

Volker Nischwitz

**Spezieserhaltende Extraktionsverfahren
für Festproben**



Herbert Utz Verlag · München

Ökologische Chemie

Zugl.: München, Techn. Univ., Diss., 2004

Bibliografische Information Der Deutschen Bibliothek:
Die Deutsche Bibliothek verzeichnet diese Publikation
in der Deutschen Nationalbibliografie;
detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über
<http://dnb.ddb.de> abrufbar.

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.
Die dadurch begründeten Rechte, insbesondere die der
Übersetzung, des Nachdrucks, der Entnahme von
Abbildungen, der Wiedergabe auf photomechanischem
oder ähnlichem Wege und der Speicherung in Daten-
verarbeitungsanlagen bleiben – auch bei nur auszugs-
weiser Verwendung – vorbehalten.

Copyright © Herbert Utz Verlag GmbH · 2004

ISBN 3-8316-0390-1

Printed in Germany

Herbert Utz Verlag GmbH, München
089-277791-00 · www.utzverlag.de

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	XII
Verzeichnis der verwendeten Formelsymbole.....	XV
1. Thematik und Hintergrund.....	1
1.1 Elementspeziesanalytik.....	1
1.2 Stabilität und Transformation von Elementspezies.....	3
1.3 Methoden der Speziesanalytik in flüssigen und gasförmigen Proben.....	5
1.4 Direkte Methoden der Speziesanalytik in festen Proben.....	8
1.5 Extraktionsverfahren für Festproben.....	11
1.6 Zielsetzung dieser Dissertation.....	12
2. Material und Methoden.....	16
2.1 Chemikalien, Modellspezies und Proben.....	16
2.2 Verwendete Laborgeräte und Verbrauchsmaterialien.....	17
2.3 Instrumentelle Analytik.....	18
2.3.1 Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC).....	18
2.3.2 Kapillarelektrophorese (CE).....	23
2.3.3 Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-MS).....	25
2.3.4 Optische Emissionsspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-OES).....	31
2.3.5 Elektrosprayionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS).....	33
2.3.6 Kopplungsmethoden.....	39
2.3.6.1 HPLC-ICP-MS (online).....	39
2.3.6.2 HPLC-ESI-MS (offline).....	42
2.3.6.3 CE-ESI-MS (online).....	43
2.4 Datenauswertung.....	44
2.4.1 Integrationssoftware für HPLC-ICP-MS: NICHROM.....	45
2.4.2 Berechnung der Analytkonzentrationen mit ihren Vertrauensbereichen.....	47
3. Spezieserhaltende Extraktionsverfahren.....	51
3.1 Referenzmaterialien für Spurenelementspezies.....	51
3.2 Spiking-Experimente.....	52

3.3 Allgemeines Konzept für die Optimierung der Extraktionsverfahren.....	54
3.4 Qualitätssicherung.....	55
4. Biomedizinische Matrix: Schweineleber.....	57
4.1 Anatomie und Biochemie der Leber.....	57
4.2 Modellverbindungen für die Methodenentwicklung: Metallothioneine (MT) und Superoxiddismutase (SOD).....	59
4.3 Literaturübersicht der Extraktionsverfahren für MT und CuZn-SOD aus Leberproben.....	62
4.4 Literaturübersicht der Analytik von MT und CuZn-SOD in Leberextrakten.....	64
4.5 Probenmaterial und Probenhandhabung.....	69
4.6 Methodenentwicklung für die Analyse der Modellspezies in Leberextrakten.....	71
4.6.1 Größenausschlusschromatographie (SEC) mit online UV- und ICP-MS-Detektion.....	72
4.6.2 Umkehrphasenchromatographie (RPC) mit online UV- und ICP-MS-Detektion.....	78
4.6.3 Kapillarelektrophorese (CE) mit online UV- und ESI-MS-Detektion.....	89
4.6.4 Umkehrphasenchromatographie (RPC) mit offline ESI-MS-Detektion.....	96
4.6.5 Probenaufschluss und Bestimmung der Gesamtgehalte mit ICP-OES.....	103
4.6.6 Schema für die Elementspeziesanalytik in Leberproben.....	105
4.6.7 Qualitätssicherung.....	106
4.7 Stufe 1: Stabilität der Modellspezies.....	107
4.7.1 Variation des Extraktionsmittels.....	107
4.7.2 Variation der Temperatur.....	110
4.7.3 Variation des pH-Wertes.....	111
4.7.4 Variation der Pufferkonzentration.....	112
4.7.5 Einfluss von Sauerstoff.....	113
4.7.6 Einwirkung von Ultraschall.....	114
4.7.7 Einwirkung von Mikrowellen.....	116
4.7.8 Wiederfindungen von Cd, Cu und Zn bei der RPC-ICP-MS.....	118
4.7.9 Zusammenfassung.....	119
4.8 Stufe 2: Extraktion gespikter Leberproben.....	120
4.8.1 Probenvorbereitung und Spike-Zusatz.....	121
4.8.2 Extraktion.....	121
4.8.3 Vergleich verschiedener Extraktionsverfahren aus der Literatur.....	122
4.8.4 Variation der Pufferkonzentration.....	126

4.8.5 Variation des Extraktionsmittel-Leber-Verhältnisses.....	127
4.8.6 Element-Massenbilanz.....	128
4.8.7 Zusammenfassung.....	131
4.9 Stufe 3: Extraktion ungespikter Leberproben.....	132
4.9.1 Charakterisierung der natürlichen Gehalte der Modellspezies am Bsp. eines Tris-Extrakts.....	133
4.9.2 Charakterisierung weiterer Spurenelementspezies am Bsp. eines Tris-Extrakts.....	142
4.9.3 Vergleich verschiedener Probenvorbereitungs- bzw. Probenlagerungsmethoden.....	147
4.9.4 Mehrfachextraktion.....	150
4.9.5 Anwendung der optimierten Extraktionsverfahren.....	151
4.9.6 Zellfraktionierung am Bsp. eines Tris/Saccharose-Extrakts.....	153
4.9.7 Element-Massenbilanz.....	156
4.9.8 Zusammenfassung.....	159
4.10 Diskussion und Ausblick.....	160
5. Umweltrelevante Matrix: Tunnelstaub.....	163
5.1 Zusammensetzung und Eigenschaften von Tunnelstaub.....	163
5.2 Emission von Pt-Spezies.....	166
5.3 Modellverbindungen für die Methodenentwicklung: Pt-Spezies verschiedener Oxidationsstufen.....	168
5.4 Literaturübersicht zur Extraktion von Pt-Spezies aus Straßen- bzw. Tunnelstaub.....	170
5.5 Literaturübersicht zur Analytik von Pt und Pt-Spezies in Umweltproben.....	172
5.6 Probenmaterial und Probenhandhabung.....	176
5.7 Sequentielle Extraktion von Tunnelstaub zur Fraktionierung der Elementgesamtgehalte nach abnehmender Mobilität.....	177
5.8 Methodenentwicklung für die Analyse von PtCl_4^{2-} und PtCl_6^{2-} in Tunnelstaubextrakten.....	180
5.8.1 Q-ICP-MS-Detektion von Pt.....	181
5.8.2 Ionenpaar-Umkehrphasenchromatographie (IP-RPC) mit ICP-MS-Detektion.....	186
5.8.3 Ionenchromatographie (IC) mit UV- und ICP-MS-Detektion.....	188
5.8.4 ESI-MS-Detektion der Modellspezies.....	199
5.8.5 Probenaufschluss und Bestimmung der Gesamtgehalte mit ICP-MS bzw. ICP-OES.....	203
5.8.6 Übersichtsschema zur Analytik der Chloroplatinate in Tunnelstaubextrakten.....	206
5.8.7 Qualitätssicherung und Validierung.....	207

5.9 Stufe 1: Stabilität der Modellspezies.....	209
5.9.1 Variation der Schüttelzeit.....	209
5.9.2 Variation des pH-Wertes.....	210
5.9.3 Variation des Extraktionsmittels.....	211
5.9.4 Variation des Energieeintrages.....	215
5.9.5 Pt-Gesamtgehalte in den Lösungen.....	217
5.9.6 Zusammenfassung.....	217
5.10 Stufe 2: Extraktion gespikter Tunnelstaubproben.....	218
5.10.1 Spike-Zusatz und Extraktion.....	218
5.10.2 Variation des pH-Wertes.....	219
5.10.3 Variation des Extraktionsmittels (gemischte Spikelösung).....	222
5.10.4 Variation des Extraktionsmittels (einzelne Spikelösungen).....	225
5.10.5 Variation des Extraktionsmittel-Tunnelstaub-Verhältnisses.....	228
5.10.6 Platin-Massenbilanz.....	229
5.10.7 Extrahierte Gehalte weiterer Elemente im Vergleich zu Pt.....	230
5.10.8 Zusammenfassung.....	232
5.11 Stufe 3: Extraktion ungespikter Tunnelstaubproben.....	233
5.11.1 Extraktion von Tunnelstaub BCR-723.....	234
5.11.2 Extraktion von Staub aus dem Saukopftunnel.....	236
5.11.3 Detektion weiterer Elemente bei der IEC-ICP-MS.....	240
5.11.4 Extrahierte Gehalte weiterer Elemente im Vergleich zu Pt.....	241
5.11.5 Element-Massenbilanz.....	242
5.11.6 Zusammenfassung.....	243
5.12 Diskussion und Ausblick.....	244
6. Gesamtdiskussion: Vergleichende Bewertung der Ergebnisse beider Matrices.....	247
7. Zusammenfassung.....	251
8. Ausblick.....	256
9. Literaturverzeichnis.....	258

Anhang 1 Literaturübersicht von Extraktionsverfahren für MT und CuZn-SOD aus Leberproben.....	270
Anhang 2 Literaturübersicht von Analysenmethoden bzw. Trennverfahren für MT und CuZn-SOD in Leberextrakten oder (kommerziellen) Präparationen aus Leber....	276
Anhang 3 Literaturübersicht von Methoden zur Pt-Bestimmung in Straßenstaub bzw. Tunnelstaub.....	294

1. Thematik und Hintergrund

Die Relevanz und Notwendigkeit der Entwicklung und Optimierung spezieserhaltender Extraktionsverfahren für Festproben werden in diesem einleitenden Kapitel hervorgehoben. Zunächst erfolgt eine Definition und grundlegende Darstellung der Elementspeziesanalytik, die seit der Etablierung sogenannter Kopplungstechniken aus Trennsystemen und elementselektiven Detektoren in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung gewinnt. Besondere Aufmerksamkeit muss dabei der Stabilität der analysierten Elementspezies sowie der Charakterisierung ggf. auftretender Transformationsprodukte zukommen. Dies stellt einen wesentlichen Qualitätssicherungsaspekt für die Bestimmung zuverlässiger d.h. für die Probe repräsentativer Ergebnisse dar. Die Mehrzahl der bisher publizierten Anwendungen der Elementspeziesanalytik wurde für gelöste Verbindungen in flüssigen Matrices entwickelt, da diese Proben direkt mit den erwähnten Kopplungstechniken analysiert werden können. Auch gasförmige Proben lassen sich ohne aufwendige Probenvorbereitung direkt charakterisieren. Dagegen stehen bisher für die direkte Elementspeziesanalytik in festen Proben keine ausreichend selektiven und sensitiven Methoden zur Verfügung. Daraus ergibt sich die Notwendigkeit, Extraktionsverfahren anzuwenden, um die Zielverbindungen in Lösung zu überführen und den Kopplungstechniken der Elementspeziesanalytik zugänglich zu machen. Die vielfältigen Fragestellungen und Probleme, die dieser Ansatz mit sich bringt, wie Extraktionseffizienz und Extraktionsrückstände, Beeinflussung der Speziesstabilität, Probenhomogenität und Referenzmaterialien leiten direkt über zu der Zielsetzung dieser Dissertation. Im Vordergrund steht dabei die Entwicklung und Optimierung schonender Extraktionsverfahren für Spurenelementspezies sowohl aus einer biomedizinischen Matrix als auch aus einer umweltrelevanten Matrix anhand ausgewählter Modellverbindungen.

1.1 Elementspeziesanalytik

Seit Beginn der instrumentellen Spurenelementanalytik vor etwa 50 Jahren wurden vorwiegend die Gesamtgehalte der Elemente in einer Vielzahl von Matrices bestimmt. In Realproben liegen die Elementgehalte jedoch selten in elementarer Form vor, sondern meist als chemische Verbindungen, die oft sehr unterschiedliche chemische, physikalische und toxische Eigenschaften besitzen. Diese Komplexität an Bindungsformen kann nicht durch den Gesamtgehalt der Elemente charakterisiert werden. Zur Lösung dieser Problematik werden seit ca. 20 Jahren Methoden der Elementspeziesanalytik entwickelt und zur qualitativen und quantitativen Bestimmung von Spurenelementverbindungen (Spezies) angewandt [Bernhard

et al. 1986; Günther und Weber 1998; Cornelis et al. 2000; Ebdon et al. 2001; Cornelis et al. 2003]. Dabei wird eine chemische Spezies definiert als bestimmte Form eines Elements, die festgelegt ist durch ihre Isotopenzusammensetzung, ihren elektronischen Zustand oder Oxidationszustand und ihre Komplex- bzw. Molekülstruktur [Templeton et al. 2000]. Entsprechend wird die Spezies-analytik definiert als analytische Aktivität zur Identifizierung und/oder Quantifizierung einer oder mehrerer individueller chemischer Spezies in einer Probe [Templeton et al. 2000]. Beispiele chemischer Spezies sind in Tab. 1 aufgeführt.

Tab. 1 Beispiele für chemische Spezies nach Templeton et al. [Templeton et al. 2000]

Speziescharakteristik	Beispiel
Isotopenzusammensetzung	^{206}Pb , ^{207}Pb , ^{208}Pb
Elektronischer Zustand bzw. Oxidationszustand	Cr(III), Cr(VI); Fe(II), Fe(III)
Anorganische Verbindungen und Komplexe	Ni_3S_2 , NiO, Ni^0 , NiCl_2 , NiCO_3
Organische Komplexe	Cd-EDTA, Ferrioxamine
Metallorganische Verbindungen	HgCH_3^+ ; $\text{Pb}(\text{CH}_3)_4$, $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_5)_4$; $\text{Sn}(\text{CH}_3)_3^+$
Makromolekulare Verbindungen und Komplexe	Cd-/Cu- oder Pb-Huminsäurekomplexe

Das bekannteste Beispiel der Elementspeziesanalytik ist die analytische Charakterisierung zahlreicher Kohlenstoffspezies, die als organische Spurenanalytik ein eigenständiges, seit langem etabliertes Teilgebiet der chemischen Analytik darstellt. Die strukturelle Vielfalt organischer Verbindungen wie Methanol, Phenol, Glucose, polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen, Dioxinen und Proteinen wäre allein durch Anwendung der Elementaranalyse von Kohlenstoff niemals auch nur annähernd adäquat charakterisiert worden. In Analogie lässt sich erahnen, wieviel Information dem Analytiker entgeht, wenn er eine Probe nur durch die Gesamtgehalte der Spurenelemente charakterisiert.

Mehrere Ursachen sind dafür anzuführen, dass die Entwicklung von Methoden zur Elementspeziesanalytik erst relativ spät begann.

Erstens wurde die Toxizität von Schwermetallbelastungen in umweltrelevanten und biologischen Matrices lange mit dem Gesamtgehalt dieser Metalle korreliert und selten auf eine bestimmte Verbindung zurückgeführt.

Zweitens standen erst mit der Entwicklung der optischen Emissionsspektrometer und insbesondere der Massenspektrometer mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-OES, ICP-MS) leistungsfähige und robuste elementselektive Detektoren für online Kopplungen mit Flüssig-

Trennsystemen zur Verfügung.

Drittens eignet sich die Gaschromatographie, die die organische Spurenanalytik wesentlich vorantrieb, nur in wenigen Fällen für die Trennung von Spurenelementspezies, da diese überwiegend nicht flüchtig und häufig beim Erhitzen instabil sind. Metallorganische Verbindungen wie Mono-, Di-, Tri-butylzinn, Methylquecksilber und Trimethylblei, die nach Derivatisierung gaschromatographisch getrennt werden können, gehören dementsprechend zu den am häufigsten charakterisierten Spurenelementspezies [Rosenberg und Ariese 2001].

Viertens sind viele Zielverbindungen der Speziesanalytik wenig stabil gegenüber Oxidation, Veränderungen des pH-Wertes und Temperaturerhöhung (Vgl. 1.2).

Fünftens stehen häufig die Zielspezies nicht als Reinsubstanzen für Methodenentwicklung und Kalibration zur Verfügung, da es sich z.B. um nicht eindeutig charakterisierte Emissionen und deren Transformationsprodukte handelt oder um Verbindungen, die in biologischen Systemen synthetisiert werden.

Schließlich wird in der biomedizinischen Forschung zunehmend die Bedeutung von Spurenelementen und deren Spezies in biologischen Systemen erkannt, was der Speziesanalytik ein sehr breites, vielfältiges und anspruchsvolles Forschungsgebiet eröffnet und Impulse für die Entwicklung neuer Konzepte, Geräte und Methoden gibt [Szpunar 2000].

1.2 Stabilität und Transformation von Elementspezies

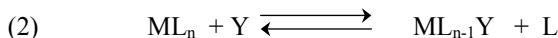
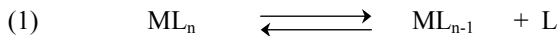
Die wichtigste Voraussetzung für die Speziesanalytik ist eine ausreichende Stabilität der Zielverbindungen. Zuverlässige Ergebnisse können nur dann erreicht werden, wenn die Spurenelementspezies in der Probe den gesamten Analysenprozess ohne relevante Veränderung durchlaufen und schließlich dieselben Spezies identifiziert und quantifiziert werden. Gegebenenfalls ist eine Transformation der Zielspezies akzeptabel, falls diese definiert, quantitativ und somit reproduzierbar erfolgt und die wesentliche Speziesinformation der ursprünglichen Verbindungen erhalten bleibt.

Am Beispiel der Metallspezies, der abgesehen von den Kohlenstoffspezies wichtigsten Teilmenge der Elementspezies, werden im folgenden verschiedene Bindungsarten und mögliche Transformationen dargestellt [Holleman-Wiberg 1995].

a) Anorganische Komplexe:

Im einfachsten Fall liegen hydratisierte Metallionen in Lösung vor (z.B. $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$). Bei Anwesenheit geeigneter Lewis-Basen wie Cl^- , OH^- , NH_3 oder CN^- als Liganden erfolgt eine Substitution der Wassermoleküle unter Bildung einfacher anorganischer Komplexe wie

$[\text{Cu}(\text{NH}_3)_4]^{2+}$. Entsprechend dieser Bildungsreaktion liegen Metallkomplexe in einem Dissoziationsgleichgewicht (1) vor, wobei die dominierende Spezies durch die Lewis-Basenstärke und die Konzentration der konkurrierenden Liganden bestimmt wird (2).



Durch Zusatz potentieller Liganden (z.B. als Bestandteil von Extraktionsmitteln oder Eluenten) können somit Veränderungen solcher Ligandenaustausch-Gleichgewichte und damit Transformationen der Spezies eintreten. Dabei bleibt jedoch die Oxidationsstufe des Metallions als Information erhalten. Redoxreaktionen z.B. durch Kontakt mit Luftsauerstoff verändern dagegen die Oxidationsstufe des Metallions z.B. $\text{Fe}^{2+}(\text{aq}) \rightarrow \text{Fe}^{3+}(\text{aq})$. Änderungen des pH-Wertes können sowohl Liganden durch Säure-Base-Reaktionen verändern (z.B. $\text{OH}^- \rightarrow \text{H}_2\text{O}$) als auch Redoxpotentiale ϵ_0 beeinflussen (z.B. $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$: $\epsilon_0(\text{pH } 0) = 0.77 \text{ V}$ und $\epsilon_0(\text{pH } 14) = -0.69 \text{ V}$). Außerdem ist durch Bildung schwerlöslicher Komplexe z.B. AgI , $\text{Fe}(\text{OH})_3$ eine Immobilisierung der Spezies möglich.

b) Metallorganische Verbindungen:

Metall-Kohlenstoffbindungen sind wegen ihrer Polarität meist wenig stabil und insbesondere hydrolyseempfindlich z.B. Grignard-Verbindungen (Alkyl-Mg-Halogenid). Eine Ausnahme bilden u.a. Alkyl-Verbindungen von Sn, Pb und Hg, die eine vergleichsweise hohe Stabilität gegenüber Oxidation, Hydrolyse und Temperaturerhöhung aufweisen. Dennoch wurden Veränderungen von Alkyl-Metallspezies während der Probenlagerung und Probenvorbereitung nachgewiesen z.B. Dealkylierung von Tributylzinn [Rosenberg und Ariese 2001, Bancon-Montigny et al. 2001].

c) Metallkomplexe mit organischen Liganden:

Bei diesem Bindungstyp muss insbesondere zwischen niedermolekularen Liganden wie Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) und hochmolekularen Liganden wie apo-Metallothionein (MT) unterschieden werden. Mit zunehmender Größe des Liganden verlagert sich der Betrachtungsschwerpunkt vom Metall, dem Zentralatom in einkernigen Komplexen, zum Liganden als dominierendem Bestandteil in makromolekularen Komplexen. Zahlreiche Transformationen sind möglich durch Veränderung der Metallionen, durch Veränderung der organischen Liganden sowie durch Beeinflussung der Metall-Ligand-Wechselwirkungen. Beim Metall kann eine Änderung der Oxidationsstufe durch Redoxreaktionen eintreten. Beim