

18. Jahrestagung Trinkwasserringversuche Nordrhein-Westfalen – Niedersachsen

02. März 2017

***Neues aus dem Bereich der „Meta-Normen“
aus der A-Reihe DEV***

- Kalibrierung, Nachweisgrenze und Co. -

Gliederung:

- Die neue DIN 38402-51 (DEV A 51)
Kalibrierung von Analysenverfahren – Lineare Kalibrierfunktion
- Überarbeitung der DIN 38402-71 (DEV A 71)
Gleichwertigkeit von zwei Analysenverfahren

Die alte A 51

- erschienen im Mai 1986
- wurde hauptsächlich für photometrische Bestimmungen entwickelt
- Hauptziel war die Bestimmung von Verfahrenskenndaten
- **viele Restriktionen für moderne Analysenverfahren**

Die alte A 51

- **Varianzenhomogenität** muss erfüllt sein
- Arbeitsbereich i.d.R. **nur eine Dekade**
- Mind. 5, gewöhnlich **10 Kalibrierpunkte**
- **Äquidistante** Verteilung der Kalibrierpunkte
- Linearitätstest mit Anpassungstest nach **Mandel**
- Berechnung der **Verfahrenskenngrößen**
- Schätzung der Messunsicherheit aus der Kalibrierung über einen **Vertrauensbereich**

Die neue DIN 38402-A 51 (Sept 2015)

- Ergebnis sechsjähriger, intensiver Diskussion
- Was ist neu?
 - neue Linearitätstests
 - Arbeitsbereich kann viel größer sein als eine Dekade
 - Varianzenhomogenität wird nicht vorausgesetzt
 - Beschreibung verschiedener Kalibrierstrategien
 - Strategien zur Prüfung der Gültigkeit der Kalibrierung
 - Mandel-Test, Berechnung von Verfahrenskenndaten und Vertrauensbereichen nur noch im informativen Anhang
- Ziel: **Kalibrierung für die Routineanalytik**

Linearitätstest in alter A 51 (Mandel-Test)

- erfordert äquidistante Kalibrierung und Varianzenhomogenität
 - Statistischer Signifikanztest angewandt auf Reststandardabweichungen aus linearer und quadratischer Regression
 - Wenn die Reststandardabweichung aus der quadratischen Regression signifikant besser ist (99% Vertrauensniveau), dann ist die Kalibrierfunktion nicht linear

Linearitätstest in neuer A 51

Zwei Möglichkeiten:

- Punkt-zu-Punkt-Steigung (im normativen Teil)
- Empirischer Krümmungstest (im informativen Anhang C)

Punkt-zu-Punkt-Steigung und empirischer Krümmungstest führen zum selben Ergebnis, beim Krümmungstest sind mehr Sonderfälle zu beachten.

Weiterhin anwendbar bei Varianzenhomogenität :

- Mandel-Test (im informativen Anhang A)

Linearitätstest über Punkt-zu-Punkt-Steigungen

- Erstellung einer Kalibrierreihe mit mindestens 6 Gehalten
 - äquidistante Verteilung über den Arbeitsbereich oder
 - geometrische Reihe (z.B. 1, 2, 4, 8,...) oder
 - auf einer logarithmischen Skala in annähernd äquidistanten Abständen, z.B. 0,1; 0,2; 0,5; 1; 2; 5; 10; 20; 50;...
- Visuelle Prüfung im x-y-Diagramm,
Darstellung der Messpunkte, ggf. mit linearer Ausgleichsfunktion und
Ausgleichsfunktion 2. Grades
- Darstellung der Differenzen der Punkt-zu-Punkt-
Steigungen zum Median der Steigungen
Entsprechend den Genauigkeitsanforderungen an die Analytik kann
ein Toleranzbereich festgelegt werden.

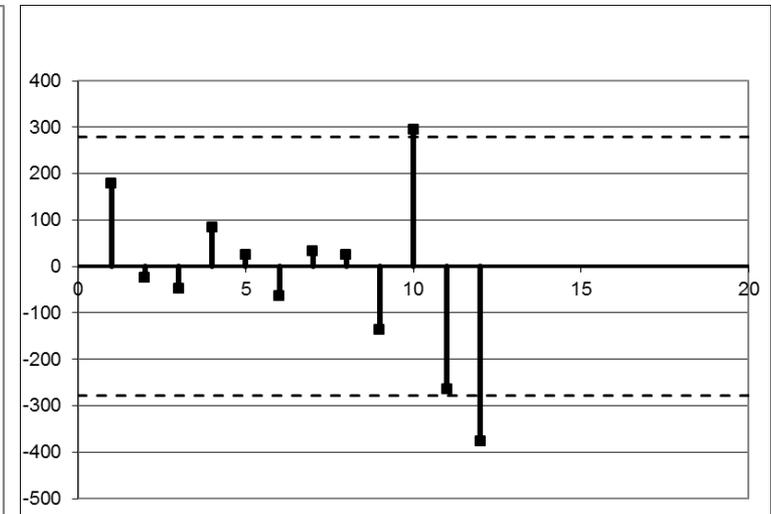
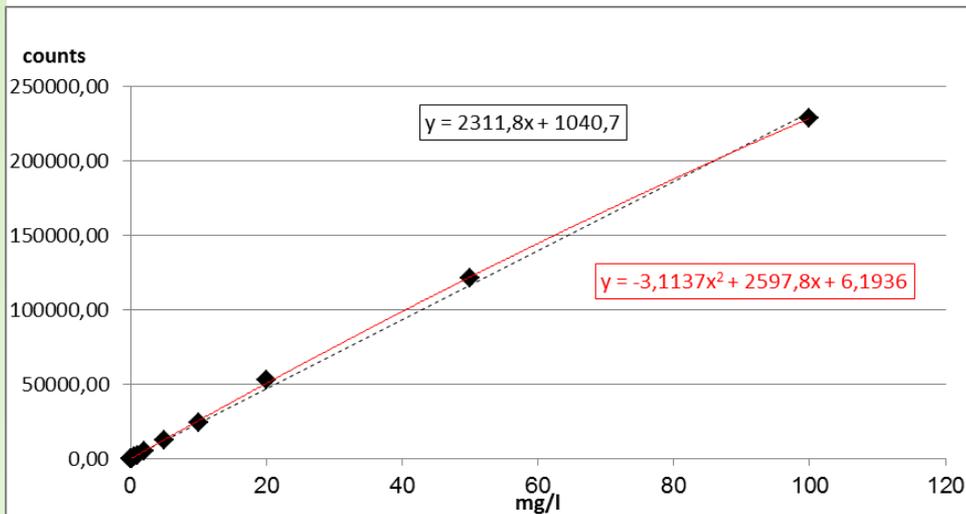
Linearitätstest über Punkt-zu-Punkt-Steigungen

Beispiel: Bestimmung von Blei mittels ICP-OES

Visuelle Prüfung der Linearität

Δ Punkt-zu-Punkt-Steigungen

Tolerierte Abweichung: 10%



Ergebnis: ab 20 mg/l ist eine Abweichung vom linearen Verhalten wahrscheinlich

Linearitätstest über empirischen Krümmungstest

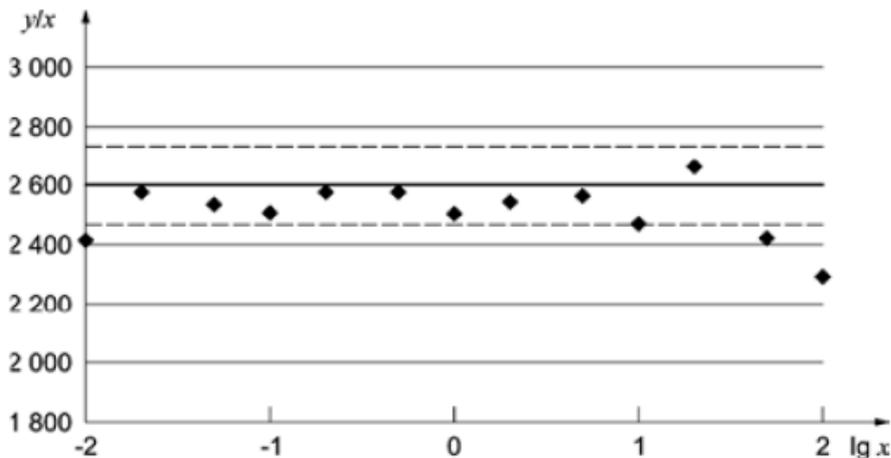
- Jeweils die Steigung der Ursprungsgerade durch die einzelnen Messpunkte, d.h. die **Responsivität** $R = y/x$ bestimmen
- Kalibrierfunktion 2. Grades ($y = a + bx + cx^2$) berechnen
- Die maximal zu tolerierende Abweichung von R zum Koeffizienten b aus der Kalibrierfunktion zweiten Grades festlegen, z.B. 5% (abhängig vom Analysenverfahren)
- Schwellenwert R_0 berechnen:
 $R_0 = 0,95 \times b$ (bei negativem Vorzeichen von b) bzw.
 $R_0 = 1,05 \times b$ (bei positivem Vorzeichen von b)

Linearitätstest über empirischen Krümmungstest

Beispiel: Bestimmung von Blei mittels ICP-OES

Arbeitsbereich 0,01 mg/l bis 100 mg/l

Tolerierte Abweichung: 5 %, Schwellenwert: $R_0 = 0,95 \times b = 2\,468$



(b aus der Kalibrierfunktion 2. Grades)

Ergebnis: Für den 13. und den 12. Messpunkt gilt $R < R_0$, d.h. der 13. und der 12. Messpunkt gehören zum gekrümmten Bereich der Kalibrierfunktion

Kalibrierstrategie I

Kalibrierung des Messverfahrens mit externem Standard, mit Bestimmung der Wiederfindungsrate des Analyten

- Matrixfreie Kalibrierlösung
- Gehaltswert der Probe wird ungeachtet der Matrix der Probe aus dem Anzeigewert der Probe und der Kalibrierfunktion bestimmt
- Matrixeinfluss oder verfahrensbedingte Einflüsse werden über die Wiederfindungsrate aufgestockter realer oder synthetischer Proben korrigiert, sofern notwendig

Für Analyseverfahren mit weitgehend konstanten Wiederfindungsraten

Kalibrierstrategie II

Kalibrierung des Messverfahrens mit internem Standard, mit Bestimmung der Wiederfindungsrate des internen Standards

- Matrixfreie Kalibrierlösung mit internem Standard
- Gehaltswert der Probe wird ermittelt aus dem Quotienten der Anzeigewerte des Analyten und des internen Standards und der Kalibrierfunktion
- Durch das Zusetzen des internen Standards zur Probe vor der Probenaufarbeitung werden Matrixeinflüsse korrigiert

Bei von Probe zu Probe unterschiedlichem und nicht zu vernachlässigendem Matrixeinfluss.

Kalibrierstrategie III

Kalibrierung des Gesamtverfahrens mit externem Standard

- synthetische Proben oder analytfreie reale Proben werden mit Analyt zur Herstellung von Kalibrierproben aufgestockt und dem gesamten Verfahren unterzogen
- Gehaltswert der Probe wird ungeachtet der Matrix der Probe aus dem Anzeigewert der Probe und der Kalibrierfunktion bestimmt

Bei matrixbedingten Störungen, die sich in Betrag und Richtung gleichartig auf die Messergebnisse auswirken.

Für Analyseverfahren, bei denen der Analyt derivatisiert wird.

Kalibrierstrategie IV

Kalibrierung des Gesamtverfahrens mit internem Standard

- Zur Herstellung von Kalibrierproben werden synthetische Proben oder analytfreie reale Proben mit Analyt aufgestockt und mit internem Standard dotiert und diese dem gesamten Verfahren unterzogen
- Durch das Zusetzen des internen Standards zur Probe vor der Probenaufarbeitung werden Matrixeinflüsse korrigiert

Bei von Probe zu Probe unterschiedlichem und nicht zu vernachlässigendem Matrixeinfluss.

Für Analyseverfahren, bei denen der Analyt derivatisiert wird.

Kalibrierstrategie V

Kalibrierung nach dem Verfahren der Standardaddition

- Die Probe selbst wird zur Herstellung der Kalibrierproben durch Aufstocken mit Analyt verwendet
- Gehaltswert der Probe wird durch Division des Anzeigewerts der unaufgestockten Probe durch die Steigung der Kalibrierfunktion ermittelt

Für Analyseverfahren, von denen bekannt ist, dass jede Matrix signifikant und in unvorhersagbarer Weise den Anzeigewert beeinflusst.

Strategien zur Prüfung der Gültigkeit der Kalibrierung

- Prüfung muss arbeitstäglich erfolgen
- Der notwendige Umfang der Prüfung ist von vielen Faktoren abhängig und muss vom Anwender festgelegt werden

Mögliche Strategien

- Überprüfung mit einer Kontrolllösung/-probe
 - Für Kalibrierstrategien I und II: unabhängige Kontrolllösung, z.B. aus zertifiziertem Standard
 - Für Kalibrierstrategien III und IV: Matrix-ZRM oder stabile reale Probe aus Laborvergleichsuntersuchungen
 - Dokumentation über Regelkarte
- Prüfung der Steigung der Kalibriergeraden
 - mit zwei Kontrolllösungen/-proben
 - Steigung zwischen diesen beiden Punkten muss im Toleranzbereich liegen

Informative Anhänge

- A** Anpassungstest nach Mandel, Verfahrensstandardabweichung, Verfahrensvariationskoeffizient und Vertrauensbereich
Für die Fortsetzung von Qualitätskontrollprogrammen basierend auf Verfahrenskenndaten nach der alten A 51
- B** Beispiele zum Linearitätstest über Punkt-zu-Punkt-Steigungen
- C** Prüfung des linearen Arbeitsbereichs mithilfe des empirischen Krümmungstests
- D** Gewichtete Regression – Wichtung $1/x$

Excel-Arbeitsblätter

Für die Berechnungen nach dieser Norm wurden drei Excel-Arbeitsblätter erstellt:

- Linearitätstest über Punkt-zu-Punkt-Steigung und empirischen Krümmungstest
- Standardaddition
- Gewichtete Regression $1/x$

Nach dem Neudruck der A 51 zum Download unter www.wasserchemische-gesellschaft.de bereitgestellt.

Fehler in der Norm vom September 2015

- Die zunächst erstellten Excel-Arbeitsblätter waren fehlerhaft.
- Daher waren die Zahlenwerte und Diagramme im Anhang B fehlerbehaftet.
- Der Verkauf der im September 2015 erschienenen Norm wurde gestoppt, mit der Neuveröffentlichung wird im April 2017 gerechnet.
- Danach kommt die Norm auch in die DEV.

Zusammenfassung

- Die neue A 51 ist wesentlich mehr praxisorientiert.
- Der Wegfall der Forderungen nach Varianzenhomogenität und Äquidistanz wurde von vielen Analytikern schon lange erhofft.
- Viele Entscheidungen (z.B. tolerierte Abweichungen für die Linearitätsprüfung) liegen nun in Anwenderhand und können flexibler gehandhabt werden.
- Wenn Verfahrenskenndaten ermittelt werden sollen, kann dies auch weiter mit den im informativen Anhang A aufgeführten Verfahren getan werden.

Überarbeitung der DIN 38402-71

Titel der aktuellen Norm:

DIN 38402-71: 2002-11

Gleichwertigkeit von zwei Analysenverfahren aufgrund des Vergleiches von Analyseergebnissen und deren statistischer Auswertung, Vorgehensweise für quantitative Merkmale mit kontinuierlichem Wertespektrum (DEV A 71)

Überarbeitung DIN 38402-71

Gründe für die Überarbeitung

- Hoher zusätzlicher Messaufwand bei der alten A 71
- Ergebnisse der Gleichwertigkeitsprüfung nach der alten A 71 können vom Analytiker „manipuliert“ werden
- Kritik an Ausreißertests
- Nachteile bei sehr präzisen Verfahren
- Regressionsverfahren führen leichter zum Ergebnis „gleichwertig“ als F- und t-Test

Überarbeitung DIN 38402-71

- Gründungssitzung des Arbeitskreises am 16.09.2015
- Zweite Ausschreibung des Arbeitskreises wegen zu geringer Teilnehmerzahl
- Vier Sitzungen im Jahr 2016
 - Literaturlauswertung:
Alternative Verfahren zur Prüfung der Gleichwertigkeit
 - Grundsatzdiskussion: warum/wofür Gleichwertigkeitsnachweis
 - Vorauswahl geeigneter Verfahren
 - Auswertung von Beispieldaten aus der Praxis

Ziele

- Praxistauglich, kein großer zusätzlicher Messaufwand
- Auch für Nicht-Statistiker nachvollziehbar
- Keine spezielle Software, Prüfung sollte mit Hilfe eines Excel-Arbeitsblatts erfolgen können
- Gleichwertigkeitsprüfung soll nicht „manipulierbar“ sein
- Festlegung von Toleranzgrenzen z.B. auf der Basis von externen Vorgaben zur Messunsicherheit

Mögliche Alternativverfahren

Derzeit bei EURACHEM u.a. für die Analytik in den Bereichen Lebensmittel, Medizin und Pharma favorisierte Verfahren:

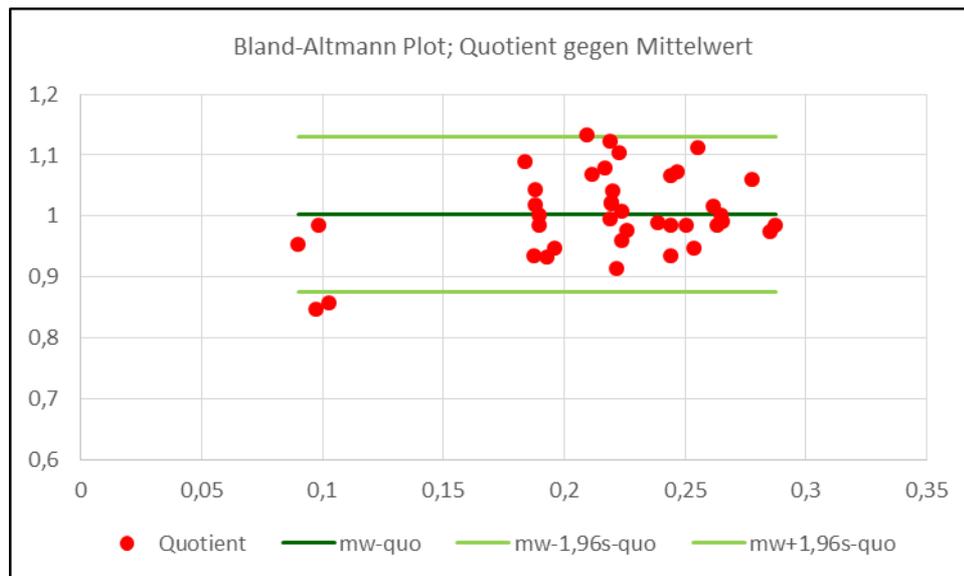
- **Bland-Altman-Diagramm**
 - Analyse verschiedener Proben mit beiden Analysenverfahren
 - Auswertung mit relativem oder absolutem Verfahren, abhängig vom Konzentrationsbereich

- **Äquivalenztest TOST** (two one-sided t -tests)
 - Alternative zum Mittelwert- t -Test
 - Akzeptanzkriterium ($\pm\theta$) muss vorher festgelegt werden
 - Wiederholmessungen einer Probe mit beiden Analyseverfahren
 - sinnvoll: Untersuchung von 3 Konzentrationsniveaus

Bland-Altman-Diagramm

Beispiel für relatives Verfahren

Vergleich der Chrom(VI)Bestimmung mittels Ionenchromatographie mit der adsorptionsvoltammetrischen Chrom(VI)Bestimmung

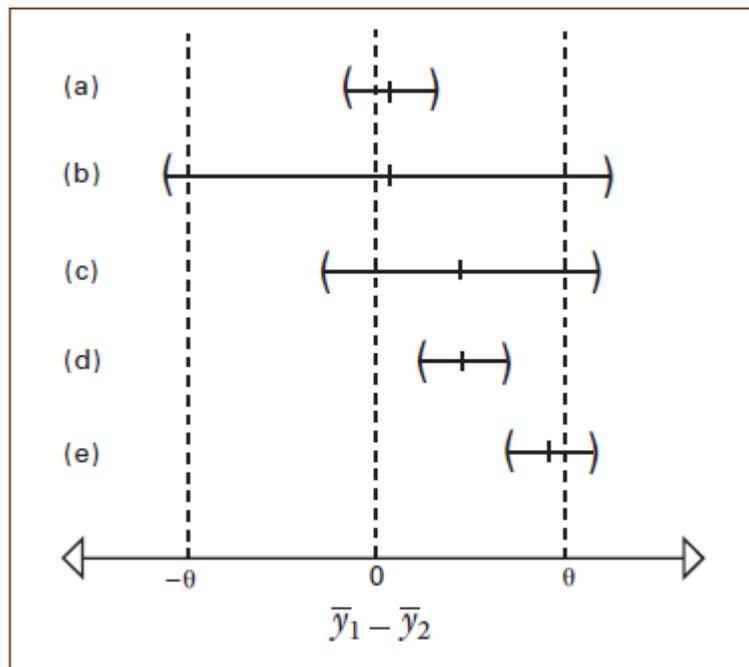


Ergebnis:

konstant-systematische Abweichung bei niedrigen Konzentrationen,
 keine proportional-systematische Abweichung
 (Daten von Dr. K.-H. Bauer, Hessenwasser)

Äquivalenztest TOST (two one-sided t -tests)

Vergleich der Ergebnisse von Mittelwert t -Test und TOST



- (a) gleichwertig und äquivalent
- (b) und (c) gleichwertig aber nicht äquivalent
- (d) nicht gleichwertig aber äquivalent
- (e) nicht gleichwertig und nicht äquivalent

Überarbeitung DIN 38402-71

Was noch zu tun ist:

- Simulationsrechnungen
 - TOST im Vergleich zu Äquivalenztest nach Uhlig (Unterschied: zentraler bzw. nicht zentraler t -Test)
 - Risiko falsch positiver Ergebnisse bei Gleichwertigkeitsprüfung minimieren
 - Mindestanzahl von Daten ermitteln
- Normentwurf
- Excel-Arbeitsblätter

Die neue A 71 wird frühestens Ende 2018 vorliegen!

**Vielen Dank
für Ihre Aufmerksamkeit**

