielfältig.

Eine bereits häufig publizierte Methode stellt die Isotopenverdünnungsanalyse mit Flüssigstandards dar (BECKER, 2002; BECKER ET AL., 2004; PICKHARDT ET AL., 2006; SELA ET AL., 2007). Dabei wird zunächst die zu analysierende Probe bei zeitgleicher Zerstäubung von verdünnter Salpetersäure (2 Gew.-%) ablatiert, gemessen und das Isotopenverhältnis des Analyten bestimmt. Darauf folgt die Ablation der Probe unter der parallelen Zerstäubung der isotonenangereicherten Spikelösung. In dem Blend, also der Mischung aus Probe und Spike, wird ebenfalls das Isotopenverhältnis bestimmt. Zuletzt wird das Isotopenverhältnis der Spikelösung bestimmt, dies geschieht ohne die Ablation eines Probenblindwertes. Anhand der drei Isotopenverhältnisse wird die Isotopenverdünnungsanalyse durchgeführt. Da sich die Empfindlichkeiten von LA-ICP-MS und ICP-MS unterscheiden, wird ein Korrekturfaktor, welcher anhand eines internen Standards bestimmt wurde, verwendet, um die verschiedenen Empfindlichkeiten anzugleichen. Mit diesem Verfahren wurden unter anderem die Elemente Uran in Haaren (SELA ET AL., 2007) und dem zertifizierten Referenzmaterial NIST SRM 1515 (PICKHARDT ET AL., 2006) sowie Silber, Thallium und Blei im zertifizierten Referenzmaterial NIST SRM 681 (BECKER ET AL., 2004) bestimmt. In den zuvor genannten Publikationen wurde eine Richtigkeit von 90 - 95 % und eine Unsicherheit von  $\leq 10$  % beschrieben.

Die Vorteile dieser Methode liegen in der relativ einfach zu implementierenden Vorgehensweise sowie in der breiten Verfügbarkeit von isotopenangereicherten Spikelösungen. Ein Nachteil jedoch stellt das abweichende Transport- und Ionisierungsverhalten im ICP der zerstäubten Spikelösung im Vergleich zu dem ablatierten Material der Probe dar (siehe Abschnitt 2.2.3). Weiterhin ist ein homogen verteilter interner Standard nötig, welcher – wie bereits erwähnt – in biologischen Proben in der Regel nicht vorliegt. Daher wurde dieses Verfahren auch bisher nicht für die Erstellung von Elementverteilungsbildern in biologischen Proben eingesetzt.

Eine weitere Herangehensweise für die Isotopenverdünnungsanalyse wurde in der Publikation von REID ET AL., 1999 veröffentlicht. Als Proben dienten Gesteinsproben, welche fein vermahlen mit einer angereicherten Spikelösung der zu analysierenden Elemente verschmolzen wurden und den Blend bildeten. Für die Messung des Isotopenverhältnisses der Probe wurden die Gesteinsproben ohne Zugabe der Spikelösung aufgeschmolzen. Das Isotopenverhältnis des Spikes wurde durch das Einschmelzen der Spikelösung in ein Blindwertmaterial erreicht. Die Homogenität der so erhaltenen Glaskugeln wurde durch mehrfaches Aufschmelzen erreicht. In der genannten Veröffentlichung wurden für die Analyse von Zirkonium und Hafnium in den Gesteinsproben eine Richtigkeit von  $\geq 95\%$  und eine mittlere Unsicherheit von  $\leq 5\%$  erreicht. Die Validierung wurde anhand von Literaturdaten durchgeführt.

Analog zu der Methode der Isotopenverdünnungsanalyse durch Zerstäubung von Flüssigstandards ist ein Vorteil die Verfügbarkeit der angereicherten Spikelösung. Die Vorgehensweise gestaltet sich jedoch komplexer und zeitaufwendiger. Allerdings wird kein interner Standard zur Korrektur der Empfindlichkeit benötigt, da der gesamte Prozess der Isotopenverdünnungsanalyse am Feststoff durchgeführt wird und damit kein abweichendes Ionisierungsverhalten von Spike und Probe im Plasma vorliegt. Einen entscheidenden Nachteil stellt die Homogenisierung der Probe mit dem Spike dar, wodurch jegliche Ortsauflösung verloren geht. Weiterhin kann diese Methode nicht für alle Analyten eingesetzt werden, da durch die Aufschmelzung flüchtige Elemente verloren gehen. Auch der Einsatz für biologische Proben ist äußerst fraglich, denn die meist stark kohlenstoffhaltigen Proben würden veraschen und könnten nur mit einem geeigneten

Blindwertmaterial ins Glas geschmolzen werden. Damit scheint diese Methode eher ungeeignet für die Quantifizierung von lokalen Elementverteilungen in biologischen Proben.

Eine ähnliche Herangehensweise wurde in der Veröffentlichung von TIBI ET AL., 2003 publiziert. In dieser Arbeit wurde die Spikelösung zu der pulverförmigen Probe hinzugegeben und aufgeschwemmt. Um die Probe vollständig zu benetzen, wurde Methanol hinzugegeben und für kurze Zeit ruhen gelassen. Im Anschluss daran wurden die gespikten Proben bei 60 °C getrocknet, mittels Teflon-Mörser und -Pistill homogenisiert und in Tablettenform gepresst. Mittels LA-ICP-MS wurden die Tabletten Probe, Spike und Blend gemessen, die Isotopenverhältnisse bestimmt und die Isotopenverdünnungsanalyse durchgeführt. Auf diese Art wurden verschiedene Elementgehalte in unterschiedlichen zertifizierten Referenzmaterialien, darunter auch biologische Referenzmaterialien, bestimmt. Die Richtigkeit lag im Mittel bei  $\geq 96 \%$  und eine Unsicherheit von  $\approx 5 \%$  wurde erreicht.

Die Vorteile und Nachteile dieser Vorgehensweise sind im Wesentlichen ähnlich zu der in der Arbeit von REID ET AL., 1999 beschriebenen Methode. Allerdings ist diese Vorgehensweise nach TIBI ET AL., 2003 deutlich besser für die Quantifizierung von Elementgehalten in biologischen Proben geeignet. Jedoch geht auch bei dieser Methode jegliche Ortsauflösung in der Probe verloren und es kann keine Elementverteilung untersucht werden.

Eine andere Art der Mischung von Probe und Spike wird in der Veröffentlichung von CLAVERIE ET AL., 2013 beschrieben. In dieser Publikation werden der halbkreisförmige Bulk einer homogenisierten Probe und der eines isotonenangereicherten Spikes auf einer um die eigene Achse rotierenden Plattform in der Ablationskammer platziert. Die beiden Bulks werden durch Einschmelzen der Probe bzw. der Spikelösung in eine Lithiumboratmatrix hergestellt. Für die Bestimmung der Isotopenverhältnisse von Probe und Spike wird jeweils der betreffende halbkreisförmige Bulk ohne Rotation der Plattform ablatiert. Im Gegensatz dazu wird für die Bestimmung des Isotopenverhältnisses des Blends die Plattform mit bis zu  $2.000 \text{ min}^{-1}$  rotieren gelassen. Dadurch werden im Wechsel Spike und Probe ablatiert und die Mischung (Blend) beider gemessen. Nach der Korrektur der möglicherweise verschiedenen Ablationsraten kann der Massenanteil des Analyten in der Probe anhand der Isotopenverhältnisse berechnet werden. In der Publikation wird eine mittlere Richtigkeit von  $\approx 95 \%$  und eine Unsicherheit von  $\leq 8 \%$  angegeben.

Auch diese Vorgehensweise zeigt die gleichen Vorteile und Nachteile auf wie die Methode aus der Veröffentlichung von REID ET AL., 1999. Weiterhin ist auch diese Vorgehensweise für die lokale Quantifizierung von Elementgehalten in biologischen Proben nicht geeignet.

Eine Verfahrensweise, welche die Untersuchung und Quantifizierung von lokalen Elementgehalten in biologischen Proben ermöglichen könnte, wird in der Publikation von DOUGLAS ET AL., 2016 beschrieben. In der Arbeit wird der Ansatz der simultanen Einleitung einer zerstäubten, isopenangereicherten Spikelösung verwendet, aber auf einen internen Standard zur Korrektur der unterschiedlichen Empfindlichkeiten verzichtet. Stattdessen wird die mittlere Massenflussrate der ablatierten Probe durch eine einfache Isotopenverdünnungsanalyse bestimmt. Dazu wird aus homogenisiertem Probenmaterial ein Bulk hergestellt und nach Totalaufschluss eines Aliquoten der Analytgehalt bestimmt. Mit dem bekannten Analytgehalt des homogenisierten Bulks erfolgt die Berechnung der mittleren Massenflussrate unter der Annahme, dass der Spike vollständig zerstäubt und transportiert wird. Danach erfolgt anhand der bestimmten mittleren Massenflussrate der Probe und den Isotopenverhältnissen von Probe, Spike und Blend die Berechnung des Massenanteils des Analyten. Bei dieser Vorgehensweise könnte der Massenanteil des Analyten auch orts aufgelöst bestimmt werden. In der Veröffentlichung wurde eine Richtigkeit von  $\geq 80\%$  und eine Unsicherheit von  $\approx 20\%$  angegeben. Einen großen Beitrag zur Unsicherheit lieferte die Masse des Spikes mit  $29,6\%$ .

Ein Vorteil der Methode liegt in der potenziellen Eignung für orts aufgelöste Quantifizierungen von Elementgehalten. Allerdings kann bei biologischen Proben eine deutliche lokale Abweichung von der mittleren Massenflussrate vorliegen, was die Richtigkeit der Methode stark beeinflusst. Weiterhin erscheint die gesamte Verfahrensweise relativ komplex und zeitaufwendig. Ein weiteres Problem stellt die Unsicherheit der Masse des Spikes dar, welche jegliche Verwendung von Flüssigstandards bei der LA-ICP-MS betrifft und die Unsicherheit der Methoden erhöht.

Alle in diesem Abschnitt dargestellten Vorgehensweisen spiegeln die Leistungsfähigkeit der Isotopenverdünnungsanalyse in Bezug auf Richtigkeit und Unsicherheit wider. Durch eine Methode, welche die orts aufgelöste Isotopenverdünnungsanalyse ermöglicht, könnte die Richtigkeit von Elementverteilungsbildern deutlich erhöht und die lokale Quantifizierung geringer Unterschiede im Massenanteil der Analyten ermöglicht werden. Aus diesem Grund



wird in dieser Arbeit die Methode der festkörperbasierten Isotopenverdünnungsanalyse entwickelt (siehe Abschnitt 2.4) und für die Analyten Blei (siehe Abschnitt 4) und Silber (siehe Abschnitt 5) erprobt und validiert.

### **2.3 Theorie zur Isotopenverdünnungsanalyse mittels ICP-MS**

In diesem Abschnitt werden die theoretischen Grundlagen der Isotopenverdünnungsanalyse mittels induktiv gekoppelter Plasma-Massenspektrometrie (im engl. *isotope dilution via inductively coupled plasma mass spectrometry*, ICP-IDMS) komprimiert zusammengefasst. Umfangreichere Literatur zu diesem Thema ist in den Publikationen von VOGL ET AL., 2000; VOGL ET AL., 2010; VOGL, 2012 und GARCIA ALONSO ET AL., 2013 zu finden.

Der genaue Ursprung der Isotopenverdünnungsanalyse (ID) ist nicht überliefert, da in der Literatur unterschiedliche Ursprünge diskutiert werden (VOGL ET AL., 2010). In der Mehrheit der Literaturquellen wird jedoch dem Fachbereich der Zoologie die erstmalige Verwendung der Isotopenverdünnungsanalyse im Jahre 1933 zugeschrieben (BERGLUND, 2004). Allerdings wurde das Grundprinzip durch VON HEVESY und PANETH bereits im Jahre 1913 für die Bestimmung der Löslichkeit von Bleisulfid in Wasser anhand eines radioaktiven Bleiisotops entwickelt, welches heute als Ursprung für die radiochemische Isotopenverdünnungsanalyse gilt (VON HEVESY ET AL., 1913). Etwa dreißig Jahre nach der erstmaligen Veröffentlichung wurde VON HEVESY im Jahr 1943 für seine Arbeiten, die den Einsatz von radioaktiven Isotopen als Tracer für die Untersuchung von chemischen Prozessen beinhaltete, welche unter anderem den Einsatz der radiochemischen Isotopenverdünnungsanalyse umfasste, mit dem Nobelpreis für Chemie ausgezeichnet (NOBELSTIFTUNG, 2016). Einige Jahre später mit der Entwicklung und Verbreitung der Massenspektrometer wurde das Prinzip der Isotopenverdünnungsanalyse mit der Massenspektrometrie kombiniert und die Isotopenverdünnungsanalyse mittels Massenspektrometrie (IDMS) in ihrer heutigen grundlegenden Form gebildet. In den frühen 1990er Jahren wurden die ersten IDMS-Analysen unter der Verwendung eines induktiv gekoppelten Plasmas (ICP) publiziert (OKAMOTO, 1991; IGARASHI ET AL., 1992). Seit dieser Zeit hat sich an dem Prinzip der ICP-IDMS nichts Grundlegendes verändert, dennoch wurden Vorgehensweisen wie die doppelte und dreifache Isotopenverdünnungsanalyse zur Reduzierung der Unsicherheit der Messergebnisse entwickelt und etabliert (VOGL ET AL., 2010; GARCIA ALONSO ET AL., 2013). Die ICP-IDMS zeichnet sich durch eine sehr hohe Selektivität und Nachweisstärke aus. Daher

wird diese Methode in der Elementanalytik zur Spuren- bzw. Ultrapurenanalyse eingesetzt. Weiterhin erfüllt die ICP-IDMS die Richtlinien für Primärmethoden des Beratenden Komitees für die Stoffmenge und Metrologie in der Chemie (CCQM), eines Unterausschusses des Internationalen Komitees für Maß und Gewicht (CIPM). Im herkömmlichen Sinne handelt es sich bei Primärmethoden „um absolute oder definitive Methoden, die auf höchstem metrologischen Niveau, d.h. mit kleinstmöglicher Unsicherheit, angewendet werden“ (PTB, 2016). Daher wird die ICP-IDMS häufig für die Zertifizierung von Referenzmaterialien (VOGL ET AL., 2000; VOGL, 2007; VOGL ET AL., 2010) und für Analysen mit geringen Wiederfindungsraten eingesetzt. Der Großteil der Anwendungen der ICP-IDMS basiert auf der Verwendung von flüssigen Proben und Spikes. Die in Abschnitt 2.2.8 erwähnten Kombinationen der ICP-IDMS mit der Laserablation von Festkörpern stellen eine Minderheit dar.

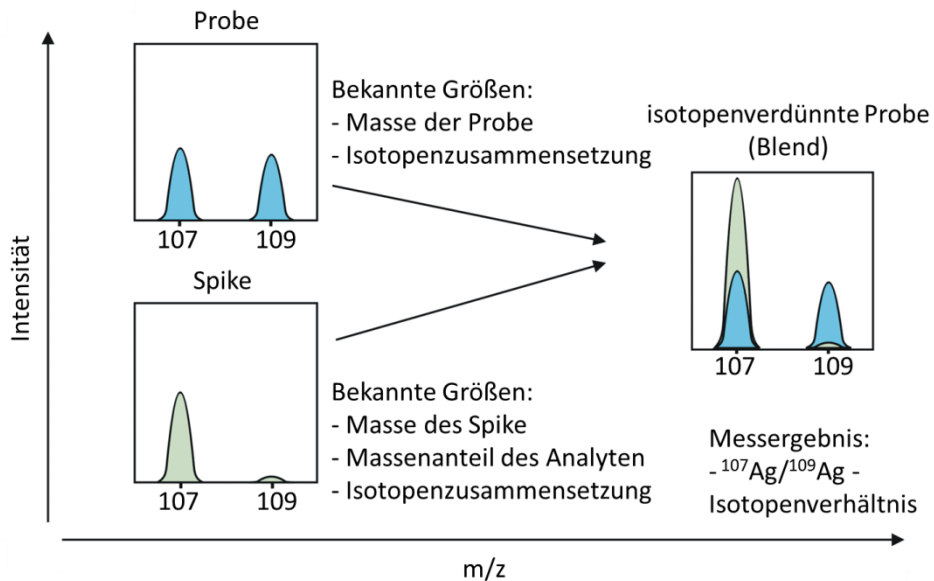
Grundsätzlich ist die Anwendung der ICP-IDMS nur für Elemente mit mindestens zwei stabilen Isotopen durchführbar; daher ist diese Methode für die anisotope Elemente nicht einsetzbar (siehe Tab. 2. 2). Im Gegensatz dazu ist die radiochemische Isotopenverdünnungsanalyse auch für Elemente mit nur einem stabilen Isotop anwendbar, wenn ein radioaktives Isotop mit einer hinreichend großen Halbwertszeit zur Verfügung steht.

**Tab. 2. 2: Anzahl der stabilen Isotope der Elemente des Periodensystems nach GARCIA ALONSO ET AL., 2013**

Anzahl der stabilen Isotope	Elementsymbol
10	Sn
9	Xe
8	Cd, Te
7	Mo, Ru, Ba, Nd, Sm, Gd, Dy, Yb, Os, Hg
6	Ca, Se, Kr, Pd, Er, Hf, Pt
5	Ti, Ni, Zn, Ge, Zr, W
4	S, Cr, Fe, Sr, Ce, Pb
3	O, Ne, Mg, Si, Ar, K, U
2	H, He, Li, B, C, N, Cl, V, Cu, Ga, Br, Rb, Ag, In, Sb, La, Eu, Lu, Ta, Re, Ir, Tl
1	Be, F, Na, Al, O, Sc, Mn, Co, As, Y, Nb, Rh, I, Cs, Pr, Tb, Ho, Tm, Au, Bi, Th

Das zugrundeliegende Prinzip der IDMS beruht auf der Veränderung des Isotopenverhältnisses der Probe mit einer bekannten Isotopenzusammensetzung durch die Zugabe eines isotopenangereicherten Standards (Spike) mit einer ebenfalls bekannten Isotopenzusammensetzung und einem bekannten Massenanteil des zu analysierenden Elements. In der Mischung aus Probe und Spike, dem sogenannten Blend, stellt sich ein

neues Isotopenverhältnis ein. Bei ebenfalls bekannter Masse der zum Blend zugegebenen Probe und des isotonenangereicherten Spikes kann der Massenanteil des Analyten in der untersuchten Probe berechnet werden. Voraussetzung hierfür ist die vollständige Durchmischung von Probe und Spike im Blend, damit die Isotopenzusammensetzung homogen vorliegt. In Abb. 2. 7 ist das vereinfachte Prinzip der Isotopenverdünnungsanalyse am Beispiel für Silber dargestellt.



**Abb. 2. 7: Schematische Darstellung des Prinzips der Isotopenverdünnungsanalyse am Beispiel von Silber mit den beiden stabilen Isotopen  $^{107}\text{Ag}$  und  $^{109}\text{Ag}$  nach VOGL ET AL., 2010.**

Die Isotopenanreicherung des Ausgangsmaterials für den Spike beruht auf dem relativen Massenunterschied der Isotope. Da sich die Isotope nur minimal in ihren chemischen Eigenschaften unterscheiden, sind in der Regel keine chemischen Verfahren zur Trennung der Isotope möglich. Bei den leichten Elementen, wie Wasserstoff und Lithium, ist die Trennung der Isotope aufgrund des relativ großen Massenunterschieds mit einfacheren Mitteln zu erreichen. Als Beispiel hierfür gilt die Trennung von schwerem Wasser  $\text{D}_2\text{O}$  (Schmelzpunkt:  $3,8\text{ °C}$ , Siedepunkt:  $101,4\text{ °C}$  nach SIGMA-ALDRICH, 2016) und leichtem Wasser  $\text{H}_2\text{O}$  (Schmelzpunkt:  $0\text{ °C}$ , Siedepunkt:  $99,97\text{ °C}$  nach LECHER ET AL., 2015). Bei schweren Elementen kommen Verfahren wie Gasdiffusion, kyrogenische Destillation, Gaszentrifugation, laserinduzierte Ionisation und elektromagnetische Trennung aufgrund des geringen relativen Massenunterschieds zum Einsatz (GARCIA ALONSO ET AL., 2013). Diese Verfahren werden als Mehrstufenprozesse durchgeführt, wobei die Anreicherung bzw. Abreicherung des betreffenden Isotops mit jeder Stufe zu- bzw. abnimmt. Die

Isotopentrennung der schweren Elemente gestaltet sich im Vergleich zu den leichten Elementen aufwendiger und kostenintensiver. Das wohl bekannteste Beispiel stellt die Anreicherung von  $^{235}\text{U}$  für Kernbrennstoff in Kernreaktoren und Kernwaffen durch Gaszentrifugation von gasförmigem Uranhexafluorid ( $\text{UF}_6$ ) dar (WORLD NUCLEAR ASSOCIATION, 2016).

In der Literatur werden verschiedene Vorgehensweisen für die Berechnung des Massenanteils des zu analysierenden Elements beschrieben. Die erste Vorgehensweise stellt die einfache Isotopenverdünnungsanalyse dar und wird nach dem in Abb. 2. 7 beschriebenen Vorgehen durchgeführt. Die einfache Isotopenverdünnungsanalyse basiert auf den drei verschiedenen Isotopenverhältnissen von Probe, Spike sowie des Blends und bildet die simpelste Form der Isotopenverdünnungsanalyse. Der Massenanteil des Analyten in der Probe wird nach Gl. 8 berechnet.

Auf die Herleitung der nachfolgenden Formeln für die Isotopenverdünnungsanalyse wird in dieser Arbeit verzichtet. Eine ausführliche Herleitung kann den Publikationen von VOGL ET AL., 2010 und GARCIA ALONSO ET AL., 2013 entnommen werden.

$$\omega_x = \omega_{y,b} \cdot \frac{M_x \cdot m_y}{M_b \cdot m_x \cdot a_{x,b}} \cdot \frac{(R_y - R_{xy})}{(R_{xy} - R_x)} \quad \text{Gl. 8}$$

- Mit  $M_b$  Atommasse des Isotops b  
 $M_x$  Standard Atommasse des Elements in der Probe  
 $R_x$  Isotopenverhältnis der Probe  
 $R_{xy}$  Isotopenverhältnis des Blend  
 $R_y$  Isotopenverhältnis des Spike  
 $a_{x,b}$  Häufigkeit des Isotops b in der Probe  
 $m_x$  Masse der Probe  
 $m_y$  Masse des Spike  
 $\omega_x$  Massenanteil des Elements in der Probe  
 $\omega_{y,b}$  Massenanteil des Isotops b in dem Spike

Eine weitere Vorgehensweise stellt die doppelte Isotopenverdünnungsanalyse unter der Verwendung eines zertifizierten Primärstandards, dem sogenannten Backspike, dar. Bei dem Backspike handelt es sich um einen Standard, welcher über eine hohe Reinheit und einen zertifizierten Massenteil des Analyten sowie über ein zertifiziertes Isotopenverhältnis nahe dem natürlichen Isotopenverhältnis der Analyten verfügt. Der Backspike dient zur Zertifizierung des Spikes, da isotonenangereichertes Material häufig nur in geringen Mengen

mit unzureichender Reinheit zur Verfügung steht und daher aufwendige Zertifizierungen und ein hoher Verbrauch des Spikes verhindert werden sollen. Mit der kommerziellen Verfügbarkeit von Isotopenangereicherten Standardlösungen mit einem zertifizierten Massenanteil und Isotopenverhältnis für eine Vielzahl der Elemente wurde dieser Ansatz in der Routineanalytik überflüssig und daher hauptsächlich für die Zertifizierung von Referenzmaterialien durch metrologische Institutionen und Organisationen eingesetzt.

Im Grunde werden zwei Isotopenverdünnungsanalysen kombiniert. Die erste Isotopenverdünnungsanalyse wird mit Backspike und Spike, welcher als Probe dient, durchgeführt. Diese werden analog zu dem oben beschriebenen Vorgehen der einfachen Isotopenverdünnungsanalyse gemischt und bilden ebenfalls einen Blend. Durch diese erste durchgeführte Isotopenverdünnungsanalyse wird somit der Spike charakterisiert und in der zweiten Isotopenverdünnungsanalyse zur Bestimmung des Massenanteils der Probe, ebenfalls analog zu dem oben beschriebenen Vorgehen, eingesetzt. Dieser Vorgang der zwei Isotopenverdünnungsanalysen wird in Gl. 9 zusammengefasst.

$$\omega_x = \frac{M_x \cdot m_y}{a_{x,b} \cdot M_b \cdot m_x} \cdot \frac{a_{z,b} \cdot M_b \cdot m_z}{M_z \cdot m_{y'}} \cdot \omega_z \cdot \frac{(R_y - R_{xy})}{(R_{xy} - R_x)} \cdot \frac{(R_{zy'} - R_z)}{(R_{y'} - R_{zy'})} \quad \text{Gl. 9}$$

- Mit
- $M_b$  Atommasse des Isotops b
  - $M_x$  Standard Atommasse des Elements in der Probe
  - $M_z$  Standard Atommasse des Elements im Back-Spike
  - $R_x$  Isotopenverhältnis der Probe
  - $R_{xy}$  Isotopenverhältnis des Blend 1 (Spike/ Probe)
  - $R_y$  Isotopenverhältnis des Spike
  - $R_{y'}$  Isotopenverhältnis des Spike
  - $R_z$  Isotopenverhältnis des Back-Spike
  - $R_{zy'}$  Isotopenverhältnis des Blend 2 (Spike/ Back-Spike)
  - $a_{x,b}$  Häufigkeit des Isotops b in der Probe
  - $a_{z,b}$  Häufigkeit des Isotops b im Back-Spike
  - $m_x$  Masse der Probe
  - $m_y$  Masse des Spikes in Blend 1 (Spike/ Probe)
  - $m_{y'}$  Masse des Spikes in Blend 2 (Spike/ Back-Spike)
  - $m_z$  Masse des Back-Spike
  - $\omega_x$  Massenanteil des Elements in der Probe
  - $\omega_z$  Massenanteil des Elements im Back-Spike

Im Rahmen dieser Arbeit wird die doppelte Isotopenverdünnungsanalyse allerdings eher als Analyse eines Kontrollstandards zur Überprüfung der Methode durchgeführt. Das heißt, der Massenanteil der Probe wird zwar nach der Formel für die doppelte

Isotopenverdünnungsanalyse berechnet, aber als Ergänzung wird bei jeder Anwendung eine Überprüfung des Spikes mittels einfacher Isotopenverdünnungsanalyse durchgeführt. Denn wenn sowohl Backspike als auch Spike ausreichend charakterisiert sind, kann die Methode bei jeder Anwendung auf ihre Richtigkeit überprüft werden. Außerdem können so mögliche Veränderungen des Spikes identifiziert werden.

Die dreifache Isotopenverdünnungsanalyse wird in dieser Arbeit nicht angewendet und daher nur kurz angerissen. Im Grunde wird zur Vermeidung einer Kontamination des ICP-MS durch den stark isotonen angereicherten Spike eine weitere dritte Isotopenverdünnungsanalyse durchgeführt, um auf die direkte Bestimmung des Isotopenverhältnisses des Spikes verzichten zu können (MILTON ET AL., 2002; MILTON ET AL., 2003).

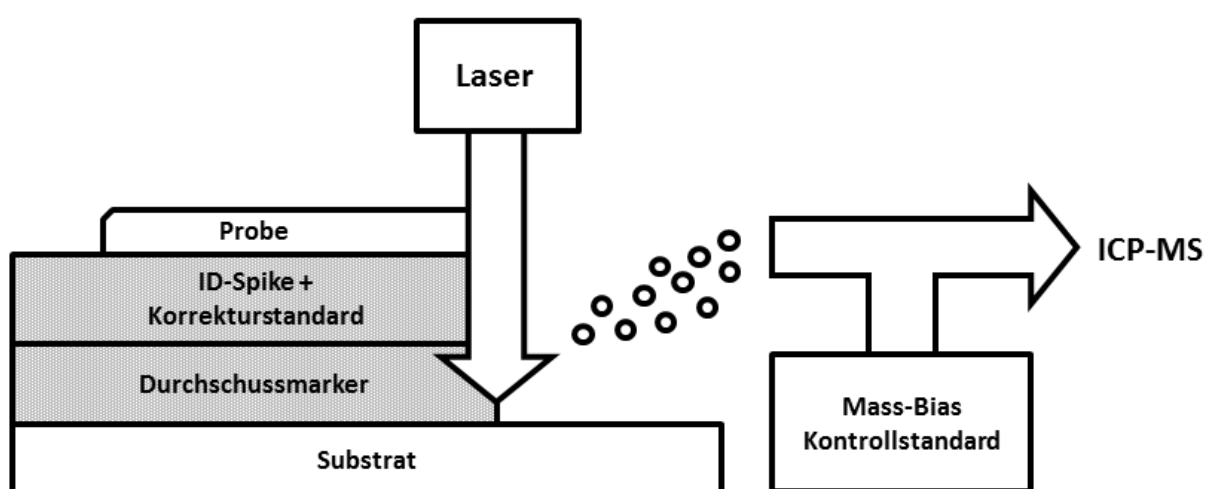
Die typischerweise erreichbaren relativen erweiterten Unsicherheiten der Isotopenverdünnungsanalyse wurden in der Publikation von VOGL, 2012 veröffentlicht. In der Arbeit lagen die publizierten relativen erweiterten Unsicherheiten ( $k = 2$ ) der einfachen IDMS bei 1 – 2 %. Die bei der doppelten IDMS erreichten relativen erweiterten Unsicherheiten zeigten einen Wert von 0,1 bis 0,5 % auf, und die dreifache IDMS erreichte Werte von  $\geq 0,1$  %. Allerdings gestaltet sich die Unsicherheitsberechnung der Isotopenverdünnungsanalyse komplex und wird auf verschiedenste Art und Weise durchgeführt. In der Regel verfahren nur metrologische Institutionen und Organisationen sowie zertifizierte Laboratorien nach der Vorgehensweise des EURACHEM/CITAC GUIDE CG 4 zur Ermittlung der Messunsicherheit in der analytischen Messtechnik. Die einzige zur Verfügung stehende DIN-Norm für die Isotopenverdünnungsanalyse verzichtet gar auf die Angabe einer Unsicherheit (DIN EN 16801, 2016). Daher sind häufig mit der IDMS bestimmte Analytgehalte ohne Unsicherheit in der Literatur publiziert. Weiterhin wird auch die Standardabweichung aus Mehrfachanalysen gelegentlich als Unsicherheit angegeben.

### **2.4 Festkörperbasierte Isotopenverdünnungsanalyse**

In diesem Abschnitt wird die Vorgehensweise der festkörperbasierten Isotopenverdünnungsanalyse mittels LA-ICP-MS beschrieben. Die Methode wurde im Rahmen der dreijährigen Forschungsarbeit für die orts aufgelöste Quantifizierung von Elementverteilungen in biologischen Proben entwickelt. In dieser Kalibrationsstrategie werden die Vorteile der IDMS (siehe Abschnitt 2.3) mit der Normalisierung über einen homogen

verteilten Korrekturstandard (siehe Abschnitt 2.2.2 und 2.2.7) kombiniert und dadurch eine neue Vorgehensweise gebildet, welche den bestehenden Pool an verschiedensten Kalibrationsstrategien für die LA-ICP-MS erweitert. Da es sich bei der IDMS um eine Primärmethode handelt (siehe Abschnitt 2.3), soll durch den Einsatz der festkörperbasierten Isotopenverdünnungsanalyse eine Erhöhung der Richtigkeit und eine Verringerung der Unsicherheit bei der Quantifizierung von Elementgehalten ermöglicht werden.

Der zugrundeliegende Aufbau der festkörperbasierten Isotopenverdünnungsanalyse mittels LA-ICP-MS ist in Abb. 2. 8 schematisch dargestellt.



**Abb. 2. 8:** Darstellung der festkörperbasierten Isotopenverdünnungsanalyse mittels LA-ICP-MS.

Die Grundlage dieser Methode bildet die Modifizierung der Dünnschichtmethode nach AUSTIN ET AL., 2010. Ein Probendünnschnitt wird auf einer Dünnschicht des isotopenangereicherten Spikes platziert und mittels Laserablation simultan und vollständig abgetragen. Im Gegensatz zu der laserablationsgestützten ICP-IDMS unter der Verwendung von Flüssigstandards wird bei der festkörperbasierten Isotopenverdünnungsanalyse der Spike in Form eines Festkörpers verwendet, welcher zu einem vergleichbareren Atomisierungs- und Ionisierungsprozess von Probe und Spike führt. Durch die Angleichung des Prozesses bei der Erzeugung des analytischen Signals von Probe und Spike wird eine potenzielle Fehlerquelle im Vergleich zu der Verwendung von Flüssigstandards für die LA-ICP-IDMS nach BECKER, 2002; BECKER ET AL., 2004; PICKHARDT ET AL., 2006; SELA ET AL., 2007 eliminiert. Voraussetzung hierfür ist die Verwendung einer an die Probenzusammensetzung angepassten Matrix des Festkörperspikes, um eine vergleichbare Partikelgröße des ablatierten Materials von Probe und Spike zu erreichen. Dennoch sollten die Bildung der Partikel und deren Größenverteilung von Probe und Spike untersucht werden, um einen

möglicherweise abweichenden Atomisierungs- und Ionisierungsprozess festzustellen. Dies könnte durch den Vergleich der über die Schichtdicke normalisierten Empfindlichkeiten von Spike und Probe sowie der Doppelschicht aus Spike und Probe durchgeführt werden. Vergleichbare normalisierte Empfindlichkeiten deuten auf ein ähnliches Ablationsverhalten hin. Mit Realproben kann dieser Vergleich nicht durchgeführt werden, daher wird in dieser Arbeit für die verwendeten biologischen Proben ein ähnliches Ablationsverhalten angenommen. Durch den Einsatz eines fs-Lasers könnte diese Fehlerquelle ausgeschlossen werden, da bei der fs-LA-ICP-MS vornehmlich Partikel mit einer Größe von  $\leq 100$  nm entstehen, welche in der Regel vollständiger atomisiert und ionisiert werden (HORN, 2008). Im Rahmen dieser Arbeit wird der Spike daher in Form einer kohlenstoffhaltigen Polymermatrix auf Basis eines Acrylats – und damit teilweise an die Probenzusammensetzung angepasst – verwendet. Die homogene Verteilung des Spikes ermöglicht die Durchführung einer orts aufgelösten Isotopenverdünnungsanalyse an der Probe und somit erstmalig die Erstellung von auf der IDMS beruhenden Elementverteilungsbildern.

Neben dem isotonenangereicherten Spike ist in der Dünnschicht auch ein geeigneter Korrekturstandard, ebenfalls homogen verteilt, eingebracht. Mit dem Korrekturstandard werden die gemessenen Isotope des zu analysierenden Elements normalisiert, um Schwankungen der Laserleistung, Änderungen der Ablationsrate, lokale Matrixeffekte und die Drift des Massenspektrometers zu korrigieren (KINDNESS ET AL., 2003; ZORIY ET AL., 2008; HARE ET AL., 2009; AUSTIN ET AL., 2010; POZEBON ET AL., 2014). Die Normalisierung über den Korrekturstandard ist bei der Isotopenverdünnungsanalyse streng genommen gar nicht nötig, da durch die Bestimmung des Isotopenverhältnisses des Analyten bereits eine Normalisierung, noch dazu über das geeignetste Element, durchgeführt wird. Das geeignetste Element für die Normalisierung bildet das zu analysierende Element selbst, da es über das gleiche physikalische und chemische Verhalten verfügt und damit den idealen internen Standard nach VANHAECKE ET AL. 1992, FINLEY-JONES ET AL. 2008 und FRICK ET AL. 2012 darstellt. Allerdings erfüllt der Korrekturstandard weitere Aufgaben. Durch die Normalisierung über den Korrekturstandard können zum einen die homogene Verteilung des Spikes während des Experiments überwacht und kontrolliert sowie Artefakte durch mögliche Inhomogenitäten festgestellt werden. Zum anderen dient der Korrekturstandard zur Normalisierung von gegebenenfalls weiteren, zwar nicht zu quantifizierenden, aber



qualitativ zu bestimmenden sowie zu lokalisierenden Elementen in der Probe. Weiterhin kann auch die grundlegende Charakterisierung der Elementverteilung der für die festkörperbasierte Isotopenverdünnungsanalyse präparierten Schichtsysteme durchgeführt werden.

Unter der Spikeschicht ist eine weitere Dünnschicht auf einem geeigneten Substrat aufgebracht. Diese Dünnschicht wird als Durchschussmarker bezeichnet und ist mit einem geeigneten Element dotiert. Der Durchschussmarker dient als Indikator für die vollständige Ablation der darüberliegenden Schichten von Probe und Spike. Das hinzudotierte Element sollte so gewählt werden, dass keine Interferenz der gemessenen Isotope des zu analysierenden Elements vorliegt. Falls in dem Substrat ein geeignetes Element vorhanden ist, kann auf die Dünnschicht des Durchschussmarkers verzichtet werden. Da in dieser Arbeit sehr reine Polyesterfolien verwendet wurden, musste auf eine weitere Dünnschicht mit Durchschussmarker zurückgegriffen werden.

Eine Grundvoraussetzung für die Anwendung der Methode der festkörperbasierten Isotopenverdünnungsanalyse mittels LA-ICP-MS stellt die simultane und vollständige Ablation von Probendünnschnitt und der Dünnschicht des Spikes dar. Diese kann durch die Verwendung eines relativ großen Laserspotdurchmessers sowie einer geringen Scangeschwindigkeit des Laserstrahls und der daraus im Vergleich zu den Schichtdicken von Probe und Spike resultierenden großen Ablationstiefe gewährleistet werden. Durch den im Vergleich zu den Schichtdicken von Probe und Spike relativ großen Durchmesser des Laserstrahls kann die Bildung unterschiedlicher Partikelgrößenverteilungen aufgrund der Abnahme der Energieübertragung des defokussierten Laserstrahls bei größerer Ablationstiefe (RUSSO ET AL., 2002) und unterschiedlichen Kantenverhältnissen des Laserkraters (LIU ET AL., 2000) verringert werden. Daher werden im Rahmen dieser Arbeit die Spikeschichten mit einer Schichtdicke von  $\approx 5 \mu\text{m}$  und Proben mit einer Dicke von  $10 - 15 \mu\text{m}$  eingesetzt. Bei dem Laser wurde ein Durchmesser von mindestens dem Dreifachen der Summe aus den Schichtdicken von Probe und Spike eingestellt. Dadurch ist bei dieser Kalibrationsstrategie die erreichbare Ortsauflösung limitiert. Die Scangeschwindigkeit des Laserstrahls wurde so gering wie möglich gewählt, um die vollständige Ablation von Probe und Spike zu gewährleisten.

Der Ablauf der festkörperbasierten Isotopenverdünnungsanalyse wird vergleichbar zu dem in Abschnitt 2.3 beschriebenen Vorgehen durchgeführt, das heißt, es werden die Isotopenverhältnisse von Probe, Spike und Blend für die Berechnung des Massenanteils in der Probe benötigt.

Die Vorgehensweise bei der Berechnung des Massenanteils in der Probe anhand der einfachen festkörperbasierten Isotopenverdünnungsanalyse erfolgt nach Gl. 10 durch eine Modifizierung von Gl. 8. Die Massen von Probe und Spike wurden durch die Schichtdicken ( $h$ ) ersetzt. Dies ist möglich, da die Massen im Zähler und Nenner nur das Verhältnis von Probe und Spike zueinander beschreiben. Dieser Austausch bildet die Grundlage der festkörperbasierten Isotopenverdünnungsanalyse, denn die Bestimmung der Schichtdicken ist im Vergleich zur Bestimmung der ablatierten Masse wesentlich einfacher und genauer möglich. Die Schwierigkeit bei der Bestimmung der ablatierten Masse liegt in der geringen Menge begründet. Weiterhin ist die Durchführung der Bestimmung der ablatierten Masse simultan zu der festkörperbasierten Isotopenverdünnungsanalyse nicht durchführbar.

$$\omega_x = \omega_{y,b} \cdot \frac{M_x \cdot h_y}{M_b \cdot h_x \cdot a_{x,b}} \cdot \frac{(R_y - R_{xy})}{(R_{xy} - R_x)} \quad \text{Gl. 10}$$

- Mit  $h_x$  Schichtdicke der Probe  
 $h_y$  Schichtdicke des Spike  
 $M_b$  Atommasse des Isotops b  
 $M_x$  Standard Atommasse des Elements in der Probe  
 $R_x$  Isotopenverhältnis der Probe  
 $R_{xy}$  Isotopenverhältnis des Blend  
 $R_y$  Isotopenverhältnis des Spike  
 $a_{x,b}$  Häufigkeit des Isotops b in der Probe  
 $\omega_x$  Massenanteil des Elements in der Probe  
 $\omega_{y,b}$  Massenanteil des Isotops b in dem Spike

Bei der doppelten festkörperbasierten Isotopenverdünnungsanalyse wird der Austausch der Massen gegen die Schichtdicken ebenfalls vollzogen (vgl. Gl. 9). Die Berechnung des Massenanteils der Probe erfolgt nach Gl. 11. Wie in Abschnitt 2.3 bereits erwähnt, wird im Rahmen dieser Arbeit zwar anhand der doppelten Isotopenverdünnungsanalyse der Massenanteil der Probe berechnet, allerdings liegt der Hauptgrund in der Überprüfung des Spikes bei jeder Anwendung.

$$\omega_x = \frac{M_x \cdot h_y}{a_{x,b} \cdot M_b \cdot h_x} \cdot \frac{a_{z,b} \cdot M_b \cdot h_z}{M_z \cdot h_{y'}} \cdot \omega_z \cdot \frac{(R_y - R_{xy})}{(R_{xy} - R_x)} \cdot \frac{(R_{zy'} - R_z)}{(R_{y'} - R_{zy'})} \quad \text{Gl. 11}$$

- Mit
- $h_x$  Schichtdicke der Probe
  - $h_y$  Schichtdicke des Spikes in Blend 1 (Spike/ Probe)
  - $h_{y'}$  Schichtdicke des Spikes in Blend 2 (Spike/ Back-Spike)
  - $h_z$  Schichtdicke des Back-Spike
  - $M_b$  Atommasse des Isotops b
  - $M_x$  Standard Atommasse des Elements in der Probe
  - $M_z$  Standard Atommasse des Elements im Back-Spike
  - $R_x$  Isotopenverhältnis der Probe
  - $R_{xy}$  Isotopenverhältnis des Blend 1 (Spike/ Probe)
  - $R_y$  Isotopenverhältnis des Spike
  - $R_{y'}$  Isotopenverhältnis des Spike
  - $R_z$  Isotopenverhältnis des Back-Spike
  - $R_{zy'}$  Isotopenverhältnis des Blend 2 (Spike/ Back-Spike)
  - $a_{x,b}$  Häufigkeit des Isotops b in der Probe
  - $a_{z,b}$  Häufigkeit des Isotops b im Back-Spike
  - $\omega_x$  Massenanteil des Elements in der Probe
  - $\omega_z$  Massenanteil des Elements im Back-Spike

Allerdings stellt die Verwendung der Schichtdicke nur eine Näherung dar, denn lokale Änderungen in der Dichte der Probe oder eine abweichende Dichte von Probe und Spike, welche in einer Änderung der tatsächlich ablatierten Masse resultieren, werden nicht berücksichtigt. Die Variation der tatsächlichen ablatierten Masse führt zu falschen Ergebnissen. Daher muss eine abweichende Dichte von Probe und Spike berücksichtigt werden, dazu kann die Variable der Schichtdicke ( $h$ ) um die Dichte ( $\rho$ ) von Probe, Spike oder Backspike erweitert werden. Durch diese Erweiterung können Dichteunterschiede berücksichtigt und somit die abweichende tatsächliche ablatierte Masse korrigiert werden. Eine Möglichkeit zur Dichtebestimmung geringer Probenmengen stellt die Gaspyknometrie dar (STANGE ET AL., 2013). Allerdings kann durch dieses Vorgehen nur die mittlere Probendichte bestimmt werden; lokale Änderungen der Dichte würden die Richtigkeit der Ergebnisse stark beeinträchtigen. Bei den in dieser Arbeit verwendeten biologischen Proben schwanken diese Variationen in der Regel in einem geringfügigen Rahmen (1 - 5%) und werden daher in dieser Arbeit vernachlässigt (DIRESTA ET AL., 1990).

Die Methode der festkörperbasierten Isotopenverdünnungsanalyse mittels LA-ICP-MS ermöglicht die Korrektur von Änderungen in der Ablationsrate, Schwankungen des Messsystems sowie lokaler Variationen der Probenmatrix und ist rückführbar auf das SI-System. Änderungen in der Ablationsrate können unter der Voraussetzung homogener

und bekannter Schichtdicken von Probe und Spike, welche mit der vollständigen Ablation zu einem konstanten Ablationsvolumen führen, auf ein Minimum reduziert werden. Die Drift von Laser und Messsystem lassen sich durch die Normalisierung über den Korrekturstandard korrigieren. Globale oder lokale Effekte der Probenmatrix, wie Signalunterdrückung oder -verstärkung wirken sich aufgrund der gleichzeitigen Ablation von Probe und Spikeschicht in gleicher Art und Weise auf den Korrekturstandard und den Spike aus und sind daher ebenfalls korrigierbar. Auch das in Abschnitt 2.1 erwähnte Phänomen des *surface resampling* tritt dadurch bei der festkörperbasierten Isotopenverdünnungsanalyse nur in abgeschwächter Form auf. Daher könnte das Verfahren der festkörperbasierten Isotopenverdünnungsanalyse zum einen zur hausinternen Charakterisierung von selbst hergestellten Referenzmaterialien, wie z. B. gedopter Biomaterialien und matrixangepasster Standards und zum anderen für die genaue Analyse von biologischen Proben eingesetzt werden.

Mit der Erprobung, Validierung und Anwendung der festkörperbasierten Isotopenverdünnungsanalyse mittels LA-ICP-MS befassen sich die Kapitel 4 und 5 dieser Arbeit. Neben den oben genannten Themen werden auch die Präparation und die Charakterisierung der Schichtsysteme für die festkörperbasierte Isotopenverdünnungsanalyse beschrieben.

# 3

---

## Matrixunabhängige Kalibrationsstrategie

---

### 3.1 Einleitung

Das Kapitel widmet sich der umfassenden Überprüfung und Validierung der von THIELEKE, 2013 entwickelten matrixunabhängigen Kalibrationsstrategie für die Analyse von biologischen Proben mittels LA-ICP-QMS. Die Vorgehensweise der matrixunabhängigen Kalibrationsstrategie ist in Abschnitt 2.2.6 zusammengefasst. In der zitierten Arbeit wurde die Entwicklung und Überprüfung anhand von vier Festkörperstandards aus verschiedenen kohlenstoffhaltigen Matrices und einer Testprobe zur Validierung durchgeführt. Ziel dieser Arbeit ist eine umfassendere Überprüfung und Validierung der Methode, um qualifiziertere Aussagen zur Eignung zu ermöglichen. Dazu werden verschiedene kohlenstoffhaltige Matrices verwendet, um sieben Kalibrationsreihen mit je sechs Konzentrationsniveaus herzustellen, auf welche das beschriebene Normalisierungs- und Korrekturverfahren angewendet wird (siehe Abschnitt 2.2.6 und THIELEKE, 2013). Weiterhin wird in jeden Kalibrationsstandard ein interner Standard (Yttrium) eingebracht, welcher im selben Massenbereich wie der Analyt (Kupfer) vorliegt, um die Eignung des Matrixelements Kohlenstoff mit dem internen Standard zu vergleichen. Auch die Überprüfung der Richtigkeit der Methode durch die Bestimmung der Abweichung zum Referenzwert (Bias) sowie eine Berechnung der Unsicherheit werden durchgeführt.

Neben der Überprüfung und Validierung werden die einzelnen Matrices auf die Eignung zur Präparation von Festkörperstandards untersucht und charakterisiert, da die Herstellung von hauseigenen Standards immer noch breite Anwendung findet (ZORIY ET AL., 2006; WU B ET AL., 2009; BECKER, 2010; HARE ET AL., 2012) und da die Auswahl an zertifizierten Referenzmaterialien sehr stark eingeschränkt ist (SCHWARTZE, 2013; DREYER, 2016). Die Charakterisierung umfasst die Quantifizierung der Elementgehalte des Analyten, der internen Standards und des zur Korrektur verwendeten Matrixelements sowie die Homogenitätsbestimmung der hinzudotierten Elementverteilung. Die Begründung der Homogenitätsuntersuchung liegt in der oft unzureichenden Qualität der verwendeten hauseigenen Standards (THIELEKE, 2013; CHEN, 2015).

Das Primärziel stellt folglich die Erweiterung und Vereinfachung des für die Analyse von Spurenelementen in biologischen Proben zur Verfügung stehenden Pools an Kalibrationsstrategien für die LA-ICP-QMS bei bewiesenem Erfolg der matrixunabhängigen Kalibrationsstrategie dar.

Die verwendeten Matrices für die Präparation der Festkörperstandards und der ausgewählten Elemente werden im Folgenden beschrieben.

#### **Verwendete Matrices**

Um die Eignung der matrixunabhängigen Kalibrationsstrategie zu untersuchen, wurden Matrices mit variierenden Kohlenstoffgehalten genutzt. Die verwendeten Matrices sind in Tab. 3.1 aufgelistet. Weiterhin ist der theoretische Kohlenstoff- und Sauerstoffgehalt angegeben.

**Tab. 3.1: Theoretischer Kohlenstoff- und Sauerstoffgehalt in den verwendeten Matrices**

<b>Matrices</b>	<b>theoretischer <math>\omega_{(C)}</math> in %</b>	<b>theoretischer <math>\omega_{(O)}</math> in %</b>
<b>Agarose</b>	47	47
<b>Cystein</b>	29	26
<b>Oxalsäure</b>	26	71
<b>Paraffin</b>	≈ 90	0
<b>Pektin</b>	37	57
<b>Pflanzen</b>	25 - 40	keine Angabe
<b>Polymer</b>	65 - 69	keine Angabe

Die Matrices Agarose, Cystein, Oxalsäure und Pektin wurden gewählt, weil sie ohnehin in vielen pflanzlichen Proben vorkommen und auch in der Literatur bereits für die Herstellung von als teilweise matrixangepasste Festkörperstandards für die LA-ICP-MS eingesetzt wurden (ZORIY ET AL., 2008; MORADI ET AL., 2010; KLUG ET AL., 2011). Die Pflanzenmatrix hingegen stellt einen Vertreter der vollständig matrixangepassten Standards dar (WU A ET AL., 2009; WU B ET AL., 2009). Die Verwendung der synthetischen Polymermatrix (siehe Abschnitt 3.2.1) begründet sich in der oft problematischen Präparation von Festkörperstandards bezüglich der Homogenität der Elementverteilung von den oben genannten pulvrigen Matrices. In der Literatur sind vielversprechende Anwendungen einer solchen synthetischen Matrix beschrieben (AUSTIN ET AL., 2010; SCHAUMANN, 2011; SCHWARTZE, 2013; SCHUBERT, 2015; DREYER, 2016). Die Paraffinmatrix wurde als Extremfall mit einem unnatürlichen Kohlenstoffgehalt für biologische Proben gewählt.

Durch die Wahl der Matrices konnte ein Kohlenstoffgehalt von 25 - 90 % für die Überprüfung der matrixunabhängigen Kalibrationsstrategie abgedeckt werden, in dem der Großteil der typischen biologischen Proben liegt (FRICK ET AL., 2012).

#### **Ausgewählte untersuchte Elemente**

Bei den für die Überprüfung der matrixunabhängigen Kalibrationsstrategie untersuchten Elementen handelt es sich um Kohlenstoff, Kupfer und Yttrium.

Kohlenstoff wurde gewählt, da es als Matrixelement in allen biologischen Proben vorkommt und die homogenste Elementverteilung aufweist (FELDMANN ET AL., 2002; CAUMETTE ET AL., 2007; STEELY ET AL., 2007; WU B ET AL., 2009). Bezüglich der verwendeten Analysetechnik LA-ICP-MS zeichnet sich Kohlenstoff mit einer ersten Ionisierungsenergie von  $1086 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  durch den relativ hohen Messuntergrund, ausgelöst durch kohlenstoffhaltige Verbindungen in der Atmosphäre und sämtlichen weiteren Reagenzien, sowie Verunreinigungen im Spurenbereich in dem Trägergas Helium und dem Plasmagas Argon aus. An möglichen Interferenzen sind Dikationen von  $^{24}\text{Mg}$  und  $^{25}\text{Mg}$  für  $^{12}\text{C}$  sowie  $^{26}\text{Mg}$  und  $^{27}\text{Al}$  für  $^{13}\text{C}$  und Molekülionen von H-Addukten zu nennen. Isobare Interferenzen treten in dem niedrigen Massenbereich der Kohlenstoffisotope nicht auf. Aufgrund der relativ hohen zweiten Ionisierungsenergie ( $\geq 1400 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) von Magnesium und Aluminium sind auch die Dikationen in der Regel zu vernachlässigen. Auch die Molekülionen der H-Addukte stellen kein Problem dar, da nur  $^{13}\text{C}$  gemessen wird und somit die möglichen  $^1\text{H}+^{11}\text{B}$  Moleküle nicht detektiert werden. Die  $^1\text{H}+^{12}\text{C}$  Moleküle sollten in ihrer Ausprägung für alle Matrices in der gleichen Häufigkeit vorliegen und somit ebenfalls zu vernachlässigen sein. Auf der anderen Seite kommen C-Addukte für viele andere schwerere Elemente als Interferenz in Frage. ICP-OES-Analysen von Kohlenstoff aus flüssigen Lösungen sind aufgrund des ubiquitären Vorkommens nicht sinnvoll. Auf  $\mu\text{RFA}$ -Messungen zur Kohlenstoffverteilung wurde ebenfalls verzichtet, da bei den leichten Elementen der Auger-Effekt überwiegt und die Röntgenquantenausbeute zu gering ist.

Das Element Kupfer wurde als Analyt für das Modellexperiment gewählt, da es sich um ein essentielles Spurenelement in biologischen Proben von wissenschaftlichem Interesse handelt (WU B ET AL., 2009; ZORIY ET AL., 2006). Sowohl in Pflanzen als auch in mehrzelligen Organismen ist Kupfer an einer Vielzahl biologischer Prozesse beteiligt, die für die Lebenserhaltung der Organismen unverzichtbar sind (LÓPEZ DE ROMAÑA ET AL., 2011; LÓPEZ DE ROMAÑA ET AL., 2014). Im Überschuss können jedoch sowohl bei Pflanzen als auch bei Menschen und Tieren toxische Effekte auftreten. Beim Menschen steht eine zu hohe Aufnahme von Kupfer im Verdacht, die Morbus-Alzheimer-Erkrankung zu fördern und daher



ist die Elementverteilung im Gehirn von Interesse (ZORIY ET AL., 2006). Bei der Erbkrankheit Morbus Wilson und dem Menkes-Syndrom ist hingegen die Verteilung in anderen Organen wie der Leber von Interesse (STRAUBE ET AL., 2007). In Pflanzen stellt ein zu hoher Gehalt von Cu-Verbindungen, welche die Photosynthese stören, ein ernstzunehmendes Potential der Phytotoxizität dar (OMRI, 2001). In der Literatur wird ebenfalls eine durch Kupfer gestörte Aufnahme von Nährstoffen in das Pflanzengewebe beschrieben (LUNDGAARD ET AL., 2002; PUIG ET AL., 2002). Für die Analytik sind in dieser Arbeit folgende Aspekte von Bedeutung. Bei der LA-ICP-MS-Analyse liegen keine isobaren Interferenzen der Isotope  $^{63}\text{Cu}$  und  $^{65}\text{Cu}$  vor. Jedoch treten Interferenzen mit den Dikationen von Tellur und diverse polyatomare Interferenzen von Addukten aus leichten Übergangsmetallen ( $A \leq 52$  u) mit Kohlenstoff und Argon auf, welche anhand der Isotopenverteilung nachvollzogen und korrigiert werden können. Für die ICP-OES standen ausreichend überlagerungsfreie und empfindliche Linien zur Verfügung, sodass die Analyse relativ unproblematisch durchführbar war. Die Messung der  $K_{\alpha}$ -Röntgenstrahlung bei der  $\mu\text{RFA}$  war störungsfrei möglich.

Yttrium wurde für das Modellexperiment verwendet, da dieses Element häufig als interner Standard bei ICP-OES- und ICP-MS-Analysen eingesetzt wird (VAN DE WIEL, 2003; ZACHARIADIS ET AL., 2010). Yttrium ist ein monoisotopes Element ( $^{89}\text{Y}$ ) und in den meisten biologischen Proben nicht zu finden. Die erste Ionisierungsenergie liegt bei  $600 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  und damit niedriger als bei Kupfer ( $745,5 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ). Dennoch spielt die erste Ionisierungsenergie nur eine untergeordnete Rolle, da diese bei beiden Elementen relativ niedrig liegt und so Plasmaschwankungen nur geringfügig ins Gewicht fallen (VANHAECKE ET AL., 1992). Als mögliche Interferenzen bei der LA-ICP-MS sind polyatomare Moleküle von Arsen, Strontium, Germanium und Selen mit Wasserstoff, Stickstoff, Sauerstoff und Kohlenstoff zu nennen, welche durch den Einsatz einer Kollisionszelle verringert werden könnten. Allerdings würde dadurch das  $^{13}\text{C}$ -Signal ebenfalls nicht ausgewertet werden können, da sich bei der Verwendung einer Kollisionszelle die gemessenen Intensitäten der leichten Isotope deutlich verringern. Daher wurden die Interferenzen in Kauf genommen und die Messparameter entsprechend angepasst, um diese auf ein Minimum zu reduzieren. Für die ICP-OES standen ausreichend überlagerungsfreie und empfindliche Linien zur Verfügung, sodass die Analyse ebenfalls relativ unproblematisch durchführbar war. Bei der  $\mu\text{RFA}$ -Analyse war die Messung der Röntgenlinien von Yttrium durch eine zu geringe Empfindlichkeit des Messsystems nicht möglich.

## 3.2 Präparation der Einzelementstandards

Die Präparationsverfahren der Einzelementstandards mit internem Standard aus den verschiedenen Matrices sind in diesem Abschnitt beschrieben. Das synthetische Polymer wird dabei gesondert betrachtet, da die Polymermatrix auch in weiteren hier vorgestellten Arbeiten verwendet wurde (siehe Kapitel 4 und 5).

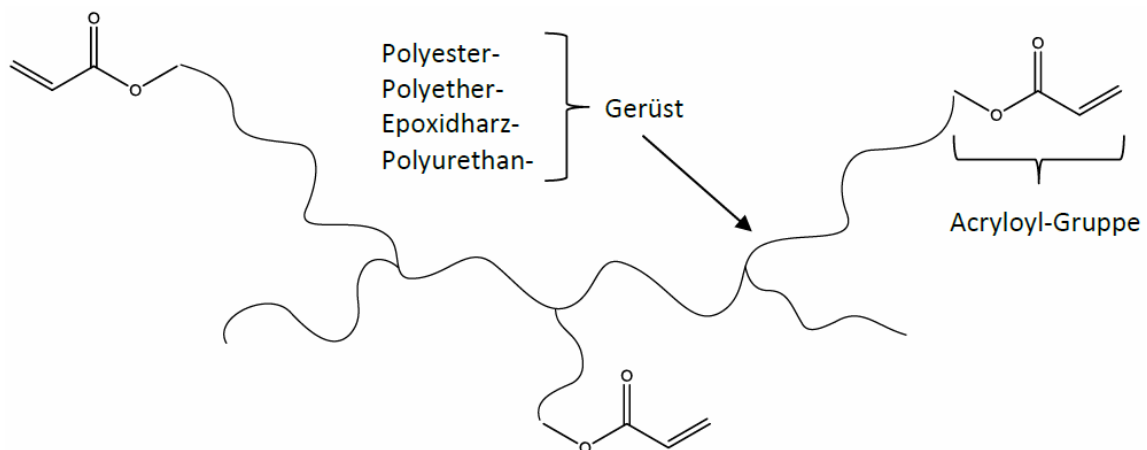
### 3.2.1 Einzelementstandards auf Basis synthetischer Polymere

In diesem Abschnitt werden neben der Präparation der polymeren Einzelementstandards mit internem Standard wichtige theoretische Grundlagen der im Rahmen dieser Dissertation verwendeten strahlenhärtenden Lacksysteme und Dispergiermethoden kurz erläutert. Umfangreichere Abhandlungen zu diesen Themenbereichen finden sich in den Arbeiten von SCHAUMANN, 2011; SCHWARTZE, 2013; MOHAMED, 2013; SCHUBERT, 2015 sowie DREYER, 2016.

#### **Strahlenhärtende Lacksysteme**

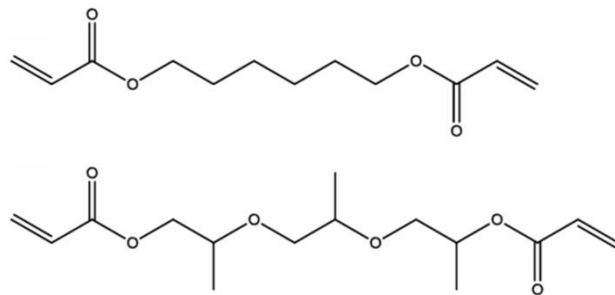
Bei den verwendeten UV-strahlenhärtenden Lacken handelt es sich um ein Lacksystem, welches durch radikalische Polymerisation irreversibel aushärtet. Die Vorteile dieses verwendeten Lacksystems liegen in der Lösemittelfreiheit, Langzeitstabilität und der im Labormaßstab guten Handhabbarkeit.

Wie in Abb. 3. 1 dargestellt, weisen die in dieser Arbeit eingesetzten strahlenhärtenden Acrylatlacke Polyester-, Polyether, Epoxid- und/oder Polyurethan-Gerüste auf, welche mit endständigen Acryloyl-Gruppen verbunden sind (BROCK ET AL., 2012).



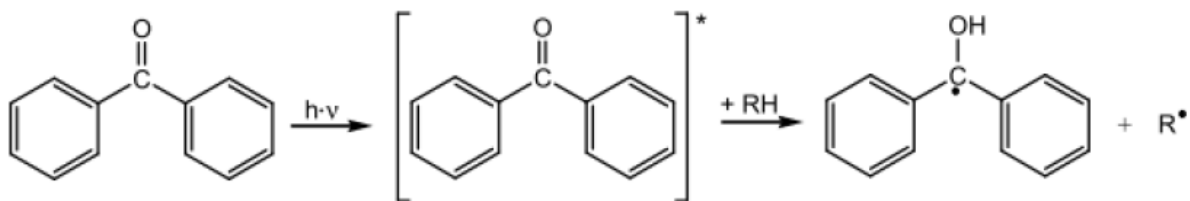
**Abb. 3. 1: Schematische Darstellung des Grundgerüsts eines strahlenhärtenden Acrylatlackes nach BROCK ET AL., 2012.**

Zu den Grundbestandteilen eines typischen lösemittelfreien UV-strahlenhärtenden Lacksystems zählen oligomere Filmbildner, Fotoinitiatoren, Reaktivverdünner und in der Regel Additive und Füllstoffe. Die oligomeren Filmbildner zeichnen sich durch einen hohen Anteil an ungesättigten Kohlenstoff-Doppelbindungen aus, welche eine Vernetzungsreaktion ermöglichen. Um die hohe Viskosität, bedingt durch die meist hochviskosen Filmbildner, zu verringern, können Reaktivverdünner, wie Hexandioldiacrylat (HDDA) und Tripropylenglycoldiacrylat (TPGDA), verwendet werden (siehe Abb. 3. 2).



**Abb. 3. 2: Strukturformeln der Reaktivverdünner HDDA (oben) und TPGDA (unten) aus SCHWARTZE, 2013.**

Als Fotoinitiator wird in dem, in dieser Arbeit verwendeten, Lacksystem Benzophenon verwendet. Unter UV-Strahlung mit einer Wellenlänge von ca. 365 nm werden durch Benzophenon Radikale gebildet (siehe Abb. 3. 3).

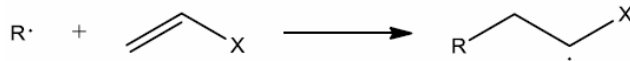


**Abb. 3. 3: Radikalbildung des Fotoinitiators Benzophenon durch Photolyse (SCHAUMANN, 2011).**

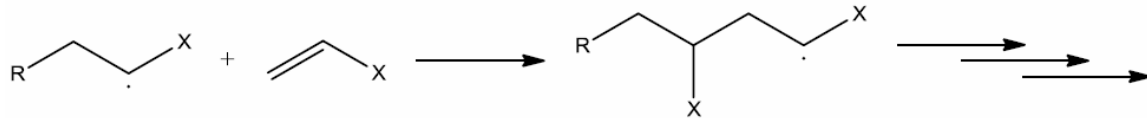
Auf die Radikalbildung folgt die radikalische Polymerisation, welche sich in drei Teilschritte unterteilt (siehe Abb. 3. 4). Im ersten Schritt, dem Kettenstart, bricht ein durch den Fotoinitiator gebildetes Radikal eine Doppelbindung der oligomeren Filmbildner auf und erzeugt ein wachstumsfähiges Primärradikal. Diesem Schritt folgt das Kettenwachstum, an das Primärradikal lagern sich weitere im Lacksystem enthaltene Monomere oder Oligomere an. Durch diesen Schritt erfolgt eine umfassende Vernetzung im Polymer. Die radikalische Polymerisation kommt durch Kombination zweier Radikale zum Erliegen, dieser Schritt wird Kettenabbruch genannt. Um die Inhibierung der Polymerisation durch Luftsauerstoff zu

verhindern, wird die UV-Aushärtung unter Argon-Schutzgasatmosphäre durchgeführt (BROCK ET AL., 2012; SCHWARTZE, 2013).

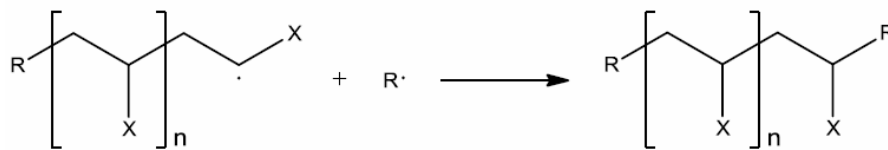
**Kettenstart**



**Kettenwachstum**



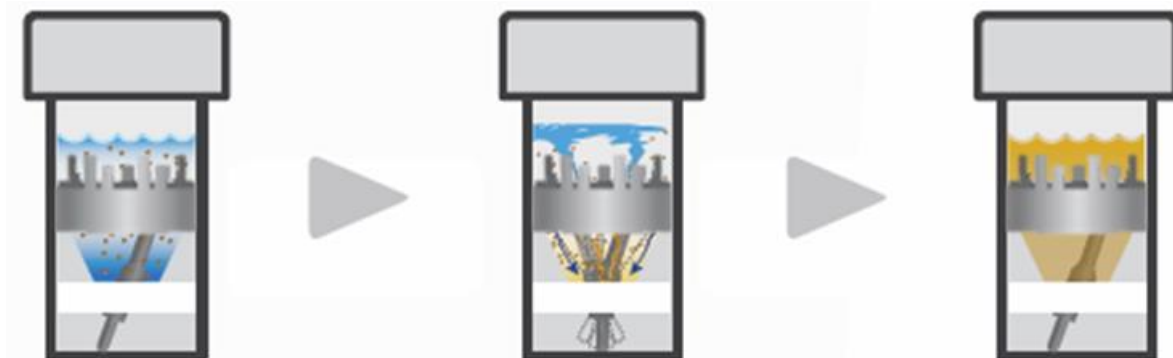
**Kettenabbruch**



**Abb. 3. 4: Schematischer Ablauf der radikalischen Polymerisation (SCHWARTZE, 2013).**

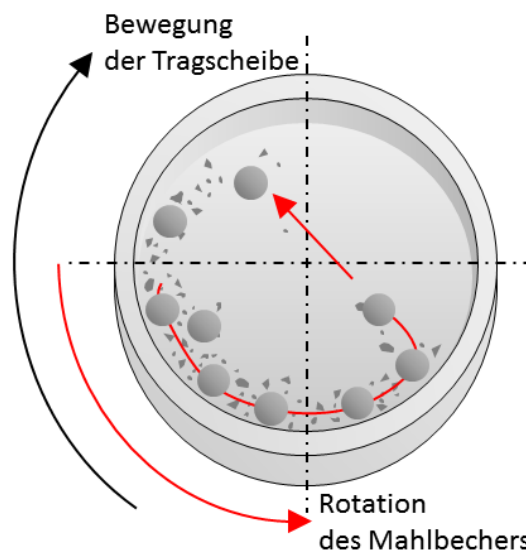
**Verwendete Dispergiermethoden**

Im Rahmen dieser Arbeit wird auf das Gerät ULTRA-TURRAX® TUBE DRIVE CONTROL der Fa. IKA-WERKE GMBH & CO. KG (Staufen) zurückgegriffen, mit dem die zufriedenstellende Dispergierung von kleinen Lackmengen (10-50 g) in den Arbeiten von SCHAUMANN, 2011, SCHWARTZE, 2013 und DREYER, 2016 erreicht wurde. Die zugehörigen Einweg-Dispergiergefäße verfügen über einen Rotor und einen Stator, welche mit vertikal angeordneten „Zähnen“ besetzt sind. Durch diese Anordnung und die Rotation des Rotors mit bis zu 6.000 min<sup>-1</sup> werden im Scherspalt, dem Bereich zwischen Stator und Rotor, hohe Scherkräfte erreicht, welche die Homogenisierung des Lacksystems mit Additiven und Elementstandards auf Ölbasis ermöglichen. Der schematische Ablauf der Dispergierung ist in Abb. 3. 5 dargestellt.



**Abb. 3. 5: Prinzipieller Aufbau der verwendeten Dispergiergefäße einer Ultra-Turrax®-Dispergiereinheit mit Rotor und Stator, modifiziert nach IKA WERKE GMBH & CO. KG 2016.**

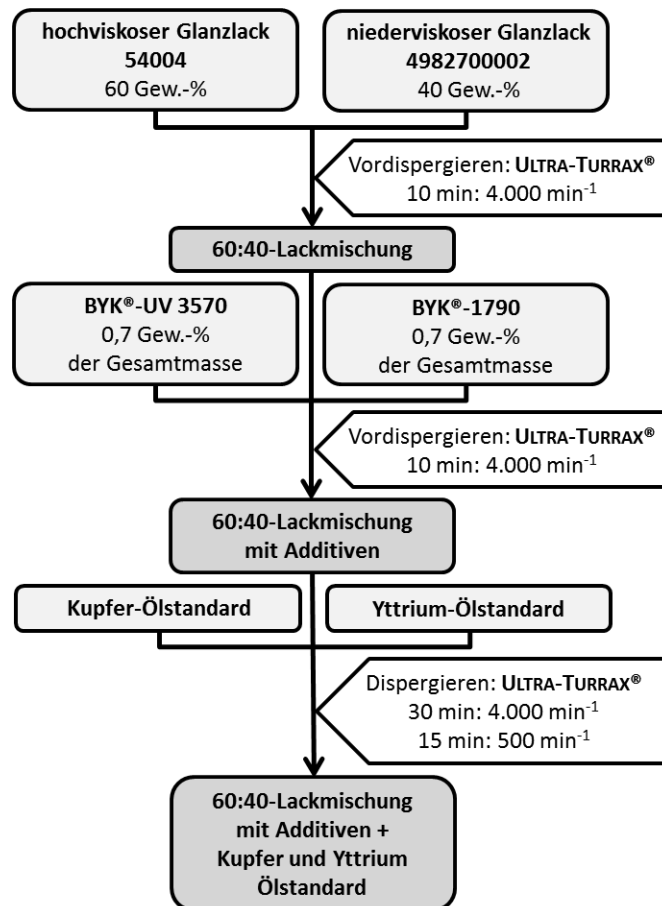
Neben der Dispergierung von flüssigen Substanzen kommt im Rahmen dieser Arbeit auch die Zerkleinerung und Homogenisierung von festen Materialien zum Einsatz. Für diesen Zweck wird die Planetenkugelmühle eingesetzt. Dabei wird das zu zerkleinernde und homogenisierende Mahlgut und Mahlkugeln in einen Becher gegeben. Dieser Mahlbecher wird auf eine rotierende Tragscheibe in der Planetenkugelmühle platziert. Während des Mahlvorganges rotiert der Mahlbecher zusätzlich um die eigene Achse in entgegengesetzter Richtung zur Tragscheibe (siehe Abb. 3. 6). Sowohl die Tragscheibe als auch der Mahlbecher rotieren somit um eine gemeinsame Hauptachse, wodurch die namensgebende Planetenbewegung erzeugt wird. Bei dieser Bewegung treten u. a. Zentrifugal- und Corioliskräfte auf, welche zu sehr energiereichen Stößen zwischen dem Mahlgut und den Mahlkugeln führen. Die energiereichen Stöße führen durch Schlag-, Scher- und Druckkräfte, zu einer effektiven Zerkleinerung des Mahlguts, und zur Homogenisierung des zerkleinerten Materials (JOHN ET AL., 1965; SCHAUMANN, 2011; DREYER, 2016).



**Abb. 3. 6: Funktionsprinzip der Planetenkugelmühle nach FRITSCH GMBH, 2016.**

#### ***Präparation der polymeren Einzelementstandards***

Die Präparation der Einzelementstandards mit internem Standard auf Basis der strahlenhärtenden Polymermatrix erfolgte nach einer Modifikation der Methoden von SCHWARTZE, 2013; THIELEKE, 2013 und CHEN, 2015. Ziel dieses Präparationsverfahrens war die Herstellung einer Kalibrationsreihe mit sechs Standards, mit Massenanteilen an Kupfer zwischen 50 und 350 mg·kg<sup>-1</sup> und Yttrium mit einem Massenteil von 200 mg·kg<sup>-1</sup>.



**Abb. 3. 7: Schematische Darstellung für den Ansatz der Lackmischungen mit Kupfer- und Yttrium-Ölstandards.**

Die Grundlage der Polymermatrix bildete eine Mischung aus 60 Gew.-% hochviskosem Glanzlack 54004 und 40 Gew.-% niederviskosem Glanzlack 4982700002 der Fa. SCHEKOLIN AG (Liechtenstein). Diese Grundlackmischung wurde in 50 mL-Dispergiergefäße DT-50 überführt und mittels ULTRA-TURRAX® TUBE DRIVE CONTROL der Fa. IKA-WERKE GMBH & Co. KG (Staufen) 10 min bei einer Drehzahl von  $4.000 \text{ min}^{-1}$  vorgemischt. Der Vormischung wurden zur Verbesserung der Eigenschaften und des Verhaltens bei der Dispergierung sowie des Aushärtevorgangs 0,7 Gew.-%, bezogen auf die Gesamtformulierung, des Entschäumers BYK®-1790 und des Verlaufsadditivs BYK®-UV 3570 der Fa. BYK-GARDNER GMBH (Geretsried) zugegeben. Die so erhaltene Basislackmischung wurde erneut 10 min bei einer Drehzahl von  $4.000 \text{ min}^{-1}$  dispergiert (vgl. Abb. 3. 7).

Die dispergierte Basislackmischung wurde auf 20 mL-Dispergiergefäße DT-20 aufgeteilt und jeweils die benötigten Mengen des Kupfer-Ölstandards ( $\omega_{(\text{Cu})} = 5.000 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , Fa. SPETEC GMBH, Erding) und Yttrium-Ölstandards ( $\omega_{(\text{Y})} = 5.000 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , Fa. SPETEC GMBH, Erding) zugegeben. Die flüssigen polymeren Elementstandards wurden für 30 min bei einer Drehzahl von  $4.000 \text{ min}^{-1}$  und weitere 15 min bei einer Drehzahl von  $500 \text{ min}^{-1}$  zur Reduzierung der

Schaumbildung dispergiert. Die einzelnen Kalibrationsniveaus der Elementstandards wurden in jeweils drei gereinigte Aluminiumschälchen überführt und für 60 min in der hauseigenen UV-Aushärtekammer unter Schutzgasatmosphäre ausgehärtet.

Bei der UV-Aushärtekammer handelt es sich um eine hölzerne Box, welche komplett mit Aluminiumfolie ausgekleidet ist, um eine optimale Ausleuchtung der Proben durch Reflektion des emittierten Lichts der an der Oberseite angebrachten vier UV-Niederdruck-Quecksilberdampf-Leuchtstofflampen (PHILIPS ACTINIC BL TL 8W/10 1FM) zu gewährleisten. Diese UV-Leuchtstofflampen emittieren Licht mit einem Maximum von 365 nm, welches die Radikalbildung des Photoinitiators Benzophenon in den Glanzlacken und somit die Polymerisation derer hervorruft. Um eine Sauerstoffinhibierung des Aushärtevorganges zu vermeiden, wurden die Proben in einer mit Argon gespülten UV-transparenten Kunststoffbox aus Acrylester-Styrol-Acrylnitril-Kunststoff (ASA) innerhalb der UV-Aushärtekammer platziert (SCHWARTZE, 2013; DREYER, 2016).

Durch dieses Vorgehen wurden jeweils drei Kalibrationsstandards der sechs unterschiedlichen Kalibrationsniveaus mit den Sollgehalten  $50 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ,  $150 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ,  $200 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ,  $250 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ,  $300 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  und  $350 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  Kupfer und jeweils  $200 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  Yttrium hergestellt. Da die Kalibrationsstandards nach dem Aushärten eine konvexe Wölbung der Oberfläche aufzeigten, wurden die Standards mittels AUTOMET™ 250 (Fa. BUEHLER GMBH, Düsseldorf) geglättet und poliert. Dazu wurden Schleifpapiere (P1200 und P2500) und eine Diamantsuspension (Schleifpartikelgröße  $1 \mu\text{m}$ ) der Fa. BUEHLER GMBH (Düsseldorf) verwendet. Von zwei der verbliebenen Kalibrationsstandards jedes Kalibrationsniveaus wurden die Aluminiumschälchen entfernt und der polymere Elementstandard für die Quantifizierung der Elementgehalte verwendet (siehe Abschnitt 3.3.1). Die Kalibrationsreihe mit den verbliebenen Aluminiumschälchen wurde für die Homogenitätsbestimmungen (siehe Abschnitt 3.3.2) und die Überprüfung der matrixunabhängigen Kalibrationsstrategie (siehe Abschnitt 3.4) genutzt.

#### **3.2.2 Matrixangepasste Einzelelementstandards**

In diesem Abschnitt wird die Präparation der sechs verschiedenen matrixangepassten Kalibrationsreihen mit internem Standard beschrieben.

#### ***Präparation der matrixangepassten Einzelementstandards***

Bei den sechs verschiedenen Matrices handelt es sich um Agarose (Fa. APPLICHEM GMBH, Darmstadt), Cystein (Fa. AMRESKO LLC, Solon, USA), Oxalsäure (Fa. MERCK KGAA, Darmstadt), Pektin (Fa. SIGMA-ALDRICH, St. Louis, USA), Paraffin (Erstarrungspunkt 56-58°C) der Fa. MERCK KGAA, Darmstadt und Blätter des Schwertfarn der Art NEPHROSLEPIS EXALTATA. Es sollten sechsstufige Kalibrationsreihen jeder Matrix mit Massenanteilen an Kupfer zwischen 50 und 350 mg·kg<sup>-1</sup> und Yttrium mit einem Massenteil von 200 mg·kg<sup>-1</sup> hergestellt werden.

Mit Ausnahme des Schwertfarns und des Paraffins lagen alle Matrices als Pulver mit unterschiedlicher Partikelgröße vor. Daher mussten die Blätter des Schwertfarns zunächst bei 40°C im Trockenschrank bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und im Anschluss mittels Planetenkugelmühle PULVERISETTE 6 CLASSIC LINE (Fa. FRITSCH GMBH, Idar-Oberstein) unter der Verwendung von Zirkondioxid-Mahlkugeln (Ø 15 mm) bei 650 min<sup>-1</sup> für 15 min grob vermahlen werden. Um eine möglichst gleichmäßige Partikelgröße der pulvrigen Matrices zu erreichen, wurden alle anderen für die Standards verwendeten Matrices einzeln mittels der Planetenkugelmühle und Zirkondioxid-Mahlkugeln (Ø 3 mm) bei 650 min<sup>-1</sup> für 40 min fein vermahlen.

Die fein vermahlenden, pulvrigen Matrices wurden mit Reinstwasser ( $\sigma = 0,054 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) vollständig aufgeschwemmt und die benötigte Menge an Kupfer- ( $\omega_{(\text{Cu})} = 10.000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) und Yttriumstandardlösung ( $\omega_{(\text{Y})} = 10.000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) der Fa. CARL ROTH GMBH + Co.KG (Karlsruhe) unter ständigem Rühren zugegeben. Diese Suspension wurde 2 Tage ruhen gelassen, um die Adsorption der zugegebenen Elemente an der Oberfläche der Matrices zu ermöglichen. Nach der Ruhephase wurde das Lösungsmittel vollständig im Trockenschrank bei 80°C verdampft und es folgte eine erneute Vermahlung mit der Planetenkugelmühle und Zirkondioxid-Mahlkugeln (Ø = 3 mm) bei 650 min<sup>-1</sup> für zweimal 40 min. Da es bei der Vermahlung zu elektrostatischer Aufladung kam und in deren Folge die Partikel agglomerierten, konnte die Partikelgröße der einzelnen Matrices nicht bestimmt werden. Die getrockneten, fein vermahlenden Einzelementstandards mit internem Standard wurden mittels Tablettenpresse bei einem Druck von 10 Tonnen gepresst. Für die Präparation der Kalibrationsreihe aus Paraffin wurde industrielles Paraffinwachs in Pastillenform verwendet. Das Paraffinwachs wurde im Wasserbad bei 60°C geschmolzen und die benötigten Mengen des Kupfer- ( $\omega_{(\text{Cu})} = 5000 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) und Yttrium-Ölstandards ( $\omega_{(\text{Y})} = 5000 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) der Fa.



SPETEC GMBH (Erding) zugegeben. Die flüssige Paraffin-Ölstandard-Mischung wurde mittels Magnetrührer 45 min homogenisiert und im Anschluss nach dem Erstarren ebenfalls mittels Tablettenpresse bei einem Druck von 10 Tonnen gepresst. Sämtliche präparierten Festkörperstandards wurden zum Schutz vor Luftfeuchtigkeit im Exsikkator gelagert.

Es wurden je Kalibrationsniveau drei Tabletten ( $\varnothing = 15 \text{ mm}$ ,  $h = 2 \text{ mm}$ ) gepresst und für die Quantifizierung der Elementgehalte (siehe Abschnitt 3.3.1), die Bestimmung der Homogenität (siehe Abschnitt 3.3.2) und die Überprüfung der matrixunabhängigen Kalibrationsstrategie (siehe Abschnitt 3.4) verwendet.

### **3.3 Charakterisierung der Einzelementstandards**

In diesem Kapitel wird die Charakterisierung der präparierten Einzelementstandards der verschiedenen Matrices erläutert. Dieser Prozess umfasst die Quantifizierung des Massenanteils von Kupfer, Yttrium und Kohlenstoff sowie die Untersuchung der Elementverteilung von Kupfer und Yttrium in den Standards.

#### **3.3.1 Quantifizierung der Elementgehalte**

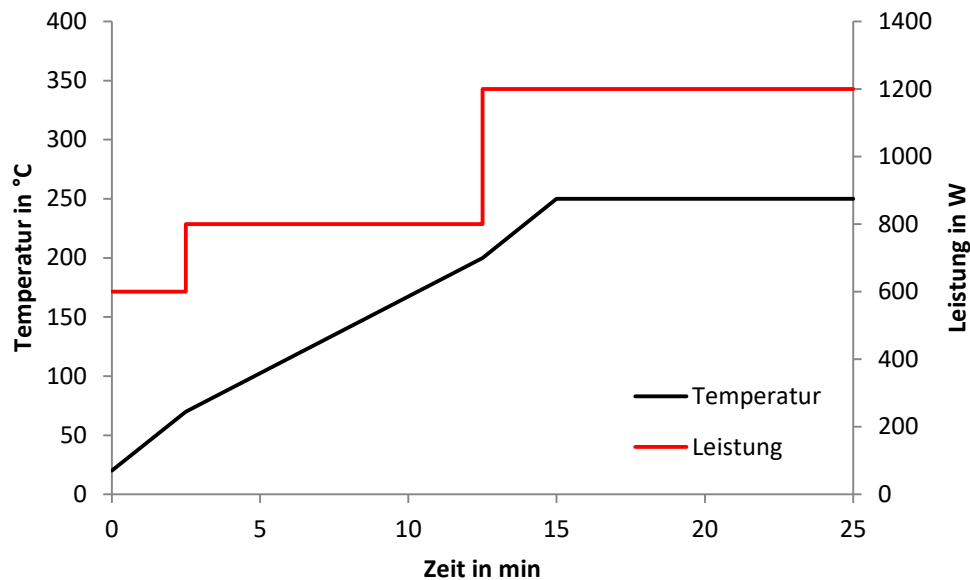
Für die Quantifizierung des Massenteils von Kupfer und Yttrium mittels ICP-OES mussten die verschiedenen Elementstandards zunächst aufgeschlossen werden. Die Quantifizierung des Kohlenstoffgehaltes mittels Elementaranalyse erfolgte hingegen aus festen Standards. Die Vorgehensweise und Ergebnisse sind im Folgenden beschrieben.

#### ***Mikrowellendruckaufschluss***

Im Präparationsprozess der verschiedenen Standards kann es zu Verlusten der Analyten kommen, etwa durch Adsorptions-, Reduktions- und/oder Oxidationsvorgänge an Gefäßwänden. Auch eine Änderung der Masse der verwendeten Matrices durch das Abdampfen von flüchtigen Probenbestandteilen oder Aufnahme von Luftfeuchtigkeit wirkt sich auf den Massenanteil des Analyten in dem Standard aus. Da somit die tatsächlichen Massenanteile von den Sollgehalten abweichen können, ist eine Quantifizierung nach der Präparation unumgänglich. Für die ICP-OES-Analyse wurden flüssige Proben benötigt, daher wurden zunächst die verschiedenen Standards aufgeschlossen.

Bei dem durchgeführten Aufschluss handelt es sich um einen Mikrowellendruckaufschluss, dazu wurde das Gerät TURBOWAVE (Fa. MLS GMBH, Leutkirch) verwendet. Die Einwaage der Standards betrug 0,25 g. Als Aufschlussreagenzien wurden 4 mL konzentrierte Salpetersäure

(65 Gew.-%, *subboiled*), 1 mL Wasserstoffperoxid (30 Gew.-%, p. a.) sowie 2 mL Reinstwasser ( $\sigma = 0,054 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) verwendet. Als Aufschlussbehälter dienen 15 mL-PTFE-Gefäße der Fa. MLS GMBH (Leutkirch). Der Aufschluss wurde nach dem in Abb. 3. 8 dargestellten Programm durchgeführt.



**Abb. 3. 8: Programm für den Mikrowellendruckaufschluss der kupferhaltigen Einzelelementstandards aus verschiedenen Matrices mit Yttrium als internem Standard.**

Um Verluste von möglichen flüchtigen Analyten in der Dampfphase zu vermeiden, wurde der Druck erst nach Abkühlen auf 25°C abgelassen. Die Aufschlusslösungen wurden im Anschluss in 30 mL-HDPE-Gefäße überführt und mit verdünnter Salpetersäure (2,5 Gew.-%, *subboiled*) auf 30 mL verdünnt.

Unter den beschriebenen Aufschlussbedingungen konnten die unterschiedlichen Matrices vollständig aufgeschlossen werden. Die Wiederfindungsraten lagen zwischen 97 und 103 % für alle untersuchten Elemente.

#### **Quantifizierung von Kupfer und Yttrium mittels ICP-OES**

Die Quantifizierung von Kupfer und Yttrium wurde am ICP-OES SPECTRO ARCOS der Fa. SPECTRO ANALYTICAL INSTRUMENTS (Kleve) durchgeführt. Die verwendeten Messparameter sind im Anhang (siehe Tab. 8. 1) aufgelistet. Zur Quantifizierung der Elementgehalte in den verdünnten Aufschlusslösungen wurde eine externe Kalibration aus acht äquidistanten Standards mit Kupfergehalten zwischen 0,1 und 4,5  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  und Yttriumgehalten zwischen 0,1 und 3  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  hergestellt. Dazu wurden ICP-Standardlösungen von

Kupfer ( $\omega_{\text{Cu}} = 10.000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) und Yttrium ( $\omega_{\text{Y}} = 10.000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) der Fa. CARL ROTH GMBH + Co. KG (Karlsruhe) verwendet. Um die Matrix der Proben und Standards anzupassen, wurden die Standards in verdünnter Salpetersäure (2,5 Gew.-%, *subboiled*) angesetzt. Die exakten Massenanteile der Standards sind in Tab. 8. 2 im Anhang dargestellt. Die gemessenen und ausgewerteten Spektrallinien sind in Tab. 3. 2 aufgelistet. Bei der Auswahl der Spektrallinien wurden deren Messempfindlichkeiten und mögliche Interferenzen durch auftretende Spektrallinienüberlagerungen berücksichtigt.

**Tab. 3. 2: Ausgewertete Emissionslinien für die Quantifizierung der Kupfer- und Yttrium-Gehalte in den aufgeschlossenen Standards**

Element	Emissionslinie $\lambda$ in nm
Kupfer	219,958
	224,700
	324,754
Yttrium	349,609
	360,073
	371,030
	377,433

Im Folgenden werden exemplarisch nur die Ergebnisse der Emissionslinien von Kupfer  $\lambda = 324,754 \text{ nm}$  und Yttrium  $\lambda = 349,609 \text{ nm}$  dargestellt, da keine signifikanten Unterschiede zwischen den Emissionslinien auftraten. Die Bestimmung der Verfahrenskenngrößen, wie das Bestimmtheitsmaß ( $R^2$ ), die Nachweis- (NWG), Erfassungs- (EG) und die Bestimmungsgrenze (BG), erfolgte nach DIN 32645 (siehe Tab. 3. 3). Die Erstellung der Kalibrierfunktion sowie die Berechnung der Probengehalte samt Vertrauensbereiche (VB) erfolgten nach DIN 38402-51 mit einem Vertrauensniveau P von 95 %.

**Tab. 3. 3: Verfahrenskenngrößen der ICP-OES-Bestimmung der aufgeschlossenen Standards nach DIN 32645**

	$\lambda_{\text{Cu}} = 324,754 \text{ nm}$	$\lambda_{\text{Y}} = 349,609 \text{ nm}$
NWG in $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	17,6	5,6
EG in $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	35,3	11,1
BG in $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	65,7	20,9
$R^2$	0,99995	0,99999

In Tab. 3. 4 werden die Ergebnisse der Quantifizierung des Massenanteils, inklusive Vertrauensbereich, von Kupfer in den präparierten Festkörperstandards mittels ICP-OES dargestellt.

**Tab. 3. 4: Via ICP-OES bestimmte Kupfergehalte und Vertrauensbereiche in den verschiedenen präparierten Festkörperstandards (n = 2)**

	$\omega_{(Cu)} \pm VB \text{ in mg}\cdot\text{kg}^{-1}$						
	Agarose	Cystein	Oxalsäure	Paraffin	Pektin	Pflanzen	Polymer
<b>Std.1</b>	57 ± 19	53 ± 20	46 ± 17	56 ± 16	60 ± 22	52 ± 16	56 ± 19
<b>Std.2</b>	167 ± 9	165 ± 8	107 ± 8	144 ± 9	157 ± 8	124 ± 9	182 ± 7
<b>Std.3</b>	217 ± 7	214 ± 3	148 ± 4	203 ± 3	228 ± 3	178 ± 3	220 ± 4
<b>Std.4</b>	279 ± 6	286 ± 6	207 ± 4	260 ± 5	280 ± 6	222 ± 4	275 ± 4
<b>Std.5</b>	327 ± 9	330 ± 11	235 ± 9	317 ± 2	337 ± 10	279 ± 11	326 ± 10
<b>Std. 6</b>	387 ± 19	366 ± 15	295 ± 14	356 ± 15	379 ± 16	313 ± 13	361 ± 14

Soll  $\omega_{(Cu)} = 50, 150, 200, 250, 300$  und  $350 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$

Die quantifizierten Massenanteile und Vertrauensbereiche der ICP-OES-Analyse von Yttrium in den präparierten Festkörperstandards sind in Tab. 3. 5 dargelegt.

**Tab. 3. 5: Via ICP-OES bestimmte Yttriumgehalte und Vertrauensbereiche in den verschiedenen präparierten Festkörperstandards (n = 2)**

	$\omega_{(Y)} \pm VB \text{ in mg}\cdot\text{kg}^{-1}$						
	Agarose	Cystein	Oxalsäure	Paraffin	Pektin	Pflanzen	Polymer
<b>Std.1</b>	229 ± 1	197 ± 1	198 ± 1	222 ± 1	219 ± 1	186 ± 1	222 ± 1
<b>Std.2</b>	212 ± 1	184 ± 1	162 ± 2	233 ± 1	201 ± 1	148 ± 2	233 ± 1
<b>Std.3</b>	221 ± 1	189 ± 1	165 ± 2	216 ± 1	222 ± 1	181 ± 1	216 ± 1
<b>Std.4</b>	185 ± 1	179 ± 1	180 ± 2	219 ± 1	209 ± 1	177 ± 2	219 ± 1
<b>Std.5</b>	221 ± 1	182 ± 1	168 ± 2	218 ± 1	219 ± 1	187 ± 1	218 ± 1
<b>Std. 6</b>	224 ± 1	189 ± 1	184 ± 2	206 ± 1	215 ± 1	189 ± 1	206 ± 1

Soll  $\omega_{(Y)} = 200 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$

Sowohl die Kupfer- als auch die Yttriumgehalte weichen von den Sollgehalten ab, dies ist bei den pulvrigen Matrices vor allem durch Rückstände der getrockneten aufgeschwemmten Matrices in den Gefäßen zu erklären. Weiterhin sind Adsorptions-, Reduktions- und/oder Oxidationsvorgänge während des Präparationsprozesses eine mögliche Erklärung. Die Abweichungen vom Sollgehalt unterstreichen die Notwendigkeit einer Bestimmung des Elementgehaltes nach der Präparation.

Die Quantifizierung der Massengehalte von Kupfer und Yttrium diene somit als hausinterne Zertifizierung der Festkörperstandards und war ein nötiger Schritt für die Verwendung als wiederum hausinternes Referenzmaterial für die Überprüfung der matrixunabhängigen Kalibrationsstrategie (siehe Abschnitt 3.4).

### **Bestimmung des Kohlenstoffgehaltes mit Elementaranalyse**

Neben der Bestimmung der Kupfer- und Yttriumgehalte wurde der Kohlenstoffgehalt in den Festkörperstandards mittels Elementaranalyse quantifiziert. Die Analyse wurde am Elementaranalysator CS-2000 der Fa. ELTRA GMBH (Haan) durchgeführt. Die Kalibrierung

erfolgte mit vier zertifizierten Kohlenstoffstandards; Calciumcarbonat ( $\omega_{(C)} = 12$  Gew.-%), Sulfanilsäure ( $\omega_{(C)} = 41,5$  Gew.-%), Atropinsulfatmonohydrat ( $\omega_{(C)} = 58,7$  Gew.-%) und Magerkohle ( $\omega_{(C)} = 91,2$  Gew.-%) der Fa. ELTRA GMBH (Haan). Die Messung der zertifizierten Kohlenstoffstandards und der präparierten Festkörperstandards wurde im O<sub>2</sub>-Strom bei 1350°C durchgeführt. Die Einwaagen sowohl der Kohlenstoffstandards als auch der präparierten Festkörperstandards betragen zwischen 20 - 80 mg. Es wurde eine Dreifachbestimmung jedes präparierten Festkörperstandards durchgeführt, die relativen Standardabweichungen (RSD) der Dreifachbestimmung lagen unter 2 %.

Die Ergebnisse der Kohlenstoffbestimmung sind in Tab. 3. 6 aufgelistet.

**Tab. 3. 6: Bestimmung des Kohlenstoffgehalts in präparierten Festkörperstandards mittels Elementaranalyse (n = 3)**

	$\omega_{(C)}$ in Gew.-%							
	Agarose	Cystein	Oxalsäure	Paraffin	Pektin	Pflanzen	Polymer	
<b>Std.1</b>	45,5	26,6	27,4	69,1 <sup>a</sup>	38,0	33,2	67,7	
<b>Std.2</b>	45,5	26,2	27,5	81,1 <sup>a</sup>	38,2	28,5	67,1	
<b>Std.3</b>	45,5	26,4	27,2	91,1	37,7	30,9	67,4	
<b>Std.4</b>	45,1	26,8	27,4	86,3	38,2	32,5	67,4	
<b>Std.5</b>	45,4	26,9	27,2	90,6	38,2	32,6	68,2	
<b>Std. 6</b>	45,7	26,9	27,5	89,4	37,9	33,3	68,5	
$\bar{x}$	45,5	26,6	27,4	(84,6) <sup>b</sup>	89,1	38,0	31,8	67,7
s	0,2	0,3	0,1	(4,2) <sup>b</sup>	1,9	0,2	1,9	0,6
<b>RSD in %</b>	0,5	1,1	0,5	(4,9) <sup>b</sup>	2,0	0,6	6,0	0,9

<sup>a</sup> Ausreißer; <sup>b</sup> mit Ausreißern berechnet

Die bestimmten Kohlenstoffgehalte innerhalb einer Matrix zeigen für Agarose, Cystein, Oxalsäure, Pektin und das Polymer RSDs zwischen 0,5 und 1,1 % und deuten auf geringe Unterschiede der Standards hin, so wie es zu erwarten war. Die hohen RSDs bei der Paraffin- und Pflanzenmatrix hingegen zeigen Unterschiede zwischen den einzelnen Konzentrationsniveaus auf. Beim Paraffin sind diese auf Probleme bei der Elementaranalyse zurückzuführen, da die Standards 1 und 2 stark rußend verbrannten und der Sauerstoffstrom nachgeregelt werden musste, um eine vollständige Verbrennung zu ermöglichen. Daher werden die Kohlenstoffgehalte der beiden Standards nicht berücksichtigt. Bei der Pflanzenmatrix hingegen deuten die RSDs auf eine vorhandene Heterogenität in den Standards hin und unterstreichen damit die Schwierigkeit bei der Präparation von der Probenmatrix angepassten Standards, wie in Abschnitt 2.2.5 bereits erwähnt.

Die Quantifizierung der Kohlenstoffgehalte in den präparierten Festkörperstandards diene ebenfalls der hausinternen Zertifizierung für die Überprüfung der matrixunabhängigen Kalibrationsstrategie (siehe Abschnitt 3.4).

### 3.3.2 Homogenitätsbestimmungen der Elementverteilung

Dieser Abschnitt befasst sich mit der Bestimmung der Homogenität der Elementverteilung von Kupfer und Yttrium in den präparierten Festkörperstandards. Die Untersuchungen zur Homogenitätsbestimmung wurden mittels  $\mu$ RFA und LA-ICP-MS durchgeführt. Bevor die Ergebnisse dargestellt werden, wird zunächst auf die verwendete Kenngröße, welche als Maß für die Homogenität der Verteilung eingesetzt wurde, eingegangen.

Wie in der Arbeit von THIELEKE, 2013 ausführlich beschrieben, kann die relative Standardabweichung (RSD; auch Variationskoeffizient genannt) als Maß für die Homogenität der Elementverteilung herangezogen werden. Die relative Standardabweichung berechnet sich nach Gl. 12 aus dem Mittelwert ( $\bar{x}$ ) und der Standardabweichung ( $s$ ). Dabei deuten niedrige RSDs auf eine homogene Verteilung und hohe RSDs auf eine heterogene Verteilung hin.

$$RSD\% = \frac{s(x)}{\bar{x}} \cdot 100 \% \quad \text{Gl. 12}$$

$$\text{Mit:} \quad \bar{x} = \frac{\sum x_i}{n} \quad \text{Gl. 13}$$

$$s(x) = \sqrt{\frac{(x_i - \bar{x})^2}{n - 1}} \quad \text{Gl. 14}$$

Wie bereits in Abschnitt 2.2.1 erwähnt, stellt der ISO-Leitfaden 30 als Anforderung für ein Referenzmaterial, als das die präparierten Festkörperstandards verwendet werden sollen, eine unscharfe Forderung nach „ausreichender“ Homogenität auf. Daher variieren die Anforderungen an das Referenzmaterial von Anwendung zu Anwendung und zwischen den verwendeten Messverfahren. Es kann somit keine scharfe Grenze der RSDs zwischen verschiedenen verwendeten Messtechniken definiert werden, sondern nur Vergleiche oder Reihenfolgen mit steigender oder sinkender Homogenität bzw. Heterogenität der Verteilung festgelegt werden. Deshalb variieren die ermittelten RSDs zwischen den unterschiedlichen Messverfahren. Ein scharfer Grenzwert kann folglich nur innerhalb eines verwendeten

Messverfahrens unter gleichen Messparametern festgelegt werden, z. B. durch Messung eines für die gewählte Analysentechnik zertifizierten Referenzmaterials, z. B. der Polymerstandard BAM-H010 für die  $\mu$ RFA (BAM-H010 A, 2014) und der Glasstandard NIST 610 für die LA-ICP-MS (NIST SRM 610, 1992).

#### **Homogenitätsbestimmung mittels $\mu$ RFA**

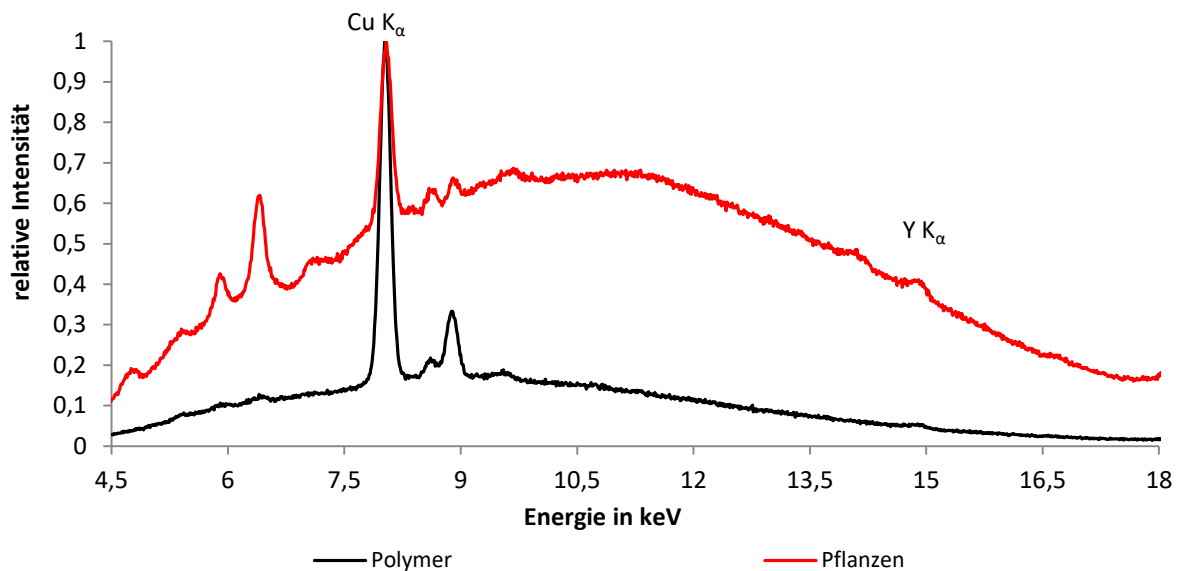
Die Elementverteilungsaufnahmen zur Homogenitätsbestimmung von Kupfer in den präparierten Festkörperstandards wurden an der  $\mu$ RFA, EAGLE  $\mu$ -PROBE II der Fa. EDAX Inc. (Mahwah, USA) durchgeführt. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden bei allen Messungen identische Messparameter eingestellt. Bei der Auswahl der Messparameter wurde sich an der Arbeit von DREYER, 2016 orientiert. Die Elementverteilungsaufnahmen wurden bei einer Beschleunigungsspannung von 40 kV, einer Anzahl von 128·100 Pixeln und einem Messpunktdurchmesser von 50  $\mu$ m aufgenommen. Es wurde eine Fläche von 6,5·4,7 mm gemessen, um keine Überlappung der Messpunkte zu gewährleisten. Aufgrund des hohen Untergrunds im Spektrum, verursacht durch die organischen Matrices und der daraus resultierenden geringen Signalintensitäten, wurde die Messzeit pro Punkt auf 4 s eingestellt, was einer Gesamtmessdauer von 19,7 Stunden je Aufnahme entspricht. Ungeachtet der langen Messdauer konnten lediglich jeweils die höchsten Kalibrationsniveaus einmal gemessen werden, da bei den niedrigeren Kupfermassenanteilen die geringen Signalintensitäten keine aussagekräftigen Rückschlüsse auf die Elementverteilung zuließen (siehe Tab. 3. 7). Die Signalintensitäten von Yttrium waren in sämtlichen Festkörperstandards ebenfalls zu gering, um zur Homogenitätsbestimmung herangezogen werden zu können und wurden daher nicht weiter berücksichtigt (vgl. Abb. 3. 9).

In Tab. 3. 7 sind die gemessenen maximalen Signalintensitäten ( $I_{max}$ ) im höchsten Kalibrationsniveau der Elemente Kupfer und Yttrium dargestellt.

**Tab. 3. 7: Intensitätsmaxima der Elementverteilungsaufnahmen der  $\mu$ RFA des höchsten Kalibrationsniveaus der verschiedenen Matrices**

<b>Matrix</b>	<b><math>I_{max}(\text{Cu})</math> in cps</b>	<b><math>I_{max}(\text{Y})</math> in cps</b>
<b>Cystein</b>	126	48
<b>Pflanzen</b>	183	96
<b>Oxalsäure</b>	231	66
<b>Pektin</b>	357	108
<b>Agarose</b>	456	81
<b>Polymer</b>	1404	75
<b>Paraffin</b>	3714	105

Abb. 3. 9 zeigt beispielhaft einen Auszug der relativen Röntgenspektren der  $\mu$ -RFA-Messung im Bereich zwischen 4,5 und 18 keV des Polymerstandards 6 und des Pflanzenstandards 6 mit dem jeweils höchsten Kupfermassenanteil. Beide Spektren zeigen den oben erwähnten erhöhten Untergrund durch die organischen Matrices, welcher in den ehemals pulvrigen Matrices, wie z. B. Cystein und Pflanzen, wesentlich höher ausfiel.



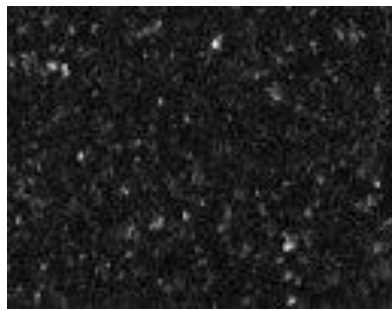
**Abb. 3. 9:** Röntgenspektrum der  $\mu$ -RFA-Messung des Polymerstandards 6 (mit  $\omega_{(\text{Cu})} = 361 \pm 14 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  und  $\omega_{(\text{Y})} = 206 \pm 1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) und des Pflanzenstandards 6 (mit  $\omega_{(\text{Cu})} = 313 \pm 13 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  und  $\omega_{(\text{Y})} = 189 \pm 1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ). Punktmessung, Messzeit live 30 s, Anregungsspannung 40 keV, Stromstärke 300  $\mu\text{A}$ .

Für die Erstellung der Elementverteilungsbilder wurden die Röntgenpeaks von Kupfer (Energie der  $K_{\alpha}$ -Strahlung = 8027,84 eV) und Yttrium (Energie der  $K_{\alpha}$ -Strahlung = 14882,94 eV) verwendet (NIST Physical Reference Data, 2016).

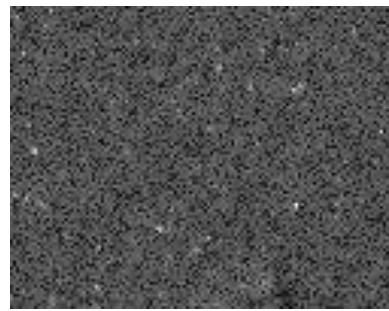
Die Auswertung der Elementverteilungsbilder erfolgte mittels der Gerätesoftware (VISION 32) und der Software IMAGE J. Dazu wurden die farbigen Elementverteilungsbilder, wobei die Helligkeit mit der gemessenen Signalintensität des Analyten korreliert, zunächst mit der Gerätesoftware der  $\mu$ RFA in 8-Bit-Graustufenverteilungen mit 256 Zuständen umgewandelt. Mittels IMAGE J wurde ein Histogramm der 8-Bit-Graustufenverteilungen erstellt und die RSDs bestimmt.

In Abb. 3. 10 sind die Graustufen-Elementverteilungsaufnahmen des höchsten Kalibrationsniveaus der verschiedenen Matrices mit den ermittelten RSDs dargestellt.

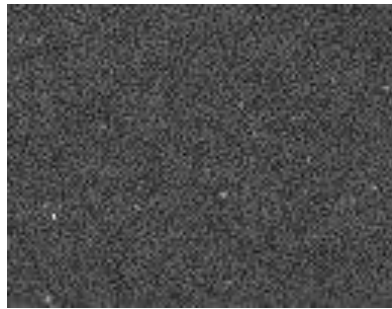




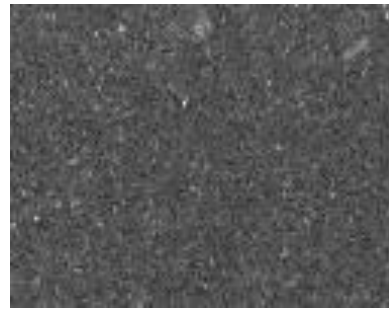
**Cystein ( $\omega_{(Cu)} = 366 \pm 15 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )**  
**RSD = 53,6 %**



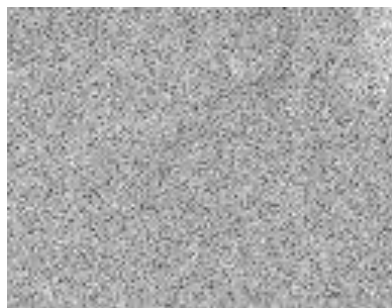
**Oxalsäure ( $\omega_{(Cu)} = 387 \pm 18 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )**  
**RSD = 22,3 %**



**Pflanzen ( $\omega_{(Cu)} = 313 \pm 13 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )**  
**RSD = 16,1 %**



**Pektin ( $\omega_{(Cu)} = 295 \pm 14 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )**  
**RSD = 13,9 %**



**Agarose ( $\omega_{(Cu)} = 378 \pm 15 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )**  
**RSD = 10,0 %**



**Polymer ( $\omega_{(Cu)} = 360 \pm 14 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )**  
**RSD = 4,3 %**



**Paraffin ( $\omega_{(Cu)} = 356 \pm 15 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )**  
**RSD = 3,6 %**

**$\mu$ RFA – Elementverteilung**

**Messparameter:**

19,7 h, 40 kV,  
6,50 mm·4,70 mm,  
128·100 Pixel

**Abb. 3. 10: Homogenitätsuntersuchung mittels  $\mu$ RFA-Elementverteilungsbildern von Kupfer in den verschiedenen Einzelelementstandards. Die Berechnung der RSDs erfolgte mittels IMAGEJ.**

Aus den Ergebnissen wird ersichtlich, dass in der Polymer- und Paraffin-Matrix die geringsten RSDs von 3,6 - 4,3 % erreicht wurden, was der gleichmäßigsten Verteilung des Analyten Kupfer entspricht. Die RSDs in den Matrices Agarose, Pektin, Pflanzen und Oxalsäure

erreichten Werte zwischen 10 und 20 %. Bemerkenswert ist der Wert der Pflanzenmatrix (RSD = 16,1 %), da diese Art von matrixangepassten Standards und deren Präparationsverfahren in der Literatur häufig verwendet wird (ZORIY ET AL., 2006; WU A ET AL., 2009; WU B ET AL., 2009; BECKER, 2010) und keine Probleme der Homogenität erwähnt werden. Die geringste Homogenität und größte RSD von über 50 % wurde in der Cystein-Matrix festgestellt. Allerdings wurden auch in dieser Probe die niedrigsten Signalintensitäten gemessen (siehe Tab. 3. 7). Die Signalhöhe hat einen direkten Einfluss auf die Bestimmung der RSDs, da sich bei geringen Intensitäten das Rauschen des Messsystems stärker auf die RSDs auswirkt als bei hohen Intensitäten. Somit ist der Wert der RSD von 53,6 % durchaus kritisch zu bewerten. Allerdings sollte das Rauschen des Messsystems bei allen Messungen in vergleichbarer Größenordnung ausfallen und daher bleibt die gesamte Aussagekraft dieses Experiments erhalten.

Um die Einordnung der oben genannten Ergebnisse zu erleichtern, wurde das zertifizierte Referenzmaterial BAM-H010 ebenfalls einer Homogenitätsbestimmung mittels  $\mu$ RFA unterzogen. Allerdings konnten keine aussagekräftigen Elementverteilungsbilder erzeugt werden, da die Signalintensitäten der Analyten unter den gewählten Messparametern zu gering ausfielen. Um dennoch einen Richtwert für RSDs in zertifizierten Referenzmaterialien zu erhalten, wurde der Zertifizierungsbericht des BAM-H010 hinzugezogen. In diesem Bericht werden RSDs zwischen 0,5 und 1,4 % für Blei, Cadmium, Chrom und Quecksilber genannt (BAM-H010 B, 2014). Die Messung des Referenzmaterials wurde unter abweichenden Messparametern an einem anderen Gerät durchgeführt und umfasste andere Analyten. So betrug der Messpunktdurchmesser 150 statt 50  $\mu$ m. Unter der Berücksichtigung der gravierenden Unterschiede bei der Homogenitätsbestimmung konnte kein Vergleich durchgeführt werden, welcher eine Bewertung der präparierten Festkörperstandards mit zertifizierten Referenzmaterialien erlaubt.

Aus den Ergebnissen der Homogenitätsbestimmung der Elementverteilung von Kupfer in den hergestellten Festkörperstandards lässt sich der Grad der Homogenität der verschiedenen Matrices in folgender Reihenfolge anordnen:

**Cystein < Oxalsäure < Pflanzen < Pektin < Agarose < Polymer < Paraffin**

#### **Homogenitätsbestimmungen mittels LA-ICP-MS**

Die Homogenitätsbestimmung der Elementverteilung von Kupfer und Yttrium in den präparierten Festkörperstandards wurde nach der von THIELEKE, 2013 beschriebenen Methode zur Bewertung der Homogenität verschiedener Festkörperstandards durchgeführt.

Verwendet wurde ein ns-Lasersystem (UP-213-2078, Fa. NEW WAVE RESEARCH INC., Fremont, USA) sowie ein Quadrupol-Massenspektrometer (XSERIE 2, Fa. THERMO FISHER SCIENTIFIC GMBH, Bremen). Als Ablationszelle diente eine hauseigene Kammer, beschrieben in der Arbeit von LEHMANN, 2011. Die Ablation der Proben erfolgte durch Linienscans mit einer Scangeschwindigkeit von  $20 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ , einer Länge von 2,5 mm und einem Abstand zwischen den einzelnen Linien von 200  $\mu\text{m}$ , was dem doppelten verwendeten Laserspotdurchmesser ( $\varnothing = 100 \mu\text{m}$ ) entsprach. Der Laser wurde auf die Probenoberfläche fokussiert. Die Schussfrequenz des gepulsten Lasers betrug 20 Hz bei einer Laserfluenz von ca.  $4,1 \text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$ . Das ablatierte Probenmaterial wurde mittels Heliumgasstrom ( $1,16 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ ) zum Massenspektrometer transportiert. Die Einstellung der Laserparameter erfolgte ebenfalls in Anlehnung an THIELEKE, 2013. Gemessen wurden die Isotope  $^{13}\text{C}$ ,  $^{63}\text{Cu}$ ,  $^{65}\text{Cu}$  und  $^{89}\text{Y}$  mit einer Dwellzeit von 30 ms. Durch die konstante Einleitung von  $0,17 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  verdünnter Salpetersäure (2,5 Gew.-%, subboiled) wurde das Plasma angefeuchtet, um ein robusteres Plasma zu erreichen (O' CONNOR ET AL., 2006). Die weiteren eingestellten Parameter des ICP-MS sind in Tab. 8. 3 im Anhang aufgelistet. Da die Größe der Ablationskammer beschränkt war, wurden jeweils nur alle sechs Kalibrationsniveaus einer Matrix zeitgleich in der Kammer platziert und vor Start der Ablation 10 min mit Helium gespült, um den Kohlenstoff aus der Umgebungsluft der Kammer zu entfernen. Im Anschluss daran wurde zunächst auf dem Standard mit dem niedrigsten Kalibrationsniveau 15 min lang ein Raster ablatiert, um das Plasma zu konditionieren. Anschließend wurde die Messung der Homogenitätsbestimmung gestartet, dazu wurden auf jedem Standard 15 Linien ablatiert, was einer ablatierten Fläche von  $3,75 \text{ mm}^2$  entspricht. Sukzessive wurden so alle sieben präparierten Kalibrationsreihen der unterschiedlichen Matrices gemessen.

Exemplarisch ist der Rohsignalverlauf des jeweils höchsten Kalibrationsniveaus mit einem Sollgehalt von  $350 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  für Kupfer und  $200 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  für Yttrium jeder verwendeten Matrix in Abb. 3. 11 und Abb. 3. 12 dargestellt. Die exakten Massenanteile können aus Tab. 3. 4 und Tab. 3. 5 entnommen werden.

### 3 Matrixunabhängige Kalibrationsstrategie

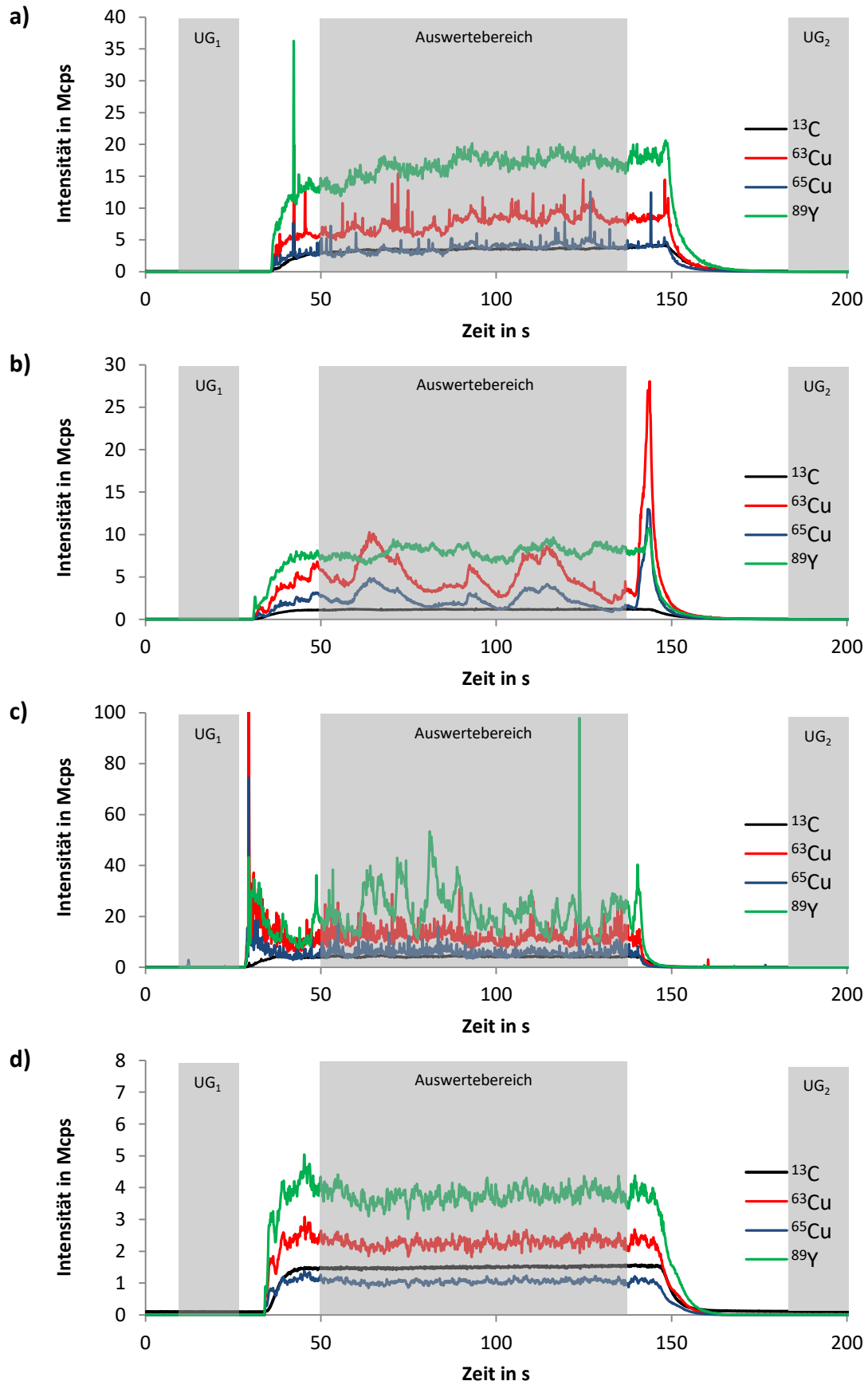


Abb. 3. 11: Rohsignalverlauf von  $^{13}\text{C}$ ,  $^{63}\text{Cu}$ ,  $^{65}\text{Cu}$  und  $^{89}\text{Y}$  während der Laserablation auf den Festkörperstandards aus Agarose (a), Cystein (b), Oxalsäure (c) und Polymer (d).

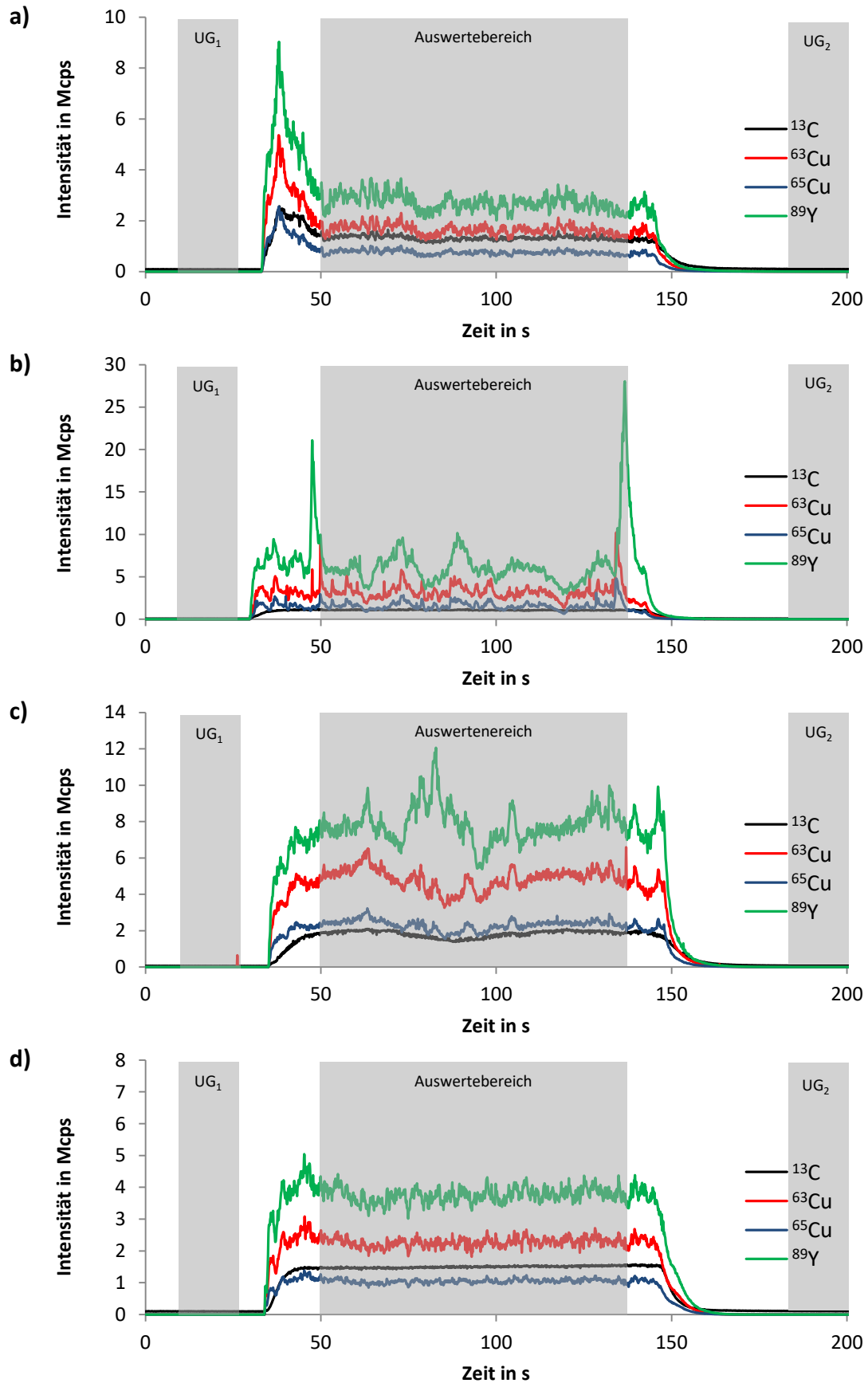


Abb. 3. 12: Rohsignalverlauf von  $^{13}\text{C}$ ,  $^{63}\text{Cu}$ ,  $^{65}\text{Cu}$  und  $^{89}\text{Y}$  während der Laserablation auf den Festkörperstandards aus Paraffin (a), Pektin (b), Pflanzen (c) und Polymer (d).

Zum Vergleich wurde in beiden Abbildungen der Polymerstandard aufgeführt, da in früheren Arbeiten diese Matrix eine homogene Elementverteilung der eingebrachten Analyten ermöglichte (SCHWARTZE, 2013; THIELEKE, 2013; DREYER, 2016).

Neben den dargestellten Signalverläufen der gemessenen Rohintensitäten der Analyten sind die Regionen zur Bestimmung des Untergrunds ( $UG_1$  und  $UG_2$ ) und des zur Auswertung betrachteten Bereichs des Messsignals (Auswertebereich) eingezeichnet. Die Untergrundkorrektur war nötig, da der Untergrund aller Isotope über die Messdauer schwankte. Des Weiteren ist ein erhöhter  $^{13}\text{C}$ -Untergrund, verursacht durch Verunreinigungen im Argongas, aus der Atmosphäre und aus Gasleitungen, zu verzeichnen (REGE ET AL., 2005). Der Auswertebereich umfasste 80 s, was einer Strecke von 1600  $\mu\text{m}$  bei einer Scangeschwindigkeit von  $20 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$  entsprach und in einer für die Auswertung verwendeten Fläche von  $2,4 \text{ mm}^2$  resultierte. Diese Reduzierung der Fläche war nötig, da zunächst im Plasma des ICPs und im Gasraum der Ablationskammer wieder ein Gleichgewichtszustand erreicht werden musste, erkennbar an dem stabilen  $^{13}\text{C}$ -Signal. Die Erreichung dieses Gleichgewichtszustands dauerte etwa 15 s und war damit bedeutend kürzer als die Konditionierung des Plasmas zu Beginn der Messung, welches der Minimierung des Langzeitdrifts diene. Versuche ohne die Konditionierung am Anfang der Messung führten zu einem langsamen Signalanstieg über etwa 15 min bis der stabile Gleichgewichtszustand erreicht war.

In den dargestellten Verläufen der gemessenen Rohintensitäten sind große Unterschiede zwischen den Matrices erkennbar. Ein gleichmäßiger Verlauf des Signals ist lediglich bei der Paraffin- und Polymermatrix zu beobachten. Die restlichen Matrices weisen einen unruhigeren Verlauf auf, wobei der ungleichmäßigste Verlauf bei der Cysteinmatrix zu verzeichnen ist. Die gemessenen Analyten  $^{63}\text{Cu}$ ,  $^{65}\text{Cu}$  und  $^{89}\text{Y}$  zeigen jeweils pro Matrix einen ähnlichen Verlauf. Dies deutet auf eine identische Verteilung der beiden Elemente Kupfer und Yttrium hin. Kohlenstoff weist in allen Matrices den ruhigsten Signalverlauf auf, da Kohlenstoff als Hauptbestandteil der Matrix im Prozentbereich und Kupfer sowie Yttrium im Spurenbereich vorliegen und eine homogene Verteilung des Matrixelements erwarten lassen.

Die über  $^{13}\text{C}$  und  $^{89}\text{Y}$  normalisierten Signalverläufe der Isotope  $^{63}\text{Cu}$  und  $^{65}\text{Cu}$  sind in Abb. 3. 13 und Abb. 3. 14 gezeigt.

### 3 Matrixunabhängige Kalibrationsstrategie

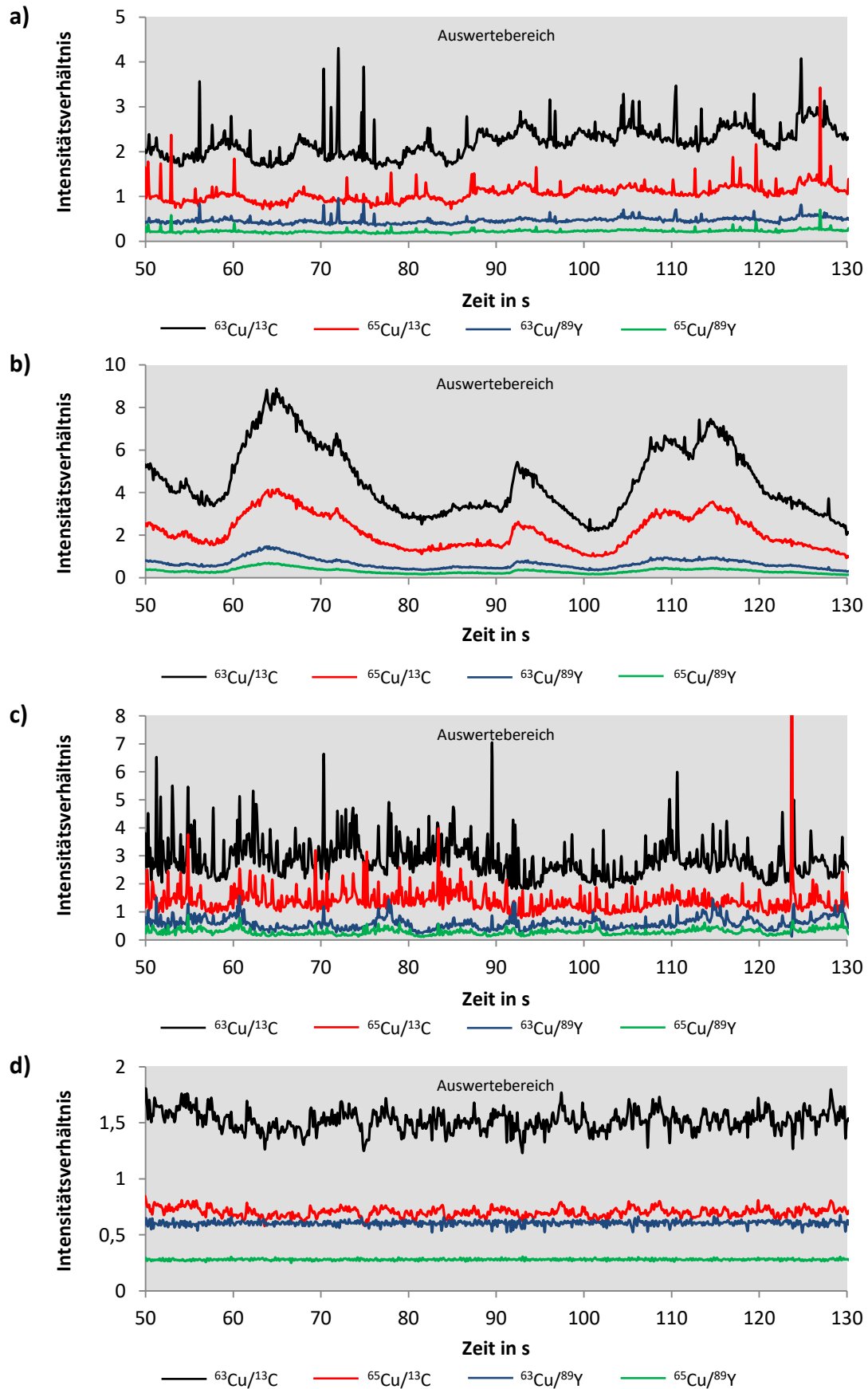


Abb. 3. 13: Normalisierter Signalverlauf von  $^{63}\text{Cu}$  und  $^{65}\text{Cu}$  während der Laserablation auf den Festkörperstandards aus Agarose (a), Cystein (b), Oxalsäure (c) und Polymer (d).

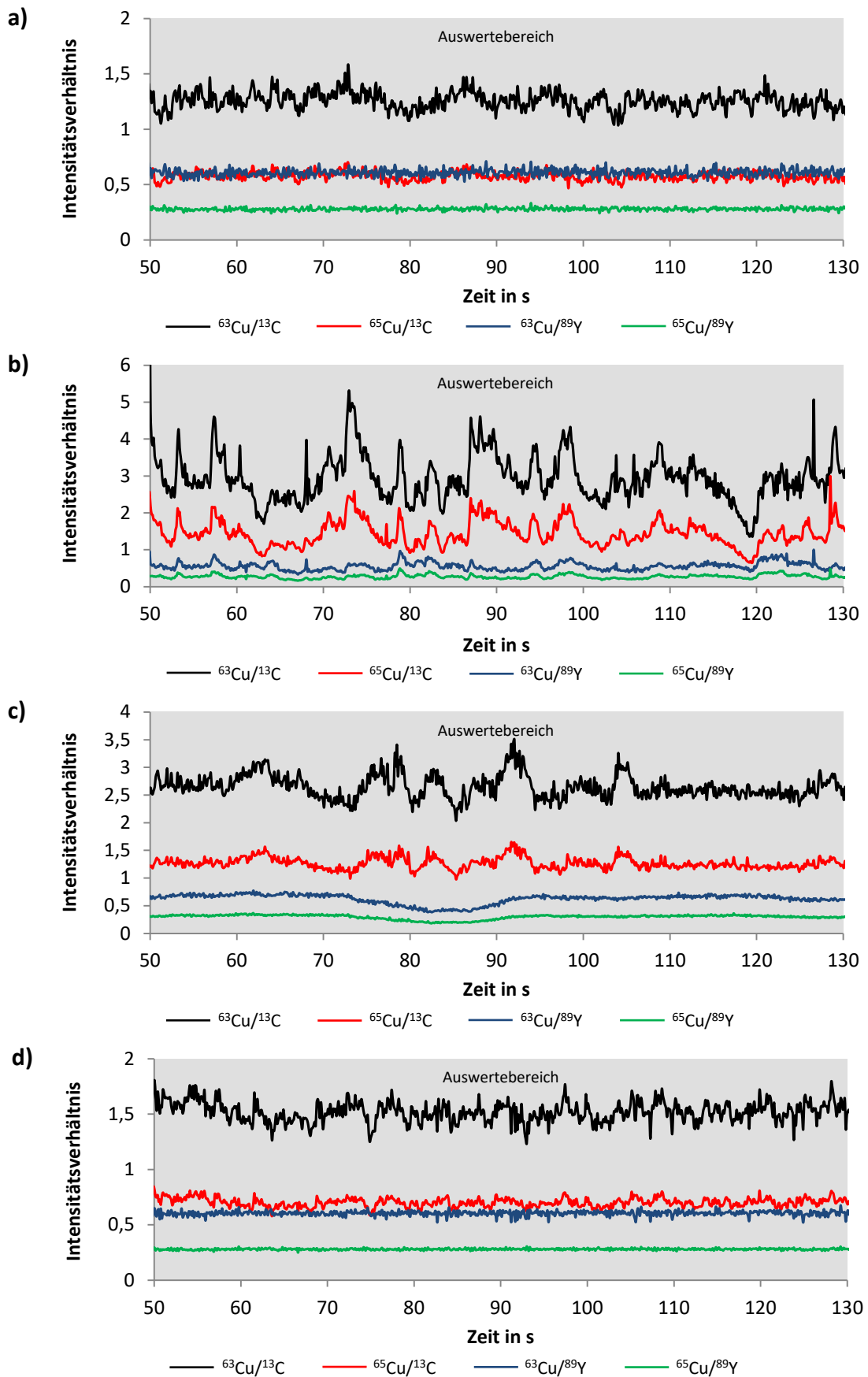


Abb. 3. 14: Normalisierter Signalverlauf von  $^{63}\text{Cu}$  und  $^{65}\text{Cu}$  während der Laserablation auf den Festkörperstandards aus Paraffin (a), Pektin (b), Pflanzen (c) und Polymer (d).



Wie in Abschnitt 2.2.2 ausführlicher beschrieben, wurde die Normalisierung durchgeführt, um Schwankungen der Laserleistung, Änderungen der Ablationsrate, der Matrixeffekte und des Drifts des Massenspektrometers zu korrigieren (KINDNESS ET AL., 2003; ZORIY ET AL., 2008; HARE ET AL., 2009; AUSTIN ET AL., 2010; POZEBON ET AL., 2014).

Auch in den dargestellten normalisierten Signalverläufen der Festkörperstandards aus den verschiedenen Matrices werden die gleichen Unterschiede zwischen den Matrices deutlich, wie bei den in Abb. 3. 11 und Abb. 3. 12 dargestellten Rohintensitäten. In der Paraffin- und Polymermatrix wurde der gleichmäßigste Signalverlauf sowohl für die über  $^{13}\text{C}$  als auch für die über  $^{89}\text{Y}$  normalisierten Kupfersignale erreicht, wobei die Normalisierung über  $^{89}\text{Y}$  zu den geringsten Signalschwankungen führte. Die ungleichmäßigsten Signale wurden in der Cysteinmatrix gemessen. Die restlichen verwendeten Matrices (Agarose, Oxalsäure, Pektin und Pflanzen) zeichnen sich ebenfalls durch relativ unruhige Signalverläufe aus. Ebenfalls auffällig ist der positive Effekt der Normalisierung über  $^{89}\text{Y}$ . In allen Matrices führte diese zu ruhigeren Signalverläufen als die Normalisierung über  $^{13}\text{C}$ .

Aus diesen Beobachtungen kann geschlossen werden, dass die Matrices bzw. die Präparationsverfahren der verschiedenen Matrices den größten Einfluss auf die Signalverläufe haben, da die Normalisierung zur Korrektur von Schwankungen der Laserleistung, Änderungen der Ablationsrate, Matrixeffekte und des Drifts des Massenspektrometers nur eine relativ geringe Änderung der Signale zur Folge hatte. Weiterhin führt die Normalisierung über ein Element (Y) mit einem ähnlichen Massenanteil wie die Analyten (Cu) zu einer effektiveren Normalisierung als bei der Verwendung eines Matrixelements (C). Somit scheint die Verteilung der hinzudotierten Analyten (Cu und Y) wesentlich gleichmäßiger zu erfolgen, als die Verteilung der Matrix (C) und der Analyten. Bei den pulvrigen Matrices könnte dieses Verhalten entweder durch eine unzureichende Homogenisierung oder – wesentlich wahrscheinlicher – durch variierende Partikelgrößen hervorgerufen werden. Denn bei unterschiedlichen Partikelgrößen ändert sich das Analyt-zu-Matrixelement-Verhältnis, da die Analyten auf der Oberfläche adsorbieren und bei größeren Partikeln somit ein größeres Volumen im Vergleich zur Oberfläche vorliegt. Dies resultiert in einer Änderung der gemessenen Kupfer-zu-Kohlenstoff-Verhältnisse.

Um aus den normalisierten Signalverläufen einen Wert für die Homogenität der Elementverteilung zu bestimmen, wurden zunächst aus dem Auswertebereich der jeweiligen

Linie ein Mittelwert und im Anschluss aus den 15 Mittelwerten der Standards ein weiterer Mittelwert und die relative Standardabweichung gebildet.

Die RSDs der  $^{63}\text{Cu}$  über  $^{13}\text{C}$  normalisierten Intensitätsverhältnisse in allen Festkörperstandards sind in Tab. 3. 8 dargestellt. In Tab. 3. 9 sind die RSDs der  $^{63}\text{Cu}$  über  $^{89}\text{Y}$  normalisierten Intensitätsverhältnisse in allen Festkörperstandards aufgelistet.

**Tab. 3. 8: Homogenitätsbestimmung von Kupfer mittels LA-ICP-MS der präparierten Festkörperstandards anhand der über  $^{13}\text{C}$  normalisierten  $^{63}\text{Cu}$ -Intensitäten (n = 15)**

	Relative Standardabweichung						
	Agarose in %	Cystein in %	Oxalsäure in %	Paraffin in %	Pektin in %	Pflanzen in %	Polymer in %
<b>Std.1</b>	2,7	57,3	11,9	1,8	3,4	50,4	1,9
<b>Std.2</b>	22,1	40,1	5,5	1,2	6,2	9,8	1,5
<b>Std.3</b>	4,8	42,4	7,8	3,3	4,4	6,7	2,9
<b>Std.4</b>	5,4	33,1	7,1	17,7	4,7	5,8	2,2
<b>Std.5</b>	5,2	22,1	6,0	5,6	4,3	5,5	3,4
<b>Std.6</b>	3,3	30,7	8,0	5,4	6,2	3,0	3,5
$\bar{x}$	7,3	37,6	7,7	5,8	4,9	13,5	2,6

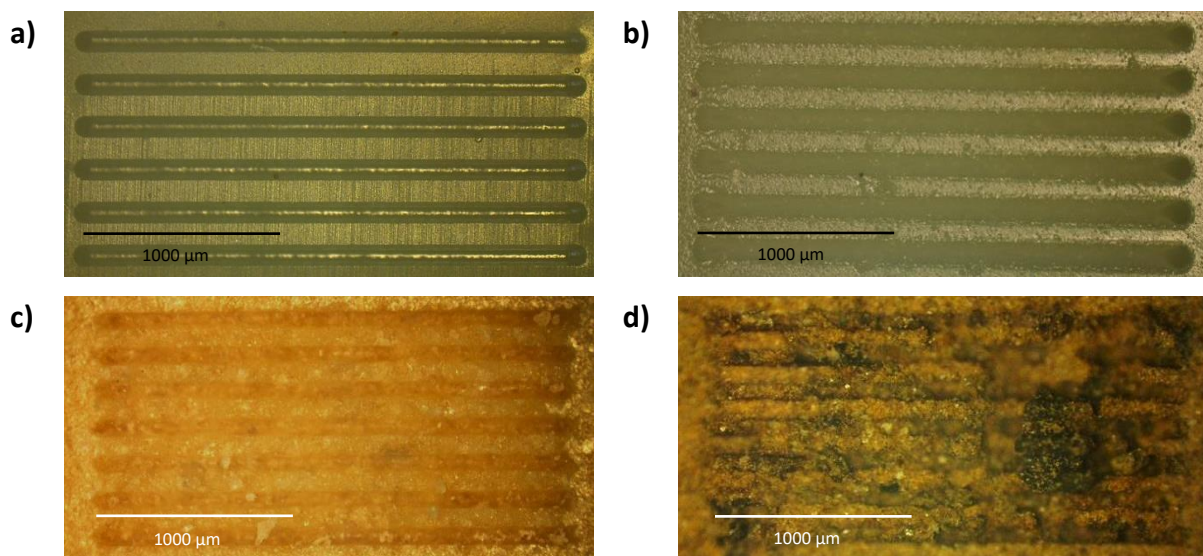
**Tab. 3. 9: Homogenitätsbestimmung von Kupfer mittels LA-ICP-MS der präparierten Festkörperstandards anhand der über  $^{89}\text{Y}$  normalisierten  $^{63}\text{Cu}$ -Intensitäten (n = 15)**

	Relative Standardabweichung						
	Agarose in %	Cystein in %	Oxalsäure in %	Paraffin in %	Pektin in %	Pflanzen in %	Polymer in %
<b>Std.1</b>	7,5	56,5	14,6	1,2	1,7	55,3	1,8
<b>Std.2</b>	8,6	34,7	8,4	0,6	3,3	10,2	0,6
<b>Std.3</b>	10,0	32,4	5,9	0,5	1,6	8,7	0,3
<b>Std.4</b>	8,2	32,1	8,5	0,7	3,6	9,5	0,6
<b>Std.5</b>	4,2	21,0	9,7	1,1	7,3	7,2	0,5
<b>Std.6</b>	4,8	32,4	13,5	0,6	7,5	5,9	0,4
$\bar{x}$	7,2	34,9	10,1	0,8	4,2	16,1	0,7

Sowohl die Homogenitätsbestimmungen aus den über  $^{13}\text{C}$  als auch die über  $^{89}\text{Y}$  normalisierten Kupferverteilungen bestätigen die oben genannten Ergebnisse der optischen Begutachtung der Messsignale. Für die Paraffin- und Polymermatrix wurden die geringsten RSDs bestimmt, welche der gleichmäßigsten Elementverteilung entsprechen. Die RSDs lagen im Mittel bei 2 – 6 % für die  $^{13}\text{C}$ -Normalisierung und unter 1 % bei der  $^{89}\text{Y}$ -Normalisierung. In der Agarose-, Oxalsäure- und Pektinmatrix wurden bei beiden Normalisierungen mittlere RSDs zwischen 4 und 10 % gemessen und somit eine mittlere Homogenität in der Elementverteilung bestimmt. Die mittleren RSDs der Pflanzenmatrix lagen bei ca. 15 % und zeigten keinen deutlichen Unterschied zwischen den beiden Normalisierungen. Die größten

mittleren RSDs ( $\geq 30\%$ ) wurden in der Cysteinmatrix bestimmt, damit wurde in dieser Matrix die geringste Homogenität erreicht. Außerdem sind in den Festkörperstandards aus pulvrigen Matrices teilweise Ausreißer mit deutlich abweichenden RSDs zu beobachten, die Probleme bei der Verwendung dieser Standardtypen verdeutlichen (vgl. Abschnitt 2.2.5).

GUILLONG ET AL., 2003 publizierten in ihrer Arbeit RSDs von 7 - 12 % für das zertifizierte Referenzmaterial NIST 610 bei der Verwendung eines 213 nm-Lasers. In der Arbeit von THIELEKE, 2013 wurde das zertifizierte Referenzmaterial ebenfalls unter vergleichbaren Bedingungen wie die in dieser Arbeit präparierten Festkörperstandards gemessen und ausgewertet. Die publizierten RSDs lagen für die betrachteten Elemente bei unter 7 %. Daher können relative Standardabweichungen von 7 - 10 % als Gütemerkmal für Standards für die LA-ICP-MS herhalten. Somit erfüllten von den sieben verschiedenen Matrices lediglich zwei Matrices (Cystein und Pflanzen) dieses Gütekriterium nicht. Auch hier zeigen sich wieder Schwierigkeiten bei der Herstellung und Verwendung von matrixangepassten Standards (vgl. Abschnitt 2.2.5). Eine weitere mögliche Erklärung für die relativ hohen RSDs einiger pulvriger Matrices liefern die Arbeiten von THIELEKE, 2013 und CHEN, 2015. Dort wurden die Ablationskrater in verschiedenen Matrices untersucht und teilweise große Abplatzungen des Standardmaterials und ungleichmäßige Ablationsspuren beobachtet (siehe Abb. 3. 15). Diese abgeplatzten Partikel können unter Umständen nicht vollständig ionisiert werden und somit zu Änderungen der Kupfer-zu-Kohlenstoff-Verhältnisse führen und in erhöhten RSDs resultieren.



**Abb. 3. 15. Ablationsspuren auf der Polymer- (a), Paraffin- (b), Cystein- (c) und Pflanzenmatrix (d). Lichtmikroskop-Aufnahmen aus CHEN 2015.**

Aus den Ergebnissen der Homogenitätsbestimmung der Elementverteilung von Kupfer in den hergestellten Festkörperstandards mittels LA-ICP-MS lässt sich der Grad der Homogenität der verschiedenen Matrices in folgender Reihenfolge anordnen:

**Cystein < Pflanzen < Oxalsäure < Agarose < Pektin < Paraffin < Polymer**

### **Vergleich der Homogenitätsbestimmung**

In diesem Abschnitt werden die beiden Herangehensweisen ( $\mu$ RFA und LA-ICP-MS) bei der Homogenitätsbestimmung der Elementverteilung miteinander verglichen. Dazu wurden zunächst die mittleren RSDs aller verwendeten Matrices für beide Normalisierungsverfahren bestimmt. Es wurden alle Einzel-RSDs der LA-ICP-MS-Bestimmung eines jeden Kalibrationsniveaus berücksichtigt und keine Ausreißertests durchgeführt, um ein umfassendes Bild über die vorliegende Elementverteilung zu erhalten. Für eine bessere Übersichtlichkeit und Nachvollziehbarkeit sind die gemittelten RSDs der verschiedenen Matrices in Tab. 3. 10 dargestellt.

**Tab. 3. 10: Vergleich der ermittelten RSDs der verwendeten Matrices zwischen  $\mu$ RFA und ns-LA-ICP-QMS**

Matrices	$\mu$ RFA	ns-LA-ICP-QMS	
	Cu	Intensitätsverhältnis	
	RSD in %	Cu <sup>63</sup> /C <sup>13</sup> RSD in %	Cu <sup>63</sup> /Y <sup>89</sup> RSD in %
Agarose	10,0	7,3	7,2
Cystein	53,6	37,6	34,9
Oxalsäure	22,3	7,7	10,1
Paraffin	3,6	5,8	0,8
Pektin	13,9	4,9	4,2
Pflanzen	16,1	13,5	16,1
Polymer	4,3	2,6	0,7

Generell zeigen die pulvrigen Matrices höhere RSDs als die Polymer- und Paraffinmatrix und unterstreichen die schwierigere Einbringung und Homogenisierung der Analyten bei der Präparation von matrixangepassten Standards nach diesem Präparationsverfahren. Bei beiden Herangehensweisen zeichnet sich die Polymermatrix durch niedrige RSDs aus und somit wurde die homogenste Elementverteilung innerhalb dieses Standards erreicht. Ebenfalls konnten die inhomogensten Elementverteilungen in der Cysteinmatrix bestimmt werden. Für die restlichen Matrices zeigen beide Verfahren Unterschiede sowohl in den RSD-Werten als auch in der Reihenfolge der erreichten Homogenität und sind damit – wie oben

bereits erwähnt – nur indirekt vergleichbar. Zu berücksichtigen ist hierbei allerdings die unterschiedliche Anzahl der untersuchten Standards einer Matrix, wie auch die untersuchte Fläche der Standards. Bei der  $\mu$ RFA konnte nur ein Kalibrationsniveau untersucht werden und damit können die RSDs nur als repräsentativ für die jeweilige Matrix angenommen werden. Allerdings betrug die untersuchte Fläche ca.  $30,5 \text{ mm}^2$  und bei der LA-ICP-MS  $2,4 \text{ mm}^2$ , was in einer etwa 13-mal größeren beprobten Fläche resultiert. Dies führt dazu, dass mögliche lokale Inhomogenitäten bei der LA-ICP-MS unerkannt bleiben könnten. Eine Angleichung der untersuchten Fläche würde zwar die Vergleichbarkeit beider Verfahren erhöhen, wäre allerdings vom Zeitaufwand her nicht sinnvoll. Durch den zerstörungsfreien Charakter der  $\mu$ RFA bietet sich diese Methode als erster Schritt zur Bestimmung der Elementverteilung an, um lokale Inhomogenitäten zu identifizieren. Außerdem könnte mittels der  $\mu$ RFA-Ergebnisse die Anzahl der Linien bei der LA-ICP-MS festgelegt werden, da eine unzureichende Homogenität durch Mehrfachmessung auszugleichen wäre. Für die entscheidende Bestimmung sollte hingegen auf die LA-ICP-MS zurückgegriffen werden, da die Festkörperstandards auch für diesen Zweck präpariert wurden. Durch den Vergleich mit einem zertifizierten Referenzmaterial konnte die erreichte Homogenität bei der LA-ICP-MS in den Festkörperstandards klassifiziert werden (siehe Abschnitt 3.3.2).

Weiterhin wurden in gut homogenisierbaren Matrices wie dem Polymer und Paraffin kleinere RSDs festgestellt, sodass die Normalisierung über ein Element, welches im selben Gehaltsbereich wie der Analyt vorliegt, geringfügig vielversprechender ausfällt als die Normalisierung über ein Matrixelement. Somit sollte die matrixunabhängige Kalibration mit einem hinzudotierten internen Standard ebenfalls ein größeres Bestimmtheitsmaß ( $R^2$ ) erreichen.

#### **3.4 Überprüfung der matrixunabhängigen Kalibrationsstrategie**

Dieser Abschnitt befasst sich mit der ausführlichen Validierung der von THIELEKE, 2013 entwickelten matrixunabhängigen Kalibrationsstrategie für die LA-ICP-MS. Dazu wird das in Kapitel 2.2.6 beschriebene Verfahren der Normalisierung und Korrektur der Kohlenstoff- und Yttriumgehalte durchgeführt, um die Eignung des Matrixelements Kohlenstoff zu überprüfen. Es wurden die gleichen Einstellungen der LA-ICP-MS Methode wie in Abschnitt 3.3.2 verwendet. Abb. 3. 16 zeigt beispielhaft den Signalverlauf in der Kalibrationsreihe aus der Polymermatrix.

### 3 Matrixunabhängige Kalibrationsstrategie

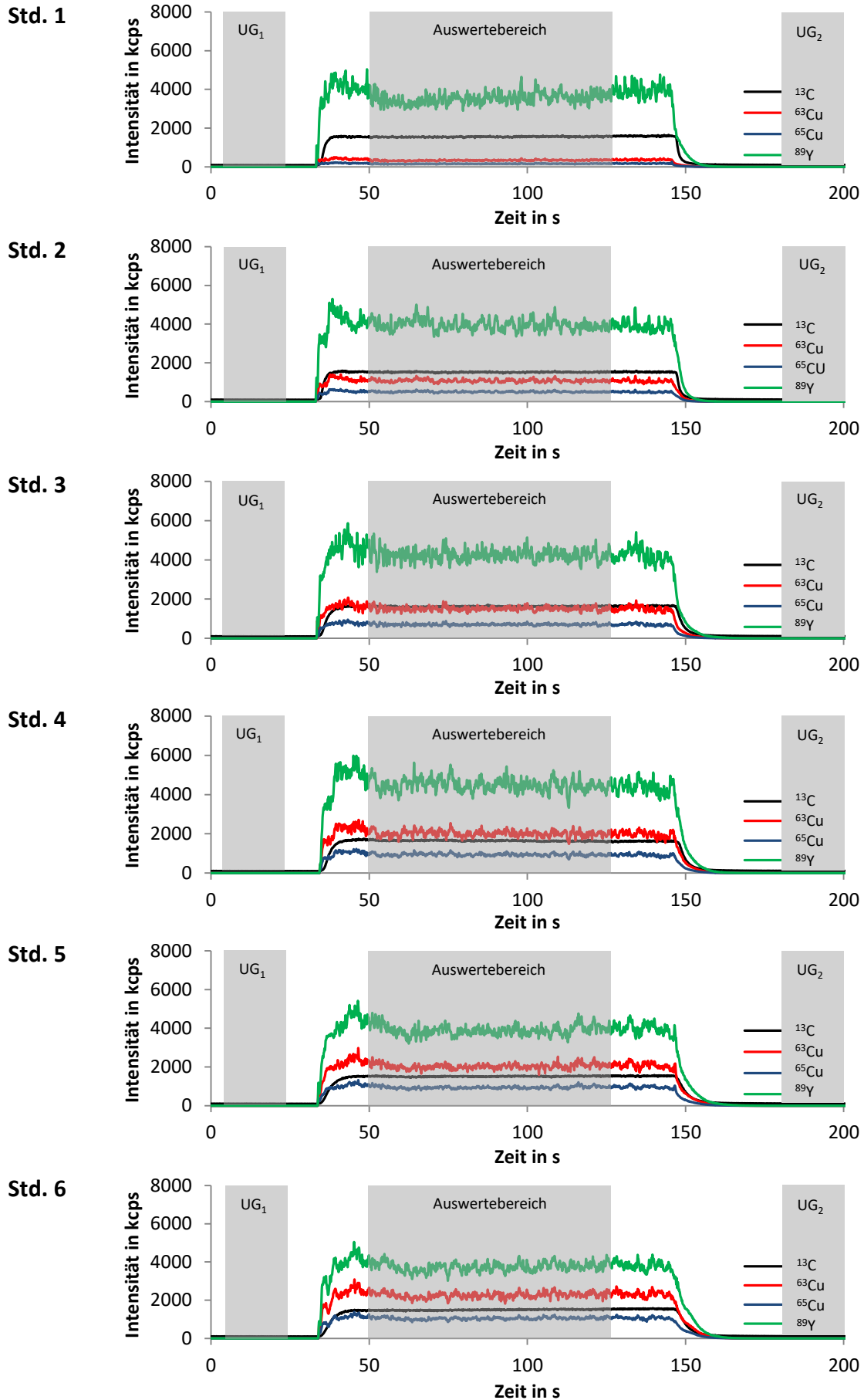
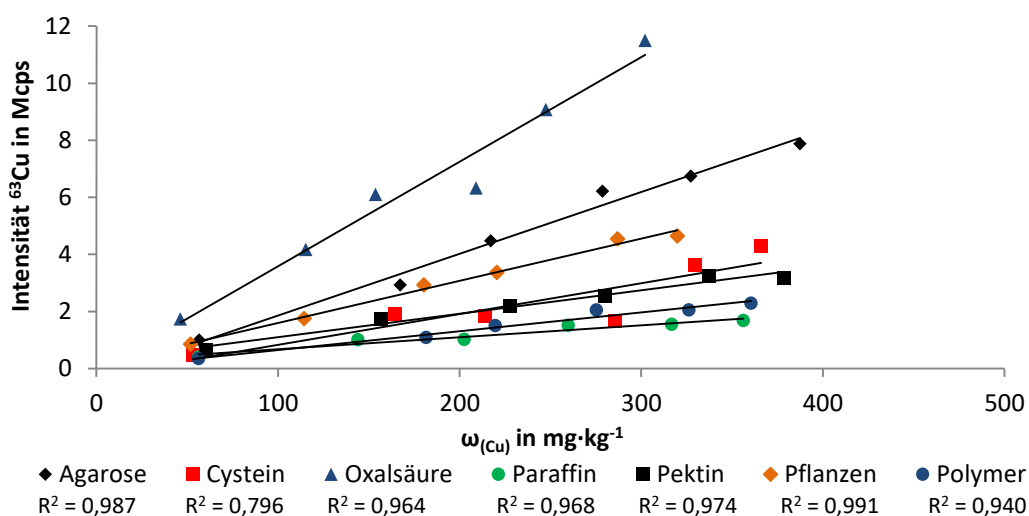


Abb. 3. 16: Signalverlauf von  $^{13}\text{C}$ ,  $^{63}\text{Cu}$ ,  $^{65}\text{Cu}$  und  $^{89}\text{Y}$  in den polymeren Festkörperstandards in steigender Reihenfolge.

Zunächst wurde für jede verwendete Matrix eine Kalibrierfunktion aus den gemessenen und untergrundkorrigierten Intensitäten der einzelnen Kalibrationsniveaus erstellt. In Abb. 3. 16 ist der Anstieg beider Kupferisotope zwischen den einzelnen Standards deutlich zu erkennen. Im Gegensatz dazu bleibt das Kohlenstoff- und Yttriumsignal relativ stabil auf einem Niveau. Die Signalverläufe von  $^{13}\text{C}$ ,  $^{63}\text{Cu}$ ,  $^{65}\text{Cu}$  und  $^{89}\text{Y}$  in den restlichen Matrices sind in diesem Abschnitt nicht dargestellt, da in den Messungen ebenfalls der Anstieg der Intensität der Kupferisotope und die relativ stabilen Kohlenstoff- und Yttriumsignale zwischen den einzelnen Kalibrationsniveaus der jeweiligen Matrix zu verzeichnen waren. Abweichungen in der Gleichmäßigkeit der Signalverläufe je nach verwendeter Matrix wurden logischerweise deutlich (vgl. Abb. 3. 11 und Abb. 3. 12).

Für die Erstellung der Kalibrierfunktion wurde aus den Mittelwerten der 15 Linien eines Standards erneut ein Mittelwert gebildet und mit den mittels ICP-OES bestimmten Kupfergehalten zur Darstellung der Kalibrierfunktionen der einzelnen Matrices sind in Abb. 3. 17 verwendet.



**Abb. 3. 17: Kalibrationsgeraden der untergrundkorrigierten  $^{63}\text{Cu}$ -Intensitäten der verwendeten Matrices.**

Im Folgenden wird nur noch das Isotop  $^{63}\text{Cu}$  betrachtet, da keine gravierenden Unterschiede zwischen den beiden Kupferisotopen festzustellen waren. Auf die Darstellung von Fehlerbalken (vgl. Tab. 3. 4 und Tab. 3. 8) wurde der Übersicht halber verzichtet. Die Kalibrationsgeraden einer Matrix weisen mit Ausnahme von Cystein Bestimmtheitsmaße von  $\geq 0,9$  auf, was auf einen linearen Zusammenhang zwischen der  $^{63}\text{Cu}$ -Intensität und dem Kupfergehalt in den Festkörperstandards schließen lässt. Weiterhin sind deutlich niedrigere

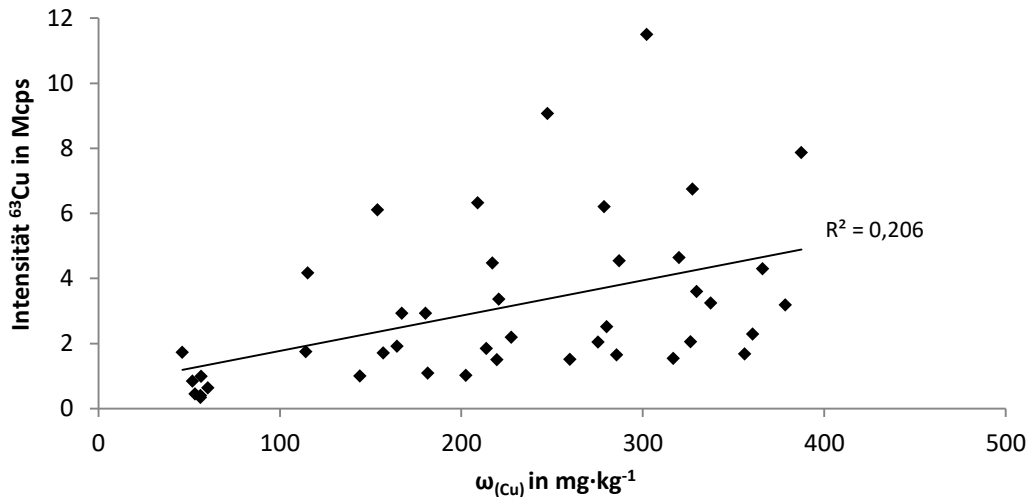
Empfindlichkeiten bei den Polymer- und Paraffinstandards zu erkennen, welche durch den geringeren Abtrag bei der Laserablation erklärt werden können. Bei der Polymermatrix handelt es sich um eine relativ feste Matrix, welche eine hohe Vernetzung aufweist und daher nur Material abgetragen wird, welches direkt dem Laserstrahl ausgesetzt ist. Im Gegensatz dazu ist die Paraffinmatrix relativ weich und es kommt ebenfalls zu geraden Laserkratern ohne weiträumige Abplatzeffekte (vgl. Abb. 3. 15). Die ehemals pulvrigen Matrices zeigen deutlich höhere Kupferintensitäten, was unter anderem durch das oben beschriebene Abplatzen von Partikeln in der Umgebung der eigentlichen Ablation hervorgerufen wird. Außerdem sind unterschiedliche Matrixzusammensetzungen, UV-Absorptionsvermögen sowie weitere optische und physikalische Eigenschaften der einzelnen Matrices entscheidend für die Ablation und die resultierenden gemessenen Intensitäten (DURRANT, 1999; BECKER, 2002; RUSSO ET AL., 2002; GÜNTHER ET AL., 2005; AGATEMOR ET AL., 2011; HARE ET AL., 2012; RESANO ET AL., 2012; LIMBECK ET AL., 2015). Die Kalibrationsgerade aus der Cysteinmatrix zeigt ein Bestimmtheitsmaß von  $< 0,8$  und lässt sich durch die schlechte Homogenität der Standards erklären. Obwohl mögliche Ausreißer innerhalb der einzelnen Kalibrationen bereits visuell identifizierbar waren, wurde zu diesem Zeitpunkt kein Ausreißertest durchgeführt, da diese möglicherweise durch Schwankungen in der Laserleistung ausgelöst und mittels Normalisierung über  $^{13}\text{C}$  oder  $^{89}\text{Y}$  ausgeglichen werden könnten. Obwohl von einem linearen Zusammenhang der Mehrheit der Kalibrierfunktionen ausgegangen werden kann, ist eine Kalibration mit der Probenmatrix unangepassten Standards unmöglich, da sich die Steigungen der Kalibrierfunktionen deutlich unterscheiden (siehe Tab. 3. 11).

**Tab. 3. 11: Steigungen und Bestimmtheitsmaße der  $^{63}\text{Cu}$ -Kalibrationsgeraden der verschiedenen Matrices**

Matrices	Steigung in Mcps/mg·kg <sup>-1</sup>	R <sup>2</sup>
<b>Agarose</b>	21625	0,987
<b>Cystein</b>	10791	0,793
<b>Oxalsäure</b>	36620	0,964
<b>Paraffin</b>	4166	0,940
<b>Pektin</b>	8219	0,974
<b>Pflanzen</b>	14751	0,991
<b>Polymer</b>	6586	0,968
$\bar{x}$	10843	0,206

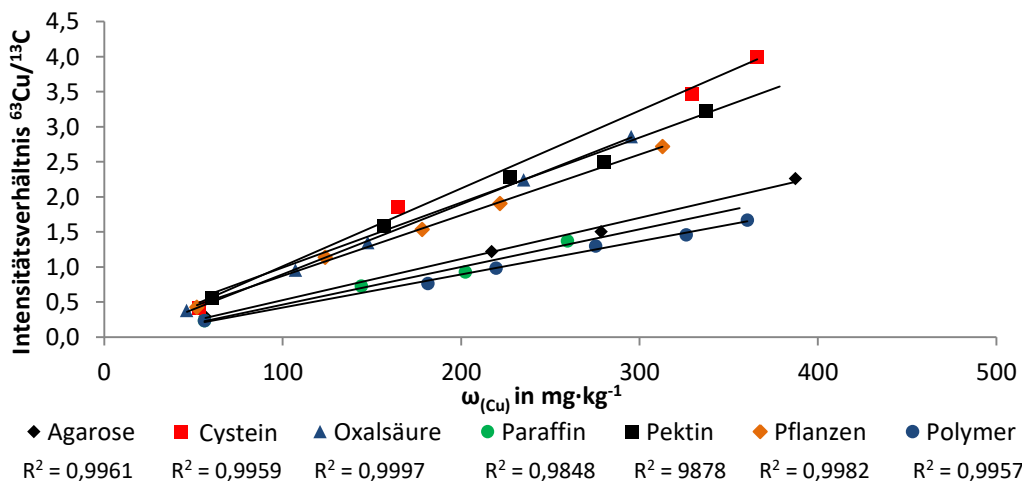


Dies wird ebenfalls in Abb. 3. 18 verdeutlicht. Die Kalibrierfunktion zeigt keine Korrelation bei der Verwendung aller präparierten Festkörperstandards aus den unterschiedlichen Matrices. Diese Ergebnisse demonstrieren das stark matrixabhängige Ablationsverhalten bei der ns-LA-ICP-MS (KUROSAWA ET AL., 2006; JOCHUM ET AL., 2007; KROSLAKOVA ET AL., 2007; JACKSON, 2008; JANNEY ET AL., 2011) und untermauern die Notwendigkeit einer Normalisierung der Messsignale und / oder dem Einsatz von Korrekturverfahren.



**Abb. 3. 18:** Kalibration der  $^{63}\text{Cu}$ -Intensitäten mit den Standards aller sieben hergestellten Standardreihen mit unterschiedlichen Matrices.

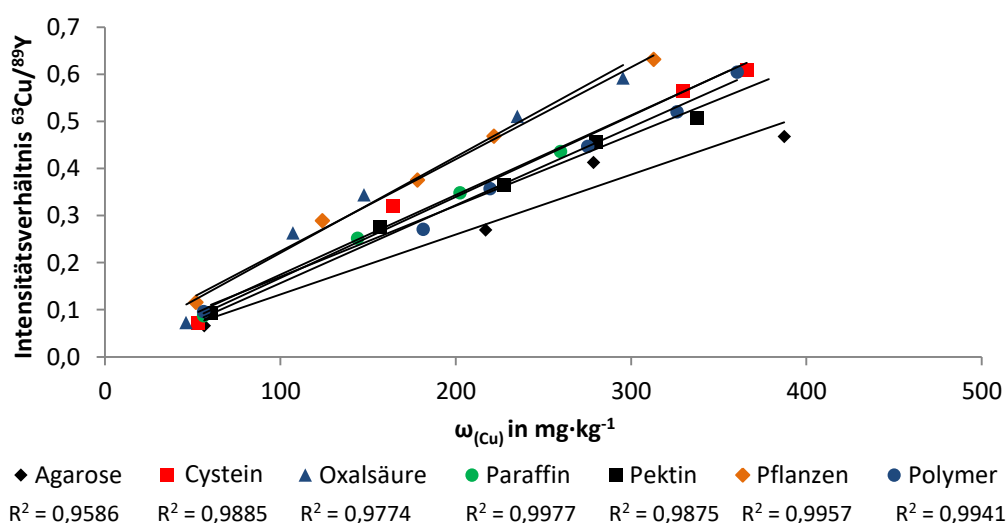
Aus diesem Grund wurden die gemessenen  $^{63}\text{Cu}$ -Intensitäten über das  $^{13}\text{C}$ -Signal normalisiert und im Anschluss erneut die Kalibrierfunktionen anhand der Mittelwerte der 15 Auswerteregionen erstellt. In Abb. 3. 19 sind die Kalibrierfunktionen der einzelnen Matrices aufgetragen. An dieser Stelle wurde der Ausreißertest nach Nalimov durchgeführt und die identifizierten Ausreißer entfernt.



**Abb. 3. 19:** Kalibration der über  $^{13}\text{C}$  normalisierten  $^{63}\text{Cu}$ -Intensitäten aller sieben Kalibrationsreihen.

Aus den Ergebnissen in Abb. 3. 19 wird der Erfolg der Normalisierung des Analytsignals deutlich. Es wurden Bestimmtheitsmaße  $\geq 0,98$  für alle Kalibrationsreihen erreicht. Allerdings zeigen die Steigungen der einzelnen Kalibrationsreihen weiterhin Unterschiede auf (siehe Tab. 3. 12). Im Falle der Normalisierung über  $^{13}\text{C}$  können die Matrices in zwei Kategorien eingeteilt werden. In Kategorie 1 liegen die Matrices Cystein, Oxalsäure, Pektin und Pflanzen mit relativ großen Steigungen, im Gegensatz dazu weist Kategorie 2 (Agarose, Paraffin und Polymer) relativ geringe Steigungen auf. Weder der Kohlenstoffgehalt noch die Art der Matrix (Pulver, Wachs oder flüssiges Polymer) oder das Präparationsverfahren (gepresst, geschmolzen oder ausgehärtet) erklären dieses Verhalten. Diese Beobachtung stellt die Sinnhaftigkeit der Verwendung von „matrixangepassten Standards“ für komplexe Proben in Frage, denn in vielen Fällen weisen die zu analysierenden, biologischen Proben eine gewisse Heterogenität der Probenmatrix auf. Es handelt sich somit meistens eher um eine Art Vielstoffgemisch als um einen Reinstoff. Die vollständige Anpassung der Matrix an ein solches Vielstoffgemisch ist praktisch unmöglich und die Verwendung von nicht vollständig der Probenmatrix angepassten Standards fehleranfällig (vgl. Abschnitt 2.2.5), weshalb in dieser Arbeit die matrixunabhängige Kalibrationsstrategie überprüft und als mögliche Alternative zu der Verwendung der matrixangepassten Standards getestet wird.

In Abb. 3. 20 sind die Kalibrierfunktionen der über  $^{89}\text{Y}$  normalisierten  $^{63}\text{Cu}$ -Intensitäten dargestellt.



**Abb. 3. 20: Kalibration der über  $^{89}\text{Y}$  normalisierten  $^{63}\text{Cu}$ -Intensitäten aller sieben Kalibrationsreihen.**

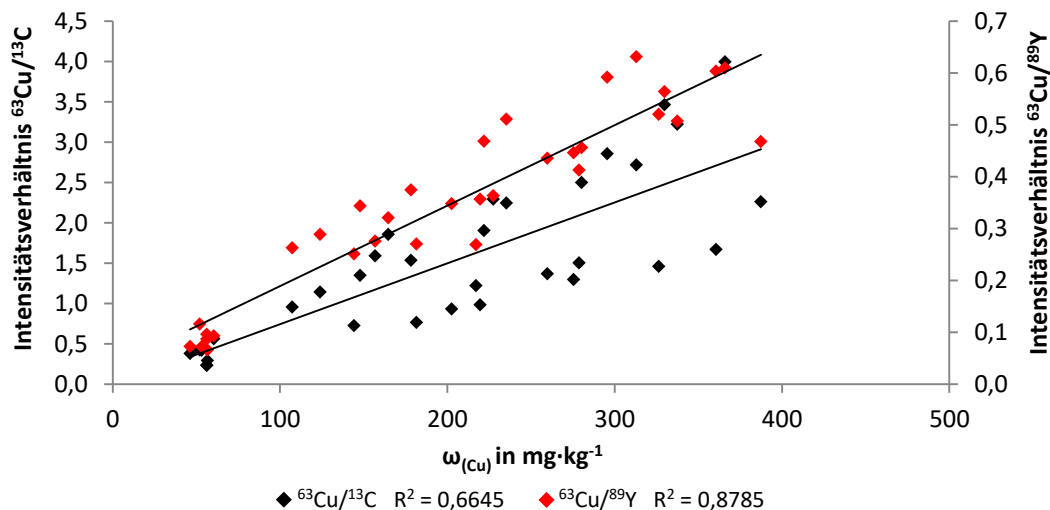
Die Bestimmtheitsmaße liegen über 0,9 und bestätigen somit die Notwendigkeit des Normalisierungsschrittes. Die Steigungen variieren um etwa 15 % und sind damit etwa halb

so groß wie die Variation der Steigung bei der Normalisierung über  $^{13}\text{C}$  (siehe Tab. 3. 12). Allerdings war diese Beobachtung zu erwarten, da Yttrium in allen Standards mit einem ähnlichen Massenanteil (vgl. Tab. 3. 5) vorliegt und im Gegensatz dazu der Kohlenstoffgehalt um den Faktor 3 variiert (vgl. Tab. 3. 6). Dennoch ist ebenfalls keine matrixunabhängige Kalibration möglich, da sich die Steigungen noch zu stark unterscheiden.

**Tab. 3. 12: Steigungen und Bestimmtheitsmaße der normalisierten  $^{63}\text{Cu}$ -Kalibrationsgeraden der verschiedenen Matrices**

Matrices	$^{63}\text{Cu}/^{13}\text{C}$		$^{63}\text{Cu}/^{89}\text{Y}$	
	Steigung in $1/\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	$R^2$	Steigung in $1/\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	$R^2$
Agarose	0,0059	0,9961	0,0013	0,9586
Cystein	0,0111	0,9959	0,0017	0,9885
Oxalsäure	0,0100	0,9997	0,0020	0,9774
Paraffin	0,0054	0,9848	0,0017	0,9977
Pektin	0,0093	0,9878	0,0015	0,9875
Pflanzen	0,0087	0,9982	0,0020	0,9957
Polymer	0,0047	0,9957	0,0017	0,9941
$\bar{x}$	0,0076	0,6645	0,0016	0,8785

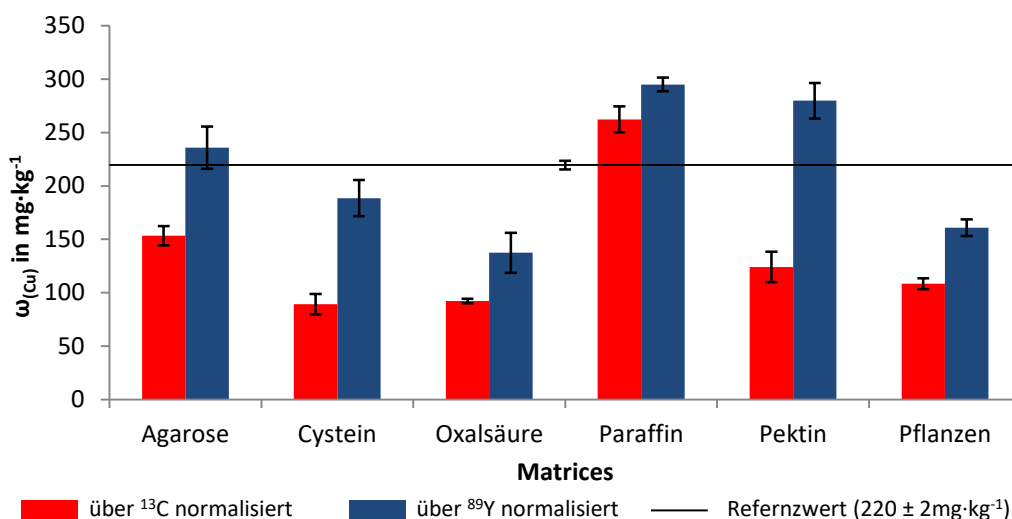
Die Kalibrationsgeraden der normalisierten  $^{63}\text{Cu}$ -Intensitäten aller Standards sind in Abb. 3. 21 abgebildet.



**Abb. 3. 21: Kalibrationsgeraden bei der Verwendung aller Festkörperstandards aus verschiedenen Matrices anhand der normalisierten  $^{63}\text{Cu}$ -Intensitäten.**

Aus der Darstellung wird die Streuung zwischen den einzelnen Standards aus den verschiedenen Matrices deutlich. Aufgrund der niedrigen Bestimmtheitsmaße und der ersichtlichen Streuung der Standards wurde kein Ausreißertest durchgeführt. Für die Bewertung des Einflusses einer mangelnden Matrixanpassung der Standards an eine Probe

wurde der Polymerstandard 3 mit einem Massenanteil von  $220 \pm 4 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  an Kupfer als Probe verwendet und mit den Kalibrationsreihen aus den anderen Matrices gemessen und der Kupfergehalt quantifiziert. Die Ergebnisse sind in Abb. 3. 22 aufgetragen. Als Fehlerbalken dienen die Vertrauensbereiche (VB) der Quantifizierung nach DIN 38402-51.



**Abb. 3. 22: Darstellung des Einflusses einer mangelnden Matrixanpassung der Standards auf die Bestimmung des Kupfergehalts in der Polymerprobe.**

In der Darstellung wird der große Einfluss der mangelnden Matrixanpassung deutlich. Die Quantifizierung mit beiden Normalisierungsverfahren führt in den meisten Fällen zu großen Abweichungen der ermittelten Kupfergehalte zum Referenzwert (vgl. Abschnitt 3.3.1). Allerdings führt die Normalisierung über <sup>89</sup>Y in den meisten Fällen zu korrekteren Werten. Dies kann ebenfalls durch die größere Ähnlichkeit von Probe und Standards bezüglich des Massenanteils von Yttrium im Vergleich zu Kohlenstoff erklärt werden.

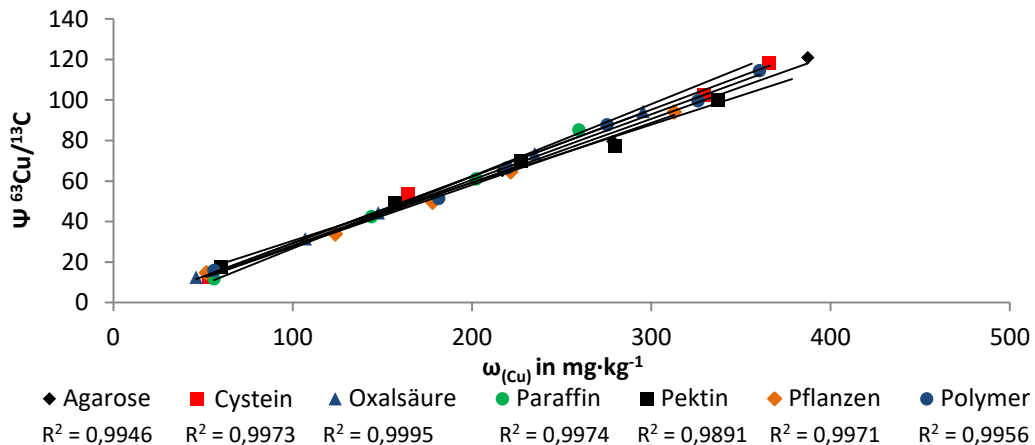
**Tab. 3. 13: Ermittelte Kupfergehalte, Vertrauensbereiche und Bias bei der Anwendung des untersuchten Normalisierungsverfahrens**

Matrices	ermittelter <sup>a</sup> ω(Cu)		VB <sup>b</sup> ω(Cu)		Bias <sup>c</sup>	
	<sup>63</sup> Cu/ <sup>13</sup> C	<sup>63</sup> Cu/ <sup>89</sup> Y	<sup>63</sup> Cu/ <sup>13</sup> C	<sup>63</sup> Cu/ <sup>89</sup> Y	<sup>63</sup> Cu/ <sup>13</sup> C	<sup>63</sup> Cu/ <sup>89</sup> Y
	in mg·kg <sup>-1</sup>	in mg·kg <sup>-1</sup>	in mg·kg <sup>-1</sup>	in mg·kg <sup>-1</sup>	in %	in %
Agarose	153	236	8,9	19,8	-30	7
Cystein	89	189	9,6	17,0	-59	-14
Oxalsäure	92	137	2,1	18,6	-58	-37
Paraffin	262	295	12,1	6,5	19	34
Pektin	124	280	14,3	16,6	-43	27
Pflanzen	109	161	5,1	7,8	-51	-27
Referenzwert	220		4			

<sup>a</sup> nach DIN 38402-51 2015; <sup>b</sup> nach DIN 38402-51 2015 mit einem Konfidenzniveau von 99 %;

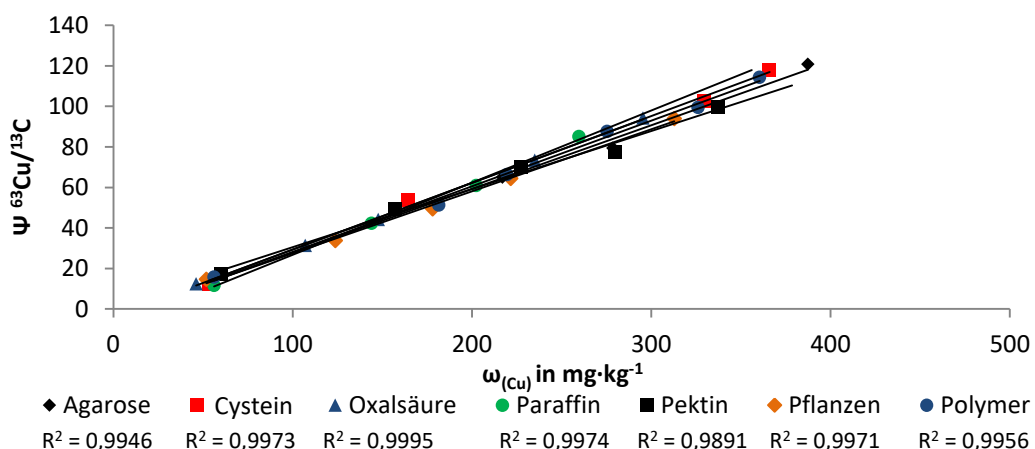
<sup>c</sup> Bias (%) = [(ermittelter Wert – Referenzwert)/Referenzwert\*100] nach KROMIDAS, 2011 und REICHENBÄCHER, 2011

In Tab. 3. 13 werden die ermittelten Kupfergehalte, Vertrauensbereiche und die Abweichung vom Referenzwert (Bias) bei beiden Normalisierungsverfahren aufgelistet. Der Fehler liegt bei der Normalisierung über  $^{13}\text{C}$  bei ca. 20 - 60 % und bei der Normalisierung mittels  $^{89}\text{Y}$  bei 7 - 40 %. Damit sind die Normalisierungsverfahren bei Verwendung von nicht der Probenmatrix vollständig angepassten Standards alleine nicht empfehlenswert für eine präzise und richtige Analyse.



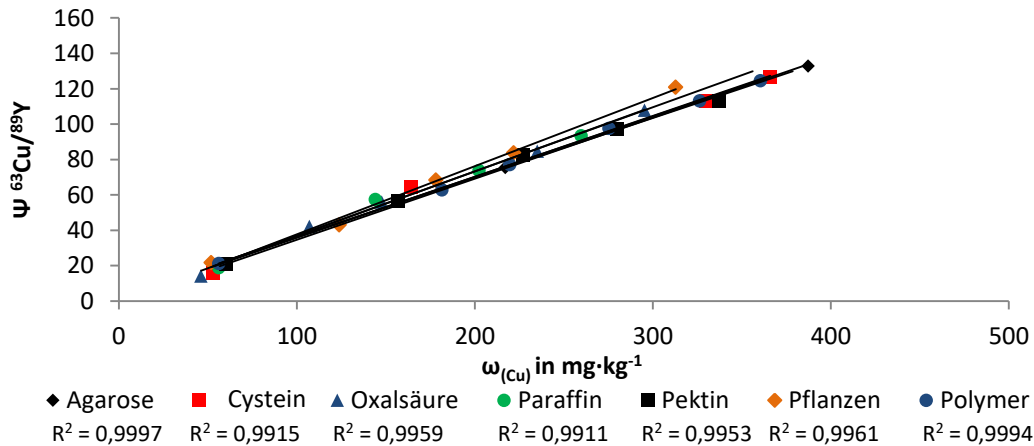
**Abb. 3. 23:** Kalibrationsgeraden der über den Massenanteil von Kohlenstoff korrigierten Intensitätsverhältnisse  $\Psi^{63}\text{Cu}/^{13}\text{C}$  der verschiedenen Matrices.

Aus diesem Grund wurde in der Arbeit von THIELEKE, 2013 ein weiterer Korrekturschritt eingeführt. Für die Korrektur des unterschiedlichen Ablationsverhaltens der verschiedenen Matrices wird der Gehalt des internen Standards (Kohlenstoff oder Yttrium) miteinbezogen (vgl. Abschnitt 2.2.6). Die Kalibrationsgeraden der korrigierten Intensitätsverhältnisse  $\Psi$  sind in Abb. 3. 24 für Kohlenstoff und in Abb. 3. 25 für Yttrium dargestellt.



**Abb. 3. 24:** Kalibrationsgeraden der über den Massenanteil von Kohlenstoff korrigierten Intensitätsverhältnisse  $\Psi^{63}\text{Cu}/^{13}\text{C}$  der verschiedenen Matrices.

Sowohl die Korrektur mit dem Kohlenstoff- als auch mit dem Yttriumgehalt der Standards führt zu größeren Bestimmtheitsmaßen ( $\approx \geq 0,99$ ). Weiterhin gleichen sich die Steigungen der Kalibrationsgeraden der verschiedenen Matrices deutlich an.



**Abb. 3. 25: Kalibrationsgeraden der über den Massenanteil von Yttrium korrigierten Intensitätsverhältnisse  $\Psi^{63\text{Cu}/89\text{Y}}$  der verschiedenen Matrices.**

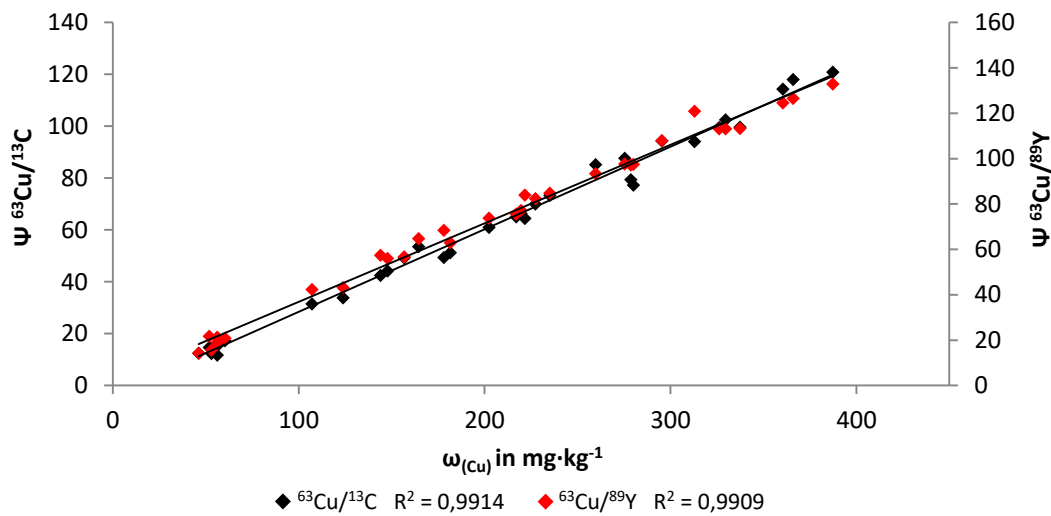
Diese Beobachtungen werden ebenfalls in Tab. 3. 14 deutlich. Die einzelnen Steigungen der jeweiligen Matrices weichen im Mittel um etwa 5 % für beide Korrekturverfahren ab. Damit erscheint das Korrekturverfahren geeignet, um Matrixunterschiede auszugleichen und der Ansatz von THIELEKE, 2013 erscheint damit vielversprechend.

**Tab. 3. 14: Steigungen und Bestimmtheitsmaße der Kalibrationsgeraden der über den Massenanteil korrigierten Intensitätsverhältnisse  $\Psi$  der verschiedenen Matrices**

Matrices	$\Psi^{63\text{Cu}/13\text{C}}$		$\Psi^{63\text{Cu}/89\text{Y}}$	
	Steigung in $\Psi/\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	$R^2$	Steigung in $\Psi/\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	$R^2$
Agarose	0,314	0,9946	0,345	0,9997
Cystein	0,329	0,9973	0,344	0,9915
Oxalsäure	0,329	0,9995	0,366	0,9959
Paraffin	0,356	0,9974	0,363	0,9911
Pektin	0,287	0,9891	0,336	0,9953
Pflanzen	0,306	0,9971	0,385	0,9961
Polymer	0,324	0,9956	0,341	0,9994
$\bar{x}$	0,318	0,9914	0,346	0,9909

Die Kalibrationsgeraden der über den Massenanteil korrigierten Intensitätsverhältnisse  $\Psi$  aller verschiedenen Matrices sind in Abb. 3. 26 dargestellt. Die Streuung der Standards um beide Trendlinien fällt wesentlich geringer aus als in Abb. 3. 21. Sowohl die Korrekturen mit Kohlenstoff als auch mit Yttrium zeigen ein Bestimmtheitsmaß von  $\geq 0,99$  und dienen als Gütekriterium der Regressionsanalyse (MILLER ET AL., 2005; KROMIDAS, 2011). Im Vergleich mit anderen gängigen Kalibrationsstrategien werden durch das hier durchgeführte

Korrekturverfahren größere Bestimmtheitsmaße erreicht (ZORIY ET AL., 2006; WU B ET AL., 2009; BECKER, 2010; SIEBOLD ET AL., 2012).



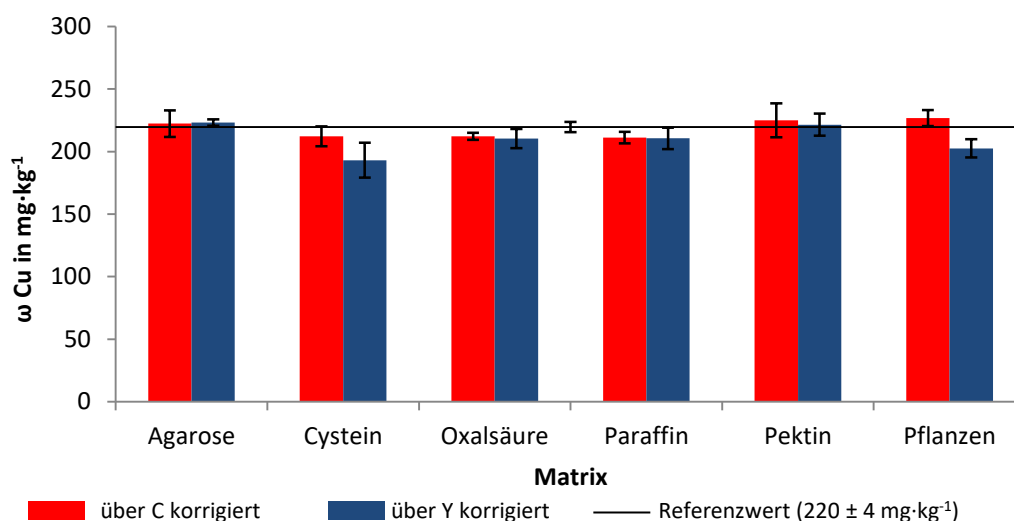
**Abb. 3. 26:** Kalibrationsgeraden bei der Verwendung aller Festkörperstandards aus verschiedenen Matrices anhand der korrigierten Intensitätsverhältnisse  $\Psi$ .

Um die Linearität der Kalibrationsgeraden weitergehend zu überprüfen, wurde der Linearitätstest nach Mandel durchgeführt (DIN 38402-51, 2015). Da der Prüfwert beider Kalibrationsgeraden kleiner als der  $F$ -Wert $_{(34; 31; 99)} = 2,322$  war, wurde die Linearität nachgewiesen. Die Verfahrenskenngrößen der LA-ICP-QMS-Bestimmung bei Anwendung der matrixunabhängigen Kalibrationsstrategie nach DIN 32645 sind in Tab. 3. 15 dargestellt.

**Tab. 3. 15:** Verfahrenskenngrößen der LA-ICP-QMS-Bestimmung bei Anwendung der matrixunabhängigen Kalibrationsstrategie (über 13 C normalisiert) nach DIN 32645

	$\omega_{(\text{Cu})}$ in $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$
<b>Nachweisgrenze</b>	3,2
<b>Erfassungsgrenze</b>	6,7
<b>Bestimmungsgrenze</b>	10,3

Um die Eignung des Korrekturverfahrens an einer Probe zu bestätigen, wurde erneut der Polymerstandard 3 mit einem Massenanteil von  $220 \pm 4 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  an Kupfer verwendet und mit von der Probenmatrix abweichenden Festkörperstandards gemessen und quantifiziert. Die Ergebnisse sind in Abb. 3. 27 abgebildet.



**Abb. 3. 27:** Darstellung des Einflusses der matrixunabhängigen Kalibrationsstrategie auf die Bestimmung des Kupfergehalts in der Polymerprobe bei Verwendung nicht-matrixangepasster Standards.

Die ermittelten Kupfergehalte bei der Kohlenstoffkorrektur zeigen nur geringe Abweichungen zum Referenzwert und die Fehlerbalken überlappen. Die Korrektur über den Yttriumgehalt weist überwiegend größere Abweichungen auf und nur die Fehlerbalken bei der Verwendung der Cystein- und Pflanzenmatrix überlappen nicht mit dem Fehler des Referenzwertes. Allerdings liegen die ermittelten Kupfergehalte in beiden Fällen deutlich näher am Referenzwert als bei dem Verfahren der Normalisierung über  $^{13}\text{C}$  bzw.  $^{89}\text{Y}$  (siehe Abb. 3. 22 und Tab. 3. 13). Zur besseren Interpretation sind die ermittelten Kupfergehalte, Vertrauensbereiche und die Abweichungen zum Referenzwert in Tab. 3. 16 zusammengefasst.

**Tab. 3. 16:** Ermittelte Kupfergehalte, Vertrauensbereiche und Bias bei der Anwendung der korrigierten Intensitätsverhältnisse  $\Psi$

Matrices	ermittelter <sup>a</sup> $\omega_{(\text{Cu})}$		VB <sup>b</sup> $\omega_{(\text{Cu})}$		Bias <sup>c</sup>	
	$^{63}\text{Cu}/^{13}\text{C}$ in $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	$^{63}\text{Cu}/^{89}\text{Y}$ in $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	$^{63}\text{Cu}/^{13}\text{C}$ in $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	$^{63}\text{Cu}/^{89}\text{Y}$ in $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	$^{63}\text{Cu}/^{13}\text{C}$ in %	$^{63}\text{Cu}/^{89}\text{Y}$ in %
Agarose	222	223	10,6	2,5	-1,2	-1,6
Cystein	212	193	7,8	14,0	3,4	12,1
Oxalsäure	212	210	2,8	7,6	3,3	4,2
Paraffin	211	211	4,7	8,5	3,8	4,1
Pektin	225	222	13,7	8,9	-2,4	-0,9
Pflanzen	227	203	6,5	7,3	-3,3	7,8
<b>Referenzwert</b>	220		4			

<sup>a</sup> nach DIN 38402-51 2015; <sup>b</sup> nach DIN 38402-51 2015 mit einem Konfidenzniveau von 99 %;

<sup>c</sup> Bias (%) = [(ermittelter Wert – Referenzwert)/Referenzwert\*100] nach KROMIDAS 2011 und REICHENBÄCHER 2011

Die Abweichungen des ermittelten Kupfergehalts vom Referenzwert liegen im Mittel bei 3 % für die Korrektur mit dem Kohlenstoffgehalt und bei 5 % bei der Korrektur mit Yttrium. Somit



werden die Unterschiede der Matrices erfolgreich durch das Korrekturverfahren korrigiert und es werden keine großen Messabweichungen bei der Verwendung der matrixunabhängigen Kalibrationsstrategie erreicht. Weiterhin bestätigen die Ergebnisse die Arbeit von THIELEKE, 2013. Die im Vergleich zur Normalisierung über  $^{13}\text{C}$  erhöhten Werte des Bias bei der Normalisierung über  $^{89}\text{Y}$  sind vermutlich auf einen nicht ideal gewählten internen Standard zurückzuführen.

Gleichzeitig wird durch die Ergebnisse die von FRICK ET AL. 2012 beschriebene Vermutung, dass die unterschiedliche Diffusion der gasförmigen und partikulären Kohlenstoffspezies die Eignung von Kohlenstoff für die Normalisierung stark einschränkt bzw. Kohlenstoff gänzlich unbrauchbar ist, widerlegt. In ihrer Arbeit wird der Sauerstoffgehalt in der Ablationskammer, aus der Probe oder als Spuren in dem verwendeten Trägergas als kritischer Parameter beschrieben, welcher Einfluss auf die Entstehung von  $\text{CO}_2$  hat und den matrixabhängigen Verlust des ablatierten Kohlenstoffs durch Diffusion (KOCH ET AL., 2011; FLAMIGNI ET AL., 2012) je nach Matrix variiert. Auch die in dieser Arbeit verwendeten Matrices weisen, wenn auch nicht quantifiziert, deutliche Unterschiede im Sauerstoffgehalt auf (vgl. Abschnitt 3.1) und lassen die Vermutung zu, dass Kohlenstoff zwar, wie von TODOLÍ ET AL., 1998 beschrieben, als gasförmige und partikuläre Kohlenstoffspezies mit je nach Matrix variierenden Anteilen das ICP erreichen, aber die Diffusionsverluste der gasförmigen Spezies nicht signifikant sind. Die Publikation von FRICK ET AL., 2012 bleibt eine Auskunft über den Umfang der Diffusionsverluste schuldig und verweist auf die Notwendigkeit von noch durchzuführenden Studien zur Klärung. Auch die Erklärung aus der Arbeit von RESANO ET AL., 2005, dass das relativ hohe erste Ionisierungspotential (11,3 eV) von Kohlenstoff zu großen Änderungen in der Signalintensität führen kann, wenn die Plasmabedingungen auch nur geringfügig variieren und damit Kohlenstoff als interner Standard ungeeignet ist, scheint nach den oben dargestellten Ergebnissen keinen signifikanten Einfluss zu haben. Damit kann aus den erhaltenen Ergebnissen geschlossen werden, dass Kohlenstoff als interner Standard eingesetzt werden kann, wie es in zahlreichen Publikationen beschrieben wurde (FELDMANN ET AL., 2002; JACKSON ET AL., 2003; BYRNE ET AL., 2010; AUSTIN ET AL., 2011). Die Grundvoraussetzung ist entweder die Verwendung von matrixangepassten Standards oder die Korrektur über den Kohlenstoffgehalt, wenn die matrixunabhängige Kalibrationsstrategie verwendet wird. Der Vorteil dieser Strategie besteht darin, dass die Polymerstandards, welche relativ einfach herzustellen und langzeitstabil sind sowie eine homogene Verteilung der dazu dotierten

Analyten aufweisen (THIELEKE, 2013; CHEN, 2015; DREYER, 2016), verwendet werden können und keine aufwendige Präparation für matrixangepasste Standards bei verschiedenen Proben nötig ist. Auch die Verwendung eines internen Standards, welcher im gleichen Gehaltsbereich wie der Analyt liegt, führt zu vergleichbaren Ergebnissen wie Kohlenstoff, wenn das Korrekturverfahren durchgeführt wird. Allerdings bleibt Kohlenstoff als Matrixelement der interne Standard der Wahl, da in biologischen Proben kein anderes Element ähnlich homogen verteilt vorliegt.

### 3.5 Unsicherheitsberechnung

In diesem Abschnitt wird die Messunsicherheit der matrixunabhängigen Kalibrationsstrategie für die Quantifizierung von Kupfer bei der Verwendung von Kohlenstoff zur Normalisierung und Korrektur beschrieben, um einen Vergleich mit gängigen Kalibrationsverfahren zu ermöglichen. Die Berechnung gilt nur unter der Annahme einer homogenen Verteilung des Kohlenstoffes, welche in vielen in der Literatur beschriebenen Verfahren getätigt wird (FELDMANN ET AL., 2002; CAUMETTE ET AL., 2007; STEELY ET AL., 2007; ZORIY ET AL., 2008; DALPÉ ET AL., 2010; MORADI ET AL., 2010). Weiterhin erfolgt die Berechnung anhand der Kalibration mit den Festkörperstandards aus der Polymermatrix und der Pektinstandards 3 und 5 als exemplarische Proben, da die Pektinmatrix einen deutlichen Unterschied im Kohlenstoffgehalt (siehe Tab. 3. 6), eine homogene Elementverteilung (siehe Abb. 3. 14) und ein von der Polymermatrix abweichendes Ablationsverhalten (siehe Abb. 3. 19) aufweist und somit eine stark abweichende Probenmatrix simuliert.

$$u_{rel} = \sqrt{u_{rel,1}^2(x_i) + u_{rel,2}^2(x_i) + u_{rel,3}^2(x_i) + \dots} \quad \text{Gl. 15}$$

$$\text{Mit} \quad u_{rel}(x_i) = \frac{u(x_i)}{\bar{x}} \quad \text{Gl. 16}$$

$$u(x_i) = \frac{s(x_i)}{\sqrt{n}} = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n(n-1)}} \quad \text{Gl. 17}$$

Die Berechnung der Messunsicherheit für die matrixunabhängige Kalibrationsstrategie erfolgte nach DIN 1319-3. Dabei berechnet sich die relative Messunsicherheit ( $u_{rel}$ ) der Methode nach Gl. 15 aus den relativen Messunsicherheiten der einzelnen Beiträge ( $x_i$ ). Als Eingangsgrößen für die Berechnung dienen die relativen Messunsicherheiten der Kohlenstoffbestimmung der Festkörperstandards und der Probe sowie der

Gehaltsbestimmung von Kupfer der Kalibrationsstandards via ICP-OES und der Quantifizierung des Kupfergehaltes in der Probe mittels LA-ICP-QMS. Da es sich bei der Standardabweichung der Kohlenstoffbestimmung und den Vertrauensbereichen um absolute Unsicherheiten ( $u$ ) handelt, werden diese nach Gl. 16 und Gl. 17 in relative Unsicherheiten umgerechnet. Die für die Berechnung der relativen Unsicherheiten aus den Vertrauensbereichen benötigten Mittelwerte sind in Tab. 3. 4 aufgelistet. Die bei der Kohlenstoffbestimmung ermittelten Standardabweichungen der Mittelwerte von den Kalibrationsstandards und der Probe können aus Tab. 3. 6 entnommen werden.

Die Berechnung erfolgt für zwei unterschiedliche Betrachtungen. In Betrachtung 1 wird von einer Probe im mittleren Kalibrationsbereich ausgegangen, wohingegen Betrachtung 2 einen konservativen Ansatz nutzt, bei dem die Probe im äußeren Kalibrationsbereich liegt und auch die Quantifizierung der Kalibrationsstandards mittels ICP-OES größere Unsicherheiten aufweist. Der Kalibrationsbereich der polymeren Festkörperstandards erstreckt sich von  $56 \pm 19$  bis  $361 \pm 14 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  für das Element Kupfer. Die Pektinstandards 3 (Betrachtung 1) und 5 (Betrachtung 2) weisen Kupfergehalte von  $228 \pm 3$  und  $337 \pm 10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  auf.

In Tab. 3. 17 sind die Eingangsunsicherheiten sowie die resultierende Messunsicherheit der gesamten Methode für beide Betrachtungen zusammengefasst.

**Tab. 3. 17: Berechnete Messunsicherheiten der matrix-unabhängigen Kalibration für Betrachtung 1 und 2**

Eingangsgröße	Betrachtung 1	Betrachtung 2
	$u_{rel}$ in %	$u_{rel}$ in %
Kohlenstoffbestimmung der Probe	0,5	0,5
Kohlenstoffbestimmung der Festkörperstandards	0,9	0,9
Vertrauensbereich LA-ICP-QMS	3,4	9,1
Vertrauensbereich ICP-OES	3,6	6,9
$u_{rel}$ der Methode	5,1	11,5

Die relativen Unsicherheiten der Kohlenstoffbestimmung, sowohl der Probe als auch der Festkörperstandards, liefern die geringsten Beiträge zur Messunsicherheit. Ein relativ großer Beitrag hingegen wird durch die Vertrauensbereiche der ICP-OES-Analyse hervorgerufen und könnte durch Mehrfachmessungen sowie eine Anpassung der Kalibrationsbereiche und/oder

Vergleichsanalysen anderer Techniken (z. B. ICP-IDMS) reduziert werden, wie in der Literatur beschrieben (VOGL ET AL., 2000; VOGL ET AL., 2010; BAM-H010 A, 2014; BAM-H010 B, 2014). Auch die Vertrauensbereiche der LA-ICP-QMS-Analyse führen zu großen, teilweise sogar zu den größten Beiträgen der Messunsicherheit. Anders als bei der hausinternen Zertifizierung der Festkörperstandards bleibt hier nur die Anpassung des Kalibrationsbereichs, da die LA-ICP-QMS keine zerstörungsfreie Methode ist und jeder Bereich einer biologischen Probe nur einmal gemessen werden kann. Dennoch wird in Betrachtung 1 eine relative Messunsicherheit von  $\leq 6\%$  und für Betrachtung 2  $\leq 12\%$  erreicht. Diese Werte decken sich mit den Arbeiten von THIELEKE, 2013 und CHEN, 2015. Auch im Vergleich mit der gängigen Anwendung von teilweise bis vollständig matrixangepassten Standards, bei denen Fehlerbereiche von 8 - 25 % publiziert sind (GRUHL ET AL., 2009; WU B ET AL., 2009; AUSTIN ET AL., 2010; KLUG ET AL., 2011; DRESCHER ET AL., 2012), erweist sich die matrixunabhängige Kalibrationsstrategie als durchaus konkurrenzfähig. Der Vorteil der Methode liegt demnach nicht in einer geringeren Messunsicherheit, sondern in der einfacheren Präparation sowie der umfangreicheren Einsetzbarkeit der hausinternen Festkörperstandards auf Basis der Polymermatrix für eine Vielzahl an diversen kohlenstoffhaltigen Proben. Auch die Richtigkeit und der Bias bei der Kupfergehaltsbestimmung in den Pektinstandards wurden erneut überprüft (siehe Tab. 3. 18).

**Tab. 3. 18: Kupferquantifizierung für Betrachtung 1 und 2 mittels LA-ICP-QMS bei der Anwendung der matrixunabhängigen Kalibrationsstrategie**

	Betrachtung 1	Betrachtung 2
<b>matrixunabhängige Kalibration</b> $\omega_{(Cu)}^a$ in $mg \cdot kg^{-1}$	$229 \pm 12$	$320 \pm 37$
<b>Referenzwert</b> $\omega_{(Cu)}^a$ in $mg \cdot kg^{-1}$	$228 \pm 3$	$337 \pm 10$
<b>Bias<sup>b</sup> in %</b>	0,6	-5,0

<sup>a</sup> nach DIN 38402-51 2015;

<sup>b</sup> Bias (%) = [(ermittelter Wert – Referenzwert)/Referenzwert\*100] nach KROMIDAS, 2011 und REICHENBÄCHER, 2011

Die Ergebnisse bestätigen die Methode, zeigen tolerable Abweichungen vom zertifizierten Wert und beweisen die Richtigkeit der matrixunabhängigen Kalibrationsstrategie.

# 4

---

## **Festkörperbasierte Isotopenverdünnungsanalyse von Blei**

---

## 4.1 Einleitung

In diesem Kapitel wird die festkörperbasierte Isotopenverdünnungsanalyse von Blei ausführlich beschrieben. Dabei wird in den folgenden Abschnitten auf die Präparation, Charakterisierung und Validierung der Methode eingegangen sowie ein Beispiel zur Anwendung der festkörperbasierten Isotopenverdünnungsanalyse von Blei in biologischen Proben aufgezeigt. Da ein Schwerpunkt dieser Arbeit in der Entwicklung und Validierung der Methode lag, wird nur kurz auf das Anwendungsbeispiel eingegangen. Teile der in diesem Kapitel dargestellten Ergebnisse wurden in der Veröffentlichung von THIELEKE ET AL., 2016 bereits publiziert.

Blei wurde als exemplarischer Analyt gewählt, da es sich um ein toxisches Element handelt und daher die Verteilung und Anreicherung von Blei in biologischen Proben von wissenschaftlichem Interesse ist (LOHS ET AL., 1981; ESTLER ET AL., 2000; UBA, 2003). Die toxische Wirkung von Blei äußert sich durch die Hemmung der für die Hämoglobinsynthese verantwortlichen Enzyme. Sowohl metallisches Blei als auch Bleiverbindungen sind für die meisten Lebensformen toxisch. Eine akute Vergiftung tritt nach einmaliger Aufnahme einer hohen Dosis auf. Im Gegenteil dazu tritt eine chronische Vergiftung durch die kontinuierliche Aufnahme niedrigerer Mengen erst langsam nach einiger Zeit auf. Da Blei nur schwer vom Organismus ausgeschieden bzw. abgebaut werden kann, reichert es sich bei Menschen und Tieren anstelle von Calcium in den Knochen oder in Zähnen und Haaren an (WIBERG ET AL., 2007; MEIBNER ET AL., 2011). Des Weiteren konnte isotonenangereichertes Blei relativ preisgünstig erstanden werden und damit erstmalig die festkörperbasierte Isotopenverdünnungsanalyse getestet werden.

Blei besitzt vier stabile Isotope ( $^{204}\text{Pb}$ ,  $^{206}\text{Pb}$ ,  $^{207}\text{Pb}$ ,  $^{208}\text{Pb}$ ). Das Isotop  $^{204}\text{Pb}$  ist ein primordiales Radionuklid mit einer Halbwertszeit von  $> 1,4 \cdot 10^{17}$  Jahren. Die weiteren Bleiisotope sind stabil und bilden die Endprodukte aus der Uran-Radium-, Uran-Actinium- und Thorium-Zerfallsreihe (siehe Tab. 4. 1). Dadurch dass die drei natürlichen Zerfallsreihen in drei Bleiisotopen enden, kann von keinen eindeutigen natürlichen Isotopenverhältnissen von Blei ausgegangen werden und es kommt zu starken regionalen Schwankungen der Isotopenzusammensetzung von Blei (BERGLUND ET AL., 2011).

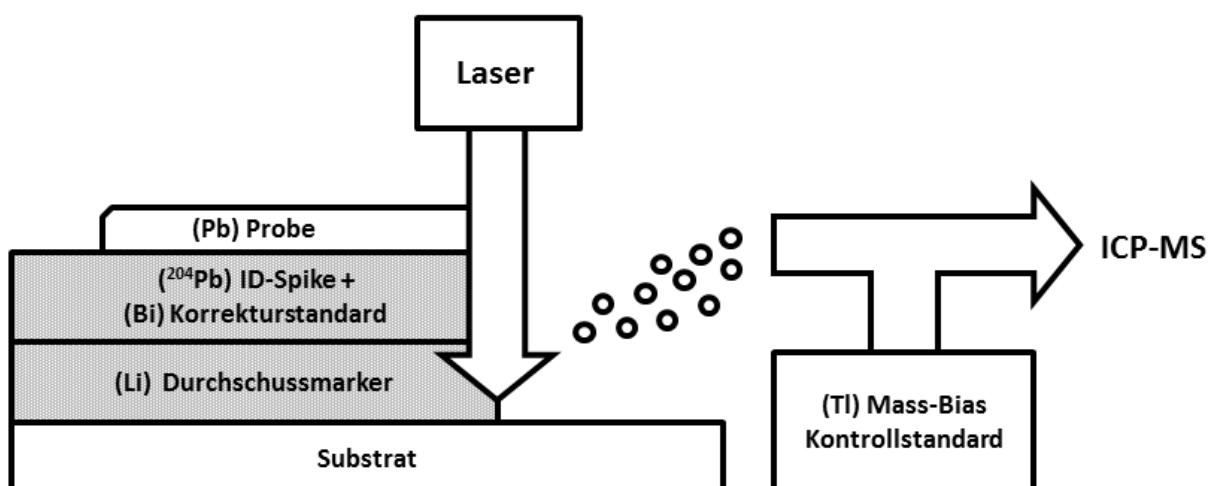
**Tab. 4. 1: Regionale Schwankungen der Isotopenhäufigkeit der vier stabilen Bleisotope aufgrund der natürlichen Zerfallsreihen**

Isotope	Isotopenhäufigkeit in %	Regionale Schwankungen Isotopenhäufigkeit in % <sup>a</sup>	Produkt aus Zerfallsreihe
<sup>204</sup> Pb	1,4	1,04 – 1,65	primordial
<sup>206</sup> Pb	24,1	20,84 – 27,48	Uran-Radium
<sup>207</sup> Pb	22,1	17,62-23,65	Uran-Actinium
<sup>208</sup> Pb	52,4	51,28 – 56,21	Thorium

<sup>a</sup> nach BERGLUND ET AL., 2011

Bei Analysen mit der ICP-MS kommen die folgenden Interferenzen für die Bleisotope in Betracht: <sup>204</sup>Pb wird durch das <sup>204</sup>Hg isobar gestört. Diese Interferenz kann mittels Quadrupol-Massenspektrometer nur indirekt über eine Interferenzkorrektur korrigiert werden (siehe Abschnitt 4.4.3). Für die drei anderen stabilen Isotope <sup>206</sup>Pb, <sup>208</sup>Pb und <sup>207</sup>Pb kommen Molekülinterferenzen aus <sup>190</sup>Pt<sup>16</sup>O<sup>+</sup>, <sup>192</sup>Pt<sup>16</sup>O<sup>+</sup> und <sup>191</sup>Ir<sup>16</sup>O<sup>+</sup> in Frage (MAY ET AL., 1998). Da Platin und Iridium nicht in biologischen Proben zu erwarten sind, wurde auf den Einsatz der Kollisionszelle zur Verringerung der Molekülinterferenzen verzichtet. Des Weiteren würde es durch den Einsatz der Kollisionszelle zu einer starken Reduzierung der für die Charakterisierung notwendigen leichten Elemente wie <sup>7</sup>Li und <sup>13</sup>C kommen (siehe Abschnitt 4.3). Außerdem wurden mindestens drei Isotopenverhältnisse bestimmt, um mögliche Interferenzen einzelner Isotope festzustellen.

In Abb. 4. 1 ist die auf den Analyten Blei angepasste Vorgehensweise der festkörperbasierten Isotopenverdünnungsanalyse dargestellt.



**Abb. 4. 1: Schematische Darstellung der festkörperbasierten Isotopenverdünnungsanalyse von Blei mittels LA-ICP-MS.**

Wie bereits in Kapitel 1 erwähnt, ist die orts aufgelöste Quantifizierung von Elementgehalten in biologischen Proben mittels LA-ICP-MS komplex und oftmals fehleranfällig. Aus diesem Grund wurde die festkörperbasierte Isotopenverdünnungsanalyse als mögliche Alternative für die orts aufgelöste Quantifizierung von Elementen entwickelt und in diesem Kapitel getestet. Für die Analyse von Blei wurde die allgemeine Vorgehensweise der festkörperbasierten Isotopenverdünnungsanalyse auf den Analyten angepasst (siehe Abb. 4. 1).

Als Durchschussmarker wurde Lithium gewählt, da von diesem Element keine Interferenzen der Bleiisotope zu erwarten waren. Außerdem hat sich Lithium in den Arbeiten von SCHWARTZE, 2013 und DREYER, 2016 für die Präparation von Schichten mit homogener Elementverteilung bewährt. Bismut wurde als Korrekturstandard eingesetzt, da es als Ölstandard kommerziell erhältlich war und relativ leicht in die Polymermatrix eingebracht werden konnte. Des Weiteren liegt die Masse von  $^{209}\text{Bi}$  relativ nahe an der Masse der untersuchten Bleiisotope. Auch die ersten Ionisierungsenergien von Bismut ( $703 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) und Blei ( $715,6 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) liegen dicht beieinander und erfüllen die von VANHAECKE ET AL. 1992, FINLEY-JONES ET AL. 2008 und FRICK ET AL. 2012 geforderten Kriterien für einen idealen internen Standard. Da Bismut jedoch nur als quasi „interner Standard“ bezeichnet werden kann, da das Element nicht in der Probe vorliegt, sondern durch den gleichzeitigen Abtrag von Probe und Spike im Blend homogen vorliegt, wird in dieser Arbeit der Terminus Korrekturstandard verwendet. Mögliche Interferenzen von  $^{209}\text{Bi}$  müssen nicht berücksichtigt werden, da für die Auswertung nicht die über  $^{209}\text{Bi}$  normalisierten Intensitätsverhältnisse, sondern die nachfolgend berechneten Isotopenverhältnisse von Blei genutzt werden. Zur Mass-Bias-Korrektur von Blei wurde das in der Literatur häufig eingesetzte Referenzmaterial NIST SRM 997 mit einem zertifizierten Isotopenverhältnis von Thallium verwendet (TAYLOR ET AL., 2001; BAKER ET AL., 2004; RIDLEY, 2005). Dazu wurde das Referenzmaterial aufgelöst und durch Zerstäubung in Form eines Aerosols simultan während der Laserablation mitgemessen, um eine parallele Korrektur des Mass-Bias durchzuführen. Für Thallium kommen hauptsächlich die Molekülinterferenzen von  $^{187}\text{Re}^{16}\text{O}^+$  und  $^{186}\text{W}^{16}\text{OH}^+$  in Betracht (MAY ET AL., 1998). Diese wurden durch Optimierung der ICP-MS-Parameter im Hinblick auf die Oxidbildungsrate von  $\leq 2 \%$  eingestellt und damit auf ein Minimum reduziert.



## 4.2 Präparation der Schichtsysteme

In diesem Teilabschnitt wird die Präparation der Schichtsysteme für die festkörperbasierte Isotopenverdünnungsanalyse beschrieben. Dazu werden in den folgenden Abschnitten die Isotopenanreicherung sowie das Ansetzen und die Applikation der Lackmischung mittels Rakeltechnik erläutert.

### 4.2.1 Isotopenanreicherung des Einzelelementstandards auf Ölbasis

Da keine isotopenangereicherten Einzelelementstandards auf Ölbasis kommerziell erhältlich waren, wurde das in diesem Abschnitt beschriebene, selbst entwickelte Verfahren angewendet.

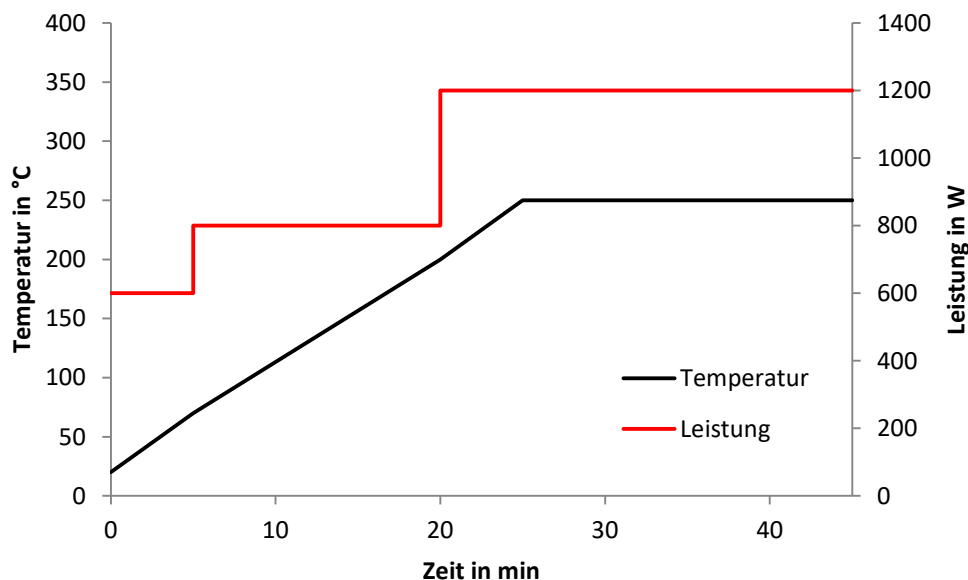
Für die Isotopenanreicherung in dem Bleistandard auf Ölbasis wurde isotopenangereichtes, elementares Blei mit einer Anreicherung von 47,80 At.-% für das  $^{204}\text{Pb}$ -Isotop der Fa. EURISOTOP GMBH (Saarbrücken) verwendet (siehe Abb. 4. 2). 100 mg des angereicherten Metalls wurden mit 5 mL halbkonzentrierter Salpetersäure ( $\approx 32,5$  Gew.-%, *subboiled*) und 1 mL Wasserstoffperoxid (30 Gew.-%, p. a.) mittels Mikrowellendruckaufschluss am Gerät TURBOWAVE der Fa. MLS GMBH (Leutkirch) aufgeschlossen. Als Aufschlussbehälter diente ein 15 mL PTFE Gefäß der Fa. MLS GMBH (Leutkirch). Das Aufschlussprogramm ist in Abb. 4. 3 dargestellt.



**Abb. 4. 2: Isotopenangereichertes elementares Blei (47,80 At.-%  $^{204}\text{Pb}$ ).**

Die Aufschlusslösung wurde in ein gereinigtes 30 mL-HDPE-Gefäß überführt und der Aufschlussbehälter dreimal mit 7 mL Reinstwasser ( $\sigma = 0,054 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) gespült und ebenfalls in das Auffanggefäß aufgenommen. Im Anschluss daran wurde die verdünnte Aufschluss-

lösung bei 85 °C im Trockenschrank vollständig eingedampft. Die zurückgebliebenen leicht löslichen Bleinitratsalze wurden in 500 µL Reinstwasser gelöst und davon 50 µL mit 4,9 g des kommerziell erwerblichen Blei-Ölstandards ( $\omega_{(pb)} = 5.000 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) und 0,1 g des Stabilisators für metall-organische Ölstandards der Fa. SPETEC GMBH (Erding) versetzt. Die Mischung wurde in ein 20 mL-Dispergiiergefäß DT-20 überführt und mittels ULTRA-TURRAX® TUBE DRIVE CONTROL der Fa. IKA-WERKE GMBH & Co. KG (Staufen) 30 min bei einer Drehzahl von  $4.000 \text{ min}^{-1}$  gemischt. Diese Prozedur wurde fünfmal innerhalb von 48 Stunden wiederholt, um die Einstellung von Gleichgewichtsbedingungen beim Isotopenaustausch zwischen Blei-Ölstandard und isotopenangereichertem Blei zu garantieren und einen hohen Anreicherungsgrad zu erreichen.



**Abb. 4. 3: Programm für den Mikrowellendruckaufschluss des isotopenangereicherten elementaren Bleis.**

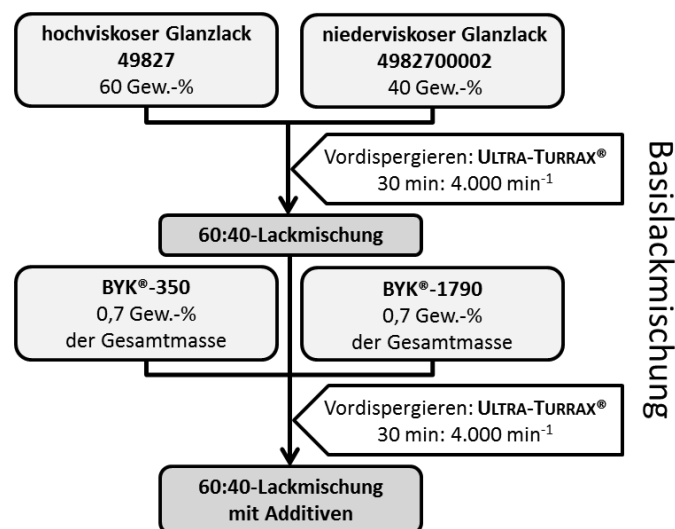
Nach der Anreicherungsphase wurde die Mischung mittels Tischzentrifuge der Fa. THERMO SCIENTIFIC (Waltham, USA) bei  $5.300 \text{ min}^{-1}$  für 30 min zentrifugiert, um die Öl-Phase von der wässrigen Phase sowie möglichen Feststoffen zu trennen.

#### 4.2.2 Anfertigung der Lackmischungen

Das Ansetzen der Lackmischungen erfolgte ebenfalls nach einer Modifikation der Methoden von SCHWARTZE, 2013; THIELEKE, 2013 und DREYER, 2016 auf der Basis der strahlenhärtenden Polymermatrix.

Zunächst wurde die Basislackmischung hergestellt (siehe Abb. 4. 4). Die Grundlage hierfür lieferte eine Mischung aus 60 Gew.-% hochviskosem Glanzlack 49827 und 40 Gew.-%

niederviskosem Glanzlack 4982700002 der Fa. SCHEKOLIN AG (Liechtenstein). Diese Grundlackmischung wurde in 50 mL-Dispergiiergefäße DT-50 überführt und mittels ULTRA-TURRAX® TUBE DRIVE CONTROL der Fa. IKA-WERKE GMBH & Co. KG (Staufen) 30 min bei einer Drehzahl von  $4.000 \text{ min}^{-1}$  vorgemischt. Zur Verbesserung der Eigenschaften und des Verhaltens bei der Dispergierung sowie des Aushärtevorgangs wurden der Vormischung 0,7 Gew.-%, bezogen auf die Gesamtformulierung des Entschäumers BYK®-1790 und des Oberflächenadditivs BYK®-350, der Fa. BYK-GARDNER GMBH (Geretsried) zugegeben. Die so erhaltene Basislackmischung wurde erneut 30 min bei einer Drehzahl von  $4.000 \text{ min}^{-1}$  dispergiert.

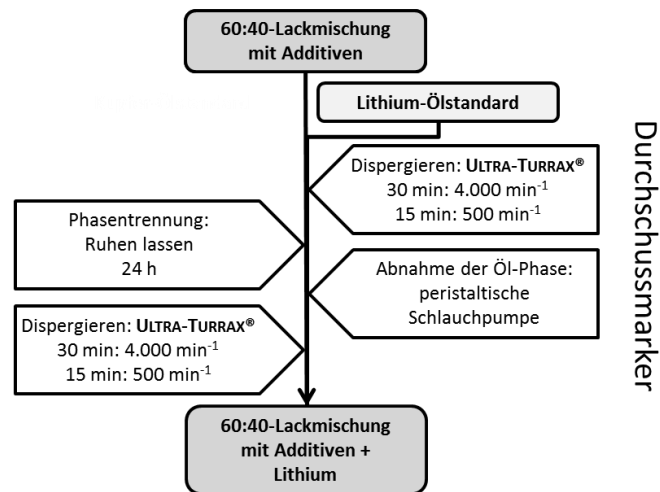


**Abb. 4. 4: Schematische Darstellung für den Ansatz der Basislackmischung.**

Es wurden insgesamt drei Chargen der Basislackmischung hergestellt und als Grundlage für die Präparation der einzelnen Schichten (Durchschussmarker, Back-Spike- und Spike) verwendet.

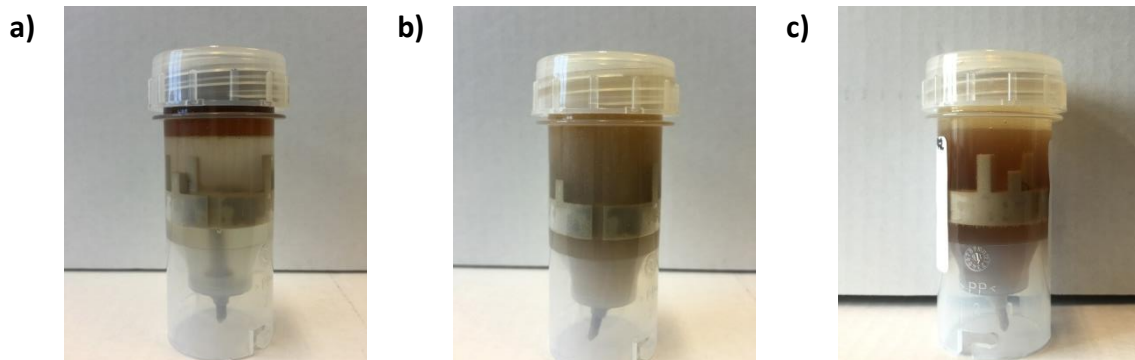
Die Charge 1 wurde für die Präparation des Durchschussmarkers verwendet. Dazu wurde der Basislackmischung der Lithium-Ölstandard ( $\omega_{\text{Li}} = 5.000 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , Fa. SPETEC GMBH, Erding) hinzugegeben, sodass ein Massenanteil von  $\approx 400 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  Lithium in der Lackmischung vorlag (siehe Abb. 4. 5). Die so erhaltene Lackmischung des Durchschussmarkers wurde erneut 30 min bei einer Drehzahl von  $4.000 \text{ min}^{-1}$  und im Anschluss daran noch einmal 15 min bei einer Drehzahl von  $500 \text{ min}^{-1}$ , zur Reduzierung der Schaumbildung, mit dem ULTRA-TURRAX® dispergiert. Danach wurde die dispergierte Lackmischung für 24 Stunden ruhen gelassen, um die Phasentrennung zwischen der Polymer- und Öl-Phase zu ermöglichen. Die

Öl-Phase wurde mittels peristaltischer Schlauchpumpe abgenommen und im Anschluss daran wurde die ölfreie Lackmischung erneut dispergiert.



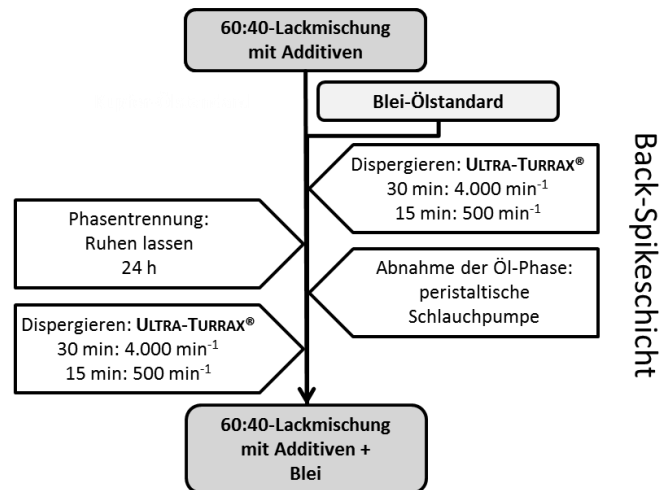
**Abb. 4. 5: Präparationsschema der Lackmischung für den Durchschussmarker.**

In Abb. 4. 6 wird der Übergang von den komplexierten Elementen aus der Öl-Phase in die Polymer-Phase deutlich.



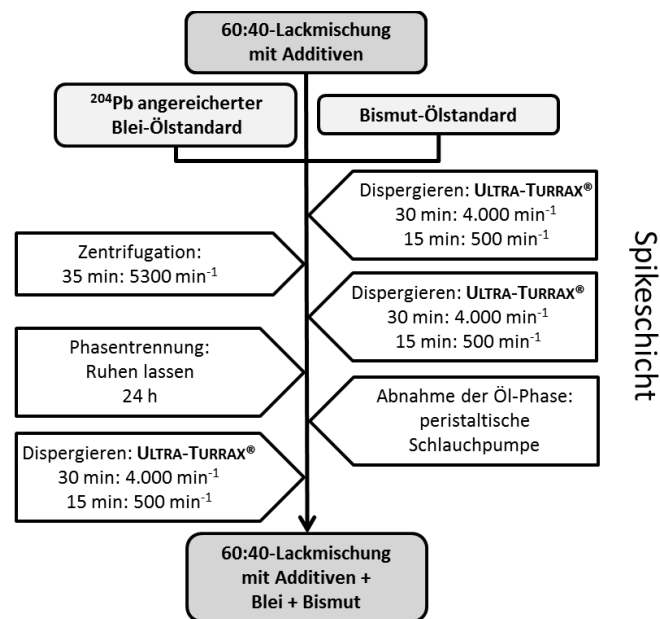
**Abb. 4. 6: Phasentrennung in den Lackmischungen (Öl-Phase oben; Polymer-Phase unten); nach Zugabe des Ölstandards (a), keine vorhandene Phasentrennung kurz nach der Dispergierung (b) und erneuerte Phasentrennung nach der Ruhephase (c).**

Die Lackmischung für die Back-Spikeschicht wurde aus der zweiten Charge der Basislackmischung angesetzt. Die Präparation erfolgte analog zur Herstellung des Durchschussmarkers, jedoch wurde anstatt des Lithium-Ölstandards ein Blei-Ölstandard ( $\omega_{(Pb)} = 5.000 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ , Fa. SPETEC GMBH, Erding) mit „natürlichem“ Isotopenverhältnis hinzudotiert (siehe Abb. 4. 7). Der Massenanteil des Bleis wurde auf  $\approx 330 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  eingestellt.



**Abb. 4. 7: Schematisches Präparationsverfahren für die Lackmischung der Back-Spikeschicht.**

Charge 3 der Basislackmischung wurde für die Herstellung der Lackmischung der Spikeschicht verwendet (siehe Abb. 4. 8).



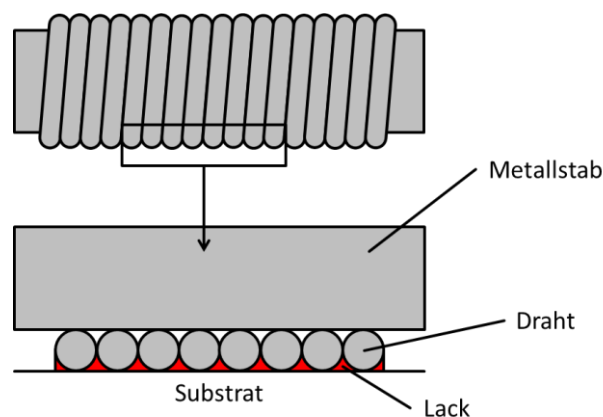
**Abb. 4. 8: Präparationsverfahren der isotope-angereicherten Spike-Lackmischung.**

Der Basislackmischung wurde hierfür der in Abschnitt 4.2.1 präparierte  $^{204}\text{Pb}$  isotopeangereicherte Blei- und ein kommerziell erhältlicher Bismut-Ölstandard ( $\omega_{(\text{Bi})} = 5.000 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ , Fa. SPETEC GMBH, Erding) hinzugegeben. Da der Massenanteil des Bleis in dem  $^{204}\text{Pb}$  isotopeangereicherten Blei-Ölstandard unbekannt war, wurde ein Massenanteil von  $5.000 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  angenommen. Diese Annahme begründet sich darin, dass ein Gleichgewichtszustand zwischen freiem und vermutlich im Komplex gebundenen Blei vorliegt, die Zahl der zur Verfügung stehenden Komplexbildner als stabil vermutet wurde und daher

nur eine relativ konstante Menge an Blei komplexiert werden kann. Der Massenanteil des Bleis in der isotonenangereicherten Lackmischung wurde unter der Annahme auf  $\approx 330 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  und Bismut auf  $\approx 100 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  angesetzt. Nach der Hinzugabe des isotonenangereicherten Blei-Ölstandards wurde die Lackmischung der Spikeschicht 30 min bei einer Drehzahl von  $4.000 \text{ min}^{-1}$  und 15 min bei einer Drehzahl von  $500 \text{ min}^{-1}$ , zur Reduzierung der Schaumbildung, mit dem ULTRA-TURRAX® dispergiert. Weiterhin wurde die dispergierte und isotonenangereicherte Spike-Lackmischung mittels Tischzentrifuge bei  $5.300 \text{ min}^{-1}$  für 30 min zentrifugiert, um mögliche verbliebene Feststoffe zu entfernen. Nach der Zentrifugation erfolgten die Dispergierung, Ruhephase, Abnahme der Ölschicht und ein erneuter Dispergierungsschritt.

### 4.2.3 Applikation mittels Rakeltechnik

Die Applikation der flüssigen Lackmischungen zur Herstellung von dünnen und gleichmäßigen Schichten erfolgte mithilfe der Rakeltechnik. Dabei wird mit einer in ein automatisches Filmaufziehgerät eingespannten Spiralrakel ein dünner Film auf das Substrat appliziert. Bei einer Spiralrakel handelt es sich um einen Metallstab, welcher spiralförmig mit einem Draht umwickelt ist (siehe Abb. 4. 9).



**Abb. 4. 9: Schematische Darstellung einer Spiralrakel für die Applikation von dünnen Schichten (SCHAUMANN, 2011).**

Durch die Umwicklung mit dem Draht entstehen Zwischenräume, deren Größe je nach Durchmesser des Drahtes variiert. Es bleibt ein variables aber definiertes Volumen der zu applizierenden Lösung zurück. An den Drahtstellen verbleiben zunächst freie Bereiche in Form von Streifen, welche durch das Zusammenfließen der Lackbereiche geschlossen werden. Wie oben bereits erwähnt, können durch Variation des Durchmessers des Drahtes

Schichtdicken im Bereich von ca. 4 - 250  $\mu\text{m}$  erzeugt werden. In den Arbeiten von SCHWARTZE, 2013 und DREYER, 2016 ist dieses Verfahren ausführlicher beschrieben.

Als Substrat dienten in dieser Arbeit Polyesterfolien (BYKO-CHARTS, CLEAR POLYESTER 4-MIL, Fa. BYK-GARDNER GMBH, Geretsried) mit einer Dicke von 100  $\mu\text{m}$ . Zur Applikation wurde das AUTOMATISCHE FILMAUFZIEHGERÄT S mit einer 25  $\mu\text{m}$ -Spiralraker (Nassschichtdicke  $\approx 12,5 \mu\text{m}$ ) für den Durchschussmarker und eine 10  $\mu\text{m}$ -Spiralraker (Nassschichtdicke  $\approx 5 \mu\text{m}$ ) für die Back-Spike- und Spikeschicht der Fa. BYK-GARDNER GMBH (Geretsried) verwendet und bei einer Aufziehgeschwindigkeit von  $50 \text{ mm}\cdot\text{s}^{-1}$  gearbeitet. Für die Applikation wurden je 2 mL der Lackmischungen direkt vor die eingespannte Spiralraker pipettiert. Nach der gleichmäßigen Verteilung der Lackmischung durch die Spiralraker auf der Polyesterfolie wurde diese in der in Abschnitt 3.2.1 beschriebenen hauseigenen Aushärtekammer zunächst nur unter Schutzgasatmosphäre für 30 min platziert, um das vollständige Glätten der Rakerstreifen zu ermöglichen. Im Anschluss daran erfolgte die Aushärtung für 30 min bei eingeschalteten UV-Niederdruck-Quecksilberdampf-Leuchtstofflampen. So wurden sukzessive die einzelnen Schichten der drei verschiedenen präparierten Lackmischungen aufgebracht. Die verschiedenen Lackmischungen wurden vor der Applikation stets erneut dispergiert, dazu wurde der letzte Dispergierungsschritt wiederholt. Die hergestellten Schichtabfolgen der beiden Schichtsysteme sind in Abb. 4. 10 dargestellt.

	<b>Schichtsystem 1</b>	<b>Schichtsystem 2</b>
<b>3. Schicht</b>		Back-Spike
<b>2. Schicht</b>	Spike	Spike
<b>1. Schicht</b>	Durchschussmarker	Durchschussmarker
	Polyestersubstrat	Polyestersubstrat

**Abb. 4. 10: Schematische Schichtabfolge der beiden präparierten Schichtsysteme.**

Nach der Aushärtung jeder Einzelschicht wurden drei  $1,5\cdot 1,5 \text{ cm}$  große Teilstücke aus der Mitte der Dünnschicht entnommen und für die Bestimmung der Schichtdicke verwendet (siehe Abschnitt 4.3.2). Neben den Schichtsystemen wurden zusätzlich von jeder Lackmischung drei Bulks in Aluminiumschälchen für die Quantifizierung der Bleigehalte hergestellt.

### 4.3 Charakterisierung der Schichtsysteme

Die Charakterisierung der präparierten Schichtsysteme umfasste die Quantifizierung der Elementgehalte, die Bestimmung der Schichtdicken mittels Lichtmikroskopie (LM) und der Isotopenverhältnisse sowie die Homogenitätsbestimmungen der Elementverteilung und ist in den folgenden Abschnitten beschrieben.

#### 4.3.1 Quantifizierung der Elementgehalte

Bei der Quantifizierung der Elementgehalte wurde das Hauptaugenmerk auf das Element Blei gelegt und die Elemente Lithium und Bismut lediglich qualitativ auf ihr Vorkommen in den ausgehärteten Lackmischungen überprüft. Die Untersuchungen erfolgten am ICP-OES, SPECTRO ARCOS der Fa. SPECTRO ANALYTICAL INSTRUMENTS (Kleve). Die verwendeten Messparameter sind im Anhang (siehe Tab. 8. 1) aufgelistet. Zur Quantifizierung des Bleigehaltes und der qualitativen Analyse von Lithium und Bismut wurden die ausgehärteten Bulks der einzelnen Lackmischungen von den Aluminiumschälchen entfernt und mittels Mikrowellendruckaufschluss nach Abschnitt 3.3.1 aufgeschlossen. Die eigentlichen Lackschichten konnten nicht aufgeschlossen werden, da die vollständige Trennung vom Substrat nicht möglich war und aufgrund der zu geringen Einwaagen der Dünnschichten. Es wurde eine externe Kalibration aus acht äquidistanten Standards mit Bleigehalten zwischen 0,1 und 4,5 mg·kg<sup>-1</sup> und jeweils ein Standard mit 1 mg·kg<sup>-1</sup> Lithium und Bismut angesetzt. Dazu wurden ICP-Standardlösungen von Blei ( $\omega_{(Pb)} = 10.000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ), Lithium ( $\omega_{(Li)} = 10.000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) und Bismut ( $\omega_{(Bi)} = 10.000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) der Fa. CARL ROTH GMBH + Co.KG (Karlsruhe) verwendet. Die Matrix der Standards wurde an die Probenmatrix der verdünnten Aufschlusslösung angepasst, indem die Standards in verdünnter Salpetersäure (2,5 Gew.-%, *subboiled*) angesetzt wurden. Die exakten Gehalte sind in Tab. 8. 4 aufgelistet.

Die unter Berücksichtigung der Messempfindlichkeit und möglicher Interferenzen durch auftretende Linienüberlagerungen gemessenen Spektrallinien sind in Tab. 4. 2 zusammengefasst.



**Tab. 4. 2: Gemessene Emissionslinien für die Quantifizierung der Bleigehalte und der qualitativen Analyse von Lithium und Bismut in den aufgeschlossenen Lackmischungen**

Element	Emissionslinie $\lambda$ in nm
Lithium	460,286
	670,784
Blei	168,215
	220,353
	283,305
Bismut	405,778
	223,061
	306,772

Im Folgenden werden exemplarisch nur die Ergebnisse der repräsentativen Emissionslinie von Blei  $\lambda = 220,353$  nm dargestellt, da keine signifikanten Unterschiede zwischen den Emissionslinien auftraten. Die Bestimmung der Verfahrenskenngrößen, wie das Bestimmtheitsmaß ( $R^2$ ), die Nachweis- (NWG), Erfassungs- (EG) und die Bestimmungsgrenze (BG), erfolgte nach DIN 32645 (siehe Tab. 4. 3). Die Erstellung der Kalibrierfunktion sowie die Berechnung der Probengehalte samt Vertrauensbereiche (VB) erfolgten nach DIN 38402-51 mit einem Vertrauensniveau P von 95 %.

**Tab. 4. 3: Verfahrenskenngrößen der ICP-OES-Bestimmung der aufgeschlossenen Standards nach DIN 32645**

	$\lambda_{(Pb)} = 220,353$ nm
NWG in $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	2,1
EG in $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	4,0
BG in $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	5,2
$R^2$	0,9998

Die qualitative Analyse von Lithium und Bismut wurde durch einen Vergleich der Emissionslinien von den  $1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  Standards, dem Blindwert in verdünnter Salpetersäure und der aufgeschlossenen Lackmischung durchgeführt. Dieser Vergleich zeigte, dass Lithium und Bismut nur in den Lackmischungen vorhanden waren, in welche die Elemente hinzudotiert wurden und bestätigte die Kontaminationsfreiheit der übrigen Lackmischungen. Die qualitative Überprüfung im Hinblick auf das Vorhandensein der beiden Elemente in den Lackmischungen reichte aus, da – wie in Abschnitt 2.4 beschrieben – die Elemente als Korrekturstandard (Bi) bzw. Durchschussmarker (Li) fungieren und nur homogen in der jeweiligen Schicht verteilt sein müssen und kein bestimmter Massenanteil vorliegen muss.

In Tab. 4. 4 sind die Ergebnisse der Quantifizierung des Massenanteils, inklusive Vertrauensbereich, von Blei in den Lackmischungen mittels ICP-OES dargestellt.

**Tab. 4. 4: Via ICP-OES bestimmte Bleigehalte und Vertrauensbereiche in den verschiedenen Lackmischungen (n = 3)**

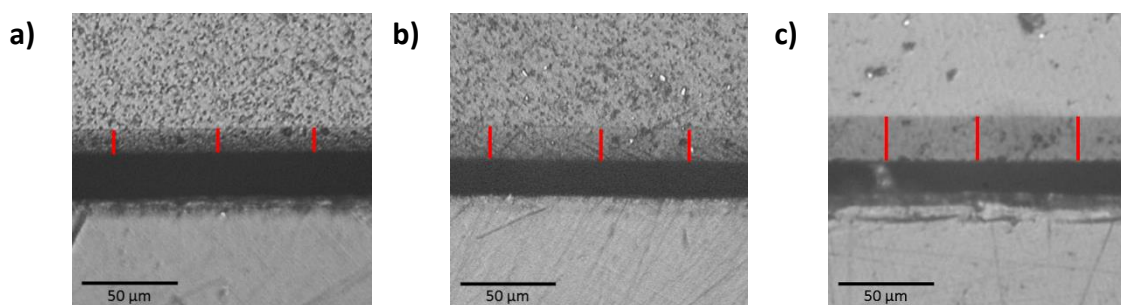
	$\omega_{(Pb)} \pm VB$ in $mg \cdot kg^{-1}$
<b>Durchschussmarker</b>	nicht nachgewiesen
<b>Spike</b>	$358 \pm 11$
<b>Back-Spike</b>	$329 \pm 9$

Die Quantifizierung des Bleigehaltes diente ebenfalls als hausinterne Zertifizierung der Schichtsysteme und war ein nötiger Schritt für die Erprobung (siehe Abschnitt 4.4.2) und Verwendung (siehe Abschnitte 4.4.3 und 4.5) der festkörperbasierten Isotopenverdünnungsanalyse von Blei.

#### 4.3.2 Schichtdickenbestimmungen

Für die Schichtdickenbestimmung wurden die entnommenen Teilstücke (siehe Abschnitt 4.2.3) in ein Zweikomponenten-Epoxidharzsystem (EPOTHIN, Fa. BUEHLER GMBH, Düsseldorf) eingebettet und nach Aushärtung senkrecht zur Substratoberfläche mittels Präzisionssäge IsoMET 1000, unter Verwendung einer Diamanttrennschreibe ISO MET DIAMOND WAFERING BLADE 30HC, der Fa. BUEHLER GMBH, Düsseldorf zerteilt. Die so erhaltenen Schnittflächen wurden mittels AUTOMET™ 250 (Fa. BUEHLER GMBH, Düsseldorf) geschliffen und poliert. Dazu wurden Schleifpapiere (P1200 und P2500) und Poliertücher mit Diamantsuspension (Schleifpartikelgröße 1  $\mu m$ ) verwendet. Die Schnittflächen wurden bis zum Erhalt einer sehr glatten und spiegelnden Oberfläche poliert.

Die so präparierten Querschnittsflächen der verschiedenen Einzel- und Mehrschichtsysteme wurden am digitalen Lichtmikroskop VHX-600 der Fa. KEYENCE DEUTSCHLAND GMBH (Neu-Isenburg) bei 1000-facher Vergrößerung entlang der Kante abgelichtet (siehe Abb. 4. 11).



**Abb. 4. 11: Schichtdickenbestimmung mittels Lichtmikroskopieaufnahmen an dem Durchschussmarker (a), Durchschussmarker + Spike (b) und Durchschussmarker + Spike + Back-Spike (c).**

Für die Schichtdickenbestimmungen wurden jeweils zehn Aufnahmen jedes Querschnitts aufgenommen. Die eigentliche Ausmessung der Schichten erfolgte mit dem Programm IMAGEJ und in Anlehnung an DIN EN ISO 1463 (Metall- und Oxidschichten – Schichtdickenmessung – mikroskopisches Verfahren). Dazu wurden auf jeder der zehn Querschnittsaufnahmen eines Einzel- oder Mehrschichtsystems je sechs Einzelmessungen entlang der Kante durchgeführt und Mittelwert, Standardabweichung, relative Standardabweichung ( $s(x)$ ) und Standardfehler ( $SE$ ) nach Gl. 18 aus der Standardabweichung und dem Stichprobenumfang ( $N$ ) bestimmt.

$$SE = \frac{s(x)}{\sqrt{N}} \quad \text{Gl. 18}$$

Da die einzelnen Schichten einer Mehrschicht nicht erkennbar waren (vgl. Abb. 4. 11), erfolgte die Bestimmung der Einzelschichtdicke durch Subtraktion der unterliegenden Schichten.

Die Ergebnisse der Schichtdickenbestimmung sind in Tab. 4. 5 zusammengefasst.

**Tab. 4. 5: Ergebnisse der Schichtdickenbestimmung in den Einzelschichten (n = 60)**

	Schichtdicke			
	$\bar{x}$ in $\mu\text{m}$	s in $\mu\text{m}$	RSD in %	SE in $\mu\text{m}$
<b>Durchschussmarker</b>	13,6	0,5	3,7	0,07
<b>Spike</b>	4,4	0,6	13,6	0,08
<b>Back-Spike</b>	4,6	0,6	13,0	0,08

Im Allgemeinen gelten RSDs  $\leq 10\%$  als relativ homogen bezüglich der Schichtdicke. Die relativ hohen RSDs bei den geringsten Schichtdicken sind durch die Lichtmikroskopie zu erklären. Bei derartig geringen Schichtdicken von nur einigen Mikrometern ist das Ausmessen sehr fehleranfällig, da an der Auflösungsgrenze des Lichtmikroskops gearbeitet wurde. In der Arbeit von WELLER, 2014, BOYER, 2015 und THÜRNUAU, 2016 werden ebenfalls RSDs zwischen 3 und 14 % für Schichten von ca. 4  $\mu\text{m}$  Dicke genannt. Da die Rakeltechnik als Präparationsverfahren gilt, mit dem in der Regel sehr gleichmäßige Schichtdicken erzeugt werden können (SCHWARTZE, 2013; DREYER, 2016), wurde auch für die dünnen Schichten eine homogene Schichtdicke angenommen. Die ermittelten Schichtdicken wurden ebenfalls für die Erprobung (siehe Abschnitt 4.4.2) und Verwendung (siehe Abschnitte 4.4.3 und 4.5) der festkörperbasierten Isotopenverdünnungsanalyse von Blei genutzt.

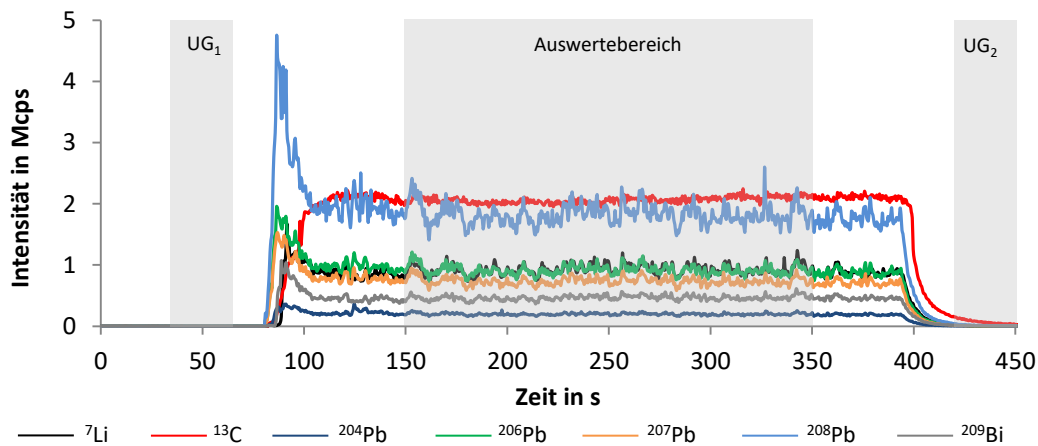
### 4.3.3 Homogenitätsbestimmungen der Elementverteilung

Die Homogenitätsbestimmungen wurden vergleichbar zu Abschnitt 3.3.2 durchgeführt. Aufgrund der geringen Schichtdicken war die  $\mu$ RFA jedoch zu unempfindlich, sodass nur auf die LA-ICP-MS zurückgegriffen wurde.

Verwendet wurde ebenfalls ein ns-Lasersystem (UP-213-2078, Fa. NEW WAVE RESEARCH INC., Fremont, USA) sowie ein Quadrupol-Massenspektrometer (XSERIE 2, Fa. THERMO FISHER SCIENTIFIC GMBH, Bremen). Als Ablationszelle diente eine hauseigene Kammer, beschrieben in der Arbeit von LEHMANN, 2011. Die Ablation der Proben erfolgte durch Linienscans mit einer Scangeschwindigkeit von  $5 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ , einer Länge von  $2000 \mu\text{m}$ , einem Abstand zwischen den einzelnen Linien von  $125 \mu\text{m}$  und einem Laserspotdurchmesser von  $100 \mu\text{m}$ . Der Laser wurde auf die Probenoberfläche fokussiert. Die Schussfrequenz des gepulsten Lasers betrug  $20 \text{ Hz}$  bei einer Laserfluenz von ca.  $3,9 \text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$ . Das ablatierte Probenmaterial wurde mittels Heliumgasstrom ( $1,16 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ ) zum Massenspektrometer transportiert. Die Einstellung der Laserparameter erfolgte ebenfalls in Anlehnung an THIELEKE, 2013. Gemessen wurden die Isotope  ${}^7\text{Li}$ ,  ${}^{13}\text{C}$ ,  ${}^{204}\text{Pb}$ ,  ${}^{206}\text{Pb}$ ,  ${}^{207}\text{Pb}$ ,  ${}^{208}\text{Pb}$  und  ${}^{209}\text{Bi}$  mit einer Dwellzeit von  $20 \text{ ms}$ . Durch die konstante Einleitung von  $0,17 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  verdünnter Salpetersäure ( $2,5 \text{ Gew.}\%$ , subboiled) wurde das Plasma angefeuchtet, um ein robusteres Plasma zu erreichen (O'CONNOR ET AL., 2006). Die weiteren eingestellten Parameter des ICP-MS sind in Tab. 8. 3 im Anhang aufgelistet.

Die  $1,5\cdot 1,5 \text{ cm}$  großen Teilstücke der Schichtsysteme 1 (Durchschussmarker + Spike) und 2 (Durchschussmarker + Spike + Back-Spike) wurden zusammen in der Ablationskammer platziert und, wie bereits in Abschnitt 3.3.2 beschrieben, zur Verringerung des Kohlenstoffuntergrunds  $10 \text{ min}$  mit Helium gespült. Auch die Konditionierung des Plasmas durch eine Rasterablation einer Probe kurz vor Messbeginn wurde durchgeführt. Im Anschluss daran wurde die Messung gestartet und  $20$  Linien auf den beiden Schichtsystemen ablatiert, was einer untersuchten Fläche von  $4 \text{ mm}^2$  entspricht.

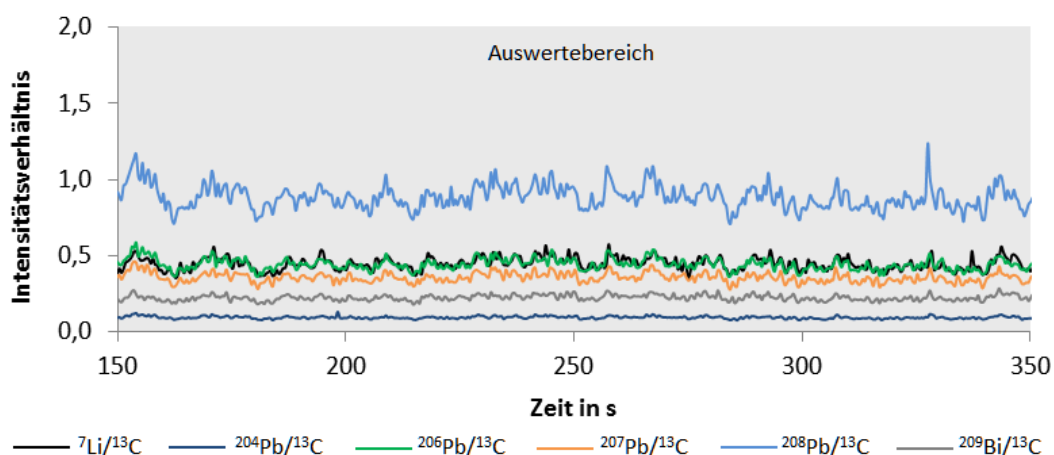
In Abb. 4. 12 sind exemplarisch die Rohsignalverläufe der gemessenen Isotope in Schichtsystem 2 dargestellt.



**Abb. 4. 12: Rohsignalverlauf von  ${}^7\text{Li}$ ,  ${}^{13}\text{C}$ ,  ${}^{204}\text{Pb}$ ,  ${}^{206}\text{Pb}$ ,  ${}^{207}\text{Pb}$ ,  ${}^{208}\text{Pb}$  und  ${}^{209}\text{Bi}$  während der Laserablation von Schichtsystem 2 (Durchschussmarker + Spike + Back-Spike).**

Die Bleisignale zeigen einen gleichmäßigen Verlauf nach dem für die Laserablation typischen Signalanstieg am Anfang des Ablationsvorgangs. Auch das Bismut- und Lithiumsignal verläuft gleichmäßig über die Ablationszeit, was eine homogene Verteilung aller zu dotierten Elemente vermuten lässt. Das vorhandene Lithiumsignal dient als Indikator, dass der Laserstrahl alle drei Schichten abgetragen hat. Das Kohlenstoffsignal zeigt wieder die geringsten Variationen, da es als Matrixelement im Prozentbereich vorkommt und somit auch am homogensten vorliegt. Das Messsignal spiegelt den typischen Verlauf von Kohlenstoff bei LA-ICP-MS Messungen wider. Kohlenstoff zeigt im Gegensatz zu den meisten anderen Elementen einen atypischen Verlauf, die Intensität steigt relativ langsam bei Beginn der Messung an und erreicht nach etwa 15 s das Plateau. Eine mögliche Erklärung liegt in der Änderung des Plasmas durch das Einleiten einer großen Menge Kohlenstoff. Durch das relativ hohe erste Ionisierungspotential von Kohlenstoff ändert sich die Zusammensetzung und die zur Verfügung stehende Energie des Plasmas und der Gleichgewichtszustand pendelt sich mit Verzögerung ein.

Im nächsten Schritt wurden die gemessenen Signale untergrundkorrigiert und über das  ${}^{13}\text{C}$ -Signal normalisiert, um die jeweilige Drift des Lasers und des Messsystems zu korrigieren. Die normalisierten Signalverläufe der Bleisotope und des Bismutisotops zeigt Abb. 4. 13.



**Abb. 4. 13:** Über  $^{13}\text{C}$  normalisierter Signalverlauf von  $^7\text{Li}$ ,  $^{204}\text{Pb}$ ,  $^{206}\text{Pb}$ ,  $^{207}\text{Pb}$ ,  $^{208}\text{Pb}$  und  $^{209}\text{Bi}$  während der Laserablation von Schichtsystem 2 (Durchschussmarker + Spike + Back-Spike).

Die normalisierten Signalverläufe aller gemessenen Isotope weisen einen geringfügig gleichmäßigeren Verlauf auf. Ähnlich wie in Abb. 3. 13 und Abb. 3. 14 verringert Kohlenstoff nur minimal die Signalschwankungen und andere Isotope wären für die Normalisierung und die damit einhergehende Korrektur von Schwankungen des Lasers und Messsystems effektiver. Da aber die Homogenität der Elementverteilung überprüft werden sollte, musste die Normalisierung über das Matrixelement Kohlenstoff erfolgen, um die gleichmäßige Verteilung der hinzudotierten Elemente zu beweisen. Alle Signale zeigen einen vergleichbaren Verlauf und lassen eine gleichmäßige Elementverteilung vermuten.

Die relativen Standardabweichungen aus den Mittelwerten der 20 ablatierten Linien sind in Tab. 4. 6 zusammen gefasst.

**Tab. 4. 6: Bestimmung der Homogenität der Elementverteilung in den präparierten Schichtsystemen 1 und 2 (n = 20)**

Isotop	Relative Standardabweichung in %	
	Schichtsystem 1	Schichtsystem 2
$^7\text{Li}$	1,2	1,3
$^{204}\text{Pb}$	1,7	1,6
$^{206}\text{Pb}$	2,8	2,9
$^{207}\text{Pb}$	3,2	3,2
$^{208}\text{Pb}$	3,9	3,8
$^{209}\text{Bi}$	3,3	3,1

Die ermittelten relativen Standardabweichungen liegen zwischen 1 und 4 % und bestätigen eine ausreichend gleichmäßige Elementverteilung der hinzudotierten Elemente und können nach den Arbeiten von GUILLONG, 2003 und THIELEKE, 2013 als homogen angesehen werden. Weiterhin ist kein Unterschied zwischen den beiden Schichtsystemen zu verzeichnen und

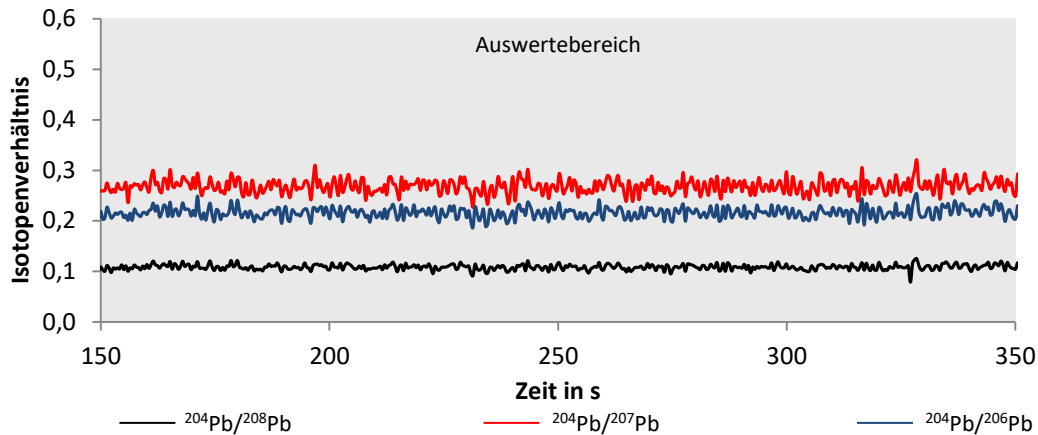
auch die RSDs des Durchschusmarkers (Li) und der darüber applizierten Spike- und Back-Spikeschicht (Pb und Bi) zeigen ähnliche Werte. Auffällig ist jedoch der Anstieg der RSDs von den Bleiisotopen mit steigender Häufigkeit. Einen Grund hierfür liefert das automatische Umspringen des Detektors zwischen Puls- und Analogmodus bei etwa 1,5 Mcps. Das heißt, die Isotope mit Intensitäten in diesem Umschaltbereich werden unter Umständen teilweise im Puls- und teilweise im Analogmodus gemessen. Wenn der Umschaltfaktor nicht optimal eingestellt ist, kommt es zu Abweichungen in den detektierten Counts zwischen den beiden Modi und somit zu größeren RSDs. Aus diesem Grund empfiehlt es sich, nur in einem Modus zu messen und den Umschaltbereich zu vermeiden. Auch die Verteilung des  $^{204}\text{Pb}$ -Isotops zeigt keine Abweichungen zu den anderen Bleiisotopen auf und somit liegt das isotopenangereicherte Blei vergleichbar wie das „natürliche“ Blei in der ausgehärteten Schicht vor. Demnach scheint der Anreicherungsprozess des Blei-Ölstandards erfolgreich zu funktionieren. Weiterhin wurde die Eignung von Bismut als Korrekturstandard für Blei bestätigt, da vergleichbare RSDs der über  $^{13}\text{C}$  normalisierten Bismut- und Blei-Verhältnisse gemessen wurden und so eine gleichmäßige Verteilung der beiden Elemente vorliegt.

Die Homogenitätsbestimmung der Verteilungen der hinzudotierten Elemente bestätigt die prinzipielle Eignung der präparierten Schichtsysteme für die festkörperbasierte Isotopenverdünnungsanalyse, da eine homogene Verteilung der Spikeisotope und des Korrekturstandards eine Grundvoraussetzung für jene Methode darstellt. Einem weiteren kritischen Punkt, der Homogenität der Isotopenverhältnisse, widmet sich der folgende Abschnitt.

### **4.3.4 Homogenitätsbestimmung der Isotopenverhältnisse**

Da für die Durchführung der festkörperbasierten Isotopenverdünnungsanalyse nicht nur die homogene Elementverteilung, sondern vielmehr die gleichmäßige Verteilung aller hinzudotierten Isotope die Grundlage bilden, wurde die Homogenität der Isotopenverhältnisse ebenfalls überprüft. Dies ist deshalb notwendig, da bei der Isotopenanreicherung des Blei-Ölstandards (siehe Abschnitt 4.2.1) möglicherweise Partikel mit abweichenden Bleiisotopenverhältnissen oder eine ungleichmäßige Verteilung der Bleiisotope in den ausgehärteten Lacksystemen vorliegen, da das isotopenangereicherte Blei unter Umständen ein anders Verhalten als das „natürliche“ Blei im Ölstandard zeigt. Um die Homogenität der Isotopenverhältnisse zu untersuchen, wurden die Rohsignalintensitäten

aus den Homogenitätsbestimmungen der Elementverteilung (siehe Abschnitt 4.3.3) untergrundkorrigiert, über den Korrekturstandard  $^{209}\text{Bi}$  normalisiert und im Anschluss daran die Isotopenverhältnisse berechnet. Die so erhaltenen Signalverläufe sind in Abb. 4. 14 beispielhaft für das Schichtsystem 2 (Durchschussmarker + Spike + Back-Spike) gezeigt.



**Abb. 4. 14:** Exemplarische Darstellung der über  $^{209}\text{Bi}$  normalisierten Bleiisotopenverhältnisse in Schichtsystem 2.

Die Signale zeigen relativ ruhige Verläufe und unterstreichen das Potential bei der Normalisierung über einen idealen Korrekturstandard gegenüber Kohlenstoff und bestätigen somit die Ergebnisse aus Abschnitt 3.3.2. Weiterhin deuten die gleichmäßigen Signalverläufe auf eine homogene Verteilung aller Bleiisotope hin.

Analog zu dem Vorgehen im Abschnitt 4.3.3 wurden die Mittelwerte der 20 Auswertebereiche erneut gemittelt und die relative Standardabweichung bestimmt. Die Ergebnisse der Homogenitätsbestimmung der Isotopenverhältnisse sind in Tab. 4. 7 zusammengefasst.

**Tab. 4. 7:** Homogenitätsbestimmung der Bleiisotopenverhältnisse in den Schichtsystemen 1 und 2 (n = 20)

Isotopenverhältnis	Relative Standardabweichung in %	
	Schichtsystem 1	Schichtsystem 2
$^{204}\text{Pb}/^{208}\text{Pb}$	0,39	0,46
$^{204}\text{Pb}/^{207}\text{Pb}$	0,34	0,41
$^{204}\text{Pb}/^{206}\text{Pb}$	0,26	0,47

Die relative Standardabweichung der drei betrachteten Isotopenverhältnisse lag in beiden Schichtsystemen unter 0,5 %. Aus den Ergebnissen kann auf eine homogene Verteilung der Bleiisotope geschlossen werden, da in der Arbeit von HEUMANN ET AL. 1998 in flüssigen Standardlösungen, also als homogen zu betrachtende Proben, bei der Verwendung von



Quadrupol-Massenspektrometern für die Bestimmung von Isotopenverhältnissen typischerweise erreichbare RSDs von 0,1 - 0,5 % publiziert sind. Daher kann die geforderte Grundlage der Homogenität der Isotopenverhältnisse in den Schichtsystemen als erfüllt betrachtet werden. Weiterhin wurde auch die hohe Präzision des verwendeten LA-ICP-MS bewiesen.

#### 4.4 Überprüfung der Methode

Das vorliegende Unterkapitel befasst sich mit der Überprüfung der festkörperbasierten Isotopenverdünnungsanalyse von Blei in polymeren Dünnschnitten. Dazu wird im Folgenden zunächst die erreichbare Richtigkeit des Quadrupol-Massenspektrometers anhand des zertifizierten Referenzmaterials NIST SRM 981 bestimmt. Weiterhin wird die Methode mittels selbstsynthetisierter bleihaltiger polymerer Dünnschnitte erprobt und im Anschluss daran mit dem zertifizierten Referenzmaterial BAM-H010 validiert. Außerdem wird eine Unsicherheitsbetrachtung durchgeführt.

Für alle Messungen wurde ein ns-Lasersystem (UP-213-2078, Fa. NEW WAVE RESEARCH INC., Fremont, USA) sowie ein Quadrupol-Massenspektrometer (XSERIE 2, Fa. THERMO FISHER SCIENTIFIC GMBH, Bremen) verwendet. Als Ablationszelle diente eine hauseigene Kammer, beschrieben in der Arbeit von LEHMANN, 2011. Die Ablation der Proben erfolgte durch Linienscans mit einer Scangeschwindigkeit von  $5 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ , einer Länge von  $1500 \mu\text{m}$ , einem Abstand zwischen den einzelnen Linien von  $125 \mu\text{m}$  und einem Laserspotdurchmesser von  $100 \mu\text{m}$ . Der Laser wurde auf die Probenoberfläche fokussiert. Die Schussfrequenz des gepulsten Lasers betrug 20 Hz bei einer Laserfluenz von ca.  $3,9 \text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$ . Das ablatierte Probenmaterial wurde mittels Heliumgasstrom ( $1,16 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ ) zum Massenspektrometer transportiert. Die Einstellung der Laserparameter erfolgte ebenfalls in Anlehnung an THIELEKE, 2013. Gemessen wurden die Isotope  $^7\text{Li}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{203}\text{Tl}$ ,  $^{205}\text{Tl}$ ,  $^{204}\text{Pb}$ ,  $^{206}\text{Pb}$ ,  $^{207}\text{Pb}$ ,  $^{208}\text{Pb}$  und  $^{209}\text{Bi}$  mit einer Dwellzeit von 20 ms. Durch die konstante Einleitung von  $0,17 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  des NIST SRM 997 ( $\omega_{(\text{Tl})} \approx 25 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) in verdünnter Salpetersäure (2,5 Gew.-%, subboiled) wurde das Plasma angefeuchtet, um ein robusteres Plasma zu erreichen (O'CONNOR ET AL., 2006). Das Thallium wurde für die Korrektur des Mass-Bias verwendet. Die weiteren eingestellten Parameter des ICP-MS sind in Tab. 8. 3 aufgelistet. Die Messung flüssiger Proben erfolgte über die Verwendung des Direkt-Einlasses für flüssige Lösungen mit einer Einleitung von  $0,1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  der Probe in die Sprühkammer.

**4.4.1 Messung des zertifizierten Referenzmaterials NIST SRM 981**

Wie bereits oben erwähnt, beschäftigt sich dieser Abschnitt mit der Bestimmung der erreichbaren Richtigkeit des verwendeten Quadrupol-Massenspektrometers. Dazu wurde das Referenzmaterial NIST SRM 981 verwendet. Die Richtigkeit wurde sowohl im Flüssigmodus als auch im Laserablationsmodus bestimmt, um den Einfluss der Laserablation festzustellen.

Für die Bestimmung der Präzision im Flüssigmodus wurden ca. 0,1 g des als Draht vorliegenden NIST SRM 981 abgenommen, in halbkonzentrierter Salpetersäure ( $\approx 32,5$  Gew.-%, *subboiled*) aufgelöst und mit Reinstwasser ( $\sigma = 0,054 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) verdünnt. Zu der verdünnten Lösung wurde der ebenfalls gleich behandelte Isotopenstandard für Thallium (NIST SRM 997) zur Korrektur des Mass-Bias hinzugegeben. Der Massenanteil in der Endverdünnung beider Elemente betrug  $\approx 25 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ . Die verdünnte Standardlösung wurde fünfmal gemessen und aus den Mittelwerten der Einzelmessungen wurden erneut der Mittelwert, die relative Standardabweichung und der Bias bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tab. 4. 8 ohne Mass-Bias-Korrektur und in Tab. 4. 9 bei durchgeführter Mass-Bias-Korrektur zusammengefasst.

**Tab. 4. 8: Gemessene Isotopenverhältnisse in dem verdünnten NIST SRM 981 Referenzmaterial ohne Mass-Bias-Korrektur**

Isotopenverhältnis	zertifizierter Wert <sup>a</sup>	gemessener Wert	Bias <sup>b</sup> in %
<sup>204</sup> Pb/ <sup>206</sup> Pb	0,059042	0,060	1,61
<sup>207</sup> Pb/ <sup>206</sup> Pb	0,91464	0,921	0,69
<sup>208</sup> Pb/ <sup>206</sup> Pb	2,1681	2,211	1,97

<sup>a</sup> NIST SRM 981 1973; <sup>b</sup> Bias = [(ermittelter Wert – Referenzwert)/Referenzwert\*100] nach KROMIDAS 2011

Ohne die Korrektur des Mass-Bias liegen die mittleren Abweichungen zwischen 1 – 2 %. Die Durchführung der Korrektur verringert den Bias im Mittel auf  $\leq 1,2$  %. Dieses Experiment beweist eine zufriedenstellende Richtigkeit bezüglich der gemessenen Isotopenverhältnisse des Quadrupol-Massenspektrometers. Die Mass-Bias-Korrektur sollte durchgeführt werden, um die Richtigkeit der gemessenen Isotopenverhältnisse zu erhöhen.

**Tab. 4. 9: Gemessene Isotopenverhältnisse in dem verdünnten NIST SRM 981 Referenzmaterial mit Mass-Bias-Korrektur**

Isotopenverhältnis	zertifizierter Wert <sup>a</sup>	gemessener Wert	Bias <sup>b</sup> in %
<sup>204</sup> Pb/ <sup>206</sup> Pb	0,059042	0,060	1,62
<sup>207</sup> Pb/ <sup>206</sup> Pb	0,91464	0,907	-0,83
<sup>208</sup> Pb/ <sup>206</sup> Pb	2,1681	2,157	-0,51

<sup>a</sup> NIST SRM 981 1973; <sup>b</sup> Bias = [(ermittelter Wert – Referenzwert)/Referenzwert\*100] nach KROMIDAS 2011

Als nächstes wurde ein Teilstück des Drahtes des Referenzmaterials NIST SRM 981 in ein Zweikomponenten-Epoxidharzsystem eingebettet und analog zu dem Vorgehen in Abschnitt 4.3.2 poliert und geschliffen. Ein Teilstück wurde in der Ablationskammer platziert und fünf Linienmessungen mittels LA-ICP-MS durchgeführt. Aus den fünf Linien wurden die Mittelwerte gebildet und daraus wiederum die Mittelwerte und relative Standardabweichung bestimmt. Die Ergebnisse sind in den Tab. 4. 10 und Tab. 4. 11 aufgelistet.

**Tab. 4. 10: Via LA-ICP-MS bestimmte Isotopenverhältnisse in dem NIST SRM 981 Referenzmaterial ohne Mass-Bias-Korrektur**

Isotopenverhältnis	zertifizierter Wert <sup>a</sup>	gemessener Wert	Bias <sup>b</sup> in %
<sup>204</sup> Pb/ <sup>206</sup> Pb	0,059042	0,061	3,32
<sup>207</sup> Pb/ <sup>206</sup> Pb	0,91464	0,965	5,51
<sup>208</sup> Pb/ <sup>206</sup> Pb	2,1681	2,198	1,38

<sup>a</sup> Zertifikat NIST SRM 981 1973; <sup>b</sup> Bias = [(ermittelter Wert – Referenzwert)/Referenzwert\*100] nach KROMIDAS 2011

Die Abweichungen zum zertifizierten Wert steigen bei der Laserablation im Vergleich zur Flüssigmessung an. Der Bias erreicht Werte von 1,5 - 5,5 %, wenn die Mass-Bias-Korrektur nicht durchgeführt wird. Im Gegensatz dazu liegt der Bias bei der durchgeführten Mass-Bias-Korrektur zwischen 0,5 und 3,6 % (siehe Tab. 4. 11). Die erhöhten relativen Standardabweichungen hängen jedoch auch mit den wesentlich höheren Intensitäten bei der Laserablationsmessung zusammen, da bei der Ablation des Drahtes, welcher vollständig aus Blei besteht, 3.000-fach höhere Intensitäten generiert werden als bei der Flüssigmessung des 25 µg·kg<sup>-1</sup> Standards. Bei derartig hohen Signalen befindet sich der Detektor nahe der Sättigungsgrenze und auch die Plasmaeigenschaften weichen ab. Ein weiterer Grund für die hohen relativen Standardabweichungen ist das Verhältnis der Bleisignale zu den Signalen der Thalliumisotope, welche sich um mindestens den Faktor 1.000 unterscheiden. Diese gravierenden Unterschiede kann die Mass-Bias-Korrektur nicht abfangen. Auch Fraktionierungseffekte bei der Laserablation und das in Abschnitt 4.3.3 beschriebene Umspringen des Detektors zwischen Puls- und Analogmodus können zu Abweichungen vom zertifizierten Wert führen. Da weder der Bleidraht als Feststoff mit ausreichend homogener Elementverteilung verdünnt werden konnte, noch die beiden NIST Referenzmaterialien so zusammen gemischt werden konnten, war das beschriebene Verfahren die einzige Möglichkeit, um die Richtigkeit abzuschätzen.

**Tab. 4. 11: Via LA-ICP-MS bestimmte Isotopenverhältnisse in dem NIST SRM 981 Referenzmaterial mit Mass-Bias-Korrektur**

Isotopenverhältnis	zertifizierter Wert <sup>a</sup>	gemessener Wert	Bias <sup>b</sup> in %
<sup>204</sup> Pb/ <sup>206</sup> Pb	0,059042	0,061	3,32
<sup>207</sup> Pb/ <sup>206</sup> Pb	0,91464	0,920	0,59
<sup>208</sup> Pb/ <sup>206</sup> Pb	2,1681	2,090	-3,60

<sup>a</sup>Zertifikat NIST SRM 981 1973; <sup>b</sup> Bias = [(ermittelter Wert – Referenzwert)/Referenzwert\*100] nach KROMIDAS 2011

Die Ergebnisse zeigen – wie erwartet – einen positiven Einfluss der Mass-Bias-Korrektur, sowohl für die Flüssigmessung als auch für die Laserablation. Bei Anwendung der Korrektur wird eine zufriedenstellende Richtigkeit bei der Messung von Isotopenverhältnissen erreicht. Da der Mass-Bias – wie in Abschnitt 2.1.2 beschrieben – bei der ICP-MS relativ stabil über die Messzeit bleibt und somit Probe, Spike und Blend gleichmäßig „falsch“ gemessen werden, korrigieren sich diese Fehler bei der Isotopenverdünnungsanalyse in den meisten Fällen heraus. Lediglich bei Langzeitmessungen ( $\geq 8$  Stunden) besteht ein erhöhtes Risiko einer Änderung des Mass-Bias und daher wird die Korrektur stets angewendet.

#### 4.4.2 Erprobung der Methode

Die Erprobung der festkörperbasierten Isotopenverdünnungsanalyse wurde anhand einer einfachen Isotopenverdünnungsanalyse durchgeführt. Für derartige Methoden müssen drei Isotopenverhältnisse bestimmt werden. Die Bestimmung des Isotopenverhältnisses der zu analysierenden Probe bildet dabei den ersten Schritt. Als zweites wird das Isotopenverhältnis der Mischung von Probe und Spike, dem Blend, bestimmt. Als letztes wird der verwendete isotopenangereicherte Spike gemessen. Für die Erprobung der festkörperbasierten LA-ICP-IDMS-Methode wurde das präparierte Schichtsystem 1 als Spike, Schichtsystem 2 als Blend und ein Bulk der Back-Spike-Lackmischung als Probe verwendet. Dazu wurden 1,5·1,5 cm große Teilstücke der beiden Schichtsysteme entnommen und zusammen mit dem Bulk der Probe in der Ablationskammer platziert. Unter den oben genannten Parametern wurden jeweils 20 Linienablationen durchgeführt.

In Abb. 4. 15 sind repräsentative Rohsignalverläufe der LA-ICP-MS-Messung von Probe, Spike und Blend dargestellt. Die ebenfalls gemessenen <sup>203</sup>Tl- und <sup>205</sup>Tl-Isotope für die Korrektur des Mass-Bias sind aufgrund der Übersichtlichkeit nicht eingezeichnet. Deutlich zu erkennen ist der relative Anstieg des <sup>204</sup>Pb-Signals von dem Back-Spike über den Blend zum Spike hin. Im Spike liegen die Signale von <sup>204</sup>Pb und <sup>207</sup>Pb beinahe gleichauf und im Gegensatz dazu zeigen sich in dem Signal des Back-Spikes und des Blends große Unterschiede zwischen den beiden

Isotopen. Dies weist auf eine erfolgreiche Anreicherung des  $^{204}\text{Pb}$ -Isotopes in der Spikeschicht hin. Der Anstieg der Bleisummensignale in Spike und Blend um den Faktor 2 weist auf etwa gleich dicke Schichten vom Spike und der auf dem Spike applizierten Probenschicht im Blend hin. Die gleichmäßigen  $^7\text{Li}$ -Signale in Blend und Spike deuten auf eine vollständige Ablation darüber liegender Schichten hin. Die insgesamt höheren Intensitäten in der Probe sind durch das größere ablatierte Volumen des Bulks im Vergleich zu den relativ geringen Ablationsvolumina von Spike und Blend zu erklären. Das Fehlen von  $^7\text{Li}$  und  $^{209}\text{Bi}$  in der Probe ist ebenfalls auf die Präparation der Probe als Bulk zurückzuführen.

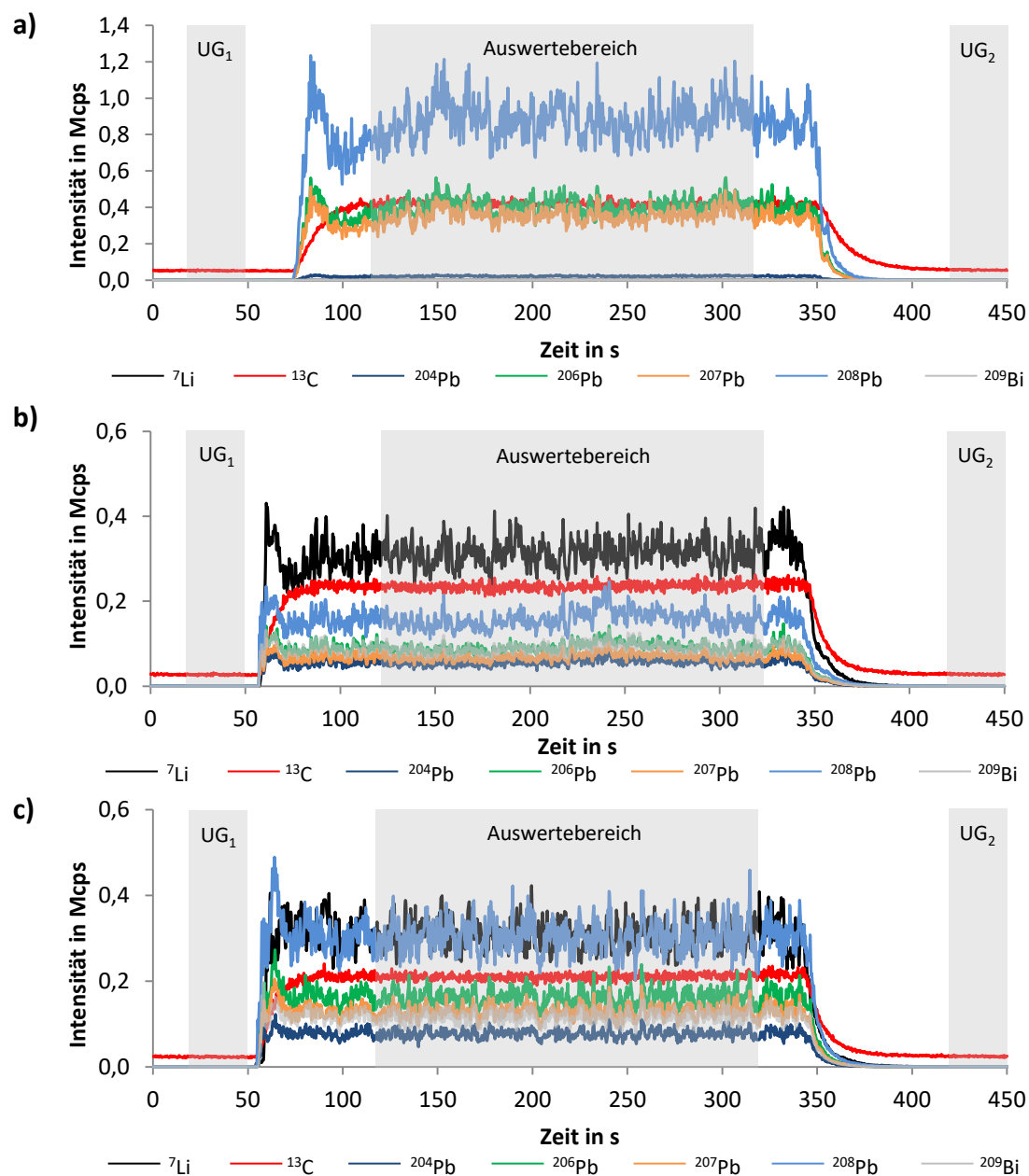


Abb. 4. 15: Signalverläufe von  $^7\text{Li}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{204}\text{Pb}$ ,  $^{206}\text{Pb}$ ,  $^{207}\text{Pb}$ ,  $^{208}\text{Pb}$  und  $^{209}\text{Bi}$  im Back-Spike (a), Spike (b) und Blend (c).  $^{203}\text{Tl}$  und  $^{205}\text{Tl}$  sind der besseren Übersichtlichkeit halber nicht dargestellt.

In den zeitaufgelösten Messsignalen wurden drei Bereiche, Untergrund (UG) 1 und 2 und der Auswertebereich, festgelegt. Die Untergrundbereiche, in der der Lasershutter geschlossen war und keine Ablation stattfand, umfassten 30 s und wurden an den Anfang und das Ende des Messsignals gelegt. Der Auswertebereich umfasste 200 s und wurde in das Plateau der aufgenommenen Messsignale gelegt. In den Untergrundbereichen wurden die mittleren Intensitäten der aufgenommenen Isotope bestimmt und die Untergrundkorrektur durch Subtraktion der mittleren Intensitäten beider Untergrundbereiche von den gemessenen zeitaufgelösten Intensitäten subtrahiert. Die untergrundkorrigierten Signale wurden über den Korrekturstandard  $^{209}\text{Bi}$  normalisiert. Im Anschluss daran wurden die mittleren normalisierten Intensitäten in dem Auswertebereich bestimmt und für die Berechnung der Isotopenverhältnisse und Isotopenhäufigkeiten verwendet. Für die Berechnung der Isotopenhäufigkeiten wurden die normalisierten Bleisignale summiert und die normalisierten Intensitäten durch die Summe dividiert. Die bestimmten Isotopenhäufigkeiten von Probe, Spike und Blend sind in Tab. 4. 12 zusammengefasst.

**Tab. 4. 12: Ermittelte Isotopenhäufigkeiten im Back-Spike, Spike und Blend mit Standardfehler ( $\pm$  SE) (n = 20)**

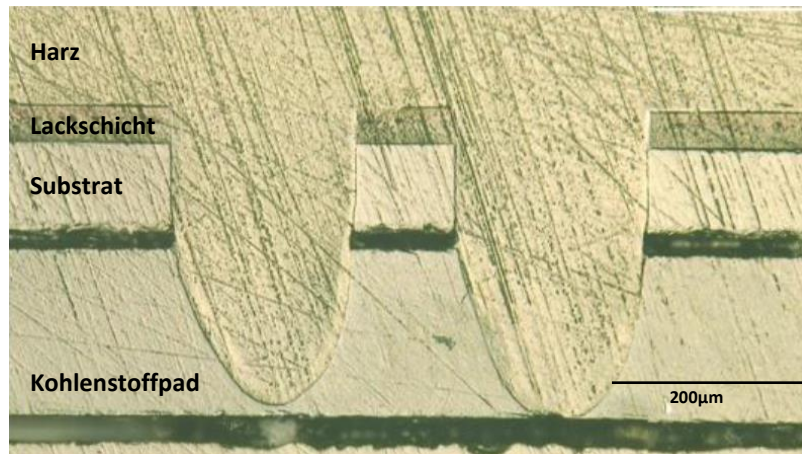
Isotop	Isotopenhäufigkeit in %		
	Back-Spike	Spike	Blend
$^{204}\text{Pb}$	$1,34 \pm 0,01$	$15,46 \pm 0,05$	$8,51 \pm 0,04$
$^{206}\text{Pb}$	$25,02 \pm 0,03$	$24,49 \pm 0,07$	$24,69 \pm 0,04$
$^{207}\text{Pb}$	$21,41 \pm 0,01$	$18,33 \pm 0,05$	$19,89 \pm 0,03$
$^{208}\text{Pb}$	$52,23 \pm 0,07$	$41,72 \pm 0,06$	$46,91 \pm 0,07$

Aus den dargestellten Ergebnissen wird zum einen die erfolgreiche Isotopenanreicherung von  $^{204}\text{Pb}$  deutlich und zum anderen erscheinen die Isotopenhäufigkeiten plausibel, da der Blend als etwa gleichteilige Mischung aus Spike und Back-Spike etwa mittlere Isotopenhäufigkeiten der vier Bleisotope zwischen den Häufigkeiten von Spike und Probe aufweist. Die Isotopenverhältnisse wurden aus den normalisierten und Mass-Bias-korrigierten Bleiintensitäten berechnet und sind in Tab. 4. 13 aufgelistet.

**Tab. 4. 13: Ermittelte Mass-Bias-korrigierte Isotopenverhältnisse im Back-Spike, Spike und Blend mit Standardfehler ( $\pm$  SE) (n = 20)**

Isotope	Isotopenverhältnis		
	Back-Spike	Spike	Blend
$^{204}\text{Pb}/^{206}\text{Pb}$	$0,054 \pm 0,001$	$0,631 \pm 0,002$	$0,345 \pm 0,001$
$^{204}\text{Pb}/^{207}\text{Pb}$	$0,062 \pm 0,002$	$0,843 \pm 0,003$	$0,428 \pm 0,003$
$^{204}\text{Pb}/^{208}\text{Pb}$	$0,025 \pm 0,001$	$0,370 \pm 0,002$	$0,181 \pm 0,001$

Bevor die Berechnung des Massenanteiles von Blei im Back-Spike erfolgte, wurde zunächst die Tiefe der Ablationskrater unter dem Lichtmikroskop untersucht, um einen vollständigen Abtrag der Spike- und Back-Spike-Schicht zu überprüfen. Dazu wurde die Blendschicht analog zu dem in Abschnitt 4.3.2 beschriebenen Vorgehen eingebettet und poliert. Die Ablationsprofile zeigten eine Eindringtiefe von ca. 200 µm und einen vollständigen und gleichmäßigen Abtrag der Back-Spike- und Spike-Schicht im Blend (siehe Abb. 4. 16).



**Abb. 4. 16: Exemplarische Lichtmikroskopie-Aufnahme der Ablationsprofile im Blend.**

Im nächsten Schritt wurde die Berechnung des Massenanteils von Blei im Backspike mittels einfacher Isotopenverdünnungsanalyse durchgeführt (siehe Gl. 10). Die verwendeten Parameter für die drei betrachteten Isotopenverhältnisse sind in Tab. 4. 14 zusammengefasst.

**Tab. 4. 14: Verwendete Parameter für die festkörperbasierte einfache Isotopenverdünnungsanalyse von Blei**

Parameter	Isotopenverhältnis		
	$^{204}\text{Pb}/^{206}\text{Pb}$	$^{204}\text{Pb}/^{207}\text{Pb}$	$^{204}\text{Pb}/^{208}\text{Pb}$
$a_{x,b}$	0,250	0,214	0,522
$h_x$ in µm	4,6	4,6	4,6
$h_y$ in µm	4,4	4,4	4,4
$M_b^a$ in g·mol <sup>-1</sup>	205,97444	206,97588	207,97663
$M_x^a$ in g·mol <sup>-1</sup>	207,2	207,2	207,2
$R_x$	0,054	0,062	0,025
$R_{xy}$	0,345	0,428	0,181
$R_y$	0,631	0,843	0,371
$\omega_{y,b}$ in mg·kg <sup>-1</sup>	88,2	65,4	147,3

<sup>a</sup> aus CIAAW, 2016

Die Ergebnisse der einfachen Isotopenverdünnung sind in Tab. 4. 15 dargestellt. Alle drei betrachteten Isotopenverhältnisse führen zu Massenanteilen nahe dem mittels ICP-OES

hausintern zertifizierten Wert. Der Bias liegt zwischen 0,4 und 1,2 % und spiegelt die Leistungsfähigkeit der festkörperbasierten Isotopenverdünnungsanalyse wider. Die Erprobung der Methode kann somit als erfolgreich betrachtet werden und wurde durch Mehrfachmessungen bestätigt. Die Berechnung der aufgezeigten Fehler der Isotopenverdünnungsanalyse wird in Abschnitt 4.4.4 beschrieben.

**Tab. 4. 15: Mittels festkörperbasierter einfacher Isotopenverdünnungsanalyse ermittelter Massenanteil von Blei im Back-Spike**

LA-ICP-IDMS	Massenanteil $\omega_{(Pb)}$ in $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	Bias <sup>a</sup> in %
$^{204}\text{Pb}/^{206}\text{Pb}$	$334 \pm 31$	1,4
$^{204}\text{Pb}/^{207}\text{Pb}$	$332 \pm 31$	0,9
$^{204}\text{Pb}/^{208}\text{Pb}$	$326 \pm 31$	-1,0
$\bar{x}$	$330 \pm 31$	0,4
<b>zertifizierter Wert<sup>b</sup></b>	<b><math>329 \pm 9</math></b>	

<sup>a</sup> Bias = [(ermittelter Wert – Referenzwert)/Referenzwert\*100] nach KROMIDAS, 2011, <sup>b</sup> mittels ICP-OES nach Mikrowellenaufschluss

Die Nachweisgrenze der Methode wurde mit einer externen Dreipunktkalibration von Dünnschichtstandards und nach der Kalibriergeradenmethode nach DIN 32645 2008 bestimmt. Bei einem Laserspotdurchmesser von 100  $\mu\text{m}$  wurde eine Nachweisgrenze für Blei von  $2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  erreicht. Die Verringerung des Laserspotdurchmessers auf 30  $\mu\text{m}$  resultierte in einer Nachweisgrenze von  $6 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ .

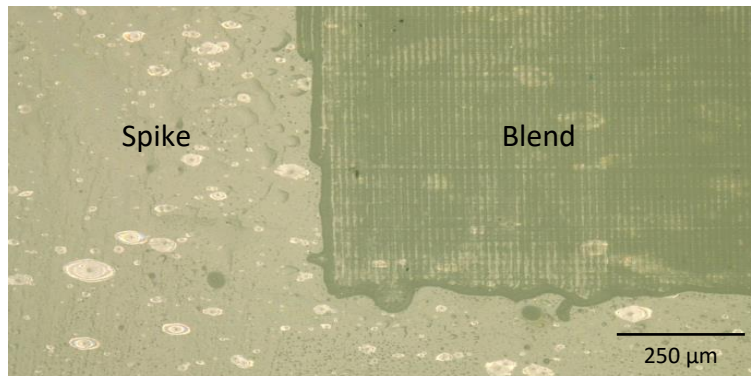
#### 4.4.3 Messung des zertifizierten Referenzmaterials BAM-H010

Die Validierung der Methode der festkörperbasierten Isotopenverdünnungsanalyse wurde am zertifizierten Referenzmaterial BAM-H010 durchgeführt. Die Vorgehensweise bei der Validierung wird in diesem Abschnitt beschrieben.

Bei dem Referenzmaterial BAM-H010 handelt es sich um ein Acrylnitril-Butadien-Styrol Copolymerisat (ABS) mit zertifizierten Massenanteilen von Chrom, Brom, Cadmium und Blei. Der Massenanteil von Quecksilber wurde aufgrund von mangelnder Langzeitstabilität nur als informativer Wert angegeben. Das Referenzmaterial lag als kreisförmige Scheibe mit einem Durchmesser von 40 mm und einer Höhe von 6 mm vor (BAM-H010 A, 2014). Aus dem Referenzmaterial wurden mittels Kryomikrotom (CRYOSTAR™ NX70 CRYOSTAT, Fa. THERMO SCIENTIFIC (Waltham, USA)) 13  $\mu\text{m}$  dicke Dünnschnitte angefertigt. Die Dünnschnitte wurden auf Teilstücke des Schichtsystems 1 aufgebracht (siehe Abb. 4. 17). Dazu wurde ein dünner



Film des strahlenhärtenden, niederviskosen Glanzlacks 4982700002 der Fa. SCHEKOLIN AG (Liechtenstein) auf das Schichtsystem aufgetragen und der Dünnschnitt darauf platziert. Durch die nachfolgende Aushärtung in der hauseigenen Aushärtekammer wurden die Dünnschnitte fixiert und für das Experiment vorbereitet.



**Abb. 4. 17: Aufgebrachter Dünnschnitt des BAM-H010 auf dem Schichtsystem 1 vor dem Laserabtrag.**

Weitere Dünnschnitte wurden in Epoxidharz eingebettet und analog zu dem beschriebenen Vorgehen in Abschnitt 4.3.2 der Schichtdickenbestimmung unterzogen. Dabei wurde eine Schichtdicke von  $13,2 \pm 0,3 \mu\text{m}$  für die Dünnschnitte des BAM-H010 ermittelt.

Die Quantifizierung des Massenanteils vom Blei erfolgte mittels doppelter festkörperbasierter Isotopenverdünnungsanalyse. Dafür wurde Schichtsystem 1 als Spike, der fixierte Dünnschnitt des BAM-H010 auf dem Schichtsystem 1 als Blend und ein weiterer Dünnschnitt des BAM-H010 als Probe verwendet. Analog zu dem Vorgehen in Abschnitt 4.4.2 wurde mithilfe des Blends aus Back-Spike und Spike, des Bulks des Back-Spikes sowie des Schichtsystems 1 der verwendete Spike charakterisiert. Alle sechs Proben wurden in der Ablationskammer platziert und die LA-ICP-MS-Messung unter den in Abschnitt 4.4 angegebenen Parametern durchgeführt. Zusätzlich wurde das Isotop  $^{200}\text{Hg}$  mitgemessen, um die Interferenzkorrektur des von  $^{204}\text{Hg}$  isobar gestörten  $^{204}\text{Pb}$  nach Gl. 19, unter Verwendung der Isotopenhäufigkeiten von  $^{200}\text{Hg}$  (23,6 %) und  $^{204}\text{Hg}$  (6,87 %), zu ermöglichen (CIAAW, 2016).

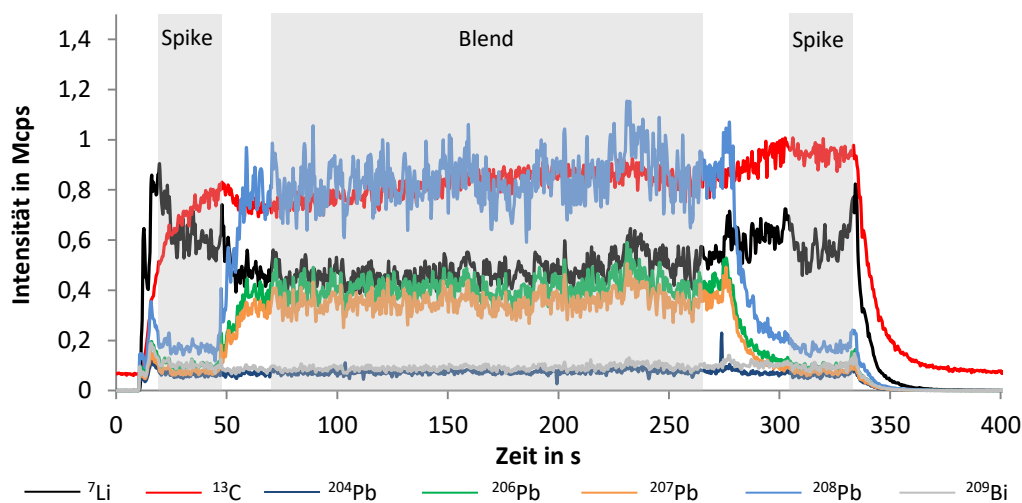
$$I_{\text{korr.}204\text{Pb}} = I_{204\text{Pb}} - \left( \frac{I_{200\text{Hg}}}{a_{200\text{Hg}}} \cdot a_{204\text{Hg}} \right) \quad \text{Gl. 19}$$

Mit  $I$  = gemessene Intensität

$I_{\text{korr.}}$  = korrigierte Intensität

$a$  = Isotopenhäufigkeit

Die Linienmessungen wurden horizontal entgegengesetzt zum Fluss des Trägergases durchgeführt. In Abb. 4. 18 sind die Signalverläufe der untergrundkorrigierten Isotope  $^7\text{Li}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{206}\text{Pb}$ ,  $^{207}\text{Pb}$ ,  $^{208}\text{Pb}$  und  $^{209}\text{Bi}$  sowie das untergrund- und interferenzkorrigierte Signal des  $^{204}\text{Pb}$ -Isotops im Blend aus BAM-H010 und Spike eingezeichnet. Die dargestellte Ablationslinie wurde auf dem Spike gestartet und über den auf dem Spike fixierten Dünnschnitt des BAM-H010 und zurück auf den Spike durchgeführt. Die für die Mass-Bias-Korrektur gemessenen Thalliumisotope  $^{203}\text{Tl}$  und  $^{205}\text{Tl}$  sind aufgrund der besseren Übersichtlichkeit nicht eingezeichnet. In die Signalverläufe sind drei Bereiche eingezeichnet, zum einen die Auswertebereiche vom Blend mit einer Breite von 200 s und zwei Auswertebereiche für den Spike mit einer Breite von 25 s. Die zwei kurzen Auswertebereiche des Spikes dienten lediglich zur Kontrolle, um mögliche Änderungen des Isotopenverhältnisses im verwendeten Spike, durch das Aufbringen und Fixieren des BAM-H010 Dünnschnittes, bei der doppelten Isotopenverdünnung zu erkennen. Die Bestimmung aller Isotopenverhältnisse erfolgte analog zu dem in Abschnitt 4.4.2 beschriebenen Vorgehen mit Auswerteregionen mit einer Breite von 200 s.



**Abb. 4. 18:** Untergrund- und interferenzkorrigierte Signalverläufe von  $^7\text{Li}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{204}\text{Pb}$ ,  $^{206}\text{Pb}$ ,  $^{207}\text{Pb}$ ,  $^{208}\text{Pb}$  und  $^{209}\text{Bi}$  im Blend aus Spike und BAM-H010.

Die Signale der Isotope  $^{206}\text{Pb}$ ,  $^{207}\text{Pb}$  und  $^{208}\text{Pb}$  zeigen wie erwartet einen deutlichen Intensitätsanstieg vom Spike zum Blend hin, da im Blend ein wesentlich höherer Bleigehalt vorliegt. Das Signal von  $^{204}\text{Pb}$  bleibt hingegen auf einem ähnlichen Niveau, welches durch die geringe Häufigkeit von  $\approx 1,4\%$  im BAM-H010 und die relativ hohe Anreicherung im Spike mit ca. 15 % zu erklären ist. Das relativ stabile  $^{209}\text{Bi}$ -Signal deutet auf eine gleichmäßige Ablation der Spikeschicht während der gesamten Messung hin. Die Ungleichmäßigkeit des  $^7\text{Li}$ - und

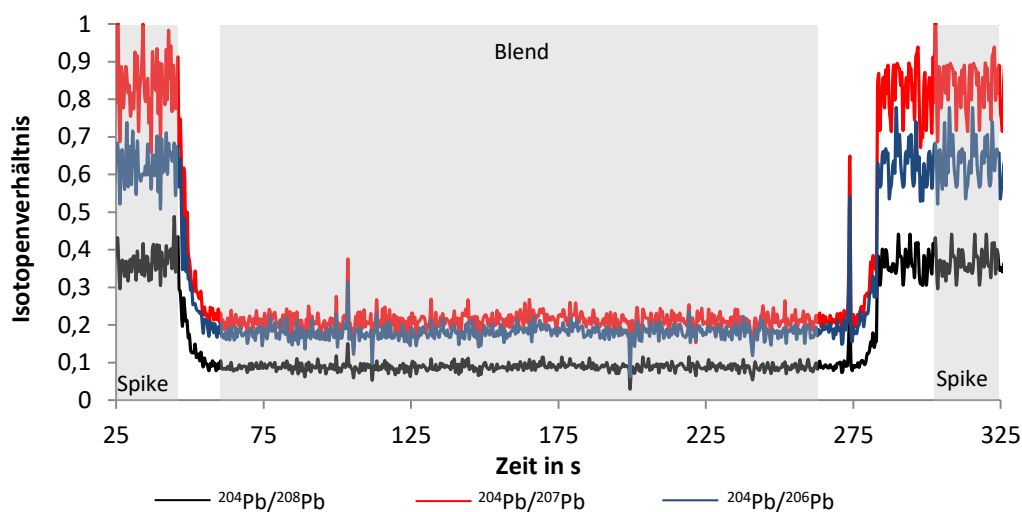
$^{13}\text{C}$ -Signals wurden vermutlich durch Änderungen des Plasmas bei der Ablation der verschiedenen Bereiche ausgelöst, da sich die Probenzusammensetzung zwischen Spike und Blend unterscheidet.

Die untergrundkorrigierten Bleiintensitäten wurden zunächst über  $^{209}\text{Bi}$  normalisiert, der Mass-Bias wurde korrigiert und die Isotopenhäufigkeiten bestimmt (vgl. Tab. 4. 16).

**Tab. 4. 16: Ermittelte Isotopenhäufigkeiten im BAM-H010, Spike und Blend mit Standardfehler ( $\pm$  SE) (n = 20)**

Isotop	Isotopenhäufigkeit in %		
	BAM-H010	Spike	Blend
$^{204}\text{Pb}$	$1,41 \pm 0,01$	$15,46 \pm 0,05$	$4,18 \pm 0,01$
$^{206}\text{Pb}$	$25,16 \pm 0,03$	$24,49 \pm 0,07$	$24,73 \pm 0,04$
$^{207}\text{Pb}$	$21,13 \pm 0,01$	$18,33 \pm 0,05$	$20,53 \pm 0,02$
$^{208}\text{Pb}$	$52,30 \pm 0,07$	$41,72 \pm 0,06$	$50,56 \pm 0,04$

Im Anschluss daran wurden die Bleiisotopenverhältnisse gebildet (siehe Abb. 4. 19). Die drei dargestellten Isotopenverhältnisse zeigen eine deutliche Änderung der gemessenen Isotopenverhältnisse vom Spike zum Blend hin, da sich der Anteil von  $^{204}\text{Pb}$  zu  $^{206}\text{Pb}$ ,  $^{207}\text{Pb}$  und  $^{208}\text{Pb}$  verringert. Im Blend ist ein gleichmäßiger Verlauf der drei dargestellten Isotopenverhältnisse zu verzeichnen, welcher auf eine gleichmäßige Mischung von Spike und BAM-H010 schließen lässt. Die Änderung der Isotopenverhältnisse vom Spike zum Blend hin dauert nur wenige Sekunden, bis das Plateau erreicht ist. Im Gegensatz dazu dauert die Rückkehr der Isotopenverhältnisse vom Blend zum Spike geringfügig länger.



**Abb. 4. 19: Gemessene Bleiisotopenverhältnisse im Spike und Blend bei der doppelten festkörperbasierten Isotopenverdünnungsanalyse des BAM-H010.**

Die ermittelten mittleren und Mass-Bias-korrigierten Isotopenverhältnisse des BAM-H010, Spike und Blends sind in Tab. 4. 17 aufgelistet und wurden für die doppelte Isotopenverdünnungsanalyse zur Bestimmung des Massenanteils von Blei im BAM-H010 verwendet.

**Tab. 4. 17: Ermittelte Mass-Bias-korrigierte Isotopenverhältnisse im BAM-H010, Spike und Blend mit Standardfehler ( $\pm$  SE) (n = 20)**

Isotopenverhältnis	BAM-H010	Spike	Blend
$^{204}\text{Pb}/^{206}\text{Pb}$	0,056 $\pm$ 0,001	0,631 $\pm$ 0,002	0,169 $\pm$ 0,001
$^{204}\text{Pb}/^{207}\text{Pb}$	0,067 $\pm$ 0,001	0,843 $\pm$ 0,003	0,204 $\pm$ 0,001
$^{204}\text{Pb}/^{208}\text{Pb}$	0,027 $\pm$ 0,001	0,371 $\pm$ 0,002	0,083 $\pm$ 0,001

Alle weiteren verwendeten Parameter der festkörperbasierten doppelten Isotopenverdünnungsanalyse von Blei im BAM-H010 sind in Tab. 4. 18 zusammengefasst.

**Tab. 4. 18: Verwendete Parameter für die festkörperbasierte doppelte Isotopenverdünnungsanalyse von Blei im BAM-H010**

Parameter	Isotopenverhältnis		
	$^{204}\text{Pb}/^{206}\text{Pb}$	$^{204}\text{Pb}/^{207}\text{Pb}$	$^{204}\text{Pb}/^{208}\text{Pb}$
$a_{x,b}$	0,252	0,213	0,523
$a_{z,b}$	0,250	0,215	0,521
$h_x$ in $\mu\text{m}$	13,2	13,2	13,2
$h_y$ in $\mu\text{m}$	4,4	4,4	4,4
$h_y$ in $\mu\text{m}$	4,4	4,4	4,4
$h_z$ in $\mu\text{m}$	4,6	4,6	4,6
$M_b^a$ in $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$	205,97444	206,97588	207,97663
$M_x^a$ in $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$	207,2	207,2	207,2
$M_z^a$ in $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$	207,2	207,2	207,2
$R_x$	0,056	0,067	0,027
$R_{xy}$	0,169	0,204	0,083
$R_y$	0,631	0,843	0,371
$R_y$	0,631	0,843	0,370
$R_{zy}$	0,345	0,428	0,181
$R_z$	0,054	0,062	0,025
$\omega_z$ in $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	329	329	329

<sup>a</sup> aus CIAAW, 2016

Nach Gl. 11 wurde der Massenanteil von Blei im Dünnschnitt des BAM-H010 berechnet. Die Ergebnisse der doppelten Isotopenverdünnungsanalyse sind in Tab. 4. 19 dargestellt.

Die Ergebnisse der drei betrachteten Isotopenverhältnisse liegen nahe dem zertifizierten Wert. Die Berechnung der dargestellten Fehler der Isotopenverdünnungsanalyse wird im nachfolgenden Abschnitt 4.4.4 beschrieben. Die Methode der festkörperbasierten

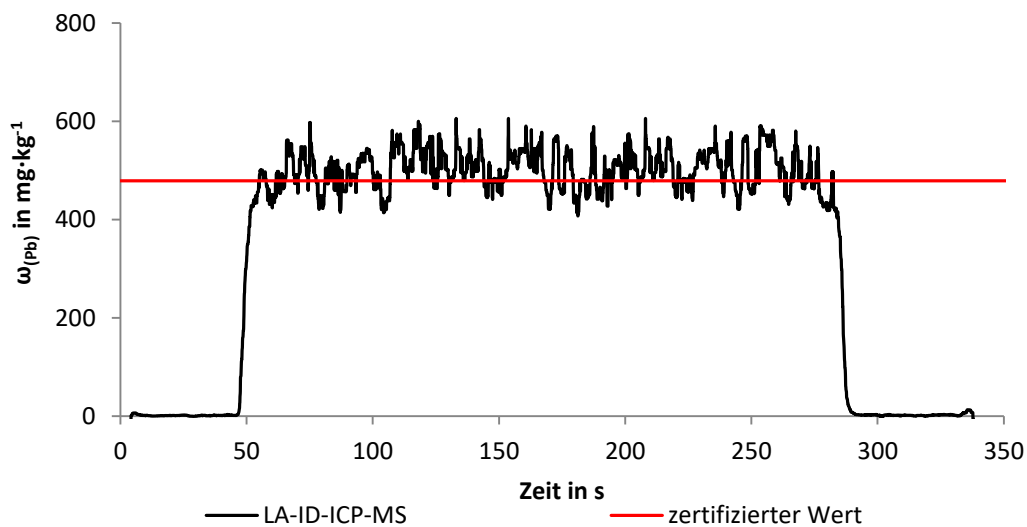
Isotopenverdünnungsanalyse konnte somit erfolgreich die Richtigkeit und Präzision an einem zertifizierten Referenzmaterial unter Beweis stellen.

**Tab. 4. 19: Mittels festkörperbasierter doppelter Isotopenverdünnungsanalyse ermittelter Massenanteil von Blei im BAM-H010**

LA-ICP-IDMS	Massenanteil $\omega_{(Pb)}$ in $mg \cdot kg^{-1}$	Bias <sup>a</sup> in %
<sup>204</sup> Pb/ <sup>206</sup> Pb	473 ± 38	-1,2
<sup>204</sup> Pb/ <sup>207</sup> Pb	476 ± 38	-0,6
<sup>204</sup> Pb/ <sup>208</sup> Pb	487 ± 38	1,7
$\bar{x}$	478 ± 38	-0,2
<b>zertifizierter Wert<sup>b</sup></b>	<b>479 ± 17</b>	

<sup>a</sup> Bias = [(ermittelter Wert – Referenzwert)/Referenzwert\*100] nach KROMIDAS 2011, <sup>b</sup> Zertifikat BAM-H010

In Abb. 4. 20 ist der transiente Verlauf des mittels festkörperbasierter Isotopenverdünnungsanalyse berechneten Massenanteils von Blei im BAM-H010 bei einer Linienablation dargestellt.



**Abb. 4. 20: Transienter Verlauf des Massenanteils von Blei im BAM-H010 bei einer Linienmessung der festkörperbasierten Isotopenverdünnungsanalyse.**

Der zeitaufgelöste Verlauf des Massenanteils von Blei deutet auf Inhomogenitäten bezüglich der Elementverteilung von Blei im BAM-H010 hin. Da die Signalschwankungen im BAM-H010 größer ausfielen als bei den selbstpräparierten Schichten, wurde eine inhomogenere Elementverteilung als Ursache für die Schwankungen des Massenanteils angenommen. Im Mittel wird jedoch der zertifizierte Bleigehalt erreicht. Das Ergebnis bestätigt die grundsätzliche Eignung der Methode für die Erstellung von Elementverteilungsbildern, da bei dieser Anwendung orts aufgelöst für jeden Messpunkt eine Isotopenverdünnungsanalyse

durchgeführt werden muss. Da in diesem Fall das Isotopenverhältnis des Blend nicht aus einem Auswertebereich gemittelt werden kann, wurden die Isotopenverhältnisse geglättet. Dabei wurde der gleitende Mittelwert mit einer Fensterbreite von 0,5 - 1 % der Anzahl der Messpunkte einer Linie zur Glättung verwendet. Diese relativ geringe Fensterbreite wurde als Kompromiss gewählt, um das Rauschen der Isotopenverhältnisse möglichst vollständig zu entfernen und gleichzeitig ortsabhängige Änderungen der Isotopenverhältnisse durch lokale Unterschiede des Massenanteils in der Probe möglichst richtig darzustellen. Sinnvoller wäre die Analyse eines Referenzmaterials mit ortsabhängiger und bekannter Änderung des Massenanteils gewesen, da so festgestellt werden könnte, ob die Schwankungen des Massenanteils aus dem Referenzmaterial oder durch die Methode hervorgerufen werden. Solche Referenzmaterialien sind allerdings nicht erhältlich und daher wurde der Versuch mit dem zur Verfügung stehenden BAM-H010 durchgeführt.

Um ein abweichendes Ablationsverhalten der verwendeten Acrylatlacke und des zertifizierten Referenzmaterials BAM-H010 zu untersuchen, welches in einer unterschiedlichen Partikelgröße und der unter Umständen damit verbundenen unvollständigen Atomisierung und Ionisierung resultiert, wurde ein weiteres Experiment durchgeführt. Dazu wurde je ein Dünnschnitt des BAM-H010, des Spikes und des Back-Spikes sowie die beiden Blends (Spike + BAM-H010 und Spike + Back-Spike) mittels LA-ICP-MS gemessen. Aus den aufsummierten Bleiintensitäten und den bekannten Massenanteilen von Blei wurden die jeweiligen Empfindlichkeiten berechnet. Im Anschluss daran wurde die jeweilige Empfindlichkeit über die zugehörige Schichtdicke normalisiert. Alle untersuchten Proben wiesen eine vergleichbare über die Schichtdicke normalisierte Empfindlichkeit auf, welches auf ein vergleichbares Ablationsverhalten der verschiedenen Proben hindeutet.

#### **4.4.4 Unsicherheitsberechnung**

Dieser Abschnitt befasst sich mit der Unsicherheitsberechnung der festkörperbasierten Isotopenverdünnungsanalyse. Exemplarisch werden die Unsicherheitsberechnungen der einfachen Isotopenverdünnungsanalyse am Isotopenverhältnis  $^{204}\text{Pb}/^{208}\text{Pb}$  für die Erprobung der Methode (siehe Abschnitt 4.4.2) und der doppelten Isotopenverdünnungsanalyse, ebenfalls am Isotopenverhältnis  $^{204}\text{Pb}/^{208}\text{Pb}$ , für die Messung des BAM-H010 (siehe Abschnitt 4.4.3) dargestellt. Die Unsicherheitsberechnungen erfolgten nach der von KRAGTEN, 1994 publizierten Methode und in Anlehnung an EURACHEM/CITAC GUIDE CG 4, 2012.

Zunächst wurden für die Unsicherheitsberechnung die Unsicherheiten der einzelnen Parameter der einfachen und doppelten Isotopenverdünnungsanalyse bestimmt (siehe Gl. 10 und Gl. 11). Als Einzelunsicherheiten wurden die bestimmten Standardfehler der Isotopenhäufigkeiten, Isotopenverhältnisse, Schichtdicken und die Vertrauensbereiche der Massenanteile der ICP-OES-Analyse verwendet. Die Atommassen der Isotope und des Elements wurden aus Datenbanken (CIAAW, 2016) bezogen und ohne Unsicherheiten verwendet. Unter Anwendung der KRAGTEN-Methode wurden der Einfluss jedes Parameters auf die Unsicherheit sowie die erweiterte Unsicherheit der Methode bestimmt. Für die einfache Isotopenverdünnungsanalyse wurde ein k-Faktor von 3 gewählt, da mögliche Änderungen des Massenanteils zwischen den einzelnen präparierten Spikeschichten nicht auffallen würden. Weiterhin hängt die ermittelte Unsicherheit der KRAGTEN-Methode von der Anzahl der eingesetzten Parameter ab. Um den Einfluss zu reduzieren und das Ergebnis der einfachen und doppelten Isotopenverdünnungsanalyse vergleichbar zu machen, wurde ebenfalls der k-Faktor von 3 gewählt. Die doppelte Isotopenverdünnungsanalyse ist hingegen durch die vorgeschaltete Bestimmung des Spikes durch den Back-Spike abgesichert und daher wird in diesem Fall mit einem k-Faktor von 2 gerechnet. Die Ergebnisse der Unsicherheitsberechnung sind für die einfache festkörperbasierte Isotopenverdünnungsanalyse in Tab. 4. 20 dargestellt.

**Tab. 4. 20: Einfluss der Parameter der einfachen Isotopenverdünnungsanalyse auf die Unsicherheit**

<b>Parameter</b>	<b>relative Unsicherheit in %</b>
$M_b$	0
$M_x$	0
$R_x$	4,2
$R_{xy}$	13,5
$R_y$	2,8
$a_{x,b}$	0,5
$h_x$	29,2
$h_y$	33,1
$\omega_{y,b}$	16,6
<b>LA-ICP-IDMS <math>\omega_{(Pb)}</math> in <math>mg \cdot kg^{-1}</math></b>	<b>326</b>
<b>Erweiterte Unsicherheit in <math>mg \cdot kg^{-1}</math></b>	<b>31</b>

Aus den Ergebnissen wird ersichtlich, dass der größte Einfluss auf die Unsicherheit von der Schichtdickenbestimmung herrührt. Die Lichtmikroskopie scheint demnach nicht geeignet zu

sein, um Dünnschichten mit einer Dicke von ca. 4,5  $\mu\text{m}$  ausreichend fehlerfrei auszumessen. Statt der Lichtmikroskopie sollte in Zukunft die Elektronenmikroskopie verwendet werden, da mit dieser Technik die Schichtdicke präziser und mit kleineren Fehlern bestimmt werden kann (THÜRNUAU, 2016). Einen weiteren großen Einfluss zeigt die relative Unsicherheit des Massenanteils des Spikes auf. Durch einen geeigneteren Kalibrationsbereich bei der ICP-OES-Bestimmung oder die Quantifizierung der aufgeschlossenen Bulkproben mittels Isotopenverdünnungsanalyse, könnte die Unsicherheit reduziert werden. Die Bestimmung der Isotopenverhältnisse trägt ebenfalls zur erweiterten Unsicherheit der Methode bei, kann allerdings nur durch die Verwendung eines anderen Typs von Massenspektrometer, wie Flugzeit-, Sektorfeld- oder Multikollektor-Massenspektrometer reduziert werden. Insgesamt wird eine erweiterte Unsicherheit von 9,5 % für die einfache festkörperbasierte Isotopenverdünnungsanalyse von Blei mittels LA-ICP-MS erreicht. Durch Optimierung der Schichtdickenbestimmung und der Bestimmung des Massenanteils des Spikes, könnte die Unsicherheit auf  $\leq 7\%$  reduziert werden. Die Ergebnisse der Unsicherheitsberechnung sind für die doppelte festkörperbasierte Isotopenverdünnungsanalyse in Tab. 4. 21 dargestellt.

**Tab. 4. 21: Einfluss der Parameter der doppelten Isotopenverdünnungsanalyse auf die Unsicherheit**

<b>Parameter</b>	<b>relative Unsicherheit in %</b>
$M_b$	0
$M_x$	0
$M_z$	0
$R_x$	2,7
$R_{xy}$	3,8
$R_y$	6,2
$R_{y'}$	3,8
$R_z$	1,2
$R_{zy'}$	8,5
$a_{x,b}$	0,3
$a_{z,b}$	0,3
$h_x$	3,5
$h_y$	20,3
$h_{y'}$	19,6
$h_z$	18,6
$\omega_z$	11,2
<b>LA-ICP-IDMS in <math>\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}</math></b>	<b>487</b>
<b>Erweiterte Unsicherheit in <math>\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}</math></b>	<b>38</b>



Auch bei der doppelten festkörperbasierten Isotopenverdünnungsanalyse tragen die Unsicherheiten der Schichtdicken ebenfalls maßgeblich zur erweiterten Unsicherheit bei und verdeutlichen nochmals den Optimierungsbedarf bei der Schichtdickenbestimmung. Die relativen Unsicherheiten der Isotopenverhältnismessungen liegen zwischen 1,3 und 6,4 % und sind mittels Quadrupol-Massenspektrometer höchstens geringfügig reduzierbar. Den letzten größeren Beitrag zur Unsicherheit liefert die Quantifizierung des Bleigehalts mittels ICP-OES. Wie bereits oben erwähnt, könnte die erweiterte Unsicherheit der Methode durch die Optimierung der Vorgehensweise bei der Quantifizierung des Back-Spikes noch weiter reduziert werden. Die erweiterte Unsicherheit der Methode der doppelten festkörperbasierten Isotopenverdünnungsanalyse liegt bei  $\approx 8\%$  und könnte im Optimalfall auf  $\leq 5\%$  verringert werden. Die Reduzierung des Laserspotdurchmessers führte zu keinem Anstieg der Unsicherheiten solange die gemessenen Intensitäten deutlich über der Nachweisgrenze lagen. Im Vergleich mit anderen gängigen Quantifizierungsstrategien (vgl. Abschnitt 2.2.1 bis 2.2.8) zeichnet sich die festkörperbasierte Isotopenverdünnungsanalyse durch eine hohe Richtigkeit und geringe Unsicherheit aus.

### 4.5 Anwendungsbeispiel

Um das Potential der festkörperbasierten Isotopenverdünnungsanalyse für quantitative Elementverteilungsbilder unter Beweis zu stellen, wurde die Verteilung und Quantifizierung von Blei in Blättern der *ARABIDOPSIS HALLERI* (Hallersche Schaumkresse) und der *ARABIDOPSIS THALIANA* (Acker-Schmalwand) untersucht. Bei der *ARABIDOPSIS HALLERI* handelt es sich um eine besonders metalltolerante Pflanze, einen sogenannten Hyperakkumulator (RASCIO et al., 2011). Aufgenommene Schwermetalle, wie Blei, Cadmium, Nickel und Zink, werden von diesen Pflanzen vor allem in den Blättern eingelagert und schaden daher den Pflanzen kaum. Diese Pflanzen sind sowohl von wissenschaftlichem als auch von wirtschaftlichem Interesse. Durch Untersuchungen der Verteilung der Schwermetalle kann die Metalltoleranz der Pflanzen genauer geklärt werden. Unter den Begriffen Phytomining (Metalle mithilfe der Pflanzen aus den oberen Erdschichten abbauen) und Phytosanierung (Sanierung von verunreinigten und kontaminierten Böden mithilfe von Pflanzen) wird die wirtschaftliche Bedeutung der Hyperakkumulatoren deutlich (RASCIO ET AL., 2011; SARMA, 2011).

Es wurden Blätter von zwei nahe verwandten Pflanzenarten untersucht. Bei Probe 1 handelte es sich um Blätter der *ARABIDOPSIS HALLERI* und bei Probe 2 um Blätter der *ARABIDOPSIS*

THALIANA. Die ARABIDOPSIS HALLERI wuchs auf Schwermetall belastetem Boden einer ehemaligen Blei- und Zinkmine nahe Littfeld (Deutschland). Die Blätter der ARABIDOPSIS THALIANA wurden von einem nahegelegenen, jedoch unbelasteten Areal entnommen. Beide Proben wurden – wie in Abschnitt 4.4.3 beschrieben – auf dem Schichtsystem 1 für die Isotopenverdünnung fixiert und mittels LA-ICP-MS untersucht und ausgewertet. Die Schichtdicke der Blätter und die Kratertiefe des Lasers wurden im Anschluss an die Ablation nach dem Verfahren in Abschnitt 4.3.2 durchgeführt. Die Proben wurden freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Ute Krämer des Lehrstuhls für Pflanzenphysiologie an der Ruhr-Universität Bochum zur Verfügung gestellt.

Für die Messung der Elementverteilungsbilder wurde ebenfalls ein ns-Lasersystem (UP-213-2078, Fa. NEW WAVE RESEARCH INC., Fremont, USA) sowie ein Quadrupol-Massenspektrometer (XSERIE 2, Fa. THERMO FISHER SCIENTIFIC GMBH, Bremen) verwendet. Als Ablationszelle diente wiederum die hauseigene Kammer aus der Arbeit von LEHMANN, 2011. Die Ablation der Proben erfolgte durch Linienscans mit einer Scangeschwindigkeit von  $5 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ , einer Länge von  $4.000 \mu\text{m}$ , einem Abstand zwischen den einzelnen Linien von  $70 \mu\text{m}$ . Es wurde ein Laserspotdurchmesser von  $60 \mu\text{m}$  eingestellt um die Ortsauflösung zu erhöhen. Der Laser wurde auf die Probenoberfläche fokussiert. Die Schussfrequenz des gepulsten Lasers betrug  $20 \text{ Hz}$  bei einer Laserfluenz von ca.  $3,2 \text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$ . Das ablatierte Probenmaterial wurde mittels Heliumgasstrom ( $1,16 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ ) zum Massenspektrometer transportiert. Die Einstellung der Laserparameter erfolgte ebenfalls in Anlehnung an THIELEKE, 2013. Gemessen wurden die Isotope  ${}^7\text{Li}$ ,  ${}^{13}\text{C}$ ,  ${}^{42}\text{Ca}$ ,  ${}^{64}\text{Zn}$ ,  ${}^{203}\text{Tl}$ ,  ${}^{205}\text{Tl}$ ,  ${}^{204}\text{Pb}$ ,  ${}^{206}\text{Pb}$ ,  ${}^{207}\text{Pb}$ ,  ${}^{208}\text{Pb}$  und  ${}^{209}\text{Bi}$  mit einer Dwellzeit von  $20 \text{ ms}$ . Durch die konstante Einleitung von  $0,17 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  des NIST SRM 997 ( $\omega_{(\text{Tl})} \approx 25 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) in verdünnter Salpetersäure (2,5 Gew.-%, *subboiled*) wurde das Plasma angefeuchtet. Das Thallium wurde für die Korrektur des Mass-Bias verwendet. Die weiteren eingestellten Parameter des ICP-MS sind in Tab. 8. 3 aufgelistet. Die Auswertung der gemessenen Intensitäten umfasste die Untergrundkorrektur, die Normalisierung über  ${}^{209}\text{Bi}$  und die Korrektur des Mass-Bias. Die Isotopenverhältnisse wurden mittels gleitenden Mittelwerts mit einer Fensterbreite von 0,5 % der Anzahl der Messpunkte einer Linie zur Glättung verwendet. Die Auswertung und Erzeugung der Elementverteilungsbilder wurden mit der Software ORIGIN 9.1 der Fa. ORIGINLAB (Northampton, USA) durchgeführt.

Abb. 4. 21 zeigt die Bleiverteilung im untersuchten Blattabschnitt der ARABIDOPSIS HALLERI. Es wird eine sehr hohe Anreicherung des Bleis in den Blattadern und dem Rand des Blattes deutlich. Aber auch im gesamten Blatt liegt Blei mit einem erhöhten Massenanteil vor. Neben der Hauptader sind auch die Sekundärädern mit einem erhöhten Bleigehalt sichtbar. Ein Vergleich des Bleimappings und der Übersichtsaufnahme des Blattes zeigt den Detailgrad der LA-ICP-IDMS. Diese Ergebnisse zeigen die Eignung der festkörperbasierten Isotopenverdünnungsanalyse für orts aufgelöste Untersuchungen und Elementverteilungsbilder. Neben der Bleiverteilung wurde auch die Verteilung von Zink als essentielles Spurenelement und Calcium als Mineralstoff in beiden Pflanzen untersucht, um mögliche Korrelationen der beiden Elemente mit Blei zu untersuchen.

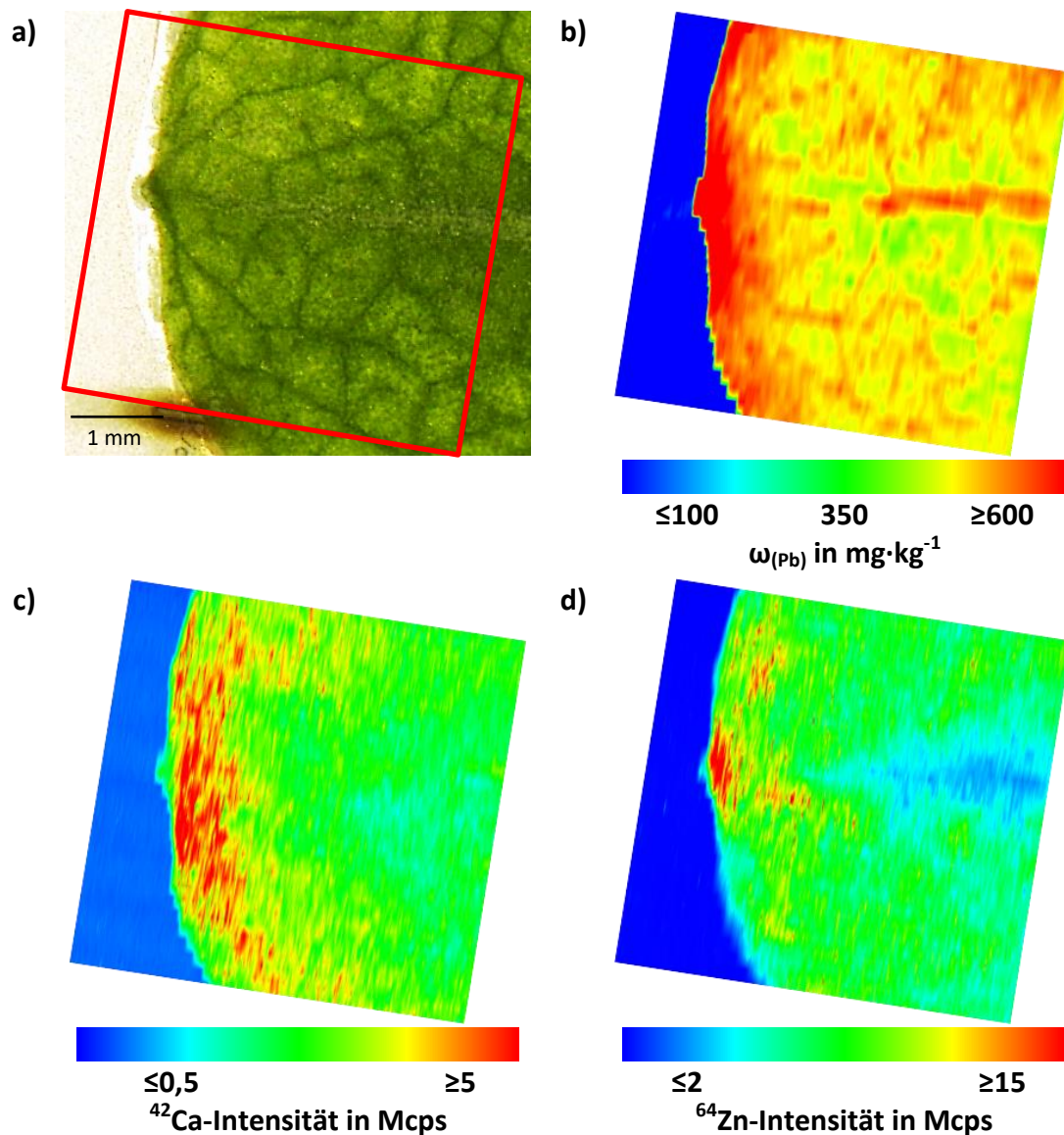
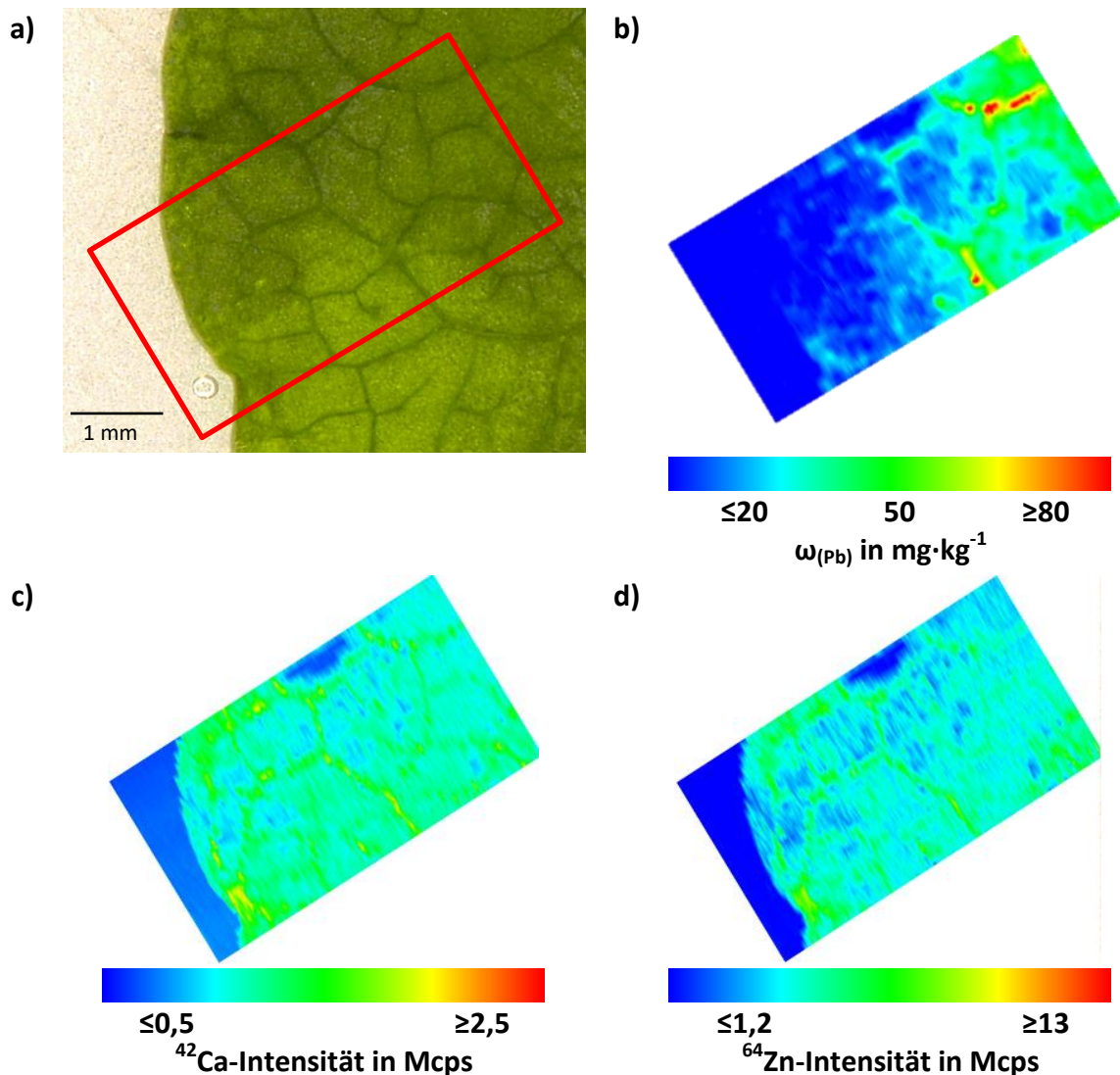


Abb. 4. 21: Elementverteilung im Blatt der ARABIDOPSIS HALLERI; Übersichtsaufnahme mittels Digitalmikroskop(a), quantifizierte Bleiverteilung (b), qualitative Calciumverteilung (c) und qualitative Zinkverteilung (d).

In Abb. 4. 22 ist die Bleiverteilung in den Blättern der ARABIDOPSIS THALIANA dargestellt.



**Abb. 4. 22: Elementverteilung im Blatt der ARABIDOPSIS THALIANA; Übersichtsaufnahme mittels Digitalmikroskop (a), quantifizierte Bleiverteilung (b), qualitative Calciumverteilung (c) und qualitative Zinkverteilung (d).**

In der ARABIDOPSIS THALIANA wird Blei in einem geringeren Massenanteil eingelagert, der Anteil an Blei liegt um den Faktor 5-8 niedriger als in Abb. 4. 21. Auch in den Blättern dieser Pflanze liegt der höchste Massenanteil des Bleis in den Adern vor. In der ARABIDOPSIS HALLERI sind sowohl Calcium als auch Zink über das ganze Blatt verteilt. In der Hauptader weisen sowohl Calcium als auch Zink geringere Intensitäten auf als im Rest des Blattes. In der ARABIDOPSIS THALIANA liegen Calcium und Zink mit den höchsten Intensitäten in den Blattadern vor. Möglicherweise werden durch die hohe Bleikonzentration in der ARABIDOPSIS HALLERI Bindungsplätze blockiert, sodass Calcium sowie Zink nicht mehr in den Blattadern, sondern im ganzen Blatt vorliegen. Auffällig sind auch die niedrigeren gemessenen Intensitäten in der ARABIDOPSIS THALIANA für Calcium und Zink, welche auf eine niedrigere Konzentration im Blatt

hindeuten. *ARABIDOPSIS HALLERI* und *ARABIDOPSIS THALIANA* sind in unterschiedlichen Regionen gewachsen. Die *ARABIDOPSIS HALLERI* ist in einer stark kontaminierten und die *ARABIDOPSIS THALIANA* in einer nicht kontaminierten Region gewachsen. Neben einer unterschiedlich starken Bleikontamination waren die Böden auch unterschiedlich stark mit Zink belastet.

Aus der überlagerten Darstellung der mithilfe von LA-ICP-IDMS ermittelten Bleiverteilung und der Übersichtsaufnahme der untersuchten Blätter in Abb. 4. 23 wird der Detailgrad der Elementverteilungsbilder deutlich. Die Struktur des Blattes mit den einzelnen Adern ist auch in den Elementverteilungsbildern nachvollziehbar. Damit stellt die festkörperbasierte Isotopenverdünnungsanalyse auch die Eignung für die Erstellung von quantitativen Elementverteilungsbildern unter Beweis. Eine Ergänzung der Isotopenverdünnung durch externe Kalibration mit Dünnschichtstandards könnte das Analytspektrum der Methode zusätzlich erweitern. Auf diese Art könnten mehrere Analyten quantifiziert werden und nicht nur qualitative Korrelationen untersucht werden. Durch die Ergänzung mittels externer Kalibration könnten auch anisotope Elemente quantifiziert werden. Auch die Isotopenverdünnung mehrerer Elemente wäre denkbar, allerdings müsste die Datenaufnahme jedes Isotops erhöht werden. Grundsätzlich wäre dies mit einem Flugzeit-Massenspektrometer möglich.

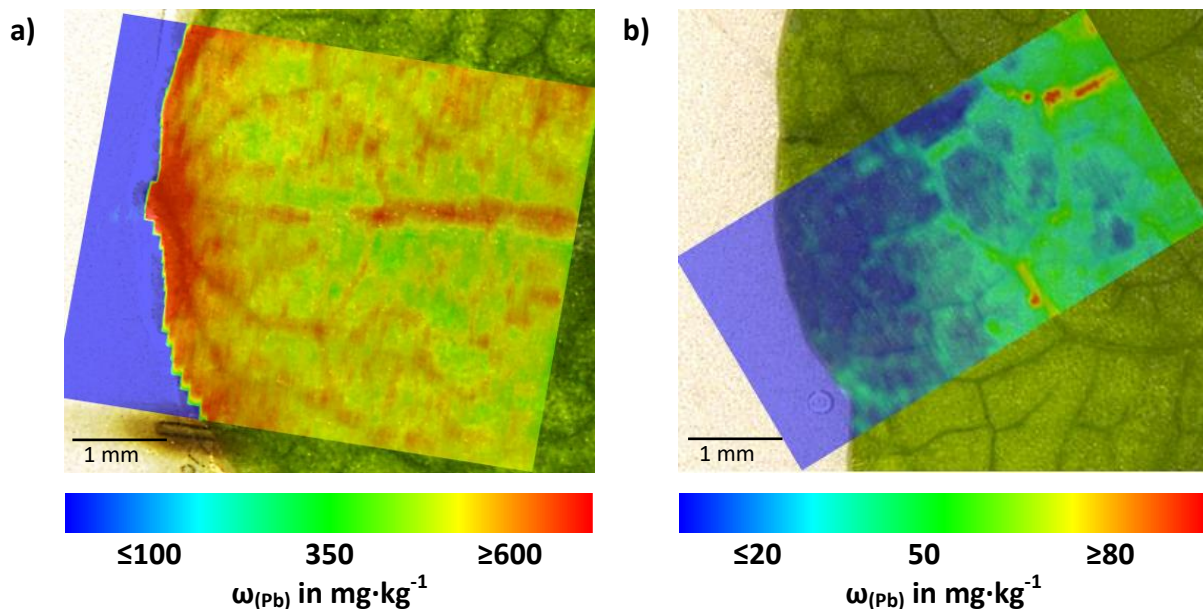


Abb. 4. 23: Überlagerte Darstellung aus der ermittelten Bleiverteilung und der Übersichtsaufnahme der Blätter der *ARABIDOPSIS HALLERI* (a) und *ARABIDOPSIS THALIANA* (b).



# 5

---

## **Festkörperbasierte Isotopenverdünnungsanalyse von Silber**

---

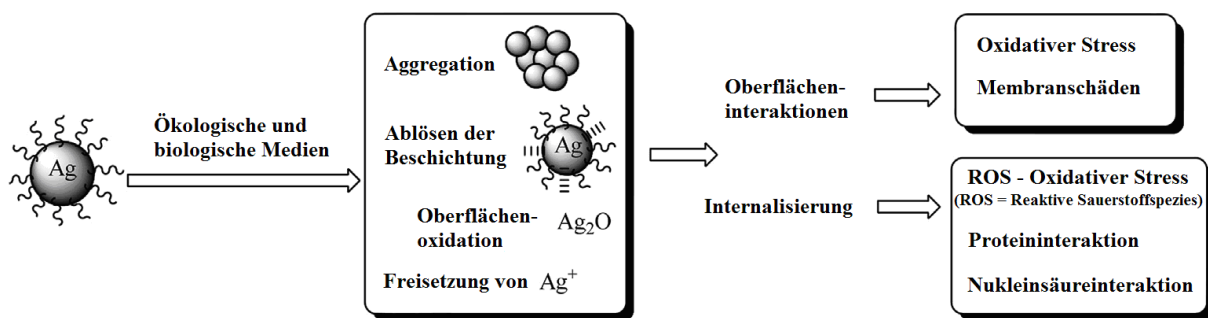
## 5.1 Einleitung

In diesem Kapitel wird die festkörperbasierte Isotopenverdünnungsanalyse von Silber umfangreich behandelt. Dabei wird in den folgenden Abschnitten auf die Präparation, Charakterisierung und Validierung der Methode eingegangen sowie ein Beispiel zur Anwendung der festkörperbasierten Isotopenverdünnungsanalyse von Silber in Gewebeproben aufgezeigt. Da ein Schwerpunkt dieser Arbeit in der Entwicklung und Validierung der festkörperbasierten Isotopenverdünnungsanalyse lag, wird nur kurz auf das Anwendungsbeispiel eingegangen.

Silber und Silbernanopartikel sind aufgrund der antimikrobiellen Wirkung heutzutage verstärkt in den Fokus medizinnaher und weiterer Industriezweige gerückt. Durch den vermehrten Einsatz von Silber und Silbernanopartikel in zahlreichen Anwendungen, wie in Wundauflagen, Beschichtungen von Implantaten und Prothesen, Arzneimitteln und Kosmetika oder zur Dotierung von Kunststoffen in Anwendungsbereichen der Medizintechnik sowie in Textilien oder zur Beschichtung der Oberflächen von Gebrauchsgegenständen, kommt es zu einer erhöhten Freisetzung und möglichen Aufnahme in biologische Organismen. Bereits seit etwa 3000 Jahren ist der antiseptische Charakter von Silber bekannt (LANDAU, 2006). Im Laufe des 19. Jahrhunderts wurden freigesetzte Silberionen aus elementarem Silber oder Silbersalzen zur Behandlung von Brandverletzungen und zur Desinfektion von medizinischem Material eingesetzt (LANDAU, 2006; ABENDROTH, 2013). Auch abseits der medizinischen Verwendung wurde Silber bereits eingesetzt, um die Haltbarkeit von Wasser und Lebensmitteln zu erhöhen (LANDAU, 2006). Mit der Einführung des Antibiotikums verschwand Silber als antimikrobieller Zusatz zunächst aus dem Fokus der Wissenschaft. Erst seit einigen Jahren wird Silber wieder vermehrt im wissenschaftlichen Bereich betrachtet und zur Bekämpfung von multiresistenten Keimen eingesetzt (LANDAU, 2006). Dabei kann zwischen zwei verschiedenen Wirkmechanismen im Hinblick auf die Mikroorganismen je nach Silberionenkonzentration unterschieden werden. Die bakteriostatische Wirkung, also die wachstumshemmende Wirkung durch physikalische Adsorption der Ionen an der Zellwand bzw. Zellmembran der Mikroorganismen, tritt bei niedriger Ionenkonzentration auf. Im Gegensatz dazu tritt bei einer höheren Silberionenkonzentration die bakterizide Wirkung auf. Durch das Eindringen der Silberionen in die Zelle werden strukturelle und funktionelle Proteine blockiert. Weiterhin treten Wechselwirkungen mit Nukleinsäuren auf, welche sich auf die Replikationsfähigkeit



auswirken und zum Absterben der Mikroorganismen führen (LANDAU, 2006). Die Wirkungsweise von Silbernanopartikeln beruht ebenfalls auf der Wirkungsweise der Silberionen und ist in Abb. 5. 1 zusammengefasst. Die Erzeugung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) führt unter anderem in der Zelle zu DNA-Schäden sowie zur Bindung und Inaktivierung von Proteinen, und sie ist einer der wichtigsten Mechanismen, auf dem die Toxizität von Silber beruht (McSHAN ET AL., 2004). Silber in elementarer Form weist im Gegensatz zu Silberionen keine antimikrobielle Wirkung auf (OVINGTON, 2004; LANDAU, 2006), d. h., dass in allen oben beschriebenen Anwendungen die Freisetzung von Silberionen stattfinden soll.



**Abb. 5. 1: Schematische Darstellung der Toxizität von Silbernanopartikeln aus RINNE 2014 nach McSHAN ET AL., 2004.**

Im Allgemeinen gelten für den menschlichen Organismus Silberverbindungen als weit weniger toxisch als andere Schwermetalle, da Silber in schwerlösliche Silberverbindungen umgewandelt wird und daher kaum im Magen-Darm-Trakt resorbiert wird. Auch die durch eine langfristige und übermäßige Aufnahme von Silber hervorgerufene Argyrie, bei der es zu einer grau-bläulichen Hautverfärbung kommt, stellt kein Gesundheitsrisiko dar. Nur die Ablagerung von Silber im Auge ist als kritisch zu bewerten, da es eine Störung der Hell-Dunkel-Adaption hervorrufen kann (LE OUAY ET AL., 2015).

Im Gegensatz zum relativ unbedenklichen Einsatz von Silber, bezogen auf die direkte Toxizität für Organismen, wird der vermehrte und vor allem breite Einsatz von Silbernanopartikeln in verschiedensten Bereichen kritisch betrachtet. Zu den Hauptkritikpunkten zählt dabei die potenzielle Anreicherung der antibakteriell wirkenden Silbernanopartikel in der Umwelt, welche z. B. die Landwirtschaft beeinträchtigen könnte, da auch effektive Mikroorganismen abgetötet werden. Weiterhin wird durch den Nachweis von Silbernanopartikeln in Mitochondrien und Nuklei menschlicher Fibroblasten bei einem in-vivo-Versuch nach Verabreichung von verschiedenen Dosen an Silbernanopartikeln ein

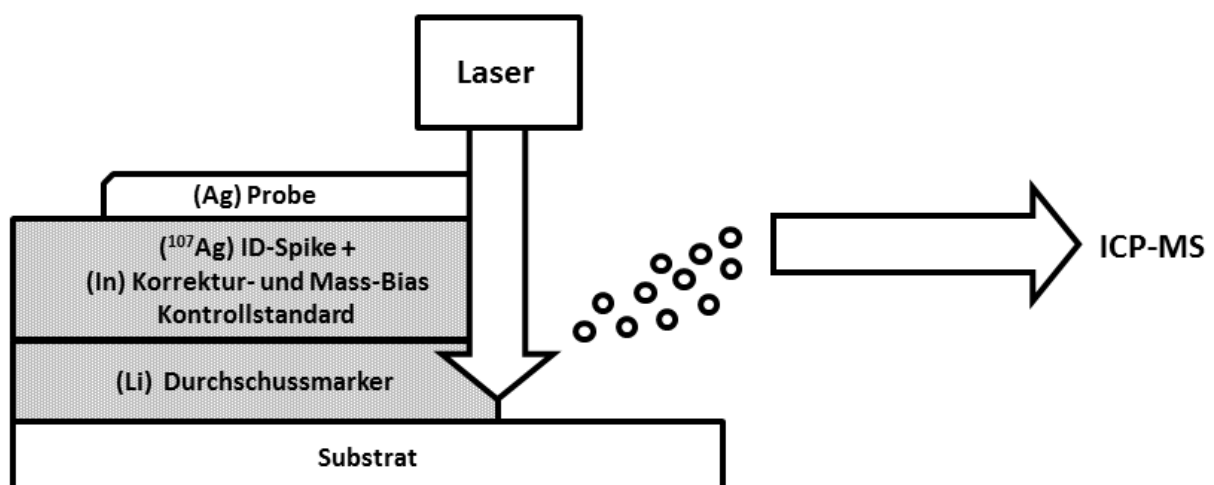
Zusammenhang zwischen der Anreicherung von Silbernanopartikeln und der Schädigung von Mitochondrien und DNA vermutet (ASHARANI ET AL., 2009).

Begründet in dem derzeitigen hohen wissenschaftlichen Interesse für die Lokalisierung und Quantifizierung von Silber in elementarer, ionischer oder partikulärer Form in biologischen Proben wurde Silber als Analyt für diesen Teil der Arbeit gewählt.

Silber besitzt die natürlichen Isotope  $^{107}\text{Ag}$  mit einer Häufigkeit von  $\approx 51,8\%$  und  $^{109}\text{Ag}$  mit  $\approx 47,2\%$ . Bei der ICP-MS treten vornehmlich Molekülinterferenzen aus Zirkon und Sauerstoff bzw. Zirkon-, Sauerstoff- und Wasserstoff-Addukten ( $^{91}\text{Zr}^{16}\text{O}^+$  und  $^{92}\text{Zr}^{16}\text{OH}^+$ ) für die beiden Silberisotope auf (MAY ET AL., 1998). Da Zirkon weder in den polymeren Modellsystemen noch in den biologischen Proben für die Anwendungsbeispiele in einem nachweisbaren Gehalt vermutet wurde, konnte auf den Einsatz der Kollisionszelle zur Verringerung der Molekülinterferenzen verzichtet werden. Dadurch ließen sich auch die leichten Isotope  $^7\text{Li}$  und  $^{13}\text{C}$  messen.

Nachdem die Methode der festkörperbasierten Isotopenverdünnungsanalyse in Kapitel 4 ihr Potential für die Quantifizierung von Blei mit hoher Richtigkeit und geringer Unsicherheit unter Beweis stellen konnte, wird in diesem Kapitel die Methode an einem weiteren Element getestet.

In Abb. 5. 2 ist die schematische Darstellung der festkörperbasierten Isotopenverdünnungsanalyse von Silber abgebildet.



**Abb. 5. 2:** Schematische Darstellung der festkörperbasierten Isotopenverdünnungsanalyse von Silber mit integrierter, ebenfalls festkörperbasierter Mass-Bias-Korrektur mittels LA-ICP-MS.

Analog zu dem Vorgehen der festkörperbasierten Isotopenverdünnungsanalyse von Blei in Abschnitt 4.1 wurde Lithium als Durchschussmarker gewählt, da dieses relativ leichte Element keine Interferenzen bei den Silberisotopen hervorruft. Außerdem hat sich Lithium in den Arbeiten von SCHWARTZE, 2013 und DREYER, 2016 für die Präparation von Schichten mit homogener Elementverteilung bewährt.

Als Korrekturstandard standen Cadmium und Indium zur Auswahl, weil die beiden Elemente über Isotope mit einer ähnlichen Masse und einer adäquaten Isotopenhäufigkeit verfügen wie die zu analysierenden Silberisotope und damit grundsätzlich eins der geforderten Kriterien für einen idealen internen Standard erfüllen (VANHAECKE ET AL., 1992; FINLEY-JONES ET AL., 2008; FRICK ET AL., 2012). Bezüglich der ersten Ionisierungsenergie scheinen weder Indium mit  $558,3 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  noch Cadmium mit  $867,8 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  für Silber ( $731 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) geeignet zu sein. Beide Elemente waren kommerziell als Ölstandards erhältlich und konnten somit relativ leicht in die Polymermatrix eingebracht werden. Letztendlich wurde das Element Indium als Korrekturstandard gewählt, weil in der Arbeit von BODE 2016, trotz einer ähnlichen Masse, ein abweichendes Verhalten von Cadmium und Silber bei der LA-ICP-MS festgestellt wurde. Cadmium zeigte im Vergleich zu Silber bei der Ablation eine kontinuierliche Verringerung der gemessenen Intensität, was auf eine unterschiedliche Ausprägung der Fraktionierungseffekte von Cadmium und Silber hin deutet. In derselben Arbeit wurde ebenfalls das Verhalten von Silber und Indium bei der LA-ICP-MS verglichen. Als Ergebnis konnte die wesentlich bessere Eignung von Indium im Vergleich zu Cadmium für die Normalisierung von Silber festgestellt werden (BODE, 2016). Indium diente in dieser Arbeit nicht nur als Korrekturstandard, sondern wurde auch für die Mass-Bias-Korrektur bei der Isotopenverdünnungsanalyse von Silber eingesetzt. Da kein Referenzmaterial mit einem zertifizierten Isotopenverhältnis von Indium zur Verfügung stand, wurde zunächst das Isotopenverhältnis von  $^{115}\text{In}/^{113}\text{In}$  hausintern zertifiziert. Dazu wurde das Referenzmaterial NIST SRM 978a mit einem zertifizierten Isotopenverhältnis von Silber verwendet. Für Indium treten bei der ICP-MS isobare Interferenzen von  $^{113}\text{Cd}$  und  $^{115}\text{Sn}$  sowie Molekülinterferenzen von  $^{96}\text{Ru}^{17}\text{O}^+$  auf (MAY ET AL., 1998). Da weder Cadmium oder Zinn noch Ruthenium in dem Modellsystem und den Proben, welche für das Anwendungsbeispiel verwendet wurden, zu erwarten waren, wurden diese Interferenzen bei der Auswertung nicht berücksichtigt.

## 5.2 Präparation der Schichtsysteme

In diesem Teilabschnitt wird die Präparation der Schichtsysteme für die festkörperbasierte Isotopenverdünnungsanalyse von Silber beschrieben. Dazu werden in den folgenden Abschnitten die Isotopenanreicherung des verwendeten und kommerziell erwerblichen Silber-Ölstandards sowie das Ansetzen und die Applikation der Lackmischung mittels Rakeltechnik erläutert.

### 5.2.1 Isotopenanreicherung des Einzelelementstandards auf Ölbasis

Da ebenfalls keine isotopenangereicherten Silberstandards auf Ölbasis kommerziell erhältlich waren, wurde das in Abschnitt 4.2.1 beschriebene Verfahren modifiziert und angewendet.

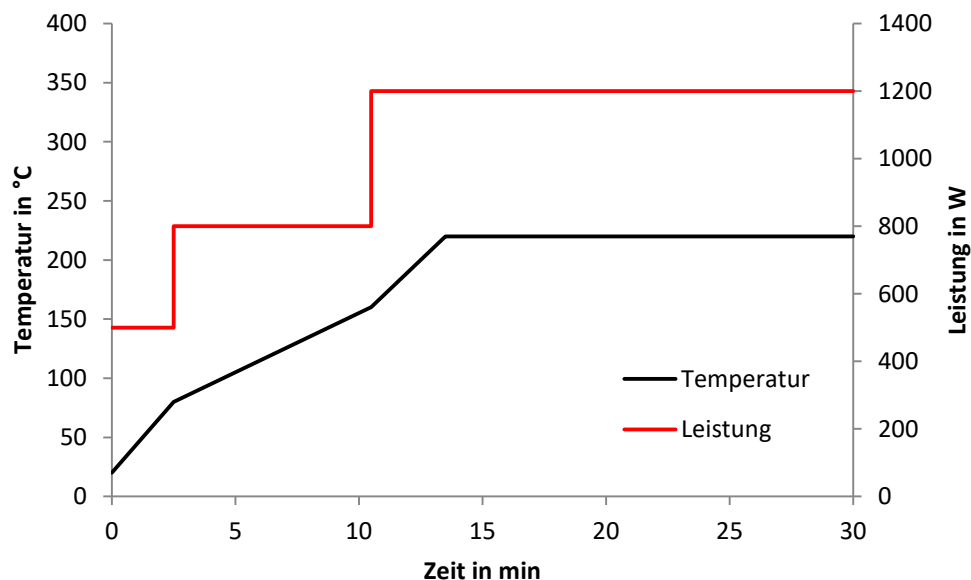
Für die Isotopenanreicherung in dem Silberstandard auf Ölbasis wurde isotopenangereichertes elementares Silber mit einer Anreicherung von 99,12 At.-% für das  $^{107}\text{Ag}$  Isotop der Fa. EURISO-TOP GMBH (Saarbrücken) verwendet (siehe Abb. 5. 3). 100 mg des angereicherten Metalls wurden mit 4 mL halbkonzentrierter Salpetersäure ( $\approx 32,5$  Gew.-%, *subboiled*) und 1 mL Wasserstoffperoxid (30 Gew.-%, p. a.) mittels Mikrowellendruckaufschluss am Gerät TURBOWAVE der Fa. MLS GMBH (Leutkirch) aufgeschlossen. Als Aufschlussbehälter diente ein 15 mL-PTFE-Gefäß der Fa. MLS GMBH (Leutkirch). Das ebenfalls modifizierte Aufschlussprogramm für elementares Silber ist in Abb. 5. 4 dargestellt.



**Abb. 5. 3: Isotopenangereichertes elementares Silber (99,12 At.-%  $^{107}\text{Ag}$ ).**

Die Aufschlusslösung wurde in ein gereinigtes 30 mL-HDPE-Gefäß überführt und der Aufschlussbehälter dreimal mit 7 mL Reinstwasser ( $\sigma = 0,054 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) gespült und ebenfalls

in das Auffanggefäß aufgenommen. Im Anschluss daran wurde die verdünnte Aufschlusslösung bei 85 °C im Trockenschrank über mehrere Tage vollständig eingedampft. Die zurückgebliebenen, leicht löslichen Silbernitrat-salze wurden in 5 mL Reinstwasser gelöst und mit 4,9 g des kommerziell erwerblichen Silber-Ölstandards ( $\omega_{(Ag)} = 5.000 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) und 0,1 g des Stabilisators für metall-organische Ölstandards der Fa. SPETEC GMBH (Erding) versetzt. Die Mischung wurde in ein 20 mL-Dispergiergefäße DT-20 überführt und mittels ULTRA-TURRAX® TUBE DRIVE CONTROL der Fa. IKA-WERKE GMBH & CO. KG (Staufen) 30 min bei einer Drehzahl von  $4.000 \text{ min}^{-1}$  gemischt. Diese Prozedur wurde fünfmal innerhalb von 48 Stunden wiederholt, um die Einstellung von Gleichgewichtsbedingungen beim Isotopenaustausch zwischen Silber-Ölstandard und isotonenangereichertem Silber zu garantieren und einen möglichst hohen Anreicherungsgrad zu erreichen.



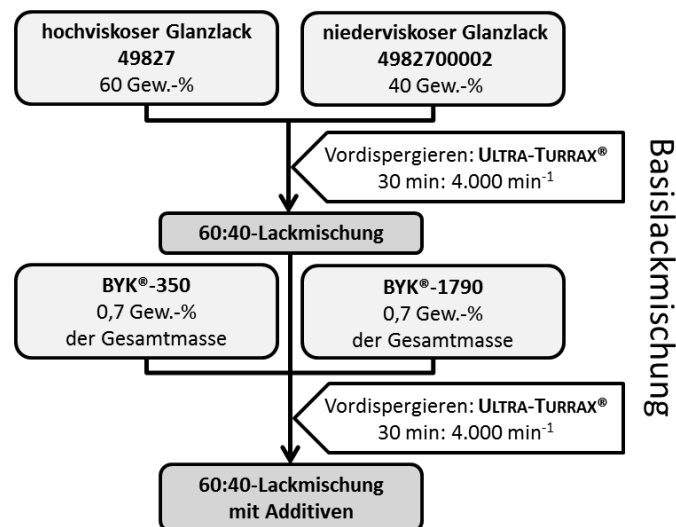
**Abb. 5. 4: Programm für den Mikrowellendruckaufschluss des isotonenangereicherten elementaren Silbers.**

Nach dem Anreicherungs-schritt wurde die Mischung zur Abtrennung der Öl-Phase von der wässrigen Phase sowie möglicher Feststoffe mittels Tischzentrifuge der Fa. THERMO SCIENTIFIC (Waltham, USA) bei  $5.300 \text{ min}^{-1}$  für 30 min zentrifugiert und die Öl-Phase für die Anfertigung der Lackmischungen abgenommen.

### 5.2.2 Anfertigung der Lackmischungen

Das Ansetzen der Lackmischungen erfolgte nach einer Modifikation des in Abschnitt 4.2.2 beschriebenen Verfahrens. Die Grundlage dieser Modifikation bildeten ebenfalls die Methoden von SCHWARTZE, 2013, THIELEKE, 2013 und DREYER, 2016.

Als erstes wurde die Basislackmischung hergestellt (siehe Abb. 5. 5). Die Grundlage hierfür lieferte eine Mischung aus 60 Gew.-% hochviskosem Glanzlack 49827 und 40 Gew.-% niederviskosem Glanzlack 4982700002 der Fa. SCHEKOLIN AG (Liechtenstein). Diese Grundlackmischung wurde in 50 mL-Dispergiergefäße DT-50 überführt und mittels ULTRA-TURRAX® TUBE DRIVE CONTROL der Fa. IKA-WERKE GMBH & Co. KG (Staufen) 30 min bei einer Drehzahl von  $4.000 \text{ min}^{-1}$  vorgemischt. Zur Verbesserung der Eigenschaften und des Verhaltens bei der Dispergierung sowie des Aushärtevorgangs wurden der Vormischung 0,7 Gew.-%, bezogen auf die Gesamtformulierung des Entschäumers BYK®-1790 und des Oberflächenadditivs BYK®UV-3570 der Fa. BYK-GARDNER GMBH (Geretsried), zugegeben. Die so erhaltene Basislackmischung wurde erneut 30 min bei einer Drehzahl von  $4.000 \text{ min}^{-1}$  dispergiert.

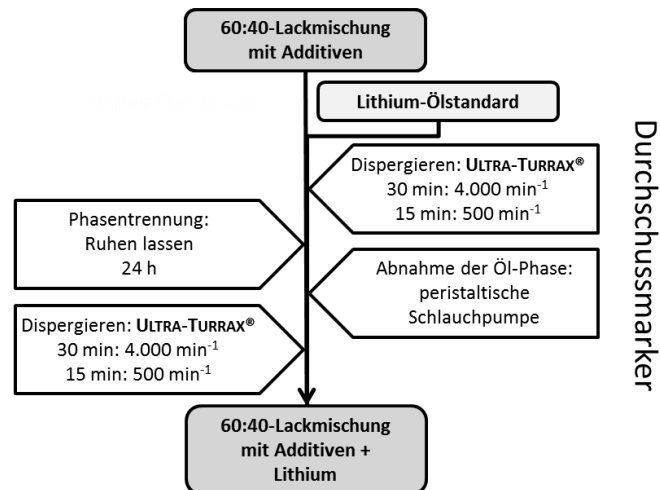


**Abb. 5. 5: Präparationsschema für den Ansatz der Basislackmischung.**

Analog zu dem Vorgehen in Abschnitt 4.2.2 wurden insgesamt drei Chargen der Basislackmischung hergestellt und als Grundlage für die Präparation der einzelnen Schichten (Durchschussmarker, Spike- und Probeschicht) verwendet.

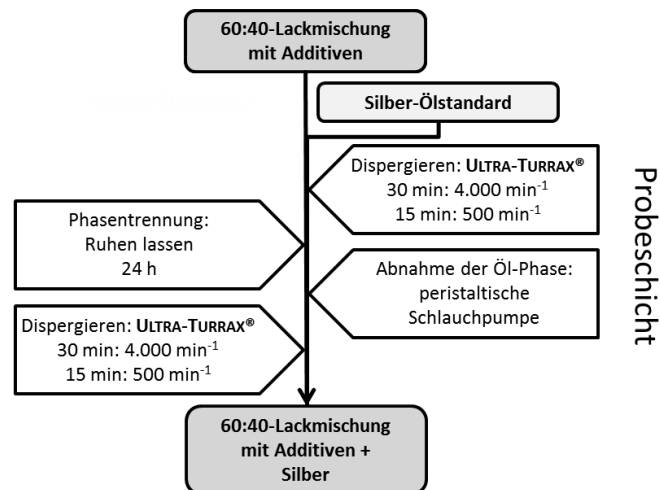
Die Charge 1 wurde für die Präparation des Durchschussmarkers verwendet. Dazu wurde zu der Basislackmischung der Lithium-Ölstandard ( $\omega_{(Li)} = 5.000 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , Fa. SPETEC GMBH, Erding) hinzugegeben, sodass ein Massenanteil von  $\approx 500 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  Lithium in der Lackmischung vorlag (siehe Abb. 5. 6). Die so erhaltene Lackmischung des Durchschussmarkers wurde erneut 30 min bei einer Drehzahl von  $4.000 \text{ min}^{-1}$  und im Anschluss daran noch einmal 15 min bei einer Drehzahl von  $500 \text{ min}^{-1}$  zur Reduzierung der Schaumbildung mit dem ULTRA-

TURRAX® dispergiert. Danach wurde die dispergierte Lackmischung für 24 Stunden ruhen gelassen, um die Phasentrennung zwischen der Polymer- und Öl-Phase zu ermöglichen. Die Öl-Phase wurde mittels peristaltischer Schlauchpumpe abgenommen und im Anschluss daran wurde die ölfreie Lackmischung erneut nach den oben genannten Parametern dispergiert.



**Abb. 5. 6: Präparationsverfahren der Lackmischung für den Durchschussmarker.**

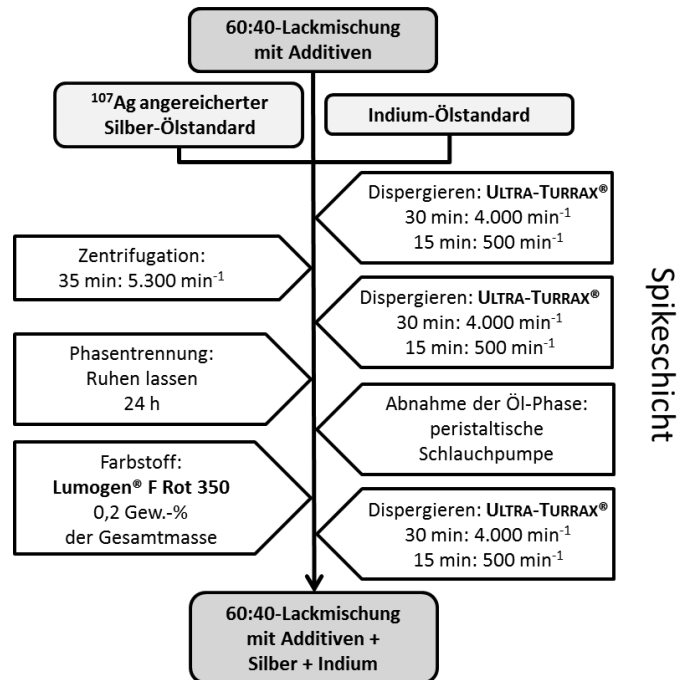
Die Lackmischung für die Probeschicht wurde aus der zweiten Charge der Basislackmischung hergestellt und nachdem in Abb. 5. 7 dargestellten Präparationsverfahren durchgeführt.



**Abb. 5. 7: Schematische Darstellung des Präparationsverfahrens für die Lackmischung der Probeschicht.**

Die Präparation erfolgte analog zur Herstellung des Durchschussmarkers, jedoch wurde anstatt des Lithium-Ölstandards ein Silber-Ölstandard ( $\omega_{(Ag)} = 5.000 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , Fa. SPETEC GMBH, Erding) mit „natürlichem“ Isotopenverhältnis hinzudotiert (siehe Abb. 5. 7). Der Massenanteil des Silbers wurde auf  $\approx 15 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  eingestellt.

Die Charge 3 der Basislackmischung wurde für die Herstellung der Lackmischung der Spikeschicht verwendet. Der Basislackmischung wurde hierfür der in Abschnitt 5.2.1 präparierte  $^{107}\text{Ag}$  isotopenangereicherte Silber-Ölstandard hinzugegeben (siehe Abb. 5. 8).



**Abb. 5. 8: Präparationsschema der isotopenangereicherten Spike-Lackmischung.**

Als Korrekturstandard für die Laserschwankungen und zur Korrektur des Mass-Bias wurde ein kommerziell erwerblicher Indium-Ölstandard ( $\omega_{(\text{In})} = 5.000 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ , Fa. SPETEC GMBH, Erding) eingesetzt. Da der Massenanteil des Silbers in dem  $^{107}\text{Ag}$  isotopenangereicherten Silber-Ölstandard unbekannt war, wurde ein Massenanteil von  $5.000 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  angenommen. Diese Annahme begründete sich darin, dass ein Gleichgewichtszustand zwischen freiem und vermutlich im Komplex gebundenem Silber vorliegt und dass die Zahl der zur Verfügung stehenden Komplexbildner als stabil vermutet wurde und daher nur eine relativ konstante Menge an Silber komplexiert werden kann. Der Massenanteil des Silbers in der isotopenangereicherten Lackmischung wurde unter der Annahme auf  $\approx 15 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  angesetzt. Der Massenanteil von Indium in der Lackmischung wurde auf  $\approx 20 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  eingestellt. Nach der Hinzugabe der beiden Ölstandards wurde die Lackmischung der Spikeschicht 30 min bei einer Drehzahl von  $4.000 \text{ min}^{-1}$  und 15 min bei einer Drehzahl von  $500 \text{ min}^{-1}$  zur Reduzierung der Schaumbildung mit dem ULTRA-TURRAX® dispergiert (siehe Abb. 5. 8). Weiterhin wurde die dispergierte und isotopenangereicherte Spike-Lackmischung mittels Tischzentrifuge bei  $5.300 \text{ min}^{-1}$  für 30 min zentrifugiert, um mögliche verbliebene



Feststoffe zu entfernen. Nach der Zentrifugation wurde der Farbstoff LUMOGEN® F ROT 350 der Fa. BASF (Ludwigshafen) mit einem Massenanteil von 0,2 Gew.-%, bezogen auf die Gesamtformulierung hinzugegeben, um die nachfolgende Schichtdickenbestimmung mittels Lichtmikroskopie zu verbessern. Im Anschluss daran erfolgten ein weiterer Dispergierungsschritt sowie die Ruhephase, die Abnahme der Ölschicht und die erneuerte Dispergierung der ölfreien Lackmischung.

### **5.2.3 Applikation mittels Rakeltechnik**

Die Herstellung der Dünnschichten erfolgte mithilfe der Rakeltechnik in Anlehnung an Abschnitt 4.2.3. Als Substrat dienten ebenfalls Polyesterfolien (BYKO-CHARTS, CLEAR POLYESTER 4-MIL, Fa. BYK-GARDNER GMBH, Geretsried) mit einer Dicke von 100  $\mu\text{m}$ . Zur Applikation wurde das AUTOMATISCHE FILMAUFZIEHGERÄT S mit einer 10  $\mu\text{m}$ -Spiralrakel (Nassschichtdicke  $\approx 5 \mu\text{m}$ ) für den Durchschussmarker, die Spike- und Probeschicht der Fa. BYK-GARDNER GMBH (Geretsried) bei einer Aufziehggeschwindigkeit von 50  $\text{mm}\cdot\text{s}^{-1}$  verwendet. Für die Applikation wurden je 2 mL der Lackmischungen direkt vor die eingespannte Spiralrakel pipettiert. Nach der gleichmäßigen Verteilung der Lackmischung durch die Spiralrakel auf der Polyesterfolie wurde diese in der in Abschnitt 3.2.1 beschriebenen hauseigenen Aushärtekammer zunächst nur unter Schutzgasatmosphäre für 30 min platziert, um das vollständige Glätten der Rakelstreifen zu ermöglichen. Im Anschluss daran erfolgte die Aushärtung für 30 min bei eingeschalteten UV-Niederdruck-Quecksilberdampf-Leuchtstofflampen. So wurden sukzessive die einzelnen Schichten der drei verschiedenen, präparierten Lackmischungen aufgebracht. Die verschiedenen Lackmischungen wurden vor der Applikation stets erneut dispergiert, dazu wurde der letzte Dispergierungsschritt wiederholt. Die hergestellten Schichtabfolgen der beiden Schichtsysteme sind in Abb. 5. 9 dargestellt.

	Schichtsystem 1	Schichtsystem 2
3. Schicht		Probe
2. Schicht	Spike	Spike
1. Schicht	Durchschussmarker	Durchschussmarker
	Polyestersubstrat	Polyestersubstrat

Abb. 5. 9: Schichtabfolge der beiden präparierten Schichtsysteme.

Nach der Aushärtung jeder Einzelschicht wurden drei 1,5·1,5 cm große Teilstücke aus der Mitte der Dünnschicht entnommen und für die Bestimmung der Schichtdicke mittels Lichtmikroskopie und Rasterelektronenmikroskopie verwendet (siehe Abschnitt 5.3.2). Neben den Schichtsystemen wurden zusätzlich von jeder Lackmischung drei Bulks in Aluminiumschälchen für die Quantifizierung der Silbergehalte mittels ICP-OES hergestellt (siehe Abschnitt 5.3.1).

Das Schichtsystem 2 wurde für die Erprobung der festkörperbasierten Isotopenverdünnungsanalyse von Silber eingesetzt. Aus dem Schichtsystem 1 wurden 2·2 cm große Teilstücke abgeschnitten und mittels doppelseitig klebendem Kohlenstoff-Klebeband auf Objektträger aus Glas fixiert. Dabei wurde darauf geachtet, dass die applizierten Schichten nach oben gerichtet auflagen. Die Randstücke des Schichtsystems wurden mit durchsichtigem Klebeband (TESAFILM® der Fa. TESA (Norderstedt)) verstärkt, um ein Ablösen der applizierten Schichten zu verhindern. In Abb. 5. 10 ist ein auf diese Weise präparierter Probenträger exemplarisch abgebildet.

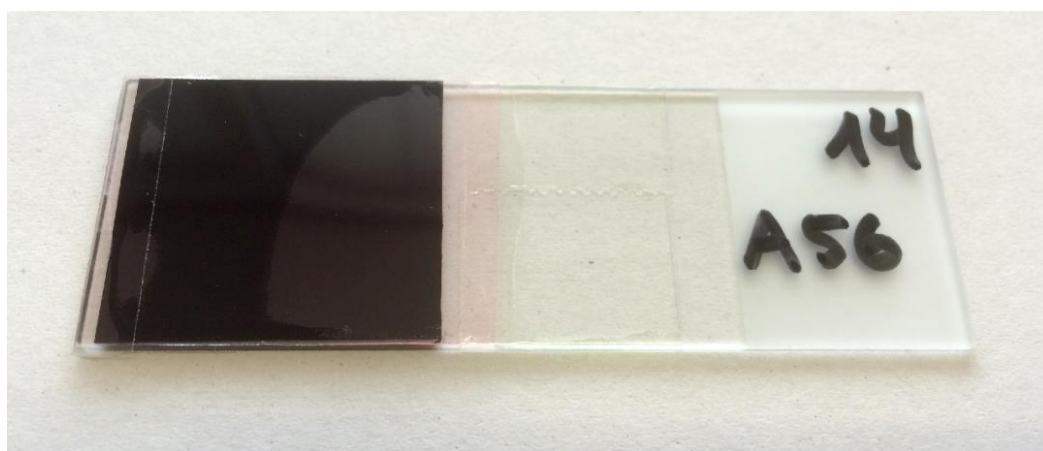


Abb. 5. 10: Präparierter Probenträger für die festkörperbasierte Isotopenverdünnungsanalyse von Silber in biologischen Proben.

Für eine eindeutige Probenzuordnung wurden die Probenträger mit fortlaufenden Nummern (z.B. A001-A100) versehen. Zusätzlich wurde eine weitere Nummerierung (z.B. 1-20) eingeführt, um die eindeutige Identifizierung des Schichtsystems sowie die korrekte Verwendung der ermittelten Schichtdicken zu gewährleisten.

### 5.3 Charakterisierung der Schichtsysteme

Die Charakterisierung der präparierten Schichtsysteme für die festkörperbasierte Isotopenverdünnungsanalyse von Silber umfasste die Quantifizierung der Elementgehalte, die Bestimmung der Schichtdicken und der Isotopenverhältnisse sowie die Homogenitätsbestimmungen der Elementverteilung und ist in den folgenden Abschnitten beschrieben.

#### 5.3.1 Quantifizierung der Elementgehalte

Bei der Quantifizierung der Elementgehalte stand das Element Silber im Vordergrund. Die weiteren hinzudotierten Elemente wie Lithium und Indium wurden lediglich qualitativ im Hinblick auf ihr Vorkommen in den ausgehärteten Lackmischungen überprüft. Die Quantifizierung erfolgte analog zu dem Vorgehen in Abschnitt 4.3.1 mittels ICP-OES SPECTRO ARCOS der Fa. SPECTRO ANALYTICAL INSTRUMENTS (Kleve). Die verwendeten Messparameter sind im Anhang (siehe Tab. 8. 1) zusammengefasst. Zur Quantifizierung des Silbergehaltes und der qualitativen Analyse von Lithium und Indium wurden die ausgehärteten Bulks der einzelnen Lackmischungen von den Aluminiumschälchen entfernt und mittels Mikrowellendruckaufschluss nach Abschnitt 3.3.1 aufgeschlossen. Es wurde eine externe Kalibration aus fünf Standards mit Silbergehalten zwischen 10 und 1000  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  und jeweils ein Standard mit 1  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  Lithium und Indium angesetzt. Dazu wurden ICP-Standardlösungen von Silber ( $\omega(\text{Ag}) = 10.000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ), Lithium ( $\omega(\text{Li}) = 10.000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) und Indium ( $\omega(\text{In}) = 10.000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) der Fa. CARL ROTH GMBH + Co.KG (Karlsruhe) verwendet. Die Matrix der Standards wurde an die Probenmatrix der verdünnten Aufschlusslösung angepasst, indem die Standards in verdünnter Salpetersäure (2,5 Gew.-%, *subboiled*) angesetzt wurden. Die exakten Gehalte der Standards sind in Tab. 8. 5 aufgelistet. Die unter Berücksichtigung der Messempfindlichkeit und möglicher Interferenzen durch auftretende Linienüberlagerungen gemessenen Spektrallinien sind in Tab. 5. 1 zusammengefasst.

**Tab. 5. 1: Gemessene Emissionslinien für die Quantifizierung des Massenanteils von Silber und der qualitativen Analyse von Lithium und Indium in den aufgeschlossenen Lackmischungen**

Element	Emissionslinie $\lambda$ in nm
Lithium	460,286
	670,784
Silber	224,641
	243,779
	328,068
Indium	338,289
	230,606
	303,936
	325,609
	451,131

Da keine signifikanten Unterschiede zwischen den Emissionslinien auftraten, werden im Folgenden exemplarisch nur die Ergebnisse der repräsentativen Emissionslinie von Silber  $\lambda = 328,068$  nm dargestellt. Die Erstellung der Kalibrierfunktion sowie die Berechnung der Probengehalte samt Vertrauensbereiche (VB) erfolgten nach DIN 38402-51 mit einem Vertrauensniveau P von 95 %. Die Bestimmung der Verfahrenskenngrößen, wie das Bestimmtheitsmaß ( $R^2$ ), die Nachweis- (NWG), Erfassungs- (EG) und die Bestimmungsgrenze (BG), erfolgte nach DIN 32645 (siehe Tab. 5. 2).

**Tab. 5. 2: Verfahrenskenngrößen der ICP-OES-Bestimmung von Silber in aufgeschlossenen Schichtsystemen nach DIN 32645**

	$\lambda_{(Ag)} = 328,068$ nm
NWG in $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	1,4
EG in $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	2,9
BG in $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	5,3
$R^2$	0,9999

Die qualitative Analyse von Lithium und Indium wurde durch einen Vergleich der Emissionslinien von den  $1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  Standards, dem Blindwert in verdünnter Salpetersäure und der aufgeschlossenen Lackmischung durchgeführt. Durch diesen Vergleich zeigte sich, dass Lithium und Indium nur in den Lackmischungen vorhanden waren, in welche die Elemente hinzudotiert wurden und der Vergleich bestätigte die Kontaminationsfreiheit der übrigen Lackmischungen. Die qualitative Überprüfung im Hinblick auf das Vorhandensein der beiden Elemente in den Lackmischungen reichte aus, da – wie in Abschnitt 2.4 beschrieben – die Elemente als Korrekturstandard (In) bzw. Durchschussmarker (Li) fungieren und nur homogen in der jeweiligen Schicht verteilt sein müssen und ein messbarer Massenanteil vorliegen muss.

In Tab. 5. 3 sind die Ergebnisse der Quantifizierung des Massenanteils, inklusive Vertrauensbereich, von Silber in den Lackmischungen mittels ICP-OES dargestellt.

**Tab. 5. 3: Via ICP-OES bestimmte Silbergehalte und Vertrauensbereiche in den verschiedenen Lackmischungen (n = 3)**

	$\omega_{(\text{Ag})} \pm \text{VB in mg}\cdot\text{kg}^{-1}$
<b>Durchschussmarker</b>	nicht nachgewiesen
<b>Spike</b>	15,0 ± 0,5
<b>Probe</b>	12,1 ± 0,5

Zusätzlich wurde der Massenanteil von Silber mittels ICP-IDMS quantifiziert. Dazu wurden ein Quadrupol-Massenspektrometer (XSERIE 2, Fa. THERMO FISHER SCIENTIFIC GMBH, Bremen) und ein  $^{109}\text{Ag}$ -Isotopenstandard ( $\omega_{(\text{Ag})} = 10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ;  $^{109}\text{Ag} = 98,7 \text{ At.-%}$ ) der Fa. SPETEC GMBH (Erding) verwendet. Gemessen wurden die Isotope  $^{107}\text{Ag}$  und  $^{109}\text{Ag}$  mit einer Dwellzeit von 20 ms mit zehnmal 50 Messzyklen pro Probe. Die weiteren eingestellten Parameter des ICP-MS sind in Tab. 8. 3 zusammengefasst. Der in verdünnter Salpetersäure (2,5 Gew.-%, *subboiled*) angesetzte Isotopenspike wurde im Überschuss zu den verdünnten und aufgeschlossenen Lackmischungen hinzugegeben. Weiterhin wurde ein hausintern zertifizierter Indiumstandard mit bekanntem Isotopenverhältnis in die aufgeschlossene Lackmischung der Probe für die Mass-Bias-Korrektur hinzudotiert (vgl. Abschnitt 5.4.1). Da Indium im aufgeschlossenen Festkörperspike bereits vorhanden war, wurde auf die Hinzugabe des hausintern zertifizierten Indiumstandards verzichtet. Im Anschluss daran wurde die einfache Isotopenverdünnung nach Gl. 8 und die Mass-Bias-Korrektur nach Gl. 2 und Gl. 3 durchgeführt.

Die verwendeten Parameter für die einfache Isotopenverdünnungsanalyse von Silber in den aufgeschlossenen Lackmischungen sind in Tab. 5. 4 zusammengefasst.

Tab. 5. 4: Verwendete Parameter für die einfache Isotopenverdünnungsanalyse von Silber in den aufgeschlossenen Lackmischungen (n = 10)

Parameter	Probe		Spike	
	Isotopenverhältnis		Isotopenverhältnis	
	$^{107}\text{Ag}/^{109}\text{Ag}$	$^{109}\text{Ag}/^{107}\text{Ag}$	$^{107}\text{Ag}/^{109}\text{Ag}$	$^{107}\text{Ag}/^{109}\text{Ag}$
$a_{x,b}$	0,494	0,506	0,268	0,732
$m_x$ in g	0,2055	0,2055	0,1499	0,1499
$m_y$ in g	0,5869	0,5869	0,5852	0,5852
$M_b^a$ in $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$	108,904755	106,90509	108,904755	106,90509
$M_x^a$ in $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$	107,9	107,9	107,9	107,9
$R_x$	1,025	0,976	2,722	0,367
$R_{xy}$	0,108	9,232	0,168	5,959
$R_y$	0,014	77,081	0,014	77,081
$\omega_{y,b}$ in $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	99,2	1,4	99,2	1,4

<sup>a</sup> aus CIAAW, 2016

Die Ergebnisse der Quantifizierung von Silber mittels einfacher Isotopenverdünnungsanalyse sind in Tab. 5. 5 dargestellt. Die mittleren berechneten Massenanteile liegen nahe dem mittels ICP-OES hausintern zertifizierten Wert und die Fehlerbereiche beider Methoden überlappen. Der Bias liegt zwischen -1,7 und 2,2 %. Die Berechnung der dargestellten Fehler der Isotopenverdünnungsanalyse erfolgte nach der Methode von KRAGTEN, 1994. Die erweiterter Unsicherheit lag bei 1,3 % bei einem k-Faktor von 3. Ziel der ICP-IDMS-Analyse war es, zum einen die ICP-OES-Ergebnisse zu verifizieren und zum anderen die Unsicherheit bei der festkörperbasierten Isotopenverdünnungsanalyse zu reduzieren, da die Unsicherheit des Massenanteils von Spikes und/oder Back-Spikes einen Anteil von 11 – 16 % zur erweiterten Unsicherheit der Methode hatte (vgl. Abschnitt 4.4.4). Da sich die Ergebnisse beider Methoden gegenseitig bestätigten, wurde das Ergebnis der ICP-IDMS-Analyse für die Erprobung (siehe Abschnitt 5.3.1) und Anwendung (siehe Abschnitt 5.5) der festkörperbasierten Isotopenverdünnungsanalyse verwendet.

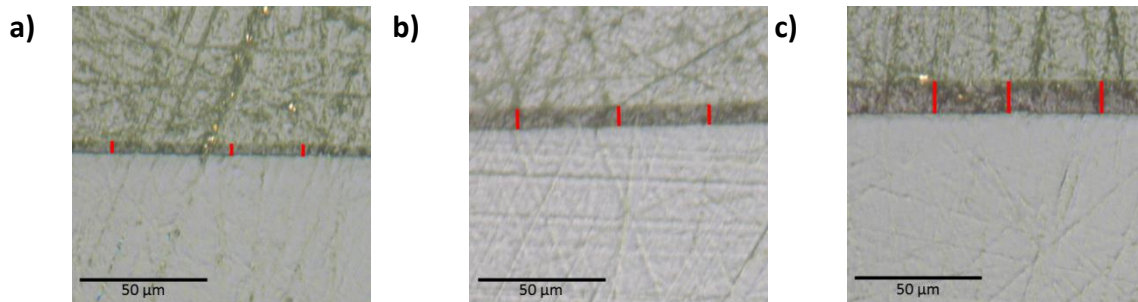
Tab. 5. 5: Mittels einfacher Isotopenverdünnungsanalyse ermittelter Massenanteil von Silber in den ausgehärteten Lackmischungen von Festkörperspike und -probe

ICP-IDMS	Probe		Spike	
	Massenanteil $\omega_{(\text{Ag})}$ in $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	Bias <sup>a</sup> in %	Massenanteil $\omega_{(\text{Ag})}$ in $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	Bias <sup>a</sup> in %
$\bar{x}$	11,9 ± 0,2	-1,7	15,3 ± 0,2	2,2
<b>zertifizierter Wert<sup>b</sup></b>	12,1 ± 0,5		15,0 ± 0,5	

<sup>a</sup> Bias = [(ermittelter Wert – Referenzwert)/Referenzwert\*100] nach KROMIDAS 2011, <sup>b</sup> mittels ICP-OES nach Mikrowellendruckaufschluss

### 5.3.2 Schichtdickenbestimmungen

Die Schichtdickenbestimmung wurde mittels Licht- und Rasterelektronenmikroskopie durchgeführt. Bei der Bestimmung der Schichtdicken mittels Lichtmikroskopie wurde analog zu dem Verfahren in Abschnitt 4.3.2 vorgegangen. In Abb. 5. 11 sind exemplarische Lichtmikroskopieaufnahmen der eingebetteten Querschnitte der Schichten abgebildet.



**Abb. 5. 11: Schichtdickenbestimmung mittels Lichtmikroskopieaufnahmen an dem Durchschussmarker (a), Durchschussmarker + Spike (b) und Durchschussmarker + Spike + Probe (c).**

Wie aus der Abbildung ersichtlich, ist die Färbung der Spikeschicht mit dem Farbstoff LUMOGEN® F ROT 350 der Fa. BASF (Ludwigshafen) nicht zu erkennen und damit kann bei derartig dünnen Schichten ( $\approx 4,5 \mu\text{m}$ ) kein positiver Effekt im Hinblick auf die Schichtdickenbestimmung festgestellt werden. Diese Ergebnisse decken sich mit den Arbeiten von KÜHN 2016 und THÜRNUAU 2016. Daher wurden die Einzelschichtdicken – wie in Abschnitt 4.3.2 beschrieben – durch das Subtraktionsverfahren bestimmt.

Die Ergebnisse der Schichtdickenbestimmung mittels Lichtmikroskopie sind in Tab. 5. 6 unter Angabe der Standardabweichung, der relativen Standardabweichung und des Standardfehlers zusammengefasst.

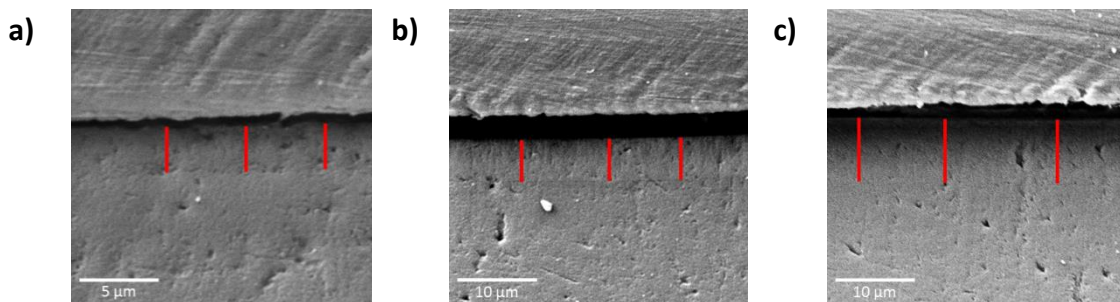
**Tab. 5. 6: Ergebnisse der Schichtdickenbestimmung mittels Lichtmikroskopie in den Einzelschichten (n = 50)**

	Schichtdicke			
	$\bar{x}$ in $\mu\text{m}$	s in $\mu\text{m}$	RSD in %	SE in $\mu\text{m}$
<b>Durchschussmarker</b>	3,6	0,3	7,2	0,04
<b>Spike</b>	3,5	0,5	13,2	0,07
<b>Probe</b>	3,0	0,4	12,1	0,05

Die Ergebnisse zeigen hohe relative Standardabweichungen und spiegeln die Ergebnisse aus Abschnitt 4.3.2 wider. Da dickere Schichten in den Arbeiten von SCHUBERT, 2015; DREYER, 2016 und THÜRNUAU, 2016 mit wesentlich geringeren RSDs hergestellt werden konnten, wurde für derartig dünne Schichten ( $\approx 3\text{-}5 \mu\text{m}$ ) zunächst eine homogene Schichtdicke angenommen

und die hohen RSDs durch die relativ geringe Vergrößerung (1000x) des verwendeten Lichtmikroskops erklärt. Um die Homogenität der Schichtdicke zu beweisen und bestenfalls die Unsicherheit bei der Bestimmung zu reduzieren, wurde die Rasterelektronenmikroskopie als Alternative eingesetzt. In der Arbeit von THÜRNUAU 2016 wurden damit die erreichten RSDs deutlich reduziert und die Homogenität der Schichtdicke bewiesen.

Die Rasterelektronenmikroskopie der eingebetteten Schichten erfolgte nach der lichtmikroskopischen Untersuchung. Dazu wurden die eingebetteten Querschnitte der Schichten mit einer dünnen Goldschicht besputtert, um elektrostatische Aufladungen bei der Rasterelektronenmikroskopie zu vermeiden. Verwendet wurde dafür der SPUTTER COATER 108AUTO (Fa. EO ELEKTRONEN-OPTIK-SERVICE GMBH, Dortmund) für die Dauer von 30 s bei einer Stromstärke von 30 mA. Die besputterten Proben wurden an einem Rasterelektronenmikroskop JSM-6610LV der Firma JOEL LTD. (Tokio, Japan) untersucht. Die eingestellten Parameter sind in Tab. 8. 6 im Anhang aufgelistet. In Abb. 5. 12 sind exemplarische Rasterelektronenmikroskopieaufnahmen abgebildet.



**Abb. 5. 12: Schichtdickenbestimmung mittels Rasterelektronenmikroskopieaufnahmen an dem Durchschussmarker (a), Durchschussmarker + Spike (b) und Durchschussmarker + Spike + Probe (c).**

Analog zur Auswertung der Lichtmikroskopieaufnahmen wurde das Programm IMAGEJ verwendet und in Anlehnung an DIN EN ISO 1463 (Metall- und Oxidschichten – Schichtdickenmessung – mikroskopisches Verfahren) ausgewertet. Dazu wurden auf jeder der fünf Querschnittsaufnahmen eines Einzel- oder Mehrschichtsystems je zehn Einzelmessungen entlang der Kante durchgeführt und Mittelwert, Standardabweichung, relative Standardabweichung und Standardfehler bestimmt. Da die einzelnen Schichten einer Mehrschicht ebenfalls nicht erkennbar waren (vgl. Abb. 5. 12 und Abb. 4. 11), erfolgte die Bestimmung der Einzelschichtdicke durch Anwendung des Subtraktionsverfahrens. Die Ergebnisse der REM-Analyse sind in Tab. 5. 7 zusammengefasst.



**Tab. 5. 7: Ergebnisse der Schichtdickenbestimmung mittels Rasterelektronenmikroskopie in den Einzelschichten (n = 50)**

	Schichtdicke			
	$\bar{x}$ in $\mu\text{m}$	s in $\mu\text{m}$	RSD in %	SE in $\mu\text{m}$
<b>Durchschussmarker</b>	3,51	0,14	3,94	0,02
<b>Spike</b>	3,55	0,14	3,92	0,02
<b>Probe</b>	3,03	0,13	4,42	0,02

Der Vergleich der Schichtdickenbestimmung mittels Licht- und Rasterelektronenmikroskopie zeigt zum einen vergleichbare mittlere Schichtdicken und zum anderen geringere Fehler bei der Bestimmung der Schichtdicken, welche sich durch niedrigere Standardabweichungen, relative Standardabweichungen und Standardfehler auszeichnen. Weiterhin deuten die relativ niedrigen RSDs von  $\leq 5\%$  auf eine homogene Schichtdicke der präparierten Dünnschichten hin. Die bestimmten RSDs weisen höhere Werte als in der Arbeit von THÜRNUAU 2016 auf. Dies ist zum einen durch die etwas geringeren Schichtdicken in dieser Arbeit und zum anderen durch die präparierten Multischichten zu erklären, denn die ermittelte Standardabweichung der Schichtdickenbestimmung einer Multischicht wurde als Standardabweichung der durch Subtraktion ermittelten Einzelschicht eingesetzt. Weiterhin wurde in dieser Arbeit bei der REM-Analyse mit einer geringeren maximalen Vergrößerung von 2500x gearbeitet, da somit eine größere Querschnittsfläche der Schichtsysteme repräsentativ ausgemessen werden konnte.

Als Ergebnis dieses Vergleichs stellt sich die Rasterelektronenmikroskopie als geeignetere Methode der Wahl für die Bestimmung der Schichtdicke von Dünnschichten heraus. Daher werden für die Erprobung (siehe Abschnitt 5.4.2), die Unsicherheitsberechnung (siehe Abschnitt 5.4.3) und das Anwendungsbeispiel (siehe Abschnitt 5.5) der festkörperbasierten Isotopenverdünnungsanalyse von Silber die Ergebnisse der Rasterelektronenmikroskopie verwendet.

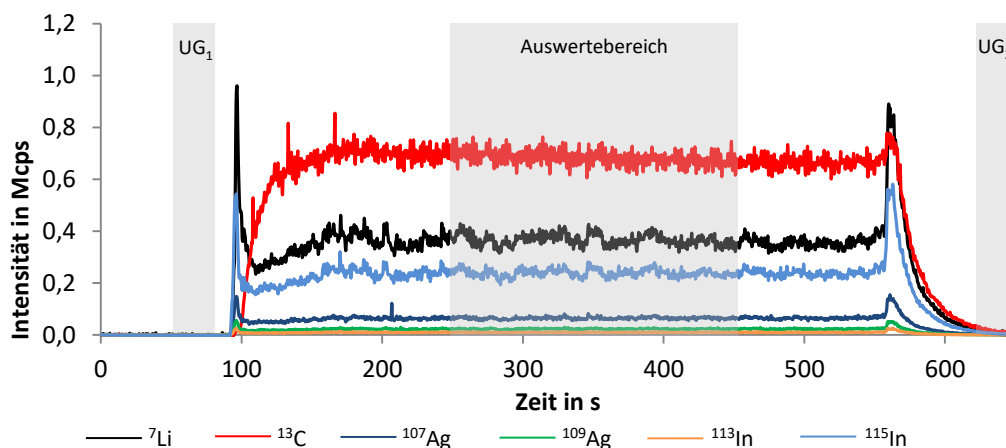
### 5.3.3 Homogenitätsbestimmungen

Die Homogenitätsbestimmungen wurden vergleichbar zu Abschnitt 4.3.3 durchgeführt. Verwendet wurde ein ns-Lasersystem (UP-213-2078, Fa. NEW WAVE RESEARCH INC., Fremont, USA) sowie ein Quadrupol-Massenspektrometer (XSERIE 2, Fa. THERMO FISHER SCIENTIFIC GMBH, Bremen). Als Ablationszelle diente eine hauseigene Kammer, beschrieben in der Arbeit von LEHMANN, 2011. Die Ablation der Proben erfolgte durch Linienscans mit einer Scangeschwindigkeit von  $5 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ , einer Länge von  $2750 \mu\text{m}$ , einem Abstand zwischen den

einzelnen Linien von 300  $\mu\text{m}$  und einem Laserspotdurchmesser von 100  $\mu\text{m}$ . Die Schussfrequenz des gepulsten Lasers betrug 20 Hz bei einer Laserfluenz von ca. 3,8  $\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$ . Das ablatierte Probenmaterial wurde mittels Heliumgasstrom ( $1,16 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ ) zum Massenspektrometer transportiert. Die Einstellung der Laserparameter erfolgte ebenfalls in Anlehnung an THIELEKE, 2013. Gemessen wurden die Isotope  $^7\text{Li}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{107}\text{Ag}$ ,  $^{109}\text{Ag}$ ,  $^{113}\text{In}$  und  $^{115}\text{In}$  mit einer Dwellzeit von 20 ms. Durch die konstante Einleitung von  $0,17 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  verdünnter Salpetersäure (2,5 Gew.-%, subboiled) wurde das Plasma angefeuchtet, um ein robusteres Plasma zu erreichen. Die weiteren eingestellten Parameter des ICP-MS sind in Tab. 8. 3 im Anhang aufgelistet.

Die 1,5·1,5 cm großen Teilstücke der Schichtsysteme 1 (Durchschussmarker + Spike) und 2 (Durchschussmarker + Spike + Probe) wurden zusammen in der Ablationskammer platziert und analog zu dem Vorgehen in Abschnitt 3.3.2 10 min zur Verringerung des Kohlenstoffuntergrunds mit Helium gespült. Auch die Konditionierung des Plasmas durch eine Rasterablation einer Probe kurz vor Messbeginn wurde durchgeführt. Im Anschluss daran wurde die Messung gestartet und 10 Linien auf den beiden Schichtsystemen ablatiert, was einer untersuchten Fläche von  $2,75 \text{ mm}^2$  entspricht.

In Abb. 5. 13 ist exemplarisch der Verlauf der untergrundkorrigierten Rohsignale der hinzudotierten Elemente in Schichtsystem 1 abgebildet.



**Abb. 5. 13: Rohsignalverlauf von  $^7\text{Li}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{107}\text{Ag}$ ,  $^{109}\text{Ag}$ ,  $^{113}\text{In}$  und  $^{115}\text{In}$  während der Laserablation von Schichtsystem 1 (Durchschussmarker + Spike).**

Das Kohlenstoffsignal erreicht das stabile Plateau erst mit einer für das Element typischen Verzögerung (vgl. Abschnitt 4.3.3). Im Gegensatz dazu zeigen die restlichen Elemente einen vergleichbaren Signalverlauf und erreichen das stabile Plateau zeitgleich. Die Signale von den

Isotopen  $^{107}\text{Ag}$  und  $^{109}\text{Ag}$  weisen große Intensitätsunterschiede auf, was auf eine erfolgreiche Anreicherung von  $^{107}\text{Ag}$  im Spike schließen lässt, da im „natürlichen“ Silber beide Isotope etwa gleich häufig vorliegen.

Als nächster Schritt folgte die Normalisierung über das Isotop  $^{13}\text{C}$ , um die jeweilige Drift des Lasers und des Messsystems zu korrigieren. Die normalisierten Signalverläufe der gemessenen Isotope zeigt Abb. 5. 14.

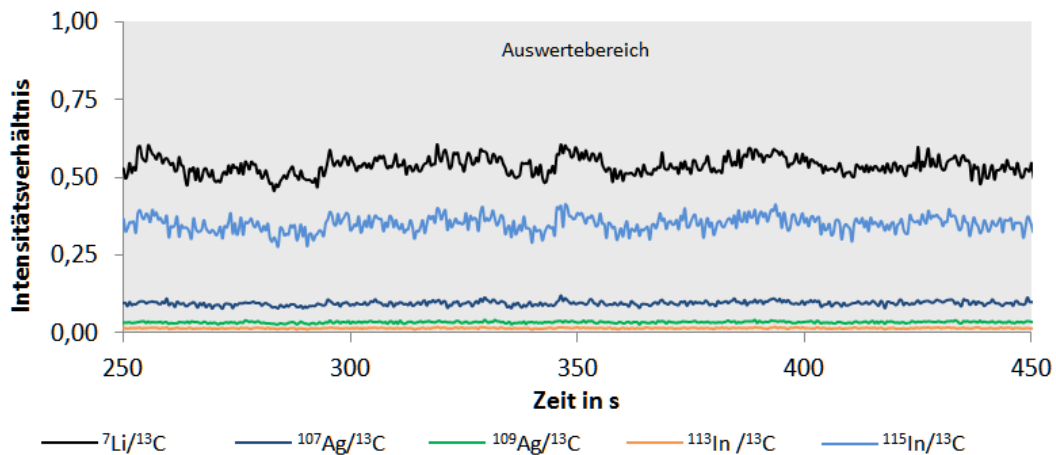


Abb. 5. 14: Über  $^{13}\text{C}$  normalisierter Signalverlauf von  $^7\text{Li}$ ,  $^{107}\text{Ag}$ ,  $^{109}\text{Ag}$ ,  $^{113}\text{In}$  und  $^{115}\text{In}$  während der Laserablation von Schichtsystem 1 (Durchschussmarker + Spike).

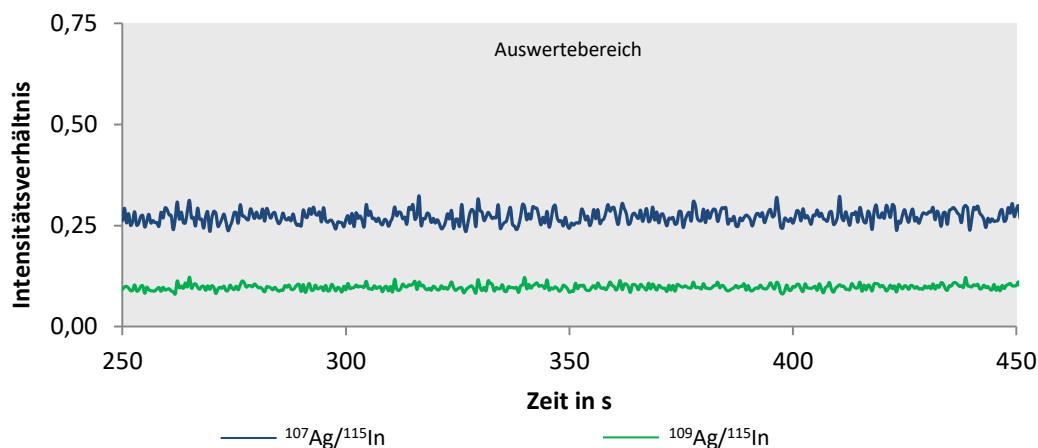
Durch die Normalisierung über  $^{13}\text{C}$  weisen die Signale einen geringfügig gleichmäßigeren Verlauf auf, da die Normalisierung über ein Matrixelement die Korrektur von Schwankungen des Lasers und Messsystems ermöglicht. Die ermittelten RSDs sind in Tab. 5. 8 aufgelistet.

Tab. 5. 8: Bestimmung der Homogenität der Elementverteilung durch Normalisierung mit  $^{13}\text{C}$  in den präparierten Schichtsystemen 1 und 2 (n = 10)

Isotop	Relative Standardabweichung in %	
	Schichtsystem 1	Schichtsystem 2
$^7\text{Li}$	5,4	3,9
$^{107}\text{Ag}$	4,4	3,9
$^{109}\text{Ag}$	4,4	4,2
$^{113}\text{In}$	4,1	3,7
$^{115}\text{In}$	4,4	3,9

Aus den Ergebnissen ist ersichtlich, dass alle Elemente in einer ausreichend homogenen Verteilung in den Schichtsystemen vorliegen, da die relativen Standardabweichungen aller hinzudotierten Elemente  $\leq 7\%$  liegen und damit vergleichbar homogen verteilt vorliegen wie in den häufig als Referenzmaterial für die LA-ICP-MS eingesetzten Glasstandards des NIST (GUILLONG ET AL., 2003; THIELEKE, 2013).

Weiterhin wurden die untergrundkorrigierten Rohsignale der beiden Silberisotope  $^{107}\text{Ag}$  und  $^{109}\text{Ag}$  über  $^{115}\text{In}$  normalisiert, um die Eignung von Indium als Korrekturstandard zu überprüfen. In Abb. 5. 15 sind die über das Isotop  $^{115}\text{In}$  normalisierten Signalverläufe der beiden Silberisotope  $^{107}\text{Ag}$  und  $^{109}\text{Ag}$  während der Laserablation von Schichtsystem 1 dargestellt.



**Abb. 5. 15:** Über  $^{115}\text{In}$  normalisierter Signalverlauf von  $^{107}\text{Ag}$  und  $^{109}\text{Ag}$  während der Laserablation von Schichtsystem 1 (Durchschussmarker + Spike).

Die über den Korrekturstandard normalisierten Signale der beiden Silberisotope zeigen einen wesentlich gleichmäßigeren Verlauf und bestätigen somit die Wahl des Korrekturstandards, da die beiden Elemente relativ ähnlich ablatiert, transportiert, atomisiert, ionisiert und detektiert werden. Die ermittelten relativen Standardabweichungen der Homogenitätsbestimmung der Silberverteilung nach Normalisierung über den Korrekturstandard  $^{115}\text{In}$  sind in Tab. 5. 9 zusammengefasst.

**Tab. 5. 9: Bestimmung der Homogenität der Elementverteilung durch Normalisierung über den Korrekturstandard  $^{115}\text{In}$  in den präparierten Schichtsystemen 1 und 2 (n = 10)**

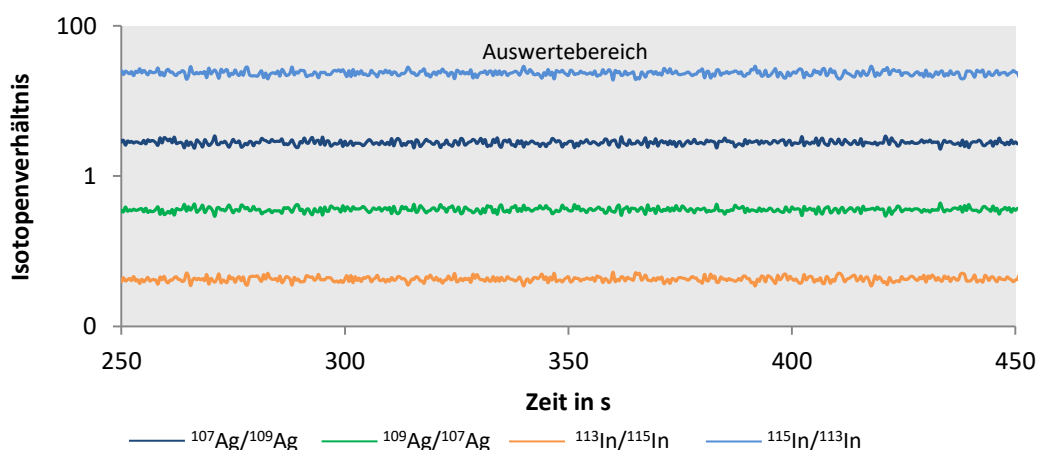
Isotop	Relative Standardabweichung in %	
	Schichtsystem 1	Schichtsystem 2
$^{107}\text{Ag}$	1,9	1,3
$^{109}\text{Ag}$	0,8	1,1

Die Ergebnisse zeigen RSDs von  $\leq 2\%$  in den präparierten Schichtsystemen auf und unterstreichen die oben genannte Wahl von Indium als Korrekturstandard. Im Vergleich zu Kohlenstoff führt die Normalisierung über  $^{115}\text{In}$  zu deutlich geringeren relativen Standardabweichungen.

Wie in Abschnitt 4.3.3 bereits beschrieben, bestätigen auch diese Ergebnisse der Homogenitätsbestimmung der Verteilung der hinzudotierten Analyten die prinzipielle Eignung der präparierten Schichtsysteme für die festkörperbasierte Isotopenverdünnungsanalyse, da eine Grundvoraussetzung für jene Methode eine homogene Verteilung der Spikeisotope und des Korrekturstandards darstellt. Einem weiteren kritischen Punkt, der Homogenität der Isotopenverhältnisse, widmet sich der folgende Abschnitt.

### 5.3.4 Homogenitätsbestimmung der Isotopenverhältnisse

Neben einer homogenen Verteilung der hinzudotierten Elemente ist ebenfalls, wie in Abschnitt 4.3.4 beschrieben, eine homogene Verteilung der Isotope im Spike eine Grundvoraussetzung für die festkörperbasierte Isotopenverdünnungsanalyse. Daher wird in diesem Abschnitt die Homogenität der Isotopenverhältnisse in den präparierten Schichtsystemen bestimmt. Dazu wurden aus den in Abschnitt 5.3.3 ermittelten untergrundkorrigierten und über  $^{115}\text{In}$  normalisierten Intensitätsverhältnissen von Silber die Isotopenverhältnisse  $^{107}\text{Ag}/^{109}\text{Ag}$  und  $^{109}\text{Ag}/^{107}\text{Ag}$  berechnet. Um die Homogenität der Isotopenverhältnisse  $^{113}\text{In}/^{115}\text{In}$  und  $^{115}\text{In}/^{113}\text{In}$  für die Mass-Bias-Korrektur zu untersuchen, wurden die untergrundkorrigierten und über  $^{13}\text{C}$  normalisierten Intensitätsverhältnisse der Indiumisotope verwendet. In Abb. 5. 16 sind exemplarisch die Signalverläufe der Isotopenverhältnisse im Schichtsystem 1 dargestellt.



**Abb. 5. 16: Logarithmische Darstellung der Silber- und Indiumisotopenverhältnisse in Schichtsystem 1.**

Zur besseren Vergleichbarkeit wurde die logarithmische Darstellung gewählt. Sowohl die Signale der Silber-, als auch der Indiumisotopenverhältnisse zeigen einen gleichmäßigen Verlauf ohne Signalausreißer auf und lassen damit auf eine homogene Verteilung aller betrachteten Isotope in dem Schichtsystem 1 schließen. Die Indiumisotopenverhältnisse

wurden nur der Vollständigkeit halber untersucht, da für Indium keine Abweichung zwischen den Isotopen zu erwarten war. Im Gegensatz dazu wären Ungleichmäßigkeiten in den Silberisotopenverhältnissen durch die Isotopenanreicherung möglich gewesen.

In Tab. 5. 10 sind die nach der Vorgehensweise aus Abschnitt 4.3.4 ermittelten relativen Standardabweichungen der zehn Linienablationen zusammengefasst.

**Tab. 5. 10: Homogenitätsbestimmung der Isotopenverhältnisse von Silber und Indium in den Schichtsystemen 1 und 2 (n = 10)**

Isotopenverhältnis	Relative Standardabweichung in %	
	Schichtsystem 1	Schichtsystem 2
$^{107}\text{Ag}/^{109}\text{Ag}$	0,54	1,09
$^{109}\text{Ag}/^{107}\text{Ag}$	0,54	1,11
$^{113}\text{In}/^{115}\text{In}$	0,39	0,43
$^{115}\text{In}/^{113}\text{In}$	0,39	0,43

Die ermittelten relativen Standardabweichungen der vier untersuchten Isotopenverhältnisse liegen in beiden präparierten Schichtsystemen unter 1,5 %. Damit bestätigen die relativen Standardabweichungen die aus der Darstellung der Silber- und Indiumisotopenverhältnisse (siehe Abb. 5. 16) vermutete Homogenität in der Isotopenverteilung der beiden Elemente. Die von HEUMANN ET AL. 1998 publizierten typischerweise erreichbaren RSDs von 0,1 - 0,5 % in flüssigen Standardlösungen bei der Verwendung von Quadrupol-Massenspektrometern für die Bestimmung von Isotopenverhältnissen werden für das isotopenangereicherte Silber geringfügig überschritten. Eine mögliche Ursache stellt die Reduktion von einigen Silberverbindungen unter Lichteinstrahlung dar, da durch diesen Vorgang möglicherweise Nanopartikel gebildet werden, welche sich ungleichmäßiger im Lacksystem verteilen. Allerdings wurden die RSDs nur geringfügig überschritten und die Untersuchung wurde mittels LA-ICP-MS durchgeführt, was nicht direkt mit den Messungen von flüssigen Standardlösungen vergleichbar ist. Aus diesen Gründen wurde die geforderte Grundlage der Homogenität der Isotopenverhältnisse in den Schichtsystemen als ausreichend betrachtet und die im folgenden Unterkapitel beschriebene Überprüfung der festkörperbasierten Isotopenverdünnungsanalyse von Silber durchgeführt.

## 5.4 Überprüfung der Methode

Das vorliegende Unterkapitel widmet sich der Überprüfung der festkörperbasierten Isotopenverdünnungsanalyse von Silber in einem polymeren Modellsystem. In den folgenden Abschnitten wird zunächst das Isotopenverhältnis des verwendeten Korrekturstandards Indium mittels des zertifizierten Referenzmaterials NIST SRM 978a hausintern

zertifiziert, um die Mass-Bias-Korrektur ebenfalls mit einem Festkörper durchzuführen. Im Anschluss daran wird die Methode mittels des silberhaltigen polymeren Modellsystems erprobt und validiert, da kein zertifiziertes Referenzmaterial für die Validierung zur Verfügung stand. Weiterhin wird eine Unsicherheitsbetrachtung der Methode durchgeführt.

Für alle Messungen in diesem Unterkapitel wurde ein ns-Lasersystem (UP-213-2078, Fa. NEW WAVE RESEARCH INC., Fremont, USA) sowie ein Quadrupol-Massenspektrometer (XSERIE 2, Fa. THERMO FISHER SCIENTIFIC GMBH, Bremen) verwendet. Als Ablationszelle diente eine hauseigene konstruierte Kammer (LEHMANN, 2011). Die Ablation der Proben erfolgte durch Linienscans mit einer Scangeschwindigkeit von  $5 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ , einer Länge von  $2750 \mu\text{m}$ , einem Abstand zwischen den einzelnen Linien von  $300 \mu\text{m}$  und einem Laserspotdurchmesser von  $100 \mu\text{m}$ . Der Laser wurde auf die Probenoberfläche fokussiert. Die Schussfrequenz des gepulsten Lasers betrug  $20 \text{ Hz}$  bei einer Laserfluenz von ca.  $3,8 \text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$ . Das ablatierte Probenmaterial wurde mittels Heliumgasstrom ( $1,16 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ ) zum Massenspektrometer transportiert. Die Einstellung der Laserparameter erfolgte ebenfalls in Anlehnung an THIELEKE, 2013. Gemessen wurden die Isotope  ${}^7\text{Li}$ ,  ${}^{13}\text{C}$ ,  ${}^{107}\text{Ag}$ ,  ${}^{109}\text{Ag}$ ,  ${}^{113}\text{In}$  und  ${}^{115}\text{In}$  mit einer Dwellzeit von  $20 \text{ ms}$ . Durch die konstante Einleitung von  $0,17 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  verdünnter Salpetersäure ( $2,5 \text{ Gew.}\%$ , subboiled) wurde das Plasma angefeuchtet, um ein robusteres Plasma zu erreichen. Die weiteren eingestellten Parameter des ICP-MS sind in Tab. 8. 3 im Anhang aufgelistet.

### 5.4.1 Messung des zertifizierten Referenzmaterials NIST SRM 978a

Da kein Referenzmaterial mit einem zertifizierten Isotopenverhältnis im Massenbereich von Silber zur Verfügung stand, konnte die Bestimmung der Richtigkeit und Präzision des verwendeten Quadrupol-Massenspektrometers für Silber nicht durchgeführt werden. Dennoch sollten die Ergebnisse aus Abschnitt 4.4.1 auch für Silber gelten, da die Richtigkeit und Präzision in der Regel nicht isotonenabhängig ist.

Aus den eingangs erwähnten Gründen beschäftigt sich dieser Abschnitt mit der hausinternen Zertifizierung der Isotopenverhältnisse des verwendeten Korrekturstandards Indium mit dem zertifizierten Referenzmaterial NIST SRM 978a, welches ein zertifiziertes Isotopenverhältnis von Silber besitzt. Dazu wurden  $0,1 \text{ g}$  des NIST-Standards mittels Mikrowellendruckaufschluss nach der Methode aus Abschnitt 5.2.1 aufgeschlossen und mit Reinstwasser ( $\sigma = 0,054 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) zwischenverdünnt. Zusätzlich wurden  $0,2 \text{ g}$  des zur Präparation der Lackmischung der Spikeschicht (siehe Abschnitt 5.2.2) verwendeten

Indium-Ölstandards ( $\omega_{(\text{In})} = 5.000 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ , Fa. SPETEC GMBH, Erding) nach der Methode aus Abschnitt 3.3 mittels Mikrowellendruckaufschluss aufgeschlossen. Darauffolgend wurden zwei Lösungen mit jeweils einem Massenanteil von Silber und Indium von  $2,5 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  angesetzt. Für beide Lösungen wurde das aufgeschlossene Referenzmaterial NIST SRM 978a verwendet. Zu Lösung 1 wurde der ebenfalls aufgeschlossene Indium-Ölstandard hinzugegeben. Für Lösung 2 wurde hingegen eine in verdünnter Salpetersäure (2,5 Gew.-%, *subboiled*) angesetzte ICP-Standardlösung von Indium ( $\omega_{(\text{In})} = 10.000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) der Fa. CARL ROTH GMBH + Co.KG (Karlsruhe) verwendet. Die beiden Lösungen wurden am Quadrupol-Massenspektrometer (XSERIE 2, Fa. THERMO FISHER SCIENTIFIC GMBH, Bremen) gemessen. Dabei wurde das Signal der Isotope  $^{107}\text{Ag}$ ,  $^{109}\text{Ag}$ ,  $^{113}\text{In}$  und  $^{115}\text{In}$  mit einer Dwellzeit von 20 ms mit zehnmal 50 Messzyklen pro Probe aufgenommen. Es wurde jeweils eine Dreifachbestimmung durchgeführt.

Für die hausinterne Zertifizierung des Isotopenverhältnisses von Indium wurde das Referenzmaterial NIST SRM 978a zur Mass-Bias-Korrektur eingesetzt und das wahre Isotopenverhältnis von  $^{115}\text{In}/^{113}\text{In}$  bestimmt. Da keine Unterschiede zwischen den Lösungen feststellbar waren, sind die Ergebnisse beider Lösungen in Tab. 5. 11 zusammengefasst.

**Tab. 5. 11: Bestimmtes und theoretisches Indiumisotopenverhältnis ( $\pm$  SE) in den Lösungen (n=3)**

	<b>Isotopenverhältnis</b> $^{115}\text{In}/^{113}\text{In}$
<b>bestimmter Wert <math>\bar{x}</math></b>	22,092 $\pm$ 0,016
<b>theoretischer Wert<sup>a</sup></b>	22,359
<b>Bias<sup>b</sup></b>	-1,2 %

<sup>a</sup> nach CIAAW, 2016; <sup>b</sup> Bias = [(ermittelter Wert – Referenzwert)/Referenzwert\*100] nach KROMIDAS 2011

Die Ergebnisse zeigen eine Abweichung von  $\approx 1,2 \%$  und sind damit vergleichbar zu den in Abschnitt 4.4.1 dargestellten Ergebnissen. Damit kann eine vergleichbare Richtigkeit und Präzision für die Bestimmung der Isotopenverhältnisse für Silber wie für Blei angenommen werden. Das hausintern zertifizierte Isotopenverhältnis von Indium wurde in den Abschnitten 5.3.1 und 5.4.2 bis 5.5 zur Korrektur des Mass-Bias verwendet.

#### 5.4.2 Erprobung der Methode

Die Erprobung der festkörperbasierten Isotopenverdünnungsanalyse wurde analog zu dem in Abschnitt 4.4.2 beschriebenen Vorgehen unter Anwendung der einfachen Isotopenverdünnungsanalyse durchgeführt. Schichtsystem 1 wurde bei der Erprobung der



Methode als Spike und Schichtsystem 2 als Blend verwendet. Für die Bestimmung des Isotopenverhältnisses der Probe wurde der Bulk der Probe verwendet und eine in verdünnter Salpetersäure (2,5 Gew.-%, *subboiled*) angesetzte ICP-Standardlösung von Indium ( $\omega_{(\text{In})} = 10.000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) der Fa. CARL ROTH GMBH + Co.KG (Karlsruhe) mit einem Massenanteil von  $5 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  zur Mass-Bias-Korrektur verwendet. Für die Messung der Isotopenverhältnisse wurden 1,5·1,5 cm große Teilstücke der beiden Schichtsysteme entnommen und zusammen mit dem Bulk der Probe in der Ablationskammer platziert und nach den in Abschnitt 5.4 zusammengefassten Parametern jeweils 20 Linienablationen durchgeführt.

In Abb. 5. 17 sind exemplarische untergrundkorrigierte Signalverläufe der gemessenen Isotope in Probe, Spike und Blend dargestellt. Die abgebildeten Signalprofile zeigen den in Abschnitt 4.3.3 beschriebenen typischen Verlauf bei Linienscans mittels LA-ICP-MS. Die vergleichbaren Intensitäten von  $^7\text{Li}$  in den beiden Schichtsystemen deuten auf eine gleichmäßige und vollständige Ablation hin. In dem Proben Bulk war kein Lithium vorhanden, daher wurde  $^7\text{Li}$  in dieser Probe nicht gemessen. Anhand der Signale der beiden Silberisotope zueinander kann die erfolgreiche Anreicherung des  $^{107}\text{Ag}$ -Isotops festgestellt werden. Aus der Abbildung kann eine Anreicherung von  $^{107}\text{Ag}$  zu  $^{109}\text{Ag}$  von 3:1 im Spike und 2:1 im Blend abgeschätzt werden. Im Gegensatz dazu wird in der Probe ein Verhältnis von  $^{107}\text{Ag}/^{109}\text{Ag}$  von ungefähr 1 erreicht, was in etwa dem natürlichen Isotopenverhältnis von Silber entspricht. Die Signale aller gemessenen Isotope untereinander, mit Ausnahme von  $^{13}\text{C}$ , zeigen in den Schichtsystemen einen sehr ähnlichen Verlauf auf. Die ansteigenden Signalverläufe der Probe in Abb. 5. 17 sind auf die konvexe Form des Bulks zurückzuführen, da der Laserstrahl am Anfang der Messung leicht defokussiert war und somit weniger Material ablatiert wurde. Signalschwankungen treten bei allen Analyten aus verschiedenen Schichten gleichmäßig auf, was auf durch das Messsystem verursachte Schwankungen hindeutet, die durch die Normalisierung mittels Korrekturstandard verringert werden (vgl. Abb. 5. 16). Weiterhin weisen die Silbersignale keine unregelmäßigen Signalanstiege auf, was auf Inhomogenitäten in der Silberverteilung durch die Isotopenanreicherung hindeuten würde. Damit wird die in Abschnitt 5.3.3 und 5.3.4 bewiesene Homogenität der Element- und Isotopenverteilung in den Schichtsystemen nochmals bestätigt.

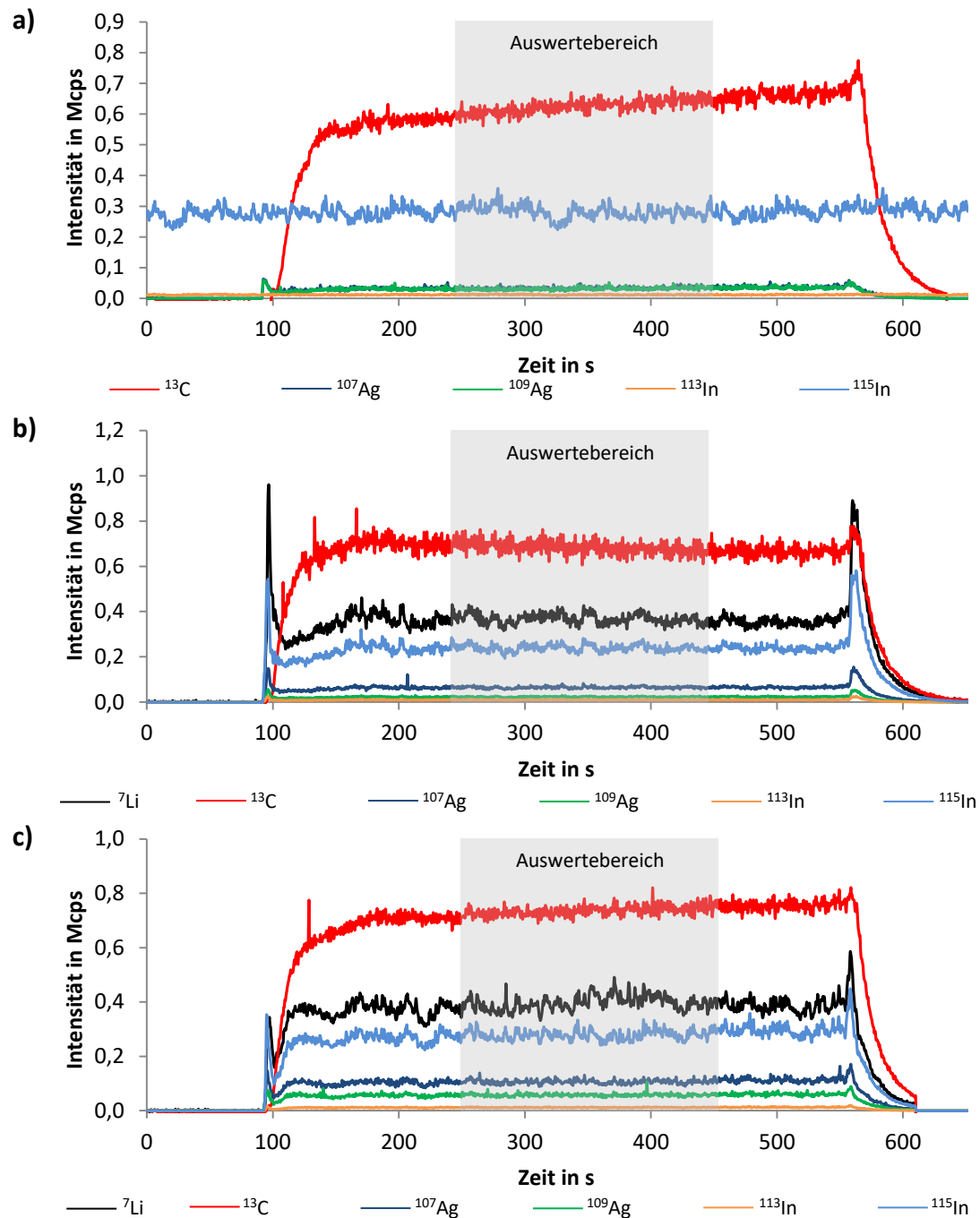


Abb. 5. 17: Untergrundkorrigierte Signalverläufe von  $^7\text{Li}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{107}\text{Ag}$ ,  $^{109}\text{Ag}$ ,  $^{113}\text{In}$  und  $^{115}\text{In}$  in Probe (a), Spike (b) und Blend (c).

Vergleichbar zu dem in Abschnitt 4.4.2 beschriebenen Vorgehen folgte die Normalisierung über  $^{115}\text{In}$  sowie die Mass-Bias-Korrektur mittels des Isotopenverhältnisses  $^{115}\text{In}/^{113}\text{In}$ . Im Anschluss daran erfolgte die Berechnung der Isotopenhäufigkeiten und Isotopenverhältnisse von Silber in der Probe, dem Spike und dem Blend. Die im Experiment ermittelten Isotopenhäufigkeiten sind in der nachfolgenden Tab. 5. 12 unter Angabe des Standardfehlers zusammengefasst.

**Tab. 5. 12: Ermittelte Mass-Bias-korrigierte Isotopenhäufigkeiten ( $\pm$  SE) in Probe, Spike und Blend (n = 20)**

Isotop	Isotopenhäufigkeit in %		
	Probe	Spike	Blend
$^{107}\text{Ag}$	52,34 $\pm$ 0,05	74,77 $\pm$ 0,02	65,95 $\pm$ 0,05
$^{109}\text{Ag}$	47,66 $\pm$ 0,05	25,23 $\pm$ 0,02	34,05 $\pm$ 0,05

Die ermittelten Isotopenhäufigkeiten unterstreichen die erfolgreiche Isotopenanreicherung im Spike. Weiterhin erscheinen die Ergebnisse plausibel, da im Spike die höchste und im Gegensatz dazu in der Probe die niedrigste Isotopenhäufigkeit von  $^{107}\text{Ag}$  ermittelt wurde. Der Blend wiederum als etwa gleichteilige Mischung von Spike und Probe zeigt – wie erwartet – eine mittlere Isotopenhäufigkeit für  $^{107}\text{Ag}$  auf.

In Tab. 5. 13 sind die ermittelten Isotopenverhältnisse mit dem Standardfehler für die festkörperbasierte Isotopenverdünnungsanalyse von Silber zusammengefasst.

**Tab. 5. 13: Ermittelte Mass-Bias korrigierte Isotopenverhältnisse ( $\pm$  SE) in Probe, Spike und Blend mit Standardfehler (n = 20)**

Isotopenverhältnis	Probe	Spike	Blend
$^{107}\text{Ag}/^{109}\text{Ag}$	1,098 $\pm$ 0,003	2,964 $\pm$ 0,005	1,937 $\pm$ 0,005
$^{109}\text{Ag}/^{107}\text{Ag}$	0,911 $\pm$ 0,003	0,337 $\pm$ 0,001	0,516 $\pm$ 0,002

Weiterhin wurden nach der Messung die Ablationsprofile im Blend nach der in Abschnitt 4.3.2 beschriebenen Vorgehensweise untersucht, um eine vollständige Ablation beider Schichten während des Experiments sicherzustellen. Dabei wurden vergleichbare Ablationstiefen ( $\geq 300 \mu\text{m}$ ) und Kraterprofile wie in Abschnitt 4.4.2 ermittelt und eine vollständige Ablation des Blends bewiesen.

**Tab. 5. 14: Verwendete Parameter für die festkörperbasierte einfache Isotopenverdünnungsanalyse von Silber**

Parameter	Isotopenverhältnis	
	$^{107}\text{Ag}/^{109}\text{Ag}$	$^{109}\text{Ag}/^{107}\text{Ag}$
$a_{x,b}$	0,477	0,523
$h_x$ in $\mu\text{m}$	3,03	3,03
$h_y$ in $\mu\text{m}$	3,55	3,55
$M_b^a$ in $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$	108,904755	106,90509
$M_x^a$ in $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$	107,8682	107,8682
$R_x$	1,098	0,911
$R_{xy}$	1,937	0,516
$R_y$	2,964	0,337
$\omega_{y,b}$ in $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	3,9	11,4

<sup>a</sup> aus CIAAW, 2016

Nachfolgend wurde die einfache festkörperbasierte Isotopenverdünnungsanalyse mit den in Tab. 5. 14 zusammengefassten Parametern nach Gl. 10 durchgeführt. Die Ergebnisse der Isotopenverdünnungsanalyse sind in der Tab. 5. 15 aufgelistet.

**Tab. 5. 15: Mittels festkörperbasierter einfacher Isotopenverdünnungsanalyse ermittelter Massenanteil von Silber in der Probe**

LA-ICP-IDMS	Massenanteil $\omega_{(Ag)}$ in $mg \cdot kg^{-1}$	Bias <sup>a</sup> in %
$^{107}Ag/^{109}Ag$	$11,5 \pm 0,7$	-3,2
$^{109}Ag/^{107}Ag$	$11,7 \pm 0,7$	-1,3
$\bar{x}$	$11,6 \pm 0,7$	-2,2
<b>zertifizierter Wert<sup>b</sup></b>	<b><math>11,9 \pm 0,2</math></b>	

<sup>a</sup> Bias = [(ermittelter Wert – Referenzwert)/Referenzwert\*100] nach KROMIDAS, 2011, <sup>b</sup> mittels ICP-IDMS nach Mikrowellenaufschluss

Die Ergebnisse der einfachen festkörperbasierten Isotopenverdünnungsanalyse von Silber überschneiden sich mit dem hausintern zertifizierten Wert mittels ICP-IDMS nach Mikrowellenaufschluss. Der Bias zum zertifizierten Wert liegt zwischen 3,2 und 1,2 %. Die Berechnung der aufgezeigten Fehler wird im nachfolgenden Abschnitt 5.4.3 behandelt. Mit den dargestellten Ergebnissen kann die Erprobung der Methode der festkörperbasierten Isotopenverdünnungsanalyse von Silber als erfolgreich betrachtet und zukünftig zur Quantifizierung eingesetzt werden. Die zusätzliche Validierung mittels eines zertifizierten Referenzmaterials war aufgrund des Mangels an einem geeigneten Standard nicht möglich. Die Bestimmung der Nachweisgrenze der Methode wurde mit einer externen Dreipunktkalibration von Dünnschichtstandards und nach der Kalibriergeradenmethode nach DIN 32645 2008 durchgeführt. Es wurde eine Nachweisgrenze für Silber von  $1,2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  unter den in Abschnitt 5.4 beschriebenen Parametern erreicht.

### 5.4.3 Unsicherheitsberechnung

Der vorliegende Abschnitt beschäftigt sich mit der Unsicherheitsberechnung der festkörperbasierten Isotopenverdünnungsanalyse von Silber mittels LA-ICP-MS. Durchgeführt wird die Unsicherheitsberechnung der einfachen Isotopenverdünnungsanalyse exemplarisch am Isotopenverhältnis  $^{107}Ag/^{109}Ag$  für die Erprobung der Methode (siehe Abschnitt 5.4.2). Die Unsicherheitsberechnungen erfolgten nach der von KRAGTEN, 1994 publizierten Methode und in Anlehnung an EURACHEM/CITAC GUIDE CG 4, 2012.

Vergleichbar zu dem Vorgehen in Abschnitt 4.4.4 wurden die Unsicherheiten der einzelnen Parameter der einfachen Isotopenverdünnungsanalyse bestimmt (siehe Gl. 10). Die

ermittelten Standardfehler der Isotopenhäufigkeiten, Isotopenverhältnisse und Schichtdickenbestimmung mittels Rasterelektronenmikroskopie sowie die erweiterte Unsicherheit der einfachen ICP-IDMS-Analyse zur Bestimmung des Massenanteiles des Spikes wurden als Einzelunsicherheiten verwendet. Die Atommassen der Silberisotope und des Elements Silber wurden aus einer Datenbank bezogen (CIAAW, 2016) und ohne Unsicherheiten eingesetzt. Durch die Anwendung der KRAGTEN-Methode wurden der Einfluss jedes einzelnen Parameters auf die Unsicherheit sowie die erweiterte Unsicherheit der gesamten Methode bestimmt. Aus den in Abschnitt 4.4.4 genannten Gründen wurde ebenfalls ein k-Faktor von 3 für die einfache Isotopenverdünnungsanalyse verwendet.

Der relative Einfluss der einzelnen Parameter für die einfache Isotopenverdünnungsanalyse und die ermittelte erweiterte Unsicherheit der Methode sind in Tab. 5. 16 aufgelistet.

**Tab. 5. 16: Einfluss der Parameter der einfachen Isotopenverdünnungsanalyse auf die Unsicherheit**

<b>Parameter</b>	<b>relative Unsicherheit in %</b>
$M_b$	0
$M_x$	0
$R_x$	3,2
$R_{xy}$	29,2
$R_y$	6,0
$a_{x,b}$	0,3
$h_x$	10,8
$h_y$	8,0
$\omega_{y,b}$	42,5
<b>LA-ICP-IDMS <math>\omega_{(Ag)}</math> in <math>mg \cdot kg^{-1}</math></b>	11,5
<b>Erweiterte Unsicherheit in <math>mg \cdot kg^{-1}</math></b>	0,7

Aus den Ergebnissen der Unsicherheitsberechnung können die Unsicherheiten des Massenanteils des Spikes und des Isotopenverhältnisses im Blend als Parameter mit dem größten Einfluss identifiziert werden. Allerdings ist auch die erweiterte Unsicherheit der gesamten Methode auf  $\approx 6\%$  abgesunken. Daher ist ein Vergleich der relativen Unsicherheiten mit Tab. 4. 20 nur eingeschränkt möglich. Aus dem Vergleich kann jedoch durch Einbeziehung der erweiterten Unsicherheit der Methode der positive Einfluss der Schichtdickenbestimmung mittels Rasterelektronenmikroskopie und der ICP-IDMS-Analyse zur Bestimmung des Massenanteiles des Spikes abgeleitet werden. Weitere Verringerungen

der erweiterten Unsicherheit wären durch die Verwendung eines anderen Typs von Massenspektrometer möglich. Der Vergleich mit anderen gängigen Quantifizierungsstrategien (vgl. Abschnitt 2.2.1 bis 2.2.8) stellt die festkörperbasierte Isotopenverdünnungsanalyse als Methode mit hoher Richtigkeit und geringer Unsicherheit dar. Die doppelte Isotopenverdünnungsanalyse wurde aufgrund des Mangels an einem geeigneten Referenzmaterial nicht durchgeführt, allerdings wäre auch hier mit einer Verringerung der erweiterten Unsicherheit zu rechnen. Die berechnete Unsicherheit gilt nicht für die Elementverteilungsbilder, da diese weder mehrfach gemessen noch gemittelt werden können. Für die Berechnung der Unsicherheit in den Elementverteilungsbildern wäre ein Referenzmaterial mit einer bekannten lokalen Änderung des Massenanteils nötig. Solche Referenzmaterialien sind leider nicht für die in dieser Arbeit untersuchten Analyten erhältlich.

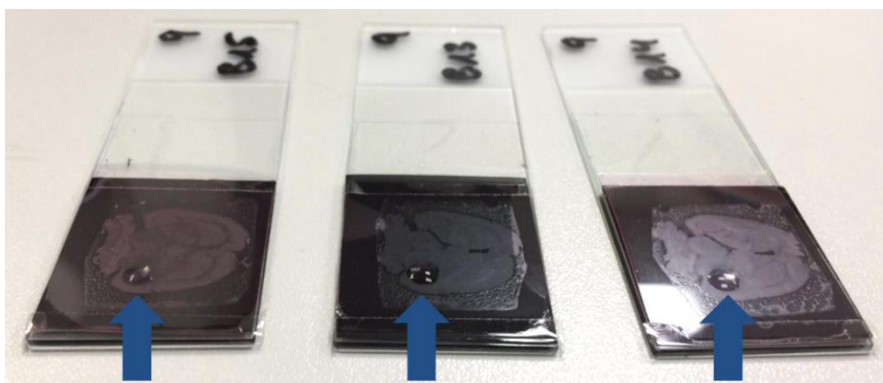
### **5.5 Anwendungsbeispiel**

Da das Hauptaugenmerk dieser Arbeit auf der Entwicklung und Erprobung der festkörperbasierten Isotopenverdünnungsanalyse lag, wird das Anwendungsbeispiel nur gekürzt behandelt.

Im Zuge dieser Arbeit wurden Dünnschnitte eines Rattengehirns der Rasse SPRAGUE DAWLEY aus einer Tierstudie, exemplarisch im Hinblick auf den Silber-Massenanteil, orts aufgelöst untersucht. Die betreffende Organprobe stammte aus einer Tierstudie, welche die potentielle Anreicherung von Implantatbestandteilen sowie deren Toxizität im Gewebe und in verschiedenen Organen der Versuchstiere untersucht. Die Organe dieser Studie waren ursprünglich für die Quantifizierung der Elementgehalte nach Totalaufschluss vorgesehen und daher nicht optimal für die orts aufgelöste Quantifizierung geeignet. Den Versuchstieren der Testgruppe wurden für einen Zeitraum von sechs Monaten jeweils sechs Prüfkörper subkutan und gleichmäßig verteilt ins Rückengewebe implantiert. Die eingesetzten Prüfkörper wurden in Form von Disks (Scheiben) mit einem Durchmesser von 10 mm und einer Höhe von 2 mm aus der Titanlegierung TiAl6V4 gefertigt. Durch plasmaelektrolytische Oxidation wurde eine poröse Oberflächenbeschichtung aus  $\text{TiO}_2$  auf die Prüfkörper aufgebracht, in welche Silbernanopartikel, die sich im Elektrolyten befanden, eingebracht waren.

Ein weiteres Gehirn einer implantatfreien Ratte aus einer anderen Tierstudie wurde verwendet, um die Methode der festkörperbasierten Isotopenverdünnungsanalyse vor der Messung der Realproben zu testen. Diese Probe wurde freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Frank Witte der Charité in Berlin zur Verfügung gestellt.

Sowohl von dem Gehirn der implantattragenden als auch von dem Gehirn der implantatfreien Ratte wurden 10 µm starke Dünnschnitte mittels Kryomikrotoms CM1860 der Fa. LEICA BIOSYSTEMS (Wetzlar) hergestellt und auf den in Abschnitt 5.2.3 präparierten Probenträgern für die festkörperbasierte Isotopenverdünnungsanalyse von Silber aufgebracht (vgl. Abb. 5. 18). Dazu wurden die Gehirne in geeigneten Probenhaltern platziert und mittels Einbett- und Fixierungsmittel (TISSUE-TEK® O.C.T.™ COMPOUND; Fa. SAKURA FINETEK GERMANY GMBH (Staufen)) unter Zuhilfenahme von flüssigem Stickstoff für die Präparation der Dünnschnitte vorbereitet. Durch Adhäsionskräfte hielten die Schnitte ohne weitere Fixierung auf den Probenträgern. Die Präparation der Dünnschnitte erfolgte dankenswerterweise an der Charité in Berlin. Bei dem Gehirn der implantattragenden Ratte traten Probleme bei dem Schneidevorgang auf. Vorher stattgefundenene Einfrier- und Auftauvorgänge der Probe führten zum Platzen von Gewebezellen und dies beeinflusste die Form und Konsistenz des Gehirns und die Qualität der Dünnschnitte, sodass beim Schneiden Risse im Gewebe auftraten. Weiterhin ist durch die mehrmaligen Einfrier- und Auftauvorgänge der ursprüngliche lokale Verbleib der Analyten fraglich. Es wurden jeweils zehn Dünnschnitte der besten Qualität für die Analyse verwendet.



**Abb. 5. 18: Aufgebrachte Tropfen der Silbernanopartikellösung auf die fixierten Dünnschnitte des Gehirns der implantatfreien Ratte auf präparierten Probenträgern für die festkörperbasierte Isotopenverdünnungsanalyse von Silber.**

Für die Testung der festkörperbasierten Isotopenverdünnungsanalyse zur Eignung für die lokale Quantifizierung des Silbermassenanteils wurde die Hälfte der Dünnschnitte des

Gehirns der implantatfreien Ratte mit einer Lösung von Silbernanopartikeln gedopt. Dafür wurde ein Tropfen der Silbernanopartikellösung auf die Dünnschnitte aufgebracht (siehe Abb. 5. 18) und eintrocknen gelassen.

Für die Messung der Elementverteilungsbilder wurde ein ns-Lasersystem (UP-213-2078, Fa. NEW WAVE RESEARCH INC., Fremont, USA) sowie ein Quadrupol-Massenspektrometer (XSERIE 2, Fa. THERMO FISHER SCIENTIFIC GMBH, Bremen) verwendet. Als Ablationszelle diente wiederum die hauseigene Kammer aus der Arbeit von LEHMANN, 2011. Die Ablation der Proben erfolgte durch Linienscans mit einer Scangeschwindigkeit von  $30 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ , einer Länge von 5.000 - 20.000  $\mu\text{m}$ , einem Abstand zwischen den einzelnen Linien von 150  $\mu\text{m}$  und einem Laserspotdurchmesser von 100  $\mu\text{m}$ . Der Laser wurde auf die Probenoberfläche fokussiert. Die Schussfrequenz des gepulsten Lasers betrug 20 Hz bei einer Laserfluenz von ca.  $3,7 \text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$ . Das ablatierte Probenmaterial wurde mittels Heliumgasstrom ( $1,16 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ ) zum Massenspektrometer transportiert. Die Einstellung der Laserparameter erfolgte ebenfalls in Anlehnung an THIELEKE, 2013. Gemessen wurden die Isotope  $^7\text{Li}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{25}\text{Mg}$ ,  $^{26}\text{Mg}$ ,  $^{64}\text{Zn}$ ,  $^{66}\text{Zn}$ ,  $^{68}\text{Zn}$ ,  $^{107}\text{Ag}$ ,  $^{109}\text{Ag}$ ,  $^{113}\text{In}$  und  $^{115}\text{In}$  mit einer Dwellzeit von 20 ms. Durch die konstante Einleitung von  $0,17 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  verdünnter Salpetersäure (2,5 Gew.-%, *subboiled*) wurde das Plasma angefeuchtet. Die Indiumsignale wurden für die Korrektur des Mass-Bias verwendet. Die weiteren eingestellten Parameter des ICP-MS sind in Tab. 8. 3 aufgelistet.

Die Auswertung der gemessenen Intensitäten umfasste die Untergrundkorrektur, die Normalisierung über  $^{113}\text{In}$  sowie die Korrektur des Mass-Bias und wurde analog zu der in Abschnitt 5.4.2 angewendeten Vorgehensweise durchgeführt. Die Isotopenverhältnisse wurden mittels gleitenden Mittelwert, mit einer Fensterbreite von 0,5 % der Anzahl der Messpunkte einer Linie, geglättet. Die Auswertung und Erzeugung der Elementverteilungsbilder wurden mit der Software ORIGIN 9.1 der Fa. ORIGINLAB (Northampton, USA) durchgeführt.

In Abb. 5. 19 sind die repräsentativen Elementverteilungsbilder von  $^{25}\text{Mg}$  und  $^{64}\text{Zn}$  sowie das ortsaufgelöste Isotopenverhältnis von  $^{107}\text{Ag}/^{109}\text{Ag}$  und die quantifizierte Silberverteilung in dem Gehirn der implantatfreien Ratte dargestellt. Zur besseren Verständlichkeit der Ergebnisse ist die Übersichtsaufnahme des Digitalmikroskops mit abgebildet.



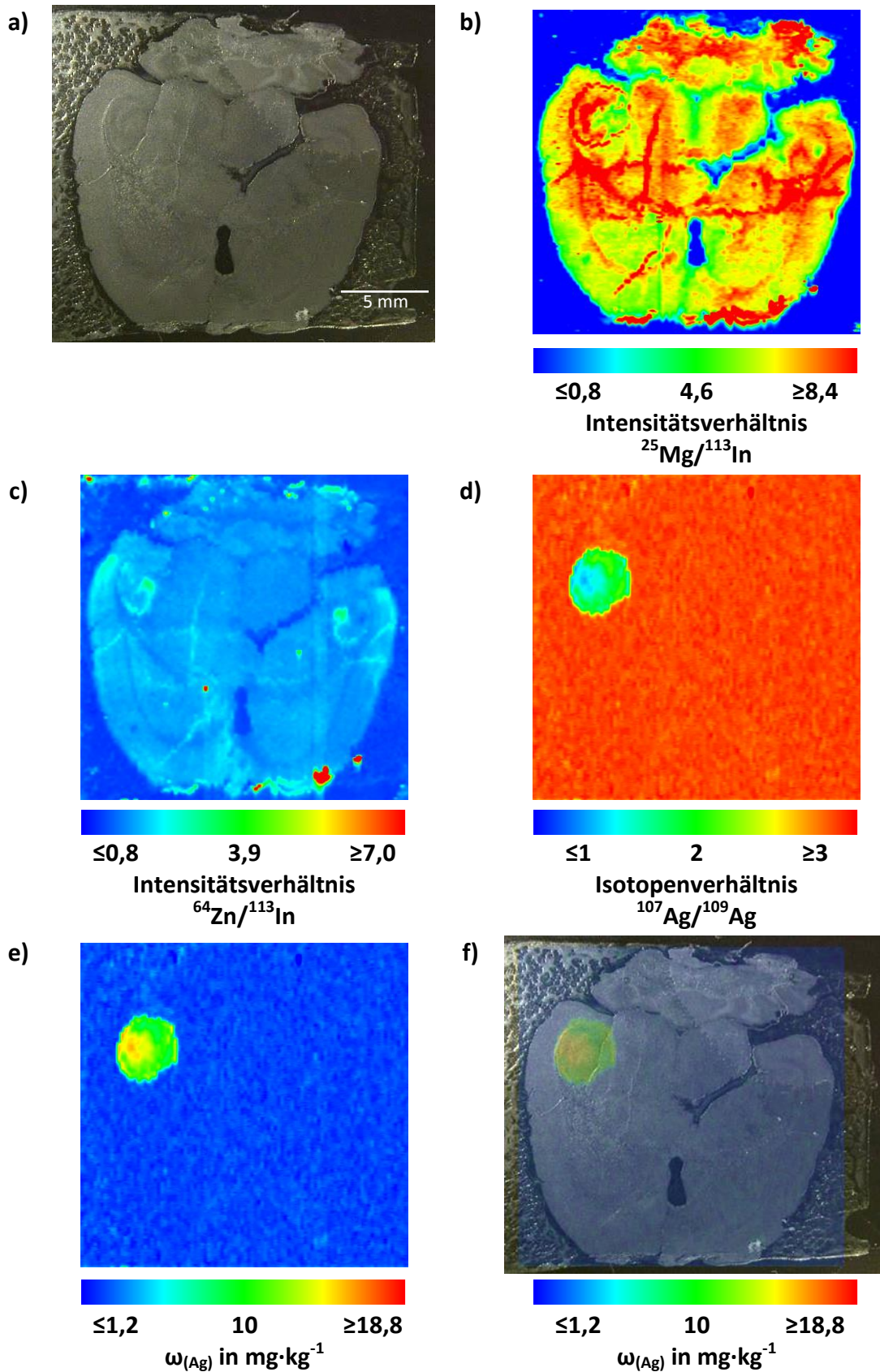


Abb. 5.19: Elementverteilung im Gehirnschnitt; Übersichtsaufnahme mittels Digitalmikroskop (a), normalisierte  $^{25}\text{Mg}$ -Verteilung (b), normalisierte  $^{64}\text{Zn}$ -Verteilung (c), ortsaufgelöstes Isotopenverhältnis von  $^{107}\text{Ag}/^{109}\text{Ag}$  (d), quantifizierte Silberverteilung (e) und überlagerte Darstellung aus der ermittelten Silberverteilung und der Übersichtsaufnahme des Gehirnschnitts (f).

Die Elementverteilungsbilder von  $^{25}\text{Mg}$  und  $^{64}\text{Zn}$  dienen als Marker für die Gehirnstruktur und weisen einen hohen Detailgrad auf. Weiterhin spiegeln diese die unterschiedliche lokale Verteilung der Analyten wider. Damit werden der qualitative Nachweis und auch die mögliche Quantifizierung weiterer Analyten, z. B. mittels externer Kalibration, als Ergänzung der festkörperbasierten Isotopenverdünnungsanalyse deutlich. In der Darstellung der orts aufgelösten Isotopenverhältnisse von  $^{107}\text{Ag}/^{109}\text{Ag}$  ist der eingetrocknete Tropfen der Silbernanopartikellösung als Erniedrigung der Isotopenverhältnisse erkennbar. Denn durch vorhandenes Silber in der Probe mit einer natürlichen Häufigkeitsverteilung der Isotope wird das Isotopenverhältnis des Spikes erniedrigt, und es stellt sich in dem vorliegenden Blend ein mittleres Isotopenverhältnis ein. Die Darstellung der quantifizierten Silberverteilung wurde nach Durchführung einer Isotopenverdünnungsanalyse an jedem Messpunkt mit anschließender Glättung erhalten. Aus der Darstellung kann ein mittlerer Silbergehalt von  $\approx 10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  in dem eingetrockneten Tropfen festgestellt werden. Der maximale bzw. minimale bestimmte Silbergehalt in dem eingetrockneten Tropfen betrug  $\approx 20$  bzw.  $\approx 5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ . Die überlagerte Darstellung aus der ermittelten Silberverteilung und der Übersichtsaufnahme des Gehirnschnitts korreliert logischerweise mit dem Auftragungsort der Silbernanopartikellösung (vgl. Abb. 5. 18).

In Abb. 5. 20 sind die Ergebnisse der Analyse des Gehirns der implantattragenden Ratte abgebildet. Die Elementverteilungsbilder von  $^{25}\text{Mg}$  und  $^{64}\text{Zn}$  weisen im Gegensatz zu Abb. 5. 19 keine erkennbare Struktur auf. Dies ist vermutlich auf die mehrfachen Einfrier- und Auftauvorgänge der Probe zurückzuführen, welche zum Platzen von Gewebezellen führten und die ursprüngliche Verteilung der Analyten verschmierte. Anhand der Darstellungen der Isotopenverhältnisse von  $^{107}\text{Ag}/^{109}\text{Ag}$  und der quantifizierten Silberverteilung nach der Isotopenverdünnungsanalyse konnte kein Silber in dem Gehirn nachgewiesen werden. Sowohl die Isotopenverhältnisse als auch die quantifizierte Silberverteilung zeigten einen gleichmäßigen Verlauf über die gesamte Probe auf. Auch bei optimaler Präparation der Dünnschnitte wäre der Nachweis von Silbernanopartikeln fraglich, da die Laserablation zu nachweisschwach für die Analyse von Nanopartikeln ist. Nur bei ausreichend hoher lokaler Akkumulation der Nanopartikel im Gewebe könnten diese nachgewiesen und quantifiziert werden. Dabei spielt der Anteil der Nanopartikel, die die Blut-Hirn-Schranke überwinden können, dahingehend eine große Rolle, ob der Nachweis mittels LA-ICP-MS gelingt. Wie groß der Anteil der Nanopartikel im Gehirn in Abhängigkeit

zur aufgenommenen Dosis ist, ist ungeklärt. Nur die Tatsache, dass Nanopartikel die Blut-Hirn Schranke überwinden können, ist bewiesen (TANG ET AL., 2008; CRAMER ET AL., 2014).

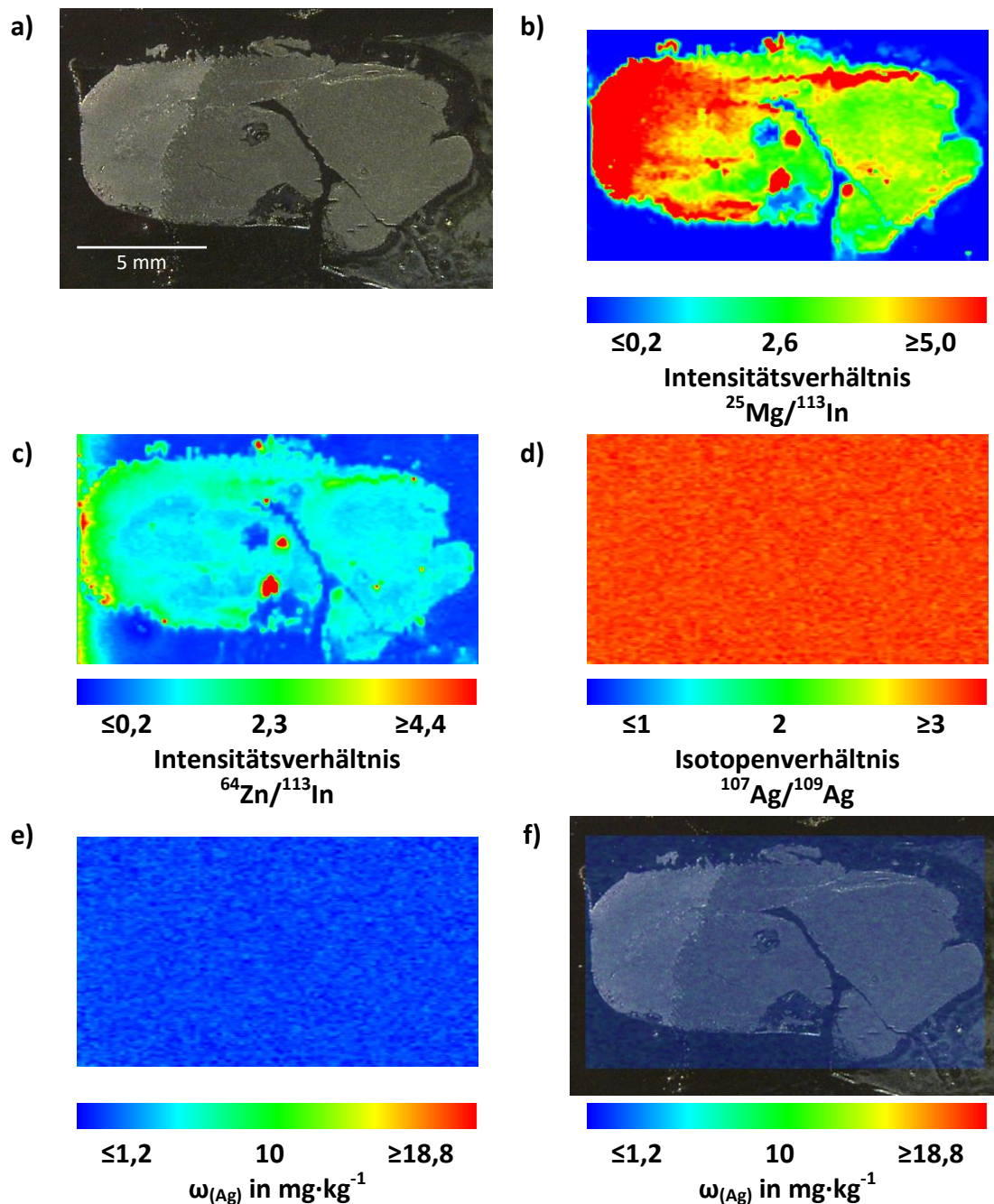


Abb. 5. 20: Elementverteilung im Dünnschnitt eines Gehirns einer implantattragenden Ratte; Übersichtsaufnahme mittels Digitalmikroskop (a), normalisierte  $^{25}\text{Mg}$ -Verteilung (b), normalisierte  $^{64}\text{Zn}$ -Verteilung (c), ortsaufgelöstes Isotopenverhältnis von  $^{107}\text{Ag}/^{109}\text{Ag}$  (d), quantifizierte Silberverteilung (e) und überlagerte Darstellung aus der ermittelten Silberverteilung und der Übersichtsaufnahme des Gehirnschnitts (f).

Das Anwendungsbeispiel unterstreicht die Einsetzbarkeit der festkörperbasierten Isotopenverdünnungsanalyse für die Lokalisierung und Quantifizierung von Elementgehalten im  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  Bereich in biologischen Proben. Damit stellt die Methode eine Ergänzung der verschiedenen herkömmlichen Quantifizierungsstrategien der LA-ICP-MS dar.



# 6

---

## Zusammenfassung und Ausblick

---

Bei der LA-ICP-MS handelt es sich um eine leistungsstarke Analysentechnik für die orts aufgelöste Analyse von Elementverteilungen und deren Quantifizierung in biologischen Proben. Dennoch gestaltet sich die genaue und richtige Quantifizierung aufgrund der probenabhängigen Matrixeffekte als schwierig und ist fehlerbehaftet. Die Wahl der eingesetzten Kalibrationsstrategie hat einen großen Einfluss auf die Richtigkeit und Unsicherheit der Quantifizierung. Weiterhin sind durch die spezifischen Matrixeffekte viele gängigen Kalibrationsstrategien nur für eine Probenmatrix einsetzbar und daher deren Verwendung bei Proben mit verschiedenen Matrices mit einem erhöhten präparativen Aufwand verbunden.

Daher wurde das von THIELEKE, 2013 entwickelte Verfahren für die matrixunabhängige Kalibrationsstrategie im Rahmen dieser Arbeit ausführlich im Hinblick auf die universelle Einsetzbarkeit für kohlenstoffhaltige biologische Proben getestet und bezüglich der Richtigkeit bei abweichendem Kohlenstoffgehalt zwischen Probe und Standards überprüft. Dazu wurden Kalibrationsreihen aus Festkörperstandards mit variierenden Kupfergehalten hergestellt. Als Matrices dienten sechs verschiedene kohlenstoffhaltige Materialien. Zusätzlich wurde Yttrium zur internen Standardisierung mit einem gleichbleibenden Gehalt hinzudotiert. Bei der Charakterisierung der Festkörperstandards, welche die Quantifizierung der Elementgehalte und die Homogenitätsbestimmungen der Elementverteilung umfasste, wurde eine unzureichende Homogenität der Elementverteilung in einigen Matrices festgestellt. Die pulvrigen Matrices Cystein und das homogenisierte Pflanzenmaterial wiesen dabei die geringste Homogenität auf. Hingegen wurde die homogenste Elementverteilung in der Polymer- und Paraffinmatrix festgestellt. Diese Ergebnisse spiegeln die Komplexität bei der Präparation von geeigneten Festkörperstandards wider, denn nicht alle Materialien sind hierzu geeignet. Der Einsatz von homogenisiertem Pflanzenmaterial zur Herstellung von Festkörperstandards kann dem Kalibrationsverfahren mit der Verwendung von gedopten Biomaterialien zugeordnet werden und verdeutlicht die Problematik bei der Verwendung jener Festkörperstandards für eine genaue Quantifizierung. Bei der Überprüfung der matrixunabhängigen Kalibrationsstrategie konnte kein signifikanter Unterschied bei der Normalisierung über das Matrixelement Kohlenstoff im Vergleich zu dem hinzudotierten Element Yttrium mit einem Massenanteil im Spurenbereich festgestellt werden. Sowohl unter der Verwendung des Elements Kohlenstoff als auch unter der Verwendung von Yttrium wurde eine Richtigkeit von  $\approx 95\%$  für die Analyse des Kupfermassenanteils in einer

homogenisierten Bulkprobe erreicht. Anhand der Ergebnisse kann die in der Wissenschaftsgemeinde kontrovers diskutierte Untauglichkeit von Kohlenstoff für die Normalisierung nicht bestätigt werden. Bei der Durchführung der Unsicherheitsberechnung wurde eine relative Unsicherheit von 5 – 12 % ermittelt. Damit erscheint die Methode der matrixunabhängigen Kalibrationsstrategie für eine Vielzahl an diversen kohlenstoffhaltigen Proben als äußerst vielversprechend und umfangreich einsetzbar. Allerdings wird bei dieser Kalibrationsstrategie der möglicherweise lokal variierende Kohlenstoffanteil der Probe nicht berücksichtigt, was einen enormen Einfluss auf die Richtigkeit der Methode hat. Daher sollte diese Methode nur für Proben mit einer geringen lokalen Variation des Kohlenstoffanteils angewendet werden.

Weiterhin wurde im Rahmen dieser Dissertation eine weitere Kalibrationsstrategie entwickelt. Die Grundlage dieses Verfahrens beruht auf einer Kombination gängiger Kalibrationsstrategien für die LA-ICP-MS, wie der Kalibration mit Dünnschichtstandards, der internen Standardisierung sowie der Isotopenverdünnungsanalyse und vereint deren Vorteile. Durch die gleichzeitige Ablation des Probendünnschnittes und der Dünnschicht des isotopenangereicherten Spikes kann die bestmögliche quasi-interne Standardisierung durchgeführt und ein Großteil der Matrixeffekte korrigiert werden. Da die Isotopenverdünnungsanalyse anhand eines Feststoffes durchgeführt wird, ist ein vergleichbarer Atomisierungs- und Ionisierungsprozess von Probe und Spike zu erwarten, was zu einer Angleichung des Prozesses bei der Erzeugung des analytischen Signals führt. Außerdem wird die Richtigkeit der Methode durch den Einsatz der Isotopenverdünnungsanalyse deutlich erhöht. Die daraus resultierende Kalibrationsstrategie der festkörperbasierten Isotopenverdünnungsanalyse wurde an zwei Elementen, Blei und Silber, erprobt.

Dazu wurde ein Verfahren zur Isotopenanreicherung von kommerziell erhältlichen Einzelelementstandards auf Ölbasis entwickelt: Als Ausgangsmaterial hierfür dienten bereits isotopenangereicherte Feststoffe der zu untersuchenden Elemente. Weiterhin wurde ein modifiziertes Präparationsverfahren zur Herstellung der benötigten Schichtsysteme mit Schichtdicken von einigen Mikrometern angewendet. Durch die Charakterisierung der präparierten Schichtsysteme konnte die modifizierte Vorgehensweise bei der Präparation als geeignetes Verfahren zur Herstellung der für die festkörperbasierte

Isotopenverdünnungsanalyse benötigten Schichtsysteme eingestuft werden. Die Charakterisierung der Schichtsysteme umfasste die Quantifizierung der Elementgehalte mittels ICP-OES und ICP-IDMS, die Schichtdickenbestimmung mittels LM und REM sowie die Homogenitätsbestimmungen der Elementverteilung und der Isotopenverhältnisse mittels LA-ICP-MS. Die präparierten Schichtsysteme zeigten eine ausreichende Homogenität der Elementverteilung und der Isotopenverhältnisse sowie eine homogene Schichtdicke.

Die Erprobung der festkörperbasierten Isotopenverdünnungsanalyse wurde zunächst am Element Blei anhand einer einfachen ID durchgeführt. Dazu wurde eine synthetische mit Blei gedoppte Dünnschicht auf Basis der Acrylatlackmatrix als Probe verwendet. Bei dem Experiment wurde eine mittlere Richtigkeit von  $\geq 99\%$  erreicht. Die Validierung der Methode wurde im Anschluss an einem Dünnschnitt des zertifizierten Referenzmaterials BAM-H010 mittels doppelter festkörperbasierter Isotopenverdünnungsanalyse durchgeführt. Auch bei der Validierung wurde eine mittlere Richtigkeit von  $\geq 99\%$  erreicht und damit die Leistungsfähigkeit der Methode unter Beweis gestellt. Bei der Unsicherheitsberechnung nach der KRAGTEN-Methode wurde eine erweiterte Unsicherheit von  $\leq 10\%$  für die einfache ID und  $\approx 8\%$  bei der doppelten ID ermittelt. Als Quellen mit dem größten Einfluss auf die Unsicherheit wurden die Schichtdickenbestimmung mittels LM und die Quantifizierung der Elementgehalte mittels ICP-OES identifiziert.

Weiterhin wurde die festkörperbasierte Isotopenverdünnungsanalyse für eine Realprobe angewendet. Dabei wurde der Massenanteil von Blei orts aufgelöst in Blättern der *ARABIDOPSIS HALLERI* und der *ARABIDOPSIS THALIANA* analysiert. Es konnte eine deutliche Akkumulation von Blei in den Blättern, vor allem in den Blattadern, der *ARABIDOPSIS HALLERI* im Vergleich zur *ARABIDOPSIS THALIANA* festgestellt werden. Die Elementverteilungsbilder von Blei zeigten einen hohen Detailgrad und spiegelten die Struktur des Blattes mit den einzelnen Adern wider. Damit konnte die Einsatzfähigkeit der Methode für die Lokalisierung und Quantifizierung von Elementverteilungen in biologischen Proben bewiesen werden.

Außerdem wurde die festkörperbasierte Isotopenverdünnungsanalyse in Kapitel 5 für das Element Silber angewendet. Das entwickelte Verfahren zur Isotopenanreicherung sowie das modifizierte Präparationsverfahren zur Herstellung der benötigten Schichtsysteme konnte ebenfalls erfolgreich für das Element Silber implementiert werden. Bei der Charakterisierung der Schichtsysteme wurde die Lichtmikroskopie durch die Rasterelektronenmikroskopie



ersetzt und für die Bestimmung des Massenanteils wurde die ICP-IDMS statt der ICP-OES verwendet. Beide Verfahren wurden zur Reduzierung der erweiterten Unsicherheit der Methode eingesetzt.

Die Validierung der Methode wurde an einer synthetischen, mit Silber gedopten Dünnschicht auf Basis der Acrylatlackmatrix durchgeführt. Dabei wurde eine mittlere Richtigkeit von  $\approx 98\%$  erreicht. Unter der Anwendung der KRAGTEN-Methode wurde eine erweiterte Unsicherheit für die einfache festkörperbasierte Isotopenverdünnungsanalyse von  $\approx 6\%$  berechnet. Damit konnte die Reduzierung der erweiterten Unsicherheit, durch den Einsatz der ICP-IDMS und der REM bei der Charakterisierung der Schichtsysteme, erfolgreich durchgeführt werden.

Weiterhin wurde die Methode für die Lokalisierung und Quantifizierung von Silber in den Gehirnen von implantattragenden Ratten exemplarisch eingesetzt. Die verwendeten Implantate waren mit Silber, aufgrund seiner antimikrobiellen Wirkung, dotiert. Bei der Analyse wurde zunächst ein Dünnschnitt eines Gehirns einer implantatfreien Ratte mit Silber dotiert und gemessen. Durch dieses Vorgehen konnte die Methode ihr Potenzial für die Lokalisierung und Quantifizierung von Silber in Gewebeschnitten unter Beweis stellen. Im Anschluss daran wurde ein Dünnschnitt von einem Gehirn einer implantattragender Ratte untersucht. Dabei konnte kein Silber in der Probe nachgewiesen werden. Die Nachweisgrenze von Silber betrug  $1,2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ .

Beide in dieser Arbeit beschriebenen Kalibrationsstrategien sind für die orts aufgelöste Analyse von Elementverteilungen geeignet und ergänzen den Pool an Kalibrationsstrategien für die Analyse mittels LA-ICP-MS von biologischen Proben. Die matrixunabhängige Kalibrationsstrategie stellt dabei eine einfach zu etablierende und relativ universell einsetzbare Vorgehensweise dar, welche für Anwendungen mit größeren tolerierbaren Fehlern geeignet ist. Im Gegensatz dazu ist die festkörperbasierte Isotopenverdünnungsanalyse eine Methode mit dem Potenzial zum Einsatz für die Zertifizierung von lokal variierenden Massenanteilen in Referenzmaterialien und für die Analyse von biologischen Proben. Weiterhin konnte durch die Erprobung, Validierung und Anwendung der festkörperbasierten Isotopenverdünnungsanalyse die Leistungsfähigkeit dieser Methode untersucht und bestätigt werden. Im Vergleich mit den gängigen

Kalibrationsstrategien zeichnet sich die Methode durch eine erhöhte Richtigkeit und eine verminderte Unsicherheit aus (siehe Tab. 6. 1).

**Tab. 6. 1: Mittlere Richtigkeit und Unsicherheit der verschiedenen Kalibrationsstrategien für die LA-ICP-MS**

<b>Kalibrationsverfahren</b>	<b>Richtigkeit in %</b>	<b>Unsicherheit in %</b>
<b>zertifizierte Referenzmaterialien</b>	≈ 95	5 - 10
<b>interne Standardisierung</b>	85 - 90	10 - 25
<b>Kalibration mit Flüssigstandards</b>	≥ 90	≈ 10
<b>gedopte Biomaterialien</b>	85 - 95	10 - 25
<b>matrixangepasste Standards</b>	≥ 85	10 - 20
<b>matrixunabhängige Kalibrationsstrategie</b>	≈ 95	5 - 12
<b>Kalibration mit Dünnschichtstandards</b>	≈ 80	12 - 25
<b>Isotopenverdünnungsanalyse mittels Laserablation</b>	≥ 95	≤ 8
<b>festkörperbasierte Isotopenverdünnungsanalyse</b>	≥ 97	6 - 10

In zukünftigen Forschungsarbeiten sollte der Einfluss der Femtosekunden-Laserablation für die beiden vorgestellten Kalibrationsstrategien untersucht werden. Durch die deutlich verringerten Matrixeffekte der Probe könnte die Richtigkeit bei der Analyse erhöht werden, da die lokalen Einflüsse der Probenmatrix reduziert werden und die Atomisierung und Ionisierung der ablatierten Partikel vollständiger und ohne Fraktionierung stattfindet. Die Verwendung eines Flugzeit- (TOF) oder Multikollektormassenspektrometers (MC-MS) bei der festkörperbasierten Isotopenverdünnungsanalyse könnte die Unsicherheit der Methode weiter reduzieren, da durch die simultane Messung der einzelnen Isotope eine präzisere Bestimmung der Isotopenverhältnisse durchgeführt werden könnte. Durch den Einsatz von Lasern mit einer höheren Fluenz könnte die Ablationstiefe bei geringeren Laserspotdurchmessern erhöht und damit die Ortsauflösung verbessert sowie die Analysendauer reduziert werden.

Weiterhin sollte die Langzeitstabilität der Schichtsysteme untersucht werden, da in den Arbeiten von SCHWARTZE, 2013 und DREYER, 2016 eine Diffusion des Lithiums in ursprünglich

lithiumfreie Schichten festgestellt wurde. Deshalb sollte eine mögliche Diffusion der in dieser Arbeit verwendeten Elemente ebenfalls untersucht werden, da die Diffusion des Spikes drastische Auswirkungen auf die Richtigkeit der Isotopenverdünnungsanalyse zur Folge hat. Sollte eine Diffusion festgestellt werden, müssten die Schichtsysteme für jede Analyse neu hergestellt werden, was den Präparationsaufwand enorm vergrößern würde.



---

## Literaturverzeichnis

---

- ABENDROTH, 2013:** Abendroth, P. 2013. *Untersuchungen zur Freisetzung von Silber aus implantatgebundenen Beschichtungen*. Hannover : Leibniz Universität Hannover, 2013. Masterarbeit.
- AGATEMOR ET AL., 2011:** Agatemor, C. und Beauchemin, D. 2011. Matrix effects in inductively coupled plasma mass spectrometry: a review. *Anal Chim Acta*. 2011, 706.
- ANDRÉN ET AL., 2004:** Andrén, H. et al. 2004. Sources of mass bias and isotope ratio variation in multi-collector ICP-MS. Optimization of instrumental parameters based on experimental observations. *J. Anal. At. Spectrom.* 2004, 19.
- ASHARANI ET AL., 2009:** Asharani, P. V., Hande, M. P. und Valiyaveetil, S. 2009. Anti-proliferative activity of silver nanoparticles. *BMC Cell Biology*. 2009.
- ASTON, 1922:** Aston, F. W. 1922. Mass spectra and isotopes. *Nobel Lectures Chemistry*. 1922.
- AUSTIN ET AL., 2011:** Austin, C. et al. 2011. Factors affecting internal standard selection for quantitative elemental bio-imaging of soft tissues by LA-ICP-MS. *J. Anal. At. Spectrom.* 2011, 26.
- AUSTIN ET AL., 2010:** Austin, C. et al. 2010. Quantification method for elemental bio-imaging by LA-ICP-MS using metal spiked PMMA films. *J. Anal. At. Spectrom.* 2010, 25.
- BAKER ET AL., 2004:** Baker, J. et al. 2004. Pb isotopic analysis of standards and samples using a <sup>207</sup>Pb–<sup>204</sup>Pb double spike and thallium to correct for mass bias with a double-focusing MC-ICP-MS. *Chemical Geology*. 2004, 3.
- BAM-H010 A, 2014:** BAM-H010. 2014. Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung. Berlin : BAM, 2014. Analysenzertifikat.
- BAM-H010 B, 2014:** BAM-H010. 2014. Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung. Berlin : BAM, 2014. Zertifizierungsbericht.
- BECKER, 2002:** Becker, J. S. 2002. Applications of inductively coupled plasma mass spectrometry and laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry in materials science. *Spectrochim Acta B At Spectrosc.* 2002, 57.
- BECKER, 2010:** Becker, J. S. 2010. Bioimaging of metals in brain tissue from micrometre to nanometre scale by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry: State of the art and perspectives. *Int. J. Mass Spectrom.* 2010, 289.
- BECKER, J. S. ET AL. 2005:** Becker, J. S. et al. 2005. Imaging of Copper, Zinc, and Other Elements in Thin Section of Human Brain Samples (Hippocampus) by Laser Ablation Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* 2005, 77.
- BECKER ET AL., 2005:** Becker, J. S. et al. 2005. Investigation of Cu-, Zn- and Fe-containing human brain proteins using isotopic-enriched tracers by LA-ICP-MS and MALDI-FT-ICR-MS. *Int. J. Mass Spectrom.* 2005, 242.
- BECKER ET AL., 2008:** Becker, J. S. et al. 2008. Quantitative images of metals in plant tissues measured by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry. *Spectrochim. Acta, Part B*. 2008, 63.

- BECKER ET AL., 2014:** Becker, J. S., Matusch, A. und Wu, B. 2014. Bioimaging mass spectrometry of trace elements – recent advance and applications of LA-ICP-MS: A review. *Analytica Chimica Acta*. 2014, 835.
- BECKER ET AL., 2004:** Becker, J. S., Pickhardt, C. und Pompe, W. 2004. Determination of Ag, Tl, and Pb in few milligrams of platinum nanoclusters by on-line isotope dilution in laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry. *Int. J. Mass Spectrom.* 2004, 237.
- BELLIS ET AL., 2010:** Bellis, D. J. und Santamaria-Fernandez, R. 2010. Ink jet patterns as model samples for the development of LA-ICP-SFMS methodology for mapping of elemental distribution with reference to biological samples. *J. Anal. At. Spectrom.* 2010, 25.
- BELLIS ET AL., 2006:** Bellis, D. J. et al. 2006. Calibration of laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry for quantitative measurements of lead in bone. *J. Anal. At. Spectrom.* 2006, 21.
- BERGLUND, 2004:** Berglund, M. 2004. Introduction to Isotope Dilution Mass Spectrometry (IDMS). [Buchverf.] P. A. De Groot. *Handbook of Stable Isotope Analytical Techniques*. Amsterdam : Elsevier B.V., 2004.
- BERGLUND ET AL., 2011:** Berglund, M. und Wieser, M. E. 2011. Isotopic compositions of the elements 2009 (IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem.* 2011, 83.
- BODE, 2016:** Bode, J. 2016. *Quantifizierung von Implantatbestandteilen in biologischer Matrix*. Hannover : Leibniz Universität Hannover, 2016. Masterarbeit.
- BOGAERTS ET AL., 2003:** Bogaerts, A. et al. 2003. Laser ablation for analytical sampling: what can we learn from modeling? *Spectrochimica Acta B*. 2003, 58.
- BONTA ET AL., 2014:** Bonta, M. et al. 2014. Application of gold thin-films for internal standardization in LA-ICP-MS imaging experiments. *Analyst*. 2014, 139.
- BOYER, 2015:** Boyer, N. 2015. *Festkörperbasierte Isotopenverdünnung mittels LA-ICP-MS*. Hannover : Leibniz Universität Hannover, 2015. Forschungspraktikum.
- BROCK ET AL., 2012:** Brock, T. et al. 2012. *Lehrbuch der Lacktechnologie*. Hannover : Vincentz Network GmbH & Co. KG, 2012.
- BYRNE ET AL., 2010:** Byrne, S. et al. 2010. Were Chinchorros exposed to arsenic? Arsenic determination in Chinchorro mummies' hair by laser ablation inductively coupled plasma-mass spectrometry (LA-ICP-MS). *Microchem. J.* 2010, 94.
- CAMMANN, 2001:** Cammann, K. 2001. *Instrumentelle analytische Chemie: Verfahren, Anwendungen und Qualitätssicherung*. Heidelberg : Spektrum Akademischer Verlag, 2001.
- CASTRO ET AL., 2010:** Castro, W. et al. 2010. Application of laser ablation (LA-ICP-SF-MS) for the elemental analysis of bone and teeth samples for discrimination purposes. *Forensic Sci. Int.* 2010, 195.

- CAUMETTE ET AL., 2007:** Caumette, G. et al. 2007. Monitoring the Arsenic and Iodine Exposure of Seaweed-Eating North Ronaldsay Sheep from the Gestational and Suckling Periods to Adulthood by Using Horns as a Dietary Archive. *Environ. Sci. Technol.* 2007, 41.
- CHEN, 2015:** Chen, X. 2015. *Entwicklung einer Matrix unabhängigen Kalibrationsstrategie für LA-ICP-MS*. Hannover : Leibniz Universität Hannover, 2015. Masterarbeit.
- CHEN, 1995:** Chen, X. 1995. *Matrix effects in inductively coupled plasma mass*. Ames : Iowa State University, 1995. Dissertation.
- CHI ET AL., 2002:** Chi, P.-H. et al. 2002. Direct impurity analysis of semiconductor photoresist samples with laser ablation ICP-MS. *J. Anal. At. Spectrom.* 2002, 17.
- CIAAW, 2016:** CIAAW. 2016. *Commission on Isotopic Abundances and Atomic Weights*. [Online] 2016. [Zitat vom: 22. September 2016.] <http://www.ciaaw.org/>.
- CLAVERIE ET AL., 2013:** Claverie, F. et al. 2013. Putting a spin on LA-ICP-MS analysis combined to isotope dilution. *Anal Bioanal Chem.* 2013, 405.
- CRAMER ET AL., 2014:** Cramer, S. et al. 2014. The Influence of Silver Nanoparticles on the Blood-Brain and the Blood-Cerebrospinal Fluid Barrier in vitro. *J Nanomed Nanotechnol.* 2014, 5.
- CROMWELL ET AL., 1995:** Cromwell, F., E. und Arrowsmith, P. 1995. Fractionation effects in laser-ablation inductively-coupled plasma-mass spectrometry. *Appl. Spectrosc.* 1995, 49.
- DALPÉ ET AL., 2010:** Dalpé, C. et al. 2010. Trace Element Analysis of Rough Diamond by LA-ICP-MS: A Case of Source Discrimination? *J. Forensic Sci.* 2010, 55.
- DECONINCK ET AL., 2006:** Deconinck, I. et al. 2006. Capabilities of laser ablation-inductively coupled plasma mass spectrometry for (trace) element analysis of car paints for forensic purposes. *J. Anal. At. Spectrom.* 2006, 21.
- DELFINO ET AL., 2011:** Delfino, R. et al. 2011. X-ray fluorescence elemental mapping and microscopy to follow hepatic disposition of a Gd-based magnetic resonance imaging contrast agent. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 2011, 38.
- DEMPSTER, 1918:** Dempster, A. J. 1918. A new Method of Positive Ray Analysis. *Phys. Rev.* 1918, 11.
- DIN 1319-3, 1996:** DIN 1319-3. 1996. Deutsches Institut für Normung e. V. Berlin : DIN, Mai 1996.
- DIN 32645, 2008:** DIN 32645. 2008. Deutsches Institut für Normung e. V. Berlin : DIN, November 2008.
- DIN 38402-51, 2015:** DIN 38402-51. 2015. Deutsches Institut für Normung e. V. Berlin : DIN, September 2015.
- DIN EN 16801, 2016:** DIN EN 16801. 2016. Deutsches Institut für Normung e. V. Berlin : DIN, 2016.



- DIN EN ISO 1463, 2004:** DIN EN ISO 1463. 2004. Deutsches Institut für Normung e. V. Berlin : DIN, August 2004.
- DiRESTA ET AL., 1990:** DiResta, G. R. et al. 1990. Measurement of brain tissue density using pycnometry. [Buchverf.] H.-J. Reulen et al. *Brain Edema VIII- Acta Neurochirurgica*. Luxemburg : Springer Science+Business Media S.A., 1990.
- DOBROWOLSKA ET AL., 2008:** Dobrowolska, J. et al. 2008. Quantitative imaging of zinc, copper and lead in three distinct regions of the human brain by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry. *Talanta*. 2008, 74.
- DOUGLAS ET AL., 2016:** Douglas, D. N. et al. 2016. Quantitation of the Fe spatial distribution in biological tissue by online double isotope dilution analysis with LA-ICP-MS: a strategy for estimating measurement uncertainty. *J. Anal. At. Spectrom.* 2016, 31.
- DRESCHER ET AL., 2012:** Drescher, D. et al. 2012. Quantitative Imaging of Gold and Silver Nanoparticles in Single Eukaryotic Cells by Laser Ablation ICP-MS. *Anal. Chem.* 2012, 84.
- DRESSLER ET AL., 2010:** Dressler, V. L. et al. 2010. Biomonitoring of essential and toxic metals in single hair using on-line solution-based calibration in laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry. *Talanta*. 2010, 82.
- DREYER, 2016:** Dreyer, A. 2016. *Präparation und Charakterisierung polymerer Ein- und Mehrschichtsysteme als Referenzmaterialien für die Kalibrierung festkörperspektroskopischer Analysenverfahren*. Hannover : Leibniz Universität Hannover, 2016. Dissertation.
- DURRANT, 1999:** Durrant, S. F. 1999. Laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry: achievements, problems, prospects. *J Anal At Spectrom.* 1999, 14.
- ESTLER ET AL., 2000:** Estler, C. J., Ahlemeyer, B. und Ammon, H. P. 2000. *Pharmakologie und Toxikologie. Lehrbuch für Studierende der Medizin, Pharmazie und Naturwissenschaften*. s.l. : Schattauer Verlag, 2000.
- EURACHEM / CITAC GUIDE CG 4, 2012:** Eurachem / Citac Guide CG 4. 2012. *Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement*. 2012.
- FARELL ET AL., 2013:** Farrell, J. et al. 2013. Bioimaging of trace metals in ancient Chilean mummies and contemporary Egyptian teeth by laser ablation-inductively coupled plasma-mass spectrometry (LA-ICP-MS). *Microchem. J.* 2013, 106.
- FELDMANN ET AL., 2002:** Feldmann, J., Kindness, A. und Ek, P. 2002. Laser ablation of soft tissue using a cryogenically cooled ablation cell. *J. Anal. At. Spectrom.* 2002, 17.
- FIGUEROA ET AL., 2013:** Figueroa, R. G., Lozano, E. und Bongiovanni, G. 2013. Element distribution imaging in rat kidney using a 2D rapid scan EDXRF device. *Rev. Mex. Fis.* 2013, 59.
- FINLEY-JONES ET AL., 2008:** Finley-Jones, H. J., Molloyx, J. L. und Holcombe, J. A. 2008. Choosing internal standards based on a multivariate analysis approach with ICP(TOF)MS. *J. Anal. At. Spectrom.* 2008, 23.

- FLAMIGNI ET AL., 2012:** Flamigni, L., Koch, J. und Günther, D. 2012. Experimental and theoretical investigations about the vaporization of laser-produced aerosols and individual particles inside inductively-coupled plasmas — Implications for the extraction efficiency of ions prior to mass spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*. 2012, 76.
- FREEDMAN, 2002:** Freedman, P. A. 2002. Mass Bias in ICP Mass Spectrometers. *Geochimica et Cosmochimica Acta*. 2002, 66.
- FRICK ET AL., 2012:** Frick, D. A. und Günther, D. 2012. Fundamental studies on the ablation behaviour of carbon in LA-ICP-MS with respect to the suitability as internal standard. *J. Anal. At. Spectrom.* 2012, 27.
- FRICTSCH GMBH, 2016:** Fritsch GmbH. 2016. Produkt-Prospekt Planetenmühlen classic line. *Fritsch GmbH*. [Online] 2016. [Zitat vom: 11. Septemebr 2016.] <http://www.fritsch.de/probenaufbereitung/mahlen/planetenmuehlen/details/produkt/pulverisette-6-classic-line/downloads/>.
- GALIOVÁ ET AL., 2013:** Galiová, M. V. et al. 2013. Elemental mapping in fossil toothroot section of *Ursus arctos* by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS). *Talanta*. 2013, 105.
- GARCIA ALONSO ET AL., 2013:** Garcia Alonso, J. I. und Rodriguez-Gonzalez, P. 2013. *Isotope Dilution Mass Spectrometry*. London : Royal Society of Chemistry, 2013.
- GARCIA ET AL., 2009:** Garcia, C. C., Lindner, H. und Niemax, K. 2009. Laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry-current shortcomings, practical suggestions for improving performance, and experiments to guide future development. *J. Anal. At. Spectrom.* 2009, 24.
- GEBEL, 2000:** Gebel, A. 2000. *Einsatz der Laserablation-ICP-MS-Analytik für geochemische Fragestellungen*. Clausthal : Technische Universität Clausthal, 2000. Dissertation.
- GIUSSANI ET AL., 2009:** Giussani, B., Monticelli, D. und Rampazzi, L. 2009. Role of laser ablation-inductively coupled plasma-mass spectrometry in cultural heritage research. *Analytica Chimica Acta*. 2009, 635.
- GRAY, 1985:** Gray, A. 1985. Solid sample introduction by laser ablation for inductively coupled plasma source mass spectrometry. *Analyst*. 1985, 110.
- GRUHL, 2006:** Gruhl, S. 2006. *Quantifizierung von Konzentrationsgradienten im µm-Bereich mittels Laserablation-ICP-MS*. Hannover : Leibniz Universität Hannover, 2006. Dissertation.
- GRUHL ET AL., 2009:** Gruhl, S. et al. 2009. Determination of concentration gradients in bone tissue generated by a biologically degradable magnesium implant. *J. Anal. At. Spectrom.* 24, 2009.
- GUILLONG ET AL., 2002:** Guillong, M. und Günther, D. 2002. Effect of particle size distribution on ICP-induced elemental fractionation in laser ablation-inductively coupled plasma-mass spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom.* 2002, 17.

- GUILLONG ET AL., 2003:** Guillong, M., Horn, I. und Günther, D. 2003. comparison of 266 nm, 213 nm and 193 nm produced from a single solid state Nd:YAG laser for laser ablation ICP-MS. *J. Anal. At. Spectrom.* 2003, 18.
- GÜNTHER ET AL., 2005:** Günther, D. und Hattendorf, B. 2005. Solid sample analysis using laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry. *TrAC Trends Anal Chem.* 2005, 3.
- GÜNTHER ET AL., 1999:** Günther, D. und Heinrich, C. A. 1999. Enhanced sensitivity in laser ablation-ICP mass spectrometry using helium-argon mixtures as aerosol carrier – Plenary lecture. *J. Anal. At. Spectrom.* 1999, 14.
- HACHMÖLLER ET AL., 2016:** Hachmöller, O. et al. 2016. Elemental bioimaging and speciation analysis for the investigation of Wilson's disease using  $\mu$ XRF and XANES. *Metallomics.* 2016, 8.
- HARE ET AL., 2012:** Hare, D., Austin, C. und Doble, P. 2012. Quantification strategies for elemental imaging of biological samples using laser ablation-inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Analyst.* 2012, 137.
- HARE ET AL., 2009:** Hare, D. et al. 2009. Elemental bio-imaging of melanoma in lymph node biopsies. *Analyst.* 2009, 134.
- HARE ET AL., 2011:** Hare, D. et al. 2011. Elemental bio-imaging of trace elements in teeth using laser ablation-inductively coupled plasma-mass spectrometry. *J. Dent.* 2011, 39.
- HARE ET AL., 2015:** Hare, D. et al. 2015. Imaging metals in biology: balancing sensitivity, selectivity and spatial resolution. *Chem. Soc. Rev.* 2015, 44.
- HARE ET AL., 2013:** Hare, D. et al. 2013. Protocol for production of matrix-matched brain tissue standards for imaging by laser ablation-inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Anal. Methods.* 2013, 5.
- HERGENRÖDER, 2006:** Hergenröder, R. 2006. Hydrodynamic sputtering as a possible source for fractionation in LA-ICP-MS. *J. Anal. At. Spectrom.* 2006, 21.
- HEUMANN ET AL., 1998:** Heumann, K. G. et al. 1998. Precision and accuracy in isotope ratio measurements by plasma source mass spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom.* 1998, 13.
- HOESL ET AL., 2014:** Hoesl, S. et al. 2014. Development of a calibration and standardization procedure for LA-ICP-MS using a conventional ink-jet printer for quantification of proteins in electro- and Western-blot assays. *J. Anal. At. Spectrom.* 2014, 29.
- HOFFMANN ET AL., 1994:** Hoffmann, E. et al. 1994. Analytical investigations of tree rings by laser ablation ICP-MS. *Fresenius' J. Anal. Chem.* 1994, 350.
- HOFFMANN ET AL., 2000:** Hoffmann, E. et al. 2000. Investigation of mercury migration in human teeth using spatially resolved analysis by laser ablation-ICP-MS. *J. Anal. At. Spectrom.* 2000, 15.
- HORN, 2008:** Horn, I. 2008. Comparison of femtosecond and nanosecond Laser interactions with geologic matrices and their influence on accuracy and precision of LA-ICP-MS

- data. [Buchverf.] P. Sylvester. *Laser Ablation–ICP–MS in the Earth Sciences–Current practices and outstanding issues*. St. John's : Mineralogical Association of Canada, 2008.
- HORN ET AL., 2003:** Horn, I. und Günther, D. 2003. The influence of ablation carrier gasses Ar, He and Ne on the particle size distribution and transport efficiencies of ablation-induced aerosols: implications for LA-ICP-MS. *Appl. Surf. Sci.* 2003, 207.
- HORN ET AL., 2000:** Horn, I., Rudnick, R. L. und McDonough, W. F. 2000. Precise elemental and isotope ratio determination by simultaneous solution nebulization and laser ablation-ICP-MS: application to U–Pb geochronology. *Chemical Geology*. 2000, 164.
- HOUK ET AL., 1997:** Houk, S., Winge, K. und Chen, X. 1997. High speed photographic study of wet droplets and solid particles in the inductively coupled plasma. *J. Anal. At. Spectrom.* 1997, 12.
- HSIEH ET AL., 2009:** Hsieh, H. F. et al. 2009. Lead determination in whole blood by laser ablation coupled with inductively coupled plasma mass spectrometry. *Talanta*. 2009, 79.
- IGARASHI ET AL., 1992:** Igarashi, Y. et al. 1992. Application of Isotope-Dilution for the Determination of Thorium in Biological Samples by Inductively Coupled Plasma Mass-Spectrometry. *Anal. Sci.* 1992, 8.
- IKA WERKE GMBH & Co. KG, 2016:** IKA Werke GmbH & Co. KG. 2016. IKA Dispergierer. [Online] 2016. [Zitat vom: 31. August 2016.] [http://www.ika.com/ika/pdf/flyer-catalog/Disperser\\_Brochure\\_IWS\\_DE\\_wop\\_screen.pdf](http://www.ika.com/ika/pdf/flyer-catalog/Disperser_Brochure_IWS_DE_wop_screen.pdf).
- ISO-LEITFADEN 30, 2015:** ISO-Leitfaden 30. 2015. Internationale Organisation für Normung. Genf : ISO, Februar 2015.
- ITAP, 2010:** ITAP. 2010. Simulation der Laserablation von Metallen. [Online] Institut für Theoretische und Angewandte Physik, Universität Stuttgart, 2010. [Zitat vom: 29. August 2013.] [http://www.uni-stuttgart.de/hkom/publikationen/uni-kurier/uk105/04\\_forschen/simulation.html](http://www.uni-stuttgart.de/hkom/publikationen/uni-kurier/uk105/04_forschen/simulation.html).
- JACKSON ET AL., 2003:** Jackson, B. P., Hopkins, W. A. und Baionno, J. 2003. Laser Ablation-ICP-MS Analysis of Dissected Tissue: A Conservation-Minded Approach to Assessing Contaminant Exposure. *Environ. Sci. Technol.* 2003, 37.
- JACKSON, 2008:** Jackson, S.E. 2008. Calibration strategies for elemental analysis by LA–ICP–MS In Laser Ablation ICP–MS in the Earth Sciences: Current Practices and Outstanding Issues. *Mineral. Assoc. Can. Short Course Series*. 2008, 40.
- JANNEY ET AL., 2011:** Janney, P. E. et al. 2011. Matrix effects in the analysis of Mg and Si isotope ratios in natural and synthetic glasses by laser ablation-multicollector ICPMS: A comparison of single- and double-focusing mass spectrometers. *Chemical Geology*. 2011, 281.
- JOCHUM ET AL., 2005:** Jochum, K. P. et al. 2005. GeoReM: a new geochemical database for reference materials and isotopic standards. *Geostand Geoanal Res.* 2005, 29.

- JOCHUM ET AL., 2007:** Jochum, K. P. et al. 2007. Validation of LA–ICP–MS trace element analysis of geological glasses using a new solid-state 193 nm Nd:YAG laser and matrix-matched calibration. *J. Analyt. Atom. Spectrom.* 2007, 22.
- JOHN ET AL., 1965:** John, G. und Vock, F. 1965. Modelluntersuchungen an einer Planetenkugelmühle. [Hrsg.] WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. *Chemie Ingenieur Technik.* 1965, 37.
- KANG ET AL., 2004:** Kang, D., D., Amarasiriwardena und Goodman, A. H. 2004. Application of laser ablation–inductively coupled plasma-mass spectrometry (LA–ICP–MS) to investigate trace metal spatial distributions in human tooth enamel and dentine growth layers and pulp. *Anal. Bioanal. Chem.* 2004, 378.
- KASPER ET AL., 2014:** Kasper, H. und Burghardt, W. 2014. *Ernährungsmedizin und Diätetik.* Amsterdam : Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH, 2014.
- KINDNESS ET AL., 2003:** Kindness, A., Sekaran, C.N. und Feldmann, J. 2003. Two-dimensional mapping of copper and zinc in liver sections by laser ablation-inductively coupled plasma mass spectrometry. *Clin. Chem.* 2003, 49.
- KLUG ET AL., 2011:** Klug, B., Specht, A. und Horst, W. J. 2011. Aluminium localization in root tips of the aluminiumaccumulating plant species buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench). *J. Exp. Bot.* 2011, 62.
- KOCH ET AL., 2011:** Koch, J. und Günther, D. 2011. Review of the State-of-the-Art of Laser Ablation Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. *Applied Spectroscopy.* 2011, 65.
- KOCH ET AL., 2004:** Koch, J. et al. 2004. Particle size distributions and compositions of aerosols produced by near-IR femto- and nanosecond laser ablation of brass. *J. Anal. At. Spectrom.* 2004, 19.
- KONZ ET AL., 2013:** Konz, I. et al. 2013. Gold internal standard correction for elemental imaging of soft tissue sections by LA-ICP-MS: element distribution in eye microstructures. *Anal Bioanal Chem.* 2013, 405.
- KONZ ET AL., 2012:** Konz, I. et al. 2012. Laser ablation ICP-MS for quantitative biomedical applications. *Anal Bioanal Chem.* 2012, 403.
- KRAGTEN, 1994:** Kragten, J. 1994. Calculating standard deviations and confidence intervals with a universally applicable spreadsheet technique. *Analyst.* 1994, 119.
- KROMIDAS, 2011:** Kromidas, S. 2011. *Handbuch Validierung in der Analytik.* Weinheim : Wiley-VCH Verlag, 2011.
- KROSLAKOVA ET AL., 2007:** Kros拉克ova, I. und Günther, D. 2007. Elemental fractionation in laser ablation-inductively coupled plasma-mass spectrometry: evidence for mass load induced matrix effects in the ICP during ablation of a silicate glass. *J. Anal. At. Spectrom.* 2007, 22.

- KÜHN, 2016:** Kühn, J. O. 2016. *Festkörperbasierte Isotopenverdünnungsanalyse zur orts aufgelösten ns-LA-ICP-Massenspektrometrie*. Hannover : Leibniz Universität Hannover, 2016. Forschungspraktikum.
- KUROSAWA ET AL., 2006:** Kurosawa, M. et al. 2006. Trace element analysis of fused wholerock glasses by laser ablation–ICP–MS and PIXE. *Geostand. & Geoanalyt. Res.* 2006, 30.
- LABORDA ET AL., 2016:** Laborda, F., Medrano, J. und Castillo, J. R. 2016. Quality of quantitative and semiquantitative results in inductively coupled plasma mass spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom.* 2016, 16.
- LANDAU, 2006:** Landau, U. 2006. *Die keimreduzierende Wirkung des Silbers in Hygiene, Medizin und Wasseraufbereitung. Die Oligodynamie des Silbers*. Oldenburg : Isensee, 2006.
- LE OUAY ET AL., 2015:** Le Ouay, B. und Stellacci, F. 2015. Antibacterial activity of silver nanoparticles: A surface science insight. *Nano Today*. 2015, 10.
- LEAR ET AL., 2012:** Lear, J. et al. 2012. High-Resolution Elemental Bioimaging of Ca, Mn, Fe, Co, Cu, and Zn Employing LA-ICP-MS and Hydrogen Reaction Gas. *Anal. Chem.* 2012, 84.
- LECHER ET AL., 2015:** Lecher, K., Lühr, H.-P. und Zanke, U. C. E. 2015. *Taschenbuch der Wasserwirtschaft*. Luxemburg : Springer Science+Business Media S.A., 2015.
- LEHMANN, 2011:** Lehmann, R. 2011. *Archäometallurgie von mittelalterlichen deutschen Silberbarren und Münzen*. Hannover : Leibniz Universität Hannover, 2011. Dissertation.
- LEVEQUE ET AL., 2013:** Leveque, T. et al. 2013. Assessing ecotoxicity and uptake of metals and metalloids in relation to two different earthworm species (*Eiseina hortensis* and *Lumbricus terrestris*). *Environ. Pollut.* 2013, 179.
- LIMBECK ET AL., 2015:** Limbeck, A. et al. 2015. Recent advances in quantitative LA-ICP-MS analysis: challenges and solutions in the life sciences and environmental chemistry. *Anal Bioanal Chem.* 2015, 407.
- LIU ET AL., 2000:** Liu, H. C. et al. 2000. Pb/U Fractionation during Nd:YAG 213 nm and 266 nm Laser Ablation Sampling with Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. *Appl. Spectrosc.* 2000, 54.
- LLOBET ET AL., 2003:** Llobet, J. M: et al. 2003. Concentrations of arsenic, cadmium, mercury, and lead in common foods and estimated daily intake by children, adolescents, adults, and seniors of Catalonia, Spain. *J Agric Food Chem.* 2003, 51.
- LOHS ET AL., 1981:** Lohs, K. und Ludewig, R. 1981. *Akute Vergiftungen: Ratgeber für toxikolog. Notfälle*. Stuttgart : Fischer, 1981.
- LONGERICH ET AL., 1996:** Longerich, H.P., Günther, D. und Jackson, S.E. 1996. Elemental fractionation in laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry. *Fresenius J. Anal. Chem.* 1996, 355.

- LÓPEZ DE ROMAÑA ET AL., 2014:** López de Romaña, D. et al. 2014. Risiken und Nutzen von Kupfer im Licht neuer Erkenntnisse zur Kupferhomöostase. *Perspectives in Medicine*. 2014, 2.
- LÓPEZ DE ROMAÑA ET AL., 2011:** López de Romaña, D. et al. 2011. Risks and benefits of copper in light of new insights of copper homeostasis. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 2011, 25.
- LP, 2014:** LP. 2014. Massenspektrometrie am Ionenbeschleuniger. [Online] Physikalisches Institut, Georg-August-Universität Göttingen, 2014. [Zitat vom: 25. Oktober 2016.] <https://lp.uni-goettingen.de/get/text/5338>.
- LUNDGAARD ET AL., 2002:** Lundsgaard, K., Prochazka, V. und Fuchs, N. 2002. *Kupfer ist mehr als ein Schwermetall – Kupfer als Pflanzenschutzmittel im biologischen Rebbau* -. Dornach : Sektion für Landwirtschaft am Goetheanum, 2002.
- MATUSCH ET AL., 2011:** Matusch, A., Bauer, A. und Becker, J. S. 2011. Element imaging in formalin fixed slices of human mesencephalon. *Int. J. Mass Spectrom.* 2011, 307.
- MAY ET AL., 1998:** May, T. W. und Wiedmeyer, R. H. 1998. A Table of Polyatomic Interferences in ICP-MS. *Atomic Spectroscopy*. 1998, 19.
- MC SHAN ET AL., 2004:** McShan, D., Ray, P. C. und Yu, H. 2004. Molecular Toxicity Mechanism of Nanosilver. *J Food Drug Anal.* 2004, 22.
- MEIßNER ET AL., 2011:** Meißner, D., Klemm, M. und Zogbaum, M. 2011. Problematik, Klinik und Beispiele der Spurenelementvergiftung – Blei. *Toxichem Krimtech.* 2011, 3.
- MILLER ET AL., 2005:** Miller, J. N. und Miller, J. C. 2005. *Statistics and chemometrics for analytical chemistry*. Harlow New York : Pearson/Prentice Hall, 2005.
- MILTON ET AL., 2002:** Milton, M. J. T. und Wang, J. A. 2002. High Accuracy Method for Isotope Dilution Mass Spectrometry with Application to the Measurement of Carbon Dioxide. *Int. J. Mass Spectrom.* 2002, 218.
- MILTON ET AL., 2003:** Milton, M. J. T. und Wang, J. A.. 2003. High Accuracy Method for the Application of Isotope Dilution to Gas Chromatography/Mass Spectrometric Analysis of Gases. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2003, 17.
- MOHAMED, 2013:** Mohamed, T. 2013. *Polymere Schichtsysteme mit definierten Magnesium-, Aluminium- und Eisengehalten*. Hannover : Leibniz Universität Hannover, 2013. Masterarbeit.
- MOORE ET AL., 2012:** Moore, K. L. et al. 2012. Elemental imaging at the nanoscale: NanoSIMS and complementary techniques for element localisation in plants. *Anal. Bioanal. Chem.* 2012, 402.
- MORADI ET AL., 2010:** Moradi, A. B. et al. 2010. Mapping of nickel in root cross-sections of the hyperaccumulator plant *Berkheya coddii* using laser ablation ICP-MS. *Environmental and Experimental Botany*. 2010, 69.

- MORENO-GORDALIZA ET AL., 2011:** Moreno-Gordaliza, E. et al. 2011. Elemental Bioimaging in Kidney by LA–ICP–MS As a Tool to Study Nephrotoxicity and Renal Protective Strategies in Cisplatin Therapies. *Anal. Chem.* 2011, 83.
- MOSES ET AL., 2015:** Moses, L. M. und Farnsworth, P. B. 2015. Evaluation of particle size distributions produced during ultra-violet nanosecond laser ablation and their relative contributions to ion densities in the inductively coupled plasma. *Spectrochimica Acta Part B.* 2015, 113.
- NIST PHYSICAL REFERENCE DATA, 2016:** NIST Physical Reference Data. 2016. National Institute of Standards and Technology. [Online] 2016. [Zitat vom: 13. 09 2016.] <https://www.nist.gov/pml/productservices/physical-reference-data>.
- NIST SRM 610, 1992:** NIST SRM 610. 1992. National Institute of Standards and Technology. Gaithersburg, USA : NIST, 1992. Analysenzertifikat.
- NIST SRM 981A, 1973:** NIST SRM 981a. 1973. National Institute of Standards and Technology. Gaithersburg, USA : NIST, 1973.
- NIST SRM 997, 2004:** NIST SRM 997. 2004. National Institute of Standards and Technology. Gaithersburg, USA : NIST, 2004.
- NOBELSTIFTUNG, 2016:** Nobelstiftung. 2016. nobelprize.org. [Online] Nobel Media AB, 2016. [Zitat vom: 22. Oktober 2016.] [http://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/chemistry/laureates/1943/](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1943/).
- O' CONNOR ET AL., 2006:** O' Connor, C., Sharp, B. L. und P., Evans. 2006. On-line additions of aqueous standards for calibration of laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry: theory and comparison of wet and dry plasma conditions. *J. Anal. At. Spectrom.* 2006, 21.
- OKAMOTO, 1991:** Okamoto, K. 1991. Preparation and Certification of Rice Flour Unpolished Reference Material. *Sci. Total Environ.* 1991, 107.
- OMRI, 2001:** OMRI. 2001. Copper Sulfate Crops for use as algicide and invertebrate pest control. *Organic Materials Review Institute.* [Online] 2001. [Zitat vom: 16. September 2016.] <https://www.ams.usda.gov/sites/default/files/media/Copper%20Sulfate%20%20TR%202001.pdf>.
- OVINGTON, 2004:** Ovington, L. G. 2004. The Truth about Silver. *Ostomy Wound Management.* 2004, 50.
- PASSARELLI ET AL., 2011:** Passarelli, M. K. und Winograd, N. 2011. Lipid imaging with time-of-flight secondary ion mass spectrometry (ToF-SIMS). *Biochim. Biophys. Acta.* 2011, 11.
- PATTBERG ET AL., 1999:** Pattberg, S. und Matschat, R. 1999. Determination of high purity copper using sector-field ICP-MS: continuous nebulization flow injection and laser ablation. *J. Anal. Chem.* 1999, 364.
- PICKHARDT ET AL., 2001:** Pickhardt, C. und Becker, J. S. 2001. Trace analysis of high-purity graphite by LA-ICP-MS. *J. Anal. Chem.* 2001, 370.



- PICKHARDT ET AL., 2006:** Pickhardt, C. et al. 2006. On-line isotope dilution in laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry using a microflow nebulizer inserted in the laser ablation chamber. *Int. J. Mass Spectrom.* 2006, 248.
- PONZEVERA ET AL., 2006:** Ponzevera, E. et al. 2006. Mass discrimination during MC-ICPMS isotopic ratio measurements: investigation by means of synthetic isotopic mixtures (IRMM-007 series) and application to the calibration of natural-like zinc materials (including IRMM-3702 and IRMM-651). *J. Am. Soc. Mass Spectrom. Chem.* 2006, 17.
- POVITSKY, 2007:** Povitsky, K. Pathak und A. 2007. Modeling of plume dynamics with shielding in laser ablation of carbon. *Appl. Surf. Sci.* 2007, 253.
- POZEBON ET AL., 2010:** Pozebon, D. et al. 2010. Bioimaging of metals in thin mouse brain section by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry: novel online quantification strategy using aqueous standards. *J. Anal. At. Spectrom.* 2010, 25.
- POZEBON ET AL., 2008:** Pozebon, D. et al. 2008. Monitoring of platinum in a single hair by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS) after cisplatin treatment for cancer. *Int. J. Mass Spectrom.* 2008, 272.
- POZEBON ET AL., 2014:** Pozebon, D. et al. 2014. Review of the applications of laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS) to the analysis of biological samples. *J. Anal. At. Spectrom.* 2014, 29.
- PTB, 2016:** PTB. 2016. Metrologie in der Chemie. [Online] 2016. [Zitat vom: 22. Oktober 2016.] <https://www.ptb.de/cms/de/ptb/fachabteilungen/abt3/fb-31/metrologie-in-der-chemie.html>.
- PUIG ET AL., 2002:** Puig, S. und Thiele, D. J. 2002. Molecular mechanisms of copper uptake and distribution, Current opinion in chemical biology. *Curr Opin Chem Biol.* 2002, 6.
- RANALDI ET AL., 2009:** Ranaldi, M. M. und Gagnon, M. M. 2009. Accumulation of cadmium in the otoliths and tissues of juvenile pink snapper (*Pagrus auratus* Forster) following dietary and waterborne exposure. *Comp. Biochem. Physiol. Part C: Toxicol. Pharmacol.* 2009, 150.
- RASCIO ET AL., 2011:** Rascio, N. und Navari-Izzo, F. 2011. Heavy metal hyperaccumulating plants: How and why do they do it? And what makes them so interesting? *Plant Science.* 2011, 180.
- REGE ET AL., 2005:** Rege, S. et al. 2005. Quantitative trace-element analysis of diamond by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom.* 2005, 20.
- REICHENBÄCHER ET AL., 2011:** Reichenbächer, M. und Einax, J. W. 2011. *Challenges in Analytical Quality Assurance.* Heidelberg Berlin : Springer-Verlag, 2011.
- REICHL ET AL., 2000:** Reichl, F.-X. und Keseberg, U. 2000. *Taschenatlas der Umweltmedizin.* Stuttgart : Thieme Verlagsgruppe, 2000.

- REID ET AL., 1999:** Reid, J. E. et al. 1999. Determination of Zr and Hf in a Flux-Free Fusion of Whole Rock Samples using Laser Ablation Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry (LA-ICP-MS) with Isotope Dilution Calibration. *Geostandards and Geoanalytical Research*. 1999, 23.
- RESANO ET AL., 2012:** Resano, M. et al. 2012. Direct determination of Cu isotope ratios in dried urine spots by means of fs-LA-MC-ICPMS. Potential to diagnose Wilson's disease. *J Anal At Spectrom*. 2012, 28.
- RESANO ET AL., 2005:** Resano, M., García-Ruiz, E. und Vanhaecke, F. 2005. Laser ablation–inductively coupled plasma–dynamic reaction cell–mass spectrometry for the multi-element analysis of polymers. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*. 2005, 60.
- RIDLEY, 2005:** Ridley, W. I. 2005. *Plumbo-Isotopy: The Measurement of Lead Isotopes by Multi-Collector Inductively Coupled Mass Spectrometry*. Virginia : U.S. Geological Survey, 2005.
- RINNE, 2014:** Rinne, M. 2014. *Charakterisierung von Ag-beschichteten Implantatoberflächen*. Hannover : Leibniz Universität Hannover, 2014. Masterarbeit.
- RUSSO ET AL., 2002:** Russo, R. E. et al. 2002. Laser ablation in analytical chemistry—a review. *Talanta*. 2002, 57.
- SANTOS ET AL., 2009:** Santos, M. C. et al. 2009. Biomonitoring of metal contamination in a marine prosobranch snail (*Nassarius reticulatus*) by imaging laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS). *Talanta*. 2009, 80.
- SARMA, 2011:** Sarma, H. 2011. Journal of Environmental Science and Technology. *Metal Hyperaccumulation in Plants: A Review Focusing on Phytoremediation Technology*. 2011, 2.
- SCHAUMANN, 2011:** Schaumann, I. 2011. *Herstellung und Charakterisierung von polymeren Schichtsystemen für die Validierung röntgenanalytischer Verfahren*. Hannover : Leibniz Universität Hannover, 2011. Dissertation.
- SCHUBERT, 2015:** Schubert, J. V. 2015. *Beiträge zur Optimierung der Homogenität polymerer Referenzmaterialien für die Festkörperelementanalytik*. Hannover : Leibniz Universität Hannover, 2015. Masterarbeit.
- SCHWARTZE, 2013:** Schwartze, G. C. 2013. *Polymere Ein- und Mehrschicht-materialien für die Kalibrierung moderner festkörperspektroskopischer Messsysteme*. Hannover : Leibniz Universität Hannover, 2013. Dissertation.
- SELA ET AL., 2007:** Sela, H. et al. 2007. Biomonitoring of hair samples by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS). *Int. J. Mass Spectrom*. 2007, 261.
- SELTZER ET AL., 2005:** Seltzer, M. D. und Berry, K. H. 2005. Laser ablation ICP-MS profiling and semiquantitative determination of trace element concentrations in desert tortoise shells: documenting the uptake of elemental toxicants. *Sci. Total Environ*. 2005, 339.

- SIEBOLD ET AL., 2012:** Siebold, M. et al. 2012. Application of elemental bioimaging using laser ablation ICP-MS in forest pathology: distribution of elements in the bark of *Picea sitchensis* following wounding. *Anal Bioanal Chem.* 2012, 402.
- SIGMA-ALDRICH, 2016:** Sigma-Aldrich. 2016. Deuterium oxide . [Online] 2016. [Zitat vom: 23. Oktober 2016.] <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/ALDRICH/191701?lang=de&region=DE>.
- SKOOG ET AL., 1996:** Skoog, D. A. und Leary, J. J. 1996. *Instrumentelle Analytik : Grundlagen, Geräte, Anwendungen.* Luxemburg : Springer Science+Business Media S.A., 1996.
- STADLBAUER ET AL., 2007:** Stadlbauer, C. et al. 2007. History of individuals of the 18th/19th centuries stored in bones, teeth, and hair analyzed by LA-ICP-MS—a step in attempts to confirm the authenticity of Mozart’s skull. *Anal. Bioanal. Chem.* 2007, 388.
- STANGE ET AL., 2013:** Stange, U., Scherf-Clavel, M. und Gieseler, H. 2013. Application of Gas Pycnometry for the Density Measurement of Freeze-Dried Products. *J. Pharm. Sci.* 2013, 102.
- STÄRK ET AL., 2011:** Stärk, H. J. und Wennrich, R. 2011. A new approach for calibration of laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry using thin layers of spiked agarose gels as references. *Anal. Bioanal. Chem.* 2011, 399.
- STEELY ET AL., 2007:** Steely, S. et al. 2007. A rapid approach for assessment of arsenic exposure by elemental analysis of single strand of hair using laser ablation-inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Microchem. J.* 2007, 86.
- STRAUBE ET AL., 2007:** Straube, A. und Hermann, W. 2007. Morbus Wilson. [Buchverf.] Brandt T. und Diener H. C. *Therapie und Verlauf neurologischer Erkrankungen.* Stuttgart : Kohlhammer, 2007.
- SYLVESTER, 2008:** Sylvester, P. 2008. Matrix effects in laser ablation-ICP-MS. *Laser Ablation-ICP-MS in the Earth Sciences-Current practices and outstanding issues.* St. John's : Mineralogical Association of Canada, 2008.
- TANG ET AL., 2008:** Tang, J. et al. 2008. Influence of silver nanoparticles on neurons and blood-brain barrier via subcutaneous injection in rats. *Applied Surface Science.* 2008, 255.
- TAYLOR ET AL., 2001:** Taylor, R. N. und Ishizuka, O. 2001. Lead Isotope Measurement by Lead Double Spike and Thallium Spike Using MC-ICP-MS and TIMS – a Comparison Using Basaltic Samples. *American Geophysical Union.* 2001, 12.
- THIELEKE, 2013:** Thieleke, J. P. 2013. *Entwicklung von Laserablationsstandards für die Analyse von Pflanzenproben.* Hannover : Leibniz Universität Hannover, 2013. Masterarbeit.
- THIELEKE ET AL., 2016:** Thieleke, J. P. und Vogt, C. 2016. A calibration strategy for LA-ICP-MS using isotope dilution for solid reference materials. *J. Anal. At. Spectrom.* 2016, 31.
- THOMSON, 1913:** Thomson, J. J. 1913. Rays of Positive Electricity. *Proceedings of the Royal Society of London.* 1913, 89.

- THÜRNUAU, 2016:** Thürnau, N. 2016. *Vergleich von Analyseverfahren für die Bestimmung der Schichtdicke polymerer Referenzmaterialen im unteren Mikrometer-Bereich.* Hannover : Leibniz Universität Hannover, 2016. Bachelorarbeit.
- TIBI ET AL., 2003:** Tibi, M. und Heumann, K. G. 2003. Isotope dilution mass spectrometry as a calibration method for the analysis of trace elements in powder samples by LA-ICP-MS. *J. Anal. At. Spectrom.* 2003, 18.
- TODOLÍ ET AL., 1998:** Todolí, J. L. und Mermet, J. M. 1998. Study of polymer ablation products obtained by ultraviolet laser ablation — inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. *Spectrochim. Acta, Part B.* 1998, 53.
- TOKAREV ET AL., 1994:** Tokarev, V. und Marine, W. 1994. Time-resolved measurements of plume shielding during ArF laser ablation of silicon. *Thin Solid Films.* 1994, 241.
- UBA, 2003:** UBA. 2003. *Leitfaden zur Anwendung umweltverträglicher Stoffe.* Berlin : Umweltbundesamt, 2003.
- VADILLO ET AL., 1999:** Vadillo, J. M. et al. 1999. Effect of Plasma Shielding on Laser Ablation Rate of Pure Metals at Reduced Pressure. *Surf. Interface Anal.* 1999, 27.
- VAN DE WIEL, 2003:** van de Wiel, H. J. 2003. *Determination of elements by ICP-AES and ICP-MS.* Bilthoven : National Institute of Public Health and the Environment (RIVM), 2003.
- VANHAECKE ET AL., 2012:** Vanhaecke, F. und Degryse, P. 2012. *Isotopic analysis. Fundamentals and applications using ICP-MS.* Weinheim : Wiley-VCH, 2012.
- VANHAECKE ET AL., 1992:** Vanhaecke, F., Vanhoe, H. und Dams, R. 1992. The use of internal standards in ICP-MS. *Talanta.* 1992, 37.
- VICKERMAN ET AL., 2015:** Vickerman, J. C. und Winograd, N. 2015. SIMS—A precursor and partner to contemporary mass spectrometry. *Int. J. Mass Spectrom.* 2015, 377.
- VOGL, 2007:** Vogl, J. 2007. Characterisation of reference materials by isotope dilution mass spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom.* 2007, 22.
- VOGL, 2012:** Vogl, J. 2012. Measurement uncertainty in single, double and triple isotope dilution mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2012, 26.
- VOGL ET AL., 2010:** Vogl, J. und Pritzkow, W. 2010. Isotope Dilution Mass Spectrometry – A Primary Method of Measurement and Its Role for RM Certification. *MAPAN.* 2010, 25.
- VOGL ET AL., 2000:** Vogl, J. et al. 2000. Contribution to the certification of B, Cd, Mg, Pb, Rb, Sr, and U in a natural water sample for the International Measurement Evaluation Programme Round 9 (IMEP-9) using ID-ICP-MS. *Accred Qual Assur.* 2000, 5.
- VON HEVESY ET AL., 1913:** von Hevesy, G. und Paneth, F. 1913. The Solubility of Lead Sulphides and Lead Chromates. *Z. Anorg. Chem.* 1913, 82.
- WATLING ET AL., 1997:** Watling, J., Lynch, F. und Herring, D. 1997. Use of Laser Ablation Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry for Fingerprinting Scene of Crime Evidence. *J. Anal. At. Spectrom.* 1997, 12.

- WELLER, 2014:** Weller, A. 2014. *Bleihaltige polymere Referenzmaterialien mit variierenden Isotopenverhältnissen*. Hannover : Leibniz Universität Hannover, 2014. Bachelorarbeit.
- WEST ET AL., 2014:** West, M. et al. 2014. 2014 Atomic Spectrometry Update – a review of advances in X-ray fluorescence spectrometry . *J. Anal. At. Spectrom.* 2014, 29.
- WIBERG ET AL., 2007:** Wiberg, N. und Holleman, A. F. 2007. *Lehrbuch der Anorganischen Chemie*. Berlin : De Gruyter, 2007.
- WILEY-VCH, 2016:** Wiley-VCH. 2016. Der Sekundärelektronenvervielfacher. [Online] Wiley Information Services GmbH, 2016. [Zitat vom: 25. Oktober 2016.] [http://www.chemgapedia.de/vsengine/topics/de/Chemie/Analytische\\_00032Chemie/Massenspektrometrie/index.html](http://www.chemgapedia.de/vsengine/topics/de/Chemie/Analytische_00032Chemie/Massenspektrometrie/index.html).
- WOODHEAD ET AL., 2007:** Woodhead, J. et al. 2007. Isotopic and Elemental Imaging of Geological Materials by Laser Ablation Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry. *Geostandards & Geoanalytical Research*. 2007, 31.
- WORLD NUCLEAR ASSOCIATION, 2016:** World Nuclear Association. 2016. Uranium Enrichment. [Online] 2016. [Zitat vom: 23. Oktober 2016.] <http://www.world-nuclear.org/information-library/nuclear-fuel-cycle/conversion-enrichment-and-fabrication/uranium-enrichment.aspx>.
- WU A ET AL., 2009:** Wu, B. et al. 2009. Imaging of nutrient elements in the leaves of *Elsholtzia splendens* by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS). *Talanta*. 2009, 78.
- WU B ET AL., 2009:** Wu, B., Chen, Y. und Becker, J. S. 2009. Study of essential element accumulation in the leaves of a Cu-tolerant plant *Elsholtziasplendens* after Cu treatment by imaging laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS). *AnalyticaChimicaActa*. 2009, 633.
- ZACHARIADIS ET AL., 2010:** Zachariadis, G. und Vogiatzis, C. 2010. An Overview of the Use of Yttrium for Internal Standardization in Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectrometry. *Applied Spectroscopy Reviews*. 2010, 45.
- ZHANG ET AL., 2005:** Zhang, D. et al. 2005. A new model of pulsed laser ablation and plasma shielding. *Physica B*. 2005, 362.
- ZORIY A ET AL., 2007:** Zoriy, M. V. und Becker, J. S. 2007. Imaging of elements in thin cross sections of human brain samples by LA-ICP-MS: A study on reproducibility. 2007, 264.
- ZORIY B ET AL., 2007:** Zoriy, M. V. et al. 2007. Laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry for imaging of copper, zinc, and platinum in thin sections of a kidney from a mouse treated with cis-platin. *Int. J. Mass Spectrom.* 2007, 260.
- ZORIY ET AL., 2008:** Zoriy, M. V. et al. 2008. Comparative imaging of P, S, Fe, Cu, Zn and C in thin sections of rat brain tumor as well as control tissues by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B*. 2008, 63.

**ZORIY ET AL., 2006:** Zoriy, M. V. et al. 2006. Imaging of Cu, Zn, Pb and U in human brain tumor resections by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry. *Int. J. Mass Spectrom.* 2006, 257.

**8**

---

**Anhang**

---

Tab. 8. 1: Verwendete Messparameter des ICP-OES

Parameter	Einstellung
Anzahl der Messungen	3
Vorspülpumpgeschwindigkeit	62 min <sup>-1</sup>
Pumpgeschwindigkeit	30 min <sup>-1</sup>
Plasmaleistung	1400 W
Kühlgasfluss	12 L·min <sup>-1</sup>
Hilfsgasfluss	1 L·min <sup>-1</sup>
Zerstäubergasfluss	0,79 L·min <sup>-1</sup>
Gas	Argon

Tab. 8. 2: Exakte Massenanteile der Standards für die ICP-OES-Analyse von Cu und Y

Element	Std.1	Std.2	Std.3	Std.4	Std.5	Std.6	Std.7	Std.8
$\omega_{(Cu)}$ in mg·kg <sup>-1</sup>	0,10	0,70	1,35	1,98	2,60	3,21	3,83	4,46
$\omega_{(Y)}$ in mg·kg <sup>-1</sup>	0,10	0,52	0,93	1,35	1,76	2,18	2,58	2,99

Tab. 8. 3: Verwendete Messparameter des ICP-MS

Parameter	Einstellung
peristaltische Pumpe	0,7 mL·min <sup>-1</sup>
Kühlgasfluss	14,4 L·min <sup>-1</sup>
Hilfsgasfluss	0,96 L·min <sup>-1</sup>
Zerstäubergasfluss	0,74 bis 1,00 L·min <sup>-1</sup>
Plasmaleistung	1400 W
Gas	Argon

Tab. 8. 4: Exakte Massenanteile der Standards für die ICP-OES-Analyse von Pb, Bi und Li

Element	Std.1	Std.2	Std.3	Std.4	Std.5	Std.6	Std.7
$\omega_{(Pb)}$ in mg·kg <sup>-1</sup>	0,36	0,97	1,59	2,00	2,42	3,01	3,39
$\omega_{(Bi)}$ in mg·kg <sup>-1</sup>	1,02	-	-	-	-	-	-
$\omega_{(Li)}$ in mg·kg <sup>-1</sup>	0,98	-	-	-	-	-	-

Tab. 8. 5: Exakte Massenanteile der Standards für die ICP-OES-Analyse von Ag, In und Li

Element	Std.1	Std.2	Std.3	Std.4	Std.5
$\omega_{(Ag)}$ in mg·kg <sup>-1</sup>	0,09	0,48	0,93	2,34	4,7
$\omega_{(In)}$ in mg·kg <sup>-1</sup>	0,99	-	-	-	-
$\omega_{(Li)}$ in mg·kg <sup>-1</sup>	1,03	-	-	-	-



**Tab. 8. 6: Verwendete Messparameter des REM**

<b>Parameter</b>	<b>Einstellung</b>
<b>Beschleunigungsspannung</b>	20 kV
<b>Vergrößerung</b>	2000x
<b>Haarnadelkathode</b>	Wolfram
<b>REM-Detektor</b>	Sekundärelektronen- und Rückstreuelektronenkontrast

## 8.1 Symbol- und Abkürzungsverzeichnis

$h_x$	Schichtdicke der Probe
$h_y$	Schichtdicke des Spikes in Blend 1 (Spike/ Probe)
$h_{y'}$	Schichtdicke des Spikes in Blend 2 (Spike/ Back-Spike)
$h_z$	Schichtdicke des Back-Spike
$I_{max}$	maximale Signalintensität
$M_b$	Atommasse des Isotops b
$M_x$	Standard Atommasse des Elements in der Probe
$M_z$	Standard Atommasse des Elements im Back-Spike
$R_x$	Isotopenverhältnis der Probe
$R_{xy}$	Isotopenverhältnis des Blend 1 (Spike/ Probe)
$R_y$	Isotopenverhältnis des Spike
$R_{y'}$	Isotopenverhältnis des Spike
$R_z$	Isotopenverhältnis des Back-Spike
$R_{zy'}$	Isotopenverhältnis des Blend 2 (Spike/ Back-Spike)
$a_{x,b}$	Häufigkeit des Isotops b in der Probe
$a_{z,b}$	Häufigkeit des Isotops b im Back-Spike
$m_x$	Masse der Probe
$m_y$	Masse des Spikes in Blend 1 (Spike/ Probe)
$m_{y'}$	Masse des Spikes in Blend 2 (Spike/ Back-Spike)
$m_z$	Masse des Back-Spike
$u_{rel}$	relative Unsicherheit
$\omega_x$	Massenanteil des Elements in der Probe
$\omega_z$	Massenanteil des Elements im Back-Spike
$\mu\text{g}$	Mikrogramm
$\mu\text{-RFA}$	Mikro-Röntgenfluoreszenzanalyse
A	Achsenabschnitt
BAM	<i>Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung</i>
BG	Bestimmungsgrenze
cps	Zählimpulse pro Sekunde
DIN	<i>Deutsches Institut für Normung</i>
E	Empfindlichkeit

---

EDX	Energiedispersive Röntgenspektroskopie
EG	Erfassungsgrenze
Fa.	Firma
fs	Femtosekunden
g	Gramm
Gew.-%	Gewichtsprozent
HDPE	Polyethylen mit hoher Dichte
ICP	induktiv gekoppeltes Plasma
ICP-MS	Massenspektrometrie (/spektrometer) mit induktiv gekoppeltem Plasma
ICP-OES	optische Emissionsspektrometrie (/spektrometer) mit induktiv gekoppeltem Plasma
ID	Isotopenverdünnungsanalyse
IDMS	Isotopenverdünnungsanalyse mittels Massenspektrometrie (/spektrometer)
IRMM	<i>Institut für Referenzmaterialien und Messungen</i>
ISO	<i>Internationale Organisation für Normung</i>
kg	Kilogramm
kV	Kilovolt
L	Liter
LA	Laserablation
LA-ICP-MS	Massenspektrometrie (/spektrometer) mit induktiv gekoppeltem Plasma gekoppelt mit Laserablation
LM	Lichtmikroskopie
m/z	Masse-Ladungs-Verhältnis
MC	Multikollektor
mg	Milligramm
mL	Milliliter
MS	Massenspektrometrie (/spektrometer)
NIST	<i>National Institute of Standards and Technology</i>
ns	Nanosekunden
NWG	Nachweisgrenze
∅	Durchmesser

---

OES	optische Emissionsspektrometrie (/spektrometer)
PMMA	Polymethylmethacrylat
PTB	<i>Physikalisch-Technische Bundesanstalt</i>
PTFE	Polytetrafluorethylen
rel.	relativ
REM	Rasterelektronenmikroskop
RSD	relative Standardabweichung
S	Standardabweichung
SIMS	Sekundärionen-Massenspektrometrie
TOF	Flugzeit
UG	Untergrundbereich
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
VB	Vertrauensbereich
$\bar{x}$	Mittelwert
$\Delta M$	Unterschied der Standard Atommasse
$\Omega$	Massenanteil
$I$	Intensität
$K$	$K$ -Faktor (Mass-Bias)
$R$	Isotopenverhältnis
$SE$	Standardfehler
$U$	erweiterte Unsicherheit
$a$	Isotopenhäufigkeit
$k$	$k$ -Faktor (erweiterte Unsicherheit)
$u$	Unsicherheit
$\Psi$	Korrigiertes Intensitätsverhältnis

## 8.2 Abbildungsverzeichnis

### 2 Theoretische Grundlagen

Abb. 2. 1: Schematischer Aufbau der LA-ICP-MS.....	8
Abb. 2. 2: Teilchenwolken einer simulierten Laserablation an einem Metall .....	9
Abb. 2. 3: Schematische Darstellung des Inter-faces am ICP-MS .....	11
Abb. 2. 4: Darstellung der Funktionsweise eines Quadrupolmassenfilters.....	11
Abb. 2. 5: Funktionsprinzip des Sekundär-elektronenvervielfachers .....	12
Abb. 2. 6: Darstellung der schematischen Vorgehensweise bei der simultanen Laser-ablation von Probe und Korrekturstandard .....	29
Abb. 2. 7: Schematische Darstellung des Prinzips der Isotopenverdünnungsanalyse am Beispiel von Silber mit den beiden stabilen Isotopen $^{107}\text{Ag}$ und $^{109}\text{Ag}$ .....	37
Abb. 2. 8: Darstellung der festkörperbasierten Isotopenverdünnungsanalyse mittels LA-ICP-MS.....	41

### 3 Matrixunabhängige Kalibrationsstrategie

Abb. 3. 1: Schematische Darstellung des Grundgerüsts eines strahlenhärtenden Acrylat-lackes nach BROCK ET AL., 2012.....	52
Abb. 3. 2: Strukturformeln der Reaktivverdünner HDDA und TPGDA.....	53
Abb. 3. 3: Radikalbildung des Fotoinitiators Benzophenon durch Photolyse.....	53
Abb. 3. 4: Schematischer Ablauf der radikalischen Polymerisation .....	54
Abb. 3. 5: Prinzipieller Aufbau der verwendeten Dispergiergefäße einer Ultra-Turrax®-Dispergiereinheit mit Rotor und Stator .....	54
Abb. 3. 6: Funktionsprinzip der Planetenkugelmühle n.....	55
Abb. 3. 7: Schematische Darstellung für den Ansatz der Lackmischungen mit Kupfer- und Yttrium-Ölstandards.....	56
Abb. 3. 8: Programm für den Mikrowellendruckaufschluss der kupferhaltigen Einzel-elementstandards aus verschiedenen Matrices mit Yttrium als internem Standard.....	60
Abb. 3. 9: Röntgenspektrum der $\mu$ -RFA-Messung des Polymerstandards 6 und des Pflanzenstandards 6.....	66
Abb. 3. 10: Homogenitätsuntersuchung mittels $\mu$ RFA-Elementverteilungsbildern von Kupfer in den verschiedenen Einzelelementstandards. ....	67

Abb. 3. 11: Rohsignalverlauf von $^{13}\text{C}$ , $^{63}\text{Cu}$ , $^{65}\text{Cu}$ und $^{89}\text{Y}$ während der Laserablation auf den Festkörperstandards aus Agarose (a), Cystein (b), Oxalsäure (c) und Polymer (d). .....	70
Abb. 3. 12: Rohsignalverlauf von $^{13}\text{C}$ , $^{63}\text{Cu}$ , $^{65}\text{Cu}$ und $^{89}\text{Y}$ während der Laserablation auf den Festkörperstandards aus Paraffin (a), Pektin (b), Pflanzen (c) und Polymer (d).....	71
Abb. 3. 13: Normalisierter Signalverlauf von $^{63}\text{Cu}$ und $^{65}\text{Cu}$ während der Laserablation auf den Festkörperstandards aus Agarose (a), Cystein (b), Oxalsäure (c) und Polymer (d). .....	73
Abb. 3. 14: Normalisierter Signalverlauf von $^{63}\text{Cu}$ und $^{65}\text{Cu}$ während der Laserablation auf den Festkörperstandards aus Paraffin (a), Pektin (b), Pflanzen (c) und Polymer (d). .....	74
Abb. 3. 15. Ablationsspuren auf der Polymer- (a), Paraffin- (b), Cystein- (c) und Pflanzenmatrix (d) .....	77
Abb. 3. 16: Signalverlauf von $^{13}\text{C}$ , $^{63}\text{Cu}$ , $^{65}\text{Cu}$ und $^{89}\text{Y}$ in den polymeren Festkörperstandards in steigender Reihenfolge. ....	80
Abb. 3. 17: Kalibrationsgeraden der untergrundkorrigierten $^{63}\text{Cu}$ -Intensitäten der verwendeten Matrices. ....	81
Abb. 3. 18: Kalibration der $^{63}\text{Cu}$ -Intensitäten mit den Standards aller sieben hergestellten Standardreihen mit unterschiedlichen Matrices. ....	83
Abb. 3. 19: Kalibration der über $^{13}\text{C}$ normalisierten $^{63}\text{Cu}$ -Intensitäten aller sieben Kalibrationsreihen. ....	83
Abb. 3. 20: Kalibration der über $^{89}\text{Y}$ normalisierten $^{63}\text{Cu}$ -Intensitäten aller sieben Kalibrationsreihen. ....	84
Abb. 3. 21: Kalibrationsgeraden bei der Verwendung aller Festkörperstandards aus verschiedenen Matrices anhand der normalisierten $^{63}\text{Cu}$ -Intensitäten.....	85
Abb. 3. 22: Darstellung des Einflusses einer mangelnden Matrixanpassung der Standards auf die Bestimmung des Kupfergehalts in der Polymerprobe. ....	86
Abb. 3. 23: Kalibrationsgeraden der über den Massenanteil von Kohlenstoff korrigierten Intensitätsverhältnisse $\Psi^{63}\text{Cu}/^{13}\text{C}$ der verschiedenen Matrices.....	87
Abb. 3. 24: Kalibrationsgeraden der über den Massenanteil von Yttrium korrigierten Intensitätsverhältnisse $\Psi^{63}\text{Cu}/^{89}\text{Y}$ der verschiedenen Matrices. ....	88
Abb. 3. 25: Kalibrationsgeraden bei der Verwendung aller Festkörperstandards aus verschiedenen Matrices anhand der korrigierten Intensitätsverhältnisse $\Psi$ .....	89

Abb. 3. 26: Darstellung des Einflusses der matrixunabhängigen Kalibrationsstrategie auf die Bestimmung des Kupfergehalts in der Polymerprobe bei Verwendung nicht-matrixangepasster Standards. .... 90

#### 4 Festkörperbasierte Isotopenverdünnungsanalyse von Blei

Abb. 4. 1: Schematische Darstellung der festkörperbasierten Isotopenverdünnungsanalyse von Blei mittels LA-ICP-MS. ....	97
Abb. 4. 2: Isotopenangereichertes elementares Blei (47,80 At.-% $^{204}\text{Pb}$ ). ....	99
Abb. 4. 3: Programm für den Mikrowellendruckaufschluss des isotopenangereicherten elementaren Bleis. ....	100
Abb. 4. 4: Schematische Darstellung für den Ansatz der Basislackmischung. ....	101
Abb. 4. 5: Präparationsschema der Lackmischung für den Durchschussmarker. ....	102
Abb. 4. 6: Phasentrennung in den Lackmischungen (Öl-Phase oben; Polymer-Phase unten) ....	102
Abb. 4. 7: Schematisches Präparationsverfahren für die Lackmischung der Back-Spikeschicht. ....	103
Abb. 4. 8: Präparationsverfahren der isotopen-angereicherten Spike-Lackmischung. ....	103
Abb. 4. 9: Schematische Darstellung einer Spiralarakel für die Applikation von dünnen Schichten (SCHAUMANN, 2011). ....	104
Abb. 4. 10: Schematische Schichtabfolge der beiden präparierten Schichtsysteme. ....	105
Abb. 4. 11: Schichtdickenbestimmung mittels Lichtmikroskopieaufnahmen an dem Durchschussmarker (a), Durchschussmarker + Spike (b) und Durchschussmarker + Spike + Back-Spike (c). ....	108
Abb. 4. 12: Rohsignalverlauf von $^7\text{Li}$ , $^{13}\text{C}$ , $^{204}\text{Pb}$ , $^{206}\text{Pb}$ , $^{207}\text{Pb}$ , $^{208}\text{Pb}$ und $^{209}\text{Bi}$ während der Laserablation von Schichtsystem 2 ....	111
Abb. 4. 13: Über $^{13}\text{C}$ normalisierter Signalverlauf von $^7\text{Li}$ , $^{204}\text{Pb}$ , $^{206}\text{Pb}$ , $^{207}\text{Pb}$ , $^{208}\text{Pb}$ und $^{209}\text{Bi}$ während der Laserablation von Schichtsystem 2 ....	112
Abb. 4. 14: Exemplarische Darstellung der über $^{209}\text{Bi}$ normalisierten Bleisotopenverhältnisse in Schichtsystem 2. ....	114
Abb. 4. 15: Signalverläufe von $^7\text{Li}$ , $^{13}\text{C}$ , $^{204}\text{Pb}$ , $^{206}\text{Pb}$ , $^{207}\text{Pb}$ , $^{208}\text{Pb}$ und $^{209}\text{Bi}$ im Back-Spike (a), Spike (b) und Blend (c) ....	119
Abb. 4. 16: Exemplarische Lichtmikroskopie-Aufnahme der Ablationsprofile im Blend. ....	121

---

Abb. 4. 17: Aufgebrachter Dünnschnitt des BAM-H010 auf dem Schichtsystem 1 vor dem Laserabtrag.....	123
Abb. 4. 18: Untergrund- und interferenzkorrigierte Signalverläufe von $^7\text{Li}$ , $^{13}\text{C}$ , $^{204}\text{Pb}$ , $^{206}\text{Pb}$ , $^{207}\text{Pb}$ , $^{208}\text{Pb}$ und $^{209}\text{Bi}$ im Blend aus Spike und BAM-H010. ....	124
Abb. 4. 19: Gemessene Bleiisotopenverhältnisse im Spike und Blend bei der doppelten festkörperbasierten Isotopenverdünnungsanalyse des BAM-H010.....	125
Abb. 4. 20: Transienter Verlauf des Massenanteils von Blei im BAM-H010 bei einer Linienmessung der festkörperbasierten Isotopenverdünnungsanalyse.....	127
Abb. 4. 21: Elementverteilung im Blatt der ARABIDOPSIS HALLERI .....	133
Abb. 4. 22: Elementverteilung im Blatt der ARABIDOPSIS THALIANA.....	134
Abb. 4. 23: Überlagerte Darstellung aus der ermittelten Bleiverteilung und der Übersichtsaufnahme der Blätter der ARABIDOPSIS HALLERI (a) und ARABIDOPSIS THALIANA (b). ....	135

## 5 Festkörperbasierte Isotopenverdünnungsanalyse von Silber

Abb. 5. 1: Schematische Darstellung der Toxizität von Silbernanopartikeln.....	139
Abb. 5. 2: Schematische Darstellung der festkörperbasierten Isotopenverdünnungsanalyse von Silber mit integrierter, ebenfalls festkörperbasierter Mass-Bias-Korrektur mittels LA-ICP-MS.....	140
Abb. 5. 3: Isotopenangereichertes elementares Silber (99,12 At.-% $^{107}\text{Ag}$ ). ....	142
Abb. 5. 4: Programm für den Mikrowellendruckaufschluss des isotopenangereicherten elementaren Silbers. ....	143
Abb. 5. 5: Präparationsschema für den Ansatz der Basislackmischung.....	144
Abb. 5. 6: Präparationsverfahren der Lackmischung für den Durchschussmarker. ....	145
Abb. 5. 7: Schematische Darstellung des Präparationsverfahrens für die Lackmischung der Probeschicht. ....	145
Abb. 5. 8: Präparationsschema der isotopenangereicherten Spike-Lackmischung. ....	146
Abb. 5. 9: Schichtabfolge der beiden präparierten Schichtsysteme.....	148
Abb. 5. 10: Präparierter Probenträger für die festkörperbasierte Isotopenverdünnungsanalyse von Silber in biologischen Proben.....	148
Abb. 5. 11: Schichtdickenbestimmung mittels Lichtmikroskopieaufnahmen an dem Durchschussmarker (a), Durchschussmarker + Spike (b) und Durchschussmarker + Spike + Probe (c). ....	153



Abb. 5. 12: Schichtdickenbestimmung mittels Rasterelektronenmikroskopieaufnahmen an dem Durchschusmarker (a), Durchschusmarker + Spike (b) und Durchschusmarker + Spike + Probe (c).....	154
Abb. 5. 13: Rohsignalverlauf von $^7\text{Li}$ , $^{13}\text{C}$ , $^{107}\text{Ag}$ , $^{109}\text{Ag}$ , $^{113}\text{In}$ und $^{115}\text{In}$ während der Laserablation von Schichtsystem 1 .....	156
Abb. 5. 14: Über $^{13}\text{C}$ normalisierter Signalverlauf von $^7\text{Li}$ , $^{107}\text{Ag}$ , $^{109}\text{Ag}$ , $^{113}\text{In}$ und $^{115}\text{In}$ während der Laserablation von Schichtsystem 1 .....	157
Abb. 5. 15: Über $^{115}\text{In}$ normalisierter Signalverlauf von $^{107}\text{Ag}$ und $^{109}\text{Ag}$ während der Laserablation von Schichtsystem 1 .....	158
Abb. 5. 16: Logarithmische Darstellung der Silber- und Indiumisotopenverhältnisse in Schichtsystem 1.....	159
Abb. 5. 17: Untergrundkorrigierte Signalverläufe von $^7\text{Li}$ , $^{13}\text{C}$ , $^{107}\text{Ag}$ , $^{109}\text{Ag}$ , $^{113}\text{In}$ und $^{115}\text{In}$ in Probe (a), Spike (b) und Blend (c).....	164
Abb. 5. 18: Aufgebrachte Tropfen der Silbernanopartikellösung auf die fixierten Dünnschnitte des Gehirns der implantatfreien Ratte auf präparierten Probenträgern für die festkörperbasierte Isotopenverdünnungsanalyse von Silber. ....	169
Abb. 5. 19: Elementverteilung im Gehirnschnitt.....	171
Abb. 5. 20: Elementverteilung im Dünnschnitt eines Gehirns einer implantattragenden Ratte .....	173

## 8.3 Tabellenverzeichnis

### 2 Theoretische Grundlagen

Tab. 2. 1: Kommerziell verfügbare biologische zertifizierte Referenzmaterialien ..... 18

Tab. 2. 2: Anzahl der stabilen Isotope der Elemente des Periodensystems ..... 36

### 3 Matrixunabhängige Kalibrationsstrategie

Tab. 3. 1: Theoretischer Kohlenstoff- und Sauerstoffgehalt in den verwendeten Matrices... 49

Tab. 3. 2: Ausgewertete Emissionslinien für die Quantifizierung der Kupfer- und Yttrium-  
Gehalte in den aufgeschlossenen Standards ..... 61

Tab. 3. 3: Verfahrenskenngrößen der ICP-OES-Bestimmung der aufgeschlossenen  
Standards nach DIN 32645 ..... 61

Tab. 3. 4: Via ICP-OES bestimmte Kupfergehalte und Vertrauensbereiche in den  
verschiedenen präparierten Festkörperstandards (n = 2) ..... 62

Tab. 3. 5: Via ICP-OES bestimmte Yttriumgehalte und Vertrauensbereiche in den  
verschiedenen präparierten Festkörperstandards (n = 2) ..... 62

Tab. 3. 6: Bestimmung des Kohlenstoffgehalts in präparierten Festkörperstandards mittels  
Elementaranalyse (n = 3) ..... 63

Tab. 3. 7: Intensitätsmaxima der Elementverteilungsaufnahmen der  $\mu$ RFA des höchsten  
Kalibrationsniveaus der verschiedenen Matrices ..... 65

Tab. 3. 8: Homogenitätsbestimmung von Kupfer mittels LA-ICP-MS der präparierten  
Festkörperstandards anhand der über  $^{13}\text{C}$  normalisierten  $^{63}\text{Cu}$ -Intensitäten (n = 15) ..... 76

Tab. 3. 9: Homogenitätsbestimmung von Kupfer mittels LA-ICP-MS der präparierten  
Festkörperstandards anhand der über  $^{89}\text{Y}$  normalisierten  $^{63}\text{Cu}$ -Intensitäten (n = 15) ..... 76

Tab. 3. 10: Vergleich der ermittelten RSDs der verwendeten Matrices zwischen  $\mu$ RFA und  
ns-LA-ICP-QMS ..... 78

Tab. 3. 11: Steigungen und Bestimmtheitsmaße der  $^{63}\text{Cu}$ -Kalibrationsgeraden der  
verschiedenen Matrices ..... 82

Tab. 3. 12: Steigungen und Bestimmtheitsmaße der normalisierten  $^{63}\text{Cu}$ -  
Kalibrationsgeraden der verschiedenen Matrices ..... 85

Tab. 3. 13: Ermittelte Kupfergehalte, Vertrauensbereiche und Bias bei der Anwendung des  
untersuchten Normalisierungsverfahrens ..... 86

---

Tab. 3. 14: Steigungen und Bestimmtheitsmaße der Kalibrationsgeraden der über den Massenanteil korrigierten Intensitätsverhältnisse $\Psi$ der verschiedenen Matrices .....	88
Tab. 3. 15: Verfahrenskenngrößen der LA-ICP-QMS-Bestimmung bei Anwendung der matrixunabhängigen Kalibrationsstrategie (über 13 C normalisiert) nach DIN 32645 .....	89
Tab. 3. 16: Ermittelte Kupfergehalte, Vertrauensbereiche und Bias bei der Anwendung der korrigierten Intensitätsverhältnisse $\Psi$ .....	90
Tab. 3. 17: Berechnete Messunsicherheiten der matrix-unabhängigen Kalibration für Betrachtung 1 und 2.....	93
Tab. 3. 18: Kupferquantifizierung für Betrachtung 1 und 2 mittels LA-ICP-QMS bei der Anwendung der matrixunabhängigen Kalibrationsstrategie .....	94

#### **4 Festkörperbasierte Isotopenverdünnungsanalyse von Blei**

Tab. 4. 1: Regionale Schwankungen der Isotopenhäufigkeit der vier stabilen Bleisotope aufgrund der natürlichen Zerfallsreihen .....	97
Tab. 4. 2: Gemessene Emissionslinien für die Quantifizierung der Bleigehalte und der qualitativen Analyse von Lithium und Bismut in den aufgeschlossenen Lackmischungen ...	107
Tab. 4. 3: Verfahrenskenngrößen der ICP-OES-Bestimmung der aufgeschlossenen Standards nach DIN 32645 .....	107
Tab. 4. 4: Via ICP-OES bestimmte Bleigehalte und Vertrauensbereiche in den verschiedenen Lackmischungen (n = 3) .....	108
Tab. 4. 5: Ergebnisse der Schichtdickenbestimmung in den Einzelschichten (n = 60) .....	109
Tab. 4. 6: Bestimmung der Homogenität der Elementverteilung in den präparierten Schichtsystemen 1 und 2 (n = 20) .....	112
Tab. 4. 7: Homogenitätsbestimmung der Bleisotopenverhältnisse in den Schichtsystemen 1 und 2 (n = 20) .....	114
Tab. 4. 8: Gemessene Isotopenverhältnisse in dem verdünnten NIST SRM 981 Referenzmaterial ohne Mass-Bias-Korrektur.....	116
Tab. 4. 9: Gemessene Isotopenverhältnisse in dem verdünnten NIST SRM 981 Referenzmaterial mit Mass-Bias-Korrektur .....	116
Tab. 4. 10: Via LA-ICP-MS bestimmte Isotopenverhältnisse in dem NIST SRM 981 Referenzmaterial ohne Mass-Bias-Korrektur.....	117

---

Tab. 4. 11: Via LA-ICP-MS bestimmte Isotopenverhältnisse in dem NIST SRM 981 Referenzmaterial mit Mass-Bias-Korrektur .....	118
Tab. 4. 12: Ermittelte Isotopenhäufigkeiten im Back-Spike, Spike und Blend mit Standardfehler ( $\pm$ SE) (n = 20) .....	120
Tab. 4. 13: Ermittelte Mass-Bias-korrigierte Isotopenverhältnisse im Back-Spike, Spike und Blend mit Standardfehler ( $\pm$ SE) (n = 20).....	120
Tab. 4. 14: Verwendete Parameter für die festkörperbasierte einfache Isotopenverdünnungsanalyse von Blei.....	121
Tab. 4. 15: Mittels festkörperbasierter einfacher Isotopenverdünnungsanalyse ermittelter Massenanteil von Blei im Back-Spike .....	122
Tab. 4. 16: Ermittelte Isotopenhäufigkeiten im BAM-H010, Spike und Blend mit Standardfehler ( $\pm$ SE) (n = 20) .....	125
Tab. 4. 17: Ermittelte Mass-Bias-korrigierte Isotopenverhältnisse im BAM-H010, Spike und Blend mit Standardfehler ( $\pm$ SE) (n = 20) .....	126
Tab. 4. 18: Verwendete Parameter für die festkörperbasierte doppelte Isotopenverdünnungsanalyse von Blei im BAM-H010 .....	126
Tab. 4. 19: Mittels festkörperbasierter doppelter Isotopenverdünnungsanalyse ermittelter Massenanteil von Blei im BAM-H010.....	127
Tab. 4. 20: Einfluss der Parameter der einfachen Isotopenverdünnungsanalyse auf die Unsicherheit .....	129
Tab. 4. 21: Einfluss der Parameter der doppelten Isotopenverdünnungsanalyse auf die Unsicherheit .....	130

## **5 Festkörperbasierte Isotopenverdünnungsanalyse von Silber**

Tab. 5. 1: Gemessene Emissionslinien für die Quantifizierung des Massenanteils von Silber und der qualitativen Analyse von Lithium und Indium in den aufgeschlossenen Lackmischungen .....	150
Tab. 5. 2: Verfahrenskenngrößen der ICP-OES-Bestimmung von Silber in aufgeschlossenen Schichtsystemen nach DIN 32645 .....	150
Tab. 5. 3: Via ICP-OES bestimmte Silbergehalte und Vertrauens-bereiche in den verschiedenen Lackmischungen (n = 3) .....	151

Tab. 5. 4: Verwendete Parameter für die einfache Isotopenverdünnungs-analyse von Silber in den aufgeschlossenen Lackmischungen (n = 10) .....	152
Tab. 5. 5: Mittels einfacher Isotopenverdünnungsanalyse ermittelter Massenanteil von Silber in den ausgehärteten Lackmischungen von Festkörperspike und -probe.....	152
Tab. 5. 6: Ergebnisse der Schichtdickenbestimmung mittels Lichtmikroskopie in den Einzelschichten (n = 50).....	153
Tab. 5. 7: Ergebnisse der Schichtdickenbestimmung mittels Rasterelektronenmikroskopie in den Einzelschichten (n = 50).....	155
Tab. 5. 8: Bestimmung der Homogenität der Elementverteilung durch Normalisierung mit $^{13}\text{C}$ in den präparierten Schichtsystemen 1 und 2 (n = 10) .....	157
Tab. 5. 9: Bestimmung der Homogenität der Elementverteilung durch Normalisierung über den Korrekturstandard $^{115}\text{In}$ in den präparierten Schichtsystemen 1 und 2 (n = 10) ...	158
Tab. 5. 10: Homogenitätsbestimmung der Isotopenverhältnisse von Silber und Indium in den Schichtsystemen 1 und 2 (n = 10) .....	160
Tab. 5. 11: Bestimmtes und theoretisches Indiumisotopenverhältnis ( $\pm$ SE) in den Lösungen (n=3).....	162
Tab. 5. 12: Ermittelte Mass-Bias-korrigierte Isotopenhäufigkeiten ( $\pm$ SE) in Probe, Spike und Blend (n = 20) .....	165
Tab. 5. 13: Ermittelte Mass-Bias korrigierte Isotopenverhältnisse ( $\pm$ SE) in Probe, Spike und Blend mit Standardfehler (n = 20).....	165
Tab. 5. 14: Verwendete Parameter für die festkörper-basierte einfache Isotopenverdünnungsanalyse von Silber .....	165
Tab. 5. 15: Mittels festkörperbasierter einfacher Isotopenverdünnungsanalyse ermittelter Massenanteil von Silber in der Probe .....	166
Tab. 5. 16: Einfluss der Parameter der einfachen Isotopenverdünnungsanalyse auf die Unsicherheit .....	167

## 6 Zusammenfassung und Ausblick

Tab. 6. 1: Mittlere Richtigkeit und Unsicherheit der verschiedenen Kalibrationsstrategien für die LA-ICP-MS .....	180
---	-----

**8 Anhang**

Tab. 8. 1: Verwendete Messparameter des ICP-OES ..... 202

Tab. 8. 2: Exakte Massenanteile der Standards für die ICP-OES-Analyse von Cu und Y ..... 202

Tab. 8. 3: Verwendete Messparameter des ICP-MS ..... 202

Tab. 8. 4: Exakte Massenanteile der Standards für die ICP-OES-Analyse von Pb, Bi und Li .. 202

Tab. 8. 5: Exakte Massenanteile der Standards für die ICP-OES-Analyse von Ag, In und Li .. 202

Tab. 8. 6: Verwendete Messparameter des REM ..... 203

## 8.4 Gleichungsverzeichnis

Gl. 1: Isotopenverhältnis ( $R$ ) .....	14
Gl. 2: $K$ -Faktor zur Mass-Bias-Korrektur .....	14
Gl. 3: Mass-Bias korrigiertes Isotopenverhältnis ( $R_{korrr.}$ ) .....	14
Gl. 4: Mass-Bias korrigierte Intensität des Isotops ( $I_{korrr.}^i$ ).....	14
Gl. 5: Isotopenhäufigkeit ( $a^i$ ) .....	14
Gl. 6: Berechnung des korrigierten Intensitätsverhältnis ( $\Psi$ ) .....	27
Gl. 7: Berechnung des Massenanteils ( $\omega$ ) des Analyten .....	27
Gl. 8: Einfache Isotopenverdünnungsanalyse.....	38
Gl. 9: Doppelte Isotopenverdünnungsanalyse .....	39
Gl. 10: Einfache festkörperbasierte Isotopenverdünnungsanalyse.....	44
Gl. 11: Doppelte festkörperbasierte Isotopenverdünnungsanalyse.....	45
Gl. 12: Relative Standardabweichung ( $RSD$ ) .....	64
Gl. 13: Mittelwert ( $\bar{x}$ ).....	64
Gl. 14: Standardabweichung ( $s$ ).....	64
Gl. 15: Berechnung der relativen Unsicherheit ( $u_{rel}$ ).....	92
Gl. 16: Berechnung der relativen Unsicherheit ( $u_{rel}$ ) aus der absoluten Unsicherheit ( $u$ ).....	92
Gl. 17: Berechnung der absoluten Unsicherheit ( $u$ ) aus der Standardabweichung ( $s$ ).....	92
Gl. 18: Berechnung des Standardfehlers ( $SE$ ) .....	109
Gl. 19: Interferenzkorrektur von $^{204}\text{Pb}$ durch $^{204}\text{Hg}$ .....	123

# Publikationen und Konferenzbeiträge

## Konferenzbeiträge (Vortrag)

---

1. **Thieleke, J. P.**, Frankfurter, R. und Vogt, C.;  
Calibration strategies for the determination of trace element distribution in biological tissue by LA-ICP-MS. Winter Conference on Plasma Spectrochemistry 2014, 6.-11. Januar, Florida (USA), **2014**.
2. **Thieleke, J. P.**, Frankfurter, R. und Vogt, C.;  
Calibration strategies for the determination of beryllium distribution in plant tissue by LA-ICP-MS. European Symposium on Atomic Spectrometry – ESAS 2014, 16.-21. März, Prag (Tschechien) **2014**.
3. **Thieleke, J. P.** und Vogt, C.;  
Kalibrationsstrategien zur Bestimmung von Spurenelementverteilungen in biologischem Gewebe mittels LA-ICP-MS. ICP-MS Anwendertreffen 2014, 13.-14. November, Wolfgang-Hanau (Deutschland), **2014**.
4. **Thieleke, J. P.**, Dreyer, A. und Vogt, C.;  
EMRP – Q-AIMDS – Project: Reference samples for quantification of trace elements in biomaterials by solid state spectroscopy. European Materials Research Society, €-MRS, Analytical Techniques for Precise Characterization of Nanomaterials – ALTECH 2014, 26.-30. Mai, Lille (Frankreich), **2014**.
5. **Thieleke, J. P.**, Dreyer, A. und Vogt, C.;  
Development of a novel calibration strategy for LA-IDMS. European Winter Conference on Plasma Spectrochemistry – EWPCPS 2015, 22.-26. Februar, Münster (Deutschland), **2015**.
6. **Thieleke, J. P.**, Dreyer, A. und Vogt, C.;  
Development of a novel calibration strategy for LA-ICP-IDMS. ANAKON 2015, 23.-26. März, Graz (Österreich), **2015**.
7. **Thieleke, J. P.**, Dreyer, A. und Vogt, C.;  
Referenzmaterialien und Kalibrationsstrategien für die Quantifizierung von Spurenelementen in organischen Matrices. 18. Tagung Festkörperanalytik, 6.-8. Juli, Wien (Österreich), **2015**.
8. **Thieleke, J. P.** und Vogt, C.;  
Isotope dilution calibration strategy by LA-ICP-MS using solid reference materials. Winter Conference on Plasma Spectrochemistry 2016, 8.-13. Januar, Tucson (USA), **2016**.
9. **Thieleke, J. P.** und Vogt, C.;  
Kalibrationsstrategien für die orts aufgelöste Festkörperspektroskopie biologischer Proben mit Laserablation ICP-MS. Leibniz Forschungszentrum ZFM – Zentrum für Festkörperchemie und Neue Materialien ZFM – Festkörperrnachtsmahl 2016, 30. Mai, Hannover (Deutschland), **2016**.



## Konferenzbeiträge (Poster)

---

1. Dreyer, A., Schwartz, G., **Thieleke, J. P.** und Vogt, C.;  
Polymeric layered systems as reference materials for solid state spectroscopic analysis. Polymers for advanced technologies – PAT 2013, 29. September- 2. Oktober, Berlin (Deutschland), **2013**.
2. **Thieleke, J. P.**, Dreyer, A., Schwartz, G. und Vogt, C.;  
Polymeric layer systems as reference materials for the calibration of solid state spectroscopic analysis techniques. European Winter Conference on Plasma Spectrochemistry – EWPCS 2015, 22.–26. Februar, Münster (Deutschland), **2015**.
3. Dreyer, A., **Thieleke, J. P.**, Schwartz, G. und Vogt, C.;  
Polymeric mono and multi layer systems as reference materials for solid state spectroscopic analysis techniques. ANAKON 2015, 23.-26. März, Graz (Österreich), **2015**.
4. **Thieleke, J. P.**, Chen, X. und Vogt, C.;  
Development of a matrix-independent calibration strategy by LA-ICP-MS. Winter Conference on Plasma Spectrochemistry 2016, 8.-13. Januar, Tucson (USA), **2016**.
5. **Thieleke, J. P.** und Vogt, C.;  
Entwicklung einer Kalibrationsstrategie für die Analyse von biologischen Proben mittels festkörperbasierter LA-ICP-IDMS. 19. Arbeitstagung Angewandte Oberflächenanalytik – AOFA 2016, 5. – 7. September, Soest (Deutschland), **2016**.

## Artikel in Fachzeitschrift

---

1. **Thieleke, J. P.** und Vogt, C.;  
A calibration strategy for LA-ICP-MS using isotope dilution for solid reference materials. *J. Anal. At. Spectrom.* **2016**, 31.



# Lebenslauf

## Persönliche Daten

---

Name: Jan Pascal Thieleke  
Geburtstag: 05.04.1988  
Geburtsort: Bergisch-Gladbach  
Staatsangehörigkeit: deutsch

## Berufserfahrung

---

11/2013 – 12/2016      Wissenschaftlicher Mitarbeiter  
Leibniz Universität Hannover  
Institut für Anorganische Chemie, Arbeitskreis Analytik

## Hochschulausbildung

---

seit 11/2013              Promotion zum Dr. rer. nat.  
Leibniz Universität Hannover  
Institut für Anorganische Chemie, Arbeitskreis Analytik  
Promotionsthema: Beiträge zur Bestimmung von lokalen  
Verteilungen ausgewählter toxischer Elemente

10/2011 – 10/2013      Studium des M. Sc. in Analytik  
Leibniz Universität Hannover  
Masterarbeitsthema: Entwicklung von Laserablationsstandards  
für die Analyse von Pflanzenproben

09/2008 – 09/2011      Studium des B. Sc. in naturwissenschaftlicher Forensik  
Hochschule Bonn-Rhein-Sieg  
Bachelorarbeitsthema: Entwicklung eines Screening-Verfahrens  
zum Nachweis von Arzneistoffen in biologischer Matrix auf  
Grundlage der Festphasenextraktion

## Grundwehrdienst

---

07/2007 – 03/2008      Luftwaffensicherungsstaffel S  
33. Jagdbombergeschwader in Cochem

## Schulbildung

---

1998 – 2007              Städtische Gesamtschule Troisdorf  
Allgemeine Hochschulreife

1994 – 1998              Grundschule Troisdorf – Oberlar

