

Spezies-Analytik von Spurenelementen in Medizin und Ökologie: Theorie und methodische Konzepte

Speciation of Trace Elements in Medicine and Ecology: Theory and Methods

B. Michalke^{1,2}, P. Schramel¹

Zusammenfassung: In den letzten Jahren wurde zunehmend erkannt, daß Aussagen über Bioverfügbarkeit, Essentialität und Toxizität von Spurenelementen eine Spezies-Analytik erfordern, d. h. die Identifizierung und Quantifizierung der Bindungsformen und Valenzzustände der Elemente in den zu untersuchenden Proben. Da diese Molekül- und Speziesinformationen bei der Untersuchung erhalten bleiben müssen, ergeben sich gegenüber der einfachen Elementanalytik vollkommen neue Anforderungen hinsichtlich Probenahme und -lagerung sowie der angewendeten Meßverfahren. Grundlage der Spezies-Analytik ist meistens die Kopplung eines möglichst speziesspezifischen Trennverfahrens mit einem spezifischen Nachweisverfahren für das interessierende Spurenelement. In der vorliegenden Übersicht werden die heute für verschiedene Analytgruppen anwendbaren Trenn- und Detektionsverfahren hinsichtlich ihrer Vorteile und Einschränkungen diskutiert. Angesichts der zahlreichen und oft nur schwierig zu beherrschenden Fehlerquellen haben interne und externe Qualitätssicherungsmaßnahmen bei der Spezies-Analytik von Spurenelementen besondere Bedeutung.

Schlüsselwörter: Spurenelemente/Analytik; Chromatographie, Flüssigkeits-; Elektrophorese, Kapillar; Spektrophotometrie; Atomabsorptions-; Massenspektrometrie; Qualitätskontrolle.

Summary: In recent years it has been increasingly recognized that statements concerning the bio-availability, essentiality and toxicity of trace elements have to be based on speciation. Chemical speciation means identification and quantification of the compounds to which the element is bound or is a part of and the quantification of different valence states of the element. As these properties have to be preserved during the analytical process, completely new requirements concerning sampling, sample storage and analytical procedures have evolved. Chemical speciation is based in most cases on the combination of a species-specific

separation method and an element-specific detection method. Advantages and limitations of contemporary separation and detection methods that can be applied for chemical speciation of different groups of analytes are discussed. In view of the various sources of analytical error in speciation analysis, internal and external quality assurance is especially important.

Keywords: Trace Elements/analysis; Chromatography, Liquid; Electrophoresis, Capillary; Spectrophotometry, Atomic Absorption; Spectrum Analysis, Mass; Quality Control.

In den letzten Jahren wurde immer deutlicher erkannt, daß die Erfassung von Element-Totalkonzentrationen noch keine Aussage über Mobilität oder Bioverfügbarkeit und somit auch nicht über Wirkungen wie Toxizität oder Essentialität ermöglicht. Die meisten Elemente üben ihre Wirkung im Organismus nicht als freie Atome oder Ionen aus, sondern als Bestandteile von Makromolekülen (Proteine, Enzyme, Hormone etc.) oder anhand ihrer unterschiedlichen Oxidationsstufen. Deshalb steht heute vielfach die qualitative und quantitative Erfassung der Bindungsformen (=Spezies) im Vordergrund. Diese sogenannte Spezies-Analytik stellt vollkommen neue Anforderungen an Probenahme, -lagerung und Analytik und gewinnt weltweit zunehmend an Bedeutung. Der wesentlichste Unterschied zur „einfachen“ Elementanalytik besteht in der Notwendigkeit, Molekül- und Speziesinformationen gesichert zu erhalten, während bei der Elementanalytik die ursprüngliche Matrix vor der Analyse quantitativ zerstört werden sollte.

Element- und Spurenelementanalytik bieten seit vielen Jahren etablierte Verfahren, um Belastungssituationen, aber auch „Normalgehalte“ an (Schwer-) Metallen, in Medizin, Biologie und Ökologie zu erfassen. Trennverfahren nach physikalischen oder chemischen Prinzipien sind für analytisch-chemische Fragestellungen weithin etabliert. Die Kopplung von (möglichst) speziesspezifischen Trennverfahren und elementselektiven Nachweisverfahren für das interessierende Spurenelement bilden heute meist die Grundlage für die Spezies-Analytik. Die Minimierung sowie die qualitative und quantitative Erfassung möglicher

¹GSF – Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit GmbH, Neuherberg

²Korrespondenzadresse: Dr. Bernhard Michalke, GSF – Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit GmbH, Ingolstädter Landstraße 1, D-85764 Neuherberg. Fax: +49-89-3187-3348. Eingegangen: 16. März 1998

Störungen müssen genauso Teil einer sinnvollen, qualitätsgesicherten Speziesanalytik sein wie die qualitative Bewertung der erzielten Ergebnisse.

Definition von Speziesanalytik

In der Literatur wird der Begriff „Speziation“ immer noch sehr unterschiedlich gehandhabt, ausgehend von unterschiedlichen methodischen Ansätzen bis hin zu verschiedenen Zielaussagen. Deshalb muß der Begriff Speziation, (im deutschen besser: Spezies-Analytik) klar definiert und von Verfahrensweisen mit anderen Zielaussagen abgegrenzt werden.

Unter (chemischer) Speziesanalytik versteht man, entsprechend den Richtlinien der EU (SM&T program, formerly BCR) und IUPAC die eindeutige Identifizierung und Quantifizierung der Spezies in einer realen Probe / Matrix [1-4]. Im Falle von Organo-Metall-Komplexen ist auch die eindeutige Identifizierung und Quantifizierung der organischen Bindungs-/ Komplettierungspartner zu berücksichtigen [3, 4].

Die verwendeten analytischen Methoden dürfen nachweislich die Spezies während der Probennahme, Lagerung und Analyse nicht verändern, so daß das qualitätsgesicherte Ergebnis also die ursprünglichen Verhältnisse in der repräsentativen Probe widerspiegelt [3, 5]. Falls dies nicht gewährleistet werden kann, muß die Qualität und Quantität der Veränderung möglichst bestimmt, zumindest aber möglichst genau abgeschätzt werden.

Abzugrenzen von der chemischen Speziation sind die sogenannte „operationelle“ und funktionelle „Speziesanalytik“. Zwei Unterscheidungen von der chemischen Speziation sind hauptsächlich zu nennen, nämlich eine Charakterisierung nach dem Verhalten der Moleküle bezüglich einer analytischen Methode, oder eine Charakterisierung hinsichtlich ihrer Wirkung, meist auf Organismen.

Charakterisierungen nach dem Verhalten gegenüber einer analytischen Methode werden demnach als „operationally defined“ bezeichnet und als „operationally defined speciation“ von der chemischen Speziation unterschieden [2, 6, 7]. Diese Ansätze sind als meist wertvolle Charakterisierungen oder Vorstufen der chemischen Speziation zu betrachten. Diese Abgrenzung liegt darin begründet, daß hier einerseits nur Gruppen

von sich ähnlich verhaltenden Molekülen als Summe erfaßt werden, andererseits dieses „ähnliche Verhalten“ und damit die Gruppenzugehörigkeit bzw. Fraktion vom experimentellen Vorgehen unmittelbar abhängt. Als Beispiele seien hier Begriffe wie „die wasserlösliche, austauschbare, reduzierbare/oxidierbare etc. Fraktion“, oder, nach elektrochemischen Gesichtspunkten, „die labilen bzw. stabilen Spezies“, genannt.

Weiterhin wird chemische Speziation vom Begriff der „funktionellen Speziation“ unterschieden. Hierunter versteht man die Charakterisierung und Zusammenfassung von Molekülen hinsichtlich ihrer Wirkung oder Funktion im Organismus. Bezeichnungen wie etwa „essentiell“ oder „toxisch“, „bioverfügbar, biologisch aktiv“ etc. [2, 3, 8] sind hier Zielaussagen. Auch hier wird die eigentliche chemische Spezies nicht weiter aufgeklärt, sondern es werden einzelne, nicht weiter identifizierte Bindungsformen oder Gruppen von sich ähnlich verhaltenden Molekülen zusammengefaßt.

Leider werden diese Unterscheidungen in der Literatur nicht immer strikt eingehalten.

Beispiele für chemische Spezies

Chemische Spezies lassen sich in einer ersten groben Einteilung in folgende Unterteilungen einordnen:

1. Elemente, die in verschiedenen Wertigkeitsstufen auftreten [2, 3, 9].

Beispiele:

As (III) / As (V), Cr (III) / Cr (VI), Fe (II) / Fe (III)
Auch Anionen sind in diese Kategorie zu rechnen.

Beispiele: $\text{NO}_3^- / \text{NO}_2^-$, $\text{SO}_4^{2-} / \text{SO}_3^{2-} / \text{S}^{2-}$

2. Metall-Organyle: Organische Verbindungen von Metallen wie Methyl-, Alkyl-, Aryl-Verbindungen [2, 8, 9].

Beispiele:

Methyl-Quecksilberchlorid, alkylierte Zinnverbindungen aus Schiffsanstrichen, methylierte As-Verbindungen, wie Monomethylarsensäure und Dimethylarsensäure, sowie weiter metabolisierte Verbindungen (Arsenobetain, Arsenocholin), Se-Organyle und Se-Aminosäuren [10]. Durch die Alkylierung bzw. Methylierung werden Mobilität, Löslichkeit, Lipophilität und damit Bioverfügbarkeit erheblich geändert. Die Toxizität hängt entscheidend davon ab.

3. Metall-Organo-Komplexe [8].

Hier handelt es sich um meist hochmolekulare Verbindungen (z.B. Proteine, Peptide), die Metalle unterschiedlich fest binden bzw. komplexieren. Häufig treten nur lockere, unter Umständen sogar unspezifische Bindungen, auf.

Beispiele:

Serum-Albumin bindet eine Vielzahl an Metallen in der Regel sehr locker und unspezifisch. Metalle können bei genügend hohem „Konkurrenzdruck“ (hohe

Nicht standardisierte Abkürzungen: CIEF, capillary isoelectric focusing; CVAAS, cold vapor atomic absorption spectroscopy; CZE, capillary zone electrophoresis; EOF, electroosmotic flow; ETV-AAS, electrothermal vaporization atomic absorption spectroscopy; FAAS, flame atomic absorption spectroscopy; GC, gas chromatography; HAAS, hydride atomic absorption spectroscopy; HIC, hydrophobic interaction chromatography; HPLC, high-performance liquid chromatography; ICP-MS, inductively coupled plasma mass spectrometry; ICP-OES, inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy; IEC, ion exchange chromatography; ITP, capillary isotachopheresis; IUPAC, International Union of Pure and Applied Chemistry; LC, liquid chromatography; MECC, micellar electrokinetic capillary chromatography; NMR, nuclear magnetic resonance; RPC, reverse phase chromatography; SEC, size exclusion chromatography.

Konzentration) von anderen Metallen verdrängt und ausgetauscht werden. Es eignet sich daher als Transportprotein [11].

Porphyrin-Ringstrukturen: Im Falle des Hämoglobin liegt Fe (II) als Zentralatom in einer Porphyrin-Ringstruktur zweifach kovalent gebunden vor. Beim Chlorophyll ist das Zentralatom ein Mg (II).

Metallothioneine können Hg, Cd, Zn oder Cu tragen und kommen bevorzugt in Niere und Leber vor. Da diese Proteine (ca. 7 - 10 kDa) zu etwa 30% aus S-haltigen Aminosäuren aufgebaut sind, zeigen sie sehr starke Komplexbildungstendenzen. Sie dienen somit u.a. zur Entgiftung (z.B. Komplexbildung von Hg und Ausscheidung über die Niere).

Als Hormone können z.B. jodhaltige Thyroidhormone genannt werden.

4. Ionische Spezies und hydrierte Ionen [8, 9].

Beispiel: $\text{Zn}(\text{H}_2\text{O})_6^{2+}$

5. Metallspezies als hochdisperse Kolloide [8, 9].

Beispiel: $(\text{FeO})\text{OH}$, $\text{Fe}(\text{OH})_3$, MnO_2 , Ag_2S , Cu_2S

6. Kolloid-gebundene Metalle [8, 12].

Beispiel: Fe-Oxide, Fulvinsäure-Kationen Komplexe.

Die „Speziesgruppen“ 4 - 6 sind von ökotoxikologischer Relevanz und spielen in biologisch-medizinischen Fragestellungen eine untergeordnete Rolle.

Notwendigkeit von Speziesanalytik

Die Beurteilung von Mobilität und Bioverfügbarkeit, von humantoxikologischer und ökotoxikologischer Wirkung von Elementen, hängt, genauso wie die Verfügbarkeit als gegebenenfalls essentielles (Spuren-) Element, weniger von der Gesamtmasse dieses Elements in einer zu beurteilenden Matrix ab. Vielmehr ist Art und Anteil der jeweils vorliegenden chemischen Verbindungsform (chemischer Spezies) von herausragender Bedeutung für die Mobilität und Bioverfügbarkeit und damit für biochemische und physikochemische Wirkung dieser Elemente [8, 9, 13, 14, 15].

Probennahme und Probenlagerung

Die Probennahme ist immer, und bei der Spezies-Analytik für biologisch-medizinische Fragestellungen ganz besonders, einer der besonders kritischen Schritte in einem Gesamtanalysenschema, da die Probennahme *per se* in der Regel bereits eine Störung der Speziesgleichgewichte darstellt.

Daher müssen die Konzepte / Verfahren der Probennahme die Spezies „schützen“. Da solche Verfahren bisher kaum existieren [7] und, falls doch, nicht allge-

meingültig sein können (es gibt keine Patentrezepte!), müssen sie der jeweiligen Problemstellung und Matrix angepaßt werden.

Grundsätzlich können folgende Probleme auftauchen:

Bei Körperflüssigkeiten können Gleichgewichte zwischen den Flüssigkeiten und dem Gewebe bei Entnahme gestört werden (z. B. bei Blutentnahme). Es können Kontaminationen durch Spritzenadeln, Metallspatel oder Metallskalpelle etc. auftreten [16, 18]. Speziesänderungen können durch bakterielle Tätigkeit auftreten.

Bei der Probenlagerung ist vor allem zu berücksichtigen, daß jede Kontamination an sich eine neue, nicht native Spezies darstellt, die native Gleichgewichte stören kann [5, 16, 17]. Als Folge kann es zu neuen Komplexen kommen oder Elementverdrängungen am Bindungspartner, das heißt, es kann zu Umkomplexierungen und Verlusten der nativen Elemente kommen. Um solche Kontaminationen zu vermeiden, sollten alle Arbeitsschritte unter Reinstraumbedingungen ausgeführt werden. Alle Materialien, mit denen die Probe in Berührung kommt, müssen vor Gebrauch gereinigt werden, ähnlich den Verfahren für die Spurenelementanalytik [18, 21].

Auch für die Lagerung und Probenvorbereitung müssen die Verfahren unter besonderer Berücksichtigung der Problemstellung und Matrix gewählt und adaptiert werden.

Für biologische Proben kann allgemein folgendes gesagt werden:

Für die längere Lagerung (fester) biologischer Proben stellte sich heraus, daß Gefriertrocknung oft eine der günstigsten Methoden darstellt. bakterielles Wachstum zu vermeiden, bei gleichzeitig eher geringen Wahrscheinlichkeit der methodischen Speziesumformationen [18, 19]. Die Probentemperatur sollte dabei keinesfalls 40 °C übersteigen. Für flüssige, biologische Proben kann auch Schockgefrieren und Lagerung bei -80 °C erfolgen [21]. Ein Einfrieren und Lagern bei -20 °C ist dagegen zu vermeiden, da beim langsamen Gefrieren Konzentrationsgradienten in der Probe entstehen können, die Speziesänderungen bewirken. Als einer der erfolgversprechendsten Ansätze erwies sich eine Analyse möglichst im unmittelbaren Anschluß an die Probennahme. Kurzzeitige Lagerungen, z.B. zwischen einzelnen Arbeitsschritten sollten dabei bei 4 °C erfolgen.

Wahl geeigneter Analyseverfahren

Spezies-Analytik kann grundsätzlich mit „direkten“ Speziationsverfahren durchgeführt werden, d.h. die Methode erkennt einzelne Spezies. Diese Methoden (z.B. Röntgenfluoreszenz, NMR) sind nicht invasiv, so daß bei der Bestimmung der Spezies keine Gefahr der Speziesumformationen durch die Methode selbst besteht. Obwohl dies einen enormen Vorteil mit sich

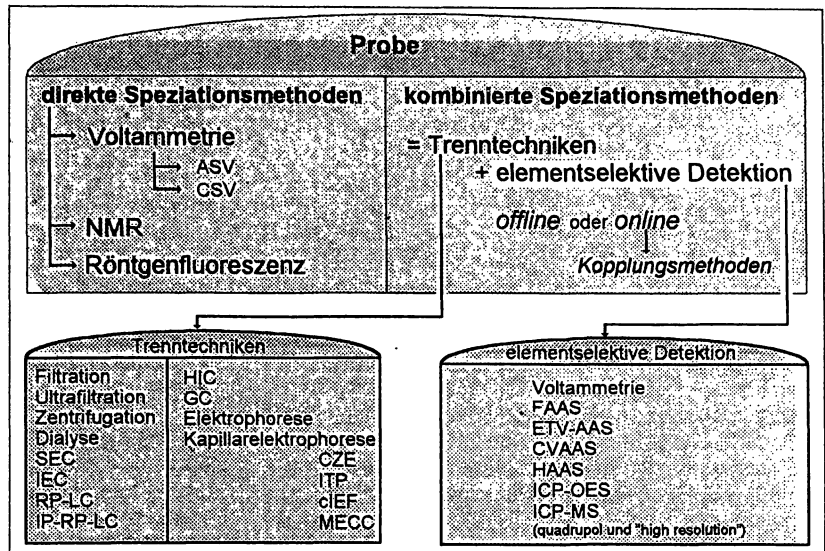


Abbildung 1 Wahl geeigneter Analyseverfahren: kombinierte Verfahren und Kopplungsverfahren. Erläuterung siehe bei Fußnote „Nicht standardisierte Abkürzungen“

bringt, haben diese Methoden nur geringe Bedeutung, da die Nachweisgrenzen dieser „non-destructive techniques“ entweder deutlich zu hoch liegen oder andere Limitierungen den Einsatz verbieten.

Der meistbeschrittene Weg ist der Einsatz von Verbundverfahren, wo Trenntechniken mit elementselektiven Detektoren kombiniert werden. Abbildung 1 gibt einen Überblick über die Möglichkeiten.

Kombinierte Verbundverfahren führen letztlich zu Kopplungsverfahren, wo der elementselektive Detektor direkt (online) mit dem Trennsystem (z.B. HPLC) verbunden ist.

Viele Vorteile der online Kopplung liegen auf der Hand [21]:

- Geringerer Zeitaufwand
- Geringere Kontaminationsmöglichkeit
- Geringerer Arbeitsaufwand
- Geringere Verlustmöglichkeiten
- Automatisierbarkeit
- Meist bessere Reproduzierbarkeit
- Keine Lagerung von Fraktionen (einschließlich der damit verbundenen Lagerungsprobleme, s.o.)
- Geringere Gefahr von Oxidation und Degradation durch Bakterien

Allerdings sind auch einige Nachteile bekannt:

- Viele qualitätssichernde Maßnahmen lassen sich offline gut, online nicht oder nur sehr schwer realisieren [20].

Es kann daher empfehlenswert sein, eine Methode offline zu entwickeln und zu validieren. Diese Methode kann dann für den online Modus adaptiert werden und gegen die (qualitätsgesicherte) offline Methode validiert werden.

- Instrumente und mobile Phase müssen sich gegenüber den Spezies inert verhalten.

- Oft muß ein Kompromiß zwischen optimaler Trennung (mobile Phase) und hoher Signalausbeute (effiziente Zerstäubung) eingegangen werden [21].
- Ein spezielles Interface muß zur Verfügung stehen, das die verschiedenen Bedürfnisse des Trennmoduls und des Detektormoduls hinsichtlich Pufferkonzentration, Salzgehalt, Anteil an organischen Lösungsmitteln und Flußrate) in Einklang bringt. Trotzdem darf das Interface nur ein geringes Totvolumen aufweisen [21].

Probleme in der Speziesanalytik, verursacht durch Trennverfahren

Grundsätzlich ist die Verwendung von Trenntechniken vor einer elementselektiven Detektion vorteilhaft, da eine große Variabilität und große Applikationsbreite erreicht wird.

Der Nachteil besteht darin, daß einerseits die Analysensysteme zunehmend komplex und damit fehlerträchtig werden, andererseits, daß bei der Trennung die Gleichgewichte zwischen den Molekülen gestört werden (Verdünnung, Trennung von Gleichgewichtspartnern etc.). Es kann demzufolge während des Trennvorganges zu Speziesumwandlungen und Speziesdegradationen kommen. Nachfolgend werden die häufigsten Trennverfahren für die Anwendung biologischer Matrices kurz angesprochen und hinsichtlich ihrer Problematik bezüglich Speziation diskutiert. Tabelle 1 gibt einen Überblick über gängige Trennverfahren, deren Prinzip und Zielspezies (modifiziert nach [21] und [22]).

Ultrafiltration

- Kontaminationen und Verluste am Filter.
- Die Filter haben große Oberflächen. Es kommt oft zu umfangreichen, manchmal irreversiblen Adsorptionen.

Tabelle 1 Anwendung verschiedener Trenntechniken bei der Spezies-Analytik

Trenntechnik	Trennprinzip	Zielspezies
Filtration	Molekülgröße	DNA, Proteine, Kolloide
LC: Size Exclusion Chromatography	Molekülgröße	DNA, Proteine, Peptide, Kolloide
LC: Ion Exchange Chromatography	Ladung	Ionische / geladene Spezies
LC: Reversed Phase Chromatography	Hydrophobizität	Peptide, Proteine
Elektrophoresis / Capillary Electrophoresis	Ladung / Masse	Ionische / geladene Spezies

- „Clogging“: Es kann leicht ein Verstopfen des Filters unabhängig von der Spezies auftreten. Es erfolgt dann keine Trennung der Spezies mehr. Als Abhilfe dienen niedrige, kontrollierte Flußraten.
- Die Filterdicke (abhängig vom Hersteller) beeinflusst das Rückhaltevermögen und Adsorptionsverhalten. Eine Abhilfe ist teilweise durch „preconditioning“ möglich. Kontaminationen und Verluste können auftreten.

LC - Liquid Chromatography

Grundsätzlich muß bei LC-Trennungen darauf geachtet werden, daß bei biologischen Matrices keine denaturierenden, mobilen und stationären Phasen eingesetzt werden [5, 21].

Bei mobilen Phasen ist zu berücksichtigen, daß z.B. Wasser (a. bidestillata) als Eluent zwar sehr rein ist [20], aber häufig zur Hydrolyse vor allem von Biomolekülen führen kann.

Puffer bergen dagegen die Gefahr in sich, Speziesgleichgewichte zu stören, z.B. wegen hoher Komplexbildungstendenzen (PO_4 -Puffer), oder der Möglichkeit, Metallkontaminationen einzutragen.

SEC - Size Exclusion Chromatography

Die Gelmatrix ist

- nie ganz ungeladen, sondern elektrostatisch [22, 23]
- zeigt Adsorptionserscheinungen; umso mehr, je länger das Gelbett ist
- zeigt hydrophobische Wechselwirkungen [22, 23]
- zeigt spezifische Affinitäten [24]
- geht H-Brückenbindungen zu Analyten ein.

Diese unerwünschten Effekte treten unabhängig von einander und in der Wirkung oft additiv [25-27] auf;

sie können teilweise schwere Störungen der Spezies verursachen (Zerstörung / Transformationen von Spezies).

IEC - Ion Exchange Chromatography

Zur Trennung können teilweise Eluenten mit hoher Ionenstärke oder extremen pH-Werten zum Einsatz kommen [22]. Bei labilen Metall-Proteinkomplexen kommt es hier häufig zur Veränderung der Originalspezies mit Verlust oder Austausch der (locker) gebundenen Metallionen [5, 21, 40]. IEC ist somit zwar für kovalent gebundene Metallspezies verschiedener Wertigkeiten geeignet (z.B. Cr (III) / Cr (VI)), aber bei labilen, lockergebundenen Metall-Proteinkomplexen kann IEC zur Zerstörung der nativen Spezies führen.

RPC - Reverse Phase Chromatography

Die Quartärstruktur von Proteinen wird entfaltet. Es kommt ggf. zur Abgabe von komplexgebundenen Metallen, die anderen Liganden zur Verfügung stehen, d.h. zu Speziestransfers. Die Elution von Biomolekülen erfordert oft organische Solventien und oft auch Säuren, da diese Moleküle viele Bindungsstellen aufweisen [22]. Die Trennung von geladenen Analyten erfordert den Zusatz von organischen Ionenpaar-Reagenzien. Der Einsatz dieser Eluenten verändert aber die Spezies. Es können im Rahmen der Speziation nur Analyte getrennt werden, die keine locker gebundenen Metalle tragen, insbesondere nicht in dem Bereich, der in Wechselwirkung mit der stationären Phase tritt.

CE - Kapillarelektrophorese

Die Kapillarelektrophorese bedient sich des Trennprinzips der Elektrophorese innerhalb einer Kapillare, al-

Tabelle 2 Anwendungsmöglichkeiten der Kapillarelektrophorese

Bezeichnung	Kürzel	Trennprinzip	Mögliche Analyte
Kapillar-Zonenelektrophorese	CZE	Ladung/ Größe	Ionen, geladene Moleküle, Aminosäuren
Kapillar-Isoelektrische Fokussierung	cIEF	Isoelektrischer Punkt	Proteine, Peptide
Kapillar-Isotachophorese	cITP	Spezifische Leitfähigkeit	Ionen, geladene Moleküle
Micellarelektrokinetische Kapillarchromatographie	MECC	Hydrophobizität	Neutrale Moleküle

lerdings bei wesentlich höheren Spannungen. Dies führt selbst bei kurzen Analysezeiten zu hoher Trenneffizienz. Daneben liegt ein wesentlicher Vorteil im Fehlen einer stationären Phase, die Speziestransformationen bewirken könnte [28]. Mit CE durchführbare Methoden sind in Tabelle 2 gezeigt [21, 29, 30].

Limitierend ist grundsätzlich die sehr geringe Probenmenge, die analysiert werden kann (in der Regel wenige Nanoliter!) [21]. Die relativen Detektionslimits liegen somit immer verhältnismäßig hoch. Erst neuere Kopplungsverfahren erlauben relative Detektionslimits von ca. 0,5 - 1 µg/L [31, 32]. Die Hochspannung und das elektrische Feld können die Spezies verändern [33]. Wenig stabile Organo-Metallkomplexe können ihre Metalle teilweise verlieren, oder es kommt zu Umkomplexierungen mit Pufferkomponenten.

Bei Kapillar-isoelektrischer Fokussierung (cIEF) muß zwingend ein elektroosmotischer Fluß (EOF) [34] unterdrückt werden, so daß nur mit beschichteten Kapillaren gearbeitet werden kann. Zusätzlich kommen „Ampholyte“ zum Einsatz, die den pH-Gradienten aufbauen, aber leicht zu Umkomplexierungen führen können. Diese Gefahr ist besonders zu beachten, da zur Trennung mit cIEF nur Peptide bzw. Proteine geeignet sind, die darüber hinaus meist Metalle nur locker gebunden haben. Ferner beruht die Trennung darauf, daß die Proteine ihren spezifischen isoelektrischen Punkt erreichen, an dem sie (nach außen) ladungsneutral sind und allein deshalb schon gebundene Metalle abgeben können [20].

Bei der micellarelektrokinetischen Kapillarchromatographie (MECC) werden Agenzien zur hydrophoben Mizellenbildung zum Puffermedium zugesetzt. Hier könnten Metallkontaminationen an den Außenoberflächen der Mizellen angereichert werden und Metallspezies vortäuschen.

Lockere hydrophobische Organo-Metallkomplexe könnten gestört werden, so daß es zur Abgabe von gebundenem Metall kommt.

Elementselektive Detektion

AAS - Atomabsorptionsspektrometrie

Alle AAS-Methoden sind Einzelelement-Bestimmungsverfahren, was auch in der Elementspezies-Analytik als Nachteil bewertet werden muß.

Die Flammen-AAS (FAAS) erreicht innerhalb der Atomabsorptionsspektroskopie die schlechtesten Nachweisgrenzen und ist häufiger Matrix-gestört, so daß Umwelt- oder biomedizinisch relevante „Normal“-Konzentrationsbereiche seltener abgedeckt werden [21, 25]. Die benötigte Probenmenge ist verhältnismäßig hoch: 4 - 5 ml/min. Für online Kopplungen ist FAAS deshalb wenig geeignet [21].

CVAAS, HAAS (Kaldampf-AAS, Hydrid-AAS) - Systeme sind z.Teil Spezies-selektiv (HAAS: selektive und empfindliche Derivatisierung mit NaBH_4) und sehr nachweisstark [21]. Allerdings können die Nachweise leicht sehr stark, matrixabhängig, gestört wer-

den. Es kommt dann zu Falschbestimmungen, meist Minderbefunden. Beim Einsatz als elementselektiver Detektor nach einem Trennsystem muß ein zum Teil aufwendiger quantitativer Aufschluß der Probe vorliegen, da darüber hinaus die Spezies unterschiedliche Detektor-Responses erzielen.

Im Falle der ETVAAS (Elektrothermale Verdampfungs-AAS), muß für jede Probe ein Temperaturprogramm abgearbeitet werden. Es kann also nur diskontinuierlich gemessen werden. Damit ist die Methode für online Kopplungen nicht geeignet, da eine Messung mehrere Minuten dauert und somit die zeitliche Auflösung für elementselektive Chromatogramme viel zu schlecht wird [21].

ICP-AES (Inductively Coupled Plasma- Atomic Emission Spectroscopy)

Ein großer Vorteil dieser Methode liegt in der Multi-element-Detektion [36]. Die hohe Plasmatemperatur verhindert häufig Matrixstörungen. Allerdings ist bei der Detektion der Elementlinien auf zusätzliche Untergrund-Kompensation zu achten. Als Probenzuführung dient in jedem Fall ein Zerstäuber zur Aerosolbildung:

Beispiele: Meinhard-, Crossflow-, DIN-, USN-Zerstäuber.

Die Zerstäubungseffizienzen sind beim Meinhard- und Crossflowzerstäuber gering (Größenordnung 1-5%), beim DIN und USN sehr hoch. Allerdings scheint der DIN-Zerstäuber ein schwierig beherrschbares, störanfälliges System darzustellen, so daß ein reproduzierbarer Betrieb nur unter enormem Aufwand zeitweise erreicht wurde [21, 37]. Er ist ferner nur für sehr geringe Probenzuführungsgeschwindigkeiten geeignet.

Der USN-Zerstäuber liefert stabile Signale, die aber bezüglich Quantifizierung oft stark Matrix-abhängig sind. Hohe Salzgehalte stellen ein großes Problem dar. Organische Lösungsmittel kühlen das Plasma soweit ab, daß es erlischt. Dies ist insofern von Bedeutung, da viele RPC-Trennungen mit organischen Lösungsmittelgradienten operieren. Als Abhilfe kann hier aber der USN-Zerstäuber mit einem Lösungsmitteldesolvator (Membrandesolvator) kombiniert werden, so daß, wie sich in der Praxis zeigt, bis zu 100% organischer Modifizier als Eluenten möglich sind. Jedoch werden an dieser Stelle auch organisch-flüchtige Elementspezies entfernt, so daß der Einsatz des Membrandesolvators nicht generell möglich ist.

ICP-MS (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry)

Das ICP-MS zählt zu den nachweisstärksten elementselektiven Detektoren [21]. Elementspezifische Konzentrationen bis in den ng/Liter Bereich sind erfaßbar. Es sind niedrig auflösende Quadrupol-Geräte neben hochauflösenden Sektorfeld-Geräten verfügbar.

Q-ICP-MS ist durch „polyatomic interferences“ im Massenbereich 40 - 80 sosehr gestört, daß manche Elemente gar nicht; andere nur unter zu Hilfenahme weiterer Matrixabtrennungen (z.B. ETV-ICP-MS [38]) bestimmt werden können.

Beispiel:

Arsen. Es existiert nur 1 Isotop, ^{75}As , das durch den $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}$ -Cluster [39], der im Massenspektrometer entsteht, gestört wird. Durch Vorschalten eines geeigneten ETV-Temperatur-Programms kann Cl^- aus der Probe vor der As-Atomisierung entfernt werden.

Da die Zerstäubung genauso erfolgt wie bei ICP-AES sind auch hier die gleichen Probleme zu lösen (z.B. bei hohem Salzgehalt der Probe). Sie treten wegen des Interface hier sogar verstärkt auf, da es z.B. an den Kernen zu Salzablagerungen oder Korrosion kommen kann.

Qualitätssicherung und Qualitätskontrolle

Grundsätzliche Bemerkungen

Grundsätzlich sollte die Qualitätssicherung/-kontrolle in der Analytik eine herausragende Rolle spielen, da von den Analysedaten weitreichende Schlußfolgerungen und Hypothesen/Theorien sowie teure Maßnahmen abhängen. Bei medizinisch-biologischen Fragestellungen hängt darüber hinaus häufig der Erfolg einer Therapie oder sogar die Gesundheit eines Patienten von der Richtigkeit der Analysedaten ab.

Qualitätssicherung beginnt bereits bei einer sinnvollen Planung des gesamten Experiments von der Probennahme bis zur Endanalyse. Literaturangaben sind möglichst umfangreich als Grundlage heranzuziehen und auf die neue Problematik zu adaptieren.

Die vorangegangenen Kapitel haben gezeigt, daß besonders bei der Spezies-Analytik weitreichende Fehler auftreten können, die oft sehr schwer und nur mit größtem Aufwand beherrschbar sind.

Fehlerquellen [16, 40]

- Probennahme: Störung der Gleichgewichte
- Probenvorbereitung: Instabilität der Spezies bei Lagerung, Extraktion, Reinigung, Aufkonzentrierung etc. Verluste oder Veränderung bei Extraktionen [1, 40].
- Trennung: Zerstörung der Spezies oder Adsorptionen [5, 40].
- Endbestimmung: Kalibrationsfehler, spektrale oder Masseninterferenzen, Peak-Überlappung, falsche Background-Korrektur [40].
- Labor: schlechtes Management, schlechtes, wenig umsichtiges Personal, Schusseligkeit [40].
- Gute Reproduzierbarkeit ist zu wenig [40].
- Genauigkeit/ Richtigkeit ist ein „Muß“.
- Ringversuche sind ein erster guter Ansatz. Bisher zeigen sie so gut wie immer, daß Speziationsergebnisse weit davon entfernt sind, richtig zu sein [40].

Problemlösungen

Es sollten zertifizierte Standard-Referenzmaterialien (CRM) verwendet werden (5 - 10% der Analysen). Diese müssen so früh wie möglich in den Analysen-

gang einbezogen werden. Die Probenzusammensetzung muß nahe an der Zusammensetzung des CRM liegen. In diesem Fall kann die Bestätigung der zertifizierten Ergebnisse die Richtigkeit der eigenen Ergebnisse zeigen. Leider sind bis jetzt noch wenig Spezies-zertifizierte CRMs erhältlich, so daß für die einzelnen Schritte problemorientierte Vorgehensweisen nötig sind. Wenn möglich, sollten mehrere, physikalisch unterschiedliche Methoden zur Verifizierung der Analyse herangezogen werden.

Probennahme

Grundsätzlich muß die Repräsentativität gewahrt bleiben [41].

Ferner:

- Probennahmebehälter vorreinigen, Kontaminationen vermeiden, problemorientiert geeignetes Behältermaterial wählen (Literatur) [18].
- Behälter mit großem Volumen/Oberfläche-Verhältnis (geringere „Wandeffekte“) wählen [18].
- Spezies-Spike-Versuche für Massenbilanzen durchführen [18, 40]
- Keine (engen) Stahlnadeln verwenden.
- Die Probennahmezeit muß kurz gehalten werden und die Proben sofort schockgefroren werden.
- Verwendung von Quarzskalpellen, Quarzbestecken [16].
- Sofortige Gefriertrocknung.
- Zusätzlich Speziesspikes für Wiederfindungsbestimmungen [18].

Probenvorbereitung

- Keine ungeeigneten Trennverfahren verwenden.
Beispiel: keine RPC bei labilen Metall-Proteinkomplexen.
- Reinigung der Trennmatrix und Deaktivierung unerwünschter reaktiver Gruppen
- Massenbilanzen zur Erfassung von Kontaminationen (aus mobilen oder stationären Phasen) und Verluste (Adsorptionen) [5, 20, 42]
- Die Trennung darf die Spezies nicht zerstören. Überprüfung mittels Reinjektionsverfahren und Monitoring aller Spezies. Im Idealfall darf wieder nur die ausgewählte Spezies (Massenbilanz!) erscheinen [21, 43, 44].
- Spülschritte nach der Trennung und Monitoring der Spezies, Metalle und Liganden.
- Spezies-Transfers überprüfen [20].
- Identifizierung der Spezies mehrdimensional durch mehrere unabhängige Verfahren [5].
- Beachtung theoretischer Grundlagen und daraus resultierender QC-Probleme, *Beispiel Kapillarelektrophorese*
- Berücksichtigung und Erfassen von Migrationszeit-Shifts mittels interner Standards und Standard-Additionsverfahren bei Speziesidentifizierungen [45]. Abbildung 2 [44] zeigt ein Beispiel zur umfangreichen Qualitätssicherung aus der Se-Speziation.

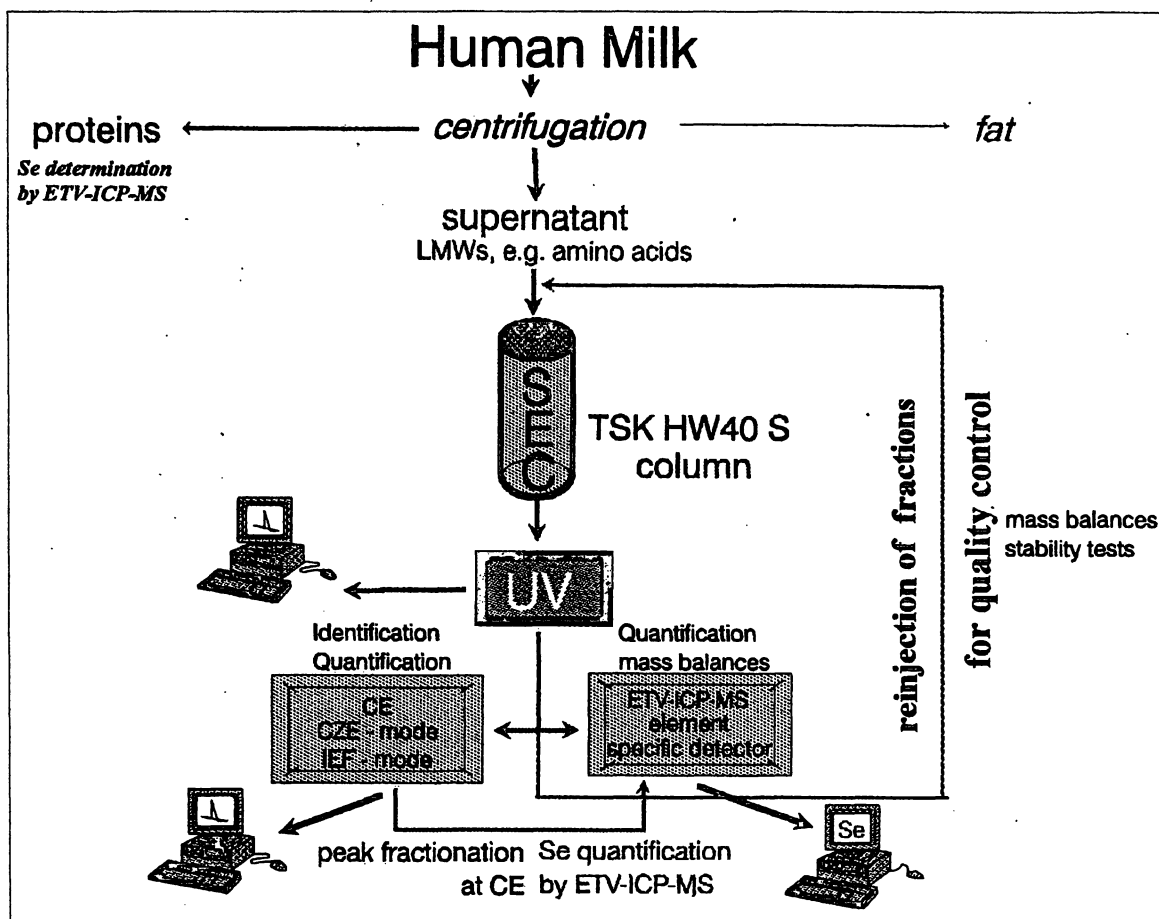


Abbildung 2 Ablauf eines qualitätsgesicherten Analysenschemas: Identifizierung von Elementspezies mittels Parallelbestimmung von ICP-MS und CZE/cIEF, Quantifizierung und Massenbilanzen, sowie Stabilitätstests mittels Re-Injektionen

Detektion

- Unspezifische Detektion vermeiden, elementselektive, ggf. speziesselektive Detektion wählen.
- Gesicherte Kalibrierung durchführen.
- Enddetektion mit CRM absichern (für viele Elemente - nicht Spezies - in vielen Matrices vorhanden).

Bewertung und Validierung der Daten

- Die Spezies dürfen nicht nur qualitativ, sondern müssen auch quantitativ erfaßt werden. Massenbilanzen sind so erst möglich [5, 21].
- Die Detektorresponse ist speziesabhängig. Dies muß bei der Bewertung berücksichtigt werden.
- Statistische Verfahren einschließlich Signifikanztests sollten zur Anwendung kommen [40].
- Die Aussagekraft der Daten sollte im Hinblick auf noch „versteckte“ oder nicht behebbare Fehlerquellen diskutiert werden.

Literatur

1. Quevauviller, Ph. Collaborative approach for testing the performance of analytical methods - an overview of results obtained by plasma spectrochemical techniques in the frame of BCR - interlaboratory studies. European Plasma Winter Conference, 15.1.97 - 20.1.97, Gent, Belgium.
2. Quevauviller, Ph. CRMs for quality controls of determination of chemical forms of elements in support to EU legislation. Fresenius' J Anal Chem 1996; 345:515-20.
3. Caroli, S. Chemical speciation: a decade of progress. In: Caroli S, Editor. Element Speciation in Bioorganic Chemistry. New York (USA): John Wiley & Sons Inc., 1996.
4. Hatland S, Martinsen I, Radzok B, Thomassen Y. (Zitiert in: Quevauviller PH, Maier E A, Griepink B. In: Caroli S, Editor. Element Speciation in Bioorganic Chemistry. New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore: John Wiley&Sons Inc, 1996). Anal Sci 1991, 7: 1029-34.
5. Michalke B. Quality control in speciation investigations. Fresenius' J Anal Chem 1994;350: 2-6.
6. Michalke B. Speziation in biomedizinischen und Umweltproben. Vorlesung „Speziation in biomedizinischen und Umweltproben“, TU Graz.
7. Kersten M, Förstner U. Speciation of trace elements in sediments. In: Batley GE, Editor. Trace Element Speciation: Analytical Methods and Problems. Boca Raton (USA): CRC Press, 1989.

8. Mota AM, Simaes Goncalves ML. Direct methods of speciation on heavy metals in natural waters. In: Caroli S, Editor. *Element Speciation in Bioorganic Chemistry*. New York, (USA): John Wiley & Sons Inc., 1996.
9. Morrison GMP. Trace elements speciation and its relationship to bioavailability and toxicity in natural waters. In: Batley GE, Editor. *Trace Element Speciation: Analytical Methods and Problems*. Boca Raton (USA): CRC Press, 1989.
10. Köhl G, Kalcher K, Irgolic K, Magee RJ. Identification and quantification of inorganic and organic selenium compounds with high performance liquid chromatography. *Appl Organomet Chem* 1993; 7:443-66.
11. Florence TM. Trace element speciation in biological systems. In: Batley GE, Editor. *Trace Element Speciation: Analytical Methods and Problems*. Boca Raton (USA): CRC Press, 1989.
12. Hart BT. Trace metal speciation. *Trace Met Nat Waters* 1992; 49:260-64.
13. Borgmann U. Metal speciation and toxicity of free metal ions to aquatic biota. In: Nriagu JO, Editor. *Aquatic Toxicology*. New York (USA): John Wiley & Sons Inc., 1983.
14. Florence TM. Trace element speciation and aquatic toxicology. *Trends Anal Chem* 1983; 2:162-9.
15. Turner DR. Relationships between biological availability and chemical measurements. *Met Ions Biol Sys* 1984; 18:137-44.
16. Gardiner PE. Considerations in the preparation of biological and environmental reference materials for use in the study of the chemical speciation of trace elements. *Fresenius' J Anal Chem* 1993; 345:287-90.
17. Reinecke H, Dunemann L. Does the supplementation of metal ions modify the intrinsic distribution of element species in food extracts? *Fresenius' J Anal Chem* 1990; 338:630-4.
18. Batley GE. Collection, preparation and storage of samples for speciation analysis. In: Batley GE, Editor. *Trace Element Speciation: Analytical Methods and Problems*. Boca Raton (USA): CRC Press, 1989.
19. La Fleur PD. Retention of mercury when freeze drying biological materials. *Anal Chem* 1973; 45: 1534-47.
20. Michalke B, Münch DC, Schramel P. Advanced quality control for zinc speciation investigations in human breast milk. *Fresenius' J Anal Chem* 1992; 344:306-10.
21. Dunemann L, Begerow J. Kopplungstechniken zur Elementspeziesanalytik. Weinheim (DE): VCH, 1995.
22. Mikes O. High performance liquid chromatography of biopolymers and biooligomers. Amsterdam (NL): Elsevier, 1988.
23. Regnier FE. (Zitiert in: Mikes O. High performance liquid chromatography of biopolymers and biooligomers. Amsterdam (NL): Elsevier, 1998). *Science* 1983; 222: 245-52.
24. Kopaciewicz W, Regnier FE. Zitiert in: Mikes O. High performance liquid chromatography of biopolymers and biooligomers. Amsterdam (NL): Elsevier, 1998. *Anal Biochem* 1982; 126: 8-16.
25. Hearn MTW, Greogo B, Bishop CH, Hancock WS. (Zitiert in: Mikes O. High performance liquid chromatography of biopolymers and biooligomers. Amsterdam (NL): Elsevier, 1998). *J Liq Chromatogr* 1980; 3:1549-60.
26. Engelhardt H, Hearn MTW. (Zitiert in: Mikes O. High performance liquid chromatography of biopolymers and biooligomers. Amsterdam (NL): Elsevier, 1998). *J Liq Chromatogr* 1981; 4: 1261-8.
27. Engelhardt H, Mathes D. zitiert in: Mikes O. High performance liquid chromatography of biopolymers and biooligomers. Amsterdam (NL): Elsevier, 1998. *Chromatographia* 1981; 4:325-32.
28. Harms J, Schwedt G. Applications of capillary electrophoresis in element speciation analysis of plant and food extracts. *Fresenius' J Anal Chem* 1994; 350:93-100.
29. Bulletin 1701. An Introduction to Capillary Electrophoresis. Hercules (USA): BioRad, 1991.
30. Kuhn R, Hofstetter-Kuhn S. *Capillary Electrophoresis: Principles and Practice*. Berlin (DE): Springer Verlag, 1993.
31. Olesik JW, Kinzer JA., Olesik SV. Capillary electrophoresis inductively coupled plasma mass spectrometry for rapid elemental speciation. *Anal Chem* 1995; 67:1-12.
32. Michalke B, Schramel P. Coupling of capillary electrophoresis with ICP-MS for speciation investigations. *Fresenius' J Anal Chem* 1997; 357:594-9.
33. Michalke B, Lustig S, Schramel P. Analysis for the stability of platinum-containing species in soil samples using capillary electrophoresis interfaced on-line with inductively coupled plasma mass spectrometry. *Electrophoresis* 1997; 18:196-201.
34. Bulletin 1641. Coatings: The key to success in capillary electrophoresis of proteins. Hercules (USA): BioRad, 1992.
35. Urasa IT. Development of new methods of speciation analysis. In: Caroli S, Editor. *Element Speciation in Bioorganic Chemistry*. New York (USA): John Wiley & Sons Inc., 1996.
36. Hill SJ, Bloxham MJ, Worsfold PJ. Chromatography coupled with inductively coupled plasma atomic emission spectrometry and inductively coupled plasma mass spectrometry. *J Anal At Spectrom* 1993; 8 499-515.
37. Lustig, S. Platinum in the Environment: Car-catalyst emitted Platinum: Transformation behaviour in soil and platinum accumulation in plants. München (DE): Herbert Utz Verlag, 1997.
38. Seubert A, Meinke R. On-line coupled ion-chromatography-ICP (AES, MS) and electrothermal vapourisation-ICP-MS in use for ultra trace analysis of high purity rhodium. *Fresenius' J Anal Chem* 1994; 348:510-9.
39. Hill SJ, Ford MJ, Ebdon L. Simplex optimization of nitrogen-argon plasmas in inductively coupled plasma atomic emission spectrometry for the removal of chlorid-based interferences. *J Anal At Spectrom* 1992; 7:719-25.
40. Quevauviller Ph, Maier EA, Griepink B. Quality control of results of speciation analysis. In: Caroli S, Editor. *Element Speciation in Bioorganic Chemistry*. New York (USA): John Wiley & Sons Inc., 1996.
41. Quevauviller Ph. Conclusion of the workshop „Trends in speciation analysis - an overview of discussions on inorganic speciation“. *Fresenius' J Anal-Chem* 1995; 351:345-50.
42. Wilken RD. Mercury analysis: a special example of species analysis. *Fresenius' J Anal Chem* 1992; 342:795-801.
43. Michalke B, Schramel P, Hasse S. Determination of free iodide in human serum: Separation from other I-species and quantification in serum pools and individual samples. *Mikrochim Acta* 1996; 12:67-76.
44. Michalke B, Schramel P. Selenium speciation in human milk with special respect to quality control. *Biol Trace Elem Res* 1997; 59:45-46.
45. Michalke B, Schramel P. Capillary electrophoresis methods for a clear identification of seleno amino acids in complex matrices like human milk. *Fresenius' J Anal Chem* 1995; 351:670-7.