

GRENZEN DER CHEMISCHEN ANALYTIK

Josef F.K. Huber

1 EINLEITUNG

Die Analytische Chemie hat die Aufgabe, Methoden zu entwickeln und anzuwenden, welche Information über die qualitative und quantitative Zusammensetzung, sowie die Struktur stofflicher Systeme geben. In der Anwendung hat die Analytische Chemie auch an der problembezogenen Interpretation ihrer Resultate mitzuwirken.

Die Bausteine der Analytischen Chemie sind die Grundoperationen, die bestimmte Teilaufgaben lösen. Sie werden problembezogen zu einem Analysengang kombiniert. Ein Analysengang kann grundsätzlich in 6 Teilschritte zerlegt werden (siehe Abbildung 1). Jeder dieser Teilschritte kann durch eine Reihe verschiedener Grundoperationen realisiert werden.

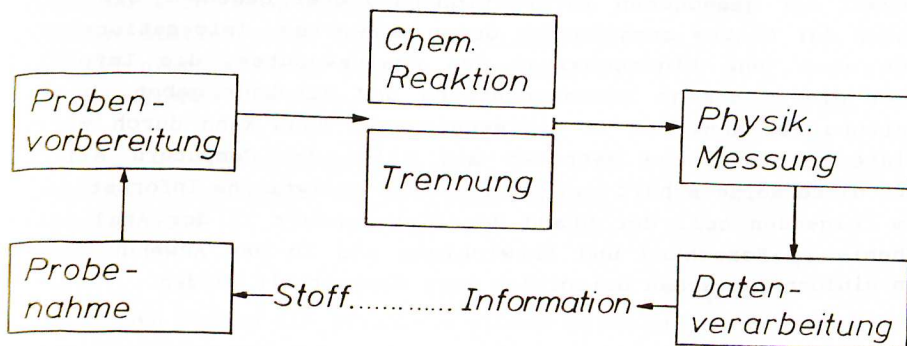


Abbildung 1: Schema eines vollständigen Analysenganges

Die einzelnen Schritte des Analysenganges haben folgende Aufgaben zu erfüllen:

- Bei der Probenahme wird eine repräsentative und für die Analyse geeignete Teilmenge des Analysengutes entnommen.
- Die Probenvorbehandlung hat im allgemeinen eine Homogenisierung der Probe zum Ziel, welche sie in einer für die folgende Verarbeitung geeigneten Form zur Verfügung stellt.
- Trennoperationen und chemische Umwandlungen werden in einer dem Problem angepaßten Anzahl und Reihenfolge eingesetzt, um bei der Messung Signale ohne störende Interferenzen und / oder ein hohes Signal/Rausch-Verhältnis zu erhalten.
- Bei der Messung wird die chemische Information in ein physikalisches Signal umgewandelt und dieses gemessen.
- Mit Hilfe der Signalverarbeitung und Dateninterpretation werden die analytischen Daten gewonnen und in einem Analysenprotokoll dokumentiert.

Heutzutage läuft eine Analyse vielfach mechanisiert und automatisiert ab und wird von einem Computer gesteuert und beaufsichtigt. Die Analytische Chemie ist grundsätzlich multidimensional, d.h. das Analysengut kann mathematisch durch Punkte im n -dimensionalen Raum dargestellt werden. Die Dimensionalität n ist durch die Anzahl der gemessenen Informationsparameter gegeben. Die Koordinaten der Punkte entsprechen deren Meßwerten. Informationsparameter sind jene Eigenschaften des Analysengutes, die Information über die chemische Zusammensetzung und Struktur geben. Die Auswertung der Meßwerte im n -dimensionalen Raum kann durch multivariate mathematische Methoden mit Hilfe des Computers erfolgen. Auf diese Weise erhält man die maximale analytische Information. Im folgenden soll der Stand der Wissenschaft in der Analytischen Chemie in Forschung und Entwicklung und in der Anwendungspraxis in einigen typischen Beispielen kurz dargestellt werden.

Die Analysenergebnisse können aufgrund folgender Qualitätskriterien beurteilt werden:

- Zahl der erfaßbaren Komponenten
- Analysenfehler (statistische, systematische)
- Detektionsgrenze
- Analysengeschwindigkeit
- Zuverlässigkeit des Analysensystems
- Aufwand (Kosten)

Die Grenzen der Leistungsfähigkeit der chemischen Analytik in der Anwendung werden weniger vom Stand der Forschung und Entwicklung bestimmt, sondern vielmehr vom Stand der Praxis.

2 STAND VON FORSCHUNG UND ENTWICKLUNG

In Tabelle 1 ist der heutige Stand der chemischen Analytik mit ihren Grenzen dargestellt.

Tabelle 1: Grenzen der Analytik 1992.

Anzahl der erfaßbaren Komponenten	> 1000
Relativer statistischer Fehler (Präzision)	0,1 %
Relativer systematischer Fehler (Richtigkeit)	0,1 %
Detektionsgrenze als Menge	< 1 Femtogramm (10^{-15} g)
als Konzentration	< 1ppq, 10^{-15} g/g
Analysengeschwindigkeit bei einfachen Proben	< 1 Sekunde
Zuverlässigkeit	> 95 %
Aufwand	10-100 ATS/ Komponente

Im folgenden werden als Beispiele einige Methoden beschrieben, die diesen Stand demonstrieren sollen.

2.1 HÖCHSTE TRENNLEISTUNG

Die Trennleistung eines Trennsystems kann definiert werden durch die maximale Anzahl von Komponenten, die mit einer gegebenen Auflösung in einer bestimmten Zeit getrennt werden können. Sie ist in der Chromatographie durch die folgende Gleichung beschrieben:

$$n_{Rt} = \frac{\log(t_{Rn}/t_{Ro})}{\log(1 + R/\sqrt{N})} \quad (1)$$

- n_{Rt} = Trennleistung,
 \bar{N} = Effizienz des Trennsystems, ausgedrückt durch die mittlere Anzahl theoretischer Trennstufen,
 t_{Rn} = Retentionszeit der zuletzt eluierten Komponente (Trennzeit),
 t_{Ro} = Verweilzeit der mobilen Phase,
 R = geforderte minimale Auflösung.

Die Abhängigkeit der Trennleistung von der geforderten Auflösung, der Effizienz der Säule und der Trennzeit ist für die Chromatographie in Tabelle 2 zahlenmäßig dargestellt.

Tabelle 2: Trennleistung einer chromatographischen Säule in Abhängigkeit von Effizienz und Trennzeit (die Auflösung ist definiert als $R_{ji} = (t_{Rj} - t_{Ri}) / \sigma_{ti}$, die Indices i und j bezeichnen zwei aufeinander folgende Komponenten).

R_{ji}	t_{Rn}/t_{Ro}	\bar{N}	n_{Rt}	
6	10	10^3	13	
		10^4	40	
		10^5	122	
		10^6	385	
		100	10^3	27
			10^4	79
10^5	245			
10^6	770			

In der Praxis kann man aber im allgemeinen nur höchstens 20% der Trennleistung ausnützen (1), da es nicht gelingt, mit Hilfe der Selektivität alle verfügbaren Peakpositionen zu besetzen. Das bedeutet, daß in der Anwendung, insbesondere in der Spurenanalytik, die Trennleistung einer einzigen Säule auch bei hoher Effizienz oft nicht ausreicht.

In der 2-dimensionalen Chromatographie, die u.a. durch Verbindung zweier Trennsäulen mit praktisch unabhängiger Retention mit Hilfe eines Schaltventils realisiert werden kann, ergibt sich eine Multiplikation der Trennleistungen der Einzelsäulen (2).

$$(n_{Rt})_1 \cdot (n_{Rt})_2 = (n_{Rt})_{1,2} \quad (2)$$

Daher folgt mit Tabelle 2, daß man z.B. mit zwei Trennsäulen von relativ niedriger Effizienz ($\bar{N} = 10^4$) und mit kurzen Chromatogrammen ($t_{Rn}/t_{Ro} = 10$) bei 2-dimensionaler Arbeitsweise eine Trennleistung von 1600 erreichen kann. Das ist etwa das Zweifache dessen, was mit einer Trennsäule von sehr hoher Effizienz ($\bar{N} = 10^6$) und langem Chromatogramm ($t_{Rn}/t_{Ro} = 100$) erreicht werden kann. Mit hoher Effizienz ($\bar{N} = 10^6$) und langer Trennsäule ($t_{Rn}/t_{Ro} = 100$) kann man die enorm hohe Trennleistung von 593.000 erreichen, welche praktisch allen Anforderungen genügt.

Voraussetzung ist allerdings, daß in der Kombination Säulen verwendet werden, deren Retentionsverhalten weitgehend unabhängig voneinander ist. Die Auswahl solcher Trennsäulen kann z.B. an Hand von Retentionsdaten mit Hilfe von Mustererkennungsmethoden erfolgen (3). Eine vollständige Auftrennung einer sehr komplexen Probe in einige tausend Komponenten ist auf diese Weise, wenn auch sehr zeitraubend, möglich (4). Im allgemeinen wird aber nur die Erfassung der Analyten gefordert. Daher müssen sie nur voneinander und von der Matrix getrennt werden, und diese Aufgabe kann viel schneller gelöst werden.

2.2 VERBESSERUNG DER ANALYSEQUALITÄT DURCH MESSUNG IM FREQUENZ- BEREICH (FOURIERTRANSFORMATIONSMETHODEN)

Für die Identifizierung und Strukturermittlung im Spurenbereich ist die Massenspektrometrie unverzichtbar. Mit der Ionencyclotronresonanz - Massenspektrometrie (ICR-MS), auch Fouriertransformations-Massenspektrometrie (FT-MS) genannt, hat die Massenspektrometrie einen Stand erreicht, der fast allen Anforderungen gerecht wird.

Die Methode beruht darauf, daß die ionisierte Probe in ein Magnetfeld mit konstanter Stärke eingebracht wird. Das Magnetfeld bringt die Ionen in eine Kreisbahn, senkrecht zur Feldrichtung (siehe Abbildung 2). Die Umlauffrequenz in einer Kreisbahn hängt vom Massen-Ladungsverhältnis der Ionen ab.

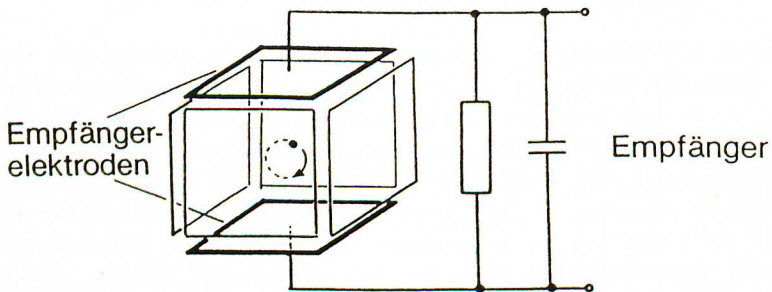


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Prinzips der Ionencyclotronresonanz - Massenspektrometrie (ICR-MS).

Der Vorgang wird durch die Cyclotrongleichung beschrieben:

$$\nu = \frac{z e B}{2 \pi m} \quad (3)$$

es gilt m = Molekülmasse, z = Ladungszahl, e = Elementarladung, B = magnetische Feldstärke, ν = Umlauffrequenz.

Legt man senkrecht zum Magnetfeld nun eine Wechselspannung im Bereich der Radiofrequenz an, so nehmen die Ionen Energie auf, vergrößern ihren Orbitradius und gehen in Phase mit der anregenden Radio-

frequenz. In den zur Wechselspannung und dem Magnetfeld senkrecht stehenden Empfängerelektroden wird dadurch ein Strom induziert, dessen Frequenzspektrum die Frequenzen aller im Magnetfeld umlaufenden Ionen enthält. Hieraus können mathematisch durch Fouriertransformation die Massenspektren der einzelnen Komponenten berechnet werden. Die Wechselspannungsamplitude der jeweiligen Frequenz ist der Ionenmenge proportional (5). Der Massenbereich wird begrenzt durch die Fähigkeit, die niederfrequenten Signalanteile messen zu können. Er reicht derzeit bis etwa 12.000 Dalton (6).

Vorteile der Methode:

- Extrem hohe, aber massenabhängige Auflösung
($R = 10^6$ bei $m = 35$; $R = 1,5 \cdot 10^5$ bei $m = 1100$).
- Sehr gute Empfindlichkeit (Erfassungsgrenze < 1 Femtogramm).

Nachteile der Methode:

- Hohe Vakuumanforderung ($< 10^{-8}$ Torr) begrenzt die anwendbaren Ionisationstechniken und erhöht den Preis.

In jüngster Zeit wurde aber ein wichtiger Schritt zur Lösung dieses Problems unternommen durch Entwicklung eines Zweikammervakuumsystems für getrennte Ionenerzeugung und Ionendetektion.

Es darf erwartet werden, daß die ICR-MS in der nächsten Zukunft in technischer Hinsicht noch weiter verbessert und praxisreif gemacht wird, sodaß auch der Preis für einen größeren Kreis erschwinglich wird.

2.3 AUSWERTUNG DER ANALYSEDATEN IM MULTIDIMENSIONALEN RAUM.

Die Möglichkeiten dieser Arbeitsrichtung sollen am Beispiel der online Kombination von HPLC und UV/VIS-Spektrometrie demonstriert werden. Abbildung 3 zeigt die Darstellung eines 3-dimensionalen Chromatogramms, welches mit dieser Methode erhalten wurde. Man erkennt leicht, daß im 3-dimensionalen Raum mehr Komponenten erkannt werden können, als dies bei der üblichen 2-dimensionalen Arbeitsweise, bei konstanter Wellenlänge möglich ist. In diesem Fall betrachtet man die Funktion $A = f(t)\lambda$.

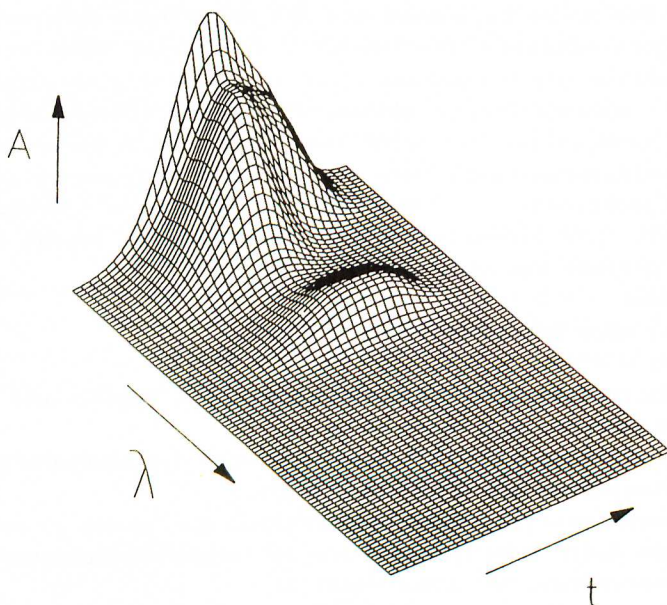


Abbildung 3: 3-dimensionales Chromatogramm einer 4-Komponenten-Mischung, aufgenommen mit einer HPLC / UV-Spektrometrie Kombination
(A = Absorption, λ = Wellenlänge, t = Elutionszeit).

Der ganze Vorteil des Arbeitens im multidimensionalen Raum wird aber erst deutlich, wenn man sich nicht nur auf die Anschauung verläßt, sondern sich mathematischer Hilfsmittel, nämlich der Matrizenrechnung, bedient. Bei der Kombination von Chromatographie und Spektrometrie hat man es im Prinzip mit Peakprofilen und Spektren zu tun. Im Falle eines Einzelpeaks kann man die Ausgangsfunktion des analytischen Verbundsystems durch eine Matrix beschreiben, welche das Produkt des Peakprofilvektors und des Spektrumvektors ist. Dabei wird der Peakprofilvektor als Spalte und der Spektrumvektor als Zeile geschrieben (siehe Abbildung 4a).

Wenn sich die Peaks überlagern, ergibt sich die Matrix der Ausgangsdaten als Produkt der Peakprofilmatrix der vorhandenen Komponenten und ihrer Spektrenmatrix (siehe Abbildung 4b).

$$\begin{pmatrix} d_{11} & d_{12} & \dots & d_{1m} \\ d_{21} & d_{22} & \dots & d_{2m} \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ d_{n1} & d_{n2} & \dots & d_{nm} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} r_1 \\ r_2 \\ \vdots \\ r_n \end{pmatrix} \cdot (c_1 \quad c_2 \quad \dots \quad c_m) \quad (a)$$

$$\begin{pmatrix} d_{11} & d_{12} & \dots & d_{1m} \\ d_{21} & d_{22} & \dots & d_{2m} \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ d_{n1} & d_{n2} & \dots & d_{nm} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} r_{11} & r_{12} & \dots & r_{1f} \\ r_{21} & r_{22} & \dots & r_{2f} \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ r_{n1} & r_{n2} & \dots & r_{nf} \end{pmatrix} \cdot \begin{pmatrix} c_{11} & c_{12} & \dots & c_{1m} \\ c_{21} & c_{22} & \dots & c_{2m} \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ c_{f1} & c_{f2} & \dots & c_{fm} \end{pmatrix} \quad (b)$$

Abbildung 4: Beschreibung der Meßdaten im mehrdimensionalen Raum mit Hilfe von Matrizen (a) Reinstoff, (b) Mischung.

Die Ausgangsmatrix kann nun z.B. mit Faktorenanalyse untersucht und eine Peakdekonvolution durchgeführt werden. Voraussetzung ist, daß die Peakprofile und die Spektren in den Mischzonen unabhängig voneinander sind. Diese Annahme ist im allgemeinen für die analytische Chromatographie, bei der in verdünnter Lösung gearbeitet wird, erlaubt.

Der Zusammenhang zwischen Präzision und Richtigkeit der Analysendaten ist in Abhängigkeit von der chromatographischen Auflösung, dem Peakgrößenverhältnis und der Ähnlichkeit der Spektren untersucht worden (7). Dabei hat sich gezeigt, daß bei Peakgrößenverhältnissen zwischen 10 und 0,1 und Korrelationskoeffizienten für die Spektren unter 0,9 bis zu einer Auflösung von 2 keine signifikante Verschlechterung der Analysenqualität gegenüber vollständiger Auftrennung beobachtet werden kann. Die Auflösung wird dabei mit Hilfe der Standardabweichung des schmäleren Peaks definiert ($R_{21} = (t_{R2} - t_{R1}) / \sigma_{t1}$). Da zur Unterscheidung neben dem Spektrum auch die Peakform herangezogen wird, können in besonderen Fällen sogar bei Auflösung null brauchbare Analysendaten erhalten werden.

Die gleiche Technik kann auch bei den Verbundmethoden GC/MS, LC/MS, GC/IR, LC/IR und weiteren Kombinationen eingesetzt werden. Es ist nicht einzusehen, daß man den Computer, der heute in jedes moderne Analysensystem integriert ist, nur dazu benutzen soll, um Ersatzgrößen aus sich überlagernden Peakhaufen zu bestimmen, statt die Peaks selbst nach Dekonvolution auszuwerten.

2.4 EXTREM NIEDERE ERFASSUNGSGRENZE

Als Beispiel für eine Methode mit extrem niedriger Erfassungsgrenze soll die Diodenlaser-Fluoreszenzspektrometrie vorgestellt werden (8). Bei dieser Methode wird ein Diodenlaser (Halbleiterlaser) zur Anregung der Lumineszenz verwendet. Gegenüber konventionellen Lasern haben sie den Vorteil einer wesentlich größeren Stabilität der Ausgangsenergie und eines höheren Wirkungsgrades. Beides wirkt sich auf die Erfassungsgrenze stark positiv aus. Darüber hinaus sind Diodenlaser auch einfacher, kompakter und billiger als andere Laser.

Ein Nachteil ist, daß Dioden-Laser nur im roten und nahem infraroten Bereich zur Fluoreszenz anregen. Ihr direkter Anwendungsbereich ist daher beschränkt auf wenige Verbindungsklassen wie z.B. Cyanine, Thiazine und Oxazine. Bei der Messung von nicht in diesem Wellenlängenbereich absorbierenden Verbindung muß daher eine Derivatisierung durchgeführt werden. Dabei werden entweder Ionenpaare des Analyten mit einem Ion gebildet, welches im roten oder nahen infraroten Bereich angeregt wird, oder mit entsprechend fluoreszierenden kovalent gebundenen Verbindungen hergestellt. Die niederen Detektionsgrenzen, die mit Modellsubstanzen erreicht wurden, sind in Tabelle 3 angegeben.

Tabelle 3: Typisches Konzentrations- und Mengen-Detektionsgrenzen in der Diodenlaser-Fluoreszenzspektrometrie nach dem heutigen Stand.

Verbindung	Wellenlänge	Detektorvolumen	Detektionsgrenze	
			Konzentration	Menge
5,5'-dichloro-1,1-diphenylamino-3,3'-diethyl-10,12-ethylen-thiacarbo-cyamine Relative molar mass: 779	678 nm	480 µl	$5,9 \cdot 10^{-14} \text{M}$	$2,8 \cdot 10^{-17} \text{mol}$
		56 nl	$1,3 \cdot 10^{-12} \text{M}$	$7,3 \cdot 10^{-20} \text{mol}$

Die Mengendetektionsgrenze ist beeindruckend. Sie entspricht beim kleineren Zellvolumen etwa 46.000 Molekülen.

Es darf erwartet werden, daß die Diodenlaser-Fluoreszenzspektrometrie schnell technisch weiterentwickelt wird und bald auf dem Markt praxisreife Geräte erscheinen werden. Von besonderer Bedeutung ist aber die Entwicklung von Derivatisierungsmethoden, welche eine größere Zahl von Verbindungsklassen dieser empfindlichen Methode zugänglich machen. Derzeit wird insbesondere am Einsatz von Oxazinen und Thiazinen als Derivatisierungsreagenzien gearbeitet, die in Kombination mit einem neuentwickelten 635 nm Diodenlaser eingesetzt werden könnten. Dadurch würde sich der Anwendungsbereich, insbesondere in der Biochemie und Medizin, stark ausweiten.

3 STAND DER ANWENDUNGSPRAXIS

Der Stand der Analytik in der Anwendungspraxis kann durch Ringversuche ermittelt werden. Dabei zeigt sich, daß ein großer Unterschied besteht zwischen dem, was in Forschung und Entwicklung erreicht wurde und dem, was in der alltäglichen Praxis verwirklicht wird. Der Grund dafür liegt im allgemeinen nicht in der technischen Ausrüstung, sondern in einer ungenügenden Erfahrung und Kenntnis der Betreiber. Auch in der Analytik müssen "Hardware" und "Software" beide auf einem hohen Stand sein, um optimale Ergebnisse zu erzielen.

Die Anforderungen an die Analytik sollten aber auch nicht übertrieben werden. Die analytischen Daten stellen nicht das Endergebnis dar, sie sind nur Mittel zum Zweck ! Gefragt ist nämlich z.B. die Toxizität einer Probe, oder die Qualität eines Werkstoffes. Die Bestimmung der gesuchten Eigenschaften selbst ist aber in der Regel nur mit einer wesentlich geringeren Qualität möglich, als die der analytische Daten. Es genügt also, wenn die Qualität der Analysendaten für die zu ziehenden Schlußfolgerungen ausreicht. Das Ergebnis eines typischen Ringversuches ist in Abbildung 5 dargestellt (9).

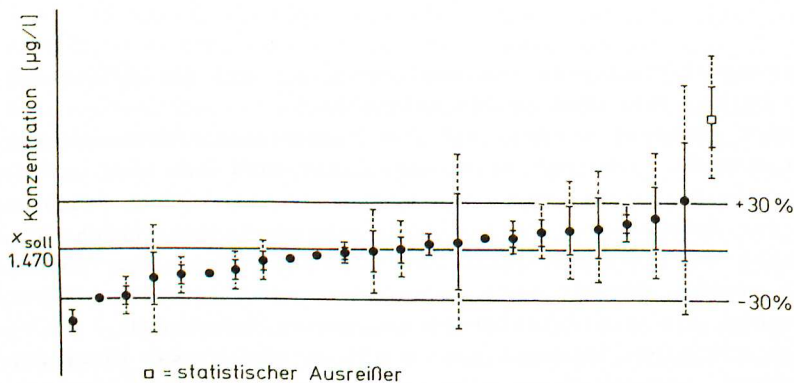


Abbildung 5: Ergebnis eines Ringversuchs von 24 Labors zur Bestimmung von Cadmium in Rheinwasser.

Probe: Standardlösung mit 1,47 µg/l.

Statistische Kennwerte der Einzellabors bei 4 Wiederholanalysen:

$$\begin{array}{c} \text{-----} \bullet \text{-----} \\ \bar{x} \quad s \quad 2s \end{array}$$

\bar{x} , s = Schätzwerte des Mittelwertes bzw. der Standardabweichung.

Das Ergebnis ist unbefriedigend, da 9 von 24 Labors, das von der EG geforderte Qualitätsziel (10) von $\pm 30\%$ Genauigkeit nicht erreichen. Dabei muß angenommen werden, daß nur jener Teil der Labors, die solche Analysen durchführen, am Ringversuch teilgenommen haben, die sich solche Analysen zutrauen. Der Rest hat es offensichtlich vorgezogen sich nicht bloßzustellen. Es muß erwähnt werden, daß nicht selten viel größere Abweichungen vorkommen und sich die Ergebnisse um mehr als einen Faktor 1000 unterscheiden (z.B. in der Dioxin-Analytik). Es ist klar, daß solche Resultate dank der Medien in der Bevölkerung Unruhe erwecken und nicht Stand der Wissenschaft sind.

Es sei darauf hingewiesen, daß am 4. August 1992 im Bundesgesetzblatt für die Republik Österreich ein neues Akkreditierungsgesetz (AkkG) veröffentlicht wurde und am 1.1.1993 in Kraft treten wird. Es ist zu hoffen, daß dieses Gesetz zur Verbesserung der Qualitätssicherung in der chemischen Analytik beitragen wird. Darüber hinaus wird auch die grundsätzlich bestehende Haftpflicht des Analytikers für die Qualität seiner Ergebnissen zu einer Hebung der Analysenqualität beitragen.

Prof.Dr.Dr.h.c.mult.

Josef F.K. Huber

Institut für Analytische Chemie
der Universität Wien
Währingerstraße 38, A-1090 Wien

LITERATUR

- 1 J.M.Davis and J.C.Giddings, *Anal.Chem.*, 57 (1985) 2168 and *Anal.Chem.* 57 (1985) 2178.
- 2 J.F.K.Huber, unpublished results.
- 3 J.F.K.Huber and G.Reich, *J.Chromatogr.*, 294 (1984) 15.
- 4 J.F.K.Huber, unpublished results.
- 5 M.B.Comisarow, A.G.Marshall, *Chem.Phys.Lett.*, 62 (1974) 293.
- 6 D.F.Hunt, J.Shabanowitz, J.R.Yates, N.-Z.Zhu, D.H.Russel and M.Castro, *Proc.Natl.Acad.Sci USA*, 34 (1987) 620.
- 7 J.Wolf, Thesis, University of Vienna, 1992.
- 8 A.J.G.Mank, H.Lingeman and C.Goojer, *Trends in Anal.Chem.*, 11 (1992) 210.
- 9 Arbeitsausschuß "Meßmethoden der Deutschen Kommission zur Reinhaltung des Rheins", Ringversuch 1982.
- 10 EG-Richtlinie vom 9.Oktober 1979 (79/869/CEF).