



Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg

Fakultät Life Sciences

Department Biotechnologie

Entwicklung und Validierung zweier ionenchromatographischer Methoden zur Spurenelementbestimmung in Hefeextrakt

Bachelorarbeit

im Studiengang

Biotechnologie

Vorgelegt von

Katharina Großbongardt



Hamburg am

14.12.2018

Erstgutachter: Prof. Dr. Susanne Töpfke (HAW Hamburg)

Zweitgutachter: Prof. Dr. Gesine Cornelissen (HAW Hamburg)

Diese Abschlussarbeit wurde erstellt und betreut im Labor für Instrumentelle Analytik der HAW Hamburg, Fakultät Life Sciences

Danksagung

Mein Dank gilt allen, die mir bei der Erstellung der Arbeit geholfen haben. Als erstes möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Susanne Töpfke und Frau Prof. Dr. Gesine Cornelissen bedanken, die meine Arbeit an der HAW Hamburg betreut und im Vorfeld alles Nötige in die Wege geleitet haben. Ebenso möchte ich mich bei Frau Stefanie Kaul bedanken, für ihr Vertrauen, sowie bei Herrn Graß und Herrn Westphal, die mir bei Problemen im Labor stets mit Rat und Tat zur Seite standen. Dank gebührt außerdem Frau Denise Brandt von der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, die so freundlich war und diese Arbeit vor der Abgabe Korrektur gelesen hat.

Besonders danken möchte ich auch meiner Familie und meinen Freunden, die mich immer unterstützt und motiviert haben. Danke. Ich hab' euch lieb.

Inhalt

1. Zielsetzung der Arbeit	5
2. Einleitung.....	6
2.1. Bedeutung der einzelnen Analyten für Mikroorganismen.....	6
2.1.1. Anionen	6
2.1.2. Kationen	6
2.2. Ionenchromatographie.....	6
2.3. Kriterien der Validierung	7
2.3.1. Richtigkeit.....	7
2.3.2. Spezifität und Selektivität.....	8
2.3.3. Wiederfindungsrate	8
2.3.4. Präzision	8
2.3.5. Linearität	9
2.3.6. Nachweis- und Bestimmungsgrenze	9
2.3.7. Robustheit	9
3. Material und Methoden	11
3.1. Material	11
3.1.1. Hefeextrakte.....	11
3.1.2. Medien, Lösungen und Chemikalien	11
3.1.3. Geräte.....	11
3.1.3.1. Metrohm 792 Basic IC	11
3.1.3.2. Merck Hitachi IC-Anlage	13
3.2. Methoden.....	14
3.2.1. Probenvorbereitung	14
3.2.2. Anionenanalytik.....	14
3.2.3. Kationenanalytik.....	15
3.2.4. Zehnpunktkalibrierung	15
3.2.5. Streuversuch mit Standards	15
3.2.6. Streuversuch mit Hefeextrakt	16
3.2.7. Standardaddition.....	16
4. Ergebnisse.....	17
4.1. Beispielchromatogramme und Retentionszeiten.....	17
4.2. Zehnpunktkalibrierung	19

4.3.	Messpräzision und zeitliche Stabilität	22
4.4.	Streuung einer realen Probe	25
4.5.	Verschiedene Hefeextrakte im Vergleich	26
4.6.	Überprüfung der Laborpräzision	27
4.7.	Wiederfindungsrate	29
4.8.	Überprüfung der Robustheit anhand der Kalibrierdaten.....	29
5.	Diskussion.....	31
5.1.	Qualität der chromatographischen Trennung.....	31
5.2.	Streuung der Messwerte und zeitliche Stabilität	31
5.3.	Robustheit der Methode.....	32
5.4.	Wiederfindungsrate	32
5.5.	Verschiedene Hefeextrakte im Vergleich.....	32
5.6.	Vergleich der gemessenen Konzentrationen mit den Angaben des Herstellers.....	33
5.7.	Laborpräzision	33
5.8.	Ausblick – Ansätze zur Verbesserung und Lösung aufgetretener Probleme	34
6.	Zusammenfassung und Fazit	35
7.	Anhang.....	36
	Abkürzungsverzeichnis.....	36
	Abbildungsverzeichnis.....	37
	Tabellenverzeichnis	38
	Literaturverzeichnis.....	40
	Chemikalienliste	41
	Geräteliste	42

1. Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist es, jeweils eine ionenchromatographische Methode zur Bestimmung verschiedener Anionen (Chlorid, Nitrat, Sulfat, Phosphat) und Kationen (Magnesium, Eisen) in Hefeextrakt zu entwickeln und zu validieren. Durch die Validierung wird gewährleistet, dass die Methode für den vorgesehenen Gebrauch geeignet ist. Eine Validierung umfasst stets verschiedene Kriterien, deren Berücksichtigung und Wichtigkeit von der individuellen analytischen Fragestellung abhängig sind. Die Vermutung ist, dass alle genannten Spurenelemente mittels Ionenchromatographie präzise zu bestimmen sind. Die Plausibilität der Ergebnisse kann anhand der Datenblätter der im Projekt verwendeten Hefeextrakte überprüft werden. Es soll ermittelt werden, unter welchen Bedingungen stabile, reproduzierbare Messergebnisse zu erzielen sind, die Erkenntnisse dieser Arbeit sollen später auch Anwendung im Rahmen einer Dissertation finden.

2. Einleitung

2.1. Bedeutung der einzelnen Analyten für Mikroorganismen

Hefeextrakt findet in der Kultivierung von Mikroorganismen breite Anwendung als Grundlage für Nährmedien. Da verschiedene Hefeextrakte über verschiedene Nährstoffzusammensetzungen verfügen, ist es wichtig diese zu kennen, um sicherzustellen, dass alle nötigen Nährstoffe in ausreichender Menge vorliegen und potenziell toxische Bestandteile nicht in zu hohen Konzentrationen vorkommen. [Schlegel, 2007]

2.1.1. Anionen

Elementares Chlor macht nur einen sehr geringen Anteil der Trockenmasse prokaryotischer Zellen aus (ca. 0,5 %). Viele Spurenelemente liegen jedoch als Chlorid vor. Nitrat und Sulfat dienen als Stickstoff- bzw. Schwefelquellen, welche zur Synthese von Aminosäuren und Proteinen nötig sind. Phosphor macht ebenfalls nur einen kleinen Teil der Trockenmasse (2-3 %) aus und liegt intrazellulär fast ausschließlich als Phosphat vor. Im Nährmedium liegt Phosphat oft trotzdem in hohen Konzentrationen vor, da das Phosphatsystem ($\text{HPO}_4^{2-}/\text{H}_2\text{PO}_4^-$) gerne zur Pufferung der Nährlösung verwendet wird. [Schlegel, 2007]

2.1.2. Kationen

Magnesium gehört zu den Makroelementen und hat einen Anteil von ca. 0,5 % an der Trockenmasse. Eisen ist als Cofaktor an der enzymatischen Umsetzung anderer Substanzen beteiligt. Da Eisen zu den Schwermetallen gehört, sollte es nur maßvoll zudosiert werden. In zu hoher Konzentration wirkt es toxisch auf die Mikroorganismen. [Schlegel, 2007]

2.2. Ionenchromatographie

Bei der Ionenchromatographie handelt es sich um eine Methode zur Trennung organischer oder anorganischer Anionen und Kationen. Die in der Probe enthaltenen Ionen werden hier nach ihrer Ladungsstärke und Größe aufgetrennt, indem sie mit den OH^- bzw. H^+ -Ionen der mobilen Phase um die freien Bindungsstellen an der stationären Phase konkurrieren. Kleine und schwach geladene Ionen eluieren dadurch eher früh, während größere und stärker geladene Ionen stärker durch die Trennsäule zurückgehalten werden (siehe Abb. 1). Zur Detektion wird in der Regel ein Leitfähigkeitsdetektor am Ende der Trennstrecke eingesetzt. Je nach Analyt wird unterschieden in Kationen- und Anionenaustauschchromatographie. Da die mobile Phase eine gewissen Eigenleitfähigkeit besitzt, ist es gegebenenfalls von Vorteil, einen Supressor zwischen Säule und

Detektor zu schalten, welcher die Eigenleitfähigkeit der mobilen Phase unterdrückt und somit eine empfindlichere Messung gewährleistet. In dieser Arbeit wurde bei der Anionenanalytik ein Suppressor verwendet. In diesem Falle handelt es sich hierbei um einen Kationenaustauscher, der die positiv geladenen Ionen abfängt. Diese lagern sich an die negativ geladene mobile Phase des Suppressors. Es wurde mit einer Drei-Säulen-Technik gearbeitet, d.h. eine Suppressorsäule ist im Gebrauch, eine wird mit Wasser gespült und eine wird mit Schwefelsäure regeneriert. [Gey, 2015]

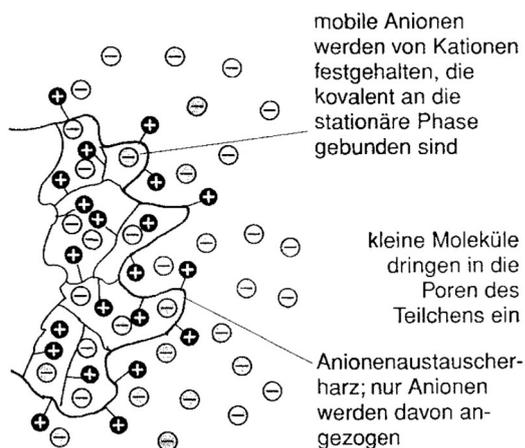


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Wirkungsweise eines Anionenaustauschers. [Quelle: Cammann: Instrumentelle Analytische Chemie]

2.3. Kriterien der Validierung

Im Folgenden sollen die Kriterien, die bei der Validierung einer Methode wichtig sind, kurz beschrieben werden.

2.3.1. Richtigkeit

Die Richtigkeit gibt Aufschluss darüber, wie stark das Messergebnis aufgrund systematischer Fehler vom "wahren Wert" abweicht. Das Fehlen von systematischen Fehlern ist somit eine Grundvoraussetzung für die Richtigkeit einer Methode. Ebenfalls Voraussetzung für die Richtigkeit einer Methode sind die Selektivität sowie eine Wiederfindungsrate von 100 % nach jedem Schritt der Probenvorbereitung (oder die Möglichkeit, dies rechnerisch zu korrigieren).

Die Richtigkeit einer Methode wird über die statistische Größe des Mittelwertes angegeben. Dieser berechnet sich folgendermaßen:

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$$

[Kromidas, 1999]

2.3.2. Spezifität und Selektivität

Eine Methode arbeitet dann selektiv, wenn verschiedene, nebeneinander zu bestimmende Komponenten ohne gegenseitige Störung erfasst und identifiziert werden können.

Die Spezifität einer Methode hingegen ist die Fähigkeit, eine Substanz oder Substanzklasse ohne Verfälschung durch andere Bestandteile der Probe eindeutig zu erfassen.

Eine selektive Methode liefert also richtige Ergebnisse für alle interessierenden Analyten, während eine spezifische Methode richtige Ergebnisse für einen einzelnen Analyten liefert, während andere Analyten sich gegenseitig stören können. [Kromidas, 1999]

2.3.3. Wiederfindungsrate

Anhand der Wiederfindungsrate lässt sich herausfinden, ob Teile des Analyten im Laufe der Probenvorbereitung verloren gehen. Dies kann bei verschiedenen Schritten der Probenaufarbeitung passieren, beispielsweise durch Extraktion, Filtration oder Aufschlüsse. Idealerweise liegt die Wiederfindungsrate bei 100 %. In diesem Falle ist bewiesen, dass die Methode selektiv, richtig und robust ist, allerdings nur unter den Bedingungen, unter denen die Wiederfindungsrate ermittelt wurde (Konzentration, Matrix, experimentelle Bedingungen). [Kromidas, 1999]

Um die Wiederfindungsrate zu ermitteln, wird eine Standardaddition durchgeführt (siehe 3.2.7.). Die Wiederfindungsrate berechnet sich dann wie folgt:

$$WFR = \frac{\omega_{\text{aufgestockt}} - \omega_{\text{Probe}}}{\omega_{\text{Zugabe}}} * 100 \%$$

mit

$$\omega_{\text{Zugabe}} = \frac{\text{Zugegebene Menge des Analyten}}{\text{Eingewogene Probemenge}}$$

2.3.4. Präzision

Die Präzision einer Methode drückt die Übereinstimmung unabhängiger Analysenergebnisse untereinander, also die Streuung der Analysenergebnisse, aus.

Bei der Präzision wird unterschieden in Systempräzision und Methodenpräzision.

Die Systempräzision fasst alle Schwankungen zusammen, die durch das Analysengerät selbst entstehen. Die Methodenpräzision gibt die zufällige Streuung der Messergebnisse wieder.

Ebenfalls wichtig für die Fragestellung dieser Arbeit ist die sogenannte Laborpräzision. Sie ist ein Maß für die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse unter Vergleichsbedingungen (in diesem Falle das gleiche Labor und das gleiche Gerät, aber verschiedene Anwender).

Die der Präzision zugeordnete statistische Größe ist die Standardabweichung:

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

[Kromidas, 1999]

2.3.5. Linearität

Linearität in einem bestimmten Konzentrationsbereich ist gegeben, wenn das Messsignal sich direkt proportional zur Konzentration des Analyten verhält. Die Linearität lässt sich aus der Kalibrierfunktion ablesen, bei der das Signal gegen die Konzentration aufgetragen wird. Wie viele Messpunkte die Kalibrierfunktion umfasst, ist von der Fragestellung und den Anforderungen an die Methode abhängig. [Kromidas: Methodvalidierung in der Analytik]

2.3.6. Nachweis- und Bestimmungsgrenze

Die Nachweisgrenze ist die kleinstmögliche Konzentration des Analyten, bei der er noch als solcher erkannt werden kann. Die Bestimmungsgrenze ist die kleine, noch quantifizierbare Konzentration des Analyten. Gängig in der Chromatographie ist das dreifache Rauschen als Nachweisgrenze und das zehnfache Rauschen als Bestimmungsgrenze.

Nachweis- und Bestimmungsgrenze sind auch immer eine Aussage über den aktuellen Gerätezustand, deswegen sollten diese Werte nach Wartungsarbeiten oder Reparaturen immer neu ermittelt werden. [Kromidas: Methodvalidierung in der Analytik]

2.3.7. Robustheit

Unter der Robustheit eines Verfahrens versteht man die Fähigkeit, ein durch variierende Bedingungen nur wenig oder gar nicht verfälschtes Ergebnis zu liefern, also die Unabhängigkeit des Ergebnisses von Änderungen aller relevanten Einflussparameter. Diese Parameter können in der Chromatographie zum Beispiel pH, Temperatur, Flussrate oder Matrix sein. Der Bereich, in dem die

Ergebnisse trotz eines veränderten Parameters stabil bleiben, gibt die Robustheit einer Methode wieder. So kann eine Methode z.B. robust zwischen $\text{pH}=6$ und $\text{pH}=8$ oder zwischen 30°C und 35°C sein. [Kromidas, 1999]

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Hefeextrakte

Im Rahmen des Projektes wurde mit drei verschiedenen Hefeextrakten gearbeitet: Leiber Fermentation H, Leiber Fermentation S und AngelYeast 803. Alle drei Extrakte unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Nährstoffzusammensetzung und dem Grad ihrer Aufreinigung. Bei Fermentation H handelt es sich um hydrolysierte und getrocknete Brauereihefe während Angel Yeast aus Bäckerhefe hergestellt wurde. Fermentation S besteht ebenfalls aus Brauereihefe, ist jedoch weniger stark aufgereinigt als Fermentation H.

Für die Ermittlung der Streuung einer realen Probe und der Wiederfindungsrate wurde FermH in den angegebenen Konzentrationen verwendet.

3.1.2. Medien, Lösungen und Chemikalien

Eine detaillierte Liste aller Chemikalien und Lösungen ist im Anhang zu finden.

3.1.3. Geräte

Eine detaillierte Liste aller verwendeten Geräte ist im Anhang zu finden.

3.1.3.1. Metrohm 792 Basic IC



Abbildung 2: Metrohm 792 Basic IC

Dieses Gerät wurde für die Anionenanalytik eingesetzt. Die Anlage wird über einen Laptop und die dazugehörige Software gesteuert. Die Probe wird über eine Spritze in das Gerät gezogen und über ein Sixport-Ventil injiziert. Durch die Pumpe wird die Probe zunächst über zwei Vorsäulen geleitet. Eine Vorsäule besteht aus RP-18-Säulenmaterial und hat den Zweck, organische Komponenten abzufangen. Die zweite Vorsäule besteht aus dem gleichen Material wie die Trennsäule und verhindert, dass die Trennsäule durch irreversibel bindende Substanzen über die Zeit zunehmend unbrauchbar wird. Auf der Trennsäule werden die einzelnen Anionen in der Probe nach ihrer Größe und Ladungsstärke aufgetrennt. Zwischen Säule und Detektor befindet sich ein Suppressor, der die Eigenleitfähigkeit des Eluenten unterdrückt und so empfindlichere Messungen erlaubt. Der genaue Trennmechanismus und die Wirkungsweise des Suppressors ist in Abschnitt 2.2. beschrieben. Die Detektion erfolgt über einen Leitfähigkeitsdetektor, dessen Messwerte in Echtzeit aufgezeichnet werden und am Ende der Messung das Chromatogramm ergeben.

Die Anlage wird mit drei verschiedenen Lösungen gespeist, neben dem Eluenten wird zusätzlich mit einer Schlauchpumpe Wasser und Schwefelsäure gefördert, um die Suppressorsäulen zu spülen und zu regenerieren. Alle Substanzen werden, nachdem sie die Anlage verlassen haben, in einem Abfallbehältnis gesammelt.

3.1.3.2. Merck Hitachi IC-Anlage



Abbildung 3: Merck Hitachi IC-Anlage. Ganz rechts befindet sich der Säulenofen, links davon befinden sich der Leitfähigkeitsdetektor, das Interface und die Pumpe (von oben nach unten).

Die zur Kationenbestimmung eingesetzte Anlage besteht aus vier Komponenten, die alle separat zu bedienen sind. Die Probe wird hier mit einer Spritze in das Sixport-Ventil eingespritzt (Stellung "Load") und durch manuelle Betätigung (Stellung "Inject") injiziert. Mittels Pumpe (Merck Hitachi L-7110) wird die Probe auch hier zunächst über eine Vorsäule aus RP-18-Säulenmaterial geleitet, um störende organische Komponenten abzufangen. Die einzelnen Analyten werden durch die Trennsäule nach ihrer Größe und Ladung aufgetrennt, durch einen Säulenofen (Merck Hitachi 655A-52) kann die optimale Temperatur für den Trennvorgang eingestellt werden. Die Detektion erfolgt wie auch bei der Anionenanalytik über einen Leitfähigkeitsdetektor (Merck Hitachi L-3720) und über ein Interface (Merck Hitachi D-7000) werden die Messergebnisse des Detektors an den PC weitergeleitet, um mit der dazugehörigen Software aufgezeichnet und ausgewertet zu werden.

3.2. Methoden

3.2.1. Probenvorbereitung

Die Hefeextrakte wurden in geeigneter Menge eingewogen und in 100 ml Eluent (Anionenanalytik) bzw. 2 mM Ascorbinsäure (Kationenanalytik) gelöst. Die verschiedenen Einwaagen sind in Tabelle 1 aufgelistet. Vor Injektion in das Messgerät wurden alle Probelösungen durch einen HPLC-Filter mit einer Porengröße von 0,45 µm filtriert.

Hefeextrakt	Anionenanalytik	Kationenanalytik
Leiber Ferm H	30 mg	400 mg
Leiber Ferm S	30 mg	400 mg
Angel Yeast 803	30 mg	400 mg

Tabelle 1: Einwaagen der verschiedenen Hefeextrakte

3.2.2. Anionenanalytik

Für die Anionenbestimmung wurde zunächst das Messgerät kalibriert. Für Chlorid, Nitrat und Sulfat wurde ein Konzentrationsbereich von 0,5 – 5 mg/l gewählt, für Phosphat ein Kalibrierbereich von 2 – 20 mg/l. Die genauen Konzentrationen der Standards sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Standard	Chlorid	Nitrat	Phosphat	Sulfat
1	0,5 mg/l	0,5 mg/l	2 mg/l	0,5 mg/l
2	1 mg/l	1 mg/l	5 mg/l	1 mg/l
3	2,5 mg/l	2,5 mg/l	15 mg/l	2,5 mg/l
4	5 mg/l	5 mg/l	20 mg/l	5 mg/l

Tabelle 2: Standardkonzentrationen in der Anionenanalytik

Nach erfolgreicher Kalibrierung können die Proben analysiert und werden. Die Messparameter sind in Tabelle 3 aufgelistet.

Druck	6-8 MPa
Flow	1 ml/min (Eluent), 0,5 ml min (H ₂ O, H ₂ SO ₄)
Temperatur	Raumtemperatur
Detektoren	Leitfähigkeit
Eluent	1,8 mM Na ₂ CO ₃ / 1,7 mM NaHCO ₃
Laufzeit	17 min
Probenvolumen	100 µl

Tabelle 3: Messparameter bei der Anionenanalytik

3.2.3. Kationenanalytik

Vor Beginn der Messungen erfolgte eine Kalibrierung des Messgrätes. Es wurde ein Konzentrationsbereich von 1-10 mg/l (Fe) bzw. 5-50 mg/l (Mg) gewählt. Nach erfolgreicher Kalibrierung können die Proben gemessen werden, eine genaue Auflistung der Messparameter ist in Tabelle 4, die Standardkonzentrationen in Tabelle 5 zu finden.

Druck	6-6,5 MPa
Flow	1,0 ml/min
Temperatur	35° C
Detektoren	Leitfähigkeit
Eluent	0,1 mM Dipicolinsäure / 3mM Ascorbinsäure / 2,34 mM HNO ₃
Laufzeit	26 min
Probenvolumen	20 µl

Tabelle 4: Messparameter bei der Kationenanalytik

Standard	Eisen	Magnesium
1	1 mg/l	5 mg/l
2	2,5 mg/l	10 mg/l
3	5 mg/l	25 mg/l
4	10 mg/l	50 mg/l

Tabelle 5: Standardkonzentrationen in der Kationenanalytik

3.2.4. Zehnpunktkalibrierung

Die Zehnpunktkalibrierung dient der Aufnahme der Verfahrenskenndaten, u.a. der Nachweis- und Bestimmungsgrenze. Für eine solche Kalibrierung werden zehn äquidistante Standards angesetzt, gemessen und das Messsignal (in diesem Falle die Peakfläche) gegen die Konzentration aufgetragen. Mittels einer vorgefertigten Excel-Tabelle können daraus neben der Kalibrierfunktion auch die Nachweis- und Bestimmungsgrenze ermittelt werden.

3.2.5. Streuversuch mit Standards

Bei diesem Versuch wurden der niedrigste und der höchste Standard jeweils fünfmal gemessen. Ziel des Versuchs ist die Ermittlung der durch das Gerät verursachten Messabweichung und der zeitlichen Stabilität des Verfahrens. Es wurden Peakfläche und Retentionszeit der jeweiligen Analyten notiert und Mittelwert sowie Standardabweichung berechnet.

3.2.6. Streuversuch mit Hefeextrakt

Durch die sechsfache Messung einer realen Probe soll überprüft werden, wie stark das Messergebnis durch andere, in der Probe enthaltene, Komponenten beeinflusst wird. Auch soll sichergestellt werden, dass keine störenden Substanzen irreversibel an die stationäre Phase binden, dort akkumulieren und das Ergebnis verfälschen. Um die Laborpräzision der Methode zu überprüfen, wurde dieser Versuch außerdem von einer anderen Person durchgeführt.

3.2.7. Standardaddition

Die Wiederfindungsrate lässt sich durch eine Aufstockung der Probe mit Analytstammlösung bestimmen. Hierfür werden drei verschiedene Proben vorbereitet und gemessen, eine Probe ohne Standardzugabe, sowie jeweils eine Probe, die mit 50 % bzw. 100 % der gefundenen Analytkonzentration aufgestockt wurde.

4. Ergebnisse

4.1. Beispielchromatogramme und Retentionszeiten

Für dieses Unterkapitel wurden für jede Methode jeweils zwei Chromatogramme ausgewählt, eines von der Messung eines Mischstandards und eines von der Messung einer realen Probe. Die Retentionszeiten der verschiedenen Analyten sind in Tabelle 6 aufgeführt.

Analyt	Retentionszeit [min]	Fenster [%]
Chlorid	5,42	5
Nitrat	8,45	5
Phosphat	12,99	5
Sulfat-	15,01	5
Eisen	9,00	10
Magnesium	16,00	20

Tabelle 6: Retentionszeiten aller Analyten

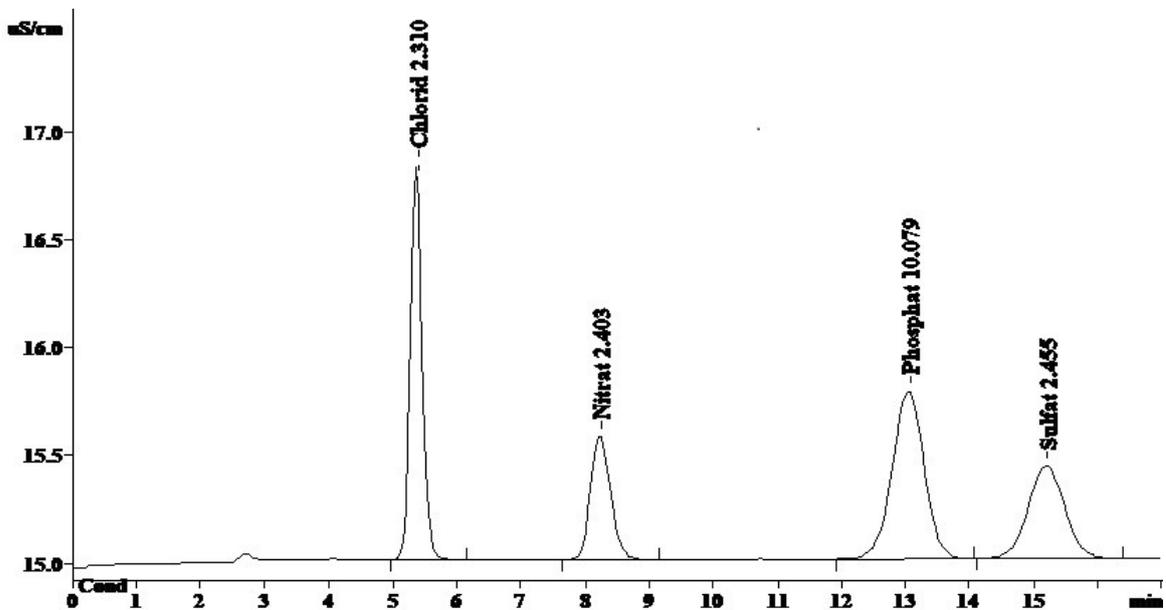


Abbildung 4: Beispielchromatogramm: Trennung eines Mischstandards aus allen anionischen Analyten

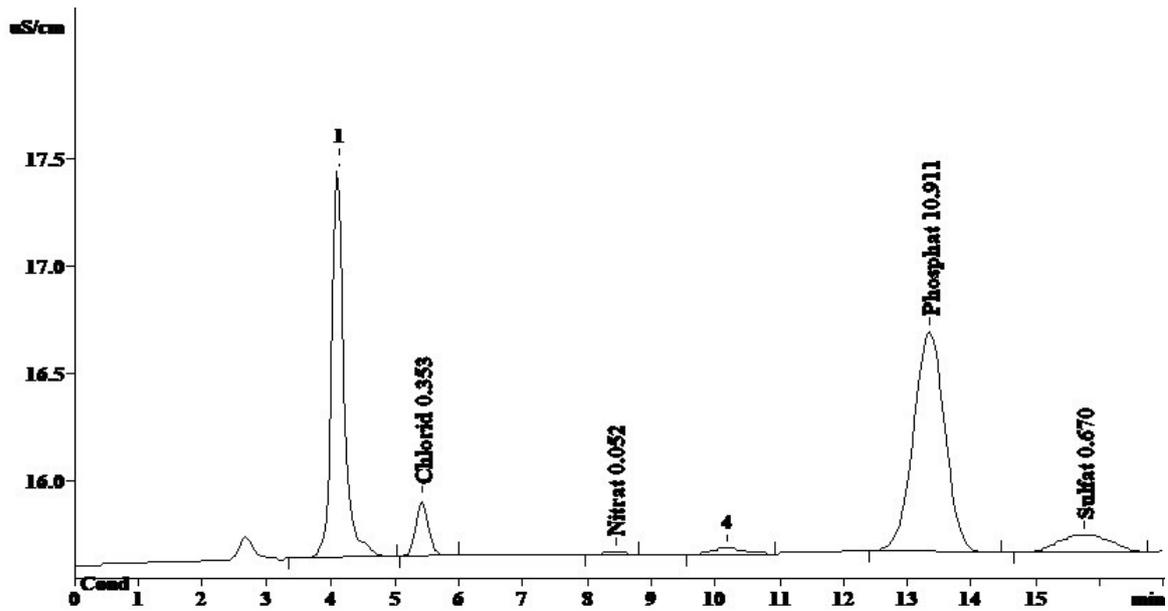


Abbildung 5: Beispielchromatogramm: Trennung einer Hefeprobe (FermH, 0,3 g/l)

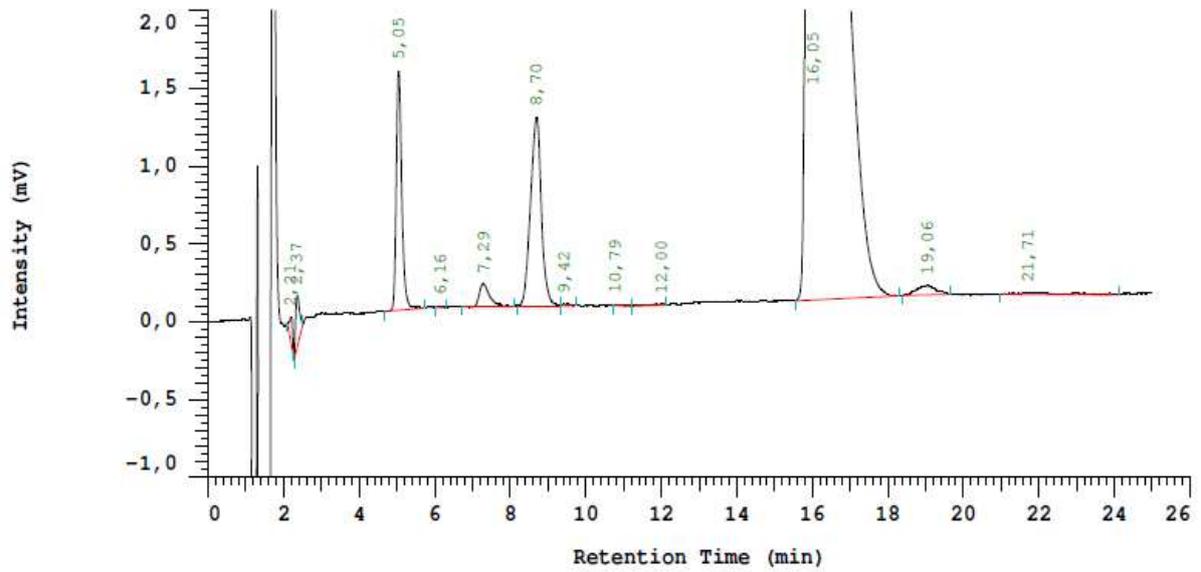


Abbildung 6: Beispielchromatogramm: Trennung eines Mischstandards aus allen kationischen Analyten

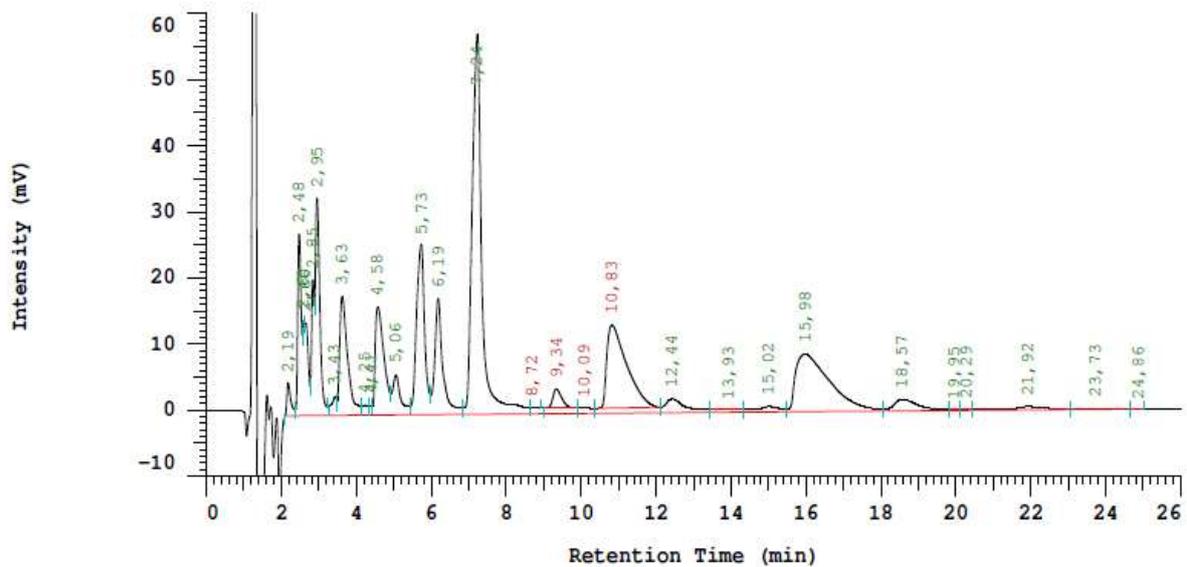


Abbildung 7: Beispielchromatogramm: Trennung einer Hefeprobe (FermH, 4 g/l)

4.2. Zehnpunktkalibrierung

Für jeden Analyten wurde eine Zehnpunktkalibrierung durchgeführt. Die Kalibriergeraden sowie die ermittelten Kenndaten sind nachfolgend aufgeführt.

Analyt	Konzentrationsbereich	Nachweisgrenze	Bestimmungsgrenze	Qualität
Chlorid	0,5 – 5 mg/l	0,2 mg/l	0,7 mg/l	o.k.
Nitrat	0,5 – 5 mg/l	0,1 mg/l	0,4 mg/l	Gut
Phosphat	2 – 20 mg/l	0,3 mg/l	1,1 mg/l	o.k.
Sulfat	0,5 – 5 mg/l	0,4 mg/l	1,5 mg/l	Gut
Eisen	1 – 10 mg/l	0,4 mg/l	1,2 mg/l	Gut
Magnesium	5 – 50 mg/l	3,3 mg/l	10,7 mg/l	ok

Tabelle 7: Übersicht über die aus der Zehnpunktkalibrierung ermittelten Verfahrenskennndaten

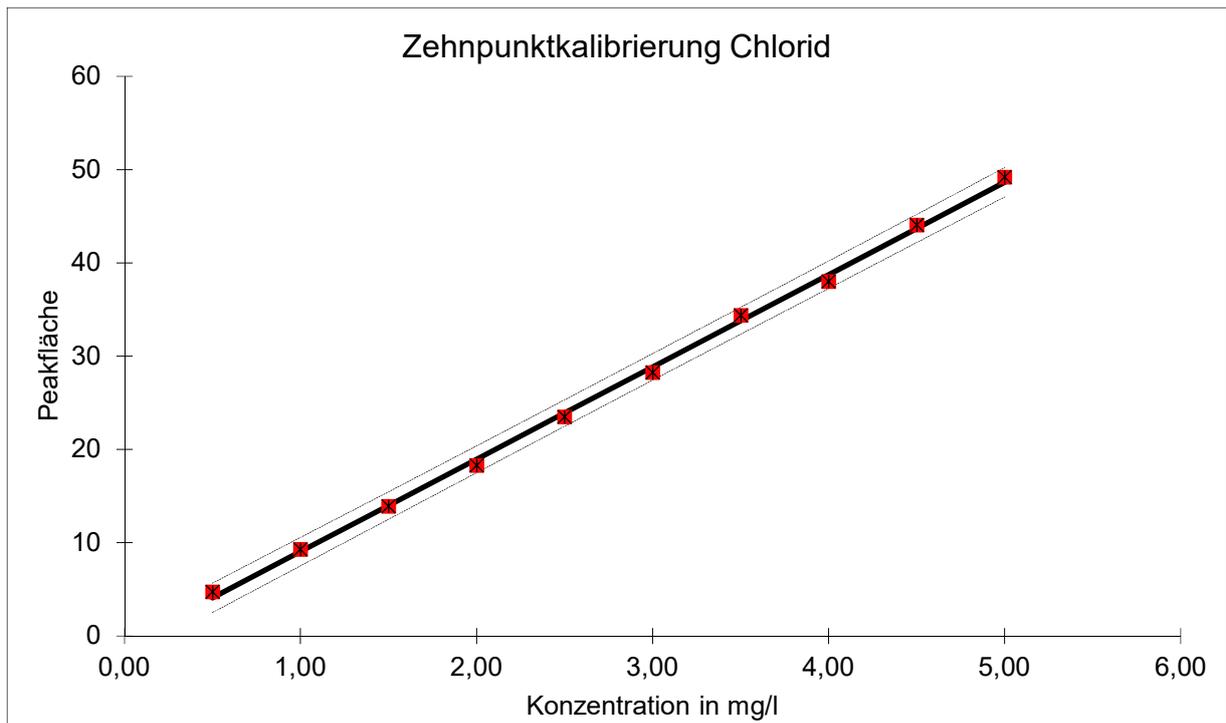


Abbildung 8: Aus einer Zehnpunktkalibrierung generierte Kalibrierfunktion für Chlorid

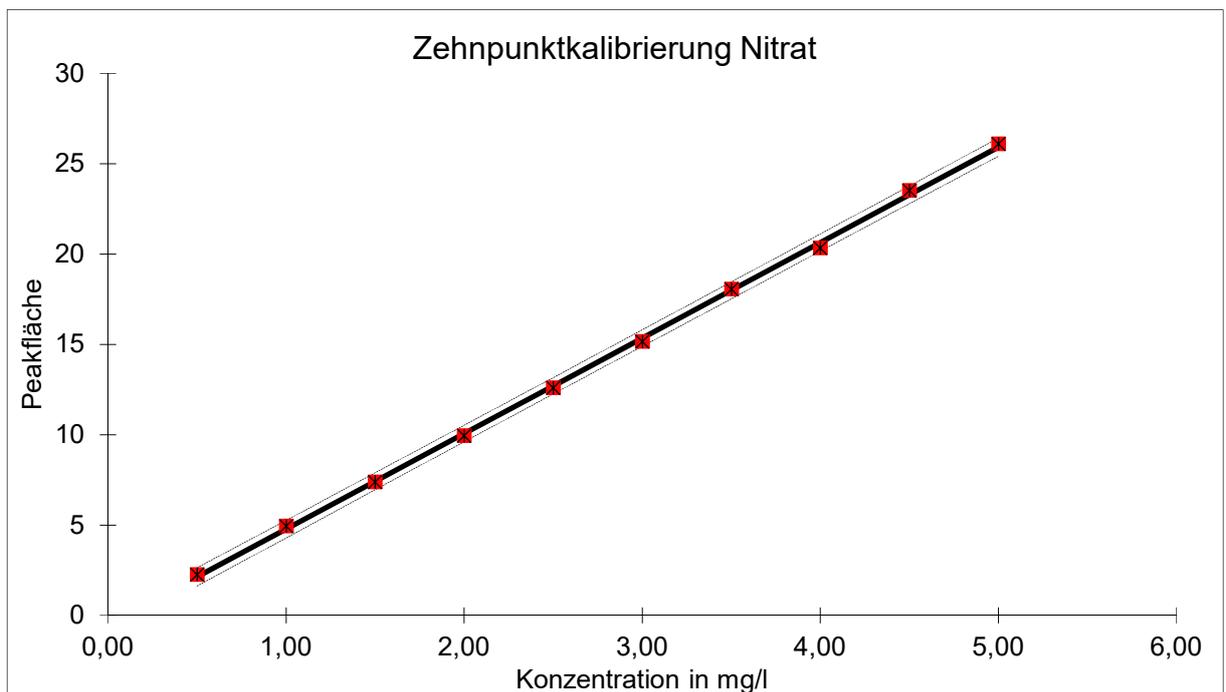


Abbildung 9: Aus einer Zehnpunktkalibrierung generierte Kalibrierfunktion für Nitrat

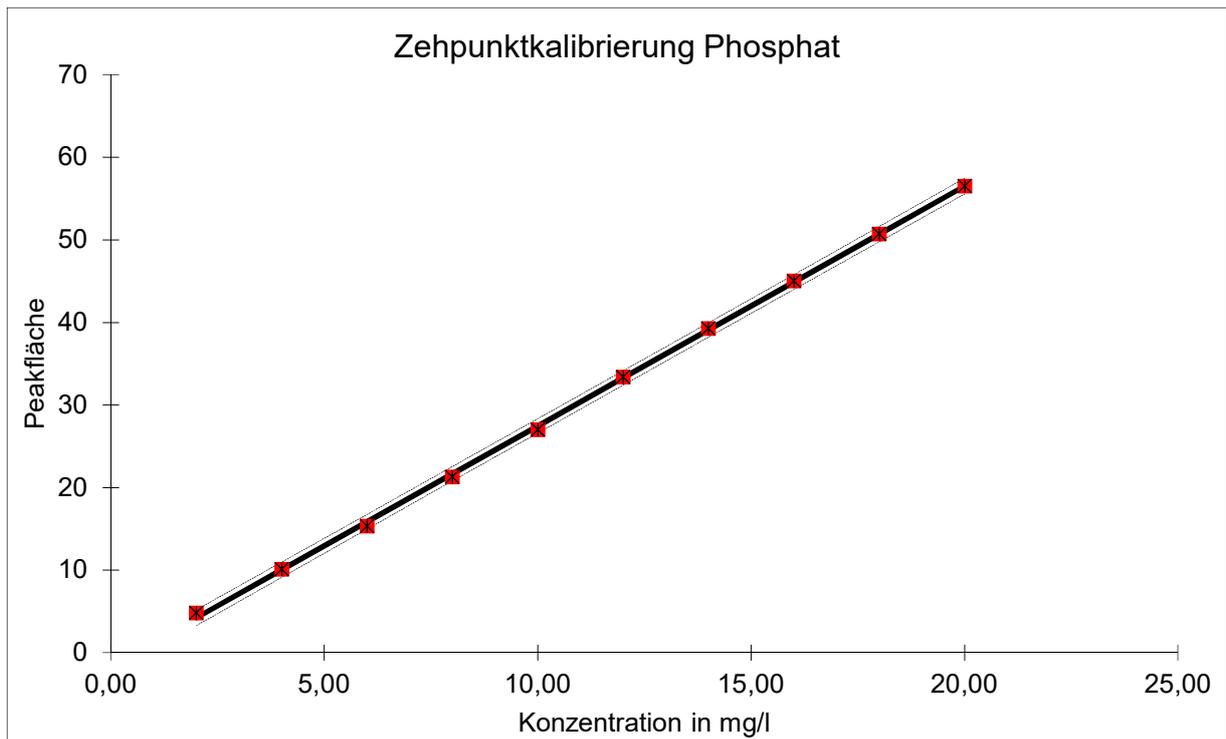


Abbildung 10: Aus einer Zehnpunktkalibrierung generierte Kalibrierfunktion für Phosphat

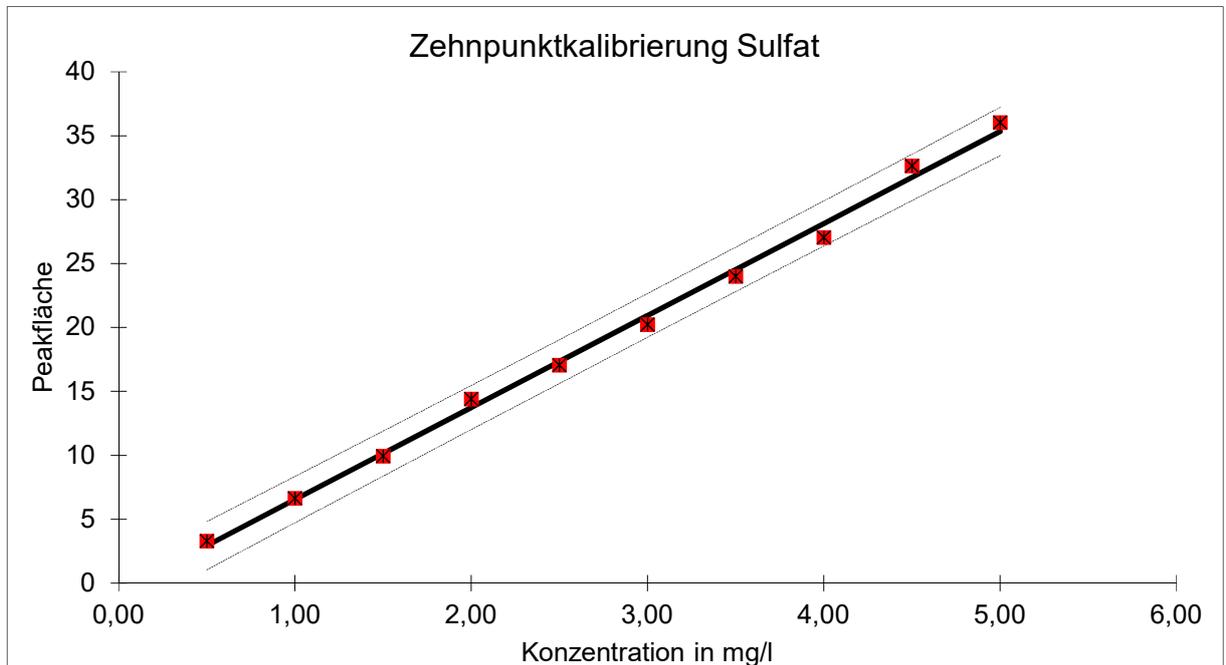


Abbildung 11: Aus einer Zehnpunktkalibrierung generierte Kalibrierfunktion für Sulfat

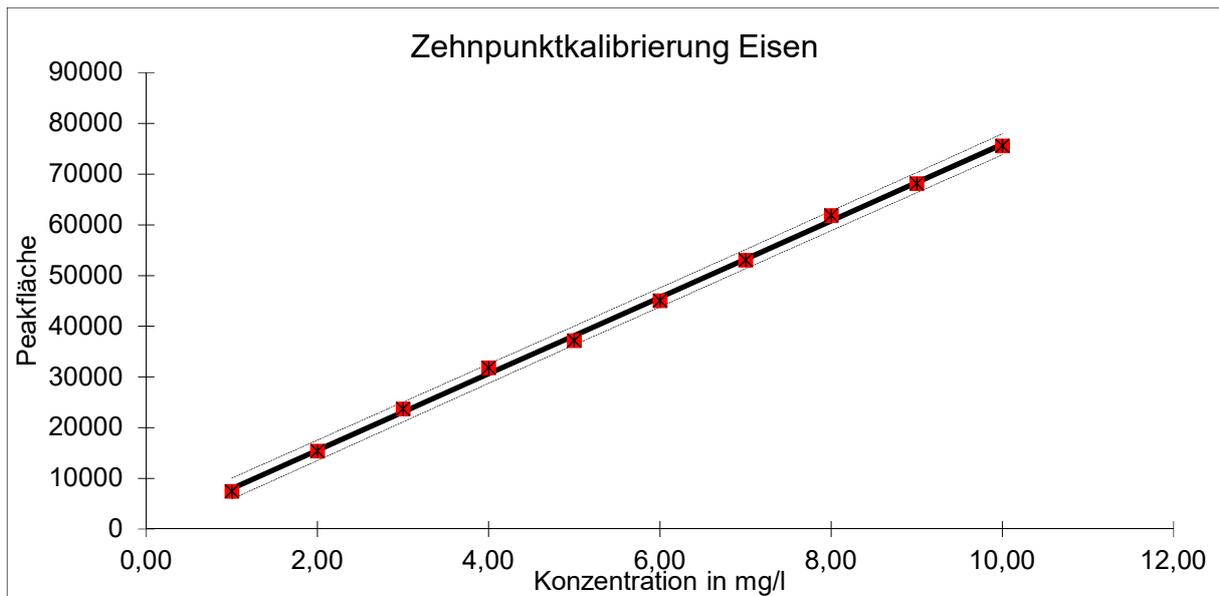


Abbildung 12: Aus einer Zehnpunktkalibrierung generierte Kalibrierfunktion für Eisen

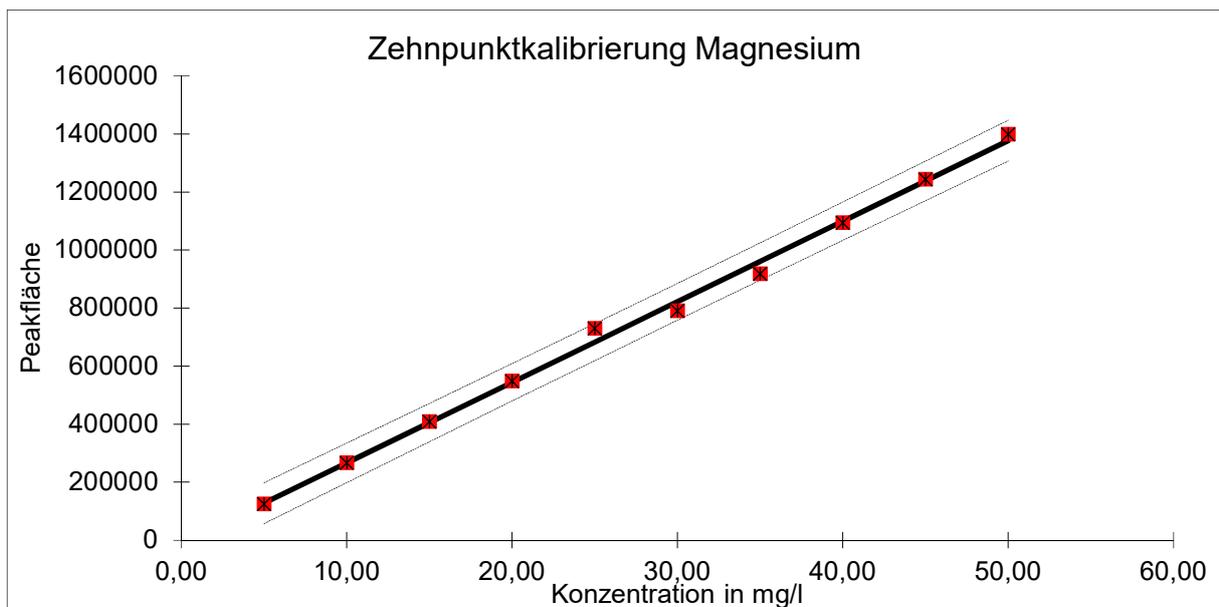


Abbildung 13: Aus einer Zehnpunktkalibrierung generierte Kalibrierfunktion für Magnesium

4.3. Messpräzision und zeitliche Stabilität

Für jeden Analyten wurde der niedrigste und höchste Standard (Kationen) bzw. jeweils ein Standard mit einer Analytkonzentration von 1 mg/l und 10 mg/l (Anionen) jeweils fünfmal gemessen und Peakfläche und Retentionszeit ermittelt. Für jede Messreihe wurden für beide Parameter Mittelwert und Standardabweichung berechnet.

Messung	1 mg/l		10 mg/l	
	Peakfläche	Retentionszeit	Peakfläche	Retentionszeit
1	5,017	8,38	53,524	8,17
2	5,047	8,32	53,529	8,16
3	5,044	8,29	53,443	8,14
4	5,013	8,27	53,369	8,13
5	5,032	8,25	53,448	8,18
Mittelwert	5,0306	8,302	53,4626	8,156
Standardabweichung	0,0137	0,0453	0,0592	0,0185
Standardabweichung in %	0,273	0,546	0,111	0,227

Tabella 8: Ermittlung der Messpräzision für Chlorid

Messung	1 mg/l		10 mg/l	
	Peakfläche	Retentionszeit	Peakfläche	Retentionszeit
1	9,927	5,37	104,826	5,33
2	9,983	5,35	104,603	5,33
3	9,888	5,34	104,283	5,33
4	9,881	5,34	104,289	5,32
5	9,881	5,34	103,938	5,36
Mittelwert	9,912	5,348	104,3878	5,334
Standardabweichung	0,0394	0,0117	0,3038	0,0136
Standardabweichung in %	0,398	0,218	0,291	0,254

Tabella 9: Ermittlung der Messpräzision für Nitrat

Messung	1 mg/l		10 mg/l	
	Peakfläche	Retentionszeit	Peakfläche	Retentionszeit
1	2,332	12,68	27,077	12,75
2	2,301	12,69	27,168	12,75
3	2,298	12,71	27,053	12,76
4	2,293	12,73	26,971	12,77
5	2,282	12,73	27,052	12,94
Mittelwert	2,3012	12,708	27,0642	12,794
Standardabweichung	0,0167	0,0204	0,0631	0,0734
Standardabweichung in %	0,726	0,160	0,233	0,574

Tabella 10: Ermittlung der Messpräzision für Phosphat

Messung	1 mg/l		10 mg/l	
	Peakfläche	Retentionszeit	Peakfläche	Retentionszeit
1	6,842	14,78	70,899	14,84
2	6,793	14,78	70,902	14,84
3	6,86	14,79	70,717	14,86
4	6,798	14,8	70,326	15,08
5	6,797	14,8	70,63	12,94
Mittelwert	6,818	14,79	70,6948	14,512
Standardabweichung	0,0276	0,0089	0,2123	0,7912
Standardabweichung in %	0,405	0,0605	0,300	5,452

Tabella 11: Ermittlung der Messpräzision für Sulfat

Messung	1 mg/l		10 mg/l	
	Retentionszeit	Peakfläche	Retentionszeit	Peakfläche
1	8,84	8395	9,09	72431
2	8,86	8554	9,1	74060
3	8,88	7963	9,11	76260
4	8,9	8834	9,1	76180
5	8,94	8831	9,11	79456
Mittelwert	8,884	8515,4	9,102	75677,4
Standardabweichung	0,034	323,185	0,007	2367,486
Standardabweichung [%]	0,387	3,795	0,082	3,128

Tabella 12: Ermittlung der Messpräzision für Eisen

Messung	5 mg/l		50 mg/l	
	Retentionszeit	Peakfläche	Retentionszeit	Peakfläche
1	15,6	136713	17,25	1249807
2	15,56	138175	17,22	1284674
3	15,53	121783	17,25	1299413
4	15,51	134955	17,19	1311628
5	15,49	139361	17,17	1330258
Mittelwert	15,538	134197,4	17,216	1295156
Standardabweichung	0,035	5823,853	0,029	24792,483
Standardabweichung [%]	0,227	4,340	0,170	1,914

Tabella 13: Ermittlung der Messpräzision für Magnesium

4.4. Streuung einer realen Probe

Messung	Chlorid	Nitrat	Phosphat	Sulfat
1	0,448	0,08	12,978	0,621
2	0,489	0,085	12,942	0,618
3	0,489	0,08	12,941	0,621
4	0,486	0,115	12,895	0,625
5	0,481	0,082	12,898	0,628
6	0,484	0,086	12,895	0,615
Mittelwert	0,4795	0,088	12,925	0,621
Standardabweichung	0,0144	0,0123	0,0313	0,0043
Standardabweichung in %	2,995	13,964	0,242	0,687

Tabella 14: Sechsfache Bestimmung der Anionen in einer realen Probe (FermH, 0,3 g/l), Angaben in mg/l

Messung	Chlorid	Nitrat	Phosphat	Sulfat
1	1,493	0,267	43,26	2,07
2	1,63	0,283	43,14	2,06
3	1,63	0,267	43,136	2,07
4	1,62	0,383	42,983	2,083
5	1,603	0,273	42,993	2,093
6	1,613	0,286	42,983	2,05
Mittelwert	1,598	0,293	43,083	2,071
Standardabweichung	0,0480	0,0408	0,1045	0,0141
Standardabweichung in %	3,002	13,926	0,242	0,681

Tabella 15: Umrechnung der Werte aus Tabella 14 auf die Trockenmasse, Angaben in mg/g

Messung	Eisen	Magnesium
1	6,383	18,533
2	6,277	19,319
3	6,130	18,682
4	6,313	19,259
5	6,320	19,202
6	6,279	19,175
Mittelwert	6,284	19,028
Standardabweichung	0,0714	0,281
Standardabweichung [%]	1,137	1,479

Tabella 16: Sechsfache Bestimmung der Kationen in einer realen Probe (FermH, 4 g/l), Angaben in mg/l

Messung	Eisen	Magnesium
1	1,596	4,633
2	1,569	4,830
3	1,533	4,671
4	1,578	4,815
5	1,580	4,801
6	1,570	4,794
Mittelwert	1,571	4,757
Standardabweichung	0,0179	0,070
Standardabweichung [%]	1,137	1,479

Tabelle 17: Umrechnung der Werte aus Tabelle 16 auf die Trockenmasse, Angaben in mg/g

4.5. Verschiedene Hefeextrakte im Vergleich

	FermH	FermS	AngelYeast 803
Chlorid	0,448	0,998	0,623
Nitrat	0,0690	0,082	0,309
Phosphat	11,437	10,083	5,159
Sulfat	0,622	0,800	1,007
Eisen	6,402	3,351	4,996
Magnesium	19,749	17,946	15,778

Tabelle 18: Messwerte dreier verschiedener Hefeprouben im Vergleich, Angaben in mg/l

	FermH	FermS	AngelYeast 803
Chlorid	1,493	0,250	0,156
Nitrat	0,230	0,0205	0,0773
Phosphat	38,123	2,521	1,290
Sulfat	2,073	0,200	0,252
Eisen	1,601	0,838	1,249
Magnesium	4,937	4,487	3,945

Tabelle 19: Umrechnung der Werte aus Tabelle 18 auf die Trockenmasse, Angaben in mg/g

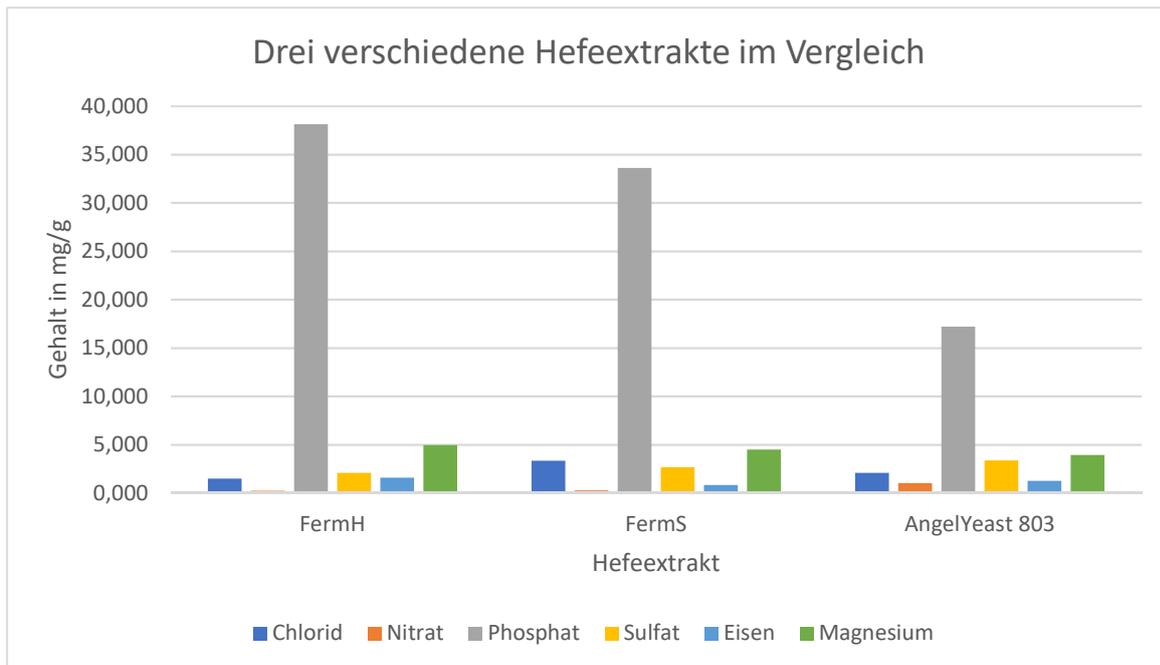


Abbildung 14: Grafische Darstellung der in verschiedenen Hefeextrakten gefundenen Spurenelementkonzentrationen

4.6. Überprüfung der Laborpräzision

Messung	Chlorid	Nitrat	Phosphat	Sulfat
1	0,452	0,05	12,947	1,196
2	0,466	0,054	13,096	0,895
3	0,464	0,078	12,981	0,867
4	0,467	0,061	12,867	0,894
5	0,462	0,058	12,88	0,883
6	0,464	0,042	12,852	0,874
Mittelwert	0,463	0,0572	12,937	0,935
Standardabweichung	0,00496	0,0111	0,0844	0,117
Standardabweichung in %	1,072	19,438	0,652	12,540

Tabelle 20: Messergebnisse des Streuversuchs mit Hefeextrakt, durchgeführt von Frau Stefanie Kaul. Angaben in mg/l

Messung	Chlorid	Nitrat	Phosphat	Sulfat
1	1,404	0,155	40,208	3,714
2	1,447	0,168	40,671	2,780
3	1,441	0,242	40,314	2,693
4	1,450	0,189	39,960	2,776
5	1,435	0,180	40,000	2,742
6	1,441	0,130	39,913	2,714
Mittelwert	1,436	0,178	40,178	2,903
Standardabweichung	0,015	0,035	0,262	0,364
Standardabweichung in %	1,072	19,438	0,652	12,540

Tabelle 21: Umrechnung der Messwerte aus Tabelle 20 auf die Trockenmasse. Angaben in mg/g.

Messung	Eisen	Magnesium
1	85,3	14,2
2	85,6	14,3
3	84,8	14,1
4	85,6	14,2
Mittelwert	85,325	14,2
Standardabweichung	0,327	0,0707
Standardabweichung in %	0,383	0,498

Tabelle 22: Messergebnisse des Streuversuchs, durchgeführt von Frau Stefanie Kaul. Angaben in mg/l

Messung	Eisen	Magnesium
1	21,272	3,541
2	21,347	3,566
3	21,147	3,516
4	21,347	3,541
Mittelwert	21,278	3,541
Standardabweichung	0,0815	0,0176
Standardabweichung in %	0,383	0,498

Tabelle 23: Umrechnung der Messwerte aus Tabelle 22 auf die Trockenmasse. Angaben in mg/g

4.7. Wiederfindungsrate

Es wurden folgende Wiederfindungsraten für die einzelnen Analyten ermittelt:

Messergebnisse [mg/l]	Zugabe	Chlorid	Nitrat	Phosphat	Sulfat	Eisen	Magnesium
	0%	0,395	0,083	11,196	0,679	5,255	20,435
	50%	0,557	0,115	15,503	0,947	5,38	31,042
	100%	0,788	0,159	20,447	1,238	5,48	41,32
Umrechnung auf Trockenmasse [mg/g]	0%	1,316	0,267	37,32	2,236	1,313	5,109
	50%	1,856	0,383	51,677	3,156	1,345	7,761
	100%	2,627	0,53	68,156	4,126	1,37	10,33
Wiederfindungsrate in %	50%	108	80,45	98,12	89,3	4,27	100
	100%	131,1	95,13	92,52	94,5	3,8	116

Tabelle 24: Wiederfindungsraten der verschiedenen Analyten

4.8. Überprüfung der Robustheit anhand der Kalibrierdaten

Bei der Kalibrierung der Anlagen wurden stets Standardabweichung und Regressionskoeffizient (R, Anionenanalytik) bzw. Bestimmtheitsmaß (R^2 , Kationenanalytik) notiert und tabellarisch erfasst. Im Folgenden sind die Werte für jeden einzelnen Analyten jedes Labortages aufgeführt.

Datum	Standardabweichung in %	R
15.10.2018	3,646	0,99959
18.10.2018	3,075	0,99983
19.10.2018	1,03	0,99997
23.10.2018	2,28	0,99982
24.10.2018	1,984	0,99987
26.10.2018	1,958	0,99998

Tabelle 25: Kalibrierdaten Chlorid

Datum	Standardabweichung in %	R
15.10.2018	1,814	0,99993
18.10.2018	2,199	0,99996
19.10.2018	1,325	0,9999
23.10.2018	2,199	0,99986
24.10.2018	1,232	0,99999
26.10.2018	2,501	0,99985

Tabelle 26: Kalibrierdaten Nitrat

Datum	Standardabweichung in %	R
15.10.2018	2,436	0,99995
18.10.2018	24,918	0,957
19.10.2018	24,567	0,95828
23.10.2018	24,62	0,95802
24.10.2018	23,885	0,96018
26.10.2018	30,693	0,93289

Tabella 27: Kalibrierdaten Phosphat

Datum	Standardabweichung in %	R
15.10.2018	1,058	0,99998
18.10.2018	2,109	0,99975
19.10.2018	1,961	0,99968
23.10.2018	1,297	0,99994
24.10.2018	1,978	0,99998
26.10.2018	3,41	0,99966

Tabella 28: Kalibrierdaten Sulfat

Datum	R ²
22.11.2018	0,9984
23.11.2018	0,9977
26.11.2018	0,9975
27.11.2018	0,9999

Tabella 29: Kalibrierdaten Eisen

Datum	R ²
22.11.2018	0,9998
23.11.2018	0,9999
26.11.2018	0,9999
27.11.2018	0,9999

Tabella 30: Kalibrierdaten Magnesium

5. Diskussion

5.1. Qualität der chromatographischen Trennung

In der Anionenanalytik ist die chromatographische Trennung sehr zufriedenstellend. Die Peaks der einzelnen Probenbestandteile, Analyten wie Nebenkomponenten, sind klar voneinander abgegrenzt und weisen eine gute Symmetrie auf. Im Laufe der Messung verbreitern sich die Peaks; während früh eluierende Substanzen hohe, schmale Peaks liefern, büßen die Peaks bei später eluierenden Komponenten zunehmend an Höhe ein und werden flacher und breiter.

In der Kationenanalytik neigen die Peaks zum Fronting (Eisen) bzw. Tailing (Magnesium). Beide Komponenten lassen sich trotzdem von anderen Probenbestandteilen abgrenzen, andere, nicht näher erfasste Probenbestandteile liefern jedoch zum Teil überlappende Peaks.

Die Gründe für eine Peakasymmetrie und -verbreiterung können vielfältig sein: Zu hohes Injektionsvolumen, schlecht gepackte Säulen, zu große Verbindungskapillaren, unspezifische Wechselwirkungen mit der stationären Phase oder Totvolumina am Säulenausgang sind nur einige mögliche Ursachen. [Gey, 2015]

5.2. Streuung der Messwerte und zeitliche Stabilität

Die Mess- und Methodenpräzision ist für fast alle Analyten gut. Die Streuung der Messwerte liegt bei fast allen Analyten unter 5 % und die zeitliche Verschiebung liegt ebenfalls innerhalb der festgelegten erlaubten Zeitfenster.

Für das Nitrat ist die Streuung der Messwerte bei einer realen Probe deutlich zu hoch, die erwünschte Präzision ist hier nicht gegeben. Dies ist allerdings dadurch zu erklären, dass die Messwerte deutlich unter der ermittelten Nachweisgrenze liegen: Bei derart niedrigen Konzentrationen kann nicht mehr davon ausgegangen werden, dass die Messergebnisse vertrauenswürdig sind.

Im Laufe einer Messreihe lässt sich eine zeitliche Verschiebung der Retentionszeiten beobachten. Die Peaks für Chlorid, Nitrat und Magnesium erscheinen zunehmend früher, während sich die Peaks für Phosphat, Sulfat und Eisen zunehmend nach hinten verschieben. In der Anionenanalytik kann dies durch eine Veränderung des pH des Eluenten begründet werden. Durch CO₂-Eintrag aus der Umgebung sinkt dieser, was zu einer veränderten Dissoziation der Analyten führen kann.

5.3. Robustheit der Methode

Die vor jeder Messreihe ermittelten Kalibriergeraden geben einen guten Aufschluss über die Robustheit der Methode. Erwünscht ist eine möglichst kleine Standardabweichung und ein Wert für R bzw. von R^2 , der möglichst nahe bei $R=1$ liegt. Dies ist bei fast allen Analyten gegeben, beim Phosphat lassen Standardabweichung und Bestimmtheitsmaß allerdings zu wünschen übrig. Dies kann allerdings darauf zurückgeführt werden, dass die Konzentrationen der Standards in der Software falsch angegeben wurden (10 mg/l statt 15 mg/l für Standard 3). Durch eine Korrektur der falschen Eingabe lässt sich dieses Problem schnell beseitigen.

5.4. Wiederfindungsrate

Für alle Analyten, ausgenommen Fe, konnten Wiederfindungsraten von 80 % oder höher ermittelt werden. Die Wiederfindungsrate des Eisens liegt bei unter 5 %, was darauf hindeutet, dass der Großteil dieses Analyten im Laufe der Analyse verloren geht.

Wie bereits in der Einführung beschrieben, ist Eisen in erster Linie als Cofaktor an der enzymatischen Umsetzung verschiedener Substanzen beteiligt, d.h. es ist vor allem an organische Komponenten in der Probe gebunden. [Schlegel, 2007]

Da diese Substanzen allerdings die Säule verschmutzen und die Messung behindern würden, werden diese entweder bereits bei der Filtration abgetrennt oder durch die Vorsäule zurückgehalten, was die niedrige Wiederfindungsrate erklären könnte.

5.5. Verschiedene Hefeextrakte im Vergleich

Wie bereits unter 3.1.1. beschrieben, unterscheiden sich die in diesem Projekt verwendeten Extrakte hinsichtlich ihrer Zusammensetzung und des Grades der Aufreinigung.

FermS und FermH ähneln sich sehr in ihrer Zusammensetzung, allerdings wurde in der Anionenanalytik ein mehr als doppelt so hoher Chloridgehalt in FermS wie in FermH gemessen. Der Eisengehalt in FermS ist jedoch nur halb so hoch wie in FermH.

AngelYeast 803 weist deutlich höhere Konzentrationen an Nitrat auf, als die FermS und FermH, dafür ist der Gehalt an Phosphat nur halb so hoch wie in FermH und FermS. Die anderen Analyten liegen in ähnlichen Konzentrationen wie in FermH und FermS vor.

5.6. Vergleich der gemessenen Konzentrationen mit den Angaben des Herstellers

Für die Extrakte FermS und FermH liegen Produktdatenblätter vom Hersteller vor (siehe Anhang). Aus diesen Datenblättern lässt sich allerdings nur der Gehalt an Eisen und Magnesium eindeutig ablesen. Für die anionischen Analyten sind keine Angaben vorhanden. Für den Extrakt AngelYeast 803 konnte trotz gründlicher Recherche kein Datenblatt gefunden werden.

Die in FermH und FermS ermittelten Konzentrationen an Eisen und Magnesium liegen über den im Datenblatt angegebenen Konzentrationen. Es ist davon auszugehen, dass diese Ergebnisse mit einer anderen Analyseverfahren (z.B. Elementaranalyse) ermittelt wurden. Auf Anfragen diesbezüglich hat der Hersteller bisher nicht reagiert.

5.7. Laborpräzision

Da die in dieser Arbeit entwickelten Methoden in erster Linie von anderen Personen angewendet werden sollen, ist die Laborpräzision ebenfalls ein wichtiges Kriterium bei der Validierung.

In der Anionenanalytik weisen die Messwerte für Chlorid und Phosphat eine sehr niedrige Streuung auf, die Messwerte für Nitrat und Sulfat streuen verhältnismäßig stark. Die starke Streuung bei den Nitratwerten ist ein bereits bekanntes Problem, welches sich darauf zurückführen lässt, dass die Konzentrationen, die in den Hefeproben gemessen wurden, unter die Nachweisgrenze fallen und somit nur bedingt aussagekräftig sind. Bei den Sulfatwerten gibt es einen Ausreißer, der für die hohe Standardabweichung verantwortlich ist.

In der Kationenanalytik ist die Streuung für beide Analyten sehr klein. Der Eisenwert ist jedoch extrem hoch, während der Magnesiumwert sehr niedrig ist. Es wurde berichtet, dass bei dieser Messung Probleme mit dem Säulenofen aufgetreten sind, was das Trennergebnis offensichtlich beeinflusst hat. Um eine wirklich präzise Aussage zur Laborpräzision treffen zu können, müsste dieser Versuch wiederholt und noch einmal unter stabilen Messbedingungen durchgeführt werden.

5.8. Ausblick – Ansätze zur Verbesserung und Lösung aufgetretener Probleme

Die im Zuge dieser Arbeit aufgetretenen Probleme waren in erster Linie die Verschiebung der Retentionszeiten im Laufe einer Messreihe sowie die Peakasymmetrie in der Kationenanalytik.

Die Verschiebung der Retentionszeiten lässt sich durch Alterung des Eluenten und Beeinflussung durch Nebenkomponten erklären. Dieses Problem lässt sich relativ einfach durch eine Anpassung der erlaubten Retentionszeit in der Software sowie die täglich frische Zubereitung des Eluenten umgehen.

Die aufgetretene Peakasymmetrie kann durch eine höhere Fließgeschwindigkeit korrigiert werden, hierbei ist allerdings darauf zu achten, dass die Selektivität nicht darunter leidet. Ebenfalls konnte beobachtet werden, dass, wenn dem Eluenten mehr HNO_3 zugesetzt wird, das Fronting bzw. Tailing abnimmt. Eine Variation des Eluenten könnte also ebenfalls ein Weg sein, dieses Problem zu beseitigen.

Bei der Fe-Bestimmung ist außerdem zu klären, ob der als Eisen identifizierte Peak wirklich nur der Eisengehalt der Probe ist, oder ob es hier zu einer Überlagerung mit einer anderen Substanz in der Probe kommt. Dafür spricht zum Einen, dass die bei der Messung von Standards aufgetretene Peakasymmetrie nicht zu beobachten ist, zum Anderen, dass der Eisengehalt ungewöhnlich hoch ist. In den Datenblättern der beiden Leiber-Extrakte werden Konzentrationen 34 mg/kg (FermH) bzw. 42 mg/kg (FermS) angegeben.

6. Zusammenfassung und Fazit

In dieser Arbeit wurde überprüft, inwiefern die Ionenchromatographie als Messmethode in der chemischen Analytik geeignet ist, um den Gehalt an Chlorid, Nitrat, Phosphat, Sulfat, Eisen und Magnesium in Hefeextrakt, welches als Substrat zur Kultivierung von Mikroorganismen eingesetzt werden soll, zu messen. Hierfür wurden verschiedene Versuche durchgeführt, um Richtigkeit, Robustheit, Präzision, Selektivität, Spezifität, Linearität, Wiederfindungsrate sowie Nachweis- und Bestimmungsgrenze zu ermitteln. Auftretende Probleme in dieser Arbeit waren in erster Linie eine anhaltende Peakasymmetrie bei der Kationenanalytik, eine starke Streuung der Nitratwerte bei einer realen Probe sowie eine geringe Wiederfindungsrate bei der Fe-Bestimmung. Hierzu sei erwähnt, dass bei der Anionenanalytik auf eine bereits existierende und erprobte Methode aus dem Praktikum zurückgegriffen wurde, während bei der Kationenanalytik zunächst eine Methode anhand von Literaturergebnissen und Datenblättern ausgearbeitet werden musste.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die in dieser Arbeit entwickelten Methoden für die Analyten Chlorid, Phosphat, Sulfat und Magnesium geeignet sind, um deren Gehalt in Hefeextrakt zu überprüfen. In der Kationenanalytik gibt es noch Raum zur Optimierung, dies hätte allerdings den Rahmen einer Bachelorarbeit gesprengt.

7. Anhang

Abkürzungsverzeichnis

% = Prozent

AY803 = AngelYeast 803

d.h. = das heißt

Fe = Eisen

FermH = Leiber Fermentation H

FermS = Leiber Fermentation S

H₂O = Reinstwasser

H₂SO₄ = Schwefelsäure

HNO₃ = Salpetersäure

Na₂CO₃ = Natriumcarbonat

NaHCO₃ = Natriumhydrogencarbonat

Mg = Magnesium

u.a. = unter anderem

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Wirkungsweise eines Anionentauschers – Seite 7

Abbildung 2: Metrohm 792 Basic IC – Seite 11

Abbildung 3: Merck Hitachi IC- Anlage – Seite 13

Abbildung 4: Beispielchromatogramm: Trennung eines Anionenmischstandards – Seite 17

Abbildung 5: Beispielchromatogramm: Bestimmung der Anionen in einer Hefeprobe – Seite 18

Abbildung 6: Beispielchromatogramm: Trennung eines Kationenmischstandards – Seite 18

Abbildung 7: Beispielchromatogramm: Bestimmung der Kationen in einer Hefeprobe – Seite 19

Abbildung 8: Zehnpunktkalibrierung Chlorid – Seite 20

Abbildung 9: Zehnpunktkalibrierung Nitrat – Seite 20

Abbildung 10: Zehnpunktkalibrierung Phosphat – Seite 21

Abbildung 11: Zehnpunktkalibrierung Sulfat – Seite 21

Abbildung 12: Zehnpunktkalibrierung Eisen – Seite 22

Abbildung 13: Zehnpunktkalibrierung Magnesium – Seite 22

Abbildung 14: Graphische Darstellung der verschiedenen Hefeextrakte im Vergleich – Seite 27

Sofern unter der Abbildung nicht angegeben, handelt es sich um eigens aufgenommene / erstellte Grafiken.

Tabellenverzeichnis

- Tabelle 1: Einwaagen der verschiedenen Hefeextrakte – Seite 12
- Tabelle 2: Standardkonzentrationen in der Anionenanalytik – Seite 12
- Tabelle 3: Trennbedingungen in der Anionenanalytik – Seite 13
- Tabelle 4: Trennbedingungen in der Kationenanalytik – Seite 13
- Tabelle 5: Standardkonzentrationen in der Kationenanalytik – Seite 13
- Tabelle 6: Retentionszeiten der verschiedenen Analyten – Seite 17
- Tabelle 7: Aus der Zehnpunktkalibrierung ermittelte Verfahrenskennndaten – Seite 19
- Tabelle 8: Ermittlung der Messpräzision für Chlorid – Seite 23
- Tabelle 9: Ermittlung der Messpräzision für Nitrat – Seite 23
- Tabelle 10: Ermittlung der Messpräzision für Phosphat – Seite 23
- Tabelle 11: Ermittlung der Messpräzision für Sulfat – Seite 24
- Tabelle 12: Ermittlung der Messpräzision für Eisen – Seite 24
- Tabelle 13: Ermittlung der Messpräzision Für Magnesium – Seite 24
- Tabelle 14: Sechsfache Bestimmung der Anionen in einer realen Probe – Seite 25
- Tabelle 15: Umrechnung der Werte aus Tab. 14 auf die Trockenmasse – Seite 25
- Tabelle 16: Sechsfache Bestimmung der Kationen in einer realen Probe – Seite 25
- Tabelle 17: Umrechnung der Werte aus Tab. 16 in auf die Trockenmasse – Seite 26
- Tabelle 18: Messwerte dreier verschiedener Hefeproben im Vergleich – Seite 26
- Tabelle 19: Umrechnung der Werte aus Tabelle 18 auf die Trockenmasse – Seite 26

Tabelle 20: Messergebnisse des Streuversuchs, durchgeführt von Stefanie Kaul – Seite 27

Tabelle 21: Umrechnung der Werte aus Tabelle 20 auf die Trockenmasse – Seite 28

Tabelle 22: Messergebnisse des Streuversuchs mit Hefe, durchgeführt von Stefanie Kaul – Seite 28

Tabelle 23: Umrechnung der Werte aus Tabelle 22 auf die Trockenmasse – Seite 28

Tabelle 24: Wiederfindungsraten der verschiedenen Analyten – Seite 29

Tabelle 25: Kalibrierdaten Chlorid – Seite 29

Tabelle 26: Kalibrierdaten Nitrat – Seite 29

Tabelle 27: Kalibrierdaten Phosphat – Seite 30

Tabelle 28: Kalibrierdaten Sulfat – Seite 30

Tabelle 29: Kalibrierdaten Eisen – Seite 30

Tabelle 30: Kalibrierdaten Magnesium – Seite 30

Literaturverzeichnis

Cataldi, Angelotti, D'Erchia, Altieri, Di Renzo: Ion-exchange analysis of soluble cations, anions and sugars in milk whey (2002, Università degli Studi della Basilicata.)

Funk, Dammann, Donnevert: Qualitätssicherung in der Analytischen Chemie (1992, Wiley-VCH)

Gey, Manfred H.: Instrumentelle Analytik und Bioanalytik (3. Auflage, 2015, SpringerSpektrum)

Jensen, Detlef: Grundlagen der Ionenchromatographie (Thermo Fisher Scientific, 2013)

Klotz, Silvia: Biotechnisch erzeugte D-Milchsäure - Substitution von Hefeextrakt durch agrarische Rohstoffhydrolysate (Technische Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig, 2017)

Kromidas, Stavros: Validierung in der Analytik (1999, Wiley VCH)

Kromidas, Stavros: Methodvalidierung in der Analytik (unbekanntes Jahr, www.kromidas.de)

Leiber: Fermentation H product data sheet

Leiber: Fermentation S product data sheet

Metrohm: IC Application Note No. C-122: Cations including total iron content in antifreeze (monoethyleneglycol)

Metrohm: IC Application Note No. C-129: Nine cations on the Metrosep C4-150 column

Metrohm: IC Application Note No. C-131: Magnesium, cadmium and iron in phosphoric acid

Metrohm: IC Application Note C-135: Cations in drinking water using Metrosep C4 – 150/4.0 column according to ISO 14911

Papula, Lothar: Mathematische Formelsammlung für Ingenieure und Naturwissenschaftler (10. Auflage, 2009, Vieweg+Teubner)

Schlegel, Hans G.: Allgemeine Mikrobiologie (8. Auflage, 2007, Georg Thieme Verlag)

Weiß, Joachim: Ionenchromatographie (3. Auflage, 2001, Wiley-VCH)

Chemikalienliste

Hersteller	Chemikalie
VWR Chemicals	HiPerSolv Chromanorm Acetonitril
Merck	Anion multi-element standard 1000 mg/l certipur
Alfa Aesar	Dipicolinsäure
Merck	H ₂ SO ₄ 0,5 M Titripur
Merck	HNO ₃ 65 % suprapur
AngelYeast	Hefeextrakt 803
Leiber	Hefeextrakt Fermentation H
Leiber	Hefeextrakt Fermentation S
VWR ProLabo	L(+)-Ascorbinsäure normapur
Merck	Na ₂ CO ₃ pro analysi
Merck	NaHCO ₃ pro analysi
Merck	Phosphate standard solution 1000 mg/l certipur
Merck	Titrisol Fe-Standardlösung 1000 mg
Merck	Titrisol Mg-Standardlösung 1000 mg

Geräteliste

Hersteller	Gerät
Brand	Messkolben, verschiedene Größen
Brand	Transferpette, verschiedene Größen
Brand	Dispensette
Brand	Einwegspritzen, 10 ml / 20 ml
VWR	HPLC-Filter, 0,45 µm
Yamato	W-15 Vakuumpumpe
Sartorius	Reinstwasseranlage
Metrohm	792 Basic IC
Metrohm	Vorsäule Metrosep A Supp 4 Guard 4.0
Metrohm	Vorsäule Metrosep RP2 Guard
Metrohm	Anionensäule Metrosep A Supp 4 250/4.0
Hitachi	L-7110 Pumpe
Hitachi	L-2470 Leitfähigkeitsdetektor
Hitachi	D-7000 Interface
Hitachi	655A-52 Säulenofen
Shodex	Vorsäule IC YK-Guard
Shodex	Kationensäule IC YK-421