

13 Zuverlässigkeitskriterien einer analytischen Methode

- 13.1 Einleitung
- 13.2 Präanalytische Phase
 - 13.2.1 Vermeidung von externen Kontaminationen bei der Probenahme
 - 13.2.2 Probenahmezeitpunkt
 - 13.2.3 Probenahmematerial
 - 13.2.4 Probenlagerung und -transport
 - 13.2.5 Probendokumentation
 - 13.2.6 Stabilität eingesetzter Chemikalien, Lösungen und Vergleichsstandards
- 13.3 Selektivität
- 13.4 Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze
 - 13.4.1 Visuelle Ableitung
 - 13.4.2 Bestimmung des Signal/Rausch-Verhältnisses
 - 13.4.3 Blindwertverfahren nach DIN 32 645
 - 13.4.4 Kalibrierkurvenverfahren nach DIN 32 645
 - 13.4.5 Standardabweichungs-Verfahren
 - 13.4.6 Beispiel
- 13.5 Kalibrierung
 - 13.5.1 Wahl der Kalibrierpunkte
 - 13.5.2 Einpunktkalibrierung
 - 13.5.3 Matrixeffekt
 - 13.5.4 Verwendung interner Standards
 - 13.5.5 Linearität der Kalibrierfunktion
 - 13.5.6 Beispiel
- 13.6 Präzision
 - 13.6.1 Beispiel
- 13.7 Richtigkeit
 - 13.7.1 Referenzmaterial (CRM)
 - 13.7.2 Referenzmethoden
 - 13.7.3 Ringversuche
 - 13.7.4 Aufstockverfahren
 - 13.7.5 Rechnerische Bestimmung der Richtigkeit
 - 13.7.6 Einflussgrößen der Richtigkeit
 - 13.7.7 Vergleichbarkeit von Methoden
 - 13.7.8 Beispiele

- 13.8 Messunsicherheit
- 13.8.1 Kombinierte und erweiterte Messunsicherheit
- 13.8.2 Abschätzung der Messunsicherheit
- 13.8.3 Beispiele
- 13.9 Qualitätssicherung
- 13.9.1 Interne Qualitätssicherung
- 13.9.2 Externe Qualitätssicherung
- 13.10 Zusammenfassung
- 13.11 Literatur
- 13.12 Glossar

13.1 Einleitung

1976 wurde die erste von mittlerweile 19 Lieferungen der Loseblatt-Sammlung *Analysen in biologischem Material* publiziert. Die Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe der Deutschen Forschungsgemeinschaft hatte es sich in den 70er Jahren zum Ziel gesetzt, Methoden zu erarbeiten und zu veröffentlichen, mit denen die innere Belastung des Menschen durch chemische Substanzen quantitativ erfasst und hinsichtlich des damit verbundenen Gesundheitsrisikos beurteilt werden kann. Damit sollte zusätzlich zur Bestimmung der Schadstoffkonzentration in der Luft des Arbeitsplatzes (äußere Belastung) ein Beitrag geleistet werden zur Prävention von Gesundheitsschäden durch chemische Substanzen, die am Arbeitsplatz oder aus der Umwelt aufgenommen werden. Dabei sollte der Richtigkeit, der Vergleichbarkeit und der Nachvollziehbarkeit der analytischen Methoden unbedingter Vorrang vor anderen Erwägungen wie etwa ökonomischen eingeräumt werden. Die nach diesen Vorgaben vom Arbeitskreis *Analysen in biologischem Material* erarbeiteten Methoden bildeten dann die Grundlage für die Ableitung von Grenzwerten (BAT, BLW, HBM), Referenzwerten (BAR, Referenzwerte der HBM) und Korrelationen (EKA).

Der Arbeitskreis *Analysen in biologischem Material* hat deshalb vor der Erarbeitung der analytischen Methoden ein Konzept ausgearbeitet, mit dem die Richtigkeit und Vergleichbarkeit der Ergebnisse eines Biologischen Monitoring gewährleistet werden können. Dieses Konzept wurde in der ersten Lieferung dieser Methodensammlung eingehend dargestellt. Nach diesem Konzept werden die Methoden im Sinne einer *standard operating procedure* (SOP) so beschrieben, dass sie jederzeit nachvollzogen werden können. Neben der eigentlichen Analysenvorschrift enthalten sie deshalb auch detaillierte Angaben zur so genannten „präanalytischen Phase“ (Probenahme, Probentransport, etc.). Jede Methode weist außerdem als Zuverlässigkeitskriterien die Präzision, Richtigkeit und Nachweisgrenze aus, die durch den Autor im Rahmen der Validierung des Verfahrens ermittelt und beschrieben wird. Die so beschriebenen und dokumentierten SOPs werden dann in mindestens einem

weiteren Laboratorium hinsichtlich ihrer Nachvollziehbarkeit, einschließlich der Zuverlässigkeitskriterien, experimentell geprüft.

Heute besteht diese Sammlung aus nahezu 200 geprüften und ausführlich dokumentierten Analysenverfahren und hat einen erheblichen Anteil daran, dass sich das Biomonitoring weltweit zu einer leistungsfähigen Methode der Prävention chemisch bedingter Erkrankungen entwickelt hat.

Obwohl sich die Dokumentationsstruktur und die zugrunde gelegten Kriterien für die Nachvollziehbarkeit und Zuverlässigkeit bewährt haben, war es nach nunmehr 30 Jahren notwendig, diese Grundlagen zu überarbeiten und neuere Entwicklungen auf diesem Gebiet zu berücksichtigen. Dies betrifft vor allem die Qualitätssicherung entsprechend den Richtlinien der Bundesärztekammer, die innerhalb der SOPs eine immer stärkere Berücksichtigung gefunden haben, sowie die Angabe der Messunsicherheit, die als Kenngröße in der vergangenen Dekade Eingang in eine Reihe von Positionspapieren und Normen zur Qualitätssicherung im Labor gefunden hat.

Das folgende Kapitel aktualisiert und präzisiert die analytischen Zuverlässigkeitskriterien zur Charakterisierung der in der Loseblatt-Sammlung enthaltenen Analysenverfahren und beschreibt den aktuellen Stand der laborinternen und -externen Qualitätssicherung. Diese Übersicht wendet sich sowohl an die Autoren und Prüfer künftig zu erarbeitender Methoden als auch an die Leser dieses Werkes und ganz besonders an diejenigen, die diese Methoden in ihren Laboratorien etablieren wollen.

13.2 Präanalytische Phase

Die präanalytische Phase umfasst alle Arbeitsschritte einer Biomonitoring-Untersuchung vor der Probenaufbereitung und Analyse im Labor. Dazu gehören die Auswahl eines geeigneten Biomarkers und seiner Matrix, des Probenahmezeitpunktes, die Vorbereitung des Probenahmematerials, die eigentliche Probenahme, die Zwischenlagerung sowie der Transport ins Labor mit anschließender Lagerung (Abb. 13-1) [1, 2, 3]. Die Ausführung der präanalytischen Phase hat einen erheblichen Einfluss auf die Richtigkeit der analytischen Bestimmung. Grundsätzlich unterscheidet man zwischen so genannten „Einflussfaktoren“ und „Störgrößen“: Einflussfaktoren betreffen Veränderungen der Analytenkonzentrationen *in vivo*, d. h. vor der eigentlichen Probenahme. Hierzu zählen z. B. der Probenahmezeitpunkt aufgrund der unterschiedlichen biologischen Halbwertszeiten von Fremdstoffen im Körper, Alkoholkonsum, Medikamenteneinnahme und Drogen aufgrund ihres möglichen Einflusses auf Fremdstoff-metabolisierende Enzyme sowie das Rauchen und individuelle Ernährungsgewohnheiten als potentielle außerberufliche Aufnahmequellen für Fremdstoffe. Demgegenüber werden als Störgrößen solche Parameter bezeichnet, die Analytenkonzentrationen *in vitro*, d. h. nach erfolgter Probenahme

me verändern. Dazu gehören z.B. Kontaminationen des Probenahmematerials durch Stäube oder Dämpfe oder produktionsbedingte Rückstände in den Entnahmegefäßen sowie Veränderungen der Probenmatrix während des Transportes oder der Lagerung (z. B. Koagulation von Blut, Sedimentierung).

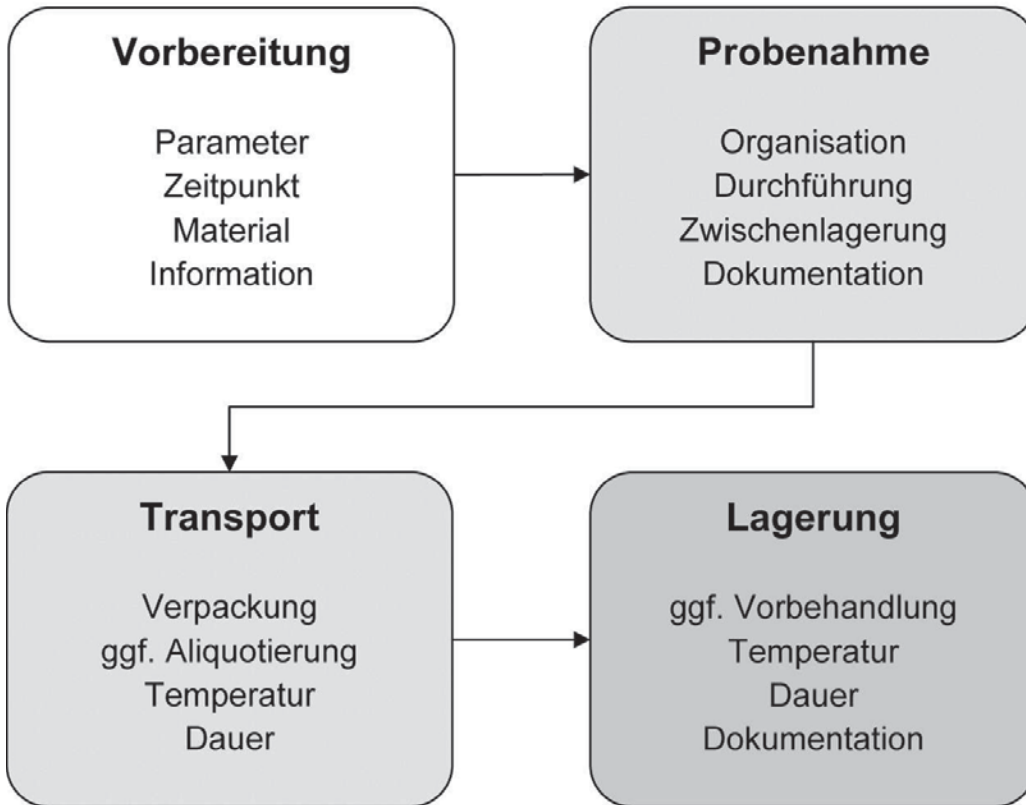


Abb. 13-1. Teilabschnitte und Einzelaspekte der präanalytischen Phase.

Daher ist es sinnvoll, die Rahmenbedingungen der präanalytischen Phase in einer Standard-Arbeitsanweisung zu spezifizieren. Dies betrifft in erster Linie die im Folgenden aufgeführten Aspekte:

13.2.1 Vermeidung von externen Kontaminationen bei der Probenahme

Bei der Probenahme in unmittelbarer oder mittelbarer Nähe zum Arbeitsplatz kann es zu einer Verunreinigung der Probe durch den Arbeitsstoff kommen. Als mögliche Ursachen kommen dabei aerogene Staubbelastungen sowie an der Arbeitskleidung oder an Hautflächen und Haaren der Beschäftigten anhängender Staub in Frage. Diese Problematik ist insbesondere bei der Bestimmung des unveränderten Gefahrstoffes (z. B. Metalle) in Urin von Bedeutung. Eine weitere Ursache für externe Kontaminationen kann das ubiquitäre Auftreten eines Gefahrstoffes in der Umwelt sein.

13.2.2 Probenahmezeitpunkt

Die Auswahl des Probenahmezeitpunktes ergibt sich aus der Toxikokinetik des Untersuchungsparameters, in erster Linie durch die biologische Halbwertszeit des Stoffes oder seines Metaboliten [4, 5]. In der jährlich aktualisierten MAK- und BAT-Werte-Liste der Deutschen Forschungsgemeinschaft sind deshalb sowohl Angaben zur Untersuchungsmatrix (i. d. R. Vollblut, Serum bzw. Plasma und Urin) als auch zum Probenahmezeitpunkt enthalten. Wenn keine Vorgabe besteht, empfiehlt sich eine Probenahme am Ende mehrerer aufeinander folgender Arbeitsschichten. In Ausnahmefällen, z. B. bei Parametern mit langer Halbwertszeit, kann die Probenahme unabhängig vom Expositionsereignis erfolgen.

In den Standard-Arbeitsanweisungen der Methodensammlung sollten daher auch bereits Empfehlungen zur Probenahme enthalten sein, die sich gegebenenfalls auf die Grenz- oder Referenzwerte des Untersuchungsparameters beziehen und vom Autor auf der Grundlage der aktuellen Kenntnisse zur Toxikokinetik des betreffenden Stoffes und seiner praktischen Erfahrung abgeleitet werden.

Im umweltmedizinischen Bereich ist der Probenahmezeitpunkt weniger kritisch, da die Belastung in der Regel einen Gleichgewichtszustand widerspiegelt. Dennoch sollten die Standard-Arbeitsanweisungen auch Hinweise zur Probenahme bei umweltmedizinischen Fragestellungen geben. So sind z. B. die Referenz- und Human-Biomonitoringwerte für Pentachlorphenol für eine Analyse des Morgenurins abgeleitet [6]. Entsprechende Vorgaben können den Stoffmonographien der Kommission Human-Biomonitoring des Umweltbundesamtes entnommen werden [5].

13.2.3 Probenahmematerial

Hinsichtlich des Probenahmematerials für die Blutentnahme bzw. die Urinsammlung ist zunächst aus praktischen Erwägungen handelsüblichem unbehandeltem Material der Vorzug zu geben. Das zentrale Auswahlkriterium ist die Eignung des Materials für Transport und Lagerung einer Probe, ohne dass unerwünschte Veränderungen der Matrix (z. B. Koagulation, Proteinfällung) oder Kontaminationen (z. B. durch Aluminium, organische Lösungsmittel, Phthalate, etc.) auftreten. Darüber hinaus muss das Transportgefäß den Vorgaben der DIN EN 829 [7] genügen, also unter anderem eine deutliche Kennzeichnung als medizinisches Untersuchungsgut tragen und einen auslaufsicheren Transport gewährleisten. Es ist auch zu berücksichtigen, ob die Urprobe oder ein Aliquot gelagert und versendet werden, so dass gegebenenfalls Angaben darüber gemacht werden müssen, wie ein repräsentatives Aliquot erstellt werden kann (z. B. durch Umschütteln). Das Versandgefäß sollte so dimensioniert sein, dass genügend Material für eine Zweitanalyse, ein Rückstellmuster oder weitergehende Untersuchungen verfügbar bleibt.

Die Entnahme von Blut erfolgt in der Regel in handelsübliche EDTA- oder Serum-Monovetten bzw. Vacutainer [2]. Die kurzfristige Lagerung der Proben von mehreren Stunden bis zu 2 Tagen im Kühlschrank bei 4 °C ist zumeist möglich. Ein Einfrieren und die damit einhergehende Hämolyse der Blutproben sollte vermieden werden, wenn Serumanalysen vorgesehen sind oder intakte Erythrocyten benötigt werden. Auch eine Koagulation der Blutproben ist ungünstig, da in diesem Fall repräsentative Aliquote für die Analyse nicht mehr gewonnen werden können. Besondere Anforderungen an das Probenahmematerial stellen auch Proteinaddukte, da eine Blutentnahme durch enge Kanülen mit hoher Fließgeschwindigkeit oder eine Sammlung in Vacutainer zu einer Hämolyse der Erythrocyten und damit zu einer unbrauchbaren Probe führen kann. Des Weiteren ist bei der Bestimmung von flüchtigen organischen Lösungsmitteln mittels Headspace-Technik auf Kontaminationsfreiheit der Probenahmegefäße zu achten. In diesem Fall können die Analyten einerseits durch undichte Probenahmegefäße verdampfen, andererseits ist die Gefahr einer externen Kontamination sehr hoch [8]. Häufig wird daher speziell vorbereitetes Probenahmematerial durch das ausführende Analysenlabor zur Verfügung gestellt. Vergleichbare allgemeine Vorgaben lassen sich auch für Urinalysen formulieren. Eine Lagerung bei 4 °C ist zumeist für kurze Zeiträume möglich, während eine längere Lagerung in tiefgefrorenem Zustand vorzunehmen ist. Urinproben werden zunächst in geeignete Sammelgefäße abgegeben und anschließend in handelsübliche Urin-Monovetten überführt. In manchen Fällen ist eine Ansäuerung (z. B. 1 mL Essigsäure auf 100 mL Urinprobe) notwendig, um die Proben zu stabilisieren. Dies kann gegebenenfalls bereits im Vorfeld durch das Labor vorbereitet werden, z. B. durch säuregetränkte Tupfer in der Monovette.

13.2.4 Probenlagerung und -transport

In der Regel können Blut- und Urinproben vor dem Versand bis zu 2 Tage in einem handelsüblichen Kühlschrank gelagert werden, ohne dass Störgrößen das Messergebnis verfälschen. Für die Mehrzahl der Untersuchungsparameter ist darüber hinaus keine weitere Probenkühlung während des Transportes erforderlich. In besonderen Fällen sollte die Arbeitsanweisung einen Hinweis zur Einhaltung einer Kühlkette mit Angabe der Temperatur enthalten. Hinsichtlich Transportverpackung und -kennzeichnung ist die DIN EN 829 [7] zu beachten.

13.2.5 Probendokumentation

Aspekte der Probendokumentation werden in den Standardarbeitsanweisungen für die Loseblattsammlung Analysen in biologischem Material nicht explizit berücksichtigt. Dennoch sind Dokumentation und Probenkennzeichnung ein relevanter Aspekt der präanalytischen Phase, da sichergestellt sein muss, dass die Identifizierung

der Proben im Labor eindeutig, nachvollziehbar und auch nach längerer Lagerung beständig ist. Dies betrifft z. B. die Art der Beschriftung und Etikettierung, da die Probenlagerung bei tieferen Temperaturen zur Ablösung von Etiketten führen kann oder Probenbeschriftungen durch Auftauvorgänge unleserlich werden können.

13.2.6 Stabilität eingesetzter Chemikalien, Lösungen und Vergleichsstandards

Informationen zur Lagerstabilität von Reinchemikalien und Vorgaben zu Lagerungsbedingungen werden in der Regel durch den Hersteller auf den Sicherheitsdatenblättern bereits angegeben. Zumeist wird eine Lagerung bei Raumtemperatur, bei 4 °C oder in tiefgefrorenem Zustand empfohlen. Hinsichtlich selbst hergestellter Lösungen und Vergleichsstandards müssen eigene Untersuchungen angestellt werden. Im Regelfall ist mindestens eine Lagerung bei 4 °C notwendig, um das Verdampfen von Lösungsmitteln oder das Wachstum von Mikroorganismen zu verzögern. In jedem Fall sollten Angaben zu praxistypischen Lagerungstemperaturen und zur möglichen Mindestlagerzeit ermittelt werden. In diesem Zusammenhang ist auch die Lagerstabilität von biologischem Kontrollmaterial (z. B. dotierte Blut- und Urinproben zur Kalibrierung) zu ermitteln. Dies gilt sowohl für die typischen Bedingungen eines Transportes als auch für eine mittel- bis langfristige Lagerung im Labor. Eine gut praktikable Möglichkeit, die Lagerungsstabilität einer Probe zu prüfen, ist die Untersuchung von Material, das wiederholten Einfrier- und Auftauzyklen unterworfen wurde. In diesem Fall wirkt sich der Einfluss von Störgrößen besonders rasch aus und Veränderungen der Probenmatrix bzw. des Analytengehaltes sind bereits nach wenigen Zyklen erkennbar. Die wiederholte Einfrier- und Auftau-Prozedur ist besonders sinnvoll, wenn die Lagerungsstabilität bei neu etablierten Analysenverfahren bzw. Untersuchungsparametern noch nicht über längere Zeiträume untersucht wurde. Darüber hinaus ist es sinnvoll, die bekannte Mindestlagerfähigkeit eines Untersuchungsmaterials bzw. Parameters mit einem entsprechenden Vermerk anzugeben.

13.3 Selektivität

Die Selektivität einer analytischen Methode beschreibt deren Fähigkeit, den Analyten ohne Störungen bzw. Interferenzen durch andere Matrixkomponenten zu erfassen und eindeutig zu identifizieren. Sie hängt direkt von der Art der eingesetzten Aufarbeitungsschritte sowie von der verwendeten Endpunktbestimmung des Analyten ab. Die Selektivität muss hauptsächlich in frühen Stadien einer Methodenentwicklung nachgewiesen werden und stellt somit ein wichtiges Validierungselement einer Methode dar. Es gibt verschiedene Ansätze, die Selektivität einer Methode zu belegen. Durch die Überprüfung der Richtigkeit der Methode wird sie indirekt

nachgewiesen, da Selektivität eine wesentliche Voraussetzung der Richtigkeit ist: wenn die Ergebnisse richtig sind, muss die Methode, die zu diesen Ergebnissen führte, selektiv sein. Die Selektivität einer Methode kann grundsätzlich auch über den Vergleich der Ergebnisse mit Resultaten aus anderen, unabhängigen Methoden belegt werden.

Die Kommission der Europäischen Gemeinschaften schreibt in ihrem Beschluss vom 12. Dezember 2002 [9], mit dem sie die Richtlinie 96/23/EC zur Leistung analytischer Methoden und Ergebnisinterpretation umsetzt, zwei Vorgehensweisen bei der Untersuchung von Interferenzen vor: zum einen sind Matrixproben unterschiedlicher Herkunft ($n \geq 20$) ohne den zu untersuchenden Analyten (Leerwerte) auf potenziell koeluierende Interferenzen hin zu untersuchen, zum anderen werden mögliche Störkomponenten, die in der Matrix zu erwarten sind (z. B. Metabolite des Analyten, Derivate und andere strukturell verwandte Substanzen), ausgewählt und in relevanter Konzentration den Leerwert-Matrixproben zudosiert. Führen diese Störkomponenten nicht zu einer falsch positiven Identifizierung des Analyten, so besitzt die Methode eine ausreichende Selektivität.

Wenn keine Leerwert-Matrixproben zur Verfügung stehen, sollte die Identität des in den Matrixproben gemessenen Analyten zunächst sichergestellt werden. Bei der Detektion mittels spektroskopischer Methoden (UV, MS, MS/MS) werden Messungen weiterer Wellenlängen oder Wellenlängenbereiche bzw. weiterer Massenfragmente, Tochterionen oder Ionenübergänge („*qualifier*“) durchgeführt. Die gemessenen *qualifier*-Signale werden ins Verhältnis zu den für die quantitative Auswertung herangezogenen Signalen („*quantifier*“) gesetzt und die so ermittelten Quotienten mit denen der Kalibrierstandards verglichen.

Im Beschluss der Kommission der Europäischen Gemeinschaften werden in Abhängigkeit von der relativen Intensität des gemessenen Massenfragments maximale Abweichungen vom Standardwert von 10–50% bei GC-MS-Methoden mit Elektronenstoßionisation sowie von 20–50% bei GC-MS-Methoden mit Chemischer Ionisation, LC-MS- und LC-MS/MS-Techniken, toleriert [9].

Auch bei der Untersuchung analytenhaltiger Matrixproben darf die Quantifizierung des Zielparameters nach Zugabe von potenziellen Störsubstanzen nicht beeinträchtigt werden. In der Praxis stehen solche Verbindungen jedoch häufig nicht für Testzwecke zur Verfügung, so dass sich ein alternatives Verfahren durchgesetzt hat, mit dem sich wertvolle Hinweise auf die Selektivität gewinnen lassen. Dazu wird die relative Wiederfindungsrate des Analyten nach Aufstockung von Matrixproben unterschiedlicher Spender bestimmt (ca. 15–20 Proben). Auf diese Weise lässt sich der Einfluss einer variierenden Zusammensetzung der Matrix auf das Analyseergebnis bestimmen: bei eingeschränkter Selektivität erhöht sich die Variabilität der Wiederfindungsrate (z. B. [10, 11]).

Zur Verbesserung einer unzureichenden Selektivität sollte eine weitere Optimierung der Analysenmethode angestrebt werden, z. B. im Bereich der Probenaufarbei-

tung, der chromatographischen Trennung oder der spektrometrischen Parameter. Bei der Detektion mittels Massenspektrometrie kann beispielsweise die Erhöhung der Massenauflösung zu einer Abnahme der Interferenzen und somit zu einer höheren Selektivität führen. Trotz der zumeist damit verbundenen Abnahme der Empfindlichkeit lässt sich auf diese Weise ein verbessertes Signal/Rausch-Verhältnis und damit eine niedrigere Nachweis- und Bestimmungsgrenze erreichen.

13.4 Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze

In der DIN 32 645 [12] sind die zentralen Parameter „Nachweisgrenze“, „Erfassungsgrenze“ und „Bestimmungsgrenze“ für den Bereich der chemischen Analytik definiert. Diese drei Parameter leiten sich von der Festlegung des „kritischen Wertes einer Messgröße“ ab, bei dessen Überschreitung unter Zugrundelegung einer definierten Wahrscheinlichkeit P erkannt wird, dass die Menge eines Analyten in der Probe größer ist als die in einer Leerprobe. Demnach versteht man unter der

- *Nachweisgrenze* (NG) (engl.: *limit of detection*, LOD) diejenige Konzentration, bei der das Vorhandensein eines Analyten in einer Matrix in der Hälfte der untersuchten Fälle durch die gewählte Messmethode detektiert wird. Der β -Fehler (falsch negatives Ergebnis) liegt in diesem Fall bei 50%, der α -Fehler (falsch positives Ergebnis) bei 1%. Die relative Ergebnisunsicherheit beträgt etwa 100%. Daher hat die Nachweisgrenze vor allem einen Entscheidungscharakter (Analyt vorhanden oder nicht) und sollte nur qualitativ interpretiert werden.
- *Erfassungsgrenze* (EG) (engl.: *limit of identification*) diejenige Konzentration, bei der α -Fehler und β -Fehler gleich groß sind (meist 1%). Demnach wird die Abwesenheit eines Analyten in einer Matrix beim Erreichen der Erfassungsgrenze mit einer definierten Wahrscheinlichkeit (meist 99%) ausgeschlossen.
- *Bestimmungsgrenze* (BG) (engl.: *limit of quantification*, LOQ) diejenige Konzentration, die mit einer vorgegebenen relativen Ergebnisunsicherheit nachgewiesen werden kann. Dabei wird zwischen der unteren und der oberen Bestimmungsgrenze differenziert: Die *untere Bestimmungsgrenze* liegt nach den meisten Berechnungs- und Schätzverfahren zwischen dem Dreifachen (33,3% Ergebnisunsicherheit) und dem Zehnfachen (10% Ergebnisunsicherheit) der Nachweisgrenze. Die untere Bestimmungsgrenze ermöglicht aufgrund ihrer definierten Ergebnisunsicherheit eine quantitative Interpretation von Messwerten und ist daher ein aussagekräftigeres Maß für die tatsächliche Leistungsfähigkeit eines Verfahrens als die Nachweisgrenze. Die *obere Bestimmungsgrenze* gibt die höchstmögliche Analytenkonzentration an, die mit einer vorgegebenen Ergebnisunsicherheit (i. d. R. 33%) bestimmt werden kann.

Die Höhe der Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze hängt nicht nur von der Empfindlichkeit des Messverfahrens ab, sondern wird erheblich vom technisch und durch die Matrix bedingten Hintergrundrauschen beeinflusst. Da sich Ergeb-

nisse im Bereich der Nachweisgrenze nicht ausreichend sicher quantitativ interpretieren lassen, ist der Anwendung der Bestimmungsgrenze zur Datenauswertung bzw. Ergebnismitteilung der Vorzug zu geben. Die Bestimmungsgrenze einer Analysenmethode sollte daher unterhalb des entscheidungsrelevanten Konzentrationsbereichs für den jeweiligen Untersuchungsparameter liegen.

Zur Festlegung der Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze wird in der Regel eines der folgenden Verfahren eingesetzt:

13.4.1 Visuelle Ableitung

Dazu wird ein Matrixleerwert mit steigenden Analytenkonzentrationen dotiert, bis ein Signal optisch „eindeutig“ zu erkennen ist. Eine Variante dieser Methode ist der Vergleich eines dem Analyten benachbarten Messsignals mit der Fläche oder Höhe eines Analytensignals bekannter Konzentration. Mit diesem Ansatz lässt sich die Nachweisgrenze grob abschätzen und als Ausgangsbasis zur genaueren Ermittlung gemäß den nachfolgenden Verfahren verwenden.

13.4.2 Bestimmung des Signal/Rausch-Verhältnisses

Dazu wird zunächst die Intensität des Grundrauschens s_0 (Differenz Maximum – Minimum) über einen kurzen Zeitraum oder bis zum nächsten Mess- oder Stör-signal vor oder nach dem Analyten bestimmt (z. B. mittels Lineal oder Trendlinienfunktion, mindestens 10 ausreißerfreie Rauschsignale). Als Nachweisgrenze wird dann die dreifache mittlere Rauschsignalintensität berechnet. Mit diesem Verfahren wird theoretisch ein α -Fehler von 1% angestrebt. Die Bestimmungsgrenze eines Verfahrens lässt sich in analoger Weise z. B. als neunfaches Signal/Rausch-Verhältnis definieren:

$$NG = 3 \cdot s_0$$

$$BG = 9 \cdot s_0.$$

13.4.3 Blindwertverfahren nach DIN 32 645

Die Nachweisgrenze kann auch aus der Standardabweichung eines Leerwertes und der Steigung der Kalibrierfunktion berechnet werden (sog. „direkte Methode“). Dieses Verfahren wird in der Regel eingesetzt, wenn der zu untersuchende Analyt kein physiologisch oder durch eine ubiquitäre Exposition bedingter Bestandteil der Untersuchungsmatrix ist, d. h. wenn keine „Hintergrundbelastung“ vorliegt. In diesem Fall sollten zunächst zehn Matrixlösungen ohne Analytenzusatz untersucht werden. Darüber hinaus wird eine Kalibrierfunktion im unteren Konzentrationsbe-

reich des Verfahrens ermittelt. Die Nachweisgrenze lässt sich dann durch folgende Gleichung berechnen:

$$NG = \frac{s_L}{b} \cdot t_p \cdot \sqrt{\frac{1}{R} + \frac{1}{N}}$$

(mit s_L = Standardabweichung des Leerwertes; b = Steigung der Kalibriergeraden; t_p = Student-Faktor; R = Anzahl Leerwertmessungen; N = Anzahl Kalibrationspunkte).

13.4.4 Kalibrierkurvenverfahren nach DIN 32 645

Nach DIN 32 645 wird zunächst eine Kalibrierfunktion mit dem Analyten in der relevanten Matrix aufgenommen, deren unterster Wert nahe der erwarteten Nachweisgrenze liegt und die aus zehn äquidistanten Kalibrierpunkten über eine Konzentrationsdekade bestehen sollte (Abb. 13-2). Aus dieser Kalibrierfunktion lassen sich Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze errechnen:

$$NG = s_{X0} \cdot t_p \cdot \sqrt{\frac{1}{R} + \frac{1}{N} + \frac{X^2}{Q_X}}$$

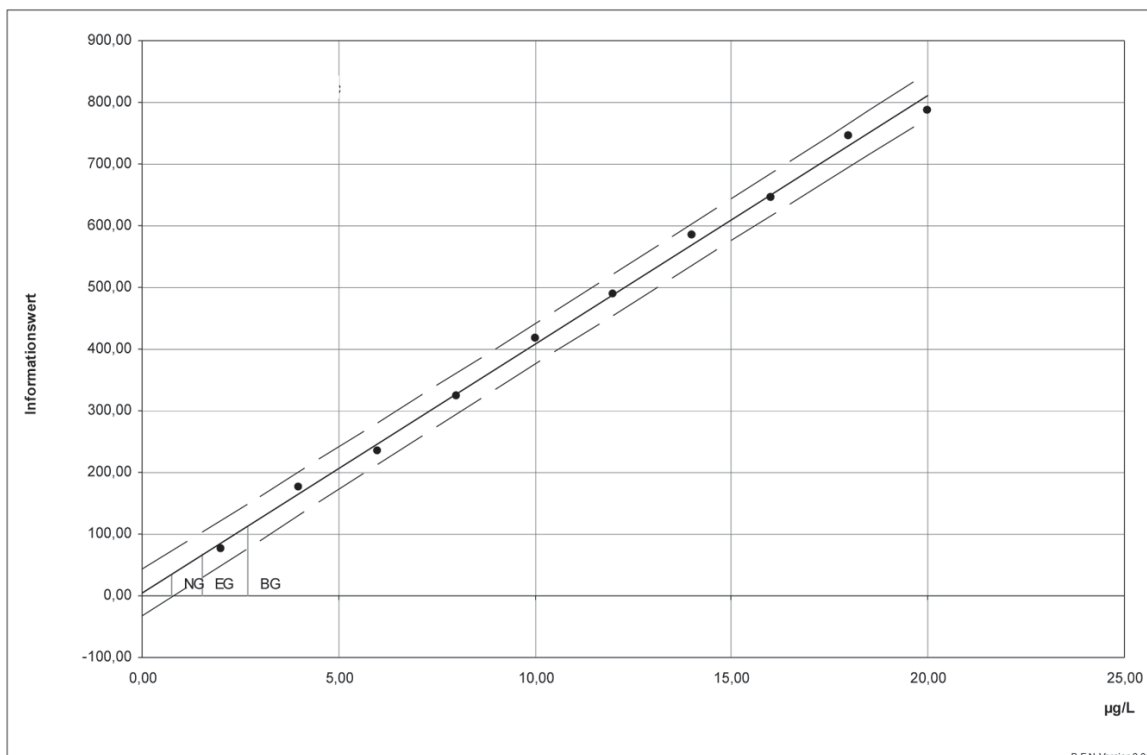


Abb. 13-2. Beispiel für eine Kalibrierfunktion zur Ermittlung von Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze gemäß DIN 32 645 (Auswerteprogramm B.E.N., Arvecon GmbH, mit freundlicher Genehmigung).

$$EG = 2 \cdot NG \text{ (für } \alpha = \beta \text{)}$$

$$BG = s_{x_0} \cdot t_p \cdot \sqrt{\frac{1}{R} + \frac{1}{N} + \frac{X_B^2}{Q_x}}$$

(mit s_{x_0} = Verfahrensstandardabweichung (bei Varianzhomogenität $s_{x_0} \approx s_L/b$); t_p = Student-Faktor (einseitig für $N-2$ Freiheitsgrade); R = Anzahl Messungen; N = Anzahl Kalibrationspunkte; $X = x - \bar{x}$ für die Nachweisgrenze (Leerwert); $X_B = x_B - \bar{x}_B$ für die Bestimmungsgrenze (näherungsweise ist $x_B = k \cdot NG$); Q_x = Summe der Abweichungsquadrate von x ; k = relative Ergebnisunsicherheit, z. B. 33,3% bei $k = 3$). Voraussetzung für die Anwendbarkeit dieses Verfahrens sind positive Tests auf Varianzhomogenität und Linearität der Kalibrierfunktion mittels F - bzw. t -Test. Als praxisorientierte Näherung kann die Verfahrensstandardabweichung s_{x_0} auf der Basis des niedrigsten Kalibrierstandards ermittelt werden.

13.4.5 Standardabweichungs-Verfahren

Von der EURACHEM wird ein Verfahren vorgeschlagen, bei dem jeweils Sechsfachbestimmungen von immer höheren Verdünnungen eines Analyten in seiner Matrix analysiert werden, bis eine vom Untersucher vorgegebene relative Standardabweichung (z. B. 10% oder 33%) erreicht wird [13]. Die entsprechende Analytenkonzentration wird als Bestimmungsgrenze definiert.

13.4.6 Beispiel

1-Hydroxypyren (1-OHPyr) wird im Urin nach Spaltung des Glucuronids und anderer Konjugate über eine Festphasen-Extraktion mittels HPLC und Fluoreszenz-Detektion bestimmt [14].

Zur Berechnung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze gemäß DIN 32 645 werden zehn äquidistant mit 1-Hydroxypyren dotierte Urinproben analysiert (Tab. 13-1).

Eine lineare Regressionsanalyse mit diesen Daten ergibt die Funktion $y = 40,32 x + 4,73$ mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,999. Der *Anpassungstest nach Mandel* (s. Kap. 13.5) belegt die Varianzhomogenität ($PW = 1,98$; kritischer F -Wert = 5,59 für $P = 95\%$; $f_1 = 1$; $f_2 = N-3 = 7$), ein *Ausreißer-F-Test* ist negativ ($PW = 8,2$; kritischer F -Wert = 5,59 für $P = 95\%$; $f_1 = 1$; $f_2 = N-3 = 7$). Die Verfahrensstandardabweichung s_{x_0} beträgt 0,34, die Summe der Abweichungsquadrate Q_x ist 330. Aus diesen Ergebnissen berechnet sich die Nachweisgrenze (für $t_p = 1,86$, einseitig für $N-2$ Freiheitsgrade und für $P = 95\%$) zu:

Tab. 13-1. Ergebnisse der Untersuchung von mit 1-Hydroxypyren dotierten Urinproben zur Berechnung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze gemäß DIN 32 645.

Dotierung (µg/L)	Peakfläche
2	76
4	176
6	234
8	325
10	418
12	489
14	585
16	645
18	746
20	788

$$NG = 0,23 \cdot 1,86 \cdot \sqrt{\frac{1}{1} + \frac{1}{10} + \frac{11^2}{330}} = 0,77 \text{ µg/L, d.h. gerundet } 1 \text{ µg/L.}$$

Die Erfassungs- und Bestimmungsgrenze einer Analysenmethode lassen sich in analoger Weise aus den Ergebnissen der Untersuchung von Kalibratoren gemäß DIN 32 645 ermitteln.

13.5 Kalibrierung

Analysengeräte messen die Konzentration eines Zielparameters nicht direkt, sondern generieren zunächst ein der Analytenkonzentration proportionales elektrisches Messsignal. Die Quantifizierung dieser Signale bei einer Probe mit unbekannter Analytenkonzentration erfolgt durch einen Vergleich mit Kalibratoren oder Kalibrierstandardproben, die zusammen mit der zu untersuchenden Probe aufgearbeitet und analysiert wurden.

Die Richtigkeit der Analytenkonzentrationen in den eingesetzten Kalibrierstandards ist für die Quantifizierung des Parameters in Proben unbekanntes Gehaltes von entscheidender Bedeutung. Daher ist es sinnvoll, die Richtigkeit einzelner Kalibrierstandards oder von Kalibrierkurven durch einen Vergleich mit zertifiziertem Referenzmaterial (CRM) zu überprüfen (s. Abschn. 13.7 und 13.9). Die Kalibrierstandards sollten auf der Basis detaillierter Arbeitsanweisungen hergestellt werden. Im Sinne einer größtmöglichen Rückführbarkeit soll die Dokumentation der Herstellung es ermöglichen, Kalibrierstandards mit identischer Qualität und Quantität zu einem späteren Zeitpunkt oder in einem anderen Laboratorium reproduzierbar herzustellen. Darüber hinaus muss die Stabilität dieser Standards unter Lagerungs-

bedingungen nachgewiesen werden, um eine kontinuierliche Qualität der Kalibrierung zu gewährleisten.

13.5.1 Wahl der Kalibrierpunkte

Die Kalibrierstandards sollten den zu erwartenden Konzentrationsbereich des Analyten widerspiegeln und nicht erheblich höhere oder niedrigere Konzentrationen aufweisen. Im optimalen Fall liegen die meisten Messwerte über den gesamten Kalibrierbereich verteilt.

Wenn die Analytenkonzentrationen in den zu untersuchenden Proben unbekannt sind, kann zunächst eine Stichprobe untersucht werden, auf deren Basis der Kalibrierbereich festgelegt wird. Um einen möglichst gleichmäßigen Verlauf des Konfidenzintervalls einer linearen Anpassungsgeraden zu erreichen, sollten die Kalibrierpunkte möglichst gleichförmig über den entscheidungsrelevanten Konzentrationsbereich hinweg verteilt sein (Abb. 13-3). Falls nötig, können die Konzentrationen der Kalibrierstandards nach einer orientierenden Messung angepasst werden (Abb. 13-4).

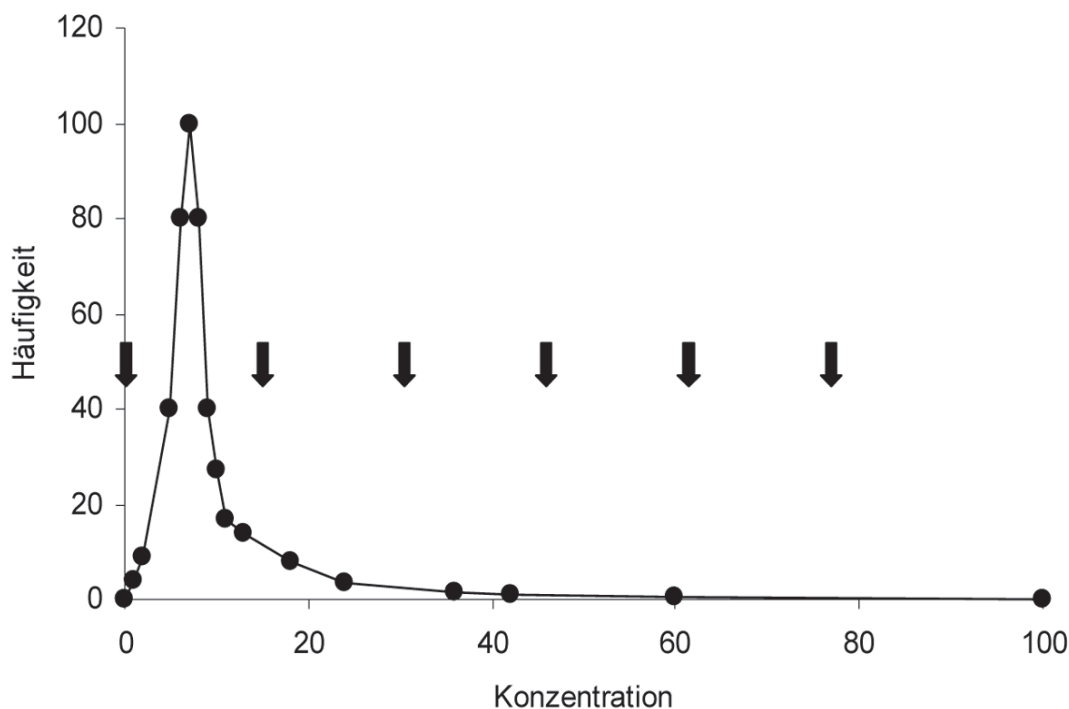


Abb. 13-3. Äquidistante Auswahl der Kalibrierpunkte (Pfeile), ohne Berücksichtigung der Konzentrationsverteilung der Messergebnisse.

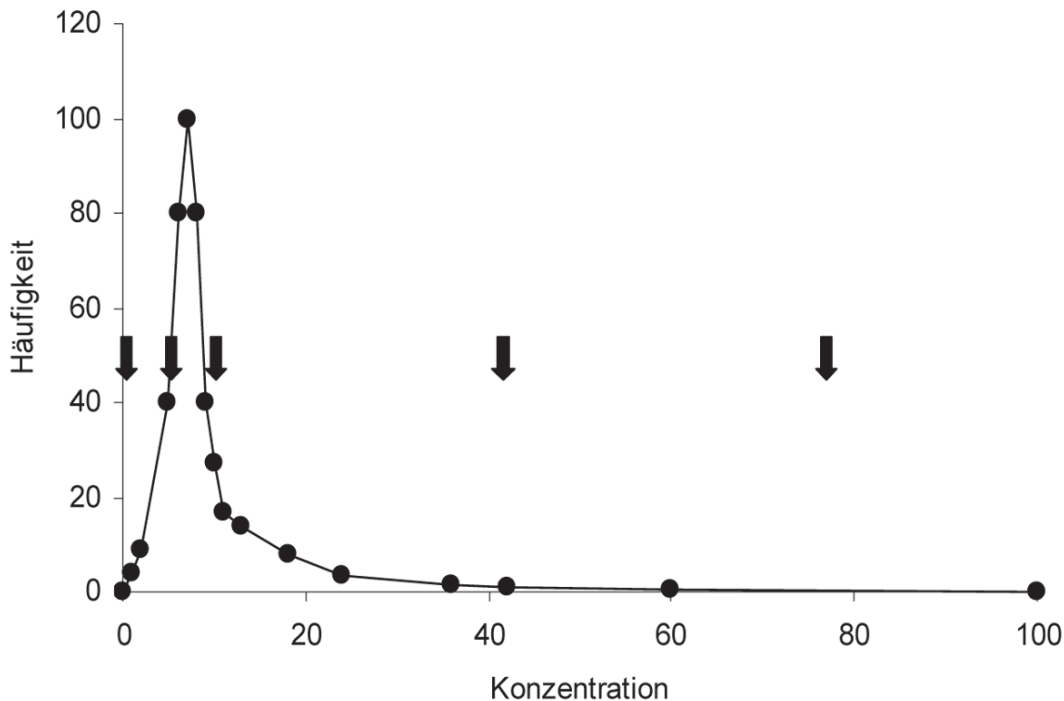


Abb. 13-4. Auswahl der Kalibrierpunkte (Pfeile) unter Berücksichtigung der Konzentrationsverteilung der Messergebnisse.

13.5.2 Einpunktkalibrierung

Eine Kalibrierung wird in der Regel für jede Analysenserie separat erstellt und zur Auswertung herangezogen. Bei Analysenverfahren mit hoher Reproduzierbarkeit und Robustheit kann es jedoch sinnvoll und ökonomisch sein, eine Kalibrierfunktion einmalig abzuleiten und die Stabilität der Methode mit Hilfe von einzelnen Kalibrierstandards in jeder Analysenserie zu überprüfen („Einpunktkalibrierung“). Liegt das Ergebnis für den Kalibrierstandard innerhalb eines zuvor spezifizierten Bereiches (z. B. im Vertrauensband der Kalibrierkurve) oder ergibt die Auswertung eines mitgeführten Qualitätskontrollmaterials auf der Basis der Einpunktkalibrierung die Übereinstimmung mit dem entsprechenden Sollwert bzw. Sollwertbereich, so können die zu untersuchenden Proben weiterhin mit der Ursprungs-Kalibrierkurve ausgewertet werden. Weichen die Ergebnisse aus der Einpunktkalibrierung stärker von den jeweiligen Erwartungswerten ab, so ist eine neue Kalibrierkurve aufzunehmen und für die Auswertung von künftigen Analysen zugrunde zu legen.

13.5.3 Matrixeffekt

Kalibrierstandards sollten genauso behandelt werden wie die zu untersuchenden Proben und denselben Aufarbeitungs- und Analysenprozeduren unterworfen werden. Kalibrierstandards in biologischer Matrix werden häufig bevorzugt, denn ma-

trixbedingte Effekte werden auf diese Weise in der Kalibrierung bereits berücksichtigt („Matrixeffekt“). Diese Vorgehensweise ist jedoch nicht immer anwendbar, beispielsweise wenn durch einen hohen endogenen Spiegel eine geringe Zusatzbelastung nicht mehr sicher objektivierbar ist (z. B. bei der Untersuchung von Phenol im Urin als Biomarker einer Benzolbelastung oder von Ameisensäure im Urin als Biomarker für Formaldehyd). Darüber hinaus kann die biologische Matrix eine erhebliche Variabilität hinsichtlich ihrer Zusammensetzung aufweisen, die durch Verwendung einer Standardmatrix zur Kalibrierung (z. B. Sammelproben von verschiedenen Personen) nur unzureichend widergespiegelt wird. Dies kann insbesondere zu unterschiedlichen Analytenausbeuten während der Probenaufarbeitung führen und damit die quantitative Bestimmung erheblich beeinflussen; insbesondere bei Verfahren, in denen kein angemessener interner Standard zur Kompensation aufarbeitungsbedingter Verluste eingesetzt wird oder werden kann. Es ist daher sinnvoll, die Variabilität des Matrixeffektes durch Dotierung und Vermessung unterschiedlicher Matrixproben zu prüfen. Unabdingbar ist es, im Rahmen der Methodvalidierung einen Vergleich von Kalibrierkurven aus wässrigen Standards sowie aus biologischer Matrix durchzuführen. Auf diese Weise lässt sich die matrixabhängige Wiederfindung bzw. der Ausbeuteverlust abschätzen. Darüber hinaus kann im Fall identischer Kalibrierkurven in Wasser und Matrix die Kalibrierung vollständig mit wässrigen Standards etabliert und damit erheblich vereinfacht werden. Die Übereinstimmung ist mit statistischen Verfahren (Übereinstimmung der Steigung, Linearität, Vertrauensband) zu überprüfen und zu sichern.

13.5.4 Verwendung interner Standards

Eine Kompensation matrix- oder aufarbeitungsbedingter Verluste kann z. B. durch die Verwendung von so genannten „internen Standards“ erreicht werden, die zu einem möglichst frühen Zeitpunkt der Aufarbeitung zugegeben werden.

Dabei wird grundsätzlich zwischen chemisch ähnlichen Standards (Surrogate) und isotope markierten Standards unterschieden. Surrogate sollten sich während der Probenaufbereitung und -analyse möglichst genauso verhalten wie der Zielparame- ter, d. h. eine ähnliche Polarität, Lipophilie und chemische Reaktivität aufweisen. Sie sollten darüber hinaus in der zu untersuchenden biologischen Matrix nicht en- dogen vorhanden sein. Isotope markierte Standards mit derselben chemischen Struktur weisen diese Eigenschaften bereits per se auf. Als stabile Isotope werden z. B. ^{13}C , ^2H und ^{15}N häufig verwendet. Allerdings neigen insbesondere deuterium- markierte Verbindungen in wässrigen Matrices zum Austausch des ^2H mit Proto- nen, so dass das Stabilitätsverhalten eines solchen internen Standards besonders zu berücksichtigen ist.

Da sich isotope markierte Verbindungen chromatographisch zumeist nur unzurei- chend von den nativen Verbindungen abtrennen lassen, können sie prinzipiell nur

unter Verwendung massendifferenzierender Detektionsverfahren (Massenspektrometrie) eingesetzt werden. In diesem Zusammenhang ist darauf zu achten, dass eine Reihe von Elementen mehrere stabile Isotope besitzt. Daher muss der Markierungsgrad eines internen Standards hoch genug sein, um eine sichere Unterscheidung vom Zielmolekül zu ermöglichen, mindestens jedoch sollte keine für die quantitative Auswertung relevante Überlappung der Massenbereiche von internem Standard und Zielmolekül möglich sein. Alternativ können auch die so genannten „Colby-Gleichungen“ für die Isotopenverdünnungsanalyse angewendet werden [15]. Die Konzentration des internen Standards sollte sich an der erwarteten Analytenkonzentration orientieren, in jedem Fall aber mindestens eine Konzentration mit einem Signal/Rausch-Verhältnis >10 aufweisen.

13.5.5 Linearität der Kalibrierfunktion

Kalibrierkurven stellen eine quantitative Beziehung zwischen dem instrumentell erhaltenen Messsignal oder einem zuvor berechneten Faktor (z.B. Quotient zwischen dem Messsignal des Zielparameters und dem des internen Standards) und der Analytenkonzentration her, auf deren Basis zunächst eine Kalibrierfunktion und anschließend die Konzentration eines Analyten in einer unbekannt Probe ermittelt werden. Als Anpassungsalgorithmen werden zumeist ungewichtete oder gewichtete lineare Gleichungen oder nichtlineare Gleichungen auf der Basis von gleitenden Mittelwerten gewählt. Eine gewichtete Auswertung sollte erfolgen, wenn die Kalibrierpunkte nicht gleichmäßig über den Messbereich verteilt sind, so dass den höheren Konzentrationen bei der Regression eine überproportionale Bedeutung zukäme.

Der Korrelationskoeffizient einer linearen Regressionsanalyse wird im Allgemeinen zur Beurteilung des linearen Zusammenhangs zwischen der Konzentration eines Analyten und dem Messsignal herangezogen. Da jedoch auch nichtlineare Zusammenhänge hohe lineare Korrelationskoeffizienten aufweisen können, sollten weitere Untersuchungen, z.B. der *Anpassungstest nach Mandel*, ein *Ausreißer-F-Test* sowie eine Analyse der Residuen des linearen Modells, durchgeführt werden, um die Linearität bzw. Nicht-Linearität einer Kalibrierung zu sichern.

Nach Vorgabe der Kalibratoren wird die Kalibrierfunktion geprüft. Die aus dem Kalibrierexperiment erhaltenen Informationswerte (y_i) werden gegen die Konzentrationen der Kalibratoren (x_i) aufgetragen und statistisch auf Ausreißer, z.B. durch den Grubbs-Test, und auf Linearität untersucht. Die Kalibration sollte ausreißerfrei und linear sein.

Zur rechnerischen Prüfung auf Linearität wird der *Anpassungstest nach Mandel* empfohlen. Hierzu werden die lineare Kalibrierfunktion 1. Grades ($y = a + b \cdot x$) und die Kalibrierfunktion 2. Grades ($y = a + b \cdot x + c \cdot x^2$), einschließlich der jeweils zugehörigen Reststandardabweichungen s_y herangezogen. Aus den Reststan-

Standardabweichungen s_{y1} für die Kalibrierfunktion 1. Grades und s_{y2} für die Kalibrierfunktion 2. Grades wird die Differenz der Varianzen berechnet:

$$DS^2 = (n-2)s_{y1}^2 - (n-3)s_{y2}^2$$

mit n = Anzahl der Kalibriermessungen und dem Freiheitsgrad $f = 1$, wobei die Reststandardabweichungen wie folgt berechnet werden:

$$s_{y1} = \sqrt{\frac{\sum (y_i - (a + b \cdot x_i))^2}{n-2}}$$

$$s_{y2} = \sqrt{\frac{\sum (y_i - (a + b \cdot x_i + c \cdot x_i^2))^2}{n-3}}$$

Für den F-Test wird der Prüfwert PW berechnet:

$$PW = \frac{DS^2}{s_{y2}^2}$$

und mit dem Tabellenwert F ($f_1 = 1$; $f_2 = n-3$; $P = 99\%$) verglichen. Die F -Werte für den Freiheitsgrad $f_1 = 1$ und für ein Signifikanzniveau von 99% finden sich in Tab. 13-2.

Falls $PW \leq F$, so wird durch die Kalibrierfunktion 2. Grades keine signifikant bessere Anpassung erreicht; die Kalibrierfunktion ist linear. Ist $PW > F$, so ist die Kalibrierfunktion nicht hinreichend linear. In diesem Fall sollten zunächst die Einzelschritte des Analysenverfahrens geprüft und falls möglich verbessert werden. Ist danach keine Linearität zu erreichen, so sollte durch Einengen des Arbeitsbereiches versucht werden, eine ausreichende Linearität zu erhalten. Kann keine lineare Kalibrierfunktion erreicht werden oder soll der Arbeitsbereich nicht eingeschränkt werden, bleibt die Verwendung einer nicht-linearen Kalibrierfunktion.

Quadratische Gleichungen und Anpassungen über den gleitenden Durchschnitt werden verwendet, wenn der Messbereich sehr groß ist und z. B. den Linearitätsbereich des Detektors überschreitet. Es ist jedoch zu berücksichtigen, dass die Analytenkonzentrationen in diesen Fällen aus einer mathematischen Interpolation zwischen zwei oder mehreren Punkten gewonnen werden und somit eine zusätzliche Unsicherheit aufweisen. Daher sollte eine Auswertung über lineare Funktionen angestrebt und z. B. geprüft werden, ob der lineare Kalibrationsbereich durch eine Verdünnung der Probe vor der Aufarbeitung erreicht werden kann.

Tab. 13-2. F-Werte für den Freiheitsgrad $f_1 = 1$ und ein Signifikanzniveau von 99% (aus [16]).

Freiheitsgrad f_2 (n-3)	F-Wert
1	4052
2	98,50
3	34,12
4	21,20
5	16,26
6	13,75
7	12,25
8	11,26
9	10,56
10	10,04
11	9,65
12	9,33
13	9,07
14	8,86
15	8,68
16	8,53
17	8,40
18	8,29
19	8,19
20	8,10

13.5.6 Beispiel

1-Hydroxypyren (1-OHPyr) wird im Urin nach Spaltung des Glucuronids und anderer Konjugate über eine Festphasen-Extraktion mittels HPLC und Fluoreszenz-Detektion bestimmt [14].

Die Kalibrierung erfolgt bei diesem Verfahren mit Kalibratoren, die in der relevanten Matrix (Urin) erstellt wurden und auf die alle Schritte der Methode angewendet wurden. Das Kalibrierexperiment erfolgte mit Kalibratoren in 6 verschiedenen Konzentrationen, die jeweils in Doppelbestimmungen analysiert wurden ($n = 12$). Die Ergebnisse (Responsewerte in Flächeneinheiten) des Kalibrierexperimentes ergaben sich wie folgt (Tab. 13-3):

Aus der Gesamtheit der Kalibrierergebnisse ergibt sich eine lineare Kalibrierfunktion von $y = 4252,3 \cdot x + 974,99$ mit einem Bestimmtheitsmaß von 0,9934 (Abb. 13-5). Für den Kalibrierfunktionsansatz 2. Grades resultiert die Funktion $y = -128,1 \cdot x^2 + 5550,6 \cdot x - 300,2$ mit einem Bestimmtheitsmaß von 0,9989 (Abb. 13-5).

Tab. 13-3 Gemessene Flächeneinheiten bei der Untersuchung von Kalibratoren für 1-Hydroxypyren im Urin mittels HPLC-Fluoreszenzdetektion.

	1-Hydroxypyren-Konzentration in Urin (mg/L)					
	0,25	0,50	1,0	2,0	5,0	10,0
1. Bestimmung	1240	2550	4780	9780	24010	43310
2. Bestimmung	1120	2710	5140	10230	24880	41410

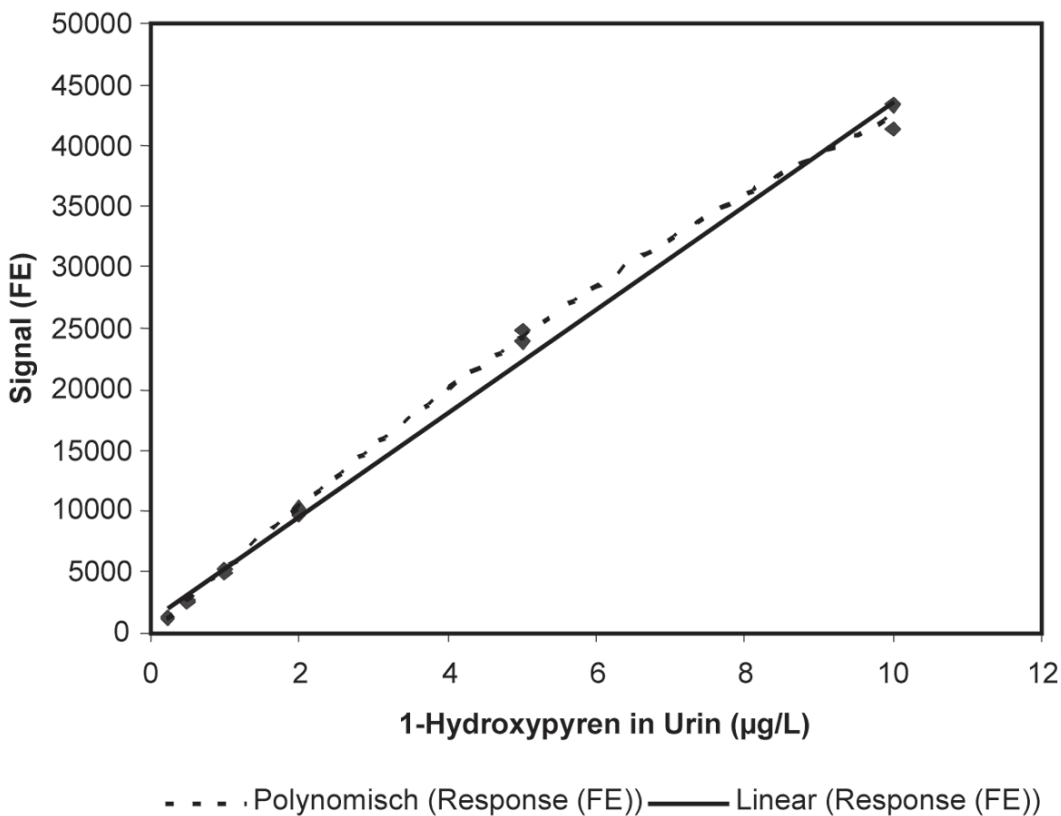


Abb. 13-5. Kurvenanpassung der Kalibrierfunktionen 1. und 2. Ordnung an die Ergebnisse des Kalibrierexperimentes für 1-Hydroxypyren.

Für die lineare Kalibrierfunktion berechnet sich eine Reststandardabweichung von

$$s_{y1} = \sqrt{\frac{\sum (y_i - (974,99 + 4252,3 \cdot x_i))^2}{12 - 2}} = 1316,3.$$

Für die Kalibrierfunktion 2. Grades beträgt die Reststandardabweichung

$$s_{y2} = \sqrt{\frac{\sum (y_i - (-300,2 + 5550,6 \cdot x_i - 128,1 \cdot x_i^2))^2}{12 - 3}} = 552,9.$$

Als Differenz der Varianzen ergibt sich somit

$$DS^2 = (12-2) \cdot (1316,3)^2 - (12-3) \cdot (552,9)^2 = 14574546,4$$

und als Prüfgröße

$$PW = \frac{14574546,4}{(552,9)^2} = 47,67.$$

Beim Vergleich mit dem F-Wert ($f_1 = 1$; $f_2 = 9$; $P = 99\%$) aus Tab. 13-2 zeigt sich, dass $PW (47,67) > F (10,56)$ ist. Damit besteht keine ausreichende Linearität.

Werden die Ergebnisse für den höchsten Kalibrator (10 $\mu\text{g/L}$) aus der Berechnung eliminiert ($n = 10$), so ergibt sich eine lineare Kalibrierfunktion von $y = 4878 \cdot x + 107,5$ mit einem Bestimmtheitsmaß von 0,9991. Für den Kalibrierfunktionsansatz 2. Grades lautet die Funktion $y = -38,2 \cdot x^2 + 5084,7 \cdot x - 22,4$ (Bestimmtheitsmaß 0,9991).

Für die lineare Kalibrierfunktion errechnet sich eine Reststandardabweichung von

$$s_{y1} = \sqrt{\frac{\sum (y_i - (107,5 + 4878 \cdot x_i))^2}{10 - 2}} = 289,1.$$

Für die Kalibrierfunktion 2. Grades beträgt die Reststandardabweichung

$$s_{y2} = \sqrt{\frac{\sum (y_i - (-22,4 + 5084,7 \cdot x_i - 38,2 \cdot x_i^2))^2}{10 - 3}} = 295,3.$$

Als Differenz der Varianzen ergibt sich somit

$$DS^2 = 8 \cdot (3310,8)^2 - 7 \cdot (2549,2)^2 = 58143,8$$

und als Prüfgröße

$$PW = \frac{42201518,1}{(2549,2)^2} = 0,667.$$

Beim Vergleich mit dem entsprechenden F-Wert ($f_1 = 1$; $f_2 = 7$; $P = 99\%$) aus Tab. 13-2 zeigt sich, dass $PW (0,67) < F (12,25)$ ist. Damit besteht für den Kalibrierbereich von 0,25 bis 5,0 $\mu\text{g/L}$ eine ausreichende Linearität.

13.6 Präzision

Die Präzision gibt an, wie stark die Analysenergebnisse aufgrund zufälliger Fehler streuen. Statistisch wird die Präzision durch die Standardabweichung bzw. den Vertrauensbereich beschrieben [17, 18]. Es wird dabei unterschieden zwischen:

- *Präzision unter Wiederholbedingungen*: Sie beschreibt die Ergebnisse, die mit demselben Verfahren am identischen Untersuchungsobjekt im selben Labor durch denselben Bearbeiter mit derselben Geräteausrüstung in kurzen Zeitabständen erzielt werden (Angabe als *Wiederholstandardabweichung*).
- *Präzision unter Vergleichsbedingungen*: Sie stellt ein Maß für die Vergleichbarkeit bzw. Übertragbarkeit eines Analysenverfahrens dar. Dazu wird dasselbe Verfahren am identischen Untersuchungsobjekt in verschiedenen Labors durch verschiedene Bearbeiter mit verschiedenen Geräteausrüstungen, z.B. im Rahmen eines Ringversuches angewendet (Angabe als *Vergleichsstandardabweichung*).

Im Rahmen der laborinternen Validierung kann lediglich die Präzision unter Wiederholbedingungen ermittelt werden. Als wichtigstes Maß wird hierzu die Methodenpräzision (Maß für die zufällige Streuung der Analysenergebnisse über die gesamte Methode) bestimmt. In bestimmten Fällen kann es darüber hinaus sinnvoll sein, die Präzision von einzelnen Methodenschritten zu bestimmen.

Bei der Bestimmung der *Präzision unter Wiederholbedingungen* ist ferner zu unterscheiden zwischen der

- *Präzision in der Serie*: Mehrfache Durchführung der Analyse des identischen Untersuchungsobjektes in einer Analysenserie und der
- *Präzision zwischen den Serien*: Analyse des identischen Untersuchungsobjektes in verschiedenen Analysenserien. In dieser Methodensammlung hat es sich bewährt, die Präzision zwischen den Serien zu bestimmen, indem man die Serien an verschiedenen Tagen analysiert (*Präzision von Tag zu Tag*).

Zur Bestimmung der Präzision in der Serie sollte eine hinreichende Anzahl an Einzelbestimmungen des Untersuchungsobjektes durchgeführt werden. Dabei ist zu beachten, dass die statistische Unsicherheit des Präzisionsexperiments exponentiell mit der Anzahl der Einzelbestimmungen abnimmt. Diese Abhängigkeit der statistischen Unsicherheit wird durch den Student-Faktor t_p ausgedrückt (s. u.). Der Tab. 13-4 ist zu entnehmen, dass der Student-Faktor bis zu einem Freiheitsgrad von 5 besonders stark abnimmt. Demnach hat die Verwendung von weniger als 6 Einzelmessungen einen besonders großen Einfluss auf die Aussagekraft des Präzisionsexperimentes. Bei der Bestimmung der Präzision sollte daher eine Anzahl von 6 Einzelmessungen nicht unterschritten werden.

Da die Präzision in den meisten Fällen von der Analytenkonzentration abhängig ist, sollte die Bestimmung der Präzision bei mindestens zwei verschiedenen Konzentrationen im erwarteten Messbereich durchgeführt werden. Die Bestimmung der Prä-

zision zwischen den Serien sollte in einer hinreichenden Anzahl ($n \geq 6$) an Analysenserien durchgeführt werden. Dabei sollte die Häufigkeit der Analysen pro Untersuchungsserie mit der in der Methodenvorschrift angegebenen Zahl an Analysen pro Probe übereinstimmen (z. B. zwei Proben pro Serie, wenn in der Vorschrift eine Doppelbestimmung festgelegt ist). Für die Ermittlung der Präzision sind Proben in der biologischen Matrix zu verwenden.

Im Rahmen der statistischen Auswertung der Präzisionsuntersuchungen werden die Standardabweichung, der Variationskoeffizient (=relative Standardabweichung) und der Vertrauensbereich (= Streubereich) ermittelt.

Die *Standardabweichung* ist definiert durch:

$$s = \sqrt{\frac{\sum (c_i - \bar{c})^2}{n - 1}}$$

wobei c_i das Analyseergebnis einer Einzelmessung, \bar{c} der Mittelwert aus allen Einzelmessungen und n die Anzahl der Einzelmessungen ist.

Der *Variationskoeffizient* errechnet sich durch den Bezug der Standardabweichung auf den Mittelwert aller Einzelmessungen:

$$\text{VK (in \%)} = \frac{s \cdot 100}{\bar{c}}$$

Da die Ergebnisunsicherheit der Standardabweichung bei kleinen Messreihen stark von der Anzahl der Einzelmessungen abhängig ist, wird aus der Standardabweichung der Vertrauensbereich berechnet, bei dem dieser Einfluss korrigiert wird.

Der *Vertrauensbereich* berechnet sich wie folgt:

$$u \text{ (in \%)} = t_p \cdot \text{VK} = t_p \cdot \frac{s \cdot 100}{\bar{c}}$$

wobei durch den Student-Faktor t_p die Anzahl an Einzelmessungen und die statistische Sicherheit berücksichtigt wird (Tab. 13-4). In der Regel wird für die Berechnung des Vertrauensbereiches eine statistische Sicherheit von $P = 95\%$ als hinreichend betrachtet.

Tab. 13-4 Student-Faktoren (t_p) für den Vertrauensbereich, zweiseitige Schranken (aus [19]).

Freiheitsgrad (n - 1)	Statistische Sicherheit/Wahrscheinlichkeit		
	95%	99%	99,5%
1	12,706	63,657	636,619
2	4,303	9,925	31,598
3	3,182	5,841	12,924
4	2,776	4,604	8,610
5	2,571	4,032	6,869
6	2,447	3,707	5,959
7	2,365	3,499	5,408
8	2,306	3,355	5,041
9	2,262	3,250	4,781
10	2,228	3,169	4,587
11	2,201	3,106	4,437
12	2,179	3,055	4,318
13	2,160	3,012	4,221
14	2,145	2,977	4,140
15	2,131	2,947	4,073
16	2,120	2,921	4,015
17	2,110	2,898	3,965
18	2,101	2,878	3,922
19	2,093	2,861	3,883
20	2,086	2,845	3,849
25	2,060	2,787	3,725
30	2,042	2,750	3,646

13.6.1 Beispiel

1-Hydroxypyren (1-OHPyr) wird im Urin nach Spaltung des Glucuronids und anderer Konjugate über Festphasen-Extraktion mittels HPLC und Fluoreszenz-Detektion bestimmt [14].

Die *intra*-Labor-Reproduzierbarkeit (R_w) wird aus der Messung von Qualitätskontrollproben ermittelt, deren Bestimmung alle Schritte der Methode in der relevanten Matrix (Urin) einschließt. Zum Aufbau einer Qualitätskontrollkarte (vgl. Kap. 13-9) wurde jeweils eine Qualitätskontrollprobe in 10 Analysenserien untersucht und für die Bestimmung der Präzision von Tag zu Tag verwendet (Tab. 13-5).

Tab. 13-5 Ergebnisse der Bestimmung von 1-Hydroxypyren im Urin mittels HPLC-Fluoreszenzdetektion in einer Qualitätskontrollprobe zur Berechnung der Präzision von Tag zu Tag (n = 10).

Serie Nr.	1-Hydroxypyren (µg/L)
1	0,542
2	0,572
3	0,552
4	0,545
5	0,538
6	0,553
7	0,560
8	0,548
9	0,539
10	0,552

Der Mittelwert aus den 10 Einzelwerten berechnet sich mit $\bar{c} = 0,550$ mg/L. Die Standardabweichung für die Ergebnisstreuung berechnet sich somit wie folgt:

$$s = \sqrt{\frac{(0,542 - 0,550)^2 + (0,572 - 0,550)^2 + (0,552 - 0,550)^2 + \dots}{9}} = 0,0103 \mu\text{g/L.}$$

Der Variationskoeffizient berechnet sich dann wie folgt:

$$\text{VK (in \%)} = \frac{0,0103 \cdot 100}{0,550} \% = 1,88\%.$$

Mit der Forderung einer statistischen Sicherheit von 95% ergibt sich damit der Vertrauensbereich wie folgt:

$$u \text{ (in \%)} = 2,262 \cdot 1,88\% = 4,25\%.$$

13.7 Richtigkeit

Die Richtigkeit ist ein Maß für die Abweichung des Messwertes vom richtigen („wahren“) Wert aufgrund eines systematischen Fehlers [17, 18]. Die Richtigkeit eines Verfahrens lässt sich mit folgenden Methoden bestimmen:

- Vergleich der Analyseergebnisse für ein Referenzmaterial (CRM, *certified reference material*) mit dem zertifizierten Referenzwert
- Vergleich des zu validierenden Analysenverfahrens mit einem für die Bestimmung des Parameters in der jeweiligen Probenmatrix zertifizierten Referenzverfahren

- Teilnahme an Ringversuchen, in denen der Sollwert durch ausgewiesene Referenzlaboratorien ermittelt wird
- Durchführung von Wiederfindungsversuchen (Aufstockverfahren)

13.7.1 Referenzmaterial (CRM)

Die zertifizierten Referenzwerte der CRM sind rückführbar auf internationale Standards und beinhalten in der Regel keine geräte- oder laborspezifischen Faktoren, was sie für eine weitgehend unbeeinflusste Bestimmung der Richtigkeit prädestiniert. Tab. 13-6 enthält eine Liste von zertifizierten Referenzmaterialien für arbeits- und umweltmedizinisch-toxikologische Untersuchungen. Bei der Auswahl des Referenzmaterials ist darauf zu achten, dass es hinsichtlich der Konzentration des zu bestimmenden Analyten und hinsichtlich der Matrix mit dem Anwendungsbereich des zu validierenden Analysenverfahrens möglichst übereinstimmt. Die

Tab. 13-6 (Teil)zertifiziertes Referenzmaterial (CRM) für arbeitsmedizinisch- und umweltmedizinisch-toxikologische Analysen.

Bezeichnung	Analyt	Matrix	Bemerkungen	Literatur
ERM-CE194 ERM-CE195 ERM-CE196 BCR-634 BCR-635 BCR-636	Cd, Pb	Rinderblut, lyophilisiert	eine Konzentration	[20]
BCR-637 BCR-638 BCR-639	Al, Se, Zn	Humanserum	eine Konzentration	[20]
SRM 2670a	Sb, Cd, Ce, Co, Pb, Hg, Mn*, Mb*, Pt*, Se*, Tl, Th, U	Humanurin, lyophilisiert	i. d. R. zwei Konzentrationen, davon 1 zertifiziert	[21]
SRM 2672a	Hg	Humanurin, lyophilisiert	zwei Konzentrationen, davon 1 zertifiziert	[21]
SRM 2671a	Fluorid	Humanurin, lyophilisiert	zwei Konzentrationen	[21]
SRM 966	Pb, Cd, Hg	Rinderblut	zwei Konzentrationen	[21]
SRM 955b	Pb	Rinderblut	vier Konzentrationen	[21]
SRM 1589	PCB (Aroclor 1260)	Humanserum	eine Summenkonzentration	[21]
RM 8444	Cotinin	Humanurin, lyophilisiert	drei Konzentrationen (nicht zertifiziert)	[21]

Verwendung von zertifiziertem Referenzmaterial zur Bestimmung der Richtigkeit ist in Abb. 13-6 schematisch dargestellt.

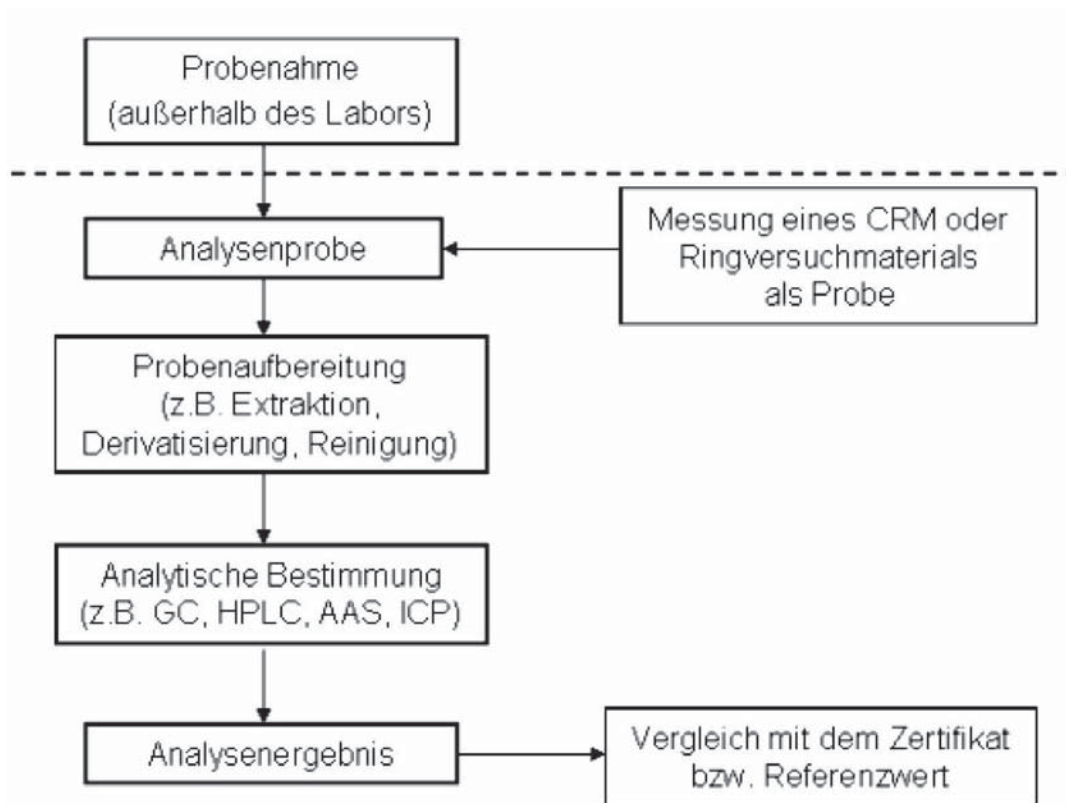


Abb. 13-6. Verwendung von zertifiziertem Referenzmaterial bzw. Ringversuchsmaterial zur Bestimmung der Richtigkeit.

13.7.2 Referenzmethoden

Bei der Auswahl einer zertifizierten Referenzmethode für einen Vergleich mit dem zu validierenden Analysenverfahren ist darauf zu achten, dass sich deren Messtechnik weitestgehend von derjenigen der zu validierenden Methode unterscheidet. Die Verwendung von zertifizierten Referenzverfahren ist in Abb. 13-7 schematisch dargestellt.

13.7.3 Ringversuche

Die dritte zuvor genannte Möglichkeit, bei der die Richtigkeit eines Analysenverfahrens durch die Teilnahme an Ringversuchen geprüft wird, erfordert die Bestimmung des Sollwertes durch Laboratorien, die für die Untersuchung des Analyten in der jeweiligen Matrix besonders ausgewiesen sind und die bei der Analyse des Ringversuchsmaterials Analysenverfahren mit hoher Richtigkeit verwenden. Der Aufwand und die Information über die Richtigkeit des Ringversuchsmaterials sind

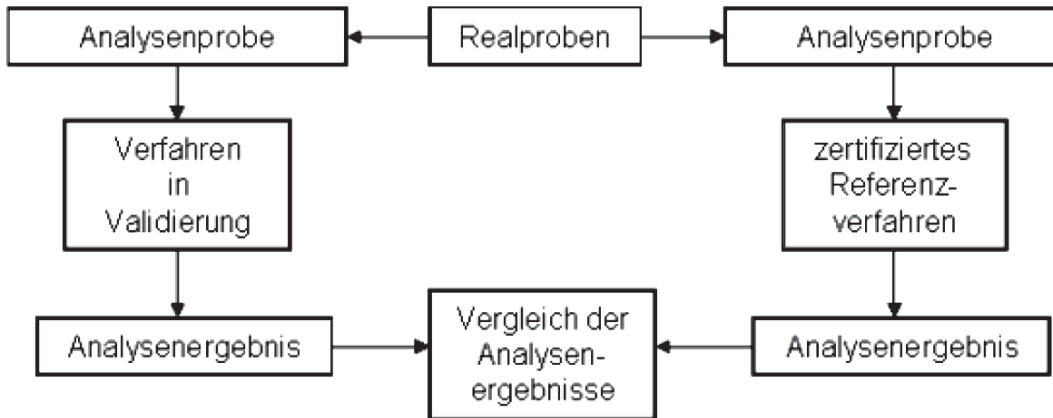


Abb. 13-7. Verwendung eines zertifizierten Referenzverfahrens zur Bestimmung der Richtigkeit.

nicht mit denen der Zertifizierung von Referenzmaterialien und Referenzverfahren gleichzusetzen. Unter anderem fehlt es häufig an einer lückenlosen Rückführbarkeit auf internationale Standards. Allerdings stellt es in vielen Fällen die einzige Möglichkeit zur Richtigkeitsbestimmung mittels externer Vergleichswerte dar, wenn entsprechende Referenzmaterialien und -methoden nicht zur Verfügung stehen. Eine Übersicht über Ringversuche für Analysen in biologischem Material findet sich im Abschn. 13.9.2. Die Verwendung von Ringversuchsmaterial zur Bestimmung der Richtigkeit ist in Abb. 13-6 schematisch dargestellt.

13.7.4 Aufstockverfahren

Beim Fehlen von Referenzmaterialien, Referenzverfahren und Ringversuchsangeboten verbleibt das Aufstockverfahren, um Kenngrößen für die Richtigkeit des Verfahrens zu ermitteln. Dabei wird ein Teil der Probenmatrix mit definierten Mengen des Analyten dotiert und anschließend der Gehalt des Analyten in der Probenmatrix sowohl in nativer als auch in dotierter Form analysiert. Dabei ergibt sich aus dem Vergleich der Differenz der Analytenergebnisse für die native und die dotierte Probenmatrix mit der definierten Dotierungsmenge die relative Wiederfindung als ein Maß für die Richtigkeit des Verfahrens. Hierbei kann die Aussagekraft der Richtigkeitsanalyse zum einen durch fehlerhafte Dotierungsmengen oder durch eine fehlerhafte Simulation der belasteten Probenmatrix beeinflusst werden.

13.7.5 Rechnerische Bestimmung der Richtigkeit

Für die Bestimmung der Richtigkeit eines Analysenverfahrens ist jeweils ein Mittelwert aus mehrfachen Analysen der Probe heranzuziehen. Dabei sollte aufgrund der Abhängigkeit der statistischen Unsicherheit von der Anzahl der Einzelmessungen (s. Abschn. 13.6) die Bestimmung der Richtigkeit mit mindestens 6 Einzelmessungen

sungen durchgeführt werden. Da die Richtigkeit sehr deutlich von der Konzentration abhängig sein kann, sollten die Richtigkeitsuntersuchungen für mindestens zwei Konzentrationen innerhalb des erwarteten Messbereiches durchgeführt werden. Je nach Divergenz der Ergebnisse können Untersuchungen in weiteren Konzentrationshöhen erforderlich sein. In der Regel wird die Richtigkeit als Quotient aus dem Mittelwert der Analysenwerte und dem Vergleichswert (z. B. zertifizierter Wert) angegeben:

$$\text{Richtigkeit (in \%)} = \frac{\text{Analysenergebnis (Mittelwert)}}{\text{Vergleichswert}} \cdot 100$$

Darüber hinaus ist beim Vergleich mit den Referenz- und Sollwerten die Unsicherheit der Referenzwert- bzw. Sollwertbestimmung zu berücksichtigen.

Bei der Verwendung von zertifiziertem Referenzmaterial erfolgt der Vergleich des Messergebnisses mit dem zertifizierten Wert unter Berücksichtigung des Unsicherheitsbereiches des zertifizierten Wertes. Nach der Messung des zertifizierten Referenzmaterials wird zunächst die absolute Differenz zwischen dem Messwert und dem zertifizierten Wert berechnet:

$$\Delta_m = |C_m - C_{\text{CRM}}|$$

(mit Δ_m = absolute Differenz zwischen dem mittleren Messwert und dem zertifizierten Wert; C_m = mittlerer Messwert; C_{CRM} = zertifizierter Wert).

Jede Messung weist eine Messunsicherheit auf, so dass auch der zertifizierte Wert eines CRM nur bis auf die im Zertifikat festgelegte Unsicherheit u_{CRM} bekannt ist. Die Messunsicherheit wird gewöhnlich als Standardabweichung ausgedrückt, aber nur die Varianzen sind additiv. Die Unsicherheit von Δ_m ist u_Δ und wird folgendermaßen berechnet:

$$u_\Delta = \sqrt{u_m^2 + u_{\text{CRM}}^2}$$

(mit u_Δ = kombinierte Unsicherheit des Ergebnisses und des zertifizierten Wertes, d. h. Unsicherheit von Δ_m ; u_m = Standardunsicherheit des Messergebnisses; u_{CRM} = Standardunsicherheit des zertifizierten Wertes).

Die erweiterte Unsicherheit U_Δ entspricht einem Konfidenzintervall auf einem Signifikanzniveau von etwa 95% und wird durch die Multiplikation von u_Δ mit einem Erweiterungsfaktor (k), der gewöhnlich den Wert 2 hat, berechnet:

$$U_\Delta = 2 \cdot u_\Delta.$$

Zur Bewertung der Leistungsfähigkeit der Methode wird Δ_m und U_Δ verglichen: Wenn $\Delta_m < U_\Delta$, dann besteht keine signifikante Differenz zwischen dem Messergebnis und dem zertifizierten Wert.

Für die Bewertung der Analysenergebnisse im Rahmen von Ringversuchen wird in der Regel der so genannte *Z-Score* berechnet und zur Bewertung herangezogen.

$$\text{Z-score} = \frac{(c - c^*)}{s^*}$$

wobei c das erzielte Analysenergebnis, c^* der Sollwert und s^* die Standardabweichung der Sollwertstreuung ist. Der Sollwert und die Sollwertstreuung werden hierfür aus den Ergebnissen der Referenzlaboratorien ermittelt. Der Ringversuchsausrichter legt in der Regel eine *Z-Score*-Grenze fest, die vom Teilnehmer unterschritten werden muss, um ein Zertifikat zu erhalten.

13.7.6 Einflussgrößen der Richtigkeit

Die Richtigkeit eines Verfahrens wird unter anderen durch die Selektivität bzw. Spezifität des Verfahrens bestimmt (s. Abschn. 13.3). Um den Einfluss der Selektivität auf die Richtigkeit zu prüfen, werden der Probenmatrix systematisch potenzielle Störsubstanzen zugesetzt und die Abhängigkeit der Analysenergebnisse von diesen „Interferenten“ untersucht. Die statistische Bewertung der Ergebnisse erfolgt mittels eines *t*-Tests.

Darüber hinaus kann die Richtigkeit eines Verfahrens durch verfahrensbedingte Verluste und damit durch die Überführungsrate (absolute Wiederfindung) der Analyten bestimmt sein. Zur Bestimmung der verfahrensbedingten Verluste sollten dotierte Untersuchungsproben analysiert werden. Parallel dazu analysiert man Lösungen des Analyten, die dieselbe Konzentration wie die in der fertig aufgearbeiteten Probe aufweisen und die, soweit möglich, keiner Probenaufbereitung bzw. nur einzelnen Probenaufarbeitungsschritten unterzogen werden. Aus dem Vergleich der Ergebnisse aufgearbeiteter und nicht aufgearbeiteter Proben lassen sich die Verluste bei der Probenaufbereitung ermitteln. Gegebenenfalls sind wie beim Aufstockverfahren die Ergebnisse für das native Probenmaterial zu berücksichtigen. Die absolute Wiederfindung berechnet sich nach:

$$\text{Wiederfindung (in \%)} = \frac{(x - x_0)}{x_{\text{vgl}}} \cdot 100$$

wobei x das Response-Ergebnis für die dotierte Probe, x_0 das Ergebnis für die native Probe und x_{vgl} das Ergebnis für die Vergleichsprobe ist.

Wie zuvor bereits erwähnt, ist es unabdingbar, dass die Bestimmung der Richtigkeit unter Verwendung der realen Probenmatrix oder zumindest eines möglichst vergleichbaren Surrogates durchgeführt wird. Das bedeutet auch, dass die ermittelten Kenngrößen der Zuverlässigkeit nur für die Anwendung des Analysenverfahrens auf die verwendete Probenmatrix gelten. Soll ein Analysenverfahren auf eine ande-

re Matrix oder Matrixvariante angewendet werden, ist eine erneute Validierung mit der neuen Matrix notwendig.

In einigen Fällen kann es auch erforderlich sein, bei der Bestimmung der Richtigkeit mehrere verschiedene Stichproben der Probenmatrix (biologisches Material von verschiedenen Probanden) zu verwenden, um zu prüfen, ob die Variation der Stichprobenzusammensetzung Einfluss auf die Richtigkeit nimmt (s. Abschn. 13.3). Die Anzahl der Stichproben sollte sich dabei an der erwarteten Variation der Probenzusammensetzung orientieren.

Bei der Analyse der Richtigkeit muss auch dem Sachverhalt Rechnung getragen werden, dass ein Mangel an Stabilität des Analyten im biologischen Material die Richtigkeit des Gesamtverfahrens (einschließlich präanalytischer Phase) beeinflussen kann. Zur Erkennung eines möglichen Stabilitätsproblems sind Verlaufsuntersuchungen unter entsprechenden Lagerungs- und Transportbedingungen von Matrixproben und ggf. auch von aufgearbeiteten Proben durchzuführen (vgl. Abschn. 13.2).

13.7.7 Vergleichbarkeit von Methoden

Neben der Bestimmung der Richtigkeit existieren mehrere Methoden, mit denen die Vergleichbarkeit von Methoden geprüft werden kann:

- Teilnahme an Ringversuchen, in denen der Sollwert auf der Basis der Teilnehmerergebnisse ermittelt wird (consensus value)
- Vergleich des zu validierenden Analysenverfahrens mit einem zweiten validierten Verfahren, das sich möglichst in allen Verfahrensschritten von dem zu validierenden Analysenverfahren unterscheiden sollte

Die Bestimmung der Vergleichbarkeit ist kein Verfahren zur Validierung einer Analysenmethode. Ihre Bestimmung kann allerdings von Bedeutung sein, wenn Analyseergebnisse mit Grenz- und Richtwerten verglichen werden sollen, deren Überwachung durch eine Konvention an ein bestimmtes Analysenverfahren gebunden ist.

13.7.8 Beispiele

a) 1-Hydroxypyren im Urin (Richtigkeit aus Ringversuchsergebnissen)

1-Hydroxypyren (1-OHPyr) wird im Urin nach Spaltung des Glucuronids und anderer Konjugate über Festphasen-Extraktion mittels HPLC und Fluoreszenz-Detektion bestimmt [14].

Die Abschätzung der Richtigkeit basiert auf den Ergebnissen eines Labors bei der Teilnahme an den Ringversuchen der Deutschen Gesellschaft für Arbeitsmedizin und Umweltmedizin e. V. (DGAUM). Dabei werden zwei Konzentrationsbereiche,

ein niedriger (umweltmedizinischer) und ein höherer (arbeitsmedizinischer) Bereich unterschieden. Tabelle 13.7 gibt die Ergebnisse für den arbeitsmedizinischen Bereich wieder:

Tab. 13-7. Abschätzung der Richtigkeit für den Parameter 1-Hydroxypyren im Urin aus den Ergebnissen von Ringversuchen.

1-Hydroxypyren Referenzwert (µg/L)	1-Hydroxypyren Laborergebnis (µg/L)	Abweichung vom Referenzwert (<i>Bias</i>) (%)	Richtigkeit (%)
2,0	2,2	8,4	108,4
12,0	11,6	-3,4	96,6
5,7	6,4	12,3	112,3
13,1	10,6	-19,1	80,9
3,5	4,1	17,1	117,1
3,5	3,8	8,6	108,6
2,6	2,7	3,8	103,8
11,7	10,5	-10,3	89,7
6,2	5,2	-16,1	83,9

Über die Ringversuche gemittelt ergibt sich eine Richtigkeit der Methode von 100,1 %. Die Unsicherheit der Richtigkeitsbestimmung ergibt sich in Form des Variationskoeffizienten zu 12,9 % (vgl. Abschn. 13.6).

b) 3-Hydroxypropylmercaptursäure im Urin (Richtigkeit aus Dotierungsversuchen)

3-Hydroxypropylmercaptursäure (HPMA) ist der Hauptmetabolit von Acrolein und wird im Urin nach Zusatz von deuteriertem HPMA mittels Festphasenextraktion und anschließender Flüssigkeitschromatographie mit Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS) bestimmt [22].

Da für HPMA kein zertifiziertes Referenzmaterial zur Verfügung steht und auch keine Ringversuche angeboten werden, wird der Methoden-Bias aus Wiederfindungsdaten (n = 10) abgeschätzt (Tab. 13-8).

Tab. 13-8 Abschätzung der Richtigkeit für den Parameter 3-Hydroxypropylmercaptursäure auf der Basis von relativen Wiederfindungsraten (n = 10).

Leerwert	Dotierung	Messwert	Differenz zwischen Messwert und Leerwert	Richtigkeit (rel. Wieder- findung)
[µg/L]	[µg/L]	[µg/L]	[µg/L]	[%]
142,1	332,5	452,0	309,9	95,3
142,1	332,5	480,1	338,0	101,2
142,1	332,5	500,1	358,0	105,4
142,1	332,5	474,6	332,5	100,0
142,1	332,5	474,1	332,0	99,9
142,1	332,5	466,3	324,2	98,3
142,1	332,5	464,7	322,6	97,9
142,1	332,5	480,5	338,4	101,2
142,1	332,5	472,0	329,9	99,5
142,1	332,5	468,7	326,6	98,8

Über die Wiederfindungsergebnisse gemittelt ergibt sich eine Richtigkeit der Methode von 99,8%. Die Unsicherheit der Richtigkeitsbestimmung ergibt sich mit 2,6%.

13.8 Messunsicherheit

Die Angabe der Messunsicherheit stellt eine wichtige Information zur Beurteilung eines analytischen Messergebnisses dar, beispielsweise bei der Überprüfung der Einhaltung von Grenzwerten. Die für Prüf- und Kalibrierlaboratorien gültige Norm DIN EN ISO/IEC 17025 [23] fordert, dass die Laboratorien über Verfahren für die Schätzung der Messunsicherheit verfügen und diese anwenden. In der Norm wird weiter ausgeführt, dass bei der Schätzung der Messunsicherheit alle Unsicherheitskomponenten in Betracht gezogen werden müssen. Als Quellen, die zur Unsicherheit beitragen, werden aufgeführt: verwendete Bezugsnormale, verwendetes Referenzmaterial, benutzte Verfahren und Einrichtungen, Umgebungsbedingungen, Eigenschaften und Zustand der zu messenden Probe sowie das Bedienungspersonal.

Die Grundlagen zum Inhalt und zur Ermittlung der Messunsicherheit wurden erstmals in den Richtlinien *Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement* [24], herausgegeben von der ISO und anderen Organisationen, niedergelegt. Zur Umsetzung dieser Richtlinien in der Praxis sind seitdem eine Reihe von Leitfäden und Handbücher erschienen. Für die Ermittlung und Anwendung der Messunsicherheit in analytisch-chemischen Laboratorien seien insbesondere das Handbuch der finnischen Nordtest [25] sowie der EURACHEM/CITAC-Leitfaden [26] genannt, auf denen die folgende Darstellung im Wesentlichen basiert.

Die *Messunsicherheit* ist folgendermaßen definiert:

„Unsicherheit ist ein Parameter, assoziiert mit dem Ergebnis einer Messung, der die Streuung der Werte charakterisiert, die vernünftigerweise der Messgröße zugeordnet werden können.“

Vereinfacht ausgedrückt ist die Messunsicherheit das, was dem \pm nach dem Messergebnis folgt, beispielsweise eine absolute oder relative Standardabweichung. Wichtig ist dabei die Tatsache, dass die Angabe der Messunsicherheit keine Zweifel an der Validität der Messung ausdrücken soll, sondern das Gegenteil angestrebt wird: die Kenntnis der Messwertstreuung impliziert ein wachsendes Vertrauen in die Messung.

13.8.1 Kombinierte und erweiterte Messunsicherheit

Die Gesamt-Messunsicherheit setzt sich aus den Unsicherheiten aller Einzelschritte zusammen, wobei Korrelationen zwischen einzelnen Komponenten bestehen können, was durch die Kovarianz berücksichtigt werden muss. Andererseits können mehrere Einzelkomponenten auch zusammengefasst werden. Die sich aus den Einzelunsicherheiten ergebende Gesamt-Unsicherheit eines Messwertes wird auch als *kombinierte Standard-Messunsicherheit* u_c bezeichnet und lässt sich, je nach zugrunde liegendem Modell für die Messgröße y nach zwei Regeln errechnen:

Regel 1:

Für Modelle, die nur Summen oder Differenzen von Größen enthalten (z. B. $y = p + q + r + \dots$), gilt:

$$u_c(y(p, q, r, \dots)) = \sqrt{u(p)^2 + u(q)^2 + u(r)^2 + \dots}$$

wobei $u(p)$, $u(q)$, $u(r)$ die Standardunsicherheiten (z. B. in Form von Standardabweichungen) der Einzelkomponenten darstellen.

Regel 2:

Für Modelle, die nur Produkte oder Quotienten enthalten (z. B. $y = p/q \cdot r \dots$), gilt:

$$u_c(y(p, q, r, \dots)) = y \cdot \sqrt{\left(\frac{u(p)}{p}\right)^2 + \left(\frac{u(q)}{q}\right)^2 + \left(\frac{u(r)}{r}\right)^2 + \dots}$$

wobei $u(p)/p$ usw. relative Standardabweichungen darstellen.

Aus der kombinierten Messunsicherheit u_c wird die so genannte *erweiterte Messunsicherheit* U durch Multiplikation mit einem Erweiterungsfaktor k berechnet:

$$U(y) = k \cdot u_c$$

Mit $k = 2$ stellt die erweiterte Messunsicherheit einen Vertrauensbereich von etwa 95 % dar, unter der Voraussetzung, dass der Ermittlung der kombinierten Messunsicherheit 6 oder mehr Messungen zugrunde liegen.

Das Messergebnis kann somit in der Form

$$y \pm U$$

angegeben werden, was bedeutet, dass der Messwert y mit einer Wahrscheinlichkeit von 95% in dem Intervall $y-U$ bis $y + U$ liegt.

13.8.2 Abschätzung der Messunsicherheit

Die Vorgehensweise bei der Abschätzung der Messunsicherheit kann in vier Stufen eingeteilt werden (Tab. 13-9).

Tab. 13-9. Vorgehensweise bei der Abschätzung der Messunsicherheit.

Stufe	Vorgang	Erläuterung
1	Spezifikation der Messgröße	Die Messgröße ist eindeutig zu beschreiben. Daraus muss sich die Abhängigkeit der Messgröße von den wichtigsten Einflussfaktoren ergeben (idealerweise in Form einer Funktionsgleichung). Die notwendigen Informationen sollten in der Methoden-SOP vorhanden sein.
2	Identifizierung der Quellen für die Unsicherheiten	Es sollte eine Liste von Einflussfaktoren aufgestellt werden, die definierte Auswirkungen auf die Messgröße haben (s. Stufe 1). Zu den möglichen Einflussfaktoren gehören: Probenahme, Lagerungsbedingungen, instrumentelle Abweichungen, Reagenzienreinheit, Messbedingungen, Matrix, Personal, Zufallseffekte. Die Aufstellung eines Ursache-Wirkungs-Diagramms kann für die Auflistung von Unsicherheitsfaktoren hilfreich sein.
3	<ul style="list-style-type: none"> – Vereinfachung durch Zusammenfassung von Unsicherheitsquellen – Quantifizierung der Unsicherheiten für einzelne Quellen und für die Gesamtheit – Umrechnung der Unsicherheiten in Standardabweichungen 	Die Quantifizierung der Unsicherheiten kann durch Messung oder Abschätzung erfolgen. In der Praxis ist es oft möglich, kombinierte Unsicherheiten für eine Anzahl von Einflussfaktoren zu verwenden. Dies ergibt sich oft aus Daten der Methodenvalidierung (z. B. Wiederholpräzision und Wiederfindungsdaten) und aus Ringversuchsergebnissen, Zertifikaten und Gerätespezifikationen. Über die Umrechnung von anderen Unsicherheitsmaßen in Standardabweichungen geben die einschlägigen Darstellungen Auskunft.
4	<ul style="list-style-type: none"> – Berechnung der kombinierten Unsicherheit – Bewertung und ggf. Reevaluierung – Berechnung der erweiterten Unsicherheit 	Der Zusammenhang zwischen den Einzelunsicherheiten, der kombinierten Unsicherheit und der erweiterten Unsicherheit ist in Abschn. 13.8.1 dargestellt. Zur Bewertung der kombinierten Messunsicherheit gehört die Ermittlung des Anteils der Einzelunsicherheiten. Vorgehensweisen hierzu sind im EURACHEM/CITAC-Leitfaden [26] angegeben.

13.8.3 Beispiele

Es wird auf die ausführliche Behandlung von Beispielen zur Ermittlung der Messunsicherheit im EURACHEM/CITAC-Leitfaden [26] hingewiesen. An dieser Stelle soll anhand von zwei Beispielen eine vereinfachte, praxisnahe Vorgehensweise in Anlehnung an die Ausführungen von Magnusson et al. [25] vorgestellt werden.

a) Bestimmung von 1-Hydroxypyren im Urin

Stufe 1 – Spezifikation der Messgröße:

1-Hydroxypyren (1-OHPyr) wird im Urin nach Spaltung des Glucuronids und anderer Konjugate über Festphasen-Extraktion mittels HPLC und Fluoreszenz-Detektion bestimmt [14].

Die Abschätzung der Messunsicherheit basiert auf den Ergebnissen der internen Qualitätskontrolle sowie auf den Ergebnissen von Ringversuchen, an denen im Zeitraum von 2003 bis 2006 teilgenommen wurde (Ringversuche für arbeits- und umweltmedizinisch-toxikologische Analysen in biologischem Material, c/o Institut und Poliklinik für Arbeits-, Sozial- und Umweltmedizin der Universität Erlangen-Nürnberg). Dabei werden zwei Untersuchungslevel, ein niedriger (umweltmedizinischer) und ein höherer (arbeitsmedizinischer) Bereich, unterschieden.

Stufe 2 – Identifizierung der Unsicherheitsquellen:

- Die Wiederholpräzision wird aus der Messung von Qualitätskontrollproben ermittelt. Die Bestimmung dieser Kontrollen umfasst alle Schritte der Methode in der relevanten Matrix (Urin). Die Unsicherheitskomponente wird durch $u(R_w)$ repräsentiert.
- Der Bias (d.h. die Abweichung vom „wahren“ Wert oder Nominalwert) wird den Ringversuchsergebnissen entnommen. Die Unsicherheit wird durch $RMS(bias)$ repräsentiert.
- Die Unsicherheit des Nominalwertes ($u(C_{ref})$) wird ebenfalls aus dem Ringversuch bezogen.

Stufe 3 – Quantifizierung der Unsicherheitsquellen:

$u(R_w)$: aus Kontrollmessungen ($n = 38$) über mehrere Monate ergab sich ein Variationskoeffizient (VK) von 1 %, somit:

$$u(R_w) = 1 \%$$

Anmerkung: Die Konzentration der Kontrollprobe lag bei 0,5 µg/L und somit im umweltmedizinischen Bereich. Es wird angenommen, dass der VK für Konzentrationen im arbeitsmedizinischen Bereich einen ähnlichen Wert hat.

RMS(bias): Die erwähnten Ringversuche erbrachten folgende Ergebnisse:

- Arbeitsmedizinischer Bereich (2–16 µg/L) (vgl. Tab. 13-7):

Bias (%): 8,4; -3,4; 12,3; -19,1; 17,1; 8,6; 3,8; -10,3; -16,1 (n = 9).

$$\text{RMS(bias)}_{\text{Arbeit}} = \sqrt{\frac{\sum (\text{bias})^2}{n}} = \sqrt{\frac{8,4^2 + (-3,4)^2 + 12,3^2 + \dots}{9}} = 12,2\%.$$

- Umweltmedizinischer Bereich (0,13–0,61 µg/L):

Bias (%): 3,5; -7,8; -23,5; 26,9; 21,7; 0,0; -1,6; 23,1 (n = 8)

$$\text{RMS(bias)}_{\text{Umwelt}} = \sqrt{\frac{\sum (\text{bias})^2}{n}} = \sqrt{\frac{3,5^2 + (-7,8)^2 + (-23,5)^2 + \dots}{8}} = 17,2\%.$$

u(Cref): Der mittlere Variationskoeffizient S_R der Ringversuche für 1-OHPyr im arbeitsmedizinischen Bereich lag bei 10,2%, im umweltmedizinischen Bereich bei 13,3%. Die mittlere Anzahl Teilnehmer betrug 23,8 bzw. 16,6. Damit ergibt sich für die Unsicherheiten der Nominalwerte:

$$u(\text{Cref})_{\text{Arbeit}} = \frac{S_R}{\sqrt{n}} = \frac{10,2}{\sqrt{23,8}} = 2,1\%$$

$$u(\text{Cref})_{\text{Umwelt}} = \frac{S_R}{\sqrt{n}} = \frac{13,3}{\sqrt{16,6}} = 3,3\%.$$

u(bias): Zur Unsicherheit des Bias tragen RMS(bias) und u(Cref) bei:

$$u(\text{bias})_{\text{Arbeit}} = \sqrt{\text{RMS(bias)}_{\text{Arbeit}}^2 + u(\text{Cref})_{\text{Arbeit}}^2} = \sqrt{12,2^2 + 2,1^2} = 12,4\%$$

$$u(\text{bias})_{\text{Umwelt}} = \sqrt{\text{RMS(bias)}_{\text{Umwelt}}^2 + u(\text{Cref})_{\text{Umwelt}}^2} = \sqrt{17,2^2 + 3,3^2} = 17,5\%$$

Alle in diesem Beispiel dargestellten Unsicherheiten stellen relative Standardunsicherheiten (in %) dar.

Stufe 4 – Berechnung der kombinierten und erweiterten Messunsicherheit:

$$u_{c, \text{Arbeit}} = \sqrt{u(R_w)^2 + u(\text{bias})_{\text{Arbeit}}^2} = \sqrt{1,0^2 + 12,4^2} = 12,4 \%$$

$$u_{c, \text{Umwelt}} = \sqrt{u(R_w)^2 + u(\text{bias})_{\text{Umwelt}}^2} = \sqrt{1,0^2 + 17,5^2} = 17,5 \%$$

$$U_{\text{Arbeit}} = 2 \cdot u_c = 2 \cdot 12,4 \% = 24,8 \%$$

$$U_{\text{Umwelt}} = 2 \cdot u_c = 2 \cdot 17,5 \% = 35,0 \%$$

Anmerkung:

Bei Bestehen des Ringversuchs kann die kombinierte Messunsicherheit u_c auch direkt aus der Reproduzierbarkeits-Standardabweichung der Ringversuche S_R abgelesen werden: $u_c = S_R$.

In dem vorliegenden Beispiel ergab sich ein mittleres S_R für den arbeitsmedizinischen Bereich von 10,2% und für den umweltmedizinischen Bereich von 13,3%, was erweiterte Messunsicherheiten U von 20,4 bzw. 26,6% ergibt. Beide Vorgehensweisen führen also zu ähnlichen Messunsicherheiten.

b) Bestimmung von 3-Hydroxypropylmercaptursäure (HPMA) im Urin

Stufe 1 – Spezifikation der Messgröße:

3-Hydroxypropylmercaptursäure (HPMA) ist der Hauptmetabolit von Acrolein. HPMA wird im Urin nach Zusatz von deuteriertem HPMA und einer Festphasenextraktion mittels Flüssigkeitschromatographie mit Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS) bestimmt [22].

Da für HPMA kein zertifiziertes Referenzmaterial zur Verfügung steht und auch keine Ringversuche angeboten werden, wird der Methoden-Bias aus Wiederfindungsdaten abgeschätzt.

Stufe 2 – Identifizierung der Unsicherheitsquellen:

- Die Wiederholpräzision (R_w) wird über die Bestimmung von Qualitätskontrollproben berechnet. Die Analyse dieser Kontrollproben umfasst alle Schritte der Methode in der relevanten Matrix (Urin). Die Unsicherheitskomponente wird durch $u(R_w)$ repräsentiert.
- Der Bias wird aus den Ergebnissen von Wiederfindungsexperimenten abgeschätzt. Die Unsicherheit wird durch $RMS(\text{bias})$ repräsentiert.

- Die Unsicherheit des durch Standardaddition erhaltenen Nominalwertes ($u(\text{Cref})$) wird aus der Unsicherheit der Volumenmessung und der Reinheit der verwendeten Referenzsubstanz ermittelt.

Stufe 3 – Quantifizierung der Unsicherheitsquellen:

$u(\text{R}_w)$: Aus Kontrollmessungen ($n = 133$, Konzentrationsbereich: ca. 1000 ng/mL) ergab sich ein VK von 4,4%, somit:

$$u(\text{R}_w) = 4,4\%.$$

RMS(bias): Die Wiederfindungsraten (%) betragen ($n = 10$): 95,3; 101,2; 105,4; 100,0; 99,9; 98,3; 97,9; 101,2; 99,5; 98,8 (vgl. Tab. 13-8). Die Wiederfindungen sind nicht signifikant von 100% verschieden.

Bias (%): -4,7; 1,2; 5,4; 0; -0,1; -1,7; -2,1; 1,2; -0,5; -1,2 ($n = 10$).

$$\begin{aligned} \text{RMS}(\text{bias}) &= \sqrt{\frac{\sum (\text{bias})^2}{n}} \\ &= \sqrt{\frac{(-4,7)^2 + 1,2^2 + 5,4^2 + 0^2 + (-0,1)^2 + \dots}{10}} = 2,5\% \end{aligned}$$

$u(\text{Cref})$: Für den HPMA-Standard steht ein Zertifikat zur Verfügung: Reinheit > 98%. Allerdings wird keine mögliche Abweichung angegeben, so dass diese mit einem 95%-Intervall von $\pm 2\%$ angenommen wird; daraus ergibt sich eine Standardunsicherheit für den Gehalt der Referenzsubstanz von 1%:

$$u(\text{conc}) = 1,0\%.$$

Die Unsicherheit des Nominalvolumens kann der jeweiligen Pipettenkalibrierung entnommen werden. In diesem Falle handelt es sich um eine 200 μL -Pipette für die eine Abweichung von $\pm 0,9\%$ angegeben wird. Die Standardabweichung für Mehrfachvolumenmessungen wurde mit 0,3% ermittelt. Somit gilt für die Volumenungenauigkeit:

$$u(\text{vol}) = \sqrt{\left(\frac{0,9}{\sqrt{3}}\right)^2 + 0,3^2} = 0,6\%.$$

Anmerkung: Bei Angaben von Abweichungen in der Form $\pm a$ (z. B. in Zertifikaten) wird für die Berechnung der Standardunsicherheit eine

symmetrische Rechteckverteilung angenommen. Für die Unsicherheit gilt: $u = a/\sqrt{3}$.

Der Gehalt der zuaddierten Referenzsubstanz hat somit eine Unsicherheit von:

$$u(\text{Cref}) = \sqrt{u(\text{conc})^2 + u(\text{vol})^2} = \sqrt{1,0^2 + 0,6^2} = 1,2\%.$$

$u(\text{bias})$: Für die Unsicherheit der systematischen Abweichung $u(\text{bias})$ ergibt sich:

$$u(\text{bias}) = \sqrt{\text{RMS}(\text{bias})^2 + u(\text{Cref})^2} = \sqrt{2,5^2 + 1,2^2} = 2,8\%.$$

Alle in diesem Beispiel dargestellten Unsicherheiten stellen relative Standardunsicherheiten (in %) dar.

Stufe 4 – Berechnung der kombinierten und erweiterten Messunsicherheit:

$$u_c = \sqrt{u(\text{Rw})^2 + u(\text{bias})^2} = \sqrt{4,4^2 + 2,8^2} = 5,2\%$$

$$U = 2 \cdot u_c = 2 \cdot 5,2\% = 10,4\%.$$

13.9 Qualitätssicherung

Die Präzision und Richtigkeit von Biomonitoring-Untersuchungen durch arbeits- und umweltmedizinisch-toxikologische Laboratorien müssen laufend durch Qualitätssicherungsmaßnahmen kontrolliert werden. Generell umfasst die Qualitätssicherung in medizinischen Laboratorien eine interne und externe Qualitätskontrolle [2, 27].

13.9.1 Interne Qualitätssicherung

Die laborinterne Qualitätssicherung dient der systematischen Überwachung der Präzision unter Wiederholbedingungen zur Erfassung zufälliger Fehler sowie der Richtigkeit quantitativer Laboruntersuchungen. In Deutschland basiert sie auf den Richtlinien der Bundesärztekammer [3]. Ihre Umsetzung in der Praxis erfolgt mit einem Kontrollprobensystem. Die dazu verwendeten Kontrollmaterialien müssen dem Untersuchungsmaterial möglichst ähnlich sein. Dabei handelt es sich vorzugsweise um kommerziell erhältliche Kontrollmaterialien mit ausgewiesenem Analytengehalt oder alternativ um selbst angesetzte Kontrollmaterialien mit konstantem Analytengehalt für den „täglichen Gebrauch“ im Rahmen der Präzisions- und Richtigkeitskontrolle.

Tab. 13-10. Kommerziell erhältliche Kontrollmaterialien in Urin (a), Plasma bzw. Serum (b) und Vollblut (c) zur internen Qualitätskontrolle arbeits- und umweltmedizinisch-toxikologischer Analysen.

Hersteller, Handelsname	Matrix	Parameterspektrum n	Parameter	Anzahl Konzentrationen
<i>a) Urin</i>				
Bio Rad (München, D) Lyphochek®	Urin	23	Al, Sb, As, Pb, Cd, Cr, Co, Hg, Cu, Mg, Mn, Ni, Se, Tl, Zn, Fluorid, 5-Aminolävulinsäure (ALA), Hippursäure, Mandelsäure, Phenylglyoxylsäure (PGA), Pentachlorphenol (PCP), Phenol, Trichloressigsäure (TCA)	2
Sero AS (Billingstad, N) Seronorm®	Urin	19	Al, Sb, As, Cd, Co, Cu, Cr, Pb, Mn, Hg, Ni, Tl, Zn, Fluorid, 1-Hydroxypyren, Phenol, TCA, Ameisensäure, Tetrachlorethylen	1
Trace Elements Urine Recipe (München, D) ClinChek® Control	Urin	21	Al, Sb, As, Be, Fe, Pb, Cd, Cr, Co, Cu, Mg, Mn, Mo, Ni, Hg, Pt, Se, Tl, V, Zn, Fluorid	2
Spurenelemente Recipe (München, D) ClinChek® Control Organische Verbindungen	Urin	29	Butoxyessigsäure, Cotinin, 2,5-Dichlorphenol, Ethoxyessigsäure, Hippursäure, 5-Hydroxy-N-Methyl-2-pyrrolidon, 2-Hydroxy-N-methylsuccinimid, 1-Hydroxypyren, o-Kresol, Mandelsäure, N-Methylformamid, Methyl-Hippursäuren, t,t-Muconsäure, PCP, Phenol, PGA, S-Phenylmercaptursäure, TCA, 2,4,6-Trichlorphenol, 6 Alkylphosphate, 4 Pyrethroidmetabolite	2
<i>b) Plasma / Serum</i>				
Sero AS (Billingstad, N) Seronorm®	Serum	8	Al, Cr, Co, Cu, Mn, Ni, Se, Zn	1
Trace Elements Serum Recipe (München, D) ClinChek® Control	Plasma	24	Al, Sb, As, Be, Bi, Cd, Cr, Co, Cu, Au, Fe, Li, Mg, Mn, Hg, Mo, Ni, Pt, Se, Tl, V, Sn, Zn, Fluorid	2
Spurenelemente Recipe (München, D) ClinChek® Control	Plasma	13	Organochlorverbindungen (DDE, DDT, HCB, HCH, 6 PCB, PCP)	2
<i>c) Vollblut</i>				
Sero AS (Billingstad, N) Seronorm®	Blut	17	Al, Sb, As, Be, Bi, Cd, Co, Cr, Pb, Mn, Mo, Hg, Ni, Se, Tl, V, Fluorid	3
Trace Elements Whole blood Bio Rad (München, D) Lyphochek®	Blut	1	Pb	3
Recipe (München, D) ClinChek® Control	Blut	9	Pb, Cd, Cr, Co, Ni, Hg, Mn, Se, Zn	3
Spurenelemente Recipe (München, D) ClinChek® Control	Blut	9	Organochlorverbindungen (DDE, γ -HCH, HCB, 6 PCB)	3

Tabelle 13-10 gibt eine Übersicht der derzeit zu Verfügung stehenden kommerziell erhältlichen Kontrollmaterialien. Diese Proben kommen lyophilisiert in den Handel und müssen vor der Verwendung rekonstituiert werden. Das Angebot für derartiges Kontrollmaterial hat sich in den vergangenen Jahren erheblich erweitert. Neben den seit langem verwendeten Materialien für die Analyse von Metallen in Blut, Serum, Plasma und Harn und den häufig analysierten Metaboliten von Lösungsmitteln im Urin wird immer häufiger auch Kontrollmaterial für aktuelle arbeits- und umweltmedizinisch relevante organische Parameter angeboten, z. B. Organochlorverbindungen im Serum, Alkylphosphate, PAH und Pyrethroidmetabolite im Harn. Das angebotene Spektrum an Kontrollmaterialien wird kontinuierlich erweitert und ermöglicht damit eine breite Anwendung für die gefächerte Qualitätssicherung in den arbeitsmedizinisch- und umweltmedizinisch-toxikologischen Laboratorien.

Für Analyten, die in kommerziell erhältlichen Kontrollproben nicht enthalten sind, können zur internen Qualitätssicherung selbst hergestellte Kontrollmaterialien verwendet werden. Tierblut bzw. Humanblut sowie Humanserum werden hierfür mit definierten Konzentrationen des Analyten versetzt. Das Kontrollmaterial wird aliquotiert und bis zur Analyse tiefgefroren gelagert. Homogenität und Lagerfähigkeit selbst hergestellten Kontrollmaterials sind durch den Anwender zu überprüfen.

Die Ergebnisse der täglichen internen Qualitätssicherung werden in Kontrollkarten eingetragen (Abb. 13-8) und mit der Standardabweichung der Methode für die Untersuchung des Kontrollmaterials verglichen. Die Standardabweichung der Methode wird in einer so genannten Vorperiode bestimmt, wobei Kontrollproben an 15 verschiedenen Arbeitstagen analysiert werden. Akzeptabel ist ein Ergebnis dann, wenn es nicht um mehr als das Dreifache dieser Standardabweichung vom Sollwert abweicht und über einen längeren Zeitraum keine Trends zu höheren oder niedrigeren Werten bestehen [3].

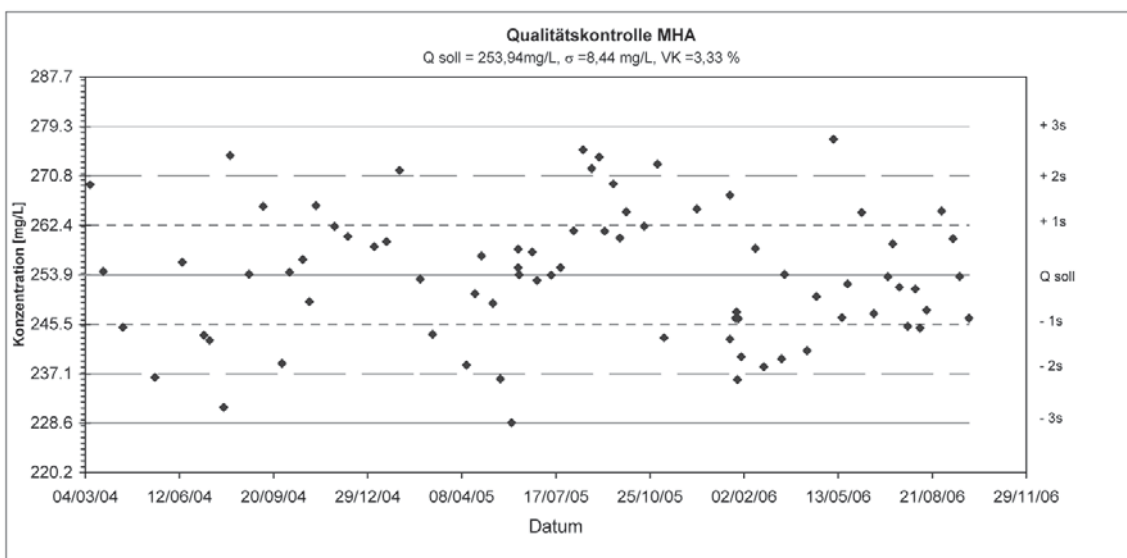


Abb. 13-8. Beispiel für eine Präzisionskontrollkarte für die Bestimmung von Methylhippursäuren in Urin

13.9.2 Externe Qualitätssicherung

Die laborexterne Qualitätssicherung auf der Basis von Ringversuchen (RV) wird zur objektiven Überwachung der Richtigkeit von Ergebnissen quantitativer Laboruntersuchungen unter Vergleichsbedingungen durchgeführt. Sie dient letztendlich der Verbesserung der Zuverlässigkeit von Laborergebnissen und der Vergleichbarkeit der Ergebnisse von Labor zu Labor sowie mit den arbeits- und umweltmedizinischen tolerierbaren Grenzwerten [28, 29, 30].

In Deutschland werden solche Ringversuche durch die einschlägigen Richtlinien der Bundesärztekammer geregelt, die in Zusammenarbeit mit der physikalisch-technischen Bundesanstalt erarbeitet wurden. Für den arbeitsmedizinischen Bereich sei auch auf die gemeinsame Bekanntmachung der DGAUM und des Verbandes deutscher Betriebs- und Werksärzte (VDBW) [31] verwiesen. Dementsprechend wird die Notwendigkeit einer externen Qualitätssicherung auch von der Kommission Humanbiomonitoring des Umweltbundesamtes [5] betont.

Nach den genannten Richtlinien sind die Ringversuchsleiter (Koordinatoren) verantwortlich für die Ankündigung, Organisation, Durchführung der Ringversuche sowie für die Auswertung der Ringversuchsergebnisse. Damit tragen die Ringversuchsleiter die wissenschaftliche Verantwortung für die Ringversuche, die von ihnen organisiert werden. Die Vorgehensweise bei der Durchführung der externen Qualitätssicherung sollte sich für jeden Parameter an folgender Grundstruktur orientieren:

- Der Koordinator organisiert die Herstellung, die Homogenitätstestung und Validierung des Kontrollmaterials.
- Der Koordinator verteilt die Kontrollproben nach einem veröffentlichten Zeitplan und lädt interessierte Laboratorien zum Ringversuch ein. Pro Jahr sind mindestens zwei Ringversuche durchzuführen, wobei für jeden Analyten zwei Ringversuchsproben mit unterschiedlicher Konzentrationseinstellung zu analysieren sind.
- Die Ringversuchsteilnehmer analysieren die Kontrollproben in einem vorgegebenen Zeitraum und übermitteln ihre Resultate zentral an die Ringversuchsleitung.
- Das Datenmaterial wird einer umfangreichen statistischen Analyse unterzogen.
- Die Sollwerte können einerseits durch Referenzlaboratorien ermittelt werden, andererseits können auch so genannte *consensus values* mit entsprechenden statistischen Verfahren errechnet werden. Beim Referenzlaboratorienmodell werden die Referenzlaboratorien anhand ihrer Qualifikation vom Ringversuchsleiter ernannt [29]. Die jeweils tolerierten Spannweiten für die Analyten (Toleranzbereiche) werden mit statistischen Methoden aus den Ergebnissen der Referenzlaboratorien (Sollwerte) oder der Ringversuchsteilnehmer (*consensus values*) errechnet.

- Auf der Basis von Sollwert und Toleranzbereich wird die individuelle Leistungsfähigkeit der Ringversuchsteilnehmer evaluiert.
- Die Ringversuchsteilnehmer werden über ihre Resultate im Vergleich zur Gesamtauswertung des Datenmaterials unterrichtet. Grafische Darstellungen, wie z. B. der *Youden-Plot*, erlauben eine Evaluierung der eigenen Resultate im Vergleich zu den gesamten Ringversuchsteilnehmern. Im Einzelfall können mögliche Maßnahmen zur Verbesserung der Ringversuchsergebnisse diskutiert werden.
- Der Koordinator kontrolliert regelmäßig die Leistungsfähigkeit und Richtigkeit des externen Qualitätskontrollsystems. Eine Erweiterung des Parameterspektrums auf der Basis des aktuellen wissenschaftlichen Erkenntnisstandes ist regelmäßig zu prüfen.

Externe Qualitätssicherungsprogramme demonstrieren objektiv den aktuellen analytischen Qualitätsstandard der Methoden des Biomonitorings. Sie zeigen auch, für welche Parameter die analytische Zuverlässigkeit verbessert werden muss. Die Bedeutung der analytischen Zuverlässigkeit der Ergebnisse des Biomonitorings und die rasante Entwicklung des Parameterspektrums haben zu einer zunehmenden Nachfrage für externe Qualitätssicherungsprogramme für das Biomonitoring geführt. Die Tabelle 13-11 zeigt eine aktuelle Übersicht der derzeit im internationalen Rahmen angebotenen externen Qualitätssicherungsprogramme.

Tab. 13-11. Externe Qualitätssicherungsprogramme.

Land	Blut	Urin	Serum/Plasma	Referenz
a) <i>Metalle und anorganische Verbindungen</i> Deutschland	Pb, Cd, Co, Cr, Ni, Mn, Hg	Al, Sb, As (anorganisch, gesamt, Spezies) Be, Cd, Cr, Co, Cu, Ni, Hg, Pb, Tl, V, Zn, Pt, Fluorid	Al, Cr, Co, Cu, Mn, Ni, Pt, Se, Zn	Institute and Outpatient Clinic for Occupational, Social and Environmental Medicine of the University of Erlangen-Nürnberg Schillerstraße 25 u. 29 D-91054 Erlangen www.G-EQUAS.de
Großbritannien	Cd, Pb, Mn, As, Hg, Mg, Zn	Cu, Cd, Zn, Fe, Hg, As, Co, Cr, Pb, Mn, Ni, Tl	Al, Cu, Se, Zn	Centre for Clinical Science and Measurement School of Biomedical and Molecular Sciences University of Surrey GB-GU27 XH Guildford www.surrey.ac.uk/sbms
Kanada	Cd, Pb, Hg	Pb, Cd, As, Hg, Cr, Se, Cu, Zn, Fluorid	Al, Mn, Cu, Se, Zn	Centre de Toxicologie, Institut National de Santé Publique du Québec, INSPQ 945, Avenue Wolfe Québec, G1V 5B3, Canada www.inspq.qc.ca
Niederlande	Cd, Co, Hg, Pb, Se, Tl	As, Cd, Co, Cu, Hg, Mg, Pb, Se, Tl, Zn	Al, Co, Cr, Cu, Li, Mg, Mn, Se, Zn	Streekziekenhuis Koningin Beatrix MCA Laboratorium Beatrixpark 1 NL-7101 BN Winterswijk www.skzi-mca.nl
USA	Pb, As, Hg, Cd, Protoporphyrin (Ery)	Pb, Cd, Hg, As, Be, Co, Cs, Ba, Tl, Mo, W, U, Sb, Pt, Al, Cr, Cu, Mn, Ni, Se, Sn, Te, V, Zn	Cu, Se, Zn, Al	New York State Department of Health Trace Elements Laboratory Wadsworth Center PO Box 509 Albany, New York 12201-0509 www.wadsworth.org/testing/lead/ptprogram.htm

<i>b) Organische Verbindungen</i>			
Deutschland			Institute and Outpatient Clinic for Occupational, Social and Environmental Medicine of the University of Erlangen-Nürnberg Schillerstrasse 25 u. 29 D-91054 Erlangen www.G-EQUAS.de
Benzol	δ-Aminolävulinsäure	p,p-DDT	
Toluol	Methanol	p,p-DDE	
Xylole	Aceton	HCB	
Ethylbenzol	Methylethylketon	α, β, γ-HCH	
Dichlormethan	Methylisobutylketon	PCB 28, 52, 101,	
1,2-Dichlorethan	Tetrahydrofuran	138, 153, 180	
Trichlorethen	Hippursäure	Pentachlorphenol	
Tetrachlorethen	1-Hydroxypyren	Perfluorooctansäure	
1,1,1-Trichlorethan	Mandelsäure	(PFOA)	
Tetrachlormethan	Methylhippursäuren	Perfluorooctansulfonat (PFOS)	
Hämoglobinaddukte:	t,t-Muconsäure		
N-Methylvalin	Phenol		
N-2-(Hydroxyethyl)-valin	Phenylglyoxylsäure		
N-2-(Cyanoethyl)-valin	S-Phenylmercaptursäure		
N-2-(Carbamoyl-ethyl)valin	Trichloressigsäure		
	o-Kresol		
	2-Thiothiazolidin-4-carbonsäure		
	Methoxyessigsäure		
	Ethoxyessigsäure		
	Butoxyessigsäure		
	N-Methylformamid		
	2,5-Hexandion		
	NMP-Metabolite		
	(5-Hydroxy-N-Methylpyrrolidon, 2-Hydroxy-N-Methylsuccinimid)		
	Methylendianilin		
	Kreatinin		
	Pyrethroid-Metabolite (Br ₂ -CA, cis-Cl ₂ -CA, trans-Cl ₂ -CA, 3-PBA)		

Tab. 13-11. Fortsetzung.

Land	Blut	Urin	Serum/Plasma	Referenz
Kanada		2,5-Dichlorphenol 2,4,6-Trichlorphenol Pentachlorphenol Alkylphosphate (DMP, DMTP, DMDTP, DEP, DETP, DEDTP) Cotinin, Nicotin Phthalat-Metabolite: (5-OH-MEHP, 5-oxo- MEHP, 5-cx-MEPP, MnBP) 1-Naphthol, 2-Naphthol	PCB 28, 74, 99, 105 118, 138, 153, 170, 180 β-HCH p,p'-DDE, p,p'-DDT HCB trans-Nonachlor Oxychlorane PBDE No. 28, 47, 99, 100, 153, 183, 209 Toxaphene Parlar No. 26, 50 PFOA, PFOS Serumlipide	Centre de Toxicologie, Institut National de Santé Publique du Québec, INSPQ 945, Avenue Wolfe Québec, G1V 5B3, Canada www.inspq.qc.ca

13.10 Zusammenfassung

Die in diesem Kapitel dargestellten und mit Beispielen versehenen Zuverlässigkeitskriterien sind ein essentieller Bestandteil der Methodenbeschreibungen in der vorliegenden Loseblatt-Sammlung. Sie werden sowohl im Rahmen der Methodenvalidierung als auch in der praktischen Prüfung durch den Autor bzw. den Prüfer untersucht und dokumentiert. Von verschiedenen Organisationen, Behörden oder wissenschaftlichen Expertengremien (z.B. IUPAC, EURACHEM, Bundesärztekammer, Umweltbundesamt, Gesellschaft für Toxikologische und Forensische Chemie, etc.) sind bereits sehr weit elaborierte und mathematisch-statistisch fundierte Konzepte und Vorgaben bezüglich der Methodenvalidierung mitgeteilt worden, auf die im vorliegenden Kapitel häufig Bezug genommen wurde. Die unterschiedlichen wissenschaftlichen und kommerziellen Vorgaben, Rahmenbedingungen und Ziele der Anwender im Bereich des arbeits- und umweltmedizinischen Biomonitorings lassen jedoch derzeit strikt vereinheitlichte Detailvorgaben hinsichtlich der Methodenvalidierung für den Arbeitskreis „Analysen in biologischem Material“ nicht als praktikabel und sinnvoll erscheinen. Die vorliegende Zusammenfassung der Zuverlässigkeitskriterien soll daher Autoren, Prüfern, Anwendern und Lesern der Loseblatt-Sammlung als aktualisiertes Kompendium und als Anstoß für eine kontinuierliche Auseinandersetzung mit allen Aspekten der laborinternen und -externen Qualitätssicherung dienen.

13.11 Literatur

- [1] *U. Ewers, M. Kramer, H. Körting*: Diagnostik der inneren Exposition (Human-Biomonitoring). In: H.E. Wichmann, H.W. Schlipkötter, G. Fülgraff (Hrsg.): Handbuch Umweltmedizin, 2. ergänzte Lieferung. ecomed Verlagsgesellschaft, Landsberg (1993).
- [2] *K.H. Schaller, J. Angerer, H. Drexler*: Biomonitoring in der Arbeitsmedizin – Übersicht zur Durchführung und Bewertung arbeitsmedizinisch-toxikologischer Untersuchungen. In: J. Konietzko, H. Dupuis, S. Letzel (Hrsg.): Handbuch der Arbeitsmedizin, 35. ergänzte Lieferung. ecomed Verlagsgesellschaft, Landsberg (2004).
- [3] *Bundesärztekammer*: Richtlinie der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen. Dtsch. Ärztebl. 7, A341–A355 (2008).
- [4] *H. Drexler (Hrsg.)*: Biologische Arbeitsstoff-Toleranzwerte (BAT-Werte), Expositionsäquivalente für krebserzeugende Arbeitsstoffe (EKA) und Biologische Leitwerte (BLW), Allgemeine Vorbemerkungen, 9. Lieferung. Wiley-VCH, Weinheim (2000).
- [5] *Kommission Human-Biomonitoring des Umweltbundesamtes*: Qualitätssicherung beim Human-Biomonitoring. Bundesgesundhbl. 6, 216–221 (1996).
- [6] *Kommission Human-Biomonitoring des Umweltbundesamtes*: Aktualisierung des Referenzwertes für Pentachlorphenol im Morgenurin. Bundesgesundhbl. 5, 499–502 (2004).
- [7] *DIN EN 829*: In-vitro-Diagnostik/Diagnostika – Transportverpackungen für medizinisches und biologisches Untersuchungsgut – Anforderungen, Prüfungen. Beuth Verlag, Berlin (1996).
- [8] *M. Bader, J. Müller, J. Angerer*: Untersuchungen zum Einfluß von Probenahme und -lagerung auf die Ergebnisse der Headspace-Analyse flüchtiger organischer Verbindungen. In:

- R. Kessel (Hrsg.): 34. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Arbeitsmedizin und Umweltmedizin (DGAUM), S. 361. Gentner Verlag, Stuttgart (1994).
- [9] *Kommission der Europäischen Gemeinschaften (EC)*: Entscheidung der Kommission vom 12. August 2002 zur Umsetzung der Richtlinie 96/23/EG des Rates betreffend die Durchführung von Analysenmethoden und die Auswertung von Ergebnissen (2002/657/EG). Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften L 221/8 vom 17. 8. 2002.
- [10] *H.M. Koch, J. Müller, J. Angerer*: Determination of secondary, oxidised di-isononylphthalate (DINP) metabolites in human urine representative for the exposure to commercial DINP plasticizers. *J. Chrom. B* 847, 114–125 (2007).
- [11] *S.E. Baker, A.O. Olsson, L.L. Needham, D.B. Barr*: High-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for quantifying sulfonylurea herbicides in human urine: reconsidering the validation process. *Anal. Bional. Chem.* 383, 963–976 (2005).
- [12] *DIN 32 645*: Chemische Analytik; Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze; Ermittlung unter Wiederholbedingungen; Begriffe, Verfahren, Auswertung. Beuth Verlag, Berlin (2008).
- [13] *EURACHEM*: The fitness for purpose of analytical methods – A laboratory guide to method validation and related topics. (www.eurachem.org/guides/valid.pdf) (1998).
- [14] *F. Jongeneelen, R.B.M. Anzion*: 1-Hydroxypyrene. In: J. Angerer, K.H. Schaller (Hrsg): *Analysen in biologischem Material, Loseblattsammlung, 11. Lieferung*. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim (1994).
- [15] *B.N. Colby, M.W. McCaman*: A comparison of calculation procedures for isotope dilution determinations using gas chromatography mass spectrometry. *Biomed. Mass. Spectrom.* 6, 225–230 (1979).
- [16] *W. Funk, V. Dammann, G. Donnevert*: *Qualitätssicherung in der Analytischen Chemie*. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim (1992).
- [17] *ISO 5725-1*: Genauigkeit (Richtigkeit und Präzision) von Meßverfahren und Meßergebnissen – Teil 1: Allgemeine Grundlagen und Begriffe. Beuth Verlag, Berlin (1997).
- [18] *DIN 55350*: Teil 13, Begriffe der Qualitätssicherung und Statistik; Begriffe zur Genauigkeit von Ermittlungsverfahren und Ermittlungsergebnissen, Beuth Verlag, Berlin (1987).
- [19] *R.E. Kaiser, J.A. Mühlbauer*: *Elementare Tests zur Beurteilung von Messdaten*. B.I. Wissenschaftsverlag, Mannheim (1983).
- [20] *Institute for Reference Materials and Measurements (IRMM)*: *Certified Reference Materials 2006*. Geel (2006).
- [21] *National Institute of Standard and Technology (NIST)*: *Standard Reference Materials*. In: <https://srms.nist.gov>. Gaithersburg, MD (2006).
- [22] *G. Scherer, M. Urban*: S-(3-Hydroxypropyl)mercaptursäure (HPMA). In: J. Angerer, K.H. Schaller (Hrsg): *Analysen in biologischem Material, Loseblattsammlung, 19. Lieferung*. Wiley-VCH, Weinheim (2009).
- [23] *DIN EN ISO/IEC 17025*: Allgemeine Anforderungen an die Kompetenz von Prüf- und Kalibrierlaboratorien. Beuth Verlag, Berlin (2005).
- [24] *International Organization for Standardization (ISO)*: *Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement (GUM)*. ISBN 92-67-10188-9, Geneva (1995).
- [25] *B. Magnusson, T. Näykki, H. Hovind, M. Krysell*: *Handbook for Calculation of Measurement Uncertainty in Environmental Laboratories*. Nordtest, Espoo, Finland (2003).
- [26] *S.L.R. Ellison, R. Rösslein, A. Williams (Hrsg.)*: *EURACHEM / CITAC Leitfaden: Ermittlung der Messunsicherheit bei analytischen Messungen*. In: www.eurolab-d.bam.de (2004).
- [27] *K.H. Schaller, J. Angerer, H. Drexler*: Quality assurance of biological monitoring in occupational and environmental medicine. *J. Chrom. B* 778, 403 (2002).

- [28] *A. Aitio*: Quality Assurance, Chapter 2. In: M.I. Mikheev (Hrsg.): Biological Monitoring of Chemical Exposure in the Workplace – Guidelines, Vol. 1, S. 20–51. World Health Organization (WHO), Geneva (1996).
- [29] *J. Angerer, K.H. Schaller, D. Weltle, Th. Göen*: Externe Qualitätssicherung arbeits- und umweltmedizinisch toxikologischer Analysen. *Arbeitsmed. Sozialmed. Umweltmed.* 30, 191–203 (1995).
- [30] *G. Lehnert, K.H. Schaller, J. Angerer*: Report on the status of the external quality-control programs for occupational-medical and environmental-medical toxicological analyses in biological materials in Germany. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 72, 60 (1999).
- [31] *Deutsche Gesellschaft für Arbeitsmedizin und Umweltmedizin (DGAUM), Verband deutscher Betriebs- und Werksärzte (VDBW)* (Hrsg.): Anforderungen an die Qualitätssicherung arbeitsmedizinisch-toxikologischer Analysen in biologischem Material (Biomonitoring). *Arbeitsmed. Sozialmed. Umweltmed.* 33, 10 (1998).

Autoren: *M. Bader, D. Barr, Th. Göen,
K.H. Schaller, G. Scherer, J. Angerer*

13.12 Glossar

Bestimmungsgrenze	(engl.: <i>limit of quantification/quantitation, LOQ</i>) die kleinste Konzentration eines Analyten, die quantitativ mit einer definierten Standardabweichung erfasst werden kann (i. d. R. 33,3%) (auch: untere Bestimmungsgrenze; engl.: <i>lower limit of quantification/quantitation, LLOQ</i>).
Einflussfaktor	(engl.: <i>influencing factor</i>) Faktoren, die den Untersuchungsparameter <i>in vivo</i> , d. h. vor der Probenahme, verändern.
Erfassungsgrenze	(engl.: <i>limit of identification</i>) die kleinste Konzentration eines Analyten, die mit einem α -Fehler und einem β -Fehler von jeweils 50% erfasst werden kann.
Genauigkeit	(engl.: <i>accuracy</i>) Maß für die Abweichung eines Messwertes vom „wahren“ Wert aufgrund systematischer und zufälliger Fehler, in der Regel als \pm Prozentangabe.
Linearität	(engl.: <i>linearity</i>) Konzentrationsbereich, in dem Messsignal und Analytenkonzentration einander proportional sind und der sich am besten durch eine lineare Anpassung beschreiben lässt (Nachweis mittels Mandel-Test nach Elimination von Ausreißern). Der Linearitätsbereich entspricht i. d. R. dem Arbeitsbereich (engl.: <i>range</i>) eines Analysenverfahrens.
Messunsicherheit	(engl.: <i>uncertainty</i>) Gesamt-Vertrauensintervall oder Streubereich des Messergebnisses nach Berücksichtigung möglicher Fehlerquellen. Die Standard-Messunsicherheit entspricht der Standardabweichung einer Messreihe; die kombinierte Standard-Messunsicherheit schließt alle Arbeitsschritte, Störgrößen und Einflussfaktoren sowie deren gegenseitige Beeinflussung ein; die erweiterte Messunsicherheit schließt die Funktion eines Vertrauensintervalls mit ein.
Nachweisgrenze	(engl.: <i>limit of detection, LOD</i>) die kleinste Konzentration eines Analyten, die qualitativ noch erfasst werden kann und damit das Vorhandensein des Analyten anzeigt. Der α -Fehler (falsch positive Identifizierung) beträgt 1%, der β -Fehler (falsch negative Identifizierung) beträgt 50%. Die Nachweisgrenze kann sich auf eine absolute Menge (z. B. zur Beschreibung der gerä-

	tebedingten Nachweisgrenze) oder auf die in der Probe vorliegende Analytenkonzentration (z.B. zur Beschreibung der verfahrensbedingten Nachweisgrenze) beziehen.
Präzision	(engl.: <i>precision</i>) Maß für die Streuung des Messwertes (Mittelwert) aufgrund zufälliger Fehler; Angabe als absolute oder relative Standardabweichung oder Konfidenzintervall.
Richtigkeit	(engl.: <i>accuracy of the mean, trueness</i>) Maß für die Abweichung eines Messwertes vom „wahren“ Wert aufgrund systematischer Fehler (im Englischen wird für die Beschreibung des systematischen Fehlers auch der Ausdruck <i>bias</i> verwendet).
Robustheit	(engl.: <i>ruggedness, robustness</i>) die (Un)empfindlichkeit eines Analysenverfahrens gegenüber Variationen der äußeren Arbeitsbedingungen oder einzelner Arbeitsschritte.
Rückführbarkeit	(engl.: <i>traceability</i>) kennzeichnet ein Analyseergebnis, das sich durch eine ununterbrochen dokumentierte Kette von Arbeitsschritten und Vergleichsmessungen mit bekannter Messunsicherheit auf einen anerkannten Standard beziehen lässt.
Spezifität	(engl.: <i>specificity</i>) die Fähigkeit eines Verfahrens, den Analyten ohne Störungen durch andere Matrixkomponenten zu erfassen und eindeutig zu identifizieren. Der Begriff <i>Selektivität</i> (engl.: <i>selectivity</i>) wird häufig synonym verwendet.
Störgröße	(engl.: <i>interference factor</i>) verändert den Untersuchungsparameter <i>in vitro</i> , d. h. nach der Probenahme.
Vergleichspräzision	(engl.: <i>reproducibility</i>) Präzision einer Messung unter Vergleichsbedingungen in verschiedenen Laboren (identische Messbedingungen: Material).
Wiederfindung	(engl.: <i>recovery</i>) Verhältnis zwischen gemessenem Wert und Erwartungswert für einen Analysenparameter nach Anwendung eines oder mehrerer Arbeitsschritte (auch: Wiederfindungsrate, Ausbeute). Ein Spezialfall ist die <i>relative Wiederfindung</i> , die durch Aufstockungsexperimente bestimmt wird.

Wiederholpräzision

(engl.: *repeatability*)

Präzision einer Messung unter Wiederholbedingungen in einem Labor (identische Messbedingungen: Material, Labor, Bearbeiter, Chemikalien, Geräte) in kurzen Zeitabständen. Spezialfälle: *Präzision in der Serie* (engl.: *intra-assay/intra-day repeatability*) und Präzision von Tag zu Tag (engl.: *inter-assay/inter-day repeatability*).