

Lineare Kalibrationsfunktionen

Dr. Volkmar Neitzel, Ruhrverband, Leiter Zentrale Aufgaben, Essen

Der größte Teil analytischer Messverfahren geht von einer Urprobe aus, die nach einer Probenvorbereitung eine Messprobe ergibt, aus der das Analysengerät unmittelbar Messwerte wie z. B. Extinktionen, Impulse pro Zeit, Peakflächen, Stromstärken oder Spannungen liefert. Aus diesen sind gemäß einer Auswertevorschrift — mit Hilfe mathematisch-statistischer Werkzeuge — die Analyseergebnisse (z. B. Konzentrationen) zu berechnen. Die Auswertevorschrift erhält man, indem man einen Zusammenhang zwischen Messwerten und Analyseergebnissen herleitet. Dieser Vorgang wird als Kalibration oder Kalibrierung bezeichnet. Fälschlicherweise taucht dafür in mancher Literatur auch der Begriff Eichung auf. Obwohl in beiden Fällen die Abhängigkeit der Anzeige eines Messgerätes von der zu messenden Größe durch Vergleich mit bereits bekannten Werten bestimmt wird, dürfen nur hierfür autorisierte Behörden eichen, während die Kalibration zum Laboralltag gehört.



Der Zusammenhang zwischen den Messwerten und den daraus zu berechnenden Analyseergebnissen kann linear sein - meist ist er das auch -, es kommen aber auch nicht lineare Zusammenhänge vor. Weiterhin gibt es in der Praxis Messverfahren, bei denen die Werte am oberen und unteren Ende des Messbereichs in vergleichbarer Weise streuen - dies ist der Idealfall - oder am oberen Ende deutlich größere Schwankungen aufweisen, als am unteren.

Im Rahmen der Kalibration werden Leistungsmerkmale des betreffenden Messverfahrens ermittelt. Hierzu gehören unter anderem auch die Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze.

Dennoch behandeln die bestehenden Normen beide verwandten Aspekte nicht gemeinsam.

Der vorliegende Artikel beschäftigt sich mit diesem für die Laborarbeit sehr wichtigen Thema. Im ersten Teil wird der einfache lineare Zusammenhang erörtert und derzeit geltende Normen werden vorgestellt. Der zweite Teil geht auf den nicht linearen Fall ein, während in Teil 3 Sonderfälle behandelt werden. Neben der Kalibration wird auch die Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze angesprochen.

■ Theorie linearer Kalibrationsfunktionen

Bei einem Großteil der in Laboren verwendeten Messverfahren besteht - zumindest in gewissen Grenzen - ein linearer Zusammenhang zwischen den Werten, die eine Messanordnung liefert (z. B. den Peakflächen in einem Chromatogramm), und den Größen, die es zu bestimmen gilt (z. B. Konzentrationen). Sofern bestimmte Randbedingungen erfüllt werden, eignet sich die lineare Regression als mathematisches Werkzeug, um den Zusammenhang zu quantifizieren. Das Rechenverfahren darf aber nur verwendet werden, wenn tatsächlich eine lineare Beziehung zwischen Messwerten und Gehaltsgrößen besteht und am oberen und unteren Ende der Kalibrationsfunktion eine im statistischen Sinn vergleichbare Streuung wiederholt gemessener Werte vorliegt. Man spricht dann von Varianzhomogenität.

Die DIN 38402 Teil 51 [1] sieht vor, zwischen einem kleinsten und größten Messwert mindestens 5, besser zehn äquidistante (gleichweit auseinander liegende) bekannte Gehalte zu vermessen. Zusätzlich sind sowohl der kleinste als auch der größte Gehalt

zehnfach zu bestimmen, um einen F-Test hinsichtlich der Varianzhomogenität durchführen zu können. Aus den jeweils zehn Werten der Wiederholmessungen lässt sich eine Varianz V gemäß:

$$V = \frac{\sum (Y_i - \bar{Y})^2}{N - 1}$$

berechnen, wobei \bar{Y} der Mittelwert aus den Wiederholmessungen ist und N die Anzahl der Werte. Teilt man die größere der beiden Varianzen durch die kleinere, erhält man eine Zahl größer als eins. Ist diese kleiner als ein Tabellenwert der F-Verteilung, er beträgt 5,35 bei jeweils zehn Messwerten und 99 % statistischer Sicherheit, sind die Streuungen homogen, also vergleichbar. Nur in diesem Fall ist die lineare Regression zulässig. Als Kunstgriff kann man in der Praxis den Messbereich soweit einengen, bis eine Varianzhomogenität vorliegt.

Um die Linearität des Zusammenhangs zu prüfen ist ein Polynom 1. Grades (linear) und 2. Grades (gekrümmt) an die Messdaten anzupassen und der Test nach Mandel durchzuführen. Beim Test nach Mandel zur Prüfung auf Linearität wird vereinfacht ausgedrückt eine lineare und eine quadratische Funktion an die Kalibrierdaten angepasst und für beide Varianten jeweils die Summe der Abweichquadrate berechnet.

In einem zweiten Schritt führt man einen F-Test durch, indem die Differenz dieser Summen durch die Restvarianz aus der quadratischen Anpassung geteilt und der so erhaltene Wert mit dem Tabellenwert der F-Verteilung verglichen wird. Ist er kleiner als der Tabellenwert, liegt eine Linearität vor. Ergibt dieser keinen signifikanten

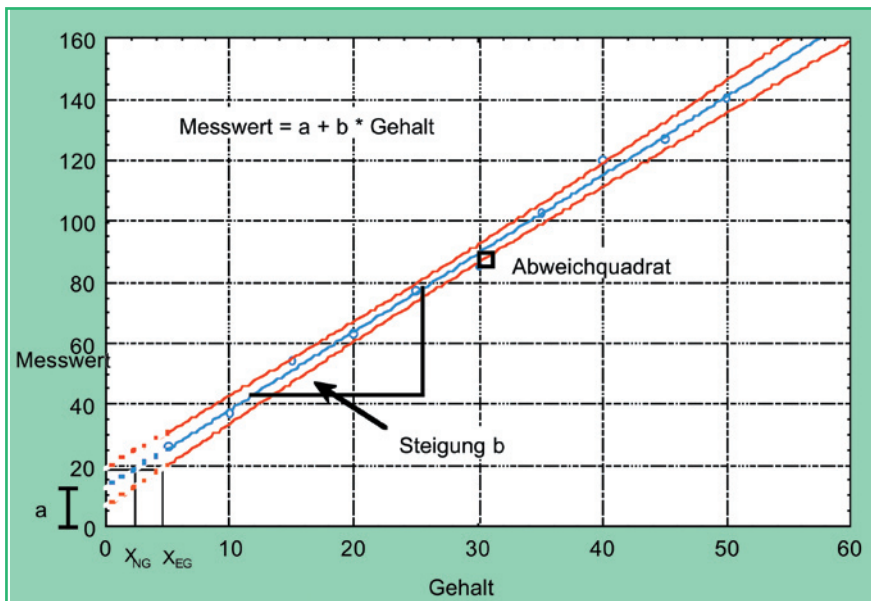


Abb. 1:
Lineare Kalibration mit Nachweis- und Erfassungsgrenze

Unterschied zwischen den Reststreuungen beider Funktionen (mittlere Abweichquadrate zwischen Messpunkten und Ausgleichsfunktion), kann die lineare Regression verwendet werden. Details zu dem Thest findet man in [1] und [2]. In Abb. 1 ist das Ergebnis dieses mathematischen Verfahrens in grafischer Form dargestellt.

Mit Hilfe der linearen Regression wird eine Gerade berechnet, bei der die Summe der quadratischen Abweichungen zwischen Messpunkten und Ausgleichsfunktion kleinstmöglich ist. Dabei wird angenommen, dass nur die Messwerte, nicht jedoch die Gehaltsgrößen fehlerhaft sind. Da die Messpunkte nicht exakt auf der Geraden liegen, ist dies auch nicht von zukünftigen Werten anzunehmen. Daher gibt es ein Prognoseintervall (rote Linien in Abb. 1), dessen Breite vom Ausmaß der Abweichungen zwischen Messpunkten und Ausgleichsfunktion sowie von der statistischen Sicherheit abhängt.

Zu den wichtigsten Größen, die sich mit Hilfe der linearen Regression aus den Messpunkten ergeben, gehören

- der Ordinatenabschnitt a (er entspricht einem Leerwert),
- die Steigung b (sie charakterisiert die Empfindlichkeit des Messverfahrens, denn je größer die Steigung ist, desto größer ist auch die Empfindlichkeit),

- der Korrelationskoeffizient (er ist ein Maß für die Güte des linearen Zusammenhangs),
- die Reststandardabweichung (sie ist ein Maß für die Streuung der Messpunkte um die Ausgleichsgerade),
- die Verfahrensstandardabweichung und der Verfahrensvariationskoeffizient (es sind absolute und relative verfahrensspezifische Streumaße).

Der Messbereich, der zwischen dem kleinsten und dem größten Kalibrationspunkt liegt, ist der vorläufige Arbeitsbereich. Nur in diesem sind Messwerte „gesichert“ und zulässig. Am oberen und unteren Ende weitet sich das Prognoseintervall, d. h. der Messfehler wird hier zunehmend größer. Die höchste Präzision liegt in der Mitte des Arbeitsbereichs vor.

Die Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze

Obwohl das untere Ende des Messbereichs durch die Bestimmungsgrenze (und nicht durch den kleinsten Kalibrationspunkt) festgelegt wird, behandelt die DIN 38402 Teil 51 diesen Aspekt nicht. Hiermit setzt sich aber eine andere Norm, die DIN 32645 [3], auseinander. Wichtig ist, dass sie nur für lineare Kalibrationsfunktionen gilt. Im Teil 2 dieses Artikels wird

eine (nicht genormte) Vorgehensweise für nicht lineare Zusammenhänge vorgestellt.

Jeder Messwert ist mit einem Fehler behaftet. Am oberen Ende des Arbeitsbereichs ist dieser klein im Verhältnis zum Messwert selbst. Zur Mitte des Arbeitsbereichs hin werden die Werte kleiner, aber auch die Fehler, die in Abb. 1 als Prognoseintervall dargestellt sind. In Richtung noch kleinerer Messwerte vergrößert sich der Fehler wieder und wird schließlich so groß, wie die Analysenwerte selbst. Aus diesem Grund gibt es eine untere Grenze, ab der quantitative Analysenergebnisse nicht mehr angegeben werden können. Bei einer genauen Betrachtung des Sachverhalts unterscheidet man zwischen einer Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze.

Viele Messverfahren erlauben es, Leerproben zu messen. Dabei handelt es sich um (ggf. matrixbehaftete) Proben, die die zu analysierende Komponente nicht enthalten, sonst aber genauso behandelt und gemessen werden, wie jede andere Probe. Leerproben können Messwerte erzeugen, die ein Analysenergebnis vortäuschen. Bei der in der DIN 32645 beschriebenen direkten Methode stützt man sich zur Berechnung der Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze auf die Leerwerte. Alternativ hierzu ist auch eine indirekte Methode zulässig, bei der die Regressionsgerade auf die Messwertachse extrapoliert wird und hier einen dem Leerwert adäquaten Ordinatenabschnitt erzeugt. Bei signifikanten Differenzen zwischen der direkten und indirekten Methode hat die direkte, auf Leerwerte basierende, Vorrang.

In Abb. 2 ist die Vorgehensweise der indirekten Methode grafisch dargestellt. Die auf die Messwertachse verlängerte Kalibrationsgerade ergibt einen Schnittpunkt a , dessen Größe im Idealfall mit dem Mittelwert der Leerwerte übereinstimmt. Verlängert man die Grenzen des Prognoseintervalls ebenfalls auf die Messwertachse, spannt sich auf dieser Achse eine Normalverteilung auf, die im Idealfall der Streuung der Leerwerte entspricht. Das Prognoseintervall (in Y-Richtung) PI berechnet sich gemäß

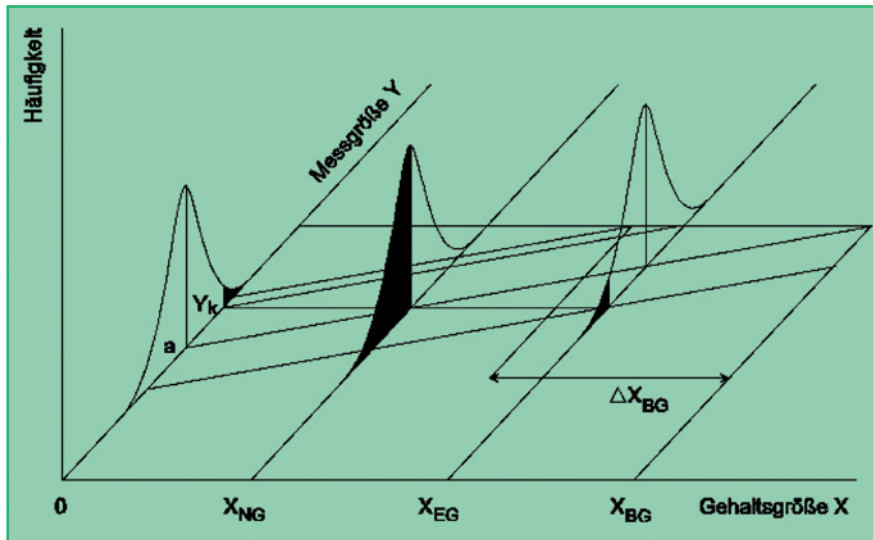
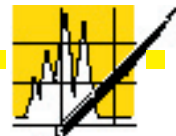


Abb. 2: Darstellung der Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze

$$PI = \pm s_0 \cdot t_{fx} \cdot \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{\bar{X}^2}{\sum (X_i - \bar{X})^2}}$$

Hierin sind s_0 die Verfahrensstandardabweichung, t der Tabellenwert der t-Verteilung, der sowohl von der Anzahl der Kalibrationspunkte, als auch von der statistischen Sicherheit abhängt, m die Zahl der Kalibrationspunkte X_i , n die Zahl der Wiederholmessungen und \bar{X} der Mittelwert über alle X_i .

Die DIN 32645 überlässt es dem Anwender, das Signifikanzniveau (die statistische Sicherheit) des Prognoseintervalls festzulegen. Als üblich werden 5 % oder 1 % Irrtumswahrscheinlichkeit angegeben. Für 10 Kalibrierpunkte bedeutet dies einen t-Wert von 1,86 bei 5 % Irrtumswahrscheinlichkeit und einen von 2,9 bei 1 % Irrtumswahrscheinlichkeit. Es liegt auf der Hand, dass bei 5 % Irrtumswahrscheinlichkeit engere Prognoseintervalle vorliegen und damit kleinere Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenzen resultieren.

Die Werte der t-Verteilung hängen auch davon ab, ob eine einseitige oder zweiseitige Fragestellung vorliegt. Einseitig ist sie z. B. dann, wenn es darum geht, ob ein Wert größer als eine Grenze ist. Wird aber gefragt, ob ein Wert größer als eine untere und kleiner als eine obere Grenze ist, liegt eine zweiseitige Fragestellung vor.

Bei einer 5 %igen Irrtumswahrscheinlichkeit beträgt der t-Wert 1,86 bei einer einseitigen und 2,31 bei einer zweiseitigen Fragestellung. Dieser Unterschied ist wichtig bei der Berechnung der Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenzen.

Die Verteilung der Leerwerte oder das Prognoseintervall der extrapolierten Kalibrationsgeraden an der Stelle $X=0$ ergeben einen oberen Messwert Y_k , der z. B. von 95 % aller Leerwerte unterschritten (weißes Feld) und 5 % überschritten wird (schwarzes Feld), sofern 5 % Irrtumswahrscheinlichkeit angenommen werden. Folgt man der Kalibrationsgeraden zu höheren Gehalten hin, so gibt es eine weitere Verteilung an der Stelle X_{NG} , bei der 50 % den Messwert Y_k unterschreiten (schwarzes Feld) und 50 % überschreiten (weißes Feld). An dieser Stelle sind nur qualitative Aussagen möglich, d. h. man kann nur sagen, ob eine untersuchte Substanz vorhanden ist, oder nicht. Hier liegt die Nachweisgrenze vor.

Da danach gefragt wird, ob der Gehalt in einer Probe größer ist, als in den meisten Leerwerten (zum Beispiel 95 %), liegt eine einseitige Fragestellung vor, was in dem Tabellenwert der t-Verteilung zu berücksichtigen ist.

Zu noch höheren Gehalten hin gibt es eine weitere Verteilung von Messwerten, die nur zu einem geringen Teil von z. B. 5 % (schwarzes Feld) den Wert Y_k unterschreitet. Ab dieser Stelle, der Erfassungsgrenze, sind im Prin-

zip quantitative Aussagen bzw. Analysenergebnisse möglich. Auch hier gilt das einseitige Prognoseintervall zur Ermittlung der Erfassungsgrenze. Die Erfassungsgrenze ist bei linearen Kalibrationsfunktionen und gleichen Irrtumswahrscheinlichkeiten doppelt so hoch, wie die Nachweisgrenze.

In der Praxis wird eine kleinste Gehaltsangabe benötigt, deren relative Unsicherheit den Anforderungen des Anwenders zu genügen hat. Dies kann im Einzelfall die Erfassungsgrenze sein, in der Regel wird aber ein größerer Wert (mit geringerer relativer Unsicherheit als bei der Erfassungsgrenze) benötigt, den man als Bestimmungsgrenze bezeichnet. Hierzu schaut man nicht auf die Achse der Messwerte, sondern auf die der Gehalte. Die halbe Breite des Prognoseintervalls in X-Richtung (ΔX_{BG}) ist eine wichtige Grundgröße, um die Bestimmungsgrenze festzulegen. Es ist zu beachten, dass der t-Wert des Prognoseintervalls hier für eine zweiseitige Fragestellung gilt. Wie aus Abb. 2 hervorgeht, ist das Intervall breiter als für die einseitige Fragestellung. Die Breite des halben Prognoseintervalls ΔX_{BG} wird mit einem Faktor k multipliziert, den der Anwender selbst bestimmen kann. Empfohlen wird in der DIN 32645 ein Wert von 3, da dann die relative Ergebnisunsicherheit 33 % beträgt. Es ist nur wichtig, dass die Bestimmungsgrenze oberhalb der Erfassungsgrenze und unterhalb des kleinsten Kalibrationspunktes liegt.

Die DIN 32645 setzt eine lineare Kalibrationsfunktion voraus, Varianzenhomogenität am oberen und unteren Ende des Arbeitsbereichs und normalverteilte Messwerte. In der Praxis kommen aber auch nicht lineare Fälle vor. Auf sie sind die DIN 38402 Teil 51 sowie die DIN 32645 nicht anwendbar. Hierauf wird in Teil 2 des Artikels eingegangen. Leser, die an den Formeln zur Kalibration, Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenzen interessiert sind, sollten sich

grenze interessiert sind, mögen diese den Normen entnehmen.

Praxisbeispiel zur linearen Kalibration

Für das nachfolgend aufgeführte praktische Beispiel zur Kalibration einschließlich der Nachweis-, Erfassungsgrenze und Bestimmungsgrenze wurde eine Excel-Anwendung erstellt, die die relevanten Kenndaten der Kalibration berechnet. Dies kann wahlweise für 95 % oder 99 % sta-

tistische Sicherheit erfolgen. Weiterhin wird sowohl der lineare als auch der nicht lineare Fall durchgerechnet und geprüft, welcher der Realität am nächsten kommt. Die Anwendung ist für fünf oder zehn Kalibrationspunkte geeignet.

Bei dem Beispiel handelt es sich um die fotometrische Bestimmung einer Komponente im unteren Messbereich eines Fotometers und weist daher eine verhältnismäßig große Streuung auf. In Abb. 3 ist die lineare

Kalibrationsfunktion gemeinsam mit dem Prognoseintervall dargestellt.

Abb. 4 zeigt für die gleichen Messpunkte des Beispiels eine nicht lineare Kalibrationsfunktion mit Prognoseintervall. Die Anpassung an die Daten ist kaum besser und die Nachweis-, Erfassungsgrenze und Bestimmungsgrenze aufgrund des breiteren Prognoseintervalls größer. Wegen der Krümmung der Kalibrationsfunktion ist der Schnittpunkt mit der Extinktionsachse negativ, was im Widerspruch zum Leerwert steht.

Es ist bemerkenswert, dass die Bestimmungsgrenze höher liegt, als der kleinste Messwert. Aus diesem Grund muss die Kalibration mit neuen, höheren Werten wiederholt werden. Die kleinste Konzentration, die zur Kalibration genommen werden kann, muss über der Bestimmungsgrenze liegen. Es kann allerdings vorkommen, dass im zweiten Kalibrationslauf größere Streuungen mit entsprechend höherer Bestimmungsgrenze auftreten und der angehobene untere Messpunkt wieder unterhalb der Bestimmungsgrenze liegt. In Tab. 1 sind die Rohdaten und Kenngrößen zum aufgeführten Beispiel zusammengestellt.

Die lineare Kalibrationsfunktion gehorcht der Gleichung $\text{Extinktion} = 0,0071 + 0,0066 \cdot \text{Konzentration}$. Das Bestimmtheitsmaß als Quadrat des Korrelationskoeffizienten ist mit 0,9769 verhältnismäßig klein, was aber im Einklang mit den weiten Prognoseintervallen steht. Da das Polynom 2. Grades keine signifikant bessere Anpassung an die Kalibrationspunkte ergibt, liegt eine Linearität vor. Weiterhin sind die Varianzen am oberen und unteren Ende des Arbeitsbereichs homogen. Dies gilt auch für die Varianz der Leerwerte und derjenigen des unteren Kalibrationspunktes. Aufgrund der Auswertung lässt sich sagen, dass ein linearer Zusammenhang vorliegt, der auch mittels der linearen Regression berechnet werden kann. Da die Bestimmungsgröße höher liegt, als der untere Kalibrationspunkt, muss die gesamte Kalibration mit höheren Gehalten wiederholt werden.

Literatur

[1] DIN 38402 Teil 51: Kalibrierung von Analyseverfahren, Auswertung von Analyseergebnissen und lineare Kalibrierfunktionen für die Bestimmung von Verfahrenskenngrößen, Mai 1986

[2] Funk, W., Dammann, V. und Donnevert, G.: Qua-

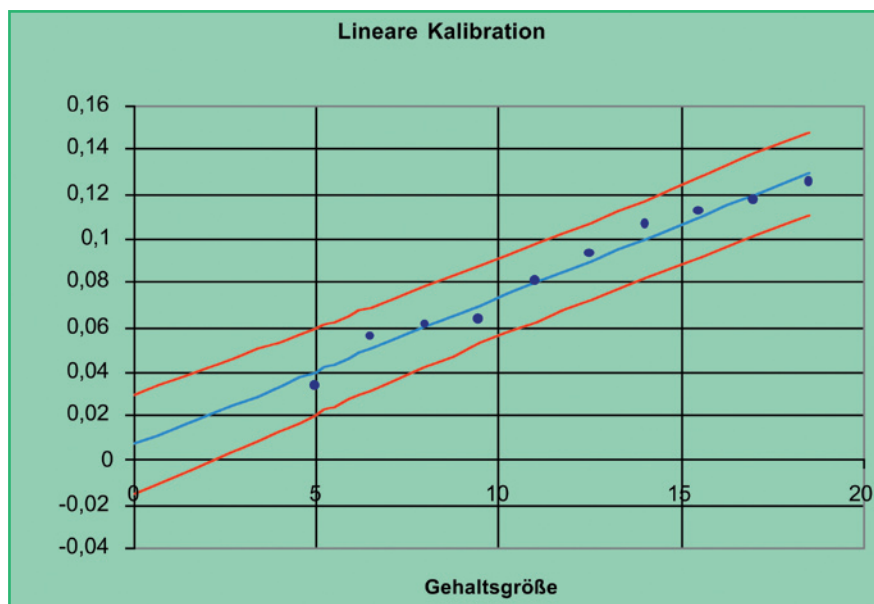


Abb. 3: Lineare Kalibrationsfunktion mit Prognoseintervall für 99 % Signifikanz

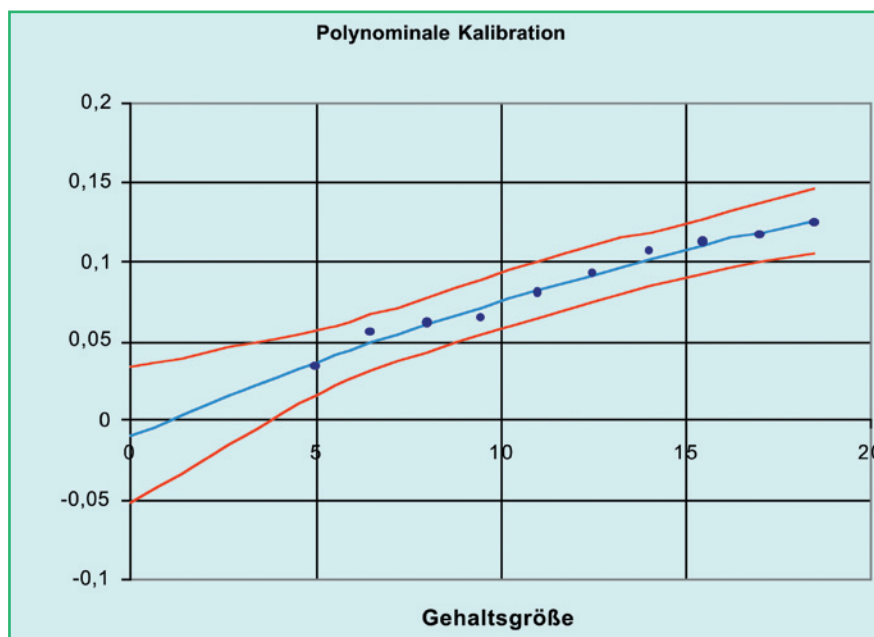
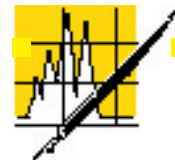


Abb. 4: Nicht lineare Kalibrationsfunktion mit Prognoseintervall für 99 % Signifikanz



Titärsicherung in der Analytischen Chemie. Weinheim: VCH 1992

[3] DIN 32645: Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze, Mai 1994

Kontakt:

Dr. Volkmar Neitzel
 Ruhrverband
 Kronprinzenstr. 37, 45128 Essen
 Tel.: 0201/1782753
 E-Mail: vne@ruhrverband.de

Tab. 1:
 Roh- und Kennwerte zum Kalibrationsbeispiel

Verfahrenskenngrößen der Kalibration bei 10 Messpunkten						
Arbeitsgruppe:	Gr 1		Kalib.-Datum:		20.02.2002	
BearbeiterIn:	Autor					
Analysenverfahren:	fiktiv		QS:			
KenngroÙe:	Test		Einheit der Messwerte:		Ext.	
			Einheit der GehaltsgröÙe:		mg/l	
Urdaten						
				Mehrfachbestimmung	Mehrfachbestimmung	
GehaltsgröÙe	Messwerte		Leerwerte	unten	oben	
5	0,034		0,005	0,034	0,125	
6,5	0,056		0,007	0,03	0,12	
8	0,061		0,006	0,033	0,118	
9,5	0,064		0,009	0,029	0,13	
11	0,081		0,007	0,036	0,122	
12,5	0,093		0,008	0,038	0,132	
14	0,106		0,003	0,033	0,13	
15,5	0,112		0,001	0,039	0,127	
17	0,117		0,008	0,027	0,125	
18,5	0,125		0,007	0,034	0,124	
Signifikanzniveau in %:	99					
Verfahrenskenngrößen						
	Gerade				Polynom	
Ordinatenabschnitt:	0,0071	Ext.	Ordinatenabschnitt:	-0,0088	Ext.	
Steigung:	0,0066	Ext./(mg/l)	Steigung X:	0,0097	Ext./(mg/l)	
Korrelationskoeffizient:	0,9884		Steigung X ² :	-0,0001	Ext./(mg/l) ²	
BestimmtheitsmaÙ:	0,9769		Reststandardabweichung:	0,0046	Ext.	
Reststandardabweichung:	0,0049	Ext.	Verfahrensstandardabw.:	0,6879	mg/l	
Verfahrensstandardabw.:	0,7408	mg/l	relative Verfahrensstand.:	5,8543	%	
relative Verfahrensstand.:	6,3047	%	Nachweisgrenze:	3,7582	mg/l	
Nachweisgrenze:	2,9171	mg/l	Erfassungsgrenze:	6,0816	mg/l	
Erfassungsgrenze:	5,8343	mg/l	Bestimmungsgrenze:	8,3534	mg/l	
Bestimmungsgrenze:	8,0024	mg/l				
			Leerwert-Nachweisgrenze:	1,1031	mg/l	
Varianzenhomogenität:	Ja		Leerw.-Erfassungsgrenze:	2,2061	mg/l	
Linearität:	Ja		Leer.-Bestimmungsgrenze:	3,3092	mg/l	
			Varianzenhomogenität			
			Leerwerte:		Ja	
Die Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenzen wurden für obiges Signifikanzniveau ermittelt.						
Bei Unterschieden in der Leerwert- und Kalibrationsmethode hat die Leerwertmethode Vorrang, sofern die						
Leerwerte symmetrisch streuen (weit genug von Null entfernt sind).						