

# Messen, Auswerten und Beurteilen

# Analytische Aufgabenbereiche

- Qualitative Bestimmung von Substanzengemischen
- Quantifizierung einzelner Substanzen
- Strukturermittlung

# Fallbeispiel

- In der gewonnenen Probe kann man analysieren:
  - Welche Fettsäuren (FAME) sind vorhanden
  - Wie viel Linolsäure kommt vor
  - Welche Struktur hat Linolsäure (weitere Vorarbeiten – Abtrennen – nötig)

# Messen

- „Die Auswahl des Analysenprinzips – d.h. des physikalischen Prozesses, der die analytische Information liefert – erfolgt so, dass die höchste analytische Qualität erhalten wird“

# Qualitätsparameter

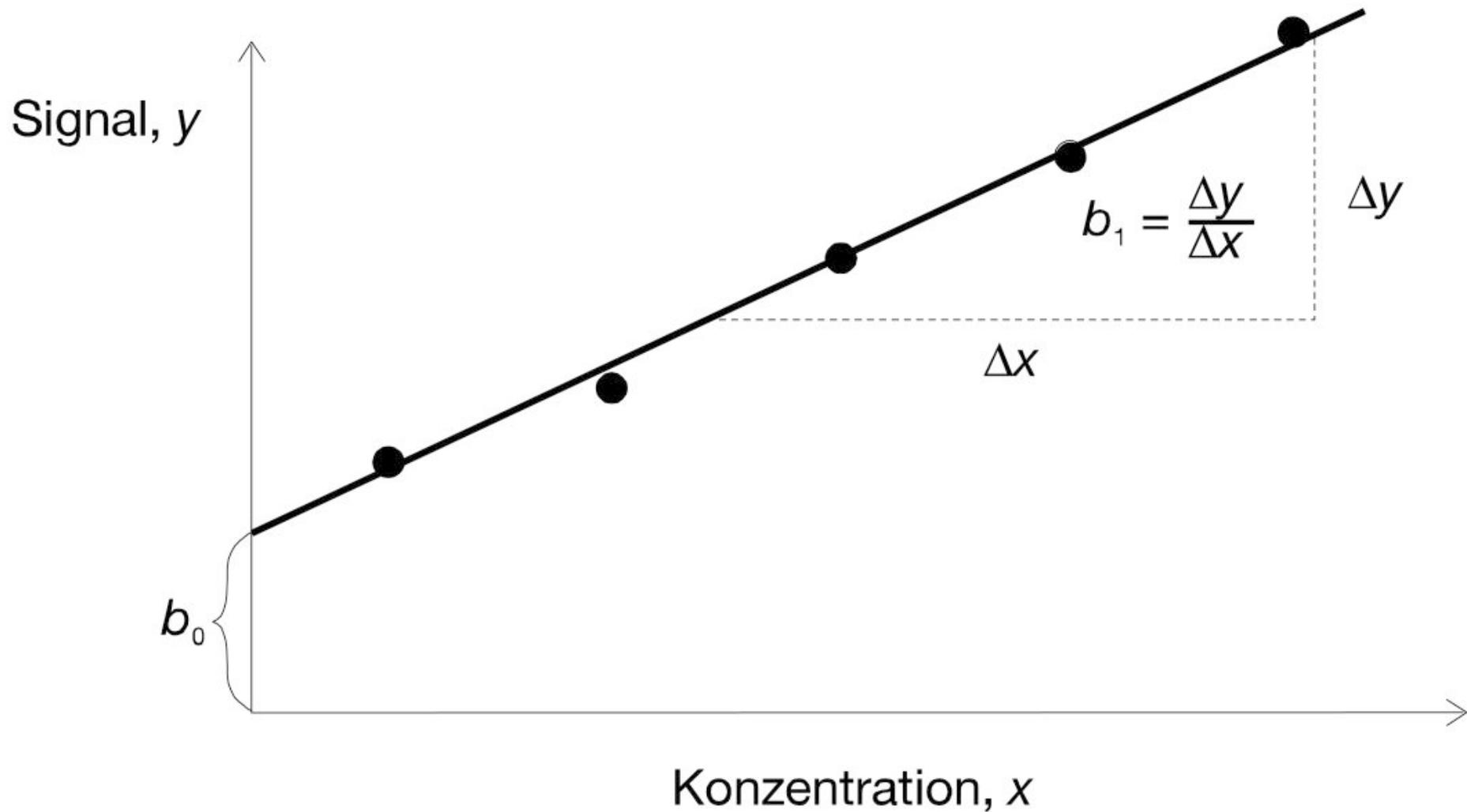
- Empfindlichkeit
  - Nachweis- und Bestimmungsgrenze
- Präzision
- Richtigkeit
- Selektivität
- Aufwand, Zeit und Kosten

# Kalibrierung

- Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Stoffen müssen kalibriert werden.
- Mit der Kalibrierung wird u.a. die Empfindlichkeit des Verfahrens erfasst.

# Kalibrierung

- Im einfachsten Fall werden bekannte Massen (Konzentrationen) vorgegeben und **die Signal-Intensität = Fläche unter dem Peak** gegen die bekannte Masse aufgetragen
- Es entsteht eine **Kalibrierkurve** für den **Äußeren Standard**



# Kalibrierkurve

- Die Empfindlichkeit ist die Steigung  $b_1$  der Kalibriergerade

$$y = b_1 x + b_0$$

- Mit dem analytischen Signal  $y$  (Messwert) und der zugehörigen Konzentration  $x$

# Kalibrierkurve

- $b_0$  ist der Mittelwert des Blind-Wertes der Kalibrierkurve, für die Masse  $x = 0$
- Die Zufallsstreuung = Standardabweichung  $s_0$  des Blindwerts entspricht dem Signal-Grundrauschen

# Kalibrierkurve

- Die Koeffizienten  $b_0$  und  $b_1$  ergeben sich aus  $n$  Messwerte-Paaren  $(x_i/y_i)$  zu

$$b_1 = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$$

$$b_0 = \bar{y} - b_1 \bar{x}$$

# Nachweisgrenze

- Ein Wert kann sicher als Messwert gelten, wenn er größer ist als der Mittelwert des Blindwerts plus mindestens 3 mal dessen Zufallsstreuung (Standardabweichung  $s_0$ )

$$\text{LOD: } y_{\text{Min}} = b_0 + 3s_0$$

*limit of detection*

# Bestimmungsgrenze

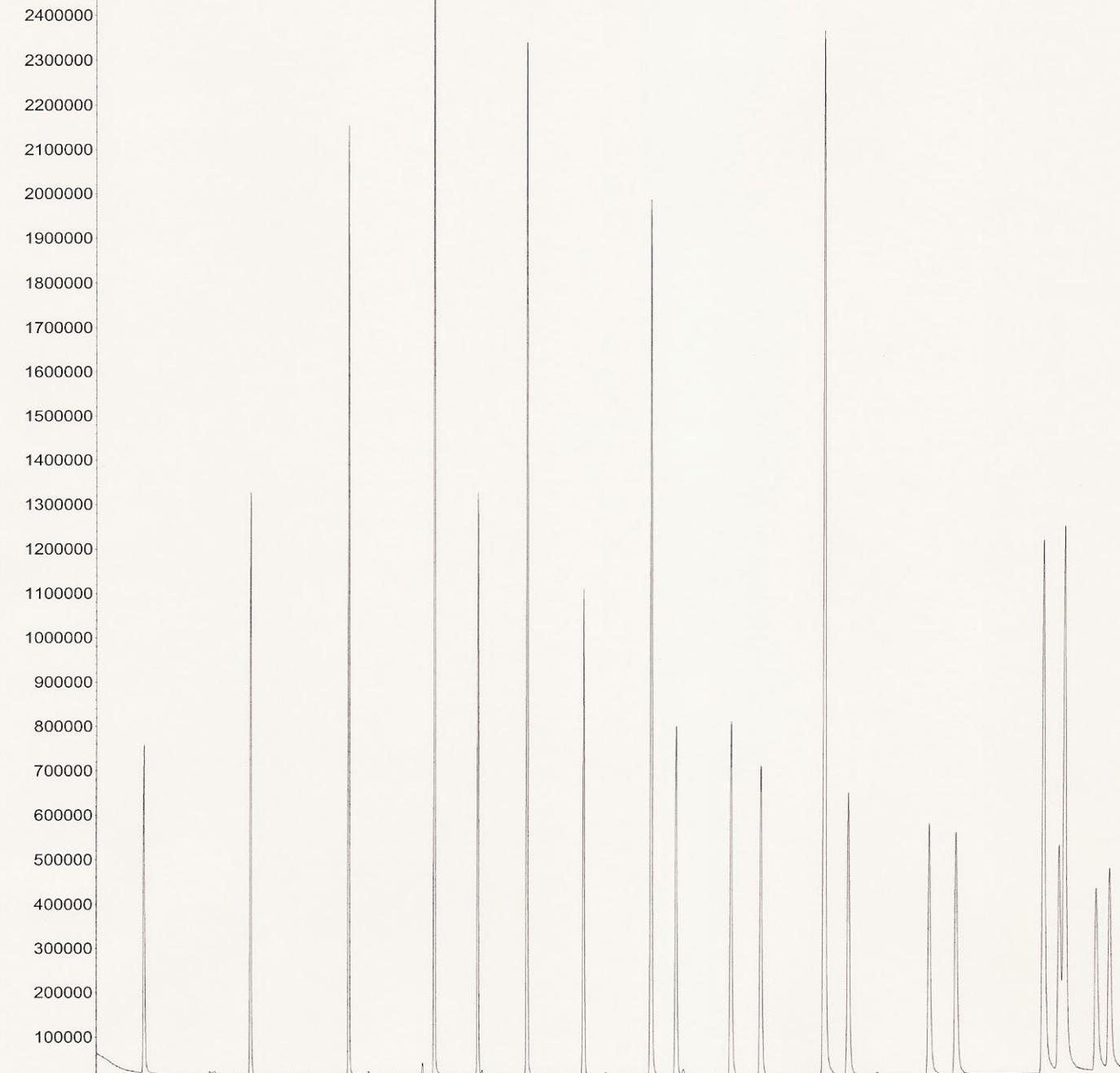
- Als Untergrenze für **Quantifizierungen** gilt entsprechend die Summe aus Blindwert und 10-fach dessen Standardabweichung

$$\text{LOQ: } y_{\text{Min}} = b_0 + 10s_0$$

*limit of quantification*

Abundance

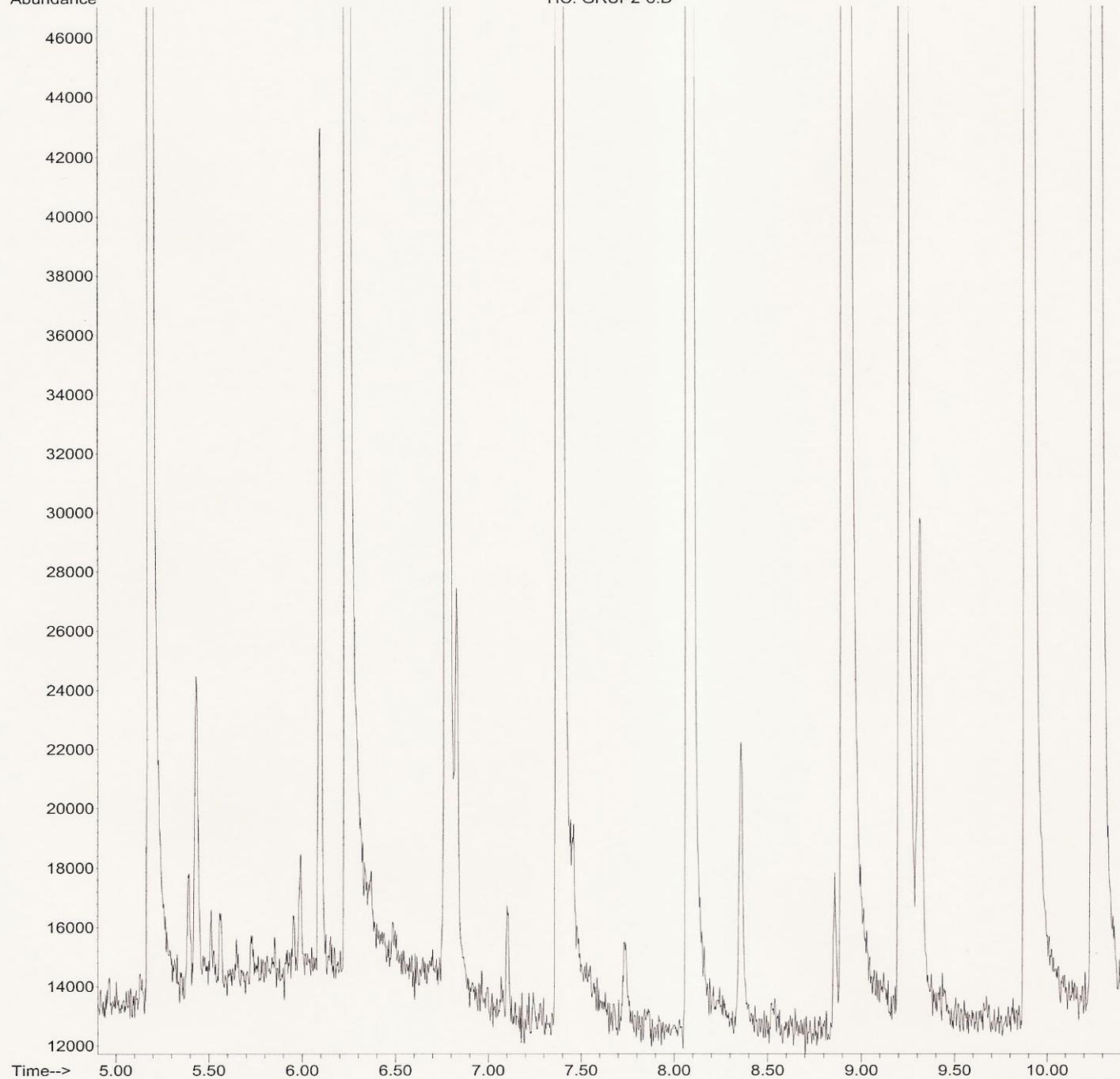
TIC: GRUP2-8.D



Time-->

Abundance

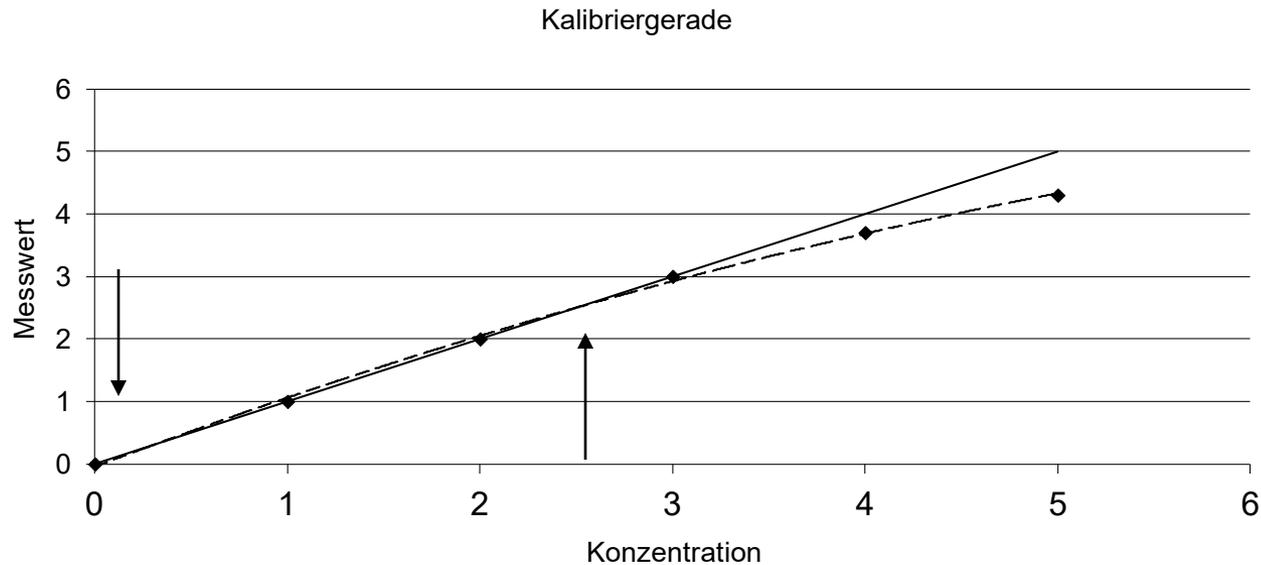
TIC: GRUP2-8.D



Time-->

# Arbeitsbereich

- Der Bereich zwischen größter und kleinster bestimmbarer Menge



# Kalibrierungen

- Einfache (s.o.) = äußerer Standard
- Innerer Standard
- Standard-Addition

# Äußerer Standard

- Verdünnungsreihen des reinen Analyten werden gemessen.
  - Kalibrierkurve
- Der Messwert der Probe wird mit dem Wert der Kalibrierkurve verglichen.
  - Konzentrationsbestimmung

# Innerer Standard

- Zu der Probe wird **möglichst früh** eine definierte Menge eines **Kalibrierstandards** zugegeben.
- Dessen Messsignal sollte ähnlich aber deutlich getrennt von der Probe sein
- Das Verhältnis der Messwerte von Analyt und Standard dient als analytischer Parameter.

# Response-Faktor

- Die Ansprech-Intensität eines Detektors ist nicht für jede Verbindung gleich
- Ein Maß ist der Resonse-Faktor  $f$

$$f = \frac{A}{c}$$

- $A$  = Signal;  $c$  = Konzentration

# Innerer Standard

- Für den inneren Standard und die Probe gilt dann:

$$A_{\text{Pr}} = f_{\text{Pr}} \times c_{\text{Pr}}$$

$$A_{\text{Is}} = f_{\text{Is}} \times c_{\text{Is}}$$

# Innerer Standard

- Mit  $k = \frac{f_{Pr}}{f_{Is}}$

- gilt dann

$$\frac{c_{pr}}{c_{is}} k = \frac{A_{pr}}{A_{is}}$$

$$c_{pr} = \frac{1}{k} \frac{A_{pr}}{A_{is}} c_{is}$$

# Innerer Standard

- Mit Hilfe des inneren Standards werden Fehler durch Probenvorbereitungsverluste oder messtechnische Fehler minimiert.

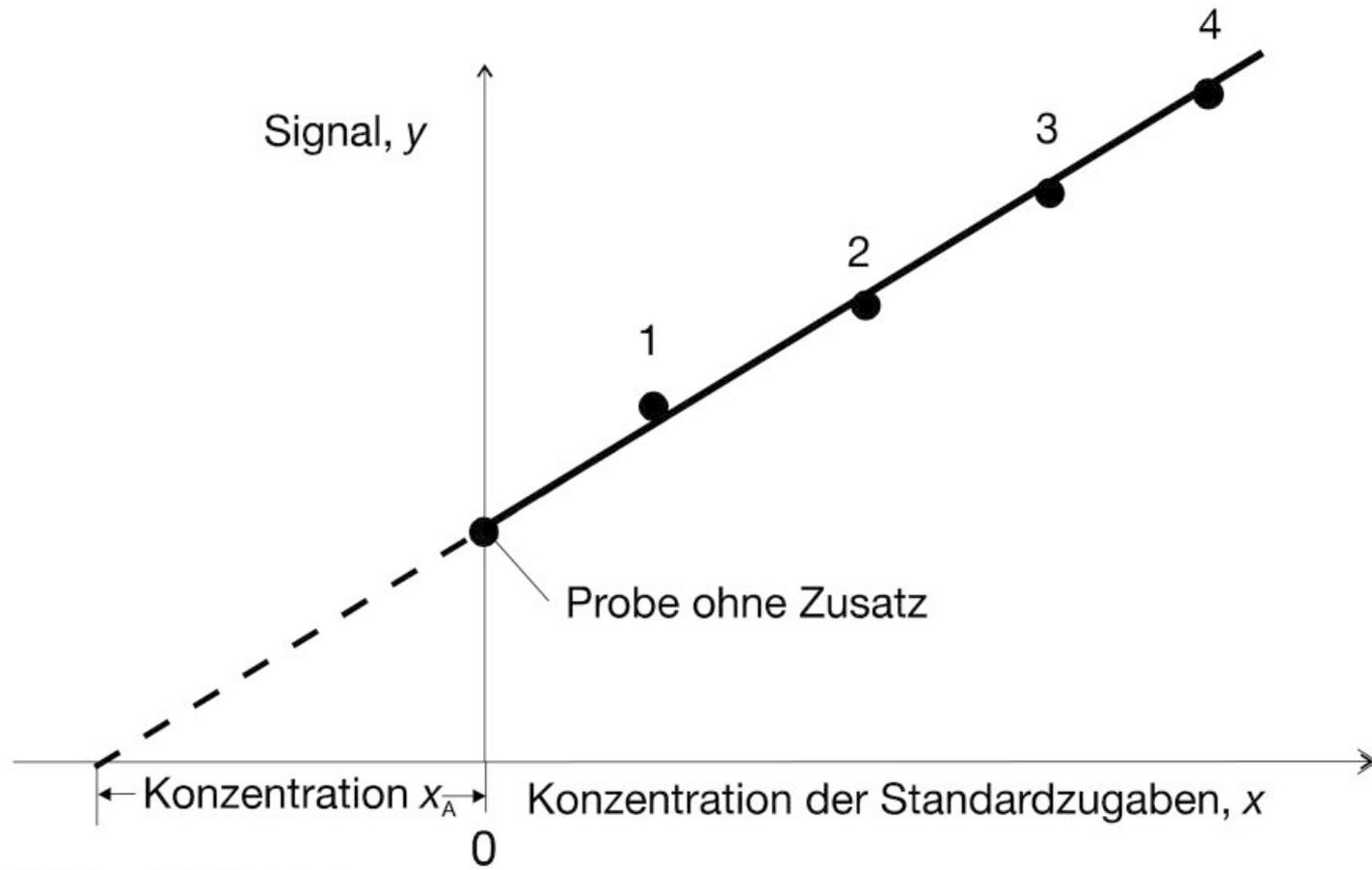
- Zur Rückstandsanalytik von 2,2',5,5'-Tetrachlorbiphenyl (TCB) in Eiern wird beim Erstellen einer Kalibrierkurve mit der entsprechenden fluorierten Verbindung (TFB) als Interner Standard gearbeitet. Für TFB kann ein analoger Responsefaktor wie für TCB angenommen werden.
- Aus einer Stammlösung von 500 µg/l TCB in Isooktan entnimmt man fünfmal je 1ml und füllt auf 2, 5, 10, 25 und 50 ml auf. Man überführt aus den Kalibrierlösungen (einschließlich der Stammlösung) jeweils 500µl in ein GC Vial und gibt überall 500µl einer TFB Lösung der Konzentration 100µg/l zu. Die Messung ergibt folgende Werte, alle in rel.counts:
 

• Messwert TCB (in 10 <sup>6</sup> counts)	Messwert TFB(in 10 <sup>6</sup> counts)
• 16 8,3 3,2 1,8 0,5 0,4	3,2 3,2 3,2 3,2 1,9 3,2
- Für die eigentliche Analyse werden 1kg Eigelb bei der Extraktion 0,5ml der Lösung des Internen Standards zugegeben, die Messung des Extrakts, der auf 1ml reduziert wurde, zeigt für TCB 4\*10<sup>6</sup>counts und für den IS 2,5\*10<sup>6</sup> counts.
- Erstellen sie die Kalibrierkurve und ermitteln sie an Hand dieser die TCB Konzentration im Ei in ppt.

# Standard-Addition

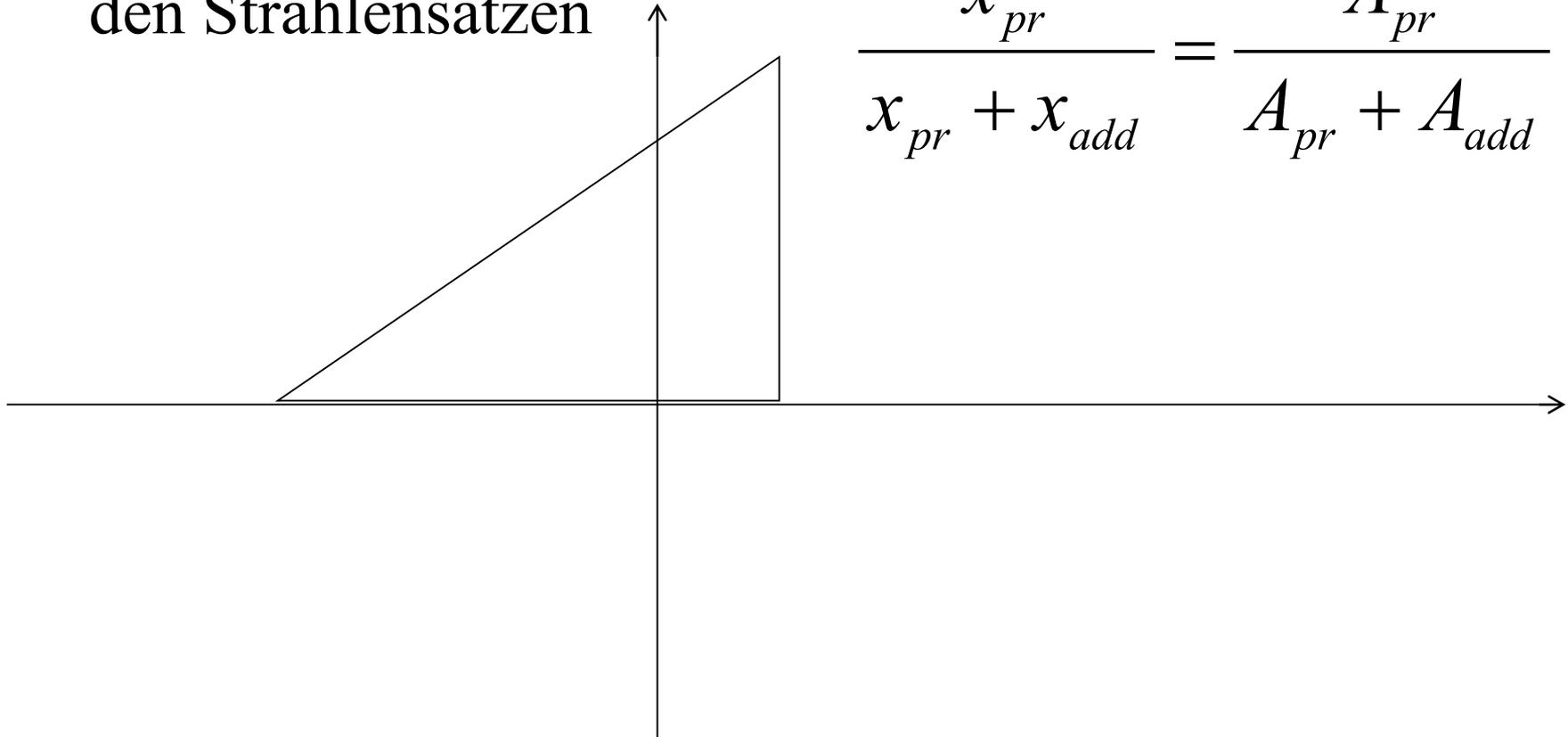
- Keine separate Kalibrierkurve
- Probe wird mit definierten Konzentrationen des Analyten aufgestockt
- Graphische Auswertung
- **Minimiert Matrixeinflüsse**

# Standard-Addition



# Standard-Addition

- Die Auswertung folgt den Strahlensätzen



$$\frac{x_{pr}}{x_{pr} + x_{add}} = \frac{A_{pr}}{A_{pr} + A_{add}}$$

# Fehlerquellen

- Während des Analytischen Prozesses lauern überall Fehlerquellen:

<i>Analyse</i>	Probenahme	Auf- bewahrung	Vor- bereitung	Einwaage	Auf- schließen Lösen Anreichern Abtrennen	Bestimmen
<i>Fehler- quellen</i>	<b>Inhomo- genität</b> <b>Blindwerte durch Gerät</b>	<b>Proben- veränderung</b> <b>Blindwerte durch Gerät</b>	<b>Analyten- verluste</b> <b>Blindwerte</b> <b>Inhomo- genität</b>	<b>Wägefehler</b> <b>Inhomo- genität</b>	<b>Blindwerte:</b> <b>Reagenzien, Luft, Gefäß</b> <b>Verluste:</b> <b>Adsorption, Verflüchti- gung</b>	<b>Meßfehler</b> <b>Kalibrier- fehler</b>

# Fehlerquellen

- Für jedes (quantitative) analytische Verfahren muss die mögliche Genauigkeit abschätzbar sein.
- Daten unbekannter Verlässlichkeit sind wertlos.

# Präzision = Wiederholungsgenauigkeit

- Die Präzision ist ein Maß für den nicht systematischen Fehler (*Zufallsfehler*)
- Sie definiert die Reproduzierbarkeit von Analyseergebnissen
- Präzision kann durch Wiederholungen der Messung bestimmt werden

# Gütezahlen der Präzision

- Mittelwert
- Absolute Standardabweichung
- Varianz
- Relative Standardabweichung /  
Variationskoeffizient

# Mittelwert

$$\bar{y} = \frac{\sum_{i=1}^n y_i}{n}$$

Der Mittelwert ist das Mittel eines endlichen Datensatzes aus  $n$  Messungen.

Für  $n \rightarrow \infty$  wird er zum Erwartungswert

# Standardabweichung/Varianz

- Die Standardabweichung  $s$  ist ein Maß für die Streuung der Messwerte um den Mittelwert.

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}{n-1}}$$

Die Varianz  $s^2$  ist das Quadrat der Standardabweichung

# Standardabweichung/Varianz

- Je geringer die Standardabweichung desto enger gruppieren sich die Messwerte um den (wahren) Mittelwert.
- Die Präzision der Messung nimmt mit abnehmendem  $s$  zu.

# Variationskoeffizient

- Wird die Standardabweichung auf den Mittelwert bezogen erhält man die relative Standardabweichung (RSD) auch Variationskoeffizient (CV) genannt

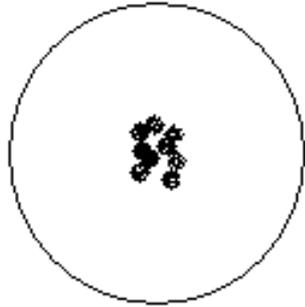
$$s_r = \frac{s}{y} \times 100\%$$

# Richtigkeit = Messgenauigkeit

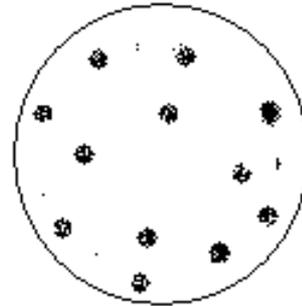
- Die *systematische* Abweichung des Mittelwerts der Analyse vom wahren Wert definiert die Richtigkeit der Methode.
- **Die absolute Richtigkeit ist eine fiktive Größe**, da niemand den wahren Wert einer Analyse kennt!

# Überprüfung der Richtigkeit

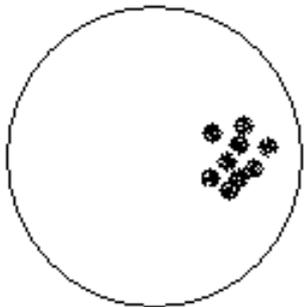
- Im einfachsten Fall: Vergleich mit zertifiziertem Material (Standardreferenzen)
- Ergebnisvergleich unterschiedlicher Methoden
- Ringversuche / Wiederfindungsraten



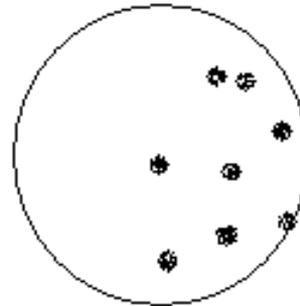
Präzise und richtig



Unpräzise und richtig



Präzise und falsch



Unpräzise und falsch

# Absoluter und relativer Fehler

- Der absolute Fehler der Konzentrationsbestimmung wird als Differenz des Mittelwerts  $\hat{y}$  der zu bestimmenden Größe
- **von einem allgemein akzeptierten Wert  $y_t$**  (true value) ausgedrückt
  - $E_a = \hat{y} - y_t$
- Relativer Fehler :
  - $E_r = (\hat{y} - y_t) / y_t * 100\%$

# Absoluter und relativer Fehler

- Geht bei genügend großem Datensatz  $\hat{y}$  gegen  $y_t$  wird  $E_a$  null.
- Als genügend wird allgemein  $n=20$  angenommen.

# Fehleraddition

- Der Gesamtfehler des Analysenwerts  $y_i$  ist die Summe der zufälligen und systematischen Abweichungen
  - $E_i = (y_i - \hat{y}) + (\hat{y} - y_t)$

# Fehleraddition

- Neben dem zufälligen und systematischen Fehler gibt es eine dritte Art:

## **Der grobe Fehler**

- Ausgelöst durch *mangelnde Sorgfalt, Ungeschicklichkeit oder Bequemlichkeit*. Im Datensatz erscheint der grobe Fehler als Ausreißer.

# Selektivität

- Selektivität definiert die Beeinflussung des Analysenprinzips (Messmethode) durch Begleitstoffe (Matrixelemente)
- Vollständig selektive Methoden sind selten. I.d.R. müssen störende Komponenten abgetrennt werden

# Aufwand, Zeit und Kosten

- Unter betriebswirtschaftlichen Betrachtungen sind Aufwand, Zeit und Kosten zu minimieren
- Dabei sollen die Verfahren valide und robust sein