Abbildung 3 (S. 354) zeigt die Massenspektren, die aus der Untersuchung eines Zellkulturüberstandes der hoch invasiven Brustkrebszelllinie MDA-MB₂₃₁ entstanden. Deutlich ist die Entwicklung von Signalen nach einer Inkubationszeit von 24 und 48 h zu erkennen. Die Analyse ergab im Zellkulturüberstand der MDA-MB₂₃₁-Zelllinie andere Signale als bei der MCF-7-Zelllinie.^{11,12)}

Sekretionsmuster oder -signaturen ausgehend von isolierten Tumorzellen erhöhen die Chance, beginnende Tumorerkrankungen im Blut nachzuweisen und verbessern so die Frühdiagnostik.

Jochen F. Peter, Bernhard Wolf
Heinz-Nixdorf-Lehrstuhl für
medizinische Elektronik
Angela Otto
Technische Universität München
Institut für Medizintechnik
peter@tum.de, wolf@tum.de
otto@tum.de
www.lme.ei.tum.de

- 1) C. Wa, R. Cerny, D. S. Hage, Anal. Biochem. 2006, 349, 229–241.
- 2) M. Gilar, E. S. P. Bouvier, B. J. Compton, J. Chrom. A 2001, 909, 111–135.
- 3) I. I. Stewart, T. Thomson, D. Figeys, Rapid Commun. Mass Spectrometry 2001, 15, 2456–2465.
- 4) S. Locke, D. Figeys, Anal. Chem. 2000, 72, 2684–2689.
- 5) N. S. Tannu, J. Wu, V. K. Rao, H. S. Gadgil, M. J. Pabst, I. C. Gerling, R. Raghov, Anal. Biochem. 2004, 327(2), 222–232.
- 6) K. D. Speicher, O. Kolbas, S. Harper, D. W. Speicher, J. Biomol. Tech. 2000, 11, 74–86.
- 7) R. P. Blakemore, Science 1975, 190, 377–379.
- 8) A. Komeili, Annu. Rev. Biochem. 2007, 76, 351–66.
- 9) X. Zhang, Sau. M. Leung, C. R. Morris, M. K. Shigenaga, J. Biomol. Tech. 2004, 15, 167–175.
- 10) J. Villanueva, A. J. Martorella, K. Lawlor, J. Philip, M. Fleisher, R. J. Robbins, P. Tempst, Mol. Cell Proteomics 2006, 5, 1840–1852.
- 11) J. F. Peter, A. M. Otto, I. Szabados, B. Wolf, Biospektrum, 2007, 4, 376–379.
- 12) J. F. Peter, A. M. Otto, B. Wolf, J. Biomol. Tech. 2007, 18, 287–297.

Systematisch Fehler finden

Die Messunsicherheit eines komplexen Analysenverfahrens lässt sich mit Softwareunterstützung einfach und schnell beziffern – wie die Bestimmung von Di-n-butylphthalat in Polyvinylchlorid zeigt.

Die Frage, die sich jeder Analytiker stellen sollte, ist: Wie zuverlässig und aussagekräftig sind meine Analyseergebnisse? Dies ist insbesondere dann wichtig, wenn sicherheitsrelevante, gesundheitsrelevante oder juristische Entscheidungen zu fällen sind.¹⁾ Die Norm ISO/IEC/EN/DIN 17025(2005) als Richtlinie für akkreditierte Laboratorien fordert daher die Angabe der Messunsicherheit.

Warum aber ist die Angabe der Messunsicherheit so aufwendig? Ein relativ einfaches und häufig praktiziertes Verfahren gibt als Fehlerintervall (Fehlerbalken) des Analysenwertes seine Varianz als relative Standardabweichung des Analysenverfahrens an. Die Varianz wird z. B. als Wiederholbarkeit des Analysenverfahrens bei der

Methodenvalidierung bestimmt und ist der zufällige Fehler des Messverfahrens. Um die vollständige Messunsicherheit zu erhalten, ist dieser Wert jedoch um die unbekannten systematischen Fehler zu ergänzen.

Unbekannt und systematisch

Unbekannte systematische Fehler sind z. B. die Kalibrationsunsicherheiten der Analysengeräte oder Referenzsubstanzen: Hat letztere eine zertifizierte Reinheit von mindestens 99 %, beträgt das Unsicherheitsintervall 1 %, d. h. die Reinheit liegt zwischen 99 und 100 %. Ein 100-mL-Messkolben der Klasse ISO A hat ein Unsicherheitsintervall von ±0,1 mL und zwar bei 20 °C und Wasser als Flüssigkeit.

Abb. 1. Programmierassistent zur Eingabe der Messgleichung.

Ähnliche unbekannte systematische Fehler existieren für Waagen, Pipetten, Analysensysteme und Probenvorbereitungsverfahren. Die Zahl der verwendeten Analysengeräte und -systeme, Referenzsubstanzen und Probenvorbereitungsschritte sowie der zu berücksichtigenden Einflüsse (Temperatur, Feuchtigkeit, Luftdruck, Alter...) lässt erahnen, dass eine vollständige Beschreibung aller Unsicherheitseinflüsse und ihre Quantifizierung sehr aufwendig ist. Dies gilt insbesondere für absolute Messverfahren wie Volumenmessung und Einwiegen.

Bei relativen Messverfahren wie chromatographischen Techniken oder Elementanalyse ist die Situation einfacher, da hier meistens nur die Unsicherheit (die Stabilität) der Kalibration eine Rolle spielt.

Mit Fehlern rechnen

Die Messunsicherheit eines Analyseergebnisses ist die Kombination des zufälligen Fehlers mit den systematischen Fehlern des Analysenverfahrens sowie der Analysengeräte und Referenzsubstanzen.

Die relative Messunsicherheit wird wie die relative Standardabweichung angegeben: z. B. als $\pm 3,4\%$ für den 1σ -Fall (d. h. $\approx 67\%$ der Gauss-Kurve). Sie ist jedoch größer als die relative Standardabweichung. Dieser Wert bedeutet, dass der wahre Analysenwert mit

einer Wahrscheinlichkeit von 67% innerhalb des Fehlerintervalls von $\pm 3,4\%$ um den angegebenen Analysenwert zu finden ist. Wenn für eine zu treffende Entscheidung größere Sicherheiten erforderlich sind, muss das Vertrauensintervall auf 95% oder 99% Wahrscheinlichkeit (entspricht $\approx 2\sigma$ bzw. 3σ) erweitert werden. Die Messunsicherheit ist üblicherweise über den Arbeitsbereich einer Methode nicht konstant, sondern variiert.

Mit Unsicherheit arbeiten

Experten in chemischer Metrologie haben das Softwarewerkzeug Uncertainty Manager entwickelt. Es arbeitet auf Basis der Richtlinien Eurachem/Citac-Leitfaden „Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement“ und „ISO Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement“.

Die Software erleichtert die Dateneingabe, visualisiert die Einflussparameter, berechnet die Messunsicherheit und erstellt einen Report. Das System schlägt für viele Parameter und Einflussgrößen auf die Messunsicherheit Werte vor und bietet eine Datenbank zu Analysengeräten und Referenzsubstanzen und deren Spezifikationen. Damit ist auch für komplexe Analysenverfahren eine einfache und schnelle Bestimmung der Messunsicherheit möglich. →

Abb. 2.
Ablaufschema des Analysenverfahrens.

● QUERGELESEN

- » Das Softwarewerkzeug Uncertainty Manager bestimmt die Messunsicherheit von Analyseergebnissen.
- » Die Version 3.0 enthält Module für Chromatographie, Elementanalytik, Photometrie, Titration und die entsprechende Probenvorbereitung.
- » Die Software simuliert und minimiert die Messunsicherheit und unterstützt so die Entwicklung neuer Methoden.

Abb. 3. Ergebnis der Messunsicherheitsberechnung: Analysenwert, absolute und relative Messunsicherheit, Beiträge der Messunsicherheitseinflüsse.

Ein Weichmacher im Kunststoff

Ein Beispiel für komplexe Analysenverfahren ist die Bestimmung von Kunststoffbestandteilen. Der Weichmacher Di-n-butylphthalat in Polyvinylchlorid (PVC) wird nach Soxhlet-Extraktion mit HPLC-Einkalibration bestimmt.

Mit einem Programmierassistent mit entsprechenden Vorlagen wird die Gleichung der Messgröße eingegeben (Abbildung 1). Die Indices s und r stehen für Probe bzw. Referenz. A_s/A_r ist das HPLC-Peakflächenverhältnis von Probe und Referenz. Anschließend folgt in der Gleichung die

Einwaage, die Reinheit und das Auflösen der Referenz im Messkolben sowie ein weiterer Verdünnungsschritt mit Pipette (Index rp) und Messkolben (Index rf). Die Probe (s) wird eingewogen und dann extrahiert. Der Extrakt wird im Rotationsverdampfer eingengt und anschließend mit einem Messkolben aufgefüllt.

Zu jedem der Faktoren werden die entsprechenden Messgeräte (hier HPLC-System, Waage, Messkolben, Pipette) und Referenzsubstanzen mit ihrer Reinheit (hier Di-n-butylphthalat) aus der Datenbank ausgewählt. Die Software erstellt ein Ablaufschema für das Analysenver-

fahren, in das die Probenvorbereitungsschritte (hier Soxhlet-Extraktion, Einengen, Verdünnen) eingegeben werden (Abbildung 2). Hierbei wird die Gleichung der Messgrößen erweitert um

- den Faktor mprep, einen multiplikativen (also konzentrationsabhängigen) Unsicherheitsfaktor der Probenvorbereitung und
- den Korrekturfaktor Rec(overy) (Wiederfindung), ein bei der Methodenvalidierung bestimmter systematischer Fehler, dessen Wiederholbarkeit (relative Standardabweichung) als Messunsicherheit eingeht.

Die Wiederholbarkeit des Verfahrens hat eine relative Standardabweichung von $\pm 1,3\%$. Die Wiederfindung wurde in diesem Fall durch Aufstocken (Spiken) der Probe mit der Referenzsubstanz mehrfach bestimmt und beträgt 92% mit einer relativen Standardabweichung von $\pm 1,5\%$. Schließlich werden als Messwerte die Einwaagen und die HPLC-Peakflächen für die Referenz und für die Probe eingegeben.

Nach Berechnung der Messunsicherheit mit der Software zeigt das Ergebnisdigramm den Analysenwert c sowie seine absolute u(c) und relative Messunsicherheit u(c;rel). Ein Balkendiagramm liefert die Größe der einzelnen Unsicherheitsbeiträge (Abbildung 3).

Im Gegensatz zu den Messunsicherheitsbeiträgen der Einwaagen und der volumetrischen Schritte sowie der Reinheit der Referenz sind die Wiederholbarkeit des Verfahrens sowie die Unsicherheit der HPLC-Kalibration in diesem Fall nicht vernachlässigbar. Den nächstgrößeren Einfluss hat die Wiederholbarkeit der Wiederfindung und den größten Einfluss die Unsicherheit bezüglich der Probenvorbereitung.

Als weiteres Ergebnis der Messunsicherheitsberechnung wird die Verteilung der Messunsicherheit angezeigt (Abbildung 4). Sie liegt in diesem Fall zwischen einer Gauss-Verteilung und einer Dreiecksverteilung. Die Linien zeigen jeweils die 67-, 95- und 99%-Vertrauensbereiche (Fehlerbalken) an.

Analytica 2008 und Analytica Pro

Aussteller aus 34 Ländern präsentieren vom 1. bis zum 3. April auf der Analytica Produkte und Dienstleistungen aus Analytik, Labortechnik und Biotechnologie. Mit etwa 1000 ausstellenden Unternehmen und Institutionen werden über 150 mehr als bei der letzten Analytica vor zwei Jahren in der Neuen Messe München vertreten sein. Parallel zur Messe findet an den ersten drei Messtagen im Kongresszentrum auf dem Münchener Messegelände die Analytica Conference statt, mit 27 Symposien zu Analytik, Diagnostik, Molekularbiologie und Biochemie. Über alle Fakten, die Messebesucher wissen müssen, sowie die Highlights der Messe informiert das Business-Magazin *Analytica Pro*, das mit dieser Ausgabe der *Nachrichten* erscheint. Beiträge zu aktuellen Themen aus Wissenschaft und Pra-

xis sowie ein Service-Teil mit Hallenplan, Aussteller- und Standverzeichnis sowie Hinweise zu Anreise und Aufenthalt in München unterstützen bei der Vorbereitung des Messebesuchs. GDCh-Mitglieder erhalten kostenlose Tageskarten für die Analytica über die GDCh-Internetseite unter „My GDCh“.

www.gdch.de
www.analytica.de

Der Fehlerteufel in der Matrix

Bei diesem Ergebnis der Messunsicherheitsberechnung ist zu beachten, dass die Unsicherheit bezüglich der Probenvorbereitung nicht mit dem bei der Wiederfindung bestimmten Probenverlust zusammenhängt, sondern mit der Methode der Wiederfindungsbestimmung.

Die Probe besteht aus einer Kunststoffmatrix, in die der Analyt eingebettet ist. Im Gegensatz dazu wurde die Wiederfindung durch Aufstocken der Probe mit der freien, reinen Referenzsubstanz bestimmt. Dies ist in der Analytik ein gängiges Verfahren. Die Frage ist, inwieweit die mit der reinen Referenzsubstanz gemessene Wiederfindung mit der Wiederfindung des Analyten aus der Matrix übereinstimmt. Die Unsicherheit des Analysenergebnisses rührt deswegen zu einem Großteil daher, dass unbekannt ist, in welchem Ausmaß der Analyt aus der Kunststoffmatrix extrahiert wird.

Falls es erforderlich ist, die Messunsicherheit dieses Verfahrens zu reduzieren, wird man sich zuerst mit dem Beitrag zu beschäftigen haben, den die Unsicherheit der Wiederfindungsbestimmung liefert. Es bestehen grundsätzlich zwei Möglichkeiten, diesen Einfluss zu verringern: Zum einen können Versuche die Extraktionseffizienz für den Analyten genauer ermitteln. Zum anderen kann mit einem zertifizierten Matrixreferenzmaterial – falls verfügbar und bezahlbar – mit der identischen Probenvorbereitung wie bei der Probe kalibriert werden.

Wolf-Dieter Beinert

VWR International GmbH/

Scientific Instruments

Darmstadt

wolf-dieter.beinert@de.vwr.com

Matthias Rösslein

EMPA, Materials Science

and Technology

St. Gallen/Schweiz

Sergio Rezzonico

Amt für Umwelt und Energie (AFU)

St. Gallen/Schweiz

Abb. 4. Die Monte-Carlo-Berechnung liefert die Verteilung der Messunsicherheit, aus der die Größe des Fehlerbalkens abzulesen ist.

1) P. de Bièvre., Accreditation and Quality Assurance, 1997, 269, Editorial.