

VALIDATIE VAN BEPALINGSMETHODEN VOOR ORGANISCHE PARAMETERS

1. INLEIDING

Vooraleer een bepalingmethode routinematig in het laboratorium toegepast wordt moet nagegaan worden of met deze methode voldoende betrouwbare resultaten verkregen worden en of aan de in de milieu- en drinkwaterreglementering opgenomen eisen voldaan kan worden.

Het validatie-onderzoek dient te gebeuren bij wijziging van reeds gevalideerde methoden en bij de implementatie van nieuwe al dan niet in-huis ontwikkelde methoden. Het laboratorium dient de prestatiekenmerken van de nieuw aangewende methode te kennen. Ook bij de aanwending van al dan niet genormeerde standaardmethoden wordt een validatie-onderzoek verricht. Het laboratorium dient immers aan te tonen dat het in staat is om aan de specificaties van de standaardmethode te voldoen.

Hieronder is een opsomming gegeven van methodekenmerken en de wijze waarop hiervoor gegevens verkregen kunnen worden.

De procedure is alleen van toepassing voor een intern validatie-onderzoek, uitgevoerd binnen het laboratorium zelf. Het externe validatie-onderzoek, waarbij de betrouwbaarheid van een (nieuwe) methode nagegaan wordt door vergelijking van resultaten bekomen door verschillende laboratoria die dezelfde methode gebruiken wordt hier buiten beschouwing gelaten. Hiervoor wordt verwezen naar ISO 5725.

2. KENMERKEN VAN EEN MEETMETHODE

Opm.: de gebruikte Nederlandstalige terminologie en bijhorende definities werden grotendeels overgenomen uit NEN 3114

2.1 Lineariteit

Er wordt nagegaan of er een lineair verband bestaat tussen opgemeten signaal en concentratie, zodat volstaan kan worden met lineaire regressie bij het opstellen van een ijkrechte (externe kalibratie) of met éénpuntskalibratie (interne kalibratie). In het andere geval dient een kwadratische vergelijking gebruikt te worden of dient het meetgebied verengd te worden.

Aan de kwaliteit van het lineair verband kan een maat gegeven worden, bv. aan de hand van de variatiecoëfficiënt van de methode (V_{x0} , zie ISO 8466) of de correlatiecoëfficiënt, en het lineaire bereik van de detector kan vastgelegd worden.

2.2 Instrumentele herhaalbaarheid

De instrumentele herhaalbaarheid geeft de spreiding weer tussen meetsignalen bekomen na herhaalde injectie van éénzelfde standaardoplossing. Gewoonlijk wordt als maat voor de herhaalbaarheid de relatieve standaardafwijking of variatiecoëfficiënt genomen.

De variatiecoëfficiënt (VC%) wordt berekend als volgt:

$$VC\% = \frac{100 * \text{standaardafwijking}}{\text{gemiddelde}}$$

De instrumentele herhaalbaarheid reflecteert de instabiliteit van het meetsignaal en de fout op de injectie.

2.3 Minimum detecteerbare hoeveelheid

De minimum detecteerbare hoeveelheid (MDH) is de kleinste hoeveelheid verbinding waarvoor nog een meetsignaal wordt waargenomen dat onderscheiden kan worden van het blankosignaal. De MDH-waarde wordt geschat op basis van het signaal waargenomen voor een standaardoplossing en uitgedrukt in een gewichtseenheid (meestal pg). De MDH-waarde is onafhankelijk van de hoeveelheid geïnjecteerde oplossing.

Zij is een maat voor de gevoeligheid van de detector en laat toe de kwaliteit van de detector op te volgen in de tijd.

2.4 Juistheid (trueness)

Dit is de mate van overeenstemming tussen de (gemiddelde) waarde verkregen uit een (reeks) analyse(n) (C_{exp}) en de werkelijke waarde (C_{ref}). Zij wordt bepaald uitgaande van gecertificeerd referentiemateriaal ofwel gedopeerde monsters. Ofwel gebruikt men als maat voor de juistheid de terugvinding :

$$\text{terugvinding} = \frac{C_{exp} * 100\%}{C_{ref}}$$

ofwel de *systematische afwijking* :

$$\text{syst.afw.} = \frac{(C_{exp} - C_{ref}) * 100\%}{C_{ref}}$$

De juistheid wordt bepaald voor alle typen matrices waarvoor de methode toegepast wordt.

Opm.: het begrip terugvinding mag niet verward worden met het begrip opwerkingsrendement of recuperatierendement (zie hieronder); de terugvinding slaat op het gehalte dat men met een welbepaalde analytische methode bekomt, ev. rekening houdend met mogelijke verliezen tijdens de opwerking (bv. door toepassing van de interne standaard methode). Het opwerkingsrendement slaat op het gehalte dat men daadwerkelijk terugvindt, relatief t.o.v. het oorspronkelijk aanwezige gehalte, na het doorlopen van de extractie-, zuiverings- en/of indampstap.

2.5 Herhaalbaarheid

De herhaalbaarheid geeft de spreiding weer tussen meetresultaten bekomen op identiek materiaal in dezelfde omstandigheden (d.i. binnen dezelfde meetreeks). Gewoonlijk wordt als maat de relatieve standaardafwijking (variatiëcoëfficiënt) genomen.

2.6 Reproduceerbaarheid

De reproduceerbaarheid geeft de spreiding weer tussen meetresultaten bekomen op identiek materiaal in verschillende omstandigheden (bv. op verschillende tijden, door verschillende operatoren, door verschillende laboratoria). Men onderscheidt binnen-laboratorium reproduceerbaarheid en tussen-laboratorium reproduceerbaarheid. De eerste kan bepaald worden aan de hand van controlekaartkarakteristieken voor een controlemonster, de tweede volgt uit interlaboratoriumvergelijkingen. Gewoonlijk wordt als maat de relatieve standaardafwijking genomen.

2.7 Nauwkeurigheid (accuracy)

Nauwkeurigheid is de mate waarin de met een bepaalde meetmethode verkregen meetwaarde de ware waarde benadert. Als maat voor nauwkeurigheid wordt in de literatuur regelmatig het begrip (relatieve) totale fout gebruikt, zijnde de som van systematische en toevallige fout. Zij wordt berekend uitgaande van de juistheid en de binnen-laboratorium reproduceerbaarheid en is gelijk aan de som van de relatieve systematische fout en tweemaal de relatieve standaardafwijking.

2.8 Recuperatierendement (inwendige standaardmethode)

Bij gebruikmaking van isotoop gemerkte inwendige standaarden kan steeds de terugvinding bepaald worden van de inwendige standaarden door vergelijking van het signaal van de inwendige standaarden, toegevoegd aan het staal voor de inbehandelingneming, met het signaal van een recovery standaard, toegevoegd aan het eindextract. Het recuperatierendement is een maat voor de kwaliteit van de uitgevoerde opwerking. Het geeft een idee over het risico voor verliezen tijdens de opwerking. Een criterium voor goede kwaliteit is een recuperatierendement groter dan 50%.

2.9 Aantoonbaarheidsgrens

De aantoonbaarheidsgrens is die concentratie in het staal waarvan men met 95% zekerheid kan stellen dat ze verschillend is van nul (of dat het gemeten signaal verschillend is van de ruis). Zij wordt bepaald door het uitvoeren van herhalingsmetingen voor zeer lage concentraties. De aantoonbaarheidsgrens is matrixafhankelijk.

2.10 Bepalingsgrens

De bepalinggrens is de laagste concentratie waarvoor de meetwaarde nog met een bepaalde onzekerheid kan vastgelegd worden. Gewoonlijk hanteert men hiervoor een herhaalbaarheid van 10% wat overeenkomt met 3.3 maal de aantoonbaarheidsgrens. Voor organische analyses is een herhaalbaarheid van 10% echter in de meeste gevallen niet haalbaar. In dat geval neemt men 25%.

2.11 Selectiviteit

Met selectiviteit wordt bedoeld de mate van onafhankelijkheid van de meetwaarde van componenten andere dan de beoogde.

Voor alle matrices waarvoor de methode toegepast wordt dienen blancostalen geanalyseerd te worden om mogelijke interferentie te detecteren.

Eventueel kan het selectieve karakter van de methode nagegaan worden door regelmatige simultane uitvoering van de analyse met een ander detectiesysteem (bv. confirmatie-analyse met GC-MS of LC-MS of analyse op kolommen van verschillende polariteit).

2.12 Houdbaarheid

De termijn waarbinnen de concentraties van standaardoplossingen, extracten en monsters “niet” veranderen.

3. WERKWIJZE

3.1 Lineariteit

Hieronder zijn verschillende evenwaardige statistische testen beschreven die toelaten te verifiëren of een detectorrespons in het onderzochte concentratiegebied lineair afhankelijk is van de concentratie of eerder een kwadratisch verloop kent. De testen vertrekken van de eerstegraads- en tweedegraadsoplossingen van een regressie-analyse en gaan, rekening houdend met de betrouwbaarheid van de bekomen oplossingen, via een t-test, een F-test of op grafische wijze na of er een significant verschil bestaat tussen beide oplossingen. De testen zijn vrij streng wat kan resulteren in vanuit praktisch oogpunt niet-werkbare nauwe lineaire gebieden. De voorkeur wordt dan ook gegeven aan een niet-statistische test waarbij het lineaire gebied begrensd wordt door een vooraf gedefinieerde toegelaten afwijking van de lineariteit. De toegelaten afwijking is functie van de te analyseren parameter.

Merk op dat kwantificatie aan de hand van een kwadratische oplossing slechts zinvol is indien dit tot relevante verschillen leidt met gehalten bekomen met een lineaire oplossing.

Ook kan kwantificatie aan de hand van een kwadratische oplossing in sommige gevallen omzeild worden door de detectorrespons en de concentratie op logaritmische wijze t.o.v. mekaar uit te zetten. Op deze wijze kan soms een zeer ruim lineair werkgebied gecreëerd worden.

3.1.1 Regressie

Maak voor een relevant werkgebied minstens 3 oplossingen per decade aan met een minimum van 5 over het volledige gebied. De concentraties zijn bij voorkeur equidistant gekozen in een logaritmische schaal. In geval van interne kalibratie wordt de inwendige standaard toegevoegd in een constante concentratie.

Meet de oplossingen in enkelvoud, tenzij geopteerd wordt voor het toepassen van de F-test conform ISO-8466. In dat geval worden voor het hoogste en laagste concentratieniveau 10 herhalingsmetingen uitgevoerd.

Voer een kwadratische fitting en een lineaire regressie uit:

$$A = K_1 C^2 + K_2 C + K_3$$

$$A = K_4 C + K_5$$

met

A = het detectorsignaal of het t.o.v. de inwendige standaard genormaliseerde signaal A/A_s.

C = de concentratie of de t.o.v. de inwendige standaard genormaliseerde concentratie C/C_s.

Controleer het lineair verband tussen signaal en concentratie m.b.v. de testen beschreven in 3.1.2 tot 3.1.5.

3.1.2 t-Test op lineariteit (volgens KIWA procedure) :

Bepaal de standaardafwijking op de coëfficiënt K_1 (S_{K1})(voor de berekeningswijze zie voorbeeld hieronder).

Ga na of K_1 significant verschillend is van 0: voer een t-test uit, waarbij $|K_1|/S_{K1}$ getoetst wordt aan een kritische t-waarde bij 95% confidentie met n-1 vrijheidsgraden:

$$\frac{|K_1|}{S_{K1}} > t(95\%, n-1)?$$

Indien de kritische t-waarde overschreden is is de kwadratische oplossing een betere weergave van het verloop van de meetresultaten dan de lineaire.

Voorbeeld:

Voor een inwendige standaardbenadering worden onderstaande meetresultaten in een EXCEL rekenblad ingevoerd:

conc. i Ci	oppervl. i Ai	conc. IS Cis	opperv IS Ais
9,235	75610	0,378	3850
4,101	39900	0,380	3985
2,077	19243	0,385	3868
1,059	9901	0,379	3860
0,254	2254	0,375	3583
0,054	488	0,378	3671
0,010	100	0,378	3720

Hieruit worden berekend:

Ci/Cis (Ci/Cis)**2	Ai/Ais
24,431	596,884
10,792	116,470
5,395	29,104
2,794	7,808
0,677	0,459
0,143	0,020
0,026	0,001

Voor de lineaire regressie bekomt men na selectie van *Tools, Data analysis, Regression, Ci/Cis (X-range)* en *Ai/Ais (Y-range)* o.a. volgende output:

SUMMARY OUTPUT

<i>Regression Statistics</i>		
Multiple R	0,997666338	
R Square	0,995338121	
Adjusted R Square	0,994405745	
Standard Error	0,539019668	
Observations	7	
	<i>Coefficients</i>	<i>Standard Error</i>
Intercept	0,294646004	0,257234982
X Variable 1	0,811570292	0,024839126

Voor de kwadratische fitting bekomt men na selectie van *Tools, Data analysis, Regression, Ci/Cis en Ci/Cis**2 (X-range)* en *Ai/Ais (Y-range)* o.a. volgende output:

SUMMARY OUTPUT

<i>Regression Statistics</i>		
Multiple R	0,999883992	
R Square	0,999767997	
Adjusted R Square	0,999651996	
Standard Error	0,134438274	
Observations	7	
	<i>Coefficients</i>	<i>Standard Error</i>
Intercept	-0,06806339	0,076404507
X Variable 1	1,008365258	0,023358794
X Variable 2	-0,00822171	0,000940913

De tweedegraadscoëfficiënt bedraagt -0.0082 , de standaardfout 0.00094 . $|K_1|/S_{K1}$ bedraagt 8.7 wat groter is dan de kritische t-waarde van 2.447 . De tweedegraadsterm is significant verschillend van nul.

3.1.3 F-Test op lineariteit (volgens ISO 8466-1) :

De ISO-norm vraagt van eerst een controle uit te voeren op de homogeniteit van de varianties. 10 herhalingsmetingen dienen uitgevoerd te worden voor de hoogste en de laagste concentratie van het onderzochte gebied en de verhouding van de varianties dient aan een F-test onderworpen te worden:

$$F = \frac{S_{\max}^2}{S_{\min}^2}$$

(of omgekeerd indien $F < 1$).

Toets aan de kritische F-waarde bij 95% confidentie en $f_1 = f_2 = 9$.

Indien $F > F_{crit}$ dan is aan de eis voor gelijkheid van variantie niet voldaan en dient het meetgebied verkleind te worden en de test voor gelijkheid van varianties herhaald te worden.

Zijn de varianties homogeen over het onderzochte gebied, bepaal dan de residuele standaardafwijking voor de kwadratische en de lineaire functie (s_{y2} en s_{y1}) (zie ISO 8466-1). Deze waarden worden door Excel gegeven in de *SUMMARY OUTPUT* onder *Standard Error*.

Bereken, met N gelijk aan het aantal meetresultaten, het verschil in varianties ΔV^2 volgens onderstaande vergelijking :

$$\Delta V^2 = (N-2)s_{y1}^2 - (N-3)s_{y2}^2$$

Voer een F-test uit op de onderstaande verhouding :

$$F = \Delta V^2 / s_{y2}^2$$

Indien $F \leq F_{crit}$, bij 95% betrouwbaarheid en $f_1 = 1$ en $f_2 = N-3$, dan wordt met de kwadratische functie geen significant betere relatie tussen signaal en concentratie bekomen en kan de lineaire functie gebruikt worden.

Indien $F > F_{crit}$ dan geldt voor het onderzochte concentratiegebied dat een niet-lineair verband tussen signaal en concentratie te prefereren is boven een lineair.

Voorbeeld:

Voor de bovenstaande oplossingen van de regressie-analyse bekomt men:

$$\Delta V^2 = 1.380$$

$$F = 76.3$$

Met $F_{crit} = 7.71$ bij 95% confidentie is er een duidelijke afwijking van lineariteit.

Opm.:

Voor organische parameters is de ISO werkwijze te omslachtig en dus minder aangewezen.

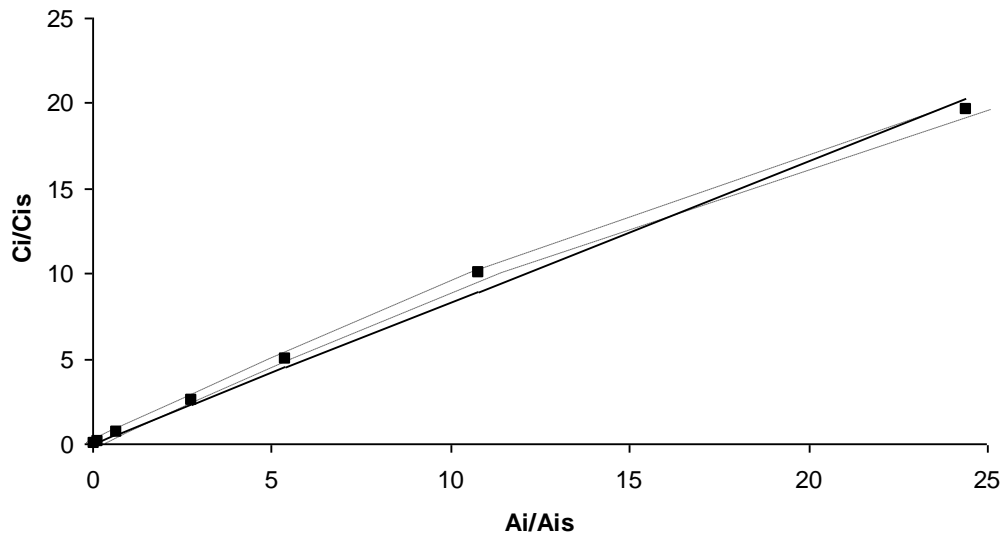
3.1.4 Controle van de lineariteit m.b.v. het betrouwbaarheidsdiagram van de kwadratische functie

Geef het verloop van de kwadratische en lineaire functie grafisch weer op éénzelfde diagram. Construeer aan de kwadratische kromme de 95% betrouwbaarheidskrommen. Ga na of de rechte behorend bij de lineaire functie binnen de betrouwbaarheidskrommen van de kwadratische functie valt (voor de constructie van de betrouwbaarheidskrommen zie ISO 8466 en opmerking hieronder). Indien dit het geval is dan is de lineaire functie evengoed een oplossing van de kwadratische regressie en mag de kwantificatie aan de hand van de lineaire functie gebeuren.

Voorbeeld :

Op basis van de bovenstaande resultaten werd het onderstaande diagram geconstrueerd. De rechte behorend bij de lineaire oplossing valt niet binnen de betrouwbaarheidskrommen van de kwadratische vergelijking en is dus een minder goede oplossing van de regressie (zie figuur 1).

Figuur 1: betrouwbaarheidsdiagram



Opm.:

De ISO-norm 8466 bevat foutieve formules. Voor de juiste formules wordt verwezen naar *W. Funk, Statistische Methoden in der Wasseranalytik*.

Formule (25) wordt:

$$\hat{x} = -\frac{b}{2c} + \sqrt{\left(\frac{b}{2c}\right)^2 - \frac{a - \hat{y}}{c}}$$

Formule (26) wordt:

$$\hat{x} = -\frac{b}{2c} - \sqrt{\left(\frac{b}{2c}\right)^2 - \frac{a - \hat{y}}{c}}$$

Formule (27) wordt:

$$VB(\hat{x}) = \frac{S_y \times t_{f1,P}}{(b + 2c\hat{x})} \times \left\{ \frac{1}{N} + \frac{1}{\hat{N}} + \frac{(\hat{x} - \bar{x})^2 Q_{x^4} + \left(\hat{x}^2 - \frac{\sum x_i^2}{N}\right)^2 Q_{xx} - 2(\hat{x} - \bar{x}) \left(\hat{x}^2 - \frac{\sum x_i^2}{N}\right) Q_{x^3}}{Q_{x^4} Q_{xx} - (Q_{x^3})^2} \right\}^{1/2}$$

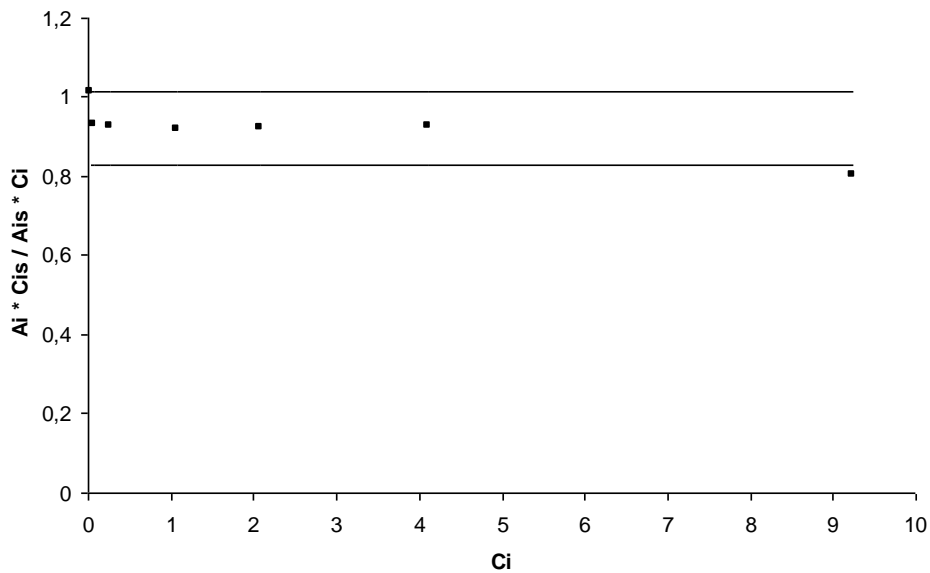
3.1.5 Controle van het lineaire verloop van de responscurve

Zet A/C uit i.f.v. C (externe kalibratie) of $(A \cdot C_{is}) / (A_{is} \cdot C)$ i.f.v. C (interne kalibratie) (zie figuur 2) en bepaal het gebied waarvoor deze waarden niet meer dan een vooropgestelde waarde (bv. 10% of 15%, afhankelijk van de instrumentele herhaalbaarheid) afwijken van de gemiddelde waarde. Dit wordt het *lineaire bereik* van de detector.

Uit figuur 2 blijkt dat voor het bovenstaande voorbeeld aan de lineariteit is voldaan voor het concentratiegebied van 0.1 tot 4 concentratie-eenheden. De hoogste concentratie van 10 valt niet binnen het lineaire bereik van de detector.

Opm.: in feite wordt het constante verloop van de responsfactor RF of van de relatieve responsfactor RRF over het werkgebied gecontroleerd, opdat kwantificering aan de hand van de RF- of RRF-waarde bekomen uitgaande van de kalibratie-oplossing(en), waarvan de concentratie kan afwijken van deze in het staal, verantwoord zou zijn.

figuur 2 : lineair gebied (+/- 10%)



3.1.6 Niet-lineair verband

Indien een niet-lineair verband wordt vastgesteld, ga na hoe relevant het verschil is tussen een resultaat bekomen met een lineaire functie en met een kwadratische functie.

Indien het verschil kleiner is dan de meetonzekerheid (2 maal de standaardafwijking) ga dan door met de lineaire vergelijking.

In het andere geval verklein het concentratiegebied tot men een lineair verband heeft ofwel ga door met de kwadratische benadering.

Voor het bovenstaande voorbeeld heeft men volgende reeks waarden bekomen met de lineaire en kwadratische functies:

Ai/Ais(lin)	Ai/Ais(kwadr)	verschil
20.25	19.65	3%
8.95	9.83	-9%
4.47	5.14	-13%
2.32	2.72	-15%
0.56	0.67	-16%
0.12	0.14	-17%
0.02	0.03	-17%

Met een instrumentele herhaalbaarheid (zie hieronder) die beter is dan 5% is het verschil tussen resultaten bekomen met kwadratische en lineaire functie wel degelijk relevant.

Alternatief kan men opteren voor een log-log benadering. Dit betekent dat men eerst het lineaire verband aantoot tussen $\log_{10}A_i$ en $\log_{10}C_i$ of tussen $\log_{10}(A_i/A_{is})$ en $\log_{10}(C_i/C_{is})$ en nadien de gehalten in de stalen gaat berekenen uitgaande van de (relatieve) responsfactor behorend bij de gelogarithmeerde waarden en uitgaande van de gemeten $\log_{10}A_i$ of $\log_{10}(A_i/A_{is})$ waarde. Merk op dat niet elke software van meetapparatuur toelaat de resultaten te berekenen aan de hand van een logaritmische relatie.

3.1.7 Lineair verband

Wordt een lineair verband vastgesteld zet dan, voor externe kalibratie, het signaal uit i.f.v. de concentratie

$$A = \langle RF \rangle \cdot C$$

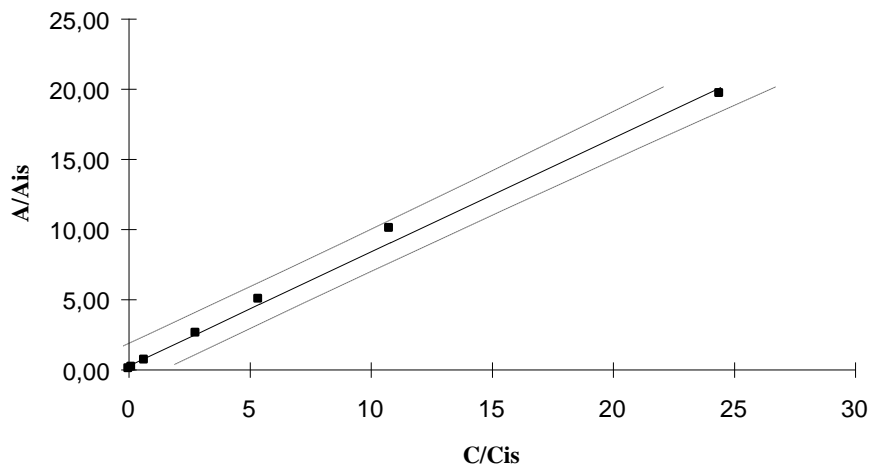
en zet, voor interne kalibratie, het naar de inwendige standaard genormaliseerde signaal uit ifv de verhouding van de concentraties (zie figuur 3)

$$A/A_{is} = \langle RRF \rangle \cdot C/C_{is}$$

Teken de betrouwbaarheidskrommen bij 95% confidentie. Indien het nulpunt gelegen is binnen de betrouwbaarheidskrommen van de rechte dan is er geen afgesneden stuk op de Y-as aanwezig dat significant verschillend is van 0 en mag de rechte door nul geforceerd worden. In het andere geval dient bij de kwantificatie het afgesneden stuk in rekening gebracht te worden.

Opmerking: het voorkomen van een afgesneden stuk is een indicatie voor het optreden van interferentie.

figuur 3 : lineair diagram



Bepaal de correlatiecoëfficiënt en de variatiecoëfficiënt van de methode, V_{xo} (zie ISO 8466-1), en toets deze waarden aan de vooropgestelde kwaliteitseis (gewoonlijk $r^2 > 0.995$ en $V_{xo} < 15\%$).

Opmerking:

de V_{xo} -waarde wordt gegeven door:

$$V_{xo} = \frac{S_{xo}}{\langle x \rangle}$$

met

$\langle x \rangle$ gelijk aan de gemiddelde x-waarde (C_i of C_i/C_{is}),

S_{xo} gelijk aan de standaardafwijking van de methode en gelijk aan

$$S_{xo} = \frac{s_y}{b}$$

met

s_y gelijk aan de residuele standaardafwijking (zie boven),

b gelijk aan de helling van de rechte.

3.2 Instrumentele herhaalbaarheid

Bepaal op basis van minstens 4 herhalingen voor een lage, een midden en een hoge concentratie in het lineaire gebied de herhaalbaarheid (relatieve standaardafwijking) i.f.v. de concentratie.

3.3 Minimum detecteerbare hoeveelheid (MDH)

Maak op basis van de signaal-ruis verhouding bekomen voor een lage standaardoplossing een inschatting van de kleinste hoeveelheid verbinding die net nog gedetecteerd kan worden.

Voorbeeld :

Bekomt men na een injectie van 2 µl van een oplossing van 0.1 µg/ml een S/R = 20, met S/R gedefinieerd als de piekhoogte gedeeld door 3 maal de hoogte van de "peak to peak" ruis, dan kan hieruit een MDH-waarde van 10 pg berekend worden.

3.4 Juistheid en herhaalbaarheid van de methode

Dopeer een blanco monster met een lage, midden en hoge concentratie aan te bepalen verbinding in het te onderzoeken werkgebied. Maak voor elke concentratie minstens 4 monsters aan. Analyseer en bepaal voor elk concentratieniveau het gemiddelde van de gemeten waarden en de standaardafwijking. Bereken terugvinding en herhaalbaarheid.

Indien gecertificeerde materialen beschikbaar zijn analyseer dan bij wijze van ultieme test ook deze materialen.

Optm. : voor elk type matrix waarvoor de methode van toepassing is dient de juistheid en de herhaalbaarheid opnieuw bepaald te worden. Zinvol hierbij is het uitzetten van de gemeten gemiddelde waarden i.f.v. de gedopeerde waarden. Matrixeffecten zijn weerspiegeld in de helling van de rechte (bv. adsorptie aan zwevende deeltjes in oppervlaktewater vertaalt zich in een kleinere helling in vergelijking met drinkwater) of in het afgesneden stuk op de Y-as (positieve/negatieve interferentie).

3.5 Reproduceerbaarheid

De binnen-laboratoriumreproduceerbaarheid wordt bepaald aan de hand van een controlemonster dat op regelmatige basis in analysereeksen wordt meegenomen.

Na 15 metingen van het controlemonster wordt het gemiddelde en de standaardafwijking bepaald en hieruit de juistheid (systematische afwijking) en de binnen-laboratoriumreproduceerbaarheid berekend. Gewoonlijk wordt voor het controlemonster op dat ogenblik een controlekaart opgestart. De binnen-laboratoriumreproduceerbaarheid evolueert mee met de kwaliteit van de controlekaart.

3.6 Nauwkeurigheid

Bereken op basis van de systematische afwijking en de reproduceerbaarheid voor het controlemonster de nauwkeurigheid als zijnde de som van de systematische afwijking (in %, met positief teken) en tweemaal de relatieve standaardafwijking. Op deze wijze heeft men een idee van de maximale afwijking t.o.v. de reële waarde die men voor de meetmethode kan verwachten.

3.7 Recuperatierendement (interne standaardmethode)

Wordt gebruik gemaakt van de interne standaardmethode, waarbij de inwendige standaard voor de opwerking aan het monster toegevoegd wordt, dan wordt automatisch voor mogelijke verliezen tijdens extractie en zuivering gecorrigeerd. Om een inschatting te kunnen maken van het rendement van de opwerking wordt de terugvinding van de inwendige standaard geverifieerd. Dit gebeurt door aan het monster na de opwerking en dus voor de eigenlijke meting een recovery standaard toe te voegen. Door vergelijking van de oppervlakten van de inwendige standaard en de recovery standaard wordt het recuperatierendement van de inwendige standaard bepaald. Het recuperatierendement wordt gegeven door :

$$R\% = \frac{A_{IS} \cdot g_{RS} \cdot 100}{A_{RS} \cdot g_{IS} \cdot RRF_{IS}}$$

met

- A_{IS} = oppervlakte van de inwendige standaard
 A_{RS} = oppervlakte van de recovery standaard
 g_{RS} = toegevoegde hoeveelheid recovery standaard aan het eindextract
 g_{IS} = toegevoegde hoeveelheid inwendige standaard aan het monster voor de monsterzuivering
 RRF_i = relatieve responsfactor van de inwendige standaard t.o.v. de recovery standaard, bepaald aan de hand van het kalibratiemengsel

Op basis van de bij de validatie bekomen waarden voor het recuperatierendement van de inwendige standaard kan voor elke analyse die men uitvoert een eis m.b.t. de terugvinding van de inwendige standaard ingevoerd worden.

3.8 Aantoonbaarheidsgrens

Maak op basis van de signaal-ruis verhouding van de laagst gemeten concentratie voor een gedopeerd monster een inschatting van de aantoonbaarheidsgrens ($1.5 \cdot \text{ruisgrootte} \cdot \text{concentratie} / \text{piekhoogte}$). Dopeer een staal met een concentratie van 1 tot 3 maal de geschatte aantoonbaarheidsgrens. Analyseer het staal 7 maal en bereken de standaardafwijking STD, ev. na toepassing van een uitbijtertest. Bereken de aantoonbaarheidsgrens als :

$$AG = t(99\%, n-1) \cdot STD \approx 3 \cdot STD$$

Ga na of de bekomen aantoonbaarheidsgrens niet teveel afwijkt van de gedopeerde waarde (meer dan 3 maal). Indien dit het geval is, herneem de procedure met een meer geschikte concentratie.

Opmerking:

Is een meetbare blanco aanwezig dan dient rekening gehouden te worden met de bijdrage van de blanco aan het totale voor een lage concentratie gemeten signaal. De standaardafwijking behorend bij het verschil (het voor de blanco gecorrigeerde signaal) wordt bekomen door de standaardafwijking behorend bij het totale signaal met 1.41 te vermenigvuldigen. De aantoonbaarheidsgrens wordt dan :

$$AG = 1.41 t(99\%, n-1) \cdot STD' \approx 4,5 \cdot STD'$$

Hierbij is STD' de standaardafwijking behorend bij het niet voor de blanco gecorrigeerde signaal.

3.9 Houdbaarheid

De houdbaarheid van standaardoplossingen kan geverifieerd worden door vergelijking van de detectorresponsen verkregen bij herhaalde injectie van resp. een oude en een nieuw aangemaakte standaardoplossing. Wordt een afname van de detectorrespons waargenomen dan kan uit de graad van afname een inschatting gemaakt worden van de maximale houdbaarheid van de standaard.

Vooraf dient evenwel een houdbaarheids criterium vastgelegd te worden (bv. maximum toegelaten afname gelijk aan 5%).

Ook controlekaarten van controlemonsters of -standaarden kunnen informatie geven m.b.t. de geldigheid van de gebruikte standaardoplossingen. Het voorkomen van drift (toenemende afwijking van de gemeten waarde aan dezelfde kant t.o.v. de referentiewaarde) is een indicatie voor veroudering van de standaardoplossing.

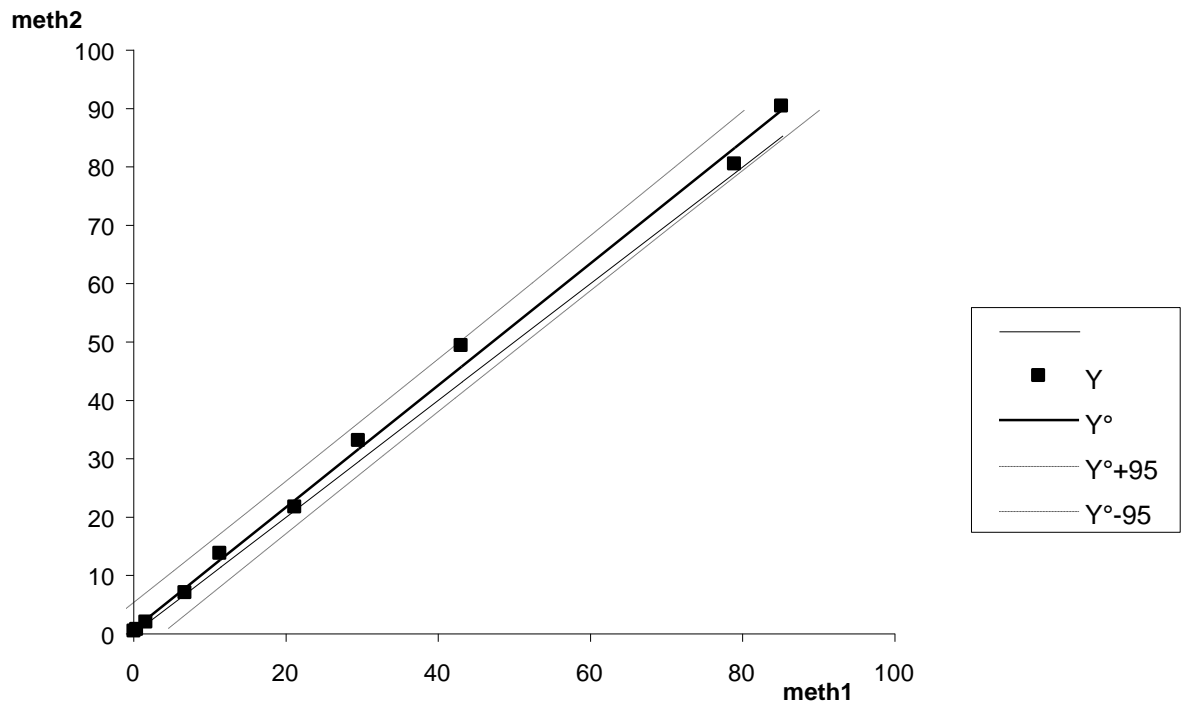
4. GELIJKWAARDIGHEID VAN METHODEN

Worden beperkte wijzigingen aan een genormaliseerde procedure aangebracht (bv. andere monsterzuiveringsstap, vervanging indampstap door groot-volume injectie, ...) dan kan volstaan worden met een beperkt validatie-onderzoek.

Analyseer hiertoe 10 reële monsters van verschillende concentratieniveaus met de genormaliseerde methode en de gewijzigde methode. Neem zoveel mogelijk monsters van verschillende matrixsamenstelling. In geval van multicomponent analyse dienen minstens 5 monsters alle te bepalen componenten te bevatten. Desnoods worden matrixspikes geanalyseerd.

- Vergelijk de met beide methoden bekomen resultaten. Deze mogen, voor elke component en voor elk monster, niet meer dan 2 maal de herhaalbaarheidseis van mekaar afwijken. Indien hieraan niet voldaan is dan kan de vernieuwde methode niet aanvaard worden.
- In het andere geval, zet in grafiek de resultaten bekomen met de gewijzigde methode uit i.f.v. de resultaten bekomen met de genormaliseerde methode (zie figuur 3). In geval van multicomponent analyse wordt voor elke verbinding een grafiek uitgezet. Construeer de eenheidsrechte en ga de ligging van de meetresultaten na t.o.v. de eenheidsrechte. Liggen alle punten aan dezelfde zijde van de eenheidsrechte dan wordt met de gewijzigde methode een systematische fout geïntroduceerd. Ga ook na of bij hogere concentraties een afbuiging is waar te nemen, wijzend op een kleiner lineair bereik.
- Aansluitend, voer een lineaire regressie uit op de meetresultaten en bepaal de richtingscoëfficiënt van de rechte en het afgesneden stuk op de Y-as. Ga na of de richtingscoëfficiënt verschillend is van 1 en/of een afgesneden stuk op de Y-as aanwezig is. Beiden zijn een indicatie voor de introductie van een (al dan niet concentratie-afhankelijke) systematische fout.
- Construeer de 95% betrouwbaarheidskrommen rond de experimentele rechte. Ga na of de eenheidsrechte binnen de betrouwbaarheidskrommen van de experimentele rechte valt. Indien dit het geval is zijn beide rechten niet significant verschillend en is de eenheidsrechte evengoed een oplossing van de lineaire regressie of worden m.a.w. met beide meetmethoden geen significant verschillende resultaten bekomen.
- Voer voor minstens één concentratieniveau herhaalbaarheidsmetingen uit en ga na of aan de herhaalbaarheidseis voldaan is.
- Maak op basis van de signaal-ruisverhouding voor het minst geconcentreerde monster een inschatting van de aantoonbaarheidsgrens voor beide methoden. Ga na of de aantoonbaarheidsgrenzen wezenlijk verschillen en of voor de vernieuwde methode aan de prestatie-eis kan voldaan worden. Indien hier twijfel rond bestaat dan dient een meer uitgebreide bepaling van de aantoonbaarheidsgrens te gebeuren zoals beschreven in 3.8.

Figuur 4 : correlatiediagram voor de vergelijking van 2 methoden



Literatuur

NEN 3114, Nauwkeurigheid van metingen: termen en definities, 1990.

KIWA SWE 96.016, Validatie van bepalingmethoden voor organische micro-verontreinigingen, 1996.

KIWA SWI 92.167, Definitie en vaststellen van aantoonbaarheidsgrenzen van chemische bepalingen, 1992.

ISO 8466, Water quality, Calibration and evaluation of analytical methods and estimation of performance characteristics, 1990.

Accreditatie programma doc. AP04, Raad voor accreditatie, 1995.

Praktische statistiek voor het laboratorium, J.W.A. Klaessens, J.A. van Leeuwen, ten Hagen Stam, 1996.

Statistische Methoden in der Wasseranalytik, W. Funk, V. Dammann, C. Vonderheid, G. Oehlmann, VCH, 1985.