

Qualitätsmanagement

Jede Analytik benötigt ein Qualitätsmanagementsystem. Das umfasst die Aufbewahrung der Daten, die Dokumentation der Methoden (als Standardarbeitsanweisungen) und die Überwachung folgender Parameter, wie z. B. Präzision, Richtigkeit, Genauigkeit und Nachweisgrenze. Dafür werden mit einem Kontrollkartensystem Blindwerte, Standards und Replikate aufgezeichnet. Diese sollen mit den Daten und für den passenden Messzeitraum archiviert werden.

Zum Qualitätsmanagement gehört auch, dass regelmäßig die Reagenzien kalibriert werden. Außerhalb des kalibrierten Messbereichs darf nicht gemessen werden. Liegt die Konzentration oberhalb des Messbereichs, muss die Probe erneut und verdünnt gemessen werden.

In Publikationen sollen mindesten die Bestimmungsgrenze und die erweiterte Standardunsicherheit angegeben. Letztere wird über die Fehlerfortpflanzung der Summe aus Standardunsicherheit von Proben und Standards berechnet. Für die anderen Grundrechenarten gibt es auch Formeln der Fehlerfortpflanzung nach Doerffel.

1 Freiheitsgrade

- Die Anzahl von *Freiheitsgraden* hängt vor allem von der Anzahl der verfügbaren Informationen ab (A).

(A) $f = n - v - m$

- f: Freiheitsgrade
- n: Anzahl der unabhängigen Beobachtungen (Messwerte)
- v: Anzahl der unabhängigen Variablen (für Kalibrierungen 1)
- m: Anzahl der in die Berechnung des Parameters noch eingehenden Werte (z. B. für Mittelwert 1)

- Die Freiheitsgrade geben diejenige Anzahl von Parametern eines Systems an, die verändert werden können, ohne dass sich der Parameter ändert. Z. B. ist ein Mittelwert aus 3 Messwerten mit dem Freiheitsgrad 2 belegt, weil sich 2 Beobachtungen ändern können, ohne dass sich der Mittelwert ändert.
- Der Parameter ist der Gehalt des zu bestimmenden Bestandteils bzw. der *Analyt*.

2 Nachweis- und Bestimmungsgrenze

- Die *Nachweisgrenze* ist derjenige kritische Gehalt des Analyten, der zwischen Leerwerten und Messwerten unterscheidet. Sie hängt von der Güte der Leerwerte bzw. der Kalibrierung (3 und 4) ab. Sie ist die Entscheidungsgrenze für das Vorhandensein des Analyten.
 - Ein Analyt ist **qualitativ** nachgewiesen bzw. vorhanden, wenn er den kritischen Wert der Messgröße überschreitet, i.e. größer ist als die Summe des Leerwerts (3) und dessen Unsicherheit (mit dem Maß der Streuung).
 - Die NG dient der Bewertung einer durchgeführten Analyse.
- Die *Bestimmungsgrenze* ist der Gehalt des Analyten, bei dem die relative Ergebnisunsicherheit einen vorgegebenen Wert annimmt. Die Ergebnisunsicherheit ergibt sich aus dem (zweiseitigen) Vorhersagebereich, dem Vertrauensniveau und dem zugehörigen Analytengehalt. Sie beschreibt die Leistungsfähigkeit des quantitativen Verfahrens.

- Ein Analyt ist **quantifizierbar**, wenn sein Gehalt mit einer relativen Ergebnisunsicherheit ermittelt werden kann, i.e. in dem der Messwert über der BG liegt. Die BG gibt damit eine Auskunft über die Durchführbarkeit quantitativer Analysen.
- NG und BG gelten niemals allgemein, sondern immer für ein bestimmtes Probenmaterial (Wasserprobe, Gestein), ein bestimmtes Analysenverfahren (Methode) und das festgelegte Vertrauensniveau.

3 Schnellschätzung der NG und BG aus Leerwerten und Kalibriergeraden

- Die *Leerprobe* (auch Blindprobe, Blank) ist eine Probe, die den Analyten nicht enthält, sonst aber mit den Proben übereinstimmt. Da sie selten vorhanden ist oder streng genommen nicht hergestellt werden kann, benutzt man eine Probe mit dem geringst möglichen Gehalt an Analyten und einer probenähnlichen Matrix (Salinität, pH u.ä.).
- Der *Leerwert* (auch Blindwert) ist das arithmetische Mittel der Leerproben.
- Die Leerwertmethode ist die direkte Bestimmung der NG und BG.
- Die **Anzahl der Messungen (Leerproben)** bestimmt den Sicherheitfaktor Φ und **soll ≥ 10 sein.**
- Der Leerwert wird aus den Konzentrationen des Analyten (in $\mu\text{mol l}^{-1}$) über eine Kalibrierfunktion ermittelt, ohne dass diese (selbst) in die NG und BG eingeht.
- Die NG ist ein Vielfaches der Verfahrensstandardabweichung (C, Leerwertmethode), wobei

(B) $s = F \cdot s_L$ ist.

(C) $NG = \Phi_{n,\alpha} \cdot s$

Φ : Faktor aus Tab. 1
 n : Anzahl der Messungen
 α : Signifikanzniveau (für einseitigen Fehler)
 s_L : Standardabweichung der Extinktionen
 s : Standardabweichung der Leerwerte (in $\mu\text{mol l}^{-1}$)
 F : Anstieg der Kalibriergeraden ($x=\text{Ext}$, $y=\text{Konz}$)

Tabelle 1. Faktoren $\Phi_{n,\alpha}$ für die Schätzung der Leerwertmethode (n : Anzahl der Messungen, α : Signifikanzniveau, wobei 0,05 einer 5%igen Irrtumswahrscheinlichkeit entsprechen). Grau hinterlegt sind das üblicherweise genutzte Signifikanzniveau und die für die Schätzung geeignete Messwertanzahl.

n	$\Phi_{n,0.05}$	$\Phi_{n,0.025}$	$\Phi_{n,0.01}$	$\Phi_{n,0.005}$
4	2.6	3.6	5.1	6.5
5	2.3	3.0	4.1	5.0
6	2.2	2.8	3.6	4.4
7	2.1	2.6	3.4	4.0
8	2.0	2.5	3.2	3.7
9	2.0	2.4	3.1	3.5
10	1.9	2.4	3.0	3.4
11	1.9	2.3	2.9	3.3
12	1.9	2.3	2.8	3.2

- Näherungsweise ergibt sich die BG wie folgt aus der NG (D)

(D) $BG \approx k \cdot NG$ $k = 3$ für $n=10$ Messungen und 33,3% relativer Ergebnisunsicherheit

- Ein zusätzlicher Sicherheitsfaktor bezieht eine Erhöhung der Standardunsicherheit durch Streuungen der Kalibriergeraden ein (E).

(E) $NG = 1,2 \cdot \Phi_{n,\alpha} \cdot s$ s : Verfahrensstandardabweichung (als Konzentration, z. B. $\mu\text{mol l}^{-1}$)
 1,2: Sicherheitsfaktor

- Die Messwerte der Leerproben müssen normal und die Varianzen homogen verteilt sein.
- Die Leerwertmethode ist zu bevorzugen, wenn die o.g. Voraussetzungen (Leerproben gleicher Matrix, frei vom Analyten) erfüllt sind.
- Die NG und BG können aber auch direkt aus der Kalibriergeraden abgeleitet werden, wenn es keine geeigneten Leerproben gibt.
- **Die Anzahl der Messwerte der Kalibriergeraden soll ebenfalls ≥ 10 sein.** Das können am besten 10 verschiedene Konzentrationen (einer äquidistanten Verdünnungsreihe) sein, aber auch Replikate von weniger Verdünnungsstufen.
- In geeigneten Programmen (nicht Excel, aber Origin) 95%-Konfidenzbanden um die Kalibriergeraden (hier Konzentration= x und Extinktion= y) einzeichnen (Abb. 1). Den Schnittpunkt der oberen 95%-Bande mit der y -Achse parallel zur x -Achse bis zur Kalibriergeraden ziehen. Lot auf die x -Achse fallen. Schnittpunkt mit der x -Achse ist die NG (Abb. 2).

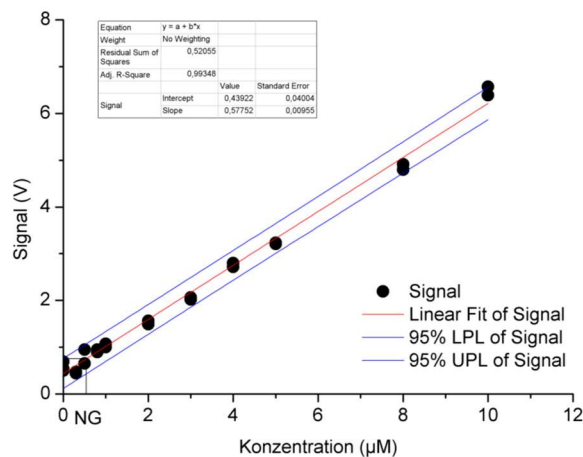


Abb. 1 Kalibriergerade mit 95%-Konfidenzbanden (Origin)

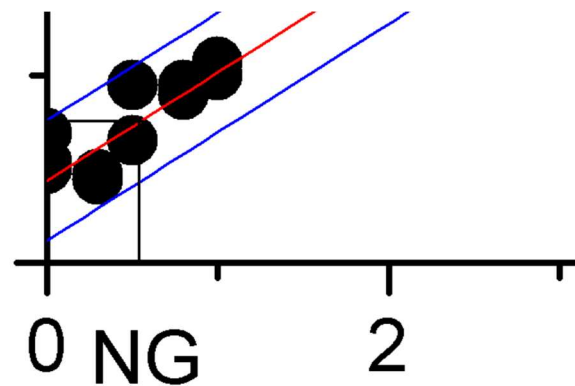


Abb. 2 Vergrößerung des Bereichs, in dem die NG=0,54 $\mu\text{mol l}^{-1}$ graphisch abgeleitet wurde.

4 Bestimmungsgrenze für BSB

- 5 Leerwerte nach Vorschrift messen.
- Bestimmungsgrenze nach Gleichung (F) berechnen.

(F) $BG = t_{0,95(f)} \cdot 2 \cdot s_{BSB} \cdot \sqrt{1 + \frac{1}{n}}$

BG: Bestimmungsgrenze
 t: t-Wert der Student-Verteilung für
 0,95: Irrtumswahrscheinlichkeit und
 f: Zahl der Freiheitsgrade
 s_{BSB} : Standardabweichung der Leerproben
 n: Anzahl der Leerproben

- Der Wurzelterm entfällt, wenn unverdünnte Proben gemessen werden.

Tabelle 2. t-Werte der Student-Verteilung (einseitiger Vertrauensbereich $1-\alpha/2$) für eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 0,95. n=Anzahl und f= Freiheitsgrade der Messungen

n	f	T
2	1	6,314
3	2	2,920
4	3	2,353
5	4	2,132

5 Kalibriergerade

- Kalibriert wird mit einem Analyten, der typischerweise dem Vorkommen der gesuchten Verbindung in den Proben gleich oder ähnlich ist. Dabei muss dessen Löslichkeit (in der passenden Matrix und unter den gegebenen Bedingungen) berücksichtigt werden.
- Eine sehr gute Gerade erhält man, wenn aus einer Stammlösung mit der höchsten zu messenden Konzentration (obere Grenze des Messbereichs) in *geometrischer Verdünnungsreihe* die niedrigeren Konzentrationen hergestellt werden.
- Eine geometrische Verdünnungsreihe entsteht durch die wiederholte Mischung gleich großer Volumina (1+1, aus der verdünnten Lösung wieder 1+1 usw. Abb. 3).

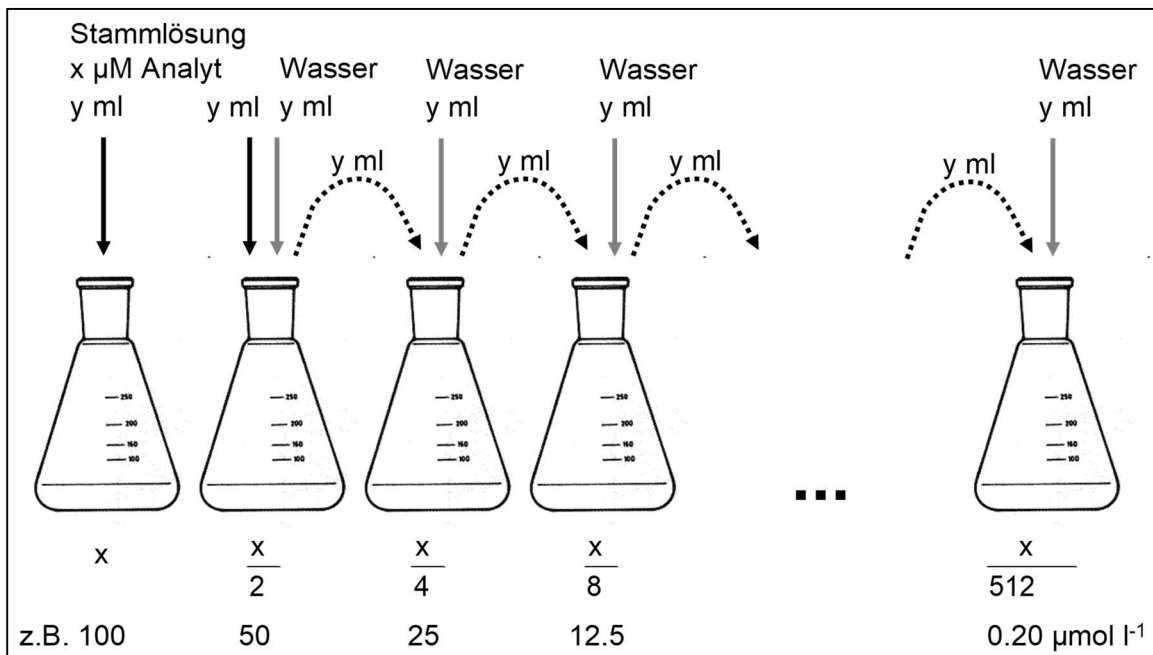
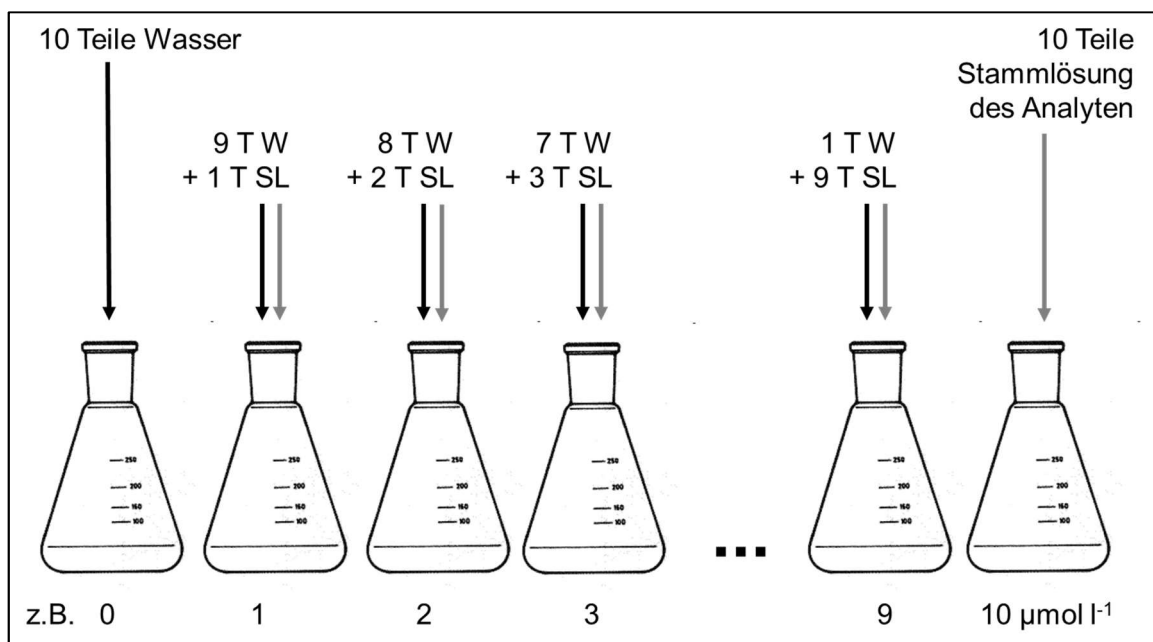


Abb. 3. Schema einer geometrischen Verdünnungsreihe. x: Konzentration des Analyten in der Stammlösung, y: Probenvolumen für die Messung, vom letzten Probengefäß muss die Hälfte der Mischung verworfen werden.

- Üblich sind jedoch *äquidistante Verdünnungsreihen* in der chemischen Analytik (Abb. 4).
- Die *obere Messbereichsgrenze* soll die höchste wahrscheinlich zu messende Konzentration etwas überschreiten, damit alle Messwerte durch Interpolation berechnet werden, i.e. im kalibrierten Bereich liegen.
- Die *untere Messbereichsgrenze* sollte in der Nähe der Leerwerte liegen.

Abb. 4. Schema einer äquidistanten Verdünnungsreihe. T: Teile, W: Reinstwasser, SL Stammlösung des Analyten.

- Pragmatisch geht man so vor:
 - Das Volumen eines Kalibranten so festlegen, wie es für die Proben auch ist. D.h. 25 ml für Phosphat und Nitrit. Die 17,5 ml für Ammonium sind unpraktisch. Deshalb 20 oder 25 ml für jeden Kalibranten herstellen. Dann muss entweder die Reagenzienmenge proportional erhöht werden oder das überschüssige Volumen jedes Kalibranten verworfen werden.
 - Das Volumen eines Teils ist 1/10 davon, z. B. hier 2,5 ml.
 - Zunächst das Reinstwasser einpipettieren. Die 25 ml Reinstwasser (10 Teile, 0 $\mu\text{mol l}^{-1}$) und die 25 ml Analyt (10 Teile, 10 $\mu\text{mol l}^{-1}$) können mit Messzylindern abgemessen werden.
 - Danach in die übrigen 8 Gefäße die benötigten Teile einpipettieren. Keine Abkürzungen! Wirklich 9 x 2,5 ml pipettieren usw.
 - Dann in umgekehrter Reihenfolge die Stammlösung hinzufügen. Gut schütteln!
- Da die meisten Vorschriften eine Leerwertkorrektur enthalten (im Sinne von Reagenzienblindwert), werden von allen Messwerten der Kalibriergeraden die Leerwerte vor der graphischen Darstellung und Berechnung der Funktion abgezogen.
- Bei 10 Kalibranten soll das Bestimmtheitsmaß $R^2 > 0,995$ sein.
- Aus praktischen Erwägungen, i.e. damit die berechnete Funktion direkt zur Konzentrationsberechnung benutzt werden kann, wird die abhängige Größe (Extinktion) auf der x-Achse und die unabhängige (Konzentration) auf der y-Achse aufgetragen (Abb. 5 und 6).
- Dann ist der Anstieg ein Umrechnungsfaktor F von Extinktion in Konzentration.
- Das absolute Glied der Geradengleichung wird üblicherweise nicht mit zur Konzentrationsberechnung benutzt. Es soll nahe Null sein und damit vernachlässigbar. Ist es systematisch > 0 , gibt es keinen analytfreien Leerwert (i.e.S. Reinstwasser). Auch dann ist es logisch, den absoluten Term wegzulassen. Nur bei regelmäßig < 0 liegenden Schnittpunkten mit der Ordinate, gibt es ein Problem mit zu hohen Unsicherheiten der Lage der Kalibriergeraden.



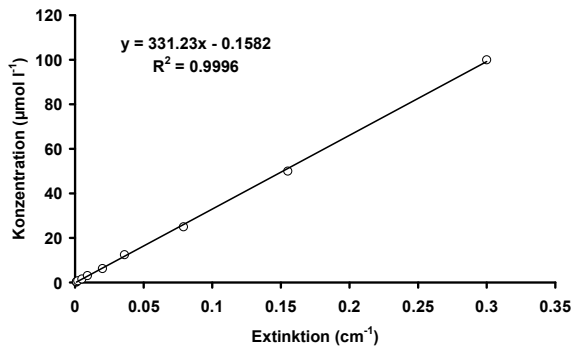


Abb. 5 Geometrische Kalibriergerade mit Faktor F=331 und Bestimmtheitsmaß $R^2 > 0,995$

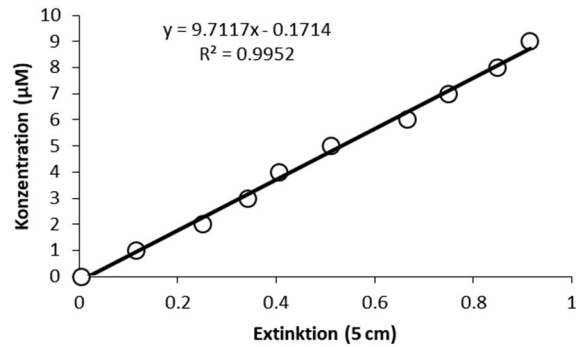


Abb. 6 Äquidistante Kalibriergerade für Ammonium (bei 630 nm) mit Faktor F=9,7 und Bestimmtheitsmaß $R^2 > 0,995$

- Diese Kalibrierung muss für jedes Gerät, für alle Probenmatrices (z. B. wässrige Lösungen verschiedener Salinität) und *jede Reagenziencharge* einmal erstellt und dokumentiert werden.

6 Qualitätsmanagement

- Neben den für die Kalibrierung und die NG nötigen 10 Kalibriermess- und 10 Leerwerten müssen je Messtag mehrere *Leerwerte zur Überwachung der Reagenzien, des Reinstwassers und der Sauberkeit der Gefäße* gemessen werden.
- Je Messreihe (gleichzeitig mit Reagenzien versehene Proben) reicht 1 Leerwert aus. Alternativ (bei geringem Probendurchsatz) sollten 3 pro Mess-Tag angesetzt werden.
- Wenn diese gering sind, werden sie in die **Blindwert-Zielkarte** eingetragen (Abb. 7).
- Steigen die Leerwerte mit der Zeit deutlich, muss eine neue Charge Reagenzien ("Shelf Life" abgelaufen) angesetzt, evtl. auch die Reinheit des Reinstwassers überprüft werden. Empfindlich sind z. B. die Reagenzien der Ammonium- und Phosphatbestimmung. Länger gelagertes Reinstwassers speichert auch Ammonium aus der Atmosphäre.
- Je Messreihe soll mindestens 1 geeigneter *Standardwert zur Überprüfung der Funktion der Reagenzien und der Reaktionsbedingungen* (z.B. Temperatur, Inkubationsdauer, aber auch zur Fehlersuche eingegliedert werden: Küvettenlänge, Messwellenlänge, Null-Stellung des Photometers u.a.).
- Zur Darstellung der Standards ist eine **Sollwert-Zielkarte** das geeignete Instrument (Abb. 8).
- Dieser Standard besteht aus dem Analyten, in mittlerer Konzentration. Am besten geeignet sind Standards, die mit einem Zertifikat bezogen wurden (unabhängiger Nachweis des Analyten, sehr teuer) oder wenigstens nicht aus derselben Stammlösung wie die Kalibranten stammen. Wenn diese Nebenbedingungen eingehalten werden, überprüft der Standard auch die *Richtigkeit* der Messung.
- Geeignete Standards enthalten mindestens den Analyten. Handelt es sich beim Nachweis auch um Aufschlüsse, Extraktionen o.ä., die aus einer Vielzahl von Verbindungen den Analyten erst freisetzen, soll unbedingt und mindestens ein weiterer Standard auch eine repräsentative aufzuschließende Verbindung sein. Diese soll nicht direkt mit den Reagenzien reagieren.
- Die Reproduzierbarkeit von Proben (=Präzision) kann in sogenannten **Spannweiten-Zielkarten** überwacht werden (Abb. 9). Eine Spannweite ist der Absolutwert der Differenz zweier Messwerte dividiert durch deren Mittelwert (Gleichung G).

$$(G) \quad SW = \frac{|X_{R1} - X_{R2}|}{\bar{X}_R} \cdot 100\% \quad SW: \quad \text{Spannweite einer Messung}$$

X_{R1} : Wert der ersten Messung (Replik 1)
 X_{R2} : Wert der zweiten Messung (Replik 2)
 X_R : Mittelwert beider Messungen

- Bei 3 und mehr Replikaten kann man auch die Standardabweichung über den Mittelwert normieren.
- Die Spannweiten werden dann in Prozent angegeben.
- Diese Zielkarte wird besonders wichtig, wenn nicht jede Probe in Replikaten gemessen wird.

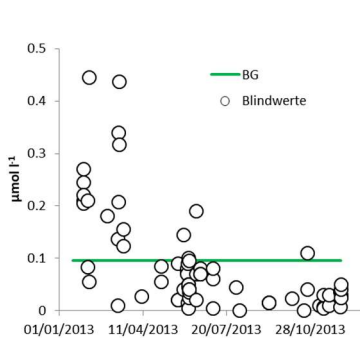


Abb. 7 Blindwertzielkarte aller Phosphatmessungen ($\mu\text{mol l}^{-1}$) aus 2013. BG: Bestimmungsgrenze

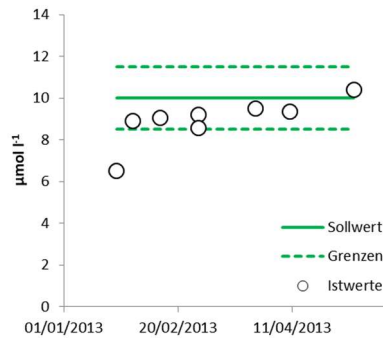


Abb. 8 Sollwertzielkarte aller Phosphatmessungen ($\mu\text{mol l}^{-1}$) aus 2013. Sollwert: Standardkonzentration, Grenzen: $\pm 15\%$ des Sollwerts

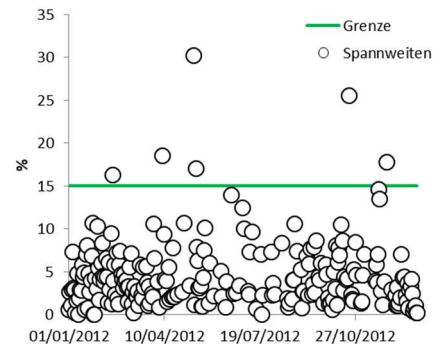


Abb. 9 Spannweitenzielkarte mit einer Obergrenze von 15%

- Die Präzision der wiederholten Messung von Standards und / oder Proben wird Standardunsicherheit genannt.
- Die Präzision der Standards wird aus der Standardabweichung aller im Probenzeitraum gemessenen Standards normalisiert über deren Mittelwert berechnet (Gleichung H). Die Präzision der Messung von Proben wird aus den Spannweiten als Mittelwert berechnet (Gleichung I).
- Im Material- und Methodenteil wird (soweit gemessen) die (daraus) kombinierte Standardunsicherheit angegeben (Gleichung J).

$$(H) \quad V_{KS} = \frac{s_{St}}{\bar{x}_{St}} \cdot 100\%$$

V_{KS} : Vertrauensintervall bzw. Standardunsicherheit aller Standards (Sollwerte) im Messzeitraum
 s_{St} : Standardabweichung aller Standards
 \bar{x}_{St} : Mittelwert aller Standards

$$(I) \quad V_{KP} = \bar{x}_{SW}$$

V_{KP} : Vertrauensintervall bzw. Standardunsicherheit aller Proben im Messzeitraum
 \bar{x}_{SW} : Mittelwert aller Spannweiten

$$(J) \quad V_K = \sqrt{V_{KS}^2 + V_{KP}^2}$$

V_K : kombinierte Standardunsicherheit aller Proben und Standards im Messzeitraum

Referenzen

DIN 32645
 Wellmitz & Gluschke (2005) Leitlinie zur Methodvalidierung. UBA-Bericht 01/05