

Positionspapier des VDLUFA zur Planung, Durchführung und Auswertung von Ringversuchen zur Methodenentwicklung

Endfassung 6. September 2007

Bearbeiter: J. Breuer (Stuttgart-Hohenheim), U. Honsel (Kassel), E. Janßen (Kassel), R. O. Kuchenbuch (Rostock), M. Leiterer (Jena), M. Munzert (Freising), J. Schönherr (Leipzig), A. Trenkle (Karlsruhe), W. Übelhör (Karlsruhe), St. Uhlig (Dresden)

1 Zielsetzung

Der Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten e.V. (VDLUFA) hat sich satzungsgemäß u.a. die Aufgabe der „Einführung und Anwendung einheitlicher Untersuchungsmethoden (Verbandsmethoden) und Beurteilungsgrundsätze“ gestellt (§ 3 Abs. 1 Satzung). Methodenentwicklung und -optimierung so wie deren Validierung sind daher ein wichtiges Themenfeld der meisten Fachgruppen des Verbandes. Dieser Standpunkt soll die Öffentlichkeit über die Vorgehensweise des VDLUFA bei der Durchführung von Ringversuchen aufklären, aber auch zur einheitlichen Handhabung von entsprechenden Ringversuchen in den Fachgruppen des Verbandes beitragen.

2 Definition und Abgrenzung

Die folgenden Ausführungen beziehen sich ausschließlich auf Ringversuche zur Entwicklung und Optimierung von Untersuchungsmethoden sowie der Erarbeitung statistischer Kenngrößen im Rahmen der Validierung einer Methode. Derartige Ringversuche werden im Verlauf der Entwicklung und Optimierung einer Methode sowie nach Abschluss der Entwicklungsarbeit zur Ableitung der statistischen Kenngrößen der Methode (Validierung) durchgeführt¹.

3 Grundsätze

Die Planung, Durchführung und Auswertung der Ringversuche orientiert sich an international anerkannten Protokollen (Anonymus 1983, Anonymus 1989, Anonymus 2006) sowie deutschen Vorschriften und Normen (Anonymus 1998)

Die Durchführung des Ringversuches sollte in der Hand der für diese Methodenentwicklung federführenden Einrichtung/Bearbeiter liegen. Der Ringversuchsleiter muss mit den Anforderungen an die Planung, Durchführung und Auswertung von Ringversuchen vertraut sein und über die notwendigen Fachkenntnisse zum spezifischen

¹ Ringversuche mit anderer Zielsetzung (Externe Qualitätssicherung, Kompetenzprüfung von Laboratorien, Zertifizierung von Referenzmaterialien) sind nicht Gegenstand dieses Positionspapiers.

analytischen Problem verfügen. Für die Auswertung ist eine validierte Software zu verwenden, die sich auf die nationalen bzw. internationalen Normen (DIN 38402-41, -42, DIN ISO 5725 bzw. entsprechend fortgeschriebene Regelwerke) stützt. Verfügt der Ringversuchsveranstalter nicht über die entsprechende Software, führt er in Zusammenarbeit mit einer anderen Einrichtung die Auswertung durch, ohne dabei die Gesamtverantwortung für den Ringversuch aufzugeben.

Vor der Durchführung des Ringversuchs muss die Analysenmethode in der zuständigen Fachgruppe hinsichtlich der Arbeitsanweisung mit den Teilnehmern abgestimmt sein. Im Bedarfsfalle kann auch eine Projektgruppe oder ein Arbeitskreis diese Abstimmungsarbeit übernehmen. Innerhalb eines Ringversuches zur Methodenentwicklung können Gruppen von Teilnehmern analytische Einzelprobleme bearbeiten.

Die Ringversuchsergebnisse werden in der zuständigen Fachgruppe diskutiert und Festlegungen zur weiteren Vorgehensweise getroffen².

Bei einem Ringversuch zur Methodvalidierung bedürfen die erarbeiteten statistischen Kenngrößen einer formellen Bestätigung durch einen entsprechenden Beschluss der Fachgruppe³.

Nach Abschluss des Ringversuchsverfahrens übergibt der Ringversuchsveranstalter eine vollständige Dokumentation zum Ringversuch an den Fachgruppenvorsitzenden derjenigen Fachgruppe, in deren Zuständigkeit der Ringversuch durchgeführt wurde. Die Unterlagen werden beim Fachgruppenvorsitzenden für mindestens 20 Jahre archiviert.

4 Planung

4.1 Teilnehmer

Die Festlegung der Teilnehmer am Ringversuch erfolgt in einer Sitzung der Fachgruppe bzw. des Arbeitskreises oder der Projektgruppe. Die Teilnehmer müssen entsprechend fachlich qualifiziert und technisch ausgerüstet sein, um die Ringanalyse bearbeiten zu können⁴. Bei einem Ringversuch zur Ermittlung statistischer Kenndaten für die Validierung einer Methode wird eine möglichst große Anzahl für die Durchführung des Ringversuches qualifizierter Teilnehmer angestrebt. Die Mindestzahl beträgt acht Teilnehmer. Steht keine ausreichende Anzahl qualifizierter Teilnehmer zur Verfügung, sind in Ausnahmefällen auch weniger Teilnehmer möglich (z.B. nicht ausreichend verfügbare Spezialanalysetechnik, s. Kapitel 6).

² In fachlich begründeten Einzelfällen können beispielsweise Ringversuchsergebnisse einzelner Teilnehmer für die statistische Auswertung eliminiert werden.

³ In der Regel erfolgt dies im Rahmen der Abstimmung bei der 2. Lesung der Methode.

⁴ Laboratorien, die entsprechende Analysen erstmals durchführen, gelten in der Regel als für die Teilnahme an einem Ringversuch zur Validierung einer Methode als nicht ausreichend qualifiziert.

4.2 Material

Das Untersuchungsmaterial für den Ringversuch wird entsprechend der anstehenden analytischen Fragestellung ausgewählt. Es muss die zu erwartenden analytischen Probleme der Praxis sowie die Matrixeinflüsse, so weit wie möglich widerspiegeln. Besonders bei der Analytik von Rückständen sind Materialien mit „natürlich gewachsenen Rückständen“ in den Ringversuch einzubeziehen. Die benötigte Gesamtprobenmenge hängt im Wesentlichen von der Masse der Endproben für die jeweiligen Teilnehmer sowie deren Anzahl ab. Bei der Herstellung der Ringversuchsproben ist das chemische Verhalten bzw. die chemische Stabilität der im Ringversuch zu prüfenden Analyten zu berücksichtigen.

4.3 Proben

Aufgrund der zu erwartenden Teilnehmerzahl wird das Material in Portionen (Einzelproben) für die einzelnen Teilnehmer geteilt. Für die Probenteilung sollte die Verwendung eines Probenteilers vorgesehen werden. Die benötigte Einzelprobenmenge ist von der Einwaage und der Anzahl der vorgesehenen Wiederholungsanalysen abhängig. Sie sollte mindestens eine vierfache Wiederholung des gesamten Analysenganges ermöglichen. In der Regel werden 10 - 20 % mehr Proben hergestellt, als für die Teilnehmer benötigt werden. Bei Probenverlust oder anderen unvorhersehbaren Problemen ist so ein Ersatz möglich.

Je nach Fragestellung oder Eigenschaften der Analyten kann es sinnvoll sein, auch Probenextrakte oder -aufschlusslösungen sowie matrixangepasste Standardlösungen zu verschicken. Auf diese Weise lassen sich separate Fehleranteile des Probenaufschlusses bzw. Extraktion sowie Aufreinigungsschritte und der Messung quantifizieren. Zur Überprüfung der Kalibration der eingesetzten Meßgeräte kann zusätzlich eine matrixangepasste Standardlösung mit unbekanntem Analytgehalt in den Ringversuch einbezogen werden. Die Ergebnisse dieser Analysen sind nicht für die Validierung geeignet.

Beim Versand von Probenextrakten, Aufschluss- oder Standardlösungen muss ebenfalls die Stabilität der Analyten sichergestellt sein.

4.4 Analyten (Ringversuchssparameter)

Die Festlegung der im Ringversuch zu analysierenden Parameter erfolgt in einer Sitzung der Fachgruppe bzw. des Arbeitskreises oder der Projektgruppe. Dabei kann zur Vereinfachung aus Gruppen von Analyten mit ähnlichen physikalischen, chemischen oder biologischen Eigenschaften ein Leitparameter ausgewählt werden.

4.5 Zeitplan

Für die Durchführung des Ringversuches ist ein Zeitplan festzulegen. Dabei ist insbesondere die Probenvorbereitung, der Versand, die Durchführung der Analysen und die Ergebnismeldung an den Ringversuchsausrichter zu terminieren. Weiterhin ist der Termin für die Präsentation der Auswertung in der entsprechenden Fachgruppe festzulegen.

Bei hinsichtlich der Stabilität sensiblen Analyten (z.B. mikrobiologische Parameter) kann die konkrete Vorgabe eines Analysentermins notwendig sein.

5 Durchführung

5.1 Probenvorbereitung

Das Material wird gemäß validierter oder allgemein akzeptierter Probenvorbereitungsvorschriften aufbereitet und homogenisiert.(VDLUFA, Anonym)

5.2 Homogenitätstest

Unabhängig von der Probenmatrix und den im Ringversuch zu bestimmenden Parametern muss eine möglichst „gute Homogenität“ der Proben angestrebt werden.

Für die Prüfung der ausreichenden Homogenität der Ringversuchsproben können unterschiedliche Verfahren eingesetzt werden (Leiterer und Uhlig, 2007). Die Auswahl des Verfahrens richtet sich dabei nach der Zielstellung des Ringversuchs, der Probenmatrix, der Art und Anzahl der Ringversuchsparameter und der Anzahl der Proben. Die Durchführung und die Ergebnisse der Homogenitätsprüfung sind zu dokumentieren.

5.3 Kennzeichnung, Zwischenlagerung und Versand der Proben

Aufbewahrung und Versand der Proben erfolgt in Gefäßen, die weder Analyte adsorbieren noch diese aus dem Gefäßmaterial freisetzen. Um die Stabilität der Proben, insbesondere der im Ringversuch zu prüfenden Analyten zu gewährleisten, kann die Einhaltung besonderer Lagerungs- und Transportbedingungen (z.B.: Kühlung oder Tiefgefrieren) notwendig sein. Die Probenkonservierung muss dabei so angelegt sein, dass die zu untersuchenden Parameter bis zum Ende des vorgegebenen Untersuchungszeitraumes stabil sind. Sollte dies nicht möglich sein, kann eine Vergleichbarkeit der Analysenwerte nur über die Einhaltung spezieller Lagerungs- und Transportbedingungen sowie detaillierte Vorgaben des Analysenzeitpunktes erreicht werden.

Die Probengefäße sind eindeutig zu beschriften. Eine spätere Zuordnung der im Ringversuch ermittelten Analysenwerte zu den im Homogenitätstest ermittelten Ergebnissen muss sicher möglich sein werden.

5.4 Ringversuchsunterlagen

Zusammen mit den Proben werden den Ringversuchsteilnehmern ein Zeitplan für die Durchführung des Ringversuches, Vorschriften zur Behandlung/Lagerung der Proben, eine detaillierte Beschreibung der anzuwendenden Analysemethoden sowie Formblätter bzw. Datenträger zur Übermittlung der Analyseergebnisse übergeben. Die Vorgaben für die Datenerfassung müssen dabei mindestens Informationen zu den zu analysierenden Einzelparametern, der Anzahl der Wiederholungsanalysen, den anzugebenden signifikanten Stellen und Maßeinheiten sowie zur verwendende Bezugsbasis (z.B. Trockenmasse, Frischmasse, Fettgehalt) beinhalten. Außerdem kann die Abfrage zusätzlicher Informationen zu experimentellen Details, die für die Auswertung erforderlich sind, notwendig sein.

6 Auswertung

Für die Datenverwaltung und -auswertung ist die Verwendung einer validierten Software (z. B. RING 4.1, ProLab, ProLab Plus (Uhlig, 2007)) zwingend erforderlich. Es ist anzustreben, dass die Ringversuchsteilnehmer ein Modul zur elektronischen Datenerfassung (per Datenträger oder E-Mail) erhalten, damit die Daten automatisch ins Auswerteprogramm übertragen werden können.

Vor der Eliminierung von bei der Plausibilitätskontrolle auffälliger Daten (nicht valide Daten), ist mit dem betreffenden Ringversuchsteilnehmer Rücksprache zu nehmen, um bei formalen Fehlern (z.B. falsche Kommasetzung, Maßeinheit oder Berechnungsbasis) eine Korrektur vornehmen zu können. Rücksprache und Grund einer eventuellen Korrektur müssen dokumentiert werden.

Vor der statistischen Auswertung der Ergebnisse sollte eine Prüfung auf Normalverteilung der einzelnen Datensätze für alle Ringversuchsparameter durchgeführt werden. Liegt bei einem Parameter kein normalverteilter Datensatz vor, muss die Ursache dafür ermittelt werden. In begründeten Fällen kann die Auswertung mit einem robusten Verfahren (z.B. Q-Methode, nach Schweizer Lebensmittelhandbuch) erfolgen.

Eine Auswertung der normalverteilten Datensätze erfolgt nach DIN ISO 5725 oder DIN 38402 A42 . Statistische Ausreißer vom Typ A (abweichender Einzelwert innerhalb der Wiederholungen in einem Labor) und Typ B (abweichender Labormittelwert) werden grundsätzlich eliminiert. Ausreißer vom Typ C (zu hohe laborinterne Streuung der Einzelwerte) werden in der Regel nicht aus dem Datensatz entfernt.

Für die statistische Berechnung müssen nach der Ausreißerbereinigung mindestens acht valide Datensätze verbleiben. In Ausnahmefällen kann die statistische Auswer-

tung auch mit weniger Datensätzen durchgeführt werden⁵. Dies muß begründet werden. Es muß weiterhin deutlich gemacht werden, dass die ermittelten Kenngrößen in diesem Fall mit einer sehr viel größeren Unsicherheit behaftet sind.

Die Dokumentation der statistischen Ringversuchsauswertung muss mindestens nachfolgende Kenngrößen enthalten:

- Untersuchungsparameter
- Auswerteverfahren
- Anzahl der Teilnehmer (Labore)
- Anzahl der eliminierten Ausreißer
- Ringversuchsmittelwert
- Vergleichstandardabweichung (absolut, relativ)
- Wiederholstandardabweichung (absolut, relativ)
- Horwitz-Verhältniszahl (HORRAT)⁶ (Horwitz, 1995)
- Wiederfindungsrate (bei Sollwertvorgabe),
- Nachweis- und Bestimmungsgrenze (Anonymus, 1994)

7 Diskussion der Ergebnisse

Die Präsentation und fachliche Diskussion der Ringversuchsergebnisse erfolgt in der Regel in der betreffenden Fachgruppe bzw. im Arbeitskreis. In Ausnahmefällen (während der Methodenentwicklung) kann die fachliche Diskussion der Ergebnisse auch lediglich in der damit beauftragten Projektgruppe erfolgen. Der Leiter der Projektgruppe berichtet dann in der nächsten Fachgruppen- bzw. Arbeitskreissitzung.

Im Rahmen der fachlichen Diskussion der Ergebnisse können auf Beschluss des jeweiligen Gremiums Änderungen an der Ringversuchsauswertung (z.B. fachlich begründete Eliminierung zusätzlicher Laboreinzelwerte, Anwendung eines anderen, aus fachlicher Sicht besser geeigneten Auswerteverfahrens) vorgenommen werden.

Die Ergebnisse der Diskussion, insbesondere die vorgenommenen Änderungen, werden im Protokoll der Fachgruppen- bzw. Arbeitskreissitzung dokumentiert.

⁵ Sofern jedes der beteiligten Laboratorien einen speziellen faktoriellen Versuchsplan realisiert, ist darüber hinaus auch die Durchführung von Ringversuchen mit nur 3 oder 4 Laboratorien möglich. Dieser Versuchsplan bedeutet eine Variation von Einflussgrößen bei der Durchführung in den beteiligten Laboratorien, z. B. unterschiedliche Geräte, Personen, Einwaagen, Temperaturen usw., um die Breite der Variationen bei einer größeren Anzahl von Teilnehmern zu simulieren (Uhlig, 2006).

⁶ Der HORRAT-Wert ist eine grobe, aber sehr einfache und praktikable Kenngröße zur Charakterisierung der Präzision. Er überschätzt jedoch die Präzision in extremen Konzentrationsbereichen und ist deshalb für die Bereiche < 10 ppb und > 10 % nur eingeschränkt gültig. Für die Abschätzung in diesen Konzentrationsbereichen müssen modifizierte Gleichungen angewendet werden (Thompson, 2000). Der HORRAT-Koeffizient gilt nicht für empirisch definierte Analysenverfahren (z. B.: Wassergehalt,

8 Ableitung der Validierungsdaten für die Methode

Für eine Methodenbeschreibung sind folgende statistische Kenndaten erforderlich:

- Arbeitsbereich,
- Aussagen zur Linearität der Kalibration,
- Nachweis- und Bestimmungsgrenze (inkl. Benennung der Berechnungsmethode) (Anonymus 1994 u. 2003),
- Wiederhol- und Vergleichsstandardabweichung, eventuell auf verschiedene Niveaus des Analyten bezogen,
- HORRAT_R-Koeffizient (Horwitz, 1995; Thompson 2000; Anonymus, 2004; Nät-scher, 2006, Leiterer, 2007)
- Erweiterte Messunsicherheit, errechnet aus der Vergleichsstandardabweichung durch Multiplikation mit dem Faktor 2 (Bassler et. al., 1981; EURACHEM, 2004; Danier et. al, 2005)
- Wiederfindungsrate
- Aussagen zur Selektivität/Spezifität und Robustheit (Leiterer, 2007)

9 Dokumentation

Der Auswerter des Ringversuches übergibt an alle Teilnehmer eine anonymisierte Ringversuchsauswertung, die neben einer Kurzinformationen zu den im Ringversuch untersuchten Proben, alle unter Punkt 5 genannten statistischen Kenngrößen sowie eine parameterspezifische, grafische Darstellung enthält.

Für alle Ringversuche aus denen Kenngrößen für die Validierung einer Methode abgeleitet werden, muss zusätzlich ein ausführlicher Ringversuchsbericht erstellt werden. Dieser Bericht muss neben den o.g. Daten zusätzlich alle in die Ringversuchsauswertung einbezogenen Einzelwerte, eine Dokumentation zur Aufbereitung, Homogenisierung, Teilung, Verpackung und zum Versand der Proben sowie eine Dokumentation der Ergebnisse des Homogenitätstests enthalten.

Außerdem erfolgt eine Dokumentation der am Ringversuch teilgenommenen Laboratorien (ohne Zuordnung zu den Daten) sowie der im Protokoll der Fachgruppen- bzw. Arbeitskreissitzung im Rahmen der Diskussion der Ringversuchsergebnisse getroffenen Festlegungen. Die Dokumentation kann in elektronischer Form auf Datenträger erfolgen.

10 Literatur

Anonymus, DIN-, CEN- und ISO-Normen zur Probenvorbereitung z. B. ISO 11464 Soil quality – Pretreatment of samples for physico-chemical analysis; DIN EN 15002 Charakterisierung von Abfällen – Herstellung von Prüfmengen aus der Laboratoriumsprobe, 2006; ISO 6498, Animal feeding stuffs – Preparation of test samples

Anonymus 1983, Pure Appl. Chem. 35, 553-556, 1983

Anonymus 1989, Guidelines for Collaborative study Procedure to Validate Characteristics of a Method of Analysis, final Draft, J. Assoc. off Anal. Chem. 72, 4, 1989

Anonymus 1994: Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze, DIN 32645, Beuth Verlag, Berlin, 1994, 10 S.

Anonymus 1998, LAWA – AQS Merkblätter, Erich Schmidt Verlag, 1998

Anonymus 2006, CEN / TR 15175 Charakterisation of sludges – Protocol for organizing and conducting interlaboratory tests of methods for chemical and microbiological analysis of sludges, 2006

R. Bassler, K. Ranfft, R. Seibold, Spielräume – Toleranzen, Kraftfutter 6, 288, 1981

J. Danier, E. Janßen, J. Kirmas, R. Klose, K. Michels, J. Schönherr, A. Trenkle: Position der Fachgruppen VI und XI des VDLUFA zur Angabe der Messunsicherheit und Wiederfindungsrate gemäß RL 2005/6/EG, 2005

EURACHEM, 2004/ EURACHEM/CITAC Leitfaden Ermittlung der Messunsicherheit bei analytischen Messungen, Zweite Auflage, 2. Auflage (Internetversion), 2/2004, S. 23 - 24

W. Horwitz: Protocol for the design, conduct and interpretation of method-performance studies, Pure & Appl. Chem., Vol. 67, No. 2, 331-343, 1995

M. Leiterer, S. Uhlig: Homogenitätsprüfung von Ringversuchsproben, http://www.tll.de/ainfo/ai_idx.htm, Jena, 2007

M. Leiterer: Validierung von Untersuchungsmethoden in der analytischen Praxis, http://www.tll.de/ainfo/ai_idx.htm, Jena, 2007

L. Nätscher, Bewertung der Qualität von VDLUFA-Methoden im Bereich der Bodenuntersuchung mittels Horwitz-Ratios, VDLUFA-Kongreß Freiburg, Poster Nr. 38, 2006

M. Thompson : Recent trends in inter-laboratory precision at ppb and sub-ppb concentrations in relation to fitness for purpose criteria in proficiency testing, Analyst, 125, 385 – 386, 2000

S. Uhlig, Handbuch ProLab Plus, Fa. Quo Data GmbH, Dresden, 2006

S. Uhlig: Software RING, ProLab, ProLab Plus, <http://www.quodata.de>, Dresden, 2007

S. Uhlig, persönliche Mitteilung

VDLUFA, Methodenhandbuch, verschiedene Bände