

Ionenmobilitätsspektrometrische Methode zum schnellen Nachweis von mikrobiellen Stoffwechselprodukten

Cornelia Zscheppank, Klaus Kerpen, Andriy Kuklya, Ursula Telgheder

[Universität Duisburg-Essen, Instrumentelle Analytische Chemie](#)

Einleitung

Die Ionenmobilitätsspektrometrie (IMS) hat sich als eine klassische Methode zur schnellen und empfindlichen Detektion von flüchtigen organischen Verbindungen etabliert, wobei ihr Haupteinsatzgebiet jahrzehntelang im militärischen Bereich zur Detektion von chemischen Kampfstoffen, Sprengstoffen und illegalen Drogen lag [1]. Weitere Anwendungsbereiche finden sich in der Arbeitsplatzüberwachung, Prozesskontrolle und bei der Überwachung von Raumfähren [2]. IMS-Geräte sind kleine, tragbare und handgehaltene Instrumente für den Feldeinsatz mit niedrigen Anschaffungs- und Unterhaltungskosten. Dies wird durch den Betrieb unter Atmosphärendruck und mit Umgebungsluft als Transportgas gewährleistet. Die Vorteile dieser Technik für die Analytik gasförmiger Substanzen stellen außerdem eine vielversprechende Möglichkeit zur Analyse organischer Verunreinigungen in wässrigen Lösungen dar. Erschwert wird die Untersuchung wässriger Proben durch die zwingend erforderliche Abtrennung des Wassers vor der Probeneingabe in das IMS. Hierzu sind entsprechende Probenvorbereitung oder Probeneingabesysteme zur Lösung dieses Problems erforderlich.

Basierend auf dieser vielversprechenden Technik wurde eine Methode zur Analyse mikrobieller Stoffwechselprodukte entwickelt. Der Konsum mikrobiell verunreinigten Wassers und Nahrungsmitteln stellt eine potenzielle Gesundheitsgefahr für den Menschen dar [3-5]. Dass dies nicht nur ein Problem von Entwicklungsländern ist, sondern auch in Westeuropa an Aktualität zunimmt, zeigt der Ausbruch des *Escherichia coli* Stammes O104:H4 in Deutschland 2011 [6]. Die Routineuntersuchungen von z. B. *Escherichia coli* und *Pseudomonas aeruginosa* in Wasser erfolgt nach standardisierten mikrobiologischen Methoden [7-10]. Diese Methoden sind sehr zeitaufwendig, da ein Ergebnis frühestens nach 18 Stunden verfügbar ist.

Die IMS stellt einen möglichen Ansatz zur schnellen und empfindlichen Detektion mikrobieller Stoffwechselprodukte in Wasser dar.

Prinzip der Ionenmobilitätsspektrometrie

Das in dieser Studie verwendete Field Asymmetric Ion Mobility Spectrometer (FAIMS) wurde erstmals Anfang der 90er Jahre beschrieben [11] und ist, vereinfacht ausgedrückt, ein Ionenfilter. Der wesentliche Unterschied zwischen klassischer Time-of-Flight (TOF)-IMS und FAIMS liegt im Prinzip der Ionentrennung und den dabei verwendeten Feldstärken. Das elektrische Feld beim TOF-IMS wird konstant unter 1.000 V/cm gehalten. In diesem Bereich bleibt die spezifische Ionenmobilitätskonstante K_0 unabhängig vom elektrischen Feld und somit konstant. Beim FAIMS hingegen wird ein asymmetrisches Wechselfeld mit maximalen Feldstärken oberhalb von 10.000 V/cm angelegt. K_0 ist dann feldabhängig und es wird ein entsprechender „Hochfeld-Mobilitätsterm“ K_h eingeführt [12]. Die Abhängigkeit der Mobilitätskonstanten K_h von der Feldstärke kann wie folgt beschrieben werden:

$$K_h = K_0 \cdot [1 + \alpha(E)] \quad (1)$$

Der Koeffizient α beschreibt den Einfluss des elektrischen Feldes (E) auf die spezifische Ionenmobilitätskonstante K_h (Abbildung 1) [13].

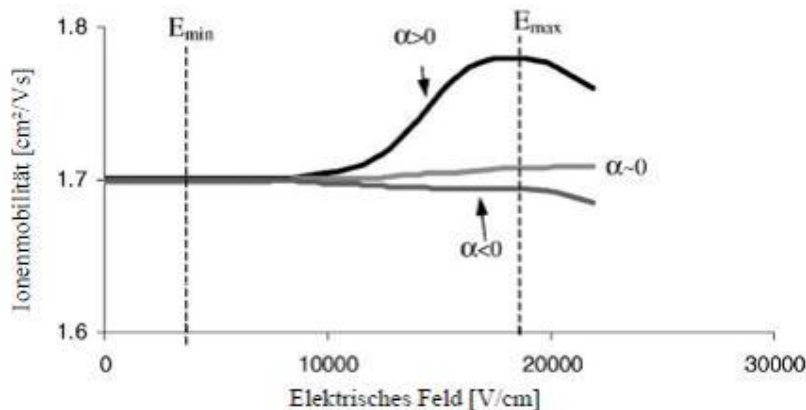


Abbildung 1: Ionenmobilitätsabhängigkeit vom elektrischen Feld am Beispiel von drei verschiedenen Ionenarten [14].

Aus Abbildung 1 wird ersichtlich, dass K_h größer wird bei steigender Feldstärke ($\alpha(E) > 0$), wohingegen bei $\alpha(E) \sim 0$ die Mobilität unverändert bleibt. Ist $\alpha(E) < 0$ sinkt K_h mit zunehmender Feldstärke.

Der prinzipielle Aufbau eines FAIMS ist in Abbildung 2 dargestellt. Das Kernstück des Analysengerätes besteht nicht wie beim klassischen TOF-IMS aus einer Driftröhre, sondern aus zwei Elektroden, welche die Filterregion bilden. Zwischen diesen beiden Elektroden ist ein hochfrequentes asymmetrisches Wechselfeld angelegt. Dieses elektrische Feld hat eine annähernd rechteckige Wellenform. Die Ionen werden mit einem ^{63}Ni β -Strahler generiert und mit dem Trägergas in die Filterregion zwischen die beiden Elektroden transportiert. Das elektrische Feld wirkt senkrecht zur Fließrichtung des Gases [15].

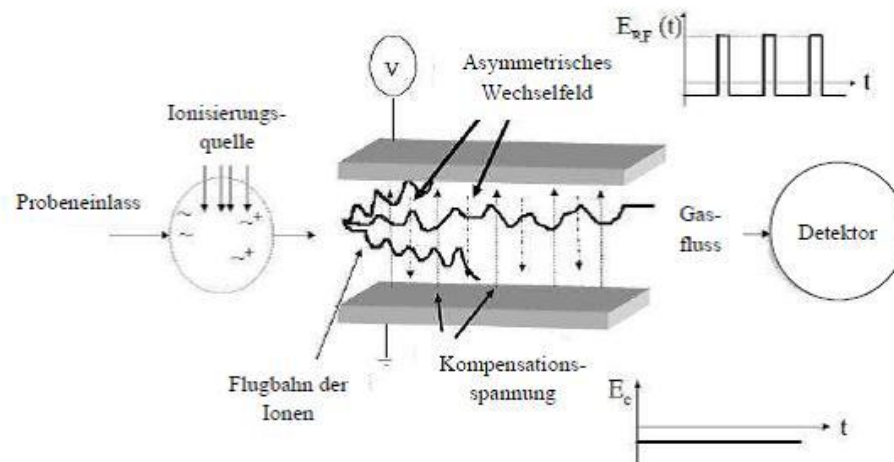


Abbildung 2: Aufbau und Funktionsweise eines FAIMS [16]

Die Ionen oszillieren durch das angelegte Feld zwischen den Elektroden quer zur Fließrichtung des Gasflusses. Während des kürzeren sehr hohen Spannungspulses wandern die Ionen z. B. zur oberen Elektrode, während des längeren niedrigeren Spannungspulses wieder in Richtung z. B. der unteren Elektrode. Dies kann mathematisch anhand folgender Formel beschrieben werden:

$$v = K(E) E(t) \tag{2}$$

v [cm/s] ist die Ionengeschwindigkeit senkrecht zur Gasflussrichtung. $K(E)$ [cm^2/Vs] ist die feldabhängige Mobilität und $E(t)$ [V/cm] ist das elektrische Feld [1].

Beim Eintritt der Ionen in die Filterregion würden diese aufgrund ihrer Polarität an der Anode bzw. Kathode entladen und stünden für eine Detektion nicht mehr zur Verfügung [17]. Um diesen Trend zu verhindern, wird die sogenannte Kompensationsspannung (CV) angelegt. Diese bewirkt, dass die Ionen entgegengesetzt der Driftbewegung wandern und so erfolgreich durch die Filterregion bis hin zum Detektor gelangen (Abbildung 2).

In dieser Studie wurde das FAIMS-Instrument Lonestar™ der Firma Owlstone, UK verwendet. Prinzipiell hat das Gerät den eben beschriebenen Aufbau. Das Owlstone FAIMS enthält einen Mikrochip, welcher eine weitere Miniaturisierung darstellt und auch kosteneffizienter sein soll (Abbildung 3a). Anstatt zwei Elektroden sind auf dem Chip insgesamt 47 identische gewundene planare Kanäle, Spaltbreite von 35 µm, aufgezätzt. (Abbildung 3 b und c) [18].

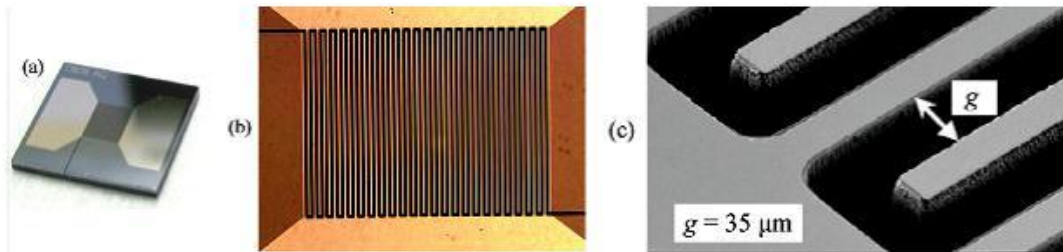


Abbildung 3: Foto des FAIMS Mikrochips (a), Darstellung der gewundenen Kanäle (b), Rasterelektronen-mikroskopische Aufnahme zur Detaildarstellung des Elektodenspaltes (c) [18]

Experimenteller Teil und Ergebnisse

Für das Optimieren und Kalibrieren des FAIMS-Gerätes wurden Reinsubstanzen ausgewählter potenzieller Stoffwechselprodukte verwendet. Die untersuchten Stoffwechselprodukte gehören zu den Stoffklassen der Aldehyde, Alkohole, Ketone und Sulfide (insgesamt 16 Verbindungen).

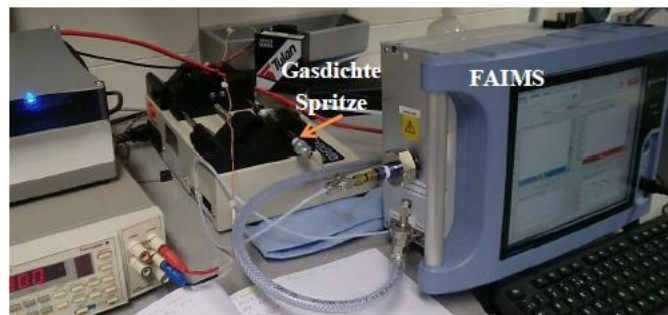
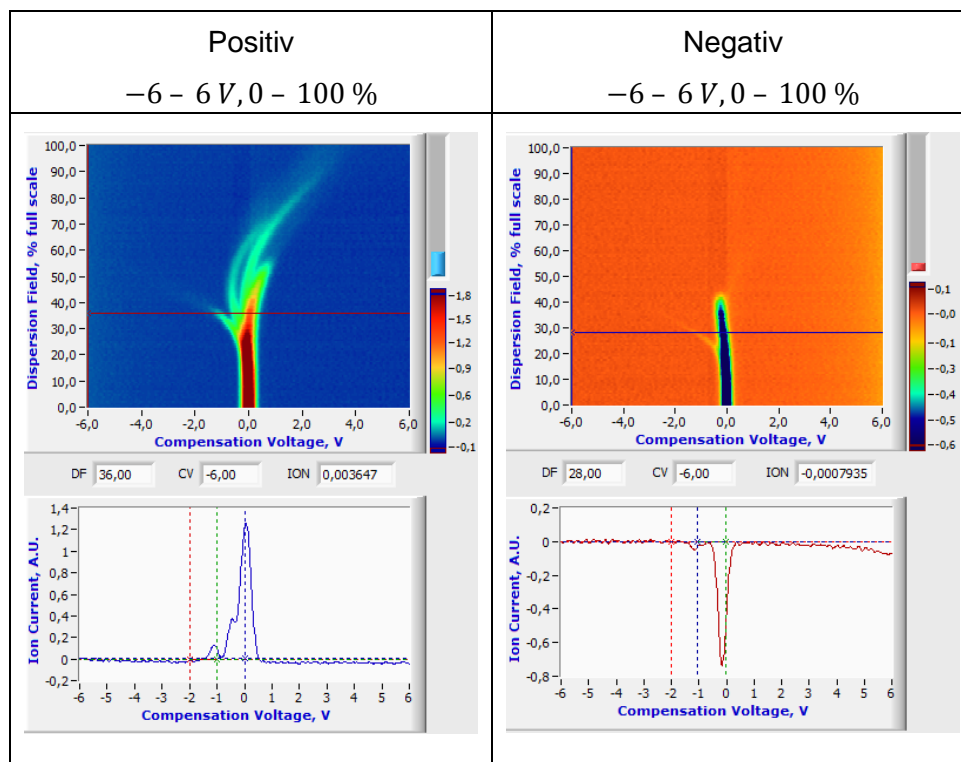


Abbildung 4: Instrumenteller Aufbau

Da diese Verbindungen gasförmig in das FAIMS eingebracht werden müssen, wurde der Dampfraum mittels gasdichter Spritzen beprobt. Diese Proben wurden anschließend mit Hilfe einer Spritzenpumpe kontinuierlich in den N₂-Grundgasfluss des FAIMS eingespritzt. Die Flussraten variierten je nach Dampfdruck der Substanzen zwischen wenigen µL/min bis hin zu mL/min. Die Flussrate des N₂-Grundgasflusses wurde bei 1,5 L/min konstant gehalten. Abbildung 4 zeigt den instrumentellen Aufbau im Labor.

Anhand von 2,3-Butandiol sollen nun die Ergebnisse exemplarisch beschrieben werden. Zunächst wurde eine Substanzbibliothek aus Dispersionsplots erstellt, um eine substanzspezifische Identifikation durch „Fingerprints“ zu ermöglichen. Die Dispersionsplots zeigen die Abhängigkeit der Kompensationsspannung von dem elektrischen Feld. In Tabelle 1 sind die Dispersionsplots von 2,3-Butandiol mit einer Konzentration von 10 ng/L im positiven und negativen Modus dargestellt.

Tabelle 1: Dispersionsplots von 2,3-Butandiol ($c = 10 \text{ ng/L}$) aufgenommen im positiven und negativen Modus

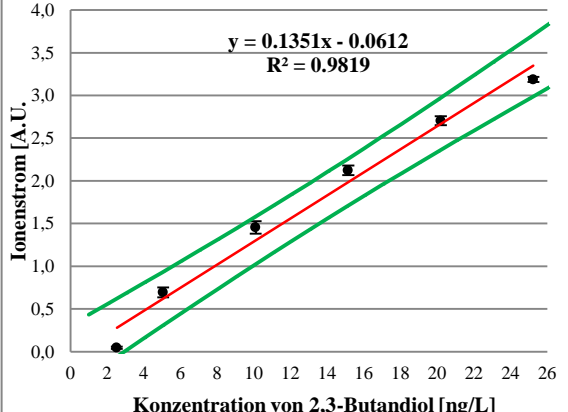
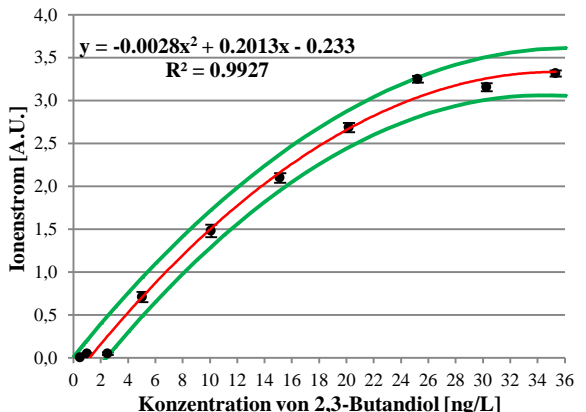


Auf der Abszisse der Dispersionsplots ist die Kompensationsspannung aufgetragen, welche beim Owlstone-FAIMS maximal von -6 bis +6 V betragen darf. Das elektrische Feld ist auf der Ordinate in Prozent aufgetragen. Null Prozent entsprechen 0 kV/cm und 100 Prozent entsprechen 80 kV/cm. Die Linie, welche bei 36 und 28 % quer durch die Dispersionsplots verläuft, zeigt, bei welchem elektrischen Feld das darunter dargestellte Spektrum aufgenommen wurde.

Für die quantitativen Analysen der Substanzen wurde das elektrische Feld konstant gehalten und die Kompensationsspannung von -3 bis +3 V verändert. Die Kalibrierungen von 2,3-Butandiol im positiven Modus sind in Tabelle 2 gezeigt. Es wurde bei allen Substanzen

linear und nicht-linear mit einer quadratischen Funktion kalibriert. Die Berechnung der nicht-linearen Kalibrierung wurde in Anlehnung an die DIN-Normen 8466-2 und 32645 durchgeführt [19-21].

Tabelle 2: Lineare und nicht-lineare Kalibrierung von 2,3-Butandiol im positiven Modus gemessen

Positiv, linear	Positiv, nicht-linear (2. Grades)
	
Dynamischer Bereich: 2,5-25 ng/L Verfahrensstandardabweichung V_{x0} : 10,2 % Nachweisgrenze x_{NG} : 2,8 ng/L Bestimmungsgrenze x_{BG} : 8,3 ng/L	Dynamischer Bereich: 0,5-31 ng/L Verfahrensstandardabweichung V_{x0} : 4,5 % Nachweisgrenze x_{NG} : 1,1 ng/L Bestimmungsgrenze x_{BG} : 3,9 ng/L Obere Bestimmungsgrenze x'_{BG} : 31,1 ng/L

Die Anwendung der nicht-linearen Kalibrierung für 2,3-Butandiol führt zu niedrigeren Nachweis- und Bestimmungsgrenzen, einer niedrigen Verfahrensstandardabweichung, einem schmaleren Vertrauensband und einem größeren dynamischen Bereich. Die Ergebnisse werden auch bei der Kalibrierung im negativen Modus (Tabelle 3) bestätigt. Zusätzlich muss bei der nicht-linearen Kalibrierung eine obere Bestimmungsgrenze x'_{BG} angegeben werden. Diese gibt die maximale Konzentration an, bis zu welcher eine quantitative Analyse möglich ist. Im optimalen Fall liegt diese Konzentration außerhalb des Kalibrierbereiches. Bei der Kalibrierung im negativen Modus ist dies der Fall, jedoch nicht bei der Kalibrierung im positiven Modus. Auch wenn die statistischen Werte der nicht-linearen Kalibrierung im negativen Modus nicht signifikant besser sind im Vergleich zur linearen Kalibrierung, empfiehlt es sich hier die Quantifizierung von 2,3-Butandiol anhand der nicht-linearen Kalibrierung im negativen Modus durchzuführen. Dies kann mit dem viel größeren dynamischen Bereich im Vergleich zu der linearen Kalibrierung und der besseren statistischen Werte im Vergleich zur nicht-linearen Kalibrierung im positiven Modus begründet werden.

Tabelle 3: Lineare und nicht-lineare Kalibrierung von 2,3-Butandiol im negativen Modus gemessen

Negativ, linear	Negativ, nicht-linear (2. Grades)
<p>Dynamischer Bereich: 0,5-20 ng/L Verfahrensstandardabweichung V_{x0}: 5,1 % Nachweisgrenze x_{NG}: 0,5 ng/L Bestimmungsgrenze x_{BG}: 1,8 ng/L</p>	<p>Dynamischer Bereich: 0,5-35 ng/L Verfahrensstandardabweichung V_{x0}: 2,6 % Nachweisgrenze x_{NG}: 0,7 ng/L Bestimmungsgrenze x_{BG}: 2,4 ng/L Obere Bestimmungsgrenze x'_{BG}: 39,1 ng/L</p>

Zusammenfassung

Eine qualitative und quantitative Analyse mikrobieller Stoffwechselprodukte mit FAIMS ist möglich. Die hohe Empfindlichkeit (Nachweisgrenzen liegen zwischen 0,0006-2,0 ng/L) des FAIMS stellt hierbei den größten Vorteil gegenüber vergleichbaren Analysemethoden dar. Zusätzlich lassen sich viele der ausgewählten Substanzen sowohl im negativen als auch im positiven Modus quantifizieren, welches sich vorteilhaft bei der Unterscheidung der einzelnen Substanzen auswirkt. Die nicht-lineare Kalibrierung führt bei ca. der Hälfte der untersuchten Substanzen zu einer Erweiterung des sehr eingeschränkten dynamischen Bereiches der IMS.

Danksagung

Die Autoren möchten sich bei den folgenden Projektpartnern bedanken: Universitätsklinikum Göttingen, Schumann-Analytics, Einbeck, B&S Analytik GmbH, Dortmund und KIST Europe, Saarbrücken. Für die finanzielle Förderung möchten wir AiF-ZIM danken (KF 2210307AK0).



Literatur

1. Eiceman, G.A. and Z. Karpas, *Ion Mobility Spectrometry*. 2005, CRC Press.
2. Spangler, G.E., *Fundamental considerations for the application of miniature ion mobility spectrometry to field analytical applications*. *Field Analytical Chemistry & Technology*, 2000. **4**(5): p. 255-267.
3. Vaillant, V., H.D. Valk, E. Baron, T. Ancelle, P. Colin, M.C. Delmas, B. Dufour, R. Pouillot, Y.L. Strat, and P. Weinbreck, *Foodborne infections in France*. *Foodborne Pathogens & Disease*, 2005. **2**(3): p. 221-232.
4. Wang, S., H. Duan, W. Zhang, and J.W. Li, *Analysis of bacterial foodborne disease outbreaks in China between 1994 and 2005*. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 2007. **51**(1): p. 8-13.
5. Chigor, V., V. Umoh, and S. Smith, *Occurrence of Escherichia coli O 157 in a river used for fresh produce irrigation in Nigeria*. *African Journal of Biotechnology*, 2010. **9**(2): p. 178-182.
6. Robert Koch-Institut. *Bericht: Abschließende Darstellung und Bewertung der epidemiologischen Erkenntnisse im EHEC O104:H4 Ausbruch, Deutschland 2011*. Berlin 2011.
7. *DIN EN ISO 9308-3:1999 Wasserbeschaffenheit Nachweis und Zählung von Escherichia coli und coliformen Bakterien in Oberflächenwasser und Abwasser Teil 3: Miniaturisiertes Verfahren durch Animpfen in Flüssigmedium (MPN-Verfahren)*.
8. *DIN EN ISO 9308-1:2001 Wasserbeschaffenheit Nachweis und Zählung von Escherichia coli und coliformen Bakterien Teil 1: Membranfiltrationsverfahren*.
9. *DIN EN ISO 12780:2002 Wasserbeschaffenheit - Nachweis und Zählung von Pseudomonas aeruginosa durch Membranfiltration*.
10. Eckner, K.F., *Comparison of membrane filtration and multiple-tube fermentation by the Colilert and Enterolert methods for detection of waterborne coliform bacteria, Escherichia coli, and enterococci used in drinking and bathing water quality monitoring in southern Sweden*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1998. **64**: p. 3079-3083.
11. Buryakov, I., E. Krylov, E. Nazarov, and U.K. Rasulev, *A new method of separation of multi-atomic ions by mobility at atmospheric pressure using a high-frequency amplitude-asymmetric strong electric field*. *International journal of mass spectrometry and ion processes*, 1993. **128**(3): p. 143ff
12. Kolakowski, B.M. and Z. Mester, *Review of applications of high-field asymmetric waveform ion mobility spectrometry (FAIMS) and differential mobility spectrometry (DMS)*. *Analyst*, 2007. **132**(9): p. 842-864.
13. Mason, E.A. and E.W. McDaniel, *Transport Properties of Ions in Gases*. 1988, New York: Wiley.
14. Miller, R.A., E.G. Nazarov, G.A. Eiceman, and A. Thomas King, *A MEMS radio-frequency ion mobility spectrometer for chemical vapor detection*. *Sensors and Actuators A: Physical*, 2001. **91**(3): p. 301-312.
15. Borsdorf, H. and G.A. Eiceman, *Ion mobility spectrometry: principles and applications*. *Applied Spectroscopy Reviews*, 2006. **41**(4): p. 323-375.
16. Miller, R.A., G.A. Eiceman, and E.G. Nazarov, *A micromachined field asymmetric ion mobility spectrometer (FA-IMS)*. *Int. J. Ion Mobility Spectrom*, 2002. **5**: p. 118.
17. Guevremont, R., *High-field asymmetric waveform ion mobility spectrometry (FAIMS)*. *Canadian Journal of Analytical Sciences and Spectroscopy*, 2004. **49**(3): p. 105-113.
18. Shvartsburg, A.A., R.D. Smith, A. Wilks, A. Koehl, D. Ruiz-Alonso, and B. Boyle, *Ultrafast differential ion mobility spectrometry at extreme electric fields in multichannel microchips*. *Analytical Chemistry*, 2009. **81**(15): p. 6489-6495.

19. *Normenausschuss Wasserwesen (NAW) im DIN, Wasserbeschaffenheit - Kalibrierung und Auswertung analytischer Verfahren und Beurteilung von Verfahrenskennwerten - Teil 2: Kalibrierstrategie für nichtlineare Kalibrierfunktionen zweiten Grades. Deutsche Norm DIN ISO 8466-2, Berlin (Juni 2004).*
20. *Normenausschuss Materialprüfung (NMP) im DIN, Chemische Analytik - Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze unter Wiederholbedingungen - Begriffe, Verfahren, Auswertung. Deutsche Norm DIN 32645, DIN Deutsches Institut für Normung e.V., Berlin (November 2008).*
21. Zscheppank, C., U. Telgheder, and K. Molt. *Stir-bar sorptive extraction and TDS-IMS for the detection of pesticides in aqueous samples; DOI: 10.1007/s12127-012-0097-x 2012; Available from: <http://www.springerlink.com/content/9601737370730200/>*