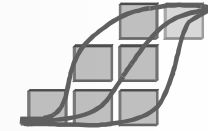


Glauben Sie Ihren Analysenwerten im Biomonitoring ?

**Einige Überlegungen
zur Qualität
von Analysendaten
und Auswertegrößen**

**Reinhard Kostka-Rick
Biologisch Überwachen
und Bewerten
D-70771 Echterdingen**





Inhalt

Qualitätsicherung im
Biomonitoring:

Fehlerursachen

Probenaufbereitung
und Homogenität

Analytik:
Richtigkeit und
Präzision

Quellen: Markert +
Klausmeyer 1990
Markert 1993

Workshop
"Biomonitoring mit
Höheren Pflanzen"
Linz 27./28.11.2008

Probenahme

- räumliche Variabilität
- Variabilität zwischen Individuen
- saisonale Variabilität

bis zu **1000 %**

Biomonitoring: relevant

(v.a. im passiven
Biomonitoring),
aber: durch
Richtlinien
(z.B. VDI) etc.
minimiert

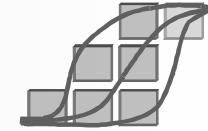
100-300%

Probenaufbereitung

- (waschen), trocknen
- homogenisieren
- veraschen, ...

2-20%

Instrumentelle Messung



Inhalt

Qualitätsicherung im
Biomonitoring:

Fehlerursachen

Probenaufbereitung
und Homogenität

Analytik:
Richtigkeit und
Präzision

Probenahme / Ernte

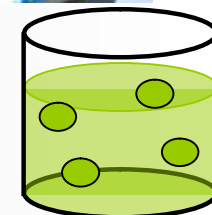
Kontaminationen z.B. durch

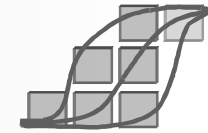
- Erde / Substrat
- Werkzeug und Behälter
- andere Proben (Querkontamination)
vermeiden



Probenaufbereitung

- Verlust von Analyten und/oder Kontamination
v.a. bei der Trocknung
- Kontamination bei Zerkleinerung (Mahlen)
- Inhomogenität (unterschiedliche Korngrößen
repräsentieren z.T. unterschiedliche Gewebe
mit evtl. unterschiedlichen Stoffgehalten)
⇒ sorgfältig Mischen
⇒ Probenentnahme (aus Gesamtprobe) stets
in mehreren, räumlich gut verteilten Teilproben





Inhalt

Qualitätsicherung im
Biomonitoring:

Fehlerursachen

Probenaufbereitung
und Homogenität

Analytik:
Richtigkeit und
Präzision

CRM =
Certified
Reference
Material

Workshop
"Biomonitoring mit
Höheren Pflanzen"
Linz 27./28.11.2008

Fehler bei der Analytik [1]

"Genauigkeit" als Überbegriff

"Richtigkeit"

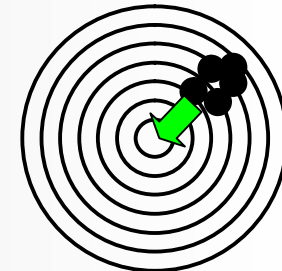
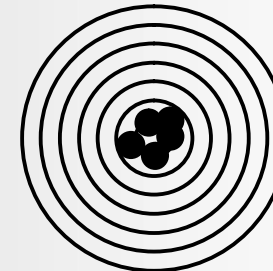
Grad der Übereinstimmung zwischen Durchschnittswert der Messungen mit akzeptiertem Referenzwert ("wahrer Wert")

"Präzision" (Wiederholbarkeit, Reproduzierbarkeit)

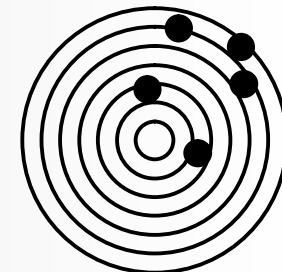
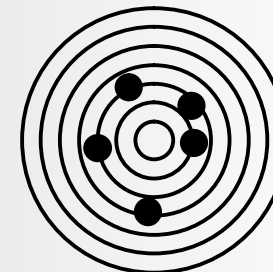
Grad der Übereinstimmung zwischen unabhängigen Analysenwerten und gleichen oder veränderten Messbedingungen

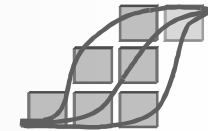


zertifiziertes Standard-
Referenzmaterial CRM



wiederholte Analytik
von Standard-
Referenzmaterial oder
'anonymen' Parallelen
(müssen homogen sein !)





Inhalt

Qualitätsicherung im
Biomonitoring:

Fehlerursachen

Probenaufbereitung
und Homogenität

Analytik:
Richtigkeit und
Präzision

Fehler bei der Analytik [2]

"Empfindlichkeit"

Änderung im Ansprechen einer Messvorrichtung /
korrespondierende Änderung des Stimulus (Analytgehalt)

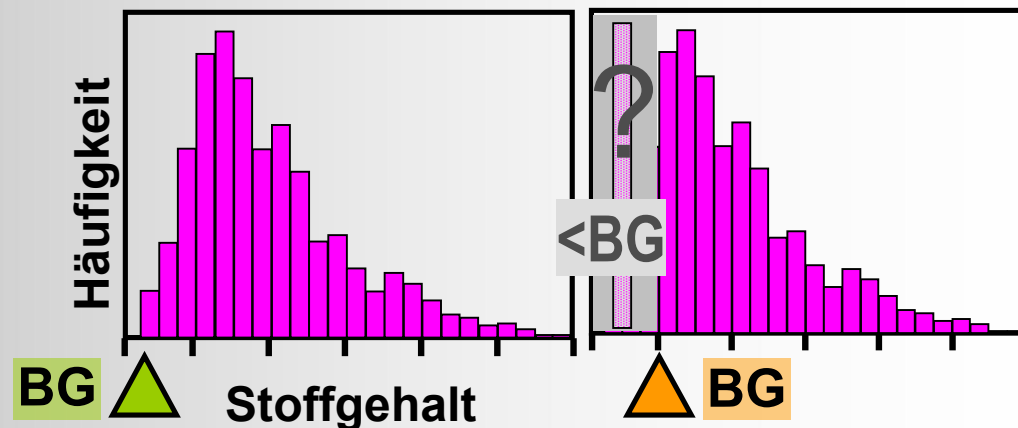
⇒ Steilheit der Kalibriergeraden

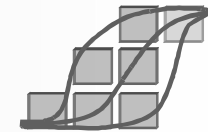
aber auch: sichere Unterscheidung von Störungen
("Hintergrundrauschen")



analytische
Bestimmungs-
grenze (BG)

sollte **niedriger** sein als der
Hintergrundwert (Erfahrungswerte)
z.B. 5-Perzentil aller Hintergrundwerte





Inhalt

Qualitätsicherung im
 Biomonitoring:

Fehlerursachen

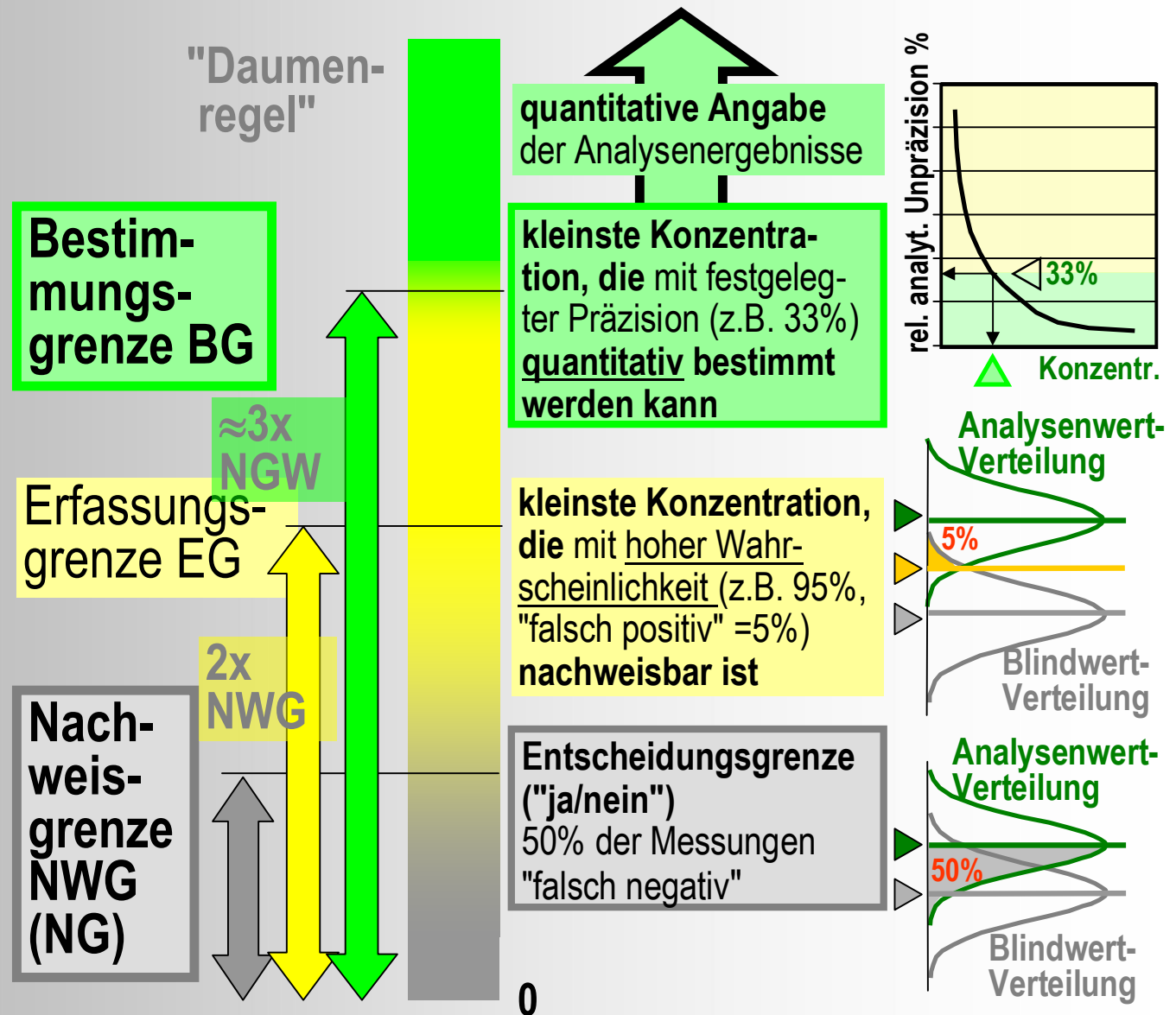
Probenaufbereitung
 und Homogenität

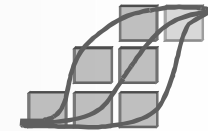
Analytik:
 Richtigkeit und
 Präzision

Nachweisgrenze
 Bestimmungsgrenze
 und andere
 Kenngrößen

Quellen: UBA 2003
 Federspiel 2006
 DIN 32645

Workshop
 "Biomonitoring mit
 Höheren Pflanzen"
 Linz 27./28.11.2008





Inhalt

Qualitätsicherung im
Biomonitoring:

Fehlerursachen

Probenaufbereitung
und Homogenität

Analytik:
Richtigkeit und
Präzision

IAEA International
Atomic Energy
Agency

Quelle: Heller-Zeisler ++ 1999
IAEA/AL/079
NAHRES-33

Workshop
"Biomonitoring mit
Höheren Pflanzen"
Linz 27./28.11.2008

"Richtigkeit" = Übereinstimmung
mit "wahrem Wert"

Beispiel: **Standard-Referenzmaterial**
IAEA-336 "Lichen Material"

- sammeln (manuell) ≈ 25 kg
- waschen (deion. Wasser)
- trocknen (40°C)
- mahlen (Teflon-Mühle)
- sieben $<125 \mu\text{m}$
- mischen (in Plastiktrommel)



vermeiden von
Kontaminationen
v.a. durch Metalle



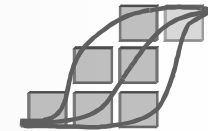
Evernia prunastri
Eichen"moos" (Portugal)

- 800 Einzelportionen (je 20 g)
- Bestrahlung (^{60}Co) zur Sterilisation

Homogenitätstest

- 20 Einzelportionen (je 2 Teilproben je 100 mg)
- Homogenität (für K, Na, Mn, Br, As, La, Sm, Ca, Fe, Sr, Zn):
Standardabw. 6% (3-10%), davon 4% durch Inhomogenität
 \Rightarrow 5% "Unsicherheitszuschlag" durch Inhomogenität

Mindest-
probenmenge: 100 mg



Inhalt

Qualitätsicherung im
Biomonitoring:

Fehlerursachen

Probenaufbereitung
und Homogenität

Analytik:
Richtigkeit und
Präzision

Quelle: Heller-Zeisler ++ 1999
IAEA/AL/079
NAHRES-33

Workshop
"Biomonitoring mit
Höheren Pflanzen"
Linz 27./28.11.2008

Beispiel: Standard-Referenzmaterial IAEA-336 "Lichen Material"



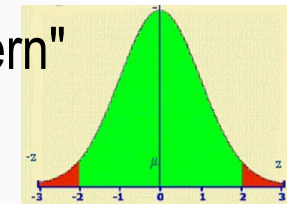
Laboranalytik (Laborvergleich, Ringanalytik)

- 42 Labors in 26 Ländern
- bis zu 47 Elemente (Makro-, Mikro-, Spurenelemente)
- ≤ 32 Bestimmungsmethoden (incl. Varianten)
- Probeneinwaage ≥ 100 mg
- ≥ 3 (-6) unabhängige Bestimmungen

Ergebnisauswertung: Ermittlung von "Ausreißern"

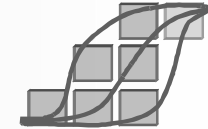
4 statistische Tests:

- Ausreißertests nach DIXON und nach GRUBBS
- Schiefe (skewness) und Steilheit (kurtosis) → Normalverteilung



aus akzeptierten Messdaten (Labormittelwerten):

- arithmetischer Mittelwert (Gesamtmittelwert)
- Standardabweichung, Standardfehler des Mittelwertes
- 95%-Vertrauensintervall des Mittelwertes



Inhalt

Qualitätsicherung im
Biomonitoring:

Fehlerursachen

Probenaufbereitung
und Homogenität

Analytik:
Richtigkeit und
Präzision

Quelle: Heller-Zeisler ++ 1999
IAEA/AL/079
NAHRES-33

Workshop
"Biomonitoring mit
Höheren Pflanzen"
Linz 27./28.11.2008

Beispiel: **Standard-Referenzmaterial
IAEA-336 "Lichen Material"**

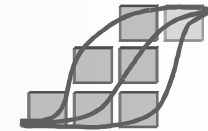


Kriterien für **"Empfohlene Werte"** bzw.
"Informationswerte"

- ≥ 2 unabhängige analytische Methoden
- keine statistisch signifikante Abweichung ('bias') zwischen den analytischen Methoden
- Gesamtmittelwert aus ≥ 10 / ≥ 5 akzeptierten Labormittelwerten
- Anteil als Ausreißer verworfener Labormittelwerte $\leq 20\%$ / $\leq 30\%$
- Relative Standardabweichung $\leq 20\%$ (für Mikro- und Spurenelemente) bzw. $\leq 10\%$ (für Makroelemente $> 500 \mu\text{g/g}$) / $\leq 30\%$

"Empfohlene Werte" für As, Ba, Br, Ce, Co, Cs, Cu, Fe, Hg, K,
La, Mn, Na, Sb, Se, Sm, Sr, Th, Zn (N=19)

"Informationswerte" für Al, Cd, Cl, Cr, Eu, Lu, Nd
P, Pb, Rb, Sc, Tb, V, Yb (N=14)

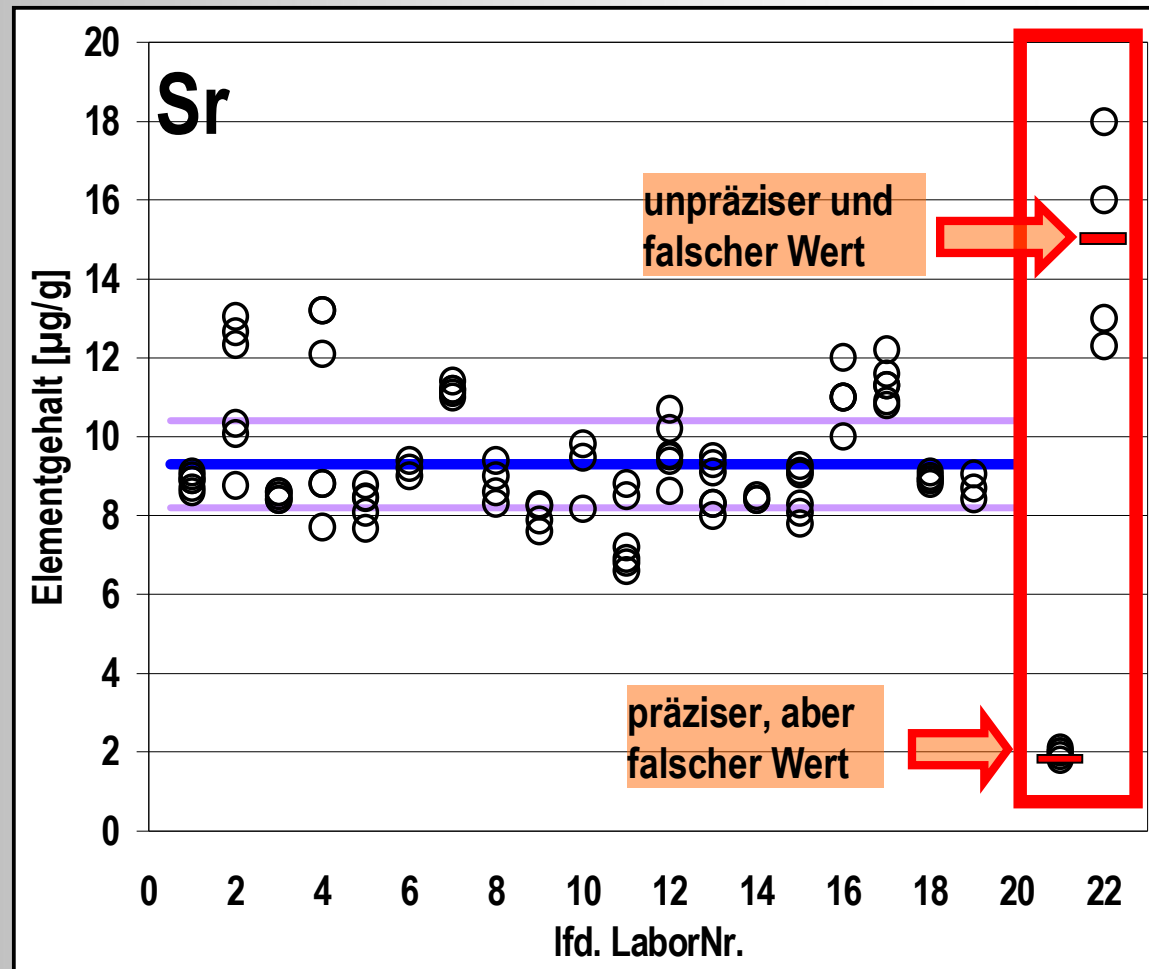


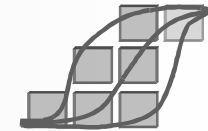
Beispiel: Standard-Referenzmaterial IAEA-336 "Lichen Material"

Strontium (Sr)
empfohlener Wert
(arithm MW, 95% CI):
9,3 (8,2 - 10,4) $\mu\text{g/g}$
CV=11,8%

Quelle: Heller-Zeisler ++ 1999
IAEA/AL/079
NAHRES-33

Workshop
"Biomonitoring mit
Höheren Pflanzen"
Linz 27./28.11.2008





Beispiel: Standard-Referenzmaterial IAEA-336 "Lichen Material"

Blei (Pb)

Informationswert

(arithm MW, 95% CI):

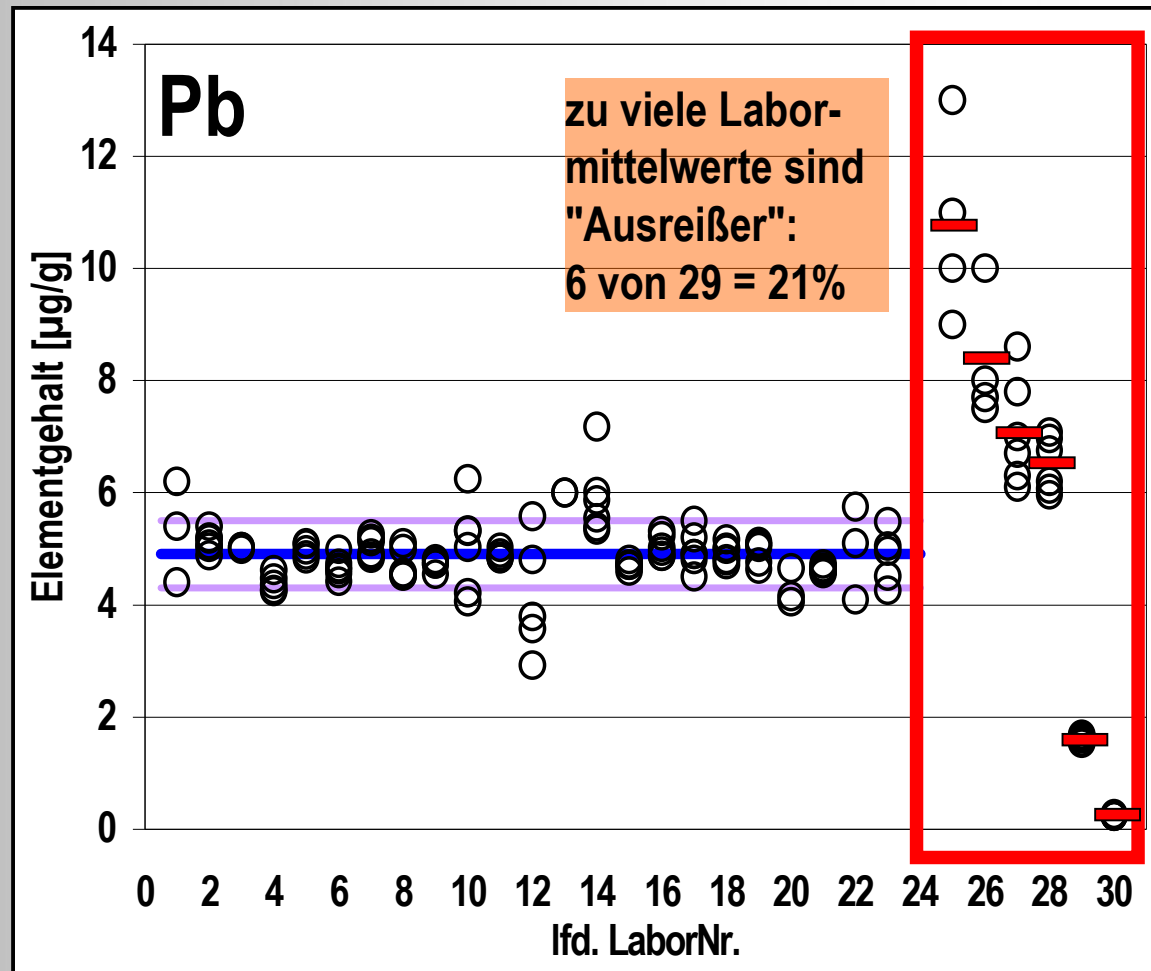
4,9 (4,3 - 5,5) $\mu\text{g/g}$

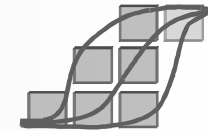
CV=8,6%

29 Labormittelwerte,
davon nur 23 im
akzeptablen Bereich
- diese aber mit sehr
geringer Streuung

Quelle: Heller-Zeisler ++ 1999
IAEA/AL/079
NAHRES-33

Workshop
"Biomonitoring mit
Höheren Pflanzen"
Linz 27./28.11.2008





Beispiel: Standard-Referenzmaterial IAEA-336 "Lichen Material"

Chrom (Cr)

Informationswert

(arithm MW, 95% CI):

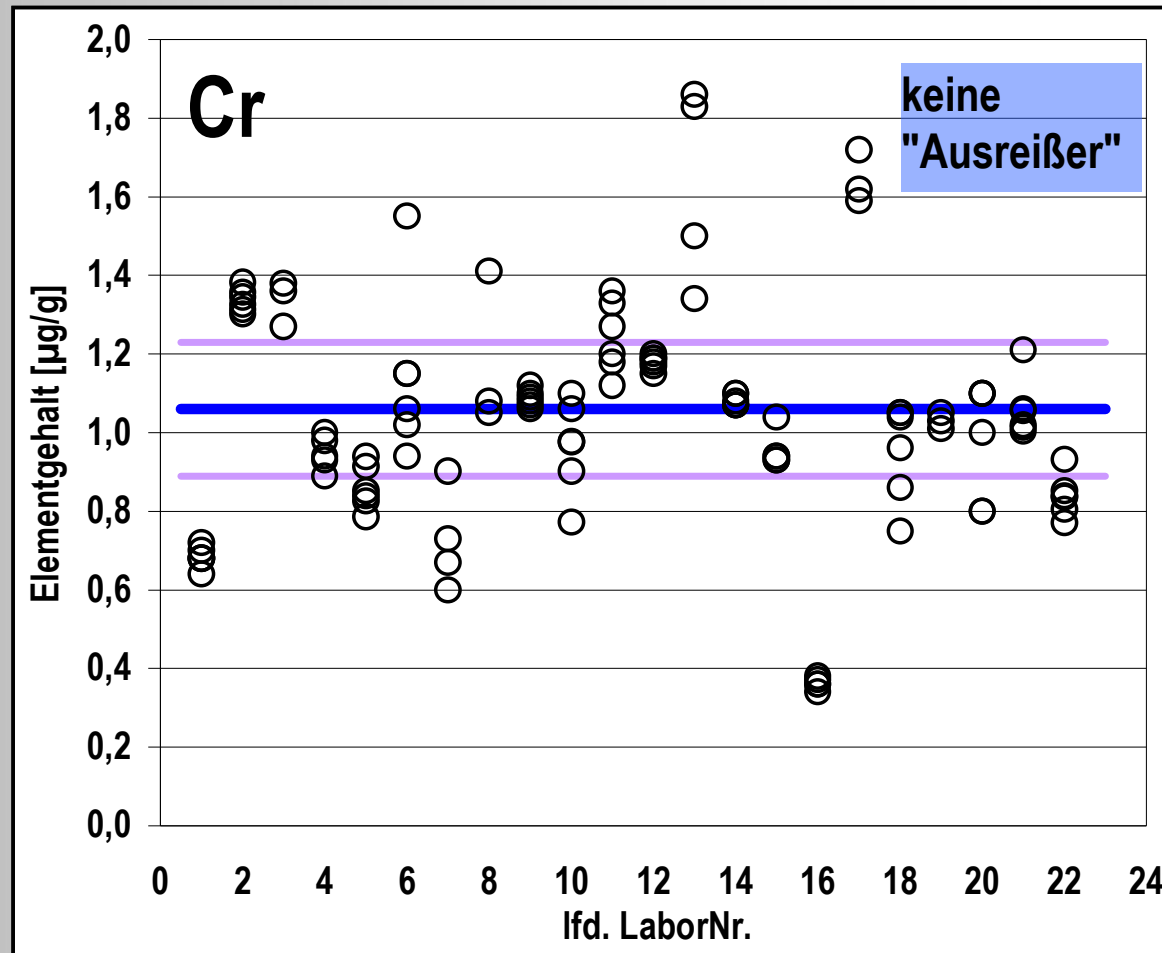
1,06 (0,89 - 1,23)

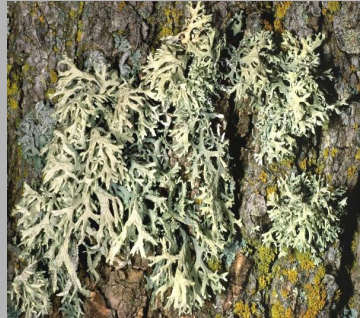
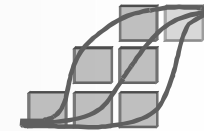
µg/g; CV=27,5%

**hohe Streuung, aber
keine Ausreißer
nach den gegebenen
Kriterien**

Quelle: Heller-Zeisler ++ 1999
IAEA/AL/079
NAHRES-33

Workshop
"Biomonitoring mit
Höheren Pflanzen"
Linz 27./28.11.2008





"Empfohlene Werte"
 für 19 Elemente

**Gehaltsangabe
 auf 2 (zwei !)
 signifikante Stellen
 genau**

Workshop
 "Biomonitoring mit
 Höheren Pflanzen"
 Linz 27./28.11.2008

**Standard-Referenzmaterial
 IAEA-336 "Lichen Material"**



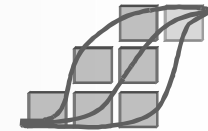
International Atomic Energy Agency
 Analytical Quality Control Services
 Wagramer Strasse 5, P.O.Box 100, A-1400 Vienna, Austria

REFERENCE SHEET

Recommended Values
 (Based on dry weight)

**Vertrauens-
 bereich**

Element	Recommended Value mg/kg	Confidence Interval* mg/kg	Vertrauens- bereich	N**
As	0.63	0.55 - 0.71	13%	17
Ba	6.4	5.3 - 7.5	17%	11
Br	12.9	11.2 - 14.6	13%	18
Ce	1.28	1.11 - 1.45	13%	13
Co	0.29	0.24 - 0.34	17%	19
Cs	0.110	0.097 - 0.123	12%	13
Cu	3.6	3.1 - 4.1	14%	21
Fe	430	380 - 480	12%	35
Hg	0.20	0.16 - 0.24	20%	15
K	1840	1640 - 2040	11%	24
La	0.66	0.56 - 0.76	15%	12
Mn	63	56 - 70	11%	29
Na	320	280 - 360	13%	20
Sb	0.073	0.063 - 0.083	14%	12
Se	0.22	0.18 - 0.26	18%	12
Sm	0.106	0.092 - 0.120	13%	15
Sr	9.3	8.2 - 10.4	12%	19
Th	0.14	0.12 - 0.16	14%	16
Zn	30.4	27.0 - 33.8	11%	38



"Empfohlene" Werte
bzw. zertifizierte
Werte für 12 - 55
Elemente (davon
≤6 Hauptnährstoffe)

Informationswerte
für weitere 4 - 20
Elemente

!! unterschiedliche
Qualität und Breite
der Datenbasis und
der Dokumentation!!

Standard-Referenzmaterialien (Höhere) Pflanzen

Lichen IAEA-336

Pine needles NIST-1575a

Apple leaves NIST-1515

Peach leaves NIST-1547

Bush branches and leaves NCS DC73348+9

Oriental tobacco leaves IC-CTA-OTL1

Virginia tobacco leaves IC-CTA-VTL2

Hay powder IAEA-V-10

Strawberry leaves LGC7162

Tomato leaves NIST-1573a

Cabbage NCS ZC73012

Spinach NCS ZC73013

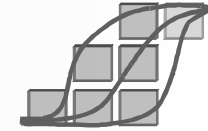
Tea leaves IC-INCT-TL-1

Tea NCS ZC73014

Mixed Polish herbs IC-INCT-MPH-2



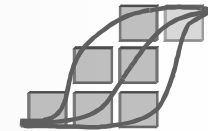
relativ hoher
Holzanteil !



Standard-Referenzmaterialien: Auswahlkriterien

Zur Überprüfung der Richtigkeit der Analysenwerte
auch: zur Überprüfung der Genauigkeit (Präzision)
bei ausreichender Anzahl von Werten

- ▶▶▶ 1. für alle / möglichst viele Elemente
zertifizierte / empfohlene / Informationswerte
- ▶▶▶ 2. Ähnliche Probenmatrix
(Gewebetyp, dominierende (Stör-?)Elemente, ...)
- ▶▶▶ 3. Qualität und Homogenität
⇒ Dokumentation, statistische Qualitätskriterien
- ▶▶▶ 4. Sollkonzentration möglichst im Bereich
der realen Probenwerte (oder darüber)
- ▶▶ 5. Mindestens 2 (oder 3) verschiedene
(aber geeignete !!) Standard-Referenzmaterialien ...
- ▶ 6. ... mit ausreichender Spannweite
zur Abdeckung realistischer Datenbereiche



Standard-Referenzmaterial: Auswahl [1]

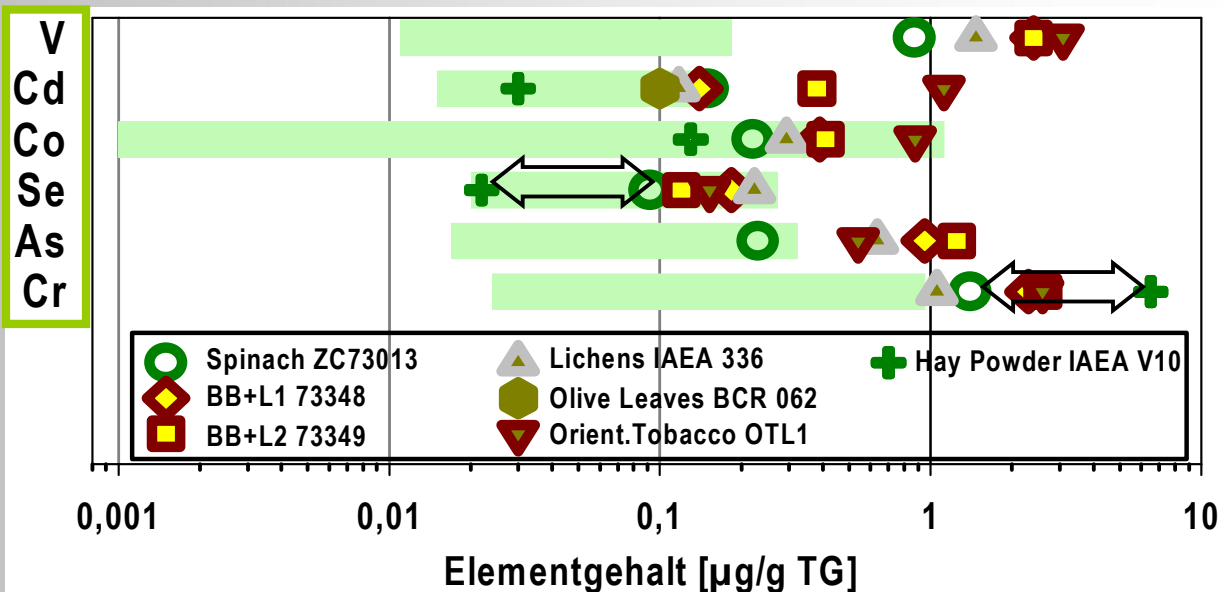
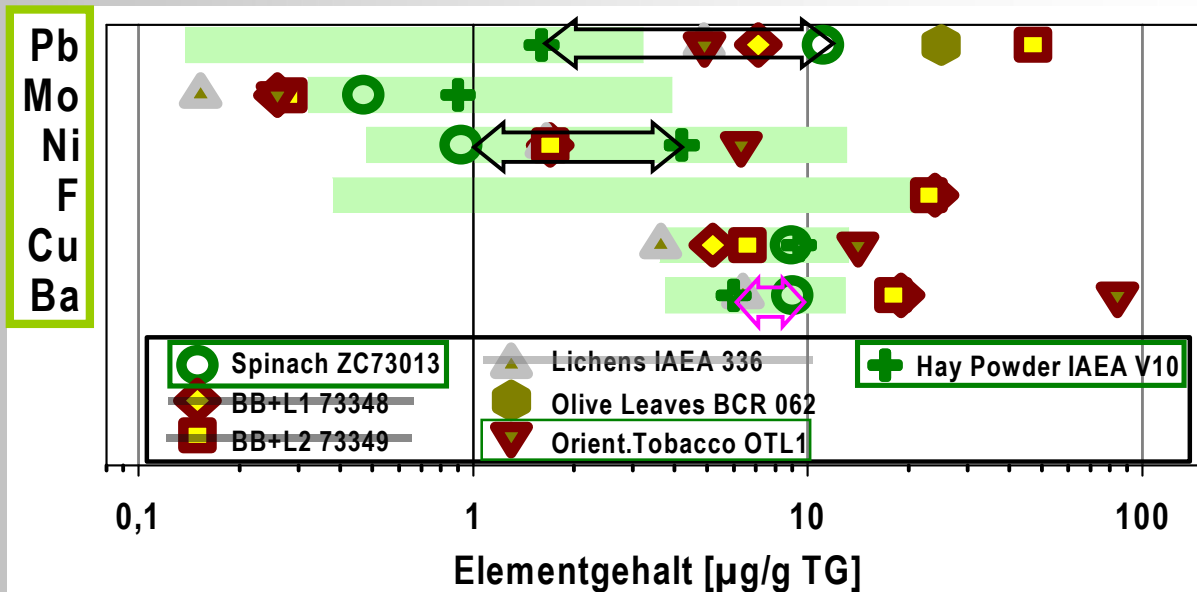
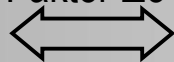
"1. für alle Elemente
 zertifizierte / empfohlene
 Werte"

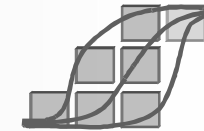
"2. ähnliche Proben-
 matrix" z.B. für Graskultur

"4. Sollkonzentration
 möglichst im Bereich
 realer Probenwerte"

hier: Graskultur-
 Hintergrundwerte
 (hellgrüne Balken)

"6. ausreichende Spann-
 weite zur Abdeckung
 realistischer Daten-
 bereiche" z.B. Faktor ≥ 3



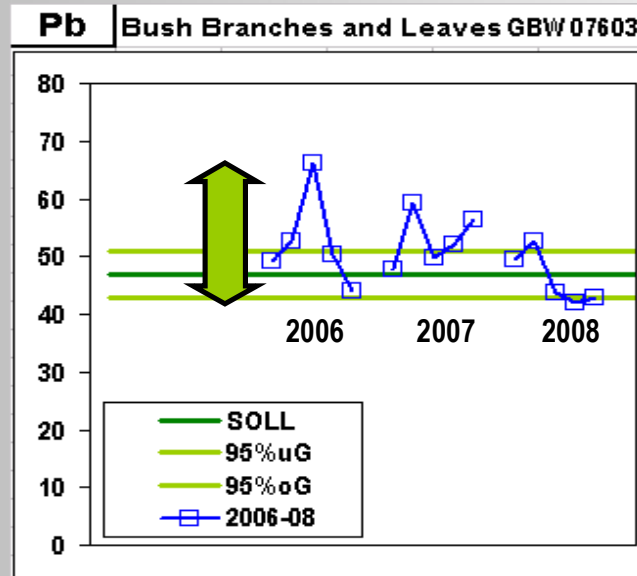


Standard-Referenzmaterial: Auswahl [2]

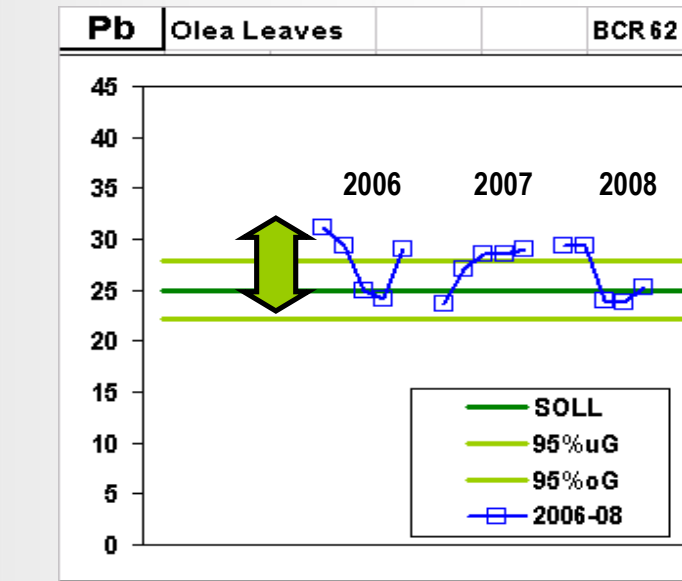
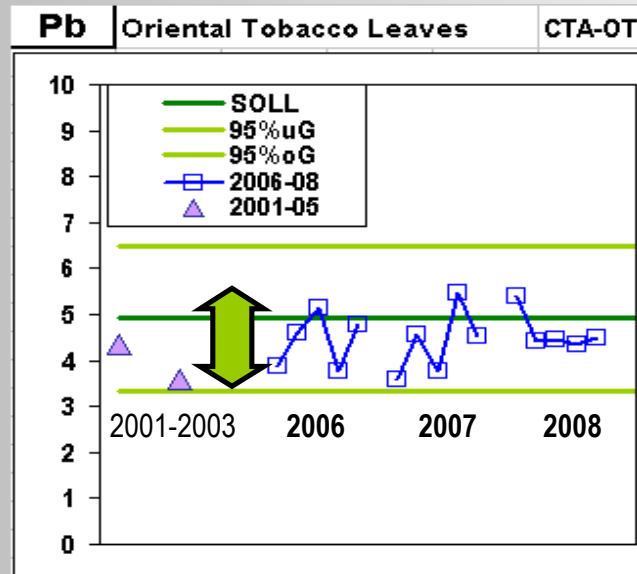
"3. Qualität und Homogenität"

hier: 3 Standard-Referenzmaterialien jeweils parallel zu 5 Graskulturserien/Jahr analysiert (2006-2008)

Blei (Pb)

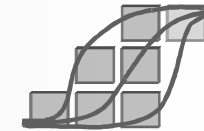


Bush Branches and Leaves GBW 07603
 107% ($\pm 14\%$)



Olive Leaves BCR62
 109% ($\pm 10\%$)

Oriental Tobacco Leaves CTA-OTL
 90% ($\pm 17\%$)

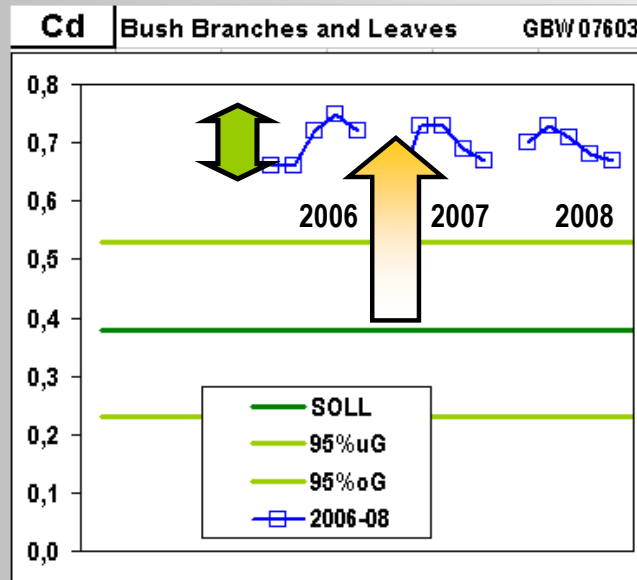


Standard-Referenzmaterial: Auswahl [3]

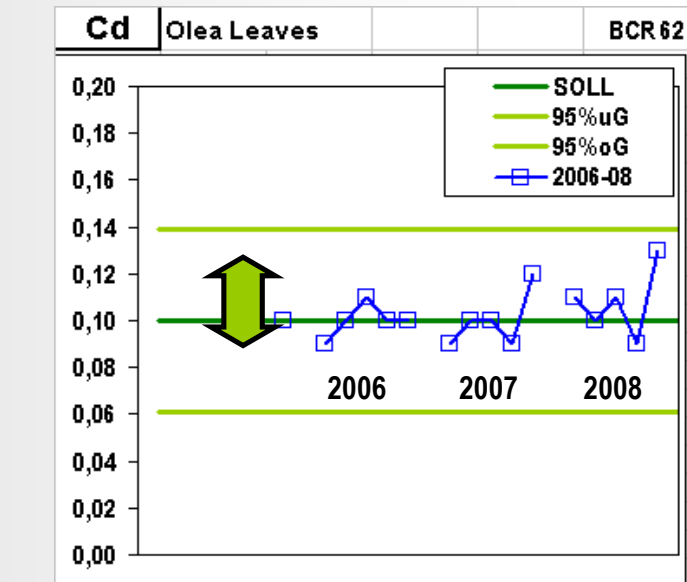
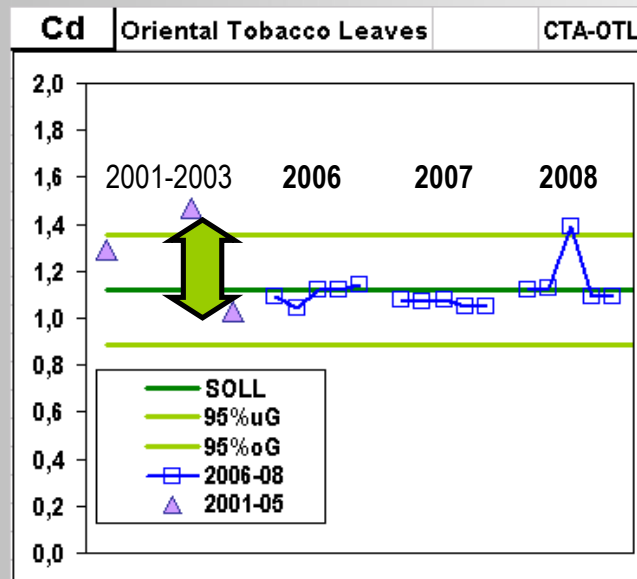
"3. Qualität und Homogenität"

hier: 3 Standard-Referenzmaterialien jeweils parallel zu 5 Graskulturserien/Jahr analysiert (2006-2008)

Cadmium (Cd)

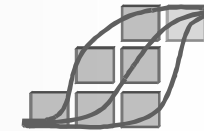


Bush Branches and Leaves GBW 07603
183% ($\pm 5\%$)



Olive Leaves BCR62
103% ($\pm 12\%$)

Oriental Tobacco Leaves CTA-OTL
101% ($\pm 12\%$)

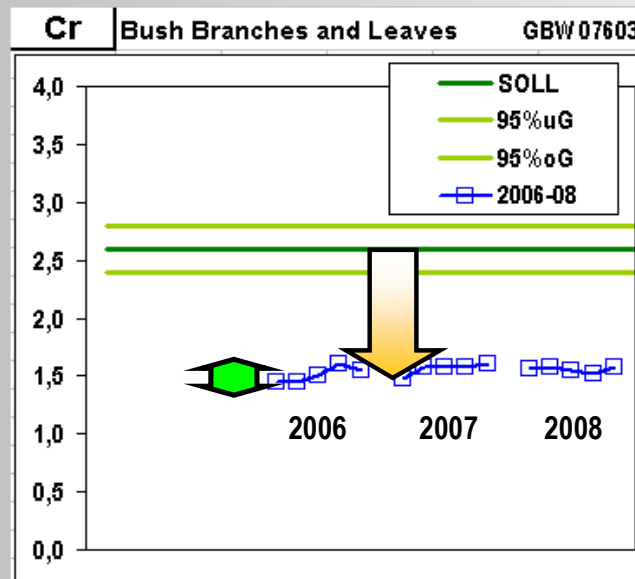


Standard-Referenzmaterial: Auswahl [4]

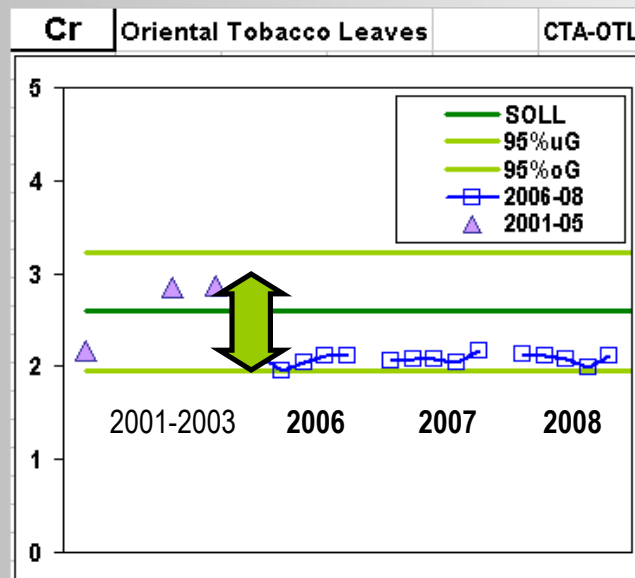
"3. Qualität und Homogenität"

hier: 3 Standard-Referenzmaterialien jeweils parallel zu 5 Graskulturserien/Jahr analysiert (2006-2008)

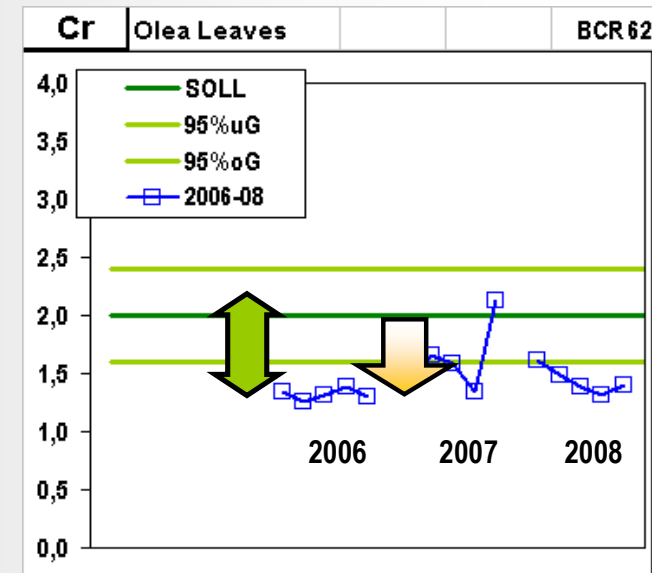
Chrom (Cr)



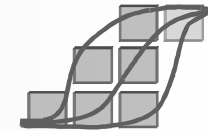
Bush Branches and Leaves GBW 07603
61% ($\pm 4\%$)



Oriental Tobacco Leaves CTA-OTL
83% ($\pm 8\%$)

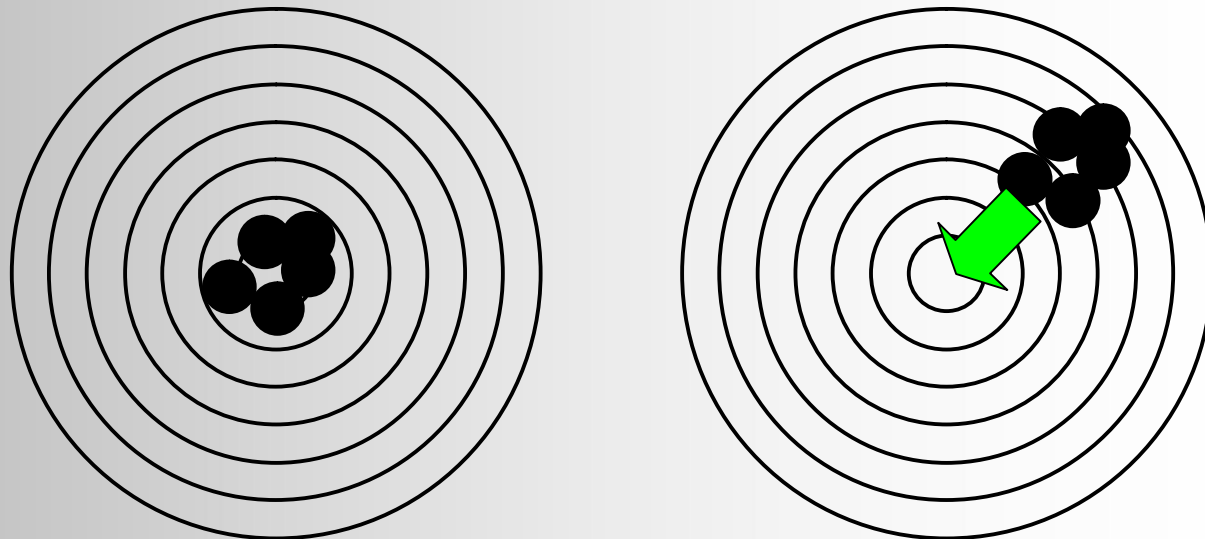


Olive Leaves BCR62
73% ($\pm 12\%$)

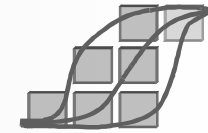


Standard-Referenzmaterialien

Überprüfung der Richtigkeit der Analysenwerte

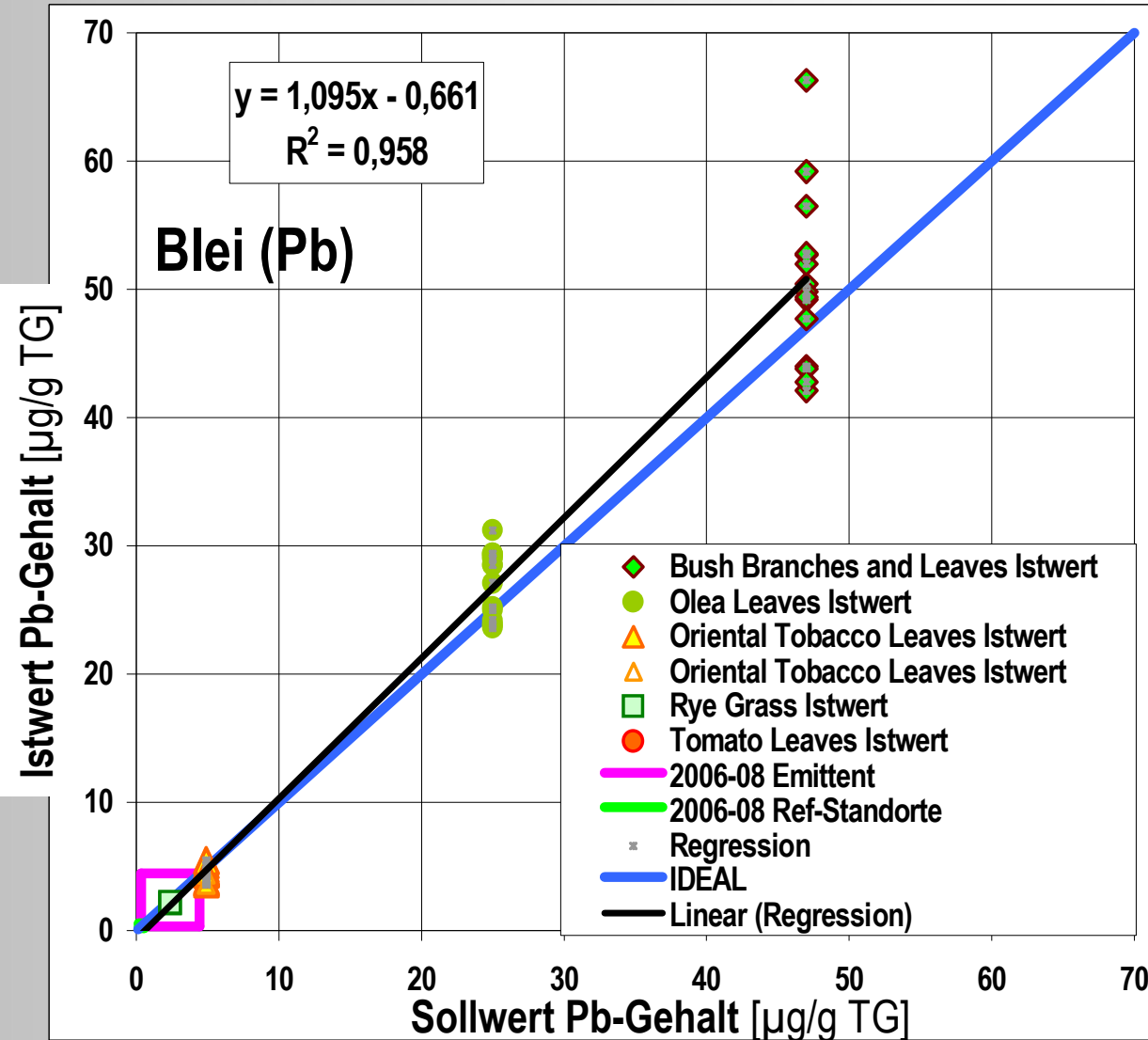


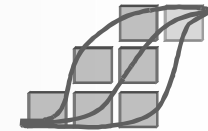
⇒ Korrekturen entsprechend den Abweichungen "Sollwert / Istwert" durchführen



Standard-Referenzmaterial

Einsatz parallel zur
Routineanalytik





Standard-Referenzmaterial

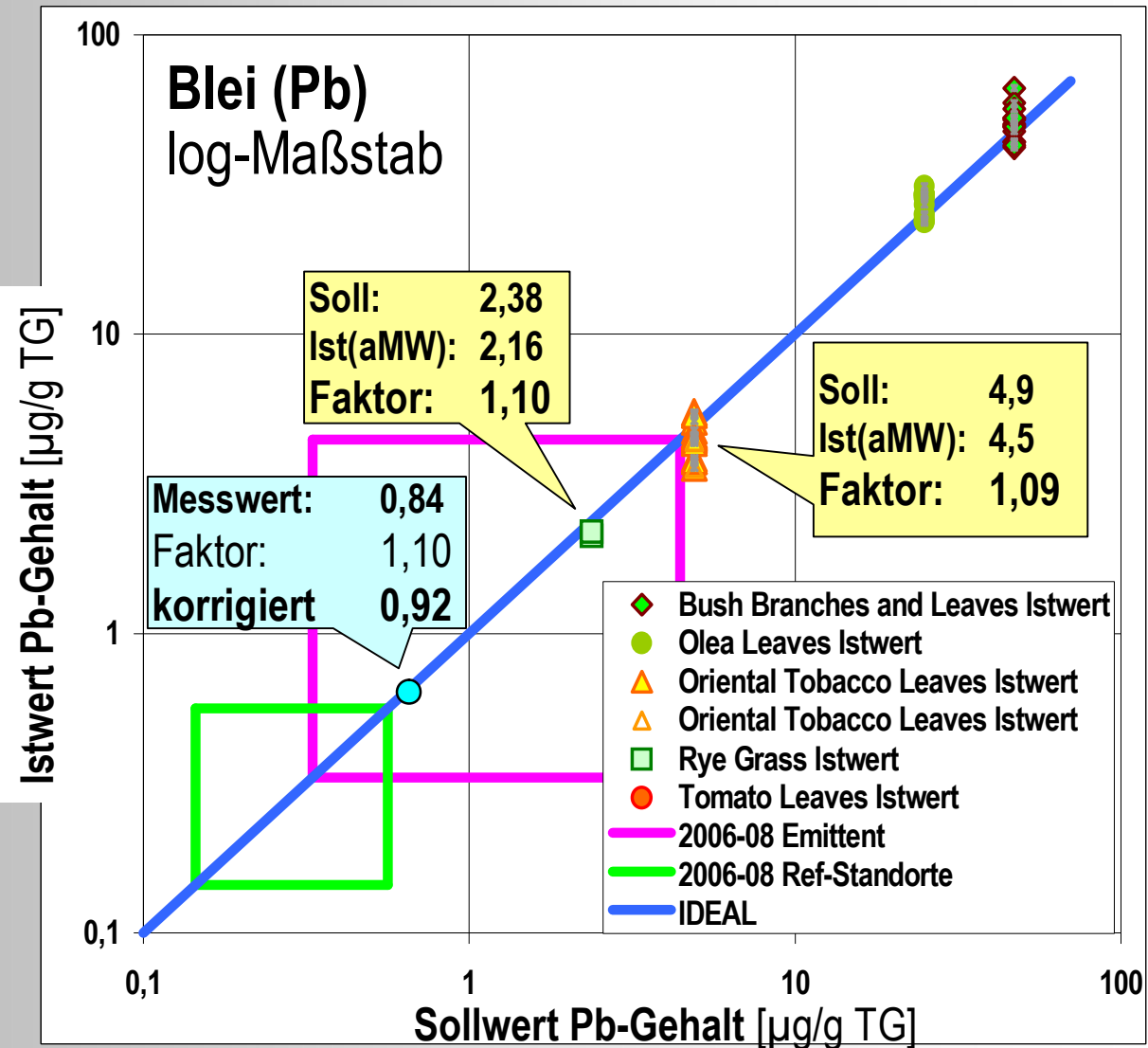
Korrektur

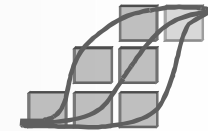
Einsatz parallel zur
 Routineanalytik

bei Pb quasi-ideale
 Übereinstimmung
 über einen relativ
 großen Wertebereich
 (2,4 - 47 µg/g)
 bei 4 verschiedenen
 Referenzmaterialien

ähnlich:
 Quecksilber (Hg)
 und Zink (Zn)

**Korrektur: Faktoren
 aus benachbarten
 Datenpunkten**



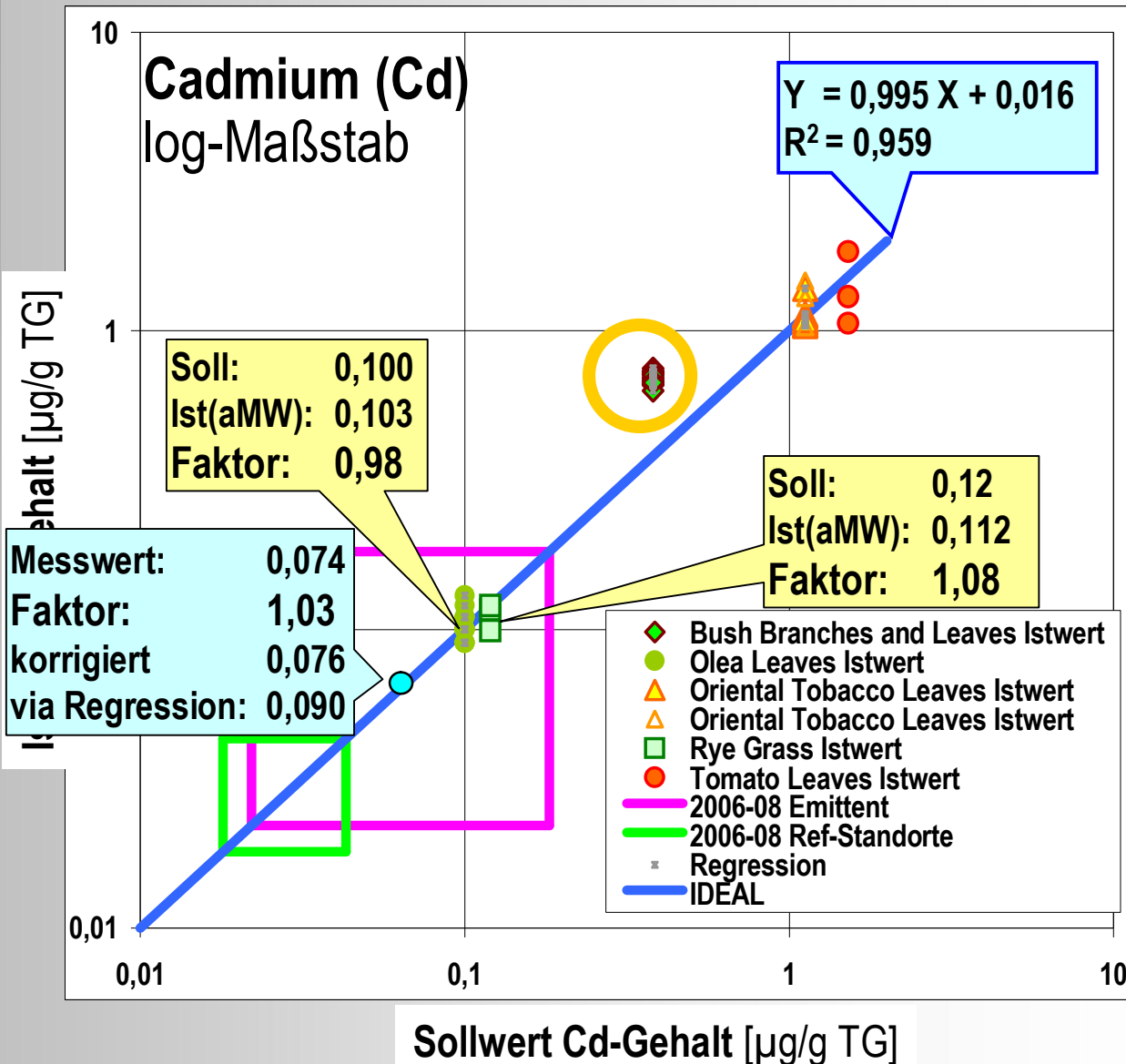


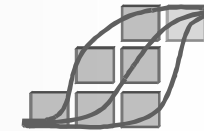
Standard-Referenzmaterial

Einsatz parallel zur
 Routineanalytik

bei Cd quasi-ideale
 Übereinstimmung
 über einen relativ
 großen Wertebereich
 (0,1 - 1,5 µg/g)
 bei 4 verschiedenen
 Referenzmaterialien

deutlich abweichende
 Ergebnisse von
 1 Referenzmaterial
nicht berücksichtigen





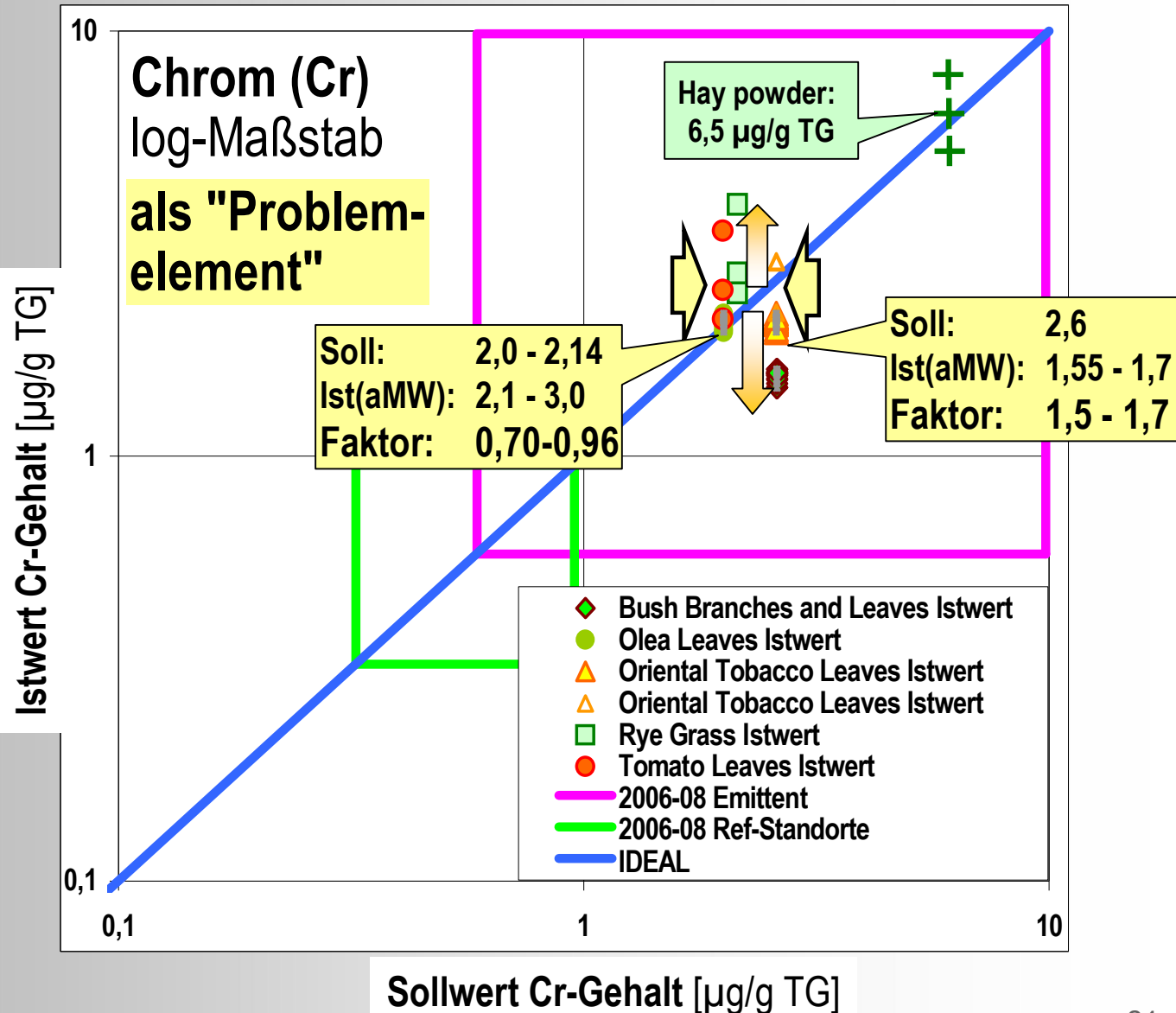
Standard-Referenzmaterial

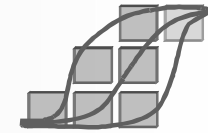
Einsatz parallel zur Routineanalytik

bei Cr im Durchschnitt von 5 verschiedenen Referenzmaterialien mäßig gute Übereinstimmung mit Sollwert

aber: z.T. deutliche systematische Abweichungen

sehr enger Wertebereich der Sollwerte: 2,0 - 2,6 µg/g





Fazit

Qualitätssicherung im Biomonitoring

Fehlerursachen: Probenahme ⇒ durch Richtlinien etc. minimiert

Probenaufbereitung

Kontamination, Verluste, Inhomogenität

Analytik

Richtigkeit, Präzision, Empfindlichkeit



Einsatz von Standard-Referenzmaterial (CRM)

- Elementespektrum möglichst voll abdecken
- ähnliche Probematrix (Gewebetyp, Störelemente)
- Qualität (Dokumentation!) und Homogenität
- ähnlicher Konzentrationsbereich wie reale Proben
- 2 (-3) verschiedene (aber geeignete !!) CRM

⇒ **routinemäßig zur laufenden Analytik einsetzen**
(alle 5 bis 10 Proben)

⇒ **Ergebnisse der CRM-Analytik**
(über Korrekturfaktoren) **auf reale Proben anwenden !!!**