

Berechnung der Verfahrensstandardabweichung und Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze aus einer Kalibrierung gemäß DIN 32645

Karl Molt^a und Ursula Telgheder^b

17. Februar 2010

DIN 32465 ist im November 2008 in überarbeiteter Form veröffentlicht worden. Gemäß dieser DIN können im Rahmen einer für die Kalibrierung durchgeführten Regressionrechnung die im Titel genannten Parameter ermittelt werden, welche eine quantitative analytische Methode im Wesentlichen charakterisieren. An einem simulierten Beispiel wird gezeigt, wie sich alle Parameter einschließlich der Bestimmungsgrenze in einem Schritt mit geschlossenen Formeln berechnen lassen.

1 Einleitung

In der instrumentellen Analytik besteht im allgemeinen ein funktionaler Zusammenhang zwischen dem mit einem Instrument gemessenen Signal y und dem zu bestimmenden Gehalt x einer Probe. Die Art dieses Zusammenhangs wird mit Hilfe von Kalibrationsstandards ermittelt, indem die für diese gemessenen Signalwerte gegen die Gehaltswerte aufgetragen werden. In den meisten Fällen ergibt sich dabei ein linearer Zusammenhang, der durch Regression nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate ermittelt wird. Aus einer vollständigen Regressionrechnung kann man dabei nicht nur die Steigung b und den y -Achsenabschnitt a der Kalibriergerade ermitteln, sondern nach DIN 32645 [1] auch Verfahrensstandardabweichung, Nachweis-, Bestimmungs- und Erfassungsgrenze. Dies wird im Folgenden an einem simulierten Beispiel dargestellt.

^aProf. Dr. Karl Molt, Universität Duisburg-Essen, Fachgebiet Instrumentelle Analytische Chemie, 47048 Duisburg, karl.molt@uni-due.de

^bPD Dr. Ursula Telgheder, dto., ursula.telgheder@uni-due.de

2 Kalibriergerade und Verfahrensstandardabweichung

Es soll davon ausgegangen werden, dass die wahre Kalibrationsfunktion die Form $y = 3x + 4$ besitzt. Ferner sollen 51 Kalibrationsstandards mit Gehaltswerten x zwischen 0 und 5 mit Inkrementen von 0,1 in einer bestimmten Einheit vorliegen, die hier nicht genannt wird, da es sich um ein simuliertes Beispiel handelt. Man geht davon aus, dass die Gehaltswerte der Kalibrationsstandards die wahren Werte sind und vernachlässigt diesbezügliche etwaige Unsicherheiten¹. Für die Simulation soll davon ausgegangen werden, dass den wahren y -Werten Gaußsches Weißes Rauschen [2] überlagert ist, das mit einem Zufallszahlengenerator erzeugt wird. Abb. 1 zeigt die so für 51 Kalibrationsstandards simulierten Daten und die damit berechnete Regressionsgerade einschließlich Vorhersageband.

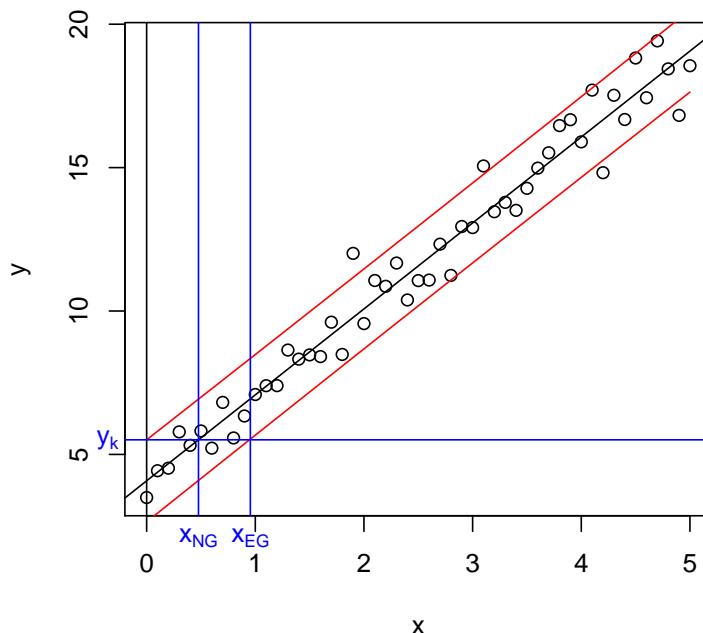


Abbildung 1: Simulierte Daten und zugehörige Regressionsgerade mit Vorhersageband für $\alpha = 0, 1$. Die Nachweisgrenze x_{NG} wird mit Hilfe des kritischen y_k berechnet, das sich als Schnittpunkt der oberen Grenze des Vorhersagebandes mit der y-Achse ergibt (allerdings bezogen auf einseitige Fragestellung und somit $\alpha = 0, 05$). Für die Erfassungsgrenze gilt $x_{EG} = 2 \times x_{NG}$.

¹Dies ist allerdings nicht immer gerechtfertigt. Für Kalibrierungen, die auch Unsicherheiten bezüglich der Gehaltswerte x berücksichtigen, wird auf ISO 6143 verwiesen.

2.1 Berechnung der Regressionsgeraden

Durch das angewendete Rechenverfahren nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate (Ordinary Least Squares, OLS [3]) wird der Fehler in y -Richtung minimiert. Die folgenden Formeln zeigen, wie die Steigung b und der y-Achsenabschnitt a berechnet werden können. Hierbei ist zu beachten, dass eine Regressionsgerade stets durch den Mittelpunkt (\bar{x}, \bar{y}) der Daten geht.

$$Q_{xx} = \sum_{i=1}^n x_i^2 - \frac{(\sum_{i=1}^n x_i)^2}{n} \quad (1)$$

$$Q_{yy} = \sum_{i=1}^n y_i^2 - \frac{(\sum_{i=1}^n y_i)^2}{n} \quad (2)$$

$$Q_{xy} = \sum_{i=1}^n (x_i y_i) - \frac{\sum_{i=1}^n x_i \sum_{i=1}^n y_i}{n} \quad (3)$$

$$b = \frac{Q_{xy}}{Q_{xx}} \quad (4)$$

$$a = \bar{y} - b\bar{x} \quad (5)$$

Aus dieser Rechnung erhält man $a = 4.079$ und $b = 2.997$. Als nächstes interessiert den Analytiker die Güte der Kalibrierung. Als Maß hierfür werden häufig der Korrelationskoeffizient R bzw. das Bestimmtheitsmaß R^2 angegeben². Es dabei zu belassen ist ein weit verbreiteter Fehler, denn diese Größen sind im Zusammenhang einer Kalibrierung wenig informativ. Entscheidend ist vielmehr die Verfahrensstandardabweichung, die in DIN 32645 mit s_{x0} bezeichnet wird. Diese kann über die Residuen berechnet werden, also die Differenzen zwischen den beobachteten y -Werten und den durch die Kalibriergerade vorausgesagten Werten \hat{y} :

$$Res_i = y_i - \hat{y}_i \quad (6)$$

$$Res_i = y_i - (bx_i + a) \quad (7)$$

Abb. 2 zeigt einen sog. „Residuenplot“, bei dem die Residuen gegen die gefitteten Werte aufgetragen sind. An Hand eines solchen Plots kann man auf Varianzhomogenität und eventuelle Ausreißer prüfen. In Abb. 2 sind z.B. die Werte Nr. 20, 43 und 50 auffällig. Diese entsprechen den grünen Punkten in Abb. 3, wo sie außerhalb des 5%-Vorhersageintervalls liegen und damit nach Huber Ausreißer [4] sein müssten. Dies ist natürlich nicht der Fall, denn in der Simulation wurden die Werte für alle Residuen einer Standardnormalverteilung entnommen. Die Quintessenz hieraus ist, dass man insbesondere bei größeren Datensätzen wie dem hier vorliegenden mit dem Entfernen von Werten außerhalb des Vorhersageintervalls zurückhaltend sein sollte, denn falls es sich tatsächlich um Ausreißer handeln sollte, beeinflussen diese das Kalibrationsergebnis nur unwesentlich. Dies gilt natürlich nicht für extreme Ausreißer, die das Kalibrationsmodell radikal verändern und z.B. durch Ablese- oder Kodierungsfehler oder Instrumentenversagen, aber auch durch atypische Kalibrationsstandards verursacht werden

²Im vorliegenden Fall ist $R = 0.9387$ und $R^2 = 0.9677$.

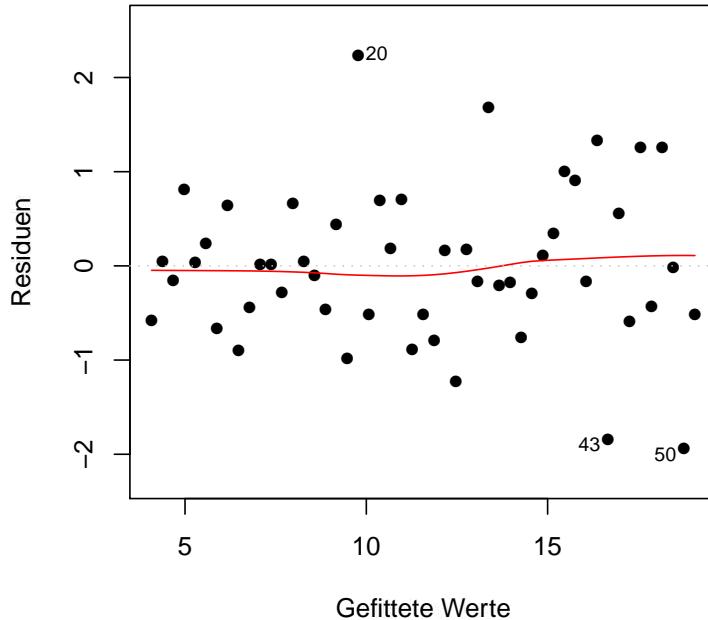


Abbildung 2: Residuenplot. Die Residuen $y_i - \hat{y}_i$ sind gegen die gefitteten Werte \hat{y}_i aufgetragen.

können. Bei kleinen Datensätzen mit z.B. fünf oder sechs Standards machen sich ohnehin nur grobe Ausreißer bemerkbar.

2.2 Berechnung der Verfahrensstandardabweichung

Aus den Residuen lässt sich die Reststandardabweichung $s_{y,x}$ der Messwerte der Kalibrierung und hieraus die Verfahrensstandardabweichung s_{x0} wie folgt berechnen:

$$s_{y,x} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n [y_i - (bx_i + a)]^2}{n - 2}} \quad (8)$$

$$s_{y,x} = \sqrt{\frac{Q_{yy} - \frac{Q_{xy}^2}{Q_{xx}}}{n - 2}} \quad (9)$$

$$s_{x0} = \frac{s_{y,x}}{b} \quad (10)$$

Im vorliegenden Fall ist die Reststandardabweichung $s_{y,x} = 0.822$ und die Verfahrensstandardabweichung $s_{x0} = 0.274$. Die Verfahrensstandardabweichung trägt die gleiche

Einheit wie die Gehalte in den Kalibrationsstandards und kann somit anschaulich als Analysenfehler verstanden werden.

3 Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze

In DIN 32645 wird zwischen der Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze unterschieden. Alle drei Werte ergeben sich aus der Regressionrechnung, wenn man die Vorhersageintervalle mitberechnet. Abb. 1 zeigt das Vorhersageband (für $\alpha = 0.1$), dessen oberer und unterer Rand die Grenze zweiseitiger Vorhersageintervalle in y -Richtung darstellen. Ein Vorhersageintervall hat folgende Bedeutung: Wird ein und derselbe Satz von Kalibrationsstandards immer wieder von neuem vermessen und die entsprechenden Kalibrierungen durchgeführt, so erhält man für einen bestimmten Konzentrationswert x einer Analyse für jede Kalibrierung ein anderes Vorhersageintervall für das Signal y . Auf lange Sicht enthalten dann $(1 - \alpha) \times 100\%$ dieser Intervalle den wahren Signalwert der Analyse und $\alpha \times 100\%$ nicht. Die Irrtumswahrscheinlichkeit α wird in der Statistik auch als „Fehler 1. Art“ bezeichnet. Die Angabe von Analysenergebnisse zusammen mit dem Vorhersageintervall entspricht dem Konzept der erweiterten Messunsicherheit. Die obere und untere Grenze der Vorhersageintervalle sind wie folgt gegeben:

$$y_{o,u} = (bx + a) \pm s_{y,x} t_{f,\alpha} \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{1}{m} + \frac{(x - \bar{x})^2}{Q_{xx}}} \quad (11)$$

n ist hierbei die Zahl der verwendeten Kalibrationsstandards und m die Zahl der Messungen³, die für die Ermittlung des Analysenwertes herangezogen wurden. $t_{f,\alpha}$ ist der t -Wert für f Freiheitsgrade ($f = n - 2$) und eine vorgegebene Irrtumswahrscheinlichkeit α , welcher mit dem Computer berechnet oder einer entsprechenden Statistik-t-Tabelle entnommen werden kann.

3.1 Berechnung der Nachweis- und Erfassungsgrenze

Die Nachweigrenze ist ein kritischer Gehaltswert, bei dessen Überschreiten von der Anwesenheit des gesuchten Analyten ausgegangen wird. Dieser entspricht einem kritischen Wert y_k der Messgröße, der gleich dem oberen Wert des Vorhersageintervalls gemäß Gl. (11) an der Stelle $x = 0$ ist. Damit erhält man für den kritischen Wert der Messgröße

$$y_k = a + s_{y,x} t_{f,\alpha} \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{1}{m} + \frac{\bar{x}^2}{Q_{xx}}} \quad (12)$$

Aus dem so ermittelten kritischen Wert y_k kann die Nachweigrenze x_{NG} berechnet werden, indem y_k in die Kalibrierfunktion $y = bx + a$ eingesetzt und nach x aufgelöst

³In der Analytik ist es zur Erhöhung der Präzision des Analysenergebnisses üblich, Wiederholmessungen durchzuführen und das Ergebnis dann als Mittelwert aus den durchgeföhrten Einzelmessungen zu berechnen.

wird:

$$y_k = bx_{NG} + a \quad (13)$$

$$x_{NG} = \frac{y_k - a}{b} \quad (14)$$

$$x_{NG} = \frac{s_{y,x} t_{f,\alpha}}{b} \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{1}{m} + \frac{\bar{x}^2}{Q_{xx}}} \quad (15)$$

$$x_{NG} = s_{x0} t_{f,\alpha} \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{1}{m} + \frac{\bar{x}^2}{Q_{xx}}} \quad (16)$$

Hierbei ist zu beachten, dass für die Bestimmung der Nachweisgrenze ein einseitiges Vorhersageintervall verwendet wird, da nur die obere Grenze relevant ist. Bei gleichbleibender oberer Grenze halbiert sich beim Übergang von einem zweiseitigen zu einem einseitigen Intervall α . Abb. 1 zeigt die graphische Lösung für das Auffinden der Nachweisgrenze, für die man nach Gl. (16) in vorliegenden Fall $x_{NG} = 0,477$ bei einem α von 0,05 erhält.

Wäre der wahre Gehaltswert einer Analysenprobe identisch mit der Nachweisgrenze, so würde man den Analyten auf lange Sicht nur in 50% der Fälle nachweisen können, in 50% der Fälle dagegen nicht ($\beta = 0,5$, „Fehler 2. Art“). Möchte man die Empfindlichkeit des Nachweises derart erhöhen, dass man in 95% der Fälle den Analyten nachweist ($\beta = 0,05$), dann erhöht sich die Entscheidungsgrenze auf das zweifache der Nachweisgrenze. Dieser Wert wird „Erfassungsgrenze“ genannt:

$$x_{EG} = 2 \times x_{NG} \quad (17)$$

Im vorliegenden Fall ist also die Erfassungsgrenze $x_{EG} = 0,954$.

3.2 Bestimmungsgrenze

Die Nachweisgrenze bzw. Erfassungsgrenze gibt an, ab welchem Gehaltswert man den Analyten in einer Probe mit vorgegebenen Irrtumswahrscheinlichkeiten α und β qualitativ nachweisen kann. Bei der Bestimmungsgrenze wird zusätzlich eine gewisse Mindestgenauigkeit gefordert, die als relative Ergebnisunsicherheit

$$\frac{1}{k} = \frac{\Delta x_{BG}}{x_{BG}} \quad (18)$$

definiert wird. Üblicherweise wird $k = 3$ verwendet. Die Zulassung eines 33%igen relativen Fehlers erscheint etwas großzügig, ist aber für die Spurenanalytik, wo man oftmals schon zufrieden ist, wenn man sich in der richtigen Größenordnung befindet, völlig ausreichend. Für andere Aufgabenstellungen kann man natürlich höhere k -Werte und damit höhere Genauigkeiten fordern.

Aus Gl. (18) erhält man durch Auflösen nach x_{BG} :

$$x_{BG} = k \times \Delta x_{BG} \quad (19)$$

Δx entspricht dem halben zweiseitigen Vorhersageintervall in x -Richtung, das man durch Auflösen von Gl. (11) nach x erhält, und nach Einsetzen in Gl. (19) ergibt sich damit für die Bestimmungsgrenze x_{BG} :

$$x_{BG} = k \frac{s_{y,x} t_{f,\alpha}}{b} \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{1}{m} + \frac{(x_{BG} - \bar{x})^2}{Q_{xx}}} \quad (20)$$

Diese Gleichung enthält x_{BG} auf der rechten und linken Seite. Eine graphische Lösung zeigt Abb. 3.

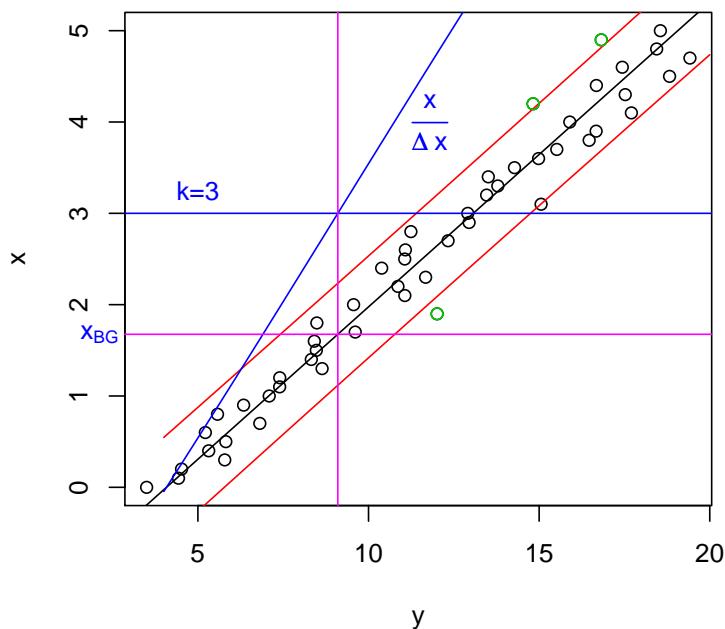


Abbildung 3: Graphische Ermittlung der Bestimmungsgrenze für $k = 3$. Die roten Linien entsprechen einem Vorhersageband mit $\alpha = 0,05$. Die horizontale blaue Linie entspricht $k = 3$, die ansteigende blaue Linie $x / \Delta x$, wobei Δx die Hälfte des Vorhersageintervalls in x -Richtung ist. Am Schnittpunkt der beiden blauen Geraden ist Gl. (19) erfüllt, woraus sich dann die Bestimmungsgrenze x_{BG} ergibt.

Anmerkung: Die grünen Punkte sehen nach Ausreißern aus, sind es in Wirklichkeit aber nicht.

Für die rechnerische Lösung empfiehlt DIN 32645 ein iteratives Verfahren. Dies ist jedoch nicht notwendig, denn Gleichung (20) lässt sich wie folgt in eine gemischt qua-

dratische Gleichung umformen und nach x_{BG} auflösen.

$$x_{BG} = k \frac{s_{y,x} t_{f,\alpha}}{b} \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{1}{m} + \frac{(x_{BG} - \bar{x})^2}{Q_{xx}}} \quad (21)$$

$$x_{BG}^2 = k^2 \frac{s_y^2 t_{f,\alpha}^2}{b^2} \left(\frac{1}{n} + \frac{1}{m} + \frac{x_{BG}^2 - 2x_{BG}\bar{x} + \bar{x}^2}{Q_{xx}} \right) \quad (22)$$

$$x_{BG}^2 = k^2 \frac{s_y^2 t_{f,\alpha}^2}{b^2} \frac{m+n}{mn} + k^2 \frac{s_y^2 t_{f,\alpha}^2}{b^2} \frac{x_{BG}^2 - 2x_{BG}\bar{x} + \bar{x}^2}{Q_{xx}} \quad (23)$$

$$\kappa = k \frac{s_{y,x} t_{f,\alpha}}{b} = ks_{x0} t_{f,\alpha} \quad (24)$$

$$x_{BG}^2 = \kappa^2 \frac{m+n}{mn} + \kappa^2 \frac{x_{BG}^2 - 2x_{BG}\bar{x} + \bar{x}^2}{Q_{xx}} \quad (25)$$

$$mnQ_{xx}x_{BG}^2 = Q_{xx}\kappa^2(m+n) + mn\kappa^2(x_{BG}^2 - 2x_{BG}\bar{x} + \bar{x}^2) \quad (26)$$

$$nm(Q_{xx} - \kappa^2)x_{BG}^2 + 2\kappa^2 nm\bar{x}x_{BG} - \kappa^2(Q_{xx}n + Q_{xx}m + nm\bar{x}^2) = 0 \quad (27)$$

$$\epsilon = nm(Q_{xx} - \kappa^2) \quad (28)$$

$$\zeta = 2\kappa^2 nm\bar{x} \quad (29)$$

$$\eta = \kappa^2(Q_{xx}n + Q_{xx}m + nm\bar{x}^2) \quad (30)$$

$$\epsilon x_{BG}^2 + \zeta x_{BG} - \eta = 0 \quad (31)$$

$$x_{BG} = \frac{-\zeta + \sqrt{\zeta^2 + 4\epsilon\eta}}{2\epsilon} \quad (32)$$

Für $k = 3$ und $\alpha = 0,05$ erhält man damit eine Bestimmungsgrenze von $x_{BG} = 1.676$.

4 Zusammenfassung

Es wurde gezeigt, wie sich mit der in der instrumentellen Analytik üblichen Kalibriergeraden-Methode die Verfahrensstandardabweichung und die Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenzen gemäß DIN 32645 berechnen lassen. Abweichend von dem in dieser DIN vorgeschlagenen Rechenverfahren (aber konform mit den Definitionen der DIN) wurde die Bestimmungsgrenze durch geschlossene Formeln in einem Schritt exakt ermittelt. Die Berechnungen lassen sich bei kleinen Datensätzen mit einem Taschenrechner und einer t-Tabelle durchführen. Zu beachten ist hierbei, dass für die Ermittlung des t-Wertes für ein bestimmtes α im Falle der Nachweisgrenze eine einseitige und im Fall der Bestimmungsgrenze eine zweiseitige Fragestellung verwendet werden muss. Bequemer lassen sich die Rechnungen mit einem Tabellenkalkulationsprogramm wie z.B. EXCEL⁴ oder mit einem Programm für die numerische oder statistische Datenverarbeitung wie Matlab oder R durchführen. Alle Berechnungen und die Erstellung von

⁴Ein geeignetes Excel-Programm kann unter <http://www.rzuser.uni-heidelberg.de/~df6/download/dintest.htm> (Rechenzentrum der Uni Heidelberg) heruntergeladen werden.

Graphiken in dieser Arbeit wurden mit der freien Software R [5] durchgeführt. Ein entsprechende R-Programm mit Erläuterung und einem Beispiel-Datensatz (AAS Kupfer-Kalibrirung) kann unter www.uni-due.de/iac/r_git.shtml heruntergeladen werden.

Literatur

- [1] DIN 32465:2008-11, Chemische Analytik – Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze unter Wiederholbedingungen – Begriffe, Verfahren, Auswertung
- [2] Josef Honerkamp, „Stochastische Dynamische Systeme. Konzepte, numerische Methoden, Datenanalyse“, Wiley-VCH (1990), Kapitel 4.1.2: Das Gaußsche Weiße Rauschen, S. 66
- [3] Lothar Sachs, Jürgen Hedderich, Angewandte Statistik - Methodensammlung mit R, 12. Aufl., Springer (2006), Kap. 6.3.3: Kleinster Fehler (OLS), S. 251
- [4] Wolfgang Gottwald, „Statistik für Anwender“, Wiley-VCH (2000), Kapitel 7.8: Ausreißer in Kalibrierdaten, S. 122
- [5] R Development Core Team (2009). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Wien, Österreich. URL <http://www.R-project.org>.