



Instrumentelle Bioanalytik

Trennverfahren

Prof. Dr. Mircea Tric

SS 2026

Qualitative und quantitative Analysen

Qualitative Analyse

- **Vergleich** der **Retentionszeit** eines Peaks mit einer authentischen Probe
- **Spiken**: Zusatz des Analyten zu einer unbekanntem Probe (Fläche des Analytpeaks nimmt zu)
- Mit Massenspektrometer: **Vergleich** eines **Massenspektrums** eines chromatographischen Peaks mit einer **Spektrenbibliothek**

Quantitative Analyse

Je nach Fragestellung und Probengegebenheiten unterscheidet man vier Methoden:

- das 100 % - Verfahren
- das Verfahren des **Externen Standards** (ESTD)
- das Verfahren des **Internen Standards** (ISTD)
- das **Standardadditionsverfahren** ("Aufstockverfahren")

Quantifizierungsverfahren

Quantifizierungsverfahren

100%-Verfahren für **Reinheitsbestimmungen** (bei einem Massenanteil von $w_i > 95\%$):

- Keine Kalibrierung
- Bestimmung anhand der Summe der Peakflächen ($\sum A_i = 100\%$)
- **Annahme:** Alle Komponenten werden mit der **gleichen** Empfindlichkeit (**Detektor-Response**) registriert!

Quantifizierung:

Prozentualer Anteil der Peakfläche für die **Zielkomponente (Analyt)** im Vergleich zur **Gesamtfläche** aller integrierter Peaks im Chromatogramm ergibt den Gehalt in [%]

$$\text{Reinheit [\%]} = \frac{\text{Fläche Hauptpeak}}{\sum \text{aller Peakflächen}} \cdot 100$$

Berechnung der Peakfläche aus einem Chromatogramm: **Peakfläche = 1,064 · Peakhöhe [mm] · $w_{1/2}$ [mm]**

Quantifizierungsverfahren

Kalibrierung:

Ermitteln des **Zusammenhangs** zwischen einem **Messsignal** und der dazugehörigen **Messgröße**

Kalibrierung mit **externen** Standardlösungen, wenn:

- **viele Proben** gemessen werden
- **Standards vorhanden** mit Eigenschaften **ähnlich** der **Probenmatrix**
- **hohe Reproduzierbarkeit** der **Analysenmethode** für Probe und Standards
- nur **kleine systematische Fehler** (z.B. bei der Probenvorbereitung) zu erwarten sind

→ sonst **internen Standard** verwenden!

Methode des externen Standards (ESTD)

Einpunktkalibration mit einem externen Standard

- Lineares Detektorverhalten vorausgesetzt
 - Schnell & einfach
1. Kalibrierung mit **einem** externen Standard liefert den **Response-Faktor** f_R

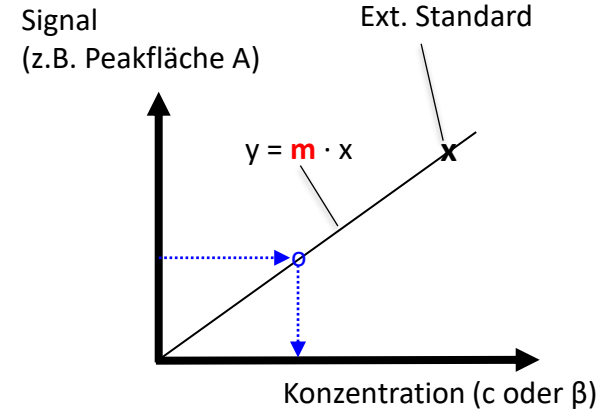
$$f_R = \frac{A_{ESTD}}{c_{ESTD}}$$

←----- Peakfläche des Standards
←----- Konzentration des Standards

2. Messung der unbekannt **Probe**
3. Bestimmung der Konzentration der Zielkomponente

$$\frac{A_{Probe}}{c_{Probe}} = f_R = \frac{A_{ESTD}}{c_{ESTD}} \Rightarrow c_{Probe} = \frac{A_{Probe}}{f_R} = \frac{y}{m}$$

Da der **externe Standard** aus **demselben Analyten** besteht, ist der **Response-Faktor** für die Probe und den Standard **identisch**.



Der **Response Faktor** f_R entspricht der **Steigung** der Kalibriergerade:

$$m = \frac{\Delta y}{\Delta x}$$

Methode des externen Standards (ESTD)

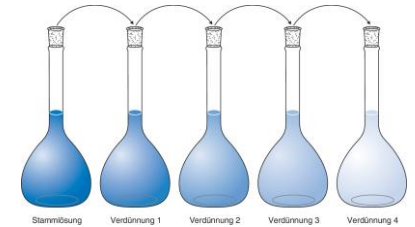
Mehrpunktkalibration mit externen Standards:

1. Verdünnung der Standardlösung mit bekannter Analytkonzentration für die Kalibriergerade
2. Möglichst **äquidistante Kalibrierpunkte** über den gesamten Arbeitsbereich* messen
3. Kalibriergerade erstellen (lineare Regression)
4. Probe messen (möglichst in der Mitte des Arbeitsbereichs)
5. Gehalt der Probe aus der **Analysefunktion** berechnen:

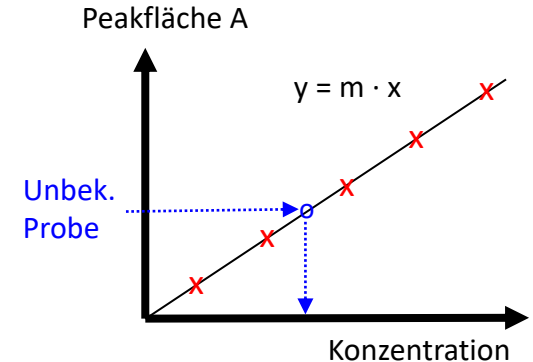
$$x = \frac{y}{m}$$

*Arbeitsbereich:

Konzentrationsbereich mit akzeptierbarer Linearität, Richtigkeit und Präzision



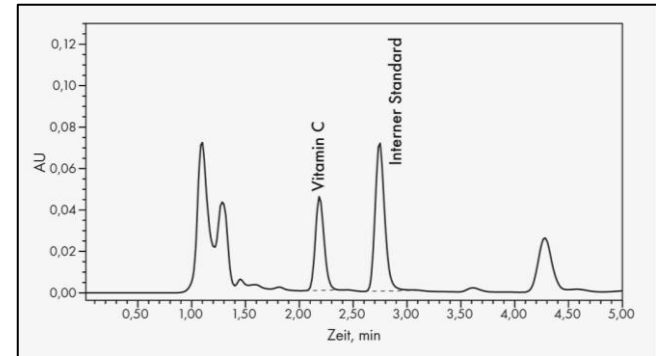
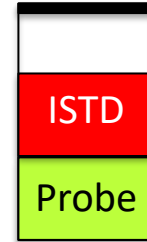
Akeret, B. (2019). Mischen und Verdünnen. In: Rechnen im Labor. Springer Spektrum, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-662-58662-4_4



Methode des internen Standards (ISTD)

Vorteil ISTD: **Messverfahren** wirkt sich auf **Analyt** und **internen Standard** gleich aus!

- **Kompensation** von **Schwankungen** bei der **Probenvorbereitung**, z.B.
 - Verflüchtigung des Lösungsmittels
 - Adsorption an Matrixbestandteilen
 - unvollständige Reaktion bei der Derivatisierung
- **Kompensation** von **Schwankungen** während der **Messung**, z.B.
 - Veränderung der Temperatur im Messgerät
 - Fehler bei injizierter Probenmenge
 - Schwankung der Fließgeschwindigkeit



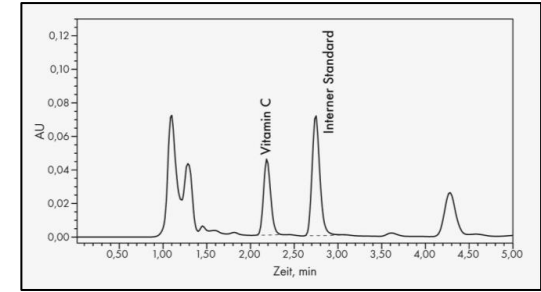
Methode des internen Standards (ISTD)

Methode des internen Standards (ISTD)

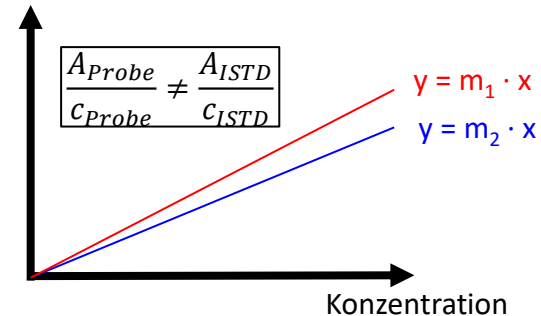
Standardmischung herstellen:

Bekante Konzentrationen an **Zielkomponente & internen Standard**

- Identisches Lösungsmittel wie in Probe verwenden
- Analyt (ZK) und int. Standard im linearen Bereich!
- Hohe Reinheit der ZK und int. Standard
- **Problem:** Verschiedene Moleküle → unterschiedliche Detektor-Response
(z.B. Absorptionskoeffizienten: Analyt \neq int. Std)
- **Relative Response Factor (RRF)** bestimmen zum Ausgleich der unterschiedlichen Response-Faktoren von Analyt und int. Standard



Peakfläche A



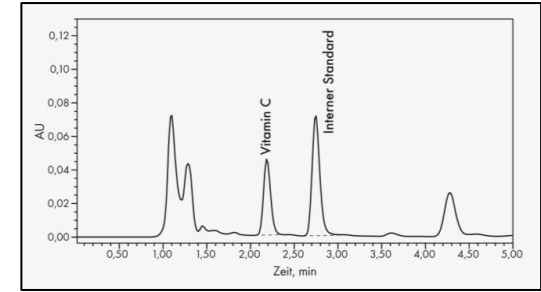
Methode des internen Standards (ISTD)

Kalibrierung mit internem Standard (ISTD)

1. Mit Hilfe der **Standardmischung** wird der **relative Responsefaktor (RRF)** bestimmt

$$RRF = \frac{f_{R,ZK}}{f_{R,ISTD}} = \frac{A_x}{A_{ISTD}} \cdot \frac{c_{ISTD}}{c_x}$$

A_x = Peakfläche Analyt
ISTD = interner Standard



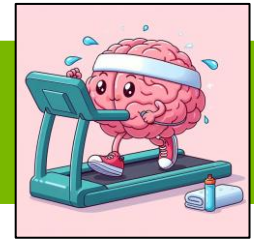
2. Int. **Standard (Konzentration bekannt)** zur Probe mit unbekannter Analyt-Konzentration
3. Probenvorbereitung und Messung
4. Berechnung der Analytkonzentration mit Hilfe des RRF:

$$c_x^{Pr} = \frac{A_x^{Pr} \cdot c_{ISTD}^{Pr}}{A_{ISTD}^{Pr}} \cdot 1/RRF$$

Der relative Responsefaktor (RRF) wird verwendet, um Unterschiede in der **Detektorempfindlichkeit (Response)** zwischen einem Analyten und einem int. Standard zu korrigieren → **Korrekturfaktor**

$$\frac{A_x^{Probe}}{c_x^{Probe}} = \frac{A_{ISTD}^{Probe}}{c_{ISTD}^{Probe}} \cdot RRF$$

Übung

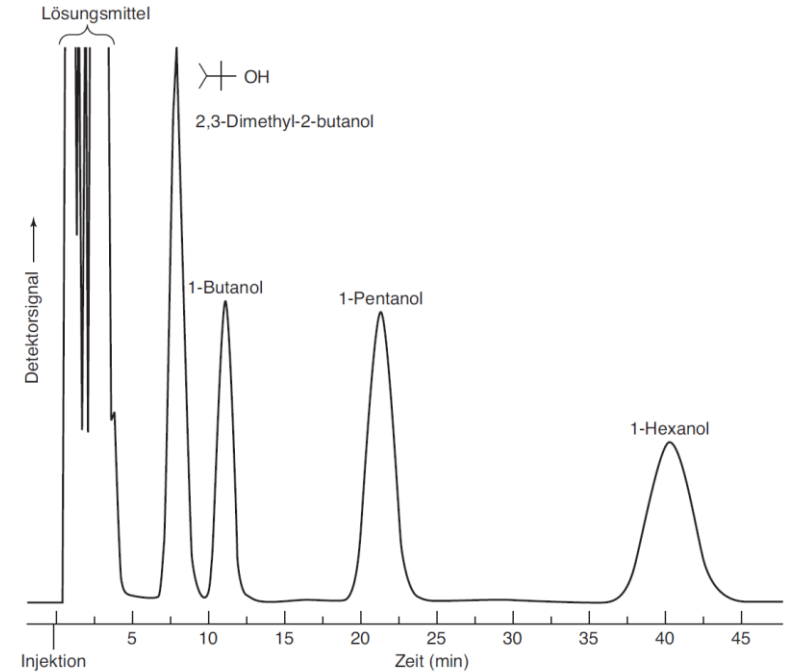


Eine Lösung, die 234 mg Butanol und 312 mg Hexanol in 10,0 mL enthält, ergab das folgende Chromatogramm.

Wir betrachten Butanol als internen Standard.

Wie groß ist der **relative Responsefaktor (RRF)** für Hexanol?

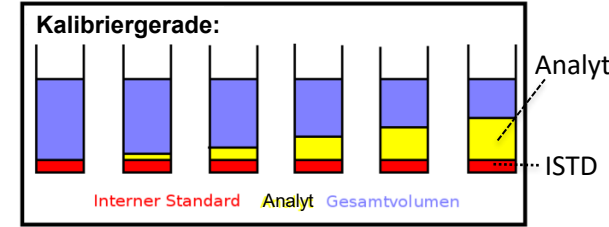
Peakfläche = 1,064 x Peakhöhe [mm] x $w_{1/2}$ [mm]



Methode des internen Standards (ISTD)

Gehaltsbestimmung mit mehreren Standardmischungen (Kalibriergerade):

1. Herstellen von internen Standards mit bekannten Analyt-Konzentrationen durch die Hinzugabe des **internen Standards** mit **konstanter Konzentration**
2. Kalibrierstandards messen und Kalibrierkurve erstellen
3. Probe ansetzen: Addieren des **internen Standards** zur **Probe**
4. Messen der Probe mit bekanntem internen Standard
5. Konzentration des Analyten aus der Analysenfunktion berechnen



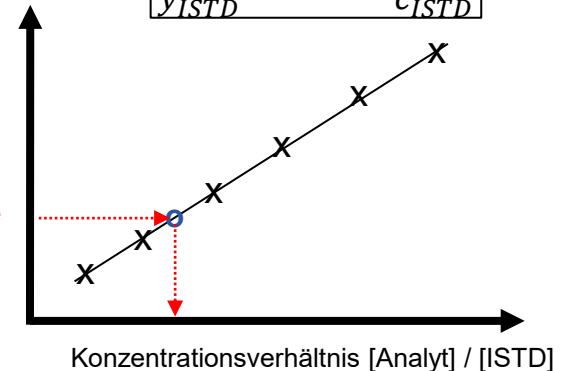
$$c_A = \frac{c_{ISTD} \left(\frac{y_A}{y_{ISTD}} - b \right)}{m}$$

b Offset der Kalibrierfunktion
m Steigung (Empfindlichkeit)
 y_A Signal Analyt
 y_{ISTD} Signal interner Standard
c Konzentration

Signalverhältnis
Analyt / ISTD

$$\frac{y_A}{y_{ISTD}} = b + m \frac{c_A}{c_{ISTD}}$$

Probe
mit IS



Methode des internen Standards (ISTD)

Vorgaben an den internen Standard:

- Hohe Reinheit (keine Verschleppung)
- Chemisch inert
- Ähnliches chemisches/physikalisches Verhalten wie Zielkomponente
- Keine Überlappung mit anderen Peaks
- Ähnliche Detektor-Response
- **Ähnliche Retentionszeit** wie Zielkomponente (**Peakverbreiterung** nimmt mit der Retentionszeit zu und damit auch der Peakflächenfehler)
- Ähnliche Konzentration (linearen Bereich des Detektors beachten!)

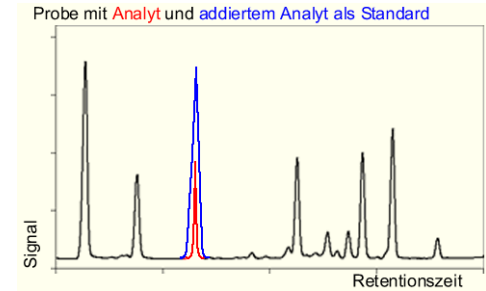
Standardaddition

Standardaddition:

Probe wird mit **bekannter Menge** an **Analyt** aufgestockt

Einsatz, wenn:

- **keine** geeigneten **ISTD** vorhanden (z.B. Probenlösung zeigt zu viele **Peaks** → **Peak-Überlagerung**)
- für die **Kalibrierung** keine vergleichbare Probenmatrix zur Verfügung steht
z.B. bei sehr **komplexer Matrix** oder **unbekannter Matrix**
- **Matrixeffekte** bestehen → Probenmatrix beeinflusst das analytische Signal



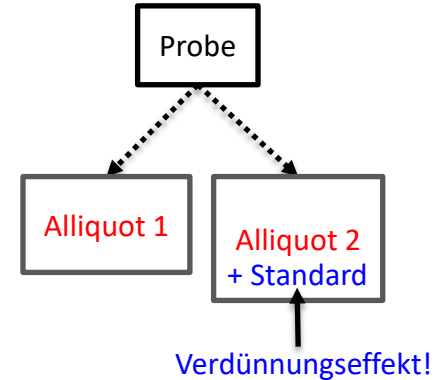
Standardaddition

Standardaddition: Einfache Dotierung

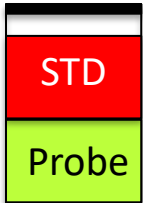
Zugabe einer **bekannten Menge** des **Analyten (X)** zu einem **zweiten Aliquot** der **Probe**.

Es gilt:

$$\frac{c_X}{A_X} = \frac{c_{X+S}}{A_{X+S}}$$



gespikte
Probe



Standardzusatzgleichung:

$$\frac{c_X}{\frac{n_X + n_S}{V_{ges}}} = \frac{c_X}{\frac{n_X}{V_{ges}} + \frac{n_S}{V_{ges}}} = \frac{c_X}{c_{X,v} + c_{S,v}} = \frac{c_X}{c_{X+S}} = \frac{A_X}{A_{X+S}}$$

- A_X Signal der ungespikten Probe
- A_{X+S} Signal der gespikten Probe
- c_X Konzentration der ungespikten Probe
- $c_{S,v}$ Konzentration des Standards bezogen auf das Volumen der gespikten Probe
- $c_{X,v}$ Konzentration des Analyten in der Probe, wenn man nur mit LM gespikt hätte
- c_S Standardkonzentration die hinzugegeben wird

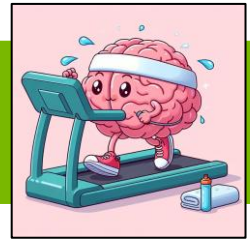
Verdünnungsfaktor:

$$\frac{\text{Ausgangsvolumen}}{\text{Endvolumen}}$$

$$c_{S,v} = c_S \cdot \frac{V_S}{V_{ges}}$$

$$c_{X,v} = c_X \cdot \frac{V_X}{V_{ges}}$$

Übung



Eine Probe Blutserum ($V = 95 \text{ mL}$), die Natriumionen enthält, ergibt bei einem Atomemissionsexperiment ein Signal von $4,27 \text{ mV}$. Es werden $5,00 \text{ mL}$ einer $2,08 \text{ M NaCl}$ -Lösung (Standard) zu 95 mL Serum gegeben. Diese gespikte Serumprobe erzeugt ein Signal von $7,98 \text{ mV}$.

Bestimmen Sie die Ausgangskonzentration an Na^+ im Serum.

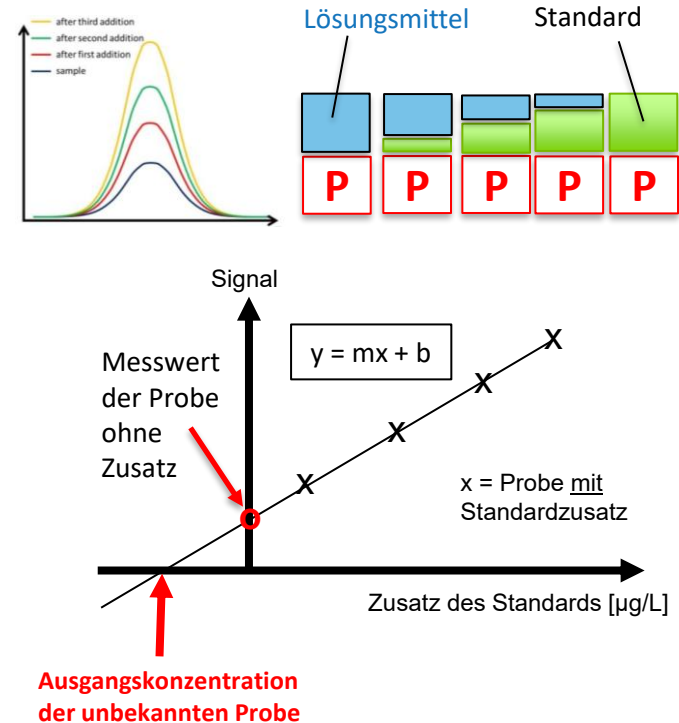
Standardaddition

Standardaddition: Mehrfachzugabe der Zielkomponente

1) **Probe (P)** wird **aliquotiert** und **verschiedene Mengen des Analyten** als **Standard** zugegeben und gemessen

→ Korrektur des Volumens bei der Standardherstellung beachten!

- 2) Auf der x-Achse wird die zugegebene Konzentration aufgetragen
- 3) Durch **Verlängerung** der **Kalibriergerade** wird ein Schnittpunkt mit der x-Achse erhalten, an dem die **Ausgangskonzentration** des Analyten abgelesen werden kann
- 4) Den Abszissenwert erhält man durch die Festlegung $y = 0$:
 $y = 0 = m \cdot x + b \rightarrow x = -b/m$
- 5) Die Ausgangskonzentration des Analyten wird aus der vorgenommenen Verdünnung berechnet



Wichtiger Hinweis

Dieses Skript ist als unterstützende Lernhilfe nur zum persönlichen Gebrauch von Studierenden des Studienganges Biotechnologie (Bachelor) an der Hochschule Weihenstephan-Triesdorf freigegeben.

Jede unbefugte Vervielfältigung und **Verbreitung**, sei es in Papierform oder in elektronischer Form, ist urheberrechtlich **verboten**.

