

**Elementspeziesanalyse des Antimons mittels
Ionenchromatographie und Kapillarelektrophorese
Grundlagen und Anwendung
am Beispiel der Leishmaniose**

**Dem
Fachbereich Chemie
der
Universität Hannover**

zur Erlangung des Grades

**Doktorin der Naturwissenschaften
– Dr. rer. Nat. –**

genehmigte

Dissertation

von

**Dipl. Chem. Rocío Costa Casado
geboren am 18. Oktober 1974 in Alicante (Spanien)**

Hannover 2004



Referent: Dr. Nina Ulrich
Korreferent: Prof. Dr. Carla Vogt
Tag der Promotion: 11. Januar 2005
Veröffentlichung: Januar 2005

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Februar 2001 bis Oktober 2004 am Institut für Anorganische Chemie / Lehrgebiet Analytik der Universität Hannover unter der Leitung von Frau Priv. Doz. Dr. N. Ulrich angefertigt.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei Frau Priv. Doz. Dr. *N. Ulrich* für die Überlassung des Themas, ihre freundliche Unterstützung sowie ihren wissenschaftlichen Rat, das gezeigte Vertrauen bei der Erstellung dieser Arbeit bedanken.

Frau Prof. Dr. *C. Vogt* danke ich für die wissenschaftlichen Rat und die Hilfsbereitschaft und für die Übernahme des Korreferates.

Für die finanzielle und materielle Unterstützung dieser Arbeit danke ich der Niedersachsen Technion Stiftung.

Fr. Dipl.-Biologin *Mitali Chatterjee* und Fr. Dr. *Helen Denton* für die sehr gute Zusammenarbeit auf dem Gebiet der Leishmaniasis.

Weiterhin gilt mein Dank meinen Kolleginnen und Kollegen des Lehrgebiets Analytische Chemie für die freundliche Aufnahme, die kooperative Zusammenarbeit und das angenehme Arbeitsklima. Klima und die Unterstützung, wobei sich vor allem Frau Dipl. Chem. *S. Gruhl* und Herr Dr. *Ralf Ohlhof* für die unzähligen Antworten auf dumme Fragen ein extra herzliches Dankeschön verdient haben.

Ein allerherzlichster Dank gilt meinen Eltern für die Verständnis und die stete Hilfsbereitschaft.

Für meinen Eltern,
die ich über alles liebe.

**Der Mensch muss bei dem Glauben
verharren, dass das Unbegreifliche
begrifflich sei; er würde sonst nicht
forschen.**

Goethe

Abstract

In many problem definitions, the information about the total content of an element in a biological context is not enough, in order to judge its effects. Detailed knowledge of the bond forms and oxidation stage has become increasingly important, since the chemical form can affect the behaviour of the element strongly. This distinction is the subject of species analytics. Only via this route, it is possible to estimate the toxicity reactivity or accumulation tendency in environmental and biological samples.

In order to determine different species of an element analytically, in the last years coupling of several analytic methods has been established for various instances. However, these techniques must be individually co-ordinated with appropriate setting of tasks.

This work shows some of these speciation possibilities in respect to antimony compounds. Methods are introduced, which allow separating and detecting the inorganic species of antimony by ion chromatographic and electrophoresis separation. Methods have been tested using different conditions and detection systems to optimise these techniques. The methods should be used to describe the behaviour of antimony in biological systems, especially to investigate the fate of antimony species in the cells of the Leishmaniasis parasites. The most important species of this element, which are found in biological samples, are the inorganic compounds of Sb(III) and Sb(V).

In particular, couplings of the separation process (anion chromatography) with the element-specific detection methods like inductive coupled plasma with atomic emission and mass spectrometry (ICP-AES and ICP-MS) have been developed. In addition, capillary zone electrophoresis has been used as separation method for the antimony species.

With the development of efficient procedures, the investigation of analytical parameters like the reproducibility and the applicability for different matrices became crucial. In addition, a good detection limit should be achieved in order to be able to examine liquid samples without a further sample preparation. This work contains the investigation of antimony species in biological samples from the medical range, like cell and tissue samples from Leishmaniasis, a widespread parasitic infection.

Keywords: Antimony speciation, ion chromatography, electrophoresis, Leishmaniasis

Abstrakt

Bei vielen Problemstellungen reicht die Fragestellung nach dem Gesamtgehalt eines Elementes in einem biologischen Kompartiment nicht aus, um seine Wirkungen sicher zu beurteilen. Vielmehr sind Informationen zu den jeweiligen Bindungsformen und Oxidationsstufen wichtig, da die chemische Form das Verhalten des Elementes stark beeinflussen kann. Diese Unterscheidung ist Gegenstand der Speziesanalytik. Erst dann wird es möglich, Aussagen über die Toxizität, Reaktivität oder Akkumulationstendenz zu treffen.

Um unterschiedliche Spezies eines Elementes analytisch zu bestimmen, haben sich in den letzten Jahren Kopplungen mehrerer analytischer Methoden immer stärker etabliert. Diese müssen jedoch individuell auf die entsprechende Aufgabenstellung abgestimmt sein.

In Rahmen der vorliegenden Arbeit sollen Beiträge zur Speziesanalytik von Antimon geliefert werden. Es sollen Analysenverfahren entwickelt werden, die eine Speziation, also Unterscheidung unterschiedlicher Verbindungen eines Elementes und ihre nachweisstarke Detektion ermöglichen. Die Applikation der Verfahren soll zur Charakteristik des Verhaltens von Antimon in biologischen Systemen, besonderes bei der Behandlung der Zellen der Leishmaniose eingesetzt werden. Insbesondere bestand die Aufgabe, Kopplungen der Anionenchromatographie mit den elementspezifischen Detektionsmethoden Plasma-Atomemissions- und Massenspektrometrie (ICP-AES und ICP-MS) zu entwickeln. Neben der Chromatographie soll auch die Kapillarzonenlektrophorese als Trennverfahren für die Spurenanalytik nutzbar gemacht werden, indem eine Trennung für die Antimonspezies ermöglicht wird. Die wichtigsten Spezies dieses Elements, die in biologischen Proben angetroffen werden, sind die anorganischen Verbindungen von Sb(III) und Sb(V).

Die vorliegende Arbeit beinhaltet die Untersuchung von Antimonspezies in biologischen Proben aus dem medizinischen Bereich, wobei Zellextrakte und Gewebeextrakte von Leishmaniose, eine weitverbreitete parasitäre Infektion, untersucht wurden. Die Untersuchung an Zellproben und Gewebeproben von *Leishmania donovani* soll zur Aufklärung des Mechanismus der Toxizität und der Resistenz in manchen Stämmen beitragen. Verglichen werden sollten dabei Promastigoten und Amastigoten eines nicht antimonresistenten und eines Sb(V)-resistenten Stammes.

Keywords: Antimonspeziation, Ionenchromatographie, Elektrophorese, Leishmaniose

Abkürzungsverzeichnis

AAS	Atomabsorptions-Spektrometrie
amu	Atomare Masseneinheiten (Atomic Mass Unit)
As	Arsen
CEM	Channel-Electron-Multipliers
CGE	Kapillargelelektrophorese
CL	Cutaneous Leishmaniasis
CZE	Kapillarzonenelektrophorese
cps	counts per second
DIHEN	Direct Injection High Efficiency Nebulizer
DIN	Direktzerstäuber (Direct Injection Nebulizer)
DIN	Deutsches Institut für Normung
DTAB	Dodecyltrimethylammoniumbromid
EDTA	Dinatriumethylendiamintetraacetat
EOF	Elektroosmotischefluss
ESA	Elementspeziesanalytik
FT-IR	Fourier-Transformations-Infrarotspektrometrie
GC	Gaschromatographie
GLC	Gas-flüssiger-Chromatographie
GSC	Gas-fester-Chromatographie
HEN	Hocheffizienter Zerstäuber (High Efficiency Nebulizer)
HHPN	Hydraulischer-Hochdruckzerstäuber (Hydraulic High-Pressure Neb.)
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie
HPLC-ICP-MS	Hochleistungsfüssigchromatographie- Induktiv gekoppeltes Plasma-Massenspektrometrie
HR-ICP-MS	Hochauflösung- Induktiv gekoppeltes Plasma- Massenspektrometrie
HTAB	Hexadecyltrimethylammoniumbromid
IC	Ionenchromatographie
IC-ESI-MS	Ionenchromatographie-Elektrospray Interface-Massenspektrometrie
IC-ICP-AES	Ionenchromatographie-Induktiv gekoppelte Plasma-Atomemissionsspekt.
IC-ICP-MS	Ionenchromatographie-Induktiv gekoppelte Plasma-Massenspektrometrie
ICP-OES	optische Emissionsspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma
ICP-QMS	Quadrupol-Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma

ICP-SFMS	Sektorfeld-Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma
IEC	Ion Exclusion Chromatography (Ionenausschlußchromatographie)
IEF	Isoelektrische Verfahren
IIC	Ion-Interaction-Chromatography (Ionenpaarchromatographie)
ITP	Isotachophorese
LC	Liquid Chromatography (Flüssigchromatographie)
LD50	zu 50 % tödliche Dosis
LLC	Liquid Liquid Chromatography (Flüssig-flüssig-Chromatographie)
LSC	Liquid Solid Chromatography (Flüssig-feste-Chromatographie)
m	Masse
m/.m	Auflösung des Massenspektrometers
MCL	Mucocutaneous Leishmaniasis
MCN	Microkonzentrischer Zerstäuber (Micro Concentric Nebulizer)
MEKC	Mizellarelektrokinetische Kapillarchromatographie
MS	Massenspektrometrie
NMR	Kernresonanzspektrometrie
NG, NWG	Nachweisgrenze
OTAC	Octadecyltrimethylammoniumchlorid
PE	Polyethylen
PEEK	Polyether-Etherketon
PTFE	Polytetrafluorethylen
PEEK	Poly-Ether-Ether-Keton
Sb	Antimon
Sb(III)	Anorganisches dreiwertiges Antimon, z. B. Antimonige Säure oder Kaliumantimonyltartrat
Sb(V)	Hexahydroxyantimonsäure und deren Salze
SDS	Sodium dodecyl sulfate (Natriumdodecylsulfat)
SEC	Size-Exclusion-Chromatography (Größenausschlußchromatographie)
TBAB	Tetrabutylammoniumbromid
TPhSb	Triphenyl Antimon
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UV/VIS	Spektralphotometrie im ultravioletten und sichtbaren (visuellen) Bereich
USN	Ultraschallzerstäuber (Ultrasonic Nebulizer)
VL	Viszerale Leishmaniasis

Inhaltverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Elementspeziesanalytik (ESA)	3
2.1	Elementspeziesarten	4
2.2	Systematische Ansätze für die Speziesanalytik	6
2.3	Allgemeine Probleme bei der Speziesanalytik	7
2.4	Methoden der Speziesanalytik	11
3	Grundlagen zur Chromatographie	13
3.1	Trennmechanismen in der HPLC	14
3.2	Größen zur Beurteilung der Güte von Trennvorgängen	23
3.3	Theoretische Konzepte zur Beschreibung der Chromatographie	28
3.4	Theorie zur Ionenaustauschchromatographie	32
3.4.1	Der Ionenaustauschprozess	32
3.4.2	Retentionsmodelle in der Kationenchromatographie	34
3.5	Aufbau einer HPLC-Apparatur	37
4	Grundlagen der ICP-MS/AES	41
4.1	ICP-MS	41
4.1.1	Zerstäuber	43
4.1.2	Plasma und Brenner	46
4.1.3	Interface und Quadrupol	49
4.2	Grundlagen der Atomemissionsspektrometrie	52
4.2.1	Aufbau eines optischen Spektrometers	55
4.2.2	Simultane und sequentielle Spektrometer	59

4.2.3	Spektrale und nicht-spektrale Störungen	59
4.3	Kopplungstechniken	60
4.3.1	HPLC-ICP-AES und HPLC-ICP-MS	60
5	Einführung in der Kapillarelektrophorese	62
5.1	Grundlagen der Kapillarelektrophorese	63
5.2	Gerätetechnik	68
5.2.1	Prinzipieller Aufbau	68
5.2.2	Spannungsquelle	69
5.2.3	Kapillare	69
5.2.4	Probeaufgabe	70
5.2.5	Detektionssysteme	71
5.3	Theorie der indirekten UV-Detektion	71
5.4	Arten der Kapillarelektrophorese	77
5.4.1	Kapillarzonenelektrophorese	78
5.4.2	Mizellare elektrokinetische Kapillarchromatographie (MEKC)	80
5.4.3	Gelelektrophorese	82
5.4.4	Isotachophorese	82
5.4.5	Isoelektrische Fokussierung	83
5.5	Parameter zur Optimierung elektrophoretischer Trennungen	85
6	Einführung in die Leishmaniose	86
6.1	Vektoren und Reservoirs	86
6.2	Krankheitserreger	88
6.3	Die Krankheit und Ihre Auswirkungen	89
6.4	Geographische Verteilung der Leishmaniose	92
6.5	Co-Infektion Leishmania /HIV	94

6.6	Lebenszyklus der Leishmaniose-Arten	95
6.6.1	Charakterisierung der Promastigoten	96
6.6.2	Charakterisierung der Amastigoten	97
6.7	Behandlung von Leishmaniosen	98
6.8	Wirkungsweise des Antimons	100
7	Antimon: Chemie und Analytik	103
7.1	Einsatzgebiete des Antimons	103
7.2	Chemie des Antimons	104
7.2.1	Stabilität der Oxidationsstufen	106
7.2.2	Chemie in wässriger Lösung	108
7.2.2.1	Antimon (V)	110
7.2.2.2	Antimon (III)	111
7.2.2.3	Redoxreaktionen von Antimon	113
7.3	Antimon in der Umwelt	114
7.4	Toxizität	117
7.5	Grenzwerte und Richtlinie für Antimon	119
8	Methodenoptimierung für die Chromatographie	121
8.1	Durchführung der Trennung	122
8.2	Untersuchungen an kommerziellen Anionenaustauschmaterialien	122
8.3	Eluenten für die IC	124
8.3.1	Kenngrößen für eine statistische Beurteilung analytischer Ergebnisse	125
8.3.2	Anionenchromatographie mit Phthalsäure als Eluent	128
8.3.3	Anionenchromatographie mit Zitronensäure als Eluent	136
8.3.4	Anionenchromatographie mit 4-Hydroxybenzoesäure als Eluent	142
8.3.5	Anionenchromatographie mit EDTA als Eluent	145
8.3.6	Anionenchromatographie mit Salpetersäure als Eluent	153
8.3.7	Anionenchromatographie mit Salzsäure als Eluent	159

8.3.8	Anionenchromatographie mit Sulfat als Eluent	163
8.3.9	Anionenchromatographie mit Carbonat als Eluent	167
8.4	Vergleichende Übersicht der Methoden: Anionenchromatographie	171
8.4.1	Anwendungsbereich: Analytische Kenndaten	171
8.5	Diskussion der Methode: Anionenchromatographie	173
9	Trennung auf der Basis der CZE-UV	175
9.1	Kenngrößen der CZE	176
9.2	Elektrodispersion	180
9.3	Weitere Größen für die Optimierung einer Trennung	181
9.4	Trennungsoptimierung	185
9.4.1	Trennung der Antimonspezies mit Phthalsäure als Puffer	186
9.4.2	Trennung der Antimonspezies mit Chromat	208
10	Untersuchung von Zellproben	217
10.1	Kultivierung der Zellproben	217
10.2	Probenvorbereitung und Lagerung	218
10.3	Methoden für die Antimonspeziesanalytik in Zellproben	220
10.4	Zellkulturen: Untersuchung eines nicht antimonresistenten Stammes von <i>Leishmania donovani</i>	220
10.4.1	Untersuchung von Promastigoten	221
10.4.2	Untersuchung von Amastigoten	223
10.5	Zellkulturen: Untersuchung eines resistenten Stammes von <i>Leishmania donovani</i>	225
10.5.1	Untersuchung von Promastigoten	225
10.5.2	Untersuchung von Amastigoten	227
10.6	Zeitabhängigkeit der Reduktionsaktivität	229

10.7	Konzentrationsabhängigkeit der Reduktionsaktivität	230
10.8	Charakterisierung der Metabolite	231
10.9	Vergleich der Ergebnisse für beide Stämme von <i>Leishmania donov.</i>	232
10.9.1	Vergleich der Antimonkonzentration	232
10.9.2	Vergleich der Speziesverteilung	235
10.10	Zusammenfassung der Untersuchung von Zellproben	240
11	Untersuchung von Gewebeproben	241
11.1	In-vivo-Kultur der Mäuse	241
11.2	Probenvorbereitung der Gewebeproben	242
11.3	Antimonanalytik in den Gewebeproben	243
11.4	Untersuchung des Sb-Gesamtgehaltes in den Gewebeproben	243
11.5	Untersuchung von Milzproben (Speziation)	246
11.5.1	Untersuchung von nicht infizierten Mäusen	247
11.5.2	Untersuchung von infizierten Proben	248
11.6	Untersuchung von Leberproben (Speziation)	249
11.6.1	Untersuchung von nicht infizierte Proben	249
11.6.2	Untersuchung von infizierten Proben	250
11.7	Matrixprobleme	251
11.8	Matrixprobleme bei der Speziation	252
11.9	Standardaddition bei der Gesamtgehaltsbestimmung	252
11.10	Standardaddition in den chromatographischen Verfahren	254
11.11	Charakterisierung der Metabolite	255
11.12	Zusammenfassung der Untersuchung von Gewebeproben	257
12	Zusammenfassung	258

13	Anhang	262
13.1	Verwendete Chemikalien	262
13.2	Allgemeine Geräte und Hilfsmittel	263
13.3	Verwendete Methoden der Kapillazonelektrophorese	263
13.3.1	Allgemeines	263
13.3.2	Konditionierung der Kapillaren	264
13.3.3	Kapillarelektrophoresemethoden	264
13.4	Verwendete Methoden der IC-ICP-AES und IC-ICP-MS	264
13.4.1	Verwendete Geräte und Trennsäulen	265
13.5	Herstellung von Sb-Standards	265
14	Literaturverzeichnis	266

1 Einleitung

Bei vielen Problemstellungen reicht die Fragestellung nach dem Gesamtgehalt eines Elementes in einem biologischen Kompartiment nicht aus, um seine Wirkungen sicher zu beurteilen. Vielmehr sind Informationen zu den jeweiligen Bindungsformen und Oxidationstufen wichtig, da die chemische Form das Verhalten des Elementes stark beeinflussen kann. Diese Unterscheidung ist Gegenstand der Speziesanalytik. Erst dann wird es möglich, Aussagen über die Toxizität, Reaktivität oder Akkumulationstendenz zu treffen.

Um unterschiedliche Spezies eines Elementes analytisch zu bestimmen, haben sich in den letzten Jahren Kopplungen mehrerer analytischer Methoden immer stärker etabliert. Diese müssen jedoch individuell auf die entsprechende Aufgabenstellung abgestimmt sein.

In Rahmen der vorliegenden Arbeit sollen Beiträge zur Speziationsanalytik von Antimon geliefert werden. Es sollen Analysenverfahren entwickelt werden, die eine Speziation, also Unterscheidung unterschiedlicher Verbindungen eines Elementes und ihre nachweisstarke Detektion ermöglichen. Zur Optimierung dieser Verfahren sollen unterschiedliche Bedingungen und Detektionssysteme gestellt werden. Die Applikation der Verfahren soll zur Charakteristik des Verhaltens von Antimon in biologischen Systemen, besonderes bei der Behandlung der Zellen der Leishmaniose eingesetzt werden. Insbesondere bestand bei der vorliegenden Arbeit die Aufgabe, Kopplungen der Anionenchromatographie mit den elementspezifischen Detektionsmethoden Plasma-Atomemissions- und Massenspektrometrie (ICP-AES und ICP-MS) zu entwickeln. Neben der Chromatographie soll auch die Kapillarzonenlektrophorese als Trennverfahren für die Spurenanalytik nutzbar gemacht werden, indem eine Trennung für die Antimonspezies ermöglicht wird. Die wichtigsten Spezies dieses Elements, die in biologischen Proben angetroffen werden, sind die anorganischen Verbindungen von Sb(III) und Sb(V).

Mit der Entwicklung leistungsfähiger Verfahren zur Spezies-Bestimmung sollen in dieser Arbeit methodische Voraussetzungen geschaffen werden. Es sollte auch eine gute Nachweisgrenze z. B. durch Anreicherungen der Analyten erreicht werden, um bei flüssigen Proben auf eine weitere Probenvorbereitung verzichten zu können.

Die vorliegende Arbeit beinhaltet die Untersuchung von Antimonspezies in biologischen Proben aus dem medizinischen Bereich, wobei Zellextrakte und Gewebeextrakte untersucht wurden.

Die Untersuchung an Zellproben und Gewebeproben von *Leishmania donovani* soll zur Aufklärung des Mechanismus der Toxizität und der Resistenz in manchen Stämmen beitragen. Verglichen werden sollten dabei Promastigoten und Amastigoten eines nicht antimonresistenten und eines Sb(V)-resistenten Stammes.

Leishmaniose [1] ist eine weitverbreitete parasitäre Infektion, die durch den Stich einer erkrankten Mücke, einer weibliche Phlebotome (siehe **Kapitel 6**), auf den Menschen übertragen wird und nach den klinischen Symptomen als kutane-, mukokutane oder viszerale Leishmaniose bezeichnet wird.

Folgende Fragestellungen sollten bearbeitet werden:

- Gibt es Unterschiede bei der Akkumulation von Sb(III) und Sb(V) durch die genannten Zellreihen?
- Kommt es zu einer Reduktion von Sb(V) in den Zellkulturen?
- Ist die Reduktionsaktivität zeitabhängig oder konzentrationsabhängig?
- Sind weitere Antimonmetabolite in den Zellen nachweisbar?

Für die Bearbeitung der ersten Frage wurde der Gesamtantimongehalt mit ICP-MS bestimmt. Die anderen Punkte wurden mit den verschiedenen speziesanalytischen Verfahren (IC-ICP-MS bzw. -ICP-MS) untersucht.

2 Elementspeziesanalytik (ESA)

In der bisherigen Forschung lassen sich zwei Formen der Analytik unterscheiden: Bei der organischen Analytik steht neben der Quantifizierung des Kohlenstoff-, Wasserstoff- und Sauerstoffgehaltes die genaue Aufklärung der Struktur im Vordergrund der Forschung. Herkömmliche Analysenmethoden innerhalb der anorganischen Analytik dienen dazu, Gesamtgehalte von Elementen oder deren Verbindungen in verschiedenen Matrices zu bestimmen. Man verzichtet dabei bewusst auf eine Unterteilung dieser Gesamtgehalte in einzelne Verbindungen, weil für eine erfolgreiche Bestimmung der Gesamtgehalte eine Uniformierung der Spezies (der Begriff wird im folgenden erklärt), z. B. durch die Atomisierung in einem induktiv gekoppelten Plasma (ICP), Voraussetzung ist.

Die Speziesanalytik dagegen stellt einen relativ neuen Zweig innerhalb der Analytischen Chemie dar, welcher die genaue Untersuchung von Bindungsformen und die Strukturaufklärung in die anorganische Analytik eingeführt hat. So können z. B. die Unterscheidung von Hg (I)/Hg(II) im anorganischen Trennungsgang [2] sowie die selektiven Extraktionsprozesse für Bodenanalytik [3] können als Anfänge der Speziesanalytik angesehen werden. Die Entwicklung immer leistungsfähigerer Geräte, wie der ICP-MS (Induktiv gekoppeltes Plasma-Massenspektrometrie), mit Nachweisgrenzen im unteren $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ -Bereich, macht heutzutage die Ausdehnung auf weitere Elemente und neue Fragestellungen möglich, weil die einzelnen Speziesgehalte in der Regel deutlich geringer sind als die Gesamtgehalte. Die Vielfältigkeit der Methoden und Ansatzpunkte der Speziesanalytik macht eine Begriffsdefinition schwierig. Derzeit arbeitet die IUPAC an einer einheitlichen Definition. Es sei an dieser Stelle die allgemein anerkannte Definition von Ure et al. [4] genannt, die als Grundlage für eine einheitliche Begriffsbestimmung dienen sollte:

Unter Elementspezies sind sämtliche physikalischen und chemischen Zustands- und Bindungsformen eines Elements, die in Abhängigkeit der Umgebungsbedingungen auftreten können, zu verstehen [5].

Das Interesse an der Elementspeziesanalytik wuchs mit der neueren Erkenntnis, dass die Mobilität, die Verteilung und Bioverfügbarkeit der chemischen Elemente, ihre Toxizität und damit ihr Gefährdungspotential, weniger von ihrem Gesamtgehalt abhängig sind, als vielmehr von der spezifischen chemischen Form. Als klassisches Beispiel sei hier die Unterscheidung

zwischen Cr(III) und Cr(VI) genannt. Cr(III) zählt zu den essentiellen Spurenstoffen, die dem Körper zugeführt werden müssen, wohingegen Cr(VI) schon in geringen Konzentrationen toxisch wirkt. Ein anderes Beispiel ist die Differenzierung von As(III) und As(V), die von Bedeutung ist, da ersteres im Gegensatz zum zweiten karzinogen und deutlich toxischer ist. Vielfach werden in der Literatur wie auch in der vorliegenden Arbeit die Begriffe „Speziesanalytik“, „Speziierung“, „Speziation“ und das englische „Speciation“ als Synonyme für die ESA verwendet.

Als Haupteinsatzbereiche der Speziierung sind neben den Abschätzungen des Gefährdungspotentials von Kontaminationen im Umweltbereich die Untersuchungen von Metabolisierungen und Wirkungsweisen von Metallen und Metallverbindungen in verschiedenen, häufig biologischen Matrices zu sehen. Noch mehr als die Gesamtgehaltsbestimmung ist sie daher Bestandteil interdisziplinärer Projekte mit Beteiligung von Biologie, Medizin, Veterinärmedizin und Pflanzenphysiologie. Im klassischen Gebiet der ESA, der Umweltanalytik, unterscheidet man die Kompartimente Atmosphäre, Wasser, Boden und Biota, d.h. Mikroorganismen sowie pflanzliche und tierische Lebewesen [6]. Dabei müssen in jedem Bereich spezielle Anforderungen in bezug auf die Zusammensetzung der Matrices, die erwarteten Spezies und den Konzentrationsbereich berücksichtigt werden. Daraus ergeben sich angepasste Verfahren, z. B. die sequentielle Extraktion für die Bodenanalytik [7], die Verbindung von Größenausschluss-Chromatographie und elementspezifischer Detektion für die Analyse von Pflanzenextrakten [8] oder die chromatographische Trennung von Komplexen in wässriger Matrix [9, 10].

Die vorliegende Arbeit beinhaltet die Untersuchung von Antimonspezies in biologischen Proben aus dem medizinischen Bereich, wobei in erster Linie Zellextrakte untersucht wurden. Die Besonderheiten und Probleme der Matrix und der Speziesanalytik von Antimon werden im **Kapitel 0** mit den analytischen Methoden und Ergebnissen vorgestellt.

2.1 Elementspeziesarten

Aus der Definition von Ure et al. geht hervor, dass die Speziierung sowohl die Differenzierung eines Elements nach seinen unterschiedlichen Oxidationsstufen als auch die Unterscheidung der Art der Bindung eines Elementes an anorganische oder organische Bindungspartner umfasst. Anhand einiger ausgewählter Beispiele sollen nun die wichtigsten Elementspeziesklassen kurz erklärt werden.

Oxidationsstufen-Spezies

Die Unterscheidung zwischen verschiedenen Oxidationsstufen eines Elementes ist vielleicht die einfachste und bekannteste Form der ESA, als deren wichtigste Vertreter bereits die Cr- und die As-Spezies benannt wurden. Auch bei Antimon spielen die Oxidationsstufen eine wichtige Rolle in der Erforschung der Tropenkrankheit Leishmaniose (siehe **Kapitel 6** und **7**) [6]. Diese Spezies werden im wesentlichen von den Umgebungsbedingungen, wie z. B. der Temperatur, den Redoxverhältnissen, den Konzentrationen, vorhanden Reaktionspartnern und Komplexbildnern und dem pH-Wert beeinflusst [11, 12]. Beim Eisen ist eine Differenzierung zwischen den Oxidationsstufen II und III für den Menschen von Relevanz, da z. B. nur lösliche Fe(II)-Präparate (meist Fe(II)-gluconat) gegen Eisenmangel wirken. Zudem spielt das Redoxpaar Fe(II)/Fe(III) in Umweltproben eine wichtige Rolle, sodass auch hier eine Unterscheidung wünschenswert ist.

Niedermolekulare Spezies

Hierzu zählen als die wichtigsten Vertreter in Umweltmatrizes und biologischen Proben die Alkylverbindungen der Elemente Arsen, Blei, Quecksilber und Zinn. Bei dem Übergang in den alkylierten Zustand ändern sich wegen der Reduzierung der Hydrophilie die Löslichkeit und die Bioverfügbarkeit der Spezies drastisch. Häufig ändert sich auch die Toxizität der Spezies stark. Es kann jedoch nicht verallgemeinert werden, dass alle alkylierten Spezies toxischer als ihre entsprechenden ionischen Erscheinungsformen sind, da z. B. die Toxizität von Methylquecksilber sehr hoch ist, während Quecksilber als hydratisiertes Hg (II)-Ion relativ untoxisch ist. Beim Arsen geht der Trend in die andere Richtung, hier ist die Monomethylarsonsäure weitaus weniger toxisch als As(III) und As(V), während Arsenobetain sogar fast keine Toxizität aufweist [13].

Höhermolekulare Spezies

Beispiele für diese Speziesklasse sind Metalloproteine, Metallothioneine und Metalloporphyrine. Unter Metalloproteinen versteht man generell Proteine, deren räumliche Struktur durch das zentrale Metall-Ion bestimmt wird, wohingegen Metallothioneine Metall-Ionen binden durch eine ionische Verbindung Metall-Schwefel und dadurch zur Schwermetallentgiftung beitragen [14]. Metalloporphyrine bestehen aus Tetrapyrrol-Segmenten mit unterschiedlichen ionischen Metallen als Zentralatom. Sie erfüllen wichtige biologische Aufgaben z. B. beim Sauerstofftransport (Fe), bei der Photosynthese (Mg) und bei der Transmethylierung (Co) [7]. Diese Spezies weisen durch das komplexe Bindungsmuster

ganz andere Eigenschaften als die freien Metallkationen auf. Man kann in Zukunft weitere Erkenntnisse über den Einfluss der Stabilität von Metallbindungen auf ihre Verfügbarkeit bzw. ihre Toxizität erwarten. Somit rücken neben den stabilen Komplexen auch labile Bindungsformen, die durch Ligandenaustausch in andere Formen umgewandelt werden, in das Interesse der ESA.

Physikalisch gebundene Spezies

Physikalische Prozesse wie Adsorption an festen Oberflächen oder Inklusion in festen oder flüssigen Strukturen können neben chemischen Bindungen auch die Eigenschaften von Analyten verändern. Diese Art von Spezies tritt hauptsächlich in den Geowissenschaften auf. Ein Beispiel für eine besonders stabile Form einer solchen Bindung ist der Einschluss von Schwermetall-Ionen in Kristallstrukturen. Die Stärke einer solchen Bindung hat praktische Bedeutung bei der Abschätzung der Freisetzbarkeit von Schwermetallen aus Böden [15].

2.2 Systematische Ansätze für die Speziesanalytik

Es lassen sich drei generelle Herangehensweisen für die ESA unterscheiden. Dies sind der operationelle, der funktionelle und der spezifische Ansatz. Kriterien für diese Einteilung ergeben sich aus den Definitionen von Spezies, Form und Phase, die verwendet werden, sowie aus der analytischen Methodik. Im Folgenden sollen die drei Ansätze kurz erläutert werden.

Operationeller Ansatz

Der operationelle Ansatz beschreibt die klassische Form der Speziesanalytik, wie sie z. B. bei der Beurteilung von Böden eingesetzt wird. Hierbei werden keine einzelnen Verbindungen der Komplexe analysiert, sondern Fraktionen, die durch chemische oder physikalische Techniken erhalten werden. Der Fraktionierungsprozess ist bestimmend, sodass man von einer Definition über den analytischen Vorgang, die Operation, sprechen kann. Als allgemeine Beispiele sollen hier die sequentiellen Extraktionsverfahren zur Bestimmung des wasser- oder säurelöslichen, austauschbaren, reduzierbaren oder oxidierbaren Anteils an bestimmten Elementen in der Probe sowie Filtration, Zentrifugation oder Dialyse von Proben zur Abtrennung von flüssigen und festen Bestandteilen und zur Größenfraktionierung genannt werden [6, 12]. An die Trennung schließt sich meist offline die Detektion durch Standardverfahren wie Atomabsorptionsspektrometrie (AAS), Induktiv gekoppeltes Plasma

Atomemissionsspektrometrie (ICP-AES) oder Induktiv gekoppelte Plasma-Massenspektrometrie (ICP-MS) an (siehe S. 11); die Verwendung von Kopplungstechniken spielt hier eine untergeordnete Rolle. In der vorliegenden Arbeit wurde der operationelle Ansatz für die Extraktion von Zellbestandteilen nach Ultrazentrifugation eingesetzt.

Funktioneller Ansatz

Begriffe wie Pflanzenverfügbarkeit, Mobilität oder Bioverfügbarkeit kennzeichnen den funktionellen Ansatz der Speziesanalytik. Es werden auch hierbei hauptsächlich Verbindungsgruppen und nicht einzelne Verbindungen nachgewiesen. Im Gegensatz zur operationellen Speziesanalytik steht jedoch die Funktion der Spezies im biologischen System oder im Umweltkompartiment im Mittelpunkt. Beispiele für den funktionellen Ansatz sind die Bestimmung der Aufnahme eines Elementes durch Pflanzen, Untersuchung der Mobilität von Metallen in Gewässern und Ermittlung des bioverfügbaren Metallanteils im Boden [12]. Die Methodik ist prinzipiell dem operationellen Ansatz ähnlich, die Operationen werden der zu untersuchenden Funktionalität angepasst.

Spezifischer Ansatz

Im Gegensatz zu den vorhergehenden Ansätzen beschäftigt sich der spezifische Ansatz mit der genauen chemischen Form der Spezies, dabei sollen möglichst keine Gruppentrennungen wie bei den beiden vorherigen Ansätzen verwendet werden. Die Lösung der analytischen Fragestellung ist dadurch am komplexesten, weil besonders spezifische und empfindliche Messmethoden eingesetzt werden müssen. Erst mit der Entwicklung der Kopplungstechniken (siehe S. 11) eröffnete sich eine Vielzahl neuer Möglichkeiten. Fortschritte gab es hauptsächlich in der Wasseranalytik, wo z. B. verschiedene Quecksilberspezies [16], Zinnspezies [17] und anorganische und methylierte Arsenspezies [18] detektiert werden konnten. Die spezifische Speziesanalytik bildet einen Hauptteil der vorliegenden Arbeit, da die entwickelten Kopplungstechniken zu diesem Bereich zu zählen sind.

2.3 Allgemeine Probleme bei der Speziesanalytik

Bei der Speziesanalytik ist grundsätzlich zwischen der Frage nach Effekten einzelner Spezies oder Speziesgruppen auf definierte geologische oder biologische Systeme und der Charakterisierung von Spezies in situ zu unterscheiden. Dabei muss man zunächst die grundlegenden Anforderungen für die Elementspurenanalytik erfüllen. Das weitere Vorgehen muss sich jedoch an die Fragestellung anpassen. Im Falle der in-situ-Charakterisierung von

Spezies muss deren weitgehende Erhaltung im nativen Zustand gewährleistet sein. Hierbei steht man vor einer Schwierigkeit. Jeder Eingriff in ein dynamisches System, bestehend aus unterschiedlichen systemimmanenten Elementspezies, muss zwangsläufig zu Störungen der ursprünglichen Verteilung führen. Diese Veränderungen so gering wie möglich zu halten, ist die Aufgabe des Analytikers. Darüber hinaus ist jeweils in Abhängigkeit von Aufgabenstellung und möglichen Konsequenzen zu entscheiden, welche Art von Veränderungen noch akzeptiert werden können. Hierbei führt nur ein Vergleich von mindestens zwei Verfahren zu sinnvollen Ergebnissen. Die Minimierung von möglichen Speziesumwandlungen zieht sich durch den kompletten Ablauf analytischer Meßmethoden. Dabei sollte neben den allgemeinen Problemen in der Elementspurenanalytik, wie z. B. der repräsentativen Probenahme und der Kontaminations- und Verschleppungsgefahr, in der Speziesanalytik zusätzlich auf die folgenden Schwierigkeiten geachtet werden:

Störungen der chemischen Gleichgewichte

Das wichtigste Problem der Speziesanalytik ist die Störung der teilweise komplexen chemischen Gleichgewichte. Auswirkungen können alle Teile des Analytischen Prozesses, also sowohl Probenahme als auch Probeklagerung, Probenvorbereitung und die Messung selbst haben, wie im folgenden kurz skizziert wird.

Probenahme

Die Analysenverfahren müssen unter Berücksichtigung von Spezies und umgebender Matrix geplant und durchgeführt werden. Die Art der Probenahme ist für eine erfolgreiche Speziation maßgeblich, z. B. für die unterschiedliche Verteilung von Elementen in Pflanzen. Neben der Art der Probenahme ist auch die Reproduzierbarkeit der Probenahme für eine erfolgreiche Speziation nötig. Beispielsweise sollte die Probenahme unter Berücksichtigung der Spezies und der umgebenden Matrix geplant und ausgeführt werden. Die Gleichgewichte zwischen Gewebeprobe und Körperflüssigkeit oder zwischen fester und flüssiger Phase sollten möglichst nicht gestört werden, ebenso können auftretende Temperaturunterschiede die meist labilen Gleichgewichte verschieben.

Probenlagerung

Eine Umwandlung von Spezies aufgrund von Reaktionen mit der Atmosphäre oder Einflüssen der Temperatur und die damit verbundene Verfälschung der Resultate muss vermieden werden. Es muss z. B. eine Umkomplexierung labiler Spezies durch andere Metalle beachtet

werden. Auch die Lagerung der Proben sollte eine möglichst geringe Verfälschung der Resultate zur Folge haben, dabei bieten sich die Lagerungsmöglichkeiten unter Ausschluss von Licht, Sauerstoff und Mikroorganismen an. Labile Spezies kann man durch eine Umkomplexierung in stabile Formen, die zur Lagerung besser geeignet sind, überführen. Bei festen Umweltproben bietet sich häufig die Gefriertrocknung bei maximal -40 °C an. Für biologische Proben ist Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff und anschließender Lagerung bei -196 °C unumgänglich. Jedoch sollte man dabei beachten, dass zu lange Lagerungszeiten zu Verlusten oder zu Abbaureaktionen z. B. von Organometallverbindungen führen können und die Analysenergebnisse die tatsächliche Speziesverteilung nicht widerspiegeln.

Probenvorbereitung

Die Probenvorbereitung in der Speziesanalytik sollte unter denselben Gesichtspunkten vorgenommen werden wie in der konventionellen Analytik. Jede Kontamination, auch wenn sie nicht den Analyten und seine Spezies direkt betrifft, könnte zu einer Verschiebung der vorherrschenden Gleichgewichte führen und so die physikalischen und/oder chemischen Ausgangsbedingungen der nativen Spezies verändern. So sollte man den Kontakt mit porösen oder metallhaltigen Werkstoffen vermeiden, weil diese wegen gesteigerter Reaktionsmöglichkeiten an den Oberflächen in die Speziesgleichgewichte eingreifen [19]. Derivatisierungsschritte sollte man nur durchführen, wenn es sich um nicht direkt detektierbare Spezies handelt. Auch auf die Konstanz von pH-Wert, Ionenstärke und Redoxbedingungen sollte geachtet werden, obwohl dies in der Praxis schwer durchführbar ist.

Isolierung der Spezies

Für die meisten in der Speziesanalytik angewendeten Verfahren sind eine Abtrennung der Matrix sowie eine Separierung der Spezies notwendig. Auch hier kommt es zu einem Eingriff in die Gleichgewichte des Systems und zu möglicher Artefaktbildung [20]. Bei den komplexen Matrizes der ESA ergeben sich zudem Probleme bei der Isolierung der Komponenten. Im Idealfall sollten alle interessierenden Spezies vollständig, zumindest aber reproduzierbar abgetrennt werden, um Fehlinterpretationen und Verschiebungen der Speziesverteilungen zu vermeiden.

Empfindliche Bestimmungen

Häufig liegt bereits der Gesamtgehalt der Analyten in Umweltmatrizes im Spuren- oder Ultraspurenbereich. Diese geringe Gesamtmenge an Analyt teilt sich für die Speziesanalytik

nochmals in mehrere Einzelspezies oder Fraktionen auf, sodass eine extrem empfindliche Detektion notwendig ist. Häufig stellt auch eine Spezies die Hauptfraktion, während die übrigen teilweise sehr geringe Bruchteile der Gesamtmenge beinhalten. Oft bietet sich zur Untersuchung eines analytischen Problems nur eine einzige Methode, die die entsprechenden Empfindlichkeiten bieten kann, an. Dadurch werden die Beurteilung und Validierung der Messergebnisse sehr erschwert.

Zertifizierte Referenzmaterialien

Neben dem Vergleich mit unabhängigen Methoden kann zur Validierung von Analysemethoden auch die Messung von Referenzmaterialien eingesetzt werden. Leider kann man im Fall der Speziesanalytik nur in sehr wenigen Bereichen auf Referenzmaterialien zurückgreifen. Zudem beschränken sich diese auf bereits gut untersuchte Anwendungsfälle (z. B. Organozinn-Verbindungen in Sedimentproben, Methylquecksilber in Hummer- und Fischgewebe). Die Herstellung solcher Referenzmaterialien ist aus genannten Gründen schwierig bzw. meist unmöglich [21]. Eine Möglichkeit diese bestehende Lücke zu schließen, wäre die Durchführung von Ringversuchen, was jedoch wiederum voraussetzt, dass die bestehende Problematik bereits häufiger bearbeitet wurde; dies ist jedoch bei der Speziesanalyse aufgrund der Mannigfaltigkeit der möglichen Fragestellungen selten gegeben.

Standardmaterialien

Ähnliche Probleme wie bei den Referenzmaterialien treten bei den Standardmaterialien bzw. -lösungen auf. Man benötigt sie bei der Verwendung von elementspezifischen Detektoren mit denen man nur Elementkonzentrationen bestimmt. Da während des Analysevorganges die Speziesinformation der Probe komplett verloren geht, muss die Zuordnung der Spezies dann über einen Abgleich z. B. der Retentionszeiten mit Vergleichssubstanzen vorgenommen werden. Es ist vor allem bei Realproben nicht auszuschließen, dass es zu Zuordnungsfehlern kommen kann. Allerdings sind auch solche Standards kommerziell nur in Ausnahmefällen erhältlich, und ihre Synthese gestaltet sich meist als kompliziert oder teilweise nicht durchführbar, wie dies z. B. bis heute bei $(\text{CH}_3)_2\text{Sb}(\text{OH})_3$ der Fall ist. [6, 12].

Aus diesen Ausführungen sieht man, dass generell darauf hingearbeitet werden sollte, einfache Bedingungen für die Probenvorbereitung sowie für Trennung und Detektion von Spezies anzuwenden [22, 23].

2.4 Methoden der Speziesanalytik

Wie bereits dargestellt, erfordert die Speziesanalyse einerseits einen möglichst geringen Eingriff durch die Probenahme, Probenaufarbeitung und Messung in die Gleichgewichte, denen die Spezies unterliegen, andererseits ist aber zur Zeit die Verwendung von lediglich element-, nicht aber speziesspezifischen Detektoren notwendig, da die untersuchten Stoffe oft nur in sehr geringen Konzentration auftreten.

Die Speziesanalytik als Teilgebiet der Analytischen Chemie beschäftigt sich mit der Untersuchung definierter Spezies, Formen und Phasen eines Materials. In der Regel lässt sich eine speziesanalytische Methode in einen Trennschritt und einen Detektionsschritt einteilen.

Prinzipiell unterscheidet man in der Speziesanalytik drei methodische Gruppen:

Direkte Methoden

Hier erfolgt die Bestimmung der Speziesinformation ohne vorgeschaltete Trennung und damit praktisch ohne Eingriff in die Gleichgewichtsprozesse innerhalb der Probe. Daher sind sie eigentlich ideal für die Speziesanalytik. Zu den direkten, speziessensitiven Methoden gehören Kernresonanzspektroskopie (NMR), Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie (FT-IR) und Röntgenmethoden, mit denen nicht nur elementspezifisch quantifiziert, sondern auch die chemische Umgebung analysiert werden kann. Allerdings haben die meisten direkten Methoden den Nachteil, nicht empfindlich genug zu sein, um für die Untersuchung von Realproben im Spuren- oder Ultraspurenbereich eingesetzt werden zu können. Sie sind daher nur begrenzt auf die Speziesanalytik anwendbar.

Kopplungstechniken

Seit geraumer Zeit bilden Kopplungstechniken einen großen Bereich innerhalb der Speziesanalytik, weil im Regelfall der analytische Prozess zur Speziesbestimmung eine Trennphase und eine Detektionsphase beinhaltet. Dabei sind offline-Kopplungen, bei denen die einzelnen Fraktionen gesammelt und in einem separaten Schritt detektiert werden, und Online-Kopplungen, bei denen Trennung und Detektion innerhalb eines Prozesses in einem geschlossenen System durchgeführt werden, zu unterscheiden. Für die Trennungsphase kommen neben chromatographischen Verfahren, wie z. B. Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC), Gaschromatographie (GC) und Ionenchromatographie (IC), Kapillarelektrophorese (CE) und auch elektrochemische Verfahren, wie z. B. Polarographie, zum Einsatz. Für die Detektion wiederum sind dies

elementspezifische Methoden wie ICP-MS, ICP-AES oder AAS. Die Techniken wurden in der vorliegenden Arbeit eingesetzt.

Theoretische Methoden

Mit Hilfe von thermodynamischen Gleichgewichtskonstanten, Aktivitätskoeffizienten und weiteren Parametern werden bei den theoretischen Methoden die Speziesverteilungen realer Proben im Computermodell simuliert. Im Idealfall kann so das Verhalten bestimmter Metalle vorhergesagt werden, ohne dass die Aufnahme von Messwerten notwendig ist. Ein zusätzlicher Vorteil ist, dass auch labile Komplexe und Spezies bei den Berechnungen berücksichtigt werden können. Besondere Bedeutung kommt den theoretischen Methoden in der Bodenkunde und der Pflanzenphysiologie zu. Man versucht dadurch Vorhersagen über die Bioverfügbarkeit von Metallionen zu treffen. Jedoch sollte man dabei nicht vergessen, dass die Matrices im Umweltbereich häufig sehr komplex sind und die notwendigen Parameter nicht in ausreichender Präzision zur Verfügung stehen bzw. für viele aktuell interessante Fälle überhaupt nicht vorhanden sind [6].

3 Grundlagen zur Chromatographie

Unter Chromatographie versteht man physikalisch-chemische Trennmethode, bei denen die Trennung von Stoffgemischen darauf beruht, dass sich zwischen einer stationären und einer mobilen Phase wiederholt Verteilungsgleichgewichte einstellen.

Die chromatographischen Techniken können nach dem Aggregatzustand der beiden beteiligten Phasen eingeteilt werden, wie in der folgenden Tabelle zu sehen ist:

Tabelle 3-1: Überblick über die verschiedenen Arten der Chromatographie

Art der Chromatographie	Aufbau der mobilen Phase	Aufbau der stationären Phase
Gas-Liquid-Chromatography (GLC)	Gasförmig	flüssig
Gas-Solid-Chromatography (GSC)	Gasförmig	fest
Liquid-Liquid-Chromatography (LLC)	Flüssig	flüssig
Liquid-Solid-Chromatography (LSC)	Flüssig	fest

In der Praxis sind von diesen vier Techniken lediglich die GLC und die LSC bedeutsam. Sie sind üblicherweise gemeint, wenn von GC bzw. LC die Rede ist.

Eine weitere Unterscheidung chromatographischer Verfahren kann nach der Art der Ausführungstechnik erfolgen [24]: Planarchromatographie (Dünnschicht- bzw. Papierchromatographie) und Säulenchromatographie (GC, LC, ...). Bei der Planarchromatographie erhält man „innere Chromatogramme“, da auf der Trennstrecke detektiert wird. Bei der Säulenchromatographie spricht man von „äußeren Chromatogrammen“, da der Detektor nach der Säule von der mobilen Phase durchflossen wird. Innerhalb der Säulenchromatographie unterscheidet man noch nach der Versuchsausführung zwischen Frontal-, Verdrängungs- und Elutionschromatographie. Für analytische Zwecke ist lediglich die Elutionschromatographie relevant.

Des Weiteren kann nach dem Trennmechanismus unterschieden werden, z. B. Adsorptions-, Verteilungs-, Größenausschluss-, Ionenaustausch-Chromatographie.

Man bevorzugt die HPLC, seltener die GC, zur Speziesanalytik. Der Grund dafür ist in den meisten Fällen die Stabilität der Spezies. Viele sind nur bei niedriger Temperatur stabil und reagieren in der Gasphase zu Reaktionsprodukten von denen nicht immer auf die Originalspezies zurück geschlossen werden kann.

Die HPLC ist als Oberbegriff für zahlreiche moderne flüssigchromatographische Trennverfahren zu verstehen. Dabei zeichnet sie sich besonders durch ihr breites Anwendungsspektrum auf die verschiedensten Substanzklassen und ihre exzellente analytische Leistungsfähigkeit aus. Die HPLC, zu der man auch die Ionenchromatographie (IC) zählt, ist damit eine der wichtigsten Trennmethode in der modernen Analytik [25, 26]. Sie wird auch auf die Problemstellungen im Rahmen dieser Arbeit angewendet.

3.1 Trennmechanismen in der HPLC

Die HPLC lässt sich anhand der verschiedenen physikalisch-chemischen Wechselwirkungen zwischen den Substanzen in einer Probe und der stationären Phase differenzieren. Obwohl im Realfall meist mehrere Mechanismen für eine erfolgreiche Trennung verantwortlich sind, ist eine grobe Klassifizierung nach folgenden grundlegenden Trennmechanismen möglich:

- Adsorption
- Verteilung
- Größenausschluss
- Ionenpaarbildung
- Ionenausschluss
- Ionenaustausch
- Affinität

Diese Mechanismen werden nachfolgend näher beschrieben.

Adsorptionschromatographie

Die Adsorptionschromatographie ist definiert durch Grenzflächenreaktionen zwischen einem gasförmigen oder flüssigen Stoff (Adsorbat) und einem festen Stoff (Adsorbens), wobei als Folge dieser Reaktion eine Anreicherung des gelösten Stoffes an der Phasengrenzfläche eintritt [24].

Man unterscheidet bei der Adsorption zwischen der Physisorption und der Chemisorption. Bei der ersteren wirken nur schwache van-der-Waals-Kräfte zwischen der Oberfläche des Adsorbens und dem Adsorbat. Der Vorgang ist ausreichend schnell und reversibel. Bei der Chemisorption werden zusätzliche, meist kovalente Bindungen zwischen den beteiligten Stoffen aufgebaut. Dieser Vorgang verläuft zumeist irreversibel und kann daher für chromatographische Zwecke nicht eingesetzt werden. Deshalb ist, wenn von Adsorptionschromatographie die Rede ist, immer Physisorption gemeint.

In der Ausführung werden zwei Techniken unterschieden:

1. Bei der Normal-Phasen-Chromatographie dient als stationäre Phase ein relativ polares Material mit hoher spezifischer Oberfläche, meistens Kieselgel oder Aluminiumoxid. Als mobile Phase werden hier unpolare Lösungsmittel eingesetzt, die wasserfrei sein müssen. Dies bedeutet für die Praxis eine zusätzliche Fehlerquelle und einen erheblichen Kostenfaktor.
2. Bei der heute üblichen Reversed-Phase-Chromatographie werden eine unpolare stationäre Phase und eine polare mobile Phase verwendet. Die Umkehrung der Polarität der stationären Phase wird beispielsweise bei Kieselgelen durch Umsetzung der Hydroxy-Gruppen mit Verbindungen wie Dialkyldichlorsilanen erreicht. Auf diese Weise werden z. B. C18-Ketten kovalent an das Kieselgel gebunden. Als mobile Phase werden dann beispielsweise Methanol oder Acetonitril verwendet, bei denen normalerweise der Wassergehalt keinen entscheidenden Einfluss auf das chromatographische System hat.

Verteilungschromatographie

Die stationäre Phase in der Verteilungschromatographie ist eine mit der mobilen Phase nicht mischbare Flüssigkeit, die als Flüssigkeitsfilm auf der Oberfläche eines festen Trägermaterials haftet. Zwischen flüssiger stationärer und flüssiger mobiler Phase stellt sich für jeden Reinstoff ein Verteilungsgleichgewicht ein. Die unterschiedlichen Löslichkeiten der Analyten in beiden Phasen sind dabei für die Trennung verantwortlich. Dabei gilt im Idealfall das Nernst'sche Verteilungsgesetz [25]. Die Lage der Adsorptions- und Verteilungsgleichgewichte ist entscheidend für den Verlauf chromatographischer Trennungen.

In der Gaschromatographie spielt dieser Trennmechanismus eine bedeutende Rolle, wenn mit Trennflüssigkeiten beschichtete Kapillaren als stationäre Phasen verwendet werden. Bei der Verwendung von mit unpolaren Kohlenwasserstoffen modifizierten Silicagelen (Octadecyl-Phasen) als stationäre Phase kann in der HPLC auch die Verteilungschromatographie als Trennmechanismus vorliegen. Durch die Wahl der stationären Phase und durch die Art des Fließmittels lassen sich die Trennungen beeinflussen. Unter konstanten Bedingungen (gleiche stationäre Phase, gleiches Fließmittel, gleiche Temperatur) sind die Trennungen reproduzierbar.

Größenausschlusschromatographie

Bei dieser Methode, auch Size-Exclusion-Chromatographie (SEC) genannt, werden Probenmoleküle im Oligomer- und Polymerbereich aufgrund eines Siebeffektes nach der Molekülgröße getrennt. Das Besondere dieser Methode liegt darin, dass die Analyten theoretisch keinerlei physikalische oder chemische Wechselwirkungen mit der stationären Phase eingehen. Als stationäre Phasen kommen Silicagele oder organische Polymerharze mit definierten Porenstrukturen und Porengrößenverteilungen zum Einsatz. Ist der Porendurchmesser für das jeweilige Molekül zu klein, so kann es nicht eindringen und wird mit der mobilen Phase weiter transportiert. Kleinere Analyten können in die Poren hinein diffundieren und werden dadurch retardiert. Die Eluentmoleküle sollten den gesamten Porenbereich durchdringen können. Da sämtliche Probenmoleküle vor der Totzeit eluieren, muss die Trennsäule genügend lang und die Flussrate genügend niedrig gewählt werden, um eine Trennung der Komponenten zu erlauben. Anwendungsschwerpunkte der SEC sind die Polymer- und Bioanalytik.

Diejenigen Moleküle, die beim chromatographischen Prozess aufgrund ihrer geringen Größe in Poren des Austauschermaterials eindringen können, werden nicht in Fließrichtung weiter transportiert, solange sie sich innerhalb dieses Porenvolumens befinden. Kleine Moleküle, die leichter in diese Poren gelangen können als große, wandern also langsamer als große, welchen der Eintritt in die Poren erschwert ist. Hieraus wird klar, dass bei der SEC auch der Prozess der Diffusion eine Rolle spielt, allerdings wird der Trenneffekt hauptsächlich durch den sterischen Ausschluss bestimmt.

Ein Charakteristikum der SEC ist, dass der Kapazitätsfaktor k' (siehe S. 25) bei der SEC immer negativ ist, während er bei anderen chromatographischen Methoden stets positive

Werte annimmt. Dies liegt daran, dass die Elution der untersuchten Makromoleküle jeweils vor dem Gesamtpermeationsvolumen V_t , welches sich aus dem Gesamtporenvolumen und dem Zwischenraumvolumen zusammensetzt, erfolgt. Voraussetzung dafür ist natürlich das bereits oben angedeutete Fehlen von Wechselwirkungen zwischen Analyt und Austauschermaterial. Die SEC-Separation findet zwischen V_o und V_t , also innerhalb eines Säulenvolumens statt, während dafür in der HPLC mehrere Säulenvolumina benötigt werden. Daraus resultiert auch die Tatsache, dass bei der SEC oftmals keine basisliniengetrennten Signale auftreten, wie dies bei den sonstigen Anwendungen der LC meist der Fall ist. Die Auflösung ist im allgemeinen geringer als bei anderen säulenchromatographischen Verfahren. Darüber hinaus zeigt die SEC nur eine geringe Temperaturabhängigkeit; letztere kann lediglich einen Einfluss über die Viskosität des Eluenten erlangen. Dies liegt daran, dass die Verteilung des Analyten zwischen mobiler und stationärer Phase entropiekontrolliert erfolgt und die Enthalpie vernachlässigt werden kann. Dies führt zu folgender Gleichgewichtskonstante:

$$K_{SEC} \cong e^{AS^\circ / R} \quad \text{Gleichung 3-1}$$

AS° in $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$
 R in $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$

In dieser ist der Temperaturterm aus der klassischen Flüssigkeitschromatographie nicht enthalten

$$K_{LC} \cong e^{-AH^\circ / RT} \quad \text{Gleichung 3-2}$$

AH° in $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$
 T in K

In der letzteren Methode beruht die Trennung auf Phänomenen wie Verteilung, Adsorption und Ionenaustausch; all diese sind von energetischer Natur, da dabei intermolekulare Kräfte zwischen der stationären und mobilen Phase eine Rolle spielen, was bei der SEC nicht der Fall ist. In der LC wird also die Entropie vernachlässigt [27].

Die mobile Phase hat die Aufgabe eines Lösungsmittels und soll so gewählt werden, dass keine Adsorption der Analyten an der stationären Phase erfolgt. So werden z. B. wässrige Eluenten zur Analytik von polaren Proben verwendet, bei unpolaren Proben kommen auch unpolare Lösungsmittel wie z. B. Tetrahydrofuran, zum Einsatz. Zur Charakterisierung

unbekannter Probengemische muss zunächst die Trennsäule mit einem Testgemisch, bestehend aus Substanzen mit genau bekanntem Molekulargewicht, kalibriert werden. Die so für die jeweiligen Molekülmassen der Testsubstanzen erhaltenen Elutionsvolumina (V_e) dienen als Referenz zur Bestimmung der Molekülmassenverteilung der Probe. Die Kalibration sollte günstigstenfalls mit denselben Molekülen durchgeführt werden, wie sie auch in der Probe zu erwarten sind, da das Elutionsvolumen der Größe des Moleküls und nicht seiner Masse entspricht. Selbstverständlich muss bei der Kalibration und der Messung der Proben mit demselben Lösungsmittel gearbeitet werden, da ein und dasselbe Molekül in verschiedenen Lösungsmitteln in seiner Größe differieren und damit unterschiedlich schnell eluiert werden kann.

Der apparative Aufbau für die SEC ist der gleiche wie bei der klassischen HPLC. Auch zur Detektion können alle hier verwendeten Detektoren zum Einsatz kommen (siehe **Kapitel 4**).

Die Größenausschlusschromatographie kann auch zur Charakterisierung von Packungsmaterialien verwendet werden. Invers ist hierbei lediglich die Fragestellung und die Art der Durchführung: Es wird hier nicht eine kalibrierte Säule verwendet, um unbekannte Stoffgemische zu vermessen, sondern die Porenstruktur unbekannter Säulenmaterialien soll über Chromatogramme von Substanzgemischen bekannter Größenverteilung aufgeklärt werden [28].

In der vorliegenden Arbeit wurde diese Methode zusammen mit der Ionenchromatographie angewendet.

Ionenpaarchromatographie

Die Ionenpaarchromatographie (ion pair chromatography, IPC) ist die universellste Methode zur Trennung von Ionen. Mit Hilfe der IPC können die gleichen Analyten getrennt werden wie mit der IC, wobei ein völlig anderer Trennmechanismus vorliegt. Man kann mit ihr im Prinzip alle Ionen trennen, da selektive Gegenionen und Modifier eingesetzt werden können [29]. Aufgrund dieser vielen veränderbaren Parameter ist es allerdings sehr aufwendig, eine optimierte, praxistaugliche Methode zu entwickeln. Als Trennsäulen werden die aus der Verteilungschromatographie bekannten, unpolaren Reversed-Phase-Säulen verwendet (vergl. *Adsorptionschromatographie*, S. 14). Weil dadurch nur unpolare Wechselwirkungen möglich sind, wird den Eluenten ein so genanntes Ionenpaarreagenz zugefügt. Chemisch gesehen sind

dies im Allgemeinen anionische oder kationische Tenside, z. B. Tetraalkylammonium-Salze oder n-Alkylsulfonsäuren. Diese Reagenzien können mit den Analytionen, die die entgegengesetzte Ladung tragen müssen, ein ungeladenes Ionenpaar bilden, welches dann an der stationären Phase durch hydrophobe Wechselwirkungen adsorbiert werden kann. Eine Stofftrennung erfolgt aufgrund der unterschiedlichen Bildungskonstanten der Ionenpaare und ihrer unterschiedlich starken Adsorption.

Über die genauen Trennmechanismen der Ionenpaarchromatographie gibt es zwei Modellvorstellungen, die in der Literatur diskutiert werden [30]:

1. Dem Analytion wird im Eluenten ein Gegenion angeboten, mit dem es sich zu einem Ionenpaar zusammenschließt. Durch Zusatz eines organischen Modifiers zum Eluenten wird die Dissoziation zurückgedrängt. Das entstandene Ionenpaar hat seinen ionischen Charakter verloren und kann als Neutralteilchen analog der Reversed-Phase-HPLC behandelt werden.
2. Die angebotenen Gegenionen lagern sich an der Oberfläche des Packungsmaterials der Trennsäule an und bilden dort in situ einen Ionenaustauscher. Es können die Retentionsmodelle der Ionenaustauschchromatographie, wie das statistische Ionenaustauschmodell (siehe **Abbildung 3-1**), angewendet werden.

Die Gegenionen für die Anionen können NH_4^+ , NR_4^+ , Phosphoniumsalze und für die Kationen R-SO_3^- , $\text{C}_n\text{F}_{2n+1}\text{COO}^-$, ROSO_3^- sein.

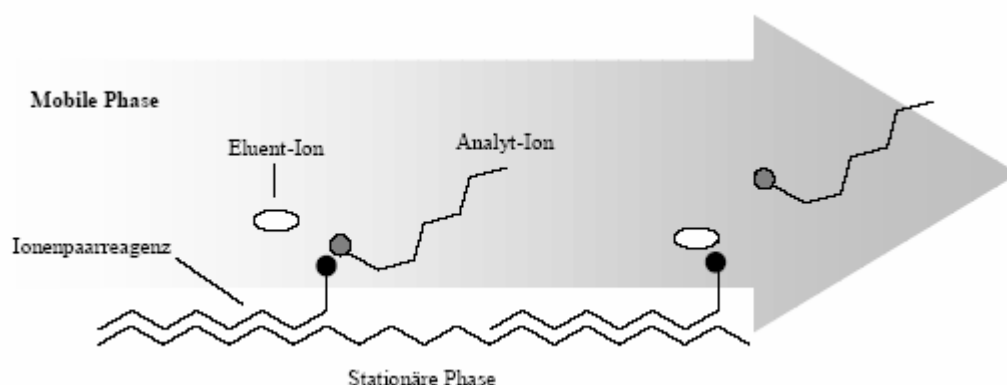


Abbildung 3-1: Schematische Darstellung des statistischen Ionenaustausch-Modells in der IPC [25]. Das Trennprinzip gilt sowohl für Anionen als auch für Kationen.

Allgemein gilt, dass für kleine Analytionen große Gegenionen zu wählen sind und umgekehrt, um genügende, aber nicht zu lange Retentionszeiten zu bekommen. Der Hauptgrund ist jedoch die Stabilität der gebildeten Ionenpaare. Die **Abbildung 3-1** zeigt vereinfacht das statistische Ionenaustausch-Modell.

Ionenausschlusschromatographie

Die Ionenausschlusschromatographie (ion exclusion chromatography, IEC) dient vor allem zur Trennung von schwachen Säuren oder Basen [29, 30]. Den größten Stellenwert besitzt die IEC bei der Analytik von schwachen Säuren wie Carbonsäuren, Aminosäuren, Phenolen oder Kohlenhydraten. Die **Abbildung 3-2** zeigt das Trennprinzip der IEC am Beispiel einer Carbonsäure R-COOH.

Das Packungsmaterial für die Ionenausschlusschromatographie besteht in der Regel aus einem makroporösen, vollständig oberflächensulfonierten Polymer, welches daher einen stark sauren Kationenaustauscher mit hoher Kapazität darstellt [29], aber auch von Materialien mit quartären Ammoniumgruppen wird berichtet [31]. Die dissoziierten Sulfonsäuregruppen bilden eine negative Ladungsschicht (Donnan-Schicht oder Donnan-Membran), welche Anionen aus der umgebenden Lösung abstößt. Kationen können ebenfalls nicht eindringen, da sonst Ladungen getrennt würden. Die Donnan-Membran kann daher nur von undissoziierten Verbindungen überwunden werden, die dann an der stationären Phase adsorbiert werden.

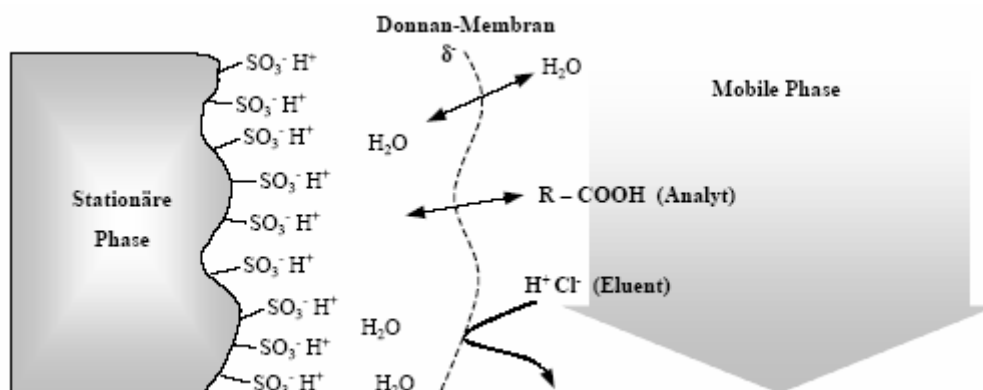


Abbildung 3-2: Der Donnan-Ausschluss als Trennprinzip in der Ionenausschlusschromatographie (IEC) [25].

Organische Carbonsäuren können getrennt werden, indem man starke Mineralsäuren als Laufmittel verwendet.

Aufgrund der niedrigen Säurekonstanten (pK_s -Werte) der Carbonsäuren liegen diese in stark sauren Eluenten nahezu vollständig undissoziiert vor. Sie können somit die Donnan-Membran durchqueren und an der stationären Phase adsorbieren, während die Chlorid-Ionen der vollständig dissoziierten Salzsäure ausgeschlossen werden. Die Trennung der Carbonsäuren ist letztendlich auf ihre unterschiedlichen pK_s -Werte zurückzuführen. Unter genau entgegengesetzten Bedingungen erfolgt die Trennung schwacher Basen. Hierbei wird ein stark basischer Anionenaustauscher mit Alkalilaugen als Eluenten eingesetzt. In der Praxis spielt die IEC bei der Trennung von schwachen Basen eine untergeordnete Rolle.

Ionenaustauschchromatographie

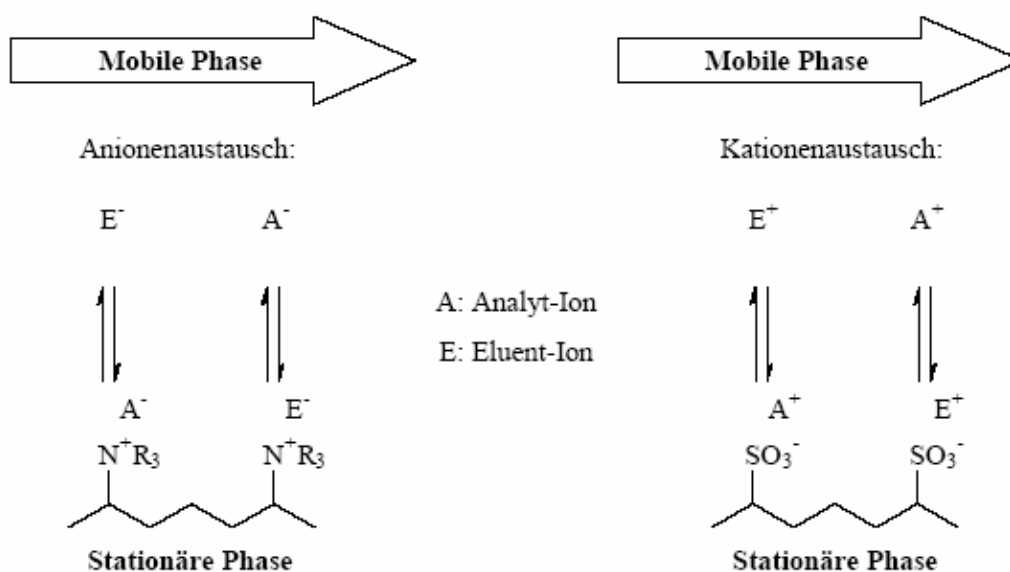
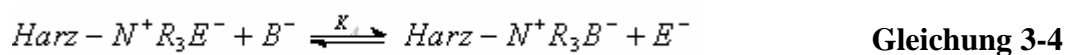
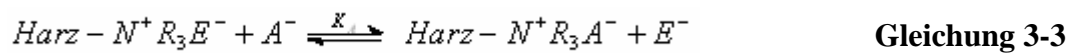


Abbildung 3-3: Schematische Darstellung des Ionenaustauschprozesses in der Ionenchromatographie [25]. Links: Anionenaustausch, rechts Kationenaustausch.

Die stationäre Phase der Ionenaustauschchromatographie (ion exchange chromatography, IC) besteht aus auf einem Grundgerüst fixierten Austauschgruppen für die zu trennenden Ionen. Bei der Anionenchromatographie stellen diese funktionellen Gruppen meist stark basische, quartäre Ammoniumgruppen mit unterschiedlichen organischen Resten dar, bei der Kationenchromatographie finden fast ausschließlich stark saure Sulfonsäuregruppen oder schwach saure Carbonsäuregruppen Verwendung. Das Besondere an diesem Trennmechanismus ist das Vorliegen einer definierten chemischen, stöchiometrischen Reaktion zwischen Ionen in einer Lösung und einem üblicherweise festen Stoff, der die funktionellen Gruppen trägt und Ionen aufgrund elektrostatischer Kräfte fixieren kann.

(**Abbildung 3-3**). Ionen gleichsinniger Ladung können theoretisch völlig reversibel zwischen beiden Phasen ausgetauscht werden. **Abbildung 3-3** zeigt schematisch die Austauschvorgänge für Anionen und Kationen.

Der Prozess des Ionenaustausches führt zu einem Gleichgewichtszustand, im Prinzip nur mit dem Eluent. Betrachtet man die gleichionische Verdrängung, so findet sich aufgrund der Elektroneutralitätsbedingung immer ein entgegengesetzt geladenes Gegen-Ion in der Nähe der funktionellen Gruppe. Das Gegen-Ion stammt aus dem Laufmittel und wird deshalb auch als Elution bezeichnet. Bei der Aufgabe von zwei Analytionen A^- und B^- auf die Säule verdrängen diese kurzzeitig das Elution, bevor sie wiederum durch Elutionen ausgetauscht werden. Für z. B. die Anionchromatographie ergeben sich folgende Gleichgewichte:



Durch die unterschiedlichen Affinitäten von A^- und B^- zu den funktionellen Gruppen des Austauschers ist eine Trennung der Komponenten möglich, da eine höhere Affinität zur stationären Phase eine stärkere Retardierung mit sich bringt. Die Gleichgewichtskonstante K wird in der Chromatographie als Selektivitätskoeffizient bezeichnet und berechnet sich für das Anion A^- wie folgt:

$$K_A = \frac{C_{\text{Harz}-N^+R_3A^-} \cdot C_{E^-}}{C_{\text{Harz}-N^+R_3E^-} \cdot C_{A^-}} = \frac{C_{A_S^-} \cdot C_{E_M^-}}{C_{E_S^-} \cdot C_{A_M^-}} \quad \text{Gleichung 3-5}$$

Dabei ist K_A keine thermodynamische Gleichgewichtskonstante, sondern ein Gleichgewichtskoeffizient, welcher von experimentellen Bedingungen abhängt und nur für verdünnte wässrige Lösungen konstant ist. Dies ist auf die Unbestimmtheit der Aktivitätskoeffizienten der einzelnen Komponenten in der Matrix des Ionenaustauschers zurückzuführen.

Da die Zeit, welche die Probe in der Säule verbringt, in der Regel nicht reicht für eine Gleichgewichtseinstellung, wird auch ein Ungleichgewichtsprozess betrachtet. Das ist einer der Gründe für die Ungenauigkeit der Modelle.

Dieser Ionenaustauschprozess zwischen mobiler und stationärer Phase wird in **Kapitel 3.4.1** ausführlicher erläutert.

Diese Technik wird in der vorliegenden Arbeit am meisten verwendet.

Affinitätschromatographie

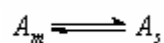
Hier ist eine hochspezifische und selektive biochemische Wechselwirkung die Ursache der Trennung. Solche Wechselwirkungen spielen sich zwischen Enzymen und ihren Substraten und zwischen Antikörpern und Antigenen (Schlüssel-Schloss-Prinzip) ab. Bei der Affinitätschromatographie ist ein Reaktionspartner am Trägermaterial der stationären Phase immobilisiert, der andere befindet sich als Analyt in der mobilen Phase. In der Praxis werden z. B. Enzyme oder Antikörper auf einer stationären Phase chemisch immobilisiert. Befindet sich nun ein entsprechendes Substrat oder Antigen in der Probe, so wird dieses mit extremer Selektivität retardiert. Mit ihrer Hilfe lassen sich Proteine und Lipide in komplexen Mischungen nachweisen. Aus diesem Grund ist die Affinitätschromatographie im Bereich der Wirkstoffanalytik (Pharmakologie) ein unverzichtbares Verfahren [24].

3.2 Größen zur Beurteilung der Güte von Trennvorgängen

Retentionsparameter

Betrachtet man ein Stoffgemisch und unterwirft dieses einer chromatographischen Trennung, so wird sich für jede Komponente ein Verteilungsgleichgewicht zwischen mobiler und stationärer Phase ausbilden [32].

Für eine Komponente A gilt:



Gleichung 3-6

Eine Stofftrennung ist nur dann erfolgreich, wenn sich die Verteilungskoeffizienten D der Komponenten ausreichend voneinander unterscheiden. Dieser Koeffizient ist definiert als das Verhältnis der Konzentrationen eines Stoffes A in der stationären (Index S) und der mobilen Phase (Index M):

$$D_A = \frac{C_{A_s}}{C_{A_m}}$$

Gleichung 3-7

Dementsprechend werden Stoffe mit einem hohen Verteilungskoeffizienten D stärker zurückgehalten als solche mit einem kleinen D .

Eine Trennung wird dann zeitaufgelöst in Form eines Chromatogramms dargestellt, bei dem das Detektorsignal als Funktion des Ausflussvolumens oder der Zeit dargestellt wird. Die Zeit, die von der Injektion einer Komponente bis zur Elution ihres Peakmaximums vergeht, bezeichnet man als Bruttoretentionszeit t_{ms} . Sie setzt sich zusammen aus der Durchflusszeit der mobilen Phase t_m , auch Totzeit genannt, und der Nettoretentionszeit t_s , welche der tatsächlichen Aufenthaltsdauer der Komponente an bzw. in der stationären Phase entspricht. Die Nettoretentionszeit lässt sich wie folgt berechnen:

$$t_s = t_{ms} - t_m$$

Gleichung 3-8

Aufgrund von Kanalbildungen, Diffusionsprozessen oder Unregelmäßigkeiten in der Gleichgewichtseinstellung zwischen mobiler und stationärer Phase können einige Teilchen die stationäre Phase aber langsamer oder schneller passieren als nach der Nettoretentionszeit t_s zu erwarten wäre [25]. Ein Chromatogramm besteht daher nicht aus unendlich schmalen Signalen, sondern im Idealfall aus glockenförmigen Kurven (Peaks), die eine Gaußverteilung repräsentieren (**Abbildung 3-4**).

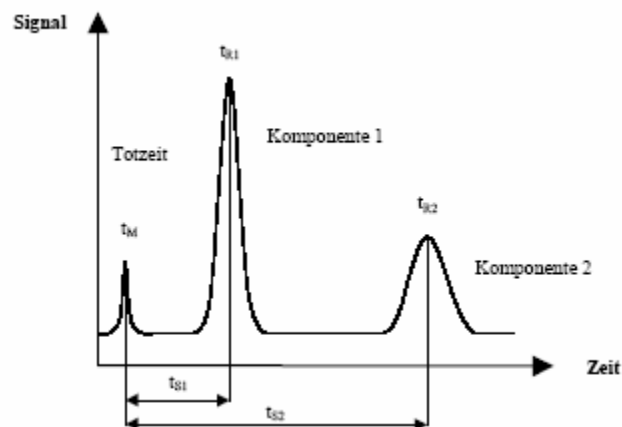


Abbildung 3-4: Idealisiertes Chromatogramm eines Zweikomponentengemisches [25].

Die Breite bei halber Höhe wird als Halbwertsbreite $w_{0,5}$ bezeichnet und entspricht der 2,354-fachen Varianz σ der Verteilung. Die Basisbreite w ist definiert durch die Differenz der Schnittpunkte der Wendetangenten mit der Abszisse, gleichbedeutend der 4-fachen Varianz. Beide Größen sind ein Maß für die Güte einer chromatographischen Trennung und können bei

idealer Peakform zur Berechnung von Trenn- und Retentionsparametern herangezogen werden.

Retentionsfaktor

Die Totzeit ist die kürzeste Zeit, in der eine Probekomponente aus einem Phasensystem eluiert werden kann. Um die Größen t_m und t_s einer Komponente unabhängig von den Säulendimensionen und der Flussrate der mobilen Phase darstellen zu können, wurde eine dimensionslose Verhältniszahl, der Kapazitätsfaktor k' wie folgt definiert:

$$k' = \frac{t_s}{t_m} \quad \text{Gleichung 3-9}$$

Durch die Normierung der Nettoretentionszeit auf die Totzeit lassen sich verschiedene Trennsysteme besser miteinander vergleichen.

Definiert man über die lineare Wanderungsgeschwindigkeit einer Probekomponente und der linearen Strömungsgeschwindigkeit der mobilen Phase den Bruchteil der Analytmoleküle, die sich in der mobilen Phase aufhalten, so lässt sich der Kapazitätsfaktor auch als das Verhältnis der Anzahl der Analytmoleküle in der stationären Phase zu der Anzahl der Analytmoleküle in der mobilen Phase auffassen. Bindet man dann noch **Gleichung 3-7** ein, so ergibt sich folgender Ausdruck [30]:

$$k' = \frac{t_s}{t_m} = \frac{n_s}{n_m} = \frac{c_s}{c_m} \cdot \frac{V_s}{V_m} \quad \text{Gleichung 3-10}$$

t_s, t_m in Sek.

n_s, n_m in mol

c_s, c_m in $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$

V_s, V_m in L

Der Quotient V_s/V_m wird als Phasenvolumenverhältnis Φ bezeichnet, die Summe von V_s und V_m ist gleich dem Säuleninnenvolumen.

Selektivität

Der Selektivitätskoeffizient α ist das Verhältnis der Nettoretentionszeiten bzw. der Kapazitätsfaktoren der Signale zweier Komponenten A und B:

$$\alpha = \frac{t_{s_B}}{t_{s_A}} = \frac{k'_B}{k'_A}$$

Gleichung 3-11

Er gibt Auskunft darüber, inwieweit sich die Verteilungskoeffizienten D_B und D_A in dem verwendeten Phasensystem voneinander unterscheiden. Der Selektivitätskoeffizient hat aber nur eine eingeschränkte Aussagekraft, da in seine Berechnung nicht die Signalbreite eingeht. Bei gleichen Selektivitäten können die Signale trotz gleicher Entfernung ihrer Maxima je nach deren Breite mehr oder weniger stark überlappen.

Effizienz

Ein Maß für die Signalbreite ist die Effizienz einer Trennsäule, sie wird als theoretische Bodenzahl N angegeben. Die Bodenzahl lässt sich am einfachsten aus der Bruttoretentionszeit und der Halbwertsbreite eines Gauß-Signals, aber auch aus anderen Größen berechnen, wie in **Gleichung 3-12** gezeigt wird:

$$N = \left(\frac{t_{ms}}{\sigma} \right)^2 = 16 \cdot \left(\frac{t_{ms}}{w} \right)^2 = 5,54 \cdot \left(\frac{t_{ms}}{b_{0,5}} \right)^2$$

Gleichung 3-12

Die Zusammenhänge zwischen den Größen σ , w und $w_{0,5}$ gehen aus **Abbildung 3-6** hervor. Verwendet man anstatt der Bruttoretentionszeit in **Gleichung 3-12** die Nettoretentionszeit, so erhält man die effektive theoretische Bodenzahl N_{eff} .

Zeigen die Analytsignale deutliche Abweichungen von der idealen Gauß-Form, so ist eine modifizierte Gleichung zu verwenden. Diese stammt aus der Momentenmethode [33] und bezieht den auf in der S. 27 beschriebenen Tailingfaktor T mit ein:

$$N = 41,7 \cdot \frac{(t_{ms}/b_{0,1})^2}{T + 1,25}$$

Gleichung 3-13

Auf das zugehörige Trennstufenmodell wird auf in der S. 29 näher eingegangen.

Auflösung

Ziel einer chromatographischen Trennung ist die ausreichende Auflösung der gewünschten Analyten bei möglichst kurzen Analysenzeiten. Die Auflösung für zwei Analyte A und B wird wie folgt berechnet:

$$R = \frac{t_{ms_B} - t_{ms_A}}{\frac{1}{2}(w_A + w_B)} = \frac{2 \cdot \Delta t_{ms}}{w_A + w_B}$$

Gleichung 3-14

Sie hat eine deutlich größere Aussagekraft als die Selektivität, da bei ihr auch die Signalbreite berücksichtigt wird.

Die Auflösung kann verbessert werden, indem - durch Erhöhung der Effizienz - die Peakbasisbreiten bei konstanter Retentionszeit verringert werden oder die Selektivität bei gleich bleibender Peakbreite erhöht wird. Aus **Gleichung 3-14** kann folgender Zusammenhang zwischen den chromatographischen Größen α , k' , N und R abgeleitet werden:

$$R = \frac{1}{4} \cdot \frac{\alpha - 1}{\alpha} \cdot \frac{k'}{1 + k'} \cdot \sqrt{N}$$

Gleichung 3-15

Aus der **Gleichung 3-15** geht hervor, dass die Auflösung zweier benachbarter Peaks durch Vergrößerung der Selektivität einfacher verbessert werden kann, als durch die Verringerung der Peakbasisbreite. Dies ist der Fall, weil die Effizienz nur mit dem Betrag der Wurzel in die Gleichung eingeht. Um Trennungen in möglichst kurzen Analysenzeiten zu erzielen, wäre es allerdings zweckmäßiger, eine möglichst effiziente Trennsäule zu verwenden.

Peakasymmetrie

Die Form eines Peaks in einem Chromatogramm lässt sich im Idealfall durch eine Gauß-Kurve beschreiben. Diese Form ergibt sich aufgrund von Strömungs- und Diffusionsvorgängen, die das ursprünglich rechteckige Injektionssignal des aufgegebenen Substanzgemisches in axialer Richtung aufweiten. Aufgrund der beteiligten Diffusionsvorgänge werden die Peaks um so breiter (und flacher), desto länger sie auf der Trennstrecke verweilen.

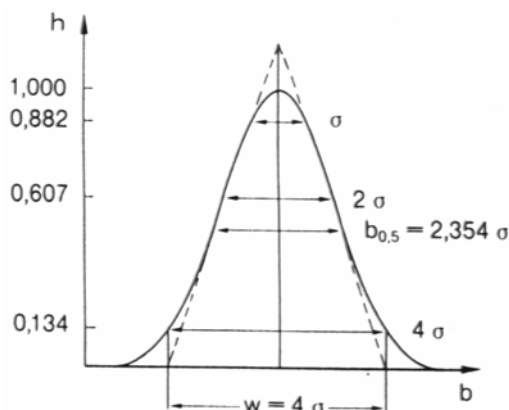
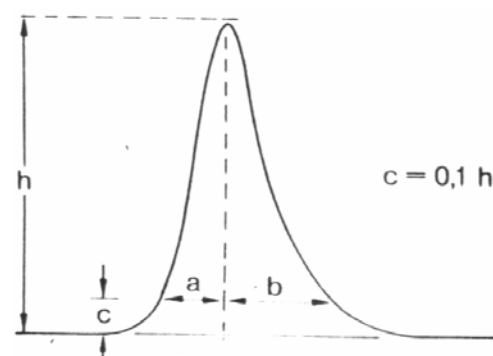
**Abbildung 3-6:** Ein Gauß-Signal [29]**Abbildung 3-5:** Der Tailingfaktor [29]

Abbildung 3-6 zeigt eine Gaußverteilung mit den zugehörigen Kenngrößen.

Abweichungen von der idealen Peakform lassen sich durch einen so genannten Symmetriefaktor T beschreiben. Er ist definiert als das Verhältnis der Strecken a und b zwischen der Mittelsenkrechten und den Flanken der Verteilung bei 10 % ihrer Höhe und berechnet sich zu

$$T = \frac{a}{b}$$

Gleichung 3-16

Für ideale Peaks ist $T = 1$ (vergl. **Abbildung 3-5**). Abweichungen nach oben werden als Tailing, nach unten als Fronting bezeichnet. In der Praxis strebt man Symmetriefaktoren von $T = 0,9$ bis $1,1$ an. Tailing, wie es in **Abbildung 3-5** gezeigt ist, bedeutet, dass die Substanz bei hohen Konzentrationen schneller über die Säule wandert, als bei niedrigen. Als Tailing bezeichnet man die Peakasymmetrie, bei der der Frontanstieg steiler ist als der Abfall des Peaks. Einmal hinter das Peakmaximum zurückgefallene Anteile können dieses nicht wieder einholen. Wenn die Elutionskraft schwächer als Adsorptionskraft ist, kommt es zu „Verschleppen“ der zu trennenden Substanz entlang der Trennstrecke. Als Fronting bezeichnet man Peaks deren Anstieg weniger steil als ihr Abfall ist. Es lässt sich im Allgemeinen darauf zurückführen, dass ein Teil der Analytmoleküle eine nicht mehr ausreichende Anzahl an geeigneten Adsorptionsplätzen vorfindet und dadurch das Peakmaximum überholt.

3.3 Theoretische Konzepte zur Beschreibung der Chromatographie

Es existieren drei grundsätzliche Theorien zur Beschreibung der Vorgänge, die bei der chromatographischen Trennung eine Rolle spielen: das Trennstufenmodell, die kinetische Theorie und die dynamische Theorie [34, 35]. Diese sollen im folgenden erläutert werden:

Die kinetische Theorie

Die kinetische Theorie ist mittlerweile ohne jede Bedeutung. Es wird das Verhalten einzelner Moleküle innerhalb des chromatographischen Systems hinsichtlich deren Wanderung in Richtung der mobilen Phase und des Überganges zwischen mobiler und stationärer Phase betrachtet. Befinden sich die Moleküle in der mobilen Phase, so haben alle die gleiche

Geschwindigkeit. Je nach Affinität einer Molekülart zur stationären Phase hat diese dort unterschiedlich lange Verweilzeiten.

Die chromatographische Trennung wird also als Kombination kinetischer Vorgänge (Adsorption, Verteilung, Desorption) betrachtet, wobei nicht vorausgesetzt wird, dass für jeden Teilprozess eine Gleichgewichtseinstellung stattfindet. Daher sind hier Abweichungen von der Gaußverteilung zulässig.

Das theoretische Trennstufenmodell

Beim Trennstufenmodell wird die Trennsäule - in Anlehnung an die Beschreibung von Destillationsprozessen - in diskrete Abschnitte (Böden bzw. Trennstufen) unterteilt, auf denen prinzipiell genau einmal eine völlig reversible und unendlich schnelle Gleichgewichtseinstellung zwischen mobiler und stationärer Phase erfolgt. Das Modell der theoretischen Trennstufen kann zur Erklärung des Auftretens gaußförmiger Signale herangezogen werden, wenn man zugrunde legt, dass es aufgrund von Strömungs- und Diffusionsprozessen nur zu einer endlich schnellen und unvollständigen Gleichgewichtseinstellung zwischen mobiler und stationärer Phase kommt. Die theoretische Trennstufenzahl N ist charakteristisch für eine Trennsäulen-Analyt-Kombination. Sie lässt sich aus den chromatographischen Daten (siehe S. 26) berechnen. Die Trennstufenhöhe H ist über die Säulenlänge mit der Trennstufenzahl N verknüpft bzw. lässt sich auch direkt über die Varianz und Säulenlänge berechnen:

$$H = \frac{L}{N} = \frac{\sigma^2}{L}$$

Gleichung 3-17

Das Trennstufenmodell ist jedoch nur ein formales Modell und der Schwachpunkt dieser Theorie ist vor allem, dass der Destillation und der Chromatographie zwei grundlegend verschiedene physikalisch-chemische Prozesse zugrunde liegen. Außerdem finden einige wichtige Parameter, die nicht die Art und Qualität der stationären Phase selbst betreffen, keine Beachtung, wie z. B. die Flussrate der mobilen Phase, der Partikeldurchmesser in der stationären Phase oder die Schichtdicke von Oberflächenfilmen auf dem Packungsmaterial. Daneben haben auch Größen wie die Diffusionskoeffizienten in den beiden Phasen oder die Temperatur einen großen Einfluss auf die Trennleistung.

Die dynamische Theorie

Die dynamische Theorie stellt eine Erweiterung des Trennstufenmodells dar. Gegenüber dem Trennstufenmodell werden diverse Faktoren berücksichtigt, wie z. B.

- Unregelmäßigkeiten in der Säulenpackung
- Querdiffusion und Stoffaustauschverzögerung durch Kanäle in der stationären Phase
- Longitudinaldiffusion unabhängig von der Geschwindigkeit der mobilen Phase
- Keine spontane und ungehemmte Einstellung von Gleichgewichten

Diese Effekte bewirken eine Erhöhung der Trennstufenhöhe und damit eine Signalverbreiterung. Es wurde folgender allgemeiner Ansatz gewählt (van-Deemter-Gleichgewicht):

$$H = A + \frac{1}{u} \cdot B + u \cdot C \quad \text{Gleichung 3-18}$$

Die drei Terme A, B und C hängen dabei in unterschiedlicher Weise von der Strömungsgeschwindigkeit u der mobilen Phase ab. Der Term A beschreibt die Streudiffusion, welche eine Ursache für die Bandenverbreiterung darstellt; dieser auch Packungsfaktor genannte Term ist von u zumindest in erster Näherung unabhängig. Der Term B beschreibt die Longitudinaldiffusion in oder entgegen der Strömungsrichtung der mobilen Phase. Er ist insbesondere in der Gaschromatographie von Bedeutung, da die Diffusionskoeffizienten von Gasen um 4 bis 5 Dekaden größer sind als die von Flüssigkeiten. Da die Bedeutung der Diffusion mit zunehmender Strömungsgeschwindigkeit abnimmt, ist B umgekehrt proportional zu u . Mit dem Term C wird der Massenübergang beschrieben. Der verzögerte Massentransfer zwischen mobiler und stationärer Phase hat zumeist den größten Anteil an der Bandenverbreiterung. Die Störungen in der Gleichgewichtseinstellung zwischen mobiler und stationärer Phase werden mit zunehmendem u größer, weshalb sich eine direkte Proportionalität ergibt.

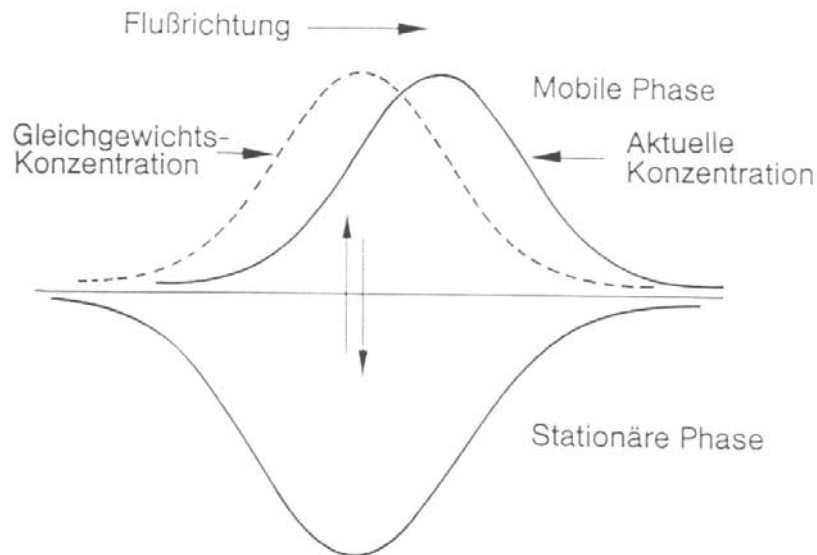


Abbildung 3-7: Stoffaustauschverzögerung beim Phasenübergang [29]

In der mobilen Phase gelöste Moleküle wandern ständig weiter, während die aus der stationären Phase zurückkehrenden Moleküle sich mit einer Verzögerung wieder einordnen. Diese Verzögerung ist nicht für jeden Phasenübergang identisch und führt zu einer Bandenverbreiterung, die mit der Zahl der Phasenübergänge und der Strömungsgeschwindigkeit zunimmt. Dieser Vorgang ist schematisch in **Abbildung 3-7** dargestellt.

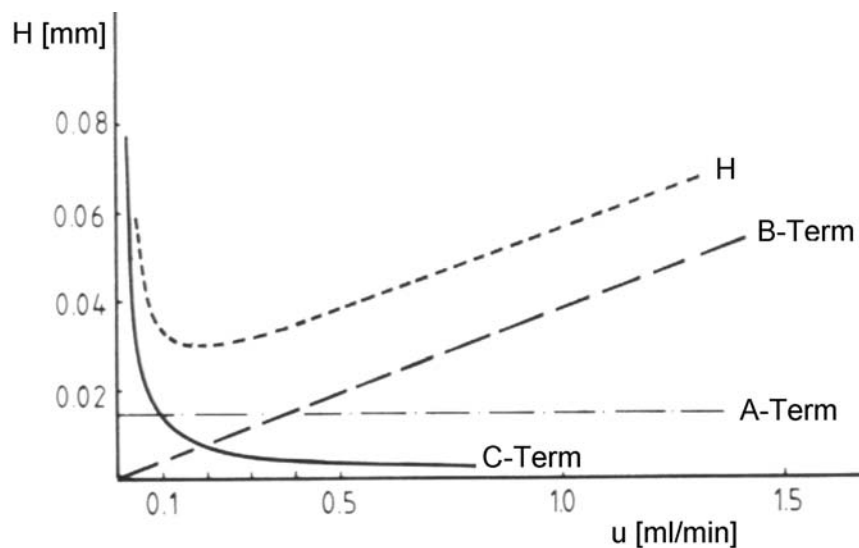


Abbildung 3-8: Graphische Darstellung der van-Deemter-Gleichung [36]

Die genannten Einflüsse werden in der van-Deemter-Gleichung (**Gleichung 3-18**) zusammengefasst. Trägt man die so berechnete Trennstufenhöhe gegen die Fließgeschwindigkeit auf, erhält man eine hyperbelartige Kurve. Ihr Minimum gibt die optimale Flussrate für das Trennsystem an (**Abbildung 3-8**).

In der Praxis werden meist höhere Flussraten verwendet (z. B. 1 ml/min), da der Verlust an Trennleistung tolerierbar und der Zeitgewinn deutlich ist.

3.4 Theorie zur Ionenaustauschchromatographie

3.4.1 Der Ionenaustauschprozess

Die stationäre Phase der Ionenaustauschchromatographie besteht aus einem Grundgerüst, an welches geladene funktionelle Gruppen gebunden sind. In der Nähe befinden sich die entsprechenden Gegenionen aus dem Eluenten. Wird ein Gegenion durch ein Analyt ion ausgetauscht, so wird dieses kurzzeitig an der Austauschfunktion zurückgehalten. Dieser Zeitraum hängt von der Affinität des Analyt ions zur funktionellen Gruppe ab. Da verschiedene Analyt ionen unterschiedliche Affinitäten zu diesen funktionellen Gruppen aufweisen, können so Substanzgemische aufgetrennt werden. Bei einem Kationenaustausch mit einer verdünnten Säure als Eluenten gilt für jeden einfach geladenen Analyt en A^+ folgendes Gleichgewicht [34]:



Die Indizes s und m gelten für stationäre und mobile Phase.

Das Gleichgewicht lässt sich unter Anwendung des Massenwirkungsgesetzes durch die thermodynamische Gleichgewichtskonstante $K_{A,H}$ beschreiben:

$$K_{A,H} = \frac{C_{A_s^+} C_{H_m^+} \gamma_{A_s^+} \gamma_{H_m^+}}{C_{A_m^+} C_{H_s^+} \gamma_{A_m^+} \gamma_{H_s^+}} \quad \text{Gleichung 3-20}$$

Im Austauscher sind keine Aktivitäten (wirksame oder effektive Konzentration von Atomen, Ionen und Molekülen in einer Lösung, $\gamma = f \cdot C$, wobei f ein dimensionsloser Korrekturfaktor ist) fassbar.

Diese können aber aufgrund der starken Verdünnung in guter Näherung gleich Eins gesetzt werden.

Die Konzentrationen in **Gleichung 3-20** lassen sich in einem Batch-Versuch ermitteln. Dazu wird eine bekannte Menge Austauschermaterial mit einer Lösung ins Gleichgewicht gebracht, die bekannte Konzentrationen an H^+ und A^+ enthält. Nach der Gleichgewichtseinstellung können die Konzentrationen in der stationären und mobilen Phase gemessen bzw. berechnet werden.

Für jedes Analyt (hier A^+) wird ein Verteilungskoeffizient D definiert:

$$D_A = \frac{C_{A^+_s}}{C_{A^+_m}} \quad \text{Gleichung 3-21}$$

Haben Gegenionen und Analytationen unterschiedliche hohe Ladungen, z. B. H^+ und C^{2+} , so muss dies berücksichtigt werden. Analog **Gleichung 3-19** und **Gleichung 3-20** gilt für ein zweifach geladenes Kation C^{2+} unter Vernachlässigung der Aktivitäten [34]:



$$K_{C,H} = \frac{C_{C^{2+}_s} \cdot (C_{H^+_m}^+)^2}{C_{C^{2+}_m} \cdot (C_{H^+_s}^+)^2} \quad \text{Gleichung 3-23}$$

Die Konstante $K_{C,H}$, auch Elektroselektivität genannt, ist von der Konzentration der Ionen in der mobilen Phase im Vergleich zur lokalen Konzentration der Austauschgruppen im Packungsmaterial abhängig. Ist die Konzentration der mobilen Phase höher, so werden gemäß des Prinzips des kleinsten Zwanges nach Le-Chatelier bevorzugt Teilchen mit geringerer Ladung am Austauschermaterial lokalisiert, da so die Gesamtkonzentration der Ionen in der mobilen Phase abnimmt. Bei einer verdünnten mobilen Phase werden entsprechend die höher geladenen Teilchen ausgetauscht. Dieses Phänomen kann bei entsprechend starker Variation der Eluentenkonzentration zu einer Selektivitätsumkehr einzelner Analytenpaare führen.

3.4.2 Retentionsmodelle in der Kationenchromatographie

Es wurden zahlreiche Retentionsmodelle entwickelt, um von den in **Kapitel 3.2** genannten makroskopischen Größen ($t_{m,s}$, k' , α , ...) Rückschlüsse auf die auf molekularer Ebene ablaufenden Vorgänge zu ermöglichen. Das Ziel solcher Modellvorstellungen ist es, die chromatographische Trennleistung für eine beliebige Trennsäulen / Eluenten - Kombination vorhersagen zu können.

Im einfachsten Fall wird das Modell der gleichionischen Verdrängung bei isokratischer Elution verwendet. Der Eluent enthält nur ein einziges Kation und die Anzahl der Austauschgruppen der Trennsäule wird durch die Kapazität Q definiert.

Der zugrunde liegende Ionenaustauschprozess wurde bereits im **Kapitel 3.4.1** vorgestellt, verallgemeinert wird hier für das Elution E^{y+} und für das Analyt A^{x+} geschrieben. Aus **Gleichung 3-19** und **Gleichung 3-20** folgt damit:



$$K_{A,E} = \frac{(C_{A_s^{x+}})^y \cdot (C_{E_m^{y+}})^x \gamma_{A_s^{x+}}^y \gamma_{E_m^{y+}}^x}{(C_{A_m^{x+}})^y \cdot (C_{E_s^{y+}})^x \gamma_{A_m^{x+}}^y \gamma_{E_s^{y+}}^x} \quad \text{Gleichung 3-25}$$

Aus den bereits erwähnten Gründen werden die Aktivitäten gleich Eins gesetzt. Um nun eine Verknüpfung des Massenwirkungsgesetzes mit apparativen und chromatographisch zugänglichen Größen zu erreichen, substituiert man die Konzentrationen des Analytens A^{x+} durch den Verteilungskoeffizienten D_A und den Retentionsfaktor k'_A :

$$D_A = \frac{C_{A_s^{x+}}}{C_{A_m^{x+}}} \quad \text{Gleichung 3-26}$$

$$k'_A = D_A \frac{V_s}{V_m} \quad \text{Gleichung 3-27}$$

Nach Umformen ergibt sich damit aus **Gleichung 3-25**:

$$K_{A,E} = \left(k'_A \frac{V_m}{V_s} \right)^y \left(\frac{C_{E_m^{y+}}}{C_{E_s^{y+}}} \right)^x \quad \text{Gleichung 3-28}$$

Da die Konzentration der Elutionen wesentlich höher ist als die der Analytione, kann man davon ausgehen, dass nahezu alle Austauschplätze der Trennsäule von Elutionen belegt sind. Die messtechnisch nicht erfassbare Eluentkonzentration in der stationären Phase kann somit gemäß **Gleichung 3-29** durch die Kapazität der Trennsäule ersetzt werden, daraus folgt dann **Gleichung 3-30**:

$$Q = y \cdot C_{E_s^{y+}} \quad \text{Gleichung 3-29}$$

$$K_{A,E} = \left(k'_A \frac{V_m}{V_s} \right)^y \left(\frac{Q}{y} \right)^{-x} \left(C_{E_m^{y+}} \right)^x \quad \text{Gleichung 3-30}$$

Löst man **Gleichung 3-30** nun nach dem Retentionsfaktor k'_A auf, so erhält man den für die Ionenchromatographie sehr wichtigen quantitativen Zusammenhang zwischen dem Retentionsfaktor und den experimentell bestimmten Parametern Austauschkapazität und Eluentkonzentration:

$$k'_A = \frac{V_s}{V_m} (K_{A,E})^{\frac{1}{y}} \left(\frac{Q}{y} \right)^{\frac{x}{y}} \left(C_{E_m^{y+}} \right)^{-\frac{x}{y}} \quad \text{Gleichung 3-31}$$

Aus Gründen der Übersichtlichkeit wird diese Gleichung meist in der logarithmierten Form verwendet:

$$\log k'_A = \frac{1}{y} \log K_{A,E} + \frac{x}{y} \log \frac{Q}{y} + \log \frac{V_s}{V_m} - \frac{x}{y} \log \left(C_{E_m^{y+}} \right) \quad \text{Gleichung 3-32}$$

Variiert man nun lediglich die Eluentkonzentration, um z. B. bei einer vorgegebenen Säule ein Trennproblem zu optimieren, so vereinfacht sich **Gleichung 3-32** erheblich, da für diesen Fall die ersten drei Terme zu einer Konstanten C zusammengefasst werden können:

$$\log k'_A = C - \frac{x}{y} \log \left(C_{E_m^{y+}} \right) \quad \text{Gleichung 3-33}$$

Die doppelt logarithmische Auftragung dieser Gleichung ergibt eine Gerade mit dem Achsenabschnitt C und der Steigung $-x/y$. Sie ist aber auf die Anwendung auf niederkapazitive Säulen und verdünnte Eluenten beschränkt, da die sonst anfangs gemachten Annahmen, z. B. bezüglich der Vernachlässigung der Aktivitäten, nicht zutreffen.

Wendet man dieses Retentionsmodell nun auf ein Trennproblem an, z. B. die Trennung der Kationen A^{x+} und B^{z+} , so kann auch für den Selektivitätskoeffizienten $\alpha_{A,B}$ über das Massenwirkungsgesetz ein mathematischer Zusammenhang hergeleitet werden. Das Analyt B konkurriert analog der bisherigen Ausführungen mit dem Elution E um die Austauschplätze, aber auch mit dem Analyt A. Auf diesen Vorgang kann entsprechend das Massenwirkungsgesetz angewendet werden:

$$K_{A,B} = \frac{\left(C_{A_s^{x+}}\right)^z \cdot \left(C_{B_m^{z+}}\right)^x}{\left(C_{A_m^{x+}}\right)^z \cdot \left(C_{B_s^{z+}}\right)^x} \quad \text{Gleichung 3-34}$$

Setzt man hier ebenfalls **Gleichung 3-7** und **Gleichung 3-10** ein, so erhält man für den Selektivitätskoeffizienten folgenden Ausdruck:

$$\alpha_{A,B} = \frac{k'_A}{k'_B} = \frac{C_{A_s^{x+}} \cdot C_{B_m^{z+}}}{C_{A_m^{x+}} \cdot C_{B_s^{z+}}} \quad \text{Gleichung 3-35}$$

Durch Umformen erhält man zwei Geradengleichungen für den logarithmierten Selektivitätskoeffizienten:

$$\log \alpha_{A,B} = \frac{1}{z} \log K_{A,B} + \frac{x-z}{z} \log \left(\frac{k'_B V_m}{V_s} \right) \quad \text{Gleichung 3-36}$$

$$\log \alpha_{A,B} = \frac{1}{x} \log K_{A,B} + \frac{x-z}{x} \log \left(\frac{k'_A V_m}{V_s} \right) \quad \text{Gleichung 3-37}$$

Tragen die beiden Analyten dieselbe Ladung ($x = z$), so entfällt der zweite Term der beiden Gleichungen und sie werden identisch:

$$\log \alpha_{A,B} = \frac{1}{x} \log K_{A,B} = \frac{1}{z} \log K_{A,B} \quad \text{Gleichung 3-38}$$

Laut dieser Gleichungen hängt die Selektivität für den Fall gleichgeladener Analyten A und B nur von der Gleichgewichtskonstanten $K_{A,B}$ und dem Betrag der Ladung x bzw. z ab. Bei unterschiedlich geladenen Analyten spielt zusätzlich noch das Phasenvolumenverhältnis eine Rolle und die beiden Retentionsfaktoren k'_A und k'_B sind nicht mehr unabhängig voneinander [30]. Eine Abhängigkeit der Selektivität von der Ladung und der Konzentration des

Eluents geht aus den Gleichungen nicht direkt hervor. Diese Unabhängigkeit gilt jedoch nicht für unterschiedlich geladene Ionen, da die Retentionsfaktoren zum einen wie bereits vorgeannt nicht unabhängig voneinander sind und zum anderen gemäß **Gleichung 3-33** ihrerseits eine ladungsabhängige Funktion der Eluentkonzentration sind. Berücksichtigt man dies, so steht das hergeleitete Retentionsmodell nicht im Widerspruch zu der in **Kapitel 3.4.1** beschriebenen Elektroselektivität.

3.5 Aufbau einer HPLC-Apparatur

Eine HPLC-Apparatur kann in vier Hauptkomponenten unterteilt werden: Pumpe, Injektor zur Probenaufnahme, Trennsäule und Detektor.

Die folgende Abbildung stellt den schematischen Aufbau eines Hochleistungsflüssigkeits-Chromatographen dar:

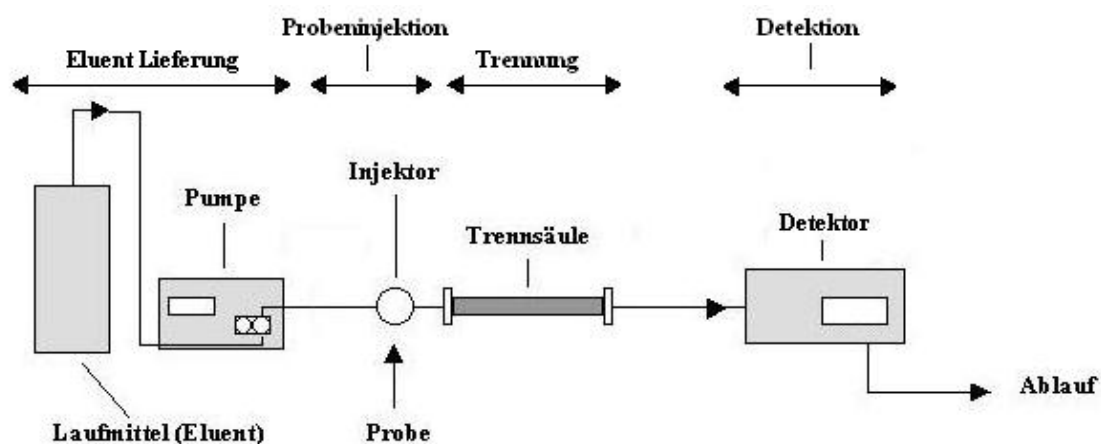


Abbildung 3-9: Prinzipieller Aufbau einer HPLC-Apparatur [30]

Im folgenden sollen die einzelnen Bestandteile kurz erläutert werden.

Die Pumpe

Durch die kleine Partikelgröße der stationären Phase entsteht ein erheblicher Staudruck, der von der Pumpe kompensiert werden muss. Dabei sollte die Pumpe die mobile Phase mit konstantem Druck und konstanter Strömungsgeschwindigkeit durch die stationäre Phase fördern. Aufgrund des hohen Staudruckes von üblicherweise 500 bis 2500 kPa kommen praktisch nur Kolbenpumpen in Frage, die trotz ausgeklügelter Kolbensteuerung immer eine

gewisse Restpulsation erzeugen. Daher wird in der Praxis noch ein Pulsationsdämpfer nachgeschaltet, um diese zu minimieren.

Das Injektionsventil

Das Probeneinlass-System hat die Aufgabe, die Probe in das unter hohem Druck stehende System zu bringen. Dieser Vorgang darf keine Druck- und Strömungsschwankungen hervorrufen. Eine Probenschleife bekannten Volumens wird mit Hilfe einer Spritze im drucklosen Zustand befüllt. Durch das Umstellen eines Mehrwegeventils wird die Probe dann in das System eingekoppelt und durch die mobile Phase in die Säule transportiert. Das Volumen der Probenschleife bewegt sich üblicherweise zwischen 10 µl und 500 µl.

Die Trennsäule

Der druckstabile Säulenkörper einer HPLC-Säule besteht aus Edelstahl oder Kunststoff. Die Art der jeweils verwendeten Packungsmaterialien wurde vorangehend bei der Beschreibung der einzelnen Trennmechanismen aufgeführt. Die idealerweise sphärischen Teilchen haben einen Durchmesser zwischen 5 und 25 µm mit einer möglichst engen Größenverteilung. Das Porenvolumen liegt im Allgemeinen zwischen 0,2 und 2 mL/g und die spezifische Oberfläche beträgt 50 bis 500 m²/g.

Der Detektor

Der Detektor soll erkennen, wann eine Substanzbande aus der Säule eluiert. Er muss die Änderung der Zusammensetzung der mobilen Phase feststellen können, diese Information in ein elektrisches Signal umwandeln und das Signal dem Integrator oder PC zur Verfügung stellen.

Folgende Eigenschaften sind bei Detektoren von besonderer Bedeutung:

1. Konzentrations- oder Massenflussabhängigkeit

Die konzentrationsabhängigen Detektoren erzeugen ein Signal, das proportional zur Konzentration eines Analyten im Eluat (die aus der Säule austretende, aufgetrennte Probe in der mobilen Phase) ist. Bei den massenabhängigen Detektoren besteht die Proportionalität zwischen dem Signal und dem Massenstrom (Anzahl der Probenmoleküle oder -Ionen pro Zeiteinheit).

2. Empfindlichkeit

Der Detektor sollte eine hohe Empfindlichkeit aufweisen. Die Steigung einer Kalibriergeraden entspricht der Empfindlichkeit eines Analyseverfahrens.

3. Rauschen

Unter dem Rauschen eines Detektors versteht man die Schwankungen des Signals, die beim Aufnehmen der Basislinie bei hoher Empfindlichkeit sichtbar werden. Das Rauschen wird durch mehrere Einflüsse verursacht: Verunreinigungen oder Luftbläschen in der mobilen Phase, Schwankungen der Umgebungstemperatur oder des Druckes, Netzstörungen, Pulsation der Pumpe, usw. sind möglich. Je kleiner das Rauschen ist, um so größer wird das Signal/Rausch-Verhältnis und um so niedriger wird die Nachweisgrenze. Das Detektorrauschen wird direkt vom Detektor generiert, z. B. durch Spannungsschwankungen.

4. Linearer Bereich

Ein idealer Detektor gibt sowohl bei großen als auch bei kleinen Analytmengen ein Signal, dessen Fläche und/oder Höhe der injizierten Substanzmenge proportional ist. Der Konzentrationsbereich, in dem das zutrifft, heißt linear-dynamischer Bereich. Oberhalb dieses Bereiches zeigen Detektoren ein Abflachen der Kalibrierfunktion. Im Idealfall sollte dieser Bereich möglichst groß sein.

5. Zeitkonstante

Die Zeitkonstante ist ein Maß für die Schnelligkeit der Registrierung eines Signals. In der HPLC sollte die Zeitkonstante nicht größer als 0,1 Sekunden sein.

Die Auswahl eines Detektors erfolgt in Abhängigkeit von den Eigenschaften der Analyten und der geforderten Nachweisgrenze. In der HPLC finden folgende Detektoren üblicherweise Verwendung:

- UV/VIS, variable Wellenlänge, bzw. mit Diodenarray-Technik Aufnahme von Spektren
- Fluoreszenz
- Leitfähigkeit
- Massenspektrometrie (MS)
- Kopplung mit ICP-AES oder ICP-MS

Die Grundlagen des in der vorliegenden Arbeit verwendeten Detektors und der Kopplungstechniken sollen näher betrachtet werden (siehe **Kapitel 4.3**).

4 Grundlagen der ICP-MS/AES

Im folgenden Abschnitt werden die beiden Techniken erläutert, die in der vorliegenden Arbeit als Detektor, mit der Chromatographie gekoppelt, verwendet wurden. Zuerst wird in **Kapitel 4.1** das ICP-MS erläutert. Die Bauteile, die in den **Kapiteln 4.1.1** und **4.1.2** dargestellt werden, sind auch Bestandteile des ICP-AES und werden infolgedessen im **Kapitel 4.2** nicht noch einmal beschrieben.

4.1 ICP-MS

Zu Beginn der 80er-Jahre beschrieben R. S. Houk, A. R. Date und A. L. Gray die Verwendung eines ICPs als Ionenquelle für die Massenspektrometrie (MS) [37]. Seit 1983 wurde die Bedeutung der Massenspektrometrie mit verschiedenen Ionenquellen für die Bestimmung der chemischen Elemente als sehr leistungsfähige Methode erkannt und hat sich mittlerweile als Routineanalytik und in der Forschung etabliert. Das ICP-MS wird in der Spuren- und Ultraspurenanalytik für die Bestimmung nahezu aller Elemente des Periodensystems eingesetzt.

Bei dieser Methode wird eine elektrische Entladung zur Ionisierung des Probenmaterials verwendet und die Ionen werden unter Verwendung elektrischer und magnetischer Felder nach ihrer Masse getrennt und detektiert.

In der ICP-MS wird in den meisten Fällen die zu analysierende Probe, die aus Flüssigkeit oder in Lösung gebrachten Feststoffen besteht, über eine peristaltische Pumpe einem Zerstäuber (meist V-Spalt, Meinhardt oder Cross Flow) zugeführt und mit Hilfe eines Argongasstroms von etwa 1 L/min zu einem feinen Nebel zerstäubt. Nach der Zerstäubung erfolgt in der gekühlten Zerstäuberchamber eine Abscheidung der großen Tröpfchen, um so ein Aerosol mit geringer Tröpfchengröße-Verteilung zu erhalten. Um die Wasserfracht, die das Plasma erreicht, weiter zu vermindern, ist die Zerstäuberchamber auf etwa 3°C gekühlt [38]. Die zerstäubte Probe wird mit dem Argongasstrom dem induktiv gekoppelten Hochfrequenzplasma (ICP) zugeführt. Das ICP ist ein elektrodenloses Plasma, das durch Einkopplung eines hochfrequenten Wechselfeldes in das Plasmagas (in der Regel Argon) erzeugt wird. Das Plasmagas wird durch ein Rohrsystem geleitet, an dessen Ende sich eine Induktionsspule befindet. Im Plasma erfolgt die Trocknung, Atomisierung und Ionisierung der Probe. Die Ionen werden extrahiert und in einen Zwischenraum (interface) mit einem Druck

von wenigen mbar gebracht, dann gelangen die Ionen in das Hochvakuum eines Massenspektrometers und werden nach der Massenauftrennung detektiert [39].

In diesem Abschnitt folgt die Beschreibung des ICP-MS mit dem oft verwendeten Quadrupol als Massenfilter, mit dem die Sb-Bestimmung der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Proben durchgeführt wurde [40, 41]. Der Quadrupol besteht aus vier zylindrischen Metallstäben, die asymmetrisch um die Hauptachse angeordnet sind. An diese Stäbe werden überlagerte Gleich- und Wechselspannungen derart angelegt, dass gegenüberliegende Stäbe die gleiche und benachbarte Stäbe die entgegengesetzte Polung aufweisen. Bei einer bestimmten Kombination der Gleich- und Wechselspannungen können nur Ionen mit einem bestimmten Verhältnis Masse/Ladung das entstehende elektrostatische Wechselfeld passieren. Alle anderen Ionen werden stark abgelenkt und gelangen nicht zur Detektionseinheit. In einem Sektorfeld-Massenspektrometer werden die Ionen in einem magnetischen und elektrischen Sektorfeld entsprechend den Masse/Ladungs-Verhältnissen aufgetrennt. Mit Sektorfeld-Massenspektrometern (ICP-SFMS) kann gegenüber Quadrupol-Geräten entweder im Betrieb mit kleiner Auflösung ($m/\Delta m \approx 300$) eine weitere Verbesserung der Nachweisgrenzen oder im höheraufgelösten Betrieb ($m/\Delta m \approx 3000$ oder $m/\Delta m \approx 9000$) eine weitgehende Beseitigung von spektralen Interferenzen erzielt werden.

Die maßgeblichen Erfinder der ICP-MS Houk [42, 43], Gray und Date [44, 45] entwickelten ein Interface zur Kopplung bzw. Verbindung des ICP mit einem Quadrupol-Massenspektrometer. Mit Bezug auf die Literatur über die verschiedenen Typen moderner Massenspektrometer wird auf Ref. [46] verwiesen.

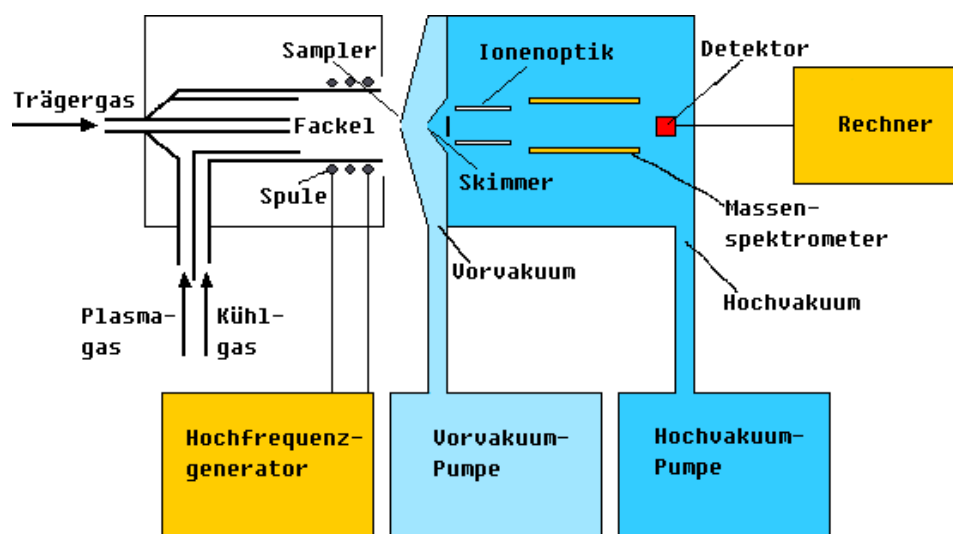


Abbildung 4-1: Schematischer Aufbau eines ICP-MS [47]

Der schematische Aufbau eines Quadrupol-ICP-MS ist in der **Abbildung 4-1** dargestellt, der in folgenden Punkten beschrieben werden soll. Ein ICP-MS besteht aus einer Ionenquelle und einem Massenspektrometer, das eine Ionenoptik, einen Massenfilter und eine Detektionseinheit enthält.

4.1.1 Zerstäuber

Die Standard-Probenzufuhr in der ICP-MS (und auch in der ICP-AES) ist die Zerstäubung flüssiger Proben [48]. Die Theorie der Aerosolbildung und die Wirkungsweise von Zerstäuber und Zerstäuberkammer werden ausführlich von Sharp beschrieben [49, 50]. Am häufigsten werden V-Spalt- oder Meinhard-Zerstäuber (konzentrisch) in Kombination mit einer Scott-Zerstäuberkammer verwendet; daneben gibt es noch Babington-, Cross-Flow- [51] und Frittenerstäuber [52]. Alle diese Typen besitzen eine schlechte Aerosolabgabe, daher können sie als niedereffektive Zerstäuber bezeichnet werden.

Die Aerosolabgabe ist die Differenz zwischen der dem Zerstäuber zugeführten und der in der Zerstäuberkammer wieder abgeschiedenen Probemenge und ist eine Kenngröße des Zerstäubers. Die Empfindlichkeit bei der anschließenden Detektion wird maßgeblich von der Bildung kleiner Aerosoltröpfchen beeinflusst, da die Aufenthaltsdauer dieser Tröpfchen im Plasma kurz ist und nur sie effektiv verdampft werden können.

Die Flüssigkeits- und Gasmengen, die dem Zerstäuber zugeführt werden, müssen auch den Anforderungen des Plasmas genügen, welches maximale Zerstäubergasflussraten von 1,5 L/min und Aerosoleinträge bis zu 0,1 mL/min toleriert. Bei höheren Einträgen wird das Plasma instabil, die Temperaturen sinken und die spektralen Interferenzen nehmen zu. Um die Belastung des Plasmas mit Wasser und damit die Interferenzen weiter zu verringern und die Empfindlichkeit für die Messung der Analyten zu steigern, wird die Zerstäuberkammer gekühlt [53]. Bei tiefer Zerstäuberkammertemperatur steigt die Empfindlichkeit für die Analyten, während die Störungen durch Oxid- oder Plasmaspezies zurückgehen.

Der Meinhard-Zerstäuber (**Abbildung 4-2**) besteht aus Quarzglas und wird in verschiedenen Typen gefertigt, die sich in der Form der Spitze und damit im erforderlichen Betriebsdruck und im erzeugten Aerosol unterscheiden. Der Zerstäuber kann auch selbstansaugend betrieben werden. Ein Vorteil ist dabei, dass jegliches Pumpenrauschen entfällt. Allerdings ist die Probenzufuhr rate schwierig einzustellen und wenig reproduzierbar. Der V-Spalt-Zerstäuber

(**Abbildung 4-2**) ist aus Kunststoff gefertigt und somit auch gegen aggressive Medien wie verdünnte Flußsäure resistent. Außerdem ist er weniger anfällig gegen Verstopfung und lässt sich leichter reinigen.

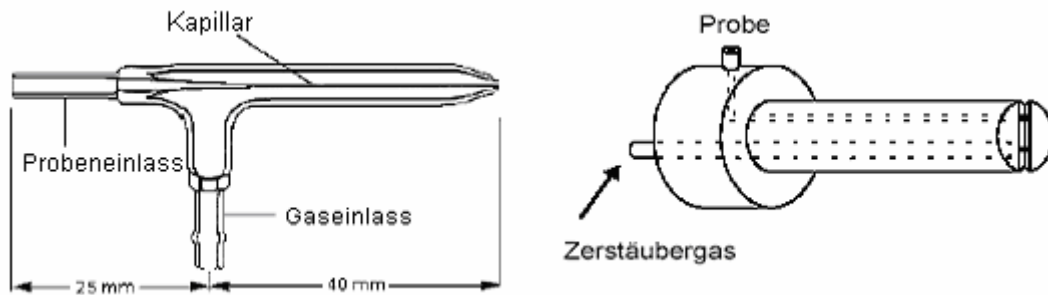


Abbildung 4-2: Meinhard-Zerstäuber (links) [54] und V-Spalt (rechts)

Die Aerosolausbeute ist bei beiden Systemen sehr schlecht und liegt bei unter 10 %. Zur besseren Aerosolausbeute wurden hocheffektive Zerstäuber entwickelt, wie der Ultraschall-Zerstäuber (USN) [55, 56], der Hocheffektive Zerstäuber (HEN) [57, 58] oder der Mikrokonzentrische Zerstäuber (MCN) [59, 60]. Allerdings steigt nicht nur die Analytmenge im Plasma, sondern auch die Matrixmenge, sodass es nicht unbedingt zu einer Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses kommt.

Der MCN (**Abbildung 4-3**) hat einen Körper aus Kunststoff. Die Probe wird durch eine kurze, dünne Kapillare gefördert, die in ein Saphirplättchen mündet. Durch die verwendeten Materialien ist der MCN sehr korrosionsbeständig und für verdünnte Flußsäure geeignet. Der MCN kann auch wie der Meinhard und der HEN selbstansaugend betrieben werden.

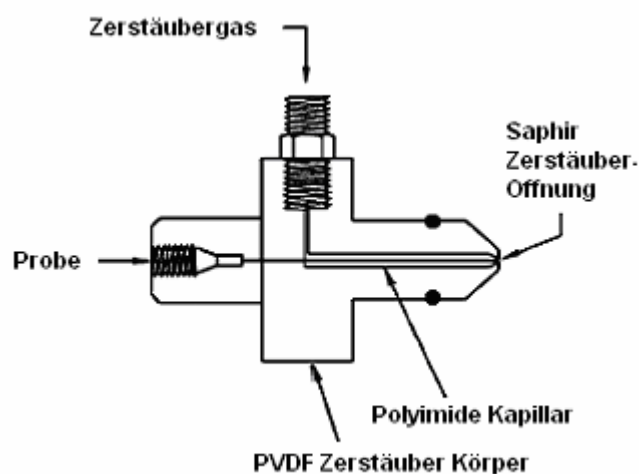


Abbildung 4-3: Mikrokonzentrischer Zerstäuber (MCN) [61]

Eine noch bessere Ausnutzung der Probe erreicht man, indem man ganz auf eine Zerstäuberkammer verzichtet und einen hocheffektiven Zerstäuber, z. B. einen Direct Injection High Efficiency Nebulizer (DIHEN) der Firma Meinhard oder einen Direct Injection Nebulizer (DIN) der Firma Cetac so in die Quarzröhre des Brenners (torch) einbaut, dass er direkt in das Zentrum des Plasmas zerstäubt. Auf diese Weise wird die komplette zerstäubte Probe in das Plasma eingebracht. Auch hier ist wieder das Plasma die limitierende Größe, das bei größeren Wasserfrachten nicht mehr stabil ist. Der Nachteil der Direktzerstäubung ist natürlich, dass hier keine Desolvatisierung möglich ist.

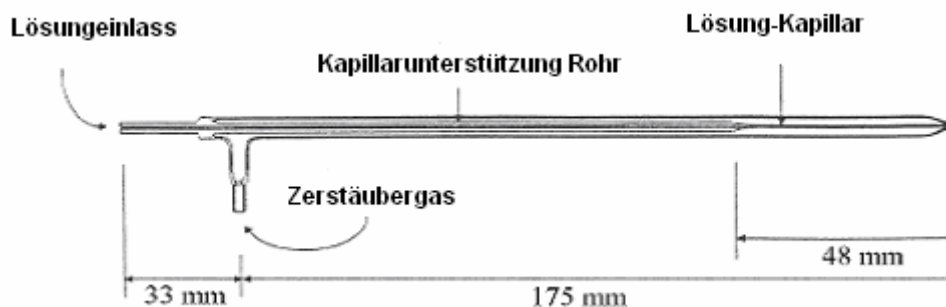


Abbildung 4-4: Direct Injection High Efficiency Nebulizer [62]

Der Direct Injection Nebulizer (DIN) ist eine Weiterentwicklung des MCN, der in das Injektorrohr eines Quarzbrenners eingebaut wurde [63, 62] (**Abbildung 4-5**). Im Unterschied zum MCN ist die Kapillare über einen kleinen Elektromotor verstellbar und ermöglicht so zusammen mit den eingestellten Zerstäubergasflüssen eine Beeinflussung der Tröpfchenverteilung [64, 65], sodass das Aerosol in das Zentrum des Plasmas gebracht werden kann.

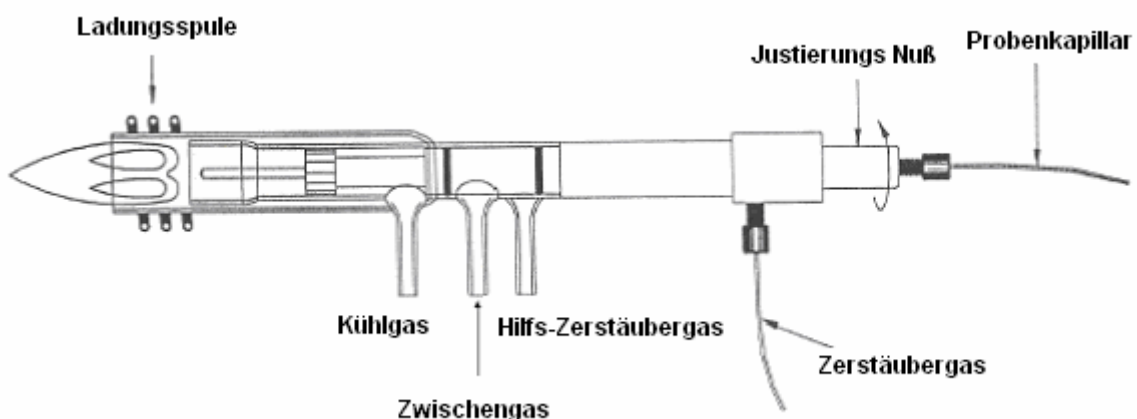


Abbildung 4-5: Direct Injection Nebulizer [66]

Der DIN hat, bedingt durch seine lange Kapillare mit einem Durchmesser von 50 μm , einen Staudruck von 3-4 MPa bei einer Flussrate von 100 $\mu\text{L}/\text{min}$. Zum Betrieb ist daher eine Pumpe nötig, die in diesem Druckbereich pulsationsfrei und reproduzierbar die recht kleinen Flussraten fördern kann. Vom Hersteller wird eine Gasverdrängungspumpe für den DIN angeboten, die zusammen mit einem Steuergerät für die Gasflüsse und Kapillarenposition geliefert wird. Der Betrieb ist aber auch mit einer HPLC-Pumpe und einem selbstgebaute Steuergerät für die Positionierung der Kapillare möglich [38].

4.1.2 Plasma und Brenner

Ein Plasma ist ein elektrisch leitendes, gasförmiges System aus Atomen, Ionen und Elektronen. Die elektrisch geladenen Teilchen stehen in Wechselwirkung zu den Atomen, jedoch nicht in einem thermodynamischen Gleichgewicht. Nach außen ist das Plasma (quasi-) neutral. Erzeugt wird es am Ende eines Quarzglasbrenners (Torch), der mittig in eine Kupferspule eingelassen ist. An dieser liegt eine Hochfrequenz-Wechselspannung an. Betrieben wird das Plasma mit Argon, welches mit einer Flussrate von 12-18 L/min durch die äußeren Glasröhren des Brennerströmt. Aufgrund der Geometrie des Brenners entstehen Gaswirbel, die das Plasma aufrechterhalten. Gleichzeitig wird durch das Plasmagas die Torch gekühlt (Coolgas), um das Schmelzen des Quarzglases durch die hohen Temperaturen (in der Nähe der Spule kann die Temperatur bis zu 10000 K erreichen) im Plasma zu verhindern. Das Plasma wird durch einen Teslafunken gezündet, der in das Plasmagas induziert wird.

Das Probenaaerosol gelangt durch die innere Glasröhre des Brennerdirekt in das Zentrum des Plasmas. Über die mittlere Röhre kann dem Plasma noch weiteres Argon als Hilfs- (Auxilliary-) Gas mit einer Flussrate von 0,5 bis 1,2 L/min zugeführt werden. Dieses Gas kann die Form, Position und damit die Stabilität des Plasmas beeinflussen, auch wenn es zum Betrieb des Plasmas nicht unbedingt notwendig ist [67].

Die Induktionsspule (s. **Abbildung 4-6**) wird vom Plasmagenerator mit einer hochfrequenten Wechselspannung versorgt. Der Generator liefert eine Leistung bis zu 2000 W bei einer Frequenz von 27,12 MHz zur Erzeugung des oszillierenden Magnetfelds. Die Frequenz wird von einem schwingenden Quarz erzeugt (Crystal Controlled) und im Generator über verschiedene Verstärkerstufen auf die endgültige Leistung gebracht [42, 68].

Das Plasmagas innerhalb der Torch bestimmt die Induktivität der Spule, sodass die Zugabe einer Probe in das Plasma oder eine Änderung der Probenmatrix Variationen der Induktivität verursachen. Eine solche Störung der Induktivität, die außerdem auch durch eine falsche Torchpositionierung, Sauerstoff im Plasmagas oder andere Störungen hervorgerufen werden kann, wird durch eine erhöhte Reflected Power, also der Leistung, die das Plasma nicht aufnehmen konnte, angezeigt. Bei Betrieb eines ICP sollte darauf geachtet werden, die Reflected Power möglichst gering zu halten, um den Generator zu schonen (hier etwa 1 Watt) [69].

Innerhalb des Plasmas wird das Probenaerosol zunächst getrocknet, dann atomisiert und schließlich ionisiert. Die einzelnen Plasmazonen lassen sich beispielsweise mit einem ICP-AES zeigen, wo der Übergang von Atom- zu Ionenlinien beobachtet werden kann. Die verschiedenen Plasmazonen werden in **Abbildung 4-6** und **Abbildung 4-7** dargestellt.

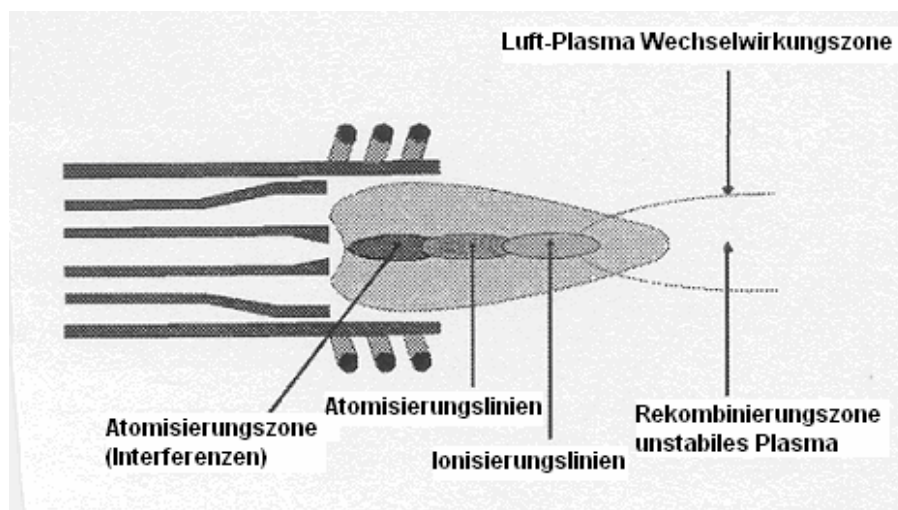


Abbildung 4-6: Verschieden Zonen in einem ICP [42]

Die Temperaturverteilung im Plasma entspricht den unterschiedlichen Zonen. Angaben über die Temperatur in der Literatur variieren mit den Plasmametern und der Methode, wie diese Werte ermittelt wurden. Die äußere Zone des Plasmas in der Nähe der Spule erreicht eine Temperatur von bis zu 10000 K, im Zentrum des Plasmas nimmt die Temperatur von der Atomisierungszone mit etwa 8000 K auf 6000 K in der Zone der Ionenlinien ab. Obgleich das Plasma eine sehr effektive Ionisierungsquelle für die meisten Elemente darstellt, so besteht es zum größten Teil aus heißem, neutralem Argon.

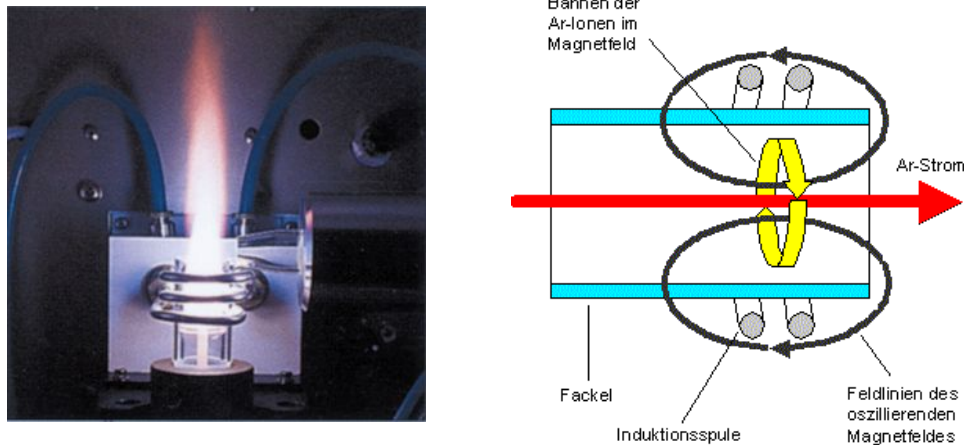


Abbildung 4-7: Bild und schematische Darstellung des Plamabrenners [47]

Im induktiv gekoppelten Plasma wird die Probe (Analyt und Matrix) verdampft, dissoziiert und atomisiert bzw. ionisiert. Bedeutsam für das ICP-MS ist eine hohe Ausbeute einfach ionisierter Analytatomte. Die Ionisierung läuft nach folgendem Schema durch Zusammenstöße der Analytatomte M mit Ar-Atomen im metastabilen Zustand (Ar^m) und mit Ar-Ionen (Ar^+) ab (siehe **Gleichung 4-1** bis **Gleichung 4-3**):



Der Ionisierungsgrad im Argonplasma hängt dabei von der Elektronendichte und Elektronentemperatur im Plasma und dem Ionisationspotential des jeweiligen Analytelementes ab. Er lässt sich näherungsweise mit der Saha-Gleichung (siehe **Gleichung 4-4**) berechnen. Je nach Element können zwischen 50-100 % einfach positiv geladene Ionen vorliegen. Nichtmetalle wie z. B. Fluor und Chlor weisen dagegen sehr geringe Ionenausbeuten von 0,001 bzw. 1% auf [42, 70]. Das Ar-ICP ist in der Lage, die meisten Elemente des Periodensystems anzuregen und zu ionisieren, wodurch eine simultane Multielementbestimmung möglich wird. Die Ionenausbeuten sind durch die Plasmaparameter steuerbar. Eine Steigerung der Generatorleistung und damit der Plasmatemperatur führt zu geringeren Ausbeuten an Molekülspezies bei gleichzeitiger Zunahme der einfach und zweifach positiv geladenen Ionen. Eine Erhöhung des Trägergasflusses bewirkt durch den verstärkten Eintrag von Probenmaterial ins Plasma eine Abkühlung der Temperatur und höhere Ausbeuten an störenden Molekülspezies. Zwei Drittel aller Elemente weisen eine 1. Ionisierungsenergie < 8 eV auf und werden zu über 90% ionisiert [71].

$$\frac{N_{ij} \cdot N_e}{N_{aj}} = \frac{(2\pi \cdot m_e kT)^{3/2}}{h^3} \cdot \frac{2z_{ij}}{z_{aj}} \cdot e^{-\frac{e_j}{kT}}$$

Gleichung 4-4

N_{aj}, N_{ij} Konzentration der Atome bzw. Ionen des Elementes j

N_e Konzentration der freie Ionen (Annahme: $1,3 \cdot 10^{15}$)

K, h, m_e Boltzmann- und Planck-Konstante, Elektronenmasse

z_{aj}, z_{ij} Partitionsfunktion der Atome bzw. Ionen vom Element j

e_j Ionisationsenergie des Elementes j

T Ionisationstemperatur im Plasma (Annahme: 8700 K)

4.1.3 Interface und Quadrupol

In der „analytischen Zone“ werden mit Hilfe einer aus Metall angefertigten, konusförmigen Lochblende (Sampler), die im Plasma gebildeten Ionen extrahiert. Ein das Plasma verlassendes Ion trifft auf ein wassergekühltes, aus Sampler und Skimmer bestehendes Interface. Die Spitze des Sampler ist eine Lochblende aus Nickel.

Während in der Torchbox mit dem Plasma Atmosphärendruck herrscht, ist im Bereich des Massenseparators Hochvakuum nötig. Es muss also parallel zur Ionenlaufstrecke ein deutlicher Druckabfall realisiert werden. Dies geschieht mittels eines Interfaces über zwei Stufen. Hinter dem Sampler wird der Druck durch eine Drehschieberpumpe auf ca. 2,5 hPa reduziert. Der Ionenstrahl, der durch das Loch des Samplers hindurch tritt, expandiert nun in dieses Vakuum hinein, wird dabei beschleunigt und trifft auf eine zweite Lochblende, den Skimmer. Durch dieses ebenfalls aus Nickel oder Platin bestehende Bauteil gelangt ein Teil des Ionenstrahls in das Hochvakuum des Massenspektrometers. Der Aufbau des Interfaces ist in **Abbildung 4-8** schematisch dargestellt.

Nach dem Interface wird der Ionenstrahl mit Hilfe verschiedener Ionenlinsen zunächst defokussiert und um den Photonenstop herumgeführt. Letzterer soll ungeladene Teilchen (wie z. B. Photonen) vom Detektor fernhalten und befindet sich dementsprechend im direkten Strahlengang. Die um ihn herum gelenkten Ionen werden nun durch weitere Ionenlinsen wieder fokussiert und auf die Eingangsblende des Quadrupols geleitet. Der Druck fällt vom Bereich der Ionenlinsen zum Quadrupol von 10^{-5} hPa auf $5 \cdot 10^{-6}$ hPa.

Im Quadrupol erfolgt dann die Trennung der Ionen nach ihrem Masse/Ladungs-Verhältnis. Der Quadrupol besteht aus vier jeweils 30 cm langen zylindrischen Metallstäben, die um die Flugbahn der Ionen herum angeordnet sind. An diese Stäbe wird eine Gleichspannung angelegt, die von einer hochfrequenten Wechsellspannung überlagert wird. Durch Variation der Gleichspannung kann erreicht werden, dass nur Teilchen mit einem bestimmten Masse/Ladungs-Verhältnis den Quadrupol passieren und den Detektor erreichen können. Alle anderen Ionen haben instabile Flugbahnen und erreichen das Ende des Quadrupols nicht. Die Steuerelektronik ist in der Lage, jede Masse im analytisch sinnvollen Bereich von 5 bis 300 amu zu analysieren und kann innerhalb einer Sekunde diesen Massenbereich mehrfach abfahren (scannen). Auch wenn der Wechsel der Masse sehr schnell erfolgen kann, so ist die gesamte Detektion doch nur quasisimultan. Das bedeutet, dass die einzelnen Massen nicht zeitgleich, sondern leicht zeitversetzt detektiert werden, und zwar je stärker, je weiter sie auseinander liegen oder je mehr Elemente mit Massen zwischen diesen beiden ebenfalls detektiert werden sollen. Dies kann zu Ungenauigkeiten bei der Bestimmung von Isotopenverhältnissen führen, da bei einer zeitversetzten Messung zweier Isotope z. B. die Schwankungen des Plasmas die Messung dieser beiden Massen nicht gleichmäßig beeinflussen [38, 69].

Die im Massenspektrometer getrennten Ionen werden mit einem Channel-Electron-Multiplier (CEM) detektiert. Jedes eintreffende Ion erzeugt im Detektor eine Vielzahl von Elektronen, die dann als Stromimpuls gemessen werden. Der analytische Bereich umfasst bis zu acht Dekaden bezogen auf die Konzentration des Analyten in der Probe [42].

Neben einem Quadrupol zur Massentrennung werden in der ICP-MS auch Magnet-Sektorfeld und Flugzeitmassenspektrometer (Time-Of-Flight, TOF), seit etwa 10 Jahren verwendet, die aufgrund ihres physikalischen Prinzips eine bessere Auflösung und in wenigen Fällen auch eine größere Empfindlichkeit für die Analyten besitzen [72].

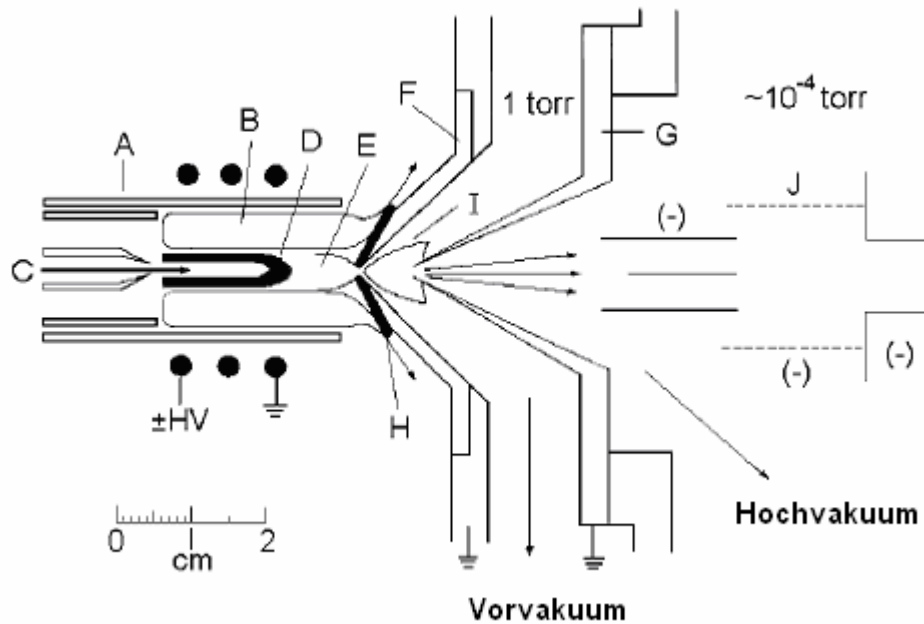


Abbildung 4-8: Aufbau von Torch, Plasma und Interface nach [73]: **A:** Brenner, **B:** äußere Plasmazone, **C:** Zerstäubergas mit Probenaerosol, **D:** Zone der Atomlinien, **E:** Zone der Ionenlinien, **F:** Sampler, **G:** Skimmer, **H:** Boundary Layer, **I:** Überschallbereich, **J:** Ionenlinsen.

Auflösung

Der Quadrupol ist in der Lage, in dem für die Elementanalyse interessierenden Massenbereich bis 300 amu ganze Massen vollständig voneinander zu trennen. Die Auflösung wird in der Massenspektrometrie gewöhnlich definiert als:

$$R = \frac{M}{\Delta M}$$

Gleichung 4-5

R: Auflösung

M: Masse

ΔM : Massendifferenz zwischen zwei Peaks auf 10 % Peakhöhe

Eine Steigerung der Auflösung führt immer zu einer Verringerung der Empfindlichkeit.

Vor- und Nachteile

Vorteile dieser Methode sind eine Kombination der folgenden Eigenschaften [74, 75, 76]:

- Einfache und stabile Probenzuführung im ICP als Ionenquelle
- Sehr gute Nachweisgrenzen durch große Empfindlichkeit bei geringem Untergrund

- Multielementfähigkeit
- Großer dynamischer Messbereich
- Isotopenverhältnis-Erfassung
- Vergleichsweise einfache Spektren
- Geringer Zeitbedarf für eine Einzelmessung
- Vielfältige Möglichkeiten der Probenzufuhr (Kopplung)

Den vielfältigen Einsatzmöglichkeiten des ICP-MS und den vorteilhaften analytischen Eigenschaften stehen einige systematische Schwächen gegenüber:

- Einige wichtige Elemente durch isobare Überlagerungen mit Plasmaspezies nicht oder nur schwer zugänglich (^{56}Fe wird durch ArO^+ überlagert und ^{75}As durch ArCl^+)
- Empfindliche Messungen sind mit Einbußen der Präzision verbunden. Bei der Bestimmung von Hauptkomponenten in einer Probe sind zu empfindliche Techniken wie die ICP-MS unangebracht, da Schwankungen im Messergebnis bedingt durch die entsprechenden Verdünnungsschritte sich extrem negativ auf die Präzision der Endergebnisse auswirken.
- Keine Informationen über Spezies oder Bindungsformen der Analyten
- Beeinträchtigungen durch Probenmatrix, wie Peaküberlagerung, Peakverschiebung, Isobare Interferenzen, usw.

Mit fortschreitenden technischen Neuerungen der ICP-MS-Geräte, wie z. B. Kaltplasma oder Reaktionszelle bzw. der Kollisionszelle zur Reduzierung der Interferenzen durch Plasmaspezies [77], werden die genannten Nachteile immer weiter eingeschränkt und Speziesinformationen werden durch die Kopplung mit chromatographischen Methoden zugänglich [78, 79, 80]. Die Kopplungstechniken werden in **Kapitel 4.3** näher beschrieben.

4.2 Grundlagen der Atomemissionsspektrometrie

Die Atomemissionsspektrometrie zählt innerhalb der instrumentellen Analytik zu den wichtigsten Methoden für die Elementbestimmung.

Ein Atom kann durch Zufuhr von thermischer, elektrischer oder Strahlungsenergie (**Abbildung 4-9**) aus seinem energetischen Grundzustand (E_0) in einen angeregten, höheren Zustand (E_1) angehoben werden und gibt beim Rückfall in das niedrigere Niveau die aufgenommene Energie als elektromagnetische Strahlung wieder ab, wobei eine Spektrallinie

genau einer bestimmten Energiedifferenz der beteiligten Niveaus entspricht. Ein angeregtes Atom kann zwar sehr verschiedenartige, nicht aber beliebige Energiezustände annehmen, sodass die Zahl der Spektrallinien begrenzt bleibt. Jedes Element verfügt über einen charakteristischen Aufbau seiner Atomhülle und weist folglich auch ein charakteristisches Linienspektrum auf. Mit der Bestimmung der Wellenlänge emittierender oder absorbierender Substanzen können qualitative Aussagen getroffen werden. Außerdem ist es möglich, über die Intensität dieser Spektrallinien eine quantitative Aussage über den Analyten zu treffen, wenn Temperatur und Probevolumen bekannt sind [70]. Der Zusammenhang zwischen der Atomart und der Wellenlänge des Lichts wurde bereits 1860 von Kirchhoff und Bunsen entdeckt [81, 82]. Somit war die Nutzung des Effektes für die qualitative Analyse möglich geworden.

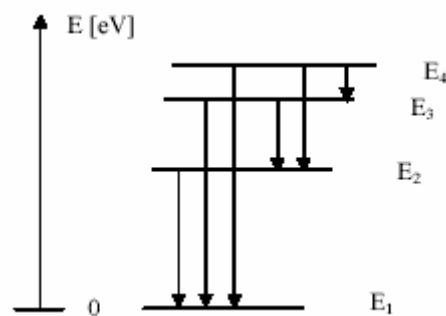


Abbildung 4-9: Energieniveauschema eines Atoms; ein Pfeil entspricht dabei einer bestimmten Spektrallinie, die beim Übergang von einem höheren Energie-zustand in einen tieferen entsteht

Die Intensität der Linie ist abhängig von der Anzahl der Atome und somit von der Konzentration. Diese Tatsache wurde 1939 von Woodson [83] für die Bestimmung von Quecksilber mittels einer Quecksilber-Dampfentladungslampe als Lichtquelle ausgenutzt und später mit der Verwendung einer Hohlkathodenlampe als Lichtquelle in der Analytik etabliert [84].

Betrachtet man die Ursachen der Spektren im sichtbaren und ultravioletten Bereich, so sind diese Spektren auf unterschiedliche Energiezustände der Valenzelektronen zurückzuführen. Die einzelnen Linien dieser Spektren entsprechen den Energiedifferenzen von zwei definierten Energiezuständen der entsprechenden Atome. Dies hat Planck in folgender Gleichung dargestellt:

$$E_2 - E_1 = h \cdot \nu = h \cdot \frac{c}{\lambda}$$

Gleichung 4-6

Dabei sind E_1 und E_2 die Energiezustände, h das Plancksche Wirkungsquantum, λ die Wellenlänge, ν die Frequenz und c die Lichtgeschwindigkeit.

Im Fall der Atomabsorption wird ein Photon mit dem entsprechenden Energiewert vom freien Atom aufgenommen. Dabei geht dieses Atom vom Grund- oder einem niedrigen angeregten Zustand in einen höheren angeregten Zustand über. Dieser Zustand ist jedoch nur sehr kurzlebig. Die aufgenommene Energie wird schnell durch Emission oder strahlungslos durch Stoß mit einem anderen Teilchen wieder abgegeben.

Die Arbeiten von Rutherford, Bohr, Planck und Sommerfeld führten zur Aufklärung der Struktur von Linienspektren einfacher Atome. Durch die Verbindung des Atommodells von Rutherford mit der Quantentheorie von Planck konnte Bohr den von Balmer empirisch ermittelten Seriencharakter der Spektren des Wasserstoffatoms erklären.

$$\bar{\nu} = R \cdot \left(\frac{1}{n_1^2} - \frac{1}{n_2^2} \right) \quad \text{Gleichung 4-7}$$

Gleichung 4-7 gibt den Zusammenhang zwischen der Wellenzahl $\bar{\nu}$ eines emittierten Photons und den Hauptquantenzahlen n an. Dabei ist n_2 die Hauptquantenzahl des höheren angeregten Zustandes und n_1 die Hauptquantenzahl des niedrigeren angeregten Zustandes bzw. des Grundzustandes. R ist der Proportionalitätsfaktor und wird Rydberg-Konstante genannt. Erhöht sich nur die Kernladungszahl (z. B. He^+ , Li^{2+}), so wird **Gleichung 4-7** mit dem Quadrat der Ordnungszahl Z erweitert.

$$\bar{\nu} = Z^2 \cdot R \cdot \left(\frac{1}{n_1^2} - \frac{1}{n_2^2} \right) \quad \text{Gleichung 4-8}$$

Diese Erweiterung berücksichtigt die stärkere Kernanziehung durch die höhere Ladung. Die sich hieraus ergebenden Spektren sind denen des Wasserstoffatoms sehr ähnlich. Dies führte Sommerfeld und Kossel dazu, den spektroskopischen Verschiebungssatz zu formulieren, wonach die Spektren von einfach geladenen Ionen denen des im Periodensystem vor ihnen stehenden Atoms ähnlich sind. Die Energie dieses Zustandes beträgt:

$$E = -Z^2 \cdot \frac{R \cdot h \cdot c}{n^2} \quad \text{Gleichung 4-9}$$

Das Auftreten von mehreren Spektralserien (bei Mehrelektronensystemen mit einem Außenelektron) führt dazu, dass neben der Hauptquantenzahl auch die Nebenquantenzahl l und die Spinquantenzahl s berücksichtigt werden müssen. Bei Mehrelektronensystemen, die auch mehrere Valenzelektronen besitzen, kommt es zur Kopplung zwischen den einzelnen Elektronen, sodass ein Gesamtenergiezustand für das Atom beschrieben werden kann. Dabei setzen sich die Nebenquantenzahlen zu einer Gesamtnebenquantenzahl und die Spinquantenzahlen zu einer Gesamtspinquantenzahl zusammen. Diese Kopplungsmöglichkeiten können zu komplizierten Spektren führen, bei denen der Seriencharakter nur schwer zu erkennen ist. Trotzdem ist hiermit die Grundlage für die Anwendung der Atomspektroskopie für die Stoffidentifizierung gegeben.

4.2.1 Aufbau eines optischen Spektrometers

Der optische Teil einer AES-Apparatur besteht aus einem Spektralapparat mit angeschlossener Datenverarbeitung. Ein Vorteil des AES im Gegensatz zur AAS besteht darin, dass die Spektrallinien aller in der Probe vorhandenen Elemente gleichzeitig ausgesandt werden. So besteht die Möglichkeit, sämtlicher interessierenden Linien je nach Ausführung des Spektralapparats simultan oder sequentiell, d. h. in rascher zeitlicher Folge, zu messen (siehe **Kapitel 4.2.2**)

In den folgenden Abbildungen wird der schematische Aufbau eines Einkanalspektrometers dargestellt:

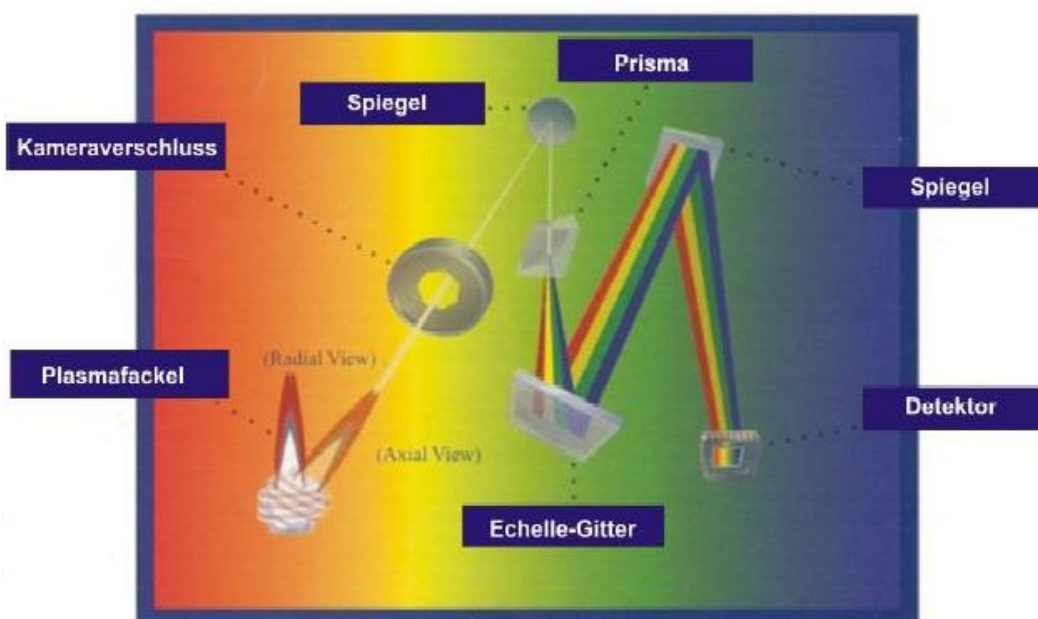


Abbildung 4-10: Echellespektrometer für die ICP-Emissionspektrometrie [85]

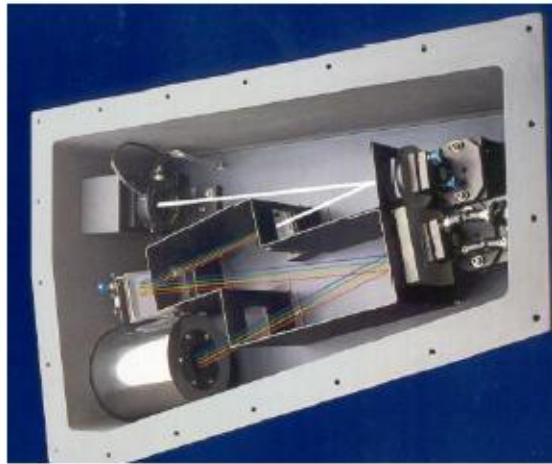


Abbildung 4-11: Apparative Aufbau eines Echellespektrometers [85]

In einem optischen Spektrometer wird emittiertes polychromatisches Licht am Eintrittsspalt zu einer quasi-parallelen Strahlung gebündelt. Die Winkelaufspaltung der Strahlung in Abhängigkeit von der Wellenlänge erfolgt an einem Reflexionsgitter, welches aus spiegelnden Flächen mit in definiertem Abstand geritzten parallelen Furchen (Gitterabstand d) besteht. Jeder Wellenlänge λ ist ein anderer Beugungswinkel α zuzuordnen, sodass sich Spektralbilder in Abhängigkeit von der Wellenlänge ordnen und somit Spektren bilden.

Die Interferenzen der gebeugten Lichtwellen führen zu einer Verstärkung bzw. Auslöschung des durch das Gitter reflektierten Lichtes. Die erhaltenen Interferenzbilder werden nach den Maxima der Intensitätsverteilung in Ordnungen m eingeteilt. Das Auftreten von mehreren Ordnungen führt zu einer Aufteilung der eingestrahnten Energie, wodurch Verluste der messbaren Lichtintensität verursacht werden.

Wichtige Kenngrößen zur Beurteilung der Leistungsfähigkeit von Spektrometern sind die Strichdichte des Gitters, die Brennweite der Spektraloptik, die Spaltbreiten sowie die reziproke lineare Dispersion und das Auflösungsvermögen. Die reziproke lineare Dispersion RLD ist ein Maß dafür, wie gut ein Spektralapparat zwei verschiedene Wellenlängen voneinander trennen kann. Sie gibt die Anzahl der Wellenlängen in nm an, die auf 1 mm der Abbildungsebene erscheinen. Hinter dem Austrittsspalt ist ein Photomultiplier angeordnet. Dieser Detektor kann optische Signale über einen sehr weiten linearen Arbeitsbereich hinweg in elektrische Signale umwandeln. Die Effizienz von Photomultipliern ist wellenlängenspezifisch in Abhängigkeit von der strahlungsempfindlichen Schicht auf der Kathode und dem Fenstermaterial [70].

Das vom Analyten ausgesandte Licht wird im hochauflösenden Monochromator (siehe **Abbildung 4-12**) über ein Spiegelsystem fokussiert und auf ein Reflexions-Gitter geleitet. Dort wird es durch Beugung spektral (geometrische Verhältnisse siehe **Abbildung 4-13**) zerlegt und auf den Austrittsspalt des Monochromators fokussiert.

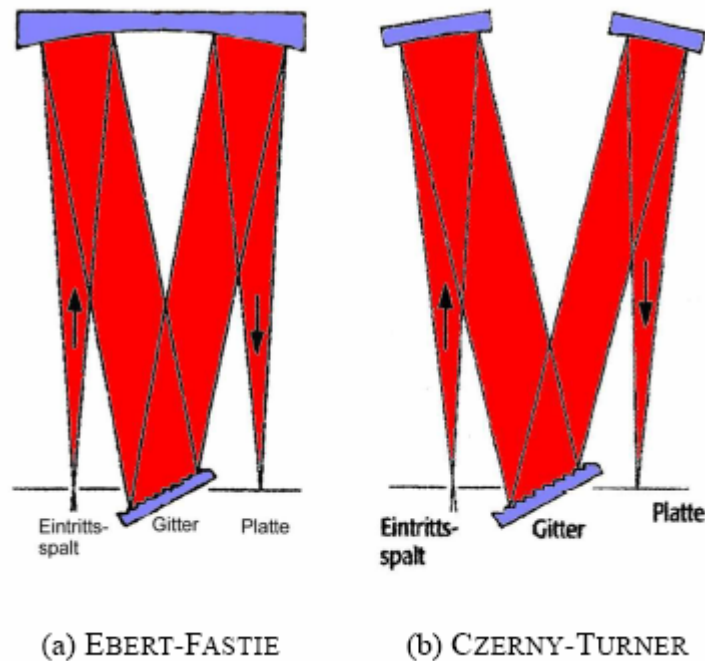


Abbildung 4-12: Vergleich verschiedener Spektrometeranordnungen.

Die monochromatische Strahlung wird von einem lichtempfindlichen Detektor registriert. Als Detektor wurde früher die lichtempfindliche Photoemulsion einer Photoplatte genutzt, heute benutzt man im Allgemeinen einen (oder auch mehrere) Sekundärelektronenvervielfacher oder ein CCD (Charge-Coupled-Device). Da aber am Gitter neben der gewünschten Strahlung (im Versuch die Strahlung aus der ersten Ordnung) auch noch Strahlung aus anderen Beugungsordnungen anfällt, muss noch ein sogenanntes OrdnungsfILTER in Abhängigkeit von der zu vermessenden Wellenlänge in den Strahlengang geschaltet werden. Oft werden bereits die verwendeten Gitter so hergestellt, dass sich die Strahlung hauptsächlich in der gewünschten Ordnung sammelt (geblazete Gitter, holographische Gitter).

Die aufgenommenen Daten werden digitalisiert und elektronisch ausgewertet. Sämtliche Spektrometerfunktionen werden vom Rechner gesteuert. Da im UV/VIS eine große Liniendichte vorliegt, muss zur sicheren Trennung der Elementlinien eine hohe spektrale Auflösung realisiert werden. Dieses erfordert neben Gittern mit einer hohen Strichzahl (im Versuch 2400 mm^{-1} und 3600 mm^{-1}) auch relativ lange Brennweiten (bei den hier

verwendeten Spektrometern 1 m). Soll das Spektrum auf eine ebene Fläche (z. B. ein CCD) abgebildet werden und ist eine höchstmögliche Auflösung notwendig, wird bevorzugt ein Spektrometer mit der Anordnung nach CZERNY-TURNER verwendet. Im verwendeten Spektrometer wird das Spektrum aber nur schrittweise abgefahren, weshalb die Forderung einer ebenen Bildebene nicht notwendig ist und deshalb ein preiswerteres Spektrometer mit einer Anordnung nach EBERT-FASTIE eingesetzt wird. Die Auswahl der zu beobachtenden Wellenlänge erfolgt durch Drehung des Gitters (Schrittweite entspricht etwa 1 pm im Spektrum im hier verwendeten Spektrometer).

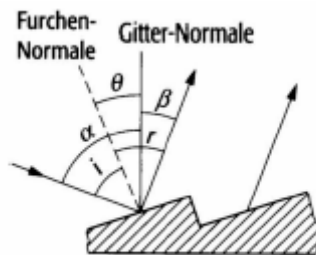


Abbildung 4-13: Strahlverlauf am Echelette-Gitter, α ist der Sägewinkel, θ ist der Blaze-Winkel

Für den Bereich unter 200 nm ist außerdem eine Spülung des Strahlenganges vom Plasma bis zum Eintrittsfenster des Spektrometers mit Stickstoff erforderlich, um Absorptionen zu vermeiden (SCHUMANN-RUNGE Absorptionsbanden von molekularem Sauerstoff [86] im Bereich von 175-205 nm). Das Spektrometer wird auf einen Druck von etwa 0,66-1,33 Pa evakuiert, so dass dort keine weiteren Absorptionen zu befürchten sind.

Bei zu hoher oder zu niedriger Verstärkerspannung, wie auch bei zu niedriger Integrationszeit ist sonst mit zu starkem Rauschen in den Spektren zu rechnen. Die bei neueren Geräten oftmals mögliche Kühlung des Detektors zur Rauschminimierung ist hier nicht möglich, da das gesamte Spektrometer immer auf etwa 31 °C temperiert wird.

Beim der Spectroflame ICP Type P von SPECTRO erfolgt eine die radiale Beobachtung des Plasmas. Der Vorteil der seitlichen Beobachtung ist die oft mögliche einfache Verringerung von Interferenzen durch eine Änderung der Beobachtungshöhe.

4.2.2 Simultane und sequentielle Spektrometer

In der Spektralanalyse unterscheidet man zwischen sequentiellen und simultanen Geräten. Beim hier benutzten simultanen Aufbau erfolgt die spektrale Zerlegung der einfallenden Strahlung an einem Konkavgitter, das sich auf einem Rowland-Kreis befindet. Die verschiedenen Wellenlängen werden auf unterschiedliche Positionen des Kreises fokussiert, auf dem bis zu 60 Austrittsspalte mit Photomultipliern angeordnet sind, die die ankommende Strahlung simultan messen. Ein Ausweichen auf andere, eventuell nicht gestörte Linien eines Elements ist nicht möglich. Häufig wird das Spektrometer nach Paschen-Runge angeordnet.

Im sequentiellen Spektrometer wird ein Monochromator eingesetzt, wobei die häufig verwendete Czerny-Turner-Anordnung z. B. über Gitter mit 2400 Strichen pro mm verfügt. Da es nur einen Austrittsspalt gibt, werden die verschiedenen Emissionslinien nacheinander mit einem Schrittmotor abgefahren. Hiermit ist eine Ausweichmöglichkeit für eine gestörte Emissionslinie eines Analyten auf eine nicht gestörte Linie möglich. Im Fall von spektralen Störungen durch Emissionslinien von Matrixelementen ist diese Alternative sehr sinnvoll.

Der Nachteil eines sequentiellen Spektrometers liegt in dem erhöhten Zeitbedarf für die Analyse mehrerer Elemente, da die einzelnen Linien nacheinander zu messen sind [70].

Da manche Elemente, wie auch das hier untersuchte Sb (206,83 nm), ihre nachweisstärksten Spektrallinien in einem Wellenlängenbereich aufweisen, in welchem die Adsorption des Sauerstoffs zu stören beginnt (unterhalb etwa 250 nm), ist es notwendig, diese Störung durch Einführung einer Vakuumoptik auszuschalten. Im verwendeten Gerät herrscht im Vakuum ein Druck von 6,66 Pa.

4.2.3 Spektrale und nicht-spektrale Störungen

Als spektrale Störungen bezeichnet man die von analytfremden Teilchen hervorgerufenen Emissionen. Mit steigenden Elementkonzentrationen sind zwar intensivere, aber auch verbreiterte Linien zu erwarten; dadurch ist eine Überlappung an den Linienflanken mit benachbarten Linien zu erwarten. Auch ein direktes Zusammenfallen von Linien ist möglich, wenn die Wellenlängendifferenz eines wenig abgereicherten Matrix-Elements und des Analyten sehr klein ist. Dies kann eventuell durch ein besseres Auflösungsvermögen des Spektralapparates verhindert werden. Ist die Lösung stark matrixhaltig, ist eine quasikontinuierliche Untergrundanhebung nicht auszuschließen.

Durch Effekte wie Rekombinations-, Streu- oder Bremsstrahlung kann eine kontinuierliche Untergrundanhebung erfolgen. Unterhalb von 400 nm können Molekülbanden auftreten, die von unvollständig dissoziierten Verbindungen wie z. B. OH-, NH- oder NO-Fragmenten stammen. Bei hohen Analytkonzentrationen kommt es häufig zur Selbstabsorption oder Selbstumkehr. Wird aus einem heißen Atomdampf Licht emittiert, dann wird beim Erreichen der kälteren Randzonen von den dort vorliegenden, nicht angeregten Atomen elektromagnetische Strahlung absorbiert und geht folglich für die Analyse verloren. Es wird ein zu geringer Analytgehalt vorgetäuscht, die Kalibrationskurve zeigt im oberen Bereich eine Krümmung nach unten.

Die Aufnahme der Messsignale erfolgte in diesem Fall für das Sb bei einer Wellenlänge von 206,83 nm [87].

4.3 Kopplungstechniken

Für die Elementspeziesanalytik (siehe **Kapitel 2**), besonderes bei der Verwendung von Kopplungstechniken, steht eine Reihe verschiedener Trenn- und Detektionssysteme zur Verfügung. Eine entsprechende Auswahl kann angepasst an das analytische Problem getroffen werden. In **Kapitel 7** wird erläutert, dass die wichtigsten biologisch relevanten Antimonspezies in Lösung vor allem in anionischer Form vorliegen. Als Trennverfahren bietet sich daher die Ionenchromatographie (IC) an, aber für die Separation organischer Moleküle mit höheren Molmassen kann auch die Größenausschlusschromatographie (SEC) eingesetzt werden. Die Chromatographie wurde als on-Line-Kopplung mit den elementspezifischen Detektionssystemen ICP-MS und ICP-AES verbunden. Der instrumentelle Aufbau dieser Kopplungen wird in **Kapitel 4.3.1** weiter erläutert. Die Unterschiede sind aber für die verschiedenen chromatographischen Techniken oder Detektoren nicht wesentlich, sodass an dieser Stelle der allgemeine Analysenablauf vorgestellt werden kann.

4.3.1 HPLC-ICP-AES und HPLC-ICP-MS

Die Kopplung von chromatographischen Trennverfahren und elementspezifischen Detektoren ist für die Elementspeziesanalytik (ESA) im Spuren- und Ultraspurenbereich eine der wichtigsten, verwendeten Analysetechniken. In der vorliegenden Arbeit wurde eine Reihe

von Kopplungen von IC und SEC mit ICP-AES und ICP-MS für die Speziesanalytik des Antimons entwickelt.

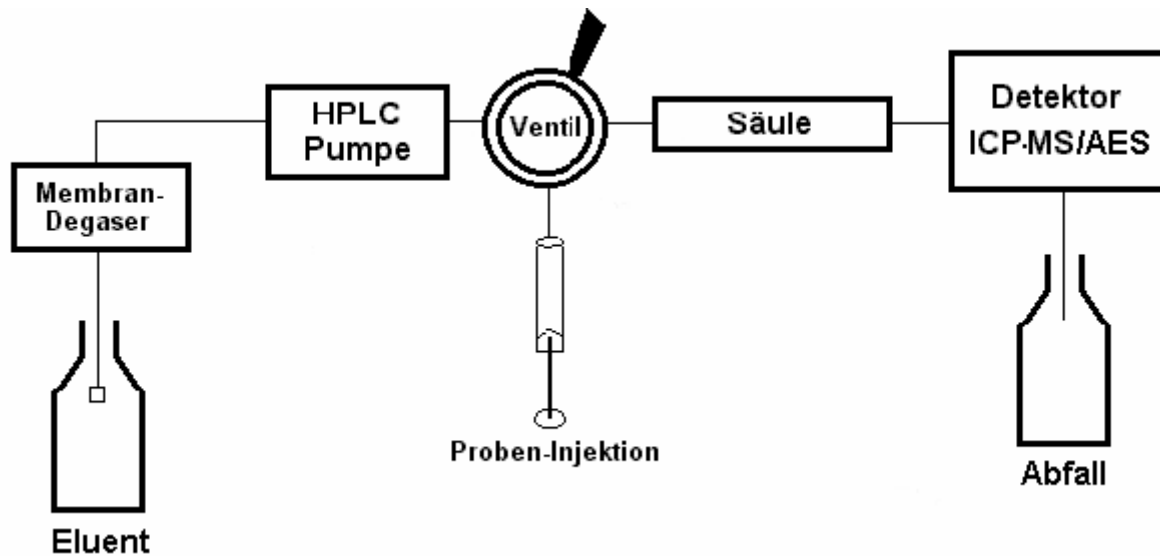


Abbildung 4-14: Schematischer Aufbau der Kopplung zwischen Chromatographie und elementenspezifischem Detektor. Es können verschiedene Eluenten eingesetzt werden. Säule: Ionen- oder Größenausschlusschromatographie

Für die Chromatographie konnten so eine Trennung und Quantifizierung der Antimonspezies innerhalb einer einzelnen Analyse realisiert werden. Der schematische Aufbau ist für alle Kopplungsverfahren ähnlich und wird in **Abbildung 4-14** gezeigt. Eine detaillierte Beschreibung der einzelnen Trenn- und Messprinzipien der chromatographischen Verfahren wurde in **Kapitel 3** und am Anfang **dieses Kapitels** gegeben. Einzelne wichtige Besonderheiten der Retentionsmechanismen für die Antimonspeziesanalytik sowie die genauen analytischen Parameter werden im Zusammenhang mit den Methoden im experimentellen Teil der vorliegenden Arbeit vorgestellt. Die Anwendung auf reale Proben folgt in dem **Kapiteln 10** und **11**.

5 Einführung in der Kapillarelektrophorese

Das Trennprinzip der Kapillarelektrophorese wurde schon Ende des letzten Jahrhunderts von Kohlrausch beschrieben. Elektrophorese wird definiert als Wanderung elektrisch geladener Teilchen in Lösung unter dem Einfluss eines angelegten elektrischen Feldes (**Abbildung 5-1**) [88]. Die geladenen Partikel und Moleküle bewegen sich jeweils in die Richtung der Elektrode mit entgegengesetztem Vorzeichen. Alle diese Partikel bewegen sich aufgrund ihrer unterschiedlichen Ladungen und Massen (Größe) mit unterschiedlicher Geschwindigkeit und werden so in einzelne Fraktionen separiert. Dieser Vorgang kann zur Trennung von Ionen aufgrund unterschiedlicher Ionenbeweglichkeit in der betreffenden Elektrolytlösung genutzt werden.

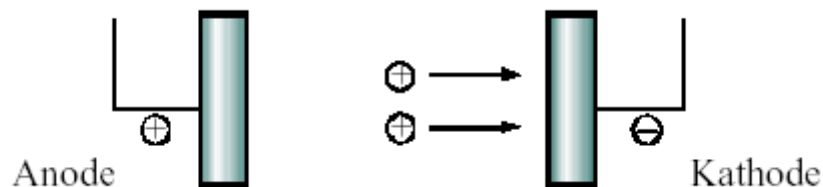


Abbildung 5-1: Schematische Darstellung der Elektrophorese [89]

Die Eigenschaften der Trennung und des resultierenden Elektropherogramms erinnern an die HPLC, doch der Trennmechanismus ist anders und weist folgende Besonderheiten auf [90]:

- die Kapillaren, in denen elektrophoretischen Trennungen finden in Kapillaren statt
- sehr hohe elektrische Felder, oft höher als 500 V/cm, werden eingesetzt
- Empfindlichkeit vergleichbar mit der GC
- für eine gute Trennung sind niedrige Proben- und Reagenzienmengen nötig
- kann ohne Probleme automatisiert werden

In der vorliegenden Arbeit wurde die Kapillarelektrophorese als weiteres Trennverfahren eingesetzt. Im folgenden werden die Grundlagen und der experimentelle Aufbau näher erläutert.

5.1 Grundlagen der Kapillarelektrophorese

Elektrophoretische Mobilität

Ursache aller elektrophoretischen Trennungen ist die unterschiedliche Migrationsgeschwindigkeit geladener Teilchen im elektrischen Feld. Die elektrische Feldstärke in der Kapillare ist eine Funktion der Spannung U und der Kapillarlänge L_{ges} :

$$E = U / L_{ges} \quad \text{Gleichung 5-1}$$

Die elektrische Kraft F_E , die ein Feld der Stärke E auf ein Teilchen der Ionenladung z ausübt, kann wie folgt erfasst werden:

$$F_E = z \cdot e \cdot E \quad \text{Gleichung 5-2}$$

e = Elementarladung des Elektrons ($e=1,602 \cdot 10^{-19} \text{C}$)

Der elektrischen Kraft F_E ist die Reibungskraft F_R entgegengerichtet. Diese kann nach Stokes für ein kugelförmiges Teilchen in Lösung durch folgende Gleichung beschrieben werden:

$$F_R = -6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r \cdot v \quad \text{Gleichung 5-3}$$

η = Viskosität der Lösung

r = hydrodynamischer Ionenradius

v = Lineare Wanderungsgeschwindigkeit des Ions

Die vektorielle Summe der Kräfte ist im Gleichgewicht Null und daher resultiert für jedes Ion eine spezifische Wanderungsgeschwindigkeit:

$$v = \frac{z \cdot e}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r} E \quad \text{Gleichung 5-4}$$

Durch Eliminierung der elektrischen Feldstärke aus **Gleichung 5-4** erhält man eine geräteunabhängige Größe, die in der Literatur als Ionenbeweglichkeit oder elektrophoretische Mobilität μ_{EP} bezeichnet wird.

$$\mu_{EP} = \frac{v}{E} = \frac{z \cdot e}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r} \quad \text{Gleichung 5-5}$$

μ_{EP} in $\text{cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$

Diese absolute Ionenbeweglichkeit ist lösungsmittel- und stoffspezifisch; sie wird, wie aus **Gleichung 5-5** ersichtlich, von dem Verhältnis zwischen der Ionenladung und Ionengröße geprägt. Die Ionen in Lösung bilden eine Solvathülle aus. Deshalb sollte für z die effektive Ionenladung verwendet werden, also die Ladung des Ions abzüglich des Anteils der umgebenden, entgegengesetzten geladenen Solvathülle. Das Ion zieht die Ionenatmosphäre aus Gegenionen bei der Wanderung im elektrischen Feld mit, wobei diese kugelsymmetrische Atmosphäre deformiert und sowohl die Wanderungsgeschwindigkeit und als auch die elektrophoretische Beweglichkeit reduziert wird. Diesen Effekt nennt man Relaxation. Es kommt zu einer Mobilitätsabsenkung hervorgerufen durch die innere Reibung [100].

Elektroosmotischer Fluss

Elektroosmose (s. **Abbildung 5-2**) ist einer der ältesten bekannten elektrokinetischen Effekte. Die Elektrophorese von Ladungsträgern bewirkt letztendlich auch den Fluss der gesamten Pufferlösung im elektrischen Feld. Dieser Effekt wird als elektroosmotischer Fluss (EOF) bezeichnet und überlagert die elektrophoretische Wanderung der Ionen. Ursache der Elektroosmose ist die Aufladung der inneren Kapillaroberfläche.

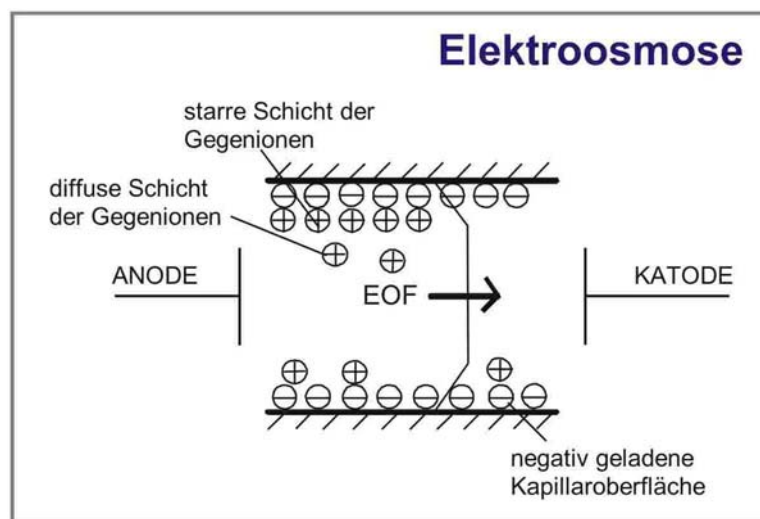


Abbildung 5-2: Ladungsverteilung in der Oberfläche [91]

In wässriger Lösung besitzen Festkörperoberflächen auf Glas- oder Quarzbasis meist eine negative Überschussladung, die auf Säure/Base-Gleichgewichten und auf der Adsorption von Ionen zurückzuführen ist. Die elektrostatischen Kräfte führen zu einer bevorzugten Anlagerung von Kationen aus der Elektrolytlösung an diese elektrostatisch anziehende Oberfläche. Es bildet sich eine elektrische Doppelschicht, bestehend aus einer starren und einer beweglichen, diffusen Grenzschicht aus. Die Verteilung der Ladung in der

Doppelschicht führt zur Ausbildung zweier Potentiale: ein lineares Potential in der starren Grenzschicht und ein exponentiell abfallendes Potential in der diffusen Grenzschicht. Dieses wird als ξ -(Zeta-)Potential bezeichnet und ist für die Elektroosmose verantwortlich.

An die Kapillare wird während der Kapillarelektrophorese ein elektrisches Feld angelegt, durch das die beweglichen Kationen der diffusen Schicht in Richtung der negativen Elektrode angezogen werden. Die entsprechenden Anionen an der Kapillarwand sind dagegen nicht beweglich. Die Kationen sind solvatisiert und ziehen deshalb die umgebenden Lösungsmittelmoleküle mit sich. Durch den kleinen Durchmesser der verwendeten Kapillare, kommen sich beide diffuse Schichten gegenüberliegender Kapillarabschnitte zur Mitte hin sehr nahe. Aus der Viskosität der Pufferlösung resultiert eine Bewegung des gesamten Elektrolyten, normalerweise in Richtung Kathode.

In der **Abbildung 5-3** sieht man einen Vergleich zwischen dem in der Kapillarelektrophorese sehr flachen Flussprofil (links), welches eine wesentlich geringere Bandenverbreiterung verursacht, und dem parabolischen Flussprofil bei den typischen hydrodynamischen Flüssen (rechts) in der HPLC.

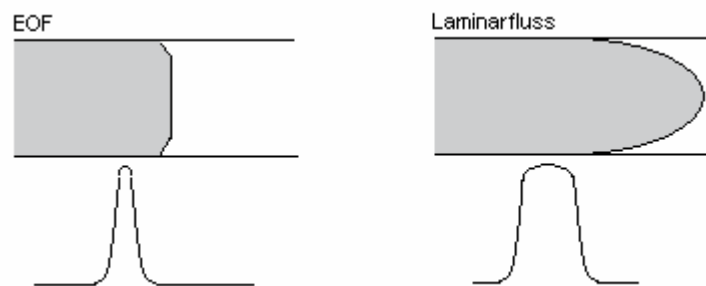


Abbildung 5-3: Fließprofile in der Kapillarelektrophorese (links) und HPLC (rechts)

Die Lineargeschwindigkeit des EOF (v_{EO}) wird durch die Helmholtz-Smoluchowski-Gleichung beschrieben:

$$v_{EO} = \frac{\varepsilon \cdot \xi}{4 \cdot \pi \cdot \eta} E = \frac{\varepsilon_0 \cdot \varepsilon_r \cdot \xi}{\eta} E \quad \text{Gleichung 5-6}$$

ξ = Zeta-Potential (Volt)

ε = absolute Dielektrizitätskonstante ($\varepsilon = 4 \cdot \pi \cdot \varepsilon_0 \cdot \varepsilon_r$)

ε_0 = elektrische Feldkonstante im Vakuum ($8,85 \cdot 10^{-12} \text{J}^{-1} \cdot \text{C}^2 \cdot \text{m}^{-1}$)

ε_r = Dielektrizitätskonstante (H_2O bei 25 °C)

Zur Variation des EOF können verschiedene experimentelle Parameter verwendet werden, wie z. B. die Ladung der Oberfläche an der Kapillarwand oder die Ionenstärke der verwendeten Pufferlösung.

Die Kationen bewegen sich mit dem EOF (Comigration), und man erhält für positiv geladene Moleküle sehr kurze Analysenzeiten, da sich elektrophoretische und elektroosmotische Geschwindigkeiten bei der Wanderung zum Detektor an der Kathodenseite addieren. (**Abbildung 5-4**) Die Anionen wandern in die entgegengesetzte Richtung des EOF (Contramigration) [100] (**Abbildung 5-5**). Auch sie werden jedoch zum Detektor an der Kathodenseite transportiert, wenn für die Anionen die Größe ihrer elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeit kleiner ist als die Strömungsgeschwindigkeit des EOF. Neutrale Teilchen werden mit der Geschwindigkeit des EOF transportiert. Dies wird in **Abbildung 5-4** dargestellt.

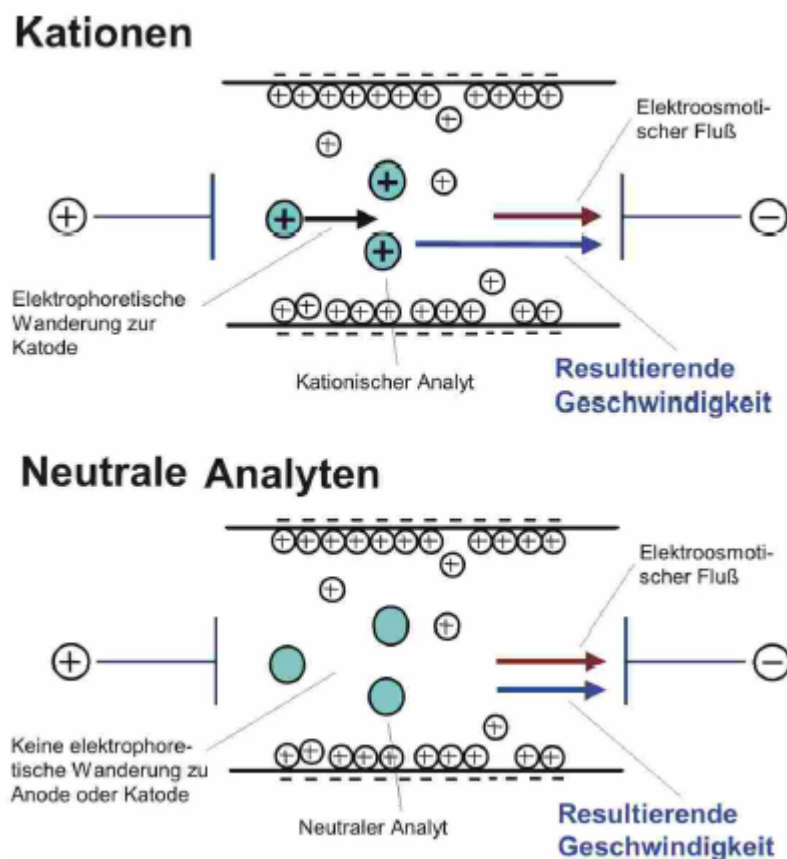


Abbildung 5-4: Wanderung der Kationen und neutralen Analyten in der Kapillare [91]

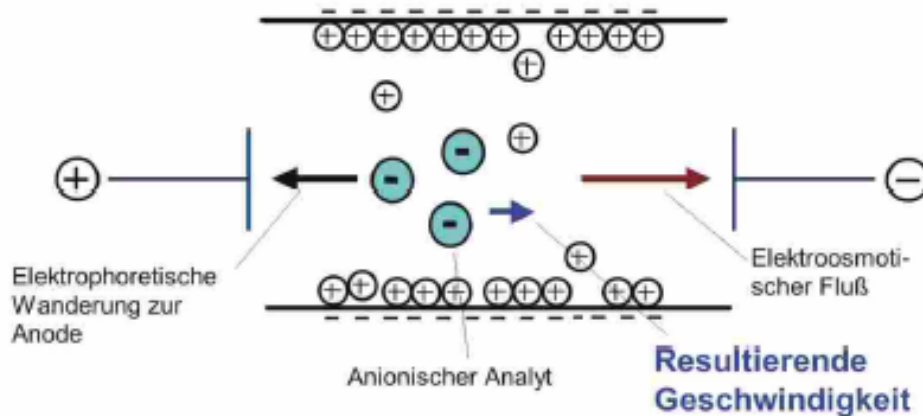


Abbildung 5-5: Wanderung der Anionen in der Kapillare bei Normalpolarität [91]

Effizienz und Auflösung

Ein Maß für die Signalbreite ist die Effizienz der Trennung, sie wird als theoretische Bodenzahl N bezeichnet. Die Bodenzahl lässt sich aus folgenden Größen berechnen, wie in **Gleichung 5-7** gezeigt wird:

$$N = \frac{L^2}{\sigma^2} \quad \text{Gleichung 5-7}$$

Während der Wanderung in der Kapillare, kann Diffusion, zur Peakdispersion (σ^2) beitragen, sie kann mit **Gleichung 5-8** berechnet werden. Es tragen noch viele andere Effekte zur Peakdispersion bei, aber bei optimierten Trennungen und gut arbeitender Technik sind die anderen Größen gegenüber der Diffusion (D_m : Diffusionskoeffizient) vernachlässigbar:

$$\sigma^2 = 2 \cdot D_m \cdot t = \frac{2 \cdot D_m \cdot L^2}{\mu_{EP} \cdot U} \quad \text{Gleichung 5-8}$$

Substituiert man die Peakdispersion in **Gleichung 5-8** mit Hilfe von **Gleichung 5-7**, folgt **Gleichung 5-9**:

$$N = \frac{\mu_{EP} \cdot U}{2 \cdot D_m} \quad \text{Gleichung 5-9}$$

Die Gleichung zeigt, dass mit Makromolekülen, wie Proteinen und DNA, die kleine Diffusionskoeffizienten (D) haben, hohe theoretische Bodenzahlen erhalten werden können. Die Verwendung hoher Spannungen verbessert die Effizienz bei einer Verkürzung der Trennzeit. Die praktische Spannungsgrenze derzeitiger Technologie ist 30 kV. Trotz deutlich

höherer Diffusionskoeffizienten kann die CE auch für die Trennung kleinerer Moleküle eingesetzt werden, weil μ_{EP} eine Funktion der Ladung und der Masse ist. Kleine Moleküle haben eine größere Beweglichkeit.

Aus **Gleichung 5-9** kann die Auflösung zweier benachbarter Peaks abgeleitet werden:

$$R = \frac{1}{4} \cdot \frac{\Delta\mu_{EP}}{\bar{\mu}_{EP}} \cdot \sqrt{N} \quad \text{Gleichung 5-10}$$

$\Delta\mu_{EP}$ ist die Differenz der elektrophoretischen Mobilitäten zwischen zwei benachbarten Spezies, $\bar{\mu}_{EP}$ ist der Mittelwert der elektrophoretische Mobilitäten der zwei Spezies und N ist die theoretische Bodenzahl. Wenn diese mit Hilfe von **Gleichung 5-10** substituiert wird, ergibt sich folgende Gleichung:

$$R = (0,177) \cdot \frac{\mu_{EP} \cdot \sqrt{U}}{\bar{\mu}_{EP} \sqrt{D_m}} \quad \text{Gleichung 5-11}$$

Diese Gleichung zeigt, dass eine Erhöhung der Spannung eine Verbesserung der Auflösung bedeutet.

5.2 Gerätetechnik

Die Kapillarelektrophorese-Systeme sind seit ca. 1988 kommerziell erhältlich. Ein Kapillarelektrophorese-System besteht aus einer Kapillare, zwei Elektrolytgefäßen, einer Hochspannungsquelle, zwei Elektroden und einer oder mehreren Detektionseinheiten.

5.2.1 Prinzipieller Aufbau

Die Kapillarelektrophorese ist, in bezug auf die zwingend erforderlichen Bauelemente, eine sehr einfache Technik, wenn man sie mit der HPLC oder GC vergleicht. Prinzipiell lässt sich mit einer Gleichstrom-Hochspannungsversorgung, zwei Platinelektroden, zwei Pufferreservoirs und einem on-Column-Detektor eine Trennung durchführen (**Abbildung 5-6**). Bei elektrophoretischen Trennungen sollte bei konstanter Spannung oder konstanter Stromstärke betrieben werden. Moderne CE-Geräte sind zusätzlich mit Probengeber und Fraktionssammler, hydrodynamischem Injektionssystem und effektiver Kapillarthermostatisierungseinheit ausgestattet. Die Detektion kann direkt innerhalb der

Kapillare erfolgen („online-Detektion“). Im folgenden werden die einzelnen Bauteile näher erläutert.

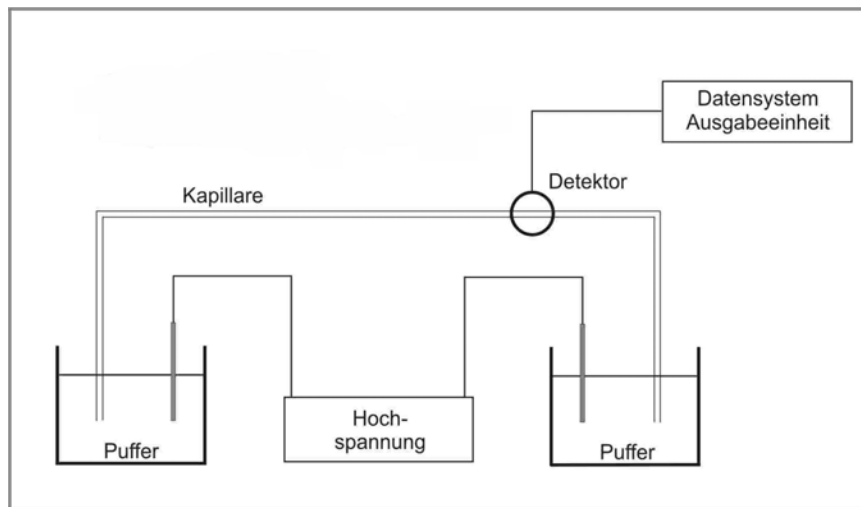


Abbildung 5-6: Schematischer Aufbau der Apparatur [91]

5.2.2 Spannungsquelle

Um die für die CE erforderliche hohe Feldstärke zu liefern, ist eine bis zu 30 kV regelbare Gleichspannungsquelle erforderlich. Sie sollte sowohl bei konstanter Spannung, als auch bei konstanter Stromstärke betrieben werden können. Grundsätzlich sind höhere Spannungen einsetzbar, führen in der Praxis aber zu Problemen: z. B. durch Entladungen durch Luftfeuchtigkeit oder über das Gehäuse. Je nach Anwendung findet die Detektion kathodenseitig bzw. anodenseitig statt, sodass die Polarität wählbar sein muss. Über abgeschirmte Kabel wird die Hochspannung an die Platinelektroden, die zusammen mit den Kapillarenden in die Puffergefäße tauchen, geleitet.

5.2.3 Kapillare

Das bei weitem am häufigsten eingesetzte Kapillarmaterial ist Quarz (fused silica). Daneben existieren auch Kapillaren aus Borsilikatglas oder Teflon, ein in der Isotachophorese seit langem verwendetes Material. Neben den mechanischen Anforderungen ist in erster Linie die UV-Transparenz für die Detektion bei der Materialauswahl limitierend. Die Notwendigkeit geringer Kapillardurchmesser für eine effiziente Wärmeableitung, die die Voraussetzung für die herausragende Trennleistung der Kapillarelektrophorese ist, wurde schon lange erkannt. Erst die technische Realisierung von Kapillaren mit geringem Innendurchmesser ermöglichte den Durchbruch der CE Anfang der 80er Jahre. Heute sind Kapillaren bis 5 μm I.D. technisch herstellbar. Die üblicherweise verwendeten Kapillaren liegen im Bereich von 50-100 μm I.D.

Um die mechanische Stabilität zu erhöhen, ist die fused-Silica-Kapillare auf der Außenoberfläche mit einer ca. 10 µm starken Polyimidschicht geschützt. Für die Detektion ist die nicht UV-transparente Polyimidschicht zu entfernen (durch Flamme oder Skalpell).

5.2.4 Probeaufgabe

Ein großes Problem in der Kapillarelektrophorese ist die reproduzierbare Probenaufgabe. Die Probenzonen sollten möglichst schmal bleiben, damit sie nicht zur Bandenverbreiterung beitragen. Das Volumen der Injektion muss zwischen 0,5 und 50 nL liegen. In den heutzutage verfügbaren Systemen, wird elektrokinetische, hydrodynamische oder hydrostatische Injektion verwendet.

Hydrostatische Injektion

Bei dieser Injektion wird durch das Anheben des Probengefäßes eine kontrollierte Druckdifferenz durch die Schwerkraft erzeugt. Durch die unterschiedliche Höhe der Flüssigkeitsspiegel in den Behältern am Ein- und Austrittsende der Kapillare entsteht ein Siphoneffekt, der die Probenlösung in die Trennkapillare saugt.

Druck-Injektion

Die Probenaufgabe erfolgt durch Anlegen einer Druckdifferenz. Diese wird im vorliegenden Fall durch einen Überdruck auf der Probenseite oder ein Vakuum auf der Detektionsseite erzeugt.

Elektrokinetische Injektion

Hier wird nach dem Eintauchen der Kapillare in das Probengefäß ein definiertes elektrisches Feld angelegt, durch das geladene Analyten in die Kapillare migrieren können. Die Wanderungsgeschwindigkeiten und damit die injizierten Probenmengen der einzelnen Substanzen differieren untereinander.

Hydrostatische Injektion und Elektrokinetische Injektion sind die Methoden, die in der vorliegenden Arbeit benutzt wurden.

Die injizierte Menge ergibt sich nicht allein durch die Konzentration der Probe in der Lösung, sondern wird durch die Konzentration aller in der Lösung vorhandenen Ionen beeinflusst. Mit zunehmendem Widerstand der Probe steigt die injizierte Menge der interessierenden Ionenart.

Wobei gegenüber der hydrodynamischen Probenaufgabe können unter Anwendung der elektrokinetischen Injektion aus wässrigen Lösungen Anreicherungsfaktoren größer als 100 erzielt werden. Dabei werden die Ionen durch die Unterschiede in der Leitfähigkeit zwischen Puffer und der wässrigen Probenlösung und den daraus resultierenden Unterschieden in der Feldstärke beschleunigt und konzentrieren sich an der Grenze zum Elektrolyten auf. Dieser Vorgang wird als „Elektro-Stacking“ bezeichnet. Die Reproduzierbarkeit sinkt jedoch mit zunehmendem Widerstand der Probenlösung, wodurch die quantitative Analyse beeinflusst wird.

Der Begriff „Sample Stacking“ fasst die verschiedenen Möglichkeiten zur online Anreicherung der Probenbestandteile in der Kapillare zusammen. Eine weitere Methode der Probenanreicherung besteht in dem Einsatz diskontinuierlicher Puffersysteme durch Ausnutzung isotachophoretischer Effekte. Bei der Isotachophorese (ITP) wird die eigentliche Probe zwischen einem Leitelektrolyten und einem Folgeelektrolyten aufgegeben (siehe **Kapitel 5.4.4**).

5.2.5 Detektionssysteme

Die geringen Probenmengen stellen hohe Anforderungen an die Detektion. Diese erfolgt entweder direkt in der Kapillare (online) oder bei der Kopplung an ein Massenspektrometer oder elektrochemische Detektoren außerhalb der Trennkapillare (offline). Am häufigsten werden optische Detektoren zur Messung der UV-Absorption, Emission von Fluoreszenzstrahlung oder Amperometrie verwendet. Die Detektion kann direkt oder indirekt sein (Dies wird in **Kapitel 5.3** weiter erklärt)

Die indirekte Detektion kann als universelle Detektion benutzt werden für Analyten die keine Eigenabsorption bei der Detektionswellenlänge besitzen.

5.3 Theorie der indirekten UV-Detektion

Obwohl verschiedene Detektionsmöglichkeiten in der Kapillarelektrophorese vorhanden sind und zum Teil auch kommerziell angeboten werden, stellt die UV-Detektion (**Abbildung 5-7**) immer noch die wichtigsten Detektionsart dar. Dies liegt einmal an der Verfügbarkeit guter, kommerziell erhältlicher UV-Detektoren in der CE. Die mangelnde Empfindlichkeit bei der Detektion von Substanzen mit kleinen molaren Extinktionskoeffizienten kann durch die

Möglichkeit der indirekten UV-Detektion ausgeschaltet werden. Die indirekte UV-Detektion kann mit einem absorbierenden Hintergrundelektrolyten ohne Modifikation des Detektors durchgeführt werden.

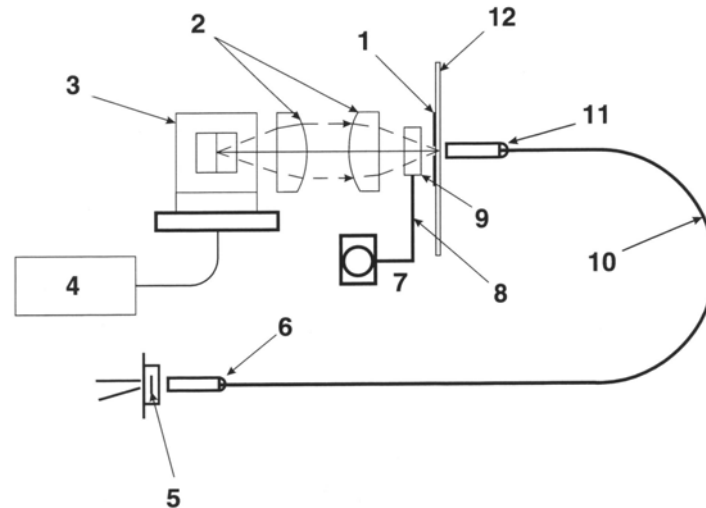


Abbildung 5-7: Diagramm der UV-Optik [92] Erläuterung der Bauteile: 1. Kapillarenapertur, 2. Quarzglaslinsen, 3. D₂ Lampe, 4. Stromversorgung der Lampe, 5. UV-Photodiode (Si), 6. Lichtleiteranschluss, 7. Motor, 8. Filterrad, mit 8 Positionen, 9. Filterposition (d.h. z. B. 214 µm), 10. Lichtleiterkabel, 11. SMA-Lichtleiteranschluss, 12. Kapillare.

Das Prinzip der indirekten UV-Detektion ist in der **Abbildung 5-8** dargestellt. Die Kapillare ist mit einem Hintergrundelektrolyten mit hoher UV-Absorption gefüllt, woraus ein Signal mit einer großen Grundabsorption resultiert. Gelangt eine Zone mit UV-inaktiven Analyten an den Detektor, wird die hohe Grundabsorption des Elektrolyten durch Verdrängung geschwächt. Wenn die Probezone den Bereich des Detektors verlassen hat, steigt die Absorption wieder auf ihren ursprünglichen Wert. Es entsteht somit ein Signal mit negativem Vorzeichen.

Die Größe der UV-Absorption wird durch das Lambert-Beersche Gesetz beschrieben. Damit dieses bei der online Detektion in der Kapillare seine Gültigkeit behält, muss die Konzentration des Elektrolyten so gewählt werden, dass der lineare Bereich des Detektors durch die Grundabsorption nicht verlassen wird [93]. Die Konzentration des Hintergrundelektrolyten besitzt außerdem einen Einfluss auf die dynamische Reserve DR, die Fähigkeit, kleine Änderungen in der Absorption gegenüber einer hohen Grundabsorption festzustellen. Unter der dynamischen Reserve versteht man das Verhältnis zwischen der

Grundabsorption des Elektrolyten und dem Hintergrundrauschen. Die DR besitzt somit einen Einfluss auf die Detektionsempfindlichkeit des Systems.

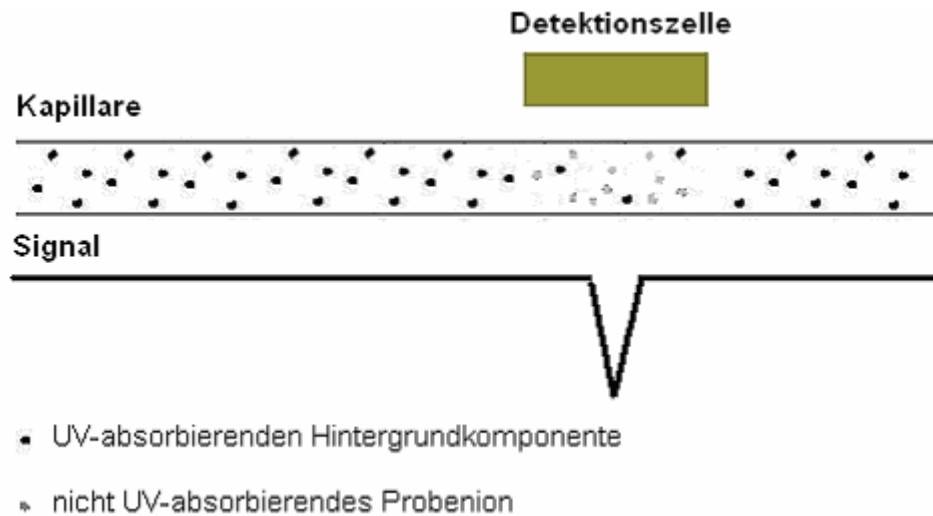


Abbildung 5-8: Prinzip der indirekten UV-Detektion

Die erreichbare Nachweisgrenze C_{Lim} ergibt sich nach Yeung [94] zu:

$$C_{Lim} = \frac{C_m}{DR \cdot TR} \quad \text{Gleichung 5-12}$$

Wobei C_m die Konzentration der UV-absorbierenden Elektrolytkomponente und TR das Verdrängungsverhältnis (Transfer Ratio) zwischen Analyt und Hintergrundelektrolyt darstellt. Die Empfindlichkeit nimmt folglich mit wachsendem TR zu. Bei niedrigen Elektrolytkonzentrationen können die größten Änderungen des Signals durch eine bestimmte Anzahl an Probemolekülen erhalten werden. Diese Aussagen beschränken sich nicht allein auf die indirekte UV-Detektion, sondern lassen sich allgemein auf indirekte Detektionsverfahren anwenden. Es handelt sich jedoch nur um eine stark vereinfachte Modellvorstellung, die nur in Abwesenheit eines elektrischen Feldes Gültigkeit besitzt. In Gegenwart eines elektrischen Feldes wird die Nachweisempfindlichkeit für eine bestimmte Ionensorte maßgeblich durch die Elektrodispersion bestimmt.

Die durch den Hintergrundelektrolyten verursachte Extinktion E_1 ergibt sich nach Lambert-Beer zu:

$$E_1 = \varepsilon_E \cdot c_E \cdot d \quad \text{Gleichung 5-13}$$

Wobei ε_E den molaren Absorptionskoeffizienten, C_E die Konzentration der UV-absorbierenden Hintergrundsubstanz und d den Innendurchmesser der Kapillare darstellt. Die Extinktion E_2 des Analyten ist dem molaren Absorptionskoeffizient ε_A und der Konzentration C_A in der Probezone proportional: Die Verminderung der Extinktion E_3 , welche durch die Verdrängung der Elektrolytmoleküle durch die Probe verursacht wird, ist von der Konzentration des UV-absorbierenden Hintergrundelektrolyten nicht abhängig.

$$E_2 = \varepsilon_A \cdot c_A \cdot d \quad \text{Gleichung 5-14}$$

$$E_3 = \varepsilon_E \cdot c_A \cdot d \quad \text{Gleichung 5-15}$$

Betrachtet man monovalente Ionen unter der Annahme einer 1:1 Verdrängung ergibt sich das resultierende Signal S aus der Differenz von E_2 und E_3 .

$$S = E_2 - E_3 = \varepsilon_A \cdot c_A \cdot d - \varepsilon_E \cdot c_A \cdot d \quad \text{Gleichung 5-16}$$

$$S = (\varepsilon_A - \varepsilon_E) \cdot c_A \cdot d \quad \text{Gleichung 5-17}$$

Die Größe des Signals ist nach **Gleichung 5-17** folglich unabhängig von der Konzentration des Hintergrundelektrolyten. Die schematische Darstellung der Signalentstehung ist in **Abbildung 5-9** aufgeführt.

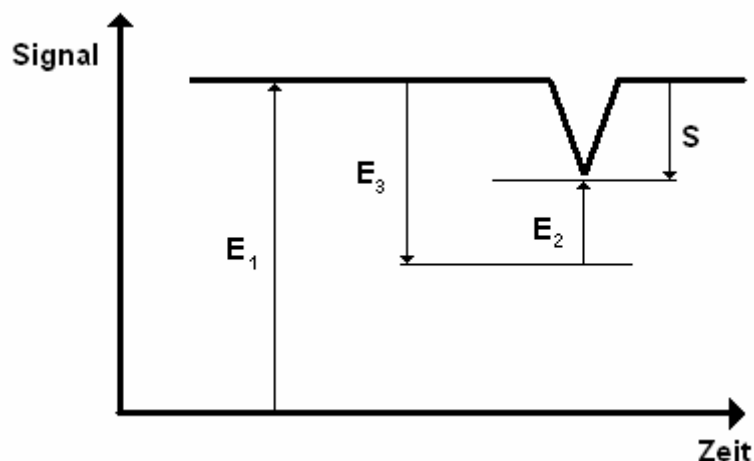


Abbildung 5-9: Schemat. Darstellung der Signalentstehung in der indirekten UV-Detektion

Geht man zu mehrfach geladenen Ionen über und betrachtet die Verdrängung von Elektrolytmolekülen der Ladung y durch Probeionen der Ladung x , ergibt sich die Verminderung der Extinktion E_3 zu:

$$E_3 = \frac{x}{y} \cdot \varepsilon_E \cdot c_A \cdot d \quad \text{Gleichung 5-18}$$

Durch Einsetzen von **Gleichung 5-18** in **Gleichung 5-16** erhält man das Signal der indirekten UV-Detektion.

$$S = \left(\varepsilon_A - \frac{x}{y} \cdot \varepsilon_E \right) \cdot c_A \cdot d = \varepsilon \cdot \left(\frac{\varepsilon_A}{\varepsilon_E} - \frac{x}{y} \right) \cdot c_A \cdot d \quad \text{Gleichung 5-19}$$

Aus **Gleichung 5-19** wird ersichtlich, dass die Größe des Signals dem molaren Absorptionskoeffizienten des Hintergrundelektrolyten proportional ist. Bei der Analyse nicht UV-absorbierender Ionen ($\varepsilon_A=0$) werden negative Signale erhalten. Positive Peaks werden dann erhalten, wenn die UV-Absorption der Analyten der Detektionswellenlänge so groß ist, dass $\varepsilon_A / \varepsilon_E > x/y$ wird. Wird $\varepsilon_A / \varepsilon_E = x/y$, resultiert kein Signal. Durch Veränderung der Detektionswellenlänge kann dennoch ein Peak erhalten werden. Die Größe des Signals nimmt mit wachsendem Unterschied zwischen ε_E und ε_A zu.

Die Nachweisempfindlichkeit ergibt sich jedoch nicht allein durch die Höhe des Signals, sondern vielmehr durch das Verhältnis zwischen Signal und Rauschen (S/N). In der Ionenchromatographie wird das Rauschen fast ausschließlich von der Absorption des Hintergrundelektrolyten bestimmt:

$$N = n \cdot \varepsilon_E \cdot c_E \cdot d \quad \text{Gleichung 5-20}$$

n: Konstante

Bei der online Detektion in der Kapillarelektrophorese liegen im Vergleich zur HPLC andere Dimensionen vor. In der CE können durch den kürzeren Lichtweg zwischen 10 und 100 μm nur kleinere Signale erhalten werden. Zusätzlich kommt es bedingt durch die Kapillargeometrie zu vermehrtem Auftreten von Streulicht. Folglich können apparative Beiträge zum Rauschen in der Kapillarelektrophorese nicht mehr vernachlässigt werden. Das Rauschen besteht somit aus der Summe des Beitrages durch den Detektor und dem Rauschen, welches durch die Absorption des Hintergrundelektrolyten verursacht wird [95]. Die Gleichung für das Rauschen muss somit durch eine additive Konstante n_D ergänzt werden [96].

$$N = n \cdot c_E \cdot \varepsilon_E \cdot d + n_D \quad \text{Gleichung 5-21}$$

Die beiden Konstanten n und n_0 lassen sich für die jeweiligen Detektoren experimentell durch die Abhängigkeit des Rauschens bei der Grundabsorption des Elektrolyten vom Innendurchmesser der Kapillare bestimmen.

Im Gegensatz zur HPLC wird in der Kapillarelektrophorese die Verdrängung der Pufferionen durch die Analyten nicht nur durch das Verhältnis der Ladungen bestimmt [97]. Unter dem Einfluss eines elektrischen Feldes ergibt sich nach Kohlrausch [98] die Änderung der Konzentration des UV-absorbierenden Hintergrundions, welche durch die Analytkonzentration c_A verursacht wird aus folgender Gleichung:

$$dc_E = -\frac{x}{y} \cdot \frac{\mu_E \cdot (\mu_A + \mu_C)}{\mu_A \cdot (\mu_E + \mu_C)} c_A \quad \text{Gleichung 5-22}$$

Wobei μ die Mobilität des Analyten (μ_A), des Hintergrundelektrolyten (μ_E) und dessen Gegenion (μ_C) symbolisiert. Die Kohlrauschsche Regulierungsfunktion (**Gleichung 5-22**) führt nicht nur zum Auftreten der Elektrodispersion bei Mobilitätsunterschieden zwischen Analyt und Hintergrundelektrolyt [99], sondern beeinflusst auch das Verdrängungsverhältnis. Folglich kann auch im Fall monovalenter Ionen eine 1:1 Verdrängung nur dann auftreten, wenn die Mobilität zwischen Probeion und Elektrolyt übereinstimmt. Mobilitätsunterschiede zwischen Analyt und Hintergrundelektrolyt lassen sich jedoch in der Praxis nicht vermeiden, da es für ein komplexes Probengemisch nur einen optimierten Mobilitätswert des Hintergrundelektrolyten geben kann. Es muss somit ein Verdrängungsverhältnis TR eingeführt werden, welches die Abweichung vom idealen Verhalten ($TR=1$) berücksichtigt.

Das Signal der indirekten UV-Detektion in der CE kann somit mit folgender Gleichung beschrieben werden:

$$S = a \cdot \left(\varepsilon_A - TR \cdot \frac{x}{y} \cdot \varepsilon_E \right) \cdot c_A \cdot d \quad \text{Gleichung 5-23}$$

Eine Berücksichtigung der unterschiedlichen Bauweise und Qualität von Detektoren verschiedener Hersteller erreicht man durch die Einführung der Detektorkonstante a . Diese lässt sich durch den Vergleich zwischen dem theoretisch erwarteten und tatsächlich gemessenen Signal des Hintergrundelektrolyten S_E bestimmen.

$$a = \frac{S_E}{\varepsilon_E \cdot c_E \cdot d}$$

Gleichung 5-24

Folglich ergibt sich für das Verhältnis zwischen Signal und Rauschen (S/N) der indirekten UV-Detektion in der Kapillarelektrophorese:

$$\frac{S}{N} = \frac{a \cdot \left(\varepsilon_A - TR \cdot \frac{x}{y} \cdot \varepsilon_B \right) \cdot c_A \cdot d}{n \cdot c_E \cdot \varepsilon_B \cdot d + n_D} = \frac{a \cdot \left(\frac{\varepsilon_A}{\varepsilon_E} - TR \cdot \frac{x}{y} \right) \cdot c_A}{n \cdot c_E + \frac{n_D}{\varepsilon_{E \cdot d}}}$$

Gleichung 5-25

Wie aus **Gleichung 5-25** hervorgeht, wird die Empfindlichkeit der indirekten UV-Detektion maßgeblich durch den Innendurchmesser der Kapillare bestimmt. In einem gegebenen Trennsystem jedoch kann die Empfindlichkeit durch die Wahl der Detektionswellenlänge und somit durch die Variation von $\varepsilon_A/\varepsilon_E$ optimiert werden. Da in den meisten Fällen die Absorption der Analyten gegenüber der Absorption des Hintergrundelektrolyten zu vernachlässigen ist, wählt man am günstigsten das Absorptionsmaximum des Elektrolyten als Detektionswellenlänge.

Für die Berechnung des Verhältnisses zwischen Signal und Rauschen in der CE muss nach der experimentellen Bestimmung der Konstanten a, n, n_D auch der Wert für das Verdrängungs-verhältnis TR bestimmt werden.

5.4 Arten der Kapillarelektrophorese

Unter dem Obergriff „Kapillarelektrophorese“ werden verschiedene Trenntechniken zusammengefasst. Kapillarzonenelektrophorese (CZE) ist eines der zurzeit am häufigsten eingesetzten Verfahren, bei der die Trennung der Probe in Kapillaren mit homogen zusammengesetztem Elektrolyt durchgeführt wird. Grundlage ist die Mobilitätsdifferenz der einzelnen ionischen Analyten. Die Kapillargelelektrophorese (CGE) ist zur Trennung von Makromolekülen geeignet. Die Kapillaren sind hier mit einem Gel oder einer Polymerlösung gefüllt, die die Migration der geladenen Makromoleküle je nach ihrer Größe behindert. Andere elektrophoretische Verfahren sind die mizellare elektrokinetische Kapillarchromatographie (MEKC) (mit der auch ungeladene Moleküle getrennt werden können), die Isotachophorese (ITP), die Elektrochromatographie (EC) (hier ist die

Trennkapillare mit stationären Phasen aus der HPLC gefüllt) oder die isoelektrische Fokussierung (IEF) [100]. Im folgenden wird die Kapillarzonenlektrophorese, die in dieser Arbeit eingesetzt wurde, weiter erläutert.

5.4.1 Kapillarzonenlektrophorese

Die Kapillarzonenlektrophorese (CZE) ist die einfachste Art der CE [90]. In der Zonenlektrophorese findet die Trennung der Analytionen auf Grund von Mobilitätsunterschieden statt, d. h. sowohl die Größe als auch die Ladung des Teilchens sind für die Trennung entscheidend. Das Trennprinzip der CZE und die elektrophoretische Migration mit unterschiedlichen Mobilitäten wurde bereits in **Kapitel 5.1** beschrieben.

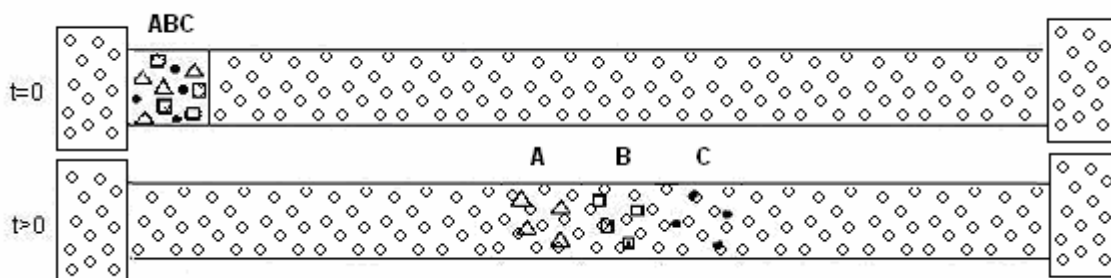


Abbildung 5-10: Trennprozess in der CZE [101]

Diese Methode wird in der vorliegenden Arbeit benutzt für die Qualifizierung und Quantifizierung der Antimonspezies. In diesem Fall wurden erst Sb-Standards und dann biologische Proben mit der Kapillarelektrophorese untersucht. Die genauen Arbeitsbedingungen werden im **Kapitel 9** konkreter dargestellt. Die Detektion der getrennten Anionen erfolgte durch indirekte UV-Detektion bei 214 nm.

Die Kapillare ist mit einem einheitlichen Elektrolytssystem gefüllt, um den Stromtransport zu gewährleisten und um eine einheitliche Feldstärke und einen konstanten pH-Wert aufrecht zu erhalten. Die Trennung von Anionen erfolgt mit der normalen Kapillarzonenlektrophorese, d. h. mit dem Probenaufrag auf der Anodenseite und der Detektion auf der Kathodenseite, wobei die Analytionen unabhängig von einander gegen den EOF wandern. Sie werden bei entsprechenden Mobilitätsunterschieden voneinander getrennt. Anionen mit hoher elektrophoretischer Mobilität sind deshalb nicht detektierbar, da sie, wie in **Kapitel 5.1** gezeigt, nicht in Richtung der Kathode wandern, weswegen eine Umpolung der Spannungsquelle nötig wird. Die langsamen Anionen wandern jedoch nach der Injektion mit

dem EOF ins Kathodengefäß. Der EOF lässt sich z. B. durch Zugabe von kationischen Tensiden mit quaternären Ammoniumgruppen umkehren. Das Tensid lagert sich an der Kapillarwand an und diese wird positiv geladen, sodass der EOF zur Anode gerichtet ist. Dann wandern die Anionen jetzt mit dem EOF in Richtung Anode, und die Trennung schneller und langsamer Anionen erfolgt in wenigen Minuten bei negativer Polung der Spannungsquelle. Das Trennprinzip ist in **Abbildung 5-10** skizziert.

Die Identifikation der Peaks erfolgt, wie in der Chromatographie, entweder durch Vergleich der Migrationszeiten von Standard und Probe oder durch Aufstocken der Probelösung mit einem entsprechenden Elektrolytstandard.

Die einfachste Optimierungsstrategie beginnt bei der Auswahl des pH-Werts des Puffersystems. Da sich die effektive Mobilität eines Analyten mit dem Dissoziationsgrad ändert, ist die größte Mobilitätsänderung bei dem pH-Wert zu beobachten, der dem pK-Wert des Analyten entspricht.

Der Trennung der Analyten wirkt die Peakverbreiterung entgegen, die in der CZE im Idealfall nur durch longitudinale Diffusion verursacht wird und dadurch sehr gering ist. Unter der Voraussetzung, dass das Eingangsprofil unendlich schmal ist, ist die örtliche Varianz σ_z^2 der Konzentrationsverteilung durch die Einstein-Gleichung bestimmt:

$$\sigma_z^2 = 2 \cdot D \cdot t \quad \text{Gleichung 5-26}$$

Wobei D der Diffusionskoeffizient ist und t die Zeit.

Wenn man wie in der Chromatographie das Konzept der theoretischen Trennstufen auf die Peakverbreiterung in der CZE anwendet, kommt man zu folgendem Ausdruck für die Anzahl der theoretischen Trennstufen N:

$$N = \frac{u \cdot U}{2 \cdot D} \quad \text{Gleichung 5-27}$$

Mobilität u und Diffusionskoeffizient D sind jedoch über die Nernst-Einstein-Beziehung wie folgt verknüpft:

$$\frac{D}{u} = \frac{k \cdot T}{z \cdot e}$$

Gleichung 5-28

Wobei T die absolute Temperatur und k die Boltzmann-Konstante ist. Einfügen der Nerst-Einstein-Beziehung in den Ausdruck für die Anzahl der theoretischen Trennstufen führt zu:

$$N = \frac{z \cdot e}{2 \cdot k \cdot T} U$$

Gleichung 5-29

Man erkennt aus dieser Gleichung, dass in der CZE die Anzahl der theoretischen Trennstufen nur von der Spannung U, die an die Kapillare angelegt wird (und nicht von der Länge) und von der Ladungszahl des Analyten als einzige substanzspezifische Größe abhängt.

In der Praxis wird jedoch in vielen Fällen nicht die maximale Bodenanzahl erreicht, da noch andere Beiträge zur Peakdispersion auftreten, z. B. durch Temperaturgradienten, Adsorption der Analyten an der Kapillarwand, Injektion und Detektion oder durch Elektrodispersion auf Grund von größeren Mobilitätsunterschieden zwischen Analyt und Pufferion. Die gesamte Varianz σ^2 der Konzentrationsverteilung ergibt sich aus der Summe der Varianzen der Einzelbeiträge [101].

5.4.2 Mizellare elektrokinetische Kapillarchromatographie (MEKC)

Das Verfahren stellt eine Erweiterung der elektrophoretischen Trenntechniken auf ungeladene Analyten dar. Die Durchführung dieser Technik ist auf allen üblichen Elektrophoresesystemen möglich. Dazu erforderlich ist nur der Zusatz geladener Tenside zum Elektrolytpuffer.



Abbildung 5-11: Schema polar/unpolar am Beispiel von SDS (Natriumdodecylsulfat) [100]

Wie in der **Abbildung 5-11** dargestellt, sind Tenside nieder- bis mittelmolekulare amphiphile, grenzflächenaktive Verbindungen, die als hydrophoben Molekülteil mindestens einen Kohlenwasserstoffrest mit 8 bis 20 Kohlenstoffatomen und als hydrophilen Molekülteil geladene oder ungeladene polare Gruppen enthalten.

Durch die asymmetrische Molekülstruktur bilden Tenside oberhalb einer bestimmten Konzentration Assoziationskolloide mit einem Durchmesser von 3-6 nm, die Mizellen genannt werden. Die hierbei entstehenden, negativ geladenen Mizellen wandern elektrophoretisch in Richtung Anode. Die neutralen Analytmoleküle verteilen sich zwischen dem Puffer (Transport durch den Elektroosmotischen Fluss (EOF) in Richtung Kathode) und dem Inneren der Mizelle [100] (**Abbildung 5-12**).

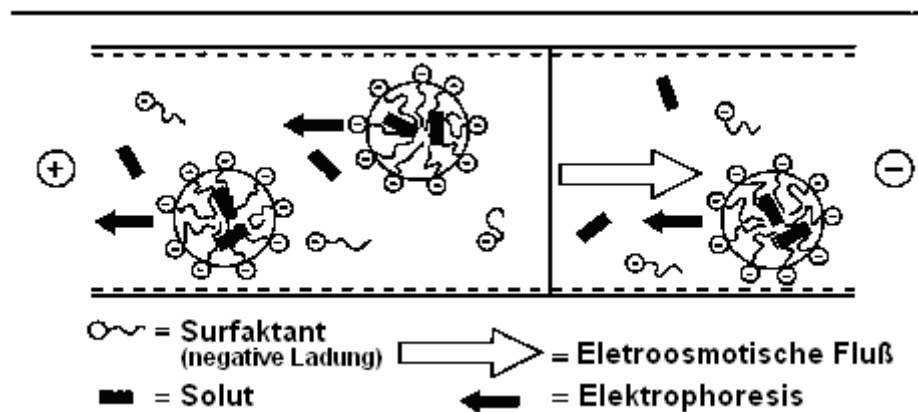


Abbildung 5-12: Der Trennprozess in der MEKC [102]

Die Mizellen bilden im Puffer mit ihrem ausgeprägten lipophilen Innenraum eine Phase, die in ihren Eigenschaften mit einer stationären Phase aus der HPLC vergleichbar ist. Aufgrund ihrer Eigenbeweglichkeit im elektrischen Feld wird sie als pseudo-stationäre Phase bezeichnet.

Die Trennung ungeladener Analyten erfolgt in der MECK generell durch die stoffspezifische polaritätsabhängige Verteilung zwischen der polaren wässrigen Phase und dem unpolaren Inneren der Mizelle, sodass es sich in diesem Fall um ein echtes chromatographisches Verfahren handelt. Neben der Lipophilie ist die Eigenladung dieser Aggregate als zweite Grundvoraussetzung an den Einsatz als pseudo-stationäre Phase geknüpft. Häufig wird SDS (**Abbildung 5-12**) eingesetzt. Die hierbei entstehenden negativ geladenen Mizellen besitzen eine elektrophoretische Mobilität in Richtung der Anode. Die neutralen Analytmoleküle verteilen sich zwischen dem Puffer (Transport durch EOF in Richtung Kathode) und dem Inneren der Mizelle. Wie in der CZE ergibt sich die effektive Wanderungsgeschwindigkeit der Analytmoleküle sowie der Mizellen aus der vektoriellen Summe der elektrophoretischen Wanderung und der elektroosmotischen Geschwindigkeit. Die elektrophoretische Mobilität ist gering, sodass bei Überlagerung mit dem elektroosmotischen Fluss eine Nettobewegung in Richtung der Kathode resultiert.

5.4.3 Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese auf Platten ist eine der am häufigsten verwendeten Trennmethode in der Biochemie. Damit ist die Trennung einer großen Anzahl verschiedener Makromoleküle möglich. Die Mobilität der Moleküle im Gel hängt von der Molekülgröße und dem Vernetzungsgrad des Gels ab. Die Anwendung der Kapillargelelektrophorese hat gegenüber den klassischen Verfahren den Vorteil, dass 10 bis 100 mal stärkere elektrische Felder eingesetzt werden können, ohne dass es zu störenden Effekten durch Erwärmung kommt. Die direkte Detektion und die Automatisierung des Verfahrens ist möglich (**Abbildung 5-13**).

Die Gele unterscheiden sich in ihrer Viskosität, Stabilität im elektrischen Feld sowie in der Porenstruktur und der Porengröße.

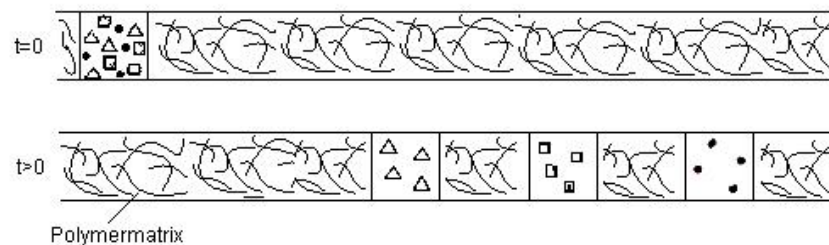


Abbildung 5-13: Trennung von ionischen Biopolymeren nach der Molekülgröße [100]

Hauptsächlich werden Gele auf Acrylamid-Basis sowie Agarosegele eingesetzt. Diese Gele sind antikonvektive Medien mit sehr geringer Diffusion von Analytmolekülen und können in Gele mit unterschiedlichem Grad an Quervernetzung und Gele, die nur aus Monomerbausteinen aufgebaut sind, unterteilt werden. Quervernetzte Polyacrylamid-Gele werden durch Copolymerisation von Acrylamiden und einem „Vernetzter“ hergestellt. Die Gele werden in der Kapillare mit dem Trennpuffer polymerisiert. Der Zusammenhalt der Monomerbausteine (Lineare Polyacrylamide (LPA)) basiert auf physikalischen Wechselwirkungen. Die LPA sind flüssig und können nach jeder Trennung durch Spülen der Kapillare ausgetauscht werden [100].

Das Hauptanwendungsgebiet dieser Methode ist die Trennung von DNA-Molekülen.

5.4.4 Isotachophorese

In der Elektrophorese mit gleicher Geschwindigkeit oder Isotachophorese wird ein diskontinuierliches Puffersystem (Puffer 1 enthält ein Leition (L), z. B. Chlorid, mit hoher

Beweglichkeit und Puffer 2, ein Folgeion (T), z. B. Glycin, mit niedriger Beweglichkeit) verwendet, wobei in beiden Puffern das gleiche Gegenion verwendet wird. Die zu trennenden Moleküle mit Mobilitäten zwischen Leit- und Folgeion werden an der Grenze zwischen den beiden Puffern aufgegeben.

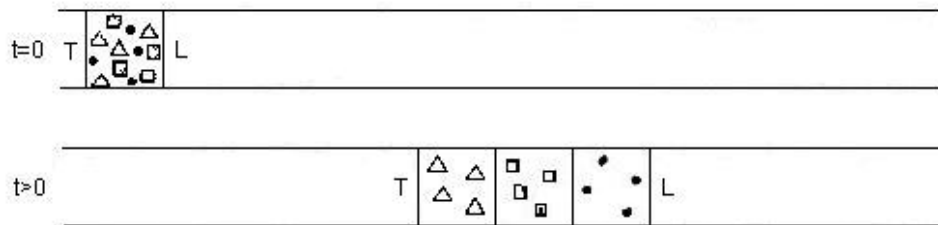


Abbildung 5-14: Schematische Darstellung der ITP [100]

Im elektrischen Feld werden auf Grund des stufenförmigen Feldstärkegradienten alle Ionen mit gleicher Geschwindigkeit wandern, sodass keine Lücke zwischen den getrennten Probezonen entstehen kann. Im Bereich der Leitonen stellt sich eine niedrige, im Bereich der Folgeionen dagegen eine hohe Feldstärke ein. Also bewegen sich die Proben in einem Feldstärkegradienten, der sich während des Laufes zu einem stufenförmigen Feldstärkeverlauf entwickelt.

Die ITP (**Abbildung 5-14**) wurde früher für die Trennung anorganischer Ionen und organischer Carbonsäuren benutzt, da es aber Schwierigkeiten gab, geeignete Elektrolyten zu finden und auch Detektionsprobleme auftauchten, hat sich die ITP nicht weiter durchgesetzt.

5.4.5 Isoelektrische Fokussierung

Die isoelektrische Fokussierung (IEF) ist ein hochauflösendes elektrophoretisches Trennverfahren für zwitterionische und amphotere Proben, wie Proteine oder Peptide, die sich in ihrem isoelektrischen Punkt (pI-Wert) unterscheiden. Der isoelektrische Punkt zeigt an, bei welchem pH-Wert eine amphotere Substanz nach außen hin elektrisch neutral ist und somit im elektrischen Feld nicht mehr wandert. Dieser pI-Wert ist eine stoffspezifische Größe. Für die Trennung nach den pI-Werten ist ein pH-Gradient in der Trennstrecke erforderlich, der den gewünschten Bereich der pI-Werte überstreicht.

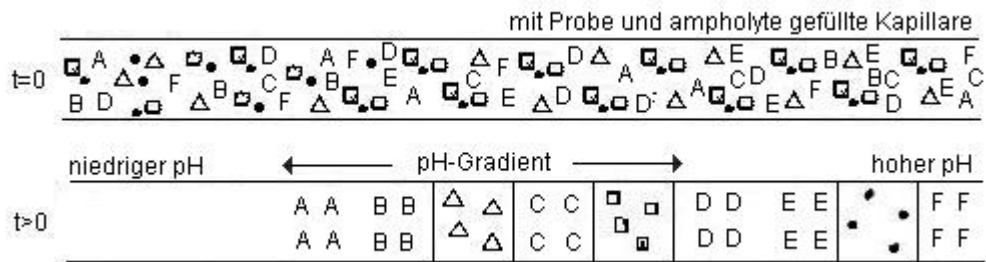


Abbildung 5-15: Schematische Darstellung der IEF [100]

Der pH-Gradient wird in der Kapillare durch eine Ampholytmischung erzeugt, welche eine Reihe von pI-Wert zwischen einem niedrigen und einem hohen pH-Wert und eine gute Pufferfunktion aufweist. Die Pufferfunktion wird durch amphotere Substanzen, wie z. B. Aminocarbonsäuren mit unterschiedlichen Verhältnissen an Amino- und Carbonsäuregruppen erreicht [102]. Je nach Art der verwendeten Ampholyte können unterschiedlich große pH-Wert-Bereiche abgedeckt und der pH-Gradient so dem Trennproblem angepasst werden. Nach der angelegten Spannung ordnen sich die Ampholyte aufgrund des Protonen- und Hydroxidioneneinflusses entsprechend ihrer pI-Werte an, und es bildet sich ein stabiler pH-Gradient über die gesamte Trennstrecke aus.

Die Ausbildung des pH-Gradienten in Folge des Protonen- bzw. Hydroxidioneneinflusses ist in **Abbildung 5-15** dargestellt.

Die aufgegebenen amphoterer Probenbestandteile wandern im elektrischen Feld entsprechend ihrer Ladung bis zu dem Punkt, an dem der sich einstellende pH-Wert ihrem isoelektrischen Punkt entspricht. Nachdem dort ihre Nettoladung gleich Null ist, wandern sie nicht mehr weiter, sondern bilden eine schmale, stabile Zone. Dies beruht auf der fokussierenden Eigenschaft des pH-Gradienten, der keine Bandenverbreiterung durch Diffusion zulässt. Nach der Fokussierung befinden sich Ampholyte und Probenbestandteile über die Kapillare verteilt. In der Flachbett-IEF muss die Detektion durch Anfärben der getrennten Zonen entweder elektrokinetisch durch den EOF oder durch Anlegen einer Druckdifferenz am Detektor vorbeigeführt werden.

Die Anwendungen dieser Trennmethode sind nützlich zur Bestimmung des pI-Wertes eines Proteins oder für die Trennung von Immunglobulinen, Hämoglobin-Spezies oder Posttranslationsmodifikationen von Protein-Rekombinanten [102].

5.5 Parameter zur Optimierung elektrophoretischer Trennungen

Um die Auflösung der Probenkomponenten zu optimieren, können eine Vielzahl von Parametern variiert werden, die mehr oder weniger stark die Trennung beeinflussen:

Tabelle 5-1: Möglichkeiten zur Veränderung der Trennung durch die Apparatur und die Veränderung der chemischen Eigenschaften des Systems.

Apparative Parameter	
Kapillarlänge	30-50 cm (10-70 cm)
Kapillar-Innendurchmesser	50/75 μm (12,5-100 μm)
Kapillarmaterial	fs, neutral, positiv geladen
Spannung	15-30 kV (5-60 kV)
Temperatur	18-25 °C (-30 – 120 °C)
Injektionsmodus	Δp , $\pm U$, g
Detektionsmodus	UV/Vis, Fluoreszenz, MS, Leitfähigkeit, ICP-MS
Chemische Parameter	
Pufferkomponenten	
Pufferkonzentration	
Puffergegenion	
pH-Wert	
Additive	Tenside für MEKC, Derivatisierungsreagenzien, Komplexbildner, Gele, Oberflächen- oder Viskositätsmodifizier

Eine Änderung in der Temperatur ergibt beispielweise eine Änderung in der Viskosität (2-3% pro K). Bei einer pH-Wert-Erniedrigung ergibt sich eine EOF-Abnahme und bei pH-Wert-Erhöhung, eine EOF-Zunahme.

6 Einführung in die Leishmaniose

Leishmaniose [103] ist eine weitverbreitete parasitäre Infektion, die durch den Stich einer erkrankten Mücke, einer weibliche Phlebotome (siehe **Kapitel 6.1**), auf den Menschen übertragen wird und nach den klinischen Symptomen als kutane, mucokutane oder viszerale Leishmaniose bezeichnet wird. Leishmanien sind begeißelte Protozoen, die mit 20 Spezies und Subspezies humane Infektionen verursachen. Die Mücken infizieren sich mit den Parasiten und geben diese anschließend durch Stich weiter. Leishmaniose kann auch direkt von Person zu Person z. B. durch die gemeinsame Nutzung medizinischer Nadeln durch infizierte Personen übertragen werden. Das wird häufig bei der Co-Infektion Leishmania /HIV beobachtet [104].

6.1 Vektoren und Reservoirs

Der Vektor

Das klinische Wörterbuch „Pschyrembel“ beschreibt einen Vektor als einen End- oder Zwischenwirt fungierenden Überträger von Krankheitserregern, die sich in ihm weiterentwickelt bzw. vermehrt haben [105].

Der Vektor oder aktiver Krankheitsüberträger der Leishmaniose ist eine Phlebotome (Sandmücke oder Sandfly), die in subtropischen und gemäßigten Regionen der Welt vorkommt. Die weibliche Mücke legt ihre Eier in bestimmte Nagetiere, in die Borke alter Bäume, in Ruinen, in die Risse von Hauswänden und in Haushaltsabfall ab, da die Larven in diesem Klima die Hitze und die Feuchtigkeit finden, die zu ihrer Entwicklung notwendig sind. Die Suche nach Blut (normalerweise abends und nachts) der weibliche Mücke umfasst einen Radius von einigen hundert Metern um ihren Lebensraum. Die Mücke kann sich dann an Erkrankten infizieren und anschließend die Krankheit auf Menschen oder andere Säugetiere übertragen. In der Mücke erfolgt während einer Periode von 4 bis 25 Tagen die Hauptumwandlung des Parasiten.

Von 500 bekannten Phlebotomenarten sind nur ca. 30 positiv als Vektoren (siehe **Abbildung 6-1**), d. h. als Verteiler der Krankheit identifiziert worden. Nur die weibliche Mücke überträgt die Leishmanien und steckt sich damit an, indem sie Blut von einem infizierten Menschen oder Säugetier saugt, um das Protein zu erhalten, das notwendig ist, ihre Eier zu entwickeln. Anschließend entwickeln sich die Parasiten im Insektenkörper und werden wieder auf

Reservoir-Lebewesen, d. h. auf Wirte für den Parasiten wie z. B. verschiedene Arten von Säugetieren oder den Menschen, übertragen. So schließt sich der parasitäre Kreislauf. Der Parasit kann für Dekaden in den asymptomatisch angesteckten Personen oder kleinen Säugetieren (reservoir hosts) überleben, die von großer epidemiologischer Bedeutung für die Übertragung der Krankheit sind.

Ein nachgewiesener Vektor der kutanen Leishmaniose (*Leishmania major*) in Israel ist z. B. der *Phlebotomus sergenti*, auch nachgewiesener Vektor der kutanen Leishmaniose (*Leishmania tropica*) in Griechenland, in der Türkei, in Marokko und Saudi Arabien, sowie vermuteter Vektor der kutanen Leishmaniose (*L. major* und *tropica*) in Afghanistan, Iran und Irak, in Indien und Russland und vermuteter Vektor der viszeralen Leishmaniose (*L. infantum*) in Griechenland.

Das Reservoir

Die Erreger werden in den endemischen Gebieten durch die Phlebotomen übertragen. Die hauptsächlichen Reservoirs für die Leishmaniose sind Hunde und Nagetiere und natürlich die Menschen selbst. Bei viszeraler Leishmaniose dienen auch Wölfe, Füchse und sogar Katzen als Erregerreservoir für Infektionen des Menschen [106]. Ratten sind auch mutmaßliche Reservoirs der *Leishmania amazonensis* in der Subandenregion von Bolivien und von *Leishmania mexicana* in Venezuela [107, 108]



Abbildung 6-1: Vektor (Schmetterlingsmücken: die Phlebotomen) und ein Hund mit Leishmaniose (Reservoir) [109, 110]

Weiterhin ist die Übertragung über die Plazenta im Mutterleib bekannt. Die Übertragung erfolgt jedoch nicht zwangsläufig. Es kann innerhalb des Wurfes einer infizierten Hündin

sowohl infizierte wie nicht infizierte Welpen geben. Einige Welpen weisen einen Antikörpertiter auf, ohne selbst infiziert zu sein.

Direkte Übertragungen von Tier zu Tier oder Tier zu Mensch wurden bisher nicht nachgewiesen. Allerdings gibt es einige ungeklärte Fälle, u. a. in Amerika, wo bislang nicht klar ist, wie sich Hunde infiziert haben, ohne in einem Endemiegebiet gewesen zu sein.

Durch Hundebisse kann Leishmaniose nicht übertragen werden, da im Speichel keine Leishmanien vorhanden sind. Selbst bei Kontakt mit frischem Blut (bei frischen Verletzungen des infizierten Hundes) besteht kaum ein Infektionsrisiko, da im frischen Blut kaum Leishmanien enthalten sind. Lediglich bei HIV-infizierten Menschen, die gleichzeitig Leishmaniose haben, ist bisher der Nachweis von Leishmanien im Blut gelungen.

6.2 Krankheiterreger

Es gibt zahlreiche Stämme der *Leishmania*, die Krankheiten hervorrufen können.

Leishmania tropica und *Leishmania major*

Diese zwei Spezies haben einen sehr ähnlichen Lebenszyklus und können ähnliche klinische Symptome hervorrufen, beide sind Erreger der kutanen Leishmaniose, aber sie haben verschiedene geographische Verteilungen. Die *Leishmania tropica* kommt in Mittelmeerraum und Südwestasien vor, während die *Leishmania major* in Nordafrika, im Mittleren Osten und in Westasien vor.

Leishmania brasiliensis

Der Erreger der mukokutanen Leishmaniose kommt in speziellen Gebieten Zentral- und Südamerikas vor. Der Lebenszyklus ist auch ähnlich zu der anderen Spezies.

Leishmania mexicana

Diese Form ist Erreger der Haut-Leishmaniose und der Diffusen Haut-Leishmaniose in Zentral- und Südamerika. In seltenen Fällen wurden sie auch mit der mukokutanen Leishmaniose in Verbindung gebracht.

Leishmania donovani

Es handelt sich um eine Gruppe von Erregern der viszeralen Leishmaniose. Diese kommt in entsprechenden Unterarten in Asien oder Nordafrika, in Südamerika und insbesondere in Brasilien vor.

Die Leishmaniose-Arten und ihre Lebenszyklen werden in **Kapitel 6.6** beschrieben. Die verschiedenen Krankheitsformen werden im nächsten Abschnitt erläutert

6.3 Die Krankheit und Ihre Auswirkungen

Die Ausprägung der Krankheit ist von dem zellulären Immunsystem der infizierten Person und dem Stamm der parasitischen Zellen abhängig. Weiterhin hängt die Ausbreitung der Krankheit u. a. mit Klimaveränderungen, Errichten von Staudämmen, neuen Bewässerungsmodellen und der Migration nicht immuner Personen in den endemischen Bereichen zusammen. Sie hemmt ernsthaft die Produktivität und den erforderlichen sozioökonomischen Fortschritt. Epidemien haben erheblich die Implementierung der zahlreichen Entwicklungsprogramme verzögert. Dies trifft besonders auf Länder wie Saudi Arabien, Marokko, das Amazonasgebiet und die tropischen Regionen der Andenländer zu.

In einigen Bereichen der Welt erhöhen epidemiologischen Änderungen, wie z. B. das Auftreten von AIDS auch das Auftreten der Fälle von Leishmaniose über Co-Infektionen. Bis jetzt haben 33 Länder weltweit über Co-Infektionen berichtet (siehe **Kapitel 6.4**). Insbesondere ist im südwestlichen Europa beobachtet worden, dass Konsumenten intravenös verabreichter Drogen als die Hauptgefährdungsgruppe für die Co-Infektion identifiziert worden sind [111].

Als Konsequenz auf diese Situation haben WHO und UNAIDS ein Überwachungssystem durch ein Netz von 28 Instituten weltweit aufgebaut. Alle Mitglieder des Netzes benutzen die gleichen Richtlinien für Diagnose und eine automatisierte Meldung der Fälle, beides protokolliert von der WHO.

Leishmaniose stellt sich nach der WHO-Einteilung im Menschen im Wesentlichen in vier unterschiedlichen Formen mit einer ausgedehnten Form klinischer Symptome dar. Alle Formen können verheerende Konsequenzen haben.

Viszerale Leishmaniose (VL)

Die viszerale Leishmaniose, auch bekannt als „Kala Azar“, ist durch unregelmäßige Fieberanfälle, erheblichen Gewichtsverlust, schwarze Verfärbung der Haut, Schwellung der Milz und der Leber sowie gelegentlich ernsthafte Anämien gekennzeichnet (siehe **Abbildung 6-2**).



Abbildung 6-2: Krankheitsbilder von Patienten mit viszeraler Leishmaniose (VL) [112]

Es ist die schwerste Form von Leishmaniose und, wenn sie unbehandelt bleibt, kann die Sterberate bis zu 100% hoch sein. Die Entwicklungsperiode kann Monate oder Jahre betragen und anders als bei den Hautformen der Leishmaniose sind die inneren Organe mit betroffen. Nach einer Therapie können Patienten chronische Haut-Leishmaniose entwickeln, die eine weitere lange und kostspielige Behandlung erfordert, da eine Rückwanderung der Parasiten von den inneren Organen in die Haut provoziert werden kann.

Bedeutung besitzt zunehmend auch die Erkrankung im Rahmen einer HIV-Coinfektion, in Italien sind beispielsweise ca. 10% der HIV-Infizierten auch mit *Leishmania* infiziert.

Mukokutane Leishmaniose (MCL)

In den mukokutanen Formen von Leishmaniose (auch „Espundia“ in Südamerika genannt), können Geschwüre bis zur teilweisen oder totalen Zerstörung der inneren und äußeren Nase und der umgebenden Gewebe auftreten (siehe **Abbildung 6-3**). Dieses kann zu einer erheblichen Entstellung der erkrankten Personen führen. Ohne plastisch-chirurgische Maßnahmen ist ein Ausschluss aus der Gesellschaft eine häufige Folge. Rekonstruktive Chirurgie von Missbildungen ist deshalb oft ein wichtiger Teil der Therapie.

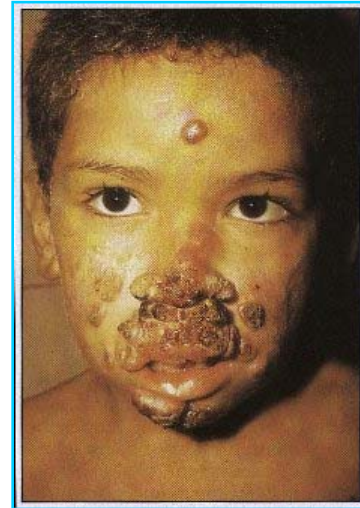


Abbildung 6-3: Schleimhautentzündung beim Patienten mit Mukokut. Leishmaniose [113].

Haut-Leishmaniose (Cutaneous Leishmaniose, CL)

Diese Formen der Krankheit sind normalerweise durch Hautgeschwüre, hauptsächlich auf den unbedeckten Körperteilen wie dem Gesicht, den Armen und den Beinen, gekennzeichnet. Diese vorwiegend in Afrika und Asien auftretende Erkrankung wird auch als Orientbeule bezeichnet. Die Krankheit kann viele Geschwüre produzieren, manchmal bis zu 200. Dies kann ernste Probleme verursachen und den Patienten dauerhaft entstellen, ein Stigma, das ernste Sozialvorurteile mit sich bringen kann. Die Schwere der Erkrankung ist von der Erregerspezies und der Konstitution des Wirtes abhängig. Die **Abbildung 6-4** zeigt die Hautform der Leishmaniose.

Nach erfolgreicher Behandlung oder auch durch Selbstheilung verursacht Haut-Leishmaniose Immunität gegen eine Wiederinfektion durch den Erregerstamm der Leishmania, der die spezifische Krankheit verursachte.

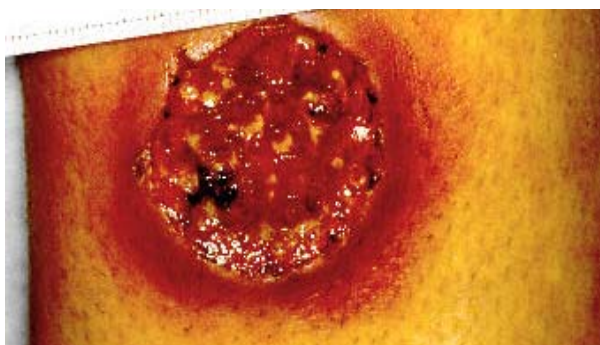


Abbildung 6-4: Hautentzündung bei Haut-Leishmaniose (CL) [113]

Diffuse Haut-Leishmaniose (Diffuse cutaneous Leishmaniasis, DCL)

Die diffuse Haut-Leishmaniose äußert sich in einer Vielzahl von Hautverletzungen, die der Lepra ähneln und nie spontan heilen. Diese Form hängt besonders mit einem defekten Immunsystem zusammen und ist häufig durch Rückfälle nach der Behandlung gekennzeichnet.

Die Hautformen von Leishmaniose sind am weitesten verbreitet und stellen 50-75% aller neuen Fälle dar.

6.4 Geographische Verteilung der Leishmaniose

Viele Jahrelang sind die Auswirkungen durch Leishmaniose durch das öffentliche Gesundheitswesen grob unterschätzt worden, hauptsächlich wegen Unkenntnis der ernststen Auswirkungen auf die Gesundheit.

Seit 1993 treten die Leishmaniose-Formen in Regionen, in denen sie endemisch ist, erheblich gehäuft auf.

Zur Verbreitung tragen zahlreiche Faktoren bei, die meistens durch die Unterentwicklung der entsprechenden Region bedingt sind. Diese umfassen massive ländlich-städtische Migration und landwirtschaftlich-industrielle Projekte, die nicht-immune städtische Bewohner in endemische ländliche Gebiete bringen. Projekte mit Klimaauswirkungen, wie Dammbauten, Bewässerungssysteme und Brunnen sowie Abholzung tragen auch zur Verbreitung von Leishmaniose bei.

AIDS und andere immundepressive Erkrankungen erhöhen die Gefahr durch Leishmaniose; der Ausbruch der Krankheit wird dadurch gefördert (siehe **Kapitel 6.5**) [114, 115].

Die Leishmaniose tritt in fünf Kontinenten auf: Afrika, Asien, Europa, Nordamerika und Südamerika, sie betrifft zurzeit 88 Länder, von denen 72 Entwicklungsländer sind. 90% aller viszeralen Leishmaniosefälle treten in Bangladesch, Brasilien, Indien, Nepal und im Sudan auf; 90% der mukokutanen Leishmaniose treten in Bolivien, Brasilien und Peru auf; 90% der Haut-Leishmaniosefälle treten in Afghanistan, Brasilien, Iran, Peru, Saudi Arabien und in Syrien auf. 350 Millionen Menschen weltweit leben in Risikogebieten. Man nimmt an, dass weltweit 12 Millionen Menschen an Leishmaniose erkrankt sind. Von den 1,5-2 Millionen

neuen Fällen der Leishmaniose, die jährlich weltweit auftreten, werden nur 600.000 offiziell erfasst.



Abbildung 6-5: Geographische Verteilung der viszeralen Leishmaniose [104]

Die geographische Verteilung der Leishmaniose (s. **Abbildung 6-5** und **Abbildung 6-6**) ist von den Lebensräumen der Phlebotomen, der Stärke ihrer Neigung, Blut von Menschen oder Haustieren zu saugen, der internen Entwicklung der spezifischen Art von Leishmania und vom Klima abhängig. Hoch endemische Länder.

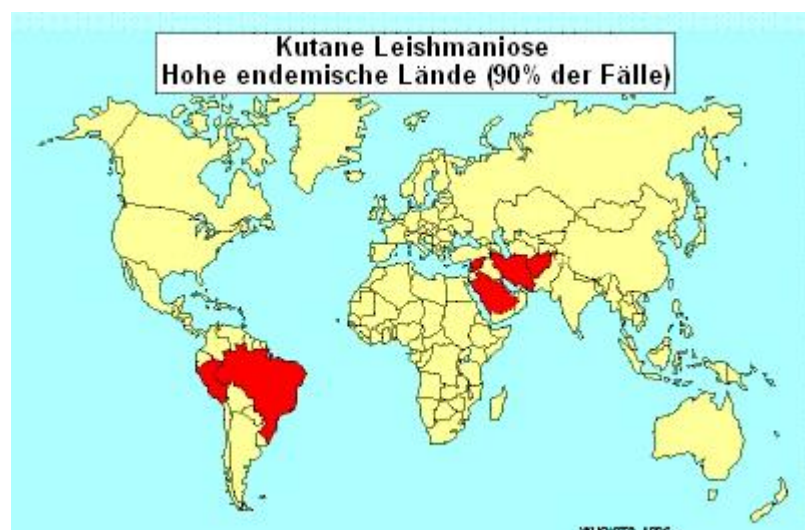


Abbildung 6-6: Geographische Verteilung der kutanen Leishmaniose [104]

6.5 Co-Infektion Leishmania /HIV

Co-Infektion von Leishmania und HIV tauchten als extrem ernstes, neues Krankheitsbild vor kurzem auf mit einer stark steigenden Zahl nachgewiesener Fälle. Obgleich die Menschen häufig durch Mücken gebissen werden, die Protozoen der verschiedenen Leishmania-Stämme in sich tragen, bricht bei den meisten von ihnen die Krankheit nicht aus. Unter immundepressiven Personen, (z. B. resultierend aus vorangehender HIV-Infektion, immundepressiver Behandlung von Organtransplantaten, hämatologischen oder autoimmunen Krankheiten), entwickeln sich die Fälle jedoch sehr schnell zu einer vollen klinischen Darstellung einer schweren Leishmaniose. Der Zusammenhang von AIDS und Viszeralen Leishmaniose (VL) ist ein Teufelskreis. Einerseits beschleunigt VL schnell die Auswirkungen von AIDS (mit begleitenden Krankheiten wie Tuberkulose oder Pneumonie) und verkürzt die Lebenserwartung der HIV-Infizierten. Andererseits erhöhen HIV-Infektionen die Verbreitung von VL [116].

Dieses Krankheitsduo produziert einen kumulativen Mangel an immuner Antwort, da die Leishmania-Parasiten und HIV die gleichen Zellen zerstören und die Krankheitskomplikationen und Konsequenzen damit exponentiell zunehmen. VL gilt als einer der Hauptmitwirkenden bei tödlichem Ausgang bei Co-infizierten Patienten. In der letzten Zeit konnte durch die Anwendung spezieller Therapien, so sie anwendbar sind, die Prognose für die Fälle Leishmania /HIV verbessert werden (siehe **Kapitel 6.7**).

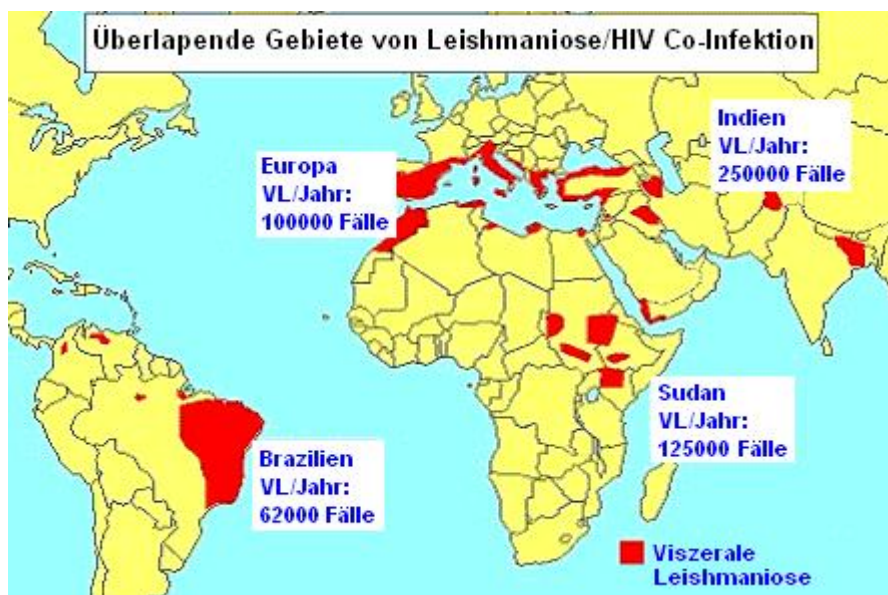


Abbildung 6-7: Geographische Verteilung von VL/HIV Co-Infektion [104]

Die geographischen Überschneidungen von VL und AIDS entstehen durch zwei Hauptfaktoren: die pandemische Verbreitung von AIDS in den Vorstadt- und ländlichen Gebieten der Welt und die simultane Ausbreitung von VL von ländlichen Arealen zu den Vorstadtbereichen (s. **Abbildung 6-7**). Die meisten Co-Infektionen in Amerika werden aus Brasilien berichtet, wo die Ausdehnung von AIDS von Fällen pro 100 000 Einwohner gestiegen ist.

6.6 Lebenszyklus der Leishmaniose-Arten

Die Erreger der Leishmaniose sind protozoische Parasiten der Klasse Flagellata, Ordnung Kinetoplastida. Man unterscheidet zwei Lebensstadien (Promastigoten und Amastigoten), die in dem **Kapitel 6.6.1** und **6.6.2** nachfolgend beschrieben werden.

Der digenetische Lebenszyklus der Leishmanien Spezies wird in der **Abbildung 6-8** dargestellt. Zuerst vermehren sich die Mikroorganismen frei im Verdauungstrakt (mittlere Darmabschnitte) von weiblichen, blutsaugenden Schmetterlingsmücken (Phlebotomen). Diese Vektoren sind nur wenige Millimeter groß und kommen vor allem in ländlichen Gebieten in unmittelbarer Nähe des Menschen vor. Wie bei der Malaria werden über den Stich dieser Insekten die Parasiten auf den Wirtsorganismus übertragen. Außer dem Menschen können auch zahlreiche Säugetierspezies von der Krankheit befallen werden, hauptsächlich ist in südeuropäischen Ländern die Infektion von Hunden verbreitet [117]. In den Wirtsorganismen werden die Parasiten vom Immunsystem entdeckt und von Makrophagen durch Phagozytose aufgenommen, ohne allerdings aufgelöst zu werden. Dort verwandeln sich die Mikroorganismen in die Amastigotform und vermehren sich in großen, parasitophoren Vakuolen der Makrophagenzellen durch Zweiteilung. Nach der Bildung zahlreicher Amastigoten bricht die Wirtszelle auf und gibt weitere Parasiten frei, die erneut im Rahmen der Immunabwehr von Makrophagen aufgenommen werden [6, 118]. Die Amastigoten können über das Blut infizierter Wirtsorganismen wiederum von der Sandmücke aufgenommen zu werden und dort verwandeln sich die Parasiten wieder in die Promastigotform um. Damit ist der Lebenszyklus geschlossen.

Die Leishmaniose ist deshalb eine Erkrankung des Immunsystems. Aus diesem Grund und wegen der Gleichartigkeit der chemischen Reaktionen der Wirtszellen und der Parasitenzellen ist diese Erkrankung wie z. B. auch Malaria nur schwer therapierbar.

Für lange Zeit war wenig über die Zyklen der Krankheit bekannt, aber in den letzten Jahren haben Feldforschung und die Anwendung der molekularen Biologie einen erheblichen Fortschritt ermöglicht, weil sie die unterschiedlichen Verbindungen in der Entwicklungskette aufgedeckt haben. Außerdem sind einfache, neue Diagnosetechniken vor kurzem entwickelt worden, die praktisch, billig und zuverlässig sind. Diese Methoden sind für betroffene Länder für die frühe Diagnose und die schnelle Behandlung der Krankheit unentbehrlich.

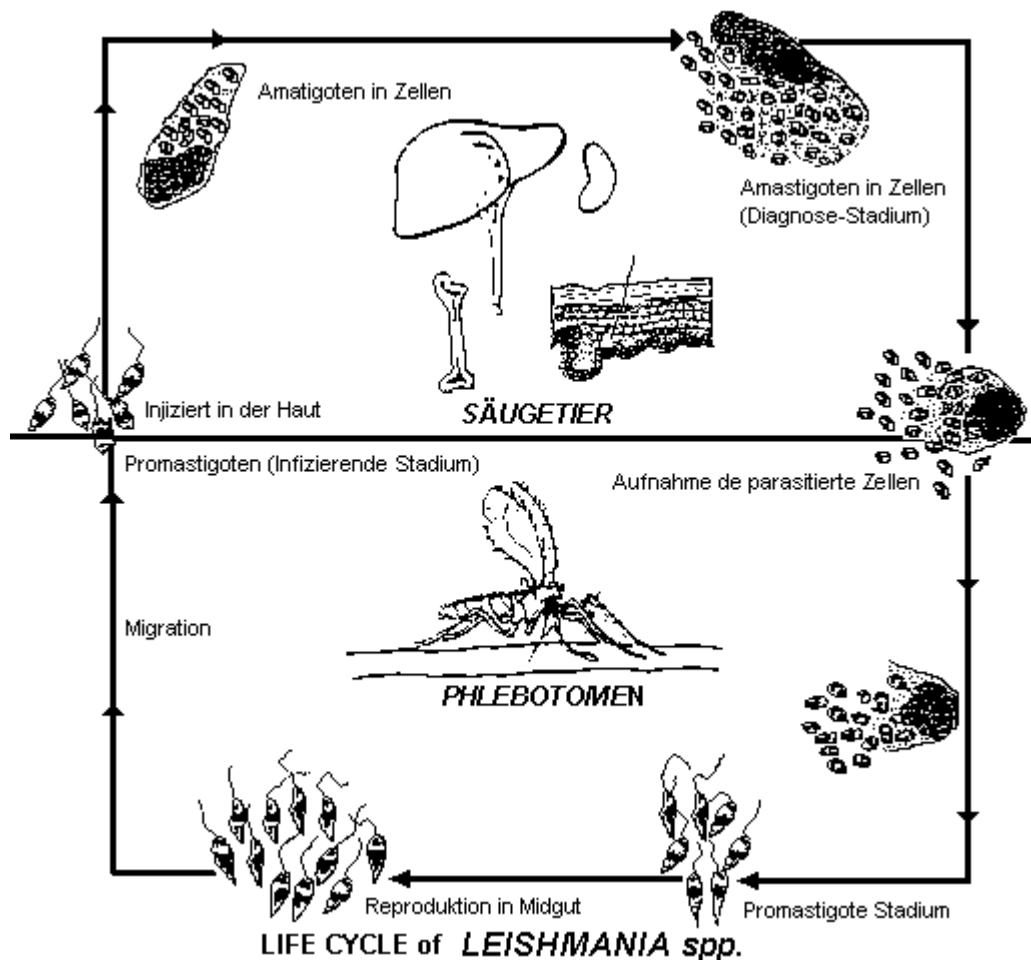


Abbildung 6-8: Lebenszyklus der Leishmania-Erreger [115]

6.6.1 Charakterisierung der Promastigoten

Im Vektor, d. h. in den Schmetterlingsmücken, liegen die Parasiten als extrazelluläre, begeißelte und deswegen bewegliche Formen, den Promastigoten, vor.

Die Promastigoten sind 8-25 μm lange, 2 μm breite, spindelförmige Zellen mit einer ca. 5 μm langen Zuggeißel. Es lassen sich zwei unterschiedliche Formen in den Schmetterlingsmücken nachweisen. Im Saugapparat lagern sich tropfenförmige Körper zusammen, während sich im Darm der Insekten einzelne, teilungsfähige Promastigoten befinden (siehe **Abbildung 6-9**).

Sie unterscheiden sich jedoch nicht nur in ihrer äußeren Form, sondern auch in ihren biochemischen Eigenschaften deutlich voneinander.

Die Promastigoten lassen sich gut kultivieren, daher wurden sie bisher ausschließlich zur Untersuchung der Wirkmechanismen von Therapeutika eingesetzt [1, 119, 120].



Abbildung 6-9: Begeißelte Promastigoten [121]

6.6.2 Charakterisierung der Amastigoten

Die Amastigoten werden als unbegeißelte, intrazelluläre Form von Leishmania bezeichnet, welche wesentlich kleiner als die Promastigoten (ca. 2-5 μm Durchmesser) sind.

Im Wirbeltier findet die Aufnahme von Promastigoten durch Makrophagen mittels Phagozytose („Zellfressen“) statt. Darauf kommt es zu einer Umwandlung in Amastigoten (siehe **Abbildung 6-10**), welche innerhalb großer, parasitophorer Vakuolen der Makrophagenzelle leben und sich vermehren. Wenn die Amastigoten sich genügend vermehrt haben, platzt der Makrophage und die Amastigoten werden für die Infizierung weiterer Makrophagen freigesetzt.

Die Amastigoten sind die eigentlichen Erreger der Leishmaniose. Lokal begrenzt führen sie zu der kutanen oder mukokutanen Form, bei einer Generalisierung der Erkrankung kommt es zur viszeralen Leishmaniose.

Bis vor wenigen Jahren konnten lediglich infizierte Makrophagenzellen kultiviert werden, nicht aber direkt die Amastigoten. Die biochemischen Vorgänge innerhalb der Amastigoten

ließen sich so kaum untersuchen, weil der Stoffwechsel der wesentlich größeren Makrophagenzellen die innerhalb der Amastigoten ablaufenden Prozesse überdeckte [122]. Erst vor wenigen Jahren gelang die in-vitro-Kultur der Amastigotenstadien im Medium. Damit steht ein Hilfsmittel zur Studie der Wirkmechanismen und Resistenzen direkt in den Erregern zur Verfügung [123], dass auch im Rahmen dieser Arbeit genutzt wurde.

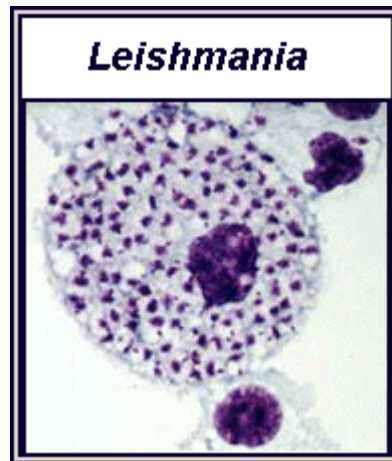


Abbildung 6-10: Amastigoten in eine Makrophagenzelle [121]

6.7 Behandlung von Leishmaniosen

Das angestrebte Ziel der Behandlung infizierter Personen ist die klinische und parasitologische Heilung sowie die Verhinderung von Rückfällen. Leider sind in solchen Behandlungsfällen die Nebenwirkungen auf Grund der Giftigkeit der Medikamente und Rückfälle durch sich entwickelnder Medikamentresistenzen sehr häufig.

Zu Beginn des 20. Jahrhunderts wurde die Wirksamkeit von Antimon gegen Leishmaniose entdeckt. Zunächst wurde den Patienten dreiwertiges Antimon in Form von Kaliumantimonyltartrat verabreicht. Dieser war allerdings sehr toxisch für die Patienten [124]. Neuere Untersuchungen zeigten die Wirksamkeit von Sb(V) [125], das heute als Stibogluconat [126] oder als Megluminantimonat [127] (s. **Abbildung 6-11** und **Tabelle 6-1**) eingesetzt wird. Im südwestlichen Europa zeigen Anschlussstudien mit fünfwertigen Antimon-Verbindungen (siehe **Kapitel 7**), eine positive Antwort in 83% der Fälle. Jedoch erkrankten 52% der Patienten innerhalb einer Periode von einem Monat bis drei Jahren erneut.

Als hauptsächliche Therapiealternativen werden Pentamidine eingesetzt, Amphotericin B und Amphotericin B eingekapselt in Liposomen. Diese Verkapselung verringert das Auftreten von Nebenwirkungen, aber Rückfälle treten ebenfalls noch auf und das Medikament ist extrem kostspielig und somit problematisch für Entwicklungsländer.

Da Sb(III) auch für den menschlichen Organismus sehr toxisch ist, wurden schwere Nebenwirkungen, wie z. B. Nierenversagen [128], beobachtet. Sb(V) ist prinzipiell weniger toxisch. Die Wirkdosis des intramuskulär verabreichten Sb(V) ist aber mit ca. 20 mg/kg Körpergewicht pro Tag für eine Dauer bis zu 30 Tagen sehr hoch, sodass auch die Behandlung mit fünfwertigem Antimon von zahlreichen Nebenwirkungen beeinträchtigt werden kann [112, 129].

Tabelle 6-1: Therapeutika gegen Leishmaniose [130]

Präparat	behandelte Krankheit	Präparat	behandelte Krankheit
Pentavalentes Antimon	VL	Ketoconazole	CL
(intravenös oder intramuskulär)	CL	Itraconazole	CL
	MCL	Dapsone	CL
Amphotericin B deoxycholate	VL	Allopurinol	CL
(intravenös)	CL	Paromomycinsulphate	CL
	MCL	ointment	
Pentamidine isothionate	VL	Lipid Formulationen von	VL
(intravenös oder intramuskulär)	CL	Amphotericin B	CL
	MCL	(intravenös)	ML
Paromomycin sulphate	VL	Intralesional Sb (V)	CL
(intravenös oder intramuskulär)	CL		
Rekombinantes Interferon Gamma	VL		
(subkutan oder intramuskulär)	CL		

Die Behandlung der Leishmaniose ist ein klares Beispiel für die Anwendung von Metall- und Halbmetallverbindungen in höheren Konzentrationen in der modernen Medizin. Der Wirkmechanismus des Antimons ist dabei noch weitgehend ungeklärt, da bislang nicht viele

Methoden zur Antimonspeziesanalytik in Zellproben im biochemisch/medizinisch nutzbaren Konzentrationsbereich zur Verfügung standen. Die Wirkungsweise der Antimonpräparate ist leider zurzeit noch unklar.

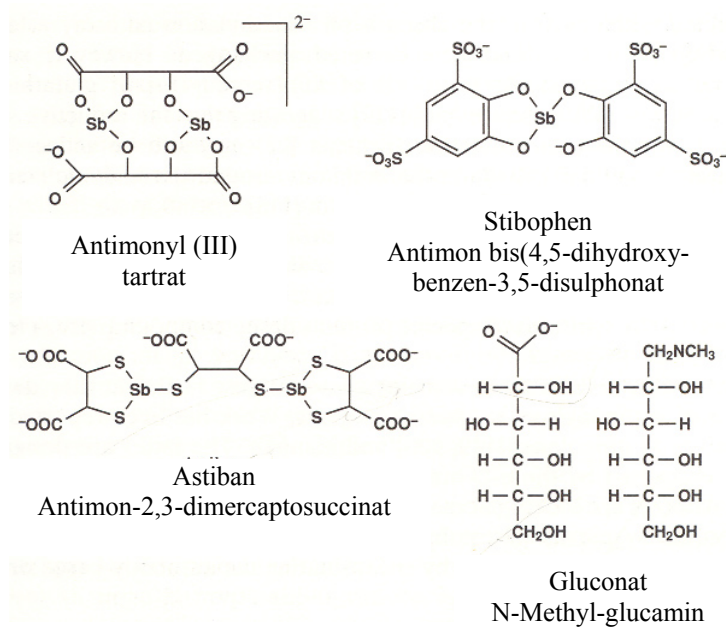


Abbildung 6-11: Antimon-Verbindungen die für eine Behandlung der Leishmaniose verwendet werden [131]

6.8 Wirkungsweise des Antimons

Verschiedene Untersuchungen weisen die Anreicherung von Antimon in Serum und Urin während der Therapie nach [132]. Eine Untersuchung der Oxidationsstufen mit pH-Wertkontrollierter Reduktion des Sb(III) und Sb(V) und Detektion mit HG-AAS deutet auf die Reduktion zumindest teilweise des Sb(V) zu Sb(III) im Organismus hin [133]. Eine genauere Aufklärung der Vorgänge, speziell die Lokalisierung und biochemische Aufklärung der Reduktionsaktivität war auf diese Art nicht möglich.

In einigen Gebieten kommt es zu einer Zunahme der Resistenz der Leishmania-Erreger gegenüber fünfwertigen Antimonverbindungen. Die Toxizität des Sb(III) bleibt dabei nahezu unverändert, was auf eine direkte Wirkung der Antimonpräparate auf den Mikroorganismus hinweist [134, 135].

Von einigen Arbeitsgruppen wird für die Resistenz ein ähnlicher Metabolismus und Exkretionsmechanismus wie für Arsen postuliert, da bei dem dort verwendeten Leishmania-

Stamm eine Kreuzresistenz zwischen Arsen und Antimon auftrat [134, 136]. Ein analytischer Nachweis für die ablaufenden Vorgänge konnte bisher nicht erbracht werden. Demgegenüber zeigt der im Rahmen der Habilitationsarbeit von Frau Dr. N. Ulrich [6] und in der vorliegenden Arbeit verwendete, antimonresistente Stamm keine Abhängigkeit der Antimontoxizität von der Arsenkonzentration, was sich nur über einen separaten Mechanismus für die Antimonmetabolisierung erklären lässt. Die Reduktion des Sb(V) außerhalb oder innerhalb der Parasitenzelle wurde postuliert. Sb(III) ist dabei viel toxischer für die Amastigoten von *Leishmania* als Sb(V). Die letzten Untersuchungen zeigen, dass die axenischen (extra-zellulären) Amastigoten genauso anfällig sind für Sb(V) wie intrazelluläre Amastigoten [137].

Es ist sehr wahrscheinlich, dass der Wirkmechanismus innerparasitär, formspezifisch und makrophagenunabhängig ist. Die **Abbildung 6-12** stellt einen Vorschlag für die Metabolisierung des Antimons dar.

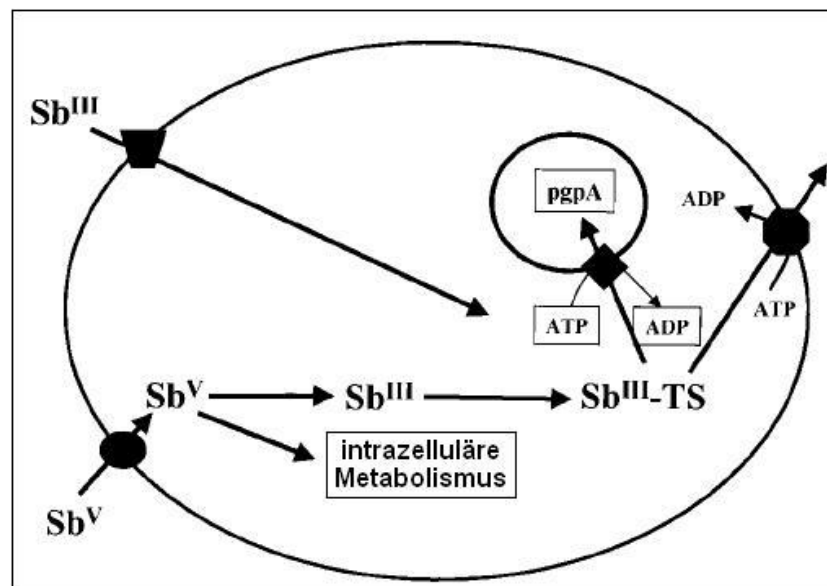


Abbildung 6-12: Vorgeschlagener Mechanismus für den Antimonmetabolismus und seine Neutralisierung bei *L. donovani*. In Promastigoten und Amastigoten sammelt sich Sb(V). Enzymatische Reduktion von Sb(V) nach Sb(III) [137].

Das Modell in der **Abbildung 6-12** schlägt die Reduktion des Antimonats und die spätere Neutralisation von Sb(III) bei Trypanothion vor. Das Sb(III) akkumuliert sich in den Zellen per Transport durch die plasmatische Membran und/oder durch intrazelluläre Reduktion von Sb(V) zu Sb(III) entweder via eines enzymatischen oder eines nicht enzymatischen

Mechanismus. Sb(III) komplexiert dann das Trypanothion über Interaktion mit der Sulfhydrylgruppe [138]. Dieser Komplex wird dann vom Parasit mittels eines spezifischen Transporters aus der Zelle entfernt [139, 140, 141]. Das Trypanothion ist das wichtigste Puffersystem für den Redoxzustand von Trypanosomatiden. Die Trypanothionreduktase wird somit inhibiert und die Zellproliferation und –differentierung bzw. das rasche Wachstum der Trypanosomen wird blockiert [137].

Eine detaillierte Diskussion der möglichen Reaktionen auf biochemischer Ebene liegt außerhalb des Themenkomplexes der Analytischen Chemie, sodass auf die weiterführende Literatur verwiesen sei [1, 142].

7 Antimon: Chemie und Analytik

Antimon ist ein Halbmetall aus der fünften Gruppe des Periodensystems. Es wird derzeit in vielen industriellen Bereichen eingesetzt und auch durch natürliche Prozesse in die Umwelt eingetragen. Besondere Bedeutung hat Antimon als Therapeutikum für die Tropenkrankheit Leishmaniose, deren Untersuchung aus analytisch-chemischer Sicht im Zentrum dieser Arbeit steht. Im folgenden werden die Einsatzgebiete, die chemischen Eigenschaften sowie die Analytik des Antimons näher erläutert.

7.1 Einsatzgebiete des Antimons

Schon 3000 Jahre v. Chr. kannten die Chinesen das Metall. Antimonbronzen wurden bereits im alten Ägypten verwendet. Außerdem ist in griechischen und römischen Quellen die Verwendung als Therapeutikum [143] und für Kosmetika [144] nachweisbar.

Die Darstellung des reinen Metalls gelang jedoch erst im Jahr 1780. Verbindungen wie das Antimonit (Sb_2O_3) und andere Antimonverbindungen wurden im Mittelalter als Schönheits- und Arzneimittel verwendet. Heute wird metallisches Antimon als Zugabe von Legierungen verwendet, um größere Härte und Korrosionsfestigkeit zu erreichen. Antimontrioxid weist hingegen feuerhemmende Eigenschaften auf und wird Lacken, Kunststoffen, Gummi, Textilien und Papier zugesetzt. Die Behandlung der Leishmaniose, einer tropischen Parasitenkrankheit, ist eines der wenigen Beispiele für den therapeutischen Einsatz von Halbmetallen und Metallen bis in die heutige Zeit [145].

Moderne Antimonprodukte kann man in drei große Gruppen einteilen; hierbei handelt es sich um die metallischen Produkte, die nichtmetallischen Produkte und feuerhemmende Produkte.

Zur ersten Gruppe zählen die Legierungen, hier vor allem Legierungen aus Blei und Antimon mit Antimonkonzentrationen bis 25 %. Die wichtigsten Anwendungen sind Batterien und Munition. Zu der Gruppe der nichtmetallischen Produkte gehören Katalysatoren für organische Synthese, Halbleiter, Entfärbungs- und Trübungsmittel für Spezialgläser sowie Farbstoffe. Die wichtigste Applikation für Antimon mit einem Anteil von über 50 % ist als feuerhemmende Produkte, denen Antimon als Antimontrioxid zugesetzt wird. Dieses wird Kunststoffen, Gummi, Elastomeren, Textilien und Papieren beigemischt, um die Entflammbarkeit zu verringern. Erstaunlicherweise besitzt Antimontrioxid keine

feuerhemmende Wirkung, lediglich in Verbindung mit anderen, vor allem halogenierten organischen Verbindungen, kann es die Entflammbarkeit deutlich senken.

7.2 Chemie des Antimons

Antimon befindet sich in der fünften Hauptgruppe des Periodensystems, zusammen mit Stickstoff, Phosphor, Arsen und Bismut. Seine wichtigsten Oxidationsstufen sind +5, +3, 0 und -3. Es besitzt zwei stabile Isotope mit den Massen 121 (57,25%) und 123 (42,75%), die relative Atommasse beträgt 121,76. Die elektronische Konfiguration des Antimons ist $[\text{Kr}]4d^{10}5s^2p^3$.

Reines Antimon ist ein silberweiß glänzendes Metall von geringer Härte: es wird als Halbmetall bezeichnet. Es ist weiterhin recht spröde, lässt sich daher leicht pulverisieren und hat eine Dichte von $6,69 \text{ g/cm}^3$. Es ist ein guter elektrischer Leiter, schmilzt bei $630,5^\circ\text{C}$ und siedet bei 1635°C . Es ist sehr reaktionsfreudig. So entzündet sich Antimon von selbst in Chlorgas. Es lässt sich auch leicht legieren. In Salzsäure ist Antimon unlöslich, dafür löst es sich leicht in oxidierenden Säuren.

Die **Tabelle 7-1** fasst einige wichtige physikalische und chemische Eigenschaften des Antimons zusammen.

Wichtige Antimonverbindungen sind die Oxide Sb_2O_3 und Sb_2O_5 , die Sulfide Sb_2S_3 und Sb_2S_5 , die Hexahydroxoantimonate, wie $\text{KSb}(\text{OH})_6$ und das Kalium-Antimonyl-Tartrat $\text{K}[\text{C}_4\text{H}_2\text{O}_6\text{Sb}]$. Die anorganischen Verbindungen des drei- und fünfwertigen Antimons lassen sich z. B. mit Natriumhydridoborat leicht zu gasförmigem SbH_3 reduzieren. Die antimonige Säure H_3SbO_3 ist, im Gegensatz zu den entsprechenden Säuren von Arsen und Phosphor, in wässriger Lösung frei nicht nachweisbar [146]. In Lösung können anorganisches dreiwertiges Antimon $[\text{Sb}(\text{III})]$, Hexahydroxyantimonsäure und ihre Salze $[\text{Sb}(\text{V})]$ sowie organische Antimonspezies, wie das Trimethylantimon-Kation $[(\text{CH}_3)_3\text{Sb}^{2+}]$ vorliegen. $\text{Sb}(\text{III})$ kann z. B. als antimonige Säure $[\text{Sb}(\text{OH})_3]$ oder komplexiert als Antimonyltartrat vorliegen. In Gewässern, Sedimenten und Klärschlamm konnten die Spezies $\text{Sb}(\text{III})$, $\text{Sb}(\text{V})$ und das Trimethylantimon-Kation nachgewiesen werden [147, 148, 149].

Tabelle 7-1: Physikalische und chemische Eigenschaften des Antimons [119, 150, 151]

Eigenschaften	Wert
Dichte [g/cm ³]	6,69
Schmelzpunkt [°C]	630
Siedepunkt [°C]	1635
Atomradius [Å]	1,82
Kovalenter Radius (einfacher Bindung) [Å]	1,41
Van der Waals-Radius [Å]	2,20
Ionenradius (Sb ³⁻) [Å]	2,45
Ionenradius (Sb ³⁺) [Å]	0,76
Ionenradius (Sb ⁵⁺) [Å]	0,62
Elektronegativität	2,05 (Pauling), 1,82 (Allred)
Elektronenaffinität [eV]	0,6
pK ₁ -Wert von H ₃ SbO ₃	11,0
pK ₁ -Wert von H[Sb(OH) ₆]	2,55
1. Ionisierungsenergie der Atome [eV]	8,64
Umwandlungstemperatur amorph-kristallin [°C]	~ 0
Bildungsenthalpie SbH ₃ [kJ/mol]	+145,2
Bildungsenthalpie Sb ₂ O ₃ [kJ/mol]	-721,0
Bildungsenthalpie SbCl ₃ [kJ/mol]	-382,4
Elektrische Leitfähigkeit [mS/cm]	2,6

Das in **Abbildung 7-1** dargestellte Schema zeigt den für Arsen bekannten und für Antimon postulierten Verlauf der Umwandlung von einer anorganischen Chemikalie zur bioverfügbaren Substanz.

Die Antimonsäure H[Sb(OH)₆] ist eine einbasige Säure von der Stärke der Flusssäure, während die homologe Arsensäure dreibasig ist und der Phosphorsäure ähnelt [119]. Durch den metallischeren Charakter des Antimons bedingt sich, im Vergleich zu Phosphor und Arsen, der strukturelle Unterschied auch bei der bevorzugt oktaedrischen Koordination des Antimons im Vergleich zum häufig tetraedrisch koordinierten Arsen. Außerdem besitzt Antimon eine relativ große Affinität zu Fluorid [119].

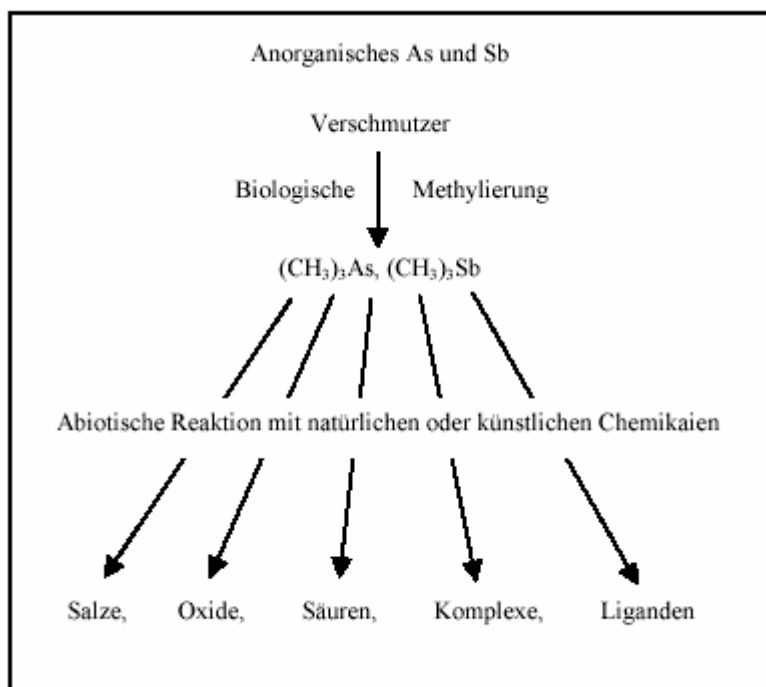


Abbildung 7-1: Schema zur biologischen Verfügbarkeit von Arsen und Antimon [152]

Die Verbindungen des Sb (V) werden in der anorganischen und organischen Synthese eingesetzt, weil sie z. T. starke Lewis-Säuren sind. Insbesondere die Pentahalogenide SbCl_5 und SbF_5 neigen zur Aufnahme eines weiteren Halogenidions unter Bildung von SbCl_6^- bzw. SbF_6^- . Im Gegensatz dazu können die Verbindungen des Antimons (III) als Lewis-Basen fungieren, wenn z. B. das TPhSb (Triphenylantimon) als Ligand für Übergangsmetalle wirkt [153, 154].

7.2.1 Stabilität der Oxidationsstufen

In umweltrelevanten Verbindungen sind III und V die wichtigsten Oxidationsstufen [155]. Antimon als Element mit der Oxidationsstufe 0 kommt in der Erde nur in sehr wenigen Lagerstätten vor [156]. In Einzelfällen, z. B. in Deponiegasen [157], wurde auch das Antimonhydrid (SbH_3) mit Oxidationsstufe –III in Umweltproben nachgewiesen [158]. In der **Tabelle 7-2** werden einige Beispiele zusammen gefasst.

Tabelle 7-2: Beispiele der Antimon-Verbindungen[151].

Oxidationszustände	Beispiele
Sb ³⁻	SbH ₃
Sb ³⁺	Sb ₄ O ₆ , SbO ₃ ³⁻ , SbF ₃ , Sb ₂ S ₃
Sb ⁵⁺	Sb ₄ O ₁₀ , Sb(OH) ₆ ⁻ (aq), SbF ₅

Tabelle 7-3: Standardpotentiale E° für Antimon [6, 151]

pH- Bereich	Redoxpaar	Potential [V]
Saure Lösung	Sb ₂ O ₅ / [SbO] ⁺	0,605
	[SbO] ⁺ / Sb	0,204
Neutrale Lösung	Sb ₂ O ₅ / Sb ₄ O ₆	0,699
	Sb ₄ O ₆ / Sb	0,150
	Sb ₂ O ₅ / Sb ₂ O ₄	1,055
	Sb ₂ O ₄ / Sb ₄ O ₆	0,342
	Sb / SbH ₃	-0,510
Basische Lösung	[Sb(OH) ₆] ⁻ / [Sb(OH) ₄] ⁻	-0,465
	[Sb(OH) ₄] ⁻ / Sb	-0,639
	Sb / SbH ₃	-1,338

Die **Tabelle 7-3** zeigt die Standardpotentiale für Antimon und die **Abbildung 7-2** stellt ein Diagramm mit den verschiedenen Oxidationsstufen dar. Die Lage der Potentiale macht deutlich, dass in Boden- und Wasserproben, in denen je nach Matrix reduzierende oder oxidierende Bedingungen vorherrschen, sowohl Sb (III) als auch Sb (V) in wechselnden Verhältnissen zu erwarten sind.

Aus **Abbildung 7-2** können wir feststellen, dass Sb größere Ähnlichkeit zu As als zu Bi hat, da dies ein stärkerer Oxidant ist. Sb (III) ist stabil und disproportioniert in Lösung nicht, ähnlich verhält sich auch die elementare Form. Sb (V) ist ein Oxidationsmittel, das jedoch in wässriger Lösung ebenfalls stabil ist. Die Gleichgewichtslage ist abhängig von den Matrixbestandteilen der Proben und ihrer Konzentration, dem pH-Wert und der Konzentration der Sb-Formen selbst.

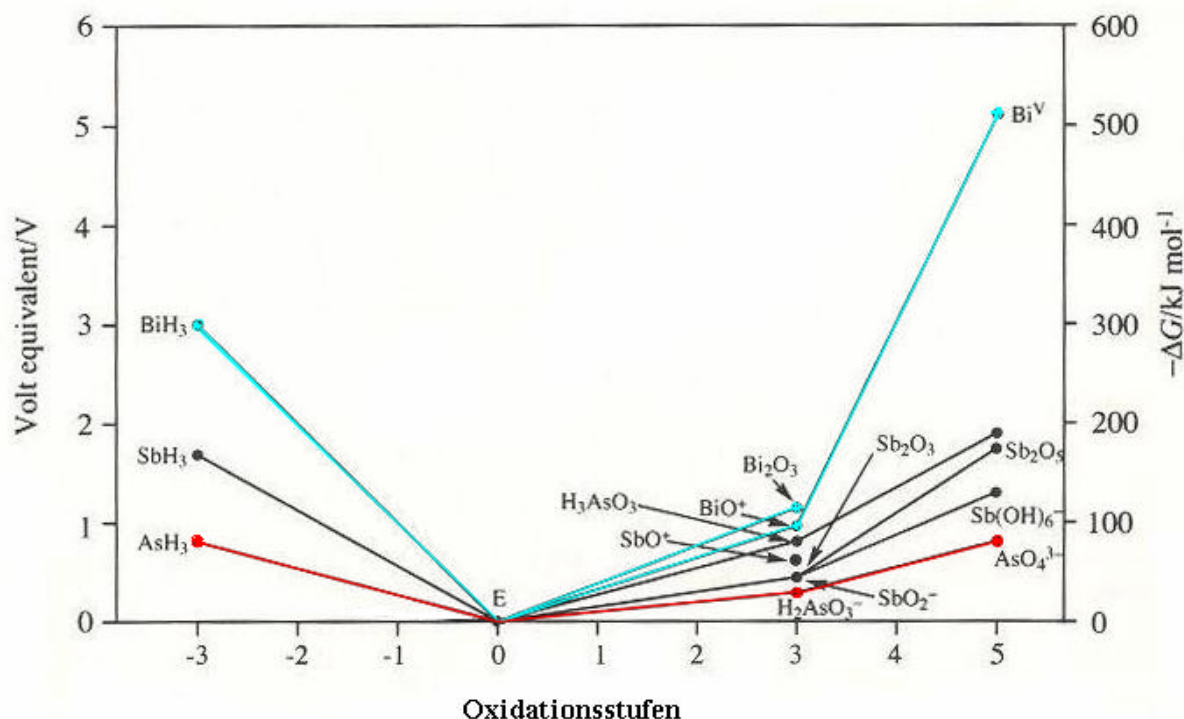


Abbildung 7-2: Oxidationsstufendiagramm von As, Sb und Bi [119]

Der geringe Unterschied der Standardpotentiale führt auch zu Problemen bei der Lagerung von Antimonstandards. Es bildet sich ein Gleichgewicht zwischen fünf- und dreiwertigem Antimon in den Standards aus, sodass für die Elementspeziesanalytik auch höher konzentrierte Standardlösungen nicht längere Zeit aufbewahrt werden sollten. Die Haltbarkeit der Standards unter verschiedenen Lagerungsbedingungen wird in **Kapitel 10.2** ausführlich erläutert.

7.2.2 Chemie in wässriger Lösung

Die Chemie des Antimons in wässriger Lösung ist von den beiden Hauptoxidationsstufen III und V sowie von der Affinität des Antimons zu Schwefel, Sauerstoff und den Halogenen geprägt. Es bildet mit Komplexbildnern zahlreiche, wenn auch häufig nicht sehr stabile Komplexe, insbesondere mit sauerstoff- und schwefelhaltigen Verbindungen. Die oxidischen und sulfidischen Antimonverbindungen sind im Wasser verhältnismäßig schwer löslich. Einen Eindruck vermitteln die Angaben der **Tabelle 7-4**. Es ist dabei festzustellen, dass die Oxide in Wasser besser löslich sind als die Sulfide, wobei die Salze des fünfwertigen Antimons jeweils eine höhere Löslichkeit zeigen als die des dreiwertigen.

Ein bekanntes Beispiel ist die Affinität des Antimons zum Tartrat, mit dem nicht nur definierte Verbindungen (z. B. Kaliumantimonyltartrat), sondern auch Agglomerate und Komplexe in Lösung gebildet werden. Diese Komponenten sind aufgrund ihrer relativen Instabilität und Hydrolyseanfälligkeit einer Analyse mit den derzeitigen technischen Mitteln kaum zugänglich und verhalten sich im Chromatogramm oder bei der selektiven Reduktion wie einfache Ionen (siehe **Kapitel 8**): Eine Unterscheidung ist praktisch unmöglich. Auf der anderen Seite ist dadurch die Anwendung der vorgestellten Verfahren für eine Bestimmung der Oxidationsstufen III und V des Antimons als Gesamtgehalt bzw. Summenparameter gegeben.

Tabelle 7-4: Löslichkeiten der Antimonsulfide und -oxide in Wasser [155]

	Bedingungen	Löslichkeit d.	Sb- Konzentration		Quelle
		Verbindung	mg/L	mol/L	
Sb ₂ O ₃	25 °C	8,4	5,75*10 ⁻⁵	7,01	[159]
	35 °C	13,05	8,95*10 ⁻⁵	10,9	[160]
	20 °C pH 4-7,5	4,1-4,7	2,8*10 ⁻⁵ - 3,2*10 ⁻⁵	3,4-3,9	[161]
Sb ₂ O ₅	35 °C	64,5	1,995*10 ⁻⁴	24,3	[159]
	35 °C	87,7	5,4*10 ⁻⁴	66	[160]
Sb ₂ S ₃	25 °C, pH=7	0,278	1,64*10 ⁻⁶	0,2	[162]
	20 °C	1,7	1*10 ⁻⁵	1,22	[163]
Sb ₂ S ₅	26 °C	7	3,47*10 ⁻⁵	4,22	[162]

Über die Chemie des Antimons in wässriger Lösung ist zurzeit nur wenig bekannt. Bei niedrigem pH-Wert liegt es in Abwesenheit größerer Mengen an Komplexbildnern kationisch vor [164], bei erhöhtem pH-Wert kommt es unter Aufnahme von Hydroxidionen zur Bildung von negativ geladenen Hydroxy- oder Oxospezies. Das Verhalten der Antimonspezies und ihre Abhängigkeit vom pH-Wert wird auch im **Kapitel 10.2** ausführlicher besprochen.

7.2.2.1 Antimon (V)

In wässriger Lösung liegt das Sb(V) überwiegend anionisch als Sb(OH)_6^- vor. Erst im pH-Bereich unterhalb $\text{pH} = 2,7$ dominieren nach **Gleichung 7-1** die ungeladenen Spezies Sb(OH)_5 [159]. Diese wurde oft als Antimonsäure bezeichnet und in der Form HSb(OH)_6 geschrieben.

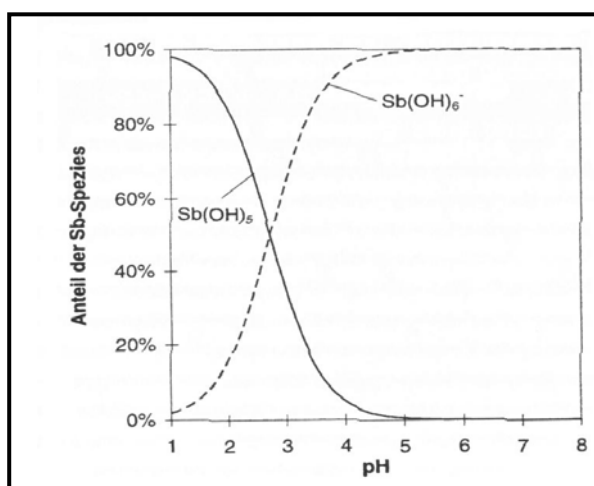
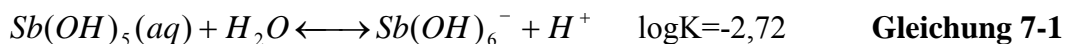


Abbildung 7-3: Verteilung der Sb(V)-Spezies in Abhängigkeit vom pH-Wert für 0,1 mol/L (berechnet mit **Gleichung 7-1** nach Baes und Mesmer [159])

Nach Pitman et al. [165] liegt bei hohen Säurekonzentrationen ($\text{pH} < -0,87$) die Spezies SbO_2^+ vor. Nach Untersuchungen von Dawson et al. [166] ist jedoch in 0,5-8 molarer Schwefelsäure kein Sb(V) in kationischer Form nachweisbar, sodass die Existenz von SbO_2^+ angezweifelt werden kann. Bei höheren Sb(V)-Konzentrationen oberhalb 1 mmol/L polymerisiert Antimon im sauren bis schwach sauren pH-Bereich, was sich durch eine Opaleszenz der Lösung bemerkbar macht. Aufgrund von Titrationsdaten postulierten Lefebvre und Maria [167] die Existenz von 6 zwölkernigen Sb(V)-Hydroxokomplexen ($\text{Sb}_{12}(\text{OH})_{60+n}^{n-}$, $n=3-8$), deren Zahl durch Neuberechnung von Baes und Mesmer [159], auf 4 Polymerverbindungen beschränkt wurde ($n = 4-7$). Die Speziesverteilung in einer 0,01 mol/L Sb(V)-Lösung sowie die Reaktionsgleichungen und Gleichgewichtskonstanten [159] können **Abbildung 7-4** entnommen werden.

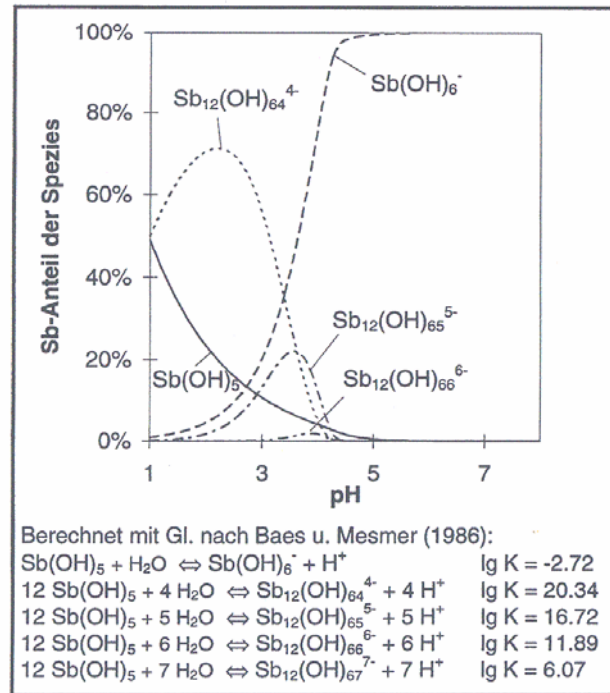


Abbildung 7-4: Verteilung der Sb-Spezies in Abhängigkeit des pH-Wertes für 0,5 mol/L [159]

Eine Komplexbildung des Sb(V) durch die üblicherweise in Abwässern und Gewässern anzutreffenden Anionen ist auszuschließen. Sulfat bildet selbst in 8 mol/L Schwefelsäure keine Komplexverbindungen [166] und SbCl_5 hydrolysiert in wässriger Lösung zu den genannten Hydroxoverbindungen des Sb(V) [168]. Allerdings kann Fluorid in höheren Konzentrationen zu einer Komplexierung des Sb(V) führen. So beschrieben bereits Lange und Askitopoulus [169] verschiedene Salze des SbF_6^- und weisen auf die stufenweise Hydrolyse dieser Verbindung zum Sb(OH)_6^- hin. Kolditz und Sarrach [170] identifizierten verschiedene Hydroxo-Fluoro-Komplexe der Zusammensetzung $\text{SbF}_n(\text{OH})_{6-n}^-$ ($n=2-5$). Die Versuche von Enders [155] zum Einfluss verschiedener Salze auf die Bestimmung des Antimons mit Atomabsorptionsspektrometrie und Hydridtechnik zeigten einen klaren Minderbefund in Gegenwart von Fluoridkonzentrationen über 5 mmol/L.

7.2.2.2 Antimon (III)

Das dreiwertige Antimon liegt in wässriger Lösung über einen breiten pH-Bereich ungeladen als Sb(OH)_3 vor. Nach den **Gleichung 7-2** und **Gleichung 7-3** [159] dominiert erst oberhalb

pH=11,8 die anionische Spezies $\text{Sb}(\text{OH})_4^-$ und unterhalb pH=1,4 die kationische Form $\text{Sb}(\text{OH})^+$ (siehe **Abbildung 7-5**)

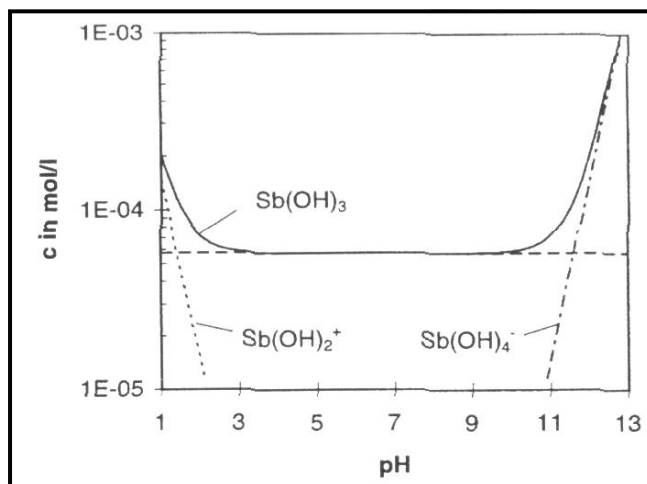
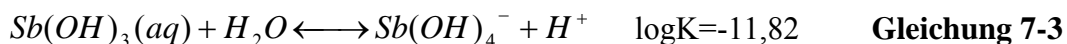
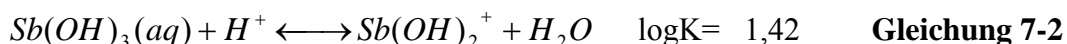
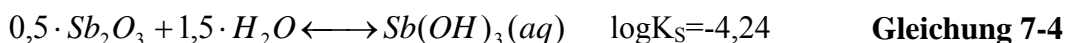


Abbildung 7-5: Löslichkeitsdiagramm und Spezieskonzentrationen des Sb(III) im Gleichgewicht mit Sb_2O_3 (0,1 mol/L, berechnet mit **Gleichung 7-4**-**Gleichung 7-6** nach Baes und Mesner [159])

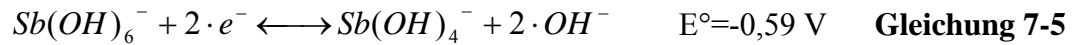
Pitman et al. [165] geben für den Logarithmus der Gleichgewichtskonstanten der **Gleichung 7-2** einen Wert von 0,87 und Anderegg und Malik [171] einen Wert von 1,28 (für 20°C) an. Die drei Spezies findet man in der Literatur auch oft in ihrer dehydratisierten Form notiert: SbO^+ , HSbO_2 oder SbOOH sowie SbO_2^- . Der Sb(III)-Gehalt in wässriger Lösung ist nach Baes und Mesmer [159] im Existenzbereich der Spezies $\text{Sb}(\text{OH})_3$ gemäß **Gleichung 7-4** auf maximal $5,5 \cdot 10^{-5}$ mol/L Sb(III) (7mg/L) beschränkt. Es sei in diesem Zusammenhang jedoch auf abweichende Angaben in der Literatur sowie auf den Überblick in **Tabelle 7-4** verwiesen.



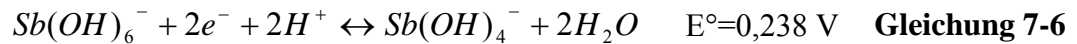
Komplexverbindungen mit verschiedenen Anionen sind zwar dokumentiert, treten aber üblicherweise erst bei extremen Bedingungen auf. So bilden sich nach Senanayake und Muir [172] die Chlorokomplexe des Sb(III) bei pH-Werten unter eins und hohen Chloridkonzentrationen (mehrere mol/L Cl^-). Sulfatkomplexe wurden von Dawson et al. [166] in Koexistenz mit $\text{Sb}(\text{OH})_2^+$ nur in 2-18 mol/L Schwefelsäure nachgewiesen.

7.2.2.3 Redoxreaktionen von Antimon

Wie in vielen vergleichbaren Fällen ist die Redoxreaktion des Antimons von der dreiwertigen in die fünfwertige Form und umgekehrt mit einer Säure-Base-Reaktion gekoppelt und damit pH-abhängig. In Tabellenwerken [173] findet sich für die gelösten Antimonspezies die **Gleichung 7-5**:



Diese Gleichung lässt sich zu **Gleichung 7-6** umformulieren, wobei sich anhand der Nernst-Gleichung und dem Ionenprodukt des Wassers das Standardpotential errechnen lässt:



Für dieselbe **Gleichung 7-6** geben Pitman et al. [165] ein Standardpotential von 0,363 V an und leiten daraus unter Berücksichtigung der verschiedenen Säure-Base-Reaktionen die Existenzbereiche der Spezies beider Antimonoxidationsstufen in einem pH- E_H -Diagramm her. Da, wie oben bereits erwähnt, die bei Pitman et al. [165] angegebene Spezies SbO_2^+ mit großer Wahrscheinlichkeit nicht existiert und die Gleichgewichtskonstanten sowie das Standardpotential in der genannten Arbeit von der neueren Literatur abweichen, wurde das pH- E_H -Diagramm neu berechnet (**Abbildung 7-6**).

Danach erfolgt in dem breiten pH-Bereich von 2,7-11,8 der Übergang zwischen den Spezies $\text{Sb}(\text{OH})_3$ und $\text{Sb}(\text{OH})_6^-$, wobei das Redoxpotential der äquimolaren Konzentration beider Spezies mit einer Steigung von -0,0887 V mit dem pH-Wert fällt und bereits bei pH=6,6 einen Wert von Null erreicht.

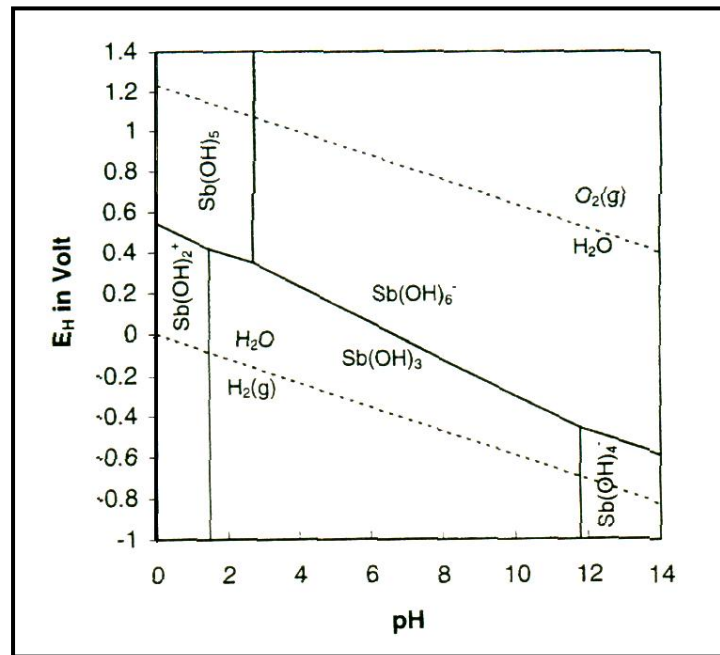


Abbildung 7-6: pH- E_H -Diagramm des drei- und fünfwertigen Antimons in wässriger Lösung (Gleichgewichtskonstanten der Säure-Base-Reaktionen aus Baes und Mesner [159], Standard-Redoxpotential aus Lide [173])

Diese auf einen Gleichgewichtszustand bezogene Betrachtung sollte jedoch nicht zu voreiligen Schlüssen hinsichtlich der Oxidationsstufen von Antimon führen, da Redoxprozesse bekanntermaßen sehr langsam verlaufen können und sich nicht jeder potentielle Reaktionspartner für eine Redoxreaktion tatsächlich als geeignet erweist. Zur Reaktionskinetik des Antimons konnten in der Literatur keine Angaben gefunden werden, so dass auf die Stabilität der jeweiligen Antimonoxidationsstufe, insbesondere bei Versuchen mit Sb(III), zu achten ist.

7.3 Antimon in der Umwelt

Antimon findet sich in der Natur analog dem Arsen in Form von Antimonsulfiden (vor allem dem Antimonglanz), Metallantimoniden und Antimonoxiden. Der Anteil an Antimon in der Erdkruste wird, etwa vergleichbar mit Cadmium, mit 0,2 g/t [174], 0,3 g/t [175] und 0,65 g/t [176] angegeben. Die wichtigsten Lagerstätten liegen in Südchina, Bolivien, Südafrika, Russland sowie Mexiko und werden auf 4,5 bis 6 Millionen Tonnen geschätzt, wobei allein das Vorkommen in China 3,5 bis 4 Millionen Tonnen beträgt.

Die Weltjahresproduktion lag in den 80iger Jahren bei ca. 70.000 t/Jahr [177], ist aber in den letzten Jahren auf ca. 140.000 t gestiegen [178]. Die Recycling-Rate (u. a. Batterien) ist zum Teil auch gestiegen. Die **Tabelle 7-5** stellt die Weltjahresproduktion 1998 und die geschätzten Lagerstätten in den wichtigsten Abbauregionen dar:

Tabelle 7-5: Weltjahresproduktion (1998) und vorhandene Lagerstätten vorkommen [178].

Staat	Produktion (t)	Lagerstätte (t)
USA	500	90.000
Bolivien	9.000	320.000
China	110.000	1.900.000
Kirgisien	1.200	150.000
Russland	6.000	370.000
Südafrika	5.000	250.000
Tadschikistan	1.200	60.000
Andere Länder	7.000	75.000
Gesamt (gerundet)	140.000	3.200.000

Die Antimonprodukte kann man in drei große Gruppen einteilen; hierbei handelt es sich um die metallischen Produkte, die nichtmetallischen Produkte und feuerhemmende Produkte.

Zur ersten Gruppe zählen die Legierungen, hier vor allem Legierungen aus Blei und Antimon mit Antimonkonzentrationen bis 25 %. Die wichtigsten Anwendungen sind Batterien und Munition.

Zu der Gruppe der nichtmetallischen Produkte gehören Katalysatoren für organische Synthesen, Halbleiter, Entfärbungs- und Trübungsmittel für Spezialgläser sowie Farbstoffe. Die wichtigste Applikation für Antimon mit einem Anteil von über 50 % ist die als feuerhemmende Produkte, denen Antimon als Antimontrioxid zugesetzt wird. Dieses wird Kunststoffen, Gummi, Elastomeren, Textilien und Papieren beigemischt, um die Entflammbarkeit zu verringern. Erstaunlicherweise besitzt Antimontrioxid keine feuerhemmende Wirkung, lediglich in Verbindung mit anderen, vor allem halogenierten organischen Verbindungen, kann es die Entflammbarkeit deutlich senken.

Der wachsende Verbrauch von Antimon im Bereich der schwer entflammaren Stoffe führt zu einem Anstieg der Antimonkonzentration im Hausmüll, wobei man davon ausgeht, dass 80% des Antimons im Hausmüll durch den Einsatz als feuerhemmende Substanz dorthin gelangt ist [179]. Untersuchungen in den Niederlanden haben ergeben, dass sich im Hausmüll 5,2 mg Antimon pro kg Trockenmüll befinden [180].

Deutlich höhere Antimongehalte findet man bei der Untersuchung von gemischtem Müll, wie er in Müllverbrennungsanlagen vorliegt. Bei einer Studie über das Müllheizkraftwerk in Bamberg wurden durchschnittliche Antimonkonzentrationen von über 40 mg/kg gemessen [181, 182]. Der Müll dieser Anlage setzt sich zu 43 % aus Industrieabfällen, zu 44 % aus städtischen Abfällen und zu 13 % aus Schlacken zusammen.

Ein weiterer Eintrag von Antimon in die Umwelt geschieht über den Abbau von Stoffen mit einer größeren wirtschaftlichen Bedeutung. So kommt Antimon als baubrechendes Mineral in Blei-, Kupfer- und Silbererzen vor. Bei einer Biomonitoring-Untersuchung im Pfälzer Bergland wurden Bodenproben mit deutlich erhöhten Gehalten an Quecksilber, Arsen und Antimon gefunden, wobei der Antimongehalt zwischen $< 0,1$ mg/kg und 776 mg/kg schwankte [183]. In dieser Region wurde vom 15. bis teilweise ins 20. Jahrhundert Quecksilber abgebaut. Neben Zinnober und Quecksilberamalgamen wurden auch sulfidische Minerale von Arsen und Antimon sowie Fahlerz gefunden.

Eine weitere wichtige Quelle für den Eintrag von Antimon in die Umwelt ist die Verbrennung fossiler Brennstoffe [184, 185, 186].

Zusätzlich zu dem von Menschen verursachten Eintrag von Antimon gelangt Antimon durch den Ausbruch von Vulkanen [187], Gesteinsverwitterungen sowie durch Erosion [188] in die Umwelt.

Da man nun herausgefunden hatte, dass und in welchen Mengen Antimon in die Umwelt gelangt, stellte sich die Frage, was mit dem Antimon geschieht. Wird es im Boden immobilisiert, ist es bioverfügbar, wird es dabei umgewandelt, oder bleibt es in der Form, in der es in die Biosphäre gelangt ist? Dazu wurden einige spezialanalytische Studien durchgeführt [189, 190, 191].

Untersuchungen an Huminsäuren haben gezeigt, dass Antimon an diesen immobilisiert werden kann, jedoch nur eine Affinität von Antimon(III) zu Huminsäuren existiert [192]. Hierbei können bis zu 10 nmol Antimon pro g Huminsäure gebunden werden.

Eine weitere Möglichkeit, mehr über den Weg des Antimons zu erfahren, bietet sich beim Austritt des radioaktiven Antimonisotops ^{125}Sb aus Kernkraftwerken. Hierbei konnte die Spur des Antimon über den Boden [189], Pflanzen [190] bis hin in kleine Säugetiere [191] nachvollzogen werden. Es hat sich jedoch gezeigt, dass Transport, Akkumulation und Umwandlung von Antimon in der Umwelt sehr gering sind im Vergleich zu anderen Elementen wie z. B. dem Arsen. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass die gefundenen Ergebnisse eher auf eine unabhängige biologische Aufnahme von Antimon durch Inhalation und Absorption, als durch eine Aufnahme über die Nahrungskette zurückzuführen sind [193].

Trotz dieser Tatsache wurden bei Untersuchungen von Seewasser im Golf von Mexiko [194], von Wasserproben aus der Ostsee [195], von Sedimenten aus deutschen Häfen und Flüssen [196] und von Proben stark kontaminierter Böden [197] neben den anorganischen Antimonspezies auch organische Spezies von Antimon gefunden. Dazu zählten Mono-, Di- und Trimethylantimonverbindungen. Diese Tatsache sowie die 1997 im Labor durchgeführte biologische Methylierung von Antimonverbindungen mit Hilfe ausgewählter Bakterienstämme [198] erbrachten den Beweis für die 1976 aufgestellte Theorie von Parris und Brinkmann [152] über die biologische Mobilität von Antimon und Antimonverbindungen.

7.4 Toxizität

Antimon ist ein nicht essentielles Spurenelement [199]. Die Toxizität des Antimons ist ca. 10 Mal kleiner als die des Arsens, ist aber von den Oxidationsstufen und der chemische Struktur abhängig. Wichtig sind die Verbindungen der Liganden und die Löslichkeit der Komponenten. Wie bei Arsen, sind beim Sb die anorganischen Verbindungen toxischer als die methylierten (organischen) Verbindungen und elementares Antimon ist giftiger als seine Salze. Außerdem ist dreiwertiges Antimon toxischer als fünfwertiges Antimon, wie Sb_2O_5 . In Tierversuchen wurde die karzinogene Wirkung von Sb_2O_3 und SbS_3 nachgewiesen, die bei Ratten durch Inhalation zu Lungentumoren führten. Die **Tabelle 7-6** stellt einige der toxischen Antimonverbindungen und ihre letalen Dosen zusammen.

Tabelle 7-6: Toxizität des Antimons: LD₅₀-Dosen einiger Antimonverbindungen [156, 119]

Applikationsform/Versuchstier	Antimon (III) ^a	Antimon (V) ^a
Chlorid, Ratte, Oral	525	1100
Oxid, Ratte, Oral	20000	
Oxid, Ratte, Intravenös	3250	4000
Oxid, Maus, intravenös	172	1000
Sulfide, Ratten Oral	1000	1500

^aLD₅₀ als mg Wirkstoff pro Kg Körpermasse

Über die Toxizität des Sb, insbesondere über den Gesamtgehalt im menschlichen Körper, gibt es kaum Informationen. Der größte Teil des Antimons wird spätestens nach 48 Stunden aus dem menschlichen Körper ausgeschieden. Sb(V) hat nur wenig Affinität zu Erythrocytein, während Sb(III) mit den Leukozyten und seinen Sulfhydryd Komponenten reagiert. Die Toxizität wird durch irreversible Bildung von Verbindungen mit dem Thiol der Enzyme verursacht. Im Gegensatz zu Arsen können Säugetiere von Antimon über Methylierung detoxifiziert werden, aber der Mechanismus ist noch nicht geklärt [200].

Blei-Batterien-Arbeiter sind gegenüber Sb₂O₃ und SbH₃ exponiert und weisen höhere Konzentrationen von Antimon in ihrem Urin auf, wie die **Tabelle 7-7** zeigt.

Tabelle 7-7: Urinale und fäkale Exkretionen von Sb in Ratten bei intravenöser Dosierung von 800 µg Sb / kg Körpergewicht [156]

Stunden nach Exposition	Urin		Exkrementen	
	µg Sb	letale Dosis	µg Sb	letale Dosis
0 - 24	39,61	19,2	34,51	16,8
24 - 48	5,21	2,5	10,58	5,1
48 - 72	1,30	0,6	4,62	2,2
72 - 96	0,14	0,1	1,02	0,5
Summe 0 - 96	46,26	22,4	50,73	24,6

Die toxischste Verbindung ist das SbH_3 , das sich durch Reduktion aus Sb(III)- und Sb(V)-Verbindungen bilden kann. Dies kann Probleme im zentralen Nervensystem und Hämolyse verursachen.

Allgemein gibt es nur wenige Daten über die Toxizität des Antimons. Durch Exposition von Antimon und seinen Verbindungen können Verätzungen in den Atmungsorganen bis zum Pneumoconiosis verursacht werden. Außerdem wurden während der Applikation als Therapeutikum bei Krankheiten wie Leishmaniasis zahlreiche Nebenwirkungen beschrieben [201], die auch bei chronischen Antimonaufnahmen beobachtet wurden. Sie reichen von Hautirritationen [202] und Magenbeschwerden [203], über Veränderungen der Blutwerte [204, 205] bis zu schwerer Anämie [206] und Nierenversagen [207].

7.5 Grenzwerte und Richtlinie für Antimon

Einige Richtlinien bzw. Vorschläge wurden für die Konzentration des Antimon und seiner Verbindungen am Arbeitsplatz, in der Luft, im Trinkwasser sowie im festen Abfall erlassen oder formuliert. In der **Tabelle 7-8** sind die verschiedenen Werte zusammengestellt:

Tabelle 7-8: Richtlinien und Vorschläge für maximale Antimonkonzentrationen

Bereich	Chemikalien	Konzentration
Luft (am Arbeitsplatz) [208]	Sb Metall als Staub	0,5 mg/m ³
	Sb(III) und (V) Fluoride	0,3 mg/m
	Sb(V) Oxide und Sulfide	2,0 mg/m ³
	Sb(III) und (V) Chloride	0,3 mg/m ³
	Sb-Hydrid (Stibin)	0,3 mg/m ³
Abgase (Industrie) [209]	Summenparameter für As, Co, Ni, Pb, Cu, Sn, Sb, V	0,5 mg/m ³
	Gesamtes Antimon	10 µg/L
Trinkwasser [210]	Trockengewicht für gesamtes Antimon	50 mg/kg

Wichtig ist, dass die Mitarbeiter einen geeigneten Schutz tragen, um die Möglichkeit von chronischen Vergiftungen zu vermeiden.

Das Risiko einer Vergiftung durch Antimon in Trinkwasser und Nahrung ist gering. Die tolerierbare tägliche Aufnahme liegt bei 86 µg/kg Körpergewicht, die tatsächliche Aufnahme dagegen liegt nur bei 23-35 µg/kg [212]. Der Antimongehalt unbelasteter Personen liegt für Blut zwischen 0,7 und 85 µg/kg, für Lebergewebe zwischen 6 und 23 µg/kg und für Lungengewebe zwischen 17 und 95 µg/kg [213].

8 Methodenoptimierung für die Chromatographie

Eine der wichtigsten Methodengruppen für die Speziesanalytik von Metallen und Halbmetallen im Spuren- und Ultraspurenbereich ist die Kopplung von Flüssigchromatographie und elementspezifischer Detektion.

Grundlage für die vorliegende Arbeit ist die Überlegung, dass Antimon von unterschiedlicher Herkunft auch in unterschiedlichen chemischen Formen vorliegen kann, sei es nun durch eine unterschiedliche Komplexierung bzw. Chelatisierung oder in einer unterschiedlichen Oxidationsstufe. Der Einsatz von chromatographischen Trennmethoden ist für den spezifischen Ansatz der Speziesanalytik sinnvoll, in dem die genaue chemische Form der Spezies betrachtet wird. Wie im **Kapitel 7** gezeigt, liegen Sb(III) und Sb(V) über einen weiten pH-Bereich als einfach oder mehrfach geladene Anionen in der Lösung vor. Daher wurden zunächst Trennverfahren auf der Basis der Anionenchromatographie entwickelt. Im Rahmen dieser Arbeit gilt es dann, eine Methode zu entwickeln, die es ermöglicht, anionische Sb-Spezies qualitativ und quantitativ nachzuweisen. Dies erscheint als notwendig, wenn man die Chromatographie als Sb-Spezifizierungsmethode bei biologischen Problemstellungen etablieren will, wie es bei Leishmaniose der Fall ist. Da die Konzentration von Sb in biologischen Proben meist gering ist, wird zur Bestimmung dieser Gehalte ein sehr empfindlicher Detektor benötigt. Hier bietet sich die Kopplung der chromatographischen Trennung mit einem elementspezifischen Detektor wie etwa der ICP-AES oder –MS an. Der prinzipielle Aufbau der Messapparatur wurde bereits in **Abbildung 4-14** in **Kapitel 4** dargestellt. Der apparative Aufbau war für alle verwendeten chromatographischen Methoden gleich, lediglich die Trennsäule und der Eluent wurden variiert.

Als Pumpe kam eine Merck LaChrom L 7100 zum Einsatz. Der Injektor war ein six-port-Ventil der Firma Reodyne. Die Probenschleife hatte ein Volumen von 100 μL , die Flussrate betrug zwischen 0,5 und 2 mL/min, abhängig von der verwendeten Trennsäule. Es konnte kein Einfluss oder eine Störung bei der Verwendung einer Metallpumpe wie der Merck LaChrom L 7100 nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu wurde dies für die Bestimmung anderer wichtiger Elemente in biologischen Proben als Problem erkannt da durch das Pumpematerial eine Kontamination der Proben oder sogar Veränderungen der untersuchten Spezies auftreten können.

Die Bedeutung der Antimonspeziesanalytik war jedoch zunächst relativ gering, lediglich Camara und de la Calle [214] hatten 1995 ein Verfahren zur Trennung von Sb(III) und Sb(V) mit Anionenchromatographie und Phthalsäure als Eluent vorgeschlagen, Ulrich [79, 196] schlug Trennungen mit Salpetersäure und Miekeley et al. [215] mit EDTA als Komplexierungsmittel und Phthalsäure als Eluent vor.

Die Anwendung auf reale Proben wird im **Kapitel 0** und **0** erläutert. Am Ende dieses Kapitels steht die vergleichende Diskussion der Methoden.

8.1 Durchführung der Trennung

Bei allen nachfolgend behandelten Trennmethode ist zu verzeichnen, dass der Analyt bei der Messung nicht vollständig eluiert wird, sondern ein teilweise beträchtlicher Anteil auf der Säule verbleibt. Dieses kann natürlich zu Störungen der nachfolgenden Messungen führen bzw. nach einer größeren Anzahl von Messungen die vollständige Belegung der Austauscherplätze und somit ein Verstopfen der Säule zur Folge haben. Um diesbezügliche Informationen zu erhalten, wurden im Folgenden verschiedenen Eluenten unter verschiedenen Trennbedingungen untersucht. Es kamen verschiedene anorganische und organische Säuren sowie der Komplexbildner EDTA als Eluent zur Anwendung, welcher den auf der Säule verbliebenen Analyten komplexieren und eluieren soll.

8.2 Untersuchungen an kommerziellen Anionenaustauschmaterialien

Neben der Wahl eines geeigneten Anionenaustauschers wird in diesem Teil der Arbeit die qualitative Bestimmung von Sb-Spezies beschrieben. Dazu werden an kommerziell erhältlichen Austauschermaterialien Untersuchungen mit unterschiedlichen Eluenten, Eluentkonzentrationen und Modifiern durchgeführt.

Für die Anionenchromatographie steht neben selbst hergestellten eine Vielzahl an kommerziell erhältlichen Austauschermaterialien zur Verfügung. Folgende Trennsäulen sollen auf ihre Tauglichkeit in der Sb-Spezifizierung untersucht werden: Phenomenex Star-Ion A300 (100 x 4,6 mm ID) und Metrosep Anion Dual 2 (125 x 4 mm ID), beide von der Firma Metrohm (Herisau, Schweiz), und Hamilton PRP X-100 (150 x 4,1 mm, Partikelgröße 10 µm) von der Firma Varian (Darmstadt, Deutschland). Bei allen Säulen handelt es sich um oberflächenfunktionalisierte Anionenaustauscher: Die Trennsäulen unterscheiden sich in

ihrem Polymer-Grundgerüst. Die Phenomenex Star-Ion A300 und die Hamilton PRP-X100 bestehen aus Polystyrol-Divinylbenzol-Copolymeren (PS-DVB), die erste funktionalisiert mit quartärem Amin und die zweite mit Trimethylammonium, die Metrosep Anion Dual 2 besteht aus Divinylbenzol-Methylmetacrylat-Copolymeren (DVB-MMA).

Die **Abbildung 8-1** zeigt exemplarisch Anionenchromatogramme einer Sb-Standardlösung, die mit den drei oben genannten Trennsäulen gemessen worden sind. Auffällig ist hierbei, dass bei Metrosep Anion Dual 2 trotz Variation der Eluent-Konzentration (2,5...60 mmol L⁻¹ HNO₃), des Eluent-pH-Wertes (3...10) und der Flussrate (0,5...2 mL min⁻¹) kein Sb(III) nachgewiesen werden kann, denn es wird kein Sb(III) eluiert. Der Grund hierfür könnte die Komplexierung von Sb(III) am Grundgerüst des Anionenaustauschers sein. Durch die Divinylbenzol-Methacrylat-Copolymere kann Sb(III) irreversibel gebunden werden, sodass es dann nicht mehr eluiert bzw. detektiert werden kann.

Bei den anderen Säulen können beide Sb-Spezies detektiert werden. Der Unterschied ist, dass bei der Phenomenex Star-Ion A300 das Sb(III) viel schneller und vollständiger eluiert, aber dagegen das Sb(V) nicht homogen eluiert wird, da das Chromatogramm eine kleine Schulter vor dem ersten Peak zeigt. Der Grund dafür könnte eine starke Lagerung der Phenomenex Säule. Diese Schlussfolgerung wurde nach mehreren nicht erfolgreichen Untersuchungen von anderen bekannten Anionen wie Chlorid, Nitrat usw. mit der oben genannten Säule getroffen. Außerdem betrug die Totzeit des Systems 50 Sekunden, dies wurde mit Mg als Analyt, welches nicht mit dem Austauschermaterial wechselwirkt, bestimmt. Wie man in der **Abbildung 8-1** beobachten kann, liegt die Retentionszeit des Sb(V) bei der Phenomenex Säule unter 60 Sekunden, das heißt, dass bei biologischen Proben, in denen sich noch andere Spezies befinden, die auch positiv geladen oder ungeladen sein können, eine vollständige Trennung nicht möglich wäre.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde nur noch die Hamilton PRP-X100-Trennsäule für die anionenchromatographische Sb-Speziierung weiter verwendet.

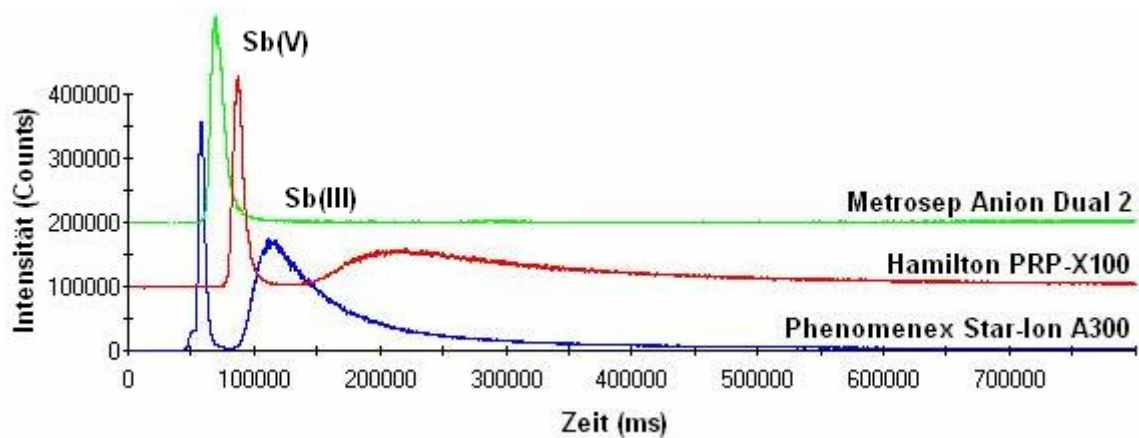


Abbildung 8-1: Anionenchromatogramme einer Sb-Standardlösung (100 µg/L Sb(V) und 600 µg/L Sb(III)) gemessen mit unterschiedlichen Trennsäulen. Eluent: 2,5 mmol/L Phthalsäure, pH=4,7, Flussrate: 1,5 mL/min

8.3 Eluenten für die IC

Nachdem die Anionenchromatographie als Methode zur qualitativen Bestimmung der vorliegenden Sb-Spezies ihre grundsätzliche Tauglichkeit bewiesen hat, geht es im Folgenden darum, eine sinnvolle Optimierung der Methode für das IC-ICP-MS zu finden. Verschiedene Möglichkeiten stehen prinzipiell dazu zur Verfügung. Man kann einerseits verschiedene Eluenten benutzen und andererseits kann man durch die Konzentration oder den pH-Wert des Eluenten die Trennung beeinflussen. Durch die Verwendung von organischen Modifiern besteht die Möglichkeit, die Halbwertsbreite des chromatographischen Peaks von Sb(III) zu verändern. Um die Trennung von Sb(III) und Sb(V) zu ermöglichen und um die starke Retention des Sb(III) in der Säule zu verhindern, ist es sehr wichtig, den richtigen Eluent auszuwählen. Als Eluenten kamen diverse anorganische (Chlorid, Sulfat, Nitrat, Perchlorat, Carbonat) und organische Anionen (Citrat, EDTA, Phthalsäure, 4-Hydroxybenzoesäure) in wässriger Lösung zum Einsatz. Die Löslichkeit der Analyten war in allen verwendeten Eluenten gegeben, auch dessen Polarität passt gut zu der des Austauschermaterials. Die Verträglichkeit des Eluenten mit dem Detektionssystem ist ebenfalls gegeben, solange die Konzentration der gelösten Stoffe nicht zu groß wird, da dies zum einen die Plasmaleistung beeinflusst, zum anderen zu Ablagerungen und Verstopfungen in der Zerstäuberkammer oder auf dem Sampler führen kann. Hier wurden keine höheren Konzentrationen als maximal 60 mmol/L eingesetzt, was bei der Verwendung eines ICP-MS als Detektor keine Probleme darstellen sollte. Der pH-Wert des Eluenten wird durch die Stabilität der Säule begrenzt, hier durfte aber in einem Bereich von pH 1-13 gearbeitet werden.

8.3.1 Kenngrößen für eine statistische Beurteilung analytischer Ergebnisse

Der Kapazitätsfaktor k' und die Auflösung zweier Peaks R wurden schon im **Kapitel 3** beschrieben (siehe **Gleichung 3-9** und **Gleichung 3-14**).

Der Asymmetriefaktor A ist das Maß für die Peakasymmetrie. Er wird als Quotient der Breiten der rechten und linken Peakhälfte in 10% der Peakhöhe bestimmt.

Ein weiterer interessanter Parameter, der den chromatographischen Messungen entnommen werden kann, ist die durchschnittliche Ladung der jeweiligen Spezies unter den chromatographischen Bedingungen. Da es während der chromatographischen Trennung u. a. zu Protonierungs-, Deprotonierungs-, Komplexbildungs- und Umkomplexierungsreaktionen kommen kann, lässt sich die Zusammensetzung der Spezies nicht exakt angeben. Diese Reaktionen finden in der Regel nicht unter Gleichgewichtsbedingungen statt, sodass die Anwendung von Bildungskonstanten kaum in Betracht kommt. Um die chromatographischen Eigenschaften der Spezies, z. B. die Veränderungen der Retentionszeit bei Variation der Eluentzusammensetzung vorherzusagen, ist die durchschnittliche Ladung ein wichtiger Anhaltspunkt.

Die durchschnittliche Ladung y wurde nach **Gleichung 8-1** mit V_R als Nettoretentionsvolumen, a als Konstante und x als Ladung des Eluenten mit der Konzentration $c(E^{x-})$ bestimmt. Die Ermittlung der durchschnittlichen Ladung erfolgte nach Small et al. [216]. Die durchschnittliche Ladung wurde auch zur Charakterisierung der Spezies, die in Realproben gefunden wurden, herangezogen. Auf die Zeit umgerechnet wäre das Nettoretentionsvolumen gleich der Nettoretentionszeit mal der Flussgeschwindigkeit des Systems.

$$\log V_R = \log(t_R \cdot F) = a - \frac{y}{x} \log[c(E^{x-})] \quad \text{Gleichung 8-1}$$

Zur Charakterisierung der Trennung müssen auch andere mathematische Kenngrößen bestimmt werden. Dazu gehören die Standardabweichung von Parallelbestimmungen (Varianz) und die Nachweisgrenze.

Der Mittelwert der Parallelbestimmungen wird nach **Gleichung 8-2** berechnet.

$$\bar{y} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n y_i$$

Gleichung 8-2

n: Anzahl der Parallelbestimmungen

i: Laufzahl für die Parallelbestimmungen

 y_i : Messwert der i-ten Parallelbestimmung \bar{y} : Arithmetisches Mittel der Messwerte der Parallelbestimmungen.

Die Standardabweichung errechnet sich aus der Quadratwurzel der mittleren Fehlerquadrate (**Gleichung 8-3**) [217].

$$s = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}$$

Gleichung 8-3

s: Standardabweichung

Aus den Mittelwerten der Parallelbestimmungen wird die Kalibriergerade mittels linearer Regression bestimmt (**Gleichung 8-4**).

$$\hat{y}_i = a + b \cdot x_i$$

Gleichung 8-4 \hat{y}_i : Geschätzter Funktionswert bei der Kalibrierung

a: Ordinatenabschnitt der Kalibriergeraden

b: Steigung der Kalibriergeraden (Empfindlichkeit)

 x_i : Gehalt einer Kalibrierprobe

Die Nachweisgrenze konnte nach DIN 32645 oder über die dreifache Standardabweichung des Leerwertauschens berechnet werden.

Für die Berechnung der Nachweisgrenze nach der DIN 32645 gilt folgende Formel:

$$x_{NWG} = s_{x0} \cdot t_{(P\%,f)} \cdot \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{1}{m} + \frac{\bar{x}^2}{Q_x}}$$

Gleichung 8-5 x_{NWG} : Nachweisgrenze s_{x0} : Verfahrensstandardabweichung \bar{x} : Arithmetisches Mittel der Gehalte aller Kalibrierproben

n: Anzahl der Kalibriermessungen

- m: Anzahl der Messungen an der Analysenprobe
 f: Zahl der Freiheitsgrade
 t: t-Faktor, abhängig vom Signifikanzniveau P% (hier einseitige Fragenstellung nach der NWG) und der Anzahl der Freiheitsgrade
 Q_x: Quadratsumme der Konzentrationen aller Standards

Die in der **Gleichung 8-5** nicht bekannten Größen Q_x und s_{x0} berechnen sich aus den **Gleichung 8-6** und **Gleichung 8-7**, vorher wird s_{y,x} nach **Gleichung 8-8** berechnet:

$$Q_x = \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 \quad \text{Gleichung 8-6}$$

$$s_{x0} = \frac{s_{x,y}}{b} \quad \text{Gleichung 8-7}$$

$$s_{y,x} = \sqrt{\frac{1}{n-2} \sum_{i=1}^n (\hat{y}_i - \bar{y}_i)^2} \quad \text{Gleichung 8-8}$$

s_{x,y}: Streuung um die Regression

\bar{y}_i : Arithmetisches Mittel der Messwerte der i-ten

Parallelbestimmung

x_i: Gehalt einer Kalibrierprobe

b: Steigung der Kalibriergeraden (Empfindlichkeit)

Die Berechnung der Nachweisgrenze über die dreifache Standardabweichung des Leerwertauschens geht auf Kaiser zurück [218]. Man geht dabei von einer gaußförmigen Verteilung des Rauschens des Leerwertes um den Mittelwert des Leerwertes aus, bei der 99,7 % der Leerwertsignale innerhalb der 3σ Grenze liegen (**Gleichung 8-9**). Damit nimmt man eine Wahrscheinlichkeit von 0,15 % in Kauf, dass ein Leerwertsignal als Messwert interpretiert wird. Die so erhaltene Nachweisgrenze hat als Einheit die Messgröße des Detektors, für die Umrechnung auf die Konzentration benötigt man noch die Steigung der Kalibriergeraden.

$$x_{NWG} = \frac{3 \cdot \sigma}{b} \quad \text{Gleichung 8-9}$$

σ: Standardabweichung des Leerwertes

Da bei dieser Methode jedoch viele Parameter wie z.B. die Zahl der Wiederholmessungen, die Zahl der Kalibrierpunkte usw. unberücksichtigt bleiben, wurde für die Bestimmung der Nachweisgrenze die DIN-Methode gewählt.

8.3.2 Anionenchromatographie mit Phthalsäure als Eluent

Zuerst soll das Verhalten von Sb(III) und Sb(V), die (wie im **Kapitel 7** erläutert) hauptsächlich als anionische Spezies zu erwarten sind, bei der Verwendung von Phthalsäure als Eluent betrachtet werden. Phthalsäure als Eluent ist etabliert für die Bestimmung von Standardanionen (wie z. B. Nitrat oder Chlorid) mit Leitfähigkeitsdetektion ohne chemische Suppression [219]. Dabei verfügt es über mittlere Elutionsstärke [220] für Anionen, wobei zum einen elektrostatische Wechselwirkungen, zum anderen Adsorptionseffekte des π -Elektronensystems am Austauschermaterial zu berücksichtigen sind.

Die Phthalsäure ist eine zweibasige Säure, sodass der pH-Wert eine wichtige Rolle bei der Entwicklung der Methode spielt. Da die Phthalsäure pK_S -Werte von 2,9 und 5,4 besitzt, liegt sie im pH-Gebiet von 3 bis 5,4 vorwiegend als einwertig geladenes Ion vor und ab pH 5,4 als zweiwertig geladenes Ion. Die Elutionskraft der Phthalsäure sollte ausreichend sein, um das Sb(III), das starke Wechselwirkungen mit dem Austauschermaterial hat, von der Säule zu eluieren.

Die Optimierung der Methode erfolgte in bezug auf die chromatographische Auflösung und die Analysendauer unter Variation der Eluentkonzentration, des pH-Wertes und des Gehaltes an organischem Modifiern. Die Messungen erfolgten mit der Kopplung IC-ICP-MS und IC-ICP-AES. Die hier verwendete Phthalsäure war zwischen 1 und 20 mmolar, der pH-Wert wurde durch die Zugabe von TRIS, Tris(hydroxymethyl)aminomethan variiert. Als Packungsmaterial wurde PRP-X100, d. h. ein Polystyrol-Divinylbenzol-Grundgerüst funktionalisiert mit quartärem Amin als stark basischer Anionenaustauscher eingesetzt.

Variation des pH-Wertes

Der pH-Wert hat einen doppelten Einfluss auf die Prozesse im chromatographischen System und damit auf die Retentionszeiten der einzelnen Spezies. Entsprechend der pK_S -Werte der einzelnen Antimonspezies und zusätzlicher Effekte, z.B. durch Agglomeration, kommt es bei Änderung des pH-Wertes zu einer Veränderung der Ladung der Antimonspezies. Wie im **Kapitel 7** erklärt wurde, liegt Sb(V) in wässriger Lösung ab pH 2,7 als einwertiges Anion

vor, während die Verhältnisse bei Sb(III) durch Agglomeration und eine zweifache oder höhere Ladung gekennzeichnet sind.

Die Abhängigkeit des Analytsignals von pH-Wert und Konzentration des Eluenten ist in **Abbildung 8-2** und **Abbildung 8-3** dargestellt. Man erkennt das für Sb(V) prognostizierte, neutrale Verhalten unter pH 2,7. Da Sb(V) bei diesem pH-Wert eine Retentionszeit von 63 s. bei einer Totzeit des Systems von 61 s. hat, konnte man zu dem Schluss kommen, dass das Sb(V) in diesem Fall eine durchschnittliche Ladung von ca. 0 hat. Während es bei höherem pH-Wert, ausgehend von den chromatographischen Daten, ein anionisches Verhalten zeigt.

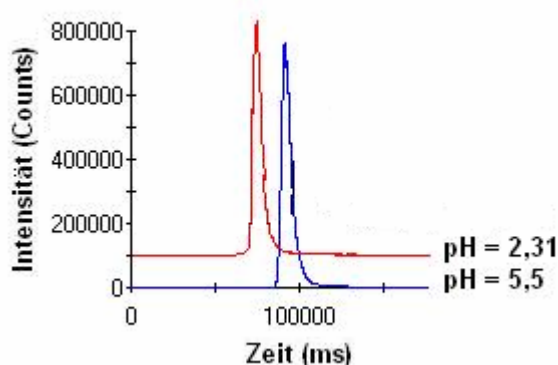


Abbildung 8-2: Chromatogramme einer Sb-Standardlösung (200 µg/L Sb(V)), Eluentkonzentration: 10 mmol/L, Flussrate: 1,5 mL/min, Detektion: ICP-MS

Außerdem ist in der **Abbildung 8-3** zu erkennen, dass das chromatographische Verhalten von der Sb(III) auch pH-abhängig ist. Im ganzen pH-Bereich ist eine ausreichende Trennung der Spezies möglich. Diese ist aber in der Praxis wegen der sehr langen Analysenzeiten, einer großen Peakverbreiterung für Sb(III), welche zu einem schlechten Signal-Rausch-Verhältnis führt, sowie eine unvollständige Elution von Sb(III) nicht nutzbar. Da sowohl ICP-AES als auch ICP-MS elementspezifische Detektoren sind, sollte man die gleiche Intensität bzw. Peakfläche für Sb(V) und Sb(III) bei einer Trennung gleicher Konzentrationen erwarten, da im Detektor keine Unterscheidung zwischen den Spezies erfolgt. Dieses ist bei der Phthalsäuremethode nicht der Fall. Die deutlich kleinere Peakfläche des Sb(III) im Vergleich zu Sb(V) deutet auf eine unvollständige Elution des Sb(III) unter den gewählten Trennbedingungen hin. Ab pH 8 ist die Elution von Sb(III) überhaupt nicht möglich. Grund dafür konnte die Bildung von mehrkernigen Komplexen mit der OH-Gruppe sein, was aber bisher nicht explizit nachgewiesen werden konnte.

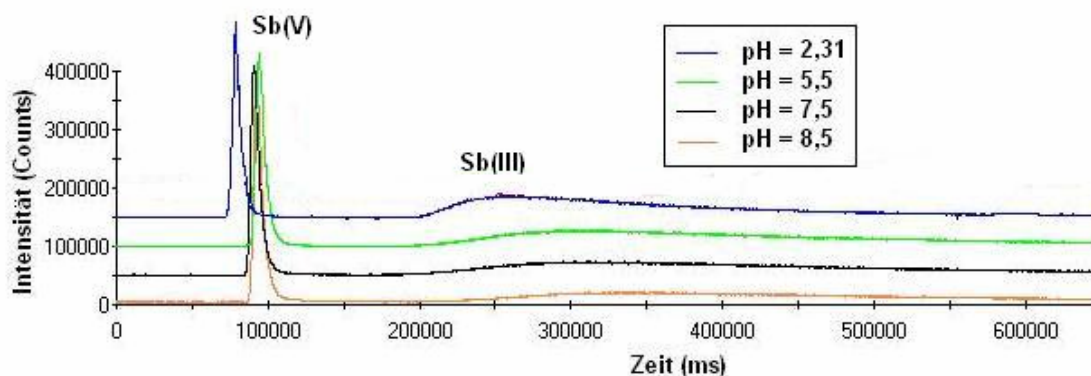


Abbildung 8-3: Chromatogramme einer Sb-Standardlösung (100 $\mu\text{g/L}$ Sb(V) und 600 $\mu\text{g/L}$ Sb(III)), Eluentkonzentration: 10 mmol/L, Flussrate: 1,5 mL/min, Detekt.: ICP-MS

Die Retentionszeit des Sb(V) bleibt nahezu unverändert, außer dem oben genannten Effekt bei $\text{pH} < 2,5$, wo das Sb(V) als nicht geladene Spezies eluiert, d. h., als Antimonsäure ($\text{Sb}[\text{OH}]_3$). (s. **Abbildung 8-4**)

Für weitere Untersuchungen wurde $\text{pH} 4,7$ ausgewählt (nach Miekeley et al. [215]), da hier die Phthalsäure als einwertiges Anion vorliegt und im Vergleich zu höheren pH -Werten, bei denen die Säure als zweiwertiges Anion vorliegt, eine Elution des Sb(III) eher möglich sein sollte. Für die Einstellung von $\text{pH} 4,7$ wird weniger TRIS benutzt und somit wird auch die Kontaminationsgefahr verringert so wie die Belastung des ICP-MS bzw. ICP-AES durch den Gehalt des Eluenten an organischen Substanzen.

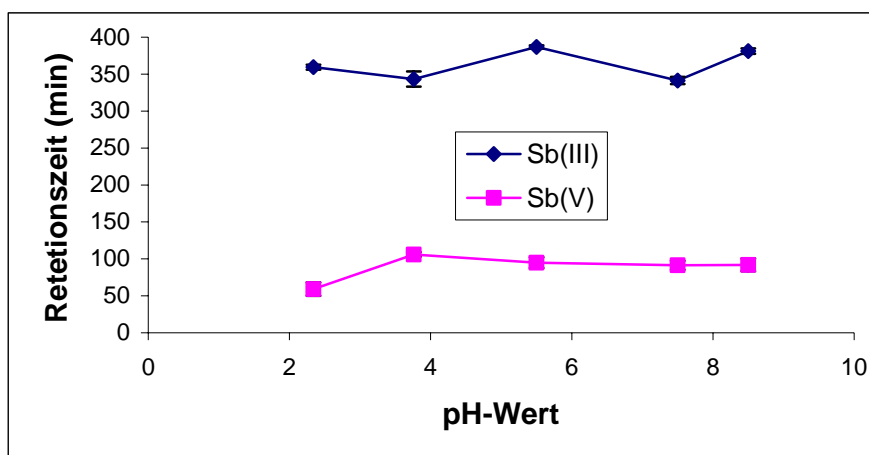


Abbildung 8-4: Einfluss des pH -Wertes auf die Retentionszeit von 100 $\mu\text{g/L}$ Sb(V) und 600 $\mu\text{g/L}$ Sb(III). Säule: PRP-X100, Eluentkonzentration: 10 mmol/L, Flussrate: 1,5 mL/min, Detektion: ICP-MS, Mittelwert aus 5 Bestimmungen

Variation der Konzentration

Die Eluentkonzentration hat über Ionenstärke und Konkurrenzreaktionen Einfluss auf die Einstellung der Gleichgewichte zwischen mobiler und stationärer Phase und damit auf die Retentionszeit der Spezies im Chromatogramm.

Bei einer Phthalsäurekonzentration von mehr als 2 mmol/L ist eine gute Trennung der beiden Spezies möglich. Unter dieser Konzentration sind die Retentionszeitunterschiede sehr klein, was zu einer Peaküberlagerung führt und eine Quantifizierung der Spezies erschwert.

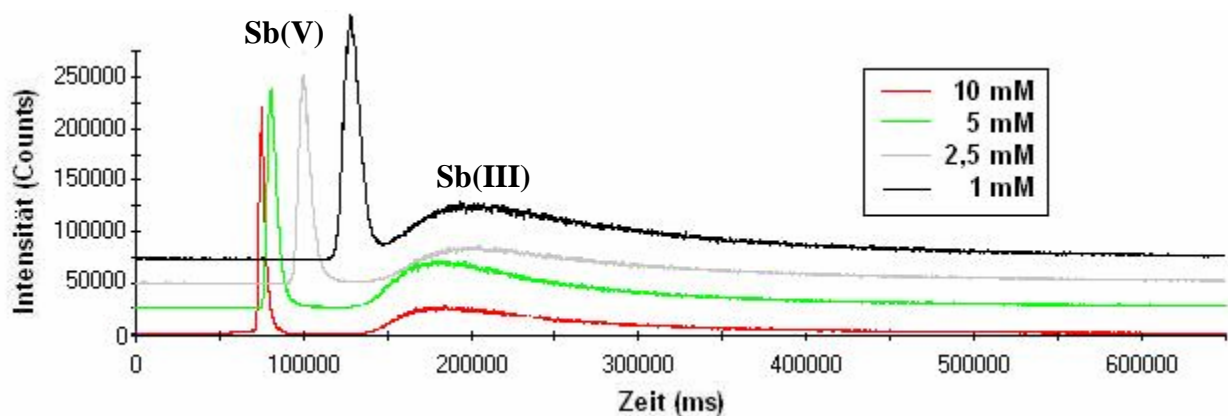


Abbildung 8-5: Chromatogramme einer Sb-Standardlösung (100 µg/L Sb(V) und 600 µg/L Sb(III)), pH-Wert 4,75, Flussrate: 1,5 mL/min, Detektion: ICP-MS

Die Erhöhung der Eluentkonzentration führt allgemein zu einer Verkürzung der Retentionszeiten [221]. Im betrachteten Konzentrationsintervall, d. h. für Eluentkonzentrationen von 1 – 20 mmol/L, ist dieser Effekt stärker für Sb(V), das sich unter den gewählten Bedingungen wie ein einwertiges Anion verhält, wohingegen das Elutionsverhalten von Sb(III) nahezu unverändert bleibt, wie **Abbildung 8-5** und **Abbildung 8-7** zeigen.

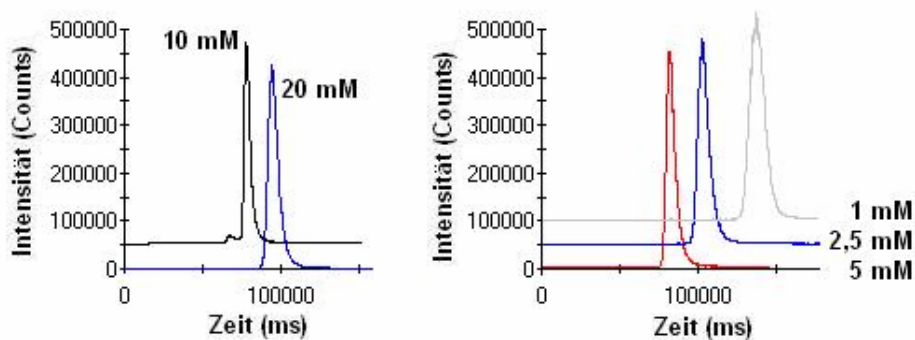


Abbildung 8-6: Chromatogramme einer Sb-Standardlösung (200 µg/L Sb(V)), pH-Wert 4,75, Flussrate: 1,5 mL/min, Detektion: ICP-MS

Abbildung 8-5 zeigt auch, dass bei Eluentkonzentrationen > 5 mmolar nicht nur eine gute Trennung, sondern auch eine zufriedenstellende Elution von Sb(III) möglich ist. Für die weiteren Untersuchungen wurde daher eine Eluentkonzentration von 5 mmol/L ausgewählt.

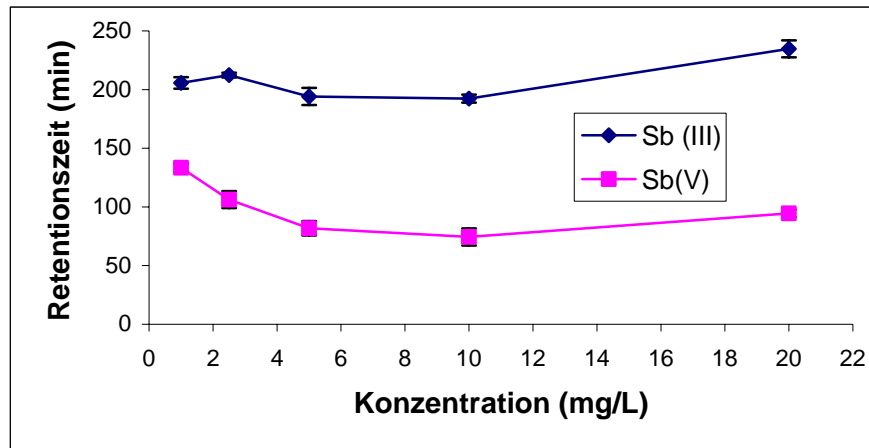


Abbildung 8-7: Einfluss der Konzentration der Phthalsäure auf die Retentionszeiten von 100 $\mu\text{g/L}$ Sb(V) und 600 $\mu\text{g/L}$ Sb(III). Säule: PRP-X100, pH-Wert 4,7, Flussrate: 1,5 mL/min, Detektion: ICP-MS, Mittelwert aus 5 Bestimmungen

Analytische Kenndaten der Trennungen mit Phthalsäure als Eluent

Das Phthalsäure-Verfahren kann sowohl als Kombination von IC mit ICP-AES als auch mit ICP-MS eingesetzt werden, ebenso wie die nachfolgend beschriebenen Verfahren.

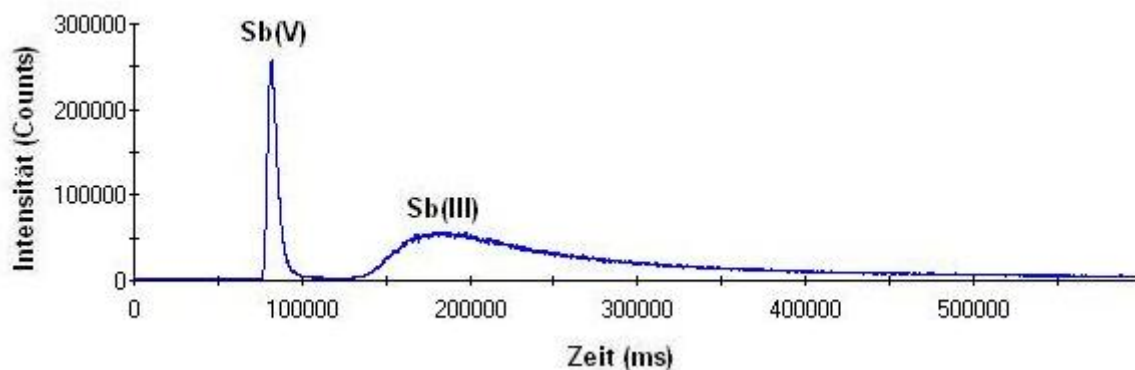


Abbildung 8-8: Trennung im Phthalsäureeluent: Chromatogramm einer Standardlösung mit 100 $\mu\text{g/L}$ Sb(V) und 600 $\mu\text{g/L}$ Sb(III). Säule: PRP-X100, Eluent: 5 mM, pH-Wert 4,7, Flussrate: 1,5 mL/min, Detektion: ICP-MS

Die **Abbildung 8-8** zeigt ein Chromatogramm mit 100 $\mu\text{g/L}$ Sb(V) und 600 $\mu\text{g/L}$ Sb(III) und ICP-MS Detektion des Antimonisotop ^{121}Sb . Spektrale Störungen durch Molekülonen sind bei der Verwendung von wässrigen Standards auf dieser Masse nicht zu erwarten. Die

chromatographischen Parameter und die Standard-Parameter für den Einsatz von ICP-AES und ICP-MS sind in den **Tabelle 8-1** und **Tabelle 8-2** zusammengefasst, in der **Tabelle 8-3** sind die analytischen Kenndaten bei der Detektion mit ICP-MS im Vergleich mit Literaturwerten für die Bestimmung von Sb(III) und Sb(V) wie die Standardabweichung von Parallelbestimmungen (Varianz) und die Nachweisgrenze (mathematische Betrachtung siehe **Kapitel 8.3.1**) dargestellt.

Tabelle 8-1: Chromatographische Parameter für die Trennung mit Phthalsäure als Eluent

Parameter	Wert
Säule	PRP-X100
Säulendurchmesser	4,1 mm
Säulenlänge	150 mm
Eluent	5 mmol/L Phthalsäure
pH-Wert	4,7 eingestellt mit TRIS
Flussrate	1,5 mL/min

Tabelle 8-2: Standard-Parameter für den Einsatz von ICP-AES und ICP-MS

Parameter	ICP-AES	ICP-MS
Typ und Hersteller	Spectroflame ICP Type P, SPECTRO A. I., Kleve, D.	X-Series ICP-MS, Thermo Elemental, Winsford, GB
RF-Leistung [W]	1260	1340
Kühlgas [L/min]	14,0	13,1
Hilfgas [L/min]	0,7	1,2
Zerstäuber-Gas [L/min]	0,32	0,95
Integrationszeit [s]	1	0,83
Zerstäubertyp	Meinhard oder V-Spalt	Mikrokonzentrischer Zerstäuber (MCN)
Beobachtung	206,83 nm (Wellenlänge)	121, 123 (m/z ¹²¹ Sb, ¹²³ Sb)
Optimierung	Wellenlänge 206,83 nm	115 (m/z ¹¹⁵ In)

Für die Charakterisierung der chromatographischen Trennung und der Qualität der Chromatogramme gibt es eine Reihe von Parametern, die auf die Methoden der vorliegenden Arbeit angewendet wurden [29].

Tabelle 8-3: Analytische Kenndaten des Phthalsäure-Verfahrens als Mittelwert aus jeweils 5 Wiederholmessungen, Vergleich der Methode von Ulrich [6] und von Camara und de la Calle[214]

Spezies	Parameter	ICP-AES ^{a)}	ICP-MS ^{a)}	ICP-MS ^{b)}
Sb(V)	Retentionszeit (s)	135	120	150
	Nachweisgrenze (µg/L)	102	0,51	0,9
	Standardabweichung (%)	6,7	4,7	6,2
Sb(III)	Retentionszeit (s)	605	590	720
	Nachweisgrenze (µg/L)	409	3,11	7,5
	Standardabweichung (%)	8,9	6,9	7,4

^{a)} Daten des Verfahrens bei Ulrich und ^{b)} Daten des Verfahrens bei Camara und de la Calle
Die hier angegebenen Ergebnisse wurden unter den folgende Bedingungen erreicht: 2 mM Phthalsäure, pH 5

Die Optimierung des Geräts wurde mit einer 10 µg/L Standardlösung durchgeführt. Dazu wurde eine 10 µg/L Multistandardlösung mit Be, Mg, Co, Ce, Bi, In und U verwendet, mit der das Gerät täglich für die Messung von Be, In und U optimiert wurde.

Tabelle 8-4: Analytische Kenndaten des Phthalsäure-Verfahrens als Mittelwert aus jeweils 5 Wiederholmessungen

Spezies	Parameter	ICP-AES ^{a)}	ICP-MS ^{b)}
Sb(V)	Retentionszeit (s)	105	86
	Nachweisgrenze (µg/L)	78,8	0,49
	Standardabweichung (%)	6,3	3,9
Sb(III)	Retentionszeit (s)	194	175
	Nachweisgrenze (µg/L)	432	5,23
	Standardabweichung (%)	6,9	7,4

^{a)} Totzeit für das ICP-AES-Verfahren: 54 s; ^{b)} Totzeit für das ICP-AES-Verfahren: 73 s
Die hier angegebenen Ergebnisse wurden unter den folgenden Bedingungen erreicht: 5 mM Phthalsäure, pH 4,7

Die Bedingungen, in den **Tabelle 8-1** und **Tabelle 8-2** dargestellt, stellen das Optimum des Verfahrens dar. Durch die vorgestellte Methode konnte eine Verkürzung der Retentionszeiten bei Detektion mit ICP-MS erreicht werden (86 s bei Sb(V) und 175 s Sb(III)) im Vergleich zu Literaturangaben. Die Totzeit des Verfahrens wurde mit Mg als zweiwertigem Kation zu 54 s bestimmt. Außerdem wurde eine Verbesserung der Nachweisgrenzen und Standardabweichungen vor allem für Sb(V) erhalten.

Die durchschnittlichen Ladung wurde nach Small et al. berechnet [216] (siehe **Gleichung 8-1**). Für Sb(III) wurde sie zu -1,73 und für Sb(V) zu -0,53 bestimmt. Die durchschnittliche Ladung wurde auch zur Charakterisierung der Spezies, die in Realproben gefunden wurden, herangezogen.

Die Auflösung R der Sb(V)- und Sb(III)-Peaks beträgt 0,89 (für die Bedingungen in der **Tabelle 8-1** dargestellt); die Kapazitätsfaktoren k' für eine Totzeit¹ t_0 von 54 s ergaben sich zu $k'_{\text{Sb(V)}} = 0,59$, $k'_{\text{Sb(III)}} = 2,24$. Die Asymmetriefaktoren A zeigen mit Werten von $A_{\text{Sb(V)}} = 0,8$ und $A_{\text{Sb(III)}} = 0,29$ vor allem für den zweiten Peak ein ausgeprägtes Tailing, das vermutlich auf Adsorptionseffekte mit dem Austauschermaterial zurückzuführen ist.

Bewertung der Trennung mit Phthalsäure unter optimierten Bedingungen

Mit dem Phthalsäure-Verfahren gelang die Trennung zweier Antimonspezies [Sb(V) und Sb(III)] über Anionenchromatographie. Dabei konnte praktisch eine Grundlinientrennung der Spezies realisiert werden. Die Elution des Sb(V) wurde bei ca. 100 Sekunden erreicht, während das Sb(III) langsamer eluierte.

Wie die analytischen Kenndaten in **Tabelle 8-1** zeigen, ist das Phthalsäure-Verfahren mit einem ICP-AES als Detektor für die Bestimmung von Antimon in biologischen Proben geeignet, wenn die Antimongehalte mindestens 500 mg/Kg betragen. Für Matrices mit geringerem Antimongehalt muss auf das ICP-MS als Detektor zurückgegriffen werden. Im Vergleich zur Methode von Camara und de la Calle [214] konnte eine leichte Verbesserung der Empfindlichkeit erreicht werden.

¹ für das ICP-MS - Verfahren, Totzeit für das ICP-AES -Verfahren 75 s durch die Notwendigkeit einer längeren Transfer-Line und die unterschiedliche Geometrie u. a. der Zerstäuberkammer innerhalb des Gerätes

Dieses Verfahren wurde in der vorliegenden Arbeit zur Untersuchung von Antimonspezies in biologischen Proben auf Grund der großen Peakverbreiterung nicht eingesetzt. Auf matrixbezogene Probleme, z. B. durch nicht identifizierbare Peaks, wird an dieser Stelle genauer eingegangen.

Für die Analytik von Antimonspezies in Proben mit Gesamtgehalten von weniger als 10 µg/L ist das Phthalsäure – Verfahren aufgrund seiner Nachweisgrenzen, insbesondere bei Sb(III), nicht geeignet. Die Grundlinie lag bei der Detektion mit ICP-MS durchschnittlich bei ca. 500 Counts pro Messzyklus (0,83 s). Aber das größte Problem ist die starke Peakverbreiterung verbunden mit einer abnehmenden Signalintensität und einer unvollständigen Elution des Sb(III). Die Basis- und Halbwertsbreiten, insbesondere des Sb(III), lassen auf nichtelektrostatische, adsorptive Wechselwirkungen mit der stationären Phase schließen. Zusätzlich zeigt das Signal von Sb(III) starkes Tailing, was die Auflösung und die Empfindlichkeit der Methode beeinträchtigt. Eine Erklärung für diese Beobachtungen könnte die Bildung von Komplexen der Antimonspezies mit dem Eluenten darstellen, worauf die experimentellen Daten zum Einfluss von Komplexbildnern auf die Antimonspeziesanalytik hinweisen (siehe **Kapitel 7.2**).

Die Reaktion der Spezies mit der stationären und mobilen Phase und damit die mögliche Artefaktbildung unter Verlust oder Verfälschung der Speziesinformation ist eines der Hauptprobleme der Speziesanalytik, z. B. konnten für die Gaschromatographie Transmethylierungseffekte auf der Säule festgestellt werden, die zu Artefaktbildung führten [6].

8.3.3 Anionenchromatographie mit Zitronensäure als Eluent

Die Zitronensäure, 3-Hydroxy-1,2,3-propantricarbonsäure, ist ähnlich wie die Phthalsäure eine eher schwache organische Säure, besitzt aber im Gegensatz zu letzterer drei Säuregruppen. Ihre drei pK_S -Werte betragen 3,13, 4,78 und 5,39.

Insbesondere das Sb(III) zeichnet sich durch eine starke Affinität zum Austauschermaterial aus und ist nur mit sehr stark eluierend wirkenden mobilen Phasen zu untersuchen. Aus diesem Grund wurde die Zitronensäure ausgewählt, obwohl sie eine hohe Komplexbildungstendenz aufweist und daher wiederum Probleme ähnlich wie Phthalsäure verursachen könnte. Auf der anderen Seite ist Zitronensäure eine aliphatische Carbonsäure,

sodass keine π -Wechselwirkungen zwischen organischem Eluenten und Gerüstkörper des Austauschermaterials auftreten können.

Die Optimierung der Parameter erfolgte in ähnlicher Weise wie bereits für das Phthalsäure-Verfahren beschrieben (siehe **Kapitel 8.3.2**). Zuerst soll wiederum der Einfluss des pH-Werts des Eluenten auf das Verhalten von Sb(V) und Sb(III) untersucht werden.

Variation des pH-Wertes

Der pH-Wert hat, wie im **Kapitel 8.3.2** erklärt, einen doppelten Einfluss auf die Prozesse im chromatographischen System und damit auf die Retentionszeiten der einzelnen Spezies.

Wie schon bei Phthalsäure zeigt die Retentionszeit eine starke Abhängigkeit vom pH-Wert des Eluenten, insbesondere beim Sb(III). Bei mittleren pH-Werten ist kein Signal von Sb(III) zu erkennen, bei kleineren und größeren pH-Werten ist dies nur recht klein. Bei kleinen pH-Werten ist das Signal zusätzlich mit einem starken „Fronting“, bei größeren pH-Werten mit einem starken „Tailing“ versehen. Diese Effekte können nicht fundiert erklärt werden.

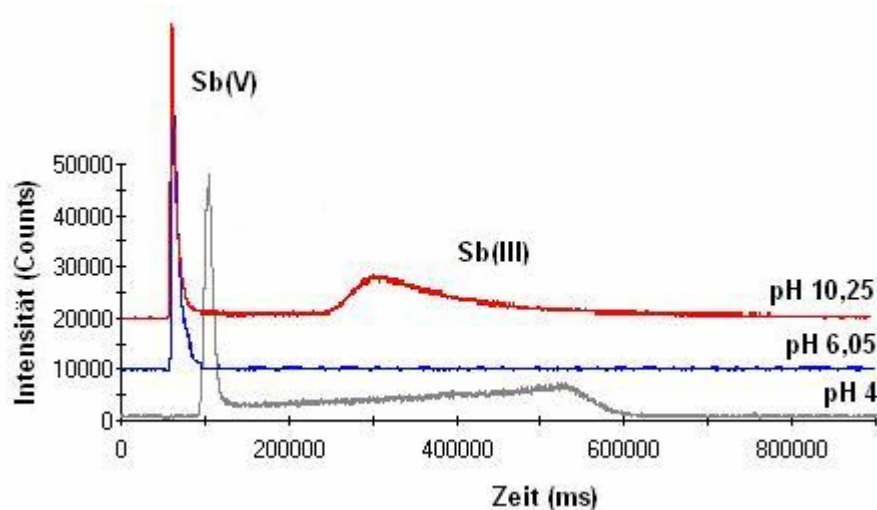


Abbildung 8-9: Anionenchromatogramme einer Sb-Standardlösung (100 $\mu\text{g/L}$ Sb(V) und 600 $\mu\text{g/L}$ Sb(III), Eluentkonzentration: 10 mmol/L, Flussrate: 1,5 mL/min, Detektion: ICP-MS

Bei $\text{pH} \approx \text{pK}_{\text{S1}}$ sind 50 % der ersten Protolysestufe deprotoniert, d.h. dass die Hälfte der Säuremoleküle einfach negativ geladen vorliegt, die andere aber noch ungeladen ist. Dies ruft beim Sb(III) einen erstaunlichen „Fronting-Effekt“ hervor. Bei einem pH-Wert von 6 ist bereits die dritte Protolysestufe der Zitronensäure zu 50 % deprotoniert, aber auch dies scheint

noch nicht auszureichen, um das Sb(III) zu eluieren, was aufgrund des großen Volumens dieses Moleküls leicht vorstellbar ist, denn die Gruppe mit der negativen Ladung muss für einen Austauschvorgang ja in die Nähe der Austauscherguppe mit dem daran haftenden Sb(III) gelangen können. Bei pH 10 hingegen ist die vollständige Deprotonierung eingetreten, hier ist dann auch eine effektivere Elution des Sb(III) zu verzeichnen. Außerdem ist die Konzentration der OH-Gruppe höher nach der Erhöhung des pH-Werts was die Bildung von OH-haltigen Spezies mit einzelnen Sb(III) verbessern könnte. Diese sind, wie das Sb(OH)_4^- , wenig geladen, was eine schnellere Elution des Sb(III) hervorruft, obwohl auch diese nicht vollständig ist, wie das **Kapitel 8.3.5** zeigen wird.

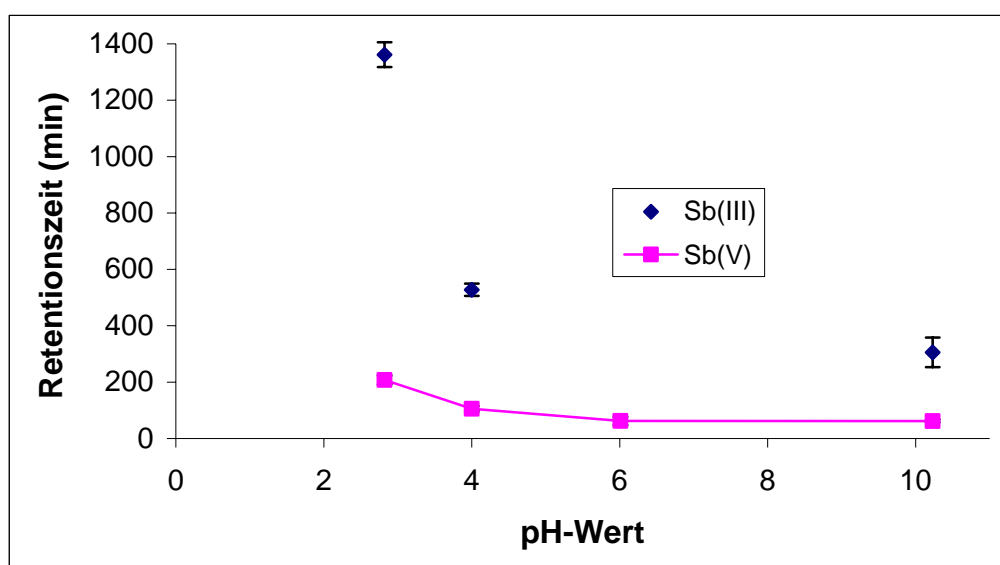


Abbildung 8-10: Einfluss des pH-Wertes auf die Retentionszeit von 100 $\mu\text{g/L}$ Sb(V) und 600 $\mu\text{g/L}$ Sb(III). Säule: PRP-X100, Eluentkonzentration: 10 mmol/L, Flussrate: 1,5 mL/min, Detektion: ICP-MS, Mittelwert aus 5 Bestimmungen.

Die Abhängigkeit des Sb(V) vom pH-Wert ist nicht so groß, es zeigt, ausgehend von den chromatographischen Daten, auf jeden Fall ein anionisches Verhalten (Totzeit, t_0 , des Systems, bei ICP-MS-Kopplung, ist 53 s).

Variation der Konzentration

Die Eluentkonzentration hat über Ionenstärke und Konkurrenzreaktionen Einfluss auf die Retentionszeiten. Die Erhöhung der Konzentration führt allgemein zu einer Verkürzung der Retentionszeiten. Die untersuchten Eluentkonzentrationen lagen zwischen 5 – 15 mmol/L. Für Sb(V) ist dieser Effekt kaum zu erkennen, unter den gewählten Bedingungen verhält es sich

wie ein einfach geladenes Anion oder sogar mit weniger Ladung. Die Retentionszeit von Sb(III), dessen chromatographische Eigenschaften denen Anion entspricht, wird kleiner bei der Erhöhung der Eluentkonzentration (siehe **Abbildung 8-11**).

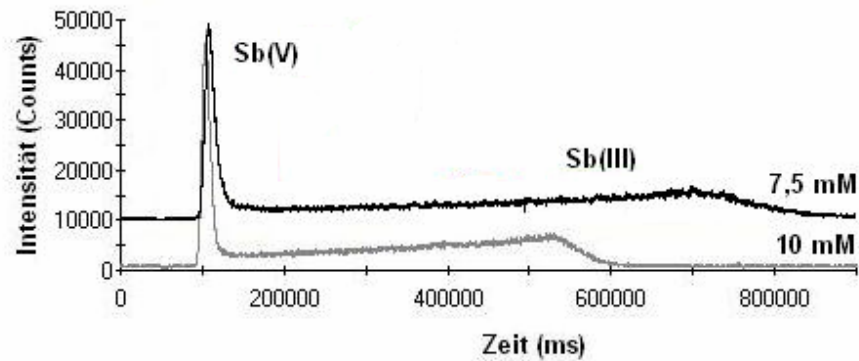


Abbildung 8-11: Chromatogramme einer Sb-Standardlösung (100 µg/L Sb(V) und 600 µg/L Sb(III)), pH-Wert 4,23, Flussrate: 1,5 mL/min, Detektion: ICP-MS

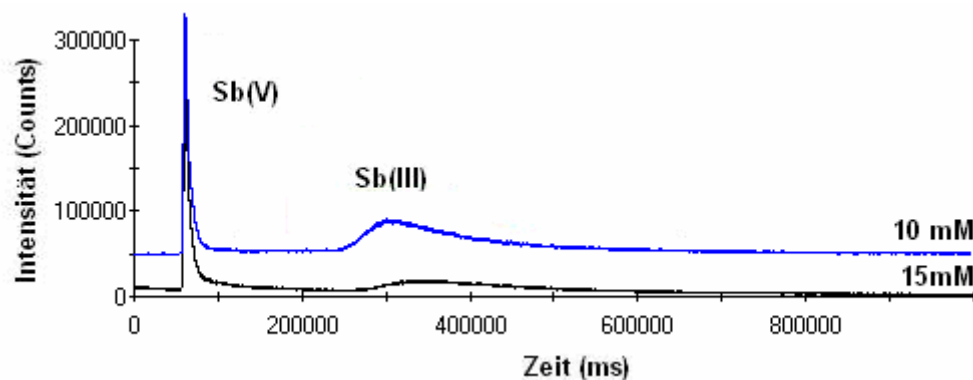


Abbildung 8-12: Chromatogramm einer Sb-Standardlösung (100 µg/L Sb(V) und 600 µg/L Sb(III)), pH 10,25, Flussrate: 1,5 mL/min, Detektion: ICP-MS

Sb(III) zeigt im Zitrat eine verbesserte Elution bei erhöhter Konzentration und bei kleineren pH-Werten; dagegen zeigt Sb(III) eine bessere Elution bei kleineren Konzentrationen und größerem pH-Wert.

Abbildung 8-13 zeigt die Beziehung zwischen der Retentionszeit der Spezies und der Eluentkonzentration dar.

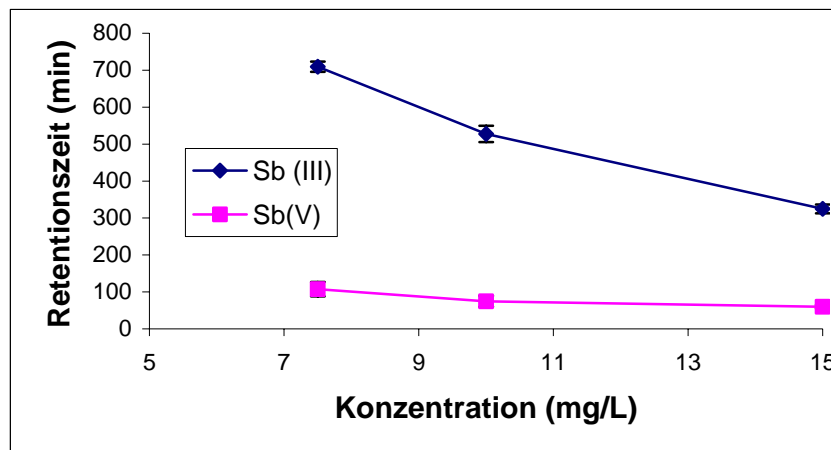


Abbildung 8-13: Einfluss der Konzentration der Zitronensäure auf die Retentionszeiten von 100 $\mu\text{g/L}$ Sb(V) und 600 $\mu\text{g/L}$ Sb(III). Säule: PRP-X100, pH-Wert 4, Flussrate: 1,5 mL/min, Detektion: ICP-MS, Mittelwert aus 5 Bestimm.

Im Folgenden wird ein Überblick über die Kenndaten des Systems gegeben.

Analytische Kenndaten und Bewertung der Trennung mit Zitronensäure

Mit Zitronensäure als Eluent war eine Trennung der beiden Sb-Spezies innerhalb einer relativ kurzen Messzeit möglich. Als optimale Bedingungen wurden 10 mM Zitronensäure und pH-Wert 10,25 ermittelt. Die Intensität des Signals vom Sb(III), ist, wie im Phthalsäure-Verfahren, sehr gering. Dies bedeutet, dass es Probleme bei der Bestimmung in biologischen Proben mit kleinem Antimongehalt (unter 20 $\mu\text{g/L}$) gibt. Die analytischen Kenndaten des Verfahrens sind in der **Tabelle 8-5** dargestellt.

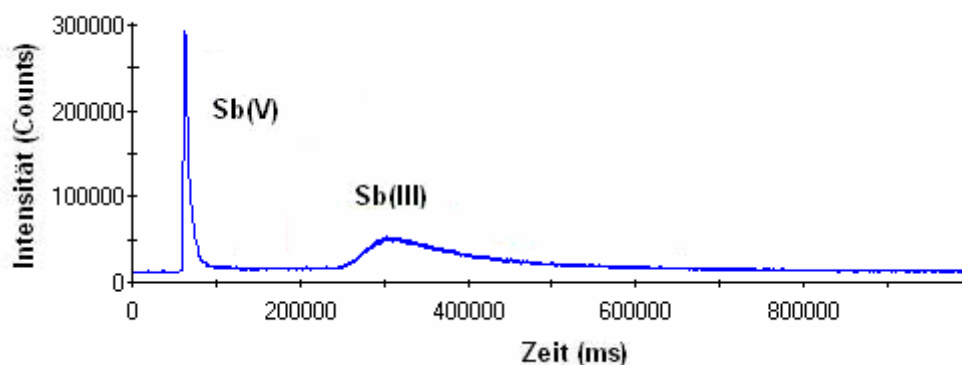
Die Nachweisgrenzen des Phthalsäure-Verfahrens konnten mit dem Zitronensäure-Verfahren nicht erreicht werden. Die Werte für Sb(V) liegen z. B. ca. dreifach höher. Ursache ist hier ein erhöhter Leerwert (ca. 6200 Counts pro Messzyklus; 0,83 s bei ICP-MS-Detektion, m/z 121). Insbesondere die Signalintensität für Sb(III) ist, wie gesagt, relativ gering.

Die Auflösung R der Sb(V)- und Sb(III)-Peaks beträgt 1,19. Die Kapazitätsfaktoren k' ergeben sich für eine Totzeit von 53 s zu $k'_{\text{Sb(V)}} = 0,17$, $k'_{\text{Sb(III)}} = 4,77$. Die Asymmetriefaktoren A liegen bei $A_{\text{Sb(V)}} = 0,78$, $A_{\text{Sb(III)}} = 0,152$. Damit wurde für den ersten und zweiten Peak ein Tailing beobachtet (beim pH-Wert 10,25, siehe **Abbildung 8-14**). Beim pH-Wert 4,23 wurde ein geringes Tailing beim ersten Peak beobachtet und ein Fronting beim zweiten. Es könnte auf Adsorptionseffekte zurückzuführen sein.

Tabelle 8-5: Analytische Kenndaten des Zitronensäure-Verfahrens als Mittelwert aus jeweils 5 Wiederholmessungen

Spezies	Parameter	ICP-AES ^{a)}	ICP-MS ^{b)}
Sb(V)	Retentionszeit (s)	81	62
	Nachweisgrenze ($\mu\text{g/L}$)	210,8	1,43
	Standardabweichung (%)	18,9	11,5
Sb(III)	Retentionszeit (s)	325	306
	Nachweisgrenze ($\mu\text{g/L}$)	259,8	15
	Standardabweichung (%)	5,9	22,8

^a Totzeit für das ICP-AES-Verfahren: 53 s; ^b Totzeit für das ICP-MS-Verfahren: 72 s
Die hier angegebenen Ergebnisse wurden unter den folgenden Bedingungen erreicht: 10 mM Zitronensäure, pH 10,25

**Abbildung 8-14:** Trennung im Zitronensäureeluent: Chromatogramm einer Standardlösung mit 100 $\mu\text{g/L}$ Sb(V) und 600 $\mu\text{g/L}$ Sb(III). Säule: PRP-X100, Eluent: 10 mM, pH-Wert 10,25, Flussrate: 1,5 mL/min, Detektion: ICP-MS

Die durchschnittliche Ladung des Sb(V) im Zitronensäure-System wurde nach Small et al. mit -2,48 bestimmt. Das Sb(V) verhält sich also wie ein negativ geladenes Anion in Lösung. Das Sb(III) hat eine durchschnittliche Ladung von -3,39, verhält es sich also wie ein dreifach negativ geladenes Anion in Lösung. Für die durchschnittliche Ladung der Spezies wurde eine deutliche pH-Abhängigkeit gefunden. In beiden Fällen sind sehr starke elektrostatische Wechselwirkungen mit den Ankergruppen des Ionenaustauschers zu erwarten. Die Retentionszeit ist bei höheren pH-Werten wesentlich kürzer. Ursache hierfür müssen Adsorptionseffekte zwischen den Antimonspezies und dem Säulenmaterial sein, d. h. es bleibt ein Anteil auf dem Gerüstmaterial zurück. Dieser kann irreversibel gebunden sein und damit

direkt Einfluss auf die Eigenschaften des Ionenaustauschers nehmen. Im Rahmen der vorliegenden Messungen wurden keine Störsignale beobachtet, eine irreversible Bindung ist daher sehr wahrscheinlich.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde das Zitronensäure-Verfahren nur zur Untersuchung von Modellsystemen verwendet. Die Messung von biologischen Proben war durch die höhere NWG mit dem Verfahren nicht möglich.

8.3.4 Anionenchromatographie mit 4-Hydroxybenzoesäure als Eluent

Die 4-Hydroxybenzoesäure ist, ähnlich wie die Phthalsäure, ein Standardeluent in der Anionenchromatographie ohne Suppressionstechnik [222]. Die Optimierung der analytischen Methode erfolgte ähnlich wie es in **Kapitel 8.3.2** und **8.3.3** beschrieben wurde. Die hier gezeigten Messungen erfolgten mit der Kopplung IC-ICP-MS. Die hier verwendete 4-Hydroxybenzoesäure war zwischen 2 und 15 mmolar, der pH-Wert wurde durch die Zugabe von Ammoniak bzw. HNO_3 variiert.

Variation des pH-Wertes

Der pH-Wert hat einen Einfluss auf die Retentionszeiten der Sb(V). **Abbildung 8-15** zeigt eine Verkürzung der Retentionszeiten mit steigendem pH. Dagegen ist das Sb(III) bis zu einem pH-Wert > 8 überhaupt nicht eluierbar und selbst bei diesem pH-Wert kaum zu sehen.

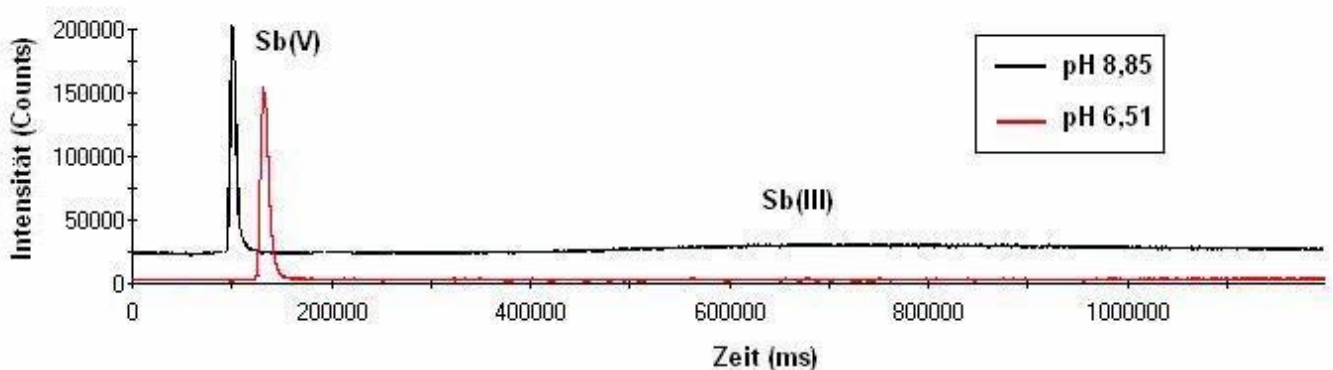


Abbildung 8-15: Anionenchromatogramme einer Sb-Standardlösung (100 $\mu\text{g/L}$ Sb(V) und 600 $\mu\text{g/L}$ Sb(III)), Eluentkonzentration: 2 mmol/L, Flussrate: 1,5 mL/min, Detektion: ICP-MS

Variation der Konzentration

Die Erhöhung der Eluentkonzentration führt allgemein zu einer Verkürzung der Retentionszeiten, dieser Effekt ist in der **Abbildung 8-16** bei Sb(V) zu beobachten. Im betrachteten Konzentrationsintervall, d. h. für Eluentkonzentrationen von 2-15 mM, ist fast kein Signal für Sb(III) erkennbar, nur vielleicht bei einer Konzentration von 5 mM, aber die Signal-Intensität für Sb(III) ist sehr gering und die Peakverbreiterung sehr groß, sodass keine Auswertung des Peaks möglich ist.

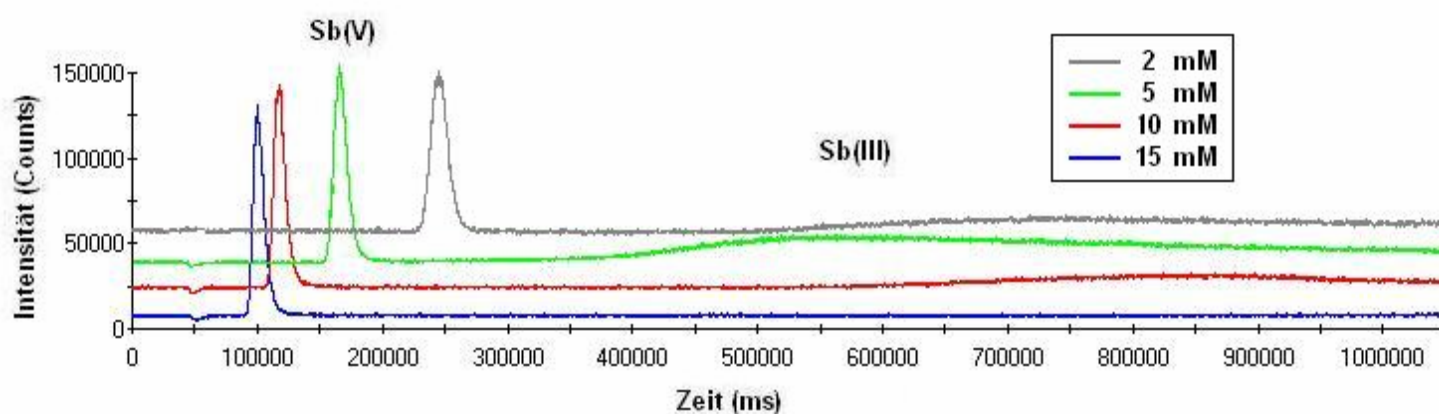


Abbildung 8-16: Chromatogramme einer Sb-Standardlösung (100 µg/L Sb(V) und 600 µg/L Sb(III)), pH-Wert = 8,85, Flussrate: 1,5 mL/min, Detektion: ICP-MS

Analytische Kenndaten und Bewertung der Trennung mit 4-Hydroxybenzoesäure

Die 4-Hydroxybenzoesäure kann als Eluent weder für die Kombination von IC mit ICP-AES noch mit ICP-MS eingesetzt werden. Die **Abbildung 8-17** zeigt ein Chromatogramm mit 100 µg/L Sb(V) und 600 µg/L Sb(III) und ICP-MS Detektion auf der Antimonmasse ^{121}Sb . Der pH-Wert wurde durch Ammoniakzugabe auf 8,85 eingestellt.

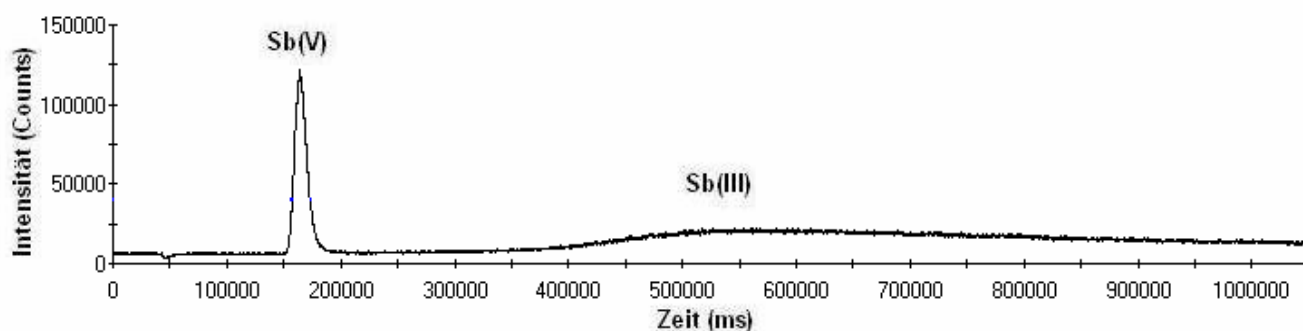


Abbildung 8-17: Signal für 100 µg/L Sb(V) und 600 µg/L Sb(III), Eluent: 5 mmol/L 4-Hydroxybenzoesäure, pH-Wert 8,85, Detektion: ICP-MS

Die folgende Tabelle fasst die chromatographischen Parameter des Systems zusammen. Der Eluent war nicht in der Lage, die beiden Spezies befriedigend zu eluieren, sondern nur das Sb(V).

Tabelle 8-6: Chromatographische Parameter für das 4-Hydroxybenzoesäure-Verfahren

Parameter	Wert
Säule	PRP-X100
Säulendurchmesser	4,1 mm
Säulenlänge	150 mm
Eluent	5 mmol/L 4-Hydroxybenzoesäure
pH-Wert	8,85 eingestellt mit NH ₃
Flussrate	1,5 mL/min

Die Auflösung R der Antimonpeaks beträgt 1,23, der Kapazitätsfaktor k' ergibt sich für eine Totzeit t_0 von 48 s (für das ICP-MS-Verfahren) zu $k'_{\text{Sb(V)}} = 2,36$ und $k'_{\text{Sb(III)}} = 9,61$. Die durchschnittliche Ladung des Sb(V) im 4-Hydroxybenzoesäure-System wurde nach Small et al. [216] mit -0,89 bestimmt. Es verhält sich also wie ein einfach negativ geladenes Anion in Lösung.

Tabelle 8-7: Analytische Kenndaten des 4-Hydroxybenzoesäure-Verfahrens als Mittelwert aus jeweils 5 Wiederholmessungen

Spezies	Parameter	ICP-AES ^{a)}	ICP-MS ^{b)}
Sb(V)	Retentionszeit (s)	183	163
	Nachweisgrenze (µg/L)	156,5	0,87
	Standardabweichung (%)	8,3	9,6
Sb(III)	Retentionszeit (s)	639	520
	Nachweisgrenze (µg/L)	487,4	53,15
	Standardabweichung (%)	9,14	12,3

^{a)} Totzeit für das ICP-AES-Verfahren: 49 s; ^{b)} Totzeit für das ICP-MS-Verfahren: 68 s
Die hier angegebenen Ergebnisse wurden unter den folgenden Bedingungen erreicht: 5 mM 4-Hydroxybenzoesäure, pH 8,85

Die durchschnittliche Ladung der Sb(III) im 4-Hydroxybenzoesäure-System konnte, auf Grund der nicht Elution des Sb(III), bei meist der verwendeten Eluentkonzentrationen, nicht bestimmt werden.

Die Berechnung der Retentionszeit und der NWG für Sb(III) wurde nach den Messungen einzelner Sb(III)-Standards durchgeführt, bei der Messung der Standardmischung wäre es nicht möglich gewesen.

Beim Sb(III) zeigt die Betrachtung der erhaltenen Chromatogramme, dass mehr als die Hälfte praktisch irreversibel an das Material gebunden bleibt und zu einer dauerhaften Veränderung der chromatographischen Eigenschaften führen können.

4-Hydroxybenzoesäure als Eluent ist für eine Trennung der Antimonspezies, aufgrund der nichtvollständigen Elution des Sb(III), nicht verwendbar. Ein weiteres Problem ist die höhere Grundlinie. Diese lag bei Detektion mit dem ICP-MS durchschnittlich bei ca. 8000 Counts pro Messzyklus (0,83 s). Nach Bestimmung des Antimongehaltes in 4-Hydroxybenzoesäure und TRIS wurde erstere als Kontaminationsquelle innerhalb des Verfahrens ermittelt. Offenbar wird während des Herstellungsprozesses der 4-Hydroxybenzoesäure, wie auch anderer organischer Substanzen, Antimon, z. B. SbCl₃ oder SbCl₅, als Katalysator eingesetzt.

8.3.5 Anionenchromatographie mit EDTA als Eluent

Ethylendiamintetraacetat (EDTA) ist ein starker Komplexbildner, der in der analytischen Chemie zu zahlreichen Titrations und Extraktionen eingesetzt werden kann [223]. Auch in der Ionenchromatographie findet er z. B. als selektivitätserhöhender Zusatz in der Kationenchromatographie [224] Verwendung. Als vierbasige Säure lässt sich die Elutionsstärke der EDTA in großer Variationsbreite über den pH-Wert steuern. Dadurch ist sie geeignet für die Trennung der zwei Antimonspezies, bei denen nicht nur die Unterschiede der Affinität zum Austausch, sondern auch der Einfluss des pH-Wertes insbesondere auf die chromatographischen Eigenschaften des Sb(III) von Bedeutung sind.

Durch die starke Komplexbildungstendenz der EDTA ist in jedem Fall mit einer Veränderung der Ligandensphäre der einzelnen Analytionen zu rechnen. Das hier vorgestellte Verfahren eignet sich daher nicht zur Untersuchung von Komplexspezies sondern nur von

Oxidationsstufen in realen Systemen. Zuerst soll das Verhalten von Sb(III) und Sb(V) bei der Verwendung von EDTA als Eluent betrachtet werden ($pK = 8,7$).

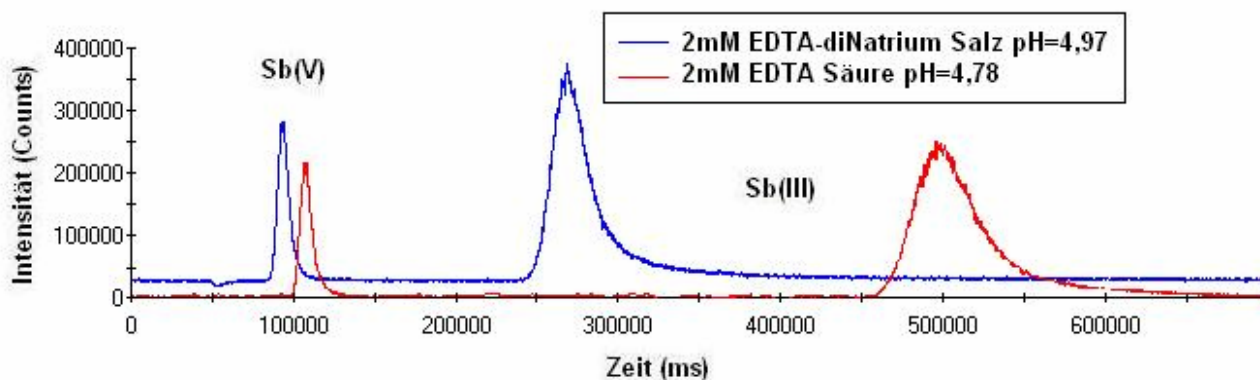


Abbildung 8-18: Anionenchromatogramme einer Sb-Standardlösung (100 $\mu\text{g/L}$ Sb(V) und 600 $\mu\text{g/L}$ Sb(III)), Eluentkonzentration: 2 mmol/L, Flussrate: 1,5 mL/min, Detektion: ICP-MS

Die Optimierung der Methode erfolgte in bezug auf die chromatographische Auflösung und die Analysendauer unter Variation der Eluentkonzentration, des pH-Wertes und des Gehaltes an organischem Modifier. Die Messungen erfolgten mit IC-ICP-MS. Die hier verwendete EDTA wurde als Di-Natrium-Salz (siehe **Abbildung 8-18**) mit einer Konzentration zwischen 2 und 20 mmolar eingesetzt, der pH-Wert wurde durch die Zugabe von TRIS bzw. HNO_3 variiert.

Variation des pH-Wertes

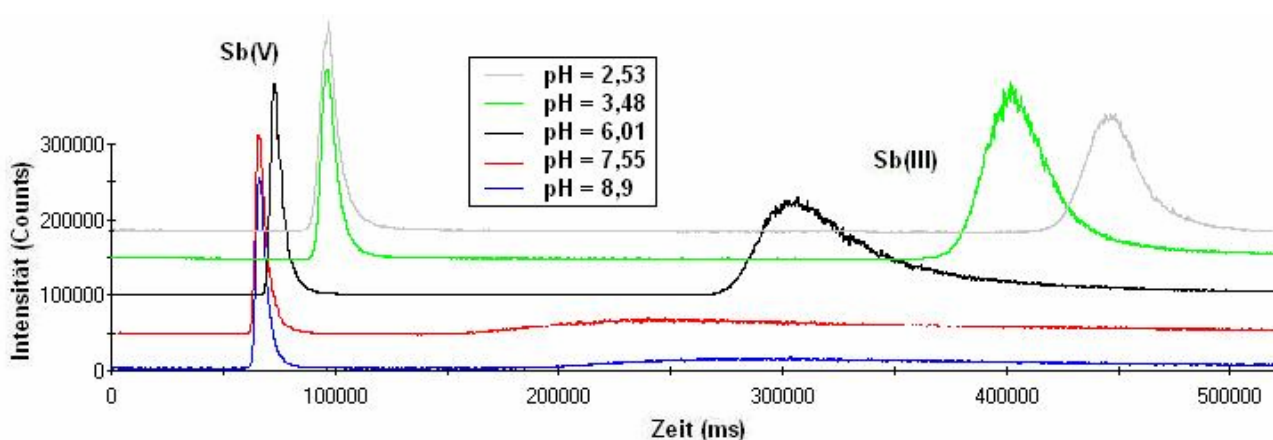


Abbildung 8-19: Anionenchromatogramme einer Sb-Standardlösung (100 $\mu\text{g/L}$ Sb(V) und 600 $\mu\text{g/L}$ Sb(III)), Eluentkonzentration: 5 mmol/L, Flussrate: 1,5 mL/min, Detektion: ICP-MS

EDTA ist ein guter Komplexbildner für Sb(III), wobei der pH-Wert des Eluenten eine wichtige Rolle spielt, wie aus **Abbildung 8-19** entnommen werden kann. Der pH-Wert des Di-Natrium-Salzes in Lösung ist 4,5, er wurde mit HNO₃ bzw. mit Ammoniak auf die verwendeten Werte eingestellt.

Mit steigendem pH-Wert bzw. steigender Retentionszeit wird der Sb(III)-Peak zunehmend flacher und breiter. Dieses Verhalten kann mit der Acidität der EDTA erklärt werden. Bei niedrigen pH-Werten liegt das Molekül noch undissoziiert und somit auch ungeladen vor, was seine Eigenschaft als Eluent, der ja die negativ geladenen Antimonionen vom Austauschplatz verdrängen soll, negativ beeinflusst. Bei steigendem pH gibt das Molekül jedoch nach und nach seine Protonen ab, sodass die EDTA von der Säure zum Säureanion wird. Dieses ist nun negativ geladen und kann mit den Antimonionen um die Austauschplätze konkurrieren. Bei kleineren pH-Werten sind die Retentionszeiten deshalb größer für beide Antimonspezies. Dagegen wird, wie die **Abbildung 8-19** zeigt, ab pH-Werten > 7 das Sb(III) von EDTA nicht komplexiert, was einen Widerspruch hervorruft, da nur das vierfach negativ geladene Anion von EDTA Komplexe mit Sb(III) bilden kann. Eine Erklärung dafür wäre eine konkurrierende Komplexierung von EDTA und Tartrat mit Sb(III). Mit der EDTA-Komplexierung wird eine vollständige Elution des Sb(III) erreicht.

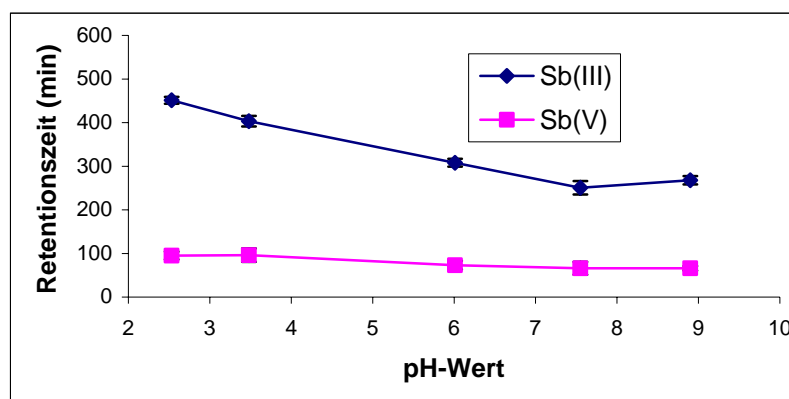


Abbildung 8-20: Einfluss des pH-Wertes auf die Retentionszeit von 100 µg/L Sb(V) und 600 µg/L Sb(III). Säule: PRP-X100, Eluentkonzentration: 5 mmol/L, Flussrate: 1,5 mL/min, Detektion: ICP-MS, Mittelwert aus 5 Bestimmungen

Abbildung 8-20 zeigt den pH-Einfluss auf beide Antimonspezies. Die Komplexbildung des Antimons mit dem EDTA ist nur mit dem vierfach negativ geladenem Salz möglich, d. h. bei höheren pH-Werten, bei denen das EDTA mehrfach deprotoniert ist, bildet Sb(III) unter den hier vorliegenden, chromatographischen Bedingungen keine Komplexe mit EDTA mehr. Der

Grund dafür kann die oben genannte Konkurrenz der Komplexstabilitäten von EDTA und OH^- sein.

Variation der Konzentration

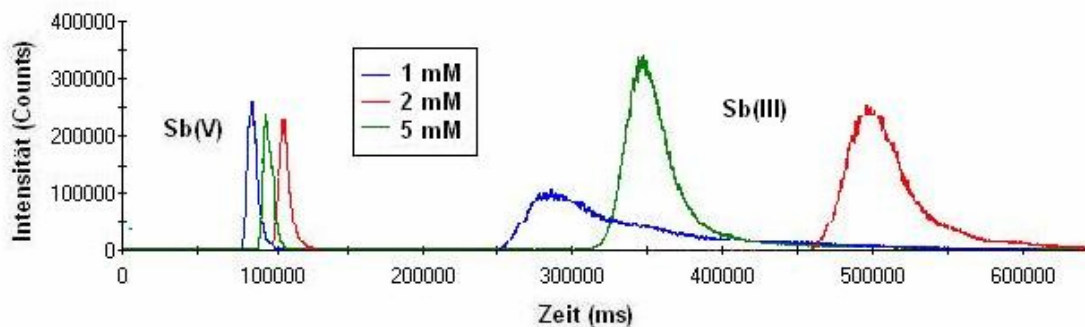


Abbildung 8-21: Anionenchromatogramme einer Sb-Standardlösung (100 $\mu\text{g/L}$ Sb(V) und 600 $\mu\text{g/L}$ Sb(III)), pH-Wert 4,7, Flussrate: 1,5 mL/min, Detektion: ICP-MS

Die Konzentration wurde zwischen 1 und 20 mmolar variiert. Wie bei den vorherigen Methoden führt eine Erhöhung der Konzentration zu einer Verkürzung der Retentionszeiten. Im betrachteten Konzentrationsintervall ist dieser Effekt stärker für Sb(III). Die **Abbildung 8-21** zeigt, dass bei einer EDTA-Konzentration von weniger als 2 mM eine Komplexbildung des Sb(III) nicht möglich ist. EDTA als Eluent erreicht jedoch eine viel bessere Elution des Sb (III) als die anderen organischen Eluenten, die in der Arbeit verwendet wurden.

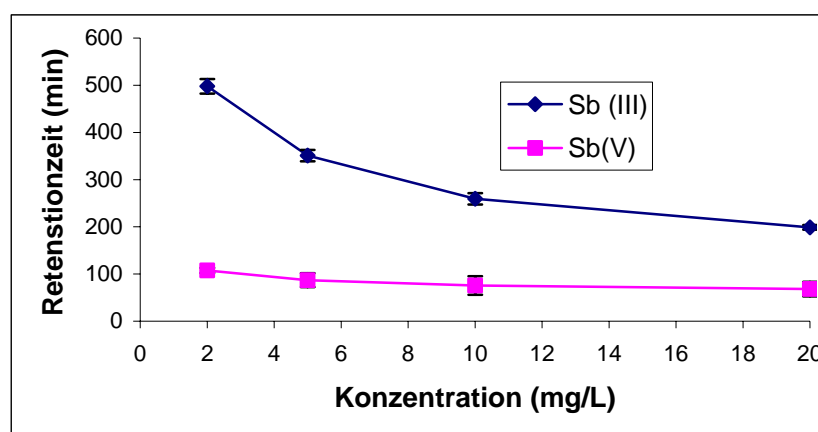


Abbildung 8-22: Einfluss der Konzentration des EDTAs auf die Retentionszeiten von 100 $\mu\text{g/L}$ Sb(V) und 600 $\mu\text{g/L}$ Sb(III). Säule: PRP-X100, pH-Wert 4,7, Flussrate: 1,5 mL/min, Detektion: ICP-MS, Mittelwert aus 5 Bestimmungen

Die **Abbildung 8-22** zeigt die graphische Darstellung des Einflusses der Eluentkonzentration auf die Retentionszeiten der Antimonspezies.

Für weitere Untersuchungen wurde diese Eluent mit einer Konzentration von 5 mmol/L und einem pH-Wert von 4,7 ausgewählt.

Einfluss von organischen Modifiern

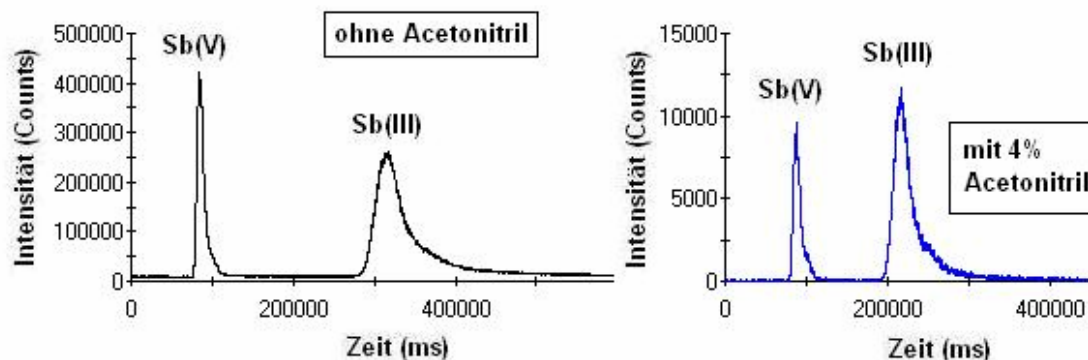


Abbildung 8-23: Chromatogramme einer Sb-Standardlösung (100 µg/L Sb(V) und 600 µg/L Sb(III)), ohne und mit 4% Acetonitril-Zusatz, Eluentkonzentration: 5 mmol/L, pH-Wert 4,7, Flussrate: 1,5 mL/min, Detektion: ICP-MS

Es wurden Ethanol, Acetonitril und Aceton in Konzentrationen von 0 - 8 % (%-Vol.) auf ihren Einfluss auf die Trennungen untersucht.

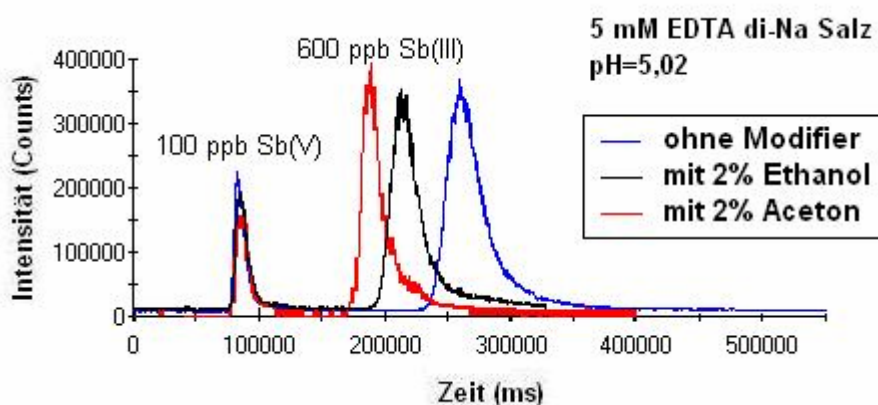


Abbildung 8-24: Chromatogramme einer Sb-Standardlösung (100 µg/L Sb(V) und 600 µg/L Sb(III)), Eluentkonzentration: 5 mmol/L, pH-Wert 5,02, Flussrate: 1,5 mL/min, Detektion: ICP-MS

Sb(III) zeigte zusätzlich zu den elektrostatischen Wechselwirkungen mit den Austauschergruppen starke Adsorptionseffekte auf dem organischen Gerüst des Austauschermaterials. Um die z. T. daraus resultierende Peakverbreiterung und das ausgeprägte Peaktailing zu verkleinern, wurden die oben genannten organischen Modifier untersucht, deren positiver Effekt bereits für andere Problemstellungen beobachtet werden konnte [225]. Zu berücksichtigen ist allerdings, dass die analytische Leistungsfähigkeit der Detektoren in der ICP-AES und noch mehr in der ICP-MS durch den Eintrag größerer Mengen organischer Substanzen in das Plasma herabgesetzt wird [226]. Ab 6% Modifikerkonzentration ist keine routinetaugliche Analytik mehr möglich. Es kommt zu einer Signaldepression durch eine Absetzen der organische Substanzen in der Interface des Geräts, die im Verlauf eines Messtages bis zu 100 % betragen kann.

Die **Abbildung 8-23** zeigt zwei Chromatogramme zur Untersuchung des Einflusses des Acetonitrils. Eine Verkürzung der Retentionszeiten und eine signifikante Verringerung der Peakbreite wurde beobachtet, aber auch eine bedeutende Verringerung der Peakintensität. Die **Abbildung 8-24** zeigt Chromatogramme von derselben Standardlösung gemessen mit EDTA als Eluent ohne Modifier, mit 2% Ethanol und mit 2% Aceton.

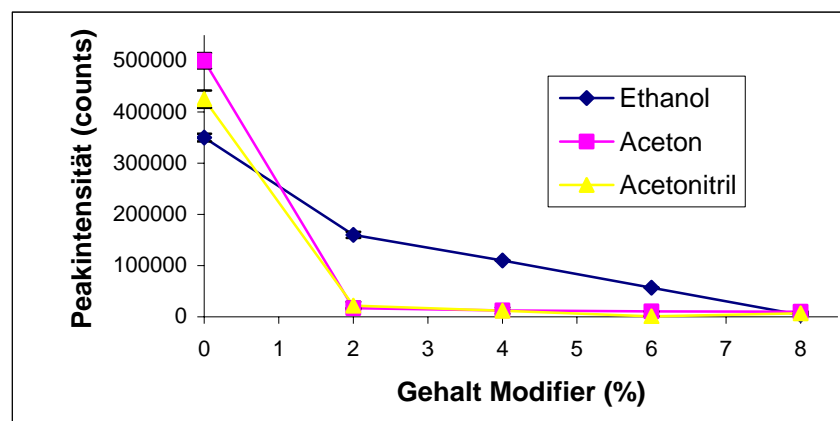


Abbildung 8-25: Veränderung der Peakintensität des chromatographischen Peaks von einer Sb-Standardlösung 600 µg/L Sb(III) in Abhängigkeit von der Konzentration an Aceton, Methanol und Acetonitril, Eluentkonzentration: 5 mmol/L, pH-Wert 4,7, Flussrate: 1,5 mL/min, Detektion: ICP-MS, Mittelwert aus 5 Bestimmungen

Abbildung 8-25 und **Abbildung 8-26** zeigen die Veränderung der Peakintensität der Antimonpeaks bei Verwendung dieser drei organischen Modifier. Die große Verringerung der

Intensitäten macht die Nutzung dieser Modifier für die Analyse biologische Proben mit kleinem Antimongehalt unmöglich.

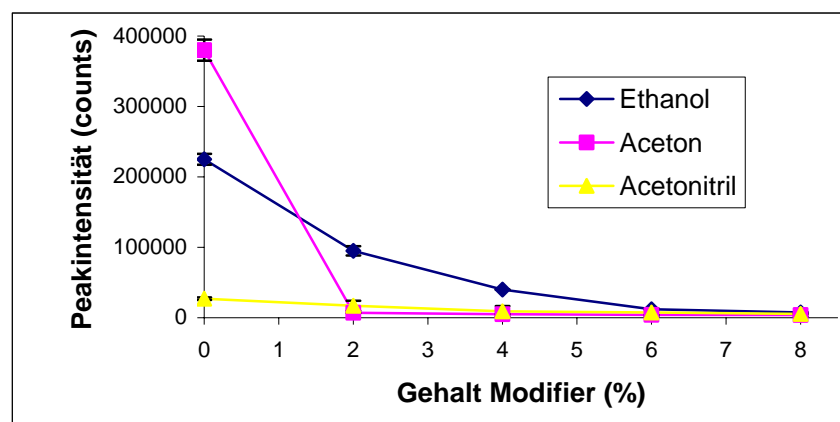


Abbildung 8-26: Veränderung der Peakintensität des chromatographischen Peaks von einer Sb-Standardlösung 100 $\mu\text{g/L}$ Sb(V) in Abhängigkeit von der Konzentration an Aceton, Methanol und Acetonitril, Eluentkonzentration: 5 mmol/L, pH-Wert 4,7, Flussrate: 1,5 mL/min, Detektion: ICP-MS, Mittelwert aus 5 Bestimmungen

Im Folgenden wird ein Überblick über die Kenndaten des Systems sowie eine Einschätzung der Leistungsfähigkeit und des Anwendungsbereiches gegeben.

Analytische Kenndaten und Bewertung der Trennung mit EDTA

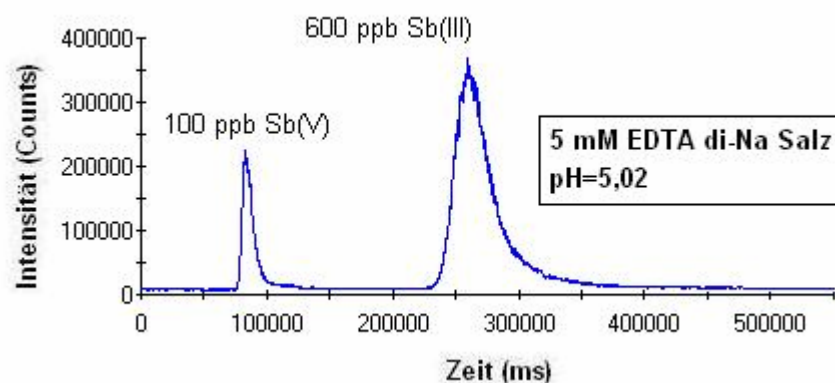


Abbildung 8-27: EDTA-Verfahren: Standardchromatogramm einer Sb-Standardlösung (100 $\mu\text{g/L}$ Sb(V) und 600 $\mu\text{g/L}$ Sb(III)), Eluentkonzentration: 5 mM, pH-Wert 5,02, Flussrate: 1,5 mL/min, Detektion: ICP-MS

Das EDTA-Verfahren kann sowohl als Kombination von IC mit ICP-AES als auch mit ICP-MS für biologische Proben eingesetzt werden. EDTA kann sowohl als Eluent als auch Komplexbildner angewendet werden. Im Vergleich zu anderen Verfahren konnte das Sb(III) komplexiert und vollständig eluiert werden. Die Elution beider Antimonspezies ist innerhalb von 7 Minuten möglich (siehe **Abbildung 8-27** und **Tabelle 8-8**).

Tabelle 8-8: Analytische Kenndaten des EDTA-Verfahrens als Mittelwert aus jeweils 5 Wiederholmessungen

Spezies	Parameter	ICP-AES ^{a)}	ICP-MS ^{b)}
Sb(V)	Retentionszeit (s)	106	87
	Nachweisgrenze ($\mu\text{g/L}$)	56,8	0,31
	Standardabweichung (%)	3,9	4,0
Sb(III)	Retentionszeit (s)	369	350
	Nachweisgrenze ($\mu\text{g/L}$)	108	3,0
	Standardabweichung (%)	6,13	9,21

^{a)} Totzeit für das ICP-AES-Verfahren: 51 s; ^{b)} Totzeit für das ICP-MS-Verfahren: 70 s

Die durchschnittliche Ladung y wurde, wie in der andere Verfahren nach **Gleichung 8-1** für Sb(III) zu -0,8 und für Sb(V) zu -1,6 bestimmt. Bei den Nachweisgrenzen des EDTA-Verfahrens konnte eine Verbesserung erreicht werden. Aus der kürzeren Retentionszeit ergibt sich ein günstigeres Verhältnis von Peakhöhe zu Peakbreite. Die Auflösung R der Antimonpeaks beträgt 2,75, die Kapazitätsfaktoren für eine Totzeit t_0 von 51 s (für das ICP-MS-Verfahren) ergeben sich zu $k'_{\text{Sb(V)}} = 0,64$, $k'_{\text{Sb(III)}} = 3,90$. Die Asymmetriefaktoren A liegen bei $A_{\text{Sb(V)}} = 0,89$, und $A_{\text{Sb(III)}} = 0,44$. Die Signale im Chromatogramm zeigen leichtes Tailing, das auf Adsorptionseffekte der Antimonspezies oder über die EDTA-Liganden mit dem Gerüstkörper der Säule zurückzuführen sein sollte.

Der Antimonleerwert der Methode lag bei Detektion mit ICP-MS durchschnittlich bei ca. 500 Counts pro Messzyklus (0,83 s bei ICP-MS-Detektion, m/Z 121).

Anwendungsbereiche für das EDTA-Verfahren sind in der vorliegenden Arbeit biologische Proben mit kleinem Antimongehalt, da dieses Verfahren ohne Probleme für die Untersuchung von Antimonspezies im Ultraspurenbereich angewendet werden kann.

8.3.6 Anionenchromatographie mit Salpetersäure als Eluent

Die Salpetersäure mit dem eluierend wirkenden Nitration kann ohne Probleme als mobile Phase in der Anionenchromatographie eingesetzt werden [227]. Vor allem bei der Verwendung elementspezifischer Detektoren [228], bei denen es nicht auf die Grundleitfähigkeit der mobilen Phase ankommt, und bei der Kombination von Kationen- und Anionenchromatographie [10] stellt sie eine nützliche Alternative dar. Gerade für die Speziesanalytik sollte sie aufgrund der geringen Komplexbildungstendenz geeignet sein.

Das Nitrat trägt zwar nur eine negative Ladung, allerdings ist diese über den gesamten pH-Bereich verfügbar, da die Säure sehr stark ist. Ein weiterer Vorteil dieses Anions ist das geringe Volumen, sodass sein Vordringen zur Austauscherguppe nicht durch die voluminösen Antimonspezies behindert werden sollte. Allerdings muss hier beachtet werden, dass die Konzentration der eingesetzten Salpetersäure nicht zu hoch sein darf, da sonst die Stabilität des Austauschermaterials nicht gewährleistet ist.

Die Optimierung der Methode erfolgte in bezug auf die chromatographische Auflösung und die Analysendauer unter Variation der Eluentkonzentration und des pH-Wertes. Die Messungen erfolgten mit der Kopplung IC-ICP-MS. Die hier verwendete Salpetersäure war zwischen 2,5 und 20 mmolar, der pH-Wert wurde durch die Zugabe von Ammoniak variiert.

Variation des pH-Wertes

Wie in **Kapitel 7** erklärt wurde, liegt Sb(V) in wässriger Lösung ab pH 2,7 als einwertiges Anion vor, während die Verhältnisse bei Sb(III) durch Agglomeration und eine zweifache oder höhere Ladung gekennzeichnet sind.

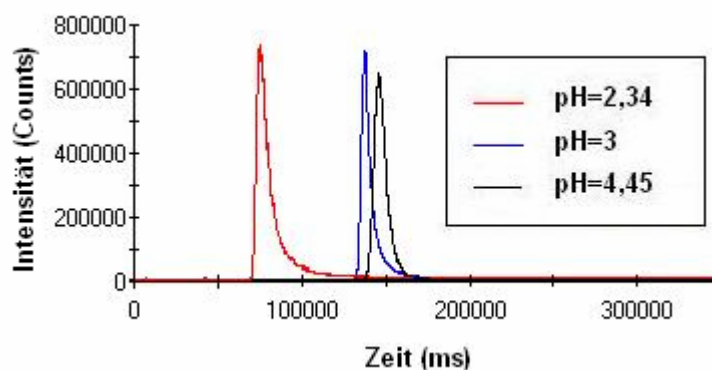


Abbildung 8-28: Chromatogramme einer Sb-Standardlösung (200 µg/L Sb(V)), Eluentkonzentration: 15 mmol/L, Flussrate: 1,5 mL/min, Detektion: ICP-MS

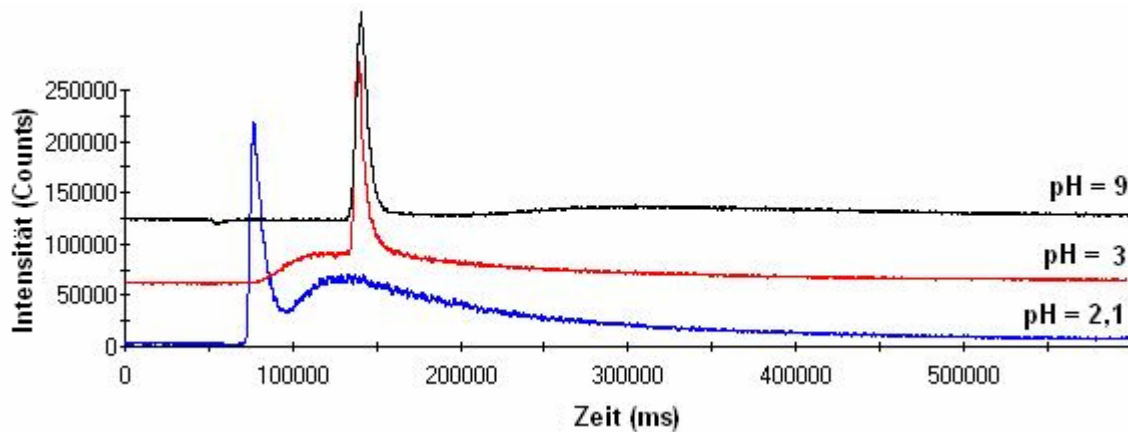


Abbildung 8-29: Anionenchromatogramme einer Sb-Standardlösung (100 $\mu\text{g/L}$ Sb(V) und 600 $\mu\text{g/L}$ Sb(III)), Eluentkonzentration: 15 mmol/L, Flussrate: 1,5 mL/min, Detektion: ICP-MS

Die Abhängigkeit des Chromatogramms von pH-Wert und Konzentration des Eluenten ist in **Abbildung 8-28** und **Abbildung 8-29** dargestellt. Das für Sb(V) prognostizierte Verhalten als nicht geladenes Molekül ist unter pH 2,7 zu erkennen, während es bei höheren pH-Werten, ausgehend von den chromatographischen Daten, ein anionisches Verhalten zeigt.

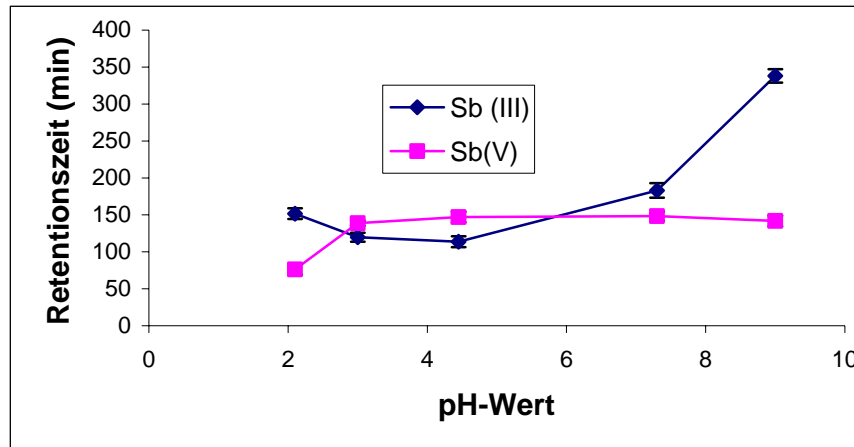


Abbildung 8-30: Einfluss des pH-Wertes auf die Retentionszeit von 100 $\mu\text{g/L}$ Sb(V) und 600 $\mu\text{g/L}$ Sb(III). Säule: PRP-X100, Eluentkonzentration: 15 mmol/L, Flussrate: 1,5 mL/min, Detektion: ICP-MS, Mittelwert aus 5 Bestimmungen

Außerdem ist in **Abbildung 8-29** zu erkennen, dass das chromatographische Verhalten von Sb(III) auch pH-abhängig ist, es verhält sich immer als Anion. Unter pH 6,5 ist keine ausreichende Trennung der Spezies möglich. Bei $\text{pH} > 7$ nimmt die Retentionszeit von Sb(III) stark zu, sodass dieser Bereich zwar für eine analytische Methode verwendbar sein könnte, diese aber durch sehr lange Analysenzeiten und eine große Peakverbreiterung des Sb(III)-

Peak nicht nutzbar sein wird. Ab pH 8 ist die Elution von Sb(III) unmöglich. Als Grund wird eine Bildung von mehrkernigen Komplexen mit der OH-Gruppe vermutet.

Die Retentionszeit des Sb(V) bleibt nahezu unverändert, außer dem oben genannten Effekt unter pH 2,5, wo das Sb(V) als nicht geladene Spezies eluiert, d. h., als Antimonsäure ($\text{Sb}[\text{OH}]_5$). (s. **Abbildung 8-30**)

Für weitere Untersuchungen wurde pH=4,7 ausgewählt, da es hier einen kleinen Unterschied der Retentionszeiten gibt und im Vergleich zu höheren pH-Werten eine gute Elution des Sb(III) möglich ist. Bei der pH-Einstellung der eingesetzten Eluenten wurde weniger NH_3 verwendet und somit die Kontaminationsgefahr verringert.

Variation der Konzentration

Im betrachteten Konzentrationsintervall, d. h. für Eluentkonzentrationen von 2,5 - 20 mmol/L ist der Effekt der Verkürzung der Retentionszeiten, bei Erhöhung der Eluentkonzentration stärker für Sb(V), das sich unter den gewählten Bedingungen wie ein mehrfach geladenes Anion verhält, als für Sb(III), dessen chromatographische Eigenschaften denen einwertiger Anion entspricht, wie **Abbildung 8-31** zeigt. Dieses erstaunliche Verhalten, das **Abbildung 8-31** und die **Abbildung 8-32** besser zeigen können, ist bisher nicht geklärt. Eine mögliche Erklärung ist die Bildung mehrkerniger Komplexe von Sb(V) mit der OH-Gruppe unter Bildung mehrfach geladenen Spezies, bei geringen Konzentrationen von Salpetersäure (siehe **Kapitel 7.2.2**).

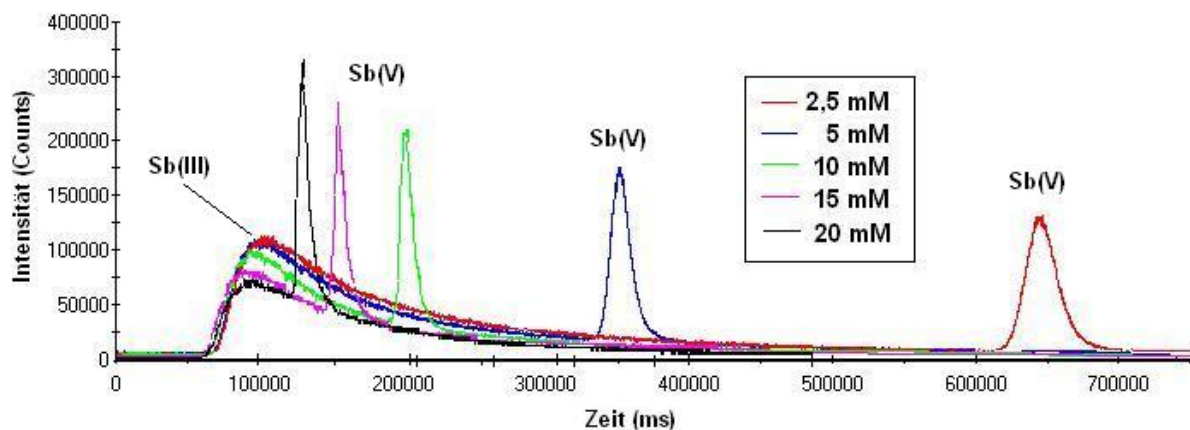


Abbildung 8-31: Chromatogramme einer Sb-Standardlösung (100 $\mu\text{g/L}$ Sb(V) und 600 $\mu\text{g/L}$ Sb(III)), pH-Wert = 4,81, Flussrate: 1,5 mL/min, Detektion: ICP-MS

Die durchschnittliche Ladung der Sb(III)-Spezies ist gering d. h. es ist nur wenig negativ geladen. Eine Erklärung dafür wäre, dass bei diesem pH-Wert die einkernigen Komplexe von Sb(III) mit OH stabiler sind als der Tartrat-Komplex (der außerdem zweikernig und zweifach negativ geladen ist).

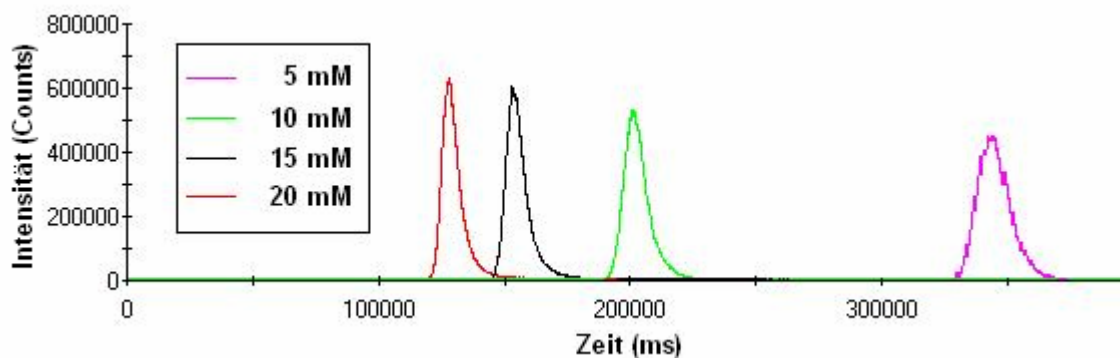


Abbildung 8-32: Chromatogramme einer Sb-Standardlösung (200 µg/L Sb(V)), pH-Wert 4,81, Flussrate: 1,5 mL/min, Detektion: ICP-MS

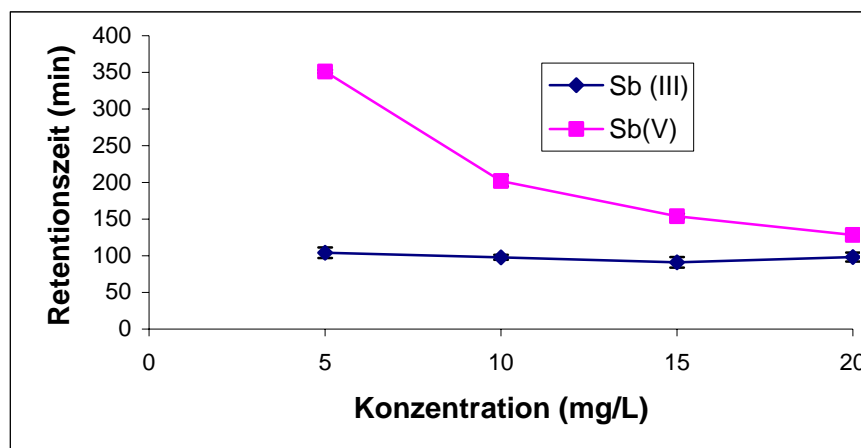


Abbildung 8-33: Einfluss der Konzentration der Salpetersäure auf die Retentionszeiten von 100 µg/L Sb(V) und 600 µg/L Sb(III). Säule: PRP-X100, pH-Wert 4,7, Flussrate: 1,5 mL/min, Detektion: ICP-MS, Mittelwert aus 5 Bestimmungen

Analytische Kenndaten und Bewertung der Trennung mit Salpetersäure

Das Nitrat-Verfahren kann sowohl als Kombination von IC mit ICP-AES als auch mit ICP-MS eingesetzt werden.

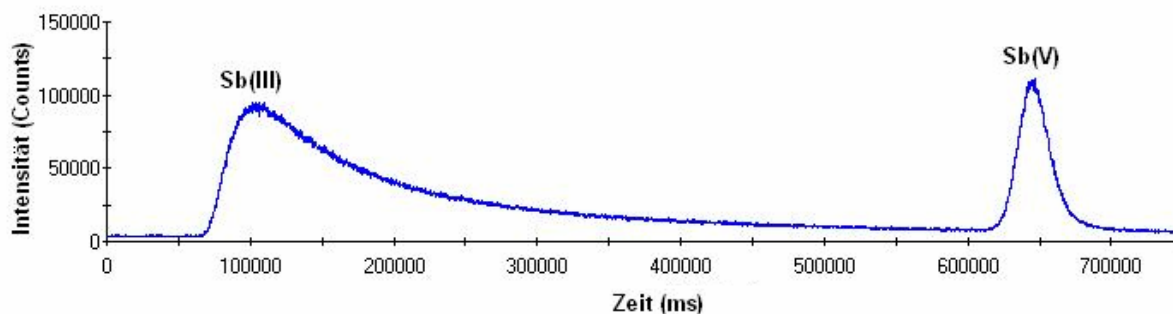


Abbildung 8-34: Trennung im Nitrat-Eluent: Chromatogramm von einer Standardlösung mit 100 $\mu\text{g/L}$ Sb(V) und 600 $\mu\text{g/L}$ Sb(III). Säule: PRP-X100, Eluent: 2,5 mM, pH-Wert 4,7, Flussrate: 1,5 mL/min, Detektion: ICP-MS

Die **Abbildung 8-34** zeigt ein Chromatogramm mit 100 $\mu\text{g/L}$ Sb(V) und 600 $\mu\text{g/L}$ Sb(III) und ICP-MS-Detektion auf der Antimonmasse ^{121}Sb . Spektrale Störungen durch Molekülionen sind bei der Verwendung von wässrigen Standards auf dieser Masse nicht zu erwarten.

Tabelle 8-9: Chromatographische Parameter des Nitrat-Verfahrens

Parameter	Wert
Säule	PRP-X100
Säulendurchmesser	4,1 mm
Säulenlänge	150 mm
Eluent	2,5 mmol/L HNO_3
pH-Wert	4,7 eingestellt mit NH_3
Flussrate	1,5 mL/min

Die chromatographischen Parameter des Nitrat-Systems sind in der **Tabelle 8-9** sind die Standard-Parameter für den Einsatz von ICP-AES und ICP-MS erfasst und in der **Tabelle 8-10** sind die analytischen Kenndaten bei der Detektion mit ICP-MS im Vergleich mit Literaturwerten für die Bestimmung von Sb(III) und Sb(V) dargestellt.

Auffällig ist, dass die Elutionsreihenfolge von Sb(V) und Sb(III) gegenüber anderen Verfahren umgekehrt ist. Die durchschnittliche Ladung y wurde, wie im anderen Verfahren nach **Gleichung 8-1** für Sb(III) zu -0,94 und für Sb(V) zu -1,68 bestimmt. Die Ermittlung der durchschnittlichen Ladung erfolgte nach Small et al. [216]. Die Auflösung R der Sb(V)- und

S(III)-Peaks beträgt 2,41, die Kapazitätsfaktoren k' für eine Totzeit² t_0 von 54 s ergaben sich zu $k'_{\text{Sb(V)}} = 11,19$, $k'_{\text{Sb(III)}} = 1$. Die Asymmetriefaktoren A zeigen mit Werten von $A_{\text{Sb(V)}} = 0,89$ und $A_{\text{Sb(III)}} = 0,08$ vor allem für den ersten Peak ein ausgeprägtes Tailing, das vermutlich auf Adsorptionseffekte auf dem Austauschermaterial zurückzuführen ist.

Tabelle 8-10: Analytische Kenndaten des Nitrat-Verfahrens als Mittelwert aus jeweils 5 Wiederholmessungen.

Spezies	Parameter	ICP-AES ^{a)}	ICP-MS ^{b)}
Sb(V)	Retentionszeit (s)	125	106
	Nachweisgrenze ($\mu\text{g/L}$)	134	0,48
	Standardabweichung (%)	5,9	2,4
Sb(III)	Retentionszeit (s)	665	646
	Nachweisgrenze ($\mu\text{g/L}$)	176	3,9
	Standardabweichung (%)	6,2	5,0

^a Totzeit für das ICP-AES-Verfahren: 53 s; ^b Totzeit für das ICP-MS-Verfahren: 72 s
Die hier angegebenen Ergebnisse wurden unter den folgenden Bedingungen erreicht: 2,5 mM Salpetersäure, pH 4,7

Mit dem Nitrat-Verfahren gelang auch die Trennung zweier Antimonspezies [Sb(V) und Sb(III)] über Anionenchromatographie. Dabei konnte auch eine Grundlinientrennung der Spezies realisiert und eine Elution des Sb(V) nach ca. elf Minuten erreicht werden, während das Sb(III) vorher eluiert.

Wie die analytischen Kenndaten in **Tabelle 8-10** zeigen, ist das Nitrat-Verfahren als Kopplung von IC-ICP-AES für die Bestimmung von Antimon in biologischen Proben bei den angegebenen Bedingungen geeignet. Für Matrices mit geringerem Antimongehalt (unter 100 $\mu\text{g/L}$) muss auf das ICP-MS als Detektor zurückgegriffen werden. Ein Vorteil der Anwendung dieses Eluenten ist die geringe Belastung des Gerätes durch die Vermeidung eines organischen Eluenten. Außerdem eluiert das Sb(III) als erstes und auch vollständig. Im

² für das ICP-MS-Verfahren, Totzeit für das ICP-AES-Verfahren 75 s durch die Notwendigkeit einer längeren Transfer-Line und die unterschiedliche Geometrie u. a. der Zerstäuberkammer innerhalb des Gerätes

Vergleich zur Methode von Camara und de la Calle [214] und von Ulrich [6] konnte eine deutliche Verbesserung der NWG erreicht werden.

Das Salpetersäure-Verfahren wurde in der vorliegenden Arbeit zur Untersuchung von Antimonspezies in biologischen Proben eingesetzt (siehe **Kapitel 0** und **0**). Auf matrixbezogene Probleme, z. B. durch nicht identifizierbare Peaks, wird an dieser Stelle genauer eingegangen.

8.3.7 Anionenchromatographie mit Salzsäure als Eluent

Das Chloridion wurde bisher praktisch nur in kationenchromatographischen Trennverfahren als Eluent eingesetzt [229]. Es ist ein stärkerer Komplexbildner und schwächerer Eluent als das Nitration, was eine höhere Eluentkonzentration notwendig und einen stärkeren Einfluss auf die vorliegenden Antimonspezies und Komplexgleichgewichte wahrscheinlich macht. Ein möglicher Vorteil des Salzsäure-Verfahrens besteht bei der Kopplung von Ionenchromatographie und Hydridgenerierung mit elementspezifischer Detektion [6]. Außerdem kann auch die Salzsäure als Eluent für ein Kombinationsverfahren von Kationen- und Anionenchromatographie verwendet werden.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde das Salzsäure-Verfahren für die Trennung der Verbindungen Sb(V) und Sb(III) bei Kopplung von IC-ICP-AES und IC-ICP-MS entwickelt. Die Optimierung der Parameter erfolgte in ähnlicher Weise wie bereits für die anderen Verfahren beschrieben, wobei der pH-Wert des Eluenten mit NaOH eingestellt wurde.

Variation des pH-Wertes

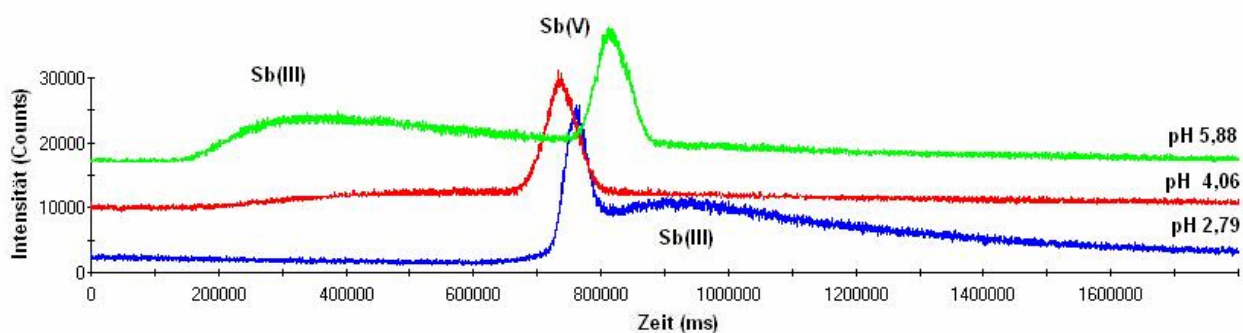


Abbildung 8-35: Anionenchromatogramme einer Sb-Standardlösung (100 µg/L Sb(V) und 600 µg/L Sb(III), Eluentkonzentration: 5 mmol/L, Flussrate: 1,5 mL/min, Detektion: ICP-MS

Dieser Teil der Optimierung wurde mit einer Konzentration von 5 mmol/L Salzsäure durchgeführt.

Das Chlorid-Ion ist als guter Komplexbildner des Antimons bekannt. Chlorid bildet Komplexe mit beiden Antimon-Oxidationsstufen. Entsprechend der pK_s -Werte dieser Antimon-Komplexe und zusätzlicher Effekte, z. B. durch Agglomeration, kommt es bei einer Änderung des pH-Wertes zu einer Veränderung der Ladung der Antimonspezies und des Grads der Komplexierung, wie **Abbildung 8-35** und **Abbildung 8-36** zeigen. Nach der **Abbildung 8-36** ist kein Trend zu erkennen, was auf die Komplexstabilitäten von Sb(III) und Sb(V) mit dem Chlorid zurückzuführen sein könnte.

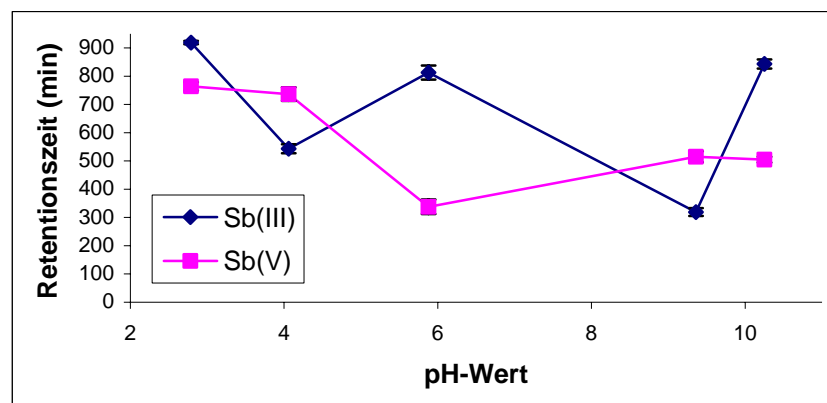


Abbildung 8-36: Einfluss des pH-Wertes der Salzsäure auf die Retentionszeiten von 100 $\mu\text{g/L}$ Sb(V) und 600 $\mu\text{g/L}$ Sb(III). Säule: PRP-X100, pH-Wert 4,7, Flussrate: 1,5 mL/min, Detektion: ICP-MS, Mittelwert aus 5 Bestimmungen

In dem ganzen pH-Bereich verhalten sich Sb(III) und Sb(V) wie negativ geladene Anionen in wässriger Lösung, d. h. beide Retentionszeiten sind größer als die Totzeit des Verfahrens, die Totzeit ist bei diesen ICP-MS-Messungen 46 s.

Variation der Konzentration

Die Erhöhung der Salzsäure-Konzentration führt zu einer Veränderung der Retentionszeiten der Spezies im Chromatogramm. Bei einer Eluentkonzentration von 10 mM eluiert das Sb(V) schneller und bei höheren Konzentrationen ist die Retentionszeit des Sb(V) größer. Eine mögliche Erklärung wäre, dass bei 10 mM die Konzentration des Chlorids nicht hoch genug ist, um Komplexe mit dem Sb(V) zu bilden. Das Sb(III) konnte im betrachteten Konzentrationsintervall nicht vollständig eluiert werden (siehe **Abbildung 8-37** und **Abbildung 8-38**).

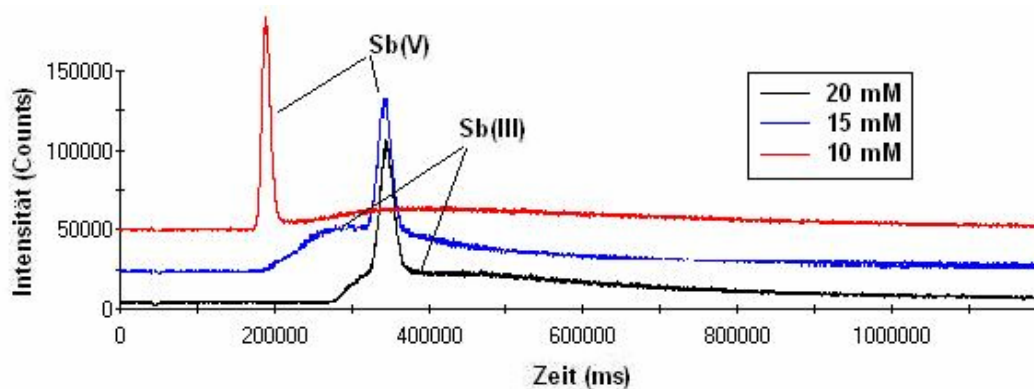


Abbildung 8-37: Anionenchromatogramme einer Sb-Standardlösung (100 $\mu\text{g/L}$ Sb(V) und 600 $\mu\text{g/L}$ Sb(III)), pH-Wert: 6, Flussrate: 1,5 mL/min, Detektion: ICP-MS

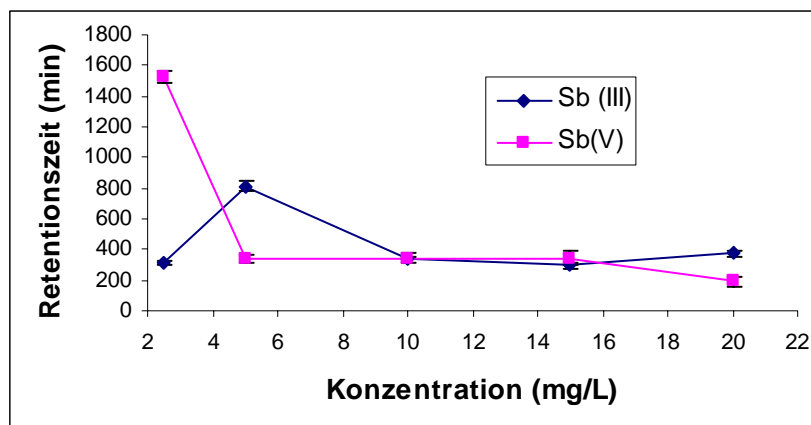


Abbildung 8-38: Einfluss der Konzentration der Salzsäure auf die Retentionszeiten von 100 $\mu\text{g/L}$ Sb(V) und 600 $\mu\text{g/L}$ Sb(III). Säule: PRP-X100, pH-Wert 6, Flussrate: 1,5 mL/min, Detektion: ICP-MS, Mittelwert aus 5 Bestimmungen

Analytische Kenndaten und Bewertung der Trennung mit Salzsäure

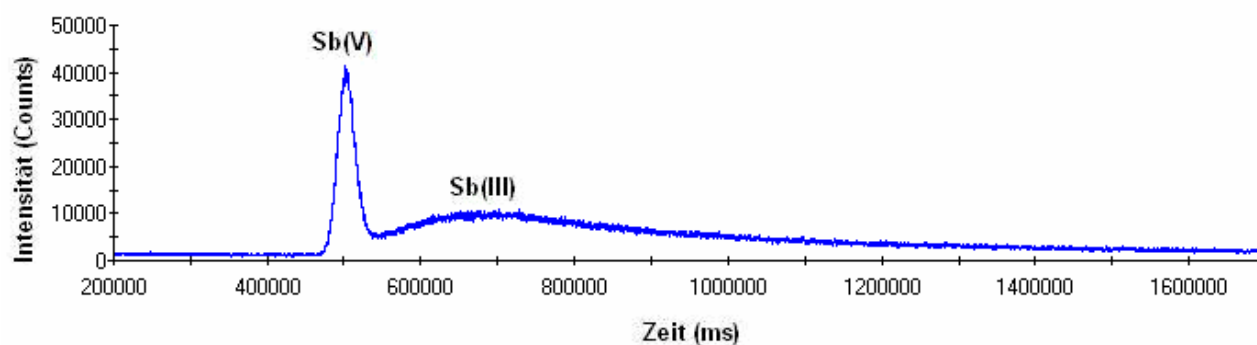


Abbildung 8-39: Trennung mit Salzsäure: Chromatogramm von einer Standardlösung mit 100 $\mu\text{g/L}$ Sb(V) und 600 $\mu\text{g/L}$ Sb(III). Säule: PRP-X100, Eluent: 5 mM, pH-Wert 10,25, Flussrate: 1,5 mL/min, Detektion: ICP-MS

Das beste Ergebnis wurde beim Salzsäure-Verfahren mit 5 mM bei pH 10,25 erreicht, trotzdem ist aber eine vollständige Elution des Sb(III) nicht möglich und eine Grundlinien-Trennung auch nicht. Die chromatographischen Parameter der Methode finden sich in der folgenden Tabelle:

Tabelle 8-11: Analytische Kenndaten des Salzsäure-Verfahrens als Mittelwert aus jeweils 5 Wiederholmessungen

Spezies	Parameter	ICP-AES ^{a)}	ICP-MS ^{b)}
Sb(V)	Retentionszeit (s)	524	505
	Nachweisgrenze ($\mu\text{g/L}$)	246,6	3,9
	Standardabweichung (%)	12,7	6,4
Sb(III)	Retentionszeit (s)	862	843
	Nachweisgrenze ($\mu\text{g/L}$)	481,8	23,0
	Standardabweichung (%)	15,9	9,14

^{a)} Totzeit für das ICP-MS-Verfahren: 46 s; ^{b)} Totzeit für das ICP-AES-Verfahren: 65 s
Die hier angegebenen Ergebnisse wurden unter den folgenden Bedingungen erreicht: 5 mM Salzsäure, pH 10,25

Die folgende Abbildung präsentiert ein Chromatogramm, das unter den oben genannten Bedingungen aufgenommen wurde.

Bei geringeren Eluentkonzentrationen kommt es zu einer noch stärkeren Retention des Sb(III), diese Spezies wird extrem stark an das Austauschermaterial gebunden und nicht reproduzierbar eluiert. Auch bei höheren Eluentkonzentrationen ist bei Sb(III) sowohl die Peakhöhe als auch die Peakfläche deutlich kleiner als bei kleineren Eluentkonzentrationen und die Peakbreite groß. Dieses Verfahren ist daher ungünstiger als z. B. das Nitrat-Verfahren. Beide Peaks entsprechend aber im Vergleich zur Totzeit eindeutig negativ geladenen Spezies. Die durchschnittliche Ladung des Sb(V) ist -0,295 und des Sb(III) -0,95. Die Kapazitätsfaktoren k' für eine Totzeit von 46 s ergeben sich zu $k'_{\text{Sb(III)}} = 14$ und $k'_{\text{Sb(V)}} = 9,98$. Die Asymmetriefaktoren A zeigen mit Werten von $A_{\text{Sb(V)}} = 0,93$ und $A_{\text{Sb(III)}} = 0,27$ ein leichtes Tailing für Sb(V), aber sehr ausgeprägt für Sb(III). Eine Basislinientrennung der beiden Spezies gelang nicht. Die Auflösung R von Sb(V) und Sb(III) beträgt 0,48.

Der Leerwert der Methode ist gegenüber dem Salpetersäure-Verfahren erhöht, was eine der Ursachen für die ungünstigeren Nachweisgrenzen im Vergleich zum Salpetersäure-Verfahren ist. Er liegt bei ca. 3500 Counts pro Messzyklus (0,83 s bei Detektion mit ICP-MS, m/z 121) gegenüber ca. 700 Counts beim Nitrat-Verfahren. Auch die Standardabweichung des Leerwertes ist erwartungsgemäß höher.

Das Salzsäure-Verfahren ist, wie die analytischen Daten zeigen, nicht für die Untersuchung von Antimonspezies geeignet. Die Retentionszeiten sind etwas länger, beide Spezies scheinen mit Chlorid eine Komplexspezies zu bilden.

Mit dem Salzsäure-Verfahren können nicht so gute Nachweisgrenzen erreicht werden. Ein Grund für die geringere Empfindlichkeit des Verfahrens liegt in einem erhöhten Leerwert verbunden mit einem höheren Rauschen. Die Salzsäure enthält auch nach Reinigung über Subboiling-Destillation eine größere Menge Antimon, da dieses als flüchtiges SbCl_3 nicht von der Säure abgetrennt werden kann.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde das Salzsäure-Verfahren nicht weiter verwendet.

8.3.8 Anionenchromatographie mit Sulfat als Eluent

Nach der Untersuchung einiger einprotoniger Säuren bzw. deren Anionen sollten auch zweifach negativ geladene Anionen zum Einsatz kommen. Diese sollten, auf Grund der doppelten Ladung, besser geeignet sein, das ebenfalls doppelt geladene Sb(III) zu eluieren, da auch ihre Bindung an die Austauscherguppen stärker ist. Als erstes soll dabei das Sulfat betrachtet werden. Die Schwefelsäure gibt ihre beiden Protonen sehr leicht ab, sodass über den gesamten nutzbaren pH-Bereich der Chromatographiesäule nur das Sulfat in der Lösung vorliegt.

Eingesetzt wurden Konzentrationen von 60, 40, 20 und 12 mmol/L. Die sich jeweils ergebenden pH-Werte wurden mittels NaOH mehrmals erhöht, und zwar auf 5, 8 und 10.

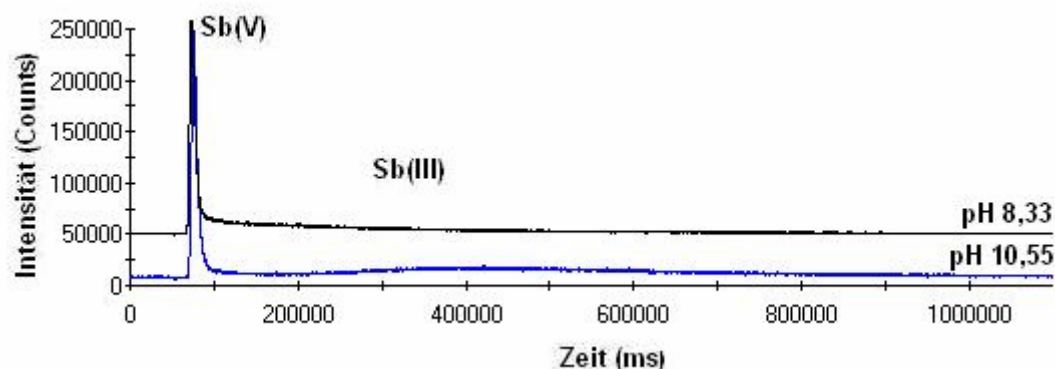
Variation des pH-Wertes

Abbildung 8-40: Anionenchromatogramme einer Sb-Standardlösung (100 µg/L Sb(V) und 600 µg/L Sb(III)), Eluentkonzentration: 12 mmol/L, Flussrate: 1,5 mL/min, Detektion: ICP-MS

Im sauren Bereich ist für Sb(III) kein Signal erkennbar, und auch bei pH-Werten > 10 trat nur ein kleines Signal auf, aber weder die Peakhöhe noch die Peakfläche sind nicht richtig auszuwerten und brachten keine ordnungsgemäßen Ergebnisse (siehe **Abbildung 8-40**).

Sb(V) allerdings zeigt keine Veränderung der Retentionszeit in Abhängigkeit vom pH-Wert, wie **Abbildung 8-41** zeigt. Die Sb(V)-Peaks zeigen die gleiche Form und ein leichtes Tailing. Auch hier ist die Sb(V)-Peakintensität etwas kleiner als bei anderen Verfahren. Die Elutionskraft des Sulfats bezüglich des Antimons ist dann schwach ausgeprägt.

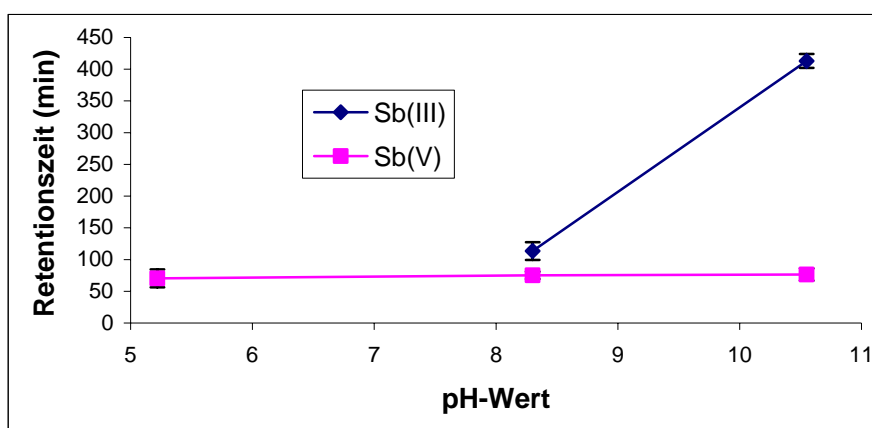


Abbildung 8-41: Einfluss der pH-Werte des Sulfat-Eluenten auf die Retentionszeiten von 100 µg/L Sb(V) und 600 µg/L Sb(III). Säule: PRP-X100, Eluentkonzentration: 12 mM, Flussrate: 1,5 mL/min, Detektion: ICP-MS, Mittelwert aus 5 Bestimmungen

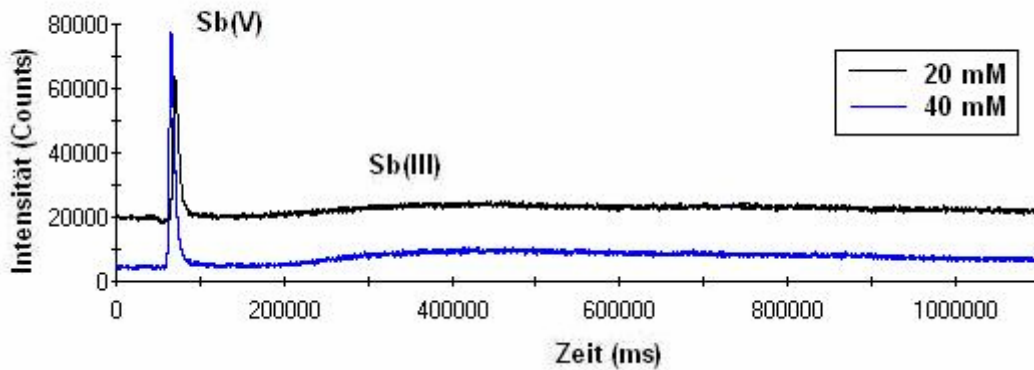
Variation der Konzentration

Abbildung 8-42: Anionenchromatogramme einer Sb-Standardlösung (100 µg/L Sb(V) und 600 µg/L Sb(III), pH-Wert 6, Flussrate: 1,5 mL/min, Detektion: ICP-MS

Bei einer Konzentration kleiner als 20 mmol/L ist kein Signal für Sb(III) erkennbar und ab dieser Konzentration nur ein sehr kleines Signal (siehe **Abbildung 8-42** und **Abbildung 8-43**). Im betrachteten Konzentrationsintervall ist kein Effekt für das Sb(V) unter Einfluss der Konzentration erkennbar, die **Abbildung 8-43** zeigt keine signifikanten Unterschiede in der Retentionszeit.

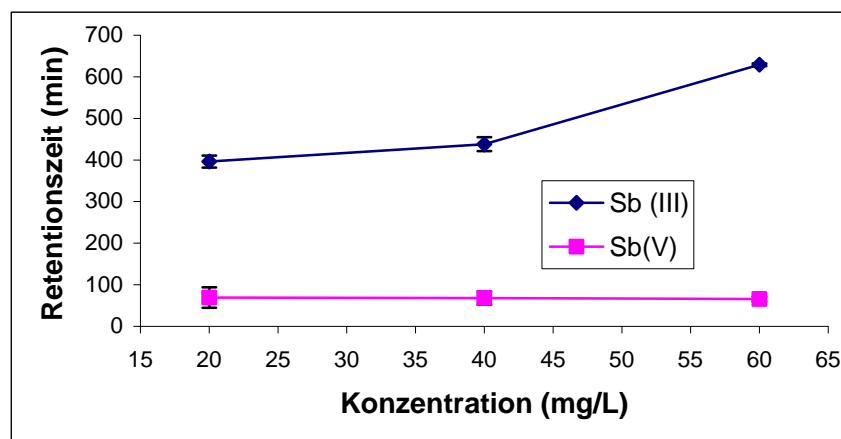


Abbildung 8-43: Einfluss der Konzentration des Sulfats auf die Retentionszeiten von 100 µg/L Sb(V) und 600 µg/L Sb(III). Säule: PRP-X100, pH-Wert 6, Flussrate: 1,5 mL/min, Detektion: ICP-MS, Mittelwert aus 5 Bestimmungen

Analytische Kenndaten und Bewertung der Trennung mit Sulfat

Mit dem Sulfat-Verfahren wurde kein gutes Ergebnis erreicht, eine Elution des Sb(III) war nicht möglich weder bei Veränderung der Konzentration noch bei Variation des pH-Wertes.

Dieses Verfahren ist daher nicht verwendbar. Der Kapazitätsfaktor k' für eine Totzeit von 53 s ergibt sich zu $k'_{\text{Sb(V)}} = 0,35$. Der Asymmetriefaktor A zeigt mit einem Wert von $A_{\text{Sb(V)}} = 0,75$ ein leichtes Tailing. Die Auflösung R konnte, auf Grund der fehlenden Elution des Sb(III), nicht berechnet werden. Die durchschnittliche Ladung des Sb(V) im Sulfat-Verfahren wurde nach Small et al. [216] mit $-0,9$ bestimmt.

Die durchschnittliche Ladung des Sb(III) im Sulfat-System konnte, auf Grund der nicht- oder unvollständigen Elution des Sb(III), bei meist der verwendeten Eluentkonzentrationen, nicht bestimmt werden.

Der Leerwert der Methode ist erhöht, was eine der Ursachen für die ungünstigeren Nachweisgrenzen, im Vergleich zu den anderen anorganischen Eluenten ist. Er liegt bei ca. 7500 Counts pro Messzyklus (0,83 s bei Detektion mit ICP-MS, m/z 121). Auch die Standardabweichung des Leerwertes ist erwartungsgemäß höher.

Das Sulfat-Verfahren konnte in der vorliegenden Arbeit für reale Proben nicht angewendet werden. (siehe die dargestellten analytischen Kenndaten des Systems in der **Tabelle 8-12**)

Tabelle 8-12: Analytische Kenndaten des Sulfat-Verfahrens als Mittelwert aus jeweils 5 Wiederholmessungen

Spezies	Parameter	ICP-AES ^{a)}	ICP-MS ^{b)}
Sb(V)	Retentionszeit (s)	88	69
	Nachweisgrenze ($\mu\text{g/L}$)	283,4	7,9
	Standardabweichung (%)	22,5	14,6
Sb(III)	Retentionszeit (s)	n. d.	n. d.
	Nachweisgrenze ($\mu\text{g/L}$)	n. d.	n. d.
	Standardabweichung (%)	n. d.	n. d.

^{a)} Totzeit für das ICP-MS-Verfahren: 52 s; ^{b)} Totzeit für das ICP-AES-Verfahren: 73 s
 Die hier angegebenen Ergebnisse wurden unter den folgenden Bedingungen erreicht: 12 mM Natriumsulfat, pH 8,3
 n. d.: mit dem Verfahren nicht detektierbar

8.3.9 Anionenchromatographie mit Carbonat als Eluent

Ein weiterer Vertreter der zweibasigen Säuren und ein häufig genutzter Eluent in der Anionenchromatographie ist die Kohlensäure. Letzteres lässt sich damit begründen, dass ein Carbonat-Eluent durch einen der Trennsäule nachgeschalteten Suppressor entfernt werden kann und somit die Detektion der Analyten nicht stört [230]. Aufgrund der hier benutzten elementspezifischen Detektion ist eine solche Abtrennung nicht unbedingt notwendig und konnte dementsprechend entfallen. Die Kohlensäure ist eine zweibasige Säure mit einem pK_{S1} von 6,35 und einem pK_{S2} von 10,33. Es ist darauf zu achten, dass der pH-Wert des Eluenten nicht zu stark sauer wird, da ansonsten die Möglichkeit des Ausgasens von CO_2 besteht, was nicht nur die Eluentkonzentration verändern, sondern auch zur Bildung von Gasbläschen führen würde, welche sich in der Säule anlagern und dann den Staudruck stark erhöhen könnten. Eine pH-Variation war also nur zwischen 3 und 11 möglich. Beim Lösen von Natriumcarbonat in Wasser entsteht eine nahezu neutrale Lösung. Zur Variation des pH-Wertes wurde wiederum Ammoniak bzw. HNO_3 verwendet.

Die Optimierung der Methode erfolgte in bezug auf die chromatographische Auflösung und die Analysendauer unter Variation der Eluentkonzentration und des pH-Wertes. Die Messungen erfolgten mit der Kopplung IC-ICP-MS. Das hier verwendete Natriumcarbonat war zwischen 10 und 60 mmolar.

Variation des pH-Wertes

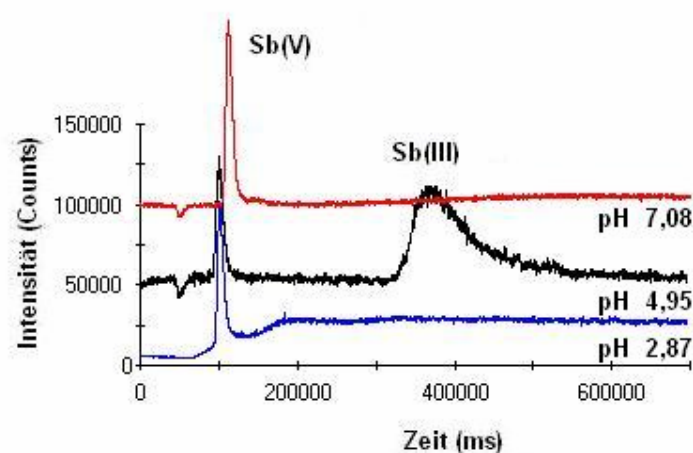


Abbildung 8-44: Anionenchromatogramme einer Sb-Standardlösung (100 $\mu\text{g/L}$ Sb(V) und 600 $\mu\text{g/L}$ Sb(III)), Eluentkonzentration: 10 mmol/L, Flussrate: 1,5 mL/min, Detektion: ICP-MS

Der Einfluss des pH-Werts auf die Elution der beiden Spezies ist in **Abbildung 8-44** dargestellt. Das Peakmaximum des Sb(V) ist dabei ein wenig verschoben, aber dieser Unterschied ist sehr klein. Das Sb(III) wird dagegen nicht vollständig eluiert. Ab pH 7 ist fast kein Signal mehr zu erkennen.

Aus der **Abbildung 8-45** kann man folgern, dass das Sb(V) nicht durch den pH-Wert beeinflusst wird. Vom Sb(III) bleibt eine große Menge an Analyt auf der Säule.

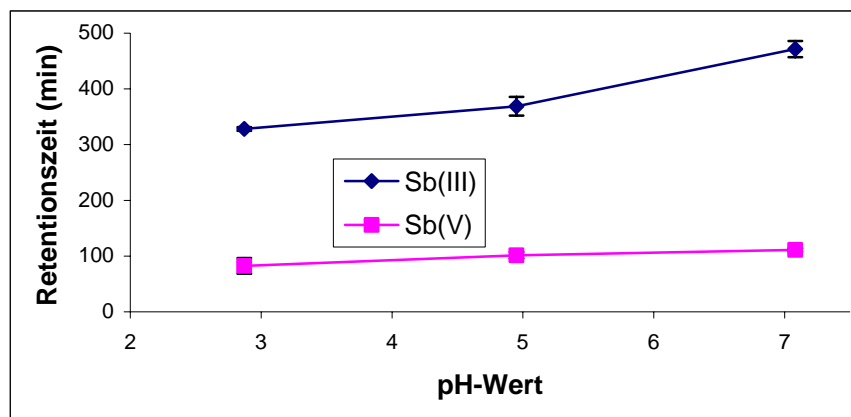


Abbildung 8-45: Einfluss des pH-Wertes des Carbonat-Eluenten auf die Retentionszeiten von 100 $\mu\text{g/L}$ Sb(V) und 600 $\mu\text{g/L}$ Sb(III). Säule: PRP-X100, Eluentkonzentration: 10 mmol/L, Flussrate: 1,5 mL/min, Detektion: ICP-MS, Mittelwert aus 5 Bestimmungen

Variation der Konzentration

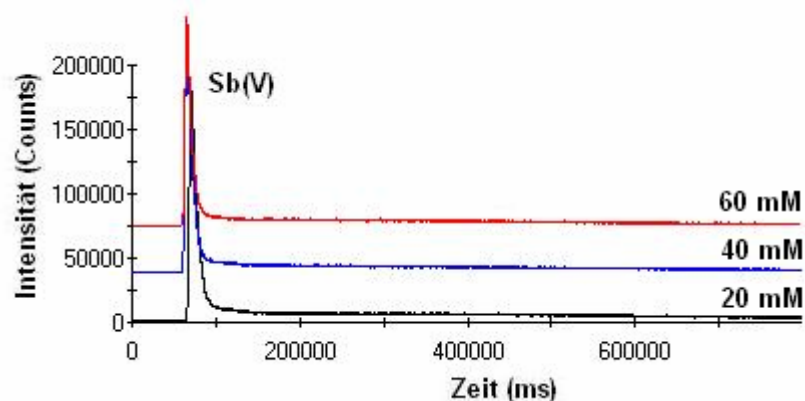


Abbildung 8-46: Anionenchromatogramme einer Sb-Standardlösung (100 $\mu\text{g/L}$ Sb(V) und 600 $\mu\text{g/L}$ Sb(III)), pH-Wert 11,40, Flussrate: 1,5 mL/min, Detektion: ICP-MS

Den gleichen Einfluss wie die Variation des pH-Wertes hat die Erhöhung der Carbonatkonzentration. Die Erhöhung des pH-Werts wirkt sich wie eine Konzentrationserhöhung aus, da im alkalischen Milieu die doppelt negativen Carbonationen und nicht nur Hydrogencarbonat oder sogar z. T. Kohlensäure vorliegt. Aber bei pH-Wert 11,40 wird Sb(III) überhaupt nicht eluiert und verbleibt auf der Säule. (siehe **Abbildung 8-46** und **Abbildung 8-47**).

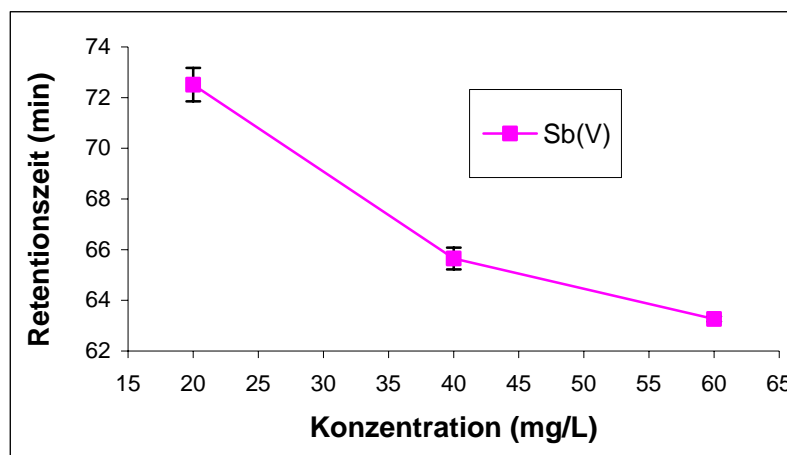


Abbildung 8-47: Einfluss der Carbonatkonzentration auf die Retentionszeiten von 100 $\mu\text{g/L}$ Sb(V). Säule: PRP-X100, pH-Wert: 11,45, Flussrate: 1,5 mL/min, Detektion: ICP-MS, Mittelwert aus 5 Bestimmungen

Analytische Kenndaten und Bewertung der Trennung mit Carbonat

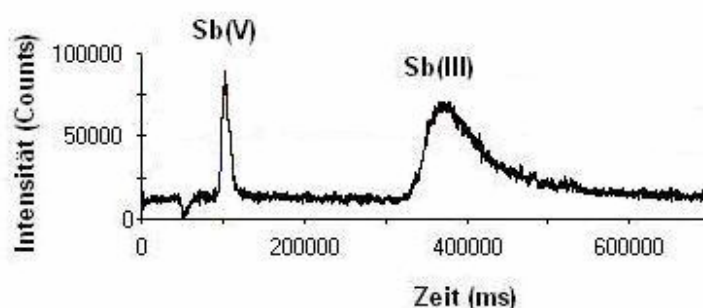


Abbildung 8-48: Trennung mit Carbonat-Eluent: Chromatogramm von einer Standardlösung mit 100 $\mu\text{g/L}$ Sb(V) und 600 $\mu\text{g/L}$ Sb(III). Säule: PRP-X100, Eluent: 10 mM, pH-Wert 4,95, Flussrate: 1,5 mL/min, Detektion: ICP-MS

Beim Carbonat-Verfahren werden mit 10 mMolar bei pH 5 die besten chromatographischen Ergebnisse erreicht (siehe **Abbildung 8-48**). Wie beim Zitronensäure- und 4-Hydroxybenzoesäure-Verfahren sind im Fall des Sb(III) die generierten Signalintensitäten der

untersuchten Antimonspezies klein. Beide Spezies sind gut getrennt, aber die Basislinie ist sehr hoch, was eine Erhöhung der Nachweisgrenzen hervorruft. Insgesamt ist zu konstatieren, dass Carbonat als Eluent für die gewünschte Sb-Speziierung auch geeignet ist.

Bei höheren Eluentkonzentrationen kommt es zu einer sehr starken Retention des Sb(III). Bei pH-Wert 5 findet man ein Optimum, da bei höheren pH-Werten das Sb(III) extrem stark an das Austauschermaterial gebunden bleibt und nicht eluiert wird. Bei kleineren pH-Werten sind die erhaltenen Signale sehr klein.

Die Retentionszeiten sind hier vergleichsweise lang gegenüber dem Phthalsäure-Verfahren, aber kürzer als die Retentionszeiten des Nitrat-Verfahrens. Die Totzeit des Verfahrens bei ICP-MS-Detektion ist 45 s. Die analytischen Kenndaten des Systems finden sich in der **Tabelle 8-13**.

Tabelle 8-13: Analytische Kenndaten des Carbonat-Verfahrens als Mittelwert aus jeweils 5 Wiederholmessungen

Spezies	Parameter	ICP-AES ^{a)}	ICP-MS ^{b)}
Sb(V)	Retentionszeit (s)	121	101
	Nachweisgrenze ($\mu\text{g/L}$)	291,7	9,3
	Standardabweichung (%)	18,5	11,14
Sb(III)	Retentionszeit (s)	383	364
	Nachweisgrenze ($\mu\text{g/L}$)	389	79
	Standardabweichung (%)	8,6	16,5

^{a)} Totzeit für das ICP-AES-Verfahren: 45 s; ^{b)} Totzeit für das ICP-MS-Verfahren: 64 s
Die hier angegebenen Ergebnisse wurden unter den folgenden Bedingungen erreicht: 10 mM Natriumcarbonat, pH 4,95

Die Kapazitätsfaktoren k' für diese Totzeit ergeben sich zu $k'_{\text{Sb(V)}} = 1,24$ und $k'_{\text{Sb(III)}} = 7$. Die Asymmetriefaktoren A zeigen mit Werten von $A_{\text{Sb(V)}} = 0,87$ und $A_{\text{Sb(III)}} = 0,47$ ein leichtes Tailing. Die Auflösung R der Sb(V)- und der Sb(III)-Peaks beträgt 2,1.

Der Leerwert der Methode ist gegenüber anderen Verfahren ein bisschen erhöht, was eine der Ursachen für die ungünstigeren Nachweisgrenzen im Vergleich zum anderen Verfahren ist. Er liegt bei ca. 7000 Counts pro Messzyklus (0,83 s bei Detektion mit ICP-MS, m/z 121)

gegenüber ca. 500 Counts bei einer EDTA-Elution. Diese Erhöhung des Untergrunds könnte durch einen „Memory-Effekt“ des Eluents oder Rückstände auf der Säule verursacht werden. Auch die Standardabweichung des Leerwertes ist erwartungsgemäß höher. Die durchschnittliche Ladung der Spezies wurde nach Small et al. für Sb(V) und Sb(III) zu -0,45 und -0,73 bestimmt.

Das Carbonat-Verfahren ist im Prinzip, wie die analytischen Kenndaten zeigen, für die Untersuchung von Antimonspezies geeignet, aber die Reproduzierbarkeit des Systems war sehr schlecht. Außerdem war die Verwendung des Natriumcarbonats als Eluent eine Belastung für das System, das Ablagerung von Natriumsalzen in Sampler und Skimmer während des Messtages verursachte. Die Ablagerung des Natriumsalzes in Sampler und Skimmer verursachte im Laufe des Messtages eine signifikante Verringerung der Signalintensität, was die Nutzbarkeit der Methode sehr einschränkt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde aus diesem Grund das Carbonat-Verfahren zur Untersuchung von Antimonspezies in biologischen Proben nicht verwendet.

8.4 Vergleichende Übersicht der Methoden: Anionenchromatographie

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden acht Verfahren zur Antimonspeziesanalytik mit Anionenchromatographie ohne Nachsäulenderivatisierung auf ihre analytische Anwendbarkeit untersucht. Dabei wurden Verfahren entwickelt um reale Proben auf Antimonkomponenten zu untersuchen.

Im Folgenden soll eine vergleichende Übersicht die Vor- und Nachteile und insbesondere die Anwendungsbereiche der verschiedenen Methoden genauer erläutern.

8.4.1 Anwendungsbereich: Analytische Kenndaten

Mit einem Teil der vorgestellten Verfahren lassen sich die Antimonspezies separieren und quantifizieren. Das Nitrat-, Carbonat- und insbesondere das EDTA-Verfahren erlauben die Untersuchung der Oxidationsstufen des anorganisch gebundenen Antimons. Mit Zitronensäure-, 4-Hydroxybenzoesäure- und Sulfat-Verfahren konnte keine gute Elution des Sb(III) erreicht werden. Die **Tabelle 8-14** für ICP-AES-Detektion und die **Tabelle 8-15** für ICP-MS-Detektion zeigen die Nachweisgrenzen und die Standardabweichungen bei einer Konzentration des Zehnfachen der Nachweisgrenze. Auf einen Vergleich des dynamischen

Bereiches wurde an dieser Stelle verzichtet, da der Einsatzbereich der Methoden für die Bioanalytik eher im unteren Konzentrationsbereich anzusiedeln ist, bei dem nicht alle Verfahren anwendbar sind. Für einzelne Anwendungen erfolgt die Charakterisierung im Zusammenhang mit den jeweiligen Matrixeinflüssen (siehe **Kapitel 11.7**).

Tabelle 8-14: Vergleichende Übersicht der Nachweisgrenzen und Standardabweichungen der vorgestellten Verfahren mit ICP-MS-Detektion

Eluent	Sb(V)		Sb(III)	
	NWG ^a	Stabw. ^b	NWG ^a	Stabw. ^b
Phthalsäure	0,49	3,9	5,23	7,4
Zitronensäure	1,43	11,5	15	22,8
4-Hydroxybenzoesäure	0,87	9,6	53,15	12,3
EDTA	0,31	4,0	3,0	9,21
Nitrat	0,48	2,4	3,9	5,0
Chlorid	3,9	6,4	23,0	9,14
Sulfat	7,9	14,6	n. d.	n. d.
Carbonat	9,3	11,14	76	16,5

^aNWG: Nachweisgrenze in µg/L nach DIN 32645; n. d.: mit dem Verfahren nicht detektierbar

^bStabw.: Standardabweichung in % bei einer Konzentration des Zehnfachen der NWG

Tabelle 8-15: Vergleichende Übersicht der Nachweisgrenzen und Standardabweichungen der vorgestellten Verfahren mit ICP-AES-Detektion

Eluent	Sb(V)		Sb(III)	
	NWG ^a	Stabw. ^b	NWG ^a	Stabw. ^b
Phthalsäure	78,8	6,3	432	6,9
Zitronensäure	210,8	18,9	259,8	5,9
4-Hydroxybenzoesäure	156,5	8,3	487,4	9,14
EDTA	56,8	3,9	108	6,13
Nitrat	134	5,9	176	6,2
Chlorid	246,6	12,7	481,8	15,9
Sulfat	283,4	22,5	n. d.	n. d.
Carbonat	291,7	18,5	389	8,9

^aNWG: Nachweisgrenze in µg/L nach DIN; n. d.: mit dem Verfahren nicht detektierbar

^bStabw.: Standardabweichung in % bei einer Konzentration des Zehnfachen der NWG

Anorganische und organische Säuren lassen sich als mobile Phase verwenden, sodass nun für die Speziesanalytik des Antimons im Spuren- und auch Ultraspurenbereich in medizinischen Proben eine methodische Grundlage vorhanden ist. Die niedrigsten Nachweisgrenzen konnten für das EDTA- und für das Nitrat-Verfahren erreicht werden.

8.5 Diskussion der Methode: Anionenchromatographie

Im allgemein wurde Sb(V) als erster Peak und Sb(III) als zweiter Peak eluiert, außer beim Nitrat-Verfahren (s. **Kapitel 8.3**). Die Formen der Peaks für die beiden Antimonspezies präsentierte sich wie folgt:

Bei den Messungen ist der zweite Peak (Sb(III)) viel breiter als der erste (Sb(V)), was ein guter Hinweis auf Instabilität dieses Ions ist.

Bei allen Sb(III)-Standardmessungen beobachtet man auch einen kleinen Sb(V)-Peak. Das bedeutet, dass die Oxidation des dreiwertigen zum fünfwertigen Antimon sofort beginnt, Sb(III) also instabil ist (**Abbildung 8-49**).

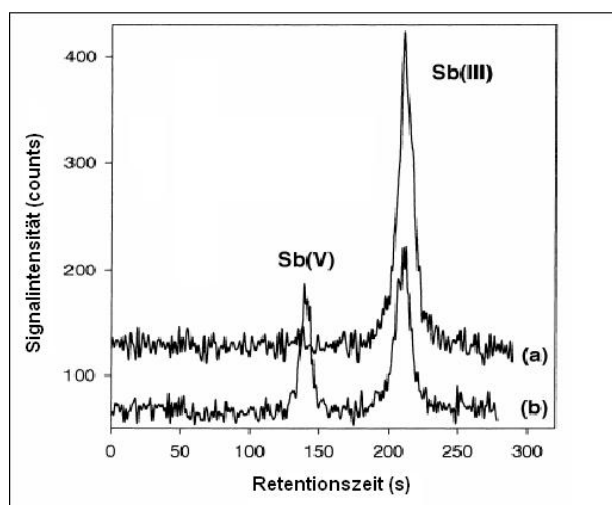


Abbildung 8-49: Chromatogramme der Trennung von Sb(V) und Sb(III), dokumentiert die Oxidation von Sb(III) to Sb(V) im mmol/L-Niveau in Wasser: (a) frisches vorbereiteteter wässriger Standard, mit 70 ng Sb(III), (b) gleicher Sb(III) Standard wie (a), injiziert 3 Stunden später [231] (Säule: PRP-X100, Eluent: 1,25 mM EDTA, pH 4,7)

Bei allen Messungen von Sb(V) gab es keinen separaten Peak des dreiwertigen Antimons, sodass sich ein guter Hinweis auf dessen Stabilität ergibt.

Die im Kapitel vorgestellten Methoden wurden für die Antimonspeziesanalytik in medizinischen Proben entwickelt. In den meisten Fällen stehen mehrere Verfahren zur Verfügung. Der Anwendungsbereich der Methoden ist vor allem durch die Nachweisgrenzen reglementiert. Bei Zellproben können die vorgestellten Verfahren Informationen über das anorganische Antimon liefern. Mehr Informationen können hier die Größenausschlusschromatographie oder die Kapillarelektrophorese liefern.

Die Anionenchromatographie kann nur zur Trennung und Quantifizierung anionischer Spezies eingesetzt werden. Viele der relevanten Antimonspezies und –komplexe liegen in wässrigem Medium anionisch vor und sind mit einigen der in diesem Kapitel vorgestellten Methoden zugänglich.

Die elementspezifische Detektion, die insbesondere mit ICP-MS als Detektor überhaupt erst die Speziesanalytik im Spuren- und im Ultraspurenbereich erlaubt, zerstört bei der Detektion vollständig die Speziesinformation. Eine Zuordnung der Komponenten ist nur über den Einsatz von Standardsubstanzen (Standardaddition) und über den Vergleich der Retentionszeiten möglich. In vielen der Realproben sind mehr Komponenten vorhanden, als Standards zur Verfügung standen. Über diese Spezies sind mit den hier vorgestellten Verfahren weder qualitative noch quantitative Informationen zu erhalten, die z. B. über Aussagen zur Ladung der Substanzen hinausgehen. An dieser Stelle müssen speziessensitive Kopplungen, wie z. B. LC-MS, entwickelt werden, deren Nachweisvermögen derzeit häufig nicht für die Untersuchung von Realproben seltenerer Elemente wie Antimon ausreicht.

Mit der Anionenchromatographie ist somit nur der Anfang für die Beurteilung des Gefährdungspotentials durch Antimon und die Untersuchung der Metabolisierung im biologischen Bereich gemacht. Zur Charakterisierung der Bindungsformen in medizinischen Proben, z. B. der Frage nach antimonhaltigen Proteinen, sollten die Größenausschlusschromatographie oder die Kapillarelektrophorese eingesetzt werden.

9 Trennung auf der Basis der CZE-UV

Ziel dieser Teil der vorliegenden Arbeit war es, die Kapillaronenelektrophorese auf ihre Eignung zur Analyse von Antimonspezies zu testen. Um Sb(III) und Sb(V) bestimmen zu können, sollte eine Trennmethode erarbeitet werden. Zur Verbesserung der Nachweisgrenze, Steigerung der Selektivität und Erweiterung der Analysenmethoden sollten verschiedene Puffer und Pufferzusätze untersucht werden. Zur Detektion der Antimonverbindungen stand ein UV-Detektor zur Verfügung.

Die Versuche zur Kapillaronenelektrophorese wurden mit einem Gerät der Firma Beckman P/ACE System MDQ durchgeführt, welches mit einem Festwellenlängen-UV-Detektor ausgestattet war. Es wurde indirekte UV-Detektion mit dem Detektor am anodischen Ende der Kapillaren verwendet.

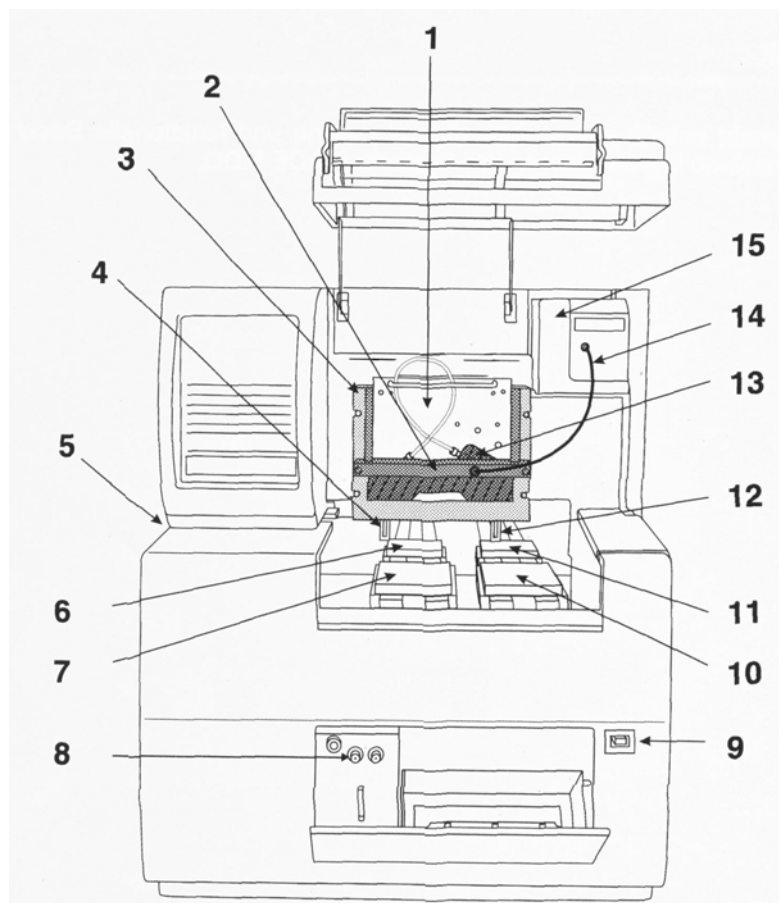


Abbildung 9-1: Kapillaronenelektrophorese-Geräts der Firma Beckman P/ACE System MDQ (2: Einschubleiste, 8: Kühlmitteleinfüllöffnungen, 9: Netzschalter, 12: geerdete Elektrode, 13: Kapillarkartusche, 14: Lichtleiter)

Zu den Hauptgeräteeinheiten (siehe **Abbildung 9-1**) des Systems zählen Halterungen für die Gläschen mit Proben, Puffern und anderen Lösungen (6: Einlassprobentablett, 7: Einlasspuffertablett, 10: Auslasspuffertablett, 11: Auslassprobentablett), ein Schnittstellenblock (3), eine Hochspannungsstromversorgung (in 5), die Hochspannungselektroden (4), die Hardware zur Temperaturregelung, ein Probeninjektionsmechanismus und ein Optik-Modul (1, mit darin befindlicher D₂-Lampe) mit Detektor (15).

Die verwendeten Kapillaren bestanden aus amorphem Quarz (fused silica) mit einer ca. 10 µm starken Polyimidschicht als Schutz. Sie waren 50/60 cm lang und hatten einen Innendurchmesser von 100 µm. Die **Abbildung 9-2** zeigt den Aufbau der Kapillarenkartusche

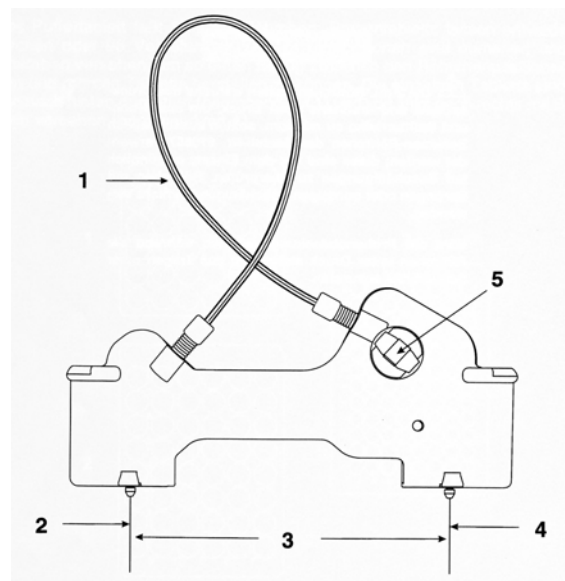


Abbildung 9-2: Aufbau der Kapillarenkartusche (1: Kühlmittelschlauch mit innenliegender Kapillare, 2: Einlass, 3: Kapillare, 4: Auslass, 5: Detektorfenster und Apertur)

In den folgenden Kapiteln die Kenngrößen der Kapillarelektrophorese kurz beschrieben, die für die Bewertung der anschließend beschriebenen Methoden nötig sind.

9.1 Kenngrößen der CZE

Die von der Chromatographie bekannten Größen zur Beschreibung der Selektivität, der theoretischen Bodenhöhe H und der Bodenzahl N wurden von Jorgenson und Lukacs [232, 233] auf die Kapillarelektrophorese übertragen, sodass ein Elektropherogramm nach den gleichen Kriterien wie ein Chromatogramm ausgewertet werden kann. Dabei ist allerdings zu beachten, dass die Signale im Elektropherogramm nur selten in Form einer Gaußschen

Glockenkurve vorliegen, sondern in der Regel die Form eines Dreiecks annehmen, weswegen die Übertragung der chromatographischen Parameter [234] auf die Elektrophorese nur eine mathematische Näherung darstellt.

Migrationszeit

In Analogie zur Retentionszeit wird die Migrationszeit als die Zeit bezeichnet, die eine Komponente von der Probenaufgabe bis zum Detektor benötigt.

$$t_m = \frac{L_{eff}}{v_{eff}} \quad \text{Gleichung 9-1}$$

t_m : Migrationszeit

L_{eff} : Länge der Kapillare bis zum Detektor

v_{eff} : Wanderungsgeschwindigkeit der Probenkomponente

Die Wanderungsgeschwindigkeit v_{eff} der Probenkomponente setzt sich aus der vektoriellen Summe der elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeit v_{ep} und des elektroosmotischen Flusses v_{eof} zusammen:

$$v_{eff} = v_{eof} \pm v_{ep} \quad \text{Gleichung 9-2}$$

v_{eof} : Geschwindigkeit des elektroosmotischen Flusses

v_{ep} : elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit

Nach Einsetzen in **Gleichung 9-1** erhält man für die Migrationszeit t_m folgende Beziehung:

$$t_m = \frac{L_{eff}}{v_{eof} \pm v_{ep}} \quad \text{Gleichung 9-3}$$

Selektivität

In der Chromatographie wird als Maß für die Selektivität der Selektivitätsfaktor α herangezogen, welcher als Quotient der Kapazitätsfaktoren k_i der beiden zu trennenden Analyten definiert ist:

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} = \frac{t_2 - t_0}{t_1 - t_0} \quad \text{Gleichung 9-4}$$

$k_{1,2}$: Kapazitätsfaktoren der Analyten 1 und 2

$t_{1,2}$: Retentionszeiten der Analyten

t_0 : Totzeit

Unter Berücksichtigung, dass es in der Kapillarzonenelektrophorese (CZE) keine Totzeit t_0 gibt und dass die Trennung nur auf die verschiedenen elektrophoretischen Mobilitäten der Analyten und nicht auf die Unterschiede in den Verteilungsgleichgewichten zweier Phasen zurückzuführen ist, gilt für den Selektivitätsfaktor α analog **Gleichung 9-4**:

$$\alpha_{CE} = \frac{t_{m2}}{t_{m1}} \quad \text{Gleichung 9-5}$$

α_{CE} : Selektivitätsfaktor in der CE

$t_{m1,2}$: Migrationszeiten der Analyten 1 und 2

Bodenzahl

Als ein quantitatives Maß für die Effizienz eines elektrophoretischen Systems können in Analogie zur Chromatographie [235] die theoretische Bodenhöhe H und die Anzahl der theoretischen Böden, auch Trennstufenzahl N genannt, verwendet werden. Beide Größen sind durch folgende Gleichung miteinander verknüpft:

$$N = \frac{L_{eff}}{H} \quad \text{Gleichung 9-6}$$

Die Breite eines Peaks lässt sich durch seine Standardabweichung σ (in Längeneinheiten) oder Varianz σ^2 darstellen. Wie bei der Chromatographie ist H als die auf die effektive Kapillarlänge bezogene Varianz definiert:

$$H = \frac{\sigma^2}{L_{eff}} \quad \text{Gleichung 9-7}$$

σ^2 : Varianz des Konzentrationsprofils bei der Gaußschen Normalverteilung

Zur Umrechnung in Zeiteinheiten dient **Gleichung 9-8**, in der σ und τ (Standardabweichung der Peaks in Zeiteinheiten) miteinander verknüpft sind:

$$\tau = \frac{\sigma \cdot t_m}{L_{eff}} \quad \text{Gleichung 9-8}$$

Mit $\tau \approx W/4$ folgt aus **Gleichung 9-8**:

$$\sigma = \frac{L_{eff} \cdot W}{4 \cdot t_m} \quad \text{Gleichung 9-9}$$

W : Basispeakbreite

Durch Einsetzen von **Gleichung 9-7** in **Gleichung 9-9** erhält man:

$$H = \frac{L_{eff} \cdot W^2}{16 \cdot t_m^2} \quad \text{Gleichung 9-10}$$

Mit **Gleichung 9-6** ergibt sich die theoretische Bodenzahl N zu:

$$N = 16 \cdot \left(\frac{t_m}{W} \right)^2 \quad \text{Gleichung 9-11}$$

Unter Verwendung der Halbwertsbreite $W_{0,5}$ (Breite des Peaks auf halber Höhe) erhält man:

$$N = 5,54 \cdot \left(\frac{t_m}{W_{0,5}} \right)^2 \quad \text{Gleichung 9-12}$$

Bandenverbreiterung

Während der Trennung unterliegen die migrierenden Zonen einer Bandenverbreiterung, die durch Diffusion, thermische Konvektion, Adsorptionseffekte an der Kapillarwand etc. hervorgerufen wird. Im Idealfall kann, wie schon erwähnt, das resultierende Konzentrationsprofil der jeweiligen Zone, ebenso wie in der Chromatographie, durch eine Gaußverteilung [236] beschrieben werden, wobei die Gesamtvarianz σ^2 als Summe der individuellen Varianzen σ_i^2 aufgeführt wird:

$$\sigma^2 = \sigma_I^2 + \sigma_D^2 + \sigma_J^2 + \sigma_{EM}^2 + \sigma_{EO}^2 + \sigma_{AE}^2 \quad \text{Gleichung 9-13}$$

Die σ_i^2 -Terme [236] beschreiben die Einflüsse der Injektion, Diffusion, Jouleschen Wärme, Elektromigration, Elektroosmose, Adsorption und anderer Effekte, die alle berücksichtigt werden müssen, um eine erfolgreiche Analyse mit der Kapillarelektrophorese zu gewährleisten.

9.2 Elektrodispersion

Die Peakverbreiterung in der CZE wird nur dann ausschließlich durch longitudinale Diffusion bestimmt, wenn die elektrische Feldstärke in der gesamten Trennkapillare konstant ist, d.h. nicht durch lokale Leitfähigkeitsunterschiede gestört wird. Dies ist nur dann der Fall, wenn die Mobilitäten des Analytens sehr viel geringer ($< \text{Faktor } 100$) als die des Puffers ist. In allen anderen Fällen findet eine zusätzliche Peakverbreiterung statt, da sich die elektrische Feldstärke in der Probenzone von der in der Umgebung, wenn auch nur geringfügig, unterscheidet. Das resultierende Konzentrationsprofil ist nicht mehr gaußförmig, sondern weist ein so genanntes Leading oder Tailing auf (**Abbildung 9-3**).

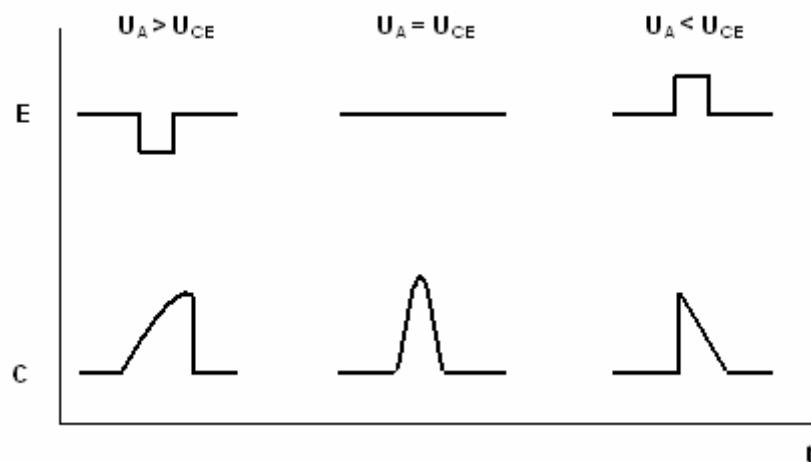


Abbildung 9-3: Konzentrationsverteilung und Feldstärkeverlauf für unterschiedliche Werte von Proben- und Puffermobilität. (U_A : Mobilität des Probenions, U_{CE} : Mobilität des Puffer-Ions)

Ist die Mobilität u_A des Proben-Ions geringer als die des gleichgeladenen Puffer-Ions (u_{CE}), so herrscht in der Probenzone eine geringere Leitfähigkeit und damit eine höhere Feldstärke als im Trägerelektrolyten. Die Vorderfront des Peaks ist deshalb scharf, während das Ende des Peaks diffus ist, da Ionen, die durch Diffusion im Trägerelektrolyten zurückbleiben, durch die geringere Feldstärke noch weiter abgebremst werden (Tailing). Im Falle einer höheren

Probenmobilität kehren sich die Verhältnisse um und das Konzentrationsprofil zeigt ein Leading.

In einem Elektropherogramm sind deshalb häufig verschiedene Peakformen zu beobachten: Leading, symmetrisch und Tailing. Die Ursachen dafür liegen nicht in der Adsorption von Analyten an die Kapillarwand, sondern nur in den unterschiedlichen Mobilitäten. Dieses Problem lässt sich durch Anpassung der Mobilität des Puffer-Ions an die des Analyten Verwendung geringerer Probenkonzentration oder höherer Pufferkonzentration lösen.

Eine Verbreiterung des Injektionsprofils erfolgt außerdem, wenn die Salzkonzentration der Probenlösung sehr hoch ist, d.h. die anfängliche Leitfähigkeit in der Probenzone höher als die im Trägerelektrolyten ist. In der CZE sollten die Probenlösungen daher möglichst wenige Fremd-Ionen enthalten, vor allem wenn die Analytkonzentration sehr gering ist und entsprechend höhere Injektionsvolumina appliziert werden.

Der Idealfall ist eine Lösung der Analyte in reinem Wasser: Hier tritt der umgekehrte Effekt ein, die anfängliche Probenzone wird auf Grund ihrer geringen Leitfähigkeit geschärft. Durch diese Probenkonzentrierung durch Leitfähigkeitsunterschiede lassen sich die Injektionsvolumina um einen Faktor 5 bis 10 steigern.

Ein weiterer wichtiger Effekt in bezug auf die Wanderungsgeschwindigkeit der Analyten ist der elektroosmotische Fluss (EOF), dieser wurde schon im **Kapitel 5.1** beschrieben.

9.3 Weitere Größen für die Optimierung einer Trennung

Ionenstärke

Die Ionenstärke des Puffers beeinflusst sowohl die Mobilität der Analytionen als auch den EOF. Höhere Ionenstärken haben den Vorteil, dass auch höhere Probenkonzentrationen bei geringer Elektrodiskersion eingesetzt werden können. Ebenso können elektrostatische Wechselwirkungen der Probeionen (z. B. Proteine) mit der Kapillarwand reduziert werden. Hohe Ionenstärken bei gleichzeitig hoher Mobilität (=Leitfähigkeit) des Puffers führen aber zu hohen Stromstärken und damit hoher Joulescher Wärmewicklung in der Kapillare, wodurch die Trenneffizienz abnimmt. Abhilfe schaffen geringe Kapillarinne Durchmesser oder aber zwitterionische Puffersubstanzen, die in sehr hoher Konzentration eingesetzt werden können und in ihrer Mobilität oft besser den Analytionen entsprechen.

Der Einfluss des EOF auf die Mobilität der Analytione wurde im **Kapitel 5.1** erläutert.

Temperatur

Temperaturgradienten in der Kapillare führen zu einem Verlust an Trenneffizienz und sollten möglichst gering gehalten werden. Eine effektive Kühlung ist deshalb eine Voraussetzung, um die maximale Trennleistung zu erzielen und den Temperaturunterschied zwischen Kapillarinne und Umgebung gering zu halten. Zu hohe Innentemperaturen können z. B. bei labilen Verbindungen zur Zersetzung führen. Eine wirksame Thermostatisierung ist wichtig da die Temperatur u. a. Einfluss auf Mobilität, pK-Werte, Löslichkeit und Gleichgewichtsreaktionen hat. Die Reproduzierbarkeit einer Trennung ist direkt mit dem Temperaturkonstanz verbunden.

Höhere Temperaturen führen auf Grund der niedrigeren Viskosität der Lösung zu höheren Mobilitäten und daher oft geringerer Effizienz, die Löslichkeit wird dagegen oft verbessert. Eine Absenkung der Temperatur ermöglicht dagegen das „Einfrieren“ von Gleichgewichten. Dadurch lassen sich Trennungen von Enantiomeren, Isomeren oder Komplexen erzielen, die bei Raumtemperatur nicht möglich sind.

Pufferzusätze

Der Puffer kann aus unterschiedlichen Gründen mit Additiven versetzt werden:

- Erhöhung der Löslichkeit von hydrophoben Proben
- Erhöhung der Selektivität
- Verhinderung oder Verringerung der Wandadsorption

Die Änderung der Selektivität einer Trennung kann auch durch Ausnutzung sekundärer Gleichgewichte, die die Mobilität verändern, erzielt werden. Zu nennen sind u. a. folgende Möglichkeiten:

1. Boratkomplexierung

Vicinale cis-Diolgruppen, etwa von Zuckermolekülen, können mit Borat-Ionen Komplexe bilden, wodurch sie eine negative Ladung erhalten und elektrophoretisch wandern können. Das Komplexgewicht wird durch pH-Wert und Boratkonzentration bestimmt.

2. Metallkomplexierung

Die Trennung von Metall-Ionen kann durch Zusatz von Chelatbildnern, z.B. Zitronensäure, Milchsäure und α -Hydroxyisobuttersäure oder Kronenether optimiert werden.

3. Einschlusskomplexierung

Zusätze von Cyclodextrinen oder Kronenethern ermöglichen eine sehr selektive Komplexierung und werden häufig zur Trennung von optischen Isomeren eingesetzt. Cyclodextrine sind cyclische Oligosaccharide mit 6, 7 oder 8 Glucoseeinheiten, die im Inneren einen hydrophoben Hohlraum bilden, der mit Aromaten oder Alkylgruppen wechselwirken kann. Die Selektivität ergibt sich durch die Ringgröße und zusätzliche Wechselwirkung der zu trennenden Probenkomponenten mit den Hydroxylgruppen der Cyclodextrine, deren Eigenschaften durch Derivatisieren modifiziert werden können. Weitere Möglichkeiten, die Trennung zu optimieren, liegen im Zusatz von Ionenpaarbildnern und vor allem Micellenbildnern; dies wird als eigene Technik, die MECK, in **Kapitel 5.4.2** abgehandelt.

Andere Pufferzusätze können Polymere sein, die entweder die Kapillarwand dynamisch belegen oder als Siebmedium wirken, organische Lösungsmittel, die einerseits die Löslichkeit verbessern, andererseits den EOF, die pK-Werte und Mobilitäten der Analyte beeinflussen, und Harnstoff, um die Solubilisierung von Proteinen zu verbessern.

Organische Lösungsmittel

Der Zusatz von mit Wasser mischbaren organischen Lösungsmitteln wie Methanol, Ethanol, Acetonitril, Aceton etc. erhöht die Löslichkeit von hydrophoben Substanzen im Puffer erheblich [237, 238]. Dadurch werden die Einsatzmöglichkeiten der CE deutlich vergrößert. Bedingt durch den Lösungsmittelanteil sind die Trennpuffer allerdings erheblich anfälliger gegenüber einer Temperaturerhöhung. Bei hohen Spannungen kann es zum Verdampfen des leichtflüchtigen organischen Pufferbestandteils und damit zur Blasenbildung in der Kapillare kommen, wodurch die angelegte Spannung zusammenbricht. Der Einsatz von organischen Lösungsmitteln erfordert deshalb eine Kapillarkühlung, die man am effektivsten durch Flüssigkühlung erreicht, bei der die Trennkapillare in eine Kühlflüssigkeit eingebettet wird. Durch den organischen Lösungsmittelanteil verändert sich darüber hinaus sowohl die Viskosität und Selektivität des Trennelektrolyten als auch das ζ -Potential an der Kapillarwand. Untersuchungen zeigen, dass es nicht immer eine erklärbare Korrelation

zwischen der Konzentration des Lösungsmittels, der Migrationszeit und der Auflösung gibt [239].

Tenside

Adsorptionseffekte, die an der Wand der fused-silica Kapillare auftreten können, führen zu einer unerwünschten Verbreiterung der Analytzone [236, 244, 240]. Durch Wechselwirkung der Analyten mit den Silanolgruppen der Kapillarwand ist ferner eine Verringerung des ζ -Potentials und damit eine unreproduzierbare Änderung des elektroosmotischen Flusses möglich. Diese störenden Beiträge entstehen durch die nicht ausreichende Inertheit der Kapillarwand gegenüber Probenbestandteilen. Aus der Flüssigkeitschromatographie ist die starke Adsorption von vielen Komponenten an Silica-Oberflächen seit langem bekannt [241]. Um diese unerwünschte Adsorption in der CE zu unterdrücken, kann die Kapillarwand durch Versetzen des Puffers mit kationischen oder neutralen Tensiden dynamisch belegt werden. Dadurch wird die mögliche Adsorption der Probenkomponenten stark reduziert und eine Bandenverbreiterung vermieden. Die hohe Tensidkonzentration führt darüber hinaus zu einer reproduzierbaren Veränderung des elektroosmotischen Flusses und damit zu konstanten Migrationszeiten. Exemplarisch ist die dynamische Beschichtung am Beispiel eines kationischen Tensides in **Abbildung 9-4** dargestellt:

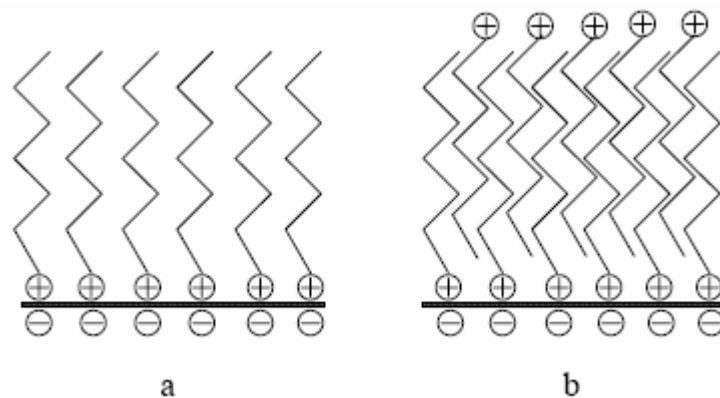


Abbildung 9-4: Adsorption von kationischen Tensiden an der Kapillarwand

Abbildung 9-4 (a) zeigt eine einfache Belegung der Kapillarwand mit dem Tensid, durch die der EOF reduziert wird. Bei größeren Tensidmengen entsteht, wie in **Abbildung 9-4 (b)** dargestellt, eine Tensiddoppelschicht, die zu einer EOF-Umkehr führt und kationische Probenkomponenten durch Coulombsche Abstoßung an einer Wandadsorption hindert. Ein Nachteil der dynamischen Belegung durch geladene Tensidmoleküle liegt in der Erhöhung der Pufferleitfähigkeit durch die Mobilitäten der Tensidgegenionen. Zur Begrenzung der

Jouleschen Wärme muss entweder die Feldstärke niedrig gehalten oder der Kapillarradius reduziert werden.

Verschiedene Tenside wurden in der vorliegende Arbeit benutzt, um eine EOF-Umkehr zu provozieren und eine schnellere Trennung zu erreichen, wie z. B. das HTAB.

9.4 Trennungsoptimierung

Für die Trennungen wurde die Spannung von -5 bis -20 kV variiert. Die nicht-absorbierenden Spezies wurden indirekt durch Veränderungen in der Absorption des Puffers detektiert.

Wie im **Kapitel 7** gezeigt, liegen Sb(III) und Sb(V) über einen weiten pH-Bereich als einfach oder mehrfach geladene Anionen in der Lösung vor, sodass prinzipiell eine Trennung der Spezies mittels Elektrophorese möglich ist. Zur Optimierung dieser Trennung wurden verschiedenen Puffer und pH-Werte untersucht [242, 243].

Die Wahl des als Elektrolytlösung verwendeten Puffersystems hat den größten Einfluss auf die Trennleistung und sollte deshalb sehr sorgfältig vorgenommen werden. Folgende Forderungen muss ein Puffersystem in der Kapillarzonenelektrophorese erfüllen [244]:

- Selektivität für die zu trennenden Ionen
- Stabilität des Puffers, stabiler pH-Wert durch hohe Pufferkapazität
- höhere UV-Absorption bei der Detektionswellenlänge
- geringe Mobilität des Gegenions
- Anpassung der Mobilität zwischen Analyt- und Pufferionen

Die mangelnde Empfindlichkeit bei der direkten Detektion von Substanzen (wie der Antimonspezies) mit kleinem molarem Extinktionskoeffizient kann durch Anwendung der indirekten UV-Detektion ausgeschaltet werden.

Die Kapillare wird dazu (wie im **Kapitel 5** beschrieben) mit einem Hintergrund-elektrolyten mit hoher UV-Absorption gefüllt, woraus ein Signal mit einer großen Grundabsorption resultiert. Gelangt eine Zone mit UV-inaktiven Analyten an den Detektor, wird die hohe Grundabsorption des Elektrolyten wegen seiner Verdrängung durch die Probenkomponenten geschwächt. Wenn die Probezone den Bereich des Detektors verlassen hat, geht die

Absorption wieder auf ihren ursprünglichen hohen Wert zurück. Es entsteht somit ein Signal mit negativem Vorzeichen.

9.4.1 Trennung der Antimonpezies mit Phthalsäure als Puffer

Phthalsäure ist eine zweibasige Säure, sodass der pH-Wert eine wichtige Rolle bei der Entwicklung der Methode spielt. Da die Phthalsäure pK_S-Werte von 2,9 und 5,4 besitzt, liegt sie im pH-Gebiet von 3 bis 5,4 vorwiegend als einfach geladenes Anion vor und ab pH 5,4 als zweifach geladenes Anion. Sie kann deswegen als Puffersystem im pH-Bereich zwischen 3-6 verwendet werden. Außerdem erzeugt Phthalsäure ein Signal mit einer großen Grundabsorption.

Die Optimierung der Methode erfolgte in bezug auf die elektrophoretische Auflösung und die Analysendauer unter Variation der Pufferkonzentration, des pH-Wertes und des Gehaltes an organischem Modifiern. Die verwendete Phthalsäure war zwischen 5 und 10 mmolar, der pH-Wert wurde durch die Zugabe von Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS) variiert.

Um die Kapillaren zu reinigen und zu konditionieren, wurde vor jeder Analyse 2 min mit NaOH (0,1 M), 5 min mit Wasser und 10 min mit Puffer gespült. So wurde die Beschädigung der Kapillare durch Ablagerung von Substanzen an den Kapillarwänden vermieden.

Variation der Konzentration

Die Pufferkonzentration sollte so gewählt werden, dass der pH-Wert durch die einsetzende Elektrolyse annähernd konstant bleibt, der EOF noch groß genug ist, um schnelle Analysenzeiten zu gewährleisten und noch keine Bandenverbreiterung durch thermische Effekte eintritt. Ob eine Dispersion durch thermische Effekte vorliegt, kann dadurch bestimmt werden, dass bei steigenden Feldstärken die resultierenden Stromstärken im Puffer bestimmt und gegen die Spannung aufgetragen werden. Gemäß dem Ohmschen Gesetz besteht ein linearer Zusammenhang zwischen der Spannung und der Stromstärke. In der Kapillare steigt die Leitfähigkeit des Puffers mit der Temperatur an. Wenn die Kühlung nicht mehr ausreicht, um die Joulesche Wärme abzuführen, nimmt der Strom überproportional mit der angelegten Spannung zu und der Gültigkeitsbereich des Ohmschen Gesetzes wird verlassen. Solange mit Pufferkonzentrationen und Spannungen gearbeitet wird, die in dessen Gültigkeitsbereich liegen, kann die Bandenverbreiterung durch thermische Effekte vernachlässigt werden. Wird

der lineare Bereich aber verlassen, muss entweder die Pufferkonzentration, die Spannung oder der Kapillarinne Durchmesser verringert werden.

Effizienzverluste treten ebenfalls auf, wenn große Unterschiede in der Leitfähigkeit zwischen Analyt und Puffer bestehen. Diese lokalen Störungen des elektrischen Feldes führen zu einer Verzerrung der Zonen und damit zu frontenden ($\lambda_S > \lambda_B$) oder tailenden ($\lambda_S < \lambda_B$) Peaks (mit λ_S als Leitfähigkeit des Analyten und λ_B als Leitfähigkeit des Puffers). Nur wenn die Leitfähigkeit in der Analytzone mit der des Puffers identisch ist, werden relativ symmetrische Signale erhalten.

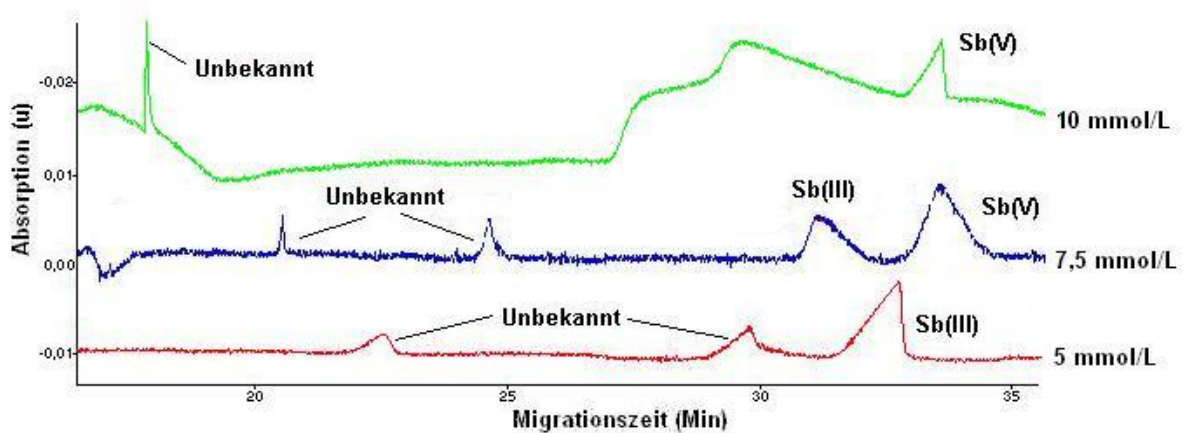


Abbildung 9-5: Elektropherogramme Sb-Standardlösung mit ca. 27 mg/L Sb(V) und ca. 33 mg/L Sb(III), Pufferkonzentration: 5-10 mmol/L, pH-Wert: 3,5, Detektion: indirekte UV, mit Peakumkehr

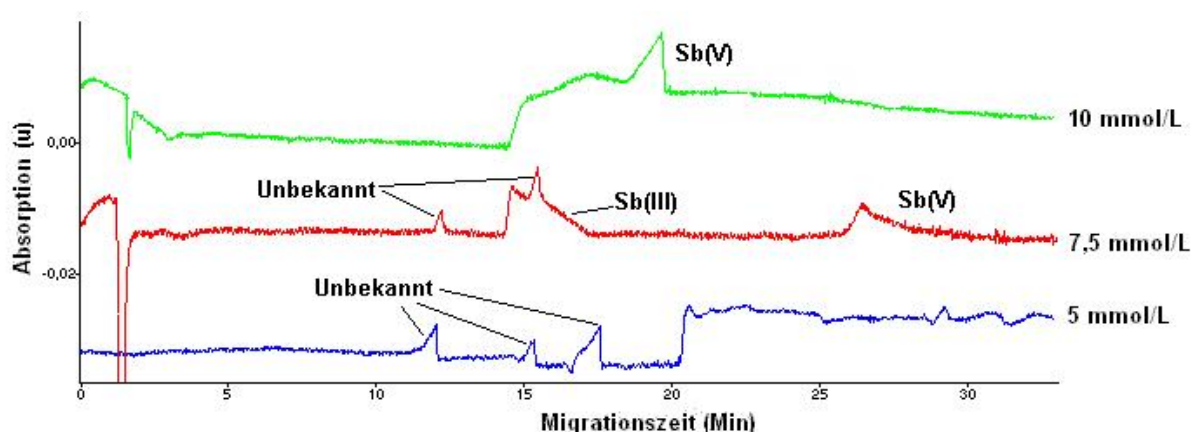


Abbildung 9-6: Elektropherogramme Sb-Standardlösung mit ca. 27 mg/L Sb(V) und ca. 33 mg/L Sb(III), Pufferkonzentration: 5-10 mmol/L, pH-Wert: 5,0, Detektion: indirekte UV, mit Peakumkehr

In **Abbildung 9-5** und **Abbildung 9-6** sind die Elektropherogramme dargestellt, die sich bei der Messung der Standards mit 5, 7,5 und 10 mmol/L bei pH 3,5 und 5,0 ergeben. Nur bei der Trennung der Antimonspezies mit 7,5 mmol/L Phthalsäure als Puffer war eine Identifizierung des Sb(III) und Sb(V) durch einzelne Injektion der Spezies bzw. Standardaddition möglich. Die Untersuchungen des Puffers mit einer Konzentration von 5 mmol/L waren nicht erfolgreich, da für Sb(V) weder bei der einzelnen Injektion noch bei der Standardaddition kein Signal erhalten wurde. Außerdem war nur bei pH-Wert 3,5 eine Identifizierung des Sb(III) möglich. Bei einer Konzentration des Puffers von 10 mmol/L war nur eine eindeutige Identifizierung des Sb(V) möglich. Der Sb(III)-Peak war sehr breit, sodass keine Basislinientrennung erreicht werden konnte.

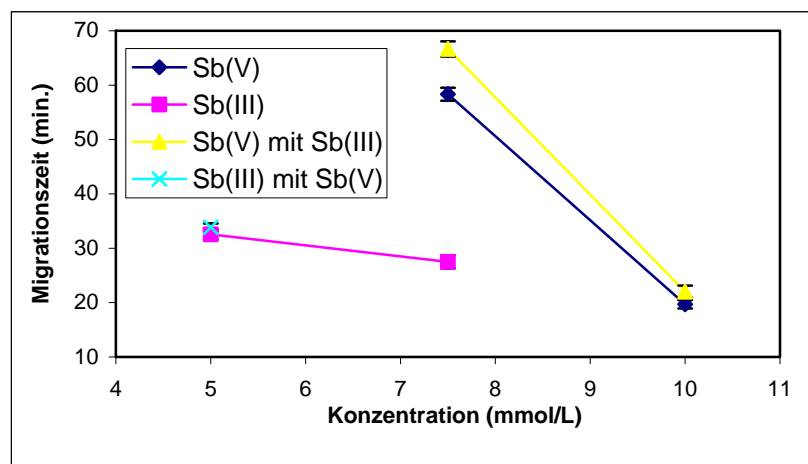


Abbildung 9-7: Migrationszeiten von Sb(III) und Sb(V) in Abhängigkeit von der Konzentration bei pH 3,5

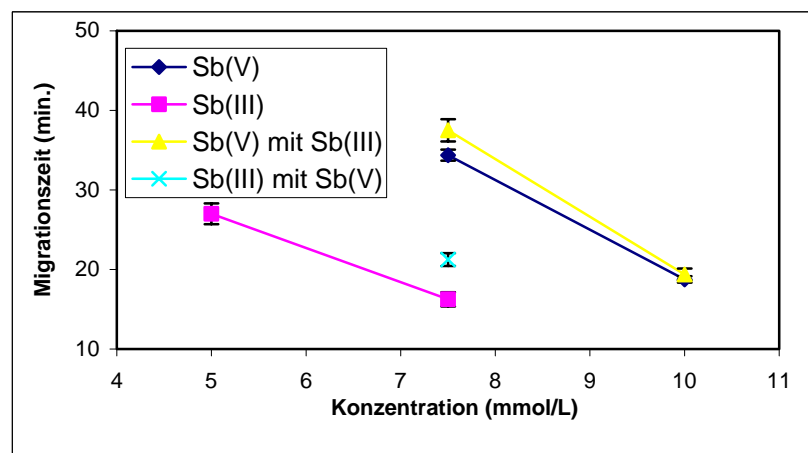


Abbildung 9-8: Migrationszeiten von Sb(III) und Sb(III) in Abhängigkeit von der Konzentration bei pH 5,0

Aus **Abbildung 9-7** und der **Abbildung 9-8** kann man schließen, dass im allgemeinen durch die Erhöhung der Pufferkonzentration die Migrationszeiten von beiden Spezies abnehmen.

Als optimale Pufferkonzentration wurde 7,5 mmol/L ausgewählt. Im folgenden wird auf der Einfluss des pH-Wertes untersucht. Die Konzentration des Puffers blieb bei 7,5 mmol/L konstant und der pH-Wert wurde durch Zugabe von TRIS variiert.

Variation des pH-Wertes

Der Einfluss des pH-Wertes beim Transport der Analyten zum Detektor kann auf zwei Ursachen zurückgeführt werden. Bei schwachen Säuren und Basen bewirkt die Variation des pH-Wertes die größten Mobilitätsänderungen, da der Dissoziationsgrad die effektive Mobilität bestimmt. Die elektrophoretische Migration ist meistens durch den elektro-osmotischen Fluss überlagert, dessen Größe unter anderem durch die Dissoziation der Silanolgruppen der Kapillarwand beeinflusst wird. Durch pH-Änderungen wird aber neben der elektrophoretischen Mobilität auch die elektroosmotische Mobilität verändert, da das ξ -Potential pH-abhängig ist. Wie gezeigt nimmt der EOF mit dem pH-Wert zu. Ein höherer EOF führt zu kürzeren Analysenzeiten (im kathodischen Modus), aber auch zu einer geringeren Auflösung für Kationen und für Anionen.

Darüber hinaus ist die Beweglichkeit der Analytmoleküle von ihrem Dissoziationsgrad im Elektrolyten und damit von seinem pH-Wert abhängig. Deshalb kann durch die Veränderung des pH-Wertes und der Art des Puffers die Trennung optimiert werden. Erst bei pH-Werten unter 2 und über 12 [244] übernehmen überwiegend die Protonen bzw. Hydroxidionen den Stromtransport. Durch die extrem hohe Mobilität dieser Ionen wird eine große Stromstärke und dadurch auch eine hohe Joulesche Wärme erzeugt, die sich nachteilig auf die Trenneffizienz auswirkt. Dieser pH-Bereich sollte daher nicht verwendet werden.

Die resultierenden Elektropherogramme und die Unterschiede in Abhängigkeit von der pH-Wert-Änderung des Eluenten sind in **Abbildung 9-9** bis **Abbildung 9-16** dargestellt. Die ersten drei Abbildungen sind mit indirekter Detektion aufgenommen, d. h. die Analytpeaks erscheinen negativ wie bereits (in **Kapitel 5.3**) erläutert wurde. Die übrigen Messungen wurden auch mit indirekter Detektion durchgeführt, aber mit Peakumkehr, sodass die negativen Peaks positiv dargestellt werden, um die Betrachtung der Abbildungen bzw. die Auswertung der Peaks zu vereinfachen.

Die Migrationszeiten sind auch höher bei der Optimierung der Konzentration als bei der Optimierung des pH-Wertes, weil bei der Optimierung des pH-Wertes die Messungen mit zusätzlichen Additiven im Puffer durchgeführt werden. Die Tenside provozieren eine Umkehr des EOFs, d. h. beide Analyten werden schneller. Diese Effekte werden im nächsten Punkt ausführlicher erläutert.

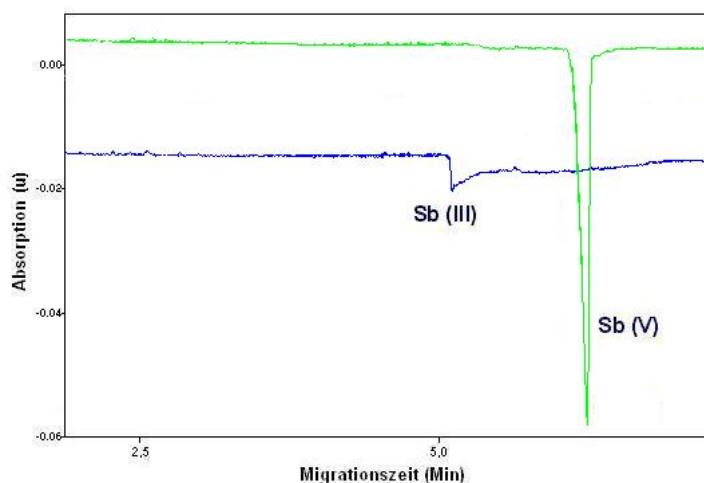


Abbildung 9-9: Elektropherogramme von Sb(III) und Sb(V) (jeweils ca. 50 mg/L), Puffer: 10 mmol/L Phthalsäure, pH-Wert: 3,0, Detektion: indirekte UV, 214 nm

Die Peaks von Sb(III) und Sb(V) wurden nach einzelner Injektion bzw. Standardaddition identifiziert. Außerdem erkennt man, dass bei der einzelnen Injektion treten keine weiteren Spezies auf. Wenn jedoch beide Spezies injiziert werden, sind weitere Peaks zu erkennen (siehe **Abbildung 9-9** und **Abbildung 9-10**). Eine mögliche chemische Reaktion der beiden Spezies miteinander innerhalb der Kapillare muss deshalb in Betracht gezogen werden.

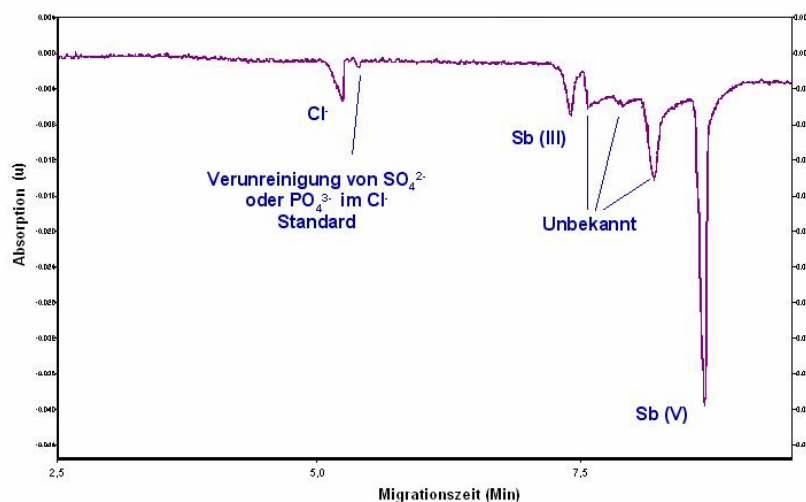


Abbildung 9-10: Elektropherogramm von Chlorid, Sb(III) und Sb(V) (jeweils ca. 50 mg/L), Puffer: 10 mmol/L Phthalsäure, pH-Wert: 3,0, Detektion: indirekt, 214 nm

Zur Prüfung wurde Chlorid zwischen die beide Antimonspezies injiziert, danach traten jedoch nur zwei Spezies zwischen das Sb(III) und das Sb(V) auf. Sb(III) ist hier schneller als Sb(V). Wenn zwischen den beiden Spezies das Chlorid injiziert wird, sollten Sb(III) und Sb(V) sich nicht berühren und damit nicht reagieren können. Es sollten sich getrennte, genau zuzuordnende Signale für Sb(III), Sb(V) und Chlorid ergeben, was hier nicht der Fall ist. Die Migrationszeiten waren nicht reproduzierbar (siehe **Abbildung 9-11**)

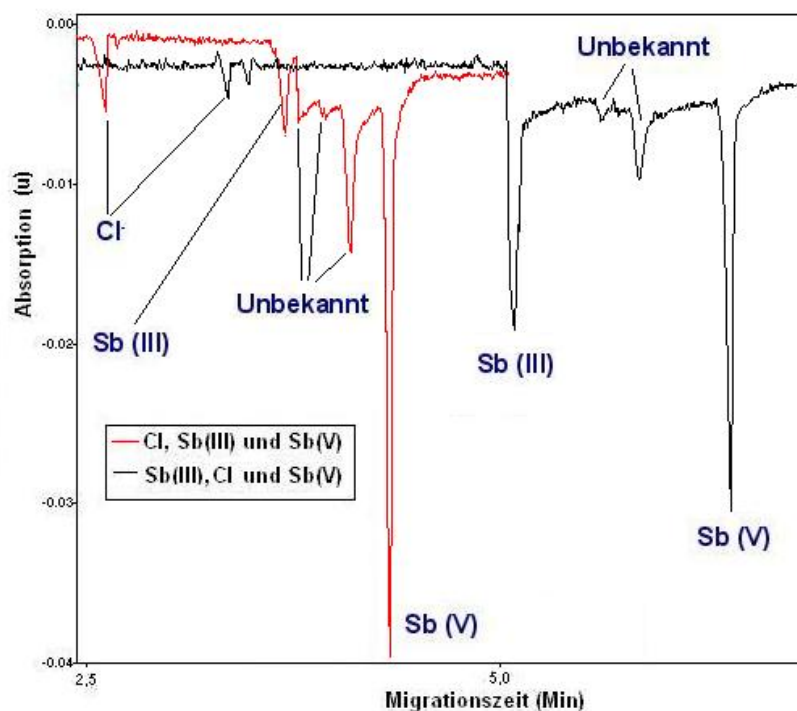


Abbildung 9-11: Elektropherogramme von Chlorid, Sb(III) und Sb(V) (jeweils ca. 50 mg/L), Puffer: 10 mmol/L Phthalsäure, pH-Wert: 3,0, Detektion: indirekt, 214 nm

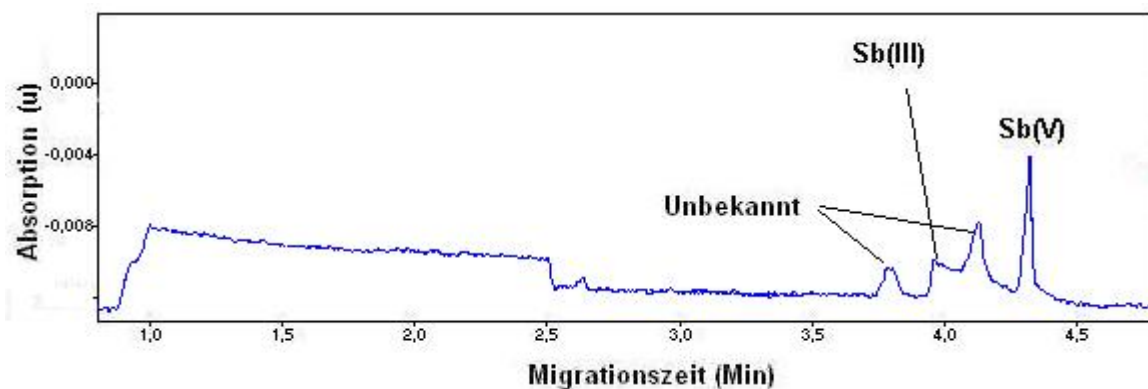


Abbildung 9-12: Elektropherogramm einer Sb-Standardlösung (ca. 27 mg/L Sb(V) und ca. 33 mg/L Sb(III)), Pufferkonzentration: 7,5 mmol/L, pH-Wert: 3,5, Modifizier: 0,2 mmol/L HTAB, Detektion: indirekte UV, mit Peakumkehr

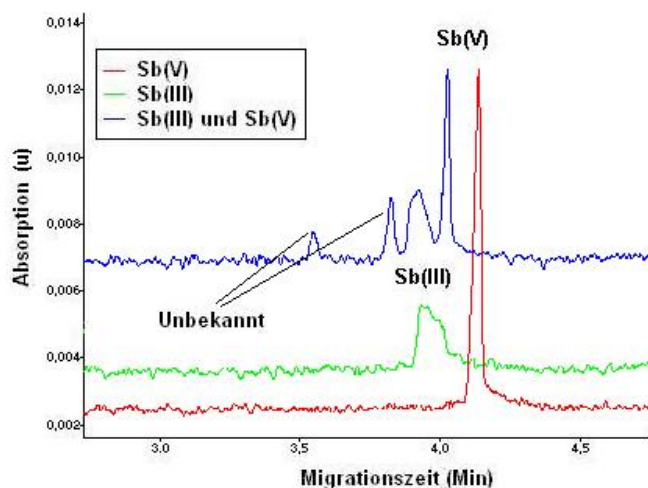


Abbildung 9-13: Elektropherogramme einer Sb-Standardlösung mit ca. 27 mg/L Sb(V) und ca. 33 mg/L, Pufferkonzentration: 7,5 mmol/L, Puffer-pH-Wert: 3,75, Modifier: 0,2 mmol/L HTAB, Detektion: indirekte UV, mit Peakumkehr

Ab **Abbildung 9-12** wurden die Messungen mit indirekter Detektion durchgeführt und Peakumkehr dargestellt, d. h. die negativen Analytpeaks erscheinen positiv. Somit können die Elektropherogramme besser interpretiert werden. Hier wurden bei höhere pH-Werten ähnliche Ergebnisse erhalten, d. h. bei der Injektion beider Spezies traten zusätzliche Peaks auf. Wie in der **Abbildung 9-12** zu erkennen ist, gibt es zwei nicht identifizierte Peaks, von denen einer vor dem Sb(III) und der andere zwischen dem Sb(III)- und Sb(V)-Peak erscheinen. In der **Abbildung 9-13**, bei pH-Wert 3,75 treten erneut zwei die unbekannt Peaks vor den beiden Spezies auf.

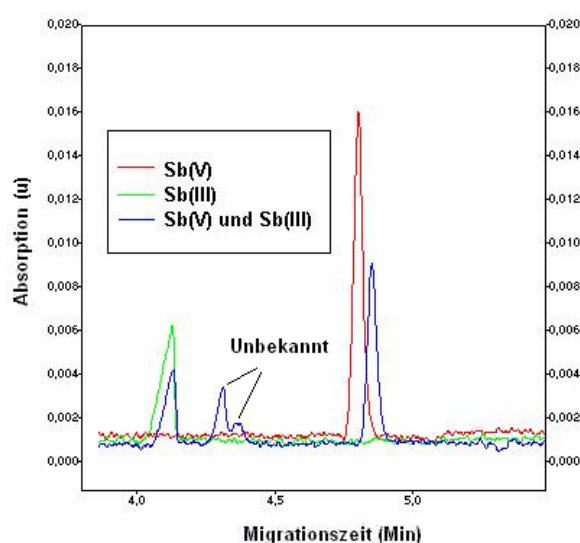


Abbildung 9-14: Elektropherogramme einer Sb-Standardlösung mit ca. 27 mg/L Sb(V) und ca. 33 mg/L Sb(III), Pufferkonzentration: 7,5 mmol/L, pH-Wert: 4,25, Modifier: 0,2 mmol/L HTAB, Detektion: indirekte UV, mit Peakumkehr



Abbildung 9-15: Elektropherogramme einer Sb-Standardlösung mit ca. 27 mg/L Sb(V) und ca. 33 mg/L Sb(III), Pufferkonzentration: 7,5 mmol/L, pH-Wert: 5,5, Modifizier: 0,2 mmol/L HTAB, Detektion: indirekte UV, mit Peakumkehr

Bei einem pH-Wert von 4,25 (**Abbildung 9-14**) treten wieder zwei Peaks zwischen Sb(III) und Sb(V) auf. Bei einem pH-Wert von 5,5 (**Abbildung 9-15**) tritt nur ein Peak zwischen Sb(III) und Sb(V) auf. Außerdem ist ein positiver Peak bei 7 Minuten zu erkennen, der als Systempeak des Phthalsäure-Puffers identifiziert wurde. Dieser Peak und der des Sb(V)-Peak sind sehr dicht beieinander, zwischen beiden gibt es keine Basislinientrennung, d. h. bei diesem pH-Wert ist somit keine gute Peakauswertung möglich.

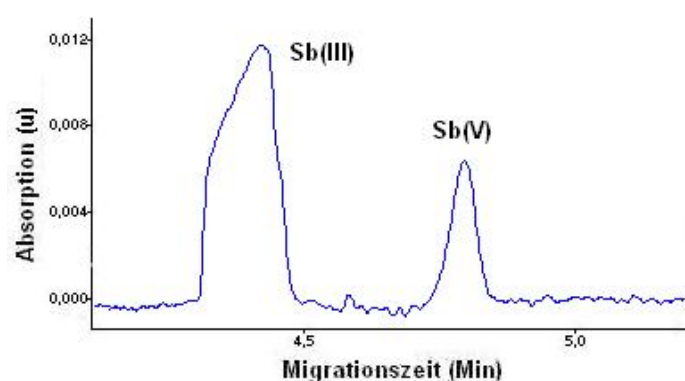


Abbildung 9-16: Elektropherogramme von Sb-Standardlösungen mit ca. 27 mg/L Sb(V) und ca. 33 mg/L Sb(III), Pufferkonzentration: 7,5 mmol/L, pH-Wert: 4,0, Modifizier: 0,2 mmol/L HTAB, Detektion: indirekte UV, mit Peakumkehr

Der optimale pH-Wert ist 4,0, wie die **Abbildung 9-16** zeigt. Hier treten keine unidentifizierten Spezies auf. Für weitere Untersuchungen wurde daher pH 4,0 ausgewählt. Die Migrationszeiten von Sb(V) und Sb(III) bleiben bei allen Messungen nahezu unverändert (für Sb(III) ca. 4,6 Min. und für Sb(V) ca. 4,9 Min) .

Eine Erhöhung des pH-Wertes führte zu einer Verlängerung der Migrationszeiten (siehe **Abbildung 9-16**). Bei pH 4 war die Reproduzierbarkeit zufriedenstellend, die Standardabweichung der Migrationszeiten bei 6 Wiederholmessungen σ betrug 0,04. Andere pH-Werte des Puffers führten zu einer deutlichen Verschlechterung der Trennleistung und fanden deshalb keine Berücksichtigung (siehe die oben erläuterten Probleme mit den auftretenden, unidentifizierten Spezies).

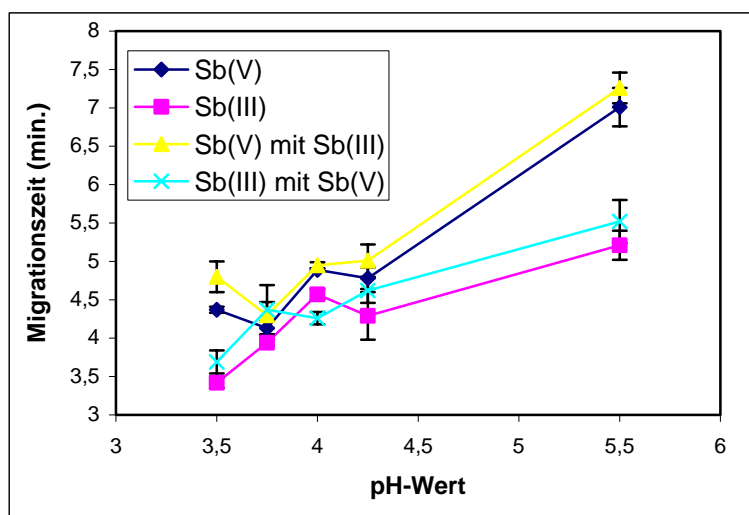


Abbildung 9-17: Migrationszeiten von Sb(III) und Sb(V) in Abhängigkeit vom pH-Wert

Im nächsten Optimierungsschritt wurde auf den Einfluss der Kapillarbelegungen untersucht. Als optimale Pufferkonzentration wurde 7,5 mmol/L ausgewählt und zusammen mit dem ausgewählten pH-Wert des Puffers (4,0) wurde das Verfahren weiter entwickelt.

Kapillarbelegungen

Die Silanolgruppen der „fused-silica“-Kapillaren können in Kontakt mit einer Elektrolytlösung in Abhängigkeit vom pH-Wert dissoziieren. Dadurch entsteht eine negativ geladene Kapillaroberfläche, wodurch einerseits der EOF resultiert, andererseits aber elektrostatische Wechselwirkungen mit entgegengesetzt geladenen Analytionen auftreten können. Adsorption von Probenkomponenten an die Kapillarwand führt zu zusätzlicher Bandenverbreiterung, Substanzverlust und Änderungen im EOF, wodurch sich die Reproduzierbarkeit drastisch verschlechtern kann.

Es gibt verschiedene Möglichkeiten eine Probenadsorption zu verhindern:

- chemische Modifikation der Silanolgruppen

- dynamisches Belegen der Kapillarwand mit Polymeren
- Zusatz kationischer Detergenzien
- hohe Ionenstärke

Die verschiedenen Methoden sind bei der Unterdrückung von Analyt-Wand-Wechselwirkungen unterschiedlich erfolgreich, wie vor allem bei Proteinen untersucht wurde [240].

Kapillarbelegungen weisen teilweise eine nur begrenzte pH-Langzeitstabilität auf. Einige wichtige Kapillarbelegungen werden bei den entsprechenden Applikationsbeispielen beschrieben.

Dynamisches Belegen wird durch Spülschritte mit einer Polymerlösung vor jeder Trennung oder einfacher durch Zusatz entsprechender Chemikalien zum Pufferelektrolyten erreicht. Durch die Polymerschicht, welche die Kapillarwand belegt, werden die negativen Oberflächenladungen vom Lösungsinnen abgeschirmt. Der EOF wird dadurch verringert, dass die Viskosität in der Doppelschicht durch das Polymer stark zunimmt. Dynamisches Belegen kann sowohl auf unbehandelte „fused-silica“-Kapillaren angewendet werden als auch auf chemisch modifizierte, wodurch der EOF sehr wirksam unterdrückt werden kann.

Der Zusatz kationischer Detergenzien die an die Kapillarwand adsorbieren, bewirkt eine Umkehr der Oberflächenladung und damit des EOF. Positiv geladene Analytionen können dadurch keine ionische Wechselwirkungen mehr mit der nun positiv geladenen Oberfläche eingehen. Die Erhöhung der Ionenstärke bewirkt eine bessere Verdrängung der Analytionen von der negativ geladenen Oberfläche.

Schnelle Trennungen werden mit der Kapillarelektrophorese dann erhalten, wenn die Wanderungsrichtung der Analyten mit der des elektroosmotischen Flusses übereinstimmt. Die elektrophoretische Mobilität von Anionen ist dem zur Kathode gerichteten elektroosmotischen Fluss entgegengesetzt. Zur schnellen Analyse von Anionen kann der EOF durch den Zusatz kationischer Tenside umgekehrt werden. Bei der Verwendung von Phthalsäure als Puffer eignen sich Octadecyltrimethylammoniumchlorid (OTAC), Dodecyltrimethylammoniumbromid (DTAB) und Hexadecyltrimethylammoniumbromid (HTAB) zur Umpolung des EOF.

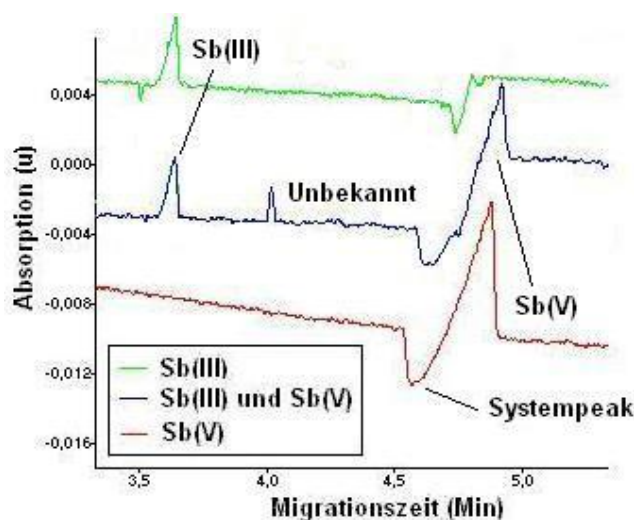


Abbildung 9-18: Elektropherogramme von Sb-Standardlösungen mit ca. 27 mmol/L Sb(V) und ca. 33 mmol/L Sb(III), Pufferkonzentration: 7,5 mmol/L, pH-Wert: 5,0 Modifizier: 0,2 mmol/L OTAC, Detektion: indirekte UV, mit Peakumkehr

In der vorliegenden Arbeit wurden drei verschiedene Substanzen zur Erhöhung der Ionenstärke untersucht, drei Beispiele sind in den **Abbildung 9-18** bis **Abbildung 9-20** dargestellt. OTAC und DTAB sind nicht sehr stabil ab pH-Wert 4, sodass eine häufige Erneuerung der Pufferlösungen notwendig ist. Nach zwei Tage bildet sich in der Lösung ein weißer Niederschlag, weshalb sie als Additiv nicht mehr benutzt werden kann. Mit allen Additiven konnte das Substanzgemisch in nur sieben Minuten aufgetrennt werden, wobei die Mobilität von Sb(V) am geringsten war. Aber wegen der geringen Haltbarkeit der Additive in der Pufferlösung wurde in den folgenden Messungen nur HTAB benutzt.

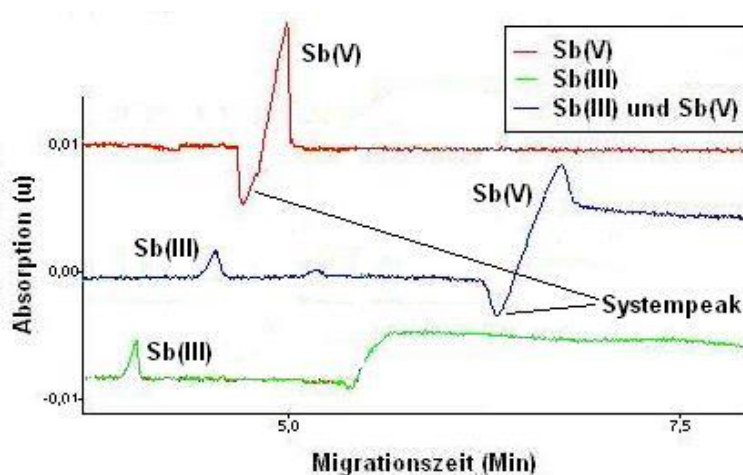


Abbildung 9-19: Elektropherogramme von Sb-Standardlösungen mit ca. 27 mmol/L Sb(V) und ca. 33 mmol/L Sb(III), Pufferkonzentration: 7,5 mmol/L, pH-Wert: 5,0 Modifizier: 0,2 mmol/L DTAB, Detektion: indirekte UV, mit Peakumkehr

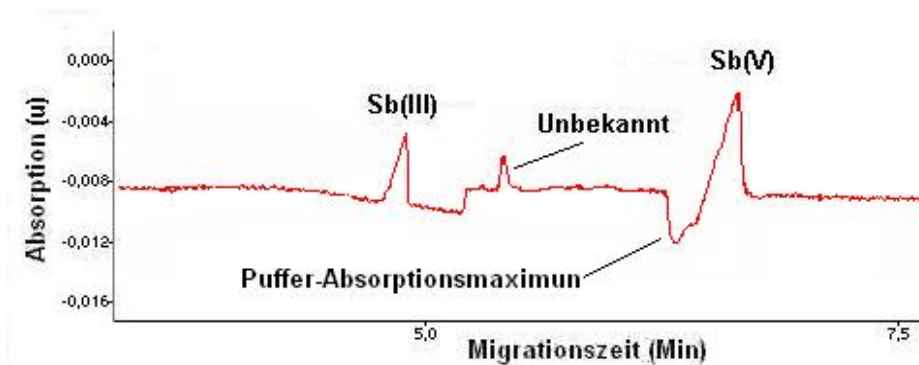


Abbildung 9-20: Elektropherogramme von Sb-Standardlösungen mit ca. 27 mmol/L Sb(V) und ca. 33 mmol/L Sb(III), Pufferkonzentration: 7,5 mmol/L, pH-Wert: 5,0 Modifizier: 0,2 mmol/L HTAB, Detektion: indirekte UV, mit Peakumkehr

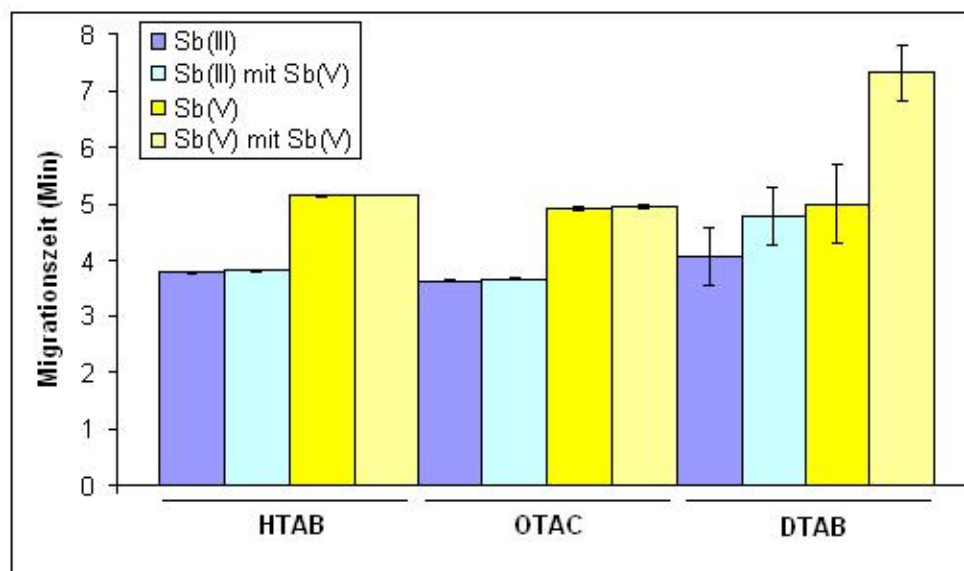


Abbildung 9-21: Migrationszeiten von Sb(III) und Sb(V) in Abhängigkeit von den Tensiden bei pH 5,0

In allen Fällen war die Identifizierung des Sb(V) und des Sb(III) möglich. Allerdings waren die Migrationszeiten der Spezies bei der Benutzung des DTAB nicht reproduzierbar (siehe **Abbildung 9-21**). Bei der Verwendung des OTAC wurde eine schnellere Trennung erreicht, das OTAC konnte aber auf Grund der kurzen Haltbarkeit nicht verwendet werden.

Metallkomplexierung

Der Puffer kann aus unterschiedlichen Gründen mit Additiven versetzt werden (siehe **Kapitel 9.3**, S.181, *Pufferzusätze*). Die Trennung von Metall-Ionen kann beispielsweise durch Zusatz

von Chelatbildnern, z. B. Zitronensäure, Milchsäure und α -Hydroxyisobuttersäure oder Kronenethern optimiert werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein mehrzähliger Ligand als Komplexbildner benutzt, das Ethylendiamintetraacetat (EDTA). Der Grund für diese Entscheidung waren die guten Ergebnisse in der Chromatographie, bei Verwendung des EDTAs als Eluent bzw. Komplexbildner für Antimon (siehe **Kapitel 8.3.5**). Die Ergebnisse dieser Untersuchungen werden in Kürze dargestellt.

Als Standard für die Untersuchungen des Sb(III) wurde das Kaliumantimonyltartrat verwendet. Da deshalb in Lösung freie Tartrationen auftreten können, wurden Standardlösung von Weinsäure unter identischen Bedingungen wie die Sb(III)-Standards gemessen und die Migrationszeit des freien Tartrations bestimmt. Der Tartratkomplex des Sb(III) und das freie Tartrat haben sehr ähnliche Migrationszeiten (**Abbildung 9-22**), sodass bei keinem der untersuchten Bedingungen eine Trennung möglich war. Dies stellt im Prinzip kein Problem für die Messung der Standards und die Kalibrierung dar, weil durch das Komplexeleichgewicht in jedem der Standards eine definierte Menge an Komplex und nicht verbundenem Tartrat vorliegen muss.

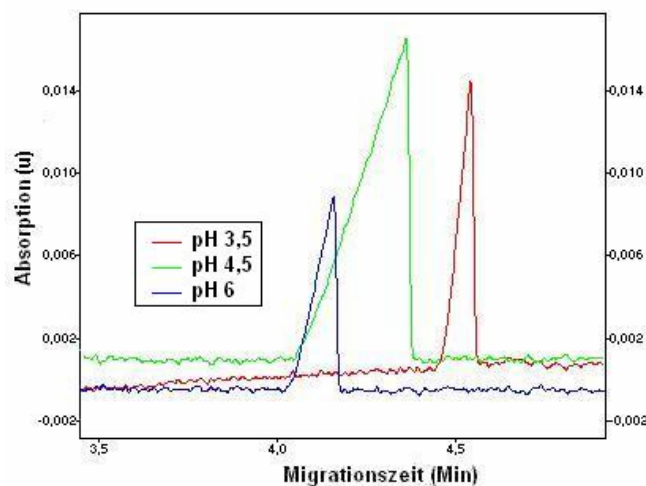


Abbildung 9-22: Elektropherogramme von einer 50 mg/L Weinsäure-Standardlösung, Puffer: 7,5 mM Phthalsäure mit unterschiedlichen pH-Werten mit 0,2 mmol/L HTAB

Probleme treten erst bei den realen Proben, in diesem Fall biologischen Proben, auf, wenn diese Proben keine Weinsäure erhalten. Im Fall der Leishmania-Proben wurden die Amastigoten und die Promastigoten (siehe **Kapitel 6**) mit Hexahydroxyantimonat (Sb(V))

und Kaliumantimonyltartrat (Sb(III)) inkubiert. Bei diesen Proben könnte im Prinzip die oben beschriebene Methode benutzt werden, solange sichergestellt ist, dass das Tartrat ebenso wie das Antimon von den Zellen aufgenommen wird. Hierzu sind weitere Untersuchungen erforderlich.

Wie oben schon genannt, wurde in der vorliegenden Arbeit EDTA als Komplexbildner verwendet. Hintergrund war die Möglichkeit der Trennung des Sb(III)-Tartrat-Komplex durch Umkomplexierung und Bildung eines Sb(III)-EDTA-Komplexes. Dieser Sb(III)-EDTA-Komplex sollte dann eine andere Migrationszeit als der Sb(III)-Tartrat-Komplex besitzen. Diese Methode wäre dann auch für andere Sb(III)-haltige Proben anwendbar insbesondere für solche Proben, die kein Tartrat und somit keinen Sb(III)-Tartrat-Komplex enthalten.

Dazu wurden verschiedene Lösungen mit EDTA und Sb(III) bei variierenden pH-Werten des Puffers bei einer Pufferkonzentration von 7,5 mmol/L untersucht (siehe **Abbildung 9-23**).

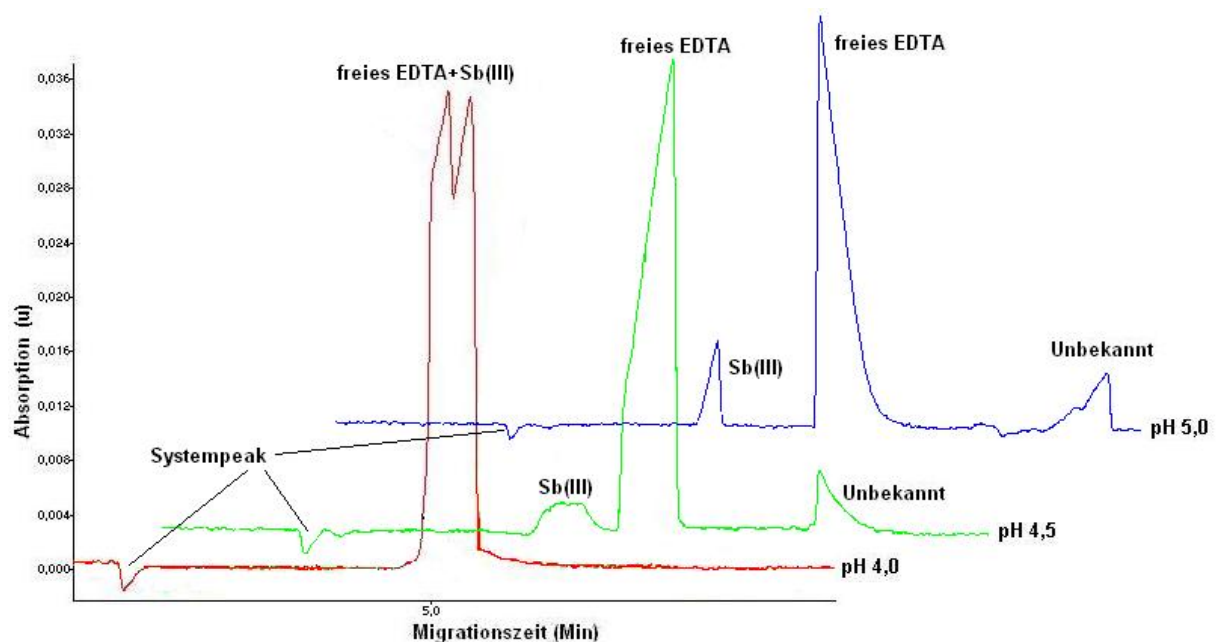


Abbildung 9-23: Elektropherogramme von Standardlösungen mit 50 mg/L EDTA und ca. 30 mmol/L Sb(III), Puffer: 7,5 mmol/L Phthalsäure, Modifier: 0,2 mM HTAB

Beim ausgewählten pH-Wert des Puffers konnte keine Trennung der freien EDTA, des Sb(III)-EDTA-Komplexes und des Sb(III)-Tartrat-Komplexes erreicht werden. Es gelang weder bei der einzelnen Injektion noch bei der Standardaddition. Bei Verwendung der 7,5 mmol/L Phthalsäure pH-Wert 5,0 gelang die Identifizierung der freien EDTA, aber die Migrationszeiten des Sb(III)-EDTA-Komplexes und des Sb(III)-Tartrat-Komplexes waren

gleich, d. h. es wurde keine Trennung erreicht. Außerdem tritt bei diesem pH-Wert das Problem zusätzlicher, unbekannter Spezies bei der gemeinsamen Injektion von Sb(III) und Sb(V) auf. Bei der Injektion der oben genannten Lösungen in einen Puffer mit pH 4,5 konnte auch nur die freie EDTA identifiziert werden, was keine große Hilfe bei der Entwicklung des Verfahrens ist. Zusätzlich treten auch hier zusätzliche unbekanntere Spezies bei der gemeinsamen Injektion der Antimonspezies auf. Bei der Verwendung des Puffers mit pH 4,0 wurde keine Trennung erreicht, die Migrationszeiten des Sb(III)-EDTA-Komplexes, des Sb(III)-Tartrat-Komplexes und des freien EDTA waren zu ähnlich.

In den folgenden Arbeiten wurde daher das EDTA als Komplexbildner nicht weiter verwendet.

Analytische Kenndaten der Trennung mit Phthalsäure

Unter den in der Tabelle aufgeführten Bedingungen wurden bei der Optimierung des Verfahrens die besten Ergebnisse erzielt und eine Trennung der Spezies innerhalb von sieben Minuten erreicht.

Tabelle 9-1: Standard Parameter für den Einsatz von CZE-UV

Parameter	Wert
Detektion [nm]	214 (indirekt)
Kapillarmaterial	Quartz (fused silica) l=50/60 cm, 100 µm
Polarität	umgekehrt
Injektion	hydrodynamisch: 35 mbar, 5 Sek
Spannung [kV]	-5 - (-20)
Trennzeit [Min]	5 - 30
Probenkonzentration [mg/L]	5 - 50
Puffer	Phthalsäure 5 - 10 mmol/L pH-Wert 3 – 6,5 eingestellt mit TRIS
Tenside	HTAB, OTAC, DTAB, TBAB
Modifizier	Acetonitril, Aceton, Methanol

Für die Charakterisierung der elektrophoretischen Trennung und der Qualität der Elektropherogramme gibt es, wie oben beschrieben, eine Reihe von Parametern, die in der vorliegenden Arbeit angewendet wurden.

Alle Messungen, die in der vorliegenden Arbeit vorgestellt werden, wurden mit einer Spannung von -20 kV gemacht. Kleinere Spannungen waren nicht ausreichend für eine Trennung der Antimonspezies. Bei der Nutzung der oben vorgestellten Modifier, wurde keine Verbesserung der Trennung beobachtet; diese wurden daher auch nicht weiter verwendet.

Bei einer Konzentration von 7,5 mM Phthalsäure und einem pH-Wert von 4,0 sowie 0,2 mM HTAB als Zusatz war sowohl eine Identifizierung und Kalibration von Sb(III) als auch Sb(V) möglich. Für die Kalibration wurden die Standardlösungen mit verschiedenen Konzentrationen der Antimonspezies 5 Sek. lang hydrodynamisch bei 35 mbar injiziert.

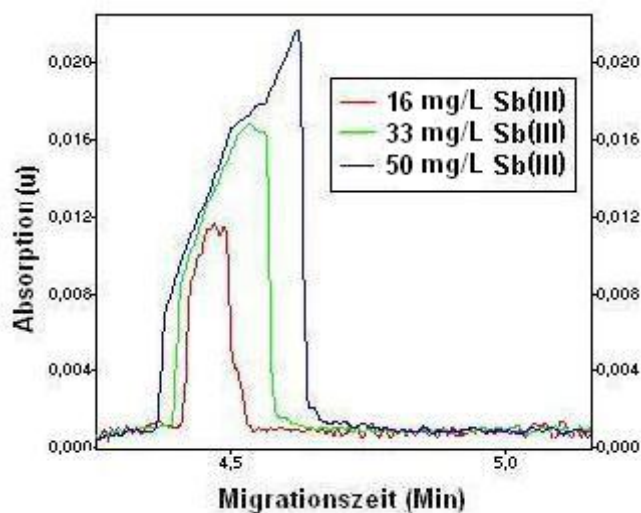


Abbildung 9-24: Elektropherogramme von Standardlösungen von verschiedene Konzentrationen an Sb(III), Puffer: 7,5 mM, pH-Wert 4,0, Modifier: 0,2 mM HTAB, Detektion: indirekte UV, mit Peakumkehr

Die **Abbildung 8-8** bis **Abbildung 9-29** zeigen jeweils ein Standardelektropherogramme mit verschiedenen Konzentrationen an Sb(V) und Sb(III) bei indirekter UV-Detektion sowie die entsprechenden Kalibrierkurven.

Die Veränderung der Peakform mit zunehmender Konzentration des Analyten ist in der oben dargestellten Abbildung und in der folgende Abbildung zu sehen. Neben der zunehmenden Peakverzerrung lässt sich feststellen, dass die Peakhöhen keine exakte Funktion der

Konzentration darstellen. Bei der Veränderung der Konzentration der Probe kommt es außerdem zu einer leichten Verschiebung des Peakmaximums, wodurch die Reproduzierbarkeit der Migrationszeiten beeinflusst wird. Bei der quantitativen Auswertung mit Hilfe der Peakhöhen wird oft kein linearer Zusammenhang zwischen Signal und Gehalt in der Probe festgestellt. In diesen Fällen muss die quantitative Auswertung anhand der Peakflächen erfolgen (siehe die oben genannten Abbildungen). Im Spurenbereich macht sich die Elektrodispersion nur geringfügig bemerkbar, so dass gaußförmige Peaks erhalten werden. Hier ist die Auswertung der Peakhöhen von Vorteil, da bei sehr kleinen Gehalten die Integration der Flächen oft fehlerhaft ist. Der so erhaltene lineare Bereich ist jedoch häufig sehr gering. Erfolgt die Aufnahme einer Kalibrierkurve über einen größeren Konzentrationsbereich, muss die Auswertung ausschließlich anhand der Peakfläche erfolgen. Grund hierfür ist die Tatsache, dass nur für gaußförmige Peaks die Peakhöhe proportional der Probenkonzentration ist, während für andere Peakformen die Peakfläche bestimmt werden muss [245].

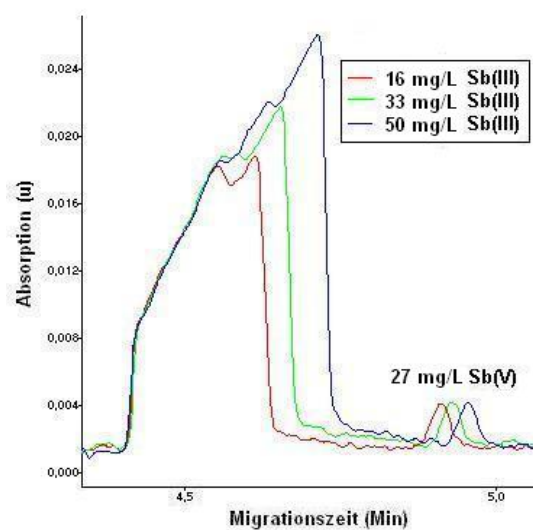


Abbildung 9-25: Elektropherogramme von Standardlösungen mit verschiedenen Konzentrationen von Sb(III) mit 27 mg/L Sb(V), Puffer: 7,5 mM, pH-Wert 4,0 Modifier: 0,2 mM HTAB, Detektion: indirekte UV, mit Peakumkehr

Der lineare Bereich ist bei einer Auswertung über die Peakhöhen extrem klein. Dieses Problem löst sich bei der Auswertung über die Peakflächen. Die Standardabweichungen lagen für ein Standardgemisch mit einer Konzentration von 13,5 mg/L Sb(V) bei 5,5 % und bei einer Konzentration von 16,6 mg/L Sb(III) bei 6,5 %, jeweils ermittelt bei 6 Messungen.

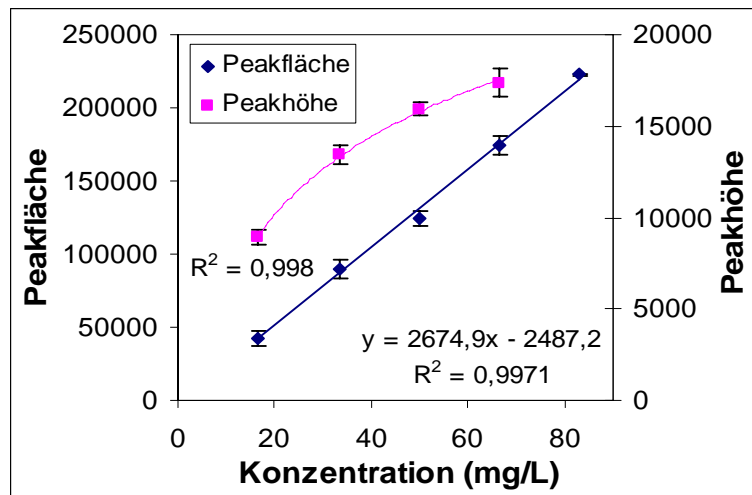


Abbildung 9-26: Kalibrierkurven einer Standardlösung an Sb(III) mit 27 mg/L Sb(V) unter Verwendung der Peakhöhen oder Peakflächen

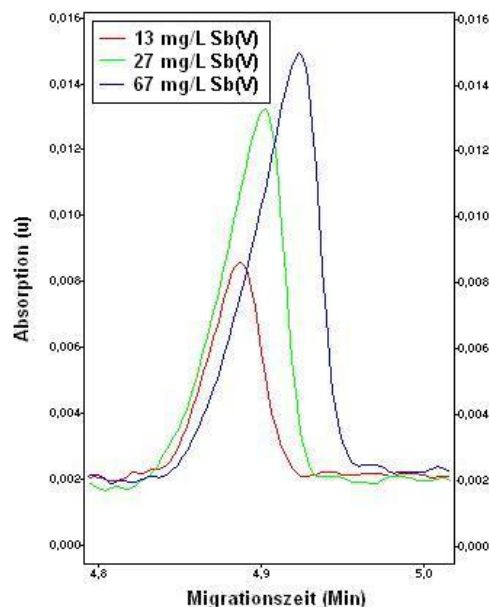


Abbildung 9-27: Elektropherogramme von Standardlösungen mit verschiedenen Konzentrationen an Sb(V), Puffer: 7,5 mM, pH-Wert 4, Modifier: 0,2 mmol/L HTAB, Detektion: indirekte UV, mit Peakumkehr

Aufgrund der unterschiedlich starken Überladungseffekte ist der lineare Bereich der Kalibration für die verschiedenen Ionen verschiedenen groß und dort am kleinsten, wo die größten Mobilitätsdifferenzen zwischen Probemolekül und Pufferion auftreten. Der Unterschied beträgt eine Größenordnung, wie nach **Abbildung 9-26** und **Abbildung 9-29** zu folgern ist.

Da die zunehmende Peakbreite keinen Einfluss auf die Peakflächenauswertung hat, kann die Quantifizierung zuverlässig nach einer Integration der Peaks über die Peakflächen erfolgen.

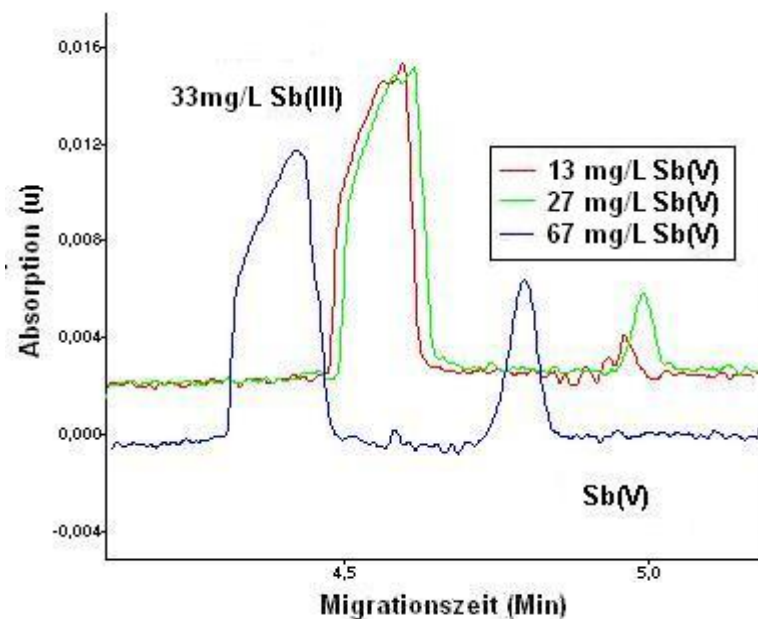


Abbildung 9-28: Elektropherogramme von Standardlösungen mit verschiedenen Konzentrationen an Sb(V) mit 33 mg/L Sb(III), Puffer: 7,5 mM, pH-Wert 4,0, Modifizier: 0,2 mmol/L HTAB, Detektion: indirekte UV, mit Peakumkehr

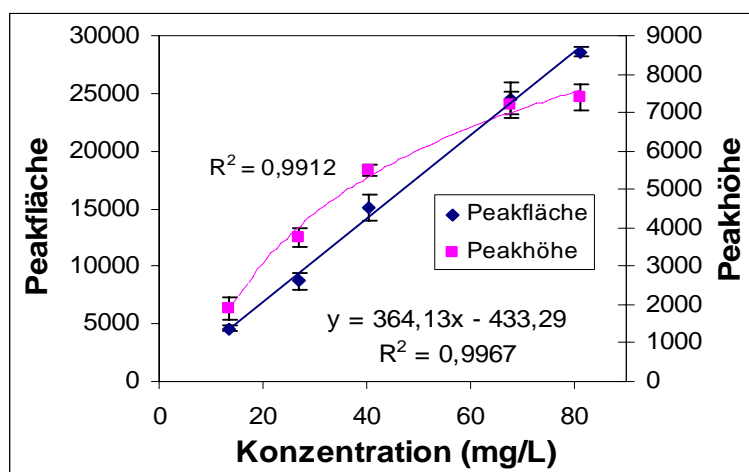


Abbildung 9-29: Kalibrierkurven von Standardlösungen an Sb(V) mit 33 mg/L Sb(III) unter Verwendung der Peakhöhen oder Peakflächen

Die hydrodynamische Injektion wurde für alle Trennungen verwendet. Unter den hier gewählten Injektionsbedingungen konnten Nachweisgrenzen von 1,33 mg/L für Sb(III) und 3,41 mg/L für Sb(V) erreicht werden. In der **Tabelle 9-2** werden die analytischen Parameter bei der indirekten-UV-Detektion für die Bestimmung von Sb(III) und Sb(V)

zusammengefasst. Der lineare Bereich ist für die in der Kalibration verwendeten Konzentrationen ausreichend (für eine Größenordnung). Bei noch höheren Konzentrationen nahm die Peakbreite der beiden Spezies stark zu und die Auftrennung der Peaks wurde erschwert.

Tabelle 9-2: Analytische Kenndaten der Trennungen im Phthalsäure-Puffer als Mittelwert aus jeweils 6 Wiederholmessungen

Spezies	Parameter	Einzelinjekt. ^a	Gemischte Injektion ^b
Sb(V)	Migrationszeit (Min)	4,89	4,95
	Nachweisgrenze (mg/L)	2,27	3,41
	Standardabweichung (%)	4,68	5,96
Sb(III)	Migrationszeit (Min)	4,57	4,58
	Nachweisgrenze (mg/L)	0,42	1,33
	Standardabweichung (%)	6,57	9,61

^a bei Injektion der einzelnen Standards, ^b bei Injektion der beiden Standards gemeinsam

Für die Quantifizierung ist neben der Reproduzierbarkeit der Migrationszeiten auch die Reproduzierbarkeit des Flächensignals wichtig. Die Messwerte in den gezeigten Kalibrationskurven wurden deshalb durch sechsfache Injektion der Standards mit Konzentrationen von 15 bis 85 mg/L erzeugt.

Bei der HPLC bzw. IC wird der Eluent durch einen konstanten Fluss, der mit Hilfe einer Pumpe gefördert wird, transportiert. Nach Elution von der Säule ist die Geschwindigkeit aller Analyten identisch. Bei der on-column-Detektion in der Kapillarelektrophorese passieren die Proben, aufgrund der unterschiedlichen elektrophoretischen Mobilitäten, den Detektor mit verschiedenen Geschwindigkeiten. Deshalb erhält man für Analyten mit gleichen molaren Extinktionskoeffizienten aber unterschiedlichen Mobilitäten unterschiedliche Peakflächen. Durch eine Normierung der Peakflächen auf die jeweilige Migrationszeit, kann der Einfluss der unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeiten eliminiert werden.

Eine wichtige Voraussetzung für die Identifizierung von Substanzen in der CE ist die Reproduzierbarkeit der Migrationszeiten, für die quantitative Analyse. Darüber hinaus ist eine Reproduzierbarkeit des Signals (Form und Peakfläche) nötig. Mit dem oben beschriebenen

Puffer wurde die Reproduzierbarkeit des Systems durch 6 aufeinander-folgende Trennungen bestimmt (siehe **Abbildung 9-30** und **Abbildung 9-31**).

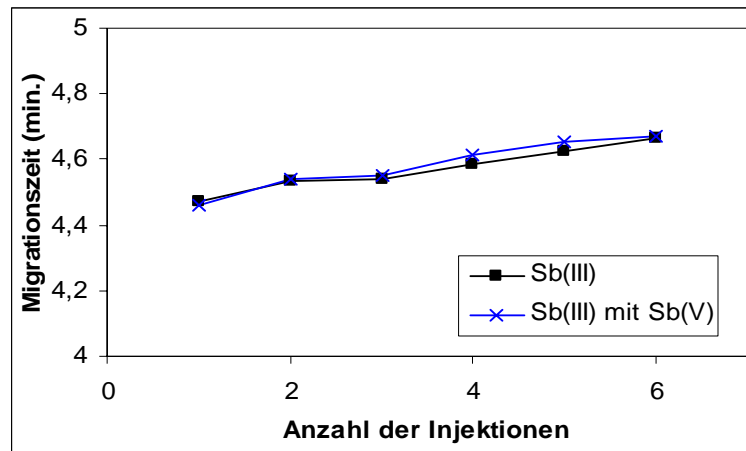


Abbildung 9-30: Wiederholmessungen von einer Standardlösung von 33 mg/L Sb(III) mit 27 mg/L Sb(V) und ohne Sb(V), Puffer: 7,5 mM, pH-Wert 4,0, Modifizier: 0,2 mmol/L HTAB, Detektion: indirekte UV, mit Peakumkehr

Die Migrationszeiten schwankten für Sb(V) bis maximal 3 Sekunden und die Absolute Standardabweichungen betragen 0,02 und 0,04 Sekunden (bei eine relative Standardabweichung von jeweils 0,42 % und 0,97 %), ohne und mit gleichzeitiger Injektion von Sb(III). Die Migrationszeiten für Sb(III) schwankten bis zu 7 Sekunden und die Absolute Standardabweichungen betragen 0,07 und 0,08 Sekunden ohne und mit gleichzeitiger Injektion von Sb(V) (bei eine relative Standardabweichung von jeweils 0,75 % und 1,06 %).

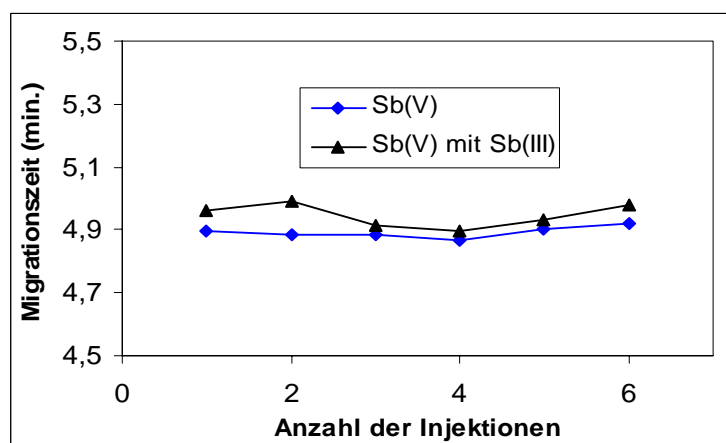


Abbildung 9-31: Wiederholmessungen von einer Standardlösung von 33 mg/L Sb(III) mit 27 mg/L Sb(V) und ohne Sb(V), Puffer: 7,5 mM, pH-Wert 4,0, Modifizier: 0,2 mmol/L HTAB, Detektion: indirekte UV, mit Peakumkehr

Mit diesen Daten ist eine der Voraussetzung zur Durchführung qualitativer Analysen erfüllt, da insbesondere in Proben, die nicht sehr viele Komponenten enthalten eine Korrelation zwischen Spezies und Peak möglich sein wird.

Bewertung der Trennung im Phthalsäure-Puffer unter optimierten Bedingungen

Mit diesem Verfahren gelang die Trennung der beiden Antimonspezies [Sb(V) und Sb(III)] mit Kapillarelektrophorese. Es konnte eine Basislinientrennung der Spezies erreicht werden, wobei jedoch das Sb(III) dieselbe Migrationszeit wie das freie Tartration aufwies.

Die Bestimmung von Antimon in biologische Proben ist bei der Verwendung optimierten Bedingungen möglich und kann beispielweise für Messungen in Leishmaniazellen, die mit denselben Standards kultiviert worden, angewendet werden. Zumindest unter der Annahme, dass Tartrat in selbem Umfang wie Sb(III) von den Zellen aufgenommen wird, was weiter untersucht werden sollte. Die biologischen Matrices besaßen allerdings einen deutlich geringeren Antimongehalt als die verwendeten Standards, weshalb mit der CZE-UV keine Ergebnisse erhalten werden konnte und auf das ICP-MS als Detektor zurückgegriffen werden musste. Das elektrophoretische Verfahren konnte daher in der vorliegenden Arbeit zur Untersuchung von Antimonspezies in biologischen Proben nicht eingesetzt werden, weil für die Analytik von Antimonspezies in Proben mit Gesamtgehalten von weniger als 1 mg/L Antimon die Nachweisgrenzen im Verfahren mit dem Phthalsäure-Puffer nicht ausreichend sind. Die NWG betragen 1,33 mg/L für Sb(III) und 3,41 mg/L für Sb(V)

Zusätzlich zeigen die Signale von Sb(III) und Sb(V) ein starkes Fronting, was neben der Auflösung auch die Empfindlichkeit der Methode beeinträchtigt. Eine Erklärung für diese Beobachtungen könnte eine höhere Mobilität der Probeionen im Vergleich zur Mobilität des Pufferions sein (**Kapitel 9.2**).

Die Probleme dieses Verfahrens mit der Koelution von Sb(III)-Tartrat und Tartrat könnten durch die Verwendung eines elementspezifischen Detektors umgangen werden. Außerdem könnte ein solcher Detektor, z. B. das ICP-MS, zu einer deutlichen Verbesserung der Nachweisgrenzen und damit einer Ausweitung des Anwendungsbereiches führen. Leider war mit dem mir zur Verfügung stehenden Gerät eine solche Kopplung nicht möglich.

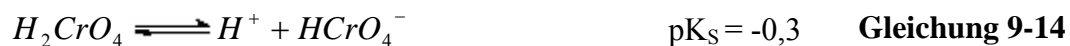
Für weitere Untersuchungen wurde Natriumchromat als Puffer ausgewählt, da es gegenüber anderen Puffersubstanzen öfter für die Bestimmung Elemente wie Arsen oder Antimon angewendet wurde [242, 243].

9.4.2 Trennung der Antimonspezies mit Chromat

Chrom erhielt seinen Namen aufgrund der vielfältigen Farben seiner Verbindungen (gr. chromos = Farbe). Chrom tritt in wässrigen Lösungen bevorzugt in sechswertiger Form u. a. als Chromat CrO_4^{2-} auf. Chrom(VI)-Verbindungen sind unter aeroben Bedingungen im pH-Bereich von 6,5 bis 8,5 in Wasser die thermodynamisch stabilsten Chromspezies.

Die seit Beginn ihrer industriellen Verwendung als stark hautreizend bekannten Chrom(VI)-Verbindungen in Form der Chromate sind giftig und sensibilisieren die Haut. Die orale Aufnahme von 2- 5 g wirkt tödlich. Außerdem sind Chromate Krebserzeuger.

In den folgenden Gleichungen sind verschiedene Chrom(VI)-Verbindungen aufgeführt, die in einem wässrigen System abhängig vom pH-Wert auftreten können.



Chromat ist einer der effektivsten eElektrolyt für die indirekte UV-Detektion auf Grund der hohen Grundabsorption. Chromat wurde auch in der letzte Zeit für die Speziation von Arsen und Selen erfolgreich verwendet [242]. Deswegen wird es hier als Puffersystem angewendet, sein Einsatzbereich ist zwischenpH-Wert 7 und 11.

Kapillarbelegungen

Eine Verbesserung der Trennleistung kann, in der CE auch durch verschiedene Pufferadditive erreicht werden. Wenn bei der CZE die Trennung durch Wechselwirkungen mit Pufferadditiven und nicht ausschließlich durch Ladungsdichtedifferenzen erzielt wird, spricht man, bei der Verwendung von pseudostationäre Phasen, von der elektrokinetischen Chromatographie.

Es gibt verschiedene Additive, die man dabei als „pseudo-stationäre“ Phase betrachtet, da die Probenbestandteile zwischen den Pufferadditiven und der durch Elektroosmose bewegten mobilen Phase verteilt werden. Es gibt auch sehr viele verschiedene Additive, die keine pseudostationären Phasen bilden.

Für die Trennungen im Chromatpuffer wurden zur Umpolung des Elektroosmotischen Fluss das OTAC, DTAB, HTAB und Tetrabutylammoniumbromid (TBAB) getestet, da bei der Verwendung des Chromatpuffers ohne Zusatz keine erfolgreiche Trennung gelang. Die Benutzung von TBAB als Additiv führt nicht zu einer Verbesserung der Trennung und wurde daher nicht weiter verwendet.

Unter den gewählten Bedingungen ist die elektrophoretische Mobilität der Antimonspezies kleiner als der entgegen gerichtete elektroosmotische Fluss, weshalb die Analyten mit dem EOF zur Kathode transportiert werden. Zunehmende Anteile der oben beschriebenen organischen Substanzen als Pufferadditive bewirkten im Elektrolyten eine entsprechende EOF-Umpolung, was zu einer drastischen Verringerung der Migrationszeiten führt.

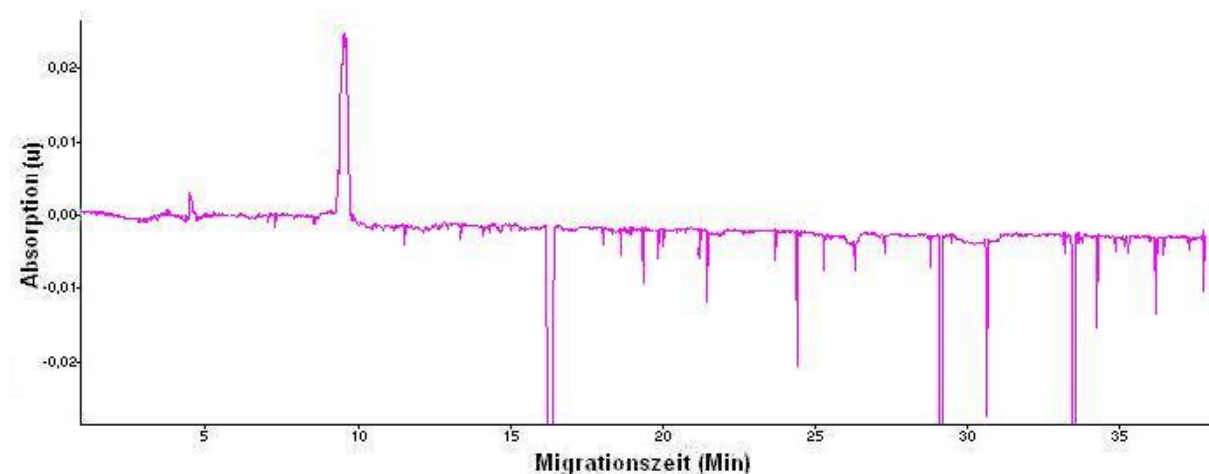


Abbildung 9-32: Elektropherogramme von EDTA, Sb(III) und Sb(V), Puffer: 5 mM Chromat, Modifier: 0,2 mM HTAB, pH-Wert: 9,5, Detektion: indirekte-UV bei 214 nm mit Peakumkehr

Auffällig war eine unter den gewählten Bedingungen vorhandene Instabilität des Puffers (siehe **Abbildung 9-32**). Der Grund hierfür konnte die Fällung des Additivs, des Chromats oder sogar des Hydroxids bei der höherem pH-Wert sein. Alle Pufferlösungen wurden mit einen 0,45 µm Minisart-Filter abfiltriert und die Proben mit einen 0,20 µm Minisart-Filter, um

die Verunreinigungen und Verstopfen der Kapillare zu vermeiden, da so Reste kleiner ungelöster Partikel oder Luftblasen ausgeschlossen wurden.

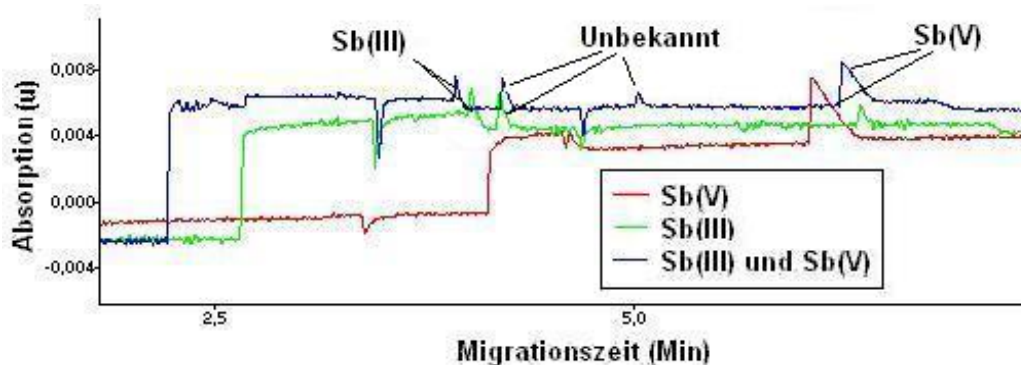


Abbildung 9-33: Elektropherogramme von ca. 33 mg/L Sb(III) und ca. 27 mg/L Sb(V), Puffer: 5 mmol/L Chromat, Modifier: 0,2 mmol/L DTAB, pH-Wert: 8,82, Detektion: indirekte-UV bei 214 nm mit Peakumkehr

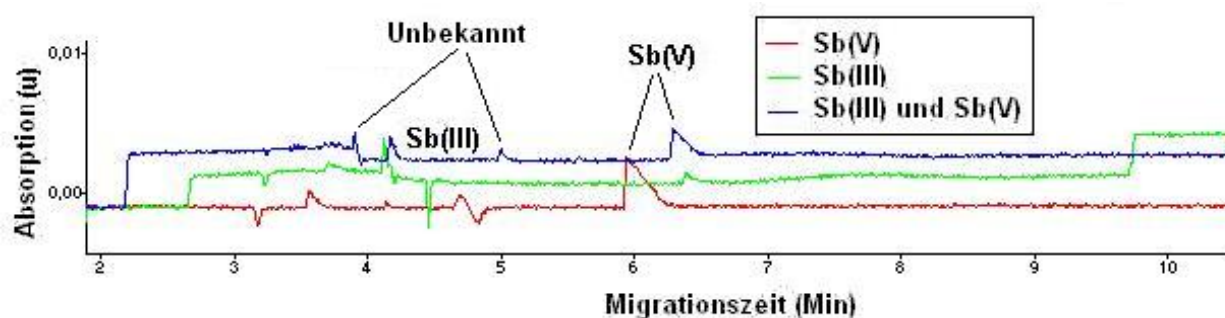


Abbildung 9-34: Elektropherogramme von ca. 33 mg/L Sb(III) und ca. 27 mg/L Sb(V), Puffer: 5 mmol/L Chromat, Modifier: 0,2 mmol/L OTAC, pH-Wert: 8,82, Detektion: indirekte-UV bei 214 nm mit Peakumkehr

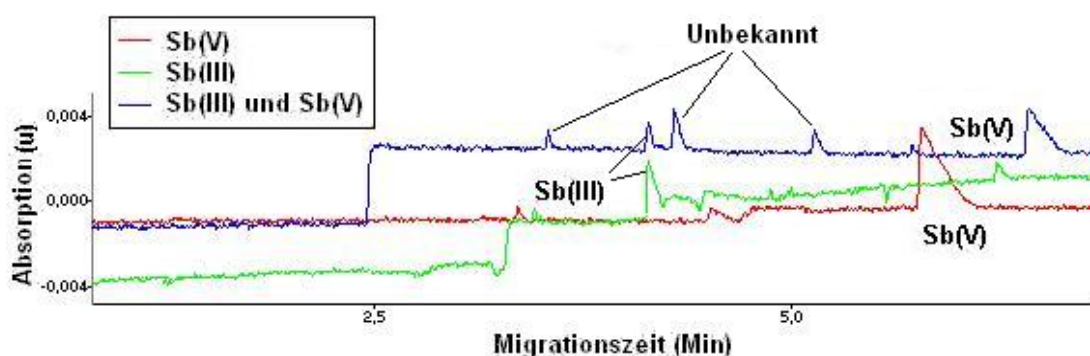


Abbildung 9-35: Elektropherogramme von ca. 33 mg/L Sb(III) und 27 mg/L Sb(V), Puffer: 5 mmol/L Chromat, Modifier: 0,2 mmol/L HTAB, pH-Wert: 8,82, Detektion: indirekte-UV bei 214 nm mit Peakumkehr

Mit allen Additiven konnte das Substanzgemisch in nur sieben Minuten aufgetrennt werden, wobei die Mobilität von Sb(V) am geringsten war (siehe **Abbildung 9-33** bis **Abbildung 9-35**).

OTAC und DTAB sind nicht sehr stabil bei diesem pH-Bereich, bei dem der Chromatpuffer eingesetzt werden kann (7-11) und ein häufiger Wechsel der Pufferlösungen ist notwendig. Der pH-Wert 8,82 wurde für die Untersuchung der Additive verwendet, bei höheren pH-Werten bildet sich in der Lösung nach einigen Stunden ein weißer Niederschlag und die Additive können nicht mehr benutzt werden. Außerdem erscheinen bei Verwendung des DTAB als Additiv 2 Peaks bei der einzelnen Injektion von Sb(III), was eine Identifizierung der Spezies erschwert bzw. unmöglich macht. Wegen der kurzen Lebensdauer der oben genannten Additive in der Pufferlösung wurde für die folgenden Untersuchungen nur HTAB benutzt.

pH-Wert Optimierung

Bei der indirekten UV-Detektion müssen bei der Optimierung des pH-Wertes zwei Gesichtspunkte beachtet werden. Da gleiche Ladungszeichen zwischen Proben-substanzen und Elektrolyt zur Signalentstehung erforderlich sind, muss zur Trennung von Anionen der pH-Wert so gewählt werden, dass sowohl der Hintergrundelektrolyt, als auch die Analyten negativ geladen sind.

Die Trennung erfolgt dann aufgrund unterschiedlicher Mobilitäten der Analyten. Da die Dissoziation schwacher Elektrolyte stark vom pH-Wert beeinflusst wird, erfolgt bei einer Variation des pH-Wertes in der Nähe des pK_S -Wertes der Probe auch eine starke Veränderung der Mobilitäten und somit der resultierenden Auflösung.

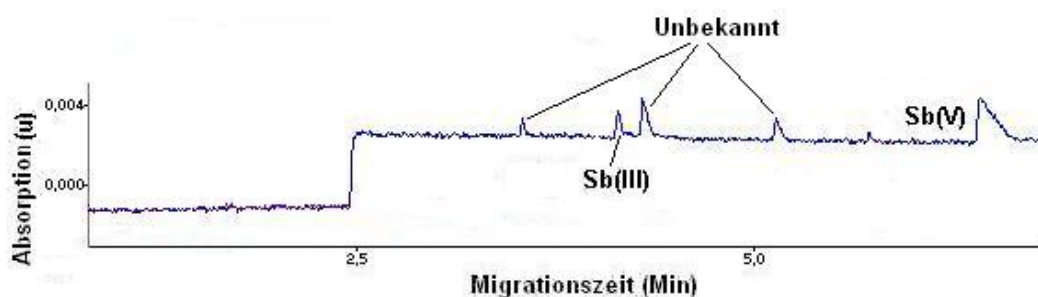


Abbildung 9-36: Elektropherogramme von ca. 33 mg/L Sb(III) und 27 mg/L Sb(V), Puffer: 5 mmol/L Chromat, Modifier: 0,2 mmol/L HTAB, pH-Wert: 8,82, Detektion: indirekte-UV bei 214 nm mit Peakumkehr

Durch die Variation des pH-Wertes zwischen 8,5 und 10,7 sollte unter Konstanthaltung der übrigen Bedingungen überprüft werden, ob die Trennung der Antimonspezies bei diesen pH-Werten durchgeführt werden kann.

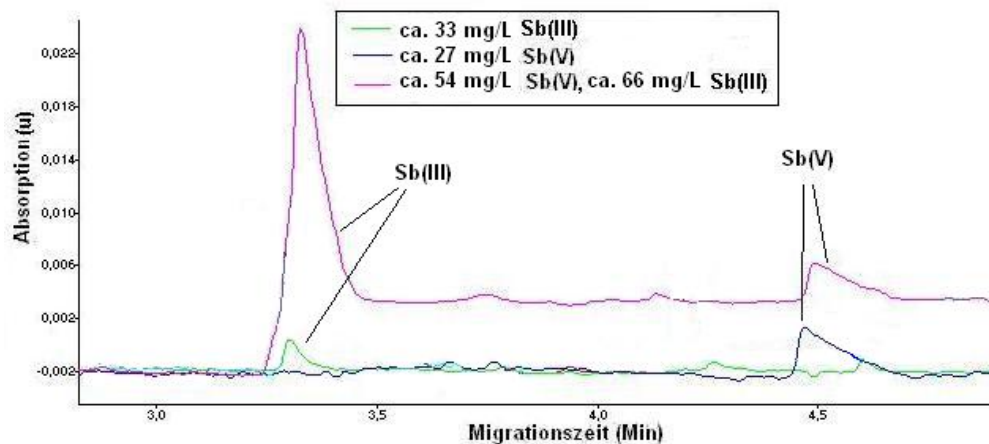


Abbildung 9-37: Elektropherogramme von verschiedenen Konzentrationen an Sb(III) und Sb(V), Puffer: 5 mM Chromat, Modifier: 0,2mM HTAB, pH-Wert: 9,5, Detektion: indirekte-UV bei 214 nm mit Peakumkehr

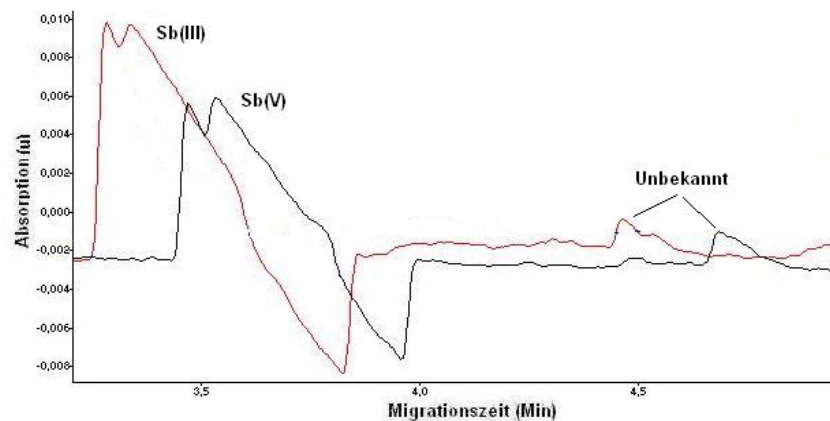


Abbildung 9-38: Elektropherogramme von ca. 33 mg/L Sb(III) und ca. 27 mg/L Sb(V), Puffer: 5 mmol/L Chromat, Modifier: 0,2 mmol/L HTAB, pH-Wert:10,25, Detektion: indirekte-UV bei 214 nm mit Peakumkehr

Es wurden Lösungen mit verschiedenen Konzentrationen an Sb(III) und Sb(V) untersucht. Aus der **Abbildung 9-36** kann geschlossen werden, dass bei pH 8,82 eine Identifizierung der Sb(V) Spezies möglich ist. Die Identifizierung des Sb(III) ist in keinem der Fälle eindeutig, bei diesem pH-Wert treten bei der einzelnen Injektion des Sb(III) zwei Peaks auf. Bei der gemeinsamen Injektion treten sogar zwei zusätzliche Signale auf, so dass keine eindeutige Identifizierung des Sb(III) möglich ist. Bei der Trennung mit pH 9,5 (**Abbildung 9-37**) als Puffer war eine Identifizierung des Sb(V) und des Sb(V) möglich. Aber ab pH 10,0 (siehe

Abbildung 9-38) war keine Trennung mehr möglich, da beide Antimonspezies sehr ähnliche Migrationszeiten hatten.

Es wurde daher für die nächsten Untersuchungen pH 9,5 ausgewählt.

Variation der Konzentration

Die Konzentration des Puffers wurde unter 5 mmol/L nicht ausreichend eine Trennung der Antimonspezies zu ermöglichen.

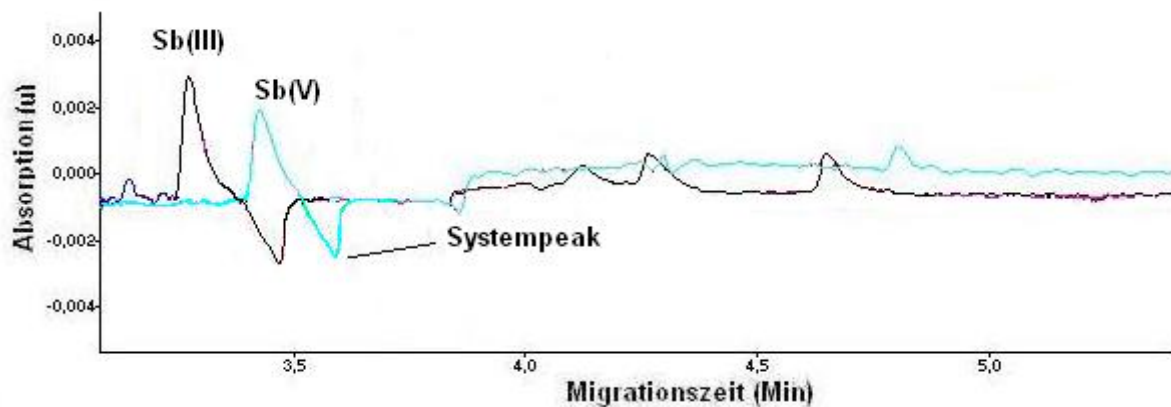


Abbildung 9-39: Elektropherogramme von EDTA, Sb(III), Sb(V) und Weinsäure, Puffer: 7,5 mM Chromat, Modifier: 0,2mM HTAB, pH-Wert: 9,5, Detektion: indirekte-UV bei 214 nm mit Peakumkehr

Die Konzentration des Puffers hat Einfluss auf die Migrationszeiten. Es wurde eine Verkürzung der Migrationszeiten der aufgetretenen Spezies bei einer Erhöhung der Konzentration beobachtet. Bei einer Konzentration des Puffers von 7,5 mmol/L waren die Migrationszeiten der Sb(III) und der Sb(V) sehr ähnlich, was bei höheren Konzentrationen der Antimonspezies eine Trennung unmöglich macht.

EDTA-Komplexierung

Auch bei der Komplexbildung mit EDTA wurde eine Standardlösung von Weinsäure untersucht, um die Migrationszeit des freien Tartrats zu bestimmen (siehe **Abbildung 9-40**). Die Migrationszeiten des Sb(III)-Tartrat-Komplex und des Tartrations waren wieder sehr ähnlich. Es wurden verschiedene Lösungen mit Sb(III), Weinsäure und EDTA untersucht, wobei wieder das EDTA als Komplexbildner verwendet wurde. Aber die Migrationszeiten des Sb(III)-Tartrat- und des Sb(III)-EDTA-Komplexes waren auch so ähnlich (siehe **Abbildung 9-41**), dass beim ausgewählten pH-Wert keine Trennung der freien EDTA, des

Sb(III)-EDTA-Komplexes und des Sb(III)-Tartrat-Komplexes erreicht werden konnte, weder bei der einzelnen Injektion noch bei der Standardaddition. Daher wurde das EDTA als Komplexbildner nicht weiter verwendet.

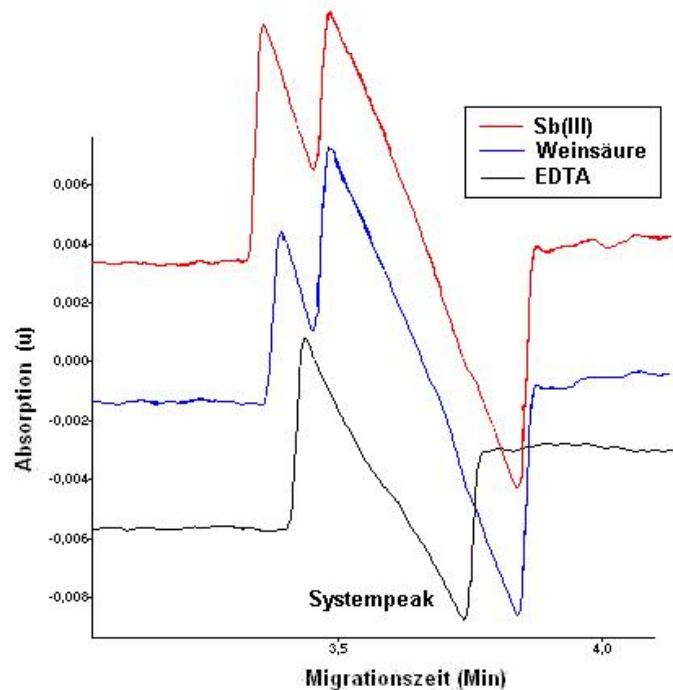


Abbildung 9-40: Elektropherogramme von 50 mg/L EDTA, ca. 33mg /L Sb(III) und 50 mg/L Weinsäure, Puffer: 5 mM Chromat, Modifier: 0,2 mM HTAB, pH-Wert:10,7, Detektion: indirekte-UV bei 214 nm mit Peakumkehr

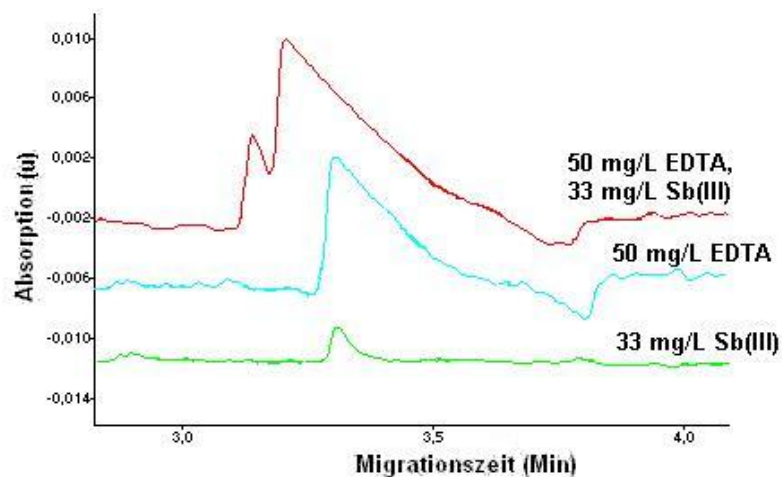


Abbildung 9-41: Elektropherogramme von Standardlösungen mit 50 mg/L EDTA und ca. 33 mmol/L Sb(III), Puffer: 7,5 mmol/L Phthalsäure, pH-Wert: 9,5, Modifier: 0,2 mM HTAB, Detektion: indirekte-UV bei 214 nm mit Peakumkehr

Wie man in der **Abbildung 9-40** und **Abbildung 9-41** beobachten kann, war das Signal von Sb(III) überhaupt nicht reproduzierbar, da sowohl für die einzelne Injektion des Sb(III) als auch für die gemeinsame Injektion mit Sb(V) oder EDTA ein oder zwei nicht getrennte, nicht zuzuordnende Peaks auftreten. Es war daher weder eine Kalibrierung der Standards noch eine richtige Auswertung möglich, daher wurde diese Methode nicht weiter getestet.

Analytische Kenndaten der Trennung mit Chromat

Unter den in der Tabelle aufgeführten Bedingungen wurden bei der Optimierung des Verfahrens gemacht. Aber durch die Instabilität und die fehlende Reproduzierbarkeit des Systems konnten keine Nachweisgrenzen berechnet werden.

Tabelle 9-3: Standard Parameter für den Einsatz von CZE-UV

Parameter	Wert
Detektion [nm]	214 (indirekt)
Kapillarmaterial	Quartz (fused silica) l=50/60 cm, 100 µm
Polarität	umgekehrt
Injektion	hydrodynamisch: 35 mbar, 5 Sek.
Spannung [kV]	-5 - (-20)
Trennzeit [Min]	5 - 30
Probenkonzentration [mg/L]	5 - 50
Puffer	Natriumchromat 2,5 - 5 mmol/L pH-Wert 3 – 6,5 eingestellt mit TRIS
Tenside	HTAB, OTAC, DTAB, TBAB

Alle Messungen, die in der vorliegenden Arbeit vorgestellt werden, wurden mit einer Spannung von -20 kV gemacht. Kleinere Spannungen waren nicht ausreichend eine Trennung der Antimonspezies zu erlangen. Bei der Nutzung der oben vorgestellten Modifier, wurde keine Verbesserung der Trennung beobachtet und daher wurden diese auch nicht weiter verwendet.

Bewertung der Trennung im Chromatpuffer

Mit diesem Verfahren gelang keine reproduzierbare Trennung der Antimonspezies [Sb(V) und Sb(III)] mit Kapillarelektrophorese. Allerdings waren die Signalintensitäten kleiner als für die Trennung mit Phthalsäure als Puffer. Eine Verbesserung der NWG konnte nicht erreicht werden, dafür wurde eine starke Unreproduzierbarkeit beobachtet. Diese Methode konnte deswegen auch nicht für die Bestimmung von Antimon in biologische Proben mit kleinem Antimongehalt, wie es der Fall der Leishmanizellen ist, angewendet werden.

10 Untersuchung von Zellproben

Das grundlegende Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Analyse von medizinischen Proben als Matrix für die Antimonpeziesanalytik. Verbindungen des fünfwertigen Antimons, z. B. das Stibogluconat, werden als Therapeutika bei Behandlung der Leishmaniose, einer parasitären Tropenkrankheit, eingesetzt (siehe **Kapitel 6**). Der Wirkmechanismus innerhalb der Zellen ist jedoch weitgehend unbekannt, bisher wurde nur wenig Speziesanalytik eingesetzt. Mehr Studien beschäftigen sich mit dem Gesamtgehalt, der keine Informationen zur Metabolisierung liefert. Zusätzlich war bis vor kurzer Zeit nur die in-vitro-Kultur der extrazellulären Promastigotstufe der *Leishmania* möglich, deren Verhalten gegenüber Antimonverbindungen sich deutlich von den Amastigoten innerhalb des Wirtsorganismus unterscheidet. Erst die Entwicklung eines Kulturverfahrens für Amastigoten durch Zilberstein et al. [246] und dessen Verhalten gegenüber Antimon, ermöglichte zusammen mit den speziesanalytischen Methoden, die in **Kapitel 8** vorgestellt wurden, eine systematische Untersuchung der ablaufenden Vorgänge auf der Basis einer interdisziplinären Kooperation zwischen Biologie (Prof. D. Zilberstein), Medizin (Prof. H. Murray, Dr. M. Chatterjee und Dr. H. Denton) und Chemie (Dr. N. Ulrich und R. Costa).

Die Zellkulturen sowie der überwiegende Teil der Extraktionen wurde am Institut für Biologie des Technions in Haifa, Israel, in der Arbeitsgruppe von Prof. Zilberstein durchgeführt. Die analytische Methodenentwicklung und die Durchführung aller Gesamtgehaltbestimmungen und speziesanalytischen Messungen erfolgten im Rahmen der vorliegenden Arbeit. Im Folgenden soll eine Übersicht der Problematik gegeben und anschließend die analytischen Ergebnisse diskutiert werden.

10.1 Kultivierung der Zellproben

Für die Untersuchung des Antimonmetabolismus in den Leishmaniazellen wurden zwei Stämme eingesetzt. Eine nicht antimonresistente Zelllinie von *Leishmania donovani* wird im folgenden als LD WT (*Leishmania donovani* wild tribes) bezeichnet. Als zweites wurde der Stamm *Leishmania donovani* 1 S.20 (im folgenden als LD 1S.20 bezeichnet) eingesetzt, der gegen Sb(V) resistent ist. Sowohl Promastigoten als auch Amastigoten beider Zelllinien wurden untersucht. Die Toxizität gegenüber Sb(V) und Sb(III) ist nicht nur vom Stamm, sondern auch von der Zellform abhängig.

Tabelle 10-1: LD₅₀-Dosen für antimonresistente und nicht resistente Kulturen [6]

Sb-Verbindung	LD WT		LD 1S.20	
	Promastigoten	Amastigoten	Promastigoten	Amastigoten
Stibogluconat [µg/mL]	5230 ± 980	19 ± 2	7800 ± 880	1230 ± 150
Antimonyltartrat [µg/mL]	13 ± 2	3 ± 0,3	10 ± 2	7 ± 1

Für die Kultur wurde Medium 199 mit 10% fetalem Kälberserum für Promastigoten bei 26°C und für Amastigoten bei 35°C verwendet [247]. Zellen in der mittleren Wachphase wurden 3, 6, 9 und 12 Stunden mit Kaliumantimonyltartrat, Natriumstibogluconat oder beiden Verbindungen inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit eiskalter Phosphatpufferlösung gewaschen, gezählt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Alle diese Zelleexperimente fanden am Technion-Haifa statt.

10.2 Probenvorbereitung und Lagerung

Für die Bestimmung der Gesamtgehalte und für die Speziesanalytik wurden die folgenden Methoden für die Probenvorbereitung, die im Technion-Haifa statt fand, eingesetzt.

Für die Speziesanalytik sollten die Gleichgewichte innerhalb der Proben möglichst wenig beeinflusst werden. Eine Extraktion mit Salpetersäure oder ein Aufschluss können daher nicht eingesetzt werden. Das Zellpellet oder Zellmembrane wurde mit 0,9 % NaCl aufgenommen und zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen gezählt. Die Zellen wurden mit einem Homogenisierungspuffer (10mmol/L TRIS, pH 8,5, 2 mM Dithiothreitol³) homogenisiert. Die gewaschenen Zellsuspensionen wurden zunächst zweimal für 30 Minuten bei 1000 rpm zentrifugiert, um die Nährlösung möglichst vollständig abzutrennen und unter 60 MPa Druck bei 0°C zweimal durch ein Nadelventil gepresst, sodass die Zellen zu 99,9% homogenisiert wurden. Anschließend erfolgte die Zellfraktionierung durch Ultrazentrifugation nach folgendem Schema:

³ Dithiothreitol (DTT) auch als Cleland's Reagent bekannt, chemische Formel: C₄H₁₀O₂S₂

- Abtrennung der größeren Bruchstücke: 10 Minuten bei 1000 rpm
- Mitochondrienfraktion: 20 Minuten bei 20000 rpm
- Mikrosomenfraktion: 60 Minuten bei 80000 rpm
- Ribosomfraktion: 180 Minuten bei 150000 rpm
- Zytosol-Fraktion: Probe für die Analyse (Überstand)

Das Volumen der Zytosol-Fraktion wurde mit entionisiertem Wasser auf 1 mL gebracht, die Proben in flüssigem Stickstoff eingefroren, im Gefrierschrank gelagert und mit Trockeneiskühlung per Luftpost von Haifa (Israel) nach Hannover versendet. Da wesentlich weniger Amastigoten in einer Kultur enthalten sind, ist die Konzentration in den Amastigotproben geringer als in den Promastigotproben. Hieraus erklären sich die Unterschiede der Intensitäten der Chromatogramme, da die Konzentrationen auf die Zellmengen und nicht auf die Lösungsmengen bezogen sind.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Speziesverteilung des Antimons in der Zytosol-Fraktion untersucht.

Auch die Proben aus Kalkutta (Indien) und Glasgow (Groß Britannien) wurden unter Trockeneiskühlung per Luftfracht nach Hannover geschickt.

Hier ist es wichtig, einmal kurz das Zytosol als Matrix zu charakterisieren: Das Zytosol ist ein Gel auf Wasserbasis, das vielfältige Moleküle enthält und in dem auch die Organellen der Zelle, wie z. B. die Mitochondrien oder die Ribosomen, liegen. Es ist das größte Kompartiment des Zellinneren, in dem viele wichtige Lebensfunktionen, wie z. B. Nährstoffabbaureaktionen stattfinden. Wenn alle Zellorganellen extrahiert und abgetrennt werden, bleiben noch die Organomoleküle, wie Proteine, in der Zytosolfraktion übrig. Dabei handelt es sich hauptsächlich um Proteine, die im Prinzip keine Störungen auf der Antimonmasse (bei elementspezifischen Detektion) geben sollten. Schwierigkeiten sind aber bei der Trennung zu erwarten, d. h. auf der Trennsäule der Ionenchromatografie könnten die Proteine Probleme verursachen, indem sie die Säule teilweise verstopfen und so nicht die gesamte Probe den Detektor erreichen lassen.

10.3 Methoden für die Antimonspeziesanalytik in Zellproben

Um die Zellproben zu charakterisieren, wurde zunächst der Gesamtantimon Gehalt der Zellextrakte (Probenvorbereitung siehe **Kapitel 10.2**) mit ICP-MS quantifiziert. Anschließend wurde der Gehalt von Sb(III) und Sb(V) mit IC-ICP-MS bestimmt. In der folgenden Tabelle sind die eingesetzten Verfahren mit einigen Besonderheiten zusammengefasst.

Für die Untersuchung der Gesamtgehalte wurden 100 µL von den Proben entnommen und bis auf 1 mL verdünnt, davon wurden wieder 100 µL entnommen und bis auf 1 mL verdünnt (1:100-Verdünnung). Für die Antimonspeziation reichte eine 1-10-Verdünnung (100 µL Probe bis auf 1 mL verdünnt), da die Proben durch den Eluent bei der Ionenchromatographie verdünnt werden.

Tabelle 10-2: Eingesetzte Verfahren zur Untersuchung der Zellproben [249].

Parameter	Gesamtgehalt	Speziesanalytik I	Speziesanalytik II
Methode	ICP-MS	EDTA-Verfahren	Salpetersäure-Verfahren
Interferenzkontrolle	Isotopenverhältnis von ^{121}Sb und ^{123}Sb	Isotopenverhältnis von ^{121}Sb und ^{123}Sb	Isotopenverhältnis von ^{121}Sb und ^{123}Sb
Interne Std.	^{115}In	kein	kein

10.4 Zellkulturen: Untersuchung eines nicht antimonresistenten Stammes von *Leishmania donovani*

Im ersten Schritt wurden Zellkulturen von Promastigoten und Amastigoten von LD WT angelegt und mit Antimon inkubiert. Dieser Stamm ist nicht gegen Antimon resistent. Die Amastigotenstufe ist sowohl gegenüber Sb(III) als auch Sb(V) empfindlich. Da Sb(III) als eigentlich toxisches Agens angesehen wird, könnte die Toxizität des Sb(V) auf der Reduktion zu Sb(III) beruhen. Im folgenden werden die Ergebnisse der Kultivierungsexperimente vorgestellt.

Bei den Chromatogrammen ist die Verdünnung in Relation zur Originalprobe (Zytosol-Fraktion aufgefüllt auf 1mL) angegeben. Unterschiede in den Signalintensitäten ergeben sich aus den Differenzen der Zellmengen pro Probe. Nicht identifizierte Peaks, die möglicherweise

Metabolisierungsprodukte des Antimons innerhalb der Zellen darstellen, sind durch Buchstaben gekennzeichnet. Signale mit vergleichbaren Retentionszeiten werden durch dieselben Buchstaben repräsentiert und es wird davon ausgegangen, dass es sich um die gleichen Spezies handelt.

Die Ergebnisse, die im Folgenden dargestellt werden, wurden mit dem Salpetersäure-Verfahren ermittelt. Im **Kapitel 10.9.1** werden diese Daten mit den Ergebnisse, die mit dem EDTA-Verfahren erhalten wurden, kurz verglichen.

10.4.1 Untersuchung von Promastigoten

Die Promastigoten von LD WT sind wesentlich weniger anfällig gegen Sb(V) als gegen Sb(III). Die Akkumulation der Antimonspezies sowie deren Metabolisierung ist im Folgenden dargestellt. Die Bestimmung des Gesamtgehaltes erfolgte mit ICP-MS, die Werte für Sb(III) und Sb(V) wurden mit dem IC-ICP-MS (Salpetersäure- und EDTA-Verfahren) ermittelt.

Aufnahme und Metabolisierung von Sb(III)

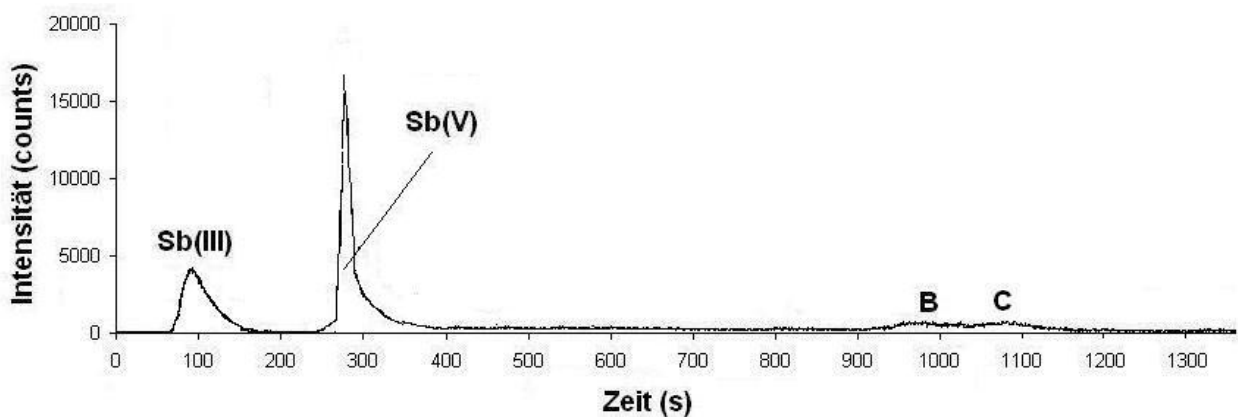


Abbildung 10-1: Chromatogramm einer Probe LD WT Pro nach Kultivierung mit Sb(III) für 6 Stunden, Probenvorbereitung siehe **Kapitel 10.2**, Parameter des Verfahrens siehe Salpetersäure-Verfahren, Verdünnung 1:100

Die Promastigoten LD WT wurden für 6 Stunden mit 100 µg/mL Sb(III) (eine höhere Sb(III)-Konzentration hätte toxisch auf die Zellen gewirkt und zum Absterben geführt) als Tartrat inkubiert. Der Antimongesamtgehalt wurde zu $98 \pm 3,4 \mu\text{g}/10^6$ Zellen bestimmt. Es konnte somit eine leichte Akkumulation festgestellt werden, im Vergleich zu den Antimongesamtgehalten von nicht mit Antimon inkubierten Zellen. In den Promastigoten mit Sb(III) wurden $56 \pm 2,9 \mu\text{g}/10^6$ Zellen Sb(III) und $17,9 \pm 1,7 \mu\text{g}/10^6$ Zellen Sb(V) detektiert. Damit ist

keine signifikante Oxidation des Sb(III) innerhalb der Promastigoten nachweisbar, die geringe detektierte Sb(V)-Menge ist wahrscheinlich auf Redoxprozesse während der Probenvorbereitung zurückzuführen. Wie **Abbildung 10-1** zeigt, kommt es zu einer Metabolisierung in der Zelle, die sich durch die Peaks B und C im Chromatogramm zeigt, zu denen sich weitere Informationen in **Kapitel 10.8** finden.

Aufnahme und Metabolisierung von Sb(V)

Die Promastigoten LD WT wurden für 6 Stunden mit 1 mg/mL Sb(V) als Stibogluconat inkubiert. Der Antimongesamtgehalt wurde zu $783 \pm 12,6 \mu\text{g}/10^6$ Zellen bestimmt. In den Promastigoten mit Sb(V) wurden $622 \pm 15,9 \mu\text{g}/10^6$ Zellen Sb(V) und $23 \pm 3,2 \mu\text{g}/10^6$ Zellen Sb(III) detektiert. Damit ist keine signifikante Reduktion des Sb(V) innerhalb der Promastigoten nachweisbar, die geringe detektierte Sb(III)-Menge ist wahrscheinlich auf Redoxprozesse während der Probenvorbereitung zurückzuführen. Wie **Abbildung 10-2** zeigt, kommt es zu einer Metabolisierung in der Zelle. Drei mögliche, nicht identifizierte Antimonspezies sind im Chromatogramm als A, B und D bezeichnet, zu denen sich weitere Informationen in **Kapitel 10.8** finden.

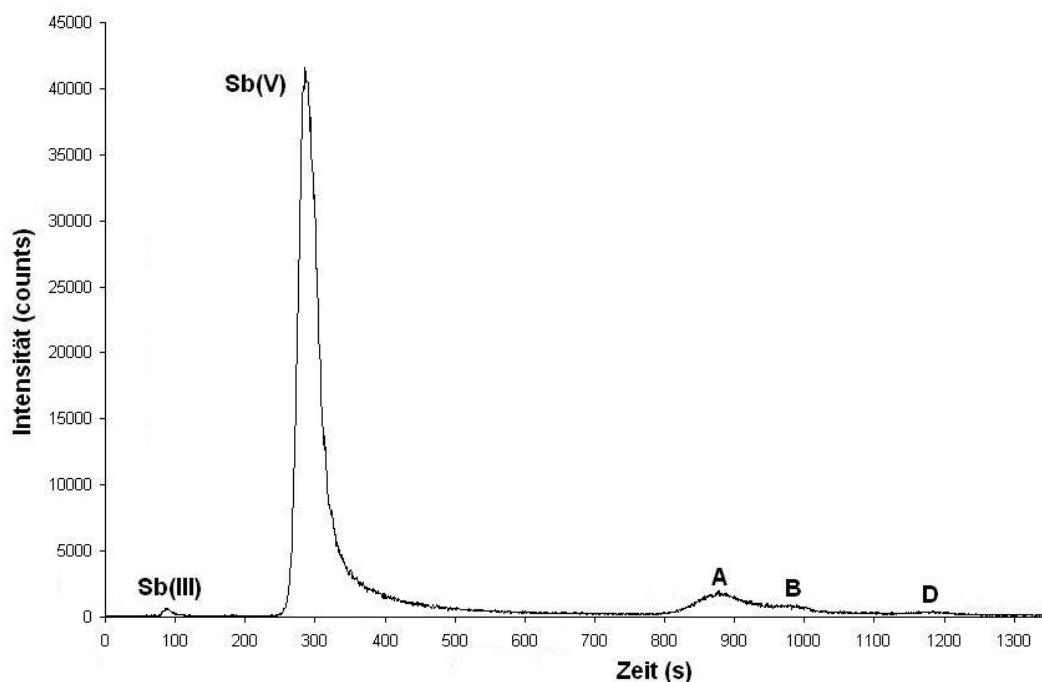


Abbildung 10-2: Chromatogramm einer Probe LD WT Pro nach Kultivierung mit Sb(V) für 6 Stunden, Probenvorbereitung siehe **Kapitel 10.2**, Parameter des Verfahren siehe Salpetersäure-Verfahren, Verdünnung 1:100

Ergebnisse

Für Promastigoten LD WT konnte sowohl bei der Kultur mit Sb(III) als auch mit Sb(V) ein deutlicher Metabolismus für Antimon nachgewiesen werden. Die Charakterisierung der Metabolite wird in **Kapitel 10.8** erfolgen. Bei Zugabe von Sb(V) war keine signifikante Reduktionsaktivität feststellbar. Sb(III) wird leicht akkumuliert, während nur eine vergleichsweise geringe Sb(V)-Konzentration innerhalb der Zellen nachweisbar war. In **Kapiteln 10.6** und **10.7** werden die Zeitabhängigkeit und die Konzentrationsabhängigkeit der Antimonaufnahme diskutiert.

10.4.2 Untersuchung von Amastigoten

Sowohl Sb(III) als auch Sb(V) besitzt eine hohe Toxizität für LD WT-Amastigoten (siehe **Tabelle 10-1**). Die Reduktion von Sb(V) zu Sb(III) ist eine Erklärungsmöglichkeit, z. B. wenn die Amastigoten über ein spezifisches Enzym, eine Art Antimonreduktase, verfügen, das bei den Promastigoten nicht oder nur in sehr geringer Konzentration vorhanden ist. Im Folgenden werden die Ergebnisse für die Kultur von LD WT-Amastigoten bei 6-stündiger Inkubation mit Antimon vorgestellt.

Aufnahme und Metabolisierung von Sb(III)

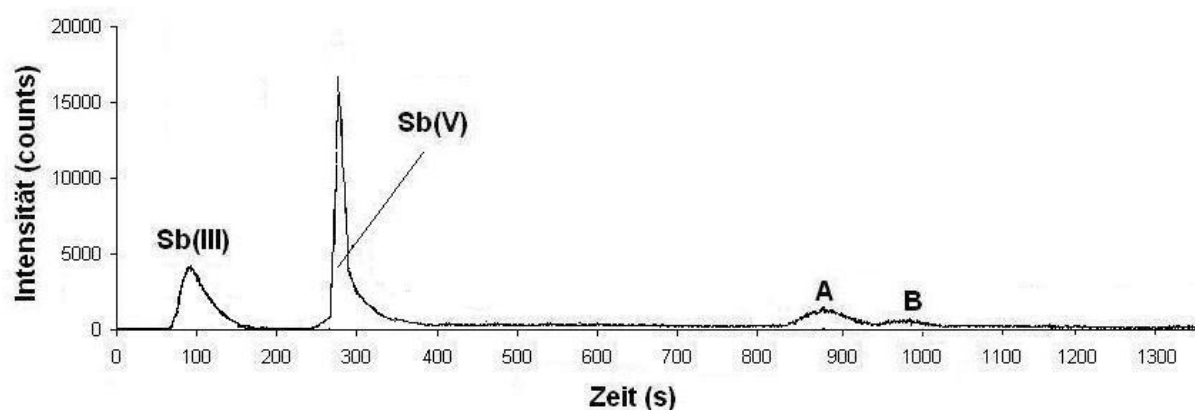


Abbildung 10-3: Chromatogramm einer Probe LD WT ama nach Kultivierung mit Sb(III) für 6 Stunden, Probenvorbereitung siehe **Kapitel 10.2**, Parameter des Verfahren siehe Salpetersäure-Verfahren, Verdünnung 1:100

Die Amastigoten LD WT wurden für 6 Stunden mit $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ Sb(III) (eine höhere Sb(III)-Konzentration hätte toxisch auf die Zellen gewirkt und zum Absterben geführt) als Tartrat inkubiert. Der Antimongesamtgehalt wurde zu $116 \pm 6,5 \mu\text{g}/10^6$ Zellen bestimmt. Er ist damit dem für die Promastigoten LD WT ermittelten Wert von $98 \mu\text{g}/10^6$ sehr ähnlich. In den

Amastigoten mit Sb(III) wurden $86 \pm 1,6 \mu\text{g}/10^6$ Zellen Sb(III) und $24 \pm 2,5 \text{ ng}/10^6$ Zellen Sb(V) detektiert. Die Sb(III)-Menge ist somit höher als bei den Promastigoten, während sich für Sb(V) nur geringe Unterschiede ergeben. Wie **Abbildung 10-3** zeigt, kommt es zu einer Metabolisierung in der Zelle, die sich durch die Peaks A und B im Chromatogramm zeigt, zu denen sich weitere Informationen in **Kapitel 10.8** finden.

Aufnahme und Metabolisierung von Sb(V)

Die Amastigoten LD WT wurden für 6 Stunden mit 1 mg/mL Sb(V) als Stibogluconat inkubiert. Der Antimongesamtgehalt wurde zu $1620 \pm 23,8 \mu\text{g}/10^6$ Zellen bestimmt, der damit deutlich höher als für Promastigoten LD WT ist. Bei Kultur mit Sb(V) wurden $1163 \pm 21,9 \mu\text{g}/10^6$ Zellen Sb(III) und $432 \pm 11,9 \mu\text{g}/10^6$ Zellen Sb(V) detektiert. Hier ist somit eine deutliche Reduktionsaktivität feststellbar. Erstmals konnte damit für Prokaryonten- und Eukaryontenzellen direkt die Reduktion von Antimon innerhalb der Zellen beobachtet werden. Die Konzentrations- und Zeitabhängigkeit wird in den **Kapiteln 10.6 und 10.7** diskutiert. Wie **Abbildung 10-4** zeigt, kommt es zu einer Metabolisierung in der Zelle. Drei mögliche, nicht identifizierte Antimonspezies sind im Chromatogramm als B, C und E gekennzeichnet, zu denen sich weitere Informationen in **Kapitel 10.8** finden.

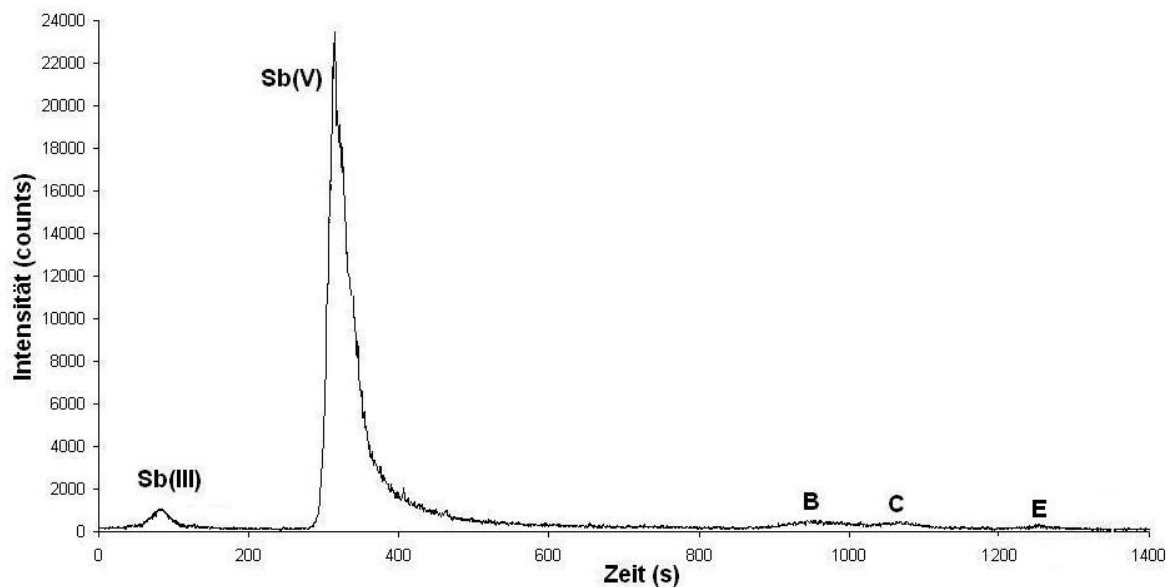


Abbildung 10-4: Chromatogramm einer Probe LD WT ama nach Kultivierung mit Sb(V) für 6 Stunden, Probenvorbereitung siehe **Kapitel 10.2**, Parameter des Verfahrens siehe Salpetersäure-Verfahren, Verdünnung 1:100

Ergebnisse

Die Ergebnisse für Amastigoten LD WT zeigen eine deutliche Reduktionsaktivität für Sb(V). Zusätzlich ist die Akkumulation sowohl für Sb(III) als auch für Sb(V) stärker als bei den Promastigoten LD WT. Eine nähere Charakterisierung der Metabolite erfolgt in **Kapitel 10.8**. Die Zeitabhängigkeit und die Konzentrationsabhängigkeit der Antimonaufnahme werden in **Kapiteln 10.6** und **10.7** diskutiert.

10.5 Zellkulturen: Untersuchung eines resistenten Stammes von *Leishmania donovani*

Um Unterschiede in der Metabolisierung zwischen antimonresistenten und nicht antimonresistenten Leishmaniakulturen zu ermitteln, wurde zusätzlich zu LD WT auch LD 1SR untersucht. Diese Mutation ist gegenüber Sb(V) sehr unempfindlich, während die Anfälligkeit gegenüber Sb(III) ähnlich wie bei LD WT ist (siehe **Tabelle 10-1**). Wenn Sb(III) das eigentliche toxische Agens für *Leishmania* ist und Sb(V) innerhalb der Zelle zu Sb(III) reduziert wird, ist die Resistenz von LD 1 S.20 am einfachsten mit einer Inhibierung der Antimonreduktionsaktivität zu erklären.

Die Ergebnisse, die im Folgenden dargestellt werden, wurden mit dem Salpetersäure-Verfahren ermittelt. Im **Kapitel 10.9.1** werden diese Daten mit den Ergebnisse, die mit dem EDTA-Verfahren erhalten wurden, kurz verglichen.

10.5.1 Untersuchung von Promastigoten

Die Promastigoten von LD 1 S.20 sind wesentlich weniger anfällig gegen Sb(V) als gegen Sb(III), wie **Tabelle 10-1** zeigt. Die Akkumulation der Antimonspezies sowie deren Metabolisierung ist im folgenden dargestellt. Die Bestimmung des Gesamtgehaltes erfolgte mit ICP-MS, die Werte für Sb(III) und Sb(V) wurden mit dem Salpetersäure- und dem EDTA-Verfahren ermittelt.

Aufnahme und Metabolisierung von Sb(III)

Die Promastigoten LD 1 S.20 wurden für 6 Stunden mit 100 µg /mL Sb(III) (eine höhere Sb(III)-Konzentration hätte toxisch auf die Zellen gewirkt und zum Absterben geführt) als Tartrat inkubiert. Der Antimongesamtgehalt wurde zu $87 \pm 5,6 \mu\text{g}/10^6$ Zellen bestimmt. Der Gehalt ist somit demjenigen für Promastigoten LD WT kultiviert mit Sb(III) sehr ähnlich. In den Promastigoten mit Sb(III) wurden $44 \pm 9,3 \mu\text{g}/10^6$ Zellen Sb(III) und $12 \pm 2,6 \mu\text{g}/10^6$

Zellen Sb(V) detektiert. Damit ist keine signifikante Oxidation des Sb(III) innerhalb der Promastigoten nachweisbar, die geringe detektierte Sb(V)-Menge ist wahrscheinlich auf Redoxprozesse während der Probenvorbereitung zurückzuführen. Wie **Abbildung 10-5** zeigt, kommt es zu einer Metabolisierung in der Zelle, die sich durch die Peaks B und C im Chromatogramm zeigt, zu denen sich weitere Informationen in **Kapitel 10.8** finden. Das Speziesmuster und die Konzentration an Antimon ist ähnlich wie bei Promastigoten LD WT, was darauf hindeutet, dass die Mutation eher bei den Amastigoten von Bedeutung ist.

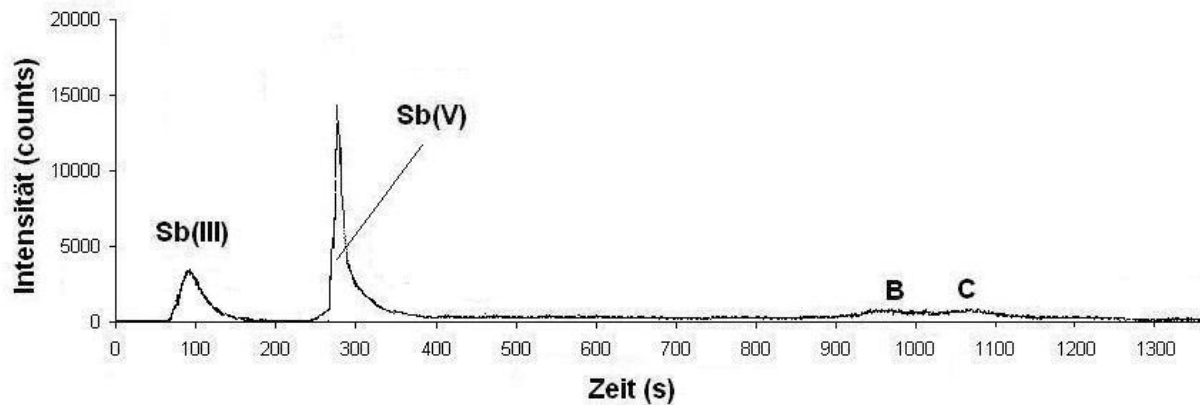


Abbildung 10-5: Chromatogramm einer Probe LD 1 S.20 pro nach Kultivierung mit Sb(III) für 6 Stunden, Probenvorbereitung siehe **Kapitel 10.2**, Parameter des Verfahrens siehe Salpetersäure-Verfahren, Verdünnung 1:100

Aufnahme und Metabolisierung von Sb(V)

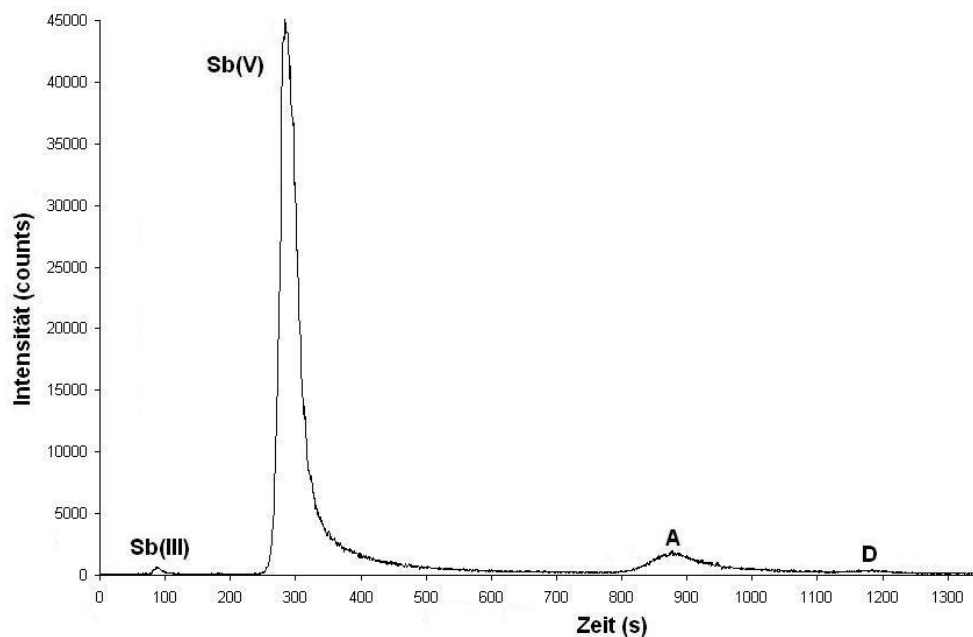


Abbildung 10-6: Chromatogramm einer Probe LD 1 S.20 pro nach Kultivierung mit Sb(V) für 6 Stunden, Probenvorbereitung siehe **Kapitel 10.2**, Parameter des Verfahrens siehe Salpetersäure-Verfahren, Verdünnung 1:100

Die Promastigoten LD 1 S.20 wurden für 6 Stunden mit 1 mg/mL Sb(V) als Stibogluconat inkubiert. Der Antimongesamtgehalt wurde zu $804 \pm 31,1 \mu\text{g}/10^6$ Zellen bestimmt. In den Promastigoten mit Sb(V) wurden $721 \pm 11,4 \mu\text{g}/10^6$ Zellen Sb(V) und $68 \pm 13,5 \mu\text{g}/10^6$ Zellen Sb(III) detektiert. Diese Werte entsprechen denjenigen für Promastigoten LD WT. Es ist keine signifikante Reduktion des Sb(V) innerhalb der Promastigoten nachweisbar, die geringe detektierte Sb(III)-Menge ist wahrscheinlich auf Redoxprozesse während der Probenvorbereitung zurückzuführen. Wie **Abbildung 10-6** zeigt, kommt es zu einer Metabolisierung in der Zelle. Es sind zwei mögliche, nicht identifizierte Antimonspezies im Chromatogramm zu erkennen, als A und D gekennzeichnet, zu der sich weitere Informationen in **Kapitel 10.8** finden.

Ergebnisse

Die Ergebnisse für Promastigoten LD 1 S.20 sind denen für Promastigoten LD WT sehr ähnlich. Insbesondere die Gesamtkonzentrationen und die ermittelten Mengen an reduzierbare Sb(III) und Sb(V) stimmen sehr gut überein. Bei Inkubation mit Sb(V) ist eine starke Verbreiterung des Sb(III)-Peaks zu beobachten, was auf eine Komplexierung mit Zellbestandteilen hindeuten könnte. Die verschiedene Metabolite werden in **Kapitel 10.8** charakterisiert. In den **Kapiteln 10.6** und **10.7** wird über die Zeitabhängigkeit und die Konzentrationsabhängigkeit der Antimonaufnahme diskutiert.

10.5.2 Untersuchung von Amastigoten

Bei die Amastigoten LD WT wurde eine Reduktionsaktivität für Sb(V) in den Zellen festgestellt. Die Resistenz von LD 1 S.20 gegen Sb(V) könnte über eine Hinderung dieser Reduktionsaktivität erklärt werden. Im Folgenden sollen die Ergebnisse für die Experimente mit Amastigoten LD 1 S.20 diskutiert werden.

Aufnahme und Metabolisierung von Sb(III)

Die Amastigoten LD 1 S.20 wurden für 6 Stunden mit $100 \mu\text{g} / \text{mL}$ Sb(III) (eine höhere Sb(III)-Konzentration hätte toxisch auf die Zellen gewirkt und zum Absterben geführt) als Tartrat inkubiert. Der Antimongesamtgehalt wurde zu $103 \pm 7,1 \mu\text{g}/10^6$ Zellen bestimmt. Er ist damit dem für die Amastigoten LD WT ermittelten Wert von $116 \mu\text{g}/10^6$ Zellen sehr ähnlich. In den Promastigoten mit Sb(III) wurden $79 \pm 6,3 \mu\text{g}/10^6$ Zellen Sb(III) und $19,1 \pm 1,7 \mu\text{g}/10^6$ Zellen Sb(V) detektiert. Es sind damit keine signifikanten Unterschiede im Vergleich mit LD WT inkubiert mit Sb(III) festzustellen. Wie **Abbildung 10-7** zeigt, kommt

es zu einer Metabolisierung in der Zelle, die sich durch die Peaks A, B und C im Chromatogramm zeigt, zu denen sich weitere Informationen in **Kapitel 10.8** finden.

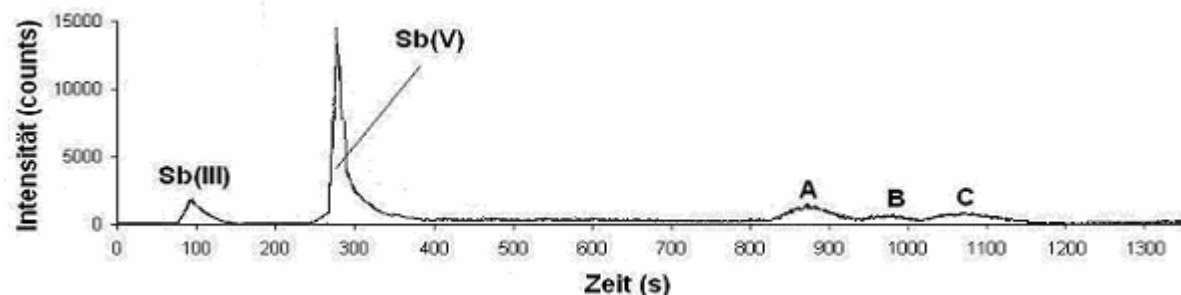


Abbildung 10-7: Chromatogramm einer Probe LD 1 S.20 ama nach Kultivierung mit Sb(V) für 6 Stunden, Probenvorbereitung siehe **Kapitel 10.2**, Parameter des Verfahren siehe Salpetersäure-Verfahren, Verdünnung 1:100

Aufnahme und Metabolisierung von Sb(V)

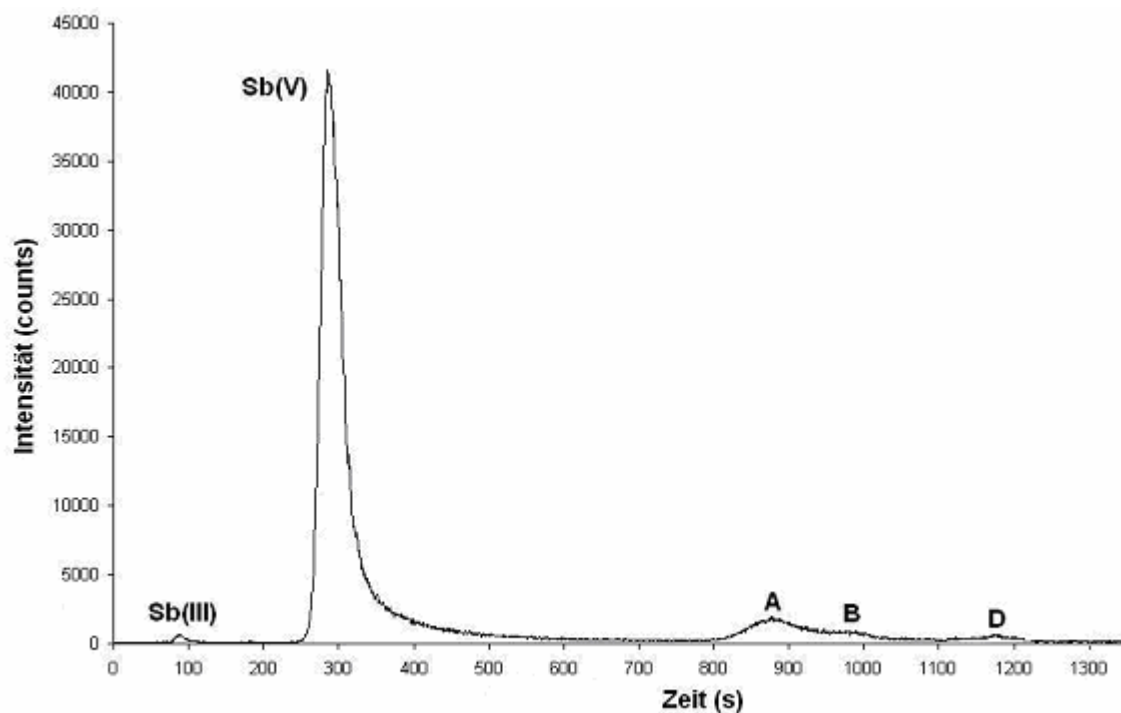


Abbildung 10-8: Chromatogramm einer Probe LD 1 S.20 ama nach Kultivierung mit Sb(V) für 6 Stunden, Probenvorbereitung siehe **Kapitel 10.2**, Parameter des Verfahren siehe Salpetersäure-Verfahren, Verdünnung 1:100

Die Amastigoten LD 1 S.20 wurden für 6 Stunden mit 1 mg/mL Sb(V) als Stibogluconat inkubiert. Der Antimongesamtgehalt wurde zu $1082 \pm 36,4 \mu\text{g}/10^6$ Zellen bestimmt. Bei Kultur mit Sb(V) wurden $47 \pm 7,8 \mu\text{g}/10^6$ Zellen Sb(III) und $833 \pm 18,1 \mu\text{g}/10^6$ Zellen Sb(V) detektiert. Im Gegensatz zu den Amastigoten LD WT ist somit keinerlei Reduktionsaktivität

nachweisbar, sodass die Inhibierung der Antimonreduktion als resistenzauslösende Mutation angesehen werden kann. Wie **Abbildung 10-8** zeigt, kommt es zu einer Metabolisierung in der Zelle. Drei mögliche, nicht identifizierte Antimonspezies im Chromatogramm zu erkennen, als A, B und D gekennzeichnet, zu denen sich weitere Informationen in **Kapitel 10.8** finden.

Ergebnisse

Für die Amastigoten LD 1 S.20 konnte keine Reduktionsaktivität von Sb(V) zu Sb(III) nachgewiesen werden. Damit wird die Hypothese unterstützt, dass die Resistenz dieses Stammes gegen Sb(V) auf einer Inhibierung der Reduktion beruht. Eine nähere Charakterisierung der Metabolite erfolgt in **Kapitel 10.8**. Die Zeitabhängigkeit und die Konzentrationsabhängigkeit der Antimonaufnahme werden in den **Kapiteln 10.6** und **10.7** diskutiert.

10.6 Zeitabhängigkeit der Reduktionsaktivität

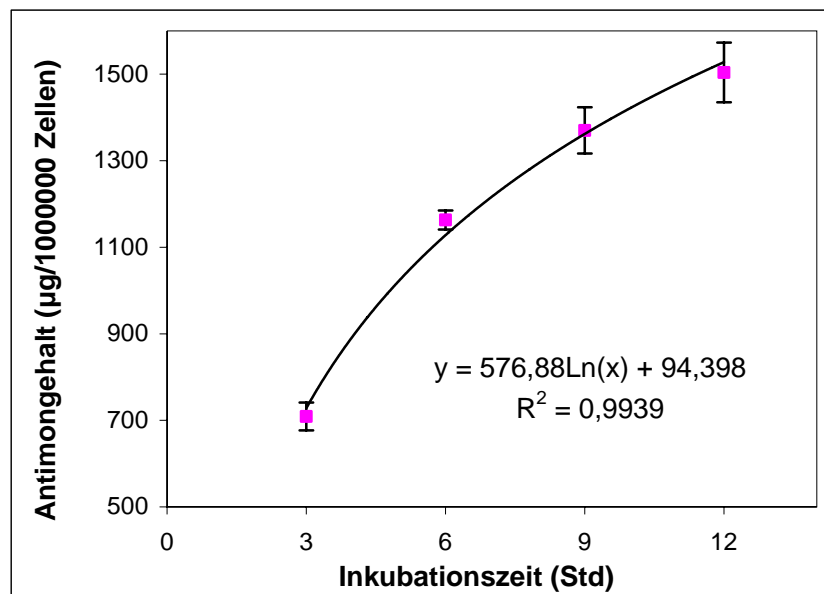


Abbildung 10-9: Zeitabhängigkeit der Reduktionsaktivität, Sb(III)-Konzentration gemessen mit dem Salpetersäure-Verfahren bei Amastigoten LD WT (s. **Kapitel 8.3.6**), Mittelwert aus 4 Wiederholmessungen

Um die Zeitabhängigkeit der Reduktionsaktivität für nicht antimonresistente Amastigoten zu untersuchen, wurden Zellkulturen für 3-12 Stunden mit Sb(V) kultiviert. Für Promastigoten und Amastigoten LD 1 S.20 ist keine Zeitabhängigkeit der Reduktionsaktivität nachweisbar, während die Sb(III)-Konzentration in den Amastigoten LD WT bei längerer Inkubation

signifikant zunimmt (siehe **Abbildung 10-9**). Die Zunahme der Sb(III)-Menge erfolgt dabei logarithmisch. In der **Abbildung 10-9** sind auch die Funktion $y(x)$ und der Korrelationskoeffizienten R^2 dargestellt.

Längere Inkubationszeiten als 12 Stunden waren nicht möglich, da sonst ein größerer Teil der Amastigotenzellen abzusterben beginnt. Die Reduktion von Sb(V) zu Sb(III) mit simultaner Akkumulation von Sb(III) in den Zellen scheint die Ursache für die Toxizität des Sb(V) gegenüber den Leishmaniazellen zu sein.

10.7 Konzentrationsabhängigkeit der Reduktionsaktivität

Die Konzentrationsabhängigkeit der Reduktionsaktivität wurde über die Inkubation von Promastigoten und Amastigoten LD WT und LD 1 S.20 mit verschiedenen Sb(V)-Mengen von 0,1-1 mg/mL untersucht. Für Promastigoten und Amastigoten LD 1 S.20 sowie für Promastigoten LD WT ist keine Konzentrationsabhängigkeit der Reduktionsaktivität nachweisbar, während die Reduktionsaktivität mit steigender Sb(V)-Konzentration in den Amastigoten LD WT signifikant zunimmt.

Wie die **Abbildung 10-10** zeigt, besteht zwischen der Menge des bei der Kultur eingesetzten Sb(V) und der durch Reduktion entstehenden Sb(III)-Mengen ein linearer Zusammenhang. Dort sind die Geradefunktion $y(x)$ und der Korrelationskoeffizient R^2 dargestellt.

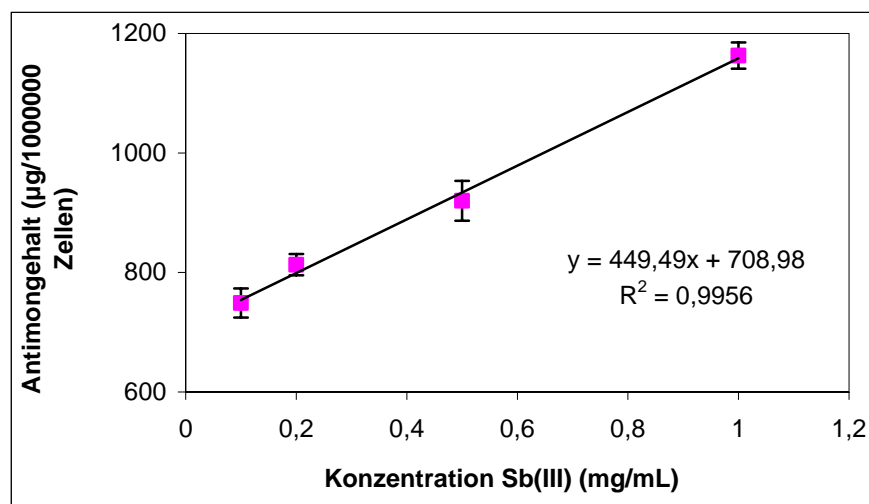


Abbildung 10-10: Konzentrationsabhängigkeit der Reduktionsaktivität, Sb(III)-Konzentration für Amastigoten LD WT, gemessen mit dem EDTA-Verfahren (s. **Kapitel 8.3.5**), Mittelwert aus 4 Wiederholmessungen

10.8 Charakterisierung der Metabolite

Zur Charakterisierung der Metabolite des Sb(III) und des Sb(V), die sich innerhalb der *Leishmania donovani*- Zellen gebildet haben, wurde die durchschnittliche Ladung der Spezies A bis E untersucht.

Im folgenden sollen die Ergebnisse kurz zusammengefasst werden. Eine weitergehende Charakterisierung dieser Spezies, bei denen es sich um Verbindungen mit Zellbestandteilen, Organoantimonmoleküle oder stabile Komplexe handeln könnte, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit zur Antimonspeziesanalytik mit elementspezifischer Detektion nicht durchgeführt.

Tabelle 10-3: Übersicht über die Ladungen der Antimonmetabolite^a

Signal im Chromatogramm	Anzahl der negativen Ladungen
A	3,83
B	4,26
C	5,01
D	5,14
E	5,44

^a ermittelt nach Small et al. mit dem EDTA-Verfahren mit 2, 5, 10 mmol/L EDTA

Um die durchschnittlichen Ladungen der Spezies zu untersuchen, wurde das EDTA-Verfahren eingesetzt und die Ladungen nach Small et al. berechnet (siehe **Kapitel 8.3.1**), die Konzentration wurde von 2 bis 10 mmol/L variiert, für weitere Informationen siehe **Kapitel 8.3.5**.

Die Signale der Spezies C bis E liegen im Chromatogramm dicht nebeneinander, sind jedoch ausreichend aufgelöst, um von mehreren Komponenten ausgehen zu können. Für diese drei Spezies wurden Ladungen von ca. -5 ermittelt, die Spezies haben längere Retentionszeiten als die Spezies A und B, außerdem sind die Signale häufig breit ohne ausgeprägtes Peakmaximum. Die Ladungen für die Spezies A und B wurden zu -3,86 und -4,26 bestimmt (siehe **Tabelle 10-3**).

10.9 Vergleich der Ergebnisse für beide Stämme von *Leishmania donov.*

Die Eigenschaften in bezug auf die Metabolisierung des Antimons unterscheiden sich für die untersuchten Stämme *Leishmania donovani*. Zusätzlich wurden auch Differenzen zwischen den Promastigoten und den Amastigoten festgestellt. Im Folgenden werden die Ergebnisse für die Stämme und die Parasitenstadien verglichen.

10.9.1 Vergleich der Antimonkonzentration

Vergleich der Gesamtgehalte

Der Gesamtgehalt der Zellproben wurde mit ICP-MS bestimmt, weitere Parameter siehe **Kapitel 10.3**. Sowohl für Promastigoten LD als für Amastigoten standen Vergleichswerte aus der Literatur zur Verfügung [248, 249], mit denen keine gute Übereinstimmung erreicht werden konnte. Die Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit sind in jedem Fall höher als die Literaturwerte. Akkumulation ist in erster Linie von der untersuchten Form (Promastigoten oder Amastigoten) und weniger vom eingesetzten Stamm (LD WT oder LD 1 S.20) abhängig, wie die **Abbildung 10-11** und **Abbildung 10-12** zeigen. Amastigoten akkumulieren deutlich mehr Antimon als Promastigoten bzw. bei Promastigoten wird das Antimon effektiver aus der Zelle exkretiert [248].

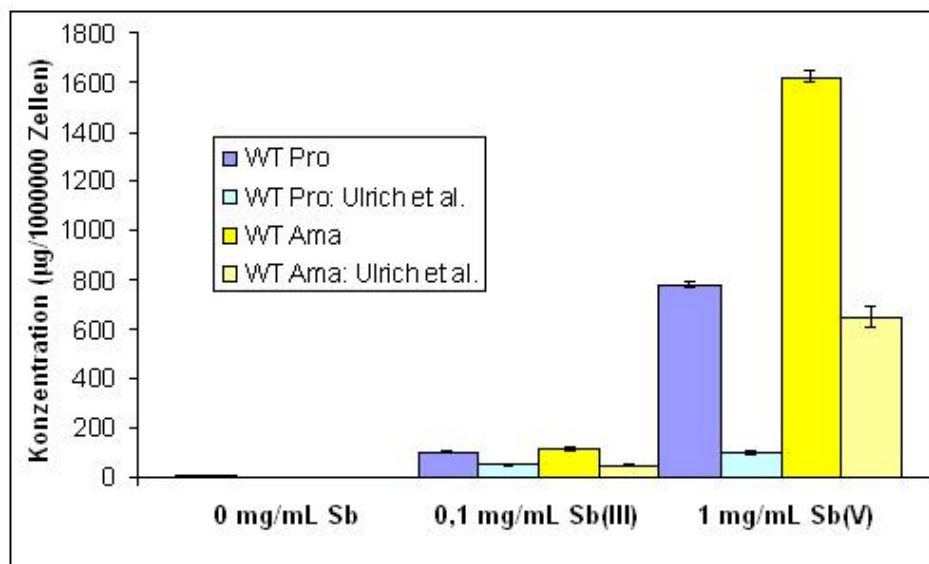


Abbildung 10-11: Antimongesamtgehalte von Promastigoten und Amastigoten von *Leishmania donovani* WT, kultiviert mit der angegebenen Antimonkonzentration für 6 Stunden, bestimmt mit ICP-MS im Vergleich zu Literaturwerten [249]

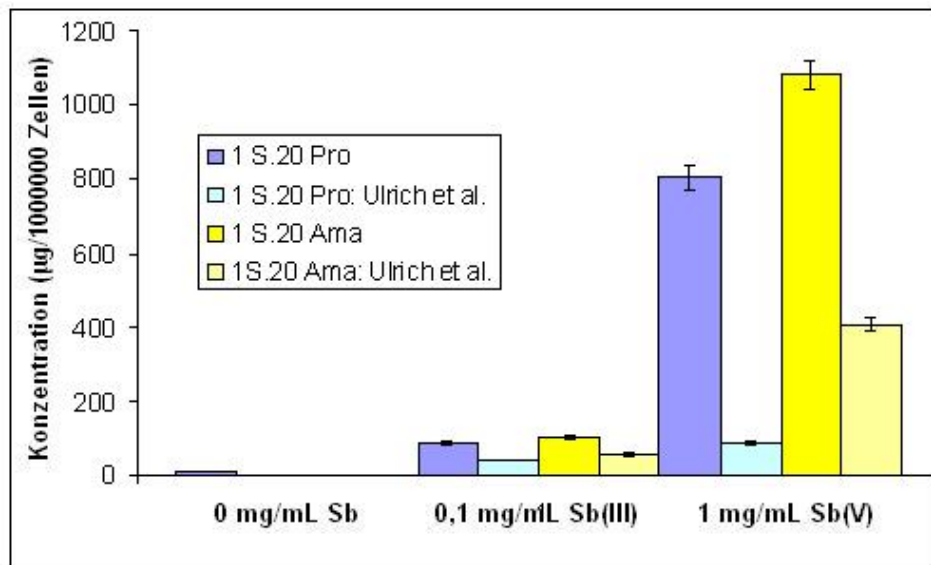


Abbildung 10-12: Antimongesamtgehalte von Promastigoten und Amastigoten von *Leishmania donovani* 1 S.20, kultiviert mit der angegebenen Antimonkonzentration für 6 Stunden, bestimmt mit ICP-MS im Vergleich zu Literaturwerten [249]

Vergleich der Konzentration des Sb(III)

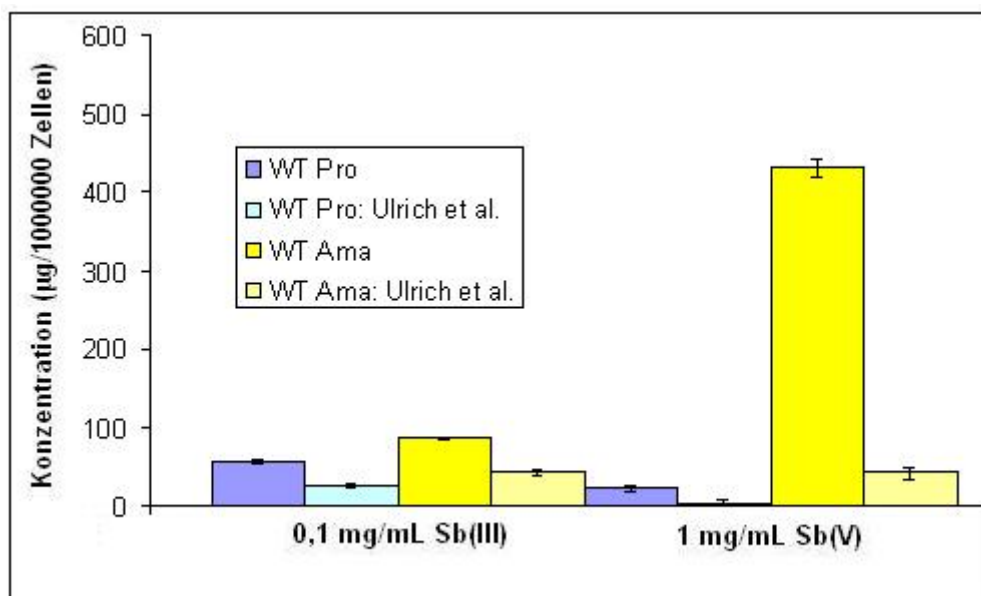


Abbildung 10-13: Sb(III)-Gehalte von Promastigoten und Amastigoten von *Leishmania donovani* WT, kultiviert mit der angegebenen Antimonkonzentration für 6 Stunden, bestimmt mit ICP-MS im Vergleich zu Literaturwerten [249]

Die Konzentration des Sb(III) in den Zellproben wurde mit HPLC-ICP-MS bestimmt, mit dem Salpetersäure-Verfahren, für weitere Parameter siehe **Kapitel 8.3.6**. In der **Abbildung**

10-13 und **Abbildung 10-14** werden sowohl für die Promastigoten LD als auch für die Amastigoten die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit mit den Literaturwerten, die zur Verfügung standen [248, 249], verglichen. Hier sind auch die Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit höher als die Literaturwerte. Akkumulation ist in erster Linie von der untersuchten Form (Promastigoten oder Amastigoten) und weniger vom eingesetzten Stamm (LD WT oder LD 1 S.20) abhängig, wie die **Abbildung 10-13** und **Abbildung 10-14** zeigen. Wie auch bei Sb(V) akkumulieren Amastigoten deutlich mehr Sb(III) als Promastigoten bzw. bei Promastigoten wird das Antimon effektiver aus der Zelle exkretiert [249].

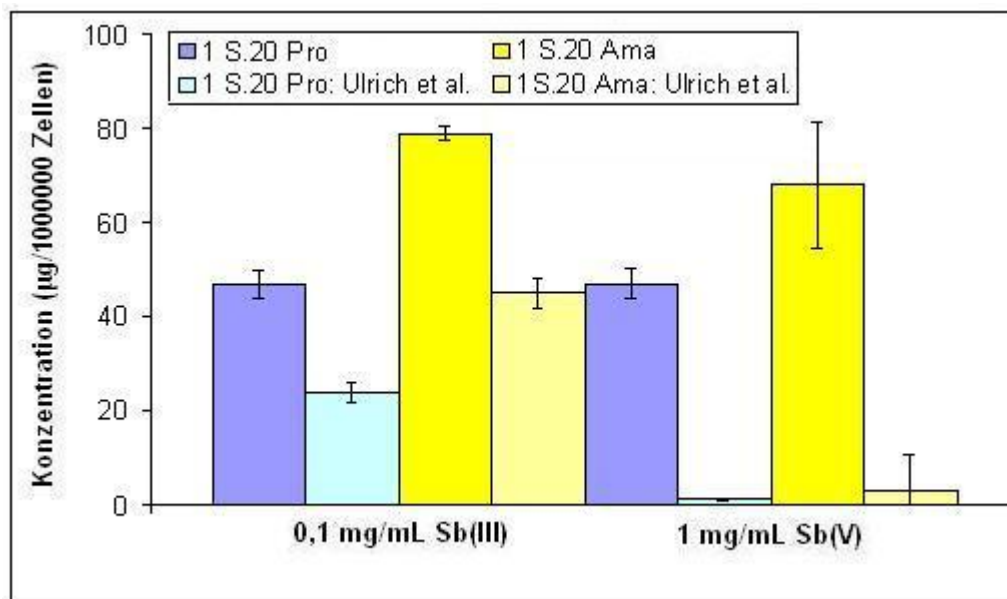


Abbildung 10-14:Sb(III)-Gehalte von Promastigoten und Amastigoten von *Leishmania donovani* 1 S.20, kultiviert mit der angegebenen Antimonkonzentration für 6 Stunden, bestimmt mit ICP-MS im Vergleich zu Literaturwerten [249]

Vergleich der Konzentration des Sb(V)

Die Konzentration des Sb(V) in den Zellproben wurde mit HPLC-ICP-MS bestimmt, mit den Salpetersäure-Verfahren, für weitere Parameter siehe **Kapitel 8.3.6**. Sowohl für Promastigoten LD als für Amastigoten wurde auch keine gute Übereinstimmung mit den Vergleichswerten aus der Literatur erreicht [248, 249]. Die Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit sind wieder höher. Wie beim Sb(III) ist Akkumulation in erster Linie von der untersuchten Form (Promastigoten oder Amastigoten) und weniger vom eingesetzten Stamm (LD WT oder LD 1 S.20) abhängig, wie die **Abbildung 10-13** und **Abbildung 10-14** zeigen. Dabei akkumulieren Amastigoten deutlich mehr Sb(V) als Promastigoten bzw. bei Promastigoten wird das Antimon effektiver aus der Zelle exkretiert [248].

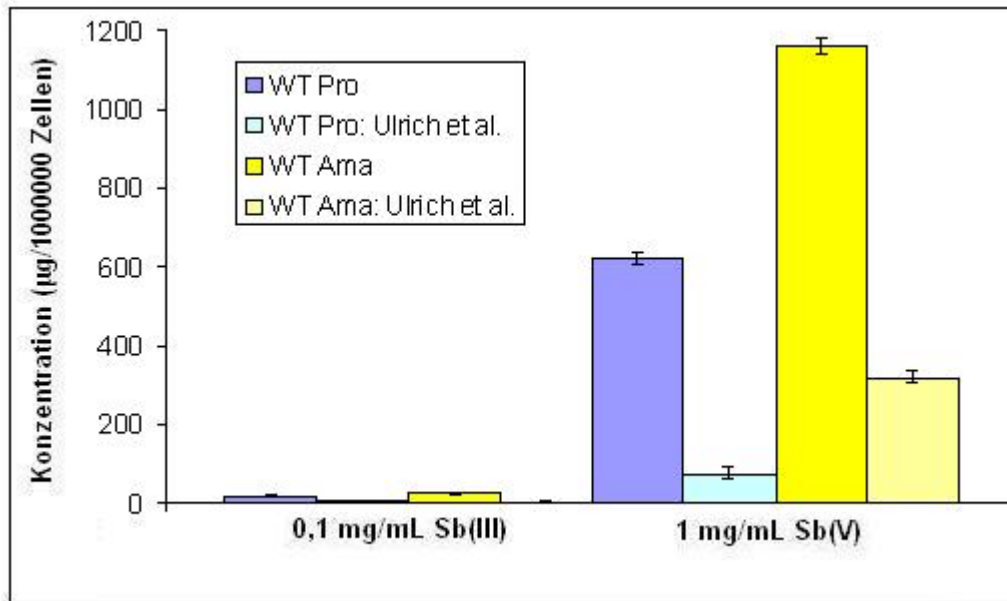


Abbildung 10-15: Sb(V)-Gehalte von Promastigoten und Amastigoten von *Leishmania donovani* WT, kultiviert mit der angegebenen Antimonkonzentration für 6 Stunden, bestimmt mit ICP-MS im Vergleich zu Literaturwerten [249]

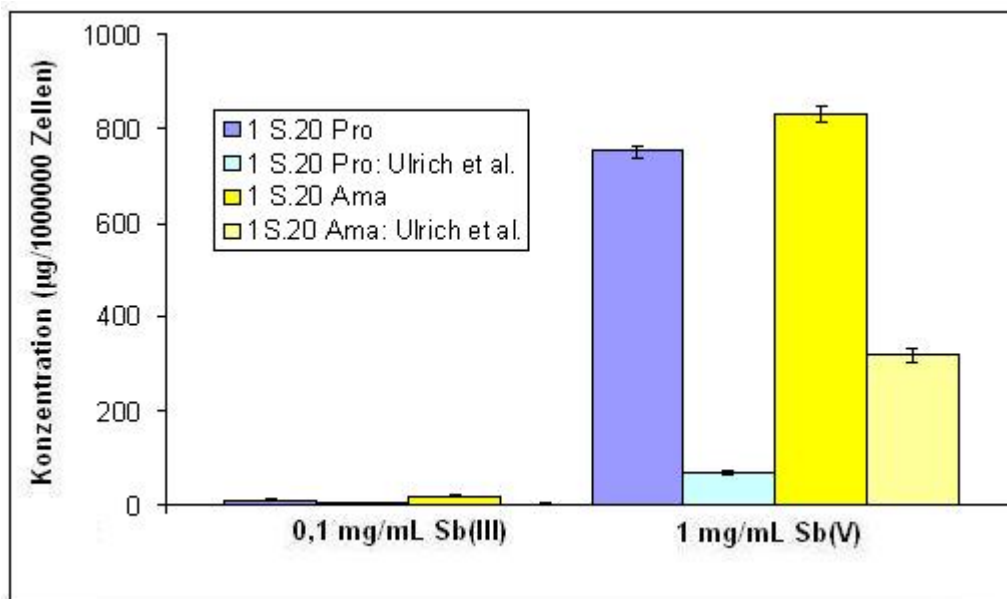


Abbildung 10-16: Sb(III)-Gehalte von Promastigoten und Amastigoten von *Leishmania donovani* 1 S.20, kultiviert mit der angegebenen Antimonkonzentration für 6 Stunden, bestimmt mit ICP-MS im Vergleich zu Literaturwerten [249]

10.9.2 Vergleich der Speziesverteilung

Die Speziesverteilung des Antimons innerhalb der *Leishmania donovani*-Zellen unterscheidet sich sowohl für die beiden Stämme als auch für die Stadien des Parasiten. Im folgenden werden daher die Ergebnisse für Promastigoten und Amastigoten getrennt zusammengefasst.

Promastigoten

Die Antimonaufnahme der Promastigoten LD WT und LD 1 S.20 unterscheidet sich bei der Kultur mit Sb(III) und Sb(V) nur wenig. Auch das Speziesmuster, d.h. die Verteilung zwischen Sb(III) und Sb(V) ist sehr ähnlich. Die Mutation des LD 1 S.20 hat somit kaum Einfluss auf die Eigenschaften der Promastigoten in bezug auf die Antimonmetabolisierung (siehe folgende Tabelle).

Tabelle 10-4: Sb-, Sb(III), Sb(V)-Gehalt in Promastigoten LD WT und LD 1 S.20^a

Zellkultur	Inkubiert mit ^a	Intrazelluläres Antimon		
		[µg Sb / 10 ⁶ Zellen]		
		Gesamtgehalt-Sb	Sb(III)	Sb(V)
LD WT	Sb(III) ^b	98 ± 3,4	56 ± 2,9	17,9 ± 1,7
LD WT	Sb(V) ^c	783 ± 13	23 ± 3,2	622 ± 16
LD WT	ohne Sb	6,86 ± 0,5		
LD 1 S.20	Sb(III) ^b	87 ± 5,6	44 ± 9,3	12 ± 2,6
LD 1 S.20	Sb(V) ^c	804 ± 31	68 ± 13	751 ± 11
LD 1 S.20	ohne Sb	9,4 ± 0,9		

^aNach 6 Stunden Inkubation, ^b0,1 mg Sb(III)/mL eines Kaliumantimonyltartratstandards, ^c1 mg Sb(V)/mL eines Natriumstibogluconatstandards

Tabelle 10-5: Sb-, Sb(III), Sb(V)-Gehalt in Amastigoten LD WT und LD 1 S.20^a

Zellkultur	Inkubiert mit	Intrazelluläres Antimon		
		[µg Sb / 10 ⁶ Zellen]		
		Gesamtgehalt-Sb	Sb(III)	Sb(V)
LD WT	Sb(III) ^b	116 ± 6,5	86 ± 1,6	24 ± 2,5
LD WT	Sb(V) ^c	1620 ± 24	432 ± 12	1163 ± 22
LD WT	ohne Sb	0,79 ± 0,1		
LD 1 S.20	Sb(III) ^b	103 ± 7,1	79 ± 6,3	19 ± 1,7
LD 1 S.20	Sb(V) ^c	1802 ± 36	47 ± 7,8	833 ± 18
LD 1 S.20	ohne Sb	0,67 ± 0,1		

^aNach 6 Stunden Inkubation, ^b0,1 mg Sb(III)/mL eines Kaliumantimonyltartratstandards, ^c1 mg Sb(V)/mL eines Natriumstibogluconatstandards

Die Amastigoten LD WT reduzieren intrazellulär Sb(V) zu Sb(III). Demgegenüber wird Sb(V) durch Amastigoten LD 1 S.20 nicht reduziert, wie in **Tabelle 10-5** dargestellt ist. Die Mutation des antimonresistenten Stammes inhibiert somit die Reduktionsaktivität. Für die Inkubation mit Sb(III) ergaben sich bei den Amastigoten vergleichbare Werte. Gegenüber Sb(V) verhalten sich Amastigoten LD 1 S.20 eher wie Promastigoten.

Vergleich der Metaboliten

Tabelle 10-6: Übersicht über mögliche Antimonspezies in den Zellproben^a

Stamm	Stufe	Kultur	A	B	C	D	E
LD WT	Promastigoten	Sb(III)	-	+	+	-	-
LD WT	Promastigoten	Sb(V)	+	+	-	+	-
LD WT	Amastigoten	Sb(III)	+	+	-	-	-
LD WT	Amastigoten	Sb(V)	-	+	+	-	+
LD 1 S.20	Promastigoten	Sb(III)	-	+	+	-	-
LD 1 S.20	Promastigoten	Sb(V)	+	-	-	+	-
LD 1 S.20	Amastigoten	Sb(III)	+	+	+	-	-
LD 1 S.20	Amastigoten	Sb(V)	+	+	-	+	-

^a mit dem Salpetersäure-Verfahren, Parameter siehe **Kapitel 8.3.6**

Tabelle 10-7: Übersicht der Retentionszeiten der mögliche Antimonspezies^{a,b}

Stamm	Stufe	Kultur	A	B	C	D	E
LD WT	Promastigoten	Sb(III)	-	975	1075	-	-
LD WT	Promastigoten	Sb(V)	885	990	-	1180	-
LD WT	Amastigoten	Sb(III)	875	980	-	-	-
LD WT	Amastigoten	Sb(V)	-	975	1080	-	1270
LD 1 S.20	Promastigoten	Sb(III)	-	970	1065	-	-
LD 1 S.20	Promastigoten	Sb(V)	870	-	-	1185	-
LD 1 S.20	Amastigoten	Sb(III)	870	980	1070	-	-
LD 1 S.20	Amastigoten	Sb(V)	890	985	-	1170	-

^a mit dem Salpetersäure-Verfahren, Parameter siehe **Kapitel 8.3.6**; ^b Retentionszeiten in Sekunden

Die **Tabelle 10-6** zeigt die Verteilung der einzelnen Signale bei Inkubation von LD WT und LD 1 S.20 Amastigoten und Promastigoten mit Sb(III) oder Sb(V) (mit 0,1 mg/mL Sb(III) bzw. mit 1 mg/mL Sb(V)). Ein Metabolit wird nur positiv angezeigt, wenn es in allen vier Messungen zu erkennen war. Es ist derzeit keine Zuordnung zu den untersuchten Stämmen, Stufen oder Kulturen möglich. Die **Tabelle 10-7** zeigt die verschiedenen Retentionszeiten der einzelnen Signale bei LD WT und LD 1 S.20 Amastigoten und Promastigoten. Die Retentionszeiten der aufgetretenen Peaks, die mit demselben Buchstaben gekennzeichnet wurden, sind vergleichbar, da die Schwankungsbreite klein ist. Aus diesem Grund wurden die Spezies A bis E weiter charakterisiert und ihre durchschnittliche Ladung berechnet.

In den Chromatogrammen der Zellproben sind fünf verschiedene Signale zu erkennen (A bis E), die möglicherweise Antimonpezies und –metaboliten zugeordnet werden können. In **Kapitel 10.8** wurden sie näher beschrieben. Eine genaue Charakterisierung war mit den im Rahmen der vorliegenden Arbeit entwickelten speziesanalytischen Verfahren mit elementspezifischer Detektion nicht möglich.

Vergleich der Salpetersäure- und der EDTA-Verfahren

Tabelle 10-8: Vergleich der Ergebnisse von der Salpetersäure- und der EDTA-Verfahren

Inkubiert mit	[µg Sb pro 10 ⁶ Zellen]	LD WT Promastigoten		LD WT Amastigoten	
		Salpetersäure	EDTA	Salpetersäure	EDTA
Sb(III)^a	Sb(III)	56 ± 2,9	63 ± 1,7	8,6 ± 1,6	102 ± 2,3
	Sb(V)	17,9 ± 1,7	21 ± 0,8	24 ± 2,5	25 ± 0,6
Sb(V)^b	Sb(III)	23 ± 3,2	28 ± 2,0	432 ± 12	471 ± 9,5
	Sb(V)	622 ± 16	647 ± 22	1163 ± 22	1215 ± 27

^a 0,1 mg Sb(III)/mL eines Kaliumantimonyltartratstandards

^b 1 mg Sb(V)/mL eines Natriumstibogluconatstandards

In der folgenden Tabelle und Diagrammen sind die Ergebnisse der Antimonergehalte in Promastigoten und Amastigoten der *Leishmania donovani* WT, gemessen mit den Salpetersäure- und mit den EDTA-Verfahren zusammengefasst.

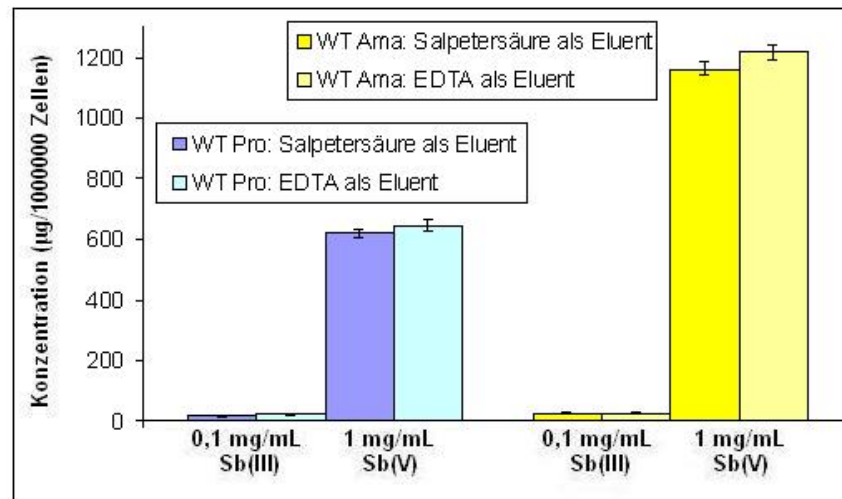


Abbildung 10-17: Sb(V)-Gehalte in Promastigoten und Amastigoten von *Leishmania donovani* WT, kultiviert mit der angegebenen Antimonkonzentration für 6 Stunden, bestimmt mit ICP-MS im Vergleich zu Literaturwerten

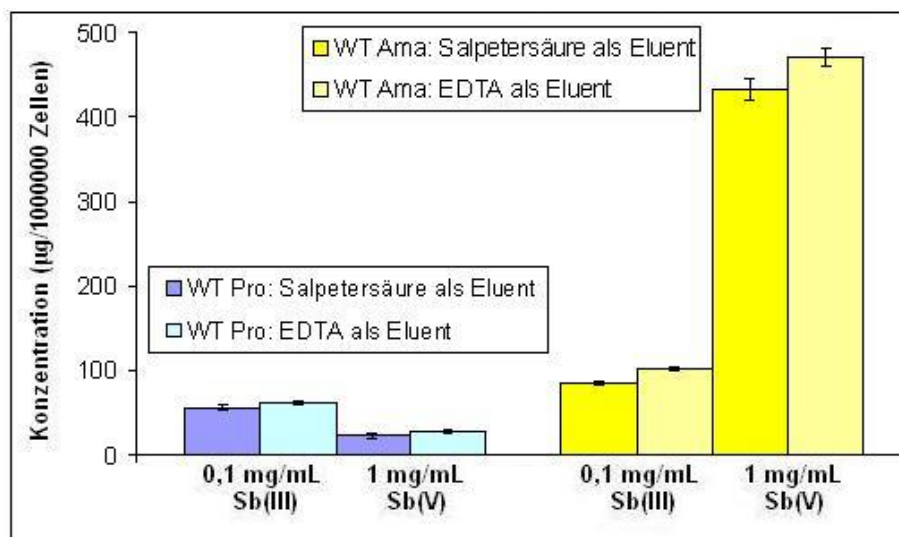


Abbildung 10-18: Sb(III)-Gehalte in Promastigoten und Amastigoten von *Leishmania donovani* WT, kultiviert mit der angegebenen Antimonkonzentration für 6 Stunden, bestimmt mit ICP-MS im Vergleich zu Literaturwerten

In der **Abbildung 10-17** ist die Konzentration des Sb(V) in den Zellproben, die mit HPLC-ICP-MS, mit dem Salpetersäure-Verfahren und mit dem EDTA-Verfahren bestimmt wurde und in der **Abbildung 10-18** ist die Konzentration des Sb(V) in den Zellproben, die mit HPLC-ICP-MS bestimmt wurde dargestellt. Sowohl für Promastigoten LD als für Amastigoten sind die Werte von Sb(V) und von Sb(III) höher beim EDTA-Verfahren als beim Salpetersäure-Verfahren, insbesondere für Sb(III). Das heißt, das EDTA effektiver als

Eluent und als Komplexbildner für die Bestimmung von Antimon in biologischen Proben ist. Die Unterschiede sind jedoch nicht so groß, dass es Auswirkungen auf die Interpretation der Messdaten in bezug auf die Reduktionsaktivität der Antimonzellen gibt.

10.10 Zusammenfassung der Untersuchung von Zellproben

Die Untersuchung von Zellproben als komplexe Matrices mit zahlreichen organischen Komponenten ist mit den chromatographischen Methoden, die im **Kapitel 8.3.6** und **8.3.5** vorgestellt wurden, möglich. Durch die Anwendung zweier, analytischer Verfahren lassen sich zuverlässige Aussagen über die Oxidationsstufen des Antimons in den Leishmaniazellen treffen.

Untersucht wurden die Promastigoten und Amastigoten eines nicht antimonresistenten sowie eines gegen Sb(V)-Präparate resistenten Stammes von *Leishmania donovani*. In den Promastigoten konnte keine signifikante Reduktionsaktivität festgestellt werden. Das Speziesmuster ist bei Zugabe verschiedener Antimonkomponenten für beide Zellarten ähnlich. Unterschiede ergaben sich dagegen bei den Amastigoten. Während sich die antimonresistenten Zellen ähnlich wie Promastigoten verhalten und keine Reduktion von Sb(V) zu Sb(III) nachweisbar ist, reduzieren nicht resistente Amastigoten Sb(V) zu Sb(III). Die Zunahme des Sb(III) als Reduktionsprodukt innerhalb der Amastigoten LD WT hat im Intervall von 3 bis 12 Stunden einen logarithmischen Verlauf, während die Variation der Inkubationskonzentration zu einer linearen Änderung der Sb(III)-Konzentration führt. Den logarithmischen Verlauf der Sb(III)-Zunahme als Reduktionsprodukt könnte man mit dem Verlauf einer typischen enzymatischen Reaktion vergleichen [250], was auf eine enzymatische Aktivität in den Promastigoten der *Leishmania* hindeutet und eine Unterstützung für die These der Wirkungsweise des Antimons in Leishmaniose-Erkrankten, wie im **Kapitel 6.8** dargestellt, bildet.

11 Untersuchung von Gewebeproben

Verbindungen des fünfwertigen Antimons, z. B. das Stibogluconat, werden als Therapeutika bei Behandlung der Leishmaniose eingesetzt (siehe **Kapitel 6**). Im vorliegenden Kapitel werden die Ergebnisse der Messungen an Gewebeproben vorgestellt. Dazu wurden Proben einer in-vivo-Studien an Mäusen die zum Teil mit *Leishmania* infiziert und mit Antimon behandelt worden waren, untersucht (Methode der in-vivo-Studie von Rondon et al. [251]). Dazu wurden die spezialanalytischen Methoden eingesetzt, die in **Kapitel 8** vorgestellt wurden.

Die Mäuse wurden am Weill-Medical College der Cornell Universität am Presbyterian Hospital, N.Y, USA infiziert und mit Sb(V) behandelt, danach wurden Proben aus der Leber und Milz entnommen. Die Amastigotenzellen wurden extrahiert und die Proben in der dortigen Arbeitsgruppe von Prof. H. Murray vorbereitet. Die analytische Methodenentwicklung und die Durchführung aller Gesamtgehaltsbestimmungen und spezialanalytischen Messungen erfolgten im Rahmen der vorliegenden Arbeit. Im Folgenden soll eine Übersicht der Problematik gegeben und anschließend die analytischen Ergebnisse diskutiert werden.

11.1 In-vivo-Kultur der Mäuse

Für die Untersuchung des Antimonmetabolismus in den Leishmaniazellen im In-Vivo-Experiment wurde eine Gruppe von 50 Mäusen (*Mus musculus*) mit viszeraler Leishmaniose (*Leishmania donovani*) infiziert. Alle Mäuse der Gruppe erkrankten, aber zwei davon starben vor dem Ende der Inkubationszeit, sodass sie nicht mit Natriumstibogluconat behandelt werden konnten. Nach zwei Wochen, hatte sich die Krankheit normal entwickelt, d.h. Leber und Milz der Tiere waren entzündet und geschwollen. Es bildeten sich als Granulomas bezeichnete, aktivierte Makrophagen, die die Parasitenzellen der *Leishmania* einschließen.

Infizierte und nicht infizierte Gruppen der Mäuse (insgesamt 96) wurden in zwei Gruppen geteilt um zwei Experimente durchzuführen, danach wurden die Ergebnisse verglichen und die Mittelwerte ermittelt. Alle Mäuse wurden einmalig mit 0 mg/kg bzw. 500 mg/kg Natriumstibogluconat behandelt. 1, 24 und 48 Stunden nach der einzelnen Injektion des Sb(V)-Präparates, wurden Leber und Milz der behandelten Mäuse vollständig entfernt. Anschließend wurden Leber und Milz zweimal mit eiskalter Phosphatpufferlösung gewaschen

und daraus das Gewebe gewonnen. Davon wurden jeweils 3 Proben pro Tier entnommen. Die Vorbereitung der Proben wurde in folgende beschrieben.

11.2 Probenvorbereitung der Gewebeproben

Die entnommenen Proben wurden in kleine Stücke geschnitten, stark zerkleinert und in 10 mL eiskalter Phosphatpufferlösung suspendiert. Die Suspensionen wurden zunächst zweimal für 30 Minuten bei 3000 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet oder Zellmembrane wurde aufgenommen und in 50 mL konzentrierter Salpetersäure 24 Stunden bei Raumtemperatur aufgeschlossen. Danach wurde 1 mL entionisiertes Wasser addiert und erneut zentrifugiert: zweimal für 10 Minuten bei 10000 rpm und 40°C.

Die Zellen, d. h. die Makrophagen wurden mit einem Homogenisierungspuffer (10mmol/L TRIS, pH 8,5, 2 mM Dithiothreitol oder DTT) homogenisiert.

Alle diese Experimente fanden am Weill-Medical College statt.

Das Volumen der Makrophagen-Fraktion wurde mit entionisiertem Wasser auf 1 mL gebracht, die Proben bei -20 °C eingefroren, im Gefrierschrank gelagert und mit Trockeneiskühlung per Luftpost von New York (USA) nach Hannover verschickt.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden der Gesamtgehalt und die Speziesverteilung des Antimons in der Makrophagen-Fraktion untersucht. Für die Untersuchung der Gesamtgehalt wurden 100 µL von den Proben entnommen und bis auf 1 mL verdünnt, davon wurden wieder 100 µL entnommen und bis auf 1 mL verdünnt (1:100-Verdünnung). Für die Antimon-speziation reichte eine 1:10-Verdünnung (100 µL der Proben auf 1 mL verdünnt), da die Proben durch den Eluent bei der Ionenchromatographie weiter verdünnt werden.

Da hier die ganzen Makrophagenzellen untersucht werden sollten, sind entsprechend mehr Schwierigkeiten mit der Matrix der Proben als im vorherigen Kapitel zu erwarten (siehe **Kapitel 10.2**), da hier nicht nur die in der Zytosolfraktion vorliegenden Moleküle in der Probe enthalten sind, sondern auch die verschiedene Zellorganellen mit ihren entsprechenden chemischen Bestandteilen. Da kommt auch das Problem zum tragen, dass einige der größten organische Moleküle mit Antimon Komplexe bilden können, wodurch sich die Trenneigenschaften stark verändern können. Obwohl die elementspezifischen Detektion

direkt nicht betroffen sein sollte, da die Konzentration nach der Trennung gering genug sein sollte, sind dennoch große Matrixeffekte zu erwarten. Die großen Moleküle wie Proteine und andere großen Zellbestandteile können die chromatographische Säule irreversibel belegen und so zu nicht reproduzierbaren Messwerten führen. Außerdem können auch Antimonspezies auf der Säule an den Zellbestandteilen fixiert werden.

11.3 Antimonanalytik in den Gewebeproben

Um die Gewebeproben zu charakterisieren, wurde zunächst der Gesamtantimongehalt der Zellextrakte (Probenvorbereitung siehe **Kapitel 11.2**) mit ICP-MS quantifiziert. Anschließend wurde der Gehalt von Sb(III) und Sb(V) mit IC-ICP-MS bestimmt. In der folgenden Tabelle sind die eingesetzten Verfahren mit einigen Besonderheiten zusammengefasst. Weitere Information zu den Parametern sind in **Kapitel 8.3.6** und **8.3.5** zusammengefasst.

Tabelle 11-1: Eingesetzte Verfahren zur Untersuchung der Gewebeproben.

Parameter	Gesamtgehalt	Speziesanalytik I	Speziesanalytik II
Methode	ICP-MS	EDTA-Verfahren	Salpetersäure-Verfahren
Interferenzkontrolle	Isotopenverhältnis von ^{121}Sb und ^{123}Sb	Isotopenverhältnis von ^{121}Sb und ^{123}Sb	Isotopenverhältnis von ^{121}Sb und ^{123}Sb
Interner Standard	^{115}In	kein	kein

11.4 Untersuchung des Sb-Gesamtgehaltes in den Gewebeproben

Der Gesamtgehalt der Gewebeproben wurde zunächst mit externer Kalibration bestimmt. Bei den chromatographischen Messungen wurde danach jedoch ein starker Matrix-Effekt festgestellt, sodass die Proben ein weiteres Mal mit Standardaddition gemessen wurden. Die Ergebnisse, die in den **Tabelle 11-2** und **Tabelle 11-3** dargestellt sind, wurden mit ICP-MS mit Standardaddition bestimmt, weitere Parameter siehe **Kapitel 11.2** und **11.3**.

Tabelle 11-2: Sb-Gehalt in infizierten und nicht infizierten Milzproben

Nicht infizierte Proben			Infizierte Proben		
Probe	gemessen nach [Std.]	[$\mu\text{g Sb /mg Gewebe}$] Sb-Gehalt	Probe	gemessen nach [Std.]	[$\mu\text{g Sb /mg Gewebe}$] Sb-Gehalt
Milz	0	$2,8 \pm 0,4$	Milz	0	$1,9 \pm 0,04$
Milz	1	$27,9 \pm 2,12$	Milz	1	$23,18 \pm 4,3$
Milz	24	$10,9 \pm 0,9$	Milz	24	$6,6 \pm 0,5$
Milz	48	$9,59 \pm 0,5$	Milz	48	$4,85 \pm 0,14$

Parameter der Auswertung siehe **Kapitel 11.3**

Tabelle 11-3: Sb-Gehalt in infizierten und nicht infizierten Leberproben

Nicht infizierte Proben			Infizierte Proben		
Probe	gemessen nach [Std.]	[$\mu\text{g Sb /mg Gewebe}$] Sb-Gehalt	Probe	gemessen nach [Std.]	[$\mu\text{g Sb /mg Gewebe}$] Sb-Gehalt
Leber	0	$1,6 \pm 0,1$	Leber	0	$1,7 \pm 3,4$
Leber	1	$26,4 \pm 3,4$	Leber	1	$22,5 \pm 1,11$
Leber	24	$18,2 \pm 0,5$	Leber	24	$14,5 \pm 0,13$
Leber	48	$11,7 \pm 0,6$	Leber	48	$10,8 \pm 0,7$

Parameter der Auswertung siehe **Kapitel 11.3**

Sowohl für die Milzproben als auch für die Leberproben standen keine Vergleichswerte aus der Literatur zur Verfügung. Die Gesamtgehalte des Antimons in den untersuchten Mäusen sind in jeden Fall höher für nicht infizierte als für infizierte Tiere. Wie die **Abbildung 11-1** und **Abbildung 11-2** zeigen, ist die Antimonkonzentration zeitabhängig und nimmt mit der Zeit ab. Außerdem nimmt die Akkumulation von Sb in den Milzproben schneller als in den Leberproben ab. Eine Erklärung dafür ist eine effektivere Exkretion aus der Milz als aus der Leber.

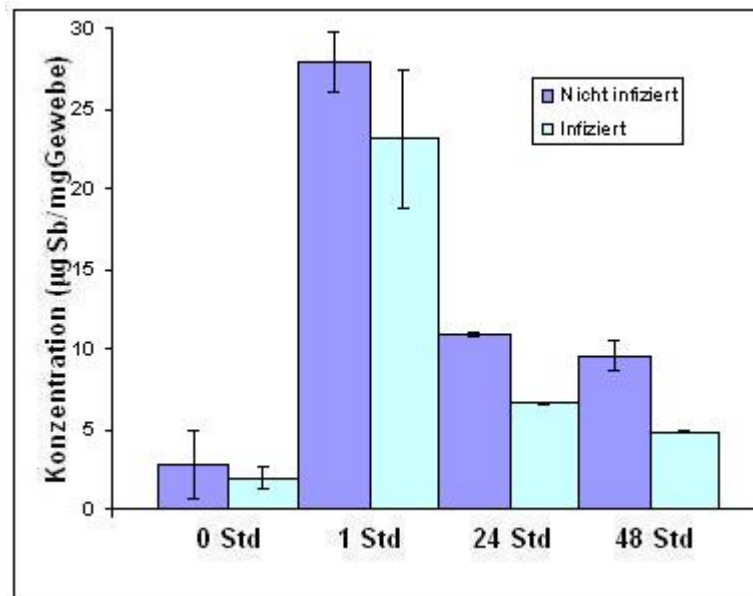


Abbildung 11-1: Antimongesamtgehalte in Milzproben von nicht infizierten und infizierten Mäusen, mit 500 mg/kg Stibogluconat behandelt, 0, 1, 24, 48 Stunden nach der Behandlung, bestimmt mit ICP-MS

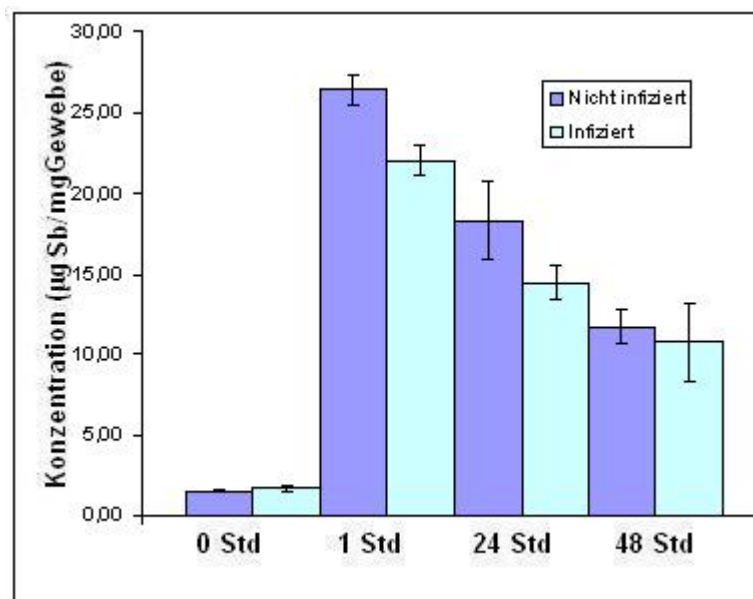


Abbildung 11-2: Antimongesamtgehalte in Leberproben von nicht infizierten und infizierten Mäusen, mit 500 mg/kg Stibogluconat behandelt, 0, 1, 24, 48 Stunden nach der Behandlung, bestimmt mit ICP-MS

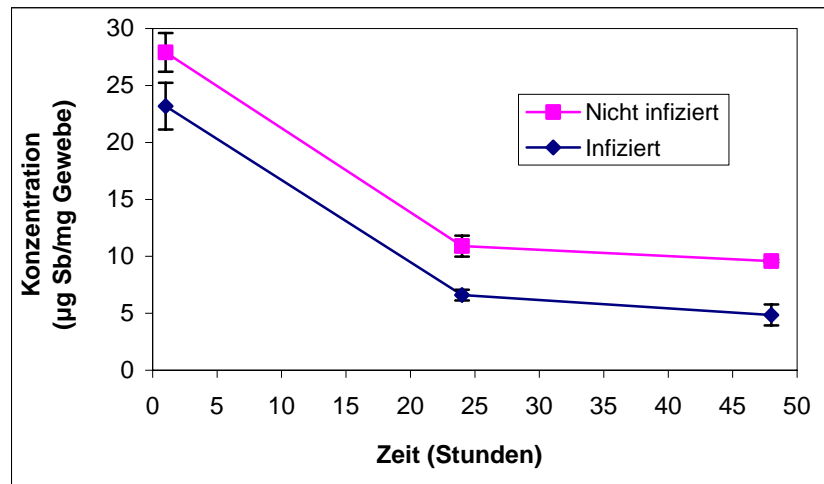


Abbildung 11-3: Zeitabhängigkeit der Antimonkonzentration in den Milzproben, gemessen mit ICP-MS, Mittelwert aus 6 Wiederholmessungen

Um die Zeitabhängigkeit der Antimonkonzentration zwischen Leber- und Milzproben zu vergleichen, wurden in der **Abbildung 11-3** und **Abbildung 11-4** die Antimonkonzentration in infizierten und nicht infizierten Proben gegen die Zeit dargestellt: Die Leberzellen exkretieren Antimon mit einer fast linearen Zeitabhängigkeit, während die Abnahme der Antimonkonzentration für die Milzzellen nicht linear ist.

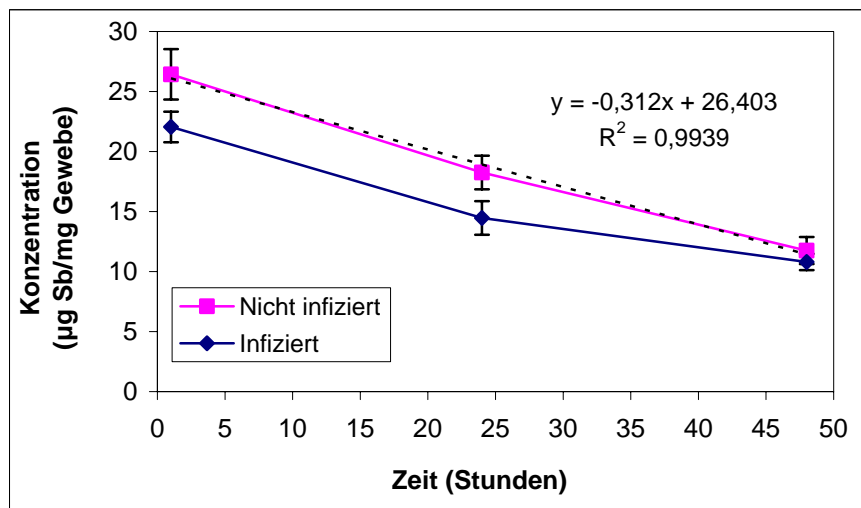


Abbildung 11-4: Zeitabhängigkeit der Antimonkonzentration in den Leberproben, gemessen mit ICP-MS, Mittelwert aus 6 Wiederholmessungen

11.5 Untersuchung von Milzproben (Speziation)

Im ersten Schritt wurden Gewebeproben aus der Milz von infizierten und nicht infizierten Mäusen mit viszeraler Leishmaniose, die mit 500 mg/kg Natriumstibogluconat 0, 1, 24 und 48 Stunden behandelt wurden, untersucht. Die Amastigotenstufe, das Zellenstadium der

Leishmania-Erreger, das sich im Säugetier befindet, ist sowohl gegenüber Sb(III) als auch Sb(V) empfindlich. Da Sb(III) als eigentlich toxisches Agens angesehen wird, könnte die Toxizität des Sb(V) auf der Reduktion zu Sb(III) beruhen. Dabei ist auch zu klären, ob die Reduktion des Antimons direkt in den Parasitenzellen oder bereits in den Säugetiermakrophagen passiert. Im Folgenden werden die Ergebnisse der Experimente vorgestellt.

Bei den Chromatogrammen ist die Verdünnung in Relation zur Originalprobe (Makrophagenfraktion aufgefüllt auf 1 mL) angegeben. Unterschiede in den Signalintensitäten ergeben sich aus den Differenzen der Zellmengen pro Probe. Nicht identifizierte Peaks, die möglicherweise Metabolisierungsprodukte des Antimons innerhalb der Zellen darstellen, sind durch Buchstaben, wie im vorherigen Kapitel, gekennzeichnet. Signale mit vergleichbaren Retentionszeiten werden durch dieselben Buchstaben repräsentiert.

11.5.1 Untersuchung von nicht infizierten Mäusen

Mäuse, die nicht mit der viszeralen Leishmaniose infiziert sind, wurden auch mit dem Sb(V)-Präparat behandelt, um Vergleichswerte von einer Kontrollgruppe zu erhalten. Die Akkumulation der Antimonspezies sowie deren Metabolisierung ist im Folgenden dargestellt. Die Untersuchungen von Sb(III) und Sb(V) wurden mit dem IC-ICP-MS (Salpetersäure-Verfahren) ermittelt.

Aufnahme und Metabolisierung von Sb(V)

Wie **Abbildung 11-5** zeigt, kommt es zu einer möglichen Metabolisierung in der Zelle. Eine nicht identifizierte Antimonspezies ist im Chromatogramm als D bezeichnet. Weitere Informationen zu nicht zuzuordnenden Signalen bzw. Antimonspezies finden sich in **Kapitel 11.11**. Die ersten beiden Peaks (in folgenden als X und Y bezeichnet) und die Matrixprobleme werden in **Kapitel 11.7** und **11.10** näher erläutert. Außerdem standen keine Vergleichswerte oder Einschätzungen über der Reduktion von Sb(V) zu Sb(III) in in-vivo-Experimenten zur Verfügung.

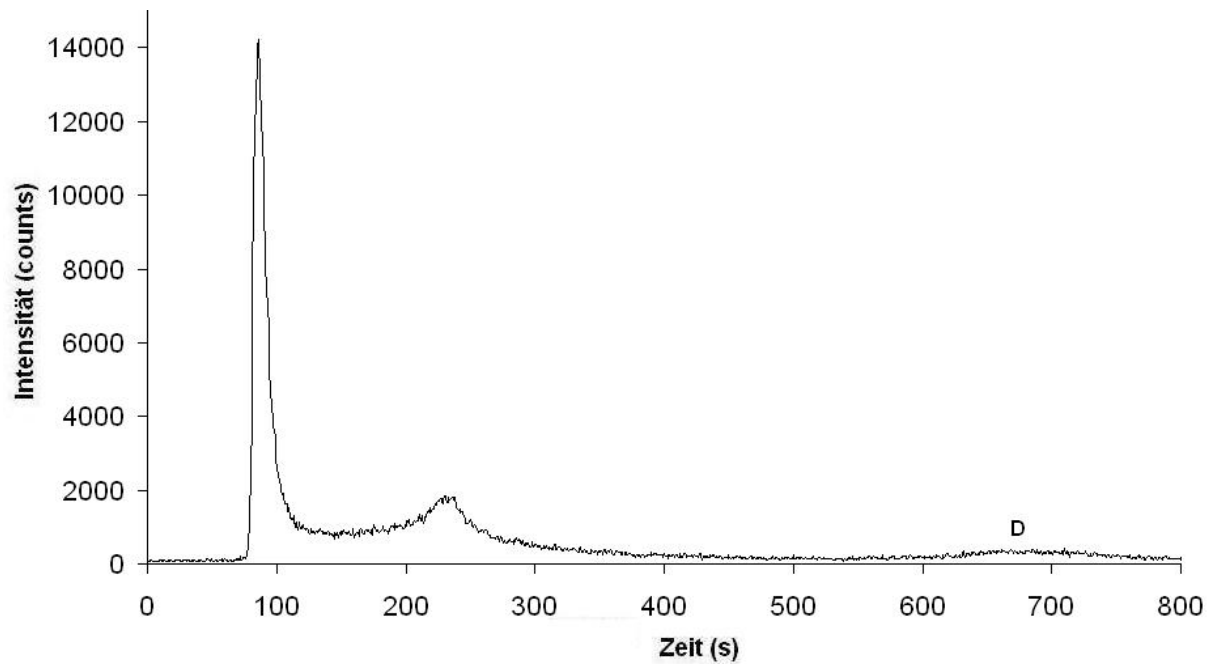


Abbildung 11-5: Chromatogramm einer nicht infizierten Milzprobe, 1 Stunde nach der Behandlung, Probenvorbereitung siehe **Kapitel 11.2**, Parameter des Verfahrens siehe Salpetersäure-Verfahren, Verdünnung 1:10

11.5.2 Untersuchung von infizierten Proben

Sowohl Sb(III) als auch Sb(V) besitzen eine hohe Toxizität für Amastigoten. Reduktion von Sb(V) zu Sb(III) ist eine Erklärungsmöglichkeit, z. B. wenn die Amastigoten über ein spezifisches Enzym, eine Art Antimonreduktase, verfügen. Im Folgenden wird das Chromatogramm einer infizierte Milzprobe, extrahiert 1 Stunden nach der Behandlung, vorgestellt.

Aufnahme und Metabolisierung von Sb(V)

Die Mäuse wurden mit der viszeralen Leishmaniose infiziert und nach zwei Wochen einmalig mit 500 mg/kg Sb(V) als Stibogluconat behandelt. Eine Stunde danach wurde die Milz extrahiert und die Probe vorbereitet. Wie **Abbildung 11-6** zeigt, kommt es zu einer Metabolisierung in der Zelle. Zwei nicht identifizierte Antimonspezies sind im Chromatogramm als B und E gekennzeichnet, zu denen sich weitere Informationen in **Kapitel 11.11** finden. Die ersten beiden Peaks und die Matrixprobleme werden in **Kapitel 11.7** und **11.10** näher erläutert. Außerdem standen keine Vergleichswerte oder Einschätzungen über die Reduktion von Sb(V) zu Sb(III) in in-vivo-Experimenten zu Verfügung.

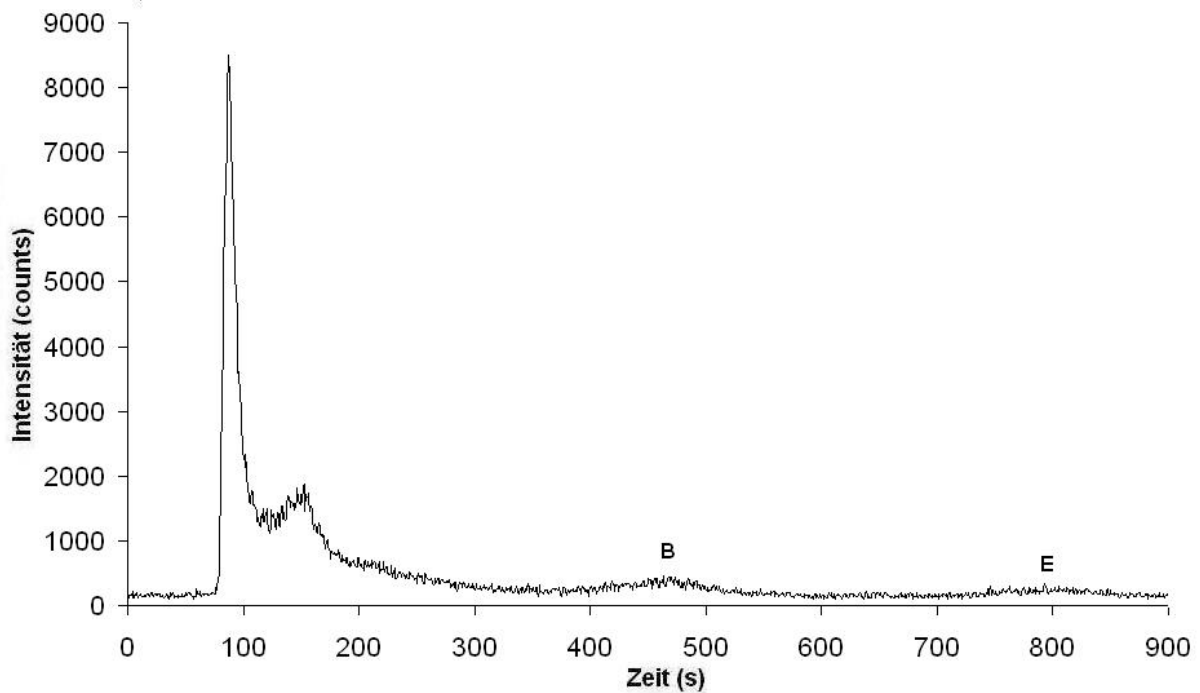


Abbildung 11-6: Chromatogramm einer infizierten Milzprobe, 1 Stunde nach der Behandlung, Probenvorbereitung siehe **Kapitel 11.2**, Parameter des Verfahrens siehe Salpetersäure-Verfahren, Verdünnung 1:10

11.6 Untersuchung von Leberproben (Speziation)

Um Unterschiede in der Metabolisierung zwischen Milz- und Leberproben zu ermitteln, wurden zusätzlich zu Milzproben auch Leberproben untersucht. Die Proben wurden genauso vorbereitet wie die Milzproben. Diese Reduktionsaktivität kann entweder direkt in der Parasitenzelle oder im Säugetiermakrophagen stattfinden. Im Folgenden werden die Ergebnisse der Experimente vorgestellt.

Bei den Chromatogrammen ist die Verdünnung in Relation zur Originalprobe (Makrophagen-Fraktion aufgefüllt auf 1 mL) angegeben. Nicht identifizierte Peaks, die möglicherweise Metabolisierungsprodukte des Antimons innerhalb der Zellen darstellen, sind durch Buchstaben gekennzeichnet. Signale mit vergleichbaren Retentionszeiten werden hier wieder durch dieselben Buchstaben repräsentiert.

11.6.1 Untersuchung von nicht infizierte Proben

Hier wurde Leberproben von nicht infizierten Mäusen analysiert, die einmalig mit 500 mg/kg Sb(V) als Stibogluconat behandelt worden sind. Die Zellen sind weniger anfällig gegen Sb(V)

als gegen Sb(III), da Sb(III) viel toxischer ist. Die Akkumulation der Antimonspezies sowie deren Metabolisierung ist im Folgenden dargestellt. Die Untersuchung des Sb(III) und Sb(V) wurde mit dem Salpetersäure-Verfahren ermittelt.

Aufnahme und Metabolisierung von Sb(V)

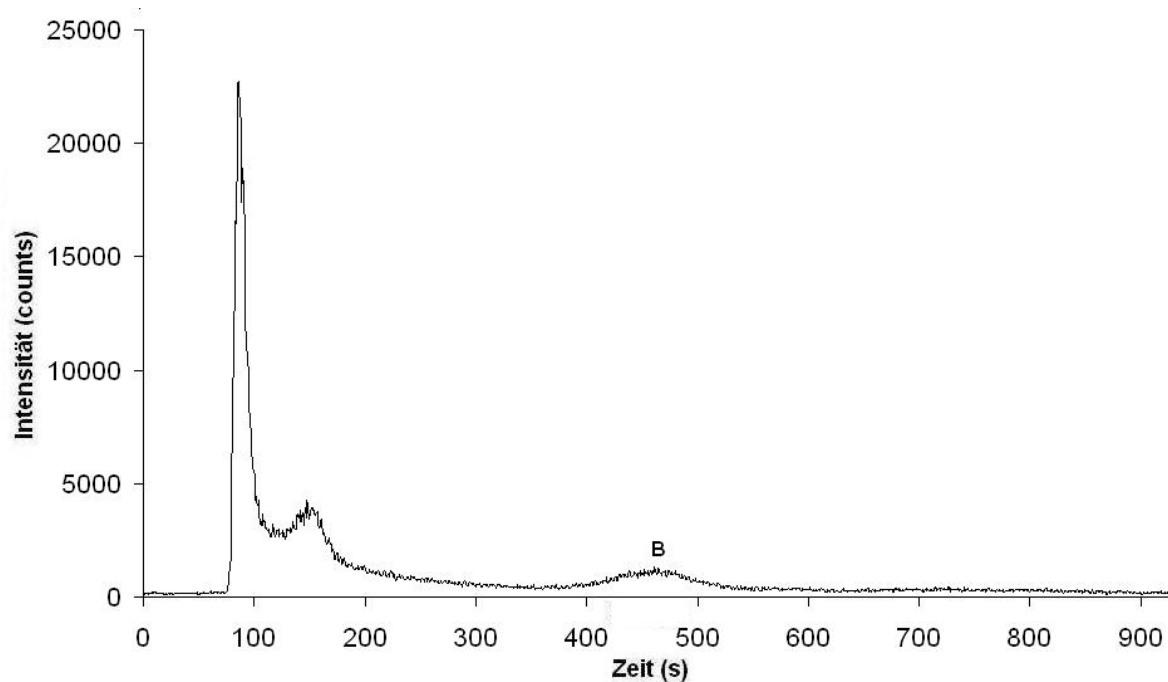


Abbildung 11-7: Chromatogramm einer nicht infizierten Leberprobe, 1 Stunde nach der Behandlung, Probenvorbereitung siehe **Kapitel 11.2**, Parameter des Verfahrens siehe Salpetersäure-Verfahren, Verdünnung 1:10

Die Proben wurden 1 Stunde nach der Behandlung aufgenommen und vorbereitet, wie in **Kapitel 11.2** dargestellt. Wie **Abbildung 11-7** zeigt, kommt es zu einer Metabolisierung in der Zelle. Es sind zwei mögliche, nicht identifizierte Antimonspezies im Chromatogramm zu erkennen, als A und D gekennzeichnet, zu denen sich weitere Informationen in **Kapitel 11.11** finden. Die ersten beiden Peaks und die Matrixprobleme werden in **Kapitel 11.7** und **11.10** näher erläutert.

11.6.2 Untersuchung von infizierten Proben

Bei den infizierten Mäusen wurden auch Leberproben zur Untersuchung genommen. Im Folgenden sollen die Ergebnisse für die Experimente dargestellt werden.

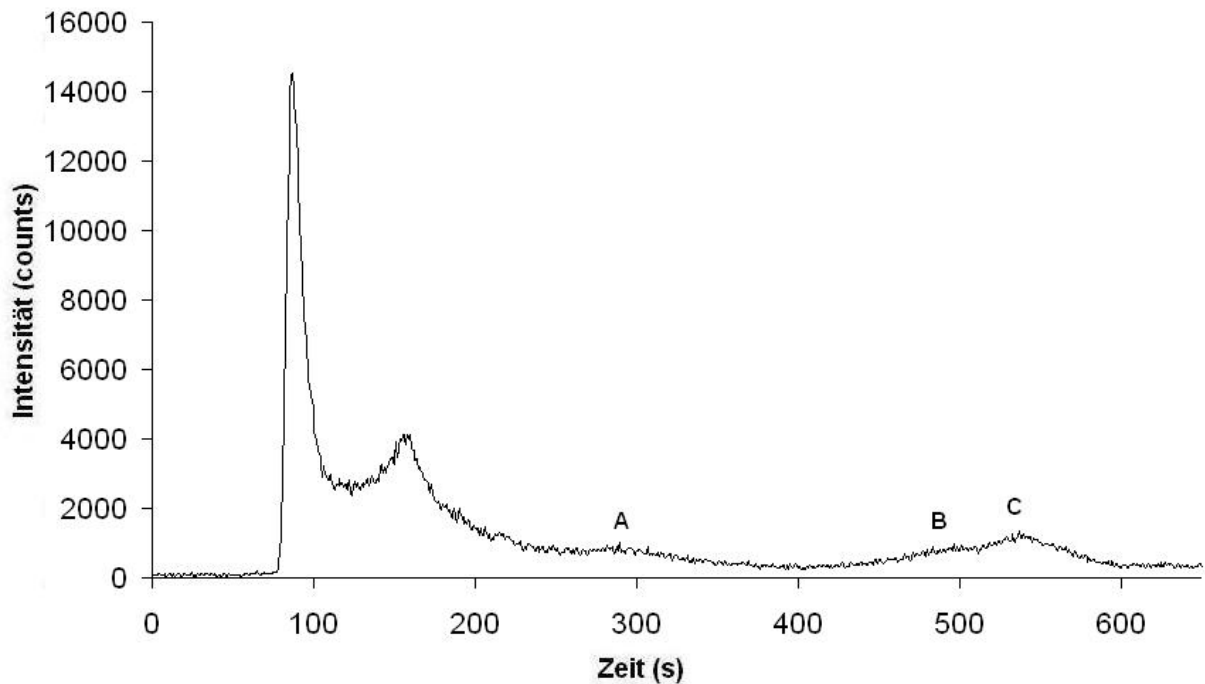
Aufnahme und Metabolisierung von Sb(V)

Abbildung 11-8: Chromatogramm einer infizierten Leberprobe, 1 Stunde nach der Behandlung, Probenvorbereitung siehe **Kapitel 11.2**, Parameter des Verfahrens siehe Salpetersäure-Verfahren, Verdünnung 1:10

Die Mäuse wurden mit der viszeralen Leishmaniose infiziert und nach zwei Wochen einmalig mit 500 mg/kg Sb(V) als Stibogluconat behandelt. Eine Stunde danach wurde die Leber extrahiert und die Probe vorbereitet. Wie **Abbildung 11-8** zeigt, kommt es zu einer Metabolisierung in der Zelle. Drei nicht identifizierte Antimonspezies sind im Chromatogramm zu erkennen, als A, B und C gekennzeichnet, zu denen sich weitere Informationen in **Kapitel 11.11** finden. Die ersten beiden Peaks und die Matrixprobleme werden in **Kapitel 11.7** und **11.10** näher erläutert.

11.7 Matrixprobleme

Biologische Proben haben im Allgemeinen sehr komplexe Matrizes, die neben den anorganischen Antimonspezies viele organische Komponenten enthalten, die von einfachen Verbindungen bis zu komplexen Makromoleküle reichen. Diese komplexen Matrizes können so genannte Matrix-Effekt verursachen, d. h. Störungen und Veränderungen der untersuchten Spezies durch Matrixbestandteile unter den Analysenbedingungen. Dieses ist hier wahrscheinlich der Fall. Diese Schlussfolgerung wurde nach den ersten Speziationsexperimenten (siehe **Kapitel 11.8**) gezogen. Eine externe Kalibration sollte daher

nicht auf Gewebeproben angewendet werden, weder für die Bestimmung der Gesamtgehalte (siehe **Kapitel 11.9**) noch für die Speziation (siehe **Kapitel 11.10**).

11.8 Matrixprobleme bei der Speziation

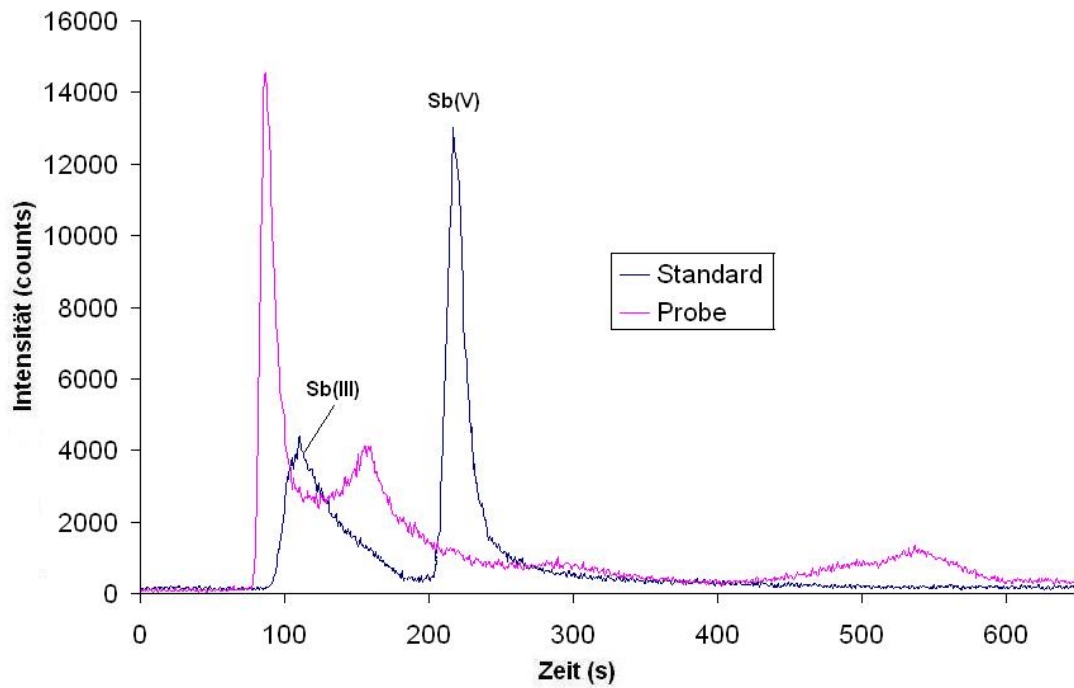


Abbildung 11-9: Chromatogramme einer infizierten Leberprobe, 1 Stunde nach der Behandlung und einer Standardlösung (100 $\mu\text{g/L}$ Sb(III) und 100 $\mu\text{g/L}$ Sb(V)), Probenvorbereitung siehe **Kapitel 11.2**, Parameter des Verfahrens siehe Salpetersäure-Verfahren, Verdünnung 1:10

Bei der Speziation der Milz- und Leberproben und der Auswertung der Ergebnisse sind folgende Probleme aufgetaucht: die Retentionszeiten der ersten beiden Peaks sind nicht mit der Retentionszeiten des Sb(III) und Sb(V) vergleichbar (siehe **Abbildung 11-9**). Daher kann keine sichere Zuordnung der Signale zu den Antimonspezies erfolgen.

Wie im den vorherigen **Kapitel** schon erläutert wurde, können die biologischen Proben so genannte Matrix-Effekte verursachen, daher wurde die Standardadditionsmethode verwendet.

11.9 Standardaddition bei der Gesamtgehaltsbestimmung

In der **Abbildung 11-10** und der **Abbildung 11-11** sind Kalibrationen für die Standardaddition in zwei untersuchten Proben dargestellt. Es zeigte sich in beiden Fällen ein

Matrixeffekt, der mit einer Erhöhung der Signalintensität verbunden war. Die Steigung der Standardadditions-Kalibrationskurve ist höher als die der externen Kalibration.

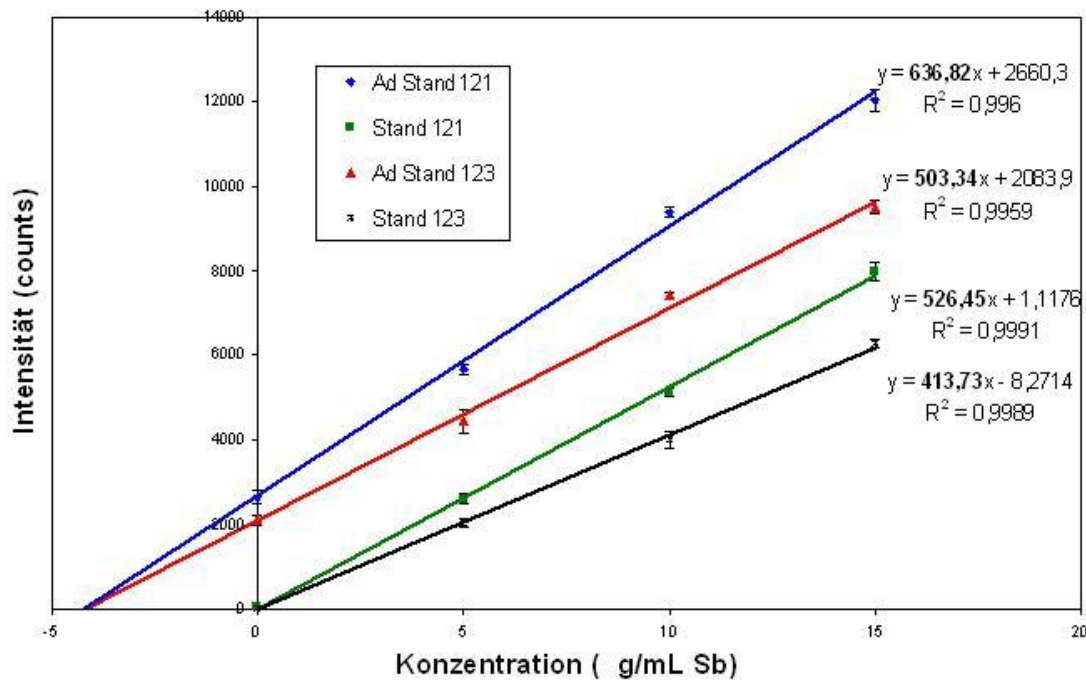


Abbildung 11-10: Kalibrationskurve einer Milzprobe (infizierter Stamm, 24 Stunden nach Behandlung), Parameter des Verfahrens siehe Salpetersäure-Verfahren, Verdünnung 1:100, Detektion: ICP-MS (121, 123 m/z ^{121}Sb , ^{123}Sb)

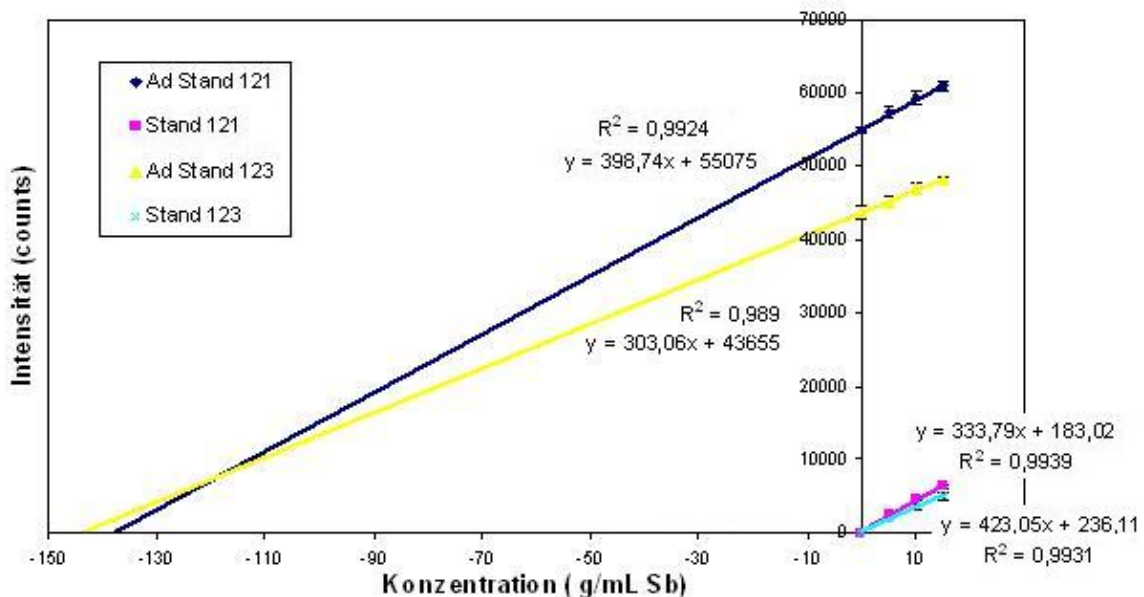


Abbildung 11-11: Kalibrationskurve einer Leberprobe (nicht infizierter Stamm, 1 Stunde nach Behandlung), Parameter des Verfahrens siehe Salpetersäure-Verfahren, Verdünnung 1:100, Detektion: ICP-MS (121, 123 m/z ^{121}Sb , ^{123}Sb)

Der beobachtete Matrixeffekt ist nicht von der Art der Proben (Leber oder Milz) oder dem Stamm (infizierte oder nicht infizierte Mäusen) abhängig. Die restlichen Proben wurden auch mit dieser Methode (Standardaddition) untersucht und ausgewertet, die Ergebnisse sind in der **Tabelle 11-2** und **Tabelle 11-3** dargestellt.

11.10 Standardaddition in den chromatographischen Verfahren

Um die Milz- und Leberproben zu untersuchen, wurden zu einer gleichen Menge Probe verschiedene Sb(V)- und Sb(III)-Mengen addiert, um den Einfluss der Addition zu untersuchen. Wie die **Abbildung 11-12** zeigt, besteht zwischen Signalen in den untersuchten Proben und den Standards kein direkter Zusammenhang. Da bei der Addition der Standards alle drei Peaks zunehmen, konnte weder das Sb(V) noch das Sb(III) in der Probe identifiziert werden.

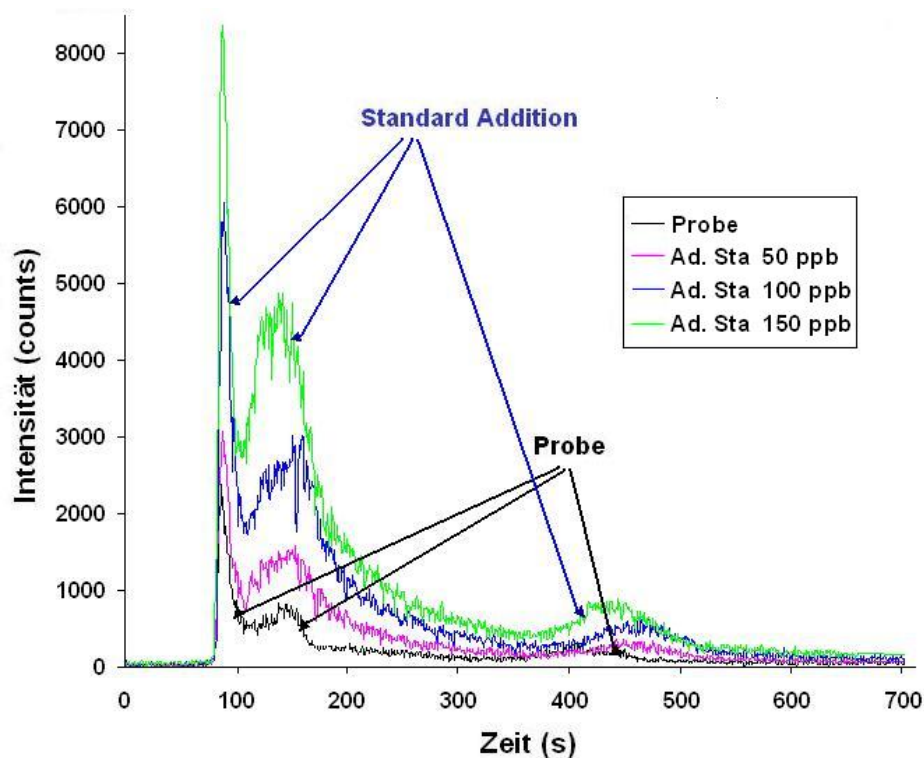


Abbildung 11-12: Chromatogramme einer Leberprobe (nicht infizierter Stamm, 24 Stunden nach Behandlung) mit Standardaddition von Sb(III) und Sb(V), jeweils 50, 100 oder 150 $\mu\text{g/L}$, gemessen mit dem Salpetersäure-Verfahren (s. **Kapitel 8.3.6**)

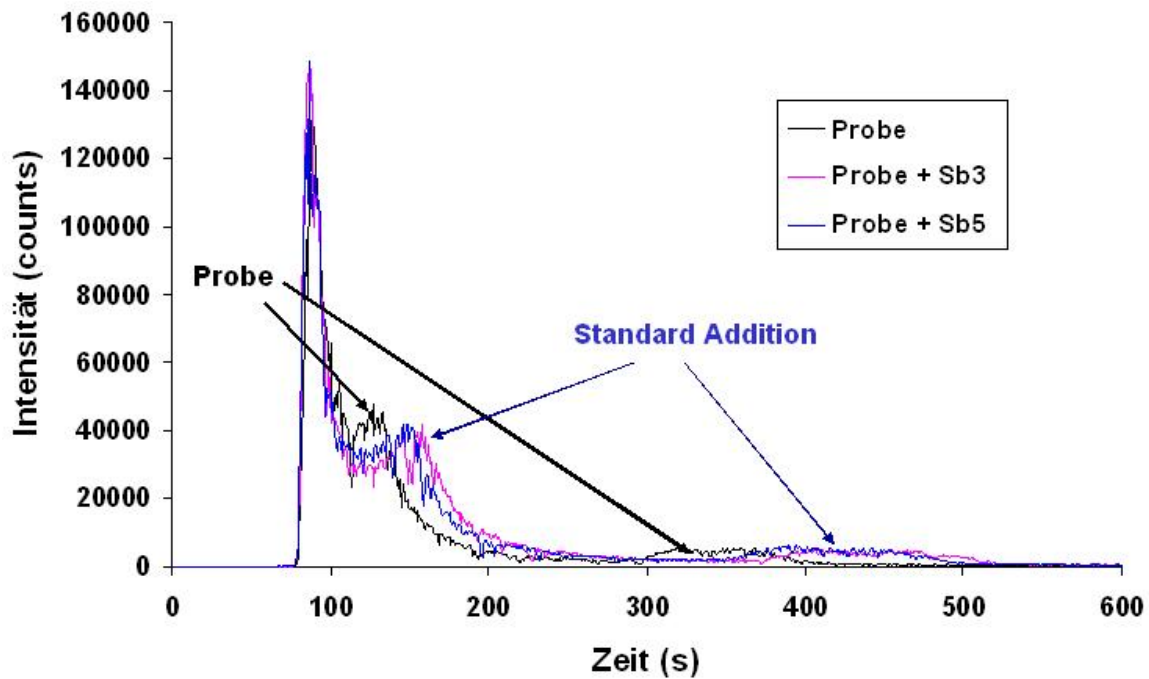


Abbildung 11-13: Chromatogramme einer Leberprobe (nicht infizierter Stamm, 1 Stunde nach Behandlung) mit Standardaddition von Sb(III) oder Sb(V), jeweils 100 $\mu\text{g/L}$, gemessen mit dem Salpetersäure-Verfahren (s. **Kapitel 8.3.6**)

Bei der einzelnen Addition der Standards von Sb(III) und Sb(V) ist auch eine Verschiebung der Retentionszeiten des zweiten und dritten Peaks bemerkbar. Diese Verschiebung ist derjenigen bei der simultanen Addition von Sb(III) und Sb(V) vergleichbar. Daher war keine Identifizierung oder Quantifizierung der Peaks möglich. Im folgenden Kapitel werden die unbekannt Spezies charakterisiert und die durchschnittliche Ladung berechnet.

11.11 Charakterisierung der Metabolite

Zur Charakterisierung der Metabolite wurde die durchschnittliche Ladung der Spezies A bis E, sowie die durchschnittliche Ladung von der ersten beiden Peaks, X und Y, untersucht.

Durchschnittliche Ladung der nicht identifizierbaren Spezies

Im Folgenden sollen die Ergebnisse kurz zusammengefasst werden. Eine weitergehende Charakterisierung dieser Spezies, bei denen es sich um Verbindungen mit Zellbestandteilen, Organoantimonmoleküle oder stabile Komplexe handeln könnte, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit zur Antimonspeziesanalytik mit elementspezifischer Detektion nicht durchgeführt.

Tabelle 11-4: Übersicht über die Ladungen der Antimonmetabolite^a

Signal im Chromatogramm	Anzahl der negativen Ladungen
A	2,18
B	2,83
C	3,15
D	3,94
E	4,66

^a ermittelt nach Small et al. mit dem Salpetersäure-Verfahren mit 1, 2, 3 mmol/L HNO₃

Um die durchschnittlichen Ladungen der Spezies zu untersuchen, wurde das Salpetersäure-Verfahren eingesetzt, die Berechnung nach Small et al. durchgeführt (siehe **Kapitel 8.3.1**) und die Konzentration von 1 bis 3 mmol/L variiert; für weitere Information siehe **Kapitel 8.3.6**.

Die Signale der Spezies B und C liegen im Chromatogramm dicht nebeneinander, sind trotzdem ausreichend aufgelöst (siehe **Tabelle 11-4**).

Die durchschnittlichen Ladungen der Spezies X und Y wurden nach Small et al. ermittelt und mit dem Salpetersäure-Verfahren untersucht. X hat eine durchschnittliche Ladung von - 0,73 und Y von - 1,37.

Vergleich der Metaboliten

Tabelle 11-5: Übersicht über mögliche Antimonspezies in den Gewebeproben ^{a,b}

Stamm	Stadium	nach (Std)	A	B	C	D	E
Milz	nicht infiziert	1	-	-	-	+	-
Milz	infiziert	1	-	+	-	-	+
Leber	nicht infiziert	1	-	+	-	-	-
Leber	infiziert	1	+	+	+	-	-

^a mit dem Salpetersäure-Verfahren, Parameter siehe **Kapitel 8.3.6**, ^b eine Stunde nach der Behandlung

Die **Tabelle 11-5** zeigt die Verteilung der einzelnen Signale bei Untersuchung der Milz- und Leberproben. Die Metabolite werden nur positiv angezeigt, wenn sie in allen Wiederhol-

messungen zu erkennen sind. Es ist derzeit keine sichere Zuordnung der ersten zwei Spezies zu den untersuchten Gewebeproben oder Identifizierung möglich.

In den Chromatogrammen der Gewebeproben sind fünf verschiedene Signale zu erkennen (A bis E), die Antimonpezies und -metaboliten zugeordnet werden können. Eine genaue Charakterisierung war mit den im Rahmen der vorliegenden Arbeit entwickelten speziesanalytischen Verfahren mit elementspezifischer Detektion nicht möglich.

11.12 Zusammenfassung der Untersuchung von Gewebeproben

Die Untersuchung von Gewebeproben als komplexe Matrices mit zahlreichen organischen Komponenten ist mit den chromatographischen Methoden, die in **Kapitel 8.3.6** und **8.3.5** vorgestellt wurden, nicht möglich.

Untersucht wurden Milz- und Leberproben von nicht infizierten und infizierten Mäusen, die mit Sb(V)-Präparaten behandelt wurden. Bei der Untersuchung der Antimongesamtgehalte konnte eine lineare Zeitabhängigkeit bei der Exkretion des Antimons in Leberproben festgestellt werden, wobei der Zusammenhang der Zeitabhängigkeit bei der Exkretion des Antimons in den Milzproben nicht linear war. Das Speziesmuster ist bei keiner der Gewebeproben ähnlich. Es konnten weder Sb(V) noch Sb(III) sicher identifiziert werden, wobei sowohl externe Kalibration als auch Standardaddition eingesetzt wurden. Es konnte ein starker Matrixeffekt bei der Untersuchung der Gewebeproben festgestellt werden.

12 Zusammenfassung

Die Speziesanalytik für Metalle und Halbmetalle hat in den letzten Jahren in der analytischen Chemie zunehmend an Bedeutung gewonnen. Für die Beurteilung zahlreicher physikalischer, biologischer und medizinischer Fragestellungen und für die Klärung des umweltrelevanten Gefährdungspotentials, das von einzelnen Elementen ausgeht, ist die Kenntnis des Gesamtgehaltes nicht mehr ausreichend. Die Untersuchung der Elementspezies ist zu einem wichtigen Zweig der Analytischen Chemie geworden, der spezielle Herausforderungen insbesondere an die Empfindlichkeit und die Präzision der eingesetzten Methoden stellt. Die Entwicklung von Methoden für die Quantifizierung der Oxidationsstufen Sb(III) und Sb(V) war eines der Ziele der vorliegenden Arbeit.

Problematisch sind insbesondere in der Umweltanalytik und im medizinischen Bereich die extrem komplexen Systeme mit vielfältigen, zum großen Teil labilen chemischen Gleichgewichten. Probenahme, Probenvorbereitung und Analyse greifen z. T. stark in diese Gleichgewichte ein, sodass es leicht zu Artefaktbildung und Fehlinterpretationen kommen kann.

Antimon ist ein nicht essentielles Spurenelement, dessen anorganische Verbindungen toxischer als die organischen wirken. In seiner Toxizität ist das Antimon dem Arsen ähnlich, da dreiwertige, anorganische Verbindungen toxischer als fünfwertige sind. Die toxikologischen Daten sind allerdings lückenhaft, da für viele Antimonverbindungen bisher kaum Untersuchungen im Tierversuch oder an Zellkulturen angestellt worden sind. Die vorliegende Arbeit beinhaltet die Untersuchung von anorganischen Antimonspezies in biologischen Proben aus dem medizinischen Bereich, wobei Zellextrakte und Gewebeextrakte untersucht wurden.

Die Untersuchung an Zellproben und Gewebeproben von *Leishmania donovani*, eine weitverbreitete parasitäre Infektion, soll zur Aufklärung des Mechanismus der Toxizität und der Resistenz in manchen Stämmen beitragen. Verglichen werden sollten dabei Promastigoten und Amastigoten eines nicht antimonresistenten und eines Sb(V)-resistenten Stammes.

Chromatographische Verfahren in Kombination mit elementspezifischer Detektion und kapillarelektrophoretische Verfahren mit UV-Detektion. Es wurden acht Verfahren auf der

Basis der Anionenchromatographie mit ICP-AES/MS Detektion entwickelt, von denen sieben die Trennung und Quantifizierung von den zwei Antimonspezies erlauben. Salpetersäure und das EDTA sind als Eluent besonders geeignet und wurden auch für die später untersuchten Realproben verwendet. Auch die Kapillarzonenelektrophorese wurde als Trennverfahren für die Antimonspeziesanalytik mittels UV-Detektion benutzt. Zwei Methoden wurden entwickelt, von denen eins für die Trennung und Quantifizierung von Antimonspezies im Spurenbereich geeignet ist. Die IC-ICP-MS Kopplung wurde für die Messung verschiedene reale Proben angewendet.

Die definierte Zusammensetzung der Standards ist in der Analytischen Chemie von großer Bedeutung für die Richtigkeit der Analysen. Bei der Speziesanalytik muss nicht nur die Gesamtmenge des Analyten konstant bleiben, sondern auch die Erhaltung der Speziesinformation sichergestellt sein. Daher ist es notwendig, die Standardlösungen einer ständigen Qualitätskontrolle zu unterziehen. Die Lagerung hatte großen Einfluss auf die Stabilität der Spezies, insbesondere des Sb(III), das nach einige Stunden durch Luftsauerstoff zu Sb(V) oxidiert wird. Die Verwendung frisch angesetzter Standards ist also entscheidend für die Richtigkeit der Analysen.

Zusätzlich muss sichergestellt sein, dass die Standardverbindungen die Komponenten in den Realproben möglichst gut repräsentieren. Für die untersuchten Antimonspezies wurde eine prinzipielle Eignung von Antimonyltartrat und Hexahydroxyantimonat als Standardmaterialien für reale Proben hier und zumindest für die Parasitenzellen festgestellt. In den Gewebeproben ergaben sich weitere Matrixprobleme. Diese Probleme werden im Folgenden erläutert.

Die Untersuchung von Zellproben als komplexe Matrizes mit zahlreichen organischen Komponenten ist mit den chromatographischen Methoden möglich. Durch die Anwendung zweier analytische Verfahren lassen sich zuverlässige Aussagen über die Oxidationsstufen des Antimons in den Leishmaniazellen treffen. Untersucht wurden die Promastigoten und Amastigoten eines nicht antimonresistenten sowie eines gegen Sb(V)-Präparate resistenten Stammes von *Leishmania donovani*. In den Promastigoten konnte keine signifikante Reduktionsaktivität festgestellt werden. Das Speziesmuster ist bei Zugabe verschiedener Antimonkomponenten für beide Zellarten ähnlich. Unterschiede ergaben sich dagegen bei den Amastigoten. Während sich die antimonresistenten Zellen ähnlich wie Promastigoten

verhalten und keine Reduktion von Sb(V) zu Sb(III) nachweisbar ist, reduzieren nicht resistente Amastigoten Sb(V) zu Sb(III). Die Zunahme des Sb(III) als Reduktionsprodukt innerhalb der Amastigoten LD WT hat im Intervall von 1 bis 12 Stunden einen logarithmischen Verlauf, während die Variation der Inkubationskonzentration zu einer linearen Änderung der Sb(III)-Konzentration führt.

Gewebeproben mit noch komplexerer Matrix wurden sowohl mit ICP-MS als auch mit den chromatographischen Methoden untersucht. Analysiert wurden Milz- und Leberproben von nicht infizierten und infizierten Mäusen, die mit Sb(V)-Präparaten behandelt worden waren. Bei der Untersuchung der Antimongesamtgehalte konnte eine lineare Zeitabhängigkeit bei der Exkretion des Antimons in Leberproben festgestellt werden, wobei der Zusammenhang für Milzproben nicht linear war. Das Speziesmuster ist bei keiner der Gewebeproben ähnlich. Es konnten weder Sb(V) noch Sb(III) sicher identifiziert werden, wobei sowohl externe Kalibration als auch Standardaddition eingesetzt wurden. Es ist ein starker Matrixeffekt bei der Untersuchung der Gewebeproben festgestellt worden, der leider nicht beseitigt werden konnte.

Die bei den kapillarelektrophoretischen Trennungen aufgetretenen Probleme könnten durch die Verwendung eines elementspezifischen Detektors umgangen werden. Ein Problem wie der Koelution von Sb(III)-Tartrat, Tartrat und Sb(III)-EDTA taucht bei der elementspezifischen Detektion nicht auf. Außerdem könnte ein solcher Detektor, wie z. B. das ICP-MS, zu einer deutlichen Verbesserung der Nachweisgrenzen und damit einer Ausweitung des Anwendungsbereiches führen. Ein weiterer Vorteil der Kopplung CE-ICP-MS ist, dass man keinen UV-aktiv Puffer benötigt, wodurch eine größere Pufferauswahl für die Optimierung der Trennungen zur Verfügung steht. Die Verwendung einer solchen Kopplung besitzt einen weiteren Vorteil. Die äußerst komplexe Matrix, die unter anderem aus großen Moleküle wie Proteinen, die mit Antimon reagieren können, besteht, kann bei der Untersuchung biologischer Proben den Untergrund erhöhen, die Trennung verschlechtern und zu nicht reproduzierbaren Messwerten führen. Außerdem können auch Antimonspezies auf der Säule an den dort angelagerten Zellbestandteilen fixiert werden. Diese Probleme sollten bei der Anwendung der Kapillarelektrophorese nicht auftreten, da die Kapillare stärker als die chromatographische Säule gespült werden kann um die Fixierung der organische Moleküle an der Kapillarwand zu vermeiden. Außerdem kann die Verwendung beschichteter Kapillaren eine Adsorption großer Zellbestandteile oder größerer Moleküle minimieren.

Problematisch war die Identifizierung der organischen Antimonspezies. Dazu sollten in weiterführenden Arbeiten auch verschiedene organische Antimonstandards, wie Trimethylantimon $[(\text{CH}_3)_3\text{Sb}]$ oder Triphenylantimon $[(\text{Ph})_3\text{Sb}]$, untersucht und ihr Verhalten in anionenchromatographischen und kapillarelektrophoretischen Trennungen als Kriterium für die Identifizierung der organischen unbekanntes Spezies verwendet werden.

Auch die Probenvorbereitung muss verbessert werden. Rodon et al. empfehlen die Mikrowelle-Aufschluss mit konzentrierte HNO_3 als Methode für die Vorbereitung biologischer Proben für die Speziation von Antimon [251]. Allerdings wurde das Antimon nicht in-vivo sondern nach der Extraktion der Gewebe zugegeben. Diese Methode könnte getestet werden und die Antimon-Wiederfindungsraten berechnet werden um festzustellen, ob die Methode für die Vorbereitung der Leishmaniazellen geeignet ist. Allerdings ist die Verwendung von Mikrowellenaufschluss und insbesondere konzentrierter Salpetersäure mit Oxidationswirkung in der Speziesanalytik kritisch zu betrachten, da eine Veränderung der Speziesinformation möglich ist.

Kopplungen der Trennverfahren Größenausschlusschromatographie sowie Kationenchromatographie mit den elementspezifischen Detektionsmethoden Plasma-Atomemissions- und Massenspektrometrie (ICP-AES und ICP-MS) sollten ebenfalls durchgeführt werden sowie Kopplungen von Größenausschlusschromatographie und Kationenchromatographie mit der Anionenchromatographie und anschließender elementspezifischer Detektion. Damit könnte eine Trennung der organischen ungeladenen Spezies erfolgen. Außerdem wäre die Untersuchung der biologischen Materialien mit HPLC-MS wünschenswert, sofern Methoden mit ausreichend niedrigen Nachweisgrenzen entwickelt werden können.

13 Anhang

13.1 Verwendete Chemikalien

Produkt	Qualität (Gehalt)	Hersteller / Lieferant
Ammoniak	ca. 25% NH ₃	Riedel de Haën, Seelze
Aceton	ca. 95%	Merck, Darmstadt
Acetonitril	p.a. (>99%)	Merck, Darmstadt
Benzoessäure	p.a.	Fluka, Buchs
Borsäure	p.a.	Fluka, Buchs
Dinatriummethyldiamintetraacetat	p.a.	Merck, Darmstadt
Dodecyltrimethylammoniumbromid	p.a.	Fluka, Buchs
Ethanol	ca. 95%	Fluka, Buchs
Hexadecyltrimethylammoniumbromid	p.a.	Sigma-Aldrich, Buchs
4-Hydroxybenzoessäure	p.a.	Fluka, Buchs
Kaliumantimonyltartrat	p.a.	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid	p.a.	Merck, Darmstadt
Kaliumhexahydroxyantimonat	p.a.	Riedel de Haën, Seelze
Natriumcarbonat	p.a.	Merck, Darmstadt
Natriumchromat	p.a. (> 99,5%)	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	p.a.	Merck, Darmstadt
Natriumsulfat	p.a.	Merck, Darmstadt
Methanol	ca. 95%	Merck, Darmstadt
Octadecyltrimethylammoniumchlorid	p.a.	Fluka, Buchs
Perchlorsäure	70%	Fluka, Buchs
Phthalsäure	p.a.	Merck, Darmstadt
Tetrabutylammoniumbromid	p.a.	Fluka, Buchs
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	p.a.	Merck, Darmstadt
Salzsäure	Suprapur (37 %)	Merck, Darmstadt
Salpetersäure	Supranal (70 %)	Riedel-de-Haën, Seelze
Zitronensäure	p.a. (> 99 %)	Riedel de Haën, Seelze
Weinsäure	p.a.	Merck, Darmstadt

13.2 Allgemeine Geräte und Hilfsmittel

Reinstwasseranlage	SG Reinstwassersystem SG Wasseraufbereitungs- und Regenerierstation GmbH, Hamburg
Injektion	hydrodynamisch: 35 mbar, 5 Sek
pH-Messung	pH-Meter Metrohm 605, pH-Glaselektrode mit Ag/AgCl-Bezugssystem Metrohm E 536, Herisau
Pipetten	100 µl / 1000 µl Varipipetten, Standardtips schermettallfrei, Eppendorf-Nethel-Hinz GmbH
Ultraschallbad	Bandelin, Sonorex, Mörfelden-Wall.
Analysenwaage	AC 6043, Sartorius AG, Göttingen
Trockenschrank	WTB binder, Jürgens, Tuttlingen
Glasgeräte	allgemeiner Laborstandard Glasgeräte

13.3 Verwendete Methoden der Kapillazonelektrophorese

Der Zuschnitt der Kapillaren auf die benötigte Länge erfolgte nach Bedarf entsprechend der Kapillarkassette von 10 m Material mit einem Glas-schärfenden-Stäbchen. Das Detektorfenster wurde eingebrannt und mit Methanol gereinigt. (Die Parameter während der Methodenentwicklung sind im Text angegeben).

13.3.1 Allgemeines

Probenaufgabe	1,8 mL Glasvial mit Gummikappel
Probenfiltration	0,20 µm Minisart-Filter
Pufferfiltration	0,45 µm Minisart-Filter
Vialbehandlung	dreifach Spülung mit Reinstwasser / 0,2 M HNO ₃ / Reinstwasser Ultraschalbehandlung in Reinstwasser / 0,2 M HNO ₃ / Reinstwasser

13.3.2 Konditionierung der Kapillaren

Konditionierung der Kapillaren vor Erstgebrauch und bei Pufferwechsel / täglich:

Reinstwasser	30-10 Min, Arbeitstemperatur
0,1 N NaOH	30-10 Min, Arbeitstemperatur
Reinstwasser	30-10 Min, Arbeitstemperatur
Elektrolyt	30-10 Min, Arbeitstemperatur

13.3.3 Kapillarenelektrophoresemethoden

Kapillare	amorphes Quarz, 50/60cm, 100 µm I.D
Injektion	hydrodynamisch: 35 mbar, 5 Sek
Temperatur	Raumtemperatur
Grundelektrolyt	Pyromellitsäure Natriumchromat Phthalsäure
pH-Wert-Einstellung	TRIS
organische Additive	Tetrabutylammoniumbromid Hexadecyltrimethylammoniumbromid (HTAB) Octadecyltrimethylammoniumchlorid Dodecyltrimethylammoniumbromid
organische Modifier	Aceton, Methanol, Acetonitril
Detektion	indirekte Detektion mit Peakumkehr, $\lambda = 214 \text{ nm}$

13.4 Verwendete Methoden der IC-ICP-AES und IC-ICP-MS

Die verwendeten Säulen wurden täglich am Ende des Messtages 30 Min. mit 0,01 molar HNO_3 gespült. Die verwendeten Detektoren wurden täglich vor und nach dem Messtag, 30 Min. mit Reinstwasser gespült.

Im Folgenden werden kurz die verwendete Geräte und Trennsäulen zusammengefasst:

13.4.1 Verwendete Geräte und Trennsäulen

Pumpe	LaChrom L 7100, Merck Hitachi, Darmstadt
Injektionsventil	6-Port Rheodyne, 100 µl Probenschleife PEEK
Detektor	X-Series Massspektrometer, Thermo Elemental, Windsford, GB
Säulen	Spectroflamme ICP Type P, SPECTRO, Kleve Hamilton PRP-X100 (150 x 4,1 mm ID), Varian, Darmstadt Phenomenex Star-Ion A300 (100 x 4,6 mm ID), Metrohm, Herisau Metrosep Anion Dual 2 (125 x 4 mm ID), Metrohm, Herisau
Flussrate	1,5 mL/min

13.5 Herstellung von Sb-Standards

Um eine chromatographische oder elektrophoretische Trennung mehrerer Substanzen sinnvoll durchführen zu können, sollten die untersuchten Substanzen als isolierte Standards mit geprüfter Reinheit vorliegen, damit ihr Verhalten ohne störende Einflüsse beobachtet werden kann. Dies stellt für Sb(V) kein Problem dar, da diese Oxidationsstufe recht stabil ist und für sie eine Zahl an Verbindungen, wie das $\text{KSb}(\text{OH})_6$, kommerziell erhältlich, welche als Standard eingesetzt werden können. Für Sb(III) gibt es wenige Verbindungen im Handel, vor allem Feststoffe; $\text{KSb}_2(\text{Tartrat})_2$ ist eine der kommerzielle Verbindungen, welches aber in wässriger Lösung instabil ist und zahlreiche, z. T. mehrkernige Komplexe mit dem Antimon bildet, die zu einem komplexen, chemischen Verhalten führen. Die Instabilität ist die Begründung für die tägliche Vorbereitung der Standards.

14 Literaturverzeichnis

- 1 K. P. Chang, R. S. Bray, *Leishmaniasis*, Elsevier, Amsterdam, (1995), 1-30
- 2 G. Jander, E. Blasius, *Lehrbuch der analytischen und präparativen anorganischen Chemie*, 13. Auflage, S. Hirzel Verlag, Stuttgart, (1989)
- 3 A. Tessier, P. G. C. Cambell, M. Bisson, *Anal. Chem.*, 51, (1979) 844
- 4 A. M. Ure, Ph. Quevauviller, H. Muntau, B. Grepink, *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, 51 (1993), 135-151
- 5 A. M. Ure, C. M. Davidson, *Chemical Speciation in the Environment*, Blackie Academic & Professional, Glasgow, (1995)
- 6 N. Ulrich, *Beiträge zur Antimonspeziesanalytik-Grundlagen, Methoden und Anwendungen*, Habilitationsschrift, (2000), Universität Hannover
- 7 R. T. Thomas, A. M. Ure, C. M. Davidson, D. Littlejohn, G. Rauret, R. Rubio, J. F. López Sánchez, *Anal. Chim. Acta*, 286 (1994) 423
- 8 K. Günther, Habilitationsschrift (1996), Universität Bonn
- 9 G. Borrmann, A. Seubert, *Anal. Chim. Acta*, 332, (1996), 233
- 10 G. Borrmann, A. Seubert, *Anal. Chim. Acta*, 386, (1999), 77
- 11 K. Günther, G. Weber, *Elementspeziesanalytik: Ein Überblick*, Analytiker Taschenbuch. Bd. 20, Springer, Berlin (1998)
- 12 A. Das, M. Guardia, *Literature survey of on-line elemental speciation in aqueous solutions*, *Talanta*, 55, (2001), 1-28
- 13 K. Yamaka, A. Hasegawa, R. Sawamura, S. Okada, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 108, (1991) 633
- 14 *Römpp Chemie Lexikon*, CD-ROM- Version 1.0, Thieme Verlag, Stuttgart / New York, (1995)
- 15 S. Tokalioglu, *Determination of heavy metals and their speciation*, *Anal. Chim. Acta*, 413, (2000), 33-40
- 16 R. D. Wilken, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 342 (1992) 791
- 17 Y. Cai, J. M. Bayona, *J. Chromat. Sci.*, 33, (1995), 89
- 18 J. Mattusch, R. Wennrich, *Anal. Chem.* 70, (1998), 3649
- 19 M. Johansson, H. Emteborg, B. Glad, F. Reinholdsson, D. C. Baxter, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 351, (1995), 461
- 20 M. Busch, A. Seubert, *Anal. Chim. Acta*, 399, (1999), 223

-
- 21 A. Tapparo, L. Soldá, G. Bombi, P. Zambendetti, P.F. Zatta, R. Bernati, B. Corain, *Analyst*, 120, (1995) 2425
 - 22 P. Quevauviller, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 351 (1995), 345
 - 23 A. Kot, J. Namiesnik, *Trends Anal. Chem.*, 19 (2000) 69
 - 24 G. Schwedt, *Chromatographische Trennmethode*n, 3. Aufl., Thieme Verlag, Stuttgart (1994)
 - 25 G. Schwedt, *Taschenatlas der Analytik*, 2. Aufl., Thieme Verlag, Stuttgart, (1995)
 - 26 J. M. Mermet, M. Otto, H. M. Widmer, *Analytical Chemistry*, 1. Auflage, Wiley-VCH Verlag, WEIHEIM-New-York, (1998)
 - 27 C. Wu, *Handbook of size exclusion chrom.*, Marcel Dekker Inc., New York, (1995)
 - 28 H. G. Barth, B. E. Boyes, C. Jackson, *Anal. Chem.* 70 (1998) 215R
 - 29 J. Weiß, *Ionenchromatographie*, 3. Aufl., Wiley-VCH (2001)
 - 30 P.R. Haddad, P.E. Jackson, *Ion Chromatography: Principles and Applications*, 1. Auflage, *J. Chromatogr. Library Vol. 46*, Elsevier Verlag, Amsterdam, (1990)
 - 31 J. S. Fritz, D. T. Gjerde, *Ion Chromatography*, 3rd ed., Wiley-VCH (2000)
 - 32 M. Otto, *Analytische Chemie*, VCH (1995)
 - 33 J. P. Fooley, J. G. Dorsey, *Anal. Chem.* 55 (1983) 730
 - 34 A. Seubert, *Vorlesung Chromatographische Methoden in der Analytischen Chemie*, Universität Hannover (1996)
 - 35 R. Ohlhof, *Dissertation (2002)*, Universität Hannover
 - 36 G. Aceed, H. J. Möckel, *Liquidchromatographie*, VCH (1991)
 - 37 R. S. Houk, V. A. Fassel, G. D. Flesh, H. Svec, A. L. Gray und C. E. Taylor, *Anal. Chem.*, 52, (1980), 2283
 - 38 D. Wollenweber, *Instrumentelle Leistungssteigerungen der ICP-MS durch neue Zerstäuber oder Kaltplasma*, Diss. Uni Hannover, (2000)
 - 39 J. Broekaert, *ICP-Massenspektrometrie*, *Analytiker Taschenbuch*, Bd. 9, Springer, Berlin, (1990)
 - 40 A. Hollemann, E. Wieberg, *Lehrbuch der Anorganischen Chemie*, Walter de Gruyter, Berlin, (1985)
 - 41 E. Riedel, *Anorganische Chemie*, Walter de Gruyter, Berlin, (1990)
 - 42 A. Montaser (Ed.): *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*, Wiley-VCH, New York, (1998)

-
- 43 J. Broekaert, ICP-Massenspektrometrie, Analytiker Taschenbuch, Bnd. 9, Springer, (1990), Berlin
 - 44 S. Kromidas, Validierung in der Analytik, Wiley-VCH, Weinheim, (1999)
 - 45 S. Kromidas, Qualität im analytischen Labor; VCH, Weinheim, (1995)
 - 46 C. Bruneo, Int. J. of Mass Spectrom. and Ion Proc., 76, (1987), 125
 - 47 <http://www.icp-ms.de/tech/>, 24.12.03, 12:36
 - 48 R. F. Browner, A. W. Boom, Anal. Chem., 56 (1984) 786A-798A
 - 49 B. L. Sharp, J. Anal. At. Spectrom., 3, (1988), 613-652
 - 50 B. L. Sharp, J. Anal. At. Spectrom., 3 (1988), 939-963
 - 51 J. V. Ivaldi, W. Slavin, J. Anal. At. Spectrom., 5, (1990), 359-364
 - 52 R. H. Clifford, A. Montaser, S. A. Sinex, S. G. Capar, Anal. Chem., 61, (1989), 2777-2784)
 - 53 R. C. Hutton, A. N. Eaton, J. Anal. At. Spectrom., 2, (1987), 595-598
 - 54 <http://www.meinhard.com/product3.htm>, 05.12.03, 16:23
 - 55 M. A. Tarr, G. Zhu, R. F. Browner, J. Anal. At. Spectrom., 7, (1992), 813-817
 - 56 S. P. Osborne, Spectroscopy, 7, (1992), 37-43
 - 57 S. H. Nam, J. S. Lim, A. Montaser, J. Anal. At. Spectrom., 9, (1994), 1357-1362
 - 58 H. Liu, A. Montaser, S. P. Dolan, R. S. Schwartz, J. Anal. At. Spectrom., 11, (1996), 307-311
 - 59 F. Vanhaecke, M. van Holderbeke, L. Moens, R. Dams, J. Anal. At. Spectrom., 11, (1996), 543-548
 - 60 T. D. Hettipathirana, D. E. Davey, J. Anal. At. Spectrom., 13, (1998), 483-488
 - 61 MCN 100 System Manual, Cetac Corp. 219-225
 - 62 D. R. Wiederin, F. G. Smith, R. S. Houk, Anal. Chem., 63, (1991), 219-223
 - 63 K. E. Lawrence, G. W. Rice, V. A. Fassel, Anal. Chem., 56, (1984), 289-292
 - 64 D. R. Wiederin, R. S. Houk, Appl. Spectroscopy, 45, (1991), 1408-1412
 - 65 S. C. K. Shum, S. K. Johnson, H. M. Pang, R. S. Houk, Appl. Spectroscop, 47, (1993), 575-583
 - 66 Bedienungsanleitung D.I.N. Torch MICRONEB 2000, AHF Analysentechnik, Tübingen, Deutschland
 - 67 P. Schramel, Anwendung der ICP-MS für die Spurenbestimmung, Analytiker Taschenbuch Bd. 15, Springer, Berlin, (1997)

-
- 68 A. Montaser, D. W. Golightly (Ed.): Inductively Coupled Plasmas in Analytical Atomic Spectrometry, VCH-Verlag, Weinheim, (1987)
 - 69 K. Jarvis, A. Gray, ICP-MS, Blackie & Sons Inc., Glasgow, (1992)
 - 70 D. Skoog, J. Leary, Instrumentelle Analytik, Springer, Berlin, (1996)
 - 71 T. Majewski, Spurenbestimmung metallischer Verunreinigungen in γ -TiAl und den hochreinen Ausgangsmaterialien Al und Ti mittels ICP-Massenspektrometrie, Dissertation, Hannover, (2002)
 - 72 U. Greb, L. Rottmann, LaborPraxis 18 (1994) 42-47
 - 73 R. S. Houk, Mass Spectrometry of Inductively Coupled Plasmas, Anal. Chem. 58 (1986) 97A-105A
 - 74 J. Böcker, J. Spectroskopie, Vogel Buchverlag, Würzburg, 1. Auflage, (1997)
 - 75 F. Vanhaecke, L. Moens, Fresenius J. Anal. Chem., (1999), 364, 440-451
 - 76 B. L. Sharp, J. Batey, I. S. Begley, D. Gregson, J. Skilling, A. B. Sulaiman, G. J. Vergobt, J. Anal. Spectrom., (1999), 14, 99-108
 - 77 S. D. Tanner, V. I. Baranov, U. Vollkopf, J. Anal. At. Spectrom., 2000, 15, 1261-1269
 - 78 A. Seubert, M. Nowak, Fresenius J. Anal. Chem., (1998), 360, 777-780
 - 79 N. Ulrich, Fresenius J. Anal. Chem., (1998), 360, 797-800
 - 80 A. Seubert, Fresenius J. Anal. Chem., (1999), 364, 404-409
 - 81 G. Kirchhoff, Phil. Mag., 4, 20, (1860), 1-89
 - 82 G. Kirchhoff, R. Bunsen, Phil. Mag., 4, 22, (1861), 329
 - 83 T. T. Woodson, Rev. Sci. Instrum., 10, (1939), 308
 - 84 A. Walsh, Spectrochim. Acta, 17, (1955), 108
 - 85 http://www.uni-hannover.de/Lehre/Praktika/QualiQuanti/Quanti/Dokumente_aktuell/Opt_Spektrometrie2.pdf, 12.10.04, 10:35
 - 86 K. Yoshino, E. D. Freeman, W. H. Parkinson, Atlas of the Schumann-Runge Absorption Bands of O₂ in the Wavelength Region 175-205 nm, Physical and Chemical Reference Data, Vol. 13, (1984), 1, 207-227
 - 87 P. Boumans, Line coincidence tables for ICP-AES, Volume 1, Pergamon Press, Oxford (1980)
 - 88 R. Kuhn, S. Hoffstetter-Kuhn, Capillary Elektrophoresis: Principles and Practice, Springer-Verlag, 2. Aufl., Berlin, (1993)
 - 89 www.ruhr-uni-bochum.de/anachem/chef/TeilB.htm, 22.12.03, 11:27
 - 90 Introduction to capillary elektrophoresis, Beckman Instruments, (1991)

-
- 91 Dr. Prof. Fr. C. Vogt, Vorlesung analytische Chemie, Universität Hannover, (2002)
 - 92 Bedienungsanleitung des P/ACE System MDQ, Beckman Instruments, (1991)
 - 93 F. Foret, S. anali, L. Ossini, P. Bocek, J. Chromatogr. A, 470, (1989), 299
 - 94 E. S. Yeung, Acc. Chem. Res., 22, (1989), 125
 - 95 T. Wang, R A. A. Hartwick, J. Chromatogr., 607, (1992), 119
 - 96 W. Beck, Dissertation, Uni Saarbrücken, (1993)
 - 97 M. W. F. Nielen, J. Chromatogr., 588, (1991), 321
 - 98 F. Kohlrauch, Ann. Phys., 62, (1887), 208
 - 99 F. E. P. Mikkers, F. M. Everaerts, T. P. E. M. Verheggen, J. Chromatogr., 169, (1979)
 - 100 K. Cammann, Instrumentelle Analytische Chemie, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg-Berlin, (2001)
 - 101 F. Lottspeich, H. Zorbas (Hrsg), Bioanalytik, Spektrum Akademischer Verlag, (1998)
 - 102 Micellar Elektrokinetik Chromatography, S. Terabe, Beckman Instruments, (1992)
 - 103 K. P. Chang, R. S. Bray, Leishmaniasis, Elsevier, Amsterdam, (1995), 1-30
 - 104 <http://www.who.int/emc/diseases/leish/index.html>, 18.12.03, 12:23
 - 105 Pschyrembel Therapeutisches Wörterbuch, Willibald Pschyrembel, (1998)
 - 106 <http://www.leishmaniose.de>, 21.06.04, 23:31
 - 107 J. Telleria, M. F. Bosseno, T. Tarifa, R. Buitrago, E. Martinez, M. Torrez, F. Le Pont, S. F. Brenière, Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio Janeiro, Vol 94, 1, (1999), 5-6
 - 108 H. de Lima, Z. de Guglielmo, A. Rodriguez, J. Convit, N. Rodriguez, Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio Janeiro, Vol 97, 2, (2002), 169-174
 - 109 <http://home.t-online.de/home/alphabrummer/leishmaniose.htm>, 5.11.03, 21:35
 - 110 <http://www.yorkie.ch/magazin/gesundheit/parasiten/leishmaniose.html>, 1.9.03, 12:40
 - 111 Co-Infektion *Leishmania* /HIV: südwestliches Europa 1990-1998, World Health Organization, (2000)
 - 112 Manual on Visceral Leishmaniasis Control, World Health Organization, (1996)
 - 113 <http://www.new-alamo.com/html/body-leishmaniose.htm>, 1.9.03, 12.50
 - 114 Report on global surveillance of epidemic-prone infectious diseases, WHO/CDS/CSR/ISR, (2000)
 - 115 <http://www.cdfound.to.it/html/leish1c.htm> , 2.9.03, 17:45
 - 116 <http://www.who.int/emc>, 2.9.03, 17:50
 - 117 A. B. Neogy, I. Vouldoukis, J. M. da Costa, L. Monjour, Vet. Parasitol, 54, (1994), 4, 367-373

-
- 118 C. Peters, Dissertation, Eberhard-Karlr-Universität Tübingen, (1996)
- 119 J. D. Berman, D. Wadell, B. D. Hanson, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 27, (1985), 916-920
- 120 A. Haimur, M. Ouellette, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 42, (1998), 1686-1694
- 121 www.biosci.ohio-state.edu/~parasite/leishmania.html, 2.2.04, 12:10
- 122 J. D. Berman, D. J. Wyler, *J. Infec. Dis.*, 142, (1980), 83-86
- 123 M. Joshi, D. M. Dwyer, H. L. Nakhasi, *Mol. Biochem. Parasitol.*, 58, (1993), 345-354
- 124 P. C. Sen Gupta, *Ind. Med. Gazette*, 88, (1953), 20-35
- 125 C. N. Oster, J. D. Chulay, L. D. Hendricks, P. B. McGarvy; E. J. Takafuji; C. L. Pamplan, *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 34, (1985), 856-860
- 126 T. Navin, B. A. Arana, F. E. Arana, J. D. Berman, J. F. Chajon, *J. Infec. Dis.*, 165, (1992), 528-534
- 127 A. Volle, J. J. Shaw, C. Bryant, *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 57, (1963), 404-408
- 128 W. R. Ballou, J. R. McChain, D. M. Gardon, G. D. Shanks, J. Andujar, J. D. Berman, *The Lancet*, 2, (1987), 13-16
- 129 W. L. Roberts, P. M. Rainey, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 37, (1993), 1842-1846
- 130 L. Herwardt, *Leishmaniasis. Seminar, The Lancet*, Vol. 354, Okt. 2, (1999)
- 131 N. C. Norman, *Chemistry of As, Sb and Bi*, Blackie Academic Professional, Weimeim, (1998)
- 132 J. G. Dorea, E. Merchan-Hamann, D. E. Ryan, Holzbecher, *J. Clin. Chem.*, 36, (1990), 680-686
- 133 A. Lugo de Yarbuh, N. Anez, Y. Patit de Pena, *Ann. Trop. Med. Med. Parasitol.*, 88, (1994), 37-42
- 134 P. Borst, M. Ouellette, *Annu. Rev. Microbiol.*, 49, (1995), 427-431
- 135 W. L. Roberts, J. D. Bermann, P. M. Rainey, *Antimicrob. Agents. Chemother.*, 39, (1995), 1234-1239
- 136 S. Dey, B. Papadopoulou, G. Poy, *Mol. Biochem. Parasit.*, 67, (1994), 49-57
- 137 P. Shaked-Mishan, N. Ulrich, M. Ephros, and D. Zilberstein, *J. Biolog. Chem.*, 276, N.6, (2001), 3971-3976
- 138 A. Gyurasics, L. Koszorus, F. Varga, Z. Gregu, *Biochem. Pharmacol.*, 44, (1992), 1275-1279
- 139 A. Haimeur, M. Ouellette, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 42, (1998), 1689-1694

-
- 140 S. Dey, M. Ouellette, J. Lightbody, B. Papadopoulou, B. P. Rosen, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93, (1996), 2192-2197
 - 141 M. Ouellette, D. Legare, A. Haimeur, K. Grondin, G. Ray, G. Brochu, B. Papadopoulou, Drug Resistance Updates, 1, (1998), 43-48
 - 142 L-G- Godwin, Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 89, (1995), 339-341
 - 143 M. M. Badr, J. Int. Col. Surg., 30, (1963), 404-420
 - 144 Strabo, Geographica, Kapitel XVII
 - 145 K. P. Chang, D. S. Bray, Leishmaniasis, Elsevier, Amsterdam, (1995), 1-30
 - 146 N. N. Greenwood, A. Earnshaw, Chemie der Elemente, Weinheim, Verlag: Chemie, (1990)
 - 147 W. M. Mok, C. M. Wai, Distribution and mobilization of arsenic and antimony species in the Coeur D'Alene River, Idaho. Environ. Sci. Technol., 24, (1990), 102-108.
 - 148 J. Lintschinger, O. Schramel, A. Kettrup, The analysis of antimony species by using ESI-MS and HPLC-ICP-MS., Fresenius J. Anal. Chem., 361, (1998), 96-102.
 - 149 N. Ulrich, Anal. Chim. Acta, 359, (1998), 245-253.
 - 150 <http://www.chem.uni-postdam.de/tools/pse/pc/sb.htm>, 7.1.04, 17:35
 - 151 A. F. Hollemann, Lehrbuch der anorganischen Chemie, Wiberg, 100. Aufl., Berlin, (1985)
 - 152 G. E. Parris, F. E. Brinckmann, Environmental Science and Technology, (1976), 1128-1134
 - 153 A. E. Reed, P. V. R. Schleyer, J. Am. Chem. Soc., 112, (1990), 1434-1437
 - 154 P. Pyykkö, Chem. Rev., 88, (1988), 563-566
 - 155 R. Enders, Dissertation, TU Berlin (1996)
 - 156 J. E. Berg, K. Skyberg, Antimony, The nordic expert group for criteria documentation of health risks from chemicals, II, Bnd. 123 (1998)
 - 157 J. Feldmann, I. Koch, W. R. Cullen, Analyst, 123, (1998), 5, 815-820
 - 158 P. J. Craig, Organometallic Compounds in the environment., Harlow, Longman, (1986)
 - 159 C. F. Baes, R. E. Mesmer, The hydrolysis of cations, Malabar, Robert E. Krieger Publishing company, (1986)
 - 160 K. H. Wedepohl (Ed.): Handbook of geochemistry, Springer Verlag, Berlin, (1978)
 - 161 C. Fahrenhorst, Retardation und Mobilität von Blei, Antimon und Arsen im Boden am Fallbeispiel von Schrottschießplätzen, (H-R. Bork, M. Renger, F. Alaily, C. Roth, G.

- Wessolek, Bodenökologie und Bodengenese, Fachgebiete Bodenkunde und Regionale Bodenkunde, Institut für Ökologie, TU. Berlin, Selbstverlag, (1993)
- 162 W. F. Linke, Solubilities- inorganic and metal-organic compounds, American Chemical Society, Washington D. C., (1965)
- 163 DVGW-Schriftenreihe Wasser, Daten und Informationen zu Wasserinhaltsstoffen, Bd. 48, Teil 1 (1985), Teil 2 (1988)
- 164 E. W. Abel, F. G. A. Stone, G. Wilkinson, Comprehensive organometallic chemistry II, Vol. 2, Pergamon, Oxford, (1995)
- 165 A. L. Pitman, M. Pourbaix, N. de Zoubov, Potential-pH diagram of the antimony-water system, J. Electrochem. Soc., 104, (1957), 594-600
- 166 J. L. Dawson, . Wilkinson, M. I. Gillibrand, Antimony Species in aqueous sulphuric acid solutions, J. Inorg. Nucl. Chem.,32, (1970), 501-517
- 167 J. Lefebvre, H. Maria, Étude des équilibres dans les solutions récentes de polyantimoniates, Compt. Rend., 256, (1963), 3121-3124
- 168 J. Falbe, M. Regitz, Römpp Chemie Lexicon, Bd. 1, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, (1989)
- 169 W. Lange, K. Askitopoulos, Über die Salze der Antimonhexafluorwasserstoffsäure HSbF_6 , Z. Anorg. Allg. Chem., 223, (1935), 369-380
- 170 L. Kolditz, D. Sarrach, Über Hydroxofluorantimonate (V), Z. Anorg. Allg. Chemie, 293, (1958), 132-146
- 171 G. Anderegg, S. Malik, Die Komplexbildungstendenz des dreiwertigen Antimons in wässriger Lösung, Helv. Chim. Acta, 53, (1970), 577-600
- 172 D. Senanayake, L. Muir, Helv. Chim. Acta 53, (1970), 621-633
- 173 D. R. Lide, Handbook of chemistry and physics, 73th Edition, CRC Press, Boca Raton, Ann Arbor, London, Tokio, (1992)
- 174 Kirk-Othmer, Encyclopedia of Chemical Technology, 4. Aufl., Band. 3, John Wiley & Sons, New York, (1992), 367-407
- 175 Antimon und Antimonverbindungen, Ullmans Encyklopädie der Technischen Chemie, 4. Aufl., Bnd. 8, Verlag Chemie, Weinheim, (1974), 1-17
- 176 R. Saager, Metallische Rohstoffe von Antimon bis Zirkonium, Bank Vontobel, Verlag, Zürich, (1984) 91-94
- 177 P. Crowson, Minerals Handbook 1992-1993, Stockton Press, New York, (1992)
- 178 U. S. Geological Survey, Mineral Commodity summaries, Reston, (1999)

-
- 179 K. Nakamura, S. Kinishita, H. Takatuki, The origin and behaviour of lead, cadmium and antimony in MSN incinerators, seminar on cycle and stabilization technologies of MSW incineration residues, Kyoto Research Park, Japan, 5-8 March (1996)
 - 180 A. I. M. Van der Beck, A. A. J. Cornelissen, T. G. Aaldr, Dutch National Institute of Public Health and Environmental Protection (R.I.V.M.), Report No738505007, (1989)
 - 181 D. O. Reimann, Heavy metals in domestic refuse and their distribution in incinerator residues, *Waste Management and Research* 7, (1989), 57-62
 - 182 D. O. Reimann Antimon (Sb) im Abfall sowie quantitativer Vergleich zu weiteren Restabfallinhaltsstoffen, Kurzbericht UO1/539A/AM, Dezember (1995)
 - 183 T. Gebel, J. Schäfer, I. Beuermann, H. Von Platen, H. Dunkelberg, Biomonitoring-Untersuchungen bei Personen in Wohngebieten mit erhöhten Bodenwerten an Quecksilber, Arsen und Antimon, *Forum Städte - Hygiene*, 46, (1995), 211-215
 - 184 M. Bettineli, U. Baroni, N. Pastorelli, *J. Anal. Atom. Spec.*, 3, (1998), 1005
 - 185 L. S. Austin, G.E. Millward, *Atmosph. Environ.*, 22, (1988), 1395
 - 186 G. V. Cullen, N.G. Siviour, *Water Res.*, 16, (1982), 1357
 - 187 M. Bichler, R. Platschka, K. Polijanc, *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, 165, (1992), 61
 - 188 S. L. Chen, S.J. Yeh, T.H. Lin, *Biol. Trace Elem. Res.*, 48, (1995), 263
 - 189 G. S. Ghuman, B. G. Motes, S. J. Fernandez, *J. Environ. Radioact.*, 21, (1993), 161
 - 190 P. Eckl, W. Hofmann, R. Turk, *Rad. Environ. Biophys.*, 25, (1986), 43
 - 191 N. Ainsworth, J. A. Cooke, M.S. Johnson, *Environ. Pollut.*, 65, (1990), 65-79
 - 192 J. Pilarski, P. Waller, W. F. Pickering, *Water Air and Soil Pollut.*, 84, (1995), 51
 - 193 N. Ainsworth, J. A. Cooke, M.S. Johnson, *Water Air and Soil Pollut.*, 57-58, (1990), 193
 - 194 M.O. Andreae, J. F. Asmode, P. Foster, L. Van't dack, *Anal Chem*, 53, (1981), 1766
 - 195 M. O. Andreae, P.N. Froehlich, *Tellus*, 36B, (1984), 101-117
 - 196 N. Ulrich, *Analytica Chimica Acta*, 359, (1998), 245-253
 - 197 E. M. Krupp, R. Grümping, U. R. R. Furchtbar, A. V. Hirner, A.V., *Fresenius J Anal Chem.*, 354, (1996), 546-549
 - 198 H. Gürleyük, V. Van Fleet-Stalder, T. G. Chasteen, *Applied organometallic Chemistry*, Vol 11, (1997), 471-483
 - 199 P. A. Cox, *The elements: Their origin, abundance and distribution*, Oxford University Press, Oxford, (1989)
 - 200 IARG Monograph, International agency for research on cancer (IARG), Vol 47, Lyon, (1989), 21-30

-
- 201 Manual on visceral Leishmaniasis control. World Health Organization, Division of control of tropical diseases, Genf. (1996)
- 202 A. Motolese, M. Truzzi, A. Giannini, S. Seidenari, Contact Dermatitis, 28 (1993), 59-62
- 203 S. Ghosh, Curr. Med. Res. Opin., 6 (1979), 280-283
- 204 J. D. Chulay, H. G. Spencer, M. Mugambi, Am. J. Trop. Med. Hyg., 34, (1985), 702-709
- 205 A. D. M. Bryceson, Trans. Roy. Soc. Trop. Hyg. 64, (1970), 369-379
- 206 J. D. Berman, Clin. Infect. Dis., 24, (1997), 684-703
- 207 W. R., Ballou, J. R. McChain, D. M. Gardon,, G. D. Sanks, J. Andujar, J. D. Berman, Lancet, 2, (1987), 13-16
- 208 N. F. Izmerov, Antimony, Scientific Reviews of Soviet Literature on Toxicity and Hazards of Chemicals, Band. 71, Moskow, (1984)
- 209 17. BimSc V, B6 B1. I, (1990), 2545, 2832
- 210 Trinkwasserverordnung, Abschnitt II (besondere Untersuchungen nach § 12, Abs. 2, <http://gapinfo.de/gesundheitsamt/alle/gesetz/tw/twv/an/02.htm>, 9.1.04, 17:30
- 211 R. Enders, C. Vater, Jekel, Müll und Abfall, 22, 12, (1990), 784-792
- 212 T. Gebel, R. H. R. Suchenwirth, C. Behmke, A. Plessow, K. Clausen, E. Schulze, H. Dunkelberg, Gesundheitswesen, 60, (1998), 580-585
- 213 T. Norseth, I. Martinsen, Biological monitoring of toxic metals, T. W. Clarkson, Plenum Publishing Corporation, New York, (1988)
- 214 P. Smichowski, Y. Madrid, M. B. De la Calle-Guntiñas, C. J. Camara, J. Anal. At. Spectrom., 354, (1995), 546-550.
- 215 N. Miekeley, S. R. Mortari, A. O. Schubach, Anal. Bioanal. Chem., 372, (2002), 495-502.
- 216 H. Small, T. R. Miller Jr., Anal. Chem., 54, (1984), 462-470
- 217 W. Funk, V. Dammann, G. Donnervert, Qualitätssicherung in der analytischen Chemie, Verlag Chemie, Weinheim, 1. Auflage, (1992)
- 218 H. Kaiser, H. Specker, Fresenius' J. Anal. Chem., 149, (1956), 46-56
- 219 P. J. Naish, Analyst, 109, (1984), 809-815
- 220 J. S. Fritz, D. T. Gjerde, Ion Chromatography, Weinheim, Wiley-WCH, (2000)
- 221 R. D. Janke, G. K. Pagenkopf, Anal. Chem., 56, (1984), 85-87
- 222 J. Behnert, P. Behrend, A. Kipplinger, Labor Praxis, 10, (1986), 8, 872-875

-
- 223 U. R. Kunze, G. Schwedt, *Grundlage der qualitativen und quantitativen Analyse*. Stuttgart: Thieme, (1996)
- 224 Y. Baba, N. Yoza, S. Ohashi, *Chromatographia*, 350, (1985), 119-125
- 225 O. A. Shpigun, Y. A. Zolotov, *Ion chromatography in water analysis*, Chichester, IUK, Ellis Horwood Ltd., (1998)
- 226 M. J. Bloxham, P. J. Worsfold, S. Hill, *J. Anal. Proc.*, 31, (19894), 95-97
- 227 J. Weiß, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 320, (1985), 679-684
- 228 A. Seubert, *Habilitationschrift*, Hannover, (1995)
- 229 K. Bächmann, K.-H. Blaskowitz, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 333, (1989), 15-16
- 230 F. Waldner, *Dissertation*, Hannover, (2002)
- 231 M. Krachler, H. Emons, *Anal. Chim. Acta*, 429, (2001), 125-133
- 232 J. W. Jorgenson, K. D. Lukacs, *Anal. Chem.*, 53, (1981), 1298-1302
- 233 J. W. Jorgenson, K. D. Lukacs, *J. Chromatogr.*, 218, (1981), 209-216
- 234 L. R. Snyder, J. J. Kirkland, *Introduction to Modern Liquid Chromatography*, John Wiley, New York, (1979)
- 235 D. A. Skoog, J. J. Leary, *Instrumentelle Analytik*, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, (1996)
- 236 F. Foret, L. Kriyánkoyá, P. Bocek, *Capillary Zone, Electrophoresis*, Verlag Chemie, Weinheim, (1993)
- 237 J. Gorse, A. T. Balchunas, D. F. Swaile, M. J. Sepaniak, *HRC*, 11, (1988), 554-559
- 238 A. G. Ewing, A. Wallingford, *Adv. Chromatogr.*, 29, (1989), 1
- 239 A. E. Bretnall, G. S. Clarke, *J. Chromatogr. A* 716, (1995), 49-55
- 240 R. Kuhn, S. Hoffstetter-Kuhn, *Capillary Electrophoresis: Principles and Practice*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, (1993)
- 241 R. J. Wieme, *Chromatography, A Laboratory Handbook of Chromatographic and Van Nostrand Reinhold*, New York, (1975)
- 242 Casiot, C. et al., *The Analyst*, 123, (1998), 2887
- 243 Casiot C. et al., *Spectrochim. Acta B*, 57, (2002), 173
- 244 H. Engelhardt, W. Beck, T. Schmitt, *Kapillarelektrophorese*, Vieweg Verlag, Braunschweig, Wiesbaden, (1994)
- 245 J. C. Giddings, *Dynamics of Chromatography, Part I, Principles and Theory*, Marcel Dekker, New York, (1965)

-
- 246 M. Ephros, E. Waldman, D. Zilberstein, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 41, (1997), 1064-1068
- 247 D. Sereno, M. Cavaleyra, K. Zemzouni, S. Maquaire, A. Ouaiissi, J. L. Lemesre, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 42, (1995), 12
- 248 N. Ulrich, P. Shaked, D. Zilberstein, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 368, (2000), 62-66
- 249 P. Shaked, N. Ulrich, M. Ephros, D. Zilberstein, *J. of Biol. Chem.*, 276, (2001), 3971-3976
- 250 <http://dc2.uni-bielefel.de/dc2/rk-mmgl.htm>, 19.10.04, 12:45
- 251 C. Rodon, J. L. Bruguera, M. R. Brunetto, M. Galignani, Y. Petit de Pena, *Fresenius' J. Anal. Chem.*, 353, (1995), 133-138