

# Einführung und Validierung von Analysemethoden

## 1 *Allgemeines*

Bei der Einführung von neuen Methoden können grundsätzlich drei Fälle unterschieden werden:

- 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 können Gehaltsbestimmungen 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, differenziert werden.

## 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. Es wird zwischen Wiederholpräzision und Vergleichspräzision unterschieden.

### *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 Analyseergebnisse 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 Einführung neuer Methoden: Vorgehen

	neue Methoden		Modifikation bestehender Methoden			offizielle Methoden		
	Behaltsbestimmung	Spurenanalytik	Behaltsbestimmung	Spurenanalytik	Behaltsbestimmung	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

### 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 wird zwischen Warngrenzen, deren vereinzelte Überschreitung noch toleriert wird, und Kontroll- oder Eingriffsgrenzen, deren Überschreiten Maßnahmen zur Folge hat, unterschieden.

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.

## 5 Mathematische Grundlagen

### 5.1 Regressionsanalyse

Hilfsgrößen

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

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

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

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

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

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

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

**Regression 1. Grades**

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

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

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  $s_{x_0} = \frac{s_y}{b}$

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

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

**Regression 2. Grades**

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

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

Koeffizient x<sup>2</sup>  $c = \frac{Q_{xy} \times Q_{x^3} - Q_{x^2y} \times Q_{xx}}{(Q_{x^3})^2 - Q_{xx} \times Q_{x^4}}$

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

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

Verfahrens-  
standard-  
abweichung  $s_{x_0} = \frac{s_y}{E}$

## 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.

### 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

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

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

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

## 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  $f_1 = 1$** 

$f_2$	F (P = 95 %)	F (P = 99 %)
1	161,40	4052,00
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

 $f_1, f_2$  = 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: sechsfach Bestimmung Standard	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
2.2.	Gerätepräzision: sechsfach Bestimmung Probe	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
2.3.	Methodenpräzision: sechsfach 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 × BG .....fach-Bestimmung	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
3.2.	Wiederfindung, Zusatz entsprechend 10 × BG .....fach-Bestimmung	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
3.3.	Wiederfindung, Zusatz entsprechend .....fach-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"/>	