

Spurenelement-Analytik von pharmazeutischen, klinischen und biologischen Proben mittels Totalreflexions-Röntgenfluoreszenzanalyse (TXRF)

Armin Gross¹⁾, Hagen Stosnach¹⁾, Kostja Renko²⁾, Thomas Behrends²⁾, Lutz Schomburg²⁾

¹⁾ Bruker AXS Microanalysis GmbH, Berlin ²⁾ Charité Berlin, Institut für Experimentelle Endokrinologie, Berlin

Email: armin.gross@bruker-axs.de

Mit der TXRF steht eine schnelle, sensitive und matrixunabhängige Analysemethode für die simultane Bestimmung vieler Spurenelemente auch aus geringen Probenmengen neuerdings auch im Labormaßstab zur Verfügung.

Einleitung

Die akkurate chemische Elementanalyse erfordert eine aufwändige Probenvorbereitung mit zahlreichen Arbeitsschritten in Abhängigkeit vom Probenotyp. Jeder Schritt verbraucht kostbare Materialien und Arbeitszeit, beinhaltet ein Risiko für analytische Fehler oder Kontaminationen und verlangt eine regelmäßige Wartung von Geräten und kontinuierliches Training der Benutzer. Überdies stellt mitunter die Entsorgung der Abfälle und Lösungsmittel ein logistisches und kostenspieliges Problem dar. Die Totalreflexions-Röntgenfluoreszenzanalyse (TXRF) ist eine vielseitige analytische Methode zur Multielementanalytik unterschiedlichster Probenotypen. Zahlreiche analytische Aufgaben lassen sich mit geringem Aufwand, relativ schnell und ohne aufwändigen Probenaufschluss lösen.

Wie funktioniert TXRF?

Die TXRF beruht auf dem physikalischen Prinzip, dass Röntgenbestrahlung von Materie die Emission von spezifischer Fluoreszenzstrahlung zur Folge hat. Dabei ist die Wellenlänge und Energie der Fluoreszenzstrahlung charakteristisch für die einzelnen in der Probe vorhandenen Elemente und erlaubt eine qualitative Zuordnung. Die Intensität der Fluoreszenzstrahlung ist wiederum in erster Näherung proportional zur Konzentration des Spurenelements. Ein Röntgenfluoreszenzspektrometer ist im Wesentlichen aus den Bauteilen Röntgenröhre, Probenhalter und Detektor aufgebaut. Bei der TXRF erfolgt die Anregungsbestrahlung unter einem extrem flachen Winkel (Abbildung 1). Die Probe muss dazu als dünner Film auf einen reflektierenden Probenträger aufgebracht sein. Die Erfassung und Auswertung der Fluoreszenzstrahlung erfolgt hier mit einem energiedispersiven Detektor und der dazugehörigen Auswertesoftware. Zur Quantifizierung der Messergebnisse ist keine externe Kalibrierung notwendig, den Proben muss lediglich ein Element (zum Beispiel Gallium) in bekannter Konzentration zur internen Standardisierung hinzu gegeben werden.

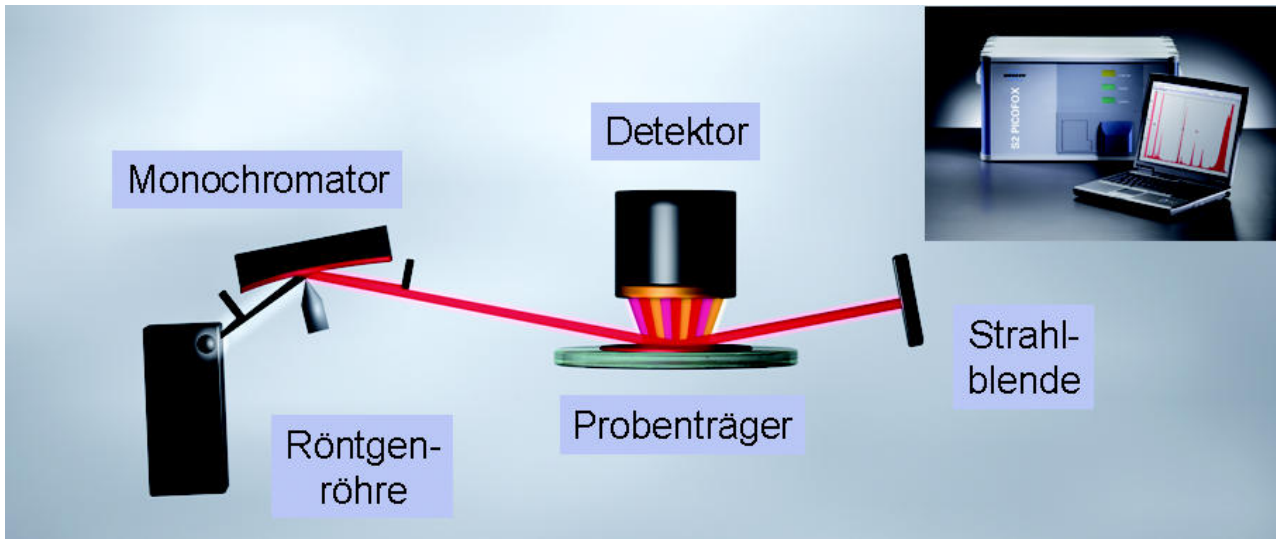


Abbildung 1: Schematischer Aufbau und Bild eines Totalreflektions-Röntgenfluoreszenz Gerätes. Die Röntgenstrahlung wird am Monochromator fokussiert, bestrahlt im sehr flachem Winkel die eingetrocknete Probe auf dem Probenträger und wird an der Strahlblende gestoppt. Die Wellenlänge und Intensität der Fluoreszenzstrahlung aus der Probe wird vom Detektor analysiert und digital weitergeleitet. Das kleine Bild zeigt ein aktuelles Auf Tisch-TXRF Spektrometer.

Die etablierten und apparativ aufwändigen Analysemethoden, wie zum Beispiel die Atomabsorptions-Spektroskopie (AAS), Neutronen-Aktivierungsanalyse (NAA) oder Optische Emissions Spektroskopie mit Induktiv-Gekoppeltem Plasma (ICP-OES) stoßen bei der Analytik biologischer Proben aus verschiedenen Gründen oftmals an ihre Grenzen. Zum einen bedürfen die sehr unterschiedlichen Matrices der zu untersuchenden Proben oftmals individueller und aufwändiger Probenvorbereitungen und Optimierungsversuche. Eine Verdünnung dieser Proben auf Volumina, die für die etablierten Analysemethoden notwendig sind, führt häufig zu Konzentrationswerten, die unterhalb der Nachweisgrenze liegen. Zusätzlich haben die Geräte oft erhöhten Platzbedarf, sind abhängig von zum Teil teuren und anspruchsvollen Verbrauchskemikalien, intensiver Schulung und regelmäßiger Wartung.

Vorteile der TXRF für biologische Proben

Mit der TXRF etabliert sich in den letzten Jahren eine neue Analysemethode im Labormaßstab, die eine schnelle, sensitive und matrixunabhängige Alternative für die simultane Bestimmung vieler Einzelelemente auch aus geringen Probenmengen erlaubt [1]. Für zahlreiche biologische Proben kann dabei auf einen Aufschluß verzichtet werden. Partikuläre Proben (Urin) oder Suspensionen (Blut, Organhomogenate) können direkt oder nach einem einfachen Verdünnungsschritt einer TXRF-Messung zugeführt werden (Tabelle 1). Ein mittlerweile erfolgreiches Anwendungsgebiet der TRFA ist zum Beispiel die simultane Analyse der essentiellen Spurenelemente Cu, Fe, Zn und Se in Vollblut-, Plasma- oder Serumproben [2].

Biological matrix	Typical volume	Sample preparation for TXRF
Blood - whole blood ¹	500 µl	1 : 1 dilution with H ₂ O, addition of internal Ga standard
Blood - serum ¹	500 µl	1 : 10 dilution with H ₂ O, addition of internal Ga standard
Blood - serum, small volumes	< 10 µl	1 : 2 dilution with H ₂ O, pipetting on carrier addition of 1 µl Ga standard solution
Urine	ml	direct addition of internal standard, fume off chlorine with HNO ₃
Tissue homogenates from mice	15 µl	1 : 1 dilution with Y standard solution or digestion in 65 % HNO ₃ , 1 h, 70°C
Seminal fluid	µl	direct addition of internal standard
Cerebrospinal fluid	µl	direct addition of internal standard
Mother's milk	ml	direct addition of internal standard
Tear fluid	µl to ml	direct addition of internal standard
1) for details see Lab Report XRF 77, Trace Element Analysis of Blood Samples		

Tabelle 1: Übersicht der biologischen Matrices, die mittels TXRF auf den Gehalt an Spurenelementen untersucht wurden. Quelle: Bruker Lab Report XRF 434

Spurenelementanalytik am Beispiel Selen

Als essentielle Spurenelemente werden die Mikronährstoffe bezeichnet, die im menschlichen Gewebe in Konzentrationen von < 50 ppm (mg/kg) vorkommen oder deren diätetische Aufnahme im Bereich von < 50 mg/Tag liegen. Um der Klassifizierung "essentiell" gerecht zu werden, muss sich eine Mangelversorgung durch charakteristische medizinische Symptome auszeichnen, deren phänotypische Ausprägung sich durch die selektive Supplementation mit dem betreffenden Spurenelement vermeiden beziehungsweise lindern lässt.

Die molekularen Mechanismen, die der Wirkung von Spurenelementen zugrunde liegen, sind im Fokus aktueller medizinischer und grundlagenorientierter Forschung. Neben den klassischen Metalloid-abhängigen Enzymen wie beispielsweise der mitochondrialen Mangan-Superoxid Dismutase, den Zink-Metalloproteasen oder den Eisen-Schwefel-Cluster enthaltenden Enzymen der Atmungskette gibt es mit dem Selen-Stoffwechsel ein weniger gut bekanntes Beispiel aus der schillernden Welt der Spurenelement-Biochemie [3]. Dieses Element zeigt eine ausgeprägte Redoxchemie und eine hohe Anzahl von natürlichen Oxidationsstufen. Selen kommt in nur wenigen Enzymen in Pro- und Eukaryonten vor, ermöglicht dort aber als Bestandteil von Redox-aktiven Zentren die Katalyse einzigartiger und oft essentieller Reaktionen. Interessanterweise zeigt dieses Metalloid in seinem Stoffwechselweg und katalysierten Reaktionen deutliche Interaktionen mit anderen Spurenelementen. Selen wirkt besonders in der Schilddrüse von Säugern über selenabhängige Glutathion-Peroxidasen dem erhöhten Peroxid-Tonus entgegen und katalysiert in Form der Deiodasen die Aktivierung und den Abbau der iodhaltigen Schilddrüsenhormone [4]. Diese wenigen Beispiele belegen das enge Netzwerk der Stoffwechselwege der einzelnen

Spurenelemente und die aktuelle Notwendigkeit, eine umfassende Analyse der gegenseitigen Abhängigkeiten und Interaktionen anzustreben.

Eine der großen Herausforderungen bei der Analyse von biologischen und medizinischen Proben ist häufig die nur limitiert zur Verfügung stehende Probenmenge. Ein Beispiel dafür ist die Analyse von Spuren toxischer Elemente im Arbeitsschutz, zum Beispiel in Form einer Haaranalytik [5] oder die Messung von Übergangsmetallen, Blei und anderen Spurenelementen in Gewebeproben von Versuchstieren. In unserem Beispiel wurden Kontrollproben aus Wildtyp- und heterozygot transgenen Mäusen und einer Selentransport-knockout Mutante untersucht [6]. Hier standen für die Spurenelementanalytik Gewebehomogenate von jeweils nur 50 µl zur Verfügung. Von dieser Probenmenge wurden 15 µl abpipettiert und mit 15 µl einer Yttrium-Lösung versetzt. Nach gründlicher Durchmischung erfolgte wiederum eine Präparation von 10 µl auf einem Quarzglasproben-träger mit anschließender Trocknung. Die Messungen erfolgten mit den gleichen Parametern wie für die Vollblut- und Serumproben. In Abbildung 2 ist ein Vergleich der Elementkonzentrationen in den drei Leber-Proben abgebildet. Es ist deutlich zu erkennen, dass in der Transporter-defizienten Probe die Gehalte an Zn und Se deutlich erhöht sind, während die Konzentrationen der anderen detektierten Elemente keinerlei Schwankungen aufweisen.

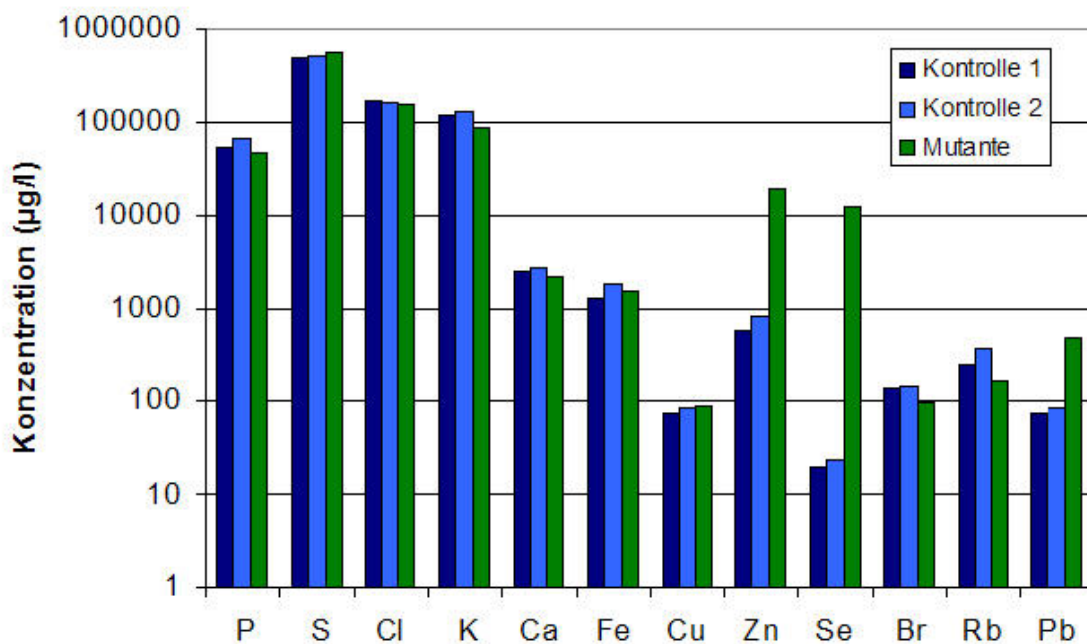


Abbildung 2: Grafische Darstellung der Spurenelementverteilung in Leberhomogenaten von Mäusen mit Spurenelement-Transportdefizit (grün) und gleichaltrigen Kontrolltieren (blau). Die Ergebnisse belegen die gegenseitige Abhängigkeit der Spurenelemente Zink und Selen in dieser Mausmutante.

In einem weiteren Experiment wurde die Organspezifität der Selen-Supplementation untersucht. Über einen Zeitraum von 3 Wochen wurden zwei Gruppen von Mäusen mit einer selenreichen bzw. selenarmen Nahrung versorgt, um anschließend die Verteilung in den Organen zu untersuchen. Zur Verbesserung der Nachweisempfindlichkeit wurden die Organhomogenate für 1 Stunde bei 70°C in 65% Salpetersäure aufgeschlossen. Die Abbildung 3 zeigt, dass die TXRF-Methode grundsätzlich geeignet ist, in allen untersuchten Organen die Konzentration von Selen zu analysieren. Wie erwartet, sinkt die Selen-Konzentration in den meisten Organen bei Mangelernährung, wobei die Versorgung der biologisch wichtigen Organe sichergestellt wird.

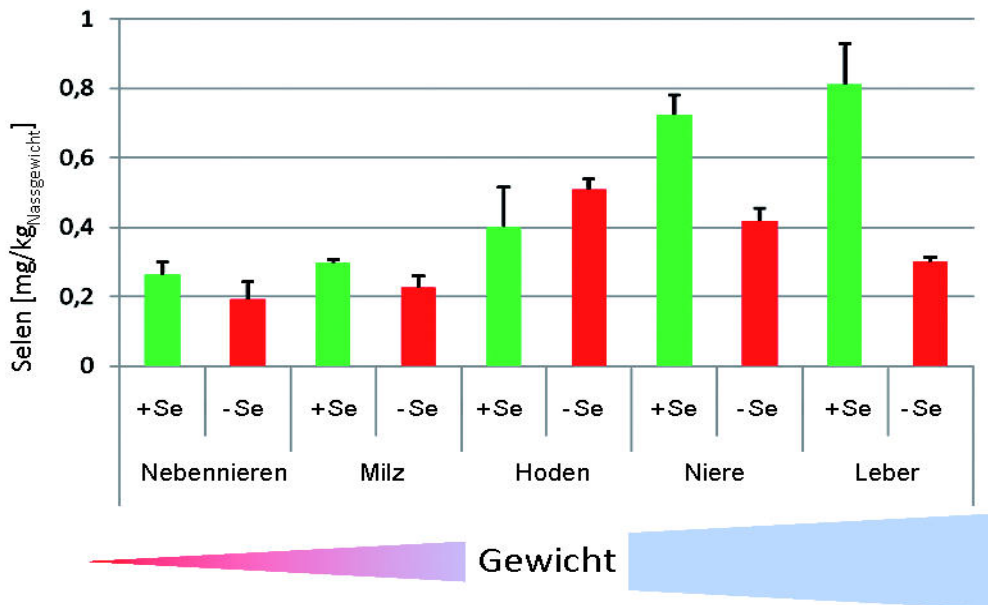


Abbildung 3: Selenkonzentrationen in Organhomogenaten von Mäusen. Die grünen Balken zeigen die Konzentrationen nach ausreichender Se-Supplementation, die roten Balken nach selenarmer Ernährung. Auffällig ist die Hierarchie innerhalb der Organe, die eine ausreichende Se-Versorgung der biologisch „wichtigen“ Organe sicherstellt.

Schlussfolgerung

Für die Anforderungen in den Biowissenschaften steht mit der TXRF-Spektroskopie ein vielseitiges Werkzeug zur Spurenelementanalyse zur Verfügung. Die analytische Leistungsfähigkeit moderner Auflichtgeräte erreicht dabei ein ähnliches Niveau wie bei AAS und ICP-OES Analysen. Im Gegensatz zu diesen Techniken erlaubt die TXRF jedoch auch die Analyse aus geringen Probenmengen mit minimalem prä-analytischen Aufwand in Bezug auf Probenvorbereitung, Kalibrierung, Messzeit und manueller Interaktion. Für die Etablierung und Akkreditierung dieser Analysetechnik als Routinemethode in analytischen Laboratorien ist die Teilnahme an nationalen und internationalen Ringversuchen in Vorbereitung. In der Zwischenzeit erfreut sich ein kleiner Kreis begeisterter Anwender an der konkurrenzlos einfachen und schnellen Spurenelementanalytik über die Totalreflektions-Röntgenfluoreszenz Analytik (TXRF).

Literatur

- [1] **Stosnach, H.** (2005): Environmental trace-element analysis using a benchtop total reflection X-ray fluorescence spectrometer. *Anal Sci.* 21: 873-876.
- [2] **Stosnach, H.** (in Vorb.) Simultaneous micro amount trace element analysis of blood, serum and protein samples using total reflection X-ray fluorescence (TXRF) spectroscopy. *J. Trace Elem. Med. Biol.*
- [3] **Hatfield, D. L., Gladyshev, V. N.** (2002): How selenium has altered our understanding of the genetic code. *Mol Cell Biol.* 22: 3565-3576.
- [4] **Schomburg, L., Köhrle, J.** (2008): On the importance of selenium and iodine metabolism for thyroid hormone biosynthesis and human health. *Mol Nutr Food Res*
- [5] **Khuder, A., Bakir, M. A., Hasan, R., Mohammad, A.** (2008): Determination of nickel, copper, zinc and lead in human scalp hair in Syrian occupationally exposed workers by total reflection X-ray fluorescence. *Environ Monit Assess.* 143: 67-74.
- [6] **Schomburg, L., Schweizer, U., Holtmann, B., Flohé, L., Sendtner, M., Köhrle, J.** (2003): Gene disruption discloses role of selenoprotein P in selenium delivery to target tissues. *Biochem J.* 370: 397-402.