

Sehr geringe Matrixempfindlichkeit

Dirk Flottmann, Jürgen Hins, Christian Rettenmaier, Norbert Schnell, Andreas Trinkle

Bisher wenig beachtete Methoden zur Ionenanalytik stellen die zweidimensionale Isotachophorese (ITP-ITP) [4-7] bzw. die Kopplung zwischen Isotachophorese und Kapillarzonenelektrophorese (ITP-CZE) [8,9] dar. Diese Verfahren zeichnen sich durch sehr geringe Matrixempfindlichkeit aus und sind prinzipiell auf alle ionischen bzw. ionisierbaren Analyten anwendbar.

Stark matrixbehaftete Proben stellen in der instrumentellen Ionenanalytik häufig ein Problem dar, da Überschusskomponenten die Analyse stören oder die zum Einsatz kommenden Analysengeräte beschädigen können [1-3]. Deshalb werden oft zeitaufwendige Probenvorbereitungsschritte benötigt, die häufig zu schlechter Reproduzierbarkeit neigen und die Analysenkosten erhöhen.

Die Autoren

Prof. Dr. Dirk Flottmann, Jahrgang 1965: Studium der Chemie an der Universität Bielefeld, 1995-2002 Wacker Chemie GmbH/Burghausen und Wacker Siltronic AG/Singapur. Seit April 2002 arbeitet er im Fachbereich Chemie der FH Aalen im Studienschwerpunkt Analytische Chemie. Sein Forschungsinteresse liegt auf dem Gebiet der Elementanalytik, der Spurenanalytik und neuartiger Trennverfahren.

Dip.-Ing. (FH) Jürgen Hins, Jahrgang 1969: Studium der Chemie an der FH Aalen, bis 2003 Mitarbeiter der Firma J&M Mess- und Regeltechnik GmbH, seit September 2003 Mitarbeiter im BMBF-Projekt von Prof. Flottmann und Prof. Schnell.

Dipl.-Ing. (FH) Christian Rettenmaier, Jahrgang 1978: Studium der Chemie an der FH Aalen, 2003-2004 Forschungsaufenthalt in Singapur, ab Oktober 2004 Beginn der Dissertation an der Universität Freiburg.

Andreas Trinkle, Jahrgang 1976: Studium der Chemie an der FH Aalen, ab September 2004 Beginn der Diplomarbeit bei der Landeswasserversorgung In Langenau auf dem Gebiet der organischen Spurenanalytik mittels LC-MS.

Prof. Dr. Norbert Schnell, Jahrgang 1960: Studium der Biochemie an der FU Berlin und der Eberhard-Karls-Universität Tübingen, 1991-93 Forschungsaufenthalt am MIT und Caltech, USA, 1994-2002 AstraZeneca plc in Manchester, UK und Boston, USA. Seit September 2002 arbeitet er im Fachbereich Chemie der FH Aalen im Studienschwerpunkt Molekulare Biotechnologie. Sein Forschungsinteresse liegt auf dem Gebiet der Vernetzung von Chemie und Biologie, beispielsweise der Aufklärung der Interaktionen von Molekülen mit lebenden Zellen.



Flottmann



Hins



Rettenmaier

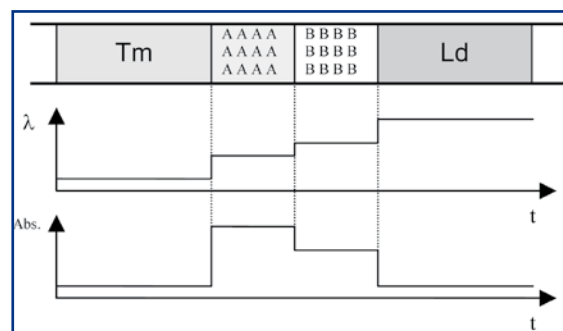


Abbildung 1: Darstellung des Verlaufs der Leitfähigkeit und der UV-Absorption eines isotachophoretischen Systems

Isotachophorese

Bei der Isotachophorese handelt es sich um eine elektrophoretische Trennmethode, bei der Ionen und ionisierbare Komponenten im elektrischen Feld gemäß ihrer elektrophoretischen Mobilitäten getrennt und detektiert werden.

Die ITP arbeitet mit einem diskontinuierlichen Elektrolytensystem, bestehend aus einem Leit- (Leading electrolyte, Ld) und einem Folgeelektrolyten (Terminating electrolyte, Tm). Der ansonsten übliche Medienfluss unterbleibt dank des hydrodynamisch geschlossenen Systems [10].

Die Analytionen ordnen sich ihrer Mobilität entsprechend zwischen dem Leitelektrolyt mit der höchsten Mobilität und dem Folgeelektrolyt mit der geringsten Mobilität unter dem Einfluss eines elektrischen Feldes in homogenen, diskreten Zonen an und wandern in sich dann einstellenden stationären Zustand alle mit gleicher Geschwindigkeit (griech.: isos = gleich, tachos = Geschwindigkeit).

Am Ende der Trennsäule wird ein treppenartiges Leitfähigkeitssignal aufgezeichnet, wobei die zeitliche Länge einer Analytzone zur Quantifizierung, die relative Stufenhöhe ($L_d = 0$; $T_m = 1$) zur Identifikation dient.

Zusätzlich zur Leitfähigkeit kann die UV/Vis-Absorption gemessen werden, wobei ein rechteckiges Signal erhalten wird (Abbildung 1).

Methodenentwicklung

Die Selektivität einer isotachophoretischen Trennung kann durch eine Veränderung der effektiven Mobilitäten der Analyten beeinflusst werden. Den wichtigsten Parameter stellt dabei der pH-Wert dar, der die effektive Ladung beeinflusst [10].

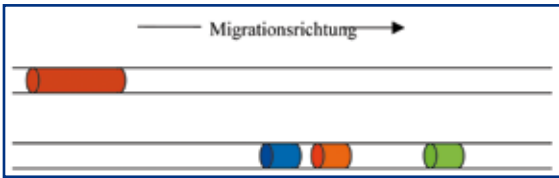


Abbildung 2: Schematische Darstellung einer CZE-Trennung.

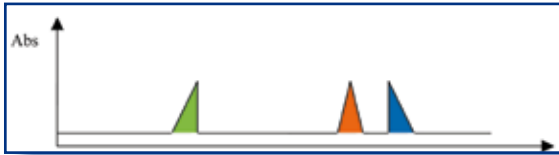


Abbildung 3: Schematisches UV/Vis-Signal. Die Abweichungen der Peakformen von der idealen Gauss-Kurve ergeben sich aus Elektrodispersionseffekten [1]

- grün: höhere Mobilität als Elektrolyt
- braun: gleiche Mobilität wie Elektrolyt
- blau: niedrigere Mobilität als Elektrolyt

Eine weitere Möglichkeit zur Mobilitätsbeeinflussung besteht in der Zugabe von Komplexbildnern zum Leitelektrolyten. Der Komplexbildner soll mit dem Analyten im dynamischen Gleichgewicht stehen und somit dessen effektive Ladung beeinflussen und/oder den effektiven Radius des Analytens vergrößern.

Kapillarzonenelektrophorese

Im Gegensatz zur ITP arbeitet die CZE mit einem kontinuierlichen Elektrolytssystem. Dadurch wandern die Analytionen mit individueller Geschwindigkeit, wodurch die aufgezeichneten Analytsignale Peakform aufweisen. Ein elektroosmotischer Fluss (EOF) kann durch das hydrodynamisch geschlossene System nicht auftreten [10].

Abbildung 2 zeigt schematisch die Trennung der Analyten im Hintergrundelektrolyt, Abbildung 3 die dazugehörigen Signale der UV-Absorption.

Gerätebeschreibung

Das ItaChrom II Kapillarisotachophoresegerät der Firma „J&M Analytische Mess- und Regeltechnik GmbH, Aalen“ wird mit zwei gekoppelten Kapillaren vertrieben [10]. Die Vortrennsäule ist mit einem Leitfähigkeitsdetektor, die Analytische Säule sowohl mit einem Leitfähigkeitsdetektor als auch mit einem UV-Detektor ausgestattet.

Durch die Kopplung zweier Kapillaren wird sowohl die zweidimensionale ITP, als auch die ITP-CZE-Kopplung ermöglicht. Überschussbestandteile lassen sich in der Oberen Säule quantifizieren und abtrennen, bevor die in geringerer Konzentration vorliegenden Komponenten in die dünnere Analytische Säule übergeben werden; dort werden sie getrennt und schliesslich detektiert. Das Injektionsventil fasst 30 µl; zusätzlich kann durch ein über dem Ventil angebrachtes Septum ein frei wählbares Volumen injiziert werden.

Die Vorratsgefäße CE1 und CE2 sind mit Leitelektrolyt bzw. Hintergrundelektrolyt gefüllt und dienen zur Bereitstellung einer ausreichenden Pufferkapazität. Sie sind durch semipermeable Membranen von den Kapillarsäulen getrennt, wodurch das Auslaufen der Elektrolytlösungen durch den hydrostatischen Druck in den Kapillaren verhindert wird. Im Vorratsgefäß TE befindet sich der Endelektrolyt, der die geringste elektrophoretische Mobilität im System besitzt. Abbildung 4 zeigt den schematischen Geräteaufbau.

Applikationsbeispiele

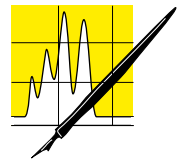
Wasseranalytik

Die Qualität von Fluss-, Regen-, Trink- und Abwasser hängt unter anderem vom Gehalt anorganischer Anionen ab. Mit der Isotachophorese können z.B. die Ionen Chlorid, Nitrat, Sulfat, Nitrit, Fluorid und Phosphat gleichzeitig bestimmt werden. Nachfolgend sind die verwendeten Kapillarsäulen und das Elektrolytssystem aufgeführt.

	Länge [mm]	Innendurchmesser [µm]	Stromstärke [µA]
Vortrennsäule:	160	800	200
Analytische Säule:	160	300	8

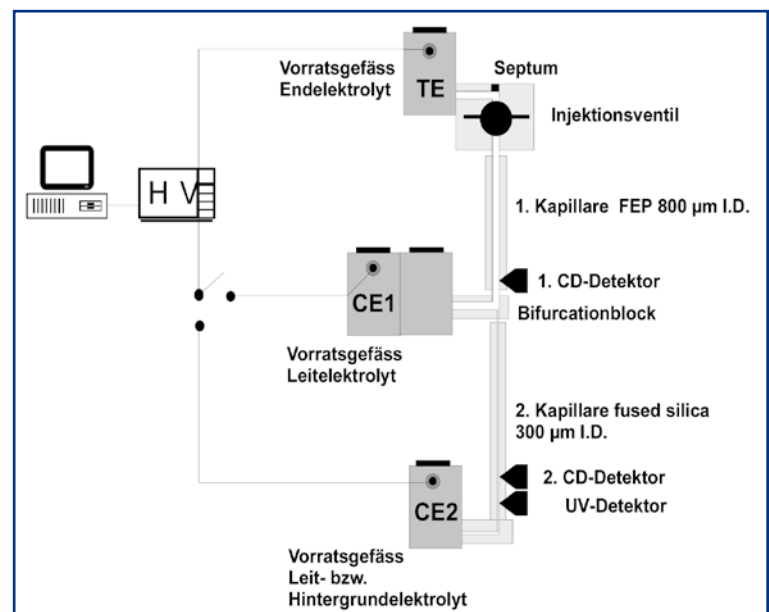
Leitelektrolyt 1:	5,0 mmol/L Dithionsäure 7,0 mmol/L β-Alanin 1,8 mmol/L Magnesiumacetat 0,1% Methylhydroxyethylcellulose pH = 3,5
Leitelektrolyt 2:	1,0 mmol/L Dithionsäure 1,4 mmol/L β-Alanin 0,4 mmol/L Magnesiumacetat 0,02% Methylhydroxyethylcellulose pH = 3,5
Endelektrolyt:	5 mmol/L Citronensäure

Die Analysenzeit pro Lauf beträgt etwa 20 Minuten.



AUFsätze

Abbildung 4: Schematische Darstellung des ItaChrom II (manuelle Version)



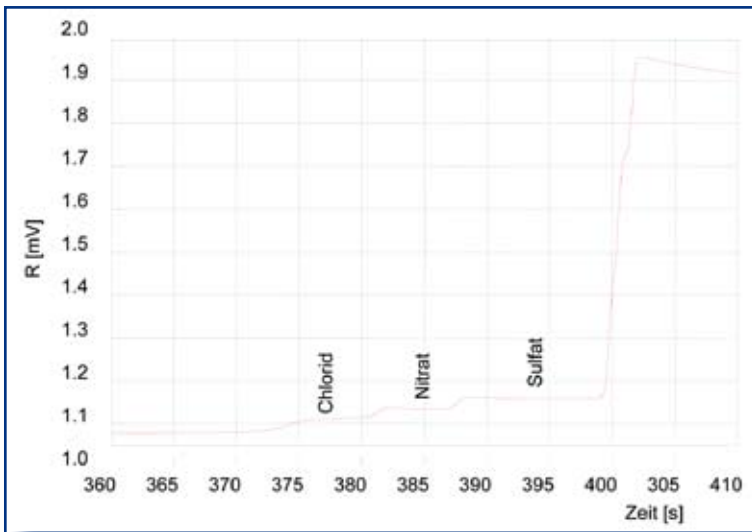


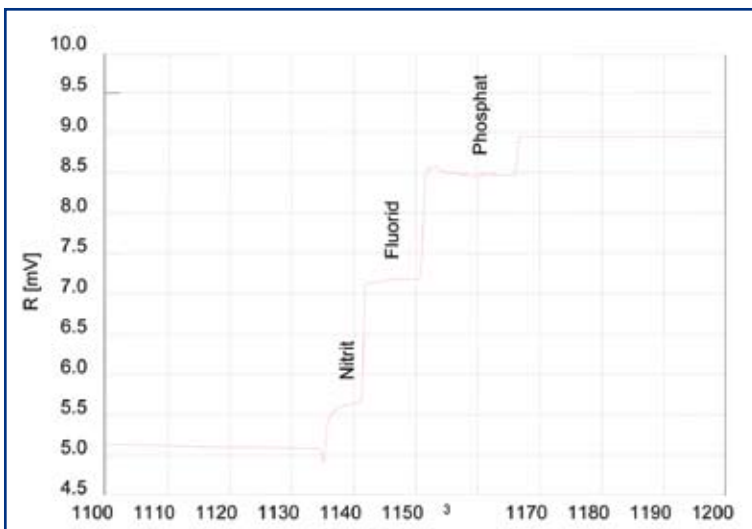
Abbildung 5: Leitfähigkeitssignal der Vortrennsäule c(Cl⁻, NO₃⁻, SO₄²⁻): je 300 µmol/L

Da o.g. Anionen in realen Proben in verschiedenen Konzentrationsbereichen vorkommen, müssen in den beiden Säulen unterschiedliche Konzentrationen des Leitions verwendet werden [10], um alle Analyten in einem Analysengang quantifizieren zu können.

Durch den Zusatz von Mg²⁺ wird die effektive Mobilität des Sulfats erniedrigt und dadurch die Trennung von Sulfat und Nitrat ermöglicht.

Die Anionen Chlorid, Nitrat und Sulfat können dank der vergleichsweise hohen Konzentrationen bereits in der Vortrennsäule quantifiziert werden. Nach Durchgang durch die Vortrennsäule werden sie ausge-

Abbildung 6: Leitfähigkeitssignal der Analytischen Säule c(NO₂⁻, F⁻, PO₄³⁻): je 30 µmol/L



schleusst. Die verbleibenden Analyten werden in die Analytische Säule überführt und dort quantifiziert.

Abbildungen 5 und 6 zeigen die Leitfähigkeitssignale der Vortrenn- bzw. Analytischen Säule eines Standards.

Für die in geringen Konzentrationen vorkommenden Anionen ergeben sich nach DIN 32 645 [11] die Nachweis- (LOD) und Bestimmungsgrenzen (LOQ) zu:

	Nitrit	Fluorid	Phosphat
LOD [µmol/L]	2,0	2,9	2,5
LOQ [µmol/L]	6,9	9,8	8,3

Bestimmung von Fluorid, Phosphat und Saccharinat in Zahnpasta

Die Bestimmung der Gehalte an Fluorid, Phosphat und Saccharin einer handelsüblichen Zahnpasta wurde mittels Standardaddition durchgeführt, um eventuelle Einflüsse der Matrix auf die Trennung auszuschließen.

Nachfolgend sind die verwendeten Säulen und das Elektrolytssystem aufgeführt:

	Länge [mm]	Innendurchmesser [µm]	Stromstärke [µA]
Vortrennsäule:	160	800	250
Analytische Säule:	160	300	50

Leitelektrolyt:	8 mmol/L HCl 3,5 mmol/L β-Alanin 3 mmol/L Bis-(tris)-propan 0,1% Methylhydroxyethylcellulose pH = 3,60
Endelektrolyt:	10 mmol/L Essigsäure

0,30 g der Zahnpasta wurden in einen Messkolben eingewogen, in 50 mL Wasser gelöst und mit dieser Lösung eine Standardaddition durchgeführt.

Abbildung 7 zeigt die Überlagerung des Leitfähigkeits- und des UV-Absorptionssignals bei 254 nm der so erhaltenen Lösung.

In Abbildung 8 sind die Kalibriergeraden (Standardadditionsverfahren) für o.g. Analyten dargestellt. Alle drei Analyten sind zu über 99,9% linear korreliert.

Bestimmung von Thiamin in Cornflakes

Ein Beispiel für die Anwendung der Kopplung von ITP und CZE stellt die Bestimmung von Thiamin in einem handelsüblichen Cornflakes-Produkt dar. Thiamin, das zur Gruppe der B-Vitamine gehört, spielt in Form seines Phosphorsäureesters eine wichtige Rolle als Coenzym im Stoffwechsel [12].

Die instrumentellen Parameter sind in folgender Tabelle zusammengefasst:

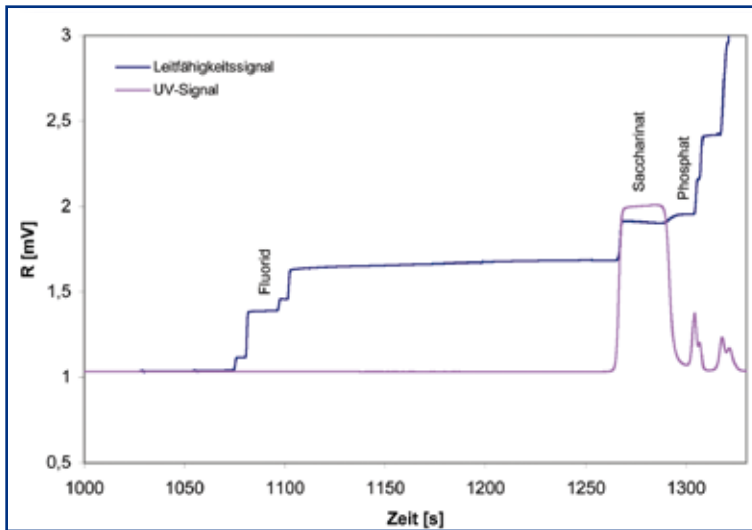


Abbildung 7: Isotachopherogramm einer 6 g/L Zahnpastalösung; Überlagerung des Leitfähigkeits- und des Absorptionssignals bei 254 nm. Bei den UV-Signalen hinter Saccharinat handelt es sich um Brechungssignale.

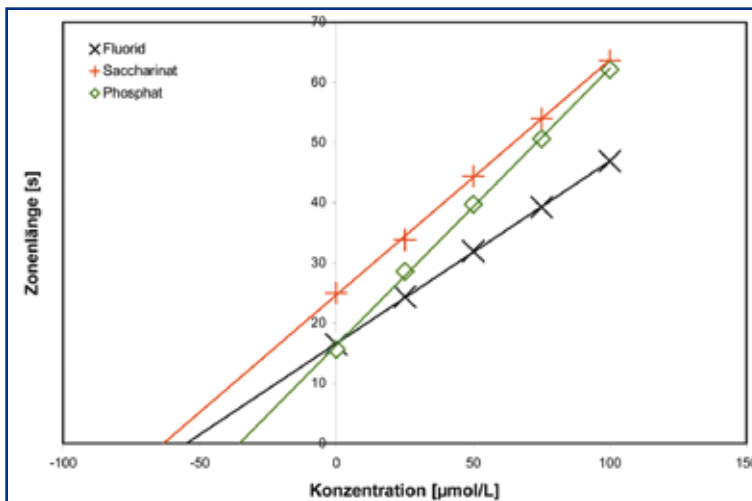


Abbildung 8: Standardaddition von Fluorid, Phosphat und Saccharinat

	Länge [mm]	Innendurchmesser [µm]	Stromstärke [µA]
Vortrennsäule:	90	800	250
Analytische Säule:	160	300	50

Leitelektrolyt:	10 mmol/L Ammoniumacetat 0,1% Methylhydroxyethylcellulose pH = 5,0
Hintergrundelektrolyt:	50 mmol/L Essigsäure 0,1% Methylhydroxyethylcellulose pH = 3,1
Endelektrolyt:	10 mmol/L Essigsäure

1,0 g handelsübliche Cornflakes wurden zerkleinert, in 10 mL Wasser aufgeschlämmt und anschliessend über ein 0,45 µm-Filter filtriert. Die erhaltene Lösung wurde in 5 Aliquote aufgeteilt. Zu diesen Aliquoten wurden 1, 2, 3 und 10 µmol/L Thiamin zuaddiert und anschliessend vermessen.

Das Thiamin zeigt eine gute UV-Absorption bei 254 nm, weswegen diese Wellenlänge zur Auswertung der Experimente herangezogen wurde.

Abbildung 9 zeigt die Signale des Oberen- und Unteren Leitfähigkeitsdetektors sowie des UV-Detektors.

In Abbildung 10 ist das Ergebnis der Standardadditionskalibrierung (Auswertung des UV-Detektors bei 254 nm) graphisch dargestellt.

Der Thiamingehalt in den Cornflakes wurde zu 62,4 mg/kg bestimmt. Der Tagesbedarf eines Erwachsenen beträgt ca. 1 – 2 mg [13].

Zusammenfassung

Die entwickelten zweidimensionalen ITP-ITP bzw. ITP-CZE-Methoden liefern eine hohe Auflösung der interessierenden Substanzen. Voraussetzung hierfür ist, dass die effektiven Mobilitäten der Analyten innerhalb des durch die Wahl des Leit- bzw. Endelektrolyten aufgespannten „Mobilitätsfensters“ liegen.

Im Gegensatz zu klassischen Bestimmungen, wie z.B. Redox-titrationen liefert die zweidimensionale ITP die Möglichkeit einer hochselektiven, simultanen Bestimmung mit kürzeren Analysenzeiten.

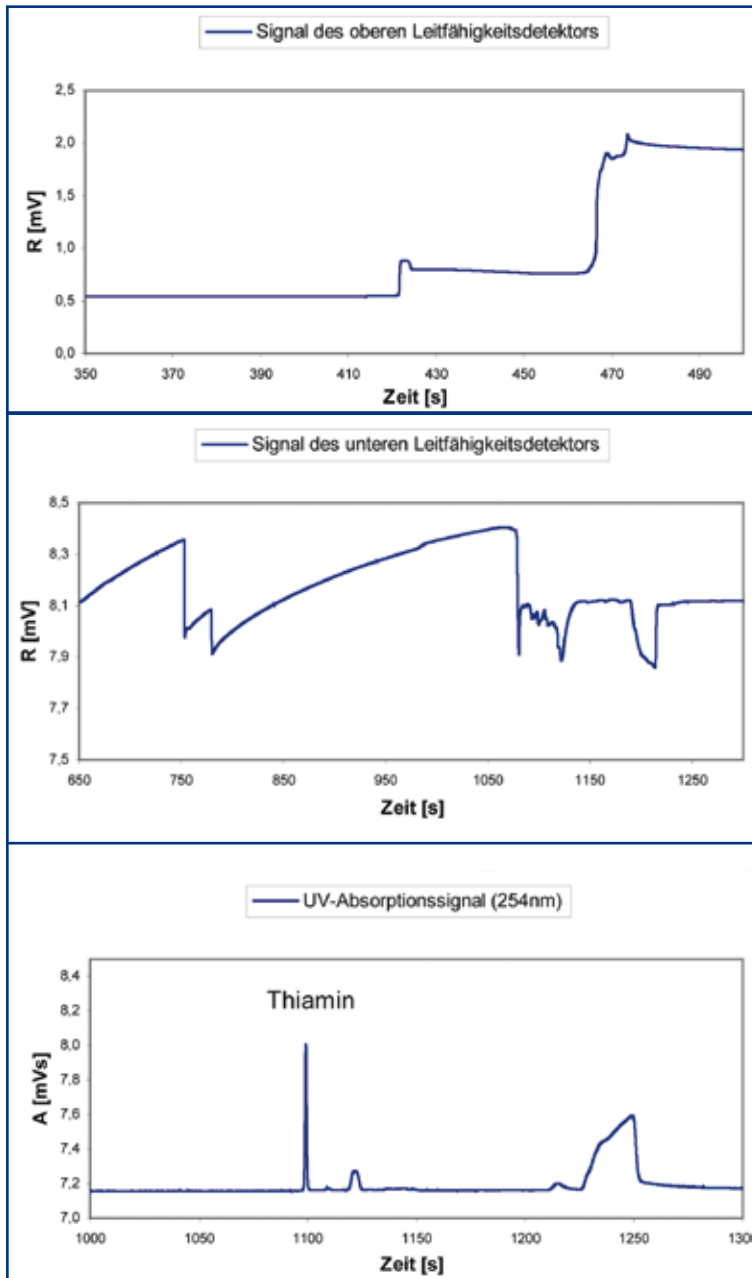
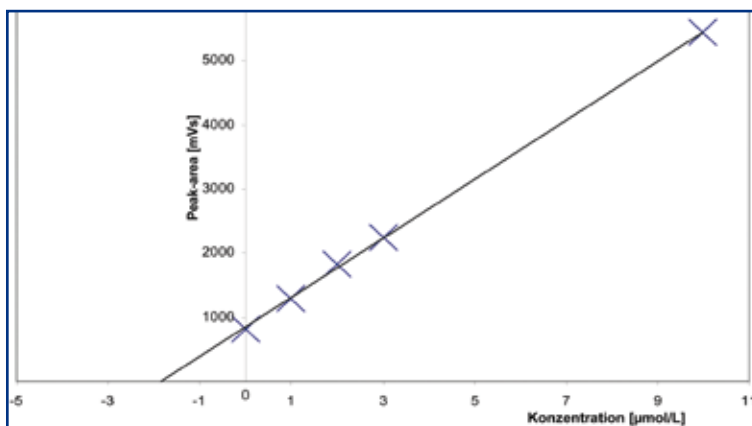


Abbildung 9: Signale der drei Detektoren für einen Analysengang mit oben beschriebener Cornflakeslösung.

Abbildung 10: Standardadditionsgerade für Thiamin (Korrelationskoeffizient: 0,99)



Die on-line Kombination der Kapillarisotachophorese (C-ITP) mit der Kapillarzonenelektrophorese (CZE) in der gekoppelten Säulenordnung zeigt die inhärente Bedeutung der ITP als Aufkonzentrationsschritt für die nachfolgende Trennung nach dem Prinzip der CZE. Die Entfernung von Matrixbestandteilen in der Vortrennsäule verhindert das Überladen der Analytischen Säule, so dass niedrige Nachweisgrenzen erreicht werden können. Die Matrixentfernung im 1. ITP-Schritt kann auch einen grossen Vorteil gegenüber der Ionenchromatographie darstellen.

Die vorgestellten Analysenverfahren können erfolgreich für die Untersuchung verschiedenster Lebensmittel angewendet werden. Die zahlreichen Möglichkeiten zur Optimierung der elektrophoretischen Bedingungen erlauben die gezielte Anpassung des Systems an das jeweilige Trennproblem bzw. die Probenmatrix. Darüber hinaus wird nur eine wenig aufwändige Probenvorbereitung benötigt.

Die in diesem Beitrag beschriebenen Beispiele sind nur zur Inspiration gedacht und zeigen nur einen kleinen Teil der vielfältigen Anwendungsmöglichkeiten.

Literatur

- [1] R. Saari-Nordhaus, L.M. Nair, J.M. Anderson, *J. Chromatogr.* 671, (1994) 159-163
- [2] F.A. Bytenhuys, *J. Chromatogr.* 218, (1981) 57-64
- [3] P.R. Haddad, *J. Chromatogr.* 546, (1991) 411-421
- [4] F.M. Everaerts, J.I. Becker, T.P.E.M. Verheggen, *Isotachophoresis: Theory, Instrumentation and Applications*, Elsevier, Amsterdam, 1976
- [5] P. Gebauer, W. Thormann, P. Bocek, *J. Chromatogr.* 608, (1992) 47-57
- [6] J. Boden, K. Bächmann, *J. Chrom.* 734, (1996) 319-330
- [7] B. Szczygiel, A. Waligora, *Galvanotechnik* 92 (2001), Nr. 11
- [8] D. Kaniansky, J. Marak, *J. Chrom.* 498, (1990) 191-204
- [9] D. Kaniansky, I. Zelensky, A. Hybenova, F.I. Onuska, (1994) *Anal Chem* 66: 4258-4264
- [10] T. Meissner, *ITP-Kompodium*, J&M Analytische Mess- und Regeltechnik, Aalen, 1998
- [11] Deutsches Institut für Normung, DIN 32645: Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze, Beuth-Verlag, Berlin, 1994
- [12] P. Karlsson, D. Doenecke, J. Koolman, *Kurzes Lehrbuch der Biochemie*, 14. Aufl., G. Thieme Verlag, Stuttgart, 1994
- [13] E. Buddecke, *Grundriss der Biochemie*, 8. Aufl., W. de Gruyter Verlag, Berlin, 1989