

1

Phase I: Erstellung eines neuen Analysenverfahrens

1.1

Einführung

1.1.1

Zielsetzung der Phase I

Bevor ein neues, insbesondere kalibrierbedürftiges Analysenverfahren Eingang in die Routineanalytik finden kann, gilt es, nicht nur die einzelnen Verfahrensschritte festzulegen, sondern sie gegebenenfalls zu optimieren und das gesamte analytische Grundverfahren auf seine Leistungsfähigkeit hin zu überprüfen. Die hierbei gewonnenen Leistungsdaten werden gemeinsam mit der Analysenvorschrift dokumentiert und/oder publiziert und bilden die Grundlage für eine spätere Qualitätssicherung in der Routineanalytik.

1.1.2

Wann werden die Kenndaten gewonnen?

Die im Folgenden beschriebenen statistischen Methoden finden in erster Linie ihre Anwendung während der Erstellung eines neuen Analysenverfahrens. Darüber hinaus sind sie geeignet, dem Analytiker während der Erprobung/Einübung eines kalibrierbedürftigen Analysenverfahrens Informationen über die aktuell erreichte Analysenqualität zu geben (s. auch Abschnitt 2.3).

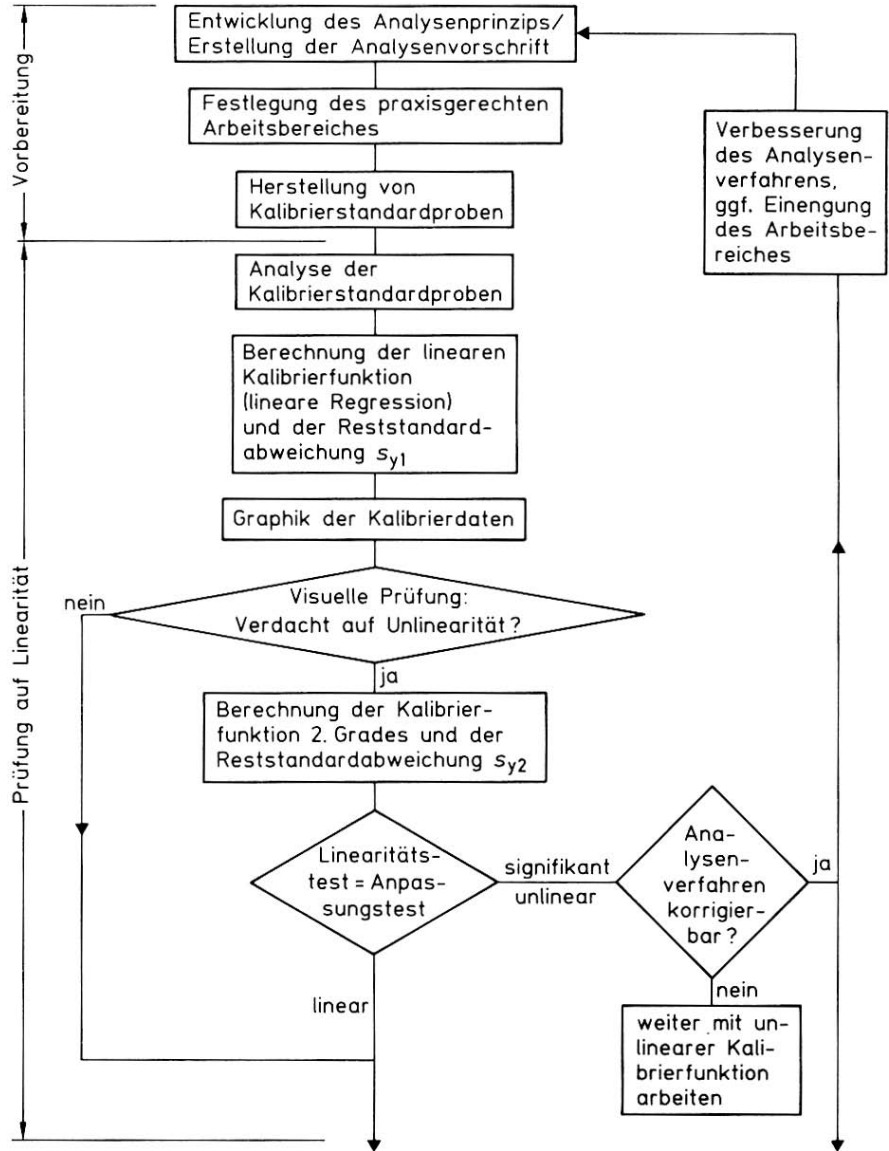
Die Verfahrenskennndaten (lineare Kalibrierfunktion einschließlich Präzisionsmaße) sollten bei jeder Neukalibrierung des Analysenverfahrens neu ermittelt werden, so z. B. nach

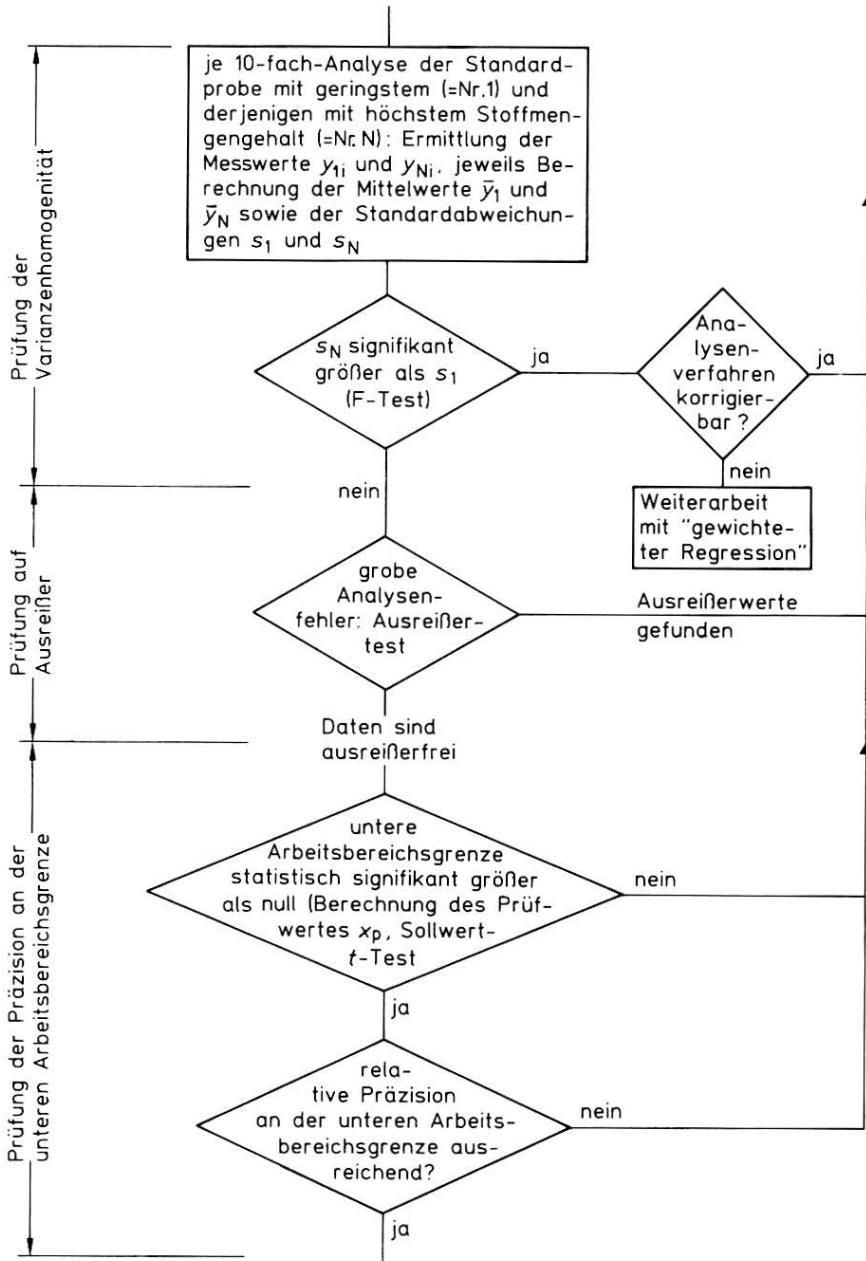
- Reagenzienwechsel (neue Chargen),
- technischen Eingriffen in Analysengeräte (nach technischen Modifikationen, Wartungs- und Instandsetzungsarbeiten, z. B. Lampenwechsel in der Photometrie),
- Personalwechsel,
- usw.

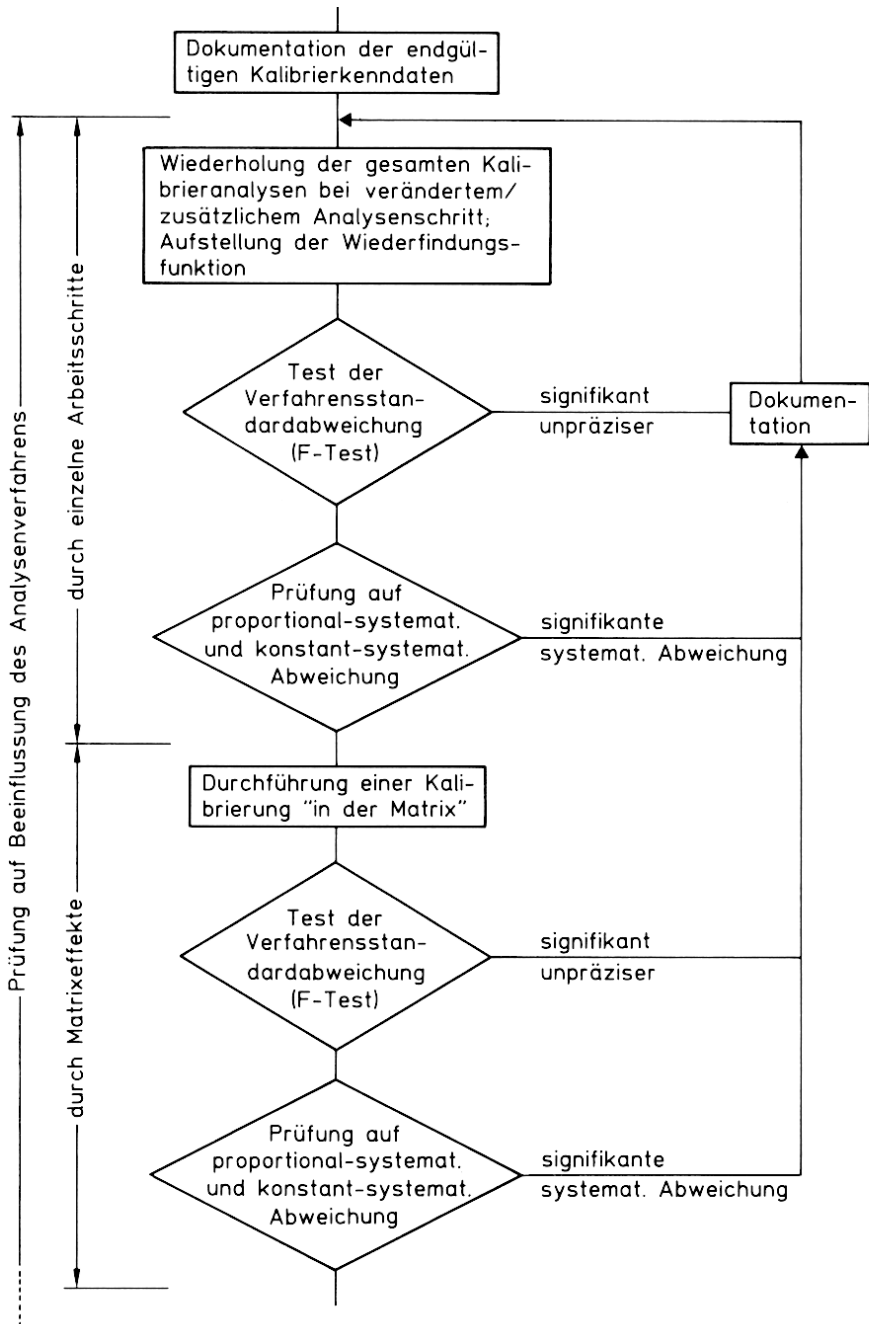
1.1.3

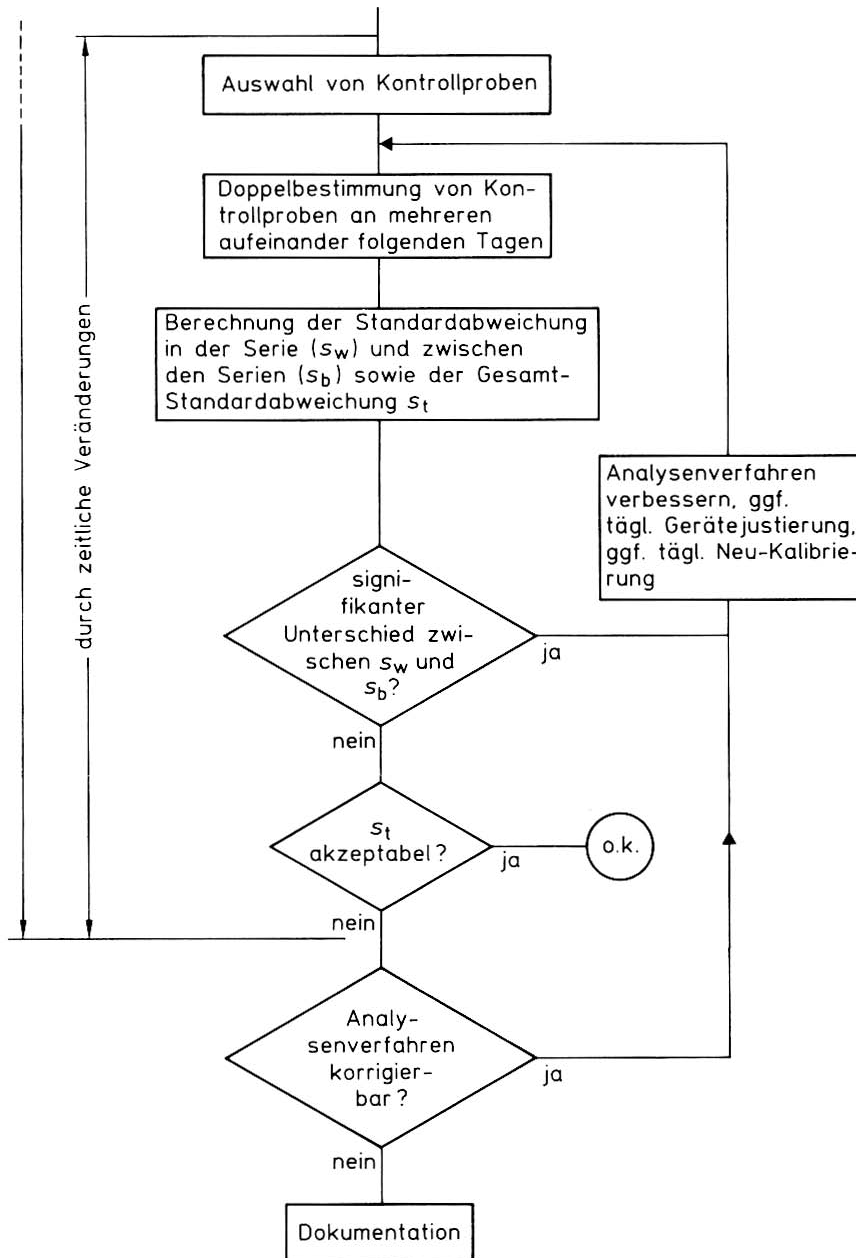
Ablauf der Phase I

Schema 1-1. Arbeitsablauf der Phase I: Ablauf-Diagramm.









Phase I beinhaltet im Wesentlichen die sechs Hauptschritte (s. Schema 1-1):

- Vorbereitung des Kalibrierexperimentes,
- Prüfung auf:
 - Linearität der Kalibrierfunktion,
 - Präzision (Varianzenhomogenität, Ausreißerfreiheit, Absicherung des unteren Arbeitsbereichsendes),
- endgültige Ermittlung der Kalibrierkenndaten,
- Prüfung auf Einfluss von einzelnen Verfahrensschritten oder von Matrixeffekten auf die Kalibrierkenndaten,
- Prüfung auf zeitliche Beeinflussung des Analysenverfahrens.

Von besonderer Bedeutung ist hierbei die gezielte Korrektur des Analysenverfahrens während der Prüfphase, sobald das Ergebnis einer Teilprüfung auf eine nicht akzeptable Qualität der Analytik hinweist. Sind alle Möglichkeiten der Qualitätsverbesserung im Rahmen des Analysenverfahrens ausgeschöpft und haben zu keiner Verbesserung geführt, so kann in den meisten Fällen eine Einengung des Arbeitsbereiches – speziell Reduzierung der gewählten höchsten Stoffmengenkonzentration – zu einer akzeptablen Präzision und zur Linearität der Kalibrierfunktion sowie der geforderten Varianzenhomogenität führen.

1.1.4

Ergebnisse der Phase I; Statistische Kenndaten

Die Phase I der Analytischen Qualitätssicherung liefert grundlegende Qualitätskenndaten für die spätere Routineanalytik.

Hierzu gehören in erster Linie:

- der geprüfte Arbeitsbereich,
- die Koeffizienten der Kalibrierfunktion:
 - im Fall der linearen Kalibrierfunktion 1. Grades ($y = a + bx$): *Achsenabschnitt a* und *Steigung b* (Maß für die Empfindlichkeit des Analysenverfahrens),
 - im Fall der Kalibrierfunktion 2. Grades ($y = a + bx + cx^2$): *Achsenabschnitt a*, Koeffizient *b* des linearen Gliedes sowie der Koeffizient *c* des quadratischen Gliedes; die aus der Funktion abgeleitete *Empfindlichkeit E* des Analysenverfahrens,
- die *Verfahrensstandardabweichung* s_{x_0} als *absolutes* Präzisionsmaß der Kalibrierung und
- der *Verfahrensvariationskoeffizient* V_{x_0} als *relatives* Präzisionsmaß.

Für die allgemeine Beurteilung des Analysenverfahrens werden darüber hinaus die Kenndaten

- *Nachweisgrenze* x_{NG} , als derjenige Stoffmengenanteil, der mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit α (z. B. $\alpha = 5\%$) einen Messwert größer als den Blindwert ergibt,
- *Erfassungsgrenze* x_{EG} , als derjenige Stoffmengenanteil, der mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit β (z. B. $\beta = 5\%$) größer als der Blindwert ist,

- *Bestimmungsgrenze* x_{BG} , als derjenige Stoffmengengehalt, der mit einer maximal zulässigen relativen Ergebnisunsicherheit ermittelt werden kann,
- *Prüfgröße* x_p zur Validierung des praxisgerechten Arbeitsbereiches,
- festgestellte konstant- und/oder proportional-systematische Abweichungen bei bestimmten Matrices sowie Hinweise auf die zeitliche Abhängigkeit der Analysenergebnisse, den Zeitaufwand und sonstige besondere Hinweise

dokumentiert.

1.2

Kalibrierung des analytischen Grundverfahrens (Grundkalibrierung)

Bei einem kalibrierbedürftigen/kalibrierfähigen Analysenverfahren führt die Anwendung des physikalischen Messprinzips nicht direkt zum Analysenergebnis; der erhaltene Messwert stellt lediglich ein physikalisches Messergebnis dar, das über die zuvor empirisch im Rahmen eines Kalibrierexperiments gewonnenen Verfahrenskenndaten in das Analysenergebnis umgerechnet werden muss [101].

Die Verwendung einer *Analysenfunktion*

Analysenergebnis = Funktion des Messwertes

bzw. in kürzerer mathematischer Schreibweise:

$$\hat{x} = f(\hat{y})$$

(mit \hat{y} als Messwert und \hat{x} als Substanzgehalt/Analysenergebnis)

basiert auf der Anwendung der im Kalibrierexperiment gewonnenen *Kalibrierfunktion*

Messwert = Funktion des Substanzgehalts bzw.

$$y = f(x)$$

(mit x = Substanzgehalt der Standardlösung und y = zugehöriger Messwert)

und deren Präzisionskenndaten für die Bestimmung eines unbekanntes Substanzgehaltes in einer Analysenprobe. Die *Kalibrierfunktion* wird hierzu – nach x aufgelöst – zur *Analysenfunktion*, die nach Einsetzen des Messwertes der untersuchten Probe \hat{y} das Analysenergebnis \hat{x} liefert [101].

Eine *Grundkalibrierung* stellt die Kalibrierung des analytischen Grundverfahrens (Analysenprinzip) dar, d.h. hierbei werden keine Probenaufbereitungsschritte wie Extraktion oder Aufschluss durchgeführt, sondern lediglich Standards in reinem Lösungsmittel (z. B. destilliertes Wasser) analysiert.

1.2.1

Festlegung des Arbeitsbereichs

Jede Kalibrierung beginnt mit der Wahl eines vorläufigen Arbeitsbereiches. Dieser richtet sich nach

- a) dem praxisbezogenen Anwendungsziel.
Er soll einen größeren Anwendungsbereich weitgehend abdecken. Außerdem soll die Arbeitsbereichsmittle etwa gleich der häufigst zu erwartenden Probenkonzentration sein, wenn dies im Einzelfall realisierbar ist.
- b) den technisch realisierbaren Möglichkeiten.
 - b1) Die Messwerte an der unteren Arbeitsbereichsgrenze müssen sich von den Messwerten des Verfahrensblindwertes signifikant unterscheiden. Eine untere Arbeitsbereichsgrenze ist nur dann sinnvoll, wenn sie mindestens gleich oder größer der *Erfassungsgrenze* (s. Abschnitt 1.3.2) dieses Verfahrens ist. Außerdem sollen Verdünnungs- und Konzentrierungsschritte bequem und fehlerfrei realisierbar sein.
 - b2) Die geforderte Analysenpräzision muss im gesamten Arbeitsbereich erreichbar sein (vgl. auch „Bestimmungsgrenze“, Abschnitt 1.3.3). Da mit zunehmendem Stoffmengengehalt die Analysenunpräzision (absolut) zunimmt, ist darauf zu achten, dass der jeweils betrachtete Arbeitsbereich nicht zu groß gewählt wird. Ist für die Routineanalytik insgesamt ein weiter Arbeitsbereich erforderlich, so sollte dieser in überlappende Teilbereiche aufgeteilt werden.

Für die Anwendbarkeit der einfachen linearen Regressionsrechnung wird weiterhin gefordert:

- b3) Die Analysenpräzision muss über den Arbeitsbereich konstant sein [151] (Homogenität der Varianzen). Bei Nichtbeachtung einer vorliegenden Varianzeninhomogenität ergibt sich eine starke Erhöhung der Messunsicherheit für die folgenden, mit der Kalibrierfunktion ermittelten Analyseergebnisse (s. Abschnitt 1.2.4.2.1).
- b4) Zwischen Substanzgehalt und Messwert muss ein linearer Zusammenhang vorliegen (Linearität der Kalibrierfunktion s. Abschnitt 1.2.4.1).

Bei Varianzeninhomogenität oder Unlinearität ist entweder der gewählte Arbeitsbereich so weit zu verkleinern, bis diese Bedingungen erfüllt sind, oder es sind aufwändigere Kalibrierungsmodelle zu wählen, z. B. Regressionsfunktion höheren Grades (s. Abschnitt 1.2.3.2) [72, 79], gewichtete Regressionsrechnung [16, 159].

1.2.2

Vorbereitung der Standardproben

Anforderungen an eine Standardprobe:

- Reinheit, Matrixfreiheit bzw. definierte Matrix,
- Homogenität,
- Repräsentativität: Die zu analysierende Substanz muss in der Standardprobe in vergleichbarer Art vorliegen wie in den später zu erwartenden Analysenproben, d. h.
 - chemisch ähnliche Verbindung,
 - gleiche Oxidationsstufe, etc.

- Haltbarkeit, Konservierbarkeit,
- Aufbewahrung: keine Probenbeeinflussung durch Gefäße, äußere Bedingungen.

Herstellung der Standardproben:

- Bei der Herstellung von Standardproben muss die Präzision von Waage und Volummessgerät mitberücksichtigt werden. Dabei ist die Wägung die genaueste Form der Probenvorgabe und daher dem Abmessen von Volumina vorzuziehen [107]. Diese Geräte müssen regelmäßig auf ihre ordnungsgemäße Funktion überprüft und kalibriert werden.
- Es sollten insbesondere keine sukzessiven Verdünnungen erfolgen, da hierbei das Risiko der Fehlerfortpflanzung besteht.

Nach der Festlegung des vorläufigen Arbeitsbereiches werden $N = 5 \dots 10$ Standardproben so angesetzt, dass deren Konzentrationen möglichst äquidistant über den gewählten Arbeitsbereich verteilt liegen.

1.2.3

Ermittlung der Kalibrierfunktion und der Verfahrenskennndaten

Aus den für diese Standardproben ermittelten Messwerten werden die vorläufigen Kalibrierfunktionen 1. und 2. Grades berechnet, deren Verfahrenskennndaten für weitere statistische Tests benötigt werden.

Anmerkungen:

1. Aus Gründen der Übersichtlichkeit werden im Folgenden die physikalischen Einheiten von Messsignalen, Konzentrationen, statistischen Kennzahlen während des Rechenganges weggelassen und erst dem Endergebnis wieder hinzugefügt. Die Plausibilität der physikalischen Einheit eines Ergebniswertes lässt sich jedoch bei Bedarf durch eine *Dimensionsanalyse* überprüfen.

Beispiel:

Steigung der linearen Kalibrierfunktion:

Substanzgehalt x : mg/l

Messwert: Peakhöhe y : mm

Steigung der Kalibrierfunktion:

$$[\text{Peakhöhe pro Substanzgehalt}] = \frac{\text{mm}}{\text{mg/l}}$$

Überprüfung anhand der Berechnungsformel:

$$\text{Steigung} = \frac{\sum (x_i - \bar{x}) \cdot (y_i - \bar{y})}{\sum (x_i - \bar{x})^2}$$

$$= \frac{\sum \left\{ \frac{\text{mg}}{1} \cdot \text{mm} \right\}}{\sum \left\{ \left(\frac{\text{mg}}{1} \right)^2 \right\}}$$

$$\begin{aligned}
 &= \frac{\left\{ \frac{\text{mg}}{\text{l}} \cdot \text{mm} \right\}}{\left\{ \frac{\text{mg}}{\text{l}} \cdot \frac{\text{mg}}{\text{l}} \right\}} \\
 &= \left\{ \frac{\text{mm}}{\text{mg/l}} \right\} \quad \text{q.e.d.}
 \end{aligned}$$

2. Bei den Summenzeichen (Σ) werden in der Regel die Laufindex-Angaben weggelassen. In diesen Fällen bildet „i“ den Index und läuft von 1 bis N.

Beispiel: $\Sigma (x_i - \bar{x})^2$ entspricht $\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2$

1.2.3.1 Verfahrenskenndaten der linearen Kalibrierfunktion

Die Regressionsanalyse liefert die Kalibrierfunktion (s. Abb. 1-1) mit den Verfahrenskenndaten.

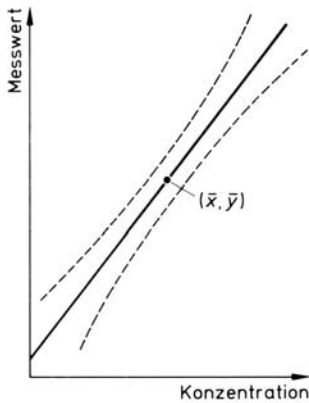


Abb. 1-1. Lineare Kalibrierfunktion ($y = a + bx$) mit Prognoseintervall.

Steigung (Maß für die Empfindlichkeit):

$$b = \frac{\sum [(x_i - \bar{x}) \cdot (y_i - \bar{y})]}{\sum (x_i - \bar{x})^2} \quad (1)$$

Achsenabschnitt:

$$a = \bar{y} - b\bar{x} \quad \text{mit} \quad \bar{x} = \frac{1}{N} \cdot \sum x_i \quad (2)$$

$$\bar{y} = \frac{1}{N} \cdot \sum y_i$$

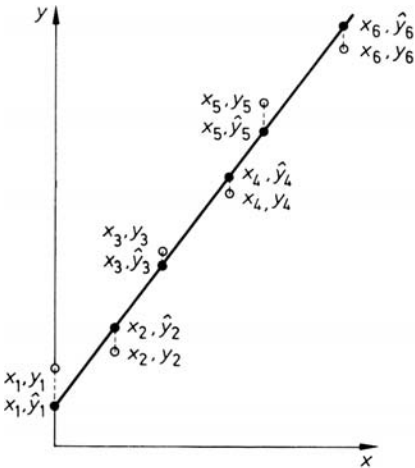


Abb. 1-2. Streuung der Messwerte \circ um die Regressionsgerade.

Reststandardabweichung (Streuung der Messwerte um die Regressionsgerade; s. Abb. 1-2):

$$s_y = \sqrt{\frac{\sum (y_i - \hat{y}_i)^2}{N - 2}} \quad \text{mit} \quad \hat{y}_i = a + bx_i \quad (3)$$

Verfahrensstandardabweichung:

$$s_{x_0} = \frac{s_y}{b} \quad (4)$$

Verfahrensvariationskoeffizient = relative Verfahrensstandardabweichung:

$$V_{x_0} = \frac{s_{x_0}}{\bar{x}} \cdot 100 (\%) \quad (5)$$

1.2.3.2 Verfahrenskenndaten der Kalibrierfunktion 2. Grades

Die Regressionsanalyse liefert hier die Kalibrierfunktion 2. Grades (s. Abb. 1-3) mit ihren Verfahrenskenndaten [72].

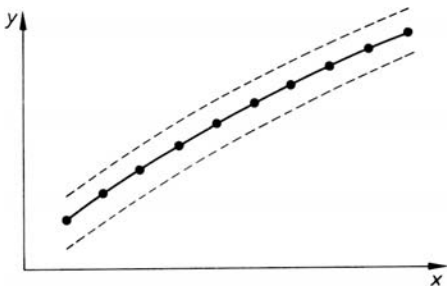


Abb. 1-3. Kalibrierfunktion 2. Grades ($y = a + bx + cx^2$).

Funktionskoeffizienten a , b , c :

$$a = \frac{1}{N} \left(\sum y_i - b \cdot \sum x_i - c \cdot \sum x_i^2 \right) \quad (6)$$

$$b = \frac{Q_{xy} - c \cdot Q_{x^3}}{Q_{xx}} \quad (7)$$

$$c = \frac{Q_{xy} \cdot Q_{x^3} - Q_{x^2y} \cdot Q_{xx}}{(Q_{x^3})^2 - Q_{xx} \cdot Q_{x^4}} \quad (8)$$

$$Q_{xx} = \sum x_i^2 - \left(\left(\sum x_i \right)^2 / N \right) \quad (9)$$

$$Q_{xy} = \sum (x_i y_i) - \left(\left(\sum x_i \right) \cdot \left(\sum y_i \right) / N \right) \quad (10)$$

$$Q_{x^3} = \sum x_i^3 - \left(\left(\sum x_i \right) \cdot \left(\sum x_i^2 \right) / N \right) \quad (11)$$

$$Q_{x^4} = \sum x_i^4 - \left(\left(\sum x_i^2 \right)^2 / N \right) \quad (12)$$

$$Q_{x^2y} = \sum (x_i^2 \cdot y_i) - \left(\left(\sum y_i \right) \cdot \left(\sum x_i^2 \right) / N \right) \quad (13)$$

Reststandardabweichung:

$$s_y = \sqrt{\frac{\sum (y_i - \hat{y}_i)^2}{N - 3}} \quad \text{mit} \quad \hat{y}_i = a + bx_i + cx_i^2 \quad (14)$$

Empfindlichkeit E :

Das Maß für die Empfindlichkeit ergibt sich aus der Änderung des Messwertes bei einer Änderung des Konzentrationswertes. Liegt für das Analysenverfahren eine lineare Kalibrierfunktion vor, so ist die Empfindlichkeit im gesamten Arbeitsbereich konstant und entspricht dem Regressionskoeffizienten b [72]. Im Falle einer gekrümmten Kalibrierfunktion ist die Empfindlichkeit jedoch abhängig vom jeweiligen Konzentrationswert und entspricht der ersten Ableitung der Kalibrierfunktion:

$$E(x) = b + 2c \cdot x \quad (15)$$

Als Verfahrenskenngröße empfiehlt es sich, die Empfindlichkeit in der Arbeitsbereichsmittle anzugeben:

$$E(\bar{x}) = b + 2c \cdot \bar{x} \quad (16)$$

Hieraus lassen sich auch die Verfahrensstandardabweichung und die relative Verfahrensstandardabweichung ableiten:

Verfahrensstandardabweichung: $s_{x_0} = \frac{s_y}{E(\bar{x})}$ Relative Verfahrensstandardabweichung: $V_{x_0} = \frac{s_{x_0} \cdot 100\%}{\bar{x}}$ (17)

1.2.3.3 Berechnung des Analyseergebnisses mit Hilfe der Kalibrierfunktionen

1.2.3.3.1 Ergebnisangabe bei Verwendung der linearen Kalibrierfunktion

Analyseergebnis und Vertrauensbereich berechnen sich unter Verwendung der linearen Kalibrierfunktion zu

$$\begin{aligned} \text{Ergebnis} &= \hat{x} \pm VB(\hat{x}) \\ &= \frac{\hat{y} - a}{b} \pm s_{x_0} \cdot t(P = 95\%, f = N_c - 2) \cdot \sqrt{\frac{1}{N_c} + \frac{1}{N_a} + \frac{(\hat{y} - \bar{y})^2}{b^2 \cdot Q_{xx}}} \end{aligned} \quad (18)$$

mit \hat{y} = Mittelwert aus N_a -Mehrfach-Messwerten (N_a kann auch = 1 sein) und den Kenndaten aus der linearen Kalibrierung:

- a = Achsabschnitt
- b = Steigung
- s_{x_0} = Verfahrensstandardabweichung
- N_c = Anzahl der Kalibrierstandards
- Q_{xx} = Summe $(x_i - \bar{x})^2$

Beispiel:

1. Kalibrierkenndaten der Nitritbestimmung

i	x_i [mg/l]	y_i [Ext.]
1	0,05	0,140
2	0,10	0,281
3	0,15	0,405
4	0,20	0,535
5	0,25	0,662
6	0,30	0,789
7	0,35	0,916
8	0,40	1,058
9	0,45	1,173
10	0,50	1,303

- \bar{x} = 0,275 [mg/l]
- \bar{y} = 0,726 [Ext.]
- a = 0,018 [Ext.]
- b = 2,575 [Ext./(mg/l)]
- s_{x_0} = 0,0020 [mg/l]
- N_c = 10
- Q_{xx} = 0,20625 [(mg/l)²]

2. Analyseergebnis

Der Messwert einer unbekannt Probe beträgt $\hat{y} = 0,641$ [Ext.].

Nach Gl. (18) errechnet sich das Analyseergebnis mit dem 95%-Prognoseintervall [$t(f=8, P=95\%) = 2,31$]:

$$\hat{x}_{1,2} = \frac{0,641 - 0,018}{2,575} \pm 0,0020 \cdot 2,31 \sqrt{\frac{1}{10} + \frac{1}{1} + \frac{(0,641 - 0,7262)^2}{2,575^2 \cdot 0,20625}} \text{ [mg/l]}$$

$$\hat{x}_{1,2} = 0,24 \pm 0,005 \text{ [mg/l]} \text{ (bei } P = 95\%, f = 8)$$

1.2.3.3.2 Ergebnisangabe bei Verwendung der linearen Kalibrierfunktion 2. Grades

Analyseergebnis und Vertrauensbereich berechnen sich unter Verwendung der linearen Kalibrierfunktion 2. Grades zu

$$\text{Ergebnis bei negativer Krümmung: } \hat{x} = -\frac{b}{2c} - \sqrt{\left(\frac{b}{2c}\right)^2 - \frac{a - \hat{y}}{c}}$$

$$\text{Ergebnis bei positiver Krümmung: } \hat{x} = -\frac{b}{2c} + \sqrt{\left(\frac{b}{2c}\right)^2 - \frac{a - \hat{y}}{c}}$$

mit

$$\text{VB}(\hat{x}) = \frac{s_y \cdot t}{(b + 2c\hat{x})} \cdot \sqrt{\frac{1}{N_c} + \frac{1}{N_a} + \frac{1}{Q_{x^4} \cdot Q_{xx} - (Q_{x^3})^2} \cdot \left\{ (\hat{x} - \bar{x})^2 Q_{x^4} + \left(\hat{x}^2 - \frac{\sum x_i^2}{N_c} \right)^2 Q_{xx} - 2 \cdot (\hat{x} - \bar{x}) \cdot \left(\hat{x}^2 - \frac{\sum x_i^2}{N_c} \right) \cdot Q_{x^3} \right\}} \quad (19)$$

Beispiel:

1. Kalibrierdaten

i	x_i [mg/l]	y_i [Ext.]
1	12	0,083
2	18	0,123
3	24	0,164
4	30	0,203
5	36	0,240
6	42	0,273
7	48	0,303
8	54	0,334
9	60	0,364
10	66	0,393

$$\begin{aligned} \bar{x} &= 39 \text{ [mg/l]} \\ a &= 0,00562 \text{ [Ext.]} \\ b &= 0,00767 \text{ [Ext./[mg/l]} \\ c &= -0,000025 \text{ [Ext./[mg/l]^2]} \\ s_y &= 0,00148 \text{ [Ext.]} \\ s_{x_0} &= 0,258617 \text{ [mg/l]} \\ N_c &= 10 \\ Q_{xx} &= 2970 \text{ [(mg/l)^2]} \\ Q_{x^3} &= 231660 \text{ [(mg/l)^3]} \\ Q_{x^4} &= 18753770 \text{ [(mg/l)^4]} \end{aligned}$$

2. Analyseergebnis

Der Messwert einer unbekannt Probe beträgt $\hat{y} = 0,223$ [Ext.]. Nach Gl. (19) errechnet sich das Analyseergebnis

$$\hat{x} = 33,46 \text{ [mg/l]}$$

Entsprechend wird das 95%-Prognoseintervall mit $t(f=7, P=95\%) = 2,36$ berechnet:

$$VB(\hat{x}) = \pm 0,643 \text{ [mg/l]}$$

1.2.4

Überprüfung der Grundkalibrierung

1.2.4.1 Überprüfung der Linearität

Nach Möglichkeit sollte mit einer linearen Kalibrierfunktion 1. Grades gearbeitet und nur in begründeten Ausnahmefällen die lineare Kalibrierung 2. Grades angewendet werden.

1.2.4.1.1 Visueller Linearitätstest

Die Ermittlung des Kalibrierfunktionstyps erfolgt im einfachsten Fall durch graphische Darstellung der Kalibrierdaten, einschließlich Kalibriergeraden und eine subjektive Beurteilung. Ergibt sich dabei eine offensichtliche Unlinearität mit hoher Präzision der Messwerte (s. Abb. 1-4), so kann auf einen gesonderten statistischen Linearitätstest verzichtet werden. In Zweifelsfällen sollte jedoch die Linearität rechnerisch überprüft werden.

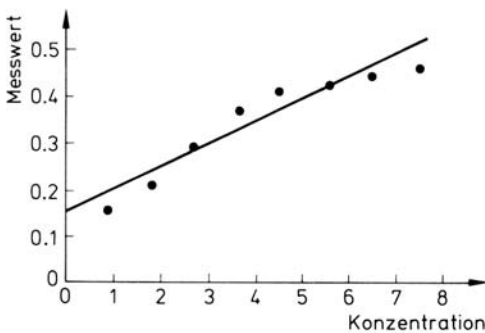


Abb. 1-4. Visueller Linearitätstest.

1.2.4.1.2 Anpassungstest nach Mandel

Zur rechnerischen Prüfung auf Linearität wird der Anpassungstest nach Mandel [47, 151, 190] empfohlen.

Der Test geht von der Annahme aus, dass die relativ großen Abweichungen der Messwerte von der Geraden durch Unlinearität verursacht sind und bei Wahl eines

„besseren“ Regressionsmodells – hier 2. Grades – signifikant verringert werden können.

Hierzu werden die lineare Kalibrierfunktion 1. Grades $y = a + bx$ und die Kalibrierfunktion 2. Grades $y = a + bx + cx^2$, einschließlich der jeweils zugehörigen Reststandardabweichung s_y (s. Abschnitte 1.2.3.1 und 1.2.3.2), herangezogen.

Aus den Reststandardabweichungen s_{y_1} (der linearen Kalibrierfunktion 1. Grades) und s_{y_2} (der Kalibrierfunktion 2. Grades) wird die Differenz der Varianzen DS^2 berechnet:

$$DS^2 = (N - 2) s_{y_1}^2 - (N - 3) s_{y_2}^2 \quad \text{mit dem Freiheitsgrad } f = 1 \quad (20)$$

Für den F -Test wird der Prüfwert PW berechnet:

$$PW = \frac{DS^2}{s_{y_2}^2} \quad (21)$$

und mit dem Tabellenwert F ($f_1 = 1, f_2 = N - 3, P = 99\%$) verglichen.

Falls $PW \leq F$ wird durch die Kalibrierfunktion 2. Grades *keine* signifikant bessere Anpassung erreicht; die Kalibrierfunktion ist linear.

Ist $PW > F$, so sollten zunächst die Einzelschritte des Analysenverfahrens geprüft und falls möglich verbessert werden. Ist danach keine Linearität zu erreichen (z. B. aufgrund der physikalisch-chemischen Gesetzmäßigkeiten), so sollte durch Einengung des Arbeitsbereiches versucht werden, eine ausreichende Linearität zu erhalten. Als letzte Möglichkeit bleibt die künftige Auswertung der Messwerte über die Kalibrierfunktion 2. Grades (s. Abschnitt 1.2.3.2). Alternativ zum Anpassungstest nach Mandel kann auch die Residualanalyse zur Überprüfung der Linearität herangezogen werden.

1.2.4.1.3 Residualanalyse

Eine weitere Möglichkeit zu prüfen, ob der gewählte funktionale Ansatz des Kalibriermodells die Messergebnisse hinreichend beschreibt, ist die Residualanalyse [113].

Dabei ergeben sich die Residuen d_i als vertikale Abstände der Messwerte von der Regressionskurve (s. Abb. 1-2)

$$d_i = y_i - \hat{y}_i \quad \text{für } i = 1, \dots, n$$

mit y_i = Messwert und \hat{y}_i = zu y_i gehöriger Schätzwert (aus der Regressionsfunktion)

Die Residuen d_i sind normalverteilt [69, 113], falls der gewählte Modellansatz richtig ist (s. Abb. 1-5 a). Weisen die Residuen jedoch einen Trend auf (s. Abb. 1-5 b–d), so ist der zugrunde gelegte Regressionsansatz zu überprüfen; z. B. müsste für den Fall (d) in Abb. 1-5 eine Funktion 2. Grades berechnet werden.

Bei der graphischen Darstellung der Residuen können z. B. die in Abb. 1-5 gezeigten Fälle auftreten.

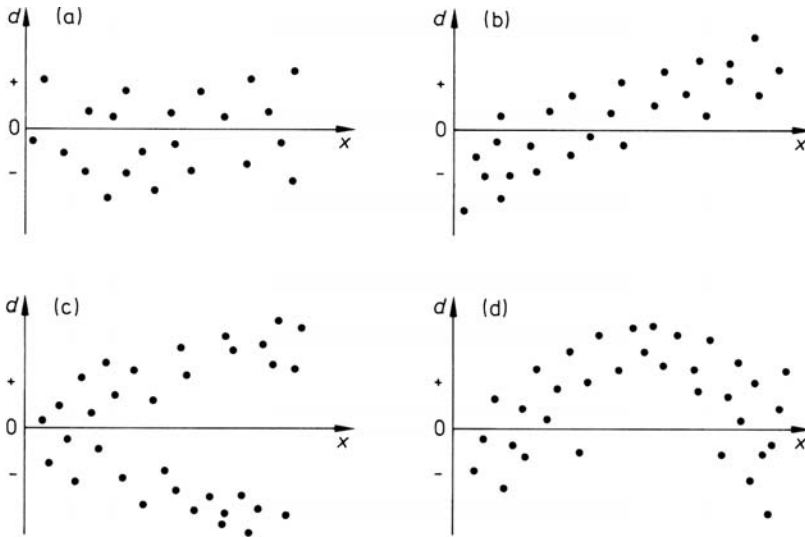


Abb. 1-5. Graphische Darstellung der Residuen in Abhängigkeit von den Konzentrationen x :

- a) idealer Verlauf, d. h. richtiger Modellansatz,
- b) linearer Trend, evtl. falscher Ansatz oder Rechenfehler,
- c) ansteigende Varianzen, d. h. Varianzeninhomogenität,
- d) nicht-linearer Verlauf, da falsche Regressionsfunktion gewählt.

1.2.4.2 Überprüfung der Präzision

1.2.4.2.1 Varianzenhomogenität

Die beschriebene lineare Regressionsrechnung geht von einer konstanten (homogenen) Unpräzision (Varianz der Messwerte) über den Arbeitsbereich aus.

Varianzeninhomogenität führt nicht nur zu einer höheren Unpräzision (s. Abb. 1-6), sondern durch mögliche Veränderung der Geradensteigung auch zu einer höheren Ungenauigkeit. Zur Überprüfung der Varianzenhomogenität werden jeweils zehn Standardproben der niedrigsten (x_1) sowie der höchsten (x_N) Konzentration des vorläufigen Arbeitsbereiches getrennt analysiert.

Man erhält $2n$ ($n = 10$) Messwerte (y_{ij}) aus diesen Messserien. Für beide Datensätze werden die Varianzen s_1^2 und s_N^2 berechnet:

$$s_i^2 = \frac{\sum (y_{ij} - \bar{y}_i)^2}{n_i - 1} \quad (\text{für } i = 1 \text{ und } i = N, \text{ bei jeweils } j \text{ von } 1 \text{ bis } 10) \quad (22)$$

Die Varianzen der beiden Messwertserien werden mittels F -Test auf Homogenität überprüft:

$$PW = \frac{s_N^2}{s_1^2} \quad (23)$$

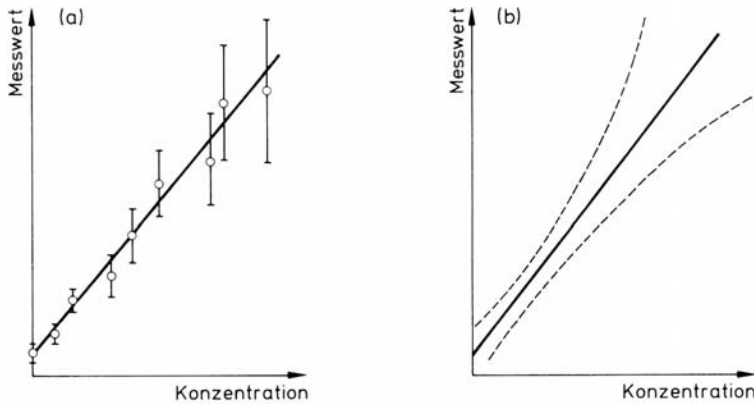


Abb. 1-6. Inhomogenität der Varianzen.

- a) Mittelwerte und Vertrauensbereiche der Messergebnisse (Mehrfachanalyse der Standards),
- b) resultierende Prognosebänder.

Für den Fall, dass der F -Test einen signifikanten Unterschied der Varianzen anzeigt, d. h. $PW > F(f_1 = 9, f_2 = 9, P = 99\%)$ ist, gibt es drei Möglichkeiten für die weitere Vorgehensweise:

1. Wahl eines engeren Arbeitsbereichs und erneute Überprüfung der Varianzenhomogenität (*empfohlene Vorgehensweise*). Eine typische Ursache für eine Varianzeninhomogenität liegt beispielsweise in einer Umschaltung des Messgerät-Anzeige- oder -Verstärkungsbereichs innerhalb des Arbeitsbereichs. Durch das Umschalten verändert sich allein der Anzeigefehler um den Faktor 10.
2. Anwendung der gewichteten Regression [159].
3. Multiple-Curve-Fitting [160].

1.2.4.2.2 Ausreißertest

Kalibrierdaten müssen grundsätzlich ausreißerfrei sein. Ausreißerverdächtige Werte können mittels verschiedener Ausreißertests überprüft werden [149]. Vorher muss in jedem Fall das geeignete Regressionsmodell ermittelt werden (s. Abschnitt 1.2.4.1), da bei der Anwendung des Ausreißertests die Richtigkeit des gewählten Regressionsansatzes vorausgesetzt wird.

Die Residualanalyse (s. Abschnitt 1.2.4.1.3) kann auch zum Nachweis von Ausreißern bei der Kalibrierung herangezogen werden [115].

Dazu wird zunächst aus allen Wertepaaren die Kalibriergerade mit der Reststandardabweichung berechnet.

Die Vorauswahl potenzieller Ausreißer erfolgt rechnerisch durch Ermittlung der Residuen ($y_i - \hat{y}_i$; s. Abb. A5; Anhang A1.2.4) und eventuell durch deren graphische Darstellung. Potenzieller Ausreißer ist jedes Wertepaar mit auffällig großem Residuum. Nach Eliminierung des verdächtigen Ausreißerpaars (x_A, y_A) aus dem Datenkollektiv wird eine neue Kalibriergerade mit der Reststreuung $s_{y_{A2}}$ berechnet.

Die Prüfung erfolgt wahlweise mit dem F -Test oder mit dem t -Test. Beide Methoden ergeben übereinstimmende Resultate.

F -Test: Die Reststreuungen $s_{y_{A1}}$ und $s_{y_{A2}}$ der beiden Geraden werden auf signifikanten Unterschied überprüft.

Man berechnet den Prüfwert

$$PW = \frac{(N_{A1} - 2) s_{y_{A1}}^2 - (N_{A2} - 2) s_{y_{A2}}^2}{s_{y_{A2}}^2} \quad (24)$$

und vergleicht ihn mit dem Tabellenwert $F(f_1 = 1, f_2 = N_{A2} - 2, P = 99\%)$.

Bei $PW < F$ liegt mit 1% Irrtumswahrscheinlichkeit kein Ausreißer vor und die eliminierten Werte werden dem Datenkollektiv wieder zugefügt.

t -Test: Für die Anwendung des t -Tests wird der Prognosebereich der zweiten Regressionsgeraden (nach Ausreißereliminierung) für die Konzentration x_A berechnet und überprüft, ob der potenzielle Ausreißerwert innerhalb dieses Prognosebandes liegt. Ist dies der Fall, so muss der eliminierte Wert wieder ins Datenkollektiv aufgenommen werden.

Berechnung des Prognosebereichs:

$$\begin{aligned} VB(\hat{y}_A) &= \hat{y}_A \pm t \cdot s_{y_{A2}} \cdot \sqrt{1 + \frac{1}{N_{A2}} + \frac{(x_A - \bar{x})^2}{\sum x_i^2 - \frac{1}{N_{A2}} (\sum x_i)^2}} \\ &= a_2 + b_2 \cdot x_A \pm t \cdot s_{y_{A2}} \cdot \sqrt{1 + \frac{1}{N_{A2}} + \frac{(x_A - \bar{x})^2}{\sum x_i^2 - \frac{1}{N_{A2}} (\sum x_i)^2}} \end{aligned} \quad (25)$$

t Tabellenwert der t -Verteilung ($P = 95\%$, $f = N_{A2} - 2$, zweiseitig)

$N_{A2} = N - 1$ (N = ursprüngliche Anzahl der Kalibrierdatenpaare)

x_A Standardkonzentration des eliminierten Ausreißer-Messwertes

\bar{x} Mittelwert aller x_i (ohne x_A)

Hinweis:

Wird mit Hilfe des F - bzw. t -Tests ein Ausreißer statistisch nachgewiesen, so muss als unabdingbare Forderung die Fehlerursache gesucht und eliminiert werden. So dann ist die gesamte Kalibrierung zu wiederholen.

1.2.4.2.3 Absicherung der unteren Arbeitsbereichsgrenze

Eine Kalibrierfunktion ist nur dann für quantitative Analysen verwendbar, wenn sich alle später mit ihr berechneten Analysenergebnisse signifikant von null unterscheiden. Daher wird geprüft, ob sich die untere Arbeitsbereichsgrenze signifikant von null unterscheidet. Die Berechnungsformeln für den Prüfwert x_p (Abb. 1-7) entsprechen denjenigen zur Ermittlung der Erfassungsgrenze (s. Abschnitt 1.3.2.2).

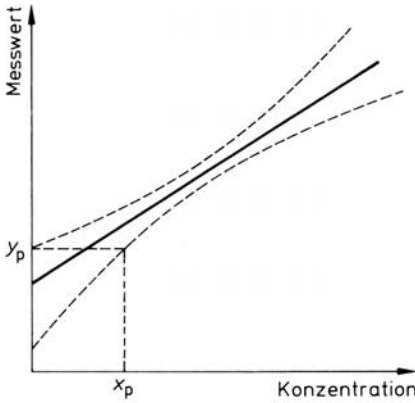


Abb. 1-7. Ermittlung von x_p über den Hilfswert y_p .

$$x_p = 2 \cdot VB_x (y = y_p); \quad \text{mit } t (f = N - 2, P = 95\%, \text{ einseitig}); \quad (26)$$

$$x_p = 2 \cdot \frac{y_p - a}{b} \quad (27)$$

mit

$$y_p = a + s_y \cdot t \cdot \sqrt{\frac{1}{N} + 1 + \frac{\bar{x}^2}{\sum (x_i - \bar{x})^2}} \quad (28)$$

Ist $x_p < x_1$ (s. Abb. 1-8a), so ist der gesamte gewählte Arbeitsbereich statistisch abgesichert, d.h. die untere Grenze des Arbeitsbereichs x_1 unterscheidet sich signifikant von der Konzentration null (s. Abschnitt 1.3.2, Erfassungsgrenze).

Liegt x_p oberhalb von x_1 (s. Abb. 1-8b), dann unterscheidet sich x_1 nicht signifikant von der Konzentration null und der Arbeitsbereich ist somit erst für Konzentrationen $> x_p$ abgesichert. In diesem Fall sind quantitative Analysen überhaupt erst ab

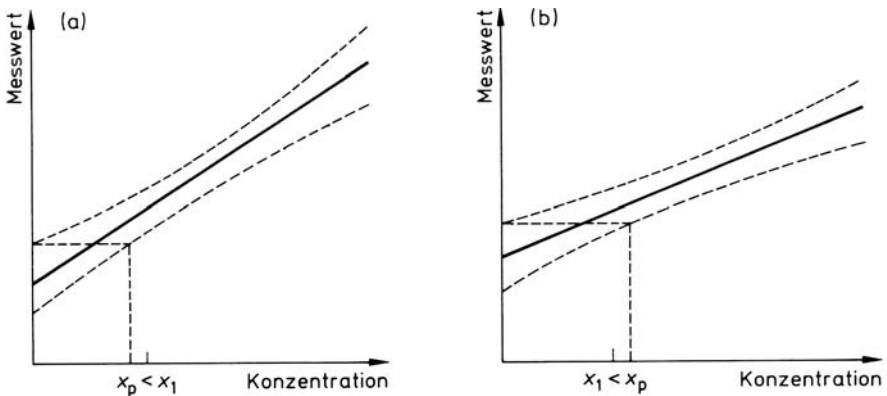


Abb. 1-8. Überprüfung der unteren Arbeitsbereichsgrenze x_1 .
a) $x_p < x_1$, b) $x_p > x_1$.

diesem Konzentrationswert möglich. Für diesen – eingeschränkten – Arbeitsbereich müsste eine vollständige neue Kalibrierung erfolgen. Sinnvoller ist jedoch, zunächst das Analysenverfahren bzw. einzelne Verfahrensschritte zu überprüfen und zu verbessern.

1.2.4.2.4 Relative analytische Unpräzision

Ist für die Analyse des gesuchten Parameters eine Mindestpräzision $VB_{\text{rel,zulässig}}$ gefordert, so ist *die relative Analysenpräzision* am unteren Arbeitsbereichsende (x_1) zu prüfen:

$$VB(x_1) = s_{x_0} \cdot t \cdot \sqrt{\frac{1}{N} + 1 + \frac{(x_1 - \bar{x})^2}{\sum (x_i - \bar{x})^2}} \quad (29)$$

$$VB_{\text{rel}}(x_1) = \frac{VB(x_1)}{x_1} \cdot 100 (\%) \quad (30)$$

Ist $VB_{\text{rel}}(x_1)$ größer als $VB_{\text{rel,zulässig}}$, so ist entweder die analytische Präzision zu verbessern (Optimierung einzelner Verfahrensschritte) oder die untere Arbeitsbereichsgrenze muss erhöht werden.

1.3

Analysen bei geringen Stoffmengengehalten

Bei den meisten Analysenverfahren verbessert sich zwar die absolute Präzision der Messwerte bzw. Analysenergebnisse mit abnehmender Konzentration des betreffenden Bestandteils. Dennoch ist es in extrem niedrigen Konzentrationsbereichen (Spurenanalytik) häufig problematisch, das Messsignal einer Probe vom Messsignal einer Blindprobe signifikant zu unterscheiden oder mit ausreichender Präzision eine quantitative Aussage zu treffen.

Wird bei einer Analyse ein geringfügig über null liegender Messwert gewonnen, so sind zwei konträre Interpretationen möglich:

- Die Probe enthält die gesuchte Substanz nicht; der Messwert ist lediglich auf die Unpräzision des Analysenverfahrens zurückzuführen und somit dem Streubereich des Blindwertes zuzuordnen.
- Die gesuchte Substanz ist in der Probe tatsächlich vorhanden; wiederholte Analysen würden in diesem Fall einen Analysenmittelwert ergeben, in dessen Streubereich der erste – in Frage gestellte – Messwert liegt.

Bei bekannter Analysenpräzision (Standardabweichung) kann für jeden Messwert sowohl die Wahrscheinlichkeit einer Zugehörigkeit zu den Blindmesswerten berechnet werden als auch die Wahrscheinlichkeit, zu einem existenten Stoffmengenanteil zu gehören. Als Entscheidungskriterium für oder wider wird die jeweilige Irrtumswahrscheinlichkeit angegeben:

- die Wahrscheinlichkeit, dass die Probe in Wirklichkeit substanzfrei ist, obwohl ein positiver Messwert vorliegt; sie wird als sog. α -Fehler bezeichnet (falsch-positive Entscheidung),
- die Wahrscheinlichkeit, dass die untersuchte Probe die Substanz doch enthält, obwohl das Analysenergebnis als null (Blindwert) angesehen wird; sie wird als sog. β -Fehler bezeichnet (falsch-negative Entscheidung), vgl. Abb. 1-9.

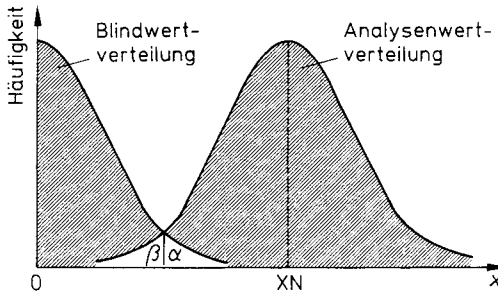


Abb. 1-9. Blindwert- und Analysenwertverteilung mit α - und β -Fehlern.

In der analytischen Praxis lassen sich – bei gegebener Präzision – drei charakteristische Werte mit unterschiedlichem Informationsgehalt definieren:

- die Nachweisgrenze x_{NG} ,
- die Erfassungsgrenze x_{EG} ,
- die Bestimmungsgrenze x_{BG} .

Je nachdem, ob es sich um ein kalibrierfähiges Analysenverfahren handelt oder nicht, wird zwischen zwei unterschiedlichen Vorgehensweisen zur Ermittlung von Nachweis- und Erfassungsgrenze unterschieden (s. Abb. 1-10).

Bei kalibrierfähigen Analysenverfahren werden die Nachweis- und die Erfassungsgrenze aus den Kalibrierdaten abgeleitet. Hierfür wird eine Kalibrierung in einem sehr niedrigen Konzentrationsbereich, der in der Nähe der erwarteten Nachweis-, Erfassungsgrenze und Bestimmungsgrenze liegt, durchgeführt. Dieser Kalibrierbereich erstreckt sich über maximal eine Dekade, damit Varianzenhomogenität gegeben ist. Er liegt üblicherweise deutlich unterhalb des Arbeitsbereiches für die spätere Routineanalytik.

Einige Analysenverfahren, wie z. B. in der Wasseranalytik die Bestimmung des chemischen Sauerstoffbedarfs (CSB) nach DIN 38409-41 [51] oder der adsorbierbaren organischen Halogene (AOX) nach DIN EN 1485 (DEV H14) [59], sind u. a. deswegen nicht kalibrierfähig, weil es keine geeignete, definierte (repräsentative) Standardsubstanz gibt.

In diesen Fällen können weder die Nachweis- noch die Erfassungsgrenze mit Hilfe von Kalibrierdaten berechnet werden. Stattdessen werden diese Kenndaten hier über Wiederholanalysen von Blindproben ermittelt.

Da mit den Kenndaten „Nachweis-, Erfassungsgrenze und Bestimmungsgrenze“ Aussagen über die Leistungsfähigkeit [88] bei der künftigen Anwendung des Analysenverfahrens gemacht werden, geht die Anzahl der künftigen Mehrfachanalysen pro Probe als N_a in ihre Berechnung ein: bei Einfachanalyse ist $N_a = 1$, bei Dreifachanalyse ist $N_a = 3$ usw.

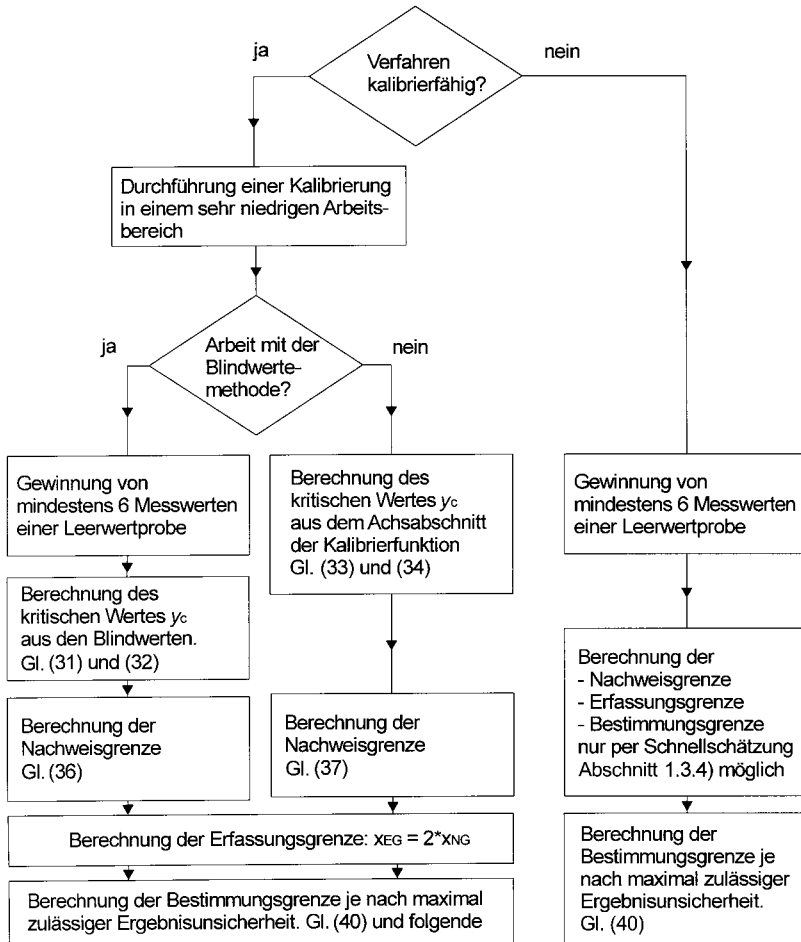


Abb. 1-10. Entscheidungskriterien für die Blindwerte- oder Kalibrierfunktionsmethode.

Die Ermittlung und Auswertung der Blindwerte setzt voraus,

- dass die Bestimmungen von Blindwert und Messwert der Probe unabhängig voneinander sind,
- dass sich der Blindwert auf das gesamte Analysenverfahren (d.h. einschließlich Probenvorbereitung und Messung) bezieht,
- dass die Messwerte der Probe und die zugehörigen Blindwerte einer Normalverteilung unterliegen [190],
- dass das Analyseergebnis, berechnet über die Differenz von Proben-Messwert und Blindwert, ebenfalls einer Normalverteilung folgt und
- dass sich die Blindwertstreuung nicht signifikant von der Streuung der Analyseergebnisse bei niedrigen Konzentrationen unterscheidet.

1.3.1

Nachweisgrenze [34, 120, 132]

Als kritischer Wert der Messgröße γ_c wird der Messwert bezeichnet, für den der β -Fehler – bei einem α -Fehler von 5% – gerade 50% beträgt (Abb. 1-11).

In der Terminologie der Irrtumswahrscheinlichkeiten ausgedrückt bedeutet dieses:

Wird mit dem Informationswert γ_c der Blindwert als überschritten angesehen („Stoff nachgewiesen“), so spricht nur eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha = 5\%$ dagegen. Bei wiederholter Analyse dieser Probe werden jedoch etwa 50% aller Ergebnisse unterhalb von γ_c liegen ($\beta = 50\%$), d.h. die Wahrscheinlichkeit, den Stoff *nicht* nachzuweisen, beträgt 50%!

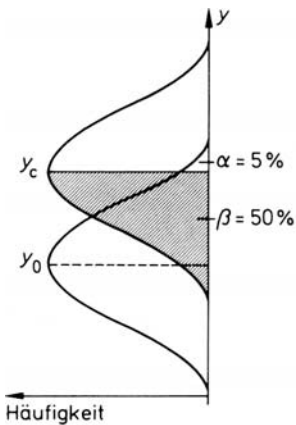


Abb. 1-11. Nachweisgrenze: α -Fehler = 5%, β -Fehler = 50%.

Praktische Ermittlung der Nachweisgrenze x_{NG}

Hierzu wird die Standardabweichung s_L des Blindwertes (Leerwertes) γ_L bzw. die Standardabweichung des Achsabschnittes a der linearen Kalibrierfunktion herangezogen.

Der Standardabweichung sollten mindestens $N_L = 6$ unter Wiederholbedingungen gewonnene Messwerte zugrunde liegen.

Zunächst wird der kritische Wert der Messgröße γ_c berechnet.

Bei der Blindwertmethode setzt er sich zusammen aus dem mittleren Blindwert $\bar{\gamma}_L$ und dem Prognoseintervall für zukünftige Blindwerte $\Delta\bar{\gamma}_L$.

$$\gamma_c = \bar{\gamma}_L + \Delta\gamma_L \quad (31)$$

mit

$$\Delta\bar{\gamma}_L = s_L \cdot t_{f,\alpha} \sqrt{\frac{1}{N_a} + \frac{1}{N_L}} \quad (32)$$

($f = N_L - 1$ Freiheitsgrade)

Bei der Kalibriergeradenmethode ergibt sich der kritische Wert der Messgröße als Summe aus dem Achsabschnitt und dem Prognosebereich des Achsabschnittes

$$y_c = a + \Delta a \quad (33)$$

mit

$$\Delta a = s_y \cdot t_{f,\alpha} \sqrt{\frac{1}{N_a} + \frac{1}{N_c} + \frac{\bar{x}^2}{Q_{xx}}} \quad (34)$$

$$(f = N_c - 2 \text{ Freiheitsgrade})$$

Durch Einsetzen des kritischen Wertes der Messgröße y_c in die Kalibrierfunktion und Auflösen nach x erhält man

$$x_{\text{NG}} = \frac{y_c - a}{b} \quad (35)$$

Bei der Blindwertmethode wird \bar{y}_L anstelle von a eingesetzt. Nach Einsetzen von Gl. (31) und (33) in Gl. (35) erhält man

$$x_{\text{NG}} = \frac{\left(\bar{y}_L + s_L \cdot t_{f,\alpha} \cdot \sqrt{\frac{1}{N_a} + \frac{1}{N_L}} \right) - \bar{y}_L}{b} \quad (36)$$

$$x_{\text{NG}} = \frac{s_L}{b} \cdot t_{f,\alpha} \sqrt{\frac{1}{N_a} + \frac{1}{N_L}} \quad (37)$$

$$(f = N_L - 1 \text{ Freiheitsgrade})$$

Da hier nur die obere Grenze des Streubereichs betrachtet wird, handelt es sich um eine einseitige Fragestellung; dies ist bei der Ermittlung des t -Wertes aus der Tabelle zu berücksichtigen.

Darüber hinaus ist der t -Faktor sowohl von der zulässigen Irrtumswahrscheinlichkeit α als auch vom Freiheitsgrad f abhängig. Aus Gründen der Einheitlichkeit, insbesondere Vergleichbarkeit von Grenzwerten sollte ein α von 5% gewählt werden. Sowohl die Irrtumswahrscheinlichkeit α als auch die Anzahl der Freiheitsgrade ist in jedem Fall mit anzugeben.

1.3.2

Ermittlung der Erfassungsgrenze [34, 120]

Eine quantitative Bestimmung mit Konzentrationsangabe ist erst dann möglich, wenn das Analyseergebnis gleich oder größer als die Erfassungsgrenze (x_{EG}) ist, da erst für dieses Analyseergebnis das geforderte Signifikanzniveau erreicht ist (s. Abb. 1-12) [192].

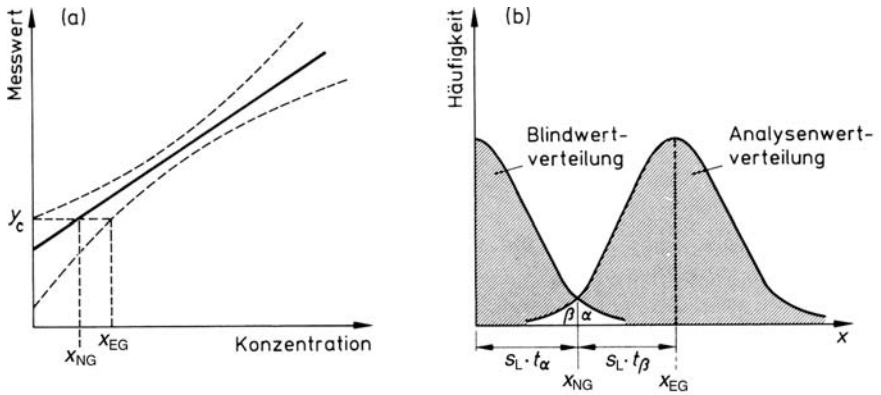


Abb. 1-12. Nachweisgrenze

- a) ermittelt über die Kalibrierfunktion mit zugehörigem Vertrauensbereich,
 b) ermittelt über die Blindwertstreuung; wichtige Annahme: gleiches s !

1.3.2.1 Erfassungsgrenze, ermittelt über die Blindwertstreuung

Die allgemeine Berechnungsformel für die Erfassungsgrenze nach der Blindwertmethode lautet:

$$x_{EG} = x_{NG} + \frac{s_L}{b} \cdot t_{f,\beta} \sqrt{\frac{1}{N_a} + \frac{1}{N_L}} \quad (38)$$

($f = N_L - 1$ Freiheitsgrade)

1.3.2.2 Erfassungsgrenze, ermittelt über die Kalibrierfunktion

Die allgemeine Berechnungsformel für die Erfassungsgrenze nach der Kalibriermethode lautet:

$$x_{EG} = x_{NG} + s_{x_0} \cdot t_{f,\beta} \sqrt{\frac{1}{N_a} + \frac{1}{N_c} + \frac{\bar{x}^2}{Q_{xx}}} \quad (39)$$

($f = N_c - 2$ Freiheitsgrade)

Auch hier handelt es sich um eine einseitige Fragestellung; dies ist bei der Ermittlung des t -Wertes aus der Tabelle zu berücksichtigen.

Der Zahlenwert der Erfassungsgrenze x_{EG} ist ebenso wie der der Nachweisgrenze x_{NG} abhängig von den gewählten Signifikanzniveaus und den Freiheitsgraden.

Für gleiche Signifikanzniveaus α und β ($\alpha = \beta$) folgt

$$t_\alpha = t_\beta = t$$

und damit

$$x_{EG} = 2 x_{NG}$$

1.3.3

Bestimmungsgrenze [34]

Die Bestimmungsgrenze gibt die minimale Stoffmengenkonzentration x an, die mit einer vorgegebenen maximalen relativen Unpräzision bzw. Ergebnisunsicherheit Δx_{rel} gerade noch analysiert werden kann.

Beispiel (grob gerechnet):

- Die ermittelte Ergebnisunsicherheit beträgt $\Delta x = 10 \text{ mg/l}$.
- Gefordert ist eine relative Ergebnisunsicherheit $\frac{\Delta x}{x}$ von maximal 10%,
- Gültige Analysenergebnisse x müssen somit größer oder gleich $\frac{\Delta x}{10\%} = \frac{10 \text{ mg/l}}{0,1} = 100 \text{ mg/l}$ sein.
- Die Bestimmungsgrenze beträgt hier also $x_{\text{BG}} = x = 100 \text{ mg/l}$. Die Bestimmungsgrenze ist $k = \frac{1}{10\%} = \frac{1}{0,1} =$ zehnmal größer als die Ergebnisunsicherheit.

Berechnung der Bestimmungsgrenze

Um die Bestimmungsgrenze mit Hilfe von Kalibrierdaten zu berechnen, sind neben dem Faktor k wiederum α und N_a vorzugeben (vgl. Tabelle 1-1). Es wird definiert:

$$\frac{\Delta x_{\text{BG}}}{x_{\text{BG}}} = \text{max. zulässige relative Ergebnisunsicherheit} = \frac{1}{k} \quad (40)$$

Die halbe Breite des zweiseitigen Prognoseintervalls der Bestimmungsgrenze Δx_{BG} für zukünftige Analysen wird wie folgt berechnet:

$$\Delta x_{\text{BG}} = s_{x_0} \cdot t_{f,\alpha} \sqrt{\frac{1}{N_a} + \frac{1}{N_c} + \frac{x_{\text{BG}} - \bar{x}^2}{Q_{xx}}} \quad (41)$$

($f = N_c - 2$ Freiheitsgrade)

Tab. 1-1. k -Faktoren zur Berechnung der Bestimmungsgrenze.

max. zulässige relative Ergebnisunsicherheit	k-Faktor
5%	20,0
10%	10,0
15%	6,7
20%	5,0
25%	4,0
33,3%	3,0
50%	2,0

Aus der Definition des relativen Prognoseintervalls (s. Gl. 40)

$$x_{BG} = k \cdot \Delta x_{BG} \quad (42)$$

ergibt sich die quadratische Gleichung

$$x_{BG} = k \cdot s_{x_0} \cdot t_{f=N_c-2, \alpha} \sqrt{\frac{1}{N_a} + \frac{1}{N_c} + \frac{(x_{BG} - \bar{x})^2}{Q_{xx}}} \quad (43)$$

Man erhält eine gute Näherung für die Bestimmungsgrenze durch Multiplikation der bereits berechneten Nachweisgrenze mit dem k -Faktor: $x_{BG} = k \cdot x_{NG}$.

Die Angabe der Bestimmungsgrenze muss *immer* im Zusammenhang mit dem vorgegebenen k -Wert erfolgen!

1.3.4

Schnellschätzung [34]

Bei gleichen Bedingungen ($N_c = 10$ bzw. $N_L = 10$ und $N_a = 1$) können Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze nach folgenden Formeln schnell geschätzt werden:

	für $\alpha = 5\%$	für $\alpha = 1\%$
Für die Blindwertmethode:	$x_{NG} = 1,9 s_L/b$	$= 3 s_L/b$
	$x_{EG} = 3,8 s_L/b$	$= 6 s_L/b$
	$x_{BG} = 1,9 \cdot k \cdot s_L/b$	$= 3 \cdot k \cdot s_L/b$
Für die Kalibriermethode:	$x_{NG} = 2,3 s_{x_0}$	$= 3,6 s_{x_0}$
	$x_{EG} = 4,6 s_{x_0}$	$= 7,2 s_{x_0}$
	$x_{BG} = 2,3 \cdot k \cdot s_{x_0}$	$= 3,6 \cdot k \cdot s_{x_0}$

1.3.5

Schätzung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze über das S/N -Verhältnis

Da die Schnellschätzung über die Leerwertmethode für chromatographische Verfahren ungeeignet und das Kalibrierverfahren oft zu zeitaufwändig ist, wird in der überarbeiteten Fassung von ISO/WD 13530 [136] ein einfaches Schätzverfahren für diese Analysenverfahren beschrieben.

Die Nachweisgrenze x_{NG} ist definiert als diejenige Konzentration, bei der das Signal-zu-Rausch-Verhältnis (S/N) den Wert $S/N = 3$ aufweist. Die Bestimmungsgrenze ergibt sich zu

$$x_{BG} = 3 \cdot x_{NG}$$

wobei der Faktor 3 der relativen Ergebnisunsicherheit von 33,3% entspricht.

1.4

Überprüfung einzelner Verfahrensschritte und Untersuchung auf Matrixeinflüsse

Ein wesentliches Gütekriterium eines Analysenverfahrens ist dessen Anwendbarkeit auf natürliche Proben. Daher kann insbesondere vom Methodenentwickler erwartet werden, dass er das Verfahren auf Beeinflussungen durch

- einerseits notwendige zusätzliche Verfahrensschritte wie z. B.
 - Probenaufschluss
 - Probenextraktion
- andererseits Interferenzen oder Matrixeffekte

hin untersucht.

Hierbei sollten typische Matrices (z. B. reales Oberflächenwasser typischer Zusammensetzung) ausgewählt werden.

Verfahrensschritte und Matrixeffekte können sich in einer Erhöhung der Unpräzision und/oder als konstant- oder proportional-systematische Abweichungen der Analyseergebnisse von den „wahren“ Werten äußern.

Sowohl zur Überprüfung einzelner Verfahrensschritte als auch zur Feststellung einer Matrixbeeinflussung eignet sich die Berechnung der Wiederfindungsfunktion, die es erlaubt, systematische (konstant-systematische sowie proportional-systematische) Abweichungen aufzudecken [100, 209].

1.4.1

Systematische Abweichungen

1.4.1.1 Konstant-systematische Abweichungen, additive Abweichungen

Bei konstant-systematischen Abweichungen (s. Abb. 1-13) ist die Abweichung unabhängig von der Konzentration der analysierten Komponente, was zu einer Parallelverschiebung der Matrix-Kalibriergeraden 2 (mit konstant-systematischer Abweichung) gegenüber der Kalibriergeraden 1 (erstellt mit reinen Standardlösungen) führt. Ursache für diese additive Abweichung könnte das Miterfassen einer

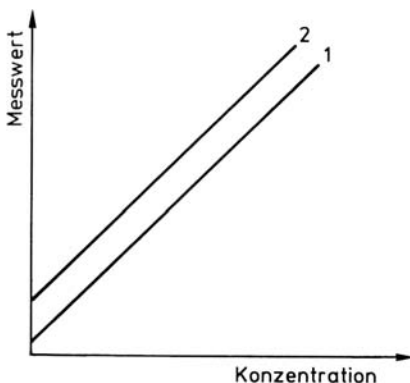


Abb. 1-13. Darstellung einer konstant-systematischen Abweichung.

Matrixkomponente sein, d.h. das Analyseverfahren ist nicht ausreichend spezifisch.

1.4.1.2 Proportional-systematische Abweichungen, multiplikative Abweichungen

Bei proportional-systematischen Abweichungen (s. Abb. 1-14) ist die Größe der Abweichung abhängig von der Konzentration der analysierten Komponente. Dies führt zu einer Änderung der Steigung der Matrix-Kalibriergeraden 2.

Diese multiplikativen Abweichungen vom wahren Wert können durch einzelne Verfahrensschritte (Probenaufschluss, Probenextraktion, Interferenzen mit Fritten, Glaswänden etc.) oder auch Matrixeffekte bedingt sein. Durch Standardaddition und/oder die Ermittlung der Wiederfindungsfunktion können systematische Abweichungen aufgedeckt werden [100, 209].

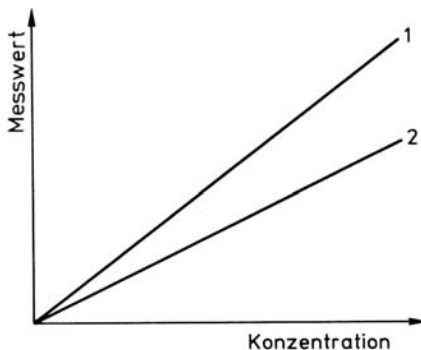


Abb. 1-14. Proportional-systematische Abweichung.

1.4.2

Ermittlung und Bewertung der Wiederfindungsfunktion

Ziel der Wiederfindungsexperimente und der Aufstellung der sog. Wiederfindungsfunktion ist die Ermittlung des Einflusses einer Verfahrens- oder Probenmodifikation (auch Matrixeinfluss!) auf das Analyseverfahren. Die Untersuchungen erfolgen über den gesamten Standard-Arbeitsbereich. Zunächst wird die Kalibrierfunktion des analytischen Grundverfahrens bestimmt:

$$y = a_c + b_c \cdot x_c \quad (44)$$

Jeder einzelne Kalibrierstandard wird daraufhin dem modifizierten Analyseverfahren unterzogen.

Die Analyseergebnisse x_f werden mit Hilfe der Analysenfunktion (nach x aufgelöste Kalibrierfunktion) berechnet

$$x_f = \frac{y_f - a_c}{b_c} \quad (45)$$

Stellt man die jeweils „gefundenen“ Konzentrationen (x_f) auf der Ordinate gegen die Kalibrierkonzentrationen (x_c) auf der Abszisse graphisch dar, so erhält man die *Wiederfindungsgerade*, die sich mathematisch durch die Wiederfindungsfunktion

$$x_f = a_f + b_f \cdot x_c \quad (46)$$

beschreiben lässt.

Im Idealfall ergibt die Wiederfindungsfunktion eine Gerade mit dem Achsenabschnitt $a_f = 0$ und der Steigung $b_f = 1$ sowie einer Reststandardabweichung s_{yf} , die der Verfahrensstandardabweichung des analytischen Grundverfahrens s_{xoc} entspricht.

1.4.2.1 Voraussetzung für die Interpretation der Wiederfindungsfunktion

Eine wichtige Voraussetzung für die Aussagefähigkeit der Wiederfindungsfunktion ist die Gleichwertigkeit der Verfahrensstandardabweichungen s_{xo} der Kalibrierfunktion des analytischen Grundverfahrens und der Kalibrierfunktion für die aufgestockte Matrix bzw. der Kalibrierfunktion für einzelne Probenvorbehandlungsschritte (z. B. Aufschluss oder Extraktion). Eine Matrix bzw. ein Probenvorbehandlungsschritt könnten zu deutlich höherer Unpräzision der Kalibrierung führen (s. Abb. 1-15), die eventuell vorliegende systematische Fehler verdeckt.

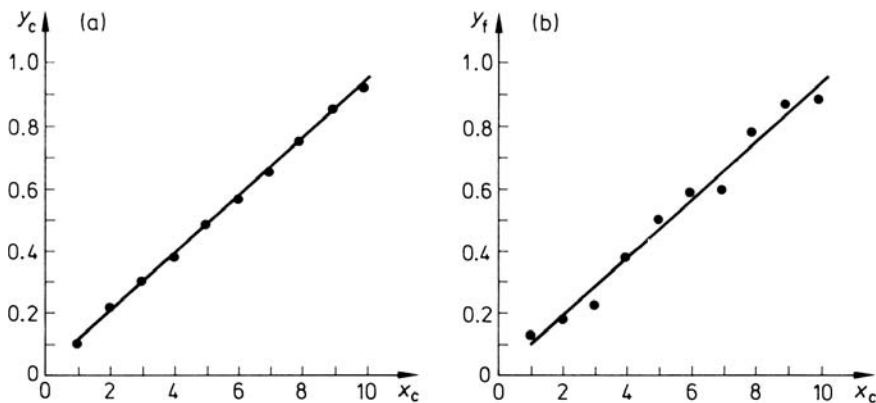


Abb. 1-15. Kalibrierfunktionen
(a) für wässrige Standards, (b) für die Matrix.

Kontrolle der Analysenpräzision

Die Verfahrensstandardabweichung der Kalibrierfunktion des Grundverfahrens s_{xoc} und die Reststandardabweichung der Wiederfindungsfunktion s_{yf} werden auf signifikanten Unterschied hin überprüft:

$$PW = \left(\frac{s_{yf}}{s_{xoc}} \right)^2 \quad (47)$$

Ist $PW > F(f_1 = f_2 = N_c - 2, P = 99\%)$, so liegt ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Standardabweichungen vor.

In diesem Fall kann keine endgültige Aussage bezüglich des Nicht-Vorliegens systematischer Abweichungen gemacht werden. Stattdessen ist die Ursache für die hohe Unpräzision zu ermitteln, anschließend zu eliminieren und daraufhin eine neue Wiederfindungsfunktion zu bestimmen.

Anmerkung: Der Vergleich von s_{yf} und s_{xoc} mittels F -Test ist hier zulässig, da beide Standardabweichungen in Konzentrationseinheiten berechnet werden.

1.4.2.2 Prüfung auf systematische Abweichungen

Da Messwerte in jedem Fall zufällige Fehler aufweisen, d. h. einer Streuung unterliegen, ergeben sich als Achsenabschnitt und Steigung der Wiederfindungsfunktion niemals die Idealwerte $a_f = 0$ und $b_f = 1$. Um eine Aussage über das Vorliegen systematischer Abweichungen treffen zu können, müssen daher die Vertrauensbereiche von a_f und b_f ermittelt werden [15].

$$VB(a_f) = a_f \pm t_{p,f} \cdot s_{a_f} \quad (48)$$

$$VB(a_f) = a_f \pm t_{p,f} \cdot s_{y_f} \cdot \sqrt{\frac{1}{N_f} + \frac{\bar{x}_c^2}{Q_{xx}}} \quad (49)$$

mit

$$s_{y_f} = \sqrt{\frac{\sum [x_{if} - (a_f + b_f \cdot x_{ic})]^2}{N_f - 2}} \quad (50)$$

und $N_f =$ Anzahl der Konzentrationsniveaus

Der Vertrauensbereich für b_f ergibt sich zu

$$VB(b_f) = b_f \pm t_{p,f} \cdot s_{b_f} \quad (51)$$

$$VB(b_f) = b_f \pm \frac{t_{p,f} \cdot s_{y_f}}{\sqrt{Q_{xx}}} \quad (52)$$

($t =$ Student- t -Faktor: $P = 95\%$, $f = N_f - 2$)

Mit Hilfe der berechneten Vertrauensbereiche kann das Vorliegen systematischer Abweichungen statistisch überprüft werden.

Eine konstant-systematische Abweichung liegt mit 95%iger statistischer Sicherheit vor, wenn der Vertrauensbereich $VB(a_f)$ nicht den Wert $a_f = 0$ einschließt.

Entsprechend gilt, dass eine proportional-systematische Abweichung mit 95%iger Sicherheit vorliegt, wenn der Vertrauensbereich $VB(b_f)$ den Wert $b_f = 1$ nicht einschließt.

1.4.3

Anwendung der Wiederfindungsfunktion**1.4.3.1 Überprüfung einzelner Verfahrensschritte**

Wurden bei der Überprüfung einzelner Verfahrensschritte (z. B. Extraktion) konstant- oder proportional-systematische Abweichungen nachgewiesen, so sollte(n) nach Möglichkeit die Ursache(n) für diese Abweichungen gesucht werden. Daraufhin ist das Analysenverfahren entsprechend zu optimieren und eine Wiederholung der Messungen zur Ermittlung der Wiederfindungsfunktion durchzuführen.

Lassen sich die systematischen Abweichungen jedoch nicht eliminieren, so ist in der Beschreibung des Analysenverfahrens *deutlich* darauf hinzuweisen, und in der Praxis muss entweder die Kalibrierung über das Gesamtverfahren (einschließlich Probenvorbereitung) erfolgen oder das Verfahren der Standardaddition angewendet werden.

Bei einer *ausschließlich* proportional-systematischen Abweichung kann z. B. die Wiederfindungsrate (*WFR*) angegeben werden. Diese lässt sich aus der Steigung b_f ableiten:

$$WFR = b_f \cdot 100 (\%) \quad (53)$$

1.4.3.1.1 Bedeutung der Wiederfindungsrate

Die Wiederfindungsrate ist ein Beurteilungskriterium für das jeweilige Analysenverfahren bzw. einen einzelnen Verfahrensschritt [154]. Wird bei der Überprüfung einzelner Verfahrensschritte eine Wiederfindungsrate von 100% ermittelt, so ist das betreffende Verfahren frei von konstant- und/oder proportional-systematischen Abweichungen und die Ermittlung von Analyseergebnissen muss hier nicht über Anwendung des Verfahrens der Standardaddition (s. Abschnitt 3.4.1.1) erfolgen.

Wurde jedoch eine konstant- bzw. proportional-systematische Abweichung festgestellt, so müssen im Falle proportional-systematischer Abweichungen zukünftige Analyseergebnisse über das Verfahren der Standardaddition ermittelt werden, beim Vorliegen konstant-systematischer Abweichungen muss ein entsprechender Warnvermerk in der Analysenvorschrift angegeben werden.

Die Wiederfindungsrate kann auch als Kontrollgröße für eine Qualitätsregelkarte (s. Abschnitt 2.6.7.1.5.3) verwendet werden. Hierbei kann die Zentrallinie entweder als $WFR = 100\%$ oder gleich der mittleren Wiederfindungsrate gewählt werden. Dies ist abhängig von den Ergebnissen der Vorperiode.

1.4.3.1.2 Auswirkung einer konstant-systematischen Abweichung auf die Wiederfindungsrate

Die Beschreibung der Richtigkeit eines Analysenverfahrens allein mit Hilfe der Wiederfindungsrate (*WFR*) führt beim Vorliegen konstant-systematischer Fehler zu Falschaussagen (Abb. 1-16).

Für jede Wiederfindungsfunktion, die

- entweder einen positiven Achsabschnitt ($a_f > 0$) und eine Steigung $b_f < 1$ (a),
- oder einen negativen Achsabschnitt ($a_f < 0$) und eine Steigung $b_f > 1$ (b)

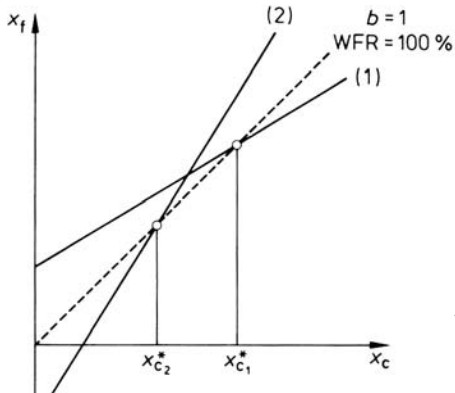


Abb. 1-16. Abhängigkeit der Wiederfindungsrate von der Steigung.

besitzt, kann bei einer einzelnen Konzentration $x_c^* > 0$ eine WFR von 100% gefunden werden (Kreuzungspunkt der Wiederfindungsgeraden mit der Winkelhalbierenden). Für alle Konzentrationen $x_c \neq x_c^*$ jedoch beträgt die $WFR \neq 100\%$!

Allgemein gilt:

$$WFR = \frac{x_f}{x_c} \cdot 100\% = \left(\frac{a_f}{x_c} + b_f \right) \cdot 100\% \quad (54)$$

Nur bei $a_f \approx 0$ ist die WFR unabhängig von x_c und allein durch b_f bestimmt.

a) Nur proportionaler Fehler:

Beispiel:

$$\begin{aligned} x_f &= 0,001 + 0,78 \cdot x_c \\ WFR &= \left(\frac{0,001}{x_c} + 0,78 \right) \cdot 100\% \\ WFR_1 (x_c = 10) &= (0,0001 + 0,78) \cdot 100\% \\ &= 78,010\% \\ WFR_2 (x_c = 50) &= (0,00002 + 0,78) \cdot 100\% \\ &= 78,002\% \\ WFR_3 (x_c = 100) &= (0,00001 + 0,78) \cdot 100\% \\ &= 78,001\% \end{aligned}$$

b) Mit signifikantem konstantem Fehler:

Beispiel:

$$\begin{aligned} x_f &= 1,0 + 0,78 \cdot x_c \\ WFR &= \left(\frac{1,0}{x_c} + 0,78 \right) \cdot 100\% \\ WFR_1 (x_c = 10) &= (0,1 + 0,78) \cdot 100\% \\ &= 88\% \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{WFR}_2(x_c = 50) &= (0,02 + 0,78) \cdot 100\% \\ &= 80\% \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{WFR}_3(x_c = 100) &= (0,01 + 0,78) \cdot 100\% \\ &= 79\% \end{aligned}$$

Konsequenz: Der konstant-systematische Fehler a_f wirkt sich auf die WFR additiv mit

$$\frac{a_f}{x_c}$$

aus.

Dieser Fehleranteil hat an der unteren Arbeitsbereichsgrenze $x_c = x_1$ seinen größten Wert und nimmt mit steigendem x_c hyperbolisch ab.

Wenn die WFR beispielsweise eine maximale, durch a_f bedingte Ungenauigkeit von 1% enthalten darf,

$$\frac{a_f}{x_c} \leq 0,01$$

muss der konstant-systematische Fehler $a_f \leq 0,01 \cdot x_1$ sein!

Beispiel zur Überprüfung eines Verfahrensschrittes:

Optimierung eines Extraktionsschrittes [140]

Vor der quantitativen HPTLC-Bestimmung von Phenobarbital in Urin wird eine Festphasenextraktion durchgeführt (EXTRELUT[®]-Säulen). Zur Überprüfung des reinen Extraktionsschrittes wurden sechs Phenobarbital-Standardlösungen der gesamten Extraktionsprozedur unterzogen: 5 ml Standardlösung wurden mit 15 ml Natriumphosphat-Puffer (pH = 6,0) verdünnt, auf die EXTRELUT-Säule gegeben und nach 10 Minuten mit 40 ml Dichlormethan/Propanol-2 (93+3, v+v) eluiert. Der Extrakt wurde danach im Stickstoffstrom zur Trockne eingengt, in 500 µl Methanol aufgenommen und auf die HPTLC-Kieselgel-60-Platte aufgetragen.

Nicht extrahierte Standards entsprechender Konzentration wurden ebenfalls im N₂-Strom eingengt, in 500 µl Methanol aufgenommen und ebenso wie die extrahierten Standardlösungen analysiert.

Mit den Messwerten dieser nicht extrahierten Standards und den zugehörigen Konzentrationen wurde eine Kalibrierfunktion aufgestellt. Die Auswertung der Messwerte der extrahierten Standards über die Kalibrierfunktion führte zu den gefundenen Konzentrationen x_f . Durch lineare Regression der gefundenen Konzentrationen x_f gegen die Kalibrierkonzentrationen x_c wurde die

$$\text{Wiederfindungsfunktion } x_f = -100,2 + 1,098 \cdot x_c$$

erhalten (Abb. 1-17).

Die Vertrauensbereiche von a_f und b_f ergaben sich zu

$$VB(a_f) = -100,2 \pm 13,698 \text{ ng/Fleck}$$

$$VB(b_f) = 1,098 \pm 0,0969$$

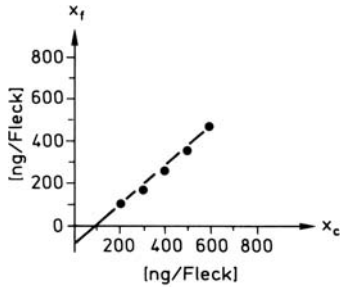


Abb. 1-17. Wiederfindungsfunktion 1 für die Phenobarbital-Extraktion.

d. h. es lag sowohl eine konstant-systematische als auch eine geringe proportional-systematische Abweichung vor.

Als Ursache für diese systematischen Abweichungen wurde eine nicht ausreichende Beschickung der EXTRELUT-Säule gefunden. Ungefähr 1 ml des EXTRELUT-Materials am unteren Ende der Säule blieb unbenetzt, wenn diese nur mit 20 ml Probenvolumen beschickt wurde. Dieser unbenetzte Teil des Sorbens readsorbierte einen Teil des eluierten Phenobarbitals bei der Elution der Säule.

Aus diesem Grund wurden zusätzlich 1,5 ml Phosphatpuffer zum ursprünglichen Probenvolumen (20 ml) zugegeben und das Wiederfindungsexperiment wiederholt. Dabei wurde die Wiederfindungsfunktion (Abb. 1-18)

$$x_f = 2,37 + 0,98 x_c$$

mit den Vertrauensbereichen

$$VB(a_f) = 2,37 \pm 13,975 \text{ ng/Fleck}$$

$$VB(b_f) = 0,98 \pm 0,082$$

ermittelt. Es lagen somit keine konstant- oder proportional-systematischen Abweichungen mehr vor.

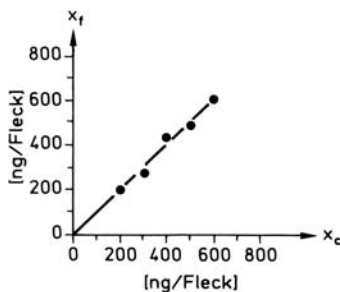


Abb. 1-18. Wiederfindungsfunktion 2 für die Phenobarbital-Extraktion.

1.4.3.2 Ermittlung der Wiederfindungsfunktion zum Nachweis von Matrixeinflüssen

Zum Nachweis von möglichen Matrixeinflüssen sollten verschiedene typische Probenmatrices, die jedoch ausnahmsweise die zu bestimmende Substanz nicht enthalten (evtl. synthetische Probenmatrix) jeweils in zehn gleich große Teilmengen

aufgeteilt werden. Diese werden mit *konzentrierten* Standardlösungen so aufgestockt, dass in den aufgestockten Matrix-Teilproben jeweils dieselben Substanzkonzentrationen vorliegen wie in den zur Kalibrierung eingesetzten wässrigen Standardlösungen.

Die so hergestellten „Proben“ werden mit dem betreffenden Analysenverfahren analysiert. Die gefundenen Messwerte y_f werden mittels der Analysenfunktion (Gl. 45) in gefundene Konzentrationen x_f umgerechnet.

Die Wiederfindungsfunktion sowie die Reststandardabweichung und die Vertrauensbereiche von Achsenabschnitt a_f und Steigung b_f werden wie in Abschnitt 1.4.2.2 beschrieben (s. Gl. 48 bis 51) berechnet und bewertet.

Hinweis: Wird für diese Untersuchungen eine reale Matrix eingesetzt, die die zu bestimmende Substanz enthält, so sind keine Aussagen hinsichtlich des Vorliegens einer konstant-systematischen Abweichung möglich.

Ergibt die Überprüfung des Matrixeinflusses, dass eine proportional- oder konstant-systematische Abweichung vorliegt, so darf die spätere Analysenauswertung *nicht* über die mit wässrigen Standards erstellte Kalibrierfunktion erfolgen, sondern es muss in jedem Falle das Verfahren der Standardaddition [138] angewandt werden.

Beispiel: HPTLC-Bestimmung von Selen in Humanserum [100]

Zur Selenbestimmung in Humanserum ist ein nasschemischer Probenaufschluss notwendig. Um den Einfluss dieser biologischen Matrix auf die Wiederfindungsrate zu ermitteln, wurde zunächst die Wiederfindungsfunktion bestimmt. Hierzu wurde eine Serumprobe in sechs Teilproben unterteilt. Fünf dieser Teilproben wurden mit unterschiedlichen Selenocystin-Konzentrationen aufgestockt. Die fünf aufgestockten und die eine nicht aufgestockte Probe wurden zuerst bei 100 °C bis zur Trockne eingedampft und anschließend mit Salpetersäure und Wasserstoffperoxid aufgeschlossen.

Danach wurden die einzelnen Proben mittels einer EXTRELUT-Säule extrahiert und die Extrakte auf eine HPTLC-Kieselgel-60-Platte aufgetragen.

Es ergab sich folgende Wiederfindungsfunktion (Abb. 1-19):

$$x_f = 10,609 + 1,002 \cdot x_c$$

Der Vertrauensbereich der Steigung b_f ($0,87 < b_f < 1,14$) zeigt, dass keine proportional-systematische Abweichung vorliegt, d.h. die Selenbestimmung in Human-

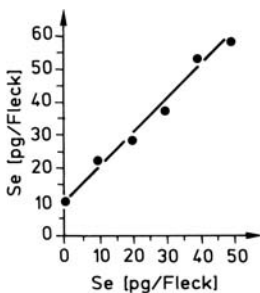


Abb. 1-19. Wiederfindungsfunktion für Selen in Humanserum.

serum muss nicht durch Anwendung des Verfahrens der Standardaddition erfolgen. Eine Aussage über das Vorliegen einer konstant-systematischen Abweichung ist nicht möglich, da die für dieses Wiederfindungsexperiment verwendete Matrix nicht nachweisbar frei von Selen war.

1.5

Weitergehende statistische Methoden

Bei nachgewiesener Varianzeninhomogenität (s. Abschnitt 1.2.4.2.1) sowie bei Störungen der Quantifizierung z. B. durch nicht-optimale Trennung der Signale (Interferenzen, Peaküberlagerung) können eventuell aufwändigere und komplexere statistische Methoden eingesetzt werden [146, 153]. Dies sind u. a.:

- gewichtete Regression [159],
- multiple-curve-fitting [160],
- multiple Regression [146],
- multivariate Standardaddition [146],
- Verfahrenskennfunktionen anstelle von Verfahrenskenndaten [153].

Diese Methoden sind jedoch nicht Thema dieses Buches. Neben einem erhöhten Rechenaufwand sind diese Verfahren v. a. auch mit einem stark erhöhten Analysenaufwand verbunden.

1.6

Verwendung interner Standards [50]

Mehrkomponenten-Verfahren sind Analysenverfahren, bei denen mehrere in einer Probe enthaltene Komponenten gleichzeitig analysiert werden. Hierzu zählen z. B. die ICP-AES, Gaschromatographie usw. Für diese Analysenverfahren gelten prinzipiell die Strategien bezüglich Kalibrierung des analytischen Grundverfahrens und Überprüfung mittels der Wiederfindungsfunktion, wie sie in den vorangegangenen Abschnitten dargestellt sind.

Zusätzlich muss hier aber noch weiteren, z. B. gegenseitigen Einflüssen Rechnung getragen werden. Qualitätssicherungsmaßnahmen umfassen hier auch die Kontrolle der Geräteparameter. Dies geschieht beispielsweise durch Einsatz von internen Standards.

1.6.1

Definition, Zweck

Als interner Standard wird eine Substanz bezeichnet von der bekannt ist, dass sie in der Analysenprobe nicht vorkommt und die in definierter Form und Menge jeder Kalibrier- und Analysenprobe zusätzlich zugesetzt und quantitativ mitanalysiert wird. Es wird davon ausgegangen, dass diese Substanzen den gleichen physikalisch-

chemischen Einflüssen unterliegen wie die eigentlich untersuchten Parameter. Die Analysenergebnisse interner Standards werden verwendet

- zu Kontrollzwecken: Vorausgesetzt, der Zusatz des internen Standards erfolgt *nach allen Vorbereitungs-schritten*, unmittelbar vor der Messung, so können die Analyseergebnisse der internen Standards zur Kontrolle der Probenapplikation (z. B. Einspritzvorgänge) oder der geräteinternen Probenweiterverarbeitung oder auch des Detektionsschrittes verwandt werden. Die Zugabe von Standards *vor der Proben-aufbereitung* ermöglicht dagegen gezielte Kontrollen der Aufbereitungsschritte;
- unter bestimmten Voraussetzungen zur rechnerischen Korrektur von Analysenergebnissen bei Vorliegen systematischer Gerätefehler.

1.6.2

Bedingungen und Einschränkungen für den Einsatz von internen Standards

Eine Substanz, die als interner Standard eingesetzt werden soll, muss einigen Bedingungen genügen:

- Sie darf mit hoher Sicherheit nicht in der natürlichen Probe enthalten sein.
- Sie darf selbst keinen Matrixeffekt erzeugen.
- Sie muss möglichst ähnliche physikalisch-chemische Eigenschaften aufweisen wie die zu bestimmenden Substanzen. Darunter zählen z. B. in der Chromatographie ein ähnlicher Siedepunkt, eine ähnliche Retentionszeit, ähnliches Detektionsverhalten usw. Sollen Probenvorbereitungsschritte mit Hilfe interner Standards kontrolliert werden, so sind auch hier ähnliche chemische Eigenschaften erforderlich.
- Die Zugabe des internen Standards muss in hochkonzentrierter Form möglich sein, um Volumenfehler zu vermeiden. Andernfalls muss das zusätzliche Volumen in der Probe bei den Analysenergebnissen rechnerisch berücksichtigt werden.
- Die Konzentration des internen Standards in der Probe muss dem Messproblem angepasst sein.
- Für einen internen Standard ist selbstverständlich auch eine Grundkalibrierung mit Ermittlung der Verfahrenskenndaten erforderlich.

Der Einsatz von internem Standard enthebt nicht von der Notwendigkeit, für jeden zu analysierenden Parameter eine vollständige Grundkalibrierung sowie Untersuchungen zur Verfahrens- und Matrixbeeinflussung durchzuführen. Insbesondere stellen interne Standards keinen Ersatz für Kalibrierfunktionen dar.

1.6.3

Vorgehensweise

Um ein Analysenverfahren mit Hilfe eines oder mehrerer interner Standards zu überwachen oder gar zu korrigieren ist es notwendig, zunächst das gesamte Analysenverfahren einer vollständigen Kalibrierung und Überprüfung der Verfahrenskenndaten zu unterziehen. Insbesondere ist das Analysenverfahren auf die Beeinflussung durch einzelne Verfahrensschritte und Matrices hin zu überprüfen. Sind entgegen aller Bemühungen Instabilitäten oder Matrixeffekte nicht in den Griff zu bekommen, so kann an den Einsatz eines oder mehrerer interner Standards gedacht werden. Zwei oder mehr interne Standards gleichzeitig bieten sich an, wenn selektiv unterschiedliche Einflussgrößen überwacht werden sollen. Bei zeitintensiven chromatographischen Trennungen beispielsweise können interne Standards unterschiedlicher Retentionszeiten zur Überwachung der gesamten Trennung und der Stabilität des Detektors benutzt werden.

Nach Auswahl geeigneter Standardsubstanzen erfolgt für diese sowohl eine Grundkalibrierung als auch eine Überprüfung auf Beeinflussung durch einzelne Verfahrensschritte und insbesondere Matrices. Nachdem die Ermittlung der Verfahrenskenndaten für die Analyse der als interne Standards vorgesehenen Substanzen erfolgreich abgeschlossen ist, erfolgt die Kalibrierung anhand der Standardgemische. Wiederholte Probeanalysen von bekannten Proben schließen die Voruntersuchungen ab.

Dient der Einsatz der internen Standards lediglich zu Kontrollzwecken, so bilden ihre Analysenergebnisse in der Routineanalytik die Basis für entsprechende Qualitätsregelsysteme/Regelkarten (s. Abschnitt 2.6).

Werden interne Standards jedoch zur systematischen Korrektur der Analysenergebnisse eingesetzt, so gehen ihre Wiederfindungsraten in jedes einzelne Analysenergebnis ein [50]: Die Wiederfindungsrate des internen Standards wird als repräsentativ für die Wiederfindungsrate der zu analysierenden Substanzen angesehen. Um die korrigierten Analysenergebnisse zu erhalten, sind die unkorrigierten Ergebnisse durch die *WFR* des internen Standards zu dividieren.

Beispiel:

- Das unkorrigierte Analysenergebnis beträgt 50 µg/l.
- Als interner Standard wird eine Konzentration von 78 µg/l einer anderen aber ähnlichen Substanz eingesetzt. Das Analysenergebnis für den internen Standard beträgt 62 µg/l. Dies bedeutet eine Wiederfindungsrate von $WFR = \frac{62}{78} = 0,795$.
- Damit ist das Analysenergebnis von 50 µg/l zu korrigieren: Das endgültige Analysenergebnis beträgt $\frac{50 \mu\text{g/l}}{WFR} = \frac{50 \text{ g/l}}{0,795} = 62,9 \mu\text{g/l}$.

Unter der Voraussetzung, dass die Konzentration des internen Standards bekannt und immer gleich ist, kann der Quotient

$$\frac{\text{Messwert des gesuchten Parameters}}{\text{Messwert des internen Standards}}$$

anstelle des Originalmesswertes des gesuchten Parameters für die Kalibrierung und die Auswertung verwendet werden.

1.7

Vorbereitung der Routineanalytik

1.7.1

Überprüfung der zeitlichen Abhängigkeit der Messwerte

Ein Qualitätsziel in der Routineanalytik ist eine gleich bleibende Präzision und Richtigkeit der Analysenergebnisse über einen längeren Zeitraum zu erhalten, d. h. ein zuverlässiges Analysenverfahren anwenden zu können.

Während die Kalibrierung in aller Regel unter sog. Wiederholbedingungen, zumindest aber innerhalb eines kurzen Zeitraumes stattfindet, wird sich bei Beobachtung der Analysenqualität über einen längeren Zeitraum allein schon durch längere Pausen zwischen einzelnen Analysenserien, Umwelteinflüsse und unterschiedliche „Tagesform“ der jeweiligen Bearbeiter eine höhere Unpräzision in den Analysenergebnissen bemerkbar machen. Unter Umständen verhindern diese zusätzlichen Unpräzisionen jegliche Vergleichbarkeit der Analysenergebnisse. Zum anderen macht sich bei einigen Analysenverfahren auch eine zeitliche Instabilität von Analysenparametern bemerkbar. So können Alterungseffekte, Verschmutzung und Ähnliches nach einer gewissen Betriebszeit, u. U. sogar schon innerhalb eines Arbeitstages, zu systematisch erniedrigten Messwerten führen.

Ziel der Vorbereitung einer Routineanalytik ist die Erkennung derartiger Effekte und Einflüsse, ihre Quantifizierung und wenn möglich deren Beseitigung. Zu ihrer Erkennung sind so genannte Kontrollproben (s. Abschnitt 2.5) erforderlich. Dabei handelt es sich um Proben, die über einen längeren Zeitraum stabil bleiben und in jeder Analysenserie „zur Kontrolle“ mitanalysiert werden.

1.7.1.1 Vergleich der Standardabweichung in der Serie (s_w) mit der Standardabweichung zwischen den Serien (s_b) [215]

Für die Präzisionsanalyse werden die Standardabweichung in der Serie (within batch) s_w und die Standardabweichung zwischen den Serien (between batch) s_b ermittelt und mittels F -Test auf signifikanten Unterschied hin untersucht.

Zur Ermittlung von s_b und s_w werden an $N = 20$ aufeinander folgenden Tagen (mindestens jedoch 6 bis 10 unterschiedliche Analysentage oder Analysenserien) Mehrfach-, mindestens jedoch Doppelbestimmungen einer Probe durchgeführt. Aus diesen Analysenergebnissen werden die Einzelstandardabweichungen (s_i), die

Standardabweichung in der Serie (s_w), die Standardabweichung zwischen den Serien (s_b) sowie die Gesamtstandardabweichung (s_t) berechnet (Indizes aus dem Englischen: „w“ = within, „b“ = between, „t“ = total).

Standardabweichung einer Mehrfachbestimmung:

$$s_i = \sqrt{\frac{1}{f_i} \cdot \sum (x_{ij} - \bar{x}_i)^2} \quad \text{mit } f_i = N_i - 1; \quad (55)$$

bei Doppelbestimmung: $f_i = 2 - 1 = 1$

Standardabweichung innerhalb der Serien:

$$s_w = \sqrt{\frac{1}{f_w} \cdot \sum (f_i \cdot s_i^2)} \quad (56)$$

mit $f_w = \sum f_i$; bei Doppelbestimmungen: $f_w = N$ (57)

Standardabweichung zwischen den Serien (von Serie zu Serie bzw. von Tag zu Tag):

$$s_b = \sqrt{\frac{1}{f_b} \sum (\bar{x}_i - \bar{\bar{x}})^2} \quad (58)$$

mit $f_b = N - 1$ und $\bar{\bar{x}} = \text{Gesamtmittelwert} = \frac{1}{N} \cdot \sum \bar{x}_i$ (59)

Die Gesamt-(totale)Standardabweichung ergibt sich zu

$$s_t = \sqrt{\frac{1}{f_t} (s_b^2 \cdot f_b + s_w^2 \cdot f_w)} \quad (60)$$

mit $f_t = f_b + f_w$; bei Doppelbestimmung: $f_t = 2N - 1$ (61)

Bewertung:

1. Die Gesamtstandardabweichung muss den Qualitätsanforderungen (maximal zulässige Unpräzision) genügen.
2. Die Standardabweichung zwischen den Serien sollte maximal das Doppelte der Standardabweichung in der Serie betragen; gegebenenfalls führt die Anwendung des Varianzen-*F*-Tests auf s_b und s_w zur Präzisionsbewertung:

$$\text{Berechnung des Prüfwertes: } PW = \frac{s_b^2}{s_w^2}$$

Beurteilung des Prüfwertes: Ist $PW \leq F(f_b, f_w, 95\%)$, so ist s_b nur zufällig größer als s_w .

Bei $PW > F(f_b, f_w, 95\%)$ beeinflusst die Unpräzision zwischen den Serien signifikant die Gesamtunpräzision. Falls die Gesamtstandardabweichung inakzeptabel hoch ist, können Suche und Korrektur der Analyseinflüsse einerseits, eine Rejustierung oder gar Rekalibrierung in jeder Serie andererseits signifikant qualitätsverbessernd wirken.

Beispiel aus der Praxis der Wasseranalytik

Für die DOC-Bestimmung (dissolved organic carbon = gelöster organischer Kohlenstoff) wurde eine Kontrollprobe mit dem Gehalt 5 mg/l ausgewählt und an zehn aufeinander folgenden Tagen jeweils einer Doppelbestimmung unterzogen. Es ergaben sich:

$$s_w = 0,099 \text{ mg/l}$$

$$s_b = 0,224 \text{ mg/l}$$

$$s_t = 0,158 \text{ mg/l}$$

$$PW = \frac{s_b^2}{s_w^2} = 5,119 \quad (\text{Tabellenwert: } F(9, 10, 99\%) = 4,94)$$

Da $PW > F(9, 10, 99\%)$, unterscheiden sich s_b und s_w signifikant.

Ursache für die erhöhte Unpräzision ist hier eine instabile Kalibrierfunktion. Durch tägliche Rekalibrierung könnte somit die Präzision der Analysenergebnisse wesentlich verbessert werden.

1.7.1.2 Überprüfung der Möglichkeit einer Tagesjustierung des Analysengerätes

Wurde eine Zeitabhängigkeit der Analysenergebnisse festgestellt, so empfiehlt es sich, vor jeder Analysenserie z. B. mit einer bzw. zwei Standardlösungen jeweils eine Tagesjustierung durchzuführen, um die *aktuelle Steigung* der Kalibrierfunktion ermitteln zu können. Voraussetzung für die Anwendbarkeit der Tagesjustierung ist jedoch, dass sich die Verfahrensstandardabweichungen s_{x_0} für verschiedene Steigungen nicht signifikant unterscheiden (s. Abb. 1-20 b). Dies kann mittels F -Test geprüft werden.

Bei gleich bleibender Reststandardabweichung s_y (Fall (a) in Abb. 1-20) ist vor der Anwendung der Tagesjustierung zu untersuchen, wie stark sich die *aktuelle Steigung* der Kalibrierfunktion (ermittelt über die Tagesjustierung) verringern darf, um noch über den gesamten gewählten analytischen Arbeitsbereich auswerten zu können. Hierzu empfiehlt sich die Überprüfung mit Hilfe der maximal zulässigen Unpräzision (s. Abschnitt 1.3.3) [22].

Verringert sich bei konstanter Reststandardabweichung s_y die Steigung der Kalibrierfunktion (s. Abb. 1-20 a), so kann es vorkommen, dass die geforderte Mindestpräzision $VB_{\text{rel,zulässig}}$ bei x_1 nicht mehr eingehalten werden kann.

Ist keine Unpräzisionsgrenze durch $VB_{\text{rel,zulässig}}$ vorgegeben, so muss eine Prüfung der unteren Arbeitsbereichsgrenze mit Hilfe des Prüfwertes x_p (s. Abschnitt 1.2.4.2.3) erfolgen (s. Abb. 1-21). Unterhalb der Konzentration x_p kann keine sichere analytische Aussage mehr gemacht werden. Der Praktiker kann aber oberhalb dieser Konzentration quantitative Analysen durchführen – vorausgesetzt, die Bestimmungsgrenze des Analysenverfahrens wird hierdurch nicht unterschritten.

1.7.1.3 Trendtest (nach Neumann [190])

Das in Abschnitt 1.7.1.1 vorgestellte Verfahren eignet sich nicht dazu, einen zeitabhängigen *systematischen Trend* nachzuweisen. Daher soll zusätzlich ein einfacher Trendtest [190] durchgeführt werden.

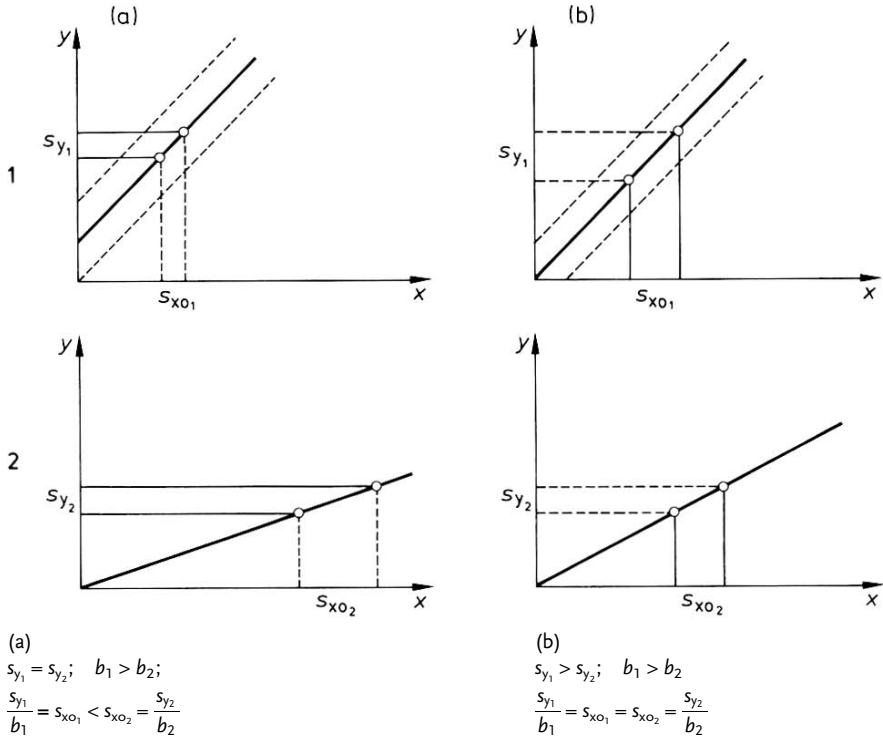


Abb. 1-20. Gegenseitige Abhängigkeit von Präzision und Empfindlichkeit.

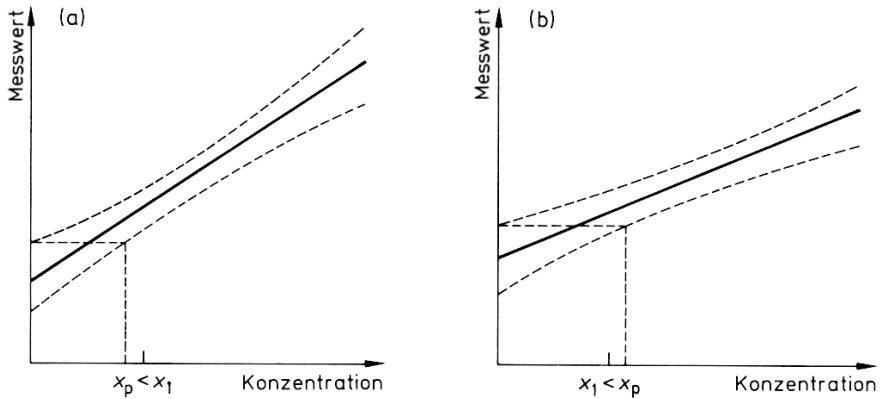


Abb. 1-21. Statistische Absicherung des Arbeitsbereichs mittels x_p bei Tagesjustierung.

- a) x_1 unterscheidet sich signifikant von der Konzentration Null,
- b) x_1 unterscheidet sich *nicht* signifikant von der Konzentration Null.

Voraussetzung für die Durchführung des Trendtests ist das Vorliegen einer Reihe zeitlich aufeinander folgender Analysenergebnisse einer Kontrollprobe x_1, x_2, \dots, x_n , die einer normalverteilten Grundgesamtheit entstammen. Dabei sollte nach Möglichkeit mindestens eine Anzahl von $n = 20$ Analysenergebnissen betrachtet werden.

Zusätzlich zur Standardabweichung s der n Werte wird das mittlere Quadrat der $n - 1$ Differenzen aufeinander folgender Werte (Einzel- bzw. Mittelwerte von aufeinander folgenden Serien) (sukzessive Differenzenstreuung) Δ^2 berechnet:

$$\Delta^2 = \frac{\sum (x_i - x_{i+1})^2}{(n - 1)} \quad (62)$$

Sind die aufeinander folgenden Werte unabhängig, dann gilt $\Delta^2 \approx 2s^2$.

Die Hypothese, aufeinander folgende Werte sind unabhängig, muss zu Gunsten der Alternativhypothese, es besteht ein Trend, aufgegeben werden, wenn der Quotient

$$\frac{\Delta^2}{s^2} = \frac{\sum (x_i - x_{i+1})^2}{\sum (x_i - \bar{x})^2} \quad (63)$$

kleiner oder gleich der kritischen Schranke ($n, \alpha = 1\%$) (s. Tabelle 1-2) wird.

Bedeutung des Trendtests

Durch Anwendung des Trendtests kann überprüft werden, ob eine im Vergleich zur Standardabweichung in der Serie (s_w) größere Standardabweichung zwischen den Serien (s_b , s. Abschnitt 1.7.1.1) auf eine zeitabhängige systematische Verschlechterung des Detektionssystems zurückzuführen ist. Beispielsweise kann so in der Gaschromatographie die Alterung des ECD festgestellt werden.

Konsequenz

Wird ein zeitabhängiger Trend nachgewiesen, so kann durch Rejustierung oder gar Rekalibrierung in jeder Serie die Qualität der Analysenergebnisse signifikant verbessert werden.

1.8

Zusammenfassung der Ergebnisse aus Phase I (Verfahrensentwicklung): Dokumentation

Die endgültige Dokumentation eines analytischen Grundverfahrens umfasst neben der Analysenvorschrift auch alle relevanten Angaben zur Analysenqualität.

Da die Qualität von Analysenergebnissen eng verbunden ist mit der Qualität der Analysenvorschrift, sollte diese eindeutig, verständlich und praxisorientiert sein [17, 123], damit ein mit dem Verfahren noch nicht vertrauter Analytiker dem Analysengang folgen und befriedigende Ergebnisse erzielen kann.

Tabelle 1-2. Kritische Schranken für den Quotienten aus der mittleren quadratischen sukzessiven Differenzenstreuung und der Varianz [190].

<i>n</i>	0,1%	1%	5%	<i>n</i>	0,1%	1%	5%
4	0,5898	0,6256	0,7805	33	1,0055	1,2283	1,4434
5	0,4161	0,5379	0,8204	34	1,0180	1,2386	1,4511
6	0,3634	0,5615	0,8902	35	1,0300	1,2485	1,4585
7	0,3695	0,6140	0,9359	36	1,0416	1,2581	1,4656
8	0,4036	0,6628	0,9825	37	1,0529	1,2673	1,4726
9	0,4420	0,7088	1,0244	38	1,0639	1,2763	1,4793
10	0,4816	0,7518	1,0623	39	1,0746	1,2850	1,4858
11	0,5197	0,7915	1,0965	40	1,0850	1,2934	1,4921
12	0,5557	0,8280	1,1276	41	1,0950	1,3017	1,4982
13	0,5898	0,8618	1,1558	42	1,1048	1,3096	1,5041
14	0,6223	0,8931	1,1816	43	1,1142	1,3172	1,5098
15	0,6532	0,9221	1,2053	44	1,1233	1,3246	1,5154
16	0,6826	0,9491	1,2272	45	1,1320	1,3317	1,5206
17	0,7104	0,9743	1,2473	46	1,1404	1,3387	1,5257
18	0,7368	0,9979	1,2660	47	1,1484	1,3453	1,5305
19	0,7617	1,0199	1,2834	48	1,1561	1,3515	1,5351
20	0,7852	1,0406	1,2996	49	1,1635	1,3573	1,5395
21	0,8073	1,0601	1,3148	50	1,1705	1,3629	1,5437
22	0,8283	1,0785	1,3290	51	1,1774	1,3683	1,5477
23	0,8481	1,0958	1,3425	52	1,1843	1,3738	1,5518
24	0,8668	1,1122	1,3552	53	1,1910	1,3792	1,5557
25	0,8846	1,1278	1,3671	54	1,1976	1,3846	1,5596
26	0,9017	1,1426	1,3785	55	1,2041	1,3899	1,5634
27	0,9182	1,1567	1,3892	56	1,2104	1,3949	1,5670
28	0,9341	1,1702	1,3994	57	1,2166	1,3999	1,5707
29	0,9496	1,1830	1,4091	58	1,2227	1,4048	1,5743
30	0,9645	1,1951	1,4183	59	1,2288	1,4096	1,5779
31	0,9789	1,2067	1,4270	60	1,2349	1,4144	1,5814
32	0,9925	1,2177	1,4354	∞	2,0000	2,0000	2,0000

Die Analysenvorschrift ist durch folgende, größtenteils in Phase I gewonnenen Informationen zu ergänzen:

- zu analysierende Substanz,
- Anwendungsbereich/Art der möglichen Urproben,
- Toleranzen (z. B.: „Füge 6,0 ml \pm 0,1 ml zu“), um die erforderliche Genauigkeit bei einzelnen Arbeitsschritten zu erzielen,
- die Messvorschrift einschließlich physikalischer Größe und Einheit des Messwertes,
- die jeweilige Vorgehensweise zur Ermittlung der Kalibrierfunktion und des Blindwerts,
- der Arbeitsbereich,
- die Kalibrieranleitung: Anzahl, Art, Herstellung der Standardlösungen,

- die Koeffizienten der Kalibrierfunktion mit Angaben über die Linearität, Empfindlichkeit und Reststandardabweichung,
- die Verfahrensstandardabweichung,
- die Nachweisgrenze mit Angaben, wie und mit wie vielen Messungen sie ermittelt wurde,
- die relative Unpräzision an der unteren Arbeitsbereichsgrenze ($VB_{rel}(x_1)$) zum späteren Vergleich mit der geforderten Bestimmungsgrenze,
- eine Vorschrift zur Auswertung und Angabe der Analysenergebnisse,
- häufig auftretende Verfahrensfehler und zugehörige Gegenmaßnahmen,
- quantitative Informationen über Störsubstanzen (interfering substances),
- qualitative und quantitative Angaben über konstant- und proportional-systematische Abweichungen sowie ihre Beseitigung,
- die Zeitstabilität (Haltbarkeit) und die Lagerungsvorschriften für Proben, Reagenzien, Standardlösungen und Referenzmaterialien,
- besondere Hinweise:
 - ggf. Einschränkung der Anwendbarkeit des Analysenverfahrens,
 - besondere Maßnahmen wie z. B. Rejustierung, Rekalibrierung, Anwendung interner Standards (inkl. Auswertung),
 - Bestimmung und Verwendung eines Blindwertes,
- Hinweise zur Entsorgung der Reagenzien und für den Arbeitsschutz,
- Literaturangaben mit weiterer Information (z. B. Anwendungsbeispiele).

Aus der nachfolgenden Routineanalytik und den damit verbundenen Qualitätssicherungsmaßnahmen ergibt sich im Nachhinein eine Ergänzung der Dokumentation durch die Ringversuchskenndaten (siehe Phase IV).