

Besondere Kalibrationsfunktionen

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

Der größte Teil der in Laboratorien verwendeten Kalibrationsfunktionen gehört zu den linearen und nicht linearen. Sie wurden in den Teilen 1 und 2 dieser Publikation behandelt [1, 2]. Beide Typen setzen normalverteilte Werte bei Wiederholmessungen und Varianzhomogenität am oberen und unteren Ende des Arbeitsbereichs voraus. Außerdem wird angenommen, dass immer nur die Messwerte fehlerbehaftet sind, nicht jedoch die Gehaltsgrößen, die bei einer Kalibration vorgegeben werden.



Wenn zum Zweck einer Kalibration Proben bekannten Gehalts hergestellt werden, sind Ursubstanzen einzuwiegen, zu lösen, aufzufüllen und zu aliquotieren. Bei jedem Arbeitsschritt entstehen Fehler und man muss davon ausgehen, dass die vorgegebenen Gehalte nicht – wie angenommen – exakt sind.

Moderne Analysengeräte werden darauf getrimmt, wirtschaftlich zu arbeiten. Dabei ist von Vorteil, wenn sie simultan mehrere Komponenten bestimmen und das über einen möglichst großen Messbereich. Die Kehrseite der Medaille ist meist eine Inhomogenität der Varianzen und eine mögliche gegenseitige Beeinflussung verschiedener Komponenten. Auch hierfür gibt es Varianten einer Kalibration, die allerdings nicht genormt sind. Der dritte Teil dieser Publikation beschäftigt sich mit diesen besonderen Kalibrationen und weitergehenden Aspekten des Themas. Dabei werden die verschiedenen Möglichkeiten mehr veranschaulicht und bezüglich der Formalismen wird auf entsprechende Literatur verwiesen.

Die inverse Kalibration

Beim klassischen Weg einer Kalibration wird der Messwert als fehlerbehaftet angenommen, während im

Verhältnis hierzu die in den Kalibrationsproben vorgelegten Gehalte einer Komponente nahezu fehlerfrei sind. Auch wenn dies in vielen Fällen zutrifft, gibt es Untersuchungen [3, 4], in denen die Messwertfehler kleiner waren, als die der Gehaltsgrößen. Bei einer derartigen Konstellation bietet sich die inverse Kalibration zur Bestimmung von Gehaltsgrößen an.

Die von der klassischen linearen Kalibration bekannten Formalismen und Voraussetzungen lassen sich uneingeschränkt auch auf die inverse Kalibration anwenden. Als Unterschied müssen nur die Mess- und Gehaltsgröße miteinander vertauscht werden, das heißt die Messgröße ist keine Funktion des Gehalts, sondern der Gehalt steht in Abhängigkeit vom Messwert. In Abbildung 1 ist der Unterschied veranschaulicht.

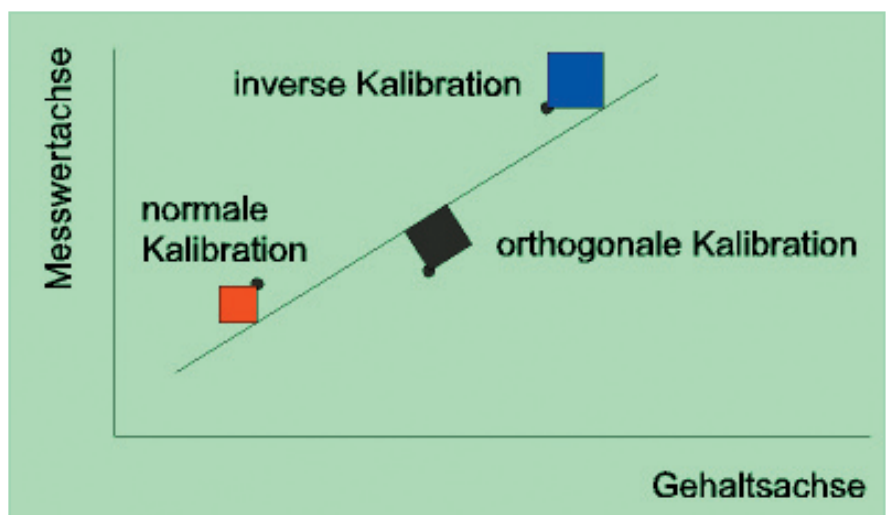
Bei der klassischen Vorgehensweise wird die Summe der Abstandsquadrate zwischen Messpunkten und Kalibrationsgerade minimiert (rotes Quadrat), wobei der senkrechte Abstand maßgebend ist. Im Fall der inversen Kalibration minimiert man die Summe der Abstandsquadrate mit waagerechtem Abstand zwischen

Messpunkt und Kalibrationsgerade (blaues Quadrat). Werden beide Achsen miteinander vertauscht, wechselt der waagerechte Abstand zum senkrechten und es liegt wieder der klassische Fall einer Kalibration vor (Abbildung 2). Mit der in Teil 1 dieser Publikation vorgestellten Excel-Anwendung lassen sich auch inverse Kalibrationen durchrechnen, indem Messwerte und Analysenwerte vertauscht eingegeben werden.

Die orthogonale Kalibration

Ein in der Praxis wenig verwendeter Kompromiss zwischen der klassischen und inversen Kalibration (hierzu gibt es auch keine genormte Vorgehensweise) ist die orthogonale Kalibration. In diesem Fall werden (wie bei der klassischen Vorgehensweise) die Messwerte auf der Y-Achse aufgetragen, die Analysenergebnisse auf der X-Achse. Die Minimierung der Summe aller Abweichquadrate zwischen Messpunkten und Ausgleichsgeraden erfolgt aber weder senkrecht noch waagrecht zur Gehaltsachse. Wie in Abbildung 1 dargestellt, ist der maßgebende Abstand der kür-

Abbildung 1: Vorgehensweise bei der normalen (klassischen), inversen und orthogonalen Kalibration



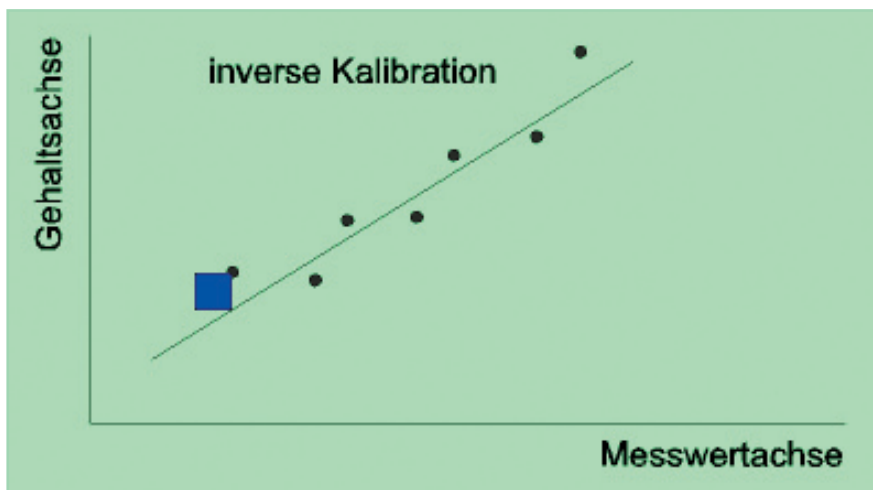
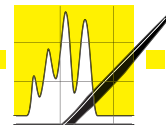


Abbildung 2:
Inverse Kalibration

zestmögliche zur Ausgleichsgeraden, das heißt das Lot vom Messpunkt zur Geraden.

Die orthogonale Regression [5] geht davon aus, dass sowohl die Messwerte, als auch die Gehaltsgröße fehlerbehaftet sind, was der Realität sehr nahe kommt. Ob die klassische, orthogonale oder inverse Vorgehensweise die jeweils beste ist, hängt davon ab, in welchem Verhältnis die Fehler der beiden Größen zueinander stehen, um die es bei der Kalibration geht. Sind die Fehler der Gehaltsgröße deutlich kleiner als die der Messgröße, empfiehlt sich die klassische Kalibration. Sind beide Fehler vergleichbar, bietet sich die orthogonale Variante an. Bei größeren Fehlern in der Gehaltsgröße ist die inverse Kalibration die beste Vorgehensweise.

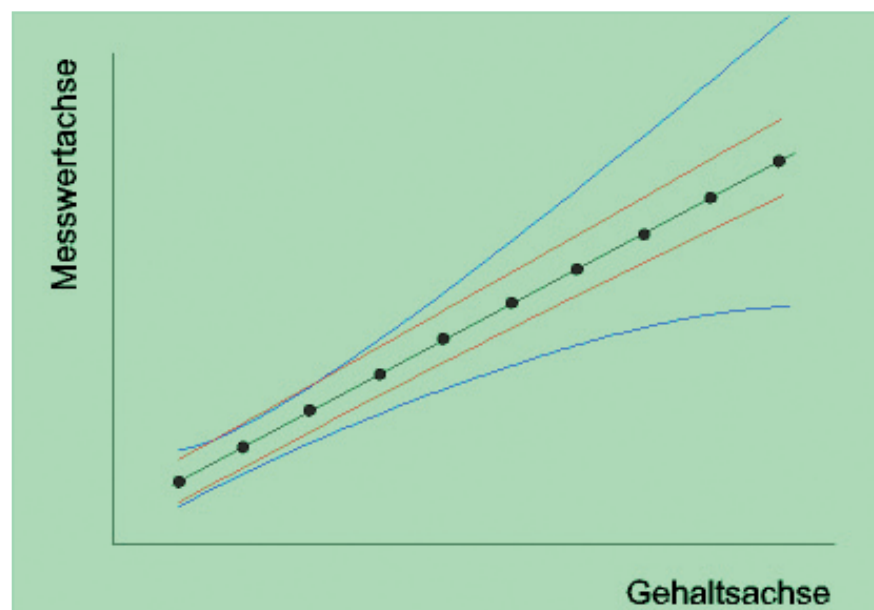
■ Die gewichtete Kalibration

Ein wohl häufig in der Praxis vorkommender Fall ist der, dass die Streuung der Messwerte zu größeren Werten hin immer weiter zunimmt. Man kann hier fast vom Normalfall sprechen. Wird der Arbeitsbereich genügend weit eingengt und so das von der Statistik (mit entsprechender Irrtumswahrscheinlichkeit) gerade noch akzeptierte Ausmaß größerer Varianz am oberen Ende des Arbeitsbereichs ausgeschöpft, kann die klassische lineare Kalibration angewandt werden. Bedauerlich ist nur, dass der Zusammenhang zwischen Messwerten und Analyseergebnissen oft über einen zum Teil mehrere Zehnerpotenzen

umfassenden Bereich linear verläuft, die lineare Kalibration aber wegen der inhomogenen Varianzen nicht verwendet werden darf. Ein Ausweg aus diesem Dilemma ist die gewichtete Kalibration [4, 6, 7].

In Abbildung 3 sind die klassische und die gewichtete lineare Kalibration gegenübergestellt. Zur praktischen Durchführung ist jeder Kalibrationspunkt mehrfach zu messen, um eine Information über die Wertestreuung (als Standardabweichung s_{yi}) zu erhalten. Die für die Kalibration zu verwendenden Datenpunkte sind die Mittelwerte der Mehrfachmessungen. Diese gehen auch in die Kalibration

Abbildung 3:
Lineare Kalibration mit gewichtetem (rot) und ungewichtetem (blau) Prognoseintervall



mit ein. Zur Berechnung der weiteren Größen wie Ordinatenabschnitt, Steigung, Reststandardabweichung, Verfahrensstandardabweichung und Prognoseintervall sind die jeweils in die Formeln einzusetzenden Messwerte und Gehalte mit einem Faktor w_i zu wichten. Dieser ergibt sich zu:

Hierin ist s_{yi} die Standardabweichung an der Stelle i und m die Anzahl der Kalibrierpunkte.

$$w_i = \frac{\frac{1}{s_{yi}^2}}{\frac{1}{m} \sum \frac{1}{s_{yi}^2}}$$

Die gewichtete Regression ist ein geeignetes Rechenverfahren für die Kalibrationsfunktion. Erst sie ermöglicht es, die Formalismen der linearen Kalibration anwenden zu dürfen. Die Funktion ist weniger anfällig gegenüber geringen Abweichungen, sie verhält sich robust. Dieser Vorteil erweist sich aber als Nachteil, wenn Ausreißerwerte vorliegen. Durch die Wichtung kommen sie weniger stark zur

Geltung. Daher ist es in jedem Fall zu empfehlen, die Daten grafisch darzustellen und mit dem Auge und der Erfahrung des Analytikers die Güte der Kalibration zu beurteilen.

Die Mehrkomponenten-Kalibration

Spektrometrische oder chromatographische Verfahren ermöglichen es, bei einem Messlauf mehrere Komponenten zu bestimmen. Dabei kann es vorkommen, dass die Signale völlig unabhängig voneinander (getrennt) auftreten (Abbildung 4 oben) oder sich gegenseitig überlappen (Abbildung 4 Mitte teilweise, Abbildung 4 unten vollständig). Bei vollständig getrennten Komponenten kann jede für sich und unabhängig von den anderen nach den bekannten Verfahren kalibriert werden.

Für den mittleren Fall der Abbildung 4, der häufig in der Praxis vorkommt, kann mit der multiplen linearen Kalibration gearbeitet werden, wenn sich die Komponentensignale additiv verhalten und eindeutig zuzuordnenbare Maxima aufweisen. Für n Komponenten benötigt man n Spektren oder Chromatogramme wechselnder Zusammensetzung, die aber nicht durch Verdünnung von Stammlösungen entstanden sein dürfen. Auf diese Weise entstehen n Signale, die jeweils aus n Anteilen verschiedener Komponenten zusammengesetzt sind.

In dem Gleichungssystem ist a_i der

$$Y_i = \sum_{j=1}^n a_j \cdot X_j + e_i$$

Anteil einer Komponente X_j und e_i der Restfehler. Eine Signalüberlappung wie in Abbildung 4 unten dargestellt, ist analytisch ungünstig. Das Gleichungssystem wird durch die Korrelationen zwischen den Komponenten instabil und kann nicht verwendet werden. Hierfür ist auf die multivariate Kalibration zurückzugreifen.

Die multivariate Kalibration

Der klassische Fall der Kalibration ist univariat, das heißt hier hängt ein Messwert vom Gehalt einer Komponente ab. In der Praxis kommt es vor, dass die Intensität eines Signals von mehreren Komponenten beeinflusst

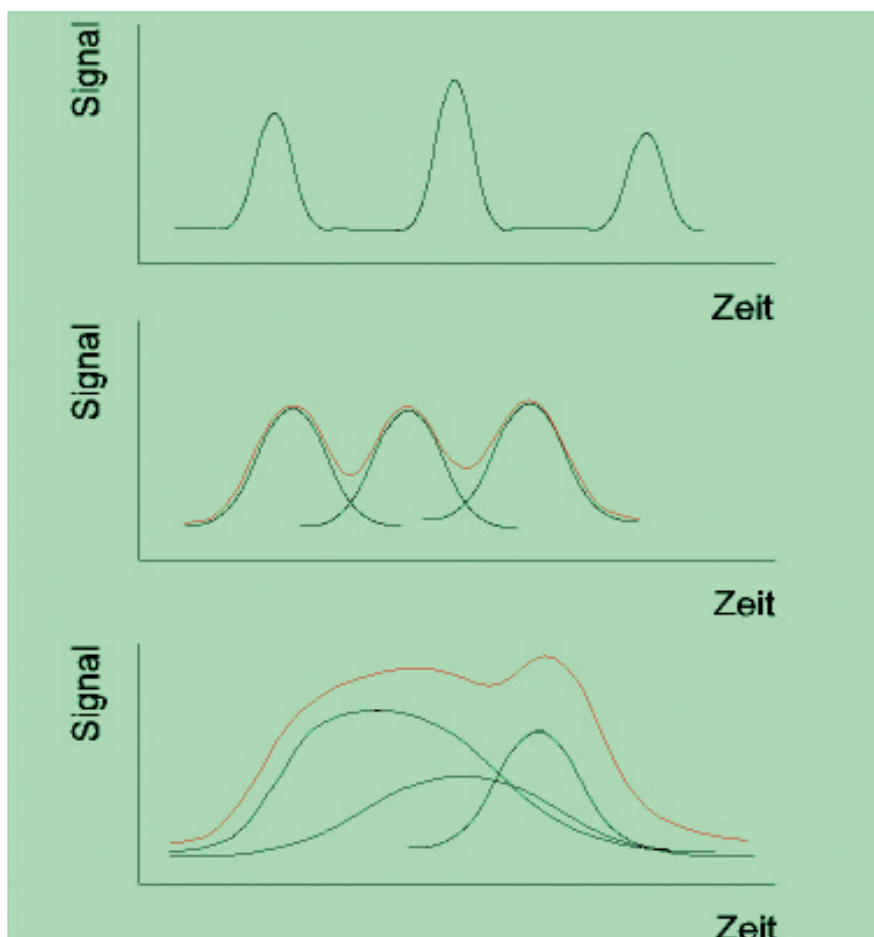


Abbildung 4: Mehrkomponentenanalysen mit unterschiedlicher Signalüberlappung

wird. Daraus resultieren komplexe Zusammenhänge, die mit Hilfe verschiedener Modelle quantifiziert werden können. Der mathematische Aufwand und die notwendigen Kenntnisse hierfür sind nicht unerheblich [8].

Es gibt – wie bei der univariaten Kalibration – klassische und inverse Vorgehensweisen. In jedem Fall bedarf es eines Modells, das möglichst mittels Testdatensätzen validiert werden sollte. Wenn, wie in Abbildung 4 unten dargestellt, drei Komponenten vorliegen und eine spektrometrische Analyse durchzuführen ist, werden mehrere Spektren aufgenommen und pro Spektrum die Intensitäten bei vielen verschiedenen Wellenlängen ermittelt. Hieraus ergeben sich verknüpfte Wertematrizen, die Basis des Kalibrationsmodells sind. In der Spektrometrie kommen derartige Fälle häufiger vor.

Weitere Aspekte

Es gibt Zusammenhänge zwischen Größen, die nicht linear sind, sich aber mit Hilfe einer Transformation in eine lineare Form überführen lassen. In einem solchen Fall lässt sich die klassische lineare Kalibration anwenden. Dabei muss aber beachtet werden, dass die Voraussetzungen nicht für die Größen selbst, sondern für deren transformierte Form gelten müssen. In der klassischen Form gilt:

$$\text{Messwert} = \text{Steigung} \cdot \text{Analysergebnis} + \text{Ordinatenabschnitt}$$

$$(Y = a \cdot X + b)$$

Nach einer geeigneten Transformation könnte beispielsweise gelten:

$$\text{Log } Y = a \cdot X + b$$

$$Y = a \cdot \text{Log } X + b$$

$$\text{Log } Y = a \cdot \text{Log } X + b$$

$$1 / Y = a \cdot X + b$$

$$1 / Y = a \cdot 1 / X + b$$

Es handelt sich immer um lineare Funktionen zwischen transformierten Größen. Sofern die Kalibration voll-

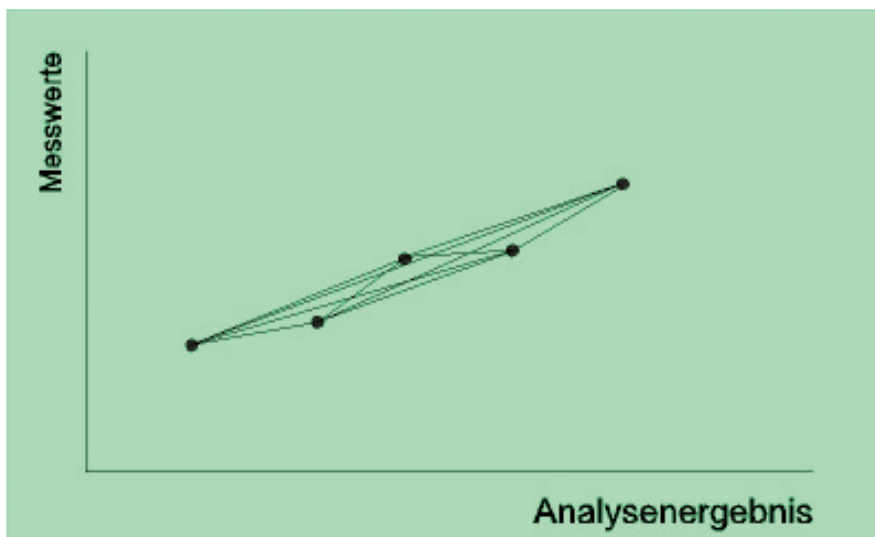


Abbildung 5:
Robuste Kalibration

zogen ist und mit den transformierten Größen gearbeitet wird, sind die Ergebnisse entsprechend zurück zu verwandeln.

Eine neuere Entwicklung in der Kalibration, vor allem seit es entsprechende Rechnerprogramme gibt, ist der Einsatz künstlicher neuronaler Netze. Es handelt sich um idealisierte Modelle, die den biologischen Nervensystemen nachgebildet sind. Die kleinsten Einheiten neuronaler Netze sind Neuronen, die sich am Eingang, Ausgang und im Inneren des Netzes befinden. Sie nehmen Signale auf, die anregend oder dämpfend wirken können, und geben sie abhängig vom aktuellen Aktivierungszustand weiter oder nicht.

Im Rahmen einer Lernphase vermag ein neuronales Netz seine innere Struktur so zu formieren, dass aus Inputdaten eine vorgegebene Kalibrationsfunktion als Output erzeugt wird [9]. Anschließend ist es möglich, auf der Basis des „Erlernen“ zu experimentellen Kalibrierdaten die zugehörige Kalibrationsfunktion zu bestimmen. Voraussetzung dafür ist die prinzipielle Gleichheit der Gegebenheiten in der Trainings- und der Anwendungsphase. Wenn ein neuronales Netz gelernt hat, lineare Funktionen an Daten anzupassen, ist es wenig geeignet, nicht lineare Zusammenhänge nachzubilden.

Eine Voraussetzung für die Anwendung der genormten Kalibrati-

onsverfahren ist, dass die Werte von Wiederholmessungen an jedem Kalibrationspunkt normalverteilt sein müssen. Trifft dies nicht zu, kann man sich mit der robusten Regression zum Zweck einer Kalibration helfen. In diesem Fall wird – wie in Abbildung 5 dargestellt – jeder Kalibrationspunkt mit jedem anderen verbunden und die jeweilige Steigung berechnet. Sortiert man anschließend die Steigungen der Größe nach, so ist die resultierende robuste Steigung die Mitte der sortierten Folge, die man auch als Median bezeichnet. In ähnlicher Weise geht man zur Berechnung des robusten Ordinatenabschnitts vor. Durch jeden Datenpunkt wird eine Gerade mit der zuvor berechneten mittleren Steigung gelegt und so entsprechend viele Ordinatenabschnitte erhalten. Werden diese wieder der Größe nach sortiert, ist der mittlere Wert der Folge der robuste Ordinatenabschnitt.

Literatur

- [1] Neitzel, V.: Die Kalibration von Analyseverfahren, Teil 1: Lineare Kalibrationsfunktionen. CLB 01/2000
- [2] Neitzel, V.: Die Kalibration von Analyseverfahren, Teil 2: Nicht lineare Kalibrationsfunktionen. CLB 02/2000
- [3] Tellinghuisen, J.: Inverse vs. Classical calibration for small data sets. *Fresenius J Anal Chem* (2000) 368, 585-588
- [4] Danzer, K., Hobert, H., Fischbacher, C. und Jagemann, K.-U.: *Chemometrik*. Berlin: Springer, 2001
- [5] Danzer, K., Wagner, M. und Fischbacher, C.: Calibration by orthogonal and common least squares – Theoretical and practical aspects. *Fresenius J Anal Chem* (1995) 352, 407-412
- [6] Schömer, S.: Die gewichtete Regression zur Validie-

- rung. *GIT Laborfachzeitschrift* (9/2000) 1043-1046
- [7] Einax, J., Bremser, W. und Machelett, B.: Inverse-variance weighted regression with uncertainty in both variables for the quantitative description of traffic-emitted lead transfer into plants. *Fresenius J Anal Chem* (1999) 364, 673-677
- [8] Bauer, G., Wegscheider, W. und Ortner, H.: Limits of detection in multivariate calibration. *Fresenius J Anal Chem* (1991) 340, 135-139
- [9] Sun, G., Chen, X., Li, Q., Wang, H., Zhou, Y. und Hu, Z.: Evaluation of nonlinear modeling based on artificial neuronal networks for the spectrophotometric determination of Pd(II) with CPA-mK. *Fresenius J Anal Chem* (2000) 367, 215-219

Kontakt:

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



Der Autor:

Dr. Volkmar Neitzel studierte Chemie an der GH/UNI Essen und ist seit 1984 als Mitarbeiter beim Ruhrverband in Essen beschäftigt, derzeit als Bereichsleiter für zentrale Aufgaben. Er ist Autor und Mitautor mehrerer Fachbücher zur Labordatenverarbeitung, zur Qualitätssicherung in der Analytik und zur Technik der Behandlung und Kontrolle von Abwasser. Seit rund zehn Jahren fungiert er als Lehrbeauftragter an der Technischen Fachhochschule Agricola in Bochum für Umweltchemie und Wassertechnologie.