

Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg

Fakultät Life Science

Bachelorarbeit

im Studiengang B.Sc. Biotechnologie

**Validierung und Anwendung einer
ionenchromatographischen Methode zur Analyse
gelöster Kationen in Hefeextrakt**

vorgelegt von

Sanja Alana Lensch, [REDACTED]

Matrikel-Nr.: [REDACTED]

Hamburg, September 2019

Erstgutachterin: Prof. Dr. Susanne Töpfke HAW Hamburg

Zweitgutachterin: Prof. Dr. Gesine Cornelissen HAW Hamburg

Erklärung

Hiermit versichere ich, Sanja Alana Lensch, dass ich die vorliegende Bachelorarbeit mit dem Titel „Validierung und Anwendung einer ionenchromatographischen Methode zur Analyse gelöster Kationen in Hefeextrakt“ ohne fremde Hilfe selbständig verfasst und nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Wörtlich oder dem Sinn nach aus anderen Werken entnommene Stellen sind unter Angabe der Quellen kenntlich gemacht.

Hamburg, den 30. September 2019 _____

Danksagung

Ich möchte allen danken, die mich bei der Erstellung dieser Abschlussarbeit unterstützt haben.

Ein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Susanne Töpfke, die mich als Betreuerin begleitet hat, mir bei allen Fragen zur Seite stand und meine Bachelorarbeit insbesondere durch einen wertvollen Austausch bereichern konnte.

Vielen Dank an Frau Prof. Dr. Gesine Cornelissen und Frau Stefanie Kaul für die Bereitstellung des spannenden Themas und die Möglichkeit, mich mit Fragen jeder Zeit an Sie wenden zu können.

Danke, an das Personal im Labor für Instrumentelle Analytik an der HAW Hamburg. Herrn Andreas Graß und Frau Nadja Schnell danke ich für die Unterstützung und ständige Hilfsbereitschaft. An dieser Stelle möchte ich ein besonderes Dankeschön an Herrn Robin Westphal für die stets herzliche Hilfsbereitschaft und die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre aussprechen. Schön, dass wir allen gezeigt haben, dass Abschlussarbeiten viel Spaß bereiten können!

Zu guter Letzt danke ich meiner Familie, meinem Freund und meinen Freunden, die sowohl die anstrengenden als auch die spannenden Tage mit mir geteilt haben. Danke für die Unterstützung.

Abstract

Diese Arbeit präsentiert eine neu entwickelte Methode zur Analyse frei gelöst vorliegender Kationen in einer komplexen organischen Hefeextraktprobe mit der Ionenaustausch-Chromatographie (IAC) ohne Suppressor-Technik. Durch die Anpassung der Reagenzien der mobilen Phase konnte ihr Einfluss auf die Trenneigenschaften ermittelt und die Selektivität der Methode signifikant verbessert werden. Mit Hilfe der Trennsäule IC YK-421 (Shodex) und dem verwendeten Fließmittel (0,4 mM Dipicolinsäure, 1,15 mM Salpetersäure) ist es möglich das komplexe Hefeextrakt „Fermentation H“ (Leiber GmbH) zu analysieren. Die Methode ermöglicht Ammonium (NH_4^+) und die Ionen der Makronährstoffe Natrium (Na^+), Kalium (K^+), Magnesium (Mg^{2+}) und Calcium (Ca^{2+}) qualitativ und quantitativ zu bestimmen, wobei die Präzision für Konzentrationen der Analyten $< 1 \text{ mg/L}$ durch den Einfluss des Rauschens der Basislinie geringer wird. Die Bestimmung von Spurenmetallen ist auf Grund ihrer niedrigen Konzentration nicht möglich.

Durch die Anwendung der Methode auf Proben aus einer Fermentation mit *Bacillus licheniformis* konnte erkannt werden, dass Mg^{2+} vollständig umgesetzt und Na^+ ebenfalls mit 93 % nahezu komplett aufgenommen wurde. Für Ca^{2+} wurde ein Rückgang von 52 %, für K^+ einer von 44 % beobachtet. Der Bedarf an NH_4^+ konnte nicht ermittelt werden, da durch die Zugabe von Ammoniak zur Regulierung des pH-Wertes während der Fermentation die NH_4^+ -Konzentration zunahm.

Zukünftig könnten mit Hilfe der entwickelten Methode Korrelationen zwischen Wachstums- und/oder Produktivitätsschwankungen und den gelöst vorliegenden Mineralstoffen erklärt werden. Außerdem könnte sie zur Beurteilung und Identifizierung geeigneter Chargen von Hefeextrakten dienen, die für die Fermentation als komplexes Nährmedium eingesetzt werden sollen.

Inhaltsverzeichnis

Erklärung	II
Danksagung	III
Abstract.....	IV
Abbildungsverzeichnis	VII
Tabellenverzeichnis	VIII
Abkürzungsverzeichnis	IX
1 Einleitung	- 10 -
1.1 Hefeextrakte und ihre Verwendung als komplexes Medium.....	- 10 -
1.2 Bedeutung der Mineralstoffe	- 10 -
1.3 Zielsetzung	- 12 -
2 Theoretischer Hintergrund.....	- 13 -
2.1 Hefeextrakte – Herstellung und Zusammensetzung	- 13 -
2.2 Kationenanalytik durch IAC	- 13 -
2.3 Validierung	- 15 -
3 Material und Methoden	- 18 -
3.1 Material	- 18 -
3.1.1 Chemikalien	- 18 -
3.1.2 Geräte und Hilfsmittel.....	- 18 -
3.1.3 Probenmaterial	- 19 -
3.2 Methoden	- 19 -
3.2.1 Ionenaustauschchromatographie	- 19 -
3.2.2 Entwicklung des Eluenten.....	- 21 -
3.2.3 Verbesserung der chromatographischen Trennung.....	- 22 -
3.2.4 Methoden zur Validierung	- 23 -
3.2.5 Qualitative und quantitative Analyse der gelösten Kationen.....	- 24 -
4 Ergebnisse und Diskussion.....	- 25 -
4.1 Bewertung der chromatographischen Bedingungen	- 25 -
4.2 Einfluss der Zusammensetzung des Eluenten.....	- 26 -
4.3 Validierung der Methode	- 31 -
4.4 Bestimmung der gelösten Kationen	- 34 -
4.4.1 Qualitative Bestimmung.....	- 34 -
4.4.2 Quantitative Bestimmung.....	- 38 -
5 Fazit und Ausblick.....	- 43 -

Literaturverzeichnis	- 45 -
Anhang	- 47 -
Anhang 1: Datenblatt Fermentation H, Leiber GmbH.....	- 47 -
Anhang 2: Zehnpunktkalibrierung der Analyten	- 48 -
Anhang 3: Übersicht der verwendeten Eluenten	- 51 -

Abbildungsverzeichnis

Nummer	Titel
2-1	Schematische Darstellung der Kenngrößen eines Chromatogramms
4-1	Chromatogramm des Hefeextraktes mit Eluent 6
4-2	Chromatogramm des Hefeextraktes mit Eluent 15
4-3	Chromatogramm des Hefeextraktes mit Eluent 17
4-4	Chromatogramm des Hefeextraktes mit Eluent 18
4-5	Chromatogramm des Hefeextraktes mit Eluent 19
4-6	Chromatogramm des Hefeextraktes mit Eluent 20
4-7	Chromatogramm des Hefeextraktes mit Eluent 21
4-8	Beispiel der Zehnpunktkalibrierung anhand der Daten von Mg^{2+}
4-9	Ausschnitt des Chromatogramms des Hefeextrakts
4-10	Chromatogramm des Mischstandards
4-11	Chromatogramm des Mischstandards mit Na^+ und K^+ aufgestockt zur Identifizierung der Peaks
4-12	Chromatogramm des Hefeextraktes zur qualitativen Bestimmung der Analyten
4-13	Chromatogramme des Hefeextraktes mit Fe^{2+} und Mn^{2+} aufgestockt
4-14	Vergleich der Analytenkonzentrationen in der unbehandelten und in der autoklavierten Probe des Hefeextrakts
4-15	Verbrauch der Mineralstoffe. Vergleich der Analytenkonzentrationen von Fermentationsprobe 1 und 2
4-16	Chromatogramm der Fermentationsprobe 2

Tabellenverzeichnis

Nummer	Titel
3-1	Übersicht der verwendeten Chemikalien und Reagenzien, deren Reinheit und Hersteller/Lieferant
3-2	Übersicht der verwendeten Geräte, deren Namen und Hersteller/Lieferant
3-3	Parameter der verwendeten Trennsäule
3-4	Übersicht der verwendeten Proben des Hefeextraktes
3-5	Betriebsparameter des IC-Systems zur Bestimmung der löslichen Kationen
3-6	Zusammensetzung des Eluenten 1
3-8	Übersicht der Probenvorbereitungen des Hefeextraktes zur Überprüfung der Effizienz
4-1	Peakflächen der Eisenstandards gelöst im Eluenten und in einer 2 mM Ascorbinsäure-Lösung
4-2	Zusammensetzung des finalen Eluenten 21
4-3	Angabe des Variationskoeffizienten (V_K) zur Bewertung der Systempräzision
4-4	Angabe des Variationskoeffizienten (V_K) zur Bewertung der Methodenpräzision
4-5	Werte für die Spurenmetalle Fe^{2+} und Mn^{2+}
4-6	Ergebnisse der Zehnpunktkalibrierung der Analyten
4-7	Ermittelte Konzentrationen der Analyten mit der jeweiligen Abweichung von Literaturwerten
A1	Übersicht der verwendeten Eluenten

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bezeichnung
BG	<u>B</u> estimmungsgrenze
Ca²⁺	Calcium-Ion
DNS	<u>D</u> esoxyribonukleinsäure
Fe²⁺	Eisen(II)-Ion
GLP	Gute Laborpraxis (<i>engl.: good <u>l</u>aboratory <u>p</u>ractice</i>)
H⁺	Wasserstoff-Ion
HPLC	Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie (<i>engl.: <u>h</u>igh <u>p</u>erformance <u>l</u>iquid <u>c</u>hromatography</i>)
IAC	<u>I</u> onenaustauschchromatographie
ICP-OES	optische Atom-Emissions-Spektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (<i>engl.: <u>i</u>nductively <u>c</u>oupled <u>p</u>lasma <u>o</u>ptical <u>e</u>mission <u>s</u>pectrometry</i>)
K⁺	Kalium-Ion
k.A.	keine Angabe
Mg²⁺	Magnesium-Ion
mM	mmol/L
Mn²⁺	Mangan-Ion
Na⁺	Natrium-Ion
NH₄⁺	Ammonium-Ion
n.n.	nicht nachweisbar
NWG	<u>N</u> achweisgrenze
rpm	Runden pro Minute (<i>engl.: <u>r</u>ounds <u>p</u>er <u>m</u>inute</i>)
VE-Wasser	<u>v</u> ollentsalztes Wasser

1 Einleitung

1.1 Hefeextrakte und ihre Verwendung als komplexes Medium

Hefeextrakte sind für zwei Industriebereiche von besonderer Bedeutung: Sie werden in der Lebensmittelindustrie als geschmacksverstärkende Zusatzstoffe verwendet und in der Biotechnologie als Substrat für die Fermentation von Mikroorganismen (Sommer, 1996).

Die biotechnologische Produktion von biologischen Präparaten und pharmazeutischen Produkten ist eine etablierte Technik in der Industrie. Häufig werden bei der Fermentation komplexe Medien als Nährstoffquellen für Mikroorganismen verwendet. Sie stellen für das Zellwachstum und die Metabolitenproduktion essenzielle Kohlenstoff- und Stickstoffverbindungen, Vitamine sowie Spurenelemente zur Verfügung.

Einige Mikroorganismen erreichen bei der Fermentation in einem reichhaltigen komplexen Medium ein stärkeres Wachstum als auf einem mineralisch definierten, da in den Medien natürlichen Ursprungs bereits die Vorgänger biosynthetischer Stoffe enthalten sind. Die Mikroorganismen können diese direkt in ihren anabolen Stoffwechsel aufnehmen und die energieineffiziente Produktion von Vorstufenmetaboliten entfällt. Die dadurch gesparte Energie steht zusätzlich für Wachstum und andere metabolische Prozesse zur Verfügung.

Der Nachteil der reichhaltigen Hefeextrakte ist, dass sie aus natürlichen Rohstoffen zusammengesetzt sind, wodurch sie produktionsbedingt chargenweise sowie je nach Hersteller variieren. Je nach Kultivierungsbedingungen, verwendetem Hefestamm und anschließender Downstream-Prozesse ändert sich die Zusammensetzung der Nährstoffe des komplexen Mediums. Das Fermentationsmedium hat einen signifikanten Einfluss auf das Wachstum und die Produktausbeuten der in ihm kultivierten Mikroorganismen. Durch die uneinheitlichen Chargen ist die Reproduzierbarkeit der industriellen Fermentationsprozesse stark eingeschränkt. In Studien führte die chargenspezifische Variabilität eines durch einen identen Herstellungsprozess produzierten Extraktes zu Unterschieden der Biomasse und Wachstumsraten der Mikroorganismen von nahezu 50 % (Zhang *et al.*, 2003).

Trotz der unbekanntenen Zusammensetzung werden Hefeextrakte immer noch verwendet, da sie hochwertige komplexe Kohlenstoff- und Stickstoffquellen bereitstellen. Die Schlüsselkomponenten von Hefeextrakten, die die Produktausbeute der Mikroorganismen beeinflussen, sind noch nicht vollständig identifiziert. Die Aufklärung wird dadurch erschwert, dass der Nährstoffbedarf, je nach Art des Energiestoffwechsels und biosynthetischer Leistung, der Mikroorganismen variiert. Der Anteil und das Verhältnis an freien Aminosäuren, Nukleotiden, Phosphaten, metabolisierbaren Verbindungen wie Trehalose und Lactat sowie der Mineralstoffgehalt scheinen einen Einfluss auf das Zellwachstum und die Produktivität zu haben (vergleiche Kaspro *et al.*, 2008; Klotz, 2017; Hahn-Hägerdal *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2003; Sommer, 1996).

1.2 Bedeutung der Mineralstoffe

Neben den Makroelementen Kohlenstoff, Sauerstoff, Wasserstoff, Stickstoff, Schwefel und Phosphor, aus denen Kohlenhydrate, Lipide, Proteine und Nukleinsäuren aufgebaut werden, spielen die kationischen Mineralstoffe Kalium (K^+), Magnesium (Mg^{2+}), Natrium (Na^+),

Calcium (Ca^{2+}) und Eisen (Fe^{2+}) eine zentrale Rolle für biologische Prozesse wie die Proteinbiosynthese und Zellatmung. Sie dienen als Co-Faktoren und prosthetische Gruppen von Enzymen (Mg^{2+} , Fe^{2+} und K^+) oder können als regulatorische Signalmoleküle (Ca^{2+}) wirken (Slonczewski & Foster, 2012). Na^+ und Ca^{2+} sind nur für einige Organismen essenzielle Nährstoffe. Fe^{2+} hat eine gesonderte Stellung, da es zu den Spurenmetallen gezählt werden kann, jedoch in größeren Mengen als diese benötigt wird. Es spielt eine Hauptrolle bei der Zellatmung und für den Elektronentransport. Unter anaeroben Bedingungen liegt das Eisen als Fe^{2+} in löslicher Form vor, unter aeroben Bedingungen als Fe^{3+} , das verschiedene nicht lösliche Mineralien bildet. Durch eisenbindende Oligopeptide, die Siderophore, kann das schwer lösliche Fe^{3+} komplexiert und von den Zellen aufgenommen werden (Madigan & Martinko, 2009). Auf Grund ihrer Notwendigkeit für die biologischen Prozesse, haben Makronährstoffe einen erheblichen Einfluss auf das Zellwachstum.

Einige Nährstoffe werden nur in geringen Spuren von Mikroorganismen benötigt. Zu diesen sogenannten Mikroelementen gehören Übergangsmetalle, wie beispielsweise Mangan (Ion: Mn^{2+}), Zink und Kupfer sowie einige Hauptgruppenelemente wie Selen, Chlor und Silicium. Diese Metalle sind häufig Bestandteile von Enzymen, die an der Umsetzung von anorganischen Verbindungen beteiligt sind (Schlegel, 2017). Insbesondere Mn^{2+} soll eine wachstumsfördernde Wirkung haben und kann aktivierend auf Enzyme wirken (Klotz, 2017).

Trotz ihrer Bedeutung für biologische Prozesse in der Zelle, konnte Klotz keinen Einfluss der Kationen K^+ , Mg^{2+} , Na^+ , Mn^{2+} und Fe^{2+} auf die Produktivität von *Sporolactobacillus inulinus* feststellen. Auf Reduzierung der einzelnen Mineralstoffe im Medium, reagierten sie nicht mit einer Limitierung der Lactatproduktion. Einzig für das anionische Phosphat konnte die Umsetzung während der Fermentation nachgewiesen werden (Klotz, 2017).

Klotz unterteilt die Mineralstoffe uneindeutig in „Mineralien und Spurenelemente“ und „lösliche Anionen und Kationen“ (Klotz, 2017). Dabei wird unter der Kategorie „Mineralien und Spurenelemente“ der Gesamtgehalt der Mineralstoffe zusammengefasst, womit die gelöst vorliegenden Kationen und Anionen eingeschlossen werden. Die Mineralstoffe werden in dieser Arbeit in Makro- und Mikroelemente (oder: Spurenelemente) aufgeteilt. Na^+ , Ca^{2+} , K^+ , Mg^{2+} und Fe^{2+} werden zu den Makroelementen gezählt, Mn^{2+} und weitere Metalle zu den Spurenelementen.

Die „Mineralien und Spurenelemente“ werden von Klotz durch optische Atom-Emissions-Spektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-OES) nach einem Mikrowellenaufschluss bestimmt. Bei diesem Verfahren wird der Gesamtgehalt an Mengen- und Spurenelementen erfasst, während durch die Ionenaustausch-Chromatographie (IAC), nur die gelöst vorliegenden Stoffe ermittelt werden können. Klotz erwähnt, dass sich Spurenelemente, wie Fe^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} und Cu^{2+} nicht mit den löslichen Ionen gemeinsam bestimmen lassen (Klotz, 2017). In einer organischen Matrix lässt sich nicht mit Bestimmtheit sagen, ob die anorganischen Ionen ausschließlich in frei gelöster Form vorliegen oder teilweise an die organische Matrix gebunden sind. Cataldi *et al.* (2003) beschreiben in einer vorhergegangenen Arbeit, dass Kationen wie Na^+ und K^+ in einer organischen Molke-Probe komplett gelöst vorliegen. Für andere Kationen wie Ca^{2+} und Mg^{2+} stellt sich ein Löslichkeitsgleichgewicht zwischen den freien und an der organischen Matrix gebundenen Ionen ein.

1.3 Zielsetzung

Auf Grund der Relevanz der Mineralstoffe für biologische Prozesse soll eine Methode für die IAC entwickelt werden, mit der die Konzentrationen der gelösten Kationen im Hefeextrakt vor oder während der Fermentation gemessen werden können. Somit dient die vorliegende Arbeit als Grundlage für die Charakterisierung von Hefeextrakt als komplexes Medium. Die Messdaten sollen Auskunft über den Gehalt der frei verfügbaren Mineralstoffe geben und darüber, welche Kationen während der Fermentation von den Mikroorganismen umgesetzt werden.

Ein erster Einstieg erfolgte durch die Bachelorarbeit von Katharina Großbongardt mit dem Titel „Entwicklung und Validierung zweier ionenchromatographischer Methoden zur Spurenelementbestimmung in Hefeextrakt“ (Großbongardt, 2018). Es wurde je eine Methode zur Analyse der gelösten Anionen und Kationen in Hefeextrakt entwickelt. Auf Grund der Relevanz der Kationenanalyse für eine Forschungsarbeit, wurde entschlossen die Analytik mit der IAC weiterzuentwickeln und die Methode zu validieren.

Der Fokus dieser Arbeit lag zunächst auf den ionischen Makronährstoffen Mg^{2+} und Fe^{2+} und dem Mikroelement Mn^{2+} , da vermutet wurde, dass besonders diese drei Kationen für das Wachstum des untersuchten Bakteriums *Bacillus licheniformis* (*B. licheniformis*) essenziell seien. Im Verlauf der Forschung wurde sich ausschließlich auf die frei gelöst vorliegenden Mineralstoffe konzentriert, die im Hefeextrakt bestimmt werden können. Dazu zählen Na^+ , Ca^{2+} , K^+ , Mg^{2+} und Ammonium (NH_4^+). NH_4^+ wird nicht den Makronährstoffen zugeordnet, kann aber von Mikroorganismen als Stickstoffquelle zum Aufbau von Proteinen und Desoxyribonukleinsäure (DNS) genutzt werden (Madigan & Martinko, 2009).

Die Entwicklung der analytischen Methode umfasst die Verbesserung des Eluenten und die Anpassung der chromatographischen Bedingungen, unter denen die Analyten des Hefeextraktes möglichst getrennt eluieren und mit dem Leitfähigkeitsdetektor aufgenommen werden können. Die Methode soll schließlich validiert werden – ihre Zuverlässigkeit soll nachgewiesen, bewertet und dokumentiert werden.

Im Rahmen der Validierung soll die Methode auf ihre Anwendbarkeit und Eignung für Proben aus der Fermentation getestet werden.

Durch Analysen einer autoklavierten Probe des Hefeextraktes und aus einer Fermentation sollen erste Aussagen darüber gemacht werden, welche Mineralstoffe die Mikroorganismen als Nährstoffquellen verwerten.

2 Theoretischer Hintergrund

2.1 Hefeextrakte – Herstellung und Zusammensetzung

Hefeextrakte sind die Autolysate der Hefezellen. Die Konzentrate beinhalten die löslichen Bestandteile aufgeschlossener Hefezellen, für die in Europa meistens *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) verwendet wird. Sie verfügen über einen hohen Proteingehalt und wachsen in einem Melasse-haltigen Medium in einer Batch-Fermentation. Andere Hefestämme (*Saccharomyces uvarum*, *Kluyveromyces fragilis* und *Candida utilis*) verwerten Molke, Ethanol oder kohlenhydratreiche Nebenprodukte aus der Holzindustrie als Substrate (Sommer, 1996).

Nach dem Ernten der Zellen werden verschiedene Methoden genutzt, um eine Lyse zu initiieren. Typisch sind Autolyse, Aufschlussmethoden bei niedriger Temperatur (bis 50 °C), Thermolyse (> 100 °C), Plasmolyse (osmotischer Schock durch hohe Salzkonzentrationen) und mechanische Aufschlussmethoden, wie zum Beispiel Hochdruckhomogenisator und Rührwerkskugelmühle. Es kommt vor, dass verschiedene Verfahren kombiniert werden. Durch den Aufschluss werden endogene Enzyme freigesetzt, die Biomoleküle zersetzen. Proteasen, Peptidasen und Ribonukleasen sind zum Großteil für die Hydrolyse von Proteinen, Peptiden und der DNS verantwortlich. Ausschlaggebende Faktoren für die Qualität der Autolyse sind der pH-Wert, die Temperatur und die Dauer. Der Vorgang kann zwischen 15 und 60 Stunden dauern. Zusätzlich zugegebene Enzyme und Salze können den Grad der Degradation beeinflussen. Die löslichen Zellbestandteile werden vom unlöslichen Zelldetritus, wie beispielsweise den Zellwandbruchstücken, abgetrennt und aufkonzentriert. Durch zusätzliche Filtrationen, Aufkonzentrierungen und Sterilisation entstehen unterschiedliche Typen der Hefeextrakte: flüssige Extrakte, Pasten oder sprühgetrocknetes Pulver (Sommer, 1996; Klotz, 2017).

Mit 73 bis 75 % bilden Proteine den Hauptteil der löslichen Bestandteile der Hefeextrakte (Sommer, 1996). Davon sind freie Aminosäuren und kleine Peptide (Di-, Tri- und Tetrapeptide) am häufigsten vorhanden. Nur ein kleiner Teil (2 bis 5 %) besteht aus großen Proteinen bis 10 kDa, da der Großteil durch Proteasen und Peptidasen während der Autolyse umgesetzt wird (Sommer, 1996). Aminosäuren und Proteine bilden Stickstoffquellen, die enthaltenen Kohlenhydrate dienen als Kohlenstoffquellen. Nukleotide werden durch die Ribonukleasen abgebaut. Folglich sind Nukleoside und Nukleobasen enthalten (Klotz, 2017). Der Gehalt der wasserlöslichen Vitamine ist abhängig vom Produktionsprozess und der Autolyse der Hefezellen. Ein geringer Fettanteil von 0,5 % (Sommer, 1996) und verschiedene Mineralstoffe, auf die unter 1.2 bereits eingegangen wurde, konnten ebenfalls nachgewiesen werden (Klotz, 2017; Sommer, 1996; Zhang *et al.*, 2003).

2.2 Kationenanalytik durch IAC

Um Wachstumsschwankungen und damit Produktionsausfälle in der biotechnologischen Produktion zu vermeiden und um Hefeextrakt-Chargen zu identifizieren, die den gewünschten Fermentationsprozess unterstützen, sollten die Extrakte vor der Verwendung als Substrat charakterisiert werden (Zhang *et al.*, 2003). Auf Grund der komplexen Zusammensetzung und um ein schnelles „Screening“ vor der Fermentation zu ermöglichen, sollten Analysemethoden verwendet werden, die eine möglichst große Anzahl ähnlicher Analyten gleichzeitig erfassen können (Klotz, 2017).

In dieser Arbeit sollen die im Hefeextrakt gelöst vorliegenden Mineralstoffe analysiert werden. Hierfür wird die Kationen-IAC angewendet, durch die sich die positiv geladenen Makroelemente bestimmen lassen.

Für die Kationenanalyse sind in der instrumentellen Analytik viele allgemeine Verfahren bekannt, wobei die meisten auf photometrischen oder spektrometrischen Methoden basieren. Mit diesen gängigen Verfahren ist eine simultane Analyse mehrerer Analyten nicht oder nur eingeschränkt möglich. Außerdem setzen diese meist eine aufwändige Probenvorbereitung (z.B. Mikrowellenaufschluss) voraus und sind demnach zeitintensiv.

Für die IAC wird keine spezielle Probenvorbereitung benötigt und sie bietet die Möglichkeit, mit einem einzigen Analyselauf mehrere Kationen qualitativ und quantitativ zu bestimmen. Auf Grund der vorhandenen, gut funktionierenden, spektrometrischen Methoden sind nur wenige reguläre Methoden zur Analyse von Kationen mit der IAC beschrieben (Jackson, 2000). In den meisten Fällen wird sie im Bereich der (Ab-) Wasseranalytik eingesetzt. Für diesen Bereich gibt es Normen (zum Beispiel DIN EN ISO 14911), die die Verfahren von den verwendeten Reagenzien bis zur Durchführung und Berechnung beschreiben.

Die IAC hat als klassische Trennmethode in der Ionenchromatographie die größte Bedeutung und wird analytisch als auch präparativ eingesetzt. Üblicherweise handelt es sich bei den Analyten um anorganische Ionen, Aminosäuren oder Proteine und bei der mobilen Phase um einen wässrigen Eluenten. Als stationäre Phase dienen Austauscherpolymerer oder Silicagel (Kieselgel), die modifiziert werden können. Kationenaustauscher besitzen negativ geladene Gruppen an der Oberfläche. Die elektrischen Ladungen werden durch Gegen-Ionen aus der mobilen Phase und kationische Probemoleküle neutralisiert. Die Trennung der Kationen erfolgt durch unterschiedlich starke Wechselwirkungen mit der stationären Phase. Mit steigender Ladung und abnehmender Größe steigt die Affinität auf Grund von elektrostatischen Anziehungskräften und die Retentionszeit nimmt zu (Cammann, 2001).

In den meisten Fällen wird für die Detektion der Ionen ein Leitfähigkeitsdetektor verwendet. Da die mobile Phase wegen ihrer Ionen eine Eigenleitfähigkeit besitzt und die Basislinie im Chromatogramm ein systemimmanentes Rauschen aufweist, wird die Empfindlichkeit der Messungen, beispielsweise im Vergleich zu Analysen mit der HPLC und UV/VIS-Detektoren, verringert. Um dies zu verhindern, kann es bei Messungen im Spurenbereich, sinnvoll sein, einen chemischen Suppressor vor den Detektor zu schalten, der die Hintergrundleitfähigkeit unterdrückt. In dieser Arbeit wird eine IAC ohne Suppressor-Technik angewendet.

Bei einer Detektion der Leitfähigkeit wird häufig eine isokratische Elution bevorzugt, da ein Gradient die mobile Phase und damit die Hintergrundleitfähigkeit verändert. Dadurch würde die Basislinie einen Drift zeigen und die Ergebnisse können unpräziser werden.

Den größten Störfaktor bei der Bestimmung spezifischer Analyten bilden andere Ionen, die im gleichen Zeitfenster eluieren (Jackson, 2000). Wegen der Peakbreiten kann es zu Überschneidungen und damit zur Verfälschung der Ergebnisse kommen. Insbesondere die Bestimmung von Spurenelementen ist durch die vergleichsweise hohen Konzentrationen anderer Ionen (in diesem Fall: Mengenelemente) nicht möglich.

2.3 Validierung

Die Validierung einer Methode ist eine wichtige Grundlage für die Qualitätssicherung. Durch die Verfahrensvalidierung soll die statistische Relevanz und Messunsicherheit ermittelt werden. Dabei muss sie zweckspezifisch sein, denn jede Validierung hat individuelle Anforderungen. Besonders kritische Schritte, wie beispielsweise die Probenvorbereitung müssen validiert werden. Die objektive Auswertung soll dazu dienen, bestimmen zu können, ob ein gemessener „wahrer Wert“ als Ausreißer gilt oder nicht.

Eine optimale Validierung entsteht durch den Vergleich mit einer etablierten Methode unter Berücksichtigung der Messpräzision der verwendeten Apparatur. In der vorliegenden Arbeit können diese Grundlagen nicht genutzt werden, da es sich um die Verbesserung einer neu entwickelten Methode handelt und keine Messunsicherheit der verwendeten Geräte bekannt ist. Allerdings sind eine empirische Methodenentwicklung und die einzelnen Schritte der Validierung miteinander verknüpft, so dass die einzelnen Schritte auf Basis der Verfahrensmerkmale bewertet und eventuell weiter angepasst werden können.

Um die Verfahrensvalidierung in dieser Arbeit durchzuführen, werden Merkmale wie Selektivität, Präzision und Linearität bewertet. Die Validierung erfolgt nach Dr. Stavros Kromidas (Kromidas, 2011).

Eine selektive Methode bietet die Möglichkeit, mehrere Komponenten parallel, ohne gegenseitige Störung, zu erfassen und sie damit eindeutig zu identifizieren. Sie kann überprüft werden, indem ein Standard getestet wird, der alle möglichen Komponenten, im Idealfall inklusive der Matrix-Bestandteile, enthält. Zur Überprüfung der Separation zweier benachbarter Peaks kann der Trennfaktor α genutzt werden, die Güte der chromatographischen Trennleistung wird durch die Auflösung R_S bewertet.

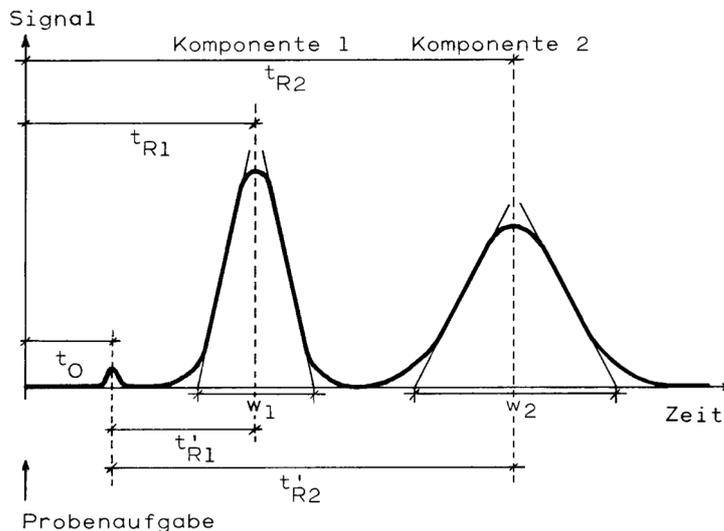


Abb. 2-1. Schematische Darstellung der Kenngrößen eines Chromatogramms zur Berechnung des Trennfaktors α und der Auflösung R_S

(Bildquelle: www.umweltlabor.de/Labor/hplc.htm, abgerufen am 27.09.19)

$$\alpha = t_{R2}/t_{R1}$$

$$R_S = (t_{R2} - t_{R1})/0,5 \cdot (w_1 + w_2)$$

t_{R1}, t_{R2} Retentionszeiten des vorderen und des hinteren Peaks

w_1, w_2 Basisbreite der Peaks

Linearität ist gegeben, wenn eine direkt proportionale Abhängigkeit von Messsignal und Analytenkonzentration besteht. Eine Grundkalibrierung mit Standards kann Auskunft über die Linearität der Apparatur und des Detektors geben, jedoch bleiben Matrixeinflüsse dabei unbeachtet. Werden verschiedene Konzentrationen der realen Probe gemessen und diese gegen die Messsignale aufgetragen, kann die Linearität der Methode bestimmt werden. Stimmen die Bereiche, in denen Linearität herrscht, überein, kann davon ausgegangen werden, dass die Matrix keine systematischen Fehler verursacht und den linearen Bereich nicht einschränkt. Die Steigung der Kalibriergeraden im Arbeitsbereich ist ein Maß für die Empfindlichkeit der Methode. Nur wenn sich die Linearität identisch verhält, können in der Routine die Standards als Kontrollproben verwendet werden.

Die Nachweisgrenze (NWG) gibt die kleinste Konzentration eines Analyten in der Probe an, bei der er qualitativ noch erfasst werden kann (Ja/Nein- Entscheidung).

$$x_{NWG} = (y_{krit.} - a)/b$$

$$y_{krit.} = a + \Delta a$$

x_{NWG} NWG

$y_{krit.}$ Kritischer Wert der Peakfläche

a, b Konstanten der Kalibriergeraden ($y = b \cdot x + a$)

Δa Vertrauensbereich

Die Bestimmungsgrenze (BG) beschreibt die kleinste Konzentration, die mit gegebener Präzision und Richtigkeit quantitativ bestimmt werden kann. In der chromatographischen Praxis gilt das dreifache Rauschen als NWG und zehnfaches als BG (Meyer, 2009). In dieser Arbeit wird die BG als dreifache NWG definiert.

Die Genauigkeit einer Methode ergibt sich aus ihrer Präzision und Richtigkeit. Die Präzision lässt sich in zwei Untergruppen aufteilen. Es werden die Systempräzision (Messpräzision) und die Methodenpräzision beurteilt. Ersteres gibt Auskunft über Schwankungen, die durch das Analysegerät und die Auswertung verursacht werden. Die Methodenpräzision bewertet zufällige Schwankungen von Ergebnissen, die durch das Verfahren selbst verursacht werden, wie in dieser Arbeit die Präzision bei der Einwaage, beim Pipettieren und Abmessen im Messkolben. Die Präzision sollte möglichst mit einer realen Probe bestimmt werden, denn gerade eine komplexe Matrix kann einen signifikanten Einfluss haben. Zur Auswertung der Präzision wird der Variationskoeffizient (V_K) herangezogen, der über die Peakflächen bestimmt wird.

$$V_K = s/\bar{x} \cdot 100 \text{ (in \%)}$$

s Standardabweichung

\bar{x} arithmetischer Mittelwert

V_K ist eine Normierung der Varianz und beschreibt damit die relative Standardabweichung.

Die Richtigkeit ist eines der gängigsten Verfahrensmerkmale in der Validierung. Sie ist ein Maß für die Abweichung des Messwertes vom „wahren Wert“ auf Grund eines systematischen Fehlers. Wenn die Methode selektiv ist, die Wiederfindungsrate bei 100 % liegt, Linearität

vorhanden ist und die Kalibriergerade durch den Nullpunkt geht, ist die Richtigkeit mit hoher Wahrscheinlichkeit gegeben. Aussagen über die Richtigkeit einer Methode zu treffen, ist für neu entwickelte Methoden schwierig, weil keine Vergleichswerte einer bereits etablierten Methode zur Verfügung stehen.

Es soll überprüft werden, ob die Methode die Anforderungen erfüllt und Aussagen über die Gültigkeit getroffen werden.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien

In Tabelle 3-1 sind die für die vorliegende Arbeit verwendeten Chemikalien und Reagenzien sowie deren Reinheit und Hersteller bzw. Lieferant aufgeführt.

Tab. 3-1. Übersicht der verwendeten Chemikalien und Reagenzien, deren Reinheit und Hersteller/Lieferant

Chemikalien und Reagenzien	Reinheit	Hersteller/Lieferant
Reinstwasser	reinst	Sartorius stedim
65%ige Salpetersäure	suprapur	Merck
Dipicolinsäure	98 %	Alfa Aesar
(L+)-Ascorbinsäure	normapur	VWR
Titrisol-Standardlösung Fe 1000 mg/L	**	Merck
Titrisol-Standardlösung Mg 1000 mg/L	**	Merck
Mn-standard for IC 1000 mg/L	TraceCERT®	Sigma Adrich
Cation multi component standard 2*	For analysis	VWR

* enthaltene Analyten: Lithium, Natrium, Ammonium, Kalium, Calcium und Magnesium, dissoziiert, 100 mg/L

** Stammlösungen wurden von Großbongardt am 01.11.18 hergestellt

3.1.2 Geräte und Hilfsmittel

Die verwendeten Geräte sind mit ihren Namen und den Herstellern/Lieferanten in Tabelle 3-2 aufgeführt.

Tab. 3-2. Übersicht der verwendeten Geräte, deren Namen und Hersteller/Lieferant

Geräte	Name	Hersteller/Lieferant
Reinstwasseranlage	arium® pro UV	Sartorius stedim
Interface der IC-Anlage	Interface D-7000	Hitachi
Pumpe	Pump L-7110	Merck, Hitachi
Leitfähigkeitsdetektor	Conductivity Detector L-2470	VWR, Hitachi
Säulenofen	655A-52 Column Oven	Merck, Hitachi
Säule	IC YK-421	Shodex
Vorsäule	IC YK-Guard	Shodex
Vakuumpumpe	W-15	Yamato
Ultraschallbad	Transsonic Digital S	Elma
0,45 µm Membranfilter	Cellulose Nitrat Filter	Sartorius
0,45 µm Spitzenvorsatzfilter	Nylon Membranfilter	VWR
0,2 µm Spitzenvorsatzfilter	Nylon-Filter mit Glasfilter PERFECT-FLOW®	Wicom
0,2 µm Spitzenvorsatzfilter	PET-Filter CHROMAFIL®	Machery-Nagel
pH-Meter	pH-Meter 763 Multi-Calimatic	Knick
Pt100	InLab® Routine Pt100	Mettler Toledo
Leitfähigkeitsmessgerät	Konduktometer 702	Knick
Laborwaage	A 210 P	Sartorius analytic
Zentrifuge	Laborfuge 400	Heraeus Instruments

Die verwendete Säule (IC YK-421, Shodex) ist in der Lage Kationen, Übergangsmetalle, Alkylamine und Aminoalkohole zu trennen. Als Grundlage der chemisch modifizierten stationären Phase der Säule dient Silicagel, an welches Carboxylgruppen (COO^-) gebunden sind. Silicagel oder ein Austauschharz mit gebundenen Carboxylgruppen zählt zu den schwachen Kationenaustauschern (Meyer, 2009).

In Tabelle 3-3 sind die Parameter und Dimensionen der Säule aufgeführt.

Tab. 3-3. Parameter der verwendeten Trennsäule

Parameter der Trennsäule	
Säule	Shodex™ IC YK-421
Säulengröße	4,6 mm ID X 125mm L
Nummer	J4851019
Säulenmaterial (innen)	Rostfreier Stahl, Typ 316
Stationäre Phase	Silicagel mit gebundenen Carboxylgruppen
Max. Flussrate	1,5 mL/min
Max. Druck	15 MPa
Temperaturbereich	Raumtemperatur bis 60 °C
pH-Wert	2 – 7

3.1.3 Probenmaterial

In der vorliegenden Arbeit wird mit dem salzfreien Hefeextrakt „Fermentation H“, Charge 17012814, der Leiber GmbH gearbeitet. Es handelt sich um ein hellbraunes Pulver-Autolysat von Bierhefe der Gattung *S. cerevisiae*. Durch spezielle Aufreinigung ist das Extrakt entbittert und arm an Kohlenhydraten und Phenolen (Leiber GmbH, 2019). Das Datenblatt befindet sich im Anhang 1 (Leiber GmbH, 2018).

Das Hefeextrakt wird in gelöster Form unbehandelt verwendet, um einen Bezugswert zu haben. Eine Probe nach dem Autoklavivorgang (20 min, 121 °C + Aufheiz- und Abkühlphase) dient dazu, Aussagen über einen eventuellen Mineralstoffverlust durch die Probenvorbereitung zu treffen. Durch Proben aus der Fermentation mit *B. licheniformis* soll geklärt werden, welche Kationen von den Mikroorganismen aufgenommen werden (Tab. 3-4). Für die IAC wird eine Probenkonzentration von 1 g/L verwendet. Die Proben werden entsprechend verdünnt.

Tab. 3-4. Übersicht der verwendeten Proben des Hefeextraktes

Proben	Details/Aussagen über	Konzentration β g/L
Hefeextrakt, unbehandelt	Bezugsprobe	
Hefeextrakt, autoklaviert	Probenvorbereitung	5
Fermentationsprobe 1	direkt nach dem Animpfen	15
Fermentationsprobe 2	25 h nach dem Animpfen	15

Die Fermentation mit *B. licheniformis* lief 35 h, wobei bereits nach 25 h kein Wachstum mehr beobachtet wurde, so dass zu diesem Zeitpunkt die Vergleichsprobe entnommen wurde. Die Temperatur wurde durchgehend auf 30 °C und der pH-Wert durch Titration mit Ammoniak auf 7 geregelt. Als Substrat wurde Glucose zugefüttert. Die Vorkultur wurde in einem Kalium-Phosphatpuffer kultiviert und machte 10 % des Reaktorinhaltes aus.

3.2 Methoden

3.2.1 Ionenaustauschchromatographie

Für die Kationenanalytik wird eine IAC-Anlage von Hitachi verwendet. Die Probe wird über ein Six-Port-Ventil in einer 20 μ L Probenschleife vorgelegt. Durch manuelles Umstellen des Hebels auf die Position „Inject“ wird die Probe injiziert. Die Probe läuft über die Vorsäule aus RP-18 Säulenmaterial auf die Trennsäule, die in der Lage ist, die positiv geladenen Teilchen

der Probe nach ihrer Ladungsstärke aufzutrennen. Am Säulenausgang wird ein Leitfähigkeitsdetektor verwendet, um die Kationen zu erfassen. Die Vor- und Trennsäule sowie der Detektor sind in einem Säulenofen untergebracht. Die Messergebnisse können am Bildschirm des verbundenen Computers eingesehen werden.

Zur Inbetriebnahme der Anlage werden zunächst die Pumpe, das Interface der IAC-Anlage, der Detektor und zuletzt der Säulenofen (40 °C) eingeschaltet. Die Equilibrierung der Säule bis zum Erreichen der Betriebstemperatur beträgt 1 bis 2 h. Bei einer zu kurzen Equilibrierungszeit steigt die Basislinie während des Laufes durch Temperaturschwankungen an. Die Anlage wird zunächst mit Reinstwasser bei einer Flussrate von 0,5 mL/min gespült. Der Fluss kann nach wenigen Minuten in kleinen Schritten hochgeregelt werden, bis der gewünschte Fluss von 1,5 mL/min erreicht wird. Ein Spülvorgang von 30 bis 60 min ist erforderlich, um die 1 %ige Acetonitril-Lösung von der Säule zu waschen und so ein mögliches Ausfallen der Puffersalze des Eluenten mit folgender Verstopfung von Vor- wie Trennsäule zu verhindern. Peakfläche und -symmetrie werden durch diese Vorbereitung maßgeblich beeinflusst. Anschließend kann auf den Eluenten umgestellt werden. Mit den Messungen kann begonnen werden, sobald die Säule vollständig equilibriert wurde, so dass die Basislinie keine Schwankungen oder Drift mehr zeigt.

In Tabelle 3-5 sind die Betriebsparameter des IAC-Systems aufgeführt.

Tab. 3-5. Betriebsparameter des IC-Systems zur Bestimmung der löslichen Kationen

Betriebsparameter	
Säule	IC YK-421
Vorsäule	IC YK-Guard
Detektion	Leitfähigkeit, ohne Suppressor-Technik
Temperatur	40 °C
Eluent	0,4 mM Dipicolinsäure, 1,15 mM Salpetersäure
Flussrate	1,5 mL/min
Druck*	85-95 bar
Probenvolumen	20 µL
Laufzeit	26,5 min

*Druck ist abhängig von der Flussrate und der Säule

Die Anzeige an der Pumpe zeigt den aktuellen Fluss in mL/min an und den dadurch resultierenden Druck in bar. Bei einer Flussrate von 1,5 mL/min wird mit dem verwendeten Eluenten ein Druck von 85 bis 95 bar erreicht.

Am Leitfähigkeitsdetektor wird eine „Recorder Range“ von 10 ($\cdot 100$) µS/cm eingestellt, „Zero Supress“ wird auf 0 µS/cm reguliert. „Auto Zero“ sollte vor den Messungen betätigt werden, damit die Leitfähigkeit, die zu diesem Zeitpunkt gemessen wird, auf 0 mV gesetzt wird.

Zum Herunterfahren der Anlage wird zuerst 1 bis 1,5 h mit Reinstwasser gespült, bis die Basislinie einen konstanten Wert angenommen hat. Anschließend muss eine 1 %ige Acetonitril-Lösung für 5 bis 10 min angeschlossen werden, in der die Trennsäule gelagert wird. Der Waschschritt ist notwendig, um die Puffersalze von der Säule zu spülen, da diese ansonsten durch die Acetonitril-Lösung ausfallen können. Sollte die Trennsäule über einen längeren Zeitraum, also mehrere Wochen bis Monate, nicht genutzt werden, sollte eine Lagerung in einer 10 %igen Acetonitril-Lösung erfolgen. Reinstwasser ist ungünstig, da Pilzwachstum auftreten kann.

Puffer eignen sich ebenfalls nicht für die Lagerung, da die Salze kristallisieren können und dadurch die Säule verstopfen würden (Meyer, 2009).

3.2.2 Entwicklung des Eluenten

Die Entwicklung einer geeigneten Zusammensetzung des Eluenten, stellte einen wesentlichen Bestandteil der vorliegenden Arbeit dar. Im Anhang 3 ist eine Tabelle aller verwendeten Eluenten mit zusätzlichen Informationen sowie Vor- und Nachteilen aufgeführt.

Alle Eluenten werden mit Reinstwasser in einem 1000 mL-Kolben angesetzt. Da für Dipicolinsäure eine schlechte Löslichkeit in Wasser charakteristisch ist, werden die Kolben für 2 min in ein Ultraschallbad gestellt, um den Lösungsvorgang zu unterstützen. Die Eluenten werden über eine Vakuumpumpe mit 0,45 µm Cellulose-Nitrat-Filter filtriert, um partikuläre Bestandteile zu entfernen, die Ventile, Kapillaren oder die Säule blockieren können. Über einen Trichter wird das Fließmittel in eine Braunglas-Flasche umgefüllt und anschließend im Ultraschallbad für 10 min entgast. Gasblasen im Detektor können zu einem Rauschen der Basislinie führen. Die Eluenten werden meistens täglich, spätestens aber nach drei Tagen neu angesetzt. Am Ende des Tages werden sie im Kühlschrank (+ 2 °C) eingelagert.

In Tabelle 3-6 ist die Zusammensetzung des Eluenten gezeigt, der zu Beginn der Arbeit verwendet wurde (Großbongardt, 2018) (Leitfähigkeit: 0,934 mS/cm, pH 2,7). Dieser Eluent bildete die Basis zur schrittweisen Verbesserung durch Anpassung der Konzentrationen der Inhaltsstoffe.

Tab. 3-6. Zusammensetzung des Eluenten 1

Chemikalie	Strukturformel	Konzentration
Salpetersäure	HNO ₃	2,34 mM
Dipicolinsäure	C ₇ H ₅ NO ₄	0,1 mM
Ascorbinsäure	C ₆ H ₈ O ₆	3 mM

Er enthält Salpetersäure als starke Säure, um die Ionenstärke und damit die Leitfähigkeit einzustellen. Dipicolinsäure ist ein Komplexbildner für Übergangsmetalle, wodurch diese, mit Ausnahme von Mn²⁺ und Fe²⁺, im Ausschlussvolumen eluieren. Die Zugabe bewirkt außerdem, dass divalente Kationen weniger stark retardiert werden und dadurch früher eluieren. Die Ascorbinsäure wurde auf Basis der von Metrohm angeführten Annahmen verwendet (Metrohm, 2018), um Fe²⁺ in der Probe zu stabilisieren. Dipicolinsäure und Ascorbinsäure wirken zu einem geringen Anteil auf die Leitfähigkeit des Eluenten ein.

Generell wird die Konkurrenz zwischen Ionen der mobilen Phase und denen der Probe um Bindungsplätze an der stationären Phase durch den Typ des Ionenaustauschers, den pH-Wert der mobilen Phase, die Ionenstärke, also die Konzentration der verwendeten Säuren und die Art der Gegen-Ionen der mobilen Phase beeinflusst (Meyer, 2009). Eine Verbesserung der chromatographischen Trennung erfolgt häufig empirisch und wird auch in dieser Arbeit mit Hilfe einer Anpassung der Zusammensetzung des Fließmittels erreicht. Durch Veränderungen der Konzentrationen kann der Einfluss der jeweiligen Reagenzien auf die Elutionszeiten und die Selektivität der Methode geklärt werden.

Da keine Suppression verwendet wird, sollte eine hinreichend empfindliche Detektion durch Austausch mit geringer Kapazität und einen relativ schwachen (gering konzentrierten) Eluenten erfolgen (Cammann, 2001).

3.2.3 Verbesserung der chromatographischen Trennung

Um zu klären, welches Lösungsmittel zum Ansetzen der Standards und Proben verwendet werden sollte, werden je vier Eisenstandards (Konzentrationsbereich 1 bis 10 mg/L) einmal in einer 2 mM Ascorbinsäure-Lösung nach den Vorgaben einer Mitarbeiterin von Metrohm (Timm, 2018) und nach Frau Großbongardt (Großbongardt, 2018)) sowie in Eluent 1 gelöst (siehe Tab. 3-6). Die Peakflächen und Kalibriergeraden werden verglichen, um eine Aussage über die Sensitivität der Methode und den Einfluss des Eluenten auf die Leitfähigkeit der Probe machen zu können.

Zur Probenvorbereitung des Hefeextraktes werden verschiedene Verfahren getestet, um ein möglichst säulenschonendes Arbeiten zu ermöglichen. Zum Vergleich der Methoden werden mehrere Ansätze der Hefeextrakt-Proben zentrifugiert, die auf unterschiedliche Weisen vorbehandelt werden. Damit soll festgestellt werden, ob sich unlösliche Stoffe aus dem Hefeextrakt abtrennen lassen. Dafür werden 25 g/L Hefeextrakt in einem 50 mL Kolben angesetzt. Es handelte sich dabei um eine größere Menge, als der Hersteller Leiber empfiehlt (Anhang 1, Leiber GmbH, 2018), weil signifikante Ergebnisse erreicht werden sollen. Das gelöste Hefeextrakt wurde für Probe 1 bis 4 aufgeteilt, wie in Tabelle 3-7 beschrieben behandelt und im Anschluss 99 min bei 4000 rpm zentrifugiert. Für Probe 5 wurden 40 g/L Hefeextrakt eingewogen und eine Carrez-Fällung durchgeführt (HAW, 2019). Nach der Fällung wurde das Extrakt durch einen Rundfilter filtriert und anschließend 60 min bei 4000 rpm zentrifugiert.

Tab. 3-7. Übersicht der Probenvorbereitungen des Hefeextraktes zur Überprüfung der Effizienz

Proben-Nr.	Probenvorbereitung
1	unfiltriert
2	0,45 µm Nylon-Filter (VWR)
3	0,2 µm Nylon-Filter mit Glasfilter (PERFECT-FLOW®, Wicom)
4	0,2 µm PET-Filter (CHROMAFIL®, Machery-Nagel)
5	Carrez-Fällung

Die Temperatur des Säulenofens und damit die Betriebstemperatur der Trennung kann die Retentionszeiten und die Peaksymmetrie beeinflussen. Hier wird eine Erhöhung der Temperatur angewendet, um das sog. Fronting des Fe^{2+} -Peaks zu minimieren (Arnold, 2017). Die Temperatur wird von 35 °C auf 50 °C und im weiteren Verlauf wieder auf 40 °C runter geregelt.

Der pH-Wert des Fließmittels wird nicht extra eingestellt. Er ist durch eine präzise Einwaage der Dipicolinsäure und der Präzision beim Pipettieren der Salpetersäure genau genug eingestellt.

Die Flussrate wird im Laufe der Messungen an der Pumpe der IAC-Anlage von 1,0 mL/min auf 1,5 mL/min reguliert. Durch eine höhere Fließmittelgeschwindigkeit steigt der Druck. Mit

dieser Einstellung wird der maximal erlaubte Fluss, laut Shodex, für den Betrieb der Säule ausgenutzt (vergleiche Tab. 3-3).

Vom Hefeextrakt wurden zu Beginn der Messungen $\beta = 4 \text{ g/L}$ injiziert. Um eine Probenkonzentration zu bestimmen, bei der eine selektive Trennung erreicht wird, wurden niedrigere Konzentrationen ausgetestet.

3.2.4 Methoden zur Validierung

Um die Selektivität der Methode zu bestimmen, müsste ein Vergleich mit einem Standard durchgeführt werden, der alle möglichen Komponenten inklusive der Matrix enthält. Dies ist nicht möglich, da die komplexe Probe viele unbekannte Komponenten enthält. Für den Vergleich wird ein fertiger Mischstandard (VWR) verwendet, der die fünf zu bestimmenden Analyten und zusätzlich Lithium enthält. Um die Selektivität der Methode für die Analyten im Extrakt bewerten und im weiteren Verlauf verbessern zu können, werden die Messungen mit vorherigen Chromatogrammen verglichen. R_s und α werden für die Bewertung herangezogen.

Um Aussagen über die Linearität und Empfindlichkeit des Detektors und der Anlage machen zu können werden die Kalibrierdaten der Zehnpunktkalibrierung ausgewertet. Die Steigungen der Kalibriergeraden im Arbeitsbereich liefern Informationen über die Empfindlichkeit der Methode für die einzelnen Analyten. Die Linearität der Methode wird durch Messungen mehrerer Konzentrationen der realen Probe überprüft, da die Matrix die Linearität beeinflussen kann. Dafür werden fünf Konzentrationen des Hefeextraktes in Doppelbestimmung gemessen (0,5 bis 2,5 g/L) und die Peakflächen der Analyten gegen die Probenkonzentration dargestellt. Zur Bewertung wird der Korrelationskoeffizient (R^2) verwendet.

Die NWG und BG werden durch die Daten der Zehnpunktkalibrierung der Analyten berechnet. Um möglichst genaue Aussagen treffen zu können, sollte die Kalibrierung in einem für die Analyten repräsentativen Konzentrationsbereich durchgeführt werden. Dafür wurde sich an den laut Datenblatt erwarteten Konzentrationen orientiert (Anhang 1). Die angewendeten Kalibrierungsbereiche sind in Tabelle 4-6 angegeben.

Die Systempräzision (Messpräzision) wird durch das sechsmalige Injizieren eines Standards bestimmt und beschreibt die Präzision der Anlage und des Detektorsystems. Die Methodenpräzision wird durch eine sechsfache Messung unterschiedlicher Standards mit der gleichen Konzentration bestimmt. Dadurch können Verdünnungsfehler sowie ungenaues Pipettieren bzw. Einwiegen bewertet werden. Zur Auswertung wird V_K herangezogen. Eine Normierung der Auswertung ist sinnvoll, da die Analyten in verschiedenen Konzentrationen im Hefeextrakt und den Fermentationsproben erwartet werden. Aus diesem Grund werden auch drei Größenordnungen der Standards für die Messungen ausgewählt, 0,3 mg/L, 3 mg/L und 30 mg/L, die die Präzision der Konzentrationsbereiche repräsentieren sollen. Für die Standardlösungen von 0,3 und 3 mg/L werden 20 mL-Messkolben verwendet, für die 30 mg/L Standards werden 10 mL-Messkolben genommen. Besonders die komplexe Probenmatrix kann die Präzision beeinflussen, daher wird zur Bewertung der Methoden- und Systempräzision neben den Standards auch die reale Probe, 1 g/L des unbehandelten Hefeextraktes, gemessen. Zur Bestimmung der Systempräzision der Probe wird ein 50 mL-Ansatz verwendet, für die Methodenpräzision je 20 mL der Probe.

3.2.5 Qualitative und quantitative Analyse der gelösten Kationen

Zur qualitativen Bestimmung der Peaks im Hefeextrakt werden Einzelstandards von Mn^{2+} und Fe^{2+} verwendet. Ein fertiger Mischstandard (VWR) enthält die Ionen Li^+ , Na^+ , NH_4^+ , K^+ , Ca^{2+} und Mg^{2+} in einer Konzentration von 100 mg/L. Um die Elutionsreihenfolge und die entsprechenden Retentionszeiten zu bestimmen, wird der Mischstandard mit Natriumchlorid und einem Kalium-Standard aufgestockt. Durch die bekannten Retentionszeiten können die Peaks und damit die Analyten in den Proben des Hefeextraktes qualitativ bestimmt werden.

Mit Mn^{2+} und Fe^{2+} wird eine Aufstockung des Hefeextraktes durchgeführt (mit 1 mg/L und 10 mg/L der Einzelstandards), um sie qualitativ in den Proben bestimmen zu können. Die Ergebnisse sollen zeigen, in welcher Umgebung die Peaks eluieren würden, wenn die beiden Kationen nachgewiesen werden könnten. Durch die Aufstockung soll ebenfalls geklärt werden, ob die zugesetzten Mengen im Extrakt wiedergefunden werden können. Für die Berechnung werden die Peakflächen verwendet. Da beide Analyten nicht getrennt von anderen Peaks eluieren (siehe Kapitel 4.4), wurde versucht die Flächen der störenden Peaks herauszurechnen.

Für die quantitativ-analytische Arbeit ist die Kalibrierung die Grundvoraussetzung. Die Zehnpunktkalibrierung wird für sieben Analyten durchgeführt: Na^+ , Ca^{2+} , K^+ , Mg^{2+} , NH_4^+ , Fe^{2+} und Mn^{2+} . Die Kalibriergeraden werden direkt von der IAC-Software errechnet und zusätzlich durch die Auftragung in Excel bestimmt, um die NWG und BG zu bestimmen. Die Geraden werden in dieser Arbeit nicht durch den Nullpunkt gezogen, weil dieses Vorgehen nicht immer zweckmäßig ist (Kromidas, 2011). Da es sich um eine neu entwickelte Methode handelt und die Einflüsse, die die Linearität beeinflussen könnten, noch nicht gänzlich geklärt sind, sollen keine Effekte unterdrückt werden und die Kalibriergeraden so realitätsnahe wie möglich beibehalten werden. Da die Analyten in verschiedenen Konzentrationsbereichen im Hefeextrakt erwartet werden, werden die Bereiche von 0,1 - 5 mg/L, 1 - 10 mg/L und 5 - 50 mg/L durch die Kalibrierung abgedeckt. Für die Konzentrationsbereiche < 1 mg/L werden Messkolben mit Volumina bis 20 mL verwendet. Für die großen Konzentrationen bis 50 mg/L werden kleine Messkolben mit Volumina bis 2 mL verwendet, um ein sparsames Arbeiten mit dem Mischstandard zu ermöglichen. Für Fe^{2+} und Mn^{2+} werden Mischstandards zusammen mit dem Einzelstandard von Mg^{2+} angesetzt. Kalibrierdaten für die Makroelemente Na^+ , Ca^{2+} , K^+ , Mg^{2+} und NH_4^+ werden mit dem Mischstandard aufgenommen. Anhand der Grundkalibrierung mit den Standards und den entstehenden Kalibrierfunktionen, können die Gehalte der einzelnen Analyten in den vorhandenen Proben (Tab. 3-4) bestimmt werden. Der Hefeextrakt und die autoklavierte Probe werden je dreimal angesetzt und vermessen, um Fehler durch ungenaue Einwaagen oder ungenaues Pipettieren eliminieren zu können. Die Fermentationsproben werden ebenfalls dreimal gemessen, jedoch wegen der geringen vorhandenen Probenvolumina, nicht für jede Messung neu angesetzt. Zur Auswertung wird der Mittelwert der Peakflächen von den Analyten ermittelt. Durch die quantitative Analyse sollen Aussagen über die Auswirkung der Probenvorbereitung auf den Kationengehalt und über den Mineralstoffbedarf der Bakterien getroffen werden.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Bewertung der chromatographischen Bedingungen

Durch einen Vergleich der Peakflächen (Tab. 4-1) lässt sich erkennen, dass die Peaks der Standards, die mit der 2 mM Ascorbinsäure-Lösung angesetzt wurden, größer sind als die, die mit dem Eluenten angesetzt wurden.

Tab. 4-1. Peakflächen der Eisenstandards gelöst im Eluenten und in einer 2 mM Ascorbinsäure-Lösung

Konzentration in mg/L	1	2,5	5	10	Kalibriergerade
Peakfläche mit Eluent 1	8244	19 546	41 112	83 266	$y = 8387x - 746$
Peakfläche mit Ascorbinsäure-Lösung	8441	20 688	42 184	82 091	$y = 8193x + 460$

Allerdings ist anhand der Kalibriergeraden zu sehen, dass die Steigung und damit die Empfindlichkeit der Methode höher ist, wenn zur Probenvorbereitung mit dem Eluenten gearbeitet wird. Ein weiterer Vorteil ist, dass nur ein Lösungsmittel angesetzt werden muss und keine weitere Lösung mit Ascorbinsäure. Zum Ansetzen der Standards und Proben wird demnach der Eluent verwendet.

Zur Aufbereitung der organischen Hefeextraktproben, wurden die in Tabelle 3-7 beschriebenen Proben 1 bis 5 ausgewertet. Nach der Zentrifugation ließ sich bei der unfiltrierten Probe 1 ein dunkles Pellet am Gefäßboden erkennen. Die Proben 2 bis 4 mit unterschiedliche Spitzenvorsatz-Filter filtriert, lieferten unauffällige Ergebnisse. Es bildete sich kein Absatz. Auch bei Probe Nummer 5, Carrez-Fällung, sammelten sich während der anschließenden Zentrifugation keine unlöslichen Bestandteile am Gefäßboden. Diese Probe hatte eine hellgelbe, durchsichtige und hellere Farbe als die anderen hellbraunen und durchsichtigen Lösungen. Die Ergebnisse der Zentrifugation zeigen, dass das Hefeextrakt filtriert auf die Säule gegeben werden sollte. Das entstandene Pellet kann aus Zellresten und unlöslichen Bestandteilen, wie zur Ausfällung neigenden Eiweißen (Leiber, 2019) bestehen, die mit Hilfe der Filtration durch einen Spitzenvorsatz-Filter abgetrennt werden können. Werden die unlöslichen, sedimentierbaren Bestandteile vor der Injektion nicht abgetrennt, könnten sie die Vorsäule nach einiger Zeit blockieren, was einen frühzeitigeren Wechsel der Vorsäule bedingen würde. Eine Zentrifugation oder eine Carrez-Fällung zur Probenvorbereitung wären theoretisch möglich, wären jedoch, im Vergleich zur Filtration, wesentlich zeitintensiver. Die Carrez-Fällung könnte neben den unlöslichen Bestandteilen auch einige gelöst vorliegende Stoffe oder kleinere Partikel aus der Probe abgetrennt haben, wodurch der hellere Farbton der Probe 5 erklärt werden kann. Für die Messungen mit einer HPLC ist eine Filtration durch einen 0,45 µm Filter ein gängiges Verfahren zur Probenvorbereitung vor der Injektion. Auch für diese Methode erscheint eine Filtration des Hefeextraktes durch einen 0,45 µm Nylon-Spitzenvorsatz-Filter als ausreichend.

Durch eine Betriebstemperatur von 50 °C kann ein Fronting des Fe²⁺-Peaks verringert werden. Jedoch dauert das Equilibrieren lange - die Basislinie driftet auch nach 2 h bei einem Fluss von 1 ml/min noch nach oben, was durch Temperaturschwankungen zu erklären ist. Eine Temperatur von 40 °C wird schneller erreicht, so dass man eher mit den Messungen beginnen kann. Schon bei dieser Temperatur kann ein Fronting des Fe²⁺-Peaks verringert werden. Im Nachhinein lässt sich sagen, dass sich das im Hefeextrakt in Spuren enthaltene Fe²⁺ nicht mit der

vorliegenden Methode nachweisen lässt, weshalb bei weiteren Versuchen wieder eine niedrigere Temperatur in Betracht gezogen werden kann.

Durch die Erhöhung der Fließmittelgeschwindigkeit steigt der Druck von ca. 65 auf 95 bar, die Analyten eluieren früher und die Gesamtlaufzeit kann verringert werden. Im Laufe der Messungen eines Tages sinkt der Druck auf bis zu 86 bar ab, es wurde aber kein Einfluss auf die Retentionszeiten beobachtet.

Zu Beginn der Messungen wurden 4 g/L des Hefeextraktes als Probe auf die Säule injiziert (Großbongardt, 2018). Abbildung 4-1 zeigt ein Chromatogramm mit dieser Konzentration. Es wird deutlich, dass die Peaks zu groß sind und sich teilweise überlagern. Die Konzentration der Probe wurde auf 1 g/L reduziert, damit eine selektive Trennung erreicht wird. Das Problem liegt hier bei den Spurenmetallen Fe^{2+} und Mn^{2+} . Um über der NWG zu liegen, müssten relativ hohe Konzentrationen des Hefeextraktes von 6 g/L für Eisen und 60 g/L für Mangan aufgetragen werden. Das würde zu einer schlechteren Auflösung durch große Peaks der anderen Bestandteile führen. Durch eine Überladung der Säule könnte es außerdem zu Verschiebungen der Retentionszeiten kommen und die Konzentrationen würden außerhalb des Arbeitsbereiches liegen, der in dieser Arbeit auf bis zu 2,5 g/L ermittelt werden konnte.

4.2 Einfluss der Zusammensetzung des Eluenten

Die folgenden Abbildungen zeigen Messungen des Hefeextraktes. Die Läufe wurden mit verschiedenen Eluenten durchgeführt, die in der Legende angegeben sind. Die Identifizierung der Analyten im Hefeextrakt ist unter „4.4.1 Qualitative Bestimmung“ zu finden.

Abbildung 4-1 zeigt ein Chromatogramm vom Hefeextrakt mit Eluent 6 als Fließmittel. Eluent 6 war mit 0,5 mM Dipicolinsäure die erste Weiterentwicklung des Eluenten 1.

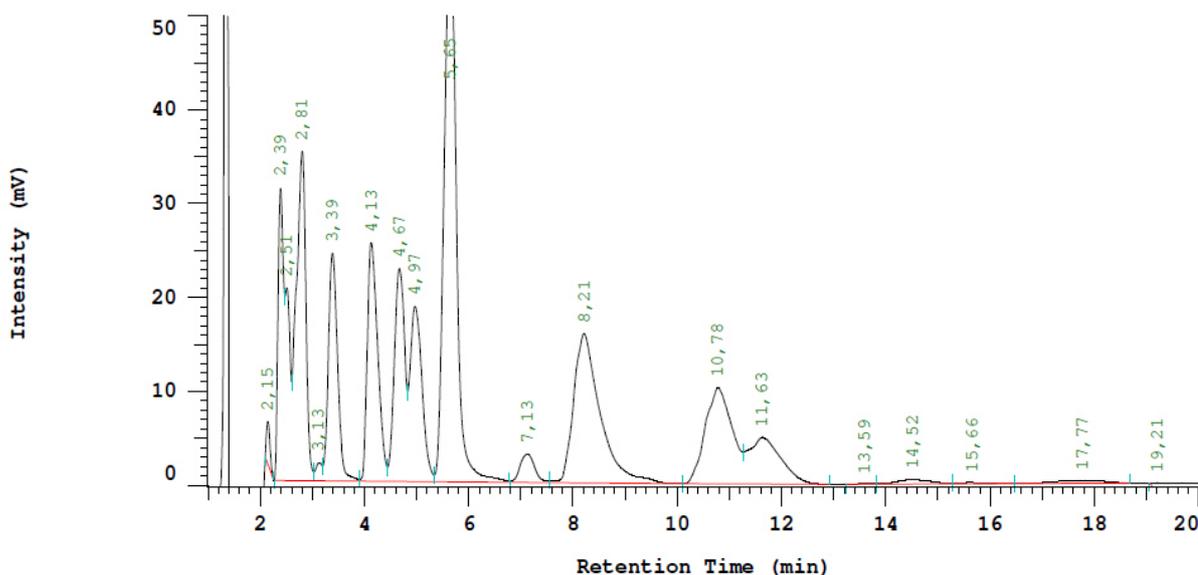


Abb. 4-1. Chromatogramm des Hefeextraktes mit Eluent 6, $\beta = 4$ g/L, 53 bar, 1,0 ml/min, 50 °C, 1,001 mS/cm

Problematisch ist, dass der Mg^{2+} -Peak bei einer Retentionszeit von 11,63 min, nicht getrennt von anderen kationischen Bestandteilen des Hefeextraktes eluiert. Die Überschneidung ist zu

stark, um eine ausreichend präzise quantitative Auswertung machen zu können. Auch andere Analyten lassen sich hier nicht präzise qualitativ und quantitativ bestimmen. Insgesamt wirkt das Chromatogramm mit 4 g/L Probenkonzentration des Hefeextraktes und einer relativ großen Ionenstärke des Eluenten, überladen und komprimiert. Die Konzentration wurde aus diesem Grund auf 1 g/L Hefeextrakt reduziert. Eine Reduzierung der Salpetersäure auf 1 mM sollte die Ionenstärke herabsetzen und somit das Chromatogramm entzerren.

In Abbildung 4-2 ist zu erkennen, dass die Analyten deutlich getrennter voneinander eluieren. Der Kreis zeigt eine Vergrößerung des Na^+ -Peaks, der nach 4,34 min detektiert wird, und des davor eluierenden Stoffes. Die Peaks sind nicht getrennt voneinander.

Durch die geringere Probenkonzentration ist das Messsignal geringer als der Spannungswert, der in Abbildung 4-1 abgebildet ist. Dadurch und durch die geringere Ionenstärke des Eluenten, sind die Peaks deutlicher voneinander getrennt und besser zu erkennen. Das Chromatogramm wirkt entzerrter und Mg^{2+} , das nach 20,90 min eluiert, ist getrennt von anderen Peaks.

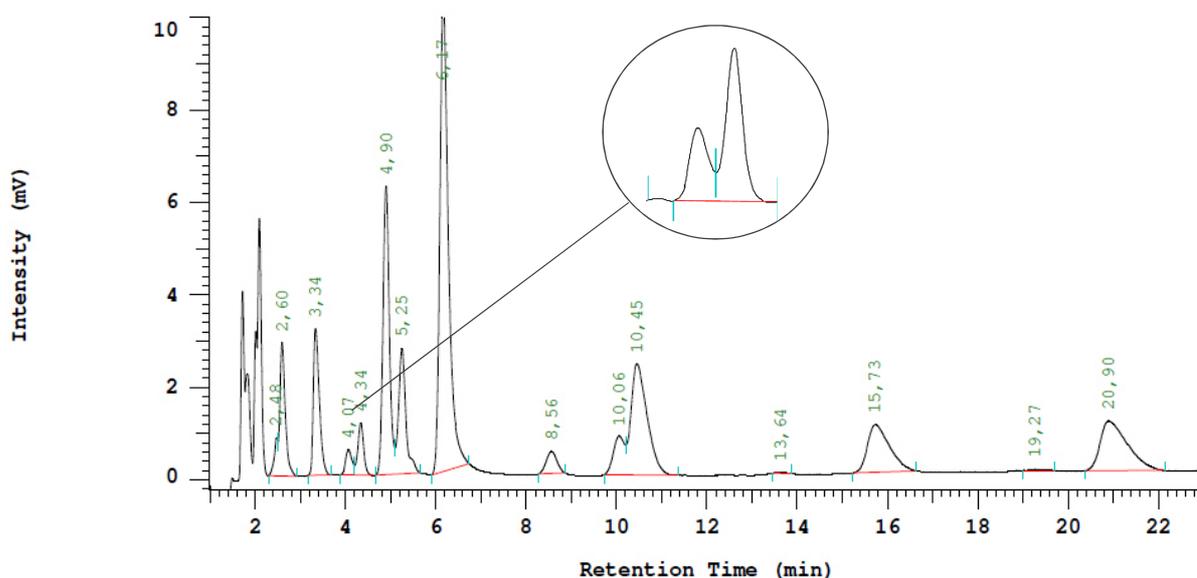


Abb. 4-2. Chromatogramm des Hefeextraktes mit Eluent 15, $\beta = 1$ g/L, 93 bar, 1,5 ml/min, 40 °C, 0,561 mS/cm

Um eine bessere Trennung für Na^+ zu erreichen, wurde die Konzentration der Dipicolinsäure von 0,5 auf 0,1 mM reduziert. Für Eluent 17 wurde die Ascorbinsäure weggelassen, da festgestellt wurde, dass Fe^{2+} in so geringen Mengen im Hefeextrakt enthalten ist, dass es nicht mit der vorliegenden Methode nachgewiesen werden kann (siehe 4.4.1). Auf den Einsatz von Ascorbinsäure zur Stabilisierung von Fe^{2+} wird in Folge verzichtet. In Abbildung 4-3 ist erkennbar, dass Na^+ und der vorherige Peak mit Eluent 17 getrennt voneinander eluieren. Mg^{2+} wird erst nach 30,85 min detektiert.

Auf Grund der niedrigen Ionenstärke eluiert Mg^{2+} erst nach ca. 31 min. Zwar weist das Chromatogramm im vorderen Bereich eine bessere Auflösung auf, allerdings ist effektiv nur für den Na^+ -Peak (5,14 min) eine bessere Trennung zu erkennen. NH_4^+ (5,83 min) eluiert nicht

getrennt vom nachfolgenden Peak. Die um ein Drittel verlängerte Gesamtlaufzeit ist im Vergleich zur Analysezeit mit Eluent 15 nicht effektiv.

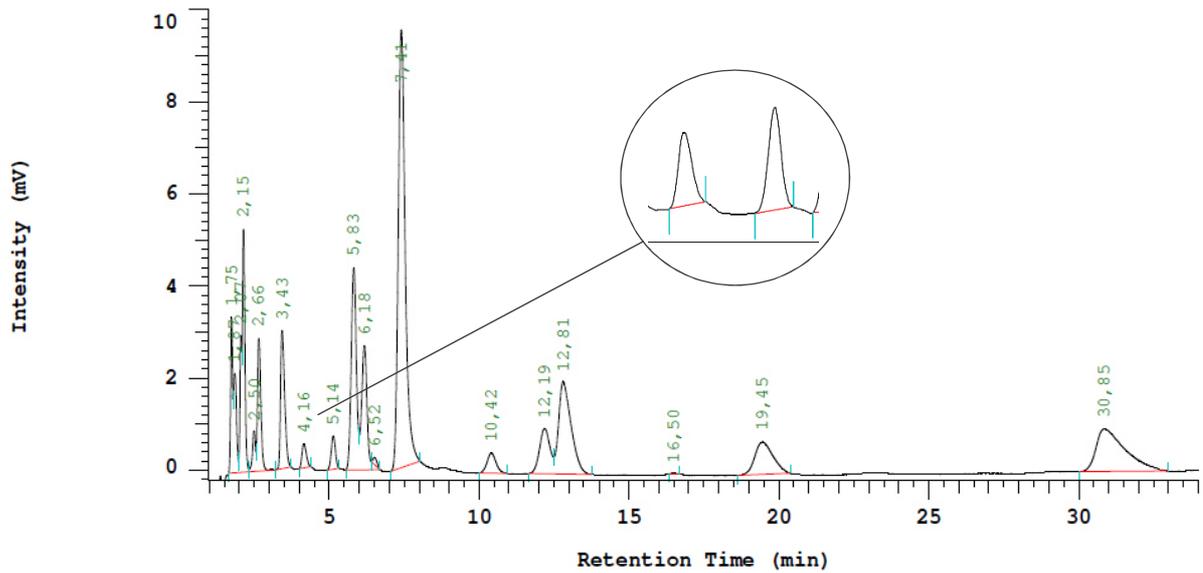


Abb. 4-3. Chromatogramm des Hefeextraktes mit Eluent 17, $\beta = 1$ g/L, 95 bar, 1,5 ml/min, 40 °C, 0,433 mS/cm

Um Mg^{2+} wieder früher zur Elution zu bringen, wurde die Konzentration der Dipicolinsäure auf 0,4 mM erhöht.

In Abbildung 4-4 wird aufgezeigt, dass Mg^{2+} dennoch relativ spät nach 28 min eluiert. Für Na^+ wird immer noch eine gute Trennung erreicht. Auffällig ist, dass ein neuer Peak bei 22,28 min erscheint, der als Ca^{2+} -Peak identifiziert werden konnte.

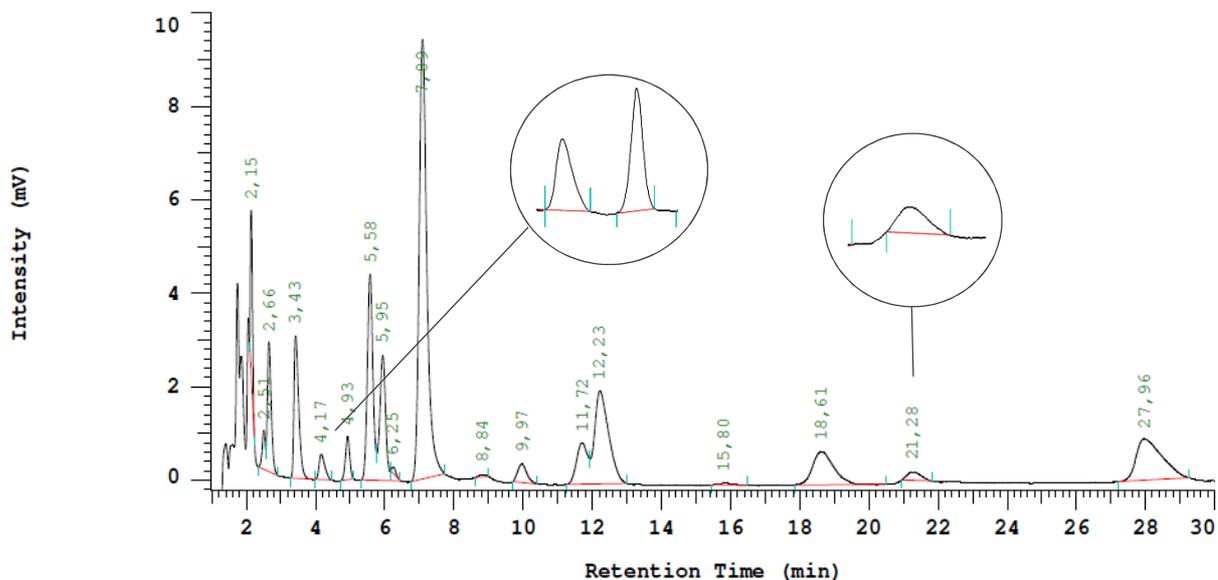


Abb. 4-4. Chromatogramm des Hefeextraktes mit Eluent 18, $\beta = 1$ g/L, 92 bar, 1,5 ml/min, 40 °C, 0,495 mS/cm

Um die Auswirkung der Ascorbinsäure zu klären, wurde dem Eluenten 18 Ascorbinsäure zugegeben (Abb. 4-5), was ein früheres Eluieren von Mg^{2+} bewirkte.

Die Erhöhung der Ionenstärke durch die Ascorbinsäure führt zu einer früheren Elution der Analyten. Allerdings wurde festgestellt, dass die Verwendung von Ascorbinsäure für ein stärkeres Rauschen der Basislinie sorgt. Ein geringeres Rauschen führt zu präziseren quantitativen Ergebnissen. Zusätzlich sorgten die Eluenten mit Ascorbinsäure für einen „Systempeak“, der wahrscheinlich unter dem Na^+ -Peak liegt. Auch dadurch führt das Weglassen der Ascorbinsäure zu einer Verbesserung der quantitativen Ergebnisse. Durch den Verzicht auf die Eisenbestimmung, wird sie nicht weiter benötigt und es sollte ein Eluent ohne sie entwickelt werden.

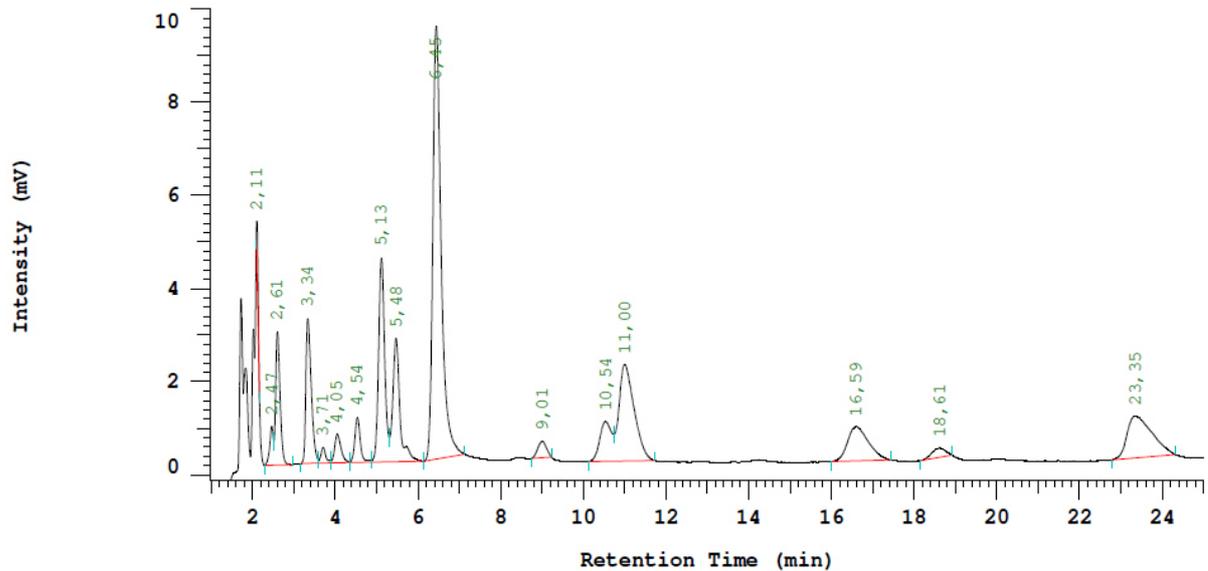


Abb. 4-5. Chromatogramm des Hefeextraktes mit Eluent 19, $\beta = 1 \text{ g/L}$, 94 bar, 1,5 ml/min, 40 °C, 0,533 mS/cm

Zur Erhöhung der Ionenstärke, um eine kürzere Gesamtlaufzeit zu erreichen, wird die Konzentration der Salpetersäure hochgesetzt. Ein Eluent mit 1,2 mM Salpetersäure und 0,4 mM Dipicolinsäure führt zu dem in Abbildung 4-6 dargestellten Chromatogramm. Sowohl Na^+ als auch Ca^{2+} sind nicht mehr basisliniengetrennt von den zuvor eluierenden Bestandteilen.

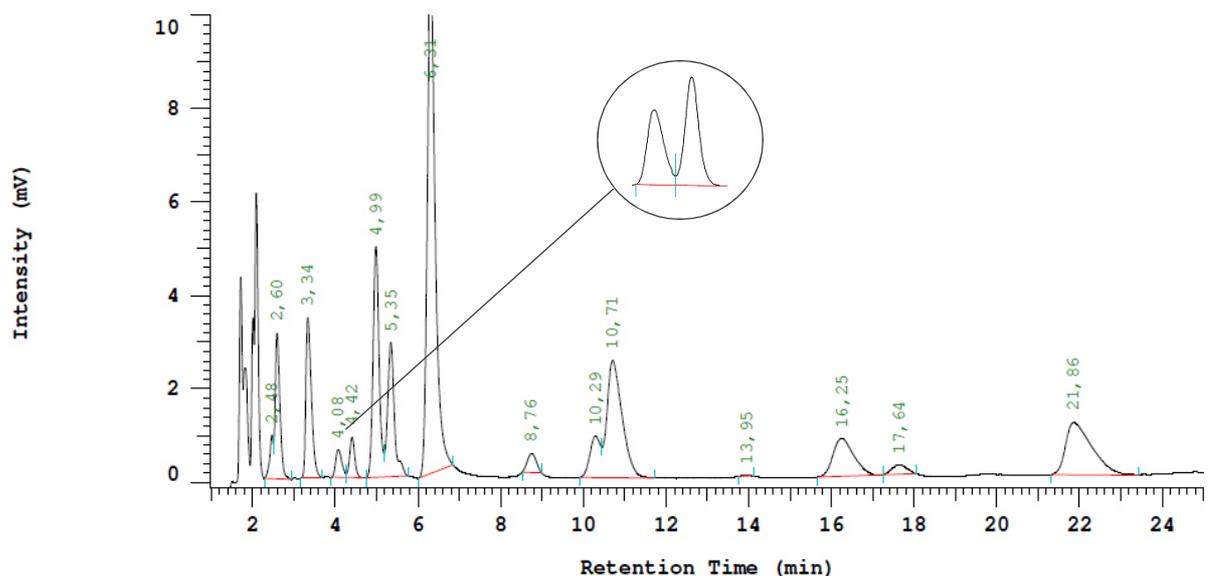


Abb. 4-6. Chromatogramm des Hefeextraktes mit Eluent 20, $\beta = 1 \text{ g/L}$, 94 bar, 1,5 ml/min, 40 °C, 0,563 mS/cm

Die höhere Leitfähigkeit sorgt dafür, dass die Peaks insgesamt früher eluieren, die Auflösung jedoch schlechter wird (vergleiche Abb. 4-5).

Als letzter Schritt zur Verbesserung der Güte der Trennung, wurde die Konzentration der Salpetersäure erneut etwas reduziert. Das in Abbildung 4-7 dargestellte Chromatogramm zeigt die Trennung der kationischen Bestandteile des Hefeextraktes mit Eluent 21. Die Peaks für Na^+ und Ca^{2+} sind im Vergleich zum Lauf mit Eluent 20 basisliniengetrennt.

Durch die verbesserte Trennleistung für die Analyten Na^+ und Ca^{2+} kann eine genauere Auswertung der Peakflächen erfolgen.

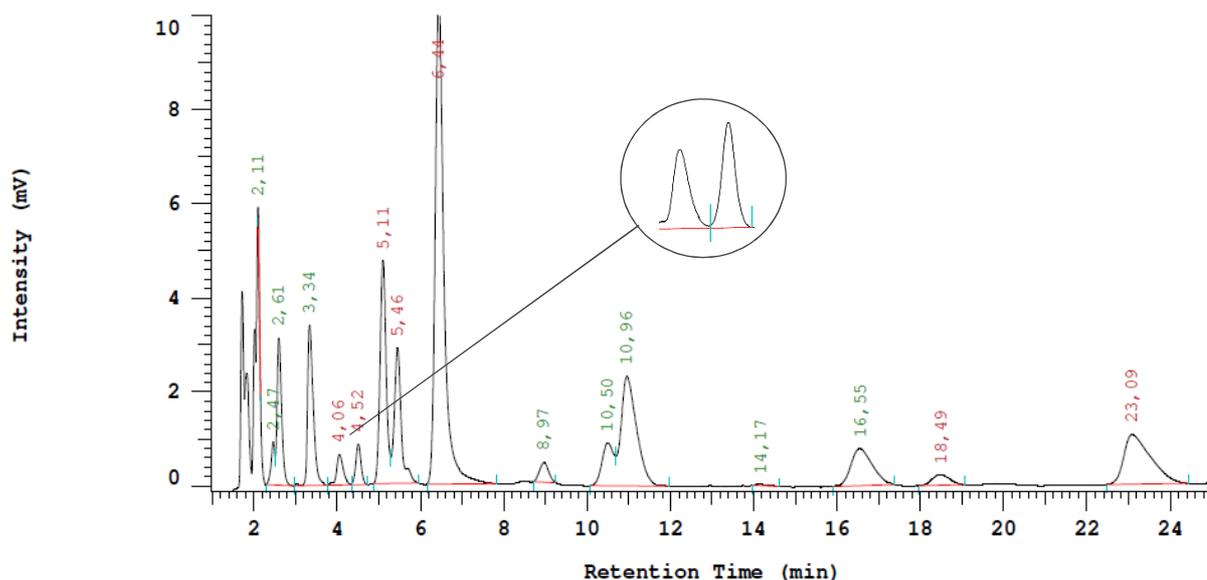


Abb. 4-7. Chromatogramm des Hefeextraktes mit Eluent 21, $\beta = 1 \text{ g/L}$, 95 bar, 1,5 ml/min, 40 °C, 0,547 mS/cm

Tabelle 4-2 zeigt den verbesserten finalen Eluenten 21 (Leitfähigkeit: 0,547 mS/cm, pH 2,8). Bei diesem wurde Ascorbinsäure weggelassen, da der Gehalt an freiem Fe^{2+} nicht bestimmt werden kann. Salpeter- und Dипicolinsäure wurden angepasst.

Tab. 4-2. Zusammensetzung des finalen Eluenten 21

Chemikalie	Strukturformel	Konzentration
Salpetersäure	HNO_3	1,15 mM
Dipicolinsäure	$\text{C}_7\text{H}_5\text{NO}_4$	0,4 mM

Von den untersuchten Analyten wird einzig für NH_4^+ (5,11 min) keine Trennung mit Eluent 21 erreicht. Die Methode ist damit nicht spezifisch für NH_4^+ , sorgt aber dafür, dass die vier weiteren Analyten getrennt von anderen Bestandteilen eluieren. Insgesamt wird durch die Anpassung der Zusammensetzung des Eluenten eine Verbesserung der Trennleistung von 12 (überlagerten) Peaks auf selektiv erkennbare, jedoch nicht unbedingt basisliniengetrennte 19 Peaks erzielt.

Der Einfluss der mobilen Phase auf die Trennleistung ist von mehreren Parametern abhängig (Meyer, 2009) und soll hier zusammenfassend dargestellt werden. Die Erhöhung der

Ionenstärke der mobilen Phase verkleinert die Retentionszeiten der Analyten, da sich das Gleichgewicht in Richtung einer bevorzugten Bindung von Gegen-Ionen und folglich vermehrter Lösung der Probe-Ionen verschiebt. Die Wahl des Gegen-Ions beeinflusst die Retentionszeit ebenfalls. Die verwendete Salpetersäure bringt H^+ als Gegen-Ion in die mobile Phase, welches für relativ hohe Retentionszeiten sorgt. K^+ oder Ca^{2+} -Lösungen würden beispielsweise eine frühere Elution der Analyten bewirken.

Ein Überblick über den gesamten Prozess der Entwicklung der Fließmittel-Zusammensetzung mit Vor- und Nachteilen der einzelnen Eluenten, ist im Anhang 3 zu finden.

4.3 Validierung der Methode

Die Selektivität kann, dadurch dass der Mischstandard keine Matrixbestandteile enthält, nicht mit Sicherheit vorhergesagt werden, aber eine Annäherung vor der Analyse der Hefeextrakt-Proben ist damit möglich. Beinahe alle Analyten eluieren mit dem angepassten Eluenten 21 getrennt voneinander, ohne dass die Peakflächen durch Bestandteile, die kurz davor oder danach eluieren, verfälscht werden. Eine Ausnahme ist der NH_4^+ -Peak in den Proben des Hefeextraktes. Dieser ist nicht basisliniengetrennt von dem Peak, der kurz danach detektiert wird. Zur Bewertung der Trennung wurde der Trennfaktor α und die Auflösung R_S für die beiden Peaks berechnet:

$$\alpha_{NH_4^+} = 1,07$$

$$R_{S,NH_4^+} = 1,24$$

α ist > 1 und bestätigt damit die Selektivität der Methode. Die Auflösung ist mit 1,24 ausreichend, bestätigt jedoch die gegenseitige Beeinflussung beider Peaks. Ab einem Wert von 1,5 kann von einer Basislinien-Trennung gesprochen werden. Laut Kromidas liegt der Fehler bei einem „Tal“ zwischen den Peaks von kleiner als 50 % ihrer Höhe und im Fall zweier gleich großer symmetrischer Peaks, bei 1 bis 2 % (Kromidas, 2017). Da der NH_4^+ -Peak aber in etwa die doppelte Fläche des nachfolgenden Peaks aufweist und das „Tal“ zwischen den beiden Peaks relativ niedrig ist (0,6 mV, NH_4^+ -Peak hat eine Höhe von 4,7 mV), kann NH_4^+ noch mit einer guten Genauigkeit (Fehler wahrscheinlich $< 1\%$) bestimmt werden.

Für Aussagen über die Linearität der Anlage und des Detektors wurden Zehnpunktkalibrierungen mit dem Mischstandard durchgeführt. Dabei wurden Korrelationskoeffizienten von 0,9990 (NH_4^+) bis 0,9998 (K^+ und Na^+) erreicht (siehe Tab. 4-6). Zur Veranschaulichung zeigt Abbildung 4-8 die Zehnpunktkalibrierung für den Analyten Mg^{2+} . Die Zehnpunktkalibrierungen aller Analyten inklusive Fe^{2+} und Mn^{2+} sind im Anhang 2 aufgeführt. Mit der verwendeten Maske wird die Qualität der Kalibrierung anhand von V_K bewertet. Dabei wurden folgende Grenzen festgelegt: „sehr gut“ für Werte $< 1\%$, „gut“ für Werte bis 2 % und „o.k.“ bis 5 %. Alle Kalibrierungen wurden mit o.k. bis gut bewertet und die Linearität wird in jedem Fall als signifikant beschrieben. Einzig für K^+ wird durch eine Funktion 2. Ordnung ein minimal besserer also niedrigerer Variationskoeffizient erreicht, und zwar 1,0 statt 1,1 %. Trotzdem wird auch hier, der Einfachheit wegen, die Funktion der Gerade verwendet. Daraus lässt sich

schließen, dass für die Anlage und den Detektor bis zu den höchsten Konzentrationen (siehe Tab. 4-6) für alle Analyten Linearität gegeben ist.

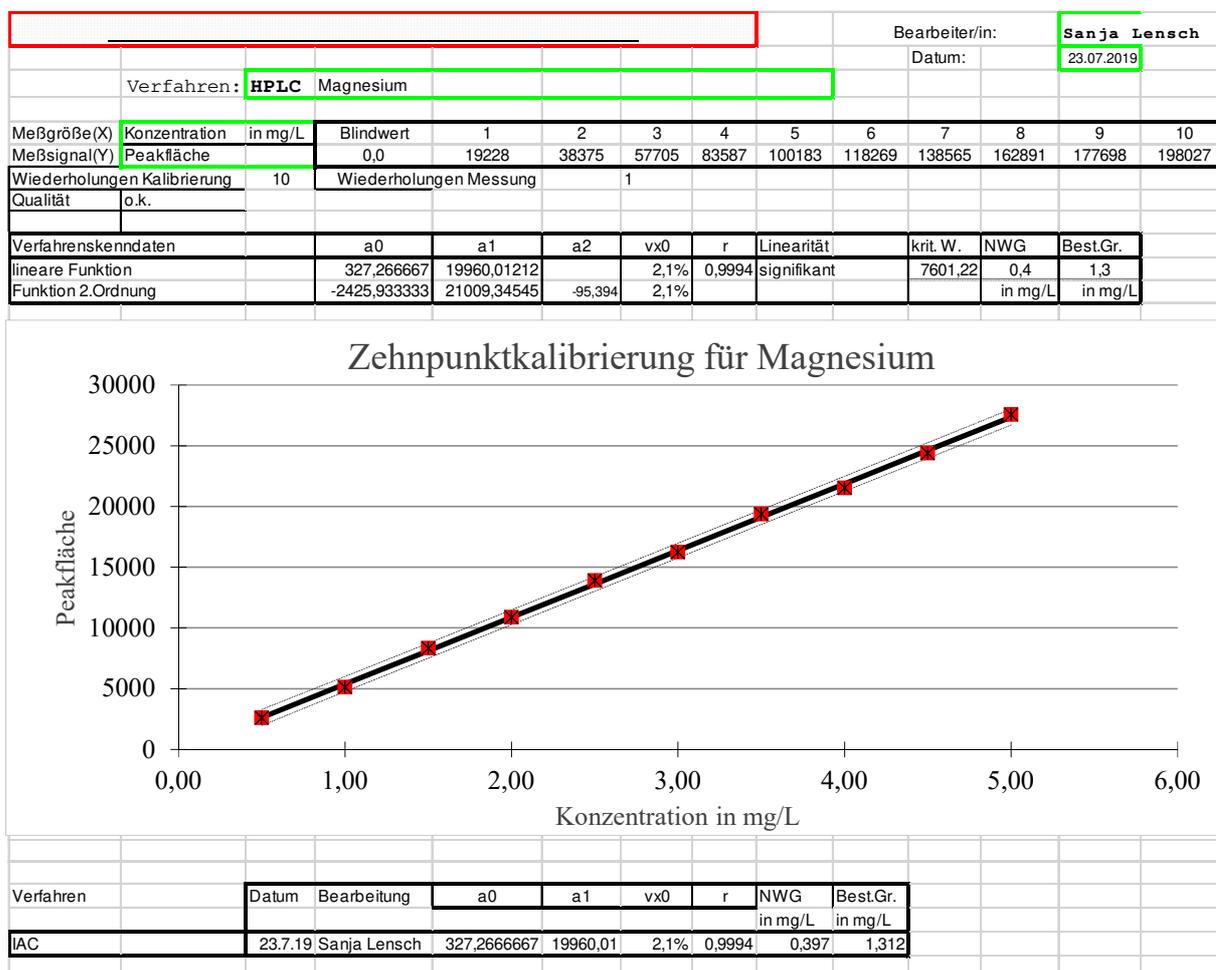


Abb. 4-8. Beispiel der Zehnpunktkalibrierung anhand der Daten von Mg²⁺

Bei der Bestimmung der Linearität der Methode wurden im untersuchten Bereich von 0,5 bis 2,5 g/L der Hefeextrakt-Proben Korrelationskoeffizienten von 0,9938 für Ca²⁺ bis 0,9998 für K⁺ und NH₄⁺ erreicht. Für Na⁺ folgte R² = 0,9983 und für Mg²⁺ R² = 0,9988. Aus der signifikanten Linearität in diesem Bereich lässt sich schließen, dass die Methode bis zu einer Probenkonzentration von 2,5 g/L für alle Analyten linear ist. Die komplexe Matrix scheint keine Auswirkung auf die Linearität der Methode zu haben. Der geringere Wert von R² für Ca²⁺ kommt durch die geringe quantitative Menge im Hefeextrakt zustande, wodurch die Auswertung unpräziser wird. Dadurch, dass die Matrix die Konzentration der Analyten bzw. das Messsignal von diesen nicht zu beeinflussen scheint, ist für diese Methode eine Grundkalibrierung mit Standards ausreichend.

Die Systempräzision wurde durch eine sechsfache Injektion desselben Standards in drei verschiedenen Konzentrationsbereichen und der sechsfachen Auftragung einer Probe des unbehandelten Hefeextraktes bestimmt. Tabelle 4-3 stellt die relative Standardabweichung (V_K), die durch die Auswertung der Peakflächen bestimmt wurde, dar. Mit Ausnahme von Na⁺ und K⁺

sinken die Werte von V_K mit steigender Konzentration des Standards. Die ermittelten Werte der Peakfläche streuen bei einer niedrigen Konzentration von 0,3 mg/L stärker. Die Streuung der Werte des Hefeextraktes sind höher.

Tab. 4-3. Angabe des Variationskoeffizienten (V_K) in % zur Bewertung der Systempräzision

Konzentration mg/L	Analyten				
	Na ⁺	NH ₄ ⁺	K ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺
0,3	0,462	1,798	3,789	4,129	2,426
3	0,688	0,679	0,722	1,469	1,082
30	0,395	0,647	0,739	0,460	0,439
Hefeextrakt (1 g/L)	3,459	0,986	1,169	4,437	1,303

Die Schwankungen, die durch die Anlage und durch die manuelle Integration zustande kommen, können durch die Systempräzision bewertet werden. Erwartungsgemäß sinkt die Streuung mit steigender Konzentration des Mischstandards. Das Rauschen der Basislinie hat bei niedrigen Konzentrationen eine stärkere Auswirkung auf die Auswertung der Peakflächen und damit wird V_K größer, je niedriger die gemessenen Konzentrationen sind. Für die Analyten Na⁺, K⁺ und NH₄⁺ ist der Unterschied zwischen dem mittleren und dem hohen Konzentrationsbereich nicht signifikant. Für Ca²⁺ und Mg²⁺ wird die Auswertung mit steigender Konzentration deutlich besser. Durch die späte Elution sind die Peaks einer stärkeren Peakverbreiterung ausgesetzt, wodurch das Rauschen der Basislinie einen stärkeren Einfluss auf die Auswertung als bei den anderen Analyten hat. Für diese beiden Analyten stimmen die ermittelten Werte der Hefeextraktprobe weitgehend mit den Werten des Standards überein. Ca²⁺ wird im niedrigen Konzentrationsbereich erwartet (< 1 mg/L) und Mg²⁺ im mittleren (< 10 mg/L). Für K⁺, NH₄⁺ und Na⁺ wurden mit dem Hefeextrakt unpräzisere Ergebnisse erzeugt als mit dem Mischstandard. Es wird davon ausgegangen, dass der relativ niedrige V_K -Wert bei einer Konzentration von 0,3 mg/L für Na⁺ inzidentell und nicht realitätsnah ist. Für die Methodenpräzision wird ebenfalls eine stärkere Streuung festgestellt (vergleiche Tab. 4-4). K⁺ und NH₄⁺ streuen durch Matrixeffekte des Hefeextraktes möglicherweise etwas stärker. Das Ergebnis des NH₄⁺-Peaks wird durch den benachbarten Peak beeinflusst.

Mit Hilfe von sechs Injektionen von jeweils neu angesetzten Standard- und Probelösungen sollen Aussagen über die Präzision der Methode getroffen werden. In Tabelle 4-4 ist ebenfalls der entsprechende Variationskoeffizient der Analyten bei verschiedenen Konzentrationen des Mischstandards und im Hefeextrakt dargestellt. An den höheren Werten von V_K ist zu erkennen, dass die ermittelten Werte der Peakflächen stärker streuen als bei der Ermittlung der Systempräzision. Für K⁺ und Ca²⁺ sinkt V_K mit steigender Konzentration. Für die anderen Analyten wird bei 30 mg/L des Standards eine größere Streuung beobachtet.

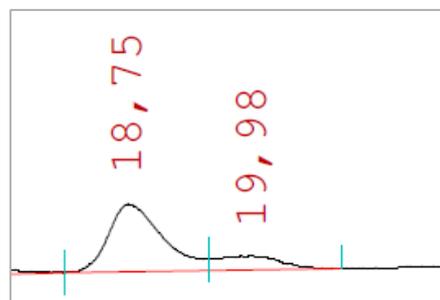
Tab. 4-4. Angabe des Variationskoeffizienten (V_K) in % zur Bewertung der Methodenpräzision

Konzentration mg/L	Analyten				
	Na ⁺	NH ₄ ⁺	K ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺
0,3	8,018	10,31	11,72	8,672	7,319
3	2,523	1,527	2,248	3,703	0,479
30	3,341	1,850	2,130	1,933	1,146
Hefeextrakt (1 g/L)	2,662	1,062	0,812	4,779	1,693

Die relative Standardabweichung der Methodenpräzision ist erwartungsgemäß größer als die der Systempräzision. Neben den Fehlern, die durch die manuelle Auswertung und durch die Anlage verursacht werden, steigern unpräzises Pipettieren kleiner Volumina und Fehler beim Ansetzen der Standards in Messkolben die Streuung der Werte der Methodenpräzision. Auch hier sind die Werte im kleinen Konzentrationsbereich (0,3 mg/L) größer, da sehr kleine Volumina beispielsweise im Bereich von 10 bis 60 μL pipettiert wurden. Die Werte im hohen Konzentrationsbereich (30 mg/L) verbessern sich für K^+ nicht signifikant im Vergleich zum mittleren (3 mg/L). Die größere Streuung für Na^+ und NH_4^+ bei hohen Konzentrationen, entstehen durch die nicht basisliniengetrennt voneinander vorliegenden Peaks und die dadurch größere gegenseitige Beeinflussung. Der niedrige V_K -Wert von Mg^{2+} im mittleren Konzentrationsbereich scheint zufällig entstanden zu sein. Die relative Standardabweichung weist bei den Proben des Hefeextraktes für alle Analyten niedrigere Werte auf, was für eine höhere Präzision spricht. Für Na^+ und NH_4^+ lässt sich diese insbesondere durch den Konzentrationsunterschied der beiden Analyten erklären. Da Na^+ in einer deutlich geringeren Konzentration im Hefeextrakt gemessen wird (vergleiche Tab. 4-7), sind die Peaks hier basisliniengetrennt und erreichen damit eine höhere Präzision.

Die geringe Präzision, die insbesondere für Na^+ und Ca^{2+} erreicht wird, ist durch ihre niedrigen Konzentrationen im Hefeextrakt zu erklären, wodurch das Rauschen der Basislinie einen größeren Einfluss auf die Auswertung hat. Bei Ca^{2+} wirkt die späte Elution nach ca. 18 min und die dadurch entstehende Verbreiterung des Peaks ebenfalls auf das Ergebnis ein. Zusätzlich kann, besonders wenn höhere Konzentrationen des Hefeextraktes injiziert werden, ein direkt nach Ca^{2+} eluierender Stoff erkannt werden (Abb. 4-9). Die Peakfläche von Ca^{2+} wird durch diesen beeinflusst und die Präzision wird geringer.

Abb. 4-9. Ausschnitt des Chromatogramms des Hefeextrakt mit $\beta = 2,5 \text{ g/L}$. Ca^{2+} eluiert nach 18,75 min, ein weiterer Bestandteil nach 19,98 min. Dieser Peak beeinflusst die Präzision von Ca^{2+}



Bei Messungen mit der HPLC sollte der Variationskoeffizient für alle Versuche nach Vorgaben der Guten Laborpraxis (GLP) kleiner als 1 % sein (Kromidas, 2011). Dieses Ergebnis wird für keinen der Analyten erreicht. Die V_K -Werte von K^+ , Mg^{2+} und NH_4^+ kommen der gewünschten Präzision am nächsten. Sie sind teilweise $< 1 \%$ oder knapp $> 1 \%$. Für Na^+ und Ca^{2+} reicht die Präzision, die mit dieser Methode erreicht wird, nicht aus.

4.4 Bestimmung der gelösten Kationen

4.4.1 Qualitative Bestimmung

In Abbildung 4-10 ist ein Chromatogramm des verwendeten Mischstandards dargestellt, der mit Eluent 21 gelaufen ist und die aktuellen Retentionszeiten für die validierte Methode anzeigt. Aus Vergleichen mit der DIN EN ISO 14911 für Wasseranalytik und dem „Certificate of Analysis“ der Trennsäule von Shodex (Shodex, 2018), in dem die gleichen Analyten aber andere Eluenten verwendet werden, lässt sich folgende Vermutung für die Elutionsreihenfolge

anstellen: Li^+ - Na^+ - NH_4^+ - K^+ - Ca^{2+} - Mg^{2+} . Ca^{2+} und Mg^{2+} eluieren auf Grund ihrer zweifachen Ladung später als die einfach geladenen Kationen. Für Mg^{2+} ist die Retentionszeit durch den Abgleich mit dem Einzelstandard bekannt. Laut Weiss eluiert Ca^{2+} typischerweise nach Mg^{2+} . Durch die komplexbildenden Eigenschaften der Dipicolinsäure in der mobilen Phase wird diese Reihenfolge jedoch umgekehrt (Weiss, 2004). Li^+ sorgt, wie in den Vergleichs-Chromatogrammen, für einen Peak mit signifikanter Höhe und Fläche.

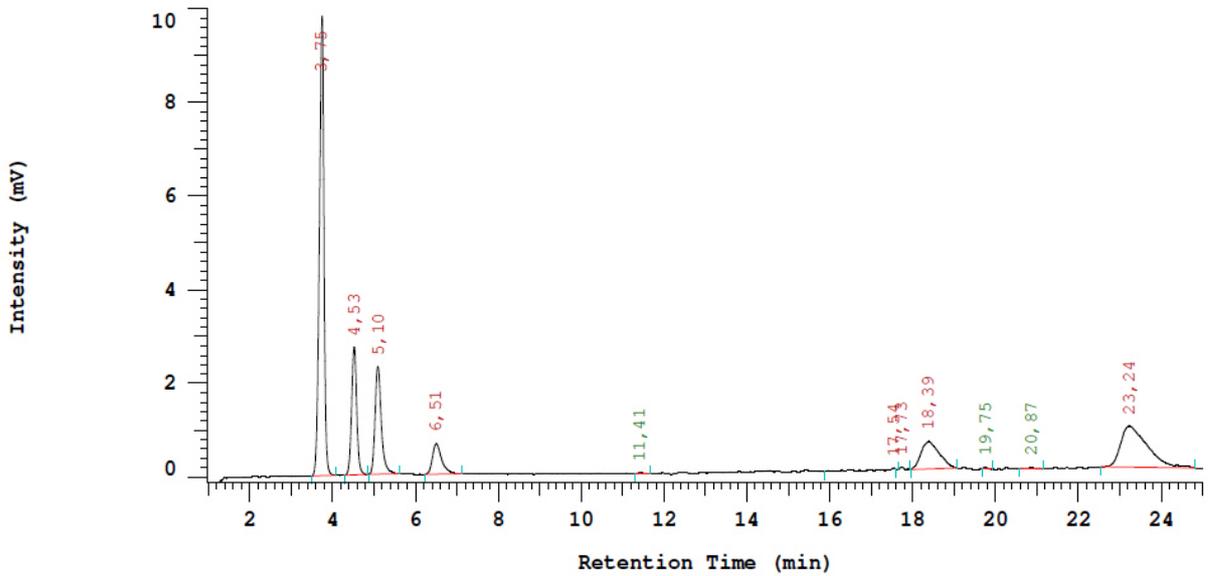


Abb. 4-10. Chromatogramm des Mischstandards mit $\beta = 2 \text{ mg/L}$ - Li^+ 3,75 min; Na^+ 4,53 min; NH_4^+ 5,10 min; K^+ 6,51 min; Ca^{2+} 18,39 min; Mg^{2+} 23,24 min

Durch eine Aufstockung des Mischstandards ($\beta = 5 \text{ mg/L}$) mit ca. 40 mg/L Natriumchlorid und 5 mg/L Kalium, konnte die Reihenfolge der Elution der Mengenelemente bestimmt werden. In Abbildung 4-11 ist das Chromatogramm der Aufstockung dargestellt. Die Retentionszeiten der Analyten entsprechen nicht denen aus Abbildung 4-10, da die Aufstockung mit Eluent Nummer 15 durchgeführt wurde.

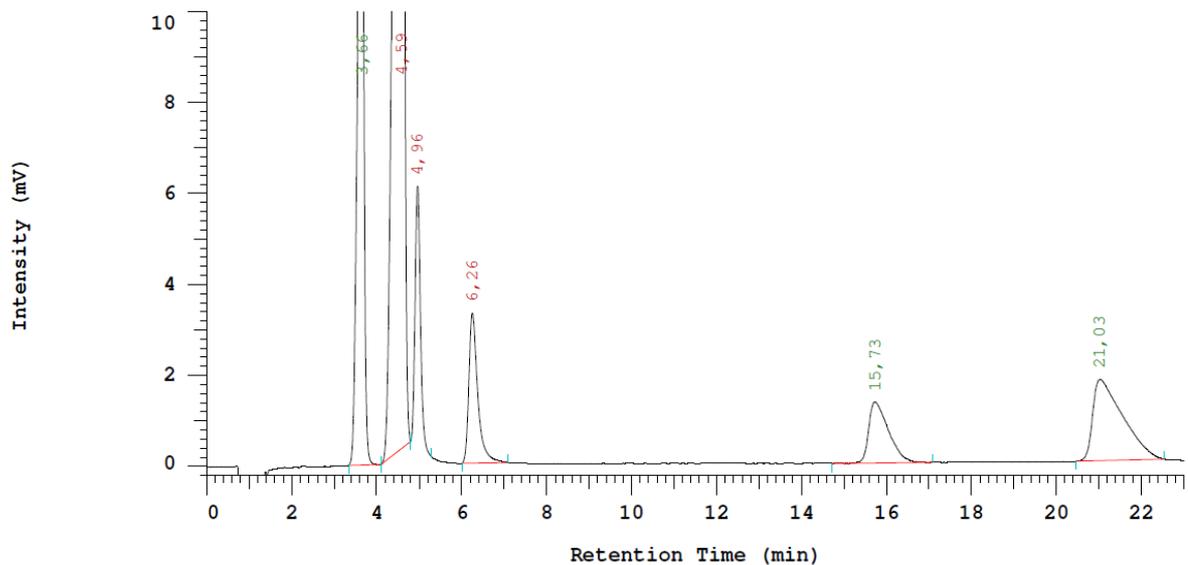


Abb. 4-11. Chromatogramm des Mischstandards mit $\beta = 5 \text{ mg/L}$ mit 10 mg/L Na^+ und 5 mg/L K^+ aufgestockt zur Identifizierung der Peaks

Der Na^+ -Peak sollte um den Faktor fünf zunehmen, jedoch ist dieser durch ungenaues Einwiegen der geringen Menge des Salzes um etwa den Faktor elf größer. K^+ konnte durch die vorliegende Form als Lösung präziser zugegeben werden. Die Peakfläche ist um den erwarteten Faktor zwei gestiegen.

Durch die bekannte Reihenfolge und Retentionszeiten der Analyten, können die Mengenelemente qualitativ im Hefeextrakt bestimmt werden (Abb. 4-12).

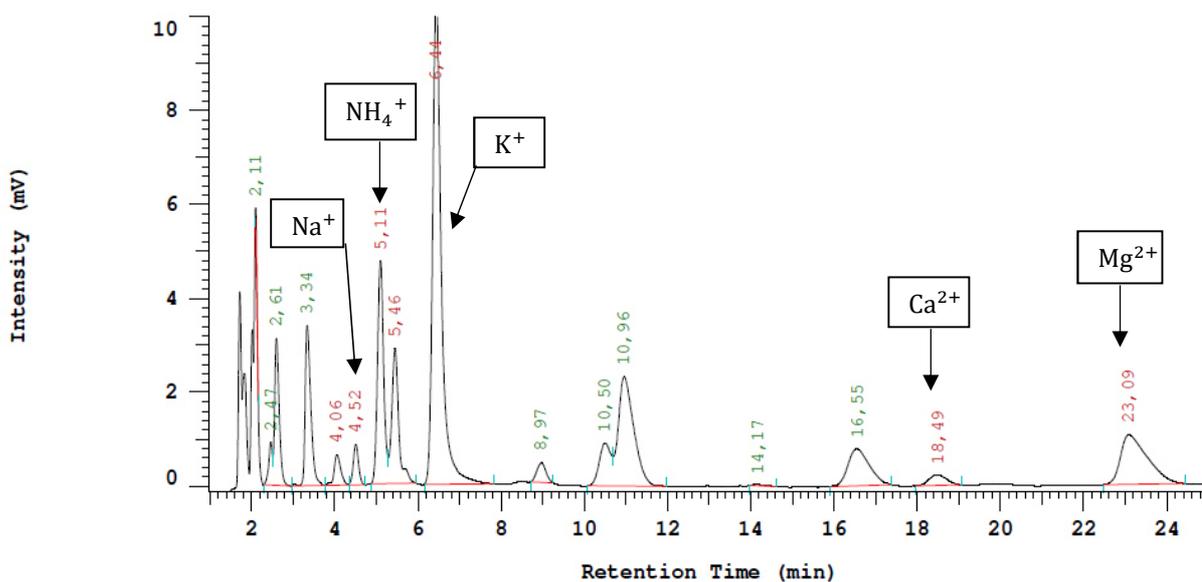


Abb. 4-12. Chromatogramm des Hefeextraktes mit $\beta = 1 \text{ g/L}$ zur qualitativen Bestimmung der Analyten: Na^+ 4,52 min; NH_4^+ 5,11 min; K^+ 6,44 min; Ca^{2+} 18,49 min; Mg^{2+} 23,09 min

Eine qualitative (und quantitative) Bestimmung der Spurenmetalle Fe^{2+} und Mn^{2+} ist mit dieser Methode nicht möglich. Die entsprechenden Peaks mit gleichen Retentionszeiten wie die der Einzelstandards, lassen sich nicht im Chromatogramm des Hefeextraktes wiederfinden. Abbildung 4-13 zeigt anhand einer Aufstockung des Hefeextraktes mit je 1 mg/L und 10 mg/L der Einzelstandards von Fe^{2+} und Mn^{2+} , an welchen Stellen die beiden Kationen eluieren würden, wenn sie in entsprechender Konzentration enthalten wären. Anhand der Peakflächen soll bestimmt werden, ob die zugegebenen Mengen der Spurenelemente wiedergefunden werden können. Tabelle 4-5 zeigt die erwarteten Konzentrationen im Hefeextrakt (bei einer Probenkonzentration von $\beta = 1 \text{ g/L}$) und die durch eine Zehnpunktkalibrierung ermittelte NWG und BG der beiden Kationen.

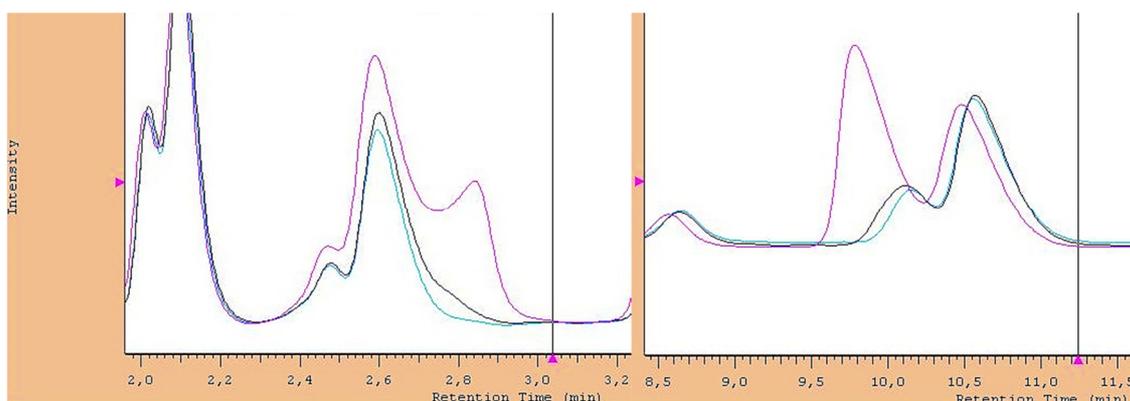


Abb. 4-13. Chromatogramme des Hefeextraktes mit $\beta = 1 \text{ g/L}$ (türkis) mit 1 (schwarz) und 10 mg/L (violett) Fe^{2+} (links) und Mn^{2+} (rechts) aufgestockt, Lauf mit Eluent 15

Tab. 4-5. Werte für die Spurenmetalle Fe^{2+} und Mn^{2+} : erwartete Konzentration in $\beta=1 \text{ g/L}$ Hefeextrakt-Probe, ermittelte NWG, BG und der Konzentrationsbereich in dem die Zehnpunktkalibrierung durchgeführt wurde

Analyt	Erwartete Konzentration*	NWG	BG	Konzentrationsbereich der Zehnpunktkalibrierung
	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L
Eisen (Fe^{2+})	0,034	0,2	0,7	0,5 – 10
Mangan (Mn^{2+})	0,0032	0,2	0,5	0,5 – 10

*nach Leiber (Datenbaltt im Anhang 1) (Leiber GmbH, 2018)

Abbildung 4-13 verdeutlicht, dass weder Fe^{2+} noch Mn^{2+} mit der verwendeten Methode nachgewiesen werden können. Es kann auch gezeigt werden, dass die Peaks mit Eluent 15 nicht von anderen Peaks getrennt wären, wenn sie aufgenommen werden könnten. Auch an der ermittelten NWG von 0,2 mg/L für beide Analyten wird deutlich, dass die geringen Mengen von 0,034 mg/L für Fe^{2+} und 0,0032 mg/L für Mn^{2+} (Leiber GmbH, 2018), die im Hefeextrakt erwartet werden, nicht detektiert werden können. Verglichen mit den Peakflächen der Zehnpunktkalibrierung, entsprechen die Flächen nach der Aufstockungen ungefähr den zu erwarteten Ergebnissen. Durch die fehlende Trennung der Peaks von anderen ist eine genaue Aussage nicht möglich. Abweichungen sind durch die unsymmetrischen Peaks (Fronting bei

Fe²⁺, Tailing bei Mn²⁺), Matrixeffekte und unpräzises Auswerten zu erklären. Signifikante Einflüsse durch die Probenmatrix, wie für Fe²⁺ vermutet wurde (Großbongardt, 2018), konnten nicht nachgewiesen werden.

4.4.2 Quantitative Bestimmung

Als Basis der quantitativen Auswertung wurde für die Analyten eine Zehnpunktkalibrierung durchgeführt (Tab. 4-6). Anhand der erwarteten Konzentrationen der Analyten (Leiber GmbH, 2018) sollte die Kalibrierung für Na⁺, Mg²⁺ und NH₄⁺ im Bereich 1 - 10 mg/L erfolgen, die für K⁺ von 5 - 50 mg/L und wegen der geringen Konzentration für Ca²⁺ zwischen 0,1 und 5 mg/L. Durch erste Auswertungen, wurde festgestellt, dass Na⁺ in einer Konzentration < 1 mg/L im Hefeextrakt enthalten sein muss, so dass für die Zehnpunktkalibrierung zusätzlich Werte von 0,2 - 0,8 mg/L aufgenommen wurden. Die NWG liegt für alle Analyten, mit Ausnahme von K⁺, bei < 1 mg/L. Für K⁺ liegt die NWG bei 1 mg/L und die BG ist mit 3,4 mg/L höher als die der anderen Analyten. Die Steigung der Kalibriergeraden reichen von 5801 für K⁺ bis 19 960 für Mg²⁺. Die besten Qualitäten wurden bei den Auswertungen für K⁺ und Na⁺ erreicht (R² = 0,9998), die geringste für NH₄⁺ (R² = 0,9990). Die V_K-Werte

Tab. 4-6. Ergebnisse der Zehnpunktkalibrierung der Analyten: angegeben sind der Kalibrierungsbereich, NWG, BG, Geradengleichung, Korrelations- und Variationskoeffizient

Analyt	Kalibrierungsbereich mg/L	NWG mg/L	BG mg/L	Kalibriergerade	Korrelationskoeffizient (R ²)	Variationskoeffizient (V _K) %
Na ⁺	0,2 – 10	0,3	1,0	y = 10 560x + 801,2	0,9998	2,9
NH ₄ ⁺	1 – 10	0,5	1,6	y = 11 964x + 3745	0,9990	2,6
K ⁺	5 – 50	1,0	3,4	y = 5800x - 1591	0,9998	1,1
Ca ²⁺	0,1 – 5	0,2	0,8	y = 10 399x + 96,40	0,9992	4,8
Mg ²⁺	1 – 10	0,4	1,3	y = 19 960x - 327,2	0,9994	2,1

Es ist zu erkennen, dass für die NWG niedrigere Werte entstehen, je geringer die Analytenkonzentration für die Kalibrierung ist. Folglich verhält es sich mit der BG genauso. In den niedrigen Konzentrationsbereichen werden realitätsnahe Werte für den y-Achsenabschnitt erreicht. Für K⁺ und NH₄⁺ entsprechen diese Werte nicht unbedingt der Realität, wodurch höhere NWG als bei den anderen Analyten entstehen. Auch in einem Chromatogramm mit 0,2 mg/L des Mischstandards konnten die Analyten K⁺, Na⁺ und NH₄⁺ deutlich vom Rauschen getrennt werden und qualitativ bestimmt werden. V_K sinkt, also verbessert sich mit steigender Konzentration der Analyten (vergleiche Tab. 4-7) Die Werte geben Auskunft über die Qualität der Kalibrierung. Die Methode ist mit einer Steigung von 19 960 für Mg²⁺ am empfindlichsten. Für die Analyten NH₄⁺, Na⁺ und Ca²⁺ kann mit Steigungen zwischen 10 399 und 11 965 eine vergleichbare Sensitivität festgestellt werden. Für K⁺ wird die geringste Empfindlichkeit detektiert, was sich bereits anhand des Chromatogramms des Mischstandards (Abb. 4-10) vermuten lässt, in dem der K⁺-Peak bei gleicher Konzentration wie die der anderen Analyten, die kleinste Fläche aufweist. Für die Messungen wurden die Standards teilweise in kleinen Messkolben angesetzt (V = 1 bis 5 mL) und für die geringen Konzentrationen (für Ca²⁺ und Na²⁺) wurden kleine Volumina (zum Beispiel 10 µL) pipettiert. Das beeinflusst die Präzision der Messungen und folglich

die Qualität der Kalibrierung sowie die ermittelten NWG und BG. Durch größere Volumina der pipettieren Lösungen sowie der verwendeten Messkolben könnte die Streuung verringert und die Qualität verbessert werden.

Tabelle 4-7 zeigt die ermittelten Konzentrationen der Analyten im unbehandelten Hefeextrakt. Die Konzentrationen wurden in dreifacher Bestimmung anhand der Peakflächen mit den in Tabelle 4-6 angegebenen Kalibriergeraden ermittelt. In der Tabelle sind außerdem die Konzentrationen des Unternehmens Leiber dargestellt (Anhang 1) (Leiber GmbH, 2018) und die von Klotz ermittelten quantitativen Mengen (Klotz, 2017). Zusätzlich sind die prozentualen Abweichungen der Werte dieser Arbeit von den besagten Literaturwerten angegeben. Der Vergleich mit den Literaturwerten von Leiber und Klotz zeigt Abweichungen von ca. $\pm 20\%$ für die Analyten K^+ , Ca^{2+} und Mg^{2+} . Größere Abweichungen wurden für Na^+ (-81 bis -91 %) und NH_4^+ (64 %) festgestellt.

Tab. 4-7. Ermittelte Konzentrationen der Analyten mit der jeweiligen Abweichung von Literaturwerten (Leiber GmbH, 2018) (Klotz, 2017)

Analyt	Konzentration im Hefeextrakt mg/L	Konzentration (Leiber) mg/L	Abweichung von Leiber	Konzentration (Klotz) mg/L	Abweichung von Klotz
Na^+	0,60	6,50	-90 %	3,08	-80 %
NH_4^+	3,63	k.A.	k.A.	2,21	64 %
K^+	25,43	31,00	-17 %	27,70	- 8 %
Ca^{2+}	0,67	0,54	23 %	k.A.	k.A.
Mg^{2+}	2,38	2,10	13 %	2,89	-17 %

Die vergleichsweise geringen Abweichungen für K^+ , Ca^{2+} und Mg^{2+} sind durch Verwendung unterschiedlicher Chargen des Hefeextraktes und die Präzision des Systems und der Methode zu erklären. Bei den Literaturwerten von Na^+ und NH_4^+ könnte es sich um veraltete Werte oder um einen anderen älteren Hefeextrakt handeln. Die Konzentrationen der Analyten Ca^{2+} und Mg^{2+} liegen unter ihrer BG (vergleiche Tab. 4-6). Die Ergebnisse werden für die weitere Auswertung genutzt, können deshalb aber unpräzise sein. Es gilt es noch zu beachten, dass die Konzentrationen der Analyten von dem Unternehmen Leiber über verschiedene spektrometrische Verfahren bestimmt wurden, wodurch der Gesamtgehalt der Kationen ermittelt werden kann. Klotz nutze die IAC zur Analyse von gelöst vorliegenden Kationen. Allerdings lässt sich zur vorliegenden Form der Kationen hier keine verlässliche Aussage treffen. Die Konzentrationen dienen als Bezugswert für die autoklavierte Probe des Hefeextraktes.

Abbildung 4-14 zeigt den Vergleich der Analytenkonzentrationen des unbehandelten und des autoklavierten Hefeextraktes in einem Diagramm. Es ist zu erkennen, dass alle Analyten in höherer Konzentration in der autoklavierten Probe wiederzufinden sind.

Die höheren Werte sind dadurch zu erklären, dass die Probe für den Autoklaven mit vollentsalztem Wasser (VE-Wasser) in einem anderen Labor angesetzt wurde. Für die Proben des unbehandelten Hefeextraktes wurde Reinstwasser verwendet. Um die Abweichungen durch das VE-Wasser genauer bestimmen zu können, wurde es als Probe ebenfalls mit der IAC analysiert. Die Konzentrationen der nachweisbaren Kationen Na^+ , NH_4^+ , K^+ und Ca^{2+} lagen im Bereich der NWG und waren somit geringer als die ermittelten Abweichungen. Dies kann durch

mehrfachen Kartuschen-Wechsel für das VE-Wasser im anderen Labor und durch die allgemeine Präzision des Systems und der Methode erklärt werden. Die Hitze und Dauer des Autoklavivorganges zur Vorbereitung des Mediums für die Fermentation scheint hier keinen signifikanten Einfluss auf den Gehalt der Analyten zu haben.

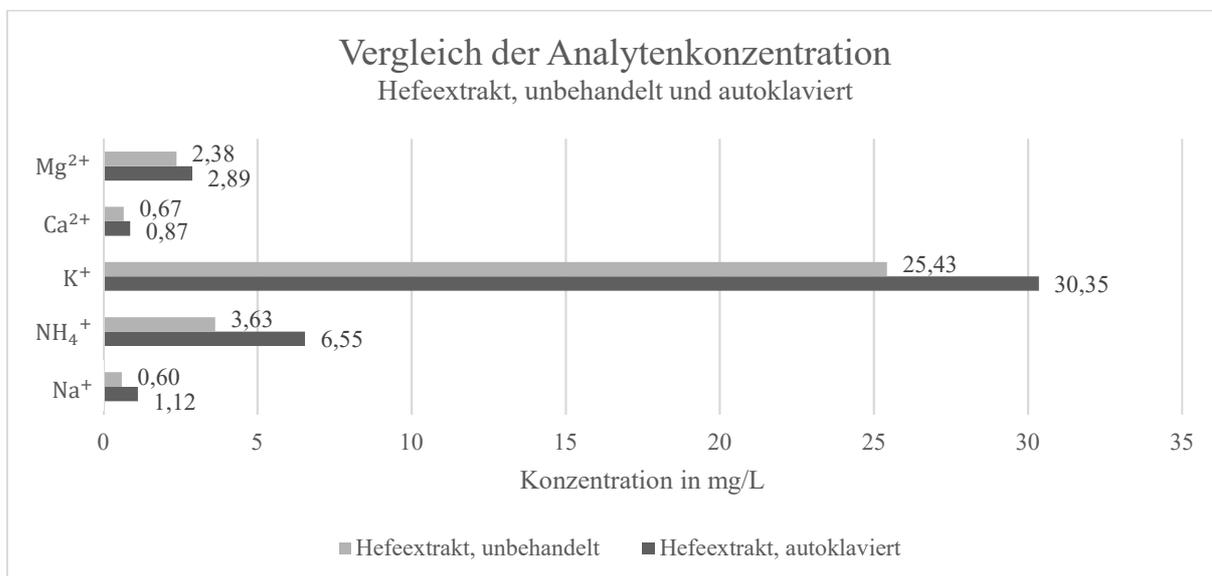


Abb. 4-14. Vergleich der Analyten-konzentrationen in der unbehandelten und in der autoklavierten Probe des Hefeextrakts

Im Vergleich der Werte des autoklavierten Hefeextraktes (vergleiche Abb. 4-14) mit denen der Fermentationsprobe 1 (vergleiche Abb. 4-15), die direkt nach dem Animpfen mit der Vorkultur genommen wurde, ist ein Anstieg von 217 % für NH₄⁺ und 39 % für K⁺ erkennbar. Der erhöhte Wert von NH₄⁺ kommt durch die Einstellung des pH-Wertes des Fermenterinhalt mit Ammoniak zustande. Der angestiegene K⁺-Wert wird durch die Zugabe der Vorkultur verursacht. Diese wurde in einem Kalium-Phosphat-Puffer kultiviert. Eine besonders hohe Abweichung wird für Na⁺ beobachtet. Die Natriumkonzentration in der Fermentationsprobe 1 ist um mehr als ein Zehnfaches größer als im autoklavierten Hefeextrakt. Diese Abweichung konnte bis zum jetzigen Zeitpunkt nicht gänzlich erklärt werden. Die vergleichsweise geringe Abweichung für Ca²⁺ von 70 % kann durch Schwankungen des Mineralstoffgehaltes des VE-Wassers erklärt werden. Die Konzentration von Mg²⁺ weicht um 22 % ab. Dieser Wert ist im Vergleich zu den anderen nicht signifikant.

Direkt nach dem Animpfen kann davon ausgegangen werden, dass *B. licheniformis* noch keine Mineralstoffe umgesetzt hat. Die Ergebnisse der Fermentationsprobe 1 dienen damit als Vergleichswerte für die Fermentationsprobe 2, die nach dem Abschluss der Wachstumsphase von *B. licheniformis* gezogen wurde. In Abbildung 4-15 werden die ermittelten Konzentrationen der Analyten aus den beiden Proben miteinander verglichen, um eine Aussage über den Verbrauch der Makroelemente treffen zu können. Es ist eine Abnahme, mit Ausnahme von NH₄⁺, für alle Analyten nachgewiesen. Für Mg²⁺ wird eine 100 %ige Abnahme beobachtet und für Na⁺ eine 93 %ige. Der Verbrauch von 0,78 mg/L von Ca²⁺ entspricht 52 % und der Rückgang

von 28,46 mg/L von K^+ entspricht 44%. In der Fermentationsprobe 2 wird 65,55 mg/L NH_4^+ nachgewiesen, wobei in Abbildung 4-14 nur Werte bis 45 mg/L angezeigt werden.

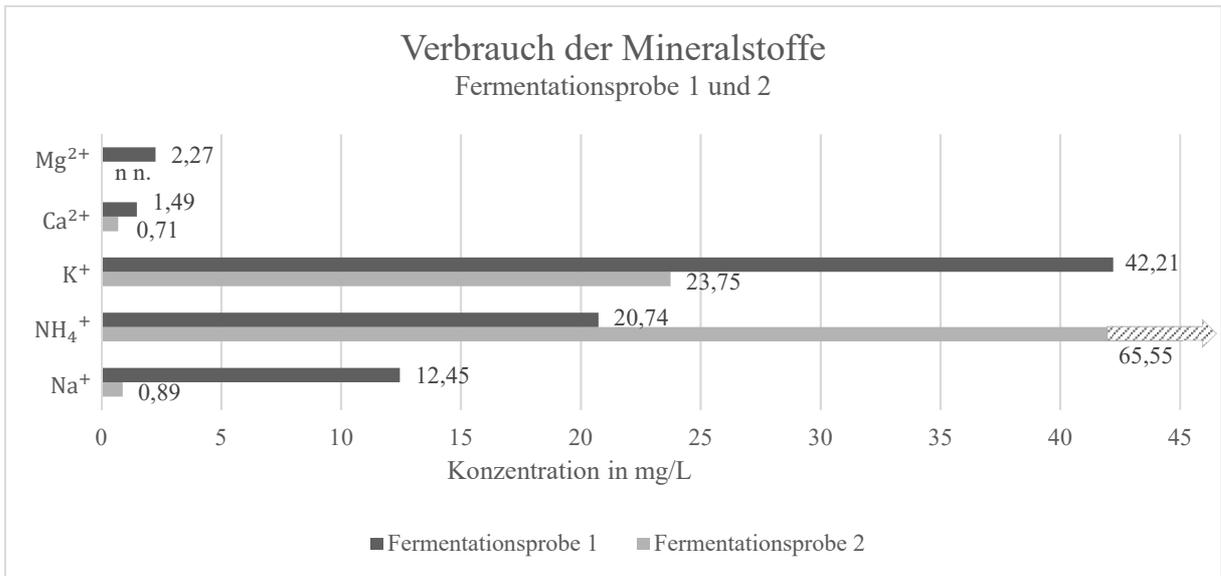


Abb. 4-15. Verbrauch der Mineralstoffe. Vergleich der Analyten-konzentrationen von Fermentationsprobe 1 und 2

Abbildung 4-16 zeigt ein Chromatogramm der Fermentationsprobe 2. Verglichen mit dem Chromatogramm des unbehandelten Hefeextraktes (Abb. 4-11) ist zu erkennen, dass alle nicht zuordnungsbaaren Peaks nicht mehr detektiert werden. Im Chromatogramm lassen sich die Peaks von Na^+ , NH_4^+ , K^+ und Ca^{2+} wiederfinden. Eine erste Vermutung, dass es sich bei dem Peak mit einer Retentionszeit von 21,13 min um Mg^{2+} handelt, wurde durch eine Aufstockung der Probe mit dem Mischstandard widerlegt. Folglich konnte Mg^{2+} nicht nachgewiesen werden und es handelt sich bei dem Peak um eine zuvor nicht vorhandene Komponente.

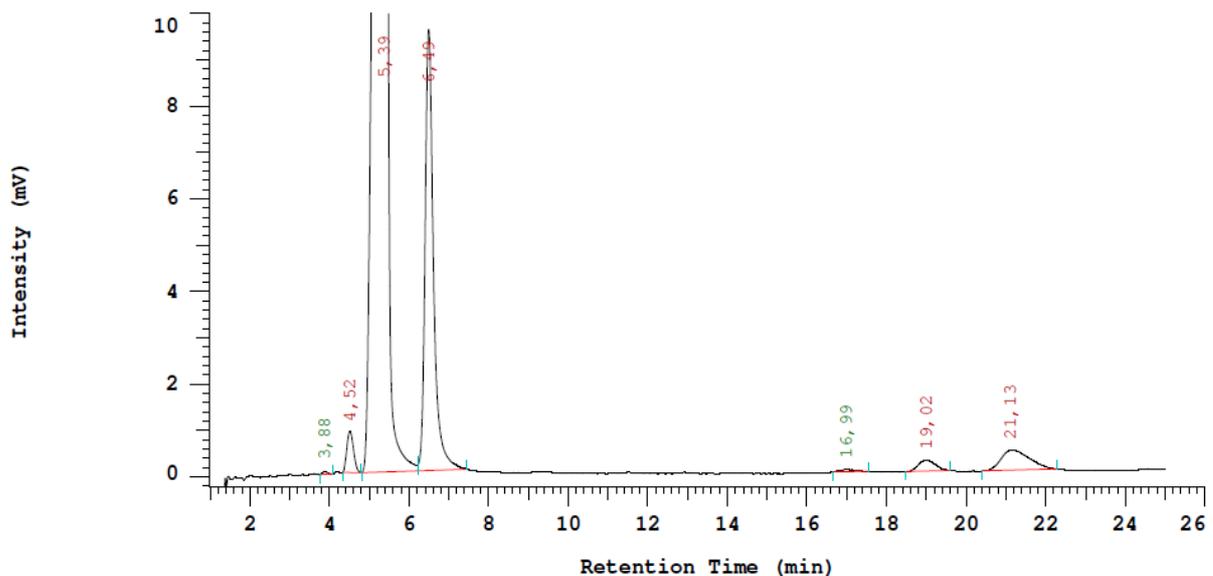


Abb. 4-16. Chromatogramm der Fermentationsprobe 2, $\beta = 1$ g/L - Na^+ 4,52 min; NH_4^+ 5,39 min; K^+ 6,49 min; Ca^{2+} 19,02 min; unbekannter Peak nach 21,13 min

Generell wird vermutet, dass *B. licheniformis* die Makroelemente während der Wachstumsphase verwertet, da sie für die biologischen Prozesse benötigt werden. Es kann aber ebenfalls der Fall sein, dass die Stoffe in anderer Weise während der Fermentation umgewandelt werden. Aus den Ergebnissen, die in Abbildung 4-15 und 4-16 aufgezeigt werden, lässt sich demnach schließen, dass Mg^{2+} vollständig aufgenommen wurde. Na^+ wurde fast vollständig von den Bakterien umgesetzt. Über den Bedarf an NH_4^+ kann keine Aussage getroffen werden. Zum Ende der Wachstumsphase konnte eine Konzentration von 65,55 mg/L gemessen werden, die aus dem Titrieren von Ammoniak während der Fermentation resultiert. Es wird davon ausgegangen, dass *B. licheniformis* alle anderen Bestandteile, die neben den Makronährstoffen im Hefeextrakt vorhanden sind und mit dieser Methode detektiert werden können, während der Fermentation verwertet. Da die Säule neben Kationen und Übergangsmetallen auch Alkylamine und Aminoalkohole trennen kann, könnte es sich bei den nicht identifizierten Peaks um diese handeln. Es wurde vermutet, dass diese Bestandteile in der Fermentationsprobe 2 auf Grund des zu vorherigen Proben abweichenden pH-Wertes möglicherweise nicht detektiert werden können. Hier soll darauf hingewiesen werden, dass die Fermentationsprobe 1 auf den gleichen pH-Wert eingestellt wurde und zum gleichen Teil mit dem Eluenten verdünnt wurde. In dieser Probe konnten die Bestandteile ebenfalls detektiert werden, womit die Annahme widerlegt werden kann und somit von einer Umsetzung durch die Mikroorganismen ausgegangen werden kann. Bei dem nach 21,13 min detektierten Peak handelt es sich wahrscheinlich um ein Abbauprodukt des *B. licheniformis*.

5 Fazit und Ausblick

Mit dem verwendeten Eluenten (vergleiche Tab. 4-2) und unter den gegebenen chromatographischen Bedingungen können die Makronährstoffe Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} und NH_4^+ qualitativ und quantitativ bestimmt werden. Die Präzision der Methode genügt allerdings für alle Analyten nicht den GLP-Vorschriften, nach denen $V_K < 1\%$ sein sollte. Die Präzision wird schlechter je kleiner die detektierten Peakflächen und damit die Konzentrationen der Analyten sind und je später diese eluieren. In diesen Fällen hat das Rauschen der Basislinie einen größeren Einfluss auf die Auswertung, als bei großen Flächen und schmalen Peaks, die früh eluieren. Es wäre zu überlegen, eine größere Probenkonzentration des Hefeextraktes zu injizieren (zum Beispiel 2 bis 3 g/L), um die Präzision für die Analyten, die in Konzentrationen $< 1\text{ mg/L}$ vorkommen, zu verbessern. Dabei könnten sich die Peaks allerdings gegenseitig beeinflussen. Eine präzisere Detektion kann durch die Verwendung eines Suppressors erreicht werden. Durch die Unterdrückung der Grundleitfähigkeit würden größere Peakflächen erreicht, die Methode dadurch empfindlicher werden und die Streuung der Werte durch die manuelle Integration verringert werden.

Die gegebenen Bedingungen erlauben keine Detektion der Spurenmetalle im Hefeextrakt. Sie sind in Relation zu den anderen Analyten in zu geringen Konzentrationen enthalten. Um die ermittelte NWG bei den gegebenen Konzentrationen für Fe^{2+} und Mn^{2+} zu erreichen, müssten für Fe^{2+} 6 g/L Probe angesetzt werden und für Mn^{2+} 60 g/L. Würden so hohe Probenkonzentrationen injiziert werden, wäre die Säule überladen und die Peaks der anderen Bestandteile wären so breit, dass die Peaks der Spurenelemente überlagert werden würden. Ein weiteres Problem zeichnet sich darin ab, dass die Methode nicht selektiv für die beiden Spurenmetalle ist. Die Auflösung kann allerdings durch die Anpassung des Eluenten verbessert werden, wodurch es möglich sein sollte, höhere Konzentrationen der Hefeextraktprobe aufzutragen, ohne die Peakflächen stark zu beeinflussen. In diesem Fall müsste die Linearität der Methode in dem entsprechenden Bereich bestätigt werden. Eine weitere Idee zur Verbesserung wäre einen Leitfähigkeitsdetektor mit kleinerer Öffnung zu verwenden (Projekttreffen, 2019). Die Ergebnisse sollten dadurch genauer werden und es könnte möglich sein, kleinere NWG zu ermitteln. Wenn Spurenelemente analysiert werden sollen, kann keine Suppressor-Technik angewendet werden, da die Metallionen in dem System Hydroxide bilden und ausfallen könnten (Weiss, 2004).

Um die Validierung der Methode abzuschließen, sollte ihre Robustheit gegenüber Schwankungen der Temperatur und des pH-Wertes überprüft werden. Eine Änderung des pH-Wertes kann besonders bei ionischen Verbindungen einen starken Einfluss haben. Ein höherer pH-Wert dissoziiert den schwachen Kationenaustauscher höher. Dieser hätte damit eine höhere Kapazität, was zu stärkeren Wechselwirkungen führen würde und damit zu erhöhten Retentionszeiten (Meyer, 2009). Der Einfluss der Temperatur sollte ebenfalls genauer untersucht werden. Trotz des Säulenofens konnten bei Zufuhr von Frischluft durch das Öffnen der nahegelegenen Labortür Schwankungen der Basislinie erkannt werden. Wenn die Anlage über Nacht lief und die Messdaten aufgenommen wurden, konnte man ein Absinken der Basislinie über Nacht erkennen und einen Anstieg morgens nach dem Sonnenaufgang. Es wäre wichtig die Störanfälligkeit der Methode zu ermitteln, um den Einfluss auf die Messungen zu bestimmen.

B. licheniformis scheint einen hohen Bedarf an Mg^{2+} und Na^+ zu haben, wobei es Mg^{2+} zu 100 % umsetzt und Na^+ zu 93 %. Durch die Verwendung von VE-Wasser zum Ansetzen des Mediums für die Fermentation gelang vermutlich eine große Menge an Na^+ in die Proben. Da die Bakterien den Mineralstoff fast vollständig verbrauchen, scheint es nicht notwendig ein entsalztes Hefeextrakt zu verwenden. Da Mg^{2+} vollständig aufgenommen wurde und auch in weiteren Arbeiten ein Einfluss durch Mg^{2+} im Medium festgestellt wurde (Projekttreffen, 2019), sollte dieser noch genauer untersucht werden. Um den maximal möglichen Verbrauch an Mg^{2+} durch *B. licheniformis* bestimmen zu können, könnte das Medium mit diesem Makronährstoff angereichert werden und der Bedarf festgestellt werden. Das gleiche Verfahren könnte auf die Spurenmetalle angewendet werden. Durch die Anreicherung des Mediums kann ein positiver oder auch negativer Einfluss auf das Wachstum und der Bedarf der Mikronährstoffe ermittelt werden. K^+ und Ca^{2+} werden von den Bakterien verwertet, sind aber in ausreichender Menge im Hefeextrakt vorhanden.

B. licheniformis scheint alle anderen Bestandteile des Hefeextraktes, die mit dieser Methode detektiert werden können, vollständig aufzunehmen. Für weitere Versuche wäre eine qualitative Analyse dieser Peaks sinnvoll.

Abschließend soll darauf hingewiesen werden, dass zurzeit noch nicht nachgewiesen werden konnte, ob die Bakterien nur gelöst vorliegende Ionen aufnehmen. In diesem Fall könnten zuvor komplexierte Ionen auf Grund der Gleichgewichtseinstellung freigesetzt werden. Um diese Frage zu klären, könnte es sinnvoll sein, bei weiteren Untersuchungen den Gesamtgehalt der Kationen zu bestimmen. Wenn der Gesamtgehalt bestimmt werden soll, muss die organische Matrix vor einer Analyse zerstört werden, dafür werden häufig Mikrowellenaufschlüsse durchgeführt. Bei diesen wirken Temperatur, Druck und das Aufschlussreagenz. Als Reagenzien werden hauptsächlich starke Säuren verwendet, die aber in der folgenden Analyse durch die IAC störend wirken können. Aus diesem Grund sollte für den Aufschluss hauptsächlich die Wirkung von Temperatur und Druck genutzt werden. Dafür sind entsprechende Gerätschaften wie druckfeste Teflon-Gefäße und eine Labor-Mikrowelle notwendig. Wird der Gesamtgehalt über spektrometrische Verfahren bestimmt, sollten die starken Säuren keine Störungen hervorrufen.

Literaturverzeichnis

Arnold E., 2017. *Lösungsfabrik*. [Online]

Verfügbar unter: <http://www.mpl.loesungsfabrik.de/blog/hplc/peak-symmetrie,-asymmetrie-und-ihre-ursachen-bei-der-hplc>, [Zugriff am 26 Jun 2019].

Cammann K., 2001. *Instrumentelle Analytik*. Heidelberg, Berlin: Spektrum Akademischer Verlag.

Cataldi TRI., Angelotti M., D'Erchia L., Altieri G., Di Renzo GC., 2003. Ion-exchange chromatographic analysis of soluble cations, anions and sugar in milk whey. *Eur Food Res Technol*, Issue 216, pp. 75-82.

Großbongardt K., 2018. *Entwicklung und Validierung zweier ionenchromatographischer Methoden zur Spurenelementbestimmung in Hefeextrakt*, Hamburg

Hahn-Hägerdal B., Karhumaa K., Larsson CU., Gorwa-Grauslund M., Görgens J., van Zyl WH., 2005. Role of cultivation media in the development of yeast strains for large scale industrial use. *Microbial Cell Factories*, 10 Nov, 4(31).

HAW, 2019. *Laborversuche Ökotröphologie*.

Jackson PE., 2000. Ion Chromatography in Environmental Analysis. *Encyclopedia of Analytical Chemistry*.

Kaspro RP., Lange AJ., Kirwan DJ., 2008. Correlation of Fermentation Yield with Yeast Extract Composition as Characterized by Near-Infrared Spectroscopy. *Biotechnology Progress*, 5 Sept, 14(2).

Klotz S., 2017. *Biotechnisch erzeugte D-Milchsäure: Substitution von Hefeextrakt durch agrarische Rohstoffhydrolysate*, Braunschweig

Kromidas S., 2017. *Wie „richtig“ integriert meine Software?*

Kromidas S., 2011. *Validierung in der Analytik*. 2. überarbeitete Auflage Hrsg. in Weinheim: Wiley-VCH Verlag & Co. KGaA.

Leiber GmbH, 2018. *Product Data Sheet - Fermentation H*.

Leiber GmbH, 2019. *Telefonat, firmenvertraulich*

Madigan MT., Martinko JM., 2009. *Brock Mikrobiologie*. 11., aktualisierte Auflage Hrsg. München: Pearson.

Metrohm, 2018. *IC Application Note No. C-122: Cations including total iron content in antifreeze (monoethyleneglycol)*

Meyer VR., 2009. *Praxis der Hochleistungs-Flüssigchromatographie*. 10. Auflage Hrsg. Weinheim: Wiley-Vch.

Projekttreffen mit der Leiber GmbH., 2019. HAW Hamburg (am 03 Sept 2019)

Schlegel HG., 2017. *Allgemeine Mikrobiologie*. 10. Auflage Hrsg. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.

Shodex, 2018. *Certificate of Analysis*

Slonczewski JL., Foster JW., 2012. *Mikrobiologie*. 2. Auflage Hrsg. Heidelberg: Springer-Verlag.

Sommer R., 1996. Yeast Extracts: production, Properties and Components. *9th International Symposium on Yeasts*, pp. 181-183.

Timm D., 2018. *E-Mail Verkehr mit Frau Timm von Metrohm* (am 13 Sept 2018).

Weiss J., 2004. *Handbook of Ion Chromatography*. 3. überarbeitete Auflage Hrsg. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.

Zhang J., Reddy J., Buckland B., Greasham R., 2003. Toward Consistent and Productive Complex Media for Industrial Fermentations: Studies on Yeas Extract for a Recombinant Yeast Fermentation process. *Biotechnology and Bioengineering*, 20 Jun, Vol. 8(No. 6).

Anhang

Anhang 1: Datenblatt Fermentation H, Leiber GmbH

Leiber-Fermentation H 100434



PRODUCT DATA SHEET

Product Description

Yeast peptone (synonym: yeast extract), derived from enzymatically hydrolysed brewers' yeast; to be used as a nutrient for biochemical fermentation processes

Appearance

Light brown powder

Application

Propagation of yeasts, lactobacilli, bifidus bacteria and other microorganisms

Recommended Dosage

1 - 10 g/l

Ingredients

Saccharomyces cerevisiae, ext.

Chemical Data

Dry matter	≥ 94	%
pH (5% solution)	5.0 - 6.0	
Protein	70 - 80	% on d.m.
NaCl	≤ 1	% on d.m.
Bitterness	≤ 5	BU/100g
Solubility 1g/250 ml hot water	clear	
Structure / Consistency	agglomerated powder	
Odour	typical	
Taste	typical	

Microbiological Data

Total plate count	≤ 10 000	CFU/g
Yeasts	≤ 100	CFU/g
Moulds	≤ 100	CFU/g
Enterobacteriaceae	≤ 10	CFU/g
Bacillus cereus	≤ 500	CFU/g
E. coli	≤ 3	CFU/g
Clostridium parfringens	≤ 10	CFU/g
Salmonellae	negative	in 25g

Minerals*

Calcium	540	mg/kg
Magnesium	2.1	g/kg
Phosphor	16	g/kg
Potassium	31	g/kg
Iron	34	mg/kg
Sodium	6.5	g/kg
Zinc	16	mg/kg
Copper	5.8	mg/kg
Chromium	0.4	mg/kg
Cadmium	0.04	mg/kg
Lead	0.28	mg/kg
Iodine	≤ 10	mg/kg
Arsenic	0.1	mg/kg
Manganese	3.2	mg/kg
Silicium	310	mg/kg
Cobalt	≤ 0.1	mg/kg

Vitamins*

B 1	10.7	mg/100g
B 2	0.7	mg/100g
B 3	52	mg/100g
B 6	3.8	mg/100g
Pantothenic acid	< 0.08	mg/100g
Folic acid	1092	µg/100g
Biotin	72	µg/100g

Amino Acids*

	Total AA	Free AA	
Aspartic acid	7.6	2.9	g/100 g
Glutamic acid	7.4	3.3	g/100 g
Serine	2.9	2.6	g/100 g
Histidine	1.5	1.4	g/100 g
Glycine	3.1	1.8	g/100 g
Threonine	3.0	2.1	g/100 g
Arginine	1.1	0.4	g/100 g
Alanine	4.6	4.0	g/100 g
Tyrosine	1.8	0.7	g/100 g
Valine	4.0	3.0	g/100 g
Phenylalanine	2.8	2.3	g/100 g
Isoleucine	3.3	2.6	g/100 g
Leucine	4.6	4.0	g/100 g
Lysine	6.3	4.1	g/100 g
Proline	1.9		g/100 g
Methionine	1.1	1.0	g/100 g
Cysteine	0.6		g/100 g
Tryptophane	0.7	0.7	g/100 g
TOTAL	58.2	43.2	g/100 g

Composition

Protein (N x 6.25)	71.6	g/100g
Salt	1.65	g/100g
Total carbohydrates	13.1	g/100g
Sugars	0.1	g/100g
Total fats	0.5	g/100g
Saturated fats	0.1	g/100g
Dietary fibres	1.2	g/100g

Packaging Standards

Paper bag with PE inner bag, net weight 20kg

Storage

Closed, dry, cool, light protected

Shelf Life

24 months

Certifications

This product is Kosher and Halal certified.

This product is gluten-free (≤20 ppm) according to EU-regulation 828/2014. Results are based on FDA approved ELISA-test of R-Biopharm (RIDASCREEN Gliadin "Sandwich" Art.Nr.: R7001).

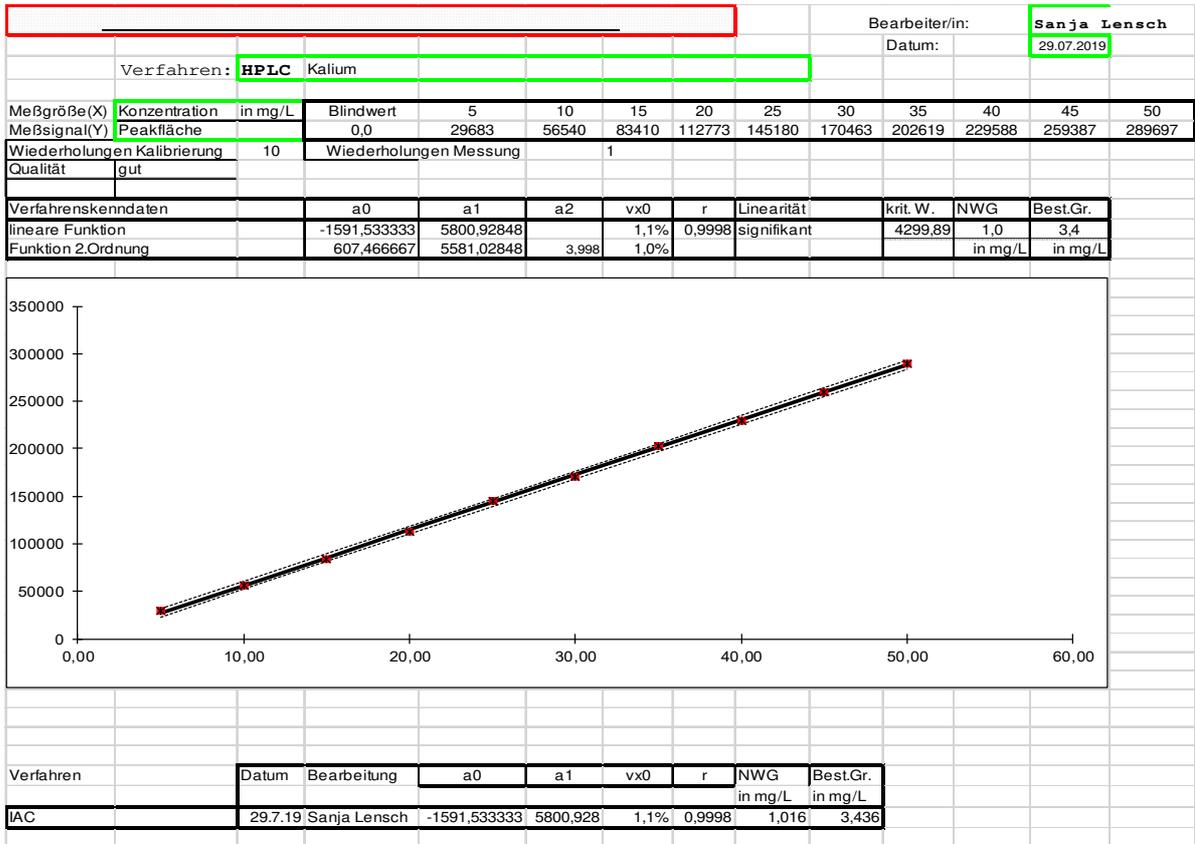
Additional Information

REACH-Registration-No.: 01-2119539417-34-0003

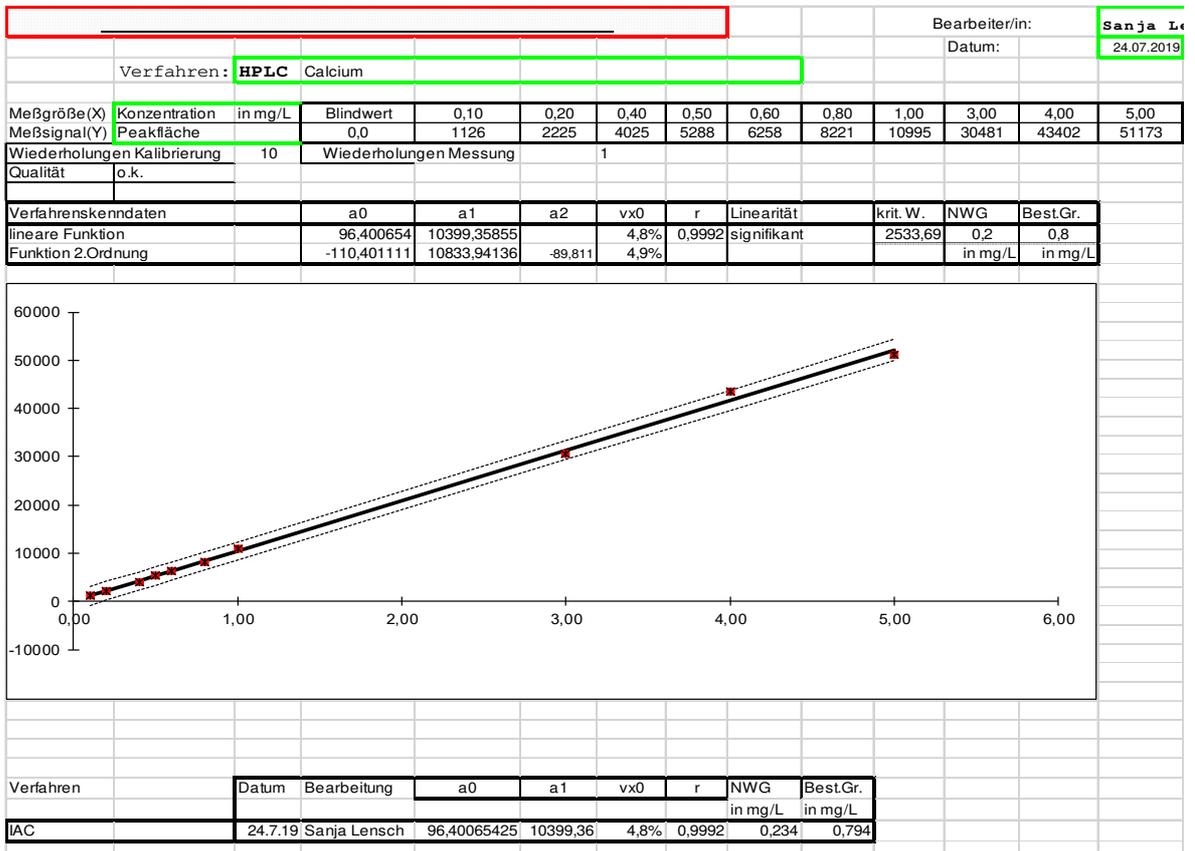
* These values are indicative and for informational purpose only
Version 20170102

Anhang 2: Zehnpunktkalibrierung der Analyten

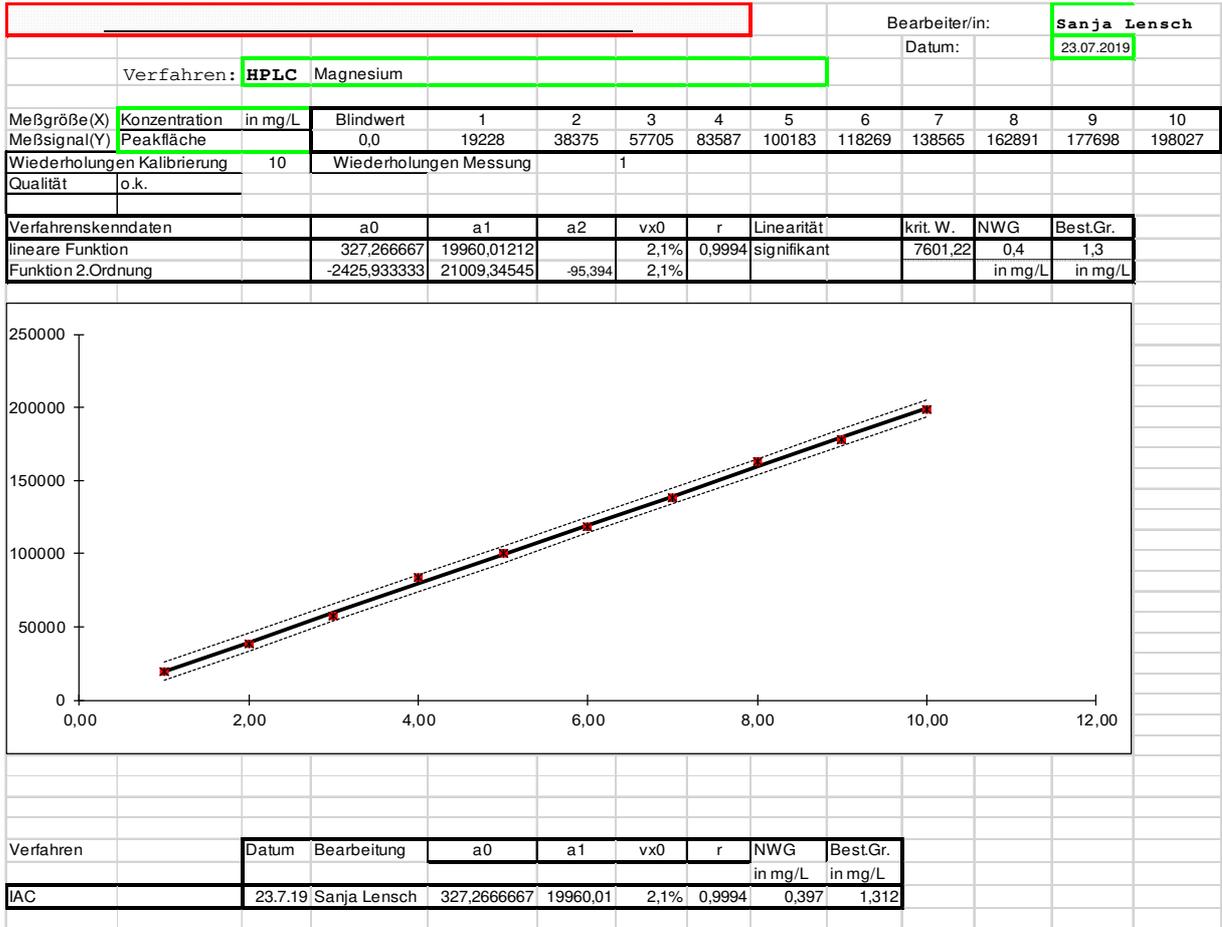
Zehnpunktkalibrierung von K⁺:



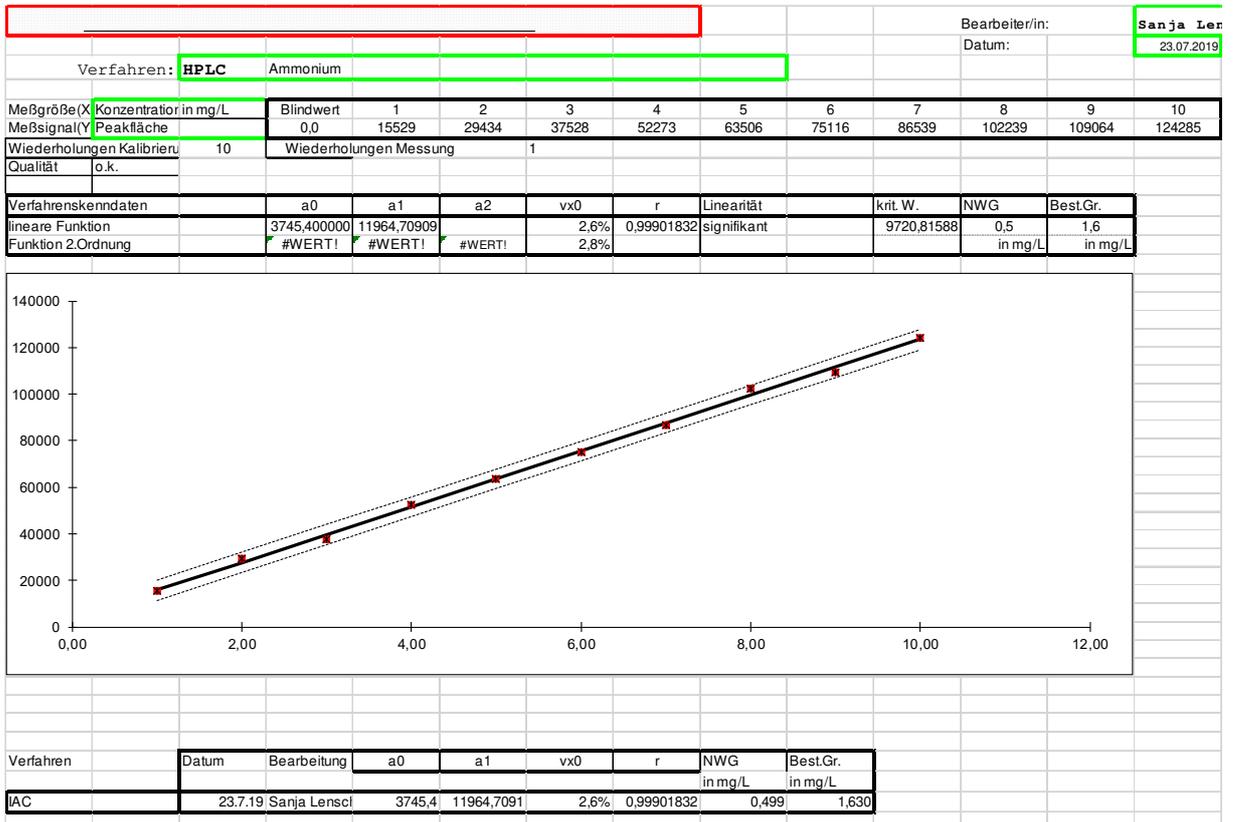
Zehnpunktkalibrierung von Ca²⁺:



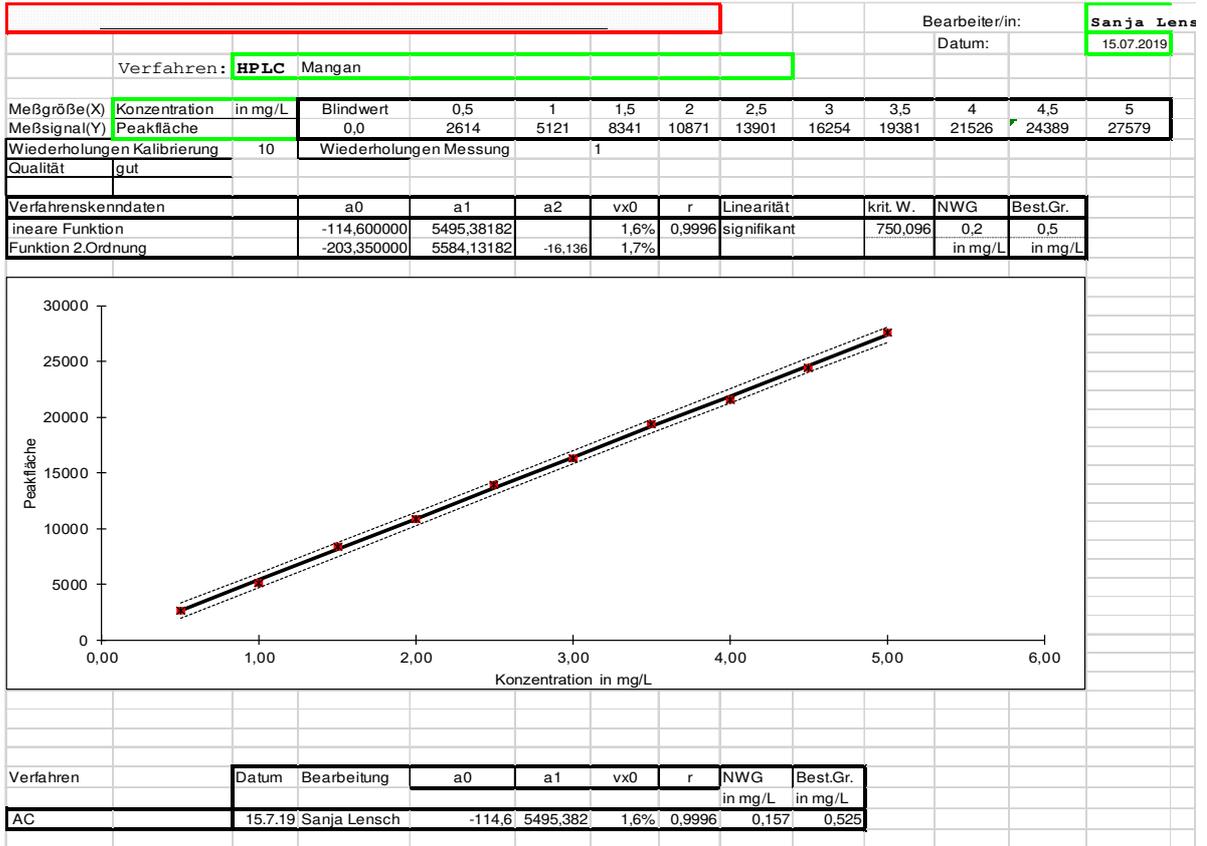
Zehnpunktkalibrierung von Mg²⁺:



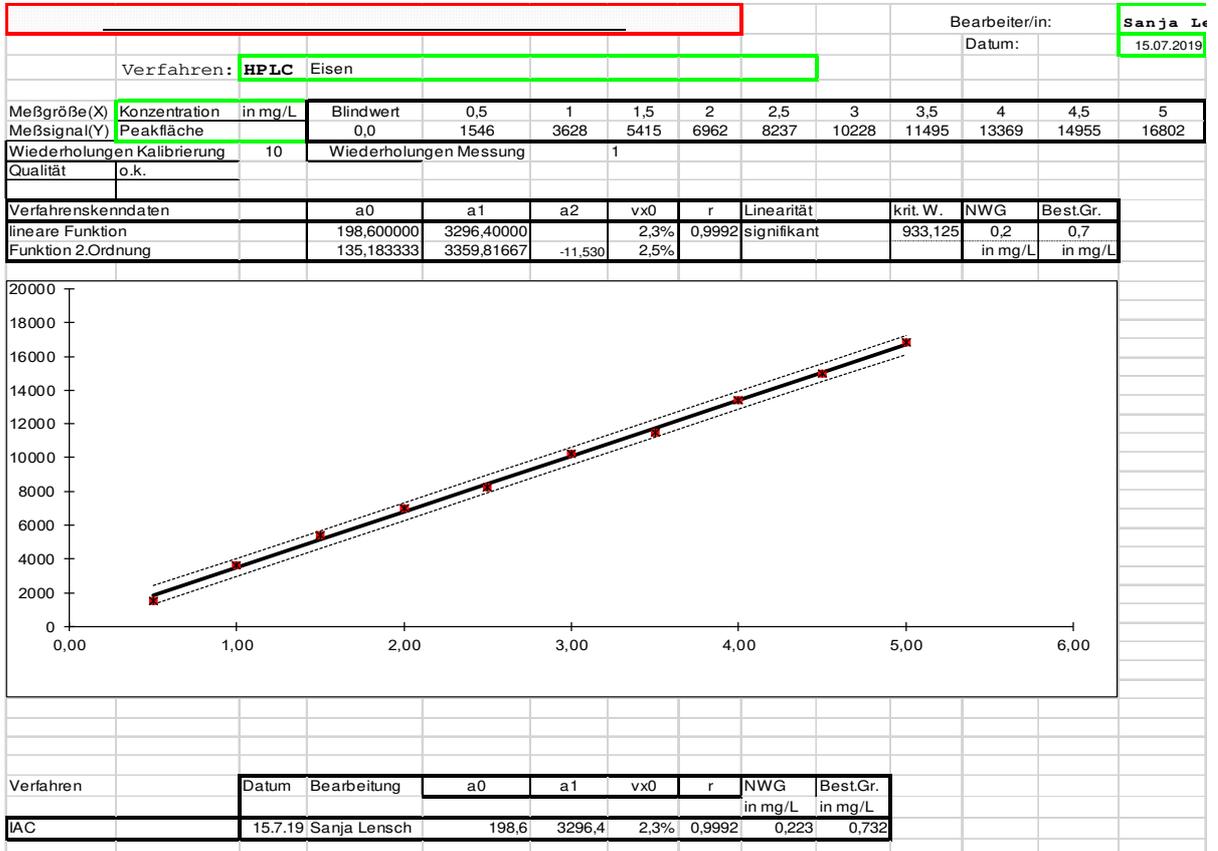
Zehnpunktkalibrierung von NH₄⁺:



Zehnpunktkalibrierung von Mn²⁺:



Zehnpunktkalibrierung von Fe²⁺:



Anhang 3: Übersicht der verwendeten Eluenten

Tab. A1. Übersicht der verwendeten Eluenten. Angabe von pH-Werten, Leitfähigkeit, Vorteilen, Nachteilen und welche Schritte zum nächsten Eluenten verändert wurden. Die hervorgehobenen Reagenzien zeigen wichtige Änderungen.

Eluent Nr.	Zusammensetzung mmol/L Chemikalie	pH-Wert	Leitfähigkeit mS/cm	Vorteile	Nachteile	Veränderungen zum nächsten Eluenten
1-5	0,1 Dipicolinsäure 2,34 Salpetersäure 3 Ascorbinsäure	2,6 – 2,7	0,917 – 0,934	keine	Mg ²⁺ -Peak und Mn ²⁺ -Peak sind nicht basislimiengetremt	Dipicolinsäure erhöhen, damit Mn ²⁺ früher eluiert
6, 7	0,5 Dipicolinsäure 2,34 Salpetersäure 3 Ascorbinsäure	2,6	1,001	Mn ²⁺ und Mg ²⁺ eluieren getrennt voneinander	Peaks des Mischstandards nicht getrennt voneinander	mehr Ascorbinsäure, um die Auswirkung zu beobachten
8	0,5 Dipicolinsäure 2,34 Salpetersäure			keine	keine	mehr Salpetersäure, um die Auswirkung zu beobachten
9	0,5 Dipicolinsäure 10 Salpetersäure 3 Ascorbinsäure	2,6*	1,910	keine	positive und negative Peaks, Peaks der Standards sehr klein	Salpetersäure wieder weniger, Dipicolinsäure weniger, damit Fe ²⁺ später eluiert
10	0,2 Dipicolinsäure 2,5 Salpetersäure 3 Ascorbinsäure	2,6	0,973	bessere Trennung als mit 0,5 mM Dipicolinsäure	Doppelpeak im Mischstandard (Ca ²⁺ und Mg ²⁺)	Eluent mit Weinsäure ausprobieren
11	1 Dipicolinsäure 4 Weinsäure 3 Ascorbinsäure	2,7	0,763	Fe ²⁺ getrennt von anderen Peaks	Peaks haben „Schulter“ im „tailing“ ^{***}	mehr Salpetersäure zur Verbesserung der Peakformen
12	1 Dipicolinsäure 4 Weinsäure 3 Ascorbinsäure			keine	Mg ²⁺ und Ca ²⁺ nicht basislimiengetremt	geringe Konzentration der Salpetersäure ausprobieren
13	2 Salpetersäure 0,2 Dipicolinsäure 0,5 Salpetersäure 3 Ascorbinsäure	3,1	0,330	keine	bis zu Min. 25 erscheint kein Peak, Ionenstärke zu gering	mehr Salpetersäure, um Ionenstärke zu erhöhen
14	0,2 Dipicolinsäure 1 Salpetersäure 3 Ascorbinsäure	2,9	0,502	Peaks kommen wieder früher	0,2 mM Dipicolinsäure lässt Fe ²⁺ zu spät eluieren	mehr Dipicolinsäure, damit Fe ²⁺ früher eluiert
15	0,5 Dipicolinsäure 1 Salpetersäure 3 Ascorbinsäure	2,9	0,561	Peaks im Mischstandard sind basislimiengetremt	Na ⁺ -Peak im Hefextrakt nicht getrennt	

			keine	asymmetrische Peaks	Weinsäure und Ascorbinsäure weglassen
16	0,5 1 3 2	Dipicolinsäure Salpetersäure Ascorbinsäure Weinsäure			
17	0,1 1	Dipicolinsäure Salpetersäure	Na ⁺ -Peak getrennt vom Nachbarpeak	Mg ²⁺ eluiert erst nach 32 min	mehr Dipicolinsäure, um Analyten früher eluieren zu lassen
18	0,4 1	Dipicolinsäure Salpetersäure	Ca ²⁺ -Peak erscheint	Gesamtlaufzeit noch zu lange	Ascorbinsäure hinzufügen, um ihren Einfluss zu definieren
19	0,4 1 3	Dipicolinsäure Salpetersäure Ascorbinsäure	Analyten eluieren früher	Ascorbinsäure erhöht Rauschen der Basislinie	Ascorbinsäure weglassen, Salpetersäure erhöhen
20	0,4 1,2	Dipicolinsäure Salpetersäure	Na ⁺ und Ca ²⁺ nicht basisliniengetreunt	kürzere Laufzeit als mit Eluent 18	Salpetersäure minimal niedriger konzentrieren
21	0,4 1,15	Dipicolinsäure Salpetersäure	Selektivität für fast alle Analyten	keine Trennung für NH ₄ ⁺	

* pH-Wert wurde von 2,1 mit ca. 30 Tropfen Ammoniak auf 2,6 eingestellt

** „Schulter“ entstand wahrscheinlich durch kaputte/verstopfte Vorsäule