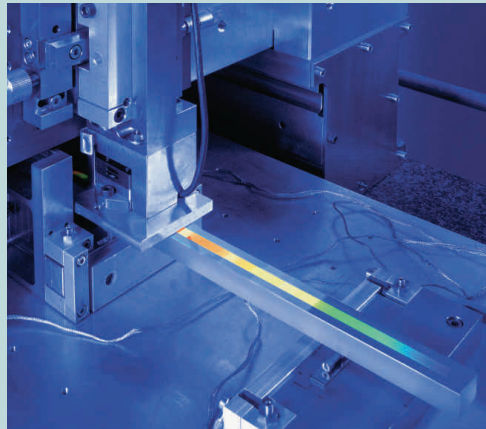


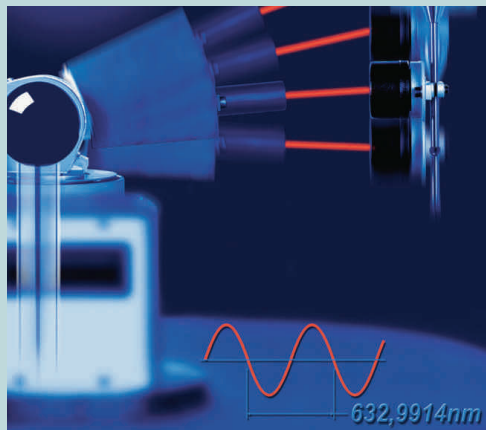
4. Fachtagung Messunsicherheit

Messunsicherheit praxisgerecht bestimmen



Bildquelle: PTB

Messwert \pm Messunsicherheit



Bildquelle: PTB

Ideelle Mitträger:



12. und 13. November 2008
in Erfurt

Messunsicherheit in der elektrochemischen Analytik

Dr. Hanspeter Andres, Dr. Samuel Wunderli

Bundesamt für Metrologie METAS, Bern-Wabern

www.metas.ch

Zusammenfassung

Die Bestimmung der chemischen Aktivität mittels elektrochemischen Methoden ermöglicht eine auf nationale Normale rückverfolgbare Kalibrierung von Messinstrumenten und Gebrauchsstandards. Aufbauend auf der Nikolskij-Eisenman Gleichung wird ein Messunsicherheitsbudget für potentiometrische Messungen von Elektrolytkomponenten mit Ionen-selektiven Elektroden aufgestellt. Die kombinierte Unsicherheit wird durch die Unsicherheiten des Diffusionspotentials und des Antwortverhalten der potentiometrischen Messkette dominiert. Für die Bestimmung von Glukose mittels der Chronoamperometrie zeigt das aufgestellte Messmodell, dass die Unsicherheiten der Reinheit der eingesetzten Glukose und des Antwortverhalten der chronoamperometrischen Messkette die kombinierte Unsicherheit dominieren. Diese Resultate bilden die Ansatzpunkte für weitere Optimierungsarbeiten mit dem Ziel einer reduzierten Messunsicherheit.

1. Einleitung

Nationale Regelungen und die europäische Richtlinie über In-vitro-Diagnostika (98/79/EG vom 27. Oktober 1998 [1]) verlangen die Rückverfolgbarkeit der dem Kalibriermaterial und/oder dem Kontrollmaterial zugeschriebenen Werte auf verfügbare Referenzmessverfahren und/oder übergeordnete Referenzmaterialien. Als Beitrag dazu stellt METAS rückverfolgbare Referenzwerte für chemische Aktivitätsmessungen von komplex zusammengesetzten Elektrolyten und Glukose in Lösungen bereit. Diese beiden Typen von Analytmessungen gehören zu den häufigsten Aufgaben in einem klinisch-chemischen Laboratorium und sind von großer Wichtigkeit für die Mediziner. Die chemische Aktivität von gelösten Ionen und Glukose in physiologischen Lösungen entspricht dem frei verfügbaren Anteil dieser Komponenten in einer Mischung. Sie bestimmt deren biochemische Wirkung. In physiologischen Lösungen, wie Blutserum, unterscheidet sich die chemische Aktivität deutlich von der Ionen- und Substratkonzentration. Potentiometrische und chronoamperometrische Messungen mittels Ionen-selektiver Elektroden bzw. Biosensoren erlauben die direkte Bestimmung der chemischen Aktivität. Auf dem Markt sind jedoch Messgeräte und -methoden verbreitet, bei denen der Zusammenhang zwischen der ermittelten Stoffmengenkonzentration und ihrem biologisch aktiven Anteil nicht immer klar ist.

Mit gravimetrisch hergestellten Referenzlösungen kalibriert METAS Messinstrumente und Gebrauchsstandards auf einer konventionell festgelegten Aktivitätsskala. Als Komparatoren werden voll automatisierte potentiometrische bzw. chronoamperometrische Messsysteme

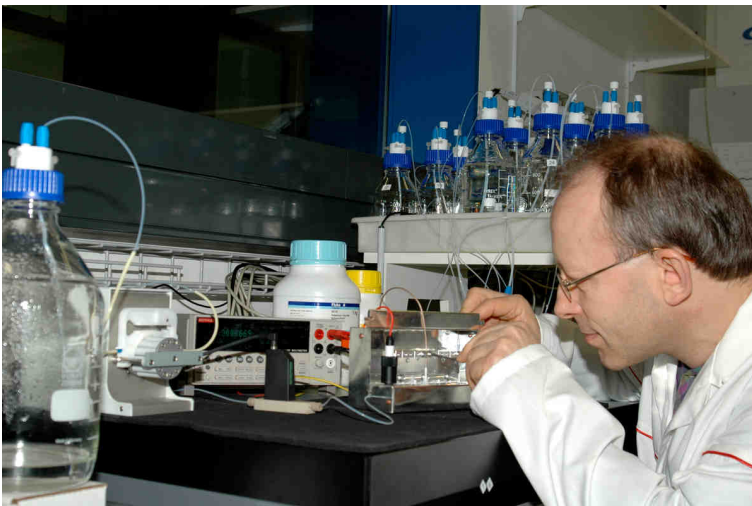
eingesetzt. Als Kalibrierlösungen werden wässrige Mischungen von hochreinem Natrium-, Kalium-, Calcium- und Magnesiumchlorid bzw. von hochreiner Glukose verwendet. Die Rückverfolgbarkeit von Elektrolyt- und Glukosemessresultaten auf nationale Referenzmasse sichert deren internationale Vergleichbarkeit und vermeidet laborabhängige Messresultate.

2. Messmodell für potentiometrische Messungen mittels ionen-selektiven Elektroden

Theorie: Im Gleichgewichtszustand wird das Potential E über einer ionen-selektiven Membran hauptsächlich durch die chemische Aktivität der Ionen ausserhalb der Membran bestimmt und kann durch die Nikolskij-Eisenman Gleichung beschrieben werden [2]:

$$E = E_0 + E_D + \frac{RT}{z_I F} \ln \left[a_I + \sum_{J \neq I} (K_{I,J}^{pot}) a_J^{z_I/z_J} \right]. \quad (1)$$

E_0 summiert über alle konstanten Potentialdifferenzen des Messsystems, E_D ist das abschätzbare Diffusionspotential, z_i ist die Ladung des Ions i , a_i ist die chemische Aktivität des Ions i , $K_{I,J}^{pot}$ ist der potentiometrische Selektivitätskoeffizient zwischen dem Ion I und dem Stör-Ion J , R ist die Gaskonstante, T ist die absolute Temperatur in Kelvin und F ist die Faradaykonstante.



Messung: Die Messung der chemischen Aktivität des Ion I erfolgt mittels eines automatisierten Flusssystems; das Messsignal ist die Potentialdifferenz einer Messkette mit ionen-selektiven Elektroden und der Referenzelektrode. Im Bild 1a ist das Messsignal für eine Kalium-selektive Elektrode von drei Referenzlösungen sowie einer Testlösung mit Kaliumkonzentrationen im physiologischen Bereich dargestellt.

Kalibrierfunktion: Um auch das zeitliche Verhalten des Messsignals im Messmodell zu berücksichtigen, wird die Gleichung 1 wie folgt erweitert:

$$E = E_0 + E_D + \kappa(t) \frac{RT}{z_I F} \ln \left[a_I + \sum_{J \neq I} (K_{I,J}^{pot}) a_J^{z_I/z_J} \right] + D(t). \quad (2)$$

$\kappa(t) = \kappa$ beschreibt das asymptotische Antwortverhalten der potentiometrischen Messkette als Funktion der Zeit. Beim Gleichgewichtszustand ist $\kappa = 1$; die Unsicherheit in κ hängt vom Verhältnis Einstellzeit zu Messzeit ab. Der Driftterm $D(t) = D$ fasst nicht konstante Potentialdifferenzen zusammen. Die zeitliche Drift des Messsignals wird in der Regel rechnerisch korrigiert, somit wird $D = 0$ und $u(D)$ entspricht der Streuung des Messsignals.

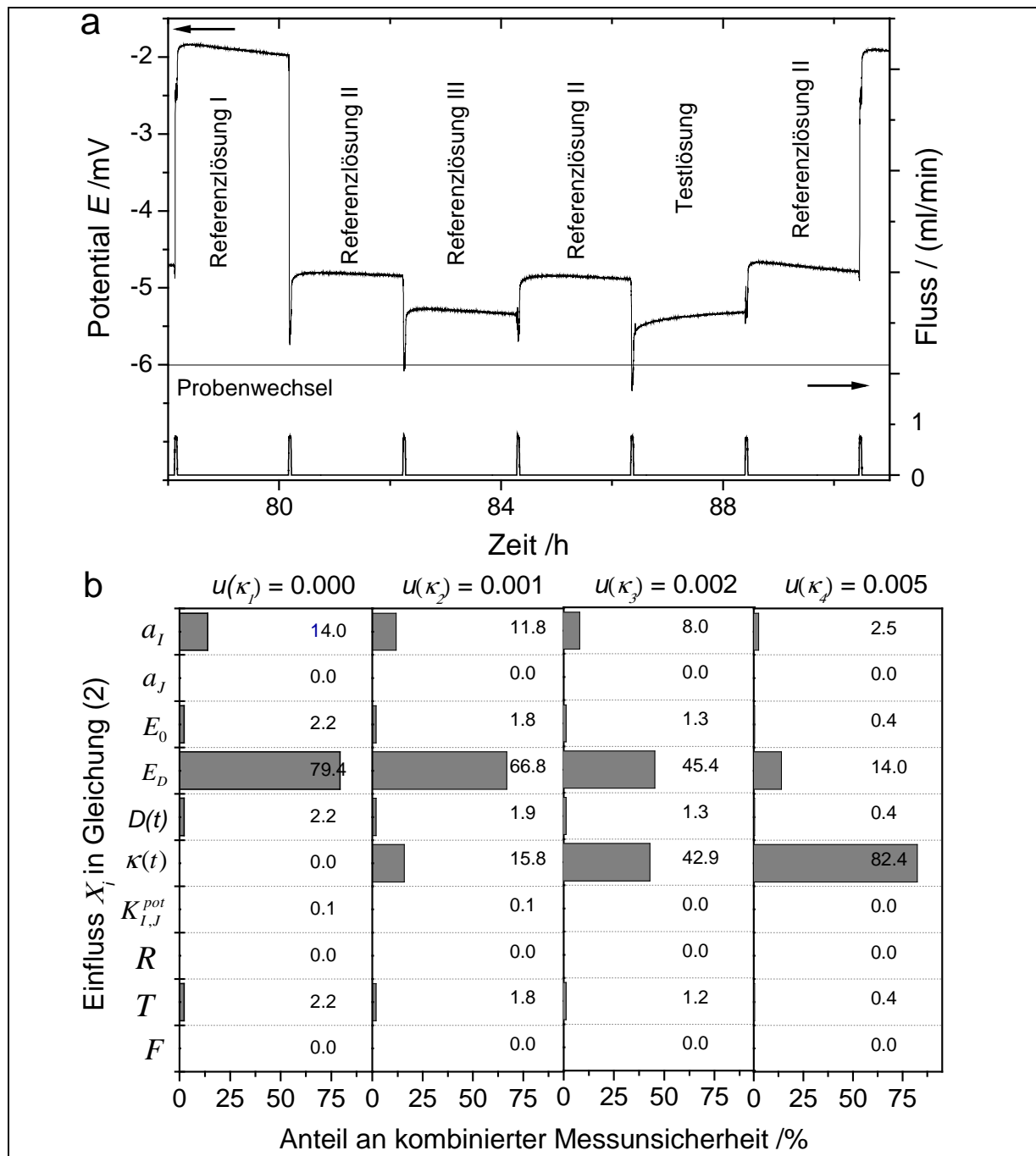


Bild 1: a) Das potentiometrische Antwortsignal einer Kalium-selektiven Elektrode als Funktion der Zeit ist dargestellt. Nach jedem Probenwechsel stabilisiert sich das Signal in der Regel innerhalb von 15 Minuten. b) Die relativen Anteile jedes Einflusses in der Gleichung (2) an der kombinierten Messunsicherheit sind in Funktion der Unsicherheit des dynamischen Terms κ dargestellt.

Das Unsicherheitsbudget des Messsignals einer Kalium-selektiven Membran für die Testlösung ist im Bild 1b dargestellt. Die kombinierte Messunsicherheit wird bei $u(\kappa_1) = 0.000$ dominiert durch die Unsicherheit des abgeschätzten Diffusionspotentials. Bei längeren Signalantwortzeiten, mit entsprechend größeren Unsicherheiten von κ , dominiert die Unsicherheit des dynamischen Terms die kombinierte Messunsicherheit [3]. Durch die gezielte Anpassung des Flusssystems für potentiometrische Messungen konnte die Signalantwortzeit, wie im Bild 1a gezeigt, auf unter 15 Minuten reduziert und somit die Unsicherheit von κ minimiert werden.

Analysefunktion: Aus den gravimetrischen Werten, korrigiert mit der Reinheit der Ausgangsmaterialien [$u = (0.05 \text{ bis } 0.5) \%$ rel.], und den Messsignalen [$u = (0.3 \text{ bis } 0.8) \text{ mV}$] der drei Referenzlösungen kann die chemische Aktivität der Testlösung mittels mittenbetonter linearer Regression gemäß ISO Norm 6143 bestimmt werden. Im physiologischen Bereich beträgt die erweiterte Messunsicherheit für die einwertigen Ionen Natrium, Kalium und Chlorid ca. 4 % rel. Für die zweiwertigen Ionen Calcium und Magnesium verdoppelt sich die Messunsicherheit.

3. Messmodell für amperometrische Messungen mittels Biosensoren

Theorie: Der Glukose-Oxidase-Test ist eine chemische Nachweismethode von Glukose, die häufig in der klinischen Chemie zum Nachweis einer Erkrankung an Diabetes mellitus verwendet wird. Das Enzym Glukose-Oxidase katalysiert dabei höchst selektiv die Umwandlung der chemisch aktiven Form der β -D-Glukose zu D-Glukonsäure-5-Lakton. Pro umgesetztes Glukosemolekül werden zwei Elektronen freigesetzt. Dieser zum Glukosegehalt proportionale Elektronenfluss bei einer konstant angelegten Spannung ist das auswertbare Phänomen bei der Chrono-Amperometrie.

Die Cottrell Gleichung beschreibt den Zusammenhang zwischen dem diffusionslimitierten Strom I an einer planaren Elektrode bei konstant angelegtem Potential [4].

$$I = n A F a_s \sqrt{\frac{D_s}{\pi t}} \quad (3)$$



n ist die Anzahl der freigesetzten Elektronen, A ist die Oberfläche der planaren Elektrode, a_s ist die chemische Aktivität des Substrates, D_s ist der Diffusionskoeffizient des Substrates, t ist die Zeit ab Anlegen der konstantem Spannung und F ist die Faradaykonstante.

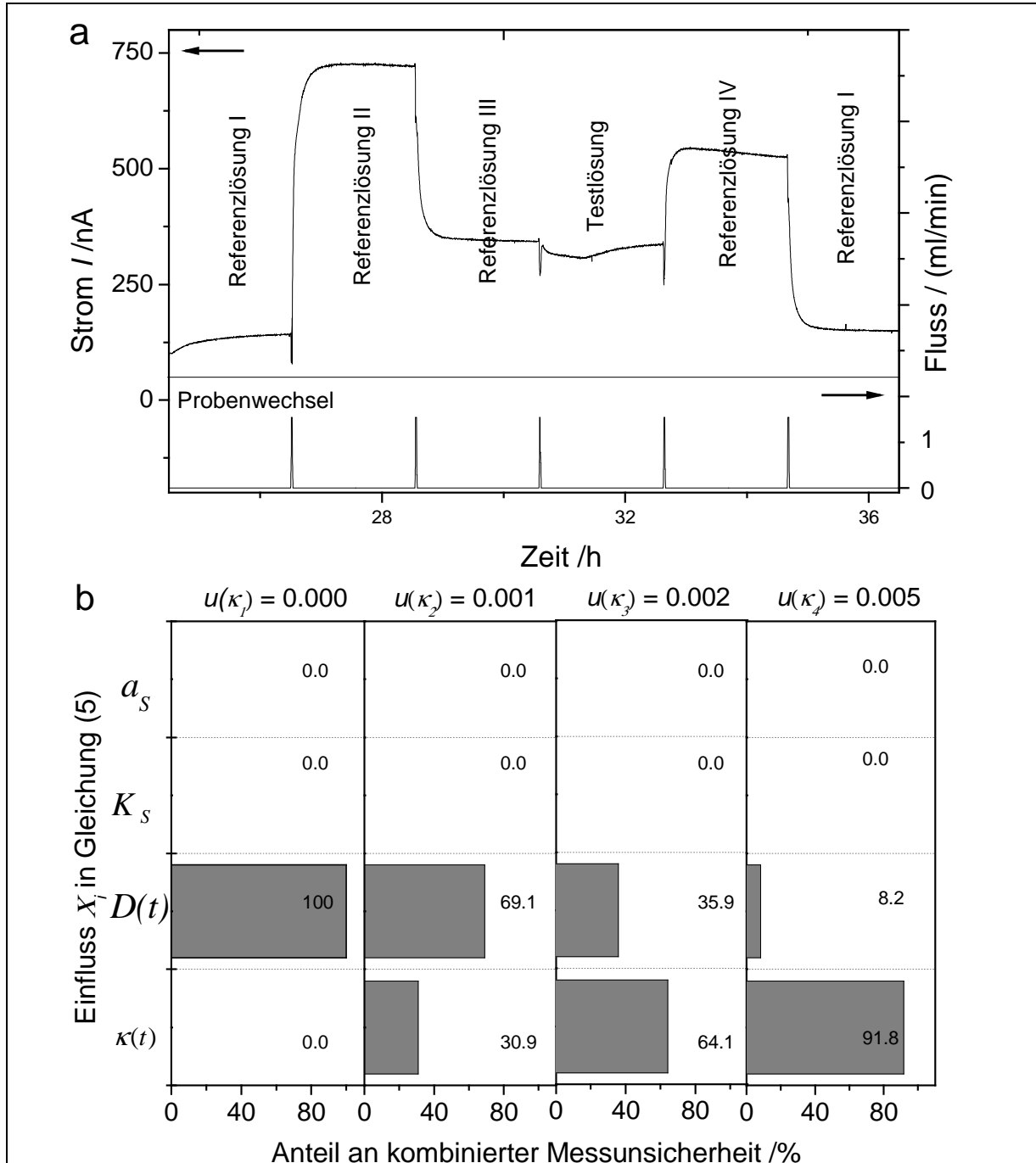


Bild 2: a) Das amperometrische Antwortsignal einer Glukose-sensitiven Elektrode als Funktion der Zeit ist dargestellt. Das Stabilisationsverhalten hängt von der Ionenstärke der Lösung ab und beträgt (30 bis 90) Minuten. b) Die relativen Anteile jedes Einflusses in der Gleichung (5) an der kombinierten Messunsicherheit sind in Funktion von $u(\kappa)$ dargestellt.

Nach der Ausbildung einer konstanten Nernst'schen Diffusionsschicht der Dicke δ_N wird der Grenzstrom I_g direkt proportional zur Substrataktivität:

$$I_g = \frac{n A F a_s D_s}{\delta_N} = K_s a_s. \quad (4)$$

Messung: Die Messung des Glukosegehaltes erfolgt mittels eines automatisierten Flusssystems, das Messsignal ist der Strom I zwischen der Enzym- und der Gegenelektrode. Im Bild 2a ist das Messsignal für eine Glukose-selektive Elektrode von drei Referenzlösungen sowie einer Testlösung mit Glukosekonzentrationen im physiologischen Bereich dargestellt. Die angelegte Spannung beträgt +200 mV (vs Ag/AgCl/3 M KCl).

Kalibrierfunktion: Wie im vorangegangenen Beispiel wird die Gleichung (4) durch die Parameter $\kappa(t)$ und $D(t)$ erweitert, um das zeitliche Verhalten des Messsignals zu berücksichtigen:

$$I_g = \kappa(t) K_s a_s + D(t) . \quad (5)$$

Die Unsicherheit des Messsignals (siehe Bild 2b) wird dominiert durch die Unsicherheit in $\kappa(t) = \kappa$; bei $u(\kappa_1) = 0.000$ beträgt sie nominal 0.5 nA. Die zeitliche Drift des Messsignals wird wiederum rechnerisch korrigiert, somit wird $D = 0$ und $u(D)$ entspricht der Streuung des Messsignals.

Analysefunktion: Aus den gravimetrischen Werten, korrigiert mit der Reinheit der Ausgangsmaterialien [$u = (0.5 \text{ bis } 1.0) \% \text{ rel.}$], und den Messsignalen [$u = (0.2 \text{ bis } 1) \text{ nA}$] der drei Referenzlösungen kann die chemische Aktivität der Testlösung mittels mittenbetonter linearer Regression gemäß ISO Norm 6143 bestimmt werden. Die kombinierte Unsicherheit in der Aktivitätsbestimmung wird dominiert durch die Unsicherheit in κ sowie durch die Unsicherheit der Reinheit der eingesetzten Glukose. Für wässrige Glukoselösungen im physiologischen Bereich beträgt die erweiterte Messunsicherheit zwischen (2 bis 4) % rel.

Literatur:

- [1] Richtlinie 98/79/EC des europäischen Parlamentes und des Rates über In-vitro-Diagnostika, Official Journal of the European Communities 1998, L331, 1-37
- [2] a) B.P. Nikolskij, Fiz. Khim. 1937, 10, 1041, b) J. Ross, Science 1967, 156, 1378. c) B.P. Nikolskij, M. Schulz, A. Belijustin, in Glas Electrodes for Hydrogen and other Cations, editiert von G. Eisenman, M. Dekker, New York, 1967.
- [3] S. Wunderli, H. Andres, Electroanalysis, 2008, 20, 324-330
- [4] F.G. Cottrell, Z. Physik. Chem., 1902, 42, 385.