

Die Ermittlung von Nachweis- und Bestimmungsgrenzen im Humanbiomonitoring

Biomonitoring-Methoden, Konzeptionelle Themen

W. Gries¹

G. Scherer²

M. Bader³

T. Göen^{4,*}

A. Hartwig^{5,*}

MAK Commission^{6,*}

Keywords

Nachweisgrenze; NWG;
Bestimmungsgrenze; BG;
Zuverlässigkeitskriterien;
Methodenvalidierung

¹ *Currenta GmbH & Co. OHG, CUR-SIT-SER-GS-BLM Institut für Biomonitoring, Chempark, Geb. Q18, 51368 Leverkusen*

² *ABF – Analytisch-Biologisches Forschungslabor GmbH, Semmelweisstraße 5, 82152 Planegg*

³ *BASF SE, Corporate Health Management, Carl-Bosch-Straße 38, 67056 Ludwigshafen*

⁴ *Leitung der Arbeitsgruppe „Analysen in biologischem Material“ der Ständigen Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe, Deutsche Forschungsgemeinschaft, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg, Institut und Poliklinik für Arbeits-, Sozial- und Umweltmedizin, Henkestraße 9–11, 91054 Erlangen*

⁵ *Vorsitz der Ständigen Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe, Deutsche Forschungsgemeinschaft, Institut für Angewandte Biowissenschaften, Abteilung Lebensmittelchemie und Toxikologie, Karlsruher Institut für Technologie (KIT), Adenauerring 20a, Geb. 50.41, 76131 Karlsruhe*

⁶ *Ständige Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe, Deutsche Forschungsgemeinschaft, Kennedyallee 40, 53175 Bonn*

* *E-Mail: T. Göen (thomas.goeen@fau.de), A. Hartwig (andrea.hartwig@kit.edu), MAK Commission (arbeitsstoffkommission@dfg.de)*

Abstract

The working group “Analyses in Biological Materials” of the German Senate Commission for the Investigation of Health Hazards of Chemical Compounds in the Work Area (MAK Commission) has evaluated six different procedures for the calculation or estimation of the detection and quantitation limits determined in the validation process of biomonitoring methods. Using the example of the biomonitoring parameter 1-hydroxypyrene in urine, the advantages and disadvantages of these approaches are considered, and all procedures are critically evaluated and discussed. In summary, the Commission does not recommend one preferred method for the calculation of detection and quantitation limits, but rather a careful consideration and fit-for-purpose check of the chosen procedure. A thorough documentation of the selected approach and its results is an essential part of a method description.

Citation Note:

Gries W, Scherer G, Bader M, Göen T, Hartwig A, MAK Commission. Die Ermittlung von Nachweis- und Bestimmungsgrenzen im Humanbiomonitoring. Biomonitoring-Methoden, Konzeptionelle Themen. MAK Collect Occup Health Saf. 2024 Sep;9(3):Doc077. https://doi.org/10.34865/bilodloqdt9_3ad

Manuskript abgeschlossen:
20 Mai 2015

Publikationsdatum:
30 Sep 2024

Lizenz: Dieses Werk ist
lizenziert unter einer [Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).



1 Einleitung

Die Kommission hat eine zusammenfassende Darstellung über die Zuverlässigkeitskriterien analytischer Methoden und deren Prüfung veröffentlicht (Bader et al. 2010). Unter anderem werden in der Publikation fünf verschiedene Möglichkeiten vorgestellt, Nachweisgrenzen (NWG oder NG) und Bestimmungsgrenzen (BG) für Biomonitoringverfahren zu ermitteln. Die kritische Diskussion der einzelnen Verfahren ist in dieser Publikation jedoch kurzgehalten, da der Fokus auf der generellen Beschreibung der Methodvalidierung lag. Die vergleichende kritische Betrachtung der erwähnten Verfahren zur Bestimmung von Nachweis- und Bestimmungsgrenze sowie eine ausführliche Abwägung ihrer Vor- und Nachteile ergänzt im Folgenden die bisherige Publikation und konkretisiert die Vorgehensweisen am Beispiel des Biomonitoringparameters 1-Hydroxypyren im Urin.

2 Allgemeines

In der chemischen Analytik – und damit auch im Humanbiomonitoring – stellt sich im niedrigen Konzentrationsbereich die Herausforderung, das Messsignal einer Probe von dem einer Leerprobe zuverlässig zu unterscheiden sowie eine quantitative Aussage mit ausreichender Präzision treffen zu können. Um diese Aufgabe zu erfüllen, werden im Rahmen der Methodvalidierung unter anderem Nachweis- und Bestimmungsgrenzen ermittelt.

Für den Bereich der chemischen Analytik sind Nachweis- und Bestimmungsgrenze in der DIN 32645 definiert (DIN 2008). Beide Parameter leiten sich von der Festlegung des „kritischen Wertes einer Messgröße“ ab, bei dessen Überschreitung unter Zugrundelegung einer definierten Irrtumswahrscheinlichkeit P für den Fehler 1. Art (Signifikanzniveau α) erkannt wird, dass der Gehalt eines Analyten in der Probe größer ist als derjenige in einer Leerprobe.

Die Nachweisgrenze ist dabei definiert als diejenige Konzentration, für die der β -Fehler (falsch negatives Ergebnis) 50 % beträgt und der α -Fehler (falsch positives Ergebnis) in der Regel auf 1 % oder 5 % festgelegt wird (Bader et al. 2010; DIN 2008).

So wird beispielsweise als Obergrenze für den Leerwert der Messwert gewählt, der nur von 1 % aller Leerwertproben überschritten wird (kritischer Wert). Ein Messergebnis, das diese Obergrenze bei wiederholter Messung zu je 50 % über- bzw. unterschreitet, kennzeichnet dann die Nachweisgrenze. Konkret bedeutet dies, dass an der Nachweisgrenze das Vorhandensein des Analyten in der Hälfte der Fälle durch die gewählte Messmethode detektiert wird. Insofern stellt die Nachweisgrenze die Entscheidungsgrenze für das Vorhandensein eines Analyten in der Probenmatrix dar und kann nur qualitativ interpretiert werden (DIN 2008; Kromidas 2011).

Als Bestimmungsgrenze ist hingegen diejenige Konzentration definiert, bei der der Analyt mit einer vorgegebenen relativen Ergebnisunsicherheit quantifiziert werden kann. Dabei wird zwischen der unteren und der oberen Bestimmungsgrenze unterschieden. Die untere Bestimmungsgrenze liegt nach den meisten Berechnungs- und Schätzverfahren zwischen dem Dreifachen (33,3 % Ergebnisunsicherheit) und dem Zehnfachen (10 % Ergebnisunsicherheit) der Nachweisgrenze. Aufgrund ihrer definierten Ergebnisunsicherheit ermöglicht die untere Bestimmungsgrenze eine quantitative Interpretation von Messwerten und ist ein aussagekräftigeres Maß für die tatsächliche Leistungsfähigkeit eines Verfahrens als die Nachweisgrenze. Die obere Bestimmungsgrenze ist im Regelfall durch den höchsten Kalibrierstandard vorgegeben, für den im Rahmen der Methodvalidierung eine Ergebnisunsicherheit bestimmt wurde (Bader et al. 2010). Wenn nicht anders angegeben, ist bei der Verwendung des Begriffs „Bestimmungsgrenze“ die untere Bestimmungsgrenze gemeint.

Da die Bestimmungsgrenze auf Basis einer maximal zulässigen Ergebnisunsicherheit ermittelt wird, hängt ihr Wert von den Genauigkeitsanforderungen (Präzision und Richtigkeit) ab, die an das Messverfahren gestellt werden. Zur Datenauswertung und Ergebnismitteilung sollte auf die Bestimmungsgrenze Bezug genommen werden. Die Bestimmungsgrenze einer geeigneten Analysenmethode sollte in Anlehnung an die DIN EN 482 (DIN 2021) bzw. ISO 20581 (ISO 2016) mindestens bei einem Zehntel des entscheidungsrelevanten Konzentrationsbereiches (z. B. eines Biologischen Grenzwertes oder eines Biologischen Arbeitsstoff-Referenzwertes) liegen.

3 Bestimmungsverfahren

Zur Festlegung von Nachweis- und Bestimmungsgrenzen gibt es eine Vielzahl von Verfahren. In dem von der Kommission veröffentlichten Kapitel „Zuverlässigkeitskriterien einer analytischen Methode“ (Bader et al. 2010) wurden fünf häufig verwendete Verfahren dargestellt. Kurz zusammengefasst können Nachweis- und Bestimmungsgrenzen in erster Näherung durch visuelle Ableitung oder über das Signal/Rauschverhältnis ermittelt werden. Des Weiteren kann die Berechnung gemäß DIN 32645 (DIN 2008) nach dem Leerwert- oder dem Kalibrierkurvenverfahren erfolgen.

Darüber hinaus können Nachweis- und Bestimmungsgrenzen auch direkt aus den Präzisionsdaten abgeleitet werden (Magnusson und Örnemark 2017).

3.1 Bestimmung durch visuelle Ableitung

Für die visuelle Ableitung wird eine Leerprobe (Matrixleerwert) mit steigenden Analytkonzentrationen dotiert und untersucht. In den erhaltenen Chromatogrammen wird das Hervortreten des Analytsignals aus dem Grundrauschen der Basislinie visuell beurteilt. Die Nachweisgrenze entspricht dabei der kleinsten Analytkonzentration, bei der sich das Analytsignal optisch eindeutig vom Grundrauschen abhebt. Alternativ kann der Analytgehalt auch durch Vergleich mit einem dem Analyten benachbarten Messsignal bekannter Konzentration abgeschätzt werden.

Dieses Verfahren ermöglicht eine erste Abschätzung der Nachweisgrenze, wobei die Fläche und Höhe des Analytsignals sowohl vom Allgemeinzustand des Analysegerätes als auch von der Matrix abhängt. Der so in erster Näherung ermittelte Wert kann als Ausgangsbasis für eine genauere Bestimmung mit einem der nachfolgenden Verfahren dienen. Als Bestimmungsgrenze kann bei diesem Verfahren in erster Näherung der dreifache Wert der Nachweisgrenze angenommen werden. Um den Einfluss der Matrix besser beurteilen zu können, ist es hilfreich, unterschiedliche Matrixleerproben mit der visuell als Nachweisgrenze bestimmten Analytkonzentration zu dotieren und zu messen.

3.2 Bestimmung über das Signal/Rausch-Verhältnis

Um die Nachweisgrenze über das Signal/Rausch-Verhältnis zu bestimmen, wird eine Leerprobe (Matrixleerwert) oder eine Probe, welche den Analyten in einer Konzentration nahe der Nachweisgrenze enthält, gemessen. Im erhaltenen Chromatogramm wird die Intensität des Grundrauschens in der Nähe des zu beurteilenden Peaks bestimmt. Die Intensität des Grundrauschens wird dabei als größte Auslenkung der Basislinie (Maximum-Minimum-Differenz) beispielsweise mittels Lineal oder Trendlinienfunktion über mindestens zehn ausreißerfreie Rauschsignale ermittelt. Die mittlere Intensität des Grundrauschens s_0 (in positiver oder negativer Richtung von der Basislinie aus gesehen) wird dann mit dem Faktor 3 multipliziert, um die Nachweisgrenze (NG) zu errechnen (dreifaches Signal/Rausch-Verhältnis, Gleichung 1). Die Bestimmungsgrenze (BG) lässt sich analog beispielsweise als neunfaches Signal/Rausch-Verhältnis definieren (Gleichung 2).

$$NG = 3 \times s_0 \quad (1)$$

$$BG = 9 \times s_0 \quad (2)$$

Dieses Verfahren stellt eine einfache Methode zur Abschätzung der Nachweisgrenze dar und lässt sich auch bei nichtlinearen Kalibrierkurven leicht anwenden. Theoretisch wird ein α -Fehler von 1% angestrebt. Auch hier ist das Grundrauschen sowie die Höhe und Fläche des Analytsignals vom Allgemeinzustand des Analysegerätes und von der Matrix abhängig. Wird die Messung matrixfrei, mit reinen Standards durchgeführt, ist eine Übertragung der ermittelten Nachweisgrenze auf reale Proben entsprechend fehlerbehaftet.

3.3 Leerwertmethode nach DIN 32645

Die DIN 32645 gilt nur für lineare Kalibrierfunktionen, bei Normalverteilung der Messwerte sowie bei Varianzhomogenität (ähnliche Wertestreuungen am oberen und unteren Ende des Kalibrierbereichs). Damit Varianzhomogenität gegeben ist, sollte sich der zur Berechnung von Nachweis- und Bestimmungsgrenze zu wählende Konzentrationsbereich maximal bis zum etwa Zehnfachen der erwarteten Nachweisgrenze erstrecken und liegt damit üblicherweise deutlich unterhalb des Arbeitsbereiches für die spätere Routineanalytik.

Die ermittelte Konzentration einer Leerprobe (Leerwert) ist mit einer Unsicherheit behaftet, die zur Berechnung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze herangezogen werden kann: Sofern keine Hintergrundbelastung durch den Analyten in der Matrix vorliegt, kann die Nachweisgrenze über die Leerwertmethode nach DIN 32645 bestimmt werden. Bei dieser sogenannten „direkten Methode“ wird eine Leerprobe (Matrixleerwert) mindestens zehnmals analysiert. Darüber hinaus wird die Steigung einer Kalibrierfunktion benötigt, um die Analytkonzentration zu bestimmen. Hierfür kann auch eine Kalibrierung über den gesamten Arbeitsbereich verwendet werden.

Aus der Standardabweichung der Leerprobenmesswerte und der Steigung der Kalibrierfunktion kann die Nachweisgrenze mit [Gleichung 3](#) berechnet werden.

$$NG = \frac{s_L}{b} \times t_{f;\alpha} \times \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n}} \quad (3)$$

mit s_L = Standardabweichung der Messwerte der Leerprobe; b = Steigung der Kalibriergeraden; t = Quantil der t-Verteilung bei einseitiger Fragestellung für Fehler 1. Art (Student-Faktor) für $f = n-1$ Freiheitsgrade; m = Anzahl der Messungen an der Analysenprobe; n = Anzahl der Leerprobenmessungen

Die Berechnung der Bestimmungsgrenze erfolgt für die Leerwertmethode durch Schnellschätzung (siehe [Abschnitt 3.5](#)), in der Routine wird der Wert der berechneten Nachweisgrenze zumeist mit dem Faktor 3 multipliziert.

Durch die Berücksichtigung der Kalibrierfunktion wird bei der Bestimmung der Nachweisgrenze mit dem Leerwertverfahren nach DIN 32645 ein aus dem Messverfahren resultierender Wert erhalten. Die Anwendung des Verfahrens ist allerdings nur möglich, sofern Leerproben zur Verfügung stehen. Dies ist bei Biomonitoringproben aufgrund von Hintergrundbelastungen häufig nicht der Fall, so dass auf die indirekte Methode (Kalibriergeradenmethode, [Abschnitt 3.4](#)) zur Bestimmung von Nachweis- und Bestimmungsgrenze zurückgegriffen werden muss.

Matrixfreie Leerproben sind wegen der fehlenden Matrixbestandteile nur bedingt verwendbar und ihr Einsatz bedarf einer speziellen Prüfung.

3.4 Kalibriergeradenmethode nach DIN 32645

Für die Berechnung der Nachweis- und der Bestimmungsgrenze nach der Kalibriergeradenmethode gemäß DIN 32645 wird die Unsicherheit des Leerwertes indirekt über die Extrapolation von Regressionsdaten einer Kalibrierung ermittelt. Dazu wird durch Dotierung von Matrix mit dem Analyten eine Kalibriergerade erstellt, wobei der unterste Wert nahe der erwarteten Nachweisgrenze liegen sollte. Die Konzentrationen der übrigen Kalibrierstandards sollten sich als äquidistante Punkte über einen Bereich bis zum etwa Zehnfachen der Nachweisgrenze erstrecken. Aus der ermittelten Kalibrierfunktion lassen sich Nachweis- und Bestimmungsgrenze wie folgt errechnen ([Gleichung 4](#) und [5](#)). Im Wurzelausdruck der [Gleichung 5](#) kann BG in guter Näherung durch $k \times NG$ ersetzt werden.

$$NG = s_{x0} \times t_{f;\alpha} \times \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{\bar{x}^2}{Q_x}} \quad (4)$$

$$BG = k \times s_{x0} \times t_{f;\frac{\alpha}{2}} \times \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{(BG - \bar{x})^2}{Q_x}} \quad (5)$$

mit s_{x_0} = Verfahrensstandardabweichung (bei Varianzhomogenität gilt $s_{x_0} \approx s_L/b$ mit s_L = Standardabweichung der Messwerte der Leerprobe und b = Steigung der Kalibriergeraden); t = Quantil der t-Verteilung bei einseitiger Fragestellung für den Fehler 1. Art (Student-Faktor) für $f = n-2$ Freiheitsgrade; m = Anzahl der Messungen an der Analysenprobe; n = Anzahl der Kalibrierproben bzw. Gesamtanzahl der Kalibriermessungen (bei gleicher Anzahl von Wiederholungsmessungen zu jedem Kalibrierpunkt); \bar{x} = arithmetisches Mittel der Gehalte der Kalibrierproben; Q_x = Summe der Abweichungsquadrate von x bei der Kalibrierung; $1/k$ = relative Ergebnisunsicherheit zur Charakterisierung der Bestimmungsgrenze (z. B. 33,3 % bei $k = 3$).

Positive Tests auf Varianzhomogenität und Linearität der Kalibrierfunktion mittels F- bzw. t-Test sind Voraussetzung für die Anwendbarkeit der Kalibriergeradenmethode. Damit die Varianzhomogenität gewährleistet bleibt, sollte der Konzentrationsbereich der Kalibriergeraden das etwa Zehnfache der Nachweisgrenze nicht überschreiten. Bei Verwendung dieses Verfahrens ist zudem zu beachten, dass eine in der Probenmatrix eventuell bereits vorliegende Analytkonzentration von allen Messpunkten subtrahiert werden muss, wobei eine solche Subtraktion nicht unproblematisch ist (Magnusson und Örnemark 2017).

Die Kalibriergeradenmethode gemäß DIN 32645 berücksichtigt die natürliche Streuung der Messpunkte einer Kalibrierreihe. Dadurch wird eine hohe Konfidenz der Nachweis- und Bestimmungsgrenze ermöglicht. Nachteilig ist der hohe Arbeitsaufwand, da eine Kalibrierung innerhalb einer Konzentrationsdekade an der Nachweisgrenze in der Praxis unüblich ist. Zudem tritt bei diesem Verfahren häufig der Effekt auf, dass sich je nach gewähltem Kalibrierbereich unterschiedliche Nachweis- und Bestimmungsgrenzen ergeben. Bei höheren Konzentrationen sind meist auch größere Streuungen bzw. Abweichungsquadrate bei der linearen Regression zu erwarten, die dann rechnerisch zu höheren Bestimmungsgrenzen führen. Die in der Praxis eingesetzte Kalibrierkurve mit Analytkonzentrationen im entscheidungsrelevanten Bereich ist daher für eine Bestätigung der kalkulierten Nachweis- und Bestimmungsgrenze ungeeignet.

3.5 Schnellschätzverfahren nach DIN 32645

DIN 32645 weist auch auf die Möglichkeit hin, die Nachweis- und die Bestimmungsgrenze mittels Schnellschätzung zu ermitteln. Bei dieser Vorgehensweise kann die Nachweisgrenze als ein Vielfaches der Verfahrensstandardabweichung, die mittels Leerwert- oder Kalibriergeradenmethode erhoben werden kann ($s_{x_0} \approx s_L/b$), aufgefasst werden und es gelten für Einzelmessungen ($m = 1$) die Gleichungen 6 und 7.

$$NG = \Phi_{n,\alpha} \times \frac{s_L}{b} \quad (\text{Leerwertmethode}) \quad (6)$$

$$NG = 1,2 \times \Phi_{n,\alpha} \times s_{x_0} \quad (\text{Kalibriergeradenmethode}) \quad (7)$$

Für die Bestimmungsgrenze ergeben sich folgende Beziehungen (Gleichungen 8 und 9).

$$BG = k \times \Phi_{n;\frac{\alpha}{2}} \times \frac{s_L}{b} \quad (\text{Leerwertmethode}) \quad (8)$$

$$BG = 1,2 \times k \times \Phi_{n;\frac{\alpha}{2}} \times s_{x_0} \quad (\text{Kalibriergeradenmethode}) \quad (9)$$

Der Faktor Φ ist für die verschiedenen n - und α -Werte in der Tabelle 2 der DIN 32645 aufgeführt.

3.6 Standardabweichungsverfahren

Nachweis- und Bestimmungsgrenzen können auch direkt aus der Präzision des Analysenverfahrens abgeleitet werden. Dazu werden Proben mit abnehmenden Analytkonzentrationen in Mehrfachbestimmung analysiert und die relativen Standardabweichungen der Wiederholungsmessungen gegen die jeweilige Analytkonzentration aufgetragen. Die Bestimmungsgrenze entspricht dann der Konzentration, deren relative Standardabweichung gerade noch unter dem zuvor festgelegten Wert (z. B. 10 % oder 33 %) liegt. Bei der Anwendung dieses Verfahrens ist auf eine hinreichend große Zahl an Analytkonzentrationen und auf genügend Wiederholungsmessungen je Konzentration zu achten.

Von der Eurachem (Magnusson und Örnemark 2017) werden beispielsweise Sechsfachbestimmungen von immer höheren Verdünnungen eines Analyten in seiner Matrix empfohlen, bis die vorgegebene relative Standardabweichung erreicht wird.

Das Standardabweichungsverfahren zur Ermittlung der Nachweis- und der Bestimmungsgrenze berücksichtigt alle relevanten Parameter, die die Nachweis- und Bestimmungsgrenze beeinflussen. Bei den mit diesem Verfahren ermittelten Nachweis- und Bestimmungsgrenzen handelt es sich somit um robuste und nachvollziehbare Größen. Allerdings ist der hohe Arbeitsaufwand hierbei von Nachteil.

4 Beispiel

Anhand eines konkreten Beispiels soll aufgezeigt werden, dass aus der Berechnung oder Abschätzung von Nachweis- und Bestimmungsgrenze mit den sechs beschriebenen Verfahren unterschiedliche Werte resultieren. Als Beispiel aus dem Bereich des Humanbiomonitorings wird die Bestimmung von 1-Hydroxypyren in Urin gewählt, wobei das 1-Hydroxypyren nach Konjugatsspaltung mittels Gaschromatographie mit hochauflösender Massenspektrometrie (GC-HR-MS) nachgewiesen wurde. Als interner Standard (ISTD) wurde 1-Hydroxypyren- d_9 verwendet.

In [Abbildung 1](#) sind Chromatogramme einer Leerprobe, einer undotierten Urinprobe sowie einer mit ansteigenden 1-Hydroxypyren-Konzentrationen dotierten Urinprobe dargestellt. Es ist zu erkennen, dass der 1-Hydroxypyren-Peak mit ansteigender Konzentration deutlicher aus dem Grundrauschen der Basislinie hervortritt. Das Signal/Rausch-Verhältnis wird mit ansteigender Analytkonzentration größer. Die **visuell abgeleitete Nachweisgrenze**, bei der sich das Analytsignal optisch eindeutig vom Grundrauschen abhebt, beträgt $0,01 \mu\text{g/l}$ ([Abbildung 1c](#)). Die über das **Signal/Rausch-Verhältnis** bestimmte Nachweisgrenze liegt zwischen $0,01$ und $0,02 \mu\text{g/l}$.

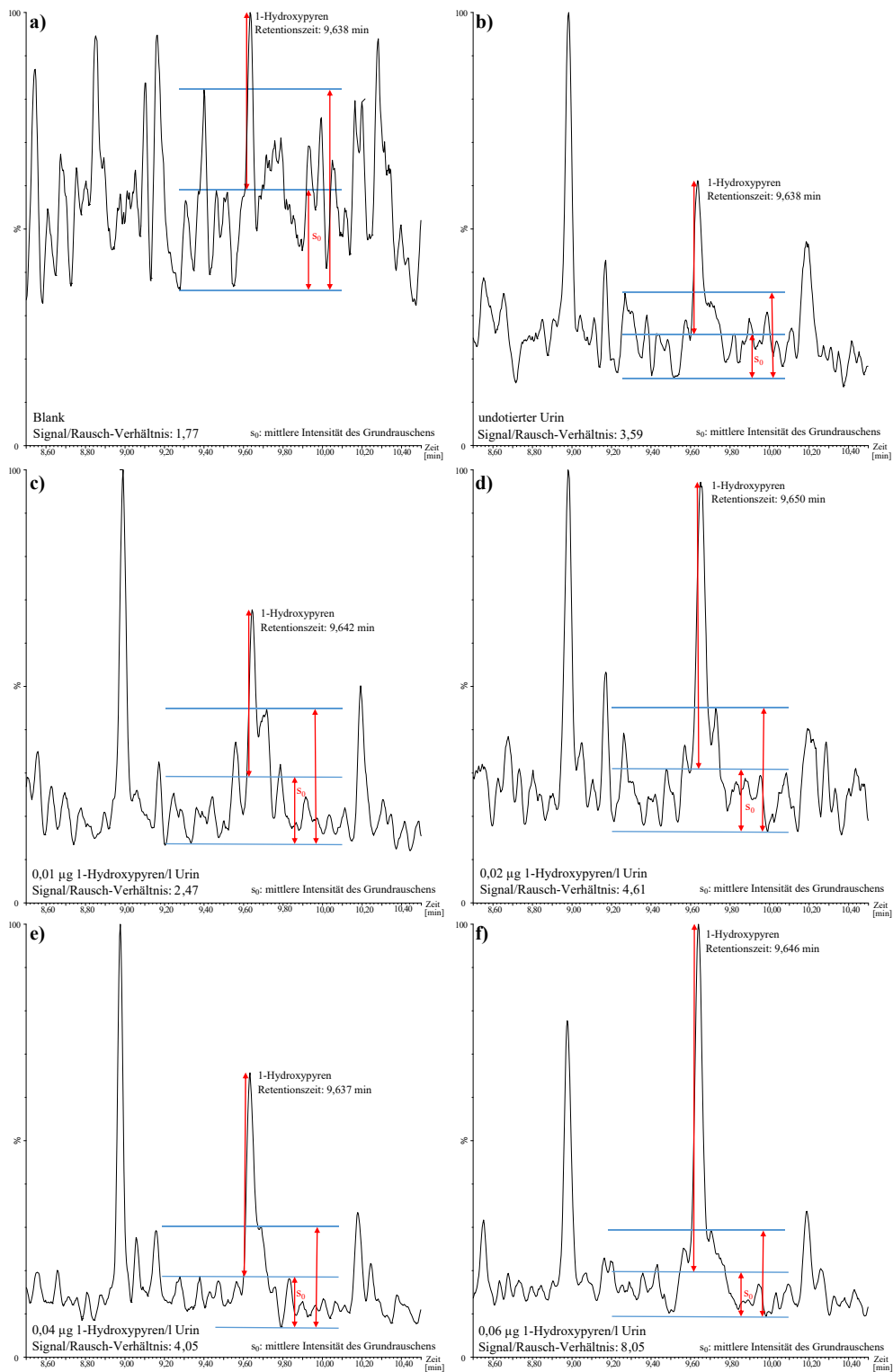


Abb. 1 Chromatogramme a) einer Leerprobe, b) einer undotierten Urinprobe sowie c)–f) einer mit ansteigenden 1-Hydroxypyren-Konzentrationen dotierten Urinprobe

Zur Bestimmung der Nachweisgrenze mit der **Leerwertmethode gemäß DIN 32645** wurde eine Leerprobe zehnfach aufgearbeitet und analysiert (Tabelle 1) und eine Kalibriergerade im Konzentrationsbereich von 0,01 bis 10 µg/l

erstellt. Die Daten, die in die Berechnung der Nachweisgrenze eingeflossen sind, sind in [Tabelle 2](#) aufgeführt. Mit dem Leerwertverfahren errechnet sich die Nachweisgrenze zu 0,0492 µg/l.

Tab. 1 Peakflächenverhältnisse der zehn Einzelmessungen einer Leerprobe

| Einzelmessung | y_L (Peakflächenverhältnis Analyt/ISTD) |
|---------------|---|
| 1 | 0,0054 |
| 2 | 0,0144 |
| 3 | 0,0108 |
| 4 | 0,0072 |
| 5 | 0,0108 |
| 6 | 0,0090 |
| 7 | 0,0126 |
| 8 | 0,0090 |
| 9 | 0,0144 |
| 10 | 0,0126 |

Tab. 2 Daten zur Berechnung der Nachweis- und der Bestimmungsgrenze nach der Leerwertmethode gemäß DIN 32645

| | | | |
|--|--------|--|---------|
| Anzahl der Leerprobenmessungen n | 10 | t-Quantil für einseitigen Vertrauensbereich ($t_{9,0,01}$) | 2,821 |
| Anzahl der Messungen der Analyseproben m | 1 | Mittelwert \bar{y}_L | 0,0106 |
| Signifikanzniveau α | 0,01 | Standardabweichung s_L | 0,00299 |
| Reziproke rel. Ergebnisunsicherheit k | 3 | NG [µg/l] | 0,0492 |
| Steigung b [l/µg] | 0,1795 | BG (nach Gleichung 8) [µg/l] | 0,167 |

Mit dem **Schnellschätzverfahren nach DIN 32645** (Leerwertmethode) errechnet sich die Nachweisgrenze zu 0,0499 µg/l und die Bestimmungsgrenze zu 0,170 µg/l.

Um Nachweis- und Bestimmungsgrenze nach der **Kalibriergeradenmethode gemäß DIN 32645** zu bestimmen, wurde eine äquidistante Zehnpunktkalibrierung im Konzentrationsbereich von 0,01 bis 0,1 µg/l erstellt (siehe [Abbildung 2](#) und [Tabelle 3](#)). Zusätzlich wurde eine Leerprobe aufgearbeitet und gemessen.

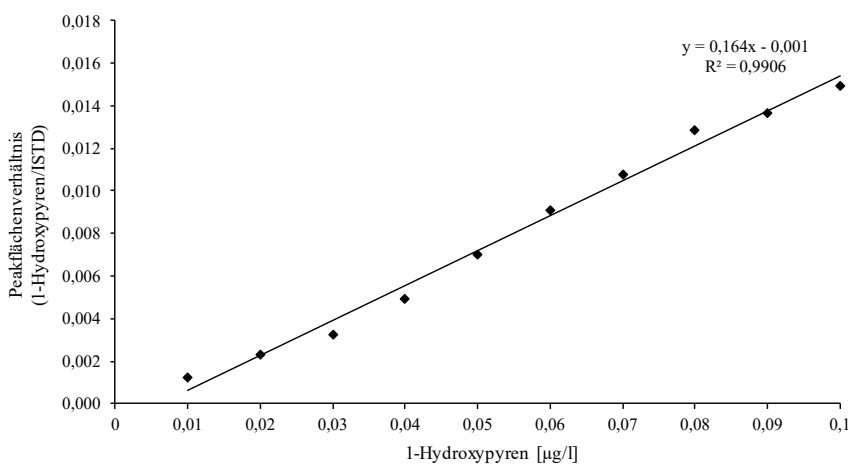


Abb. 2 Äquidistante Zehnpunktkalibrierung im Konzentrationsbereich von 0,01 bis 0,1 µg 1-Hydroxypyren/l Urin zur Berechnung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze nach der Kalibriergeradenmethode gemäß DIN 32645

Tab. 3 Daten der äquidistanten Zehnpunktkalibrierung im Konzentrationsbereich von 0,01 bis 0,1 µg 1-Hydroxypyren pro Liter Urin

| 1-Hydroxypyren [µg/l] | Peakfläche 1-Hydroxypyren [counts per second, cps] | Peakfläche ISTD [counts per second, cps] | Peakflächenverhältnis (1-Hydroxypyren/ISTD); Hintergrund abgezogen | geschätzter Funktionswert | Abweichung [%] |
|-----------------------|--|--|--|---------------------------|----------------|
| 0 | 532 209 700 | 250 872 000 000 | 0 | – | – |
| 0,01 | 649 552 000 | 194 725 375 000 | 0,001214 | 0,000620 | 96,0 |
| 0,02 | 890 253 200 | 201 982 762 500 | 0,002286 | 0,002260 | 1,2 |
| 0,03 | 1 004 576 600 | 186 459 937 500 | 0,003266 | 0,003900 | –16,3 |
| 0,04 | 1 310 319 900 | 185 881 475 000 | 0,004928 | 0,005540 | –11,1 |
| 0,05 | 1 700 813 100 | 186 213 687 500 | 0,007012 | 0,007181 | –2,3 |
| 0,06 | 2 313 397 100 | 206 608 612 500 | 0,009076 | 0,008821 | 2,9 |
| 0,07 | 2 299 595 100 | 178 268 562 500 | 0,010778 | 0,010461 | 3,0 |
| 0,08 | 2 841 040 200 | 189 599 912 500 | 0,012863 | 0,012102 | 6,3 |
| 0,09 | 3 311 612 100 | 210 045 625 000 | 0,013645 | 0,013742 | –0,7 |
| 0,1 | 4 097 364 500 | 240 139 950 000 | 0,014941 | 0,015382 | –2,9 |

Die für die Berechnung von Nachweis- und Bestimmungsgrenze benötigten Kenndaten, die sich rechnerisch aus dieser Zehnpunktkalibrierung ergeben, sind in [Tabelle 4](#) zusammengestellt.

Tab. 4 Kenndaten für die Berechnung von Nachweis- und Bestimmungsgrenze nach der Kalibriergeradenmethode gemäß DIN 32645

| | | | |
|--|------------------------|--|---------|
| Anzahl der Kalibrierproben n | 10 | t-Quantil für einseitigen Vertrauensbereich ($t_{8,0,01}$) | 2,821 |
| Anzahl der Messungen der Analyseproben m | 1 | Reststandardabweichung der Messwerte der Kalibrierung $s_{y,x}$ | 0,00051 |
| Signifikanzniveau α | 0,01 | Verfahrensstandardabweichung s_{x_0} | 0,00313 |
| Reziproke rel. Ergebnisunsicherheit k | 3 | Summe der Abweichungsquadrate von x bei der Kalibrierung Q_x | 0,00825 |
| Steigung $b \pm$ Standardabweichung [l/µg] | 0,16403 \pm 0,00565 | NG [µg/l] | 0,0107 |
| Achsenabschnitt \pm Standardabweichung | –0,00102 \pm 0,00035 | BG [µg/l] | 0,0339 |

Aus der erhaltenen Kalibrierfunktion ließen sich mit der **Kalibriergeradenmethode nach DIN 32645** Nachweis- und Bestimmungsgrenze zu 0,0107 µg/l bzw. 0,0339 µg/l berechnen.

Mit dem **Schnellschätzverfahren nach DIN 32645** errechnen sich aus der Verfahrensstandardabweichung der Kalibriergeradenmethode Nachweis- und Bestimmungsgrenze zu 0,0113 µg/l bzw. 0,0383 µg/l.

Werden die Kalibriergeraden in unterschiedlichen Konzentrationsbereichen erstellt, ergeben sich auch unterschiedliche Nachweis- und Bestimmungsgrenzen (siehe [Abschnitt 3.4](#)). Kalibrierstandards mit höheren Analytkonzentrationen führen in der Regel auch zu höheren berechneten Nachweis- sowie Bestimmungsgrenzen. Bei den in [Tabelle 5](#) angegebenen Daten ist zu beachten, dass die Werte nur in Anlehnung an DIN 32645 berechnet wurden, da nur sechs Kalibrierpunkte in die Berechnung eingeflossen sind (siehe [Abbildung 3](#)). Der Konzentrationsbereich 0,01–10 µg/l hat zudem das etwa Zehnfache der Nachweisgrenze überschritten, allerdings waren die Tests auf Varianzhomogenität und Linearität der Kalibrierfunktion mittels F- bzw. t-Test positiv. Somit war die Kalibriergeradenmethode anwendbar.

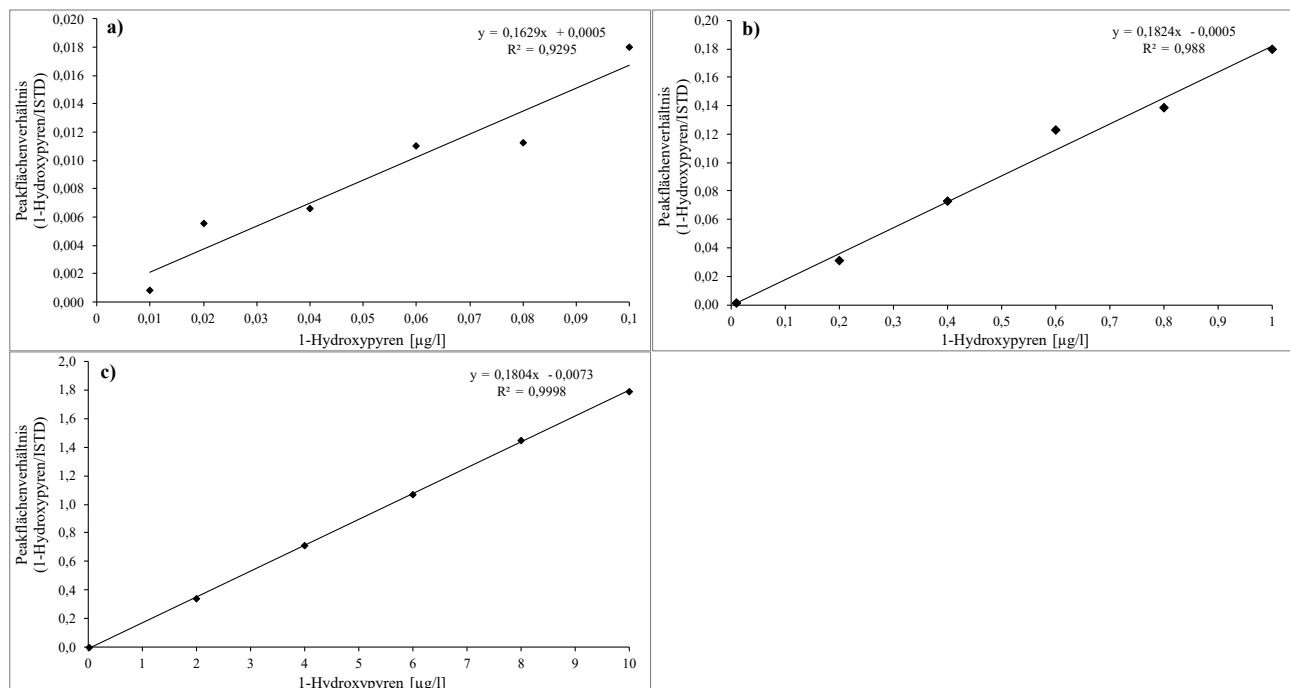


Abb. 3 Kalibriergeraden für in Anlehnung an die Kalibriergeradenmethode gemäß DIN 32645 ermittelte Nachweis- und Bestimmungsgrenzen; es wurde mit sechs Kalibrierpunkten in den Konzentrationsbereichen a) 0,01–0,1 µg, b) 0,01–1 µg sowie c) 0,01–10 µg 1-Hydroxypyren pro Liter Urin gerechnet

Tab. 5 In Anlehnung an die Kalibriergeradenmethode nach DIN 32645 ermittelte Nachweis- und Bestimmungsgrenzen; es wurde mit sechs Kalibrierpunkten in unterschiedlichen Konzentrationsbereichen gerechnet

| Kalibrierbereich [µg/l] | Nachweisgrenze [µg/l] | Bestimmungsgrenze [µg/l] |
|-------------------------|-----------------------|--------------------------|
| 0,01–0,1 | 0,051 | 0,250 |
| 0,01–1 | 0,212 | 0,700 |
| 0,01–10 | 0,276 | 0,976 |

Die für den Kalibrierbereich 0,01–0,1 µg/l errechnete Nachweisgrenze liegt deutlich höher als der mit den Daten aus [Tabelle 3](#) errechnete Wert. Dies liegt vor allem daran, dass die Datenpunkte stärker um die Regressionsgerade streuen (vergleiche [Abbildung 2](#) mit [Abbildung 3](#)), aber auch die geringere Anzahl an Kalibrierpunkten schlägt sich in der höheren Nachweisgrenze nieder.

Schließlich wurde die Bestimmungsgrenze für die Quantifizierung von 1-Hydroxypyren in Urin mit dem **Standardabweichungsverfahren nach DIN 32645** errechnet. Dazu wurden Urinproben mit abnehmenden Analytkonzentrationen dotiert, je Konzentration sechsfach aufgearbeitet und analysiert und jeweils die relative Standardabweichung berechnet. Die vorab festgelegte Präzision von 20 % wurde bei einer 1-Hydroxypyren-Konzentration von 0,06 µg/l Urin erreicht (siehe [Tabelle 6](#)).

Tab. 6 Ermittlung der Bestimmungsgrenze mit dem Standardabweichungsverfahren (n = 6)

| Probe | Dotierte Konzentration [µg/l] | Peakflächenverhältnis (1-Hydroxypyren/ISTD) | Gemessene Konzentration [µg/l] |
|------------------------------|----------------------------------|--|-----------------------------------|
| 1 | | 0,012 | 0,073 |
| 2 | | 0,014 | 0,083 |
| 3 | | 0,014 | 0,081 |
| 4 | 0,06 | 0,008 | 0,050 |
| 5 | | 0,011 | 0,064 |
| 6 | | 0,009 | 0,055 |
| Mittelwert [µg/l]: | | | 0,068 |
| Standardabweichung [µg/l]: | | | 0,0137 |
| Rel. Standardabweichung [%]: | | | 20,2 |

Die mit den unterschiedlichen Verfahren ermittelten Nachweis- und Bestimmungsgrenzen sind in [Tabelle 7](#) zusammengestellt. Die vergleichende Betrachtung verdeutlicht das Problem, dass die einzelnen Verfahren zu leicht unterschiedlichen Nachweis- und Bestimmungsgrenzen für ein und dieselbe Biomonitoringmethode führen. In dem hier aufgeführten Beispiel ist das Verhältnis zwischen der größten und der kleinsten Bestimmungsgrenze etwa 5.

Tab. 7 Mit den unterschiedlichen Verfahren erhaltene Nachweis- und Bestimmungsgrenzen

| | Visuelle Ableitung | Signal/Rausch-Verhältnis | gemäß DIN 32645 | | Standardabweichungs- verfahren |
|----|-----------------------|--------------------------|-----------------|-------------------------|-----------------------------------|
| | | | Leerwertmethode | Kalibriergeradenmethode | |
| NG | 0,02 | 0,01–0,02 | 0,049 | 0,011 | – |
| BG | 0,06 ^{a)} | 0,03–0,06 | 0,167 | 0,034 | 0,06 |

^{a)} wurde näherungsweise durch Multiplikation mit dem Faktor 3 berechnet

5 Diskussion

Grundsätzlich besteht bei der Entwicklung und Validierung von Analysemethoden die Möglichkeit, aus den unterschiedlichen Verfahren zur Bestimmung von Nachweis- und Bestimmungsgrenze zu wählen. Aus Sicht der Kommission haben alle Verfahren je nach Zielsetzung ihre Stärken und Schwächen, so dass keine einheitliche Vorgehensweise festgelegt werden soll. Allerdings ist zu beachten, dass die oben beschriebenen Verfahren nicht in beliebiger Reihenfolge aufgeführt sind. In der Regel ist die Bestimmung der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen beim Einsatz der visuellen Ableitung sowie der Ableitung aus dem Signal/Rausch-Verhältnis und der Leerwertmethode gemäß DIN 32645 weniger robust als beim Einsatz der Kalibriergeradenmethode gemäß DIN 32645 und dem Standardabweichungsverfahren.

Möglichst niedrige Nachweis- und Bestimmungsgrenzen sollten nicht das entscheidende Qualitätskriterium für die Bewertung einer Analysemethode sein und daher auch nicht das vorrangige Ziel einer Methodenentwicklung. Vielmehr sollte die Robustheit der Methode beachtet werden und nur solche Werte sollten als Bestimmungsgrenze angegeben werden, die auch unter Routinebedingungen sicher eingehalten werden können. Jenseits der Routine, wenn Methoden nur sporadisch eingesetzt werden, müssen die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen mit jedem neuen Analysenlauf separat ermittelt werden.

Die beispielhafte Berechnung der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen für die Quantifizierung von 1-Hydroxypyren im Urin unter Anwendung der verschiedenen Bestimmungsverfahren hat deutlich gemacht, dass die errechneten Werte je nach angewendetem Verfahren unterschiedlich ausfallen. Generell lassen sich die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen, die mit unterschiedlichen Verfahren erhalten werden, nicht unmittelbar gleichsetzen oder

mit Blick auf die Leistungsfähigkeit einer Analysenmethode interpretieren. Bei der Angabe von Nachweis- und Bestimmungsgrenze sollte daher immer auch das Verfahren, mit dem diese ermittelt wurden, angegeben werden.

Für die Bestimmung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze nach DIN 32645 wären weitere anzugebende Informationen beispielsweise: angewendetes Verfahren zur Ermittlung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze, Anzahl der Leer- oder Kalibrierproben, Anzahl der Messungen der Analysenprobe(n), Signifikanzniveau α („Fehler 1. Art“), Signifikanzniveau β („Fehler 2. Art“) sowie die reziproke relative Ergebnisunsicherheit k . Zudem sollten relevante Chromatogramme und gegebenenfalls auch weitere Abbildungen gezeigt werden.

Auch wenn Nachweis- und Bestimmungsgrenze mit ein und demselben Verfahren wiederholt ermittelt werden, können sich die erhaltenen Werte deutlich unterscheiden. Letztlich spiegeln die erzielten Ergebnisse auch den aktuellen Zustand des Messsystems (Messgerät, Trennsäule, Reagenzien, etc.) wider. Sollten bei Verwendung desselben Verfahrens die Anzahl der Werte zur Errechnung des Vertrauensbereiches variieren, sind die ermittelten Bestimmungsgrenzen nicht zwingend vergleichbar. Bei den nach der Kalibriergeradenmethode berechneten Nachweis- und Bestimmungsgrenzen sind diese zudem vom gewählten Konzentrationsbereich, der Korrelation der Regressionsgeraden sowie der Matrix abhängig.

Im Zusammenhang mit der Ermittlung von Nachweisgrenzen ist es zudem notwendig, zwischen der Nachweisgrenze des Messinstruments und der Nachweisgrenze der analytischen Methode zu unterscheiden. Die Nachweisgrenze des Messinstruments ergibt sich, indem matrixfreie Analytstandards oder auch Blindwertproben ohne weitere Aufarbeitung gemessen werden. Um jedoch die Leistungsfähigkeit einer analytischen Methode praxisgerecht zu bestimmen, müssen in Matrix angesetzte Analytstandards auch die gesamte Probenaufarbeitung durchlaufen. Dies gilt insbesondere für die visuelle Ableitung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze sowie deren Festlegung aus dem Signal/Rausch-Verhältnis.

Die ermittelte Bestimmungsgrenze sollte generell mit einer geeigneten Anzahl nativer Proben mit entsprechender Analytkonzentration verifiziert werden. Gegebenenfalls muss auch die Robustheit der erhaltenen Werte durch Messung verschiedener Realproben mit Analytgehalten nahe der Bestimmungsgrenze verifiziert werden.

Abschließend lässt sich festhalten, dass es nicht eine einzige richtige Standardmethode zur Berechnung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze gibt, sondern dass die gewählte Vorgehensweise jeweils sorgfältig geprüft und bedacht sein muss. Die ausführliche Dokumentation der Vorgehensweise ist ein wesentlicher Bestandteil der Methodenbeschreibung. Zur Beschreibung der Bestimmungsgrenze als Leistungsmerkmal für ein validiertes Messverfahren gehören insbesondere Angaben zum verwendeten Bestimmungsverfahren, zur statistischen Sicherheit sowie zur relativen Ergebnisunsicherheit an der Bestimmungsgrenze.

Anmerkungen

Interessenkonflikte

Die in der Kommission etablierten Regelungen und Maßnahmen zur Vermeidung von Interessenkonflikten (www.dfg.de/mak/interessenkonflikte) stellen sicher, dass die Inhalte und Schlussfolgerungen der Publikation ausschließlich wissenschaftliche Aspekte berücksichtigen.

Literatur

Bader M, Barr D, Göen T, Schaller KH, Scherer G, Angerer J (2010) Allgemeine Vorbemerkungen. Zuverlässigkeitskriterien einer analytischen Methode. In: Angerer J, Hartwig A, Hrsg. Analytische Methoden zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe. Band 2: Analysen in biologischem Material. Weinheim: Wiley-VCH. S. 284–336. Auch erhältlich unter <https://doi.org/10.1002/3527600418.bireliabd0019>

DIN (Deutsches Institut für Normung), Hrsg (2008) DIN 32645:2008-11. Chemische Analytik – Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze unter Wiederholbedingungen – Begriffe, Verfahren, Auswertung. Berlin: Beuth. <https://doi.org/10.31030/1465413>

- DIN (Deutsches Institut für Normung), Hrsg (2021) DIN EN 482:2021-05. Exposition am Arbeitsplatz – Verfahren zur Bestimmung der Konzentration von chemischen Arbeitsstoffen – Grundlegende Anforderungen an die Leistungsfähigkeit. Deutsche Fassung EN_482:2021. Berlin: Beuth. <https://doi.org/10.31030/3211072>
- ISO (International Organization for Standardization), Hrsg (2016) ISO 20581:2016. Workplace air – general requirements for the performance of procedures for the measurement of chemical agents. Berlin: Beuth
- Kromidas S, Hrsg (2011) Handbuch Validierung in der Analytik, 2. Aufl. Weinheim: Wiley-VCH
- Magnusson B, Örnemark U, Hrsg (2017) Eurachem Guide: Die Eignung von Analysenverfahren – ein Leitfaden für Laboratorien zur Verfahrensvalidierung und zu verwandten Themen. Deutsche Übersetzung 2017, 2. Aufl. Gembloux: Eurachem. https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/MV_guide_2nd_ed_DE.pdf, abgerufen am 14 Mrz 2024