

3 Einführung und Validierung von Analysemethoden

3.1 Allgemeines

Bei der Einführung von neuen Methoden kann man grundsätzlich drei Fälle unterscheiden:

- Einführung offizieller Methoden (international anerkannte, validierte Methoden, z. B. Methoden des LMBG, der Analytica EBC oder der MEBAK)
- Modifikation bereits bestehender Methoden
- Einführung von neuen Methoden, die eine umfassende Validierung verlangen.

Bei der Spurenanalytik ist das Vorgehen anders als bei den übrigen Methoden wie Gehaltsbestimmungen, physikalische Messungen usw. Im Weiteren kann man bei Gehaltsbestimmungen differenzieren in kalibrierfähige Methoden, bei denen spezifische Referenzsubstanzen für Additionsversuche zur Verfügung stehen und in solche, bei denen das nicht möglich ist, z. B. Schaummessung oder Viskositätsbestimmung.

3.2 Begriffe, Definitionen

Arbeitsbereich

Der Arbeitsbereich ist derjenige Konzentrationsbereich eines Analyten in einer Analysenlösung, innerhalb dessen das Prüfverfahren bei konstanter Präzision zuverlässige Ergebnisse liefert.

Kalibrierfunktion

Funktionaler Zusammenhang zwischen messbarer Größe und zu bestimmender Konzentration.

Die Regressionsanalyse liefert eine Kalibrierfunktion ($y = a + bx$ im Falle einer linearen Funktion 1. Grades) mit folgenden Kenndaten:

- Steigung b (Maß für die Empfindlichkeit eines Verfahrens)
- Achsenabschnitt a
- Reststandardabweichung (Streuung der Messwerte um die Regressionsgerade)
- Verfahrensstandardabweichung (absolutes Präzisionsmaß)
- Verfahrensvariationskoeffizient (relatives Präzisionsmaß)

Empfindlichkeit

Die Empfindlichkeit gibt an, in welchem Maß sich das Signal des zu messenden Systems bei Änderung eines Konzentrationswertes verändert.

Wiederfindungsrate

Die Wiederfindungsrate entspricht dem Quotienten aus wiedergefundener und zugesetzter Menge, multipliziert mit 100 (Angabe in Prozent). Wird eine Wiederfindungsrate von 100 % ermittelt, ist das Verfahren frei von Abweichungen.

Genauigkeit

Genauigkeit ist eine qualitative Bezeichnung für das Ausmaß der Annäherung von Prüfergebnissen an einen Bezugswert, z.B. den «wahren Wert». Genauigkeit ist ein Oberbegriff für Präzision und Richtigkeit.

Präzision

Präzision ist eine qualitative Bezeichnung für das Ausmaß der gegenseitigen Annäherung von einander unabhängigen Prüfergebnissen bei mehrfacher Anwendung eines festgelegten Prüfverfahrens unter vorgegebenen Bedingungen. Man unterscheidet zwischen Wiederholpräzision und Vergleichspräzision.

Wiederholpräzision

Wiederholpräzision ist die qualitative Bezeichnung für das Ausmaß der gegenseitigen Annäherung der Analyseergebnisse unter Wiederholbedingungen. Diese liegen vor, wenn unter denselben Bedingungen (derselbe Bearbeiter, dieselben Geräte, dasselbe Labor) innerhalb kurzer Zeitabstände ein festgelegtes Analysenverfahren mehrmals an identischen Proben durchgeführt wird.

Vergleichspräzision

Die Vergleichspräzision ist die qualitative Bezeichnung für das Ausmaß der gegenseitigen Annäherung der Analysenergebnisse unter Vergleichsbedingungen. Diese liegen vor, wenn Messergebnisse bei Anwendung eines festgelegten Analyseverfahrens an identischen Proben zu verschiedenen Zeiten unter verschiedenen Bedingungen (verschiedene Bearbeiter, verschiedene Geräte, verschiedene Laboratorien) gewonnen werden.

Richtigkeit

Richtigkeit ist eine qualitative Bezeichnung für das Ausmaß der Annäherung des Erwartungswertes des Prüfergebnisses an den Bezugswert, wobei dieser der wahre oder richtige Wert sein kann.

Nachweisgrenze

Die Nachweisgrenze (NG) ist der kleinste Gehalt eines Analyten in einer Probe, der mit hoher vorgegebener Wahrscheinlichkeit nachgewiesen werden kann.

Bestimmungsgrenze

Die Bestimmungsgrenze (BG) entspricht dem niedrigsten Analytengehalt, der mit einer vorgegebener Präzision quantifiziert werden kann.

Spezifität

Die analytische Spezifität ist die Fähigkeit eines Prüfverfahrens, nur den gesuchten Analyten zu erfassen, wobei andere in der Probe anwesende Bestandteile das Prüfergebnis nicht beeinflussen.

Anpassungstest nach MANDEL

Rechnerische Prüfung der Kalibrierdaten auf Linearität unter Berücksichtigung der Reststandardabweichung sowie der Varianzen der linearen Kalibrierfunktion und der Kalibrierfunktion 2. Grades.

Ausreißertest durch Residualanalyse

Rechnerische Prüfung der Kalibrierdaten auf Ausreißer unter Berücksichtigung der Reststandardabweichungen.

3.3 Einführung neuer Methoden: Vorgehen

	neue Methoden		Modifikation bestehender Methoden				offizielle Methoden	
	Gehaltsbestimmung	Spurenanalytik	Gehaltsbestimmung		Spurenanalytik	Gehaltsbestimmung		Spurenanalytik
			kf	nkf		kf	nkf	
Spezifität	x	x			x			
Linearität	x	x	x		x			x
Richtigkeit	x	x	x					
Präzision	x	x	x	x	x	x	x	
Wiederfindung	x	x			x	x		
Bestimmungsgrenze		x			x			x
Nachweisgrenze		x						
Robustheit	x	x						

kf = kalibrierfähige Methode

nkf = nichtkalibrierfähige Methode

3.4 Überwachung/Qualitätssicherung

Für die Überwachung der Qualität von Analyseverfahren können verschiedene Instrumente eingesetzt werden.

Ringanalysen/Vergleichsanalysen

Diese sollen einerseits systematische Abweichungen aufzeigen, andererseits den involvierten Mitarbeitern Sicherheit vermitteln. Die Ergebnisse der Ringversuche werden ausgewertet und daraus entsprechende Maßnahmen abgeleitet.

Qualitätsregelkarten

Das Prinzip von Qualitätsregelkarten ist eine optische Darstellung von Messwerten unter Zugrundelegung der

- Qualitätsziele (Sollwert der Ergebnisse der Kontrollproben)
- Qualitätsschranken

Bei letzteren unterscheidet man zwischen Warngrenzen, deren vereinzelte Überschreitung noch toleriert wird, und Kontroll- oder Eingriffsgrenzen, deren Überschreiten Maßnahmen zur Folge hat.

Qualitätsregelkarten werden vor allem dort eingesetzt, wo der Analysenpräzision und der Richtigkeit eines Ergebnisses ein sehr hoher Stellenwert zukommt, z.B. Kriterien bei Handelsanalysen, die für die Abrechnung herangezogen werden.

Kontrollproben

Es können verschiedene Kategorien von Kontrollproben eingesetzt werden:

- Blindproben, die den gesuchten Analyten mit Sicherheit nicht enthalten
- Referenzmaterialien mit definierten Konzentrationen einzelner Analyten, z.B. CRM-Proben (certified reference materials)
- Referenzmaterialien mit definierten Eigenschaften, z.B. Eichöl für die Kalibrierung des Viskosimeters oder Standardmalz für die Kalibrierung des Friabilimeters.

3.5 Mathematische Grundlagen

3.5.1 Regressionsanalyse

Hilfsgrößen

$$Q_{xx} = \sum x_i^2 - \frac{1}{N} \cdot (\sum x_i)^2$$

$$Q_{yy} = \sum y_i^2 - \frac{1}{N} \cdot (\sum y_i)^2$$

$$Q_{xy} = \sum (x_i \cdot y_i) - \left(\frac{1}{N} \sum x_i \cdot \sum y_i \right) \quad Q_{x^3} = \sum x_i^3 - \left(\frac{1}{N} \sum x_i \cdot \sum x_i^2 \right)$$

$$Q_{x^4} = \sum x_i^4 - \left(\frac{1}{N} (\sum x_i^2)^2 \right) \quad Q_{x^2y} = \sum (x_i^2 \cdot y_i) - \left(\frac{1}{N} (\sum y_i \cdot \sum x_i^2) \right)$$

$$\bar{x} = \frac{1}{N} \sum x_i$$

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

Regression 1. Grades

Steigung $b = \frac{Q_{xy}}{Q_{xx}}$

Achsenabschnitt $a = \bar{y} - b \cdot \bar{x}$

Korrelationskoeffizient
$$r = \frac{\sum (x_i y_i) - \frac{1}{N} (\sum x_i)(\sum y_i)}{\sqrt{\left[\sum x_i^2 - \frac{1}{N} (\sum x_i)^2 \right] \left[\sum y_i^2 - \frac{1}{N} (\sum y_i)^2 \right]}}$$

Reststandardabweichung
$$s_y = \sqrt{\frac{1}{N-2} \left(Q_{yy} - \frac{Q_{xy}^2}{Q_{xx}} \right)}$$

Verfahrensstandardabweichung
$$s_{x0} = \frac{s_y}{b}$$

Verfahrensvariationskoeffizient $V_{x_0} = \frac{s_{x_0}}{\bar{x}} \cdot 100\%$

untere Arbeitsbereichsgrenze $x_p = 2 \cdot s_{x_0} \cdot t \sqrt{\frac{1}{N} + 1 + \frac{(y_p - \bar{y})^2}{b^2 \cdot Q_{xx}}}$

Regression 2. Grades

Achsenabschnitt $a = \bar{y} - b \cdot \bar{x} - \frac{c}{N} \sum x_i^2$

Koeffizient x $b = \frac{Q_{xy} - c \cdot Q_{x^3}}{Q_{xx}}$

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

Reststandardabweichung $s_y = \sqrt{\frac{1}{N-3} \cdot \left(\sum y_i^2 - a \cdot \sum y_i - b \cdot \sum x_i y_i - c \cdot \sum x_i^2 y_i \right)}$

Empfindlichkeit $E = b + 2 \cdot c \cdot \bar{x}$

Verfahrensstandardabweichung $s_{x_0} = \frac{s_y}{E}$

3.5.2 Linearitätstest: Anpassungstest nach MANDEL

s_{y_1} Reststandardabweichung für Kalibrierfunktion 1. Grades

s_{y_2} Reststandardabweichung für Kalibrierfunktion 2. Grades

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

Prüfwert
$$PW = \frac{DS^2}{s_{y_2}^2}$$

Vergleich mit Tabellenwert $F(f_1 = 1, f_2 = N - 3, P = 99 \%)$

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

3.5.3 Ausreißertest mittels f-Test der Reststreuungen

Kalibrierdaten müssen grundsätzlich ausreißerfrei sein. Die Residualanalyse kann zum Nachweis von Ausreißern herangezogen werden. Dazu wird zunächst aus allen Wertepaaren die Kalibriergerade mit der Reststandardabweichung $s_{y_{A1}}$ berechnet. Nach Eliminierung eines verdächtigen Ausreißerpaars aus den Daten wird eine neue Kalibriergerade mit der Reststreuung $s_{y_{A2}}$ berechnet. Die Prüfung erfolgt mit dem F-Test.

$s_{y_{A1}}$ Reststandardabweichung für Kalibrierfunktion mit allen Werten

$s_{y_{A2}}$ Reststandardabweichung für Kalibrierfunktion ohne ausreißerverdächtigen Wert

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

Vergleich mit Tabellenwert $F (f_1 = 1, f_2 = N_{A2} - 2, P = 95 \%)$

Wenn $PW < F$, dann liegt kein Ausreißer vor.

3.6 Literatur

1. W. Funk, V. Dammann und G. Donnewert, Qualitätssicherung in der Analytischen Chemie, VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim 1992

t-Tabelle

f	t (P = 95 %)	t (P = 99 %)
1	12.706	63.657
2	4.303	9.925
3	3.182	5.841
4	2.776	4.604
5	2.571	4.032
6	2.447	3.707
7	2.365	3.499
8	2.306	3.355
9	2.262	3.250
10	2.228	3.169
11	2.201	3.106
12	2.179	3.055
13	2.160	3.016
14	2.145	2.977
15	2.131	2.947

f = Freiheitsgrad

F-Tabelle für f1 = 1

f2	F (P = 95 %)	F (P = 99 %)
1	161.4	4052
2	18.51	98.50
3	10.13	34.12
4	7.71	21.20
5	6.61	16.26
6	5.99	13.75
7	5.59	12.25
8	5.32	11.26
9	5.12	10.56
10	4.96	10.04
11	4.84	9.65
12	4.75	9.33
13	4.67	9.07
14	4.60	8.86
15	4.54	8.68

f1, f2 = Freiheitsgrade

FOR Methodenvalidierung

Probenart: _____

Validierung auf: _____

Methode: _____

Statistische Kenndaten

Kalibrierfunktion linear
 Polynom 2. Grades
 andere

Präzision (2.3) r:
 R:

Wiederfindung Zusatz: %
 Zusatz: %

Bestimmungsgrenze

Messbereich

Freigegeben:

Datum/Unterschrift

1. Spezifität

		Ja	Nein	Datum/Unterschrift
1.1.	Analyse des Probelösungsmittels	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
1.2.	Analyse von Verunreinigungen/Abbauprodukten	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
1.3.	Vergleich von Peakform, Retentionszeit und UV-Spektrum von Standard und Probe	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
1.4.		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	

2. Präzision

		Ja	Nein	Datum/Unterschrift
2.1.	Gerätepräzision: 6-fach Bestimmung Standard	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
2.2.	Gerätepräzision: 6-fach Bestimmung Probe	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
2.3.	Methodenpräzision: 6-fach Aufarbeitung eines homogenen Musters	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
2.4.		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	

3. Richtigkeit/Wiederfindung

		Ja	Nein	Datum/Unterschrift
3.1.	Wiederfindung, Zusatz entsprechend 1 × BGfach-Bestimmung	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
3.2.	Wiederfindung, Zusatz entsprechend 10 × BGfach-Bestimmung	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
3.3.	Wiederfindung, Zusatz entsprechendfach-Bestimmung	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
3.4.	Analyse eines zertifizierten Referenzmaterials, CRM..... fach-Bestimmung	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
3.5	Vergleich verschiedene Extraktionstechniken	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
3.6.		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	

4. Linearität

		Ja	Nein	Datum/Unterschrift
4.1.	Linearität Standard: 5 Konzentrationen zwischen und	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
4.2.	Linearität Probenaufarbeitung: 5 Konzentrationen zwischen und	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
4.3.		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	

5. Messbereich

		Ja	Nein	Datum/Unterschrift
5.1.		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	

6. Nachweisgrenze

		Ja	Nein	Datum/Unterschrift
6.1.	Nachweisgrenze (Signal/Rauschen 3:1):	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	

7. Bestimmungsgrenze

		Ja	Nein	Datum/Unterschrift
7.1.	Bestimmungsgrenze (Signal/Rauschen 10:1):	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	

8. Robustheit

		Ja	Nein	Datum/Unterschrift
8.1.		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
8.2.		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
8.3.		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	

9. Systemeignungstest

		Ja	Nein	Datum/Unterschrift
9.1.	Retentionszeit von	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
9.2..	Injektionspräzision von	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
9.3.	Analyse einer Blindprobe	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
9.4.		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
9.5.		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	