

UMWELTFORSCHUNGSPLAN DES
BUNDESMINISTERIUMS FÜR UMWELT,
NATURSCHUTZ UND REAKTORSICHERHEIT
- Wasserwirtschaft -

Forschungsbericht 298 22 242
UBA-FB 000194



Validierung neuer kostengünstiger Nachweisverfahren (Immunoassay) für Pestizide

von

Dr. Rudolf J. Schneider

Agrikulturchemisches Institut
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Institutsleiter

Prof. Dr. Heiner E. Goldbach

unter Mitarbeit von

PD Dr. habil. Steffen Uhlig

quo data GmbH, Dresden

Dipl.-Ing. agr. Martina Becher

Agrikulturchemisches Institut, Universität Bonn

Im Auftrag des Umweltbundesamtes

Diese TEXTE-Veröffentlichung kann bezogen werden bei
Vorauszahlung von DM 15,-- (7,67 Euro)
durch Post- bzw. Banküberweisung,
Verrechnungsscheck oder Zahlkarte auf das

Konto Nummer 4327 65 - 104 bei der
Postbank Berlin (BLZ 10010010)
Fa. Werbung und Vertrieb,
Ahornstraße 1-2,
10787 Berlin

Parallel zur Überweisung richten Sie bitte
eine schriftliche Bestellung mit Nennung
der **Texte-Nummer** sowie des **Namens**
und der **Anschrift des Bestellers** an die
Firma Werbung und Vertrieb.

Der Herausgeber übernimmt keine Gewähr
für die Richtigkeit, die Genauigkeit und
Vollständigkeit der Angaben sowie für
die Beachtung privater Rechte Dritter.
Die in der Studie geäußerten Ansichten
und Meinungen müssen nicht mit denen des
Herausgebers übereinstimmen.

Herausgeber: Umweltbundesamt
Postfach 33 00 22
14191 Berlin
Tel.: 030/8903-0
Telex: 183 756
Telefax: 030/8903 2285
Internet: <http://www.umweltbundesamt.de>

Redaktion: Fachgebiet II 3.6
Dr. Peter Lepom

Berlin, Juli 2001

Berichts-Kennblatt

1. Berichtsnummer UBA-FB	2.	3.
4. Titel des Berichts Validierung neuer kostengünstiger Nachweisverfahren (Immunoassay) für Pestizide		
5. Autor(en), Name(n), Vorname(n) Schneider, Dr. Rudolf J.	8. Abschlußdatum 20.06. 2001	
	9. Veröffentlichungsdatum Juni 2001	
6. Durchführende Institution (Name, Anschrift) Agrikulturchemisches Institut Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn Karlrobert-Kreiten-Str. 13 53115 Bonn	10. UFOPLAN-Nr. 298 22 242	
	11. Seitenzahl 125	
	12. Literaturangaben 71	
7. Fördernde Institution (Name, Anschrift) Umweltbundesamt, Postfach 33 00 22, D-14191 Berlin	13. Tabellen und Diagramme 14	
	14. Abbildungen 40	
	15. Zusätzliche Angaben	
16. Kurzfassung Im Rahmen dieses F+E-Vorhabens wurde ein verallgemeinerungsfähiges statistisches Konzept zur Durchführung laborinterner Validierungen (in-house-Validierung) für immunchemische Analysenverfahren entwickelt, welches auf dem sogenannten „Uncertainty“-Konzept basiert. Seine Leistungsfähigkeit wurde am Beispiel der Validierung eines kommerziell verfügbaren Immunoassays für die quantitative Bestimmung des Getreideherbizids Isoproturon in Wasser demonstriert. Als brauchbarer Schätzwert für die Unsicherheit des Konzentrationsergebnisses erwies sich die Streuung (Standardabweichung) der logarithmierten optischen Dichte (ln OD). Wichtige Varianzkomponenten waren die Raumtemperatur, die Position der Probe auf der Platte, die Expertise des Bearbeiters sowie die verwendete Ausrüstung (Pipette vs. Tropffläschchen, automatischer Washer vs. Waschen per Hand). Die resultierenden Unsicherheiten wurden quantifiziert, in ihren gegenseitigen Wechselwirkungen betrachtet und z.T. rechnerisch kompensiert. Matrixeinflüsse wurden anhand eines Vergleichs der mittels ELISA und HPLC ermittelten Isoproturongehalte von Oberflächenwasserproben untersucht und erwiesen sich als nicht relevant. Im Ergebnis der Untersuchungen wurde ein Validierungskonzept in mehreren Schritten vorgeschlagen, das ein Kalibriermodell beinhaltet, welches über die normalerweise verwendete 4-Parameter-Funktion hinausgeht. Es liefert eine Übersicht über die wichtigsten Varianzkomponenten einschließlich einer Abschätzung ihres Beitrages zur Messunsicherheit, eine Powerfunktion, die angibt, ab welcher Analytkonzentration mit einem statistisch gesicherten Ergebnis zu rechnen ist, sowie die Möglichkeit der Berechnung von Nachweis- und Bestimmungsgrenzen in Abhängigkeit von den gewählten experimentellen Bedingungen.		
17. Schlagwörter Validierung, Immunoassay, Pestizide, Isoproturon, Oberflächengewässer Uncertainty-Konzept, In-house Validierung, Messunsicherheitskonzept, laborinterne Validierung		
18. Preis	19.	20.

Report Cover Sheet

1. Report No. UBA-FB	2.	3.
4. Report Title Validation of novel cost-effective detection methods (immunoassay) for pesticides		
5. Autor(s), Family Name(s), First Name(s) Schneider, Dr. Rudolf J.		8. Report Date 06/20/01
6. Performing Organisation (Name, Address) Institute of Agricultural Chemistry University of Bonn Karlrobert-Kreiten-Str. 13 D-53115 Bonn, Germany		9. Publication Date June 2001
		10. UFOPLAN-Ref. No. 298 22 242
7. Sponsoring Agency (Name, Address) Umweltbundesamt, Postfach 33 00 22, D-14191 Berlin		11. No. of Pages 125
		12. No. of Reference 71
		13. No. of Tables, Diagrams 14
		14. No. of Figures 40
15. Supplementary Notes		
16. Abstract <p>Within the framework of the project a generalised concept for performing in-house validation studies of immunoassays which is based on the concept of uncertainty of measurement has been set up. The efficiency of the concept has been demonstrated by validation of a commercially available ELISA test for the quantitative determination of the grain herbicide isoproturon in water. The variance of the logarithm of the optical density (ln OD) has been chosen for estimating the uncertainty of the analytical results. As important components of variance have been ascertained room temperature, the position of the sample on the plate, the skill of the operator and the type of equipment used (pipettes vs dropper bottles, automated washer vs washing by hand). The resulting uncertainties were quantified, being considered in their interactions and partly mathematically compensated. Matrix effects have been studied with real samples (mainly surface water) by comparison of the results of the ELISA test with that of HPLC analysis and can be regarded as non-relevant. As a result of the study a multi-step validation concept is proposed, which implies a calibration model which leads beyond the 4-parameter function usually applied. It gives an overview on most important components of variance and an estimate of their contribution to the overall uncertainty, a power function which indicates from what concentration on a statistically sound result can be expected and the possibility of calculating the limit of detection and the limit of determination as a function of experimental conditions.</p>		
17. Keywords Validation, immunoassay, pesticides, isoproturon, surface water uncertainty concept, in-house validation		
18. Price	19.	20.

Inhaltsverzeichnis

1	Problem und Aufgabenstellung	10
2	Stand von Wissenschaft und Technik	
2.1	Status quo der Validierung von Immunoassays	12
2.2	Messunsicherheits-Konzept	14
2.3	Laborinterne Validierung	15
3	Material und Methoden	
3.1	Verzahnung von Versuchsplanung, Experiment und Auswertung	16
3.2	Modell-Immunoassay	18
3.3	Referenzverfahren	22
4	Ergebnisse	
4.1	Uncertainty der Kalibrierfunktion bei Immunoassays	
4.1.1	Verteilung und Korrelation der Parameter der Kalibrierfunktion	28
4.1.2	Deskriptive Analyse der Kalibrierfunktion	34
4.2	Uncertainty-Funktion der Ergebnisse bei Immunoassays	
4.2.1	Plattenspezifische Uncertainty	35
4.2.2	Plattenübergreifende Uncertainty	37
4.3	Festlegung der zu prüfenden Uncertainty-Faktoren	39
4.4	Überprüfung der Uncertainty-Faktoren	
4.4.1	Faktorengruppe „Matrix“	40
4.4.2	Faktorengruppe „Kit“	
4.4.2.1	Ausstattung	41
4.4.2.2	Charge	42
4.4.2.3	Kalibrierstandards	42
4.4.2.4	Selektivität	43
4.4.3	Faktorengruppe „Position“	
4.4.3.1	Experiment „Trend 1“	45
4.4.3.2	Experiment „Trend 2“	53
4.4.4	Faktorengruppe „Temperatur“	
4.4.4.1	Faktoren	55
4.4.4.2	Statistische Analyse	56
4.4.4.3	Aufstellung und Überprüfung eines Vorhersagemodells	63
4.4.4.4	Konfirmationsanalyse	67

4.4.5 Faktorengruppe „Labor und Personal“	
4.4.5.1 Faktoren	71
4.4.5.2 Statistische Analyse	71
4.4.6 Faktorengruppe „Arbeitsweise“	
4.4.6.1 Faktoren	75
4.4.6.2 Statistische Analyse	76
4.4.7 Gewichtung der Uncertainty-Faktoren	78
4.5 Realproben	
4.5.1 Realprobenexperiment I	
4.5.1.1 Pipettierschema	81
4.5.1.2 Statistische Analyse der Kalibrierung	83
4.5.1.3 Auswertesystem für das Realprobenexperiment I	85
4.5.1.4 Ergebnisse	88
4.5.2 Realprobenexperiment II	93
4.5.3 Nachweisgrenze	
4.5.3.1 Power-Funktion	96
4.5.3.2 Konfidenz- und Präzisionsprofile	100
4.6 Beurteilung des getesteten Immunoassays und Handlungsempfehlungen	104
4.7 In-house Validierungskonzept für Immunoassays	107
5 Schlussfolgerungen und Ausblick	114
6 Zusammenfassung	117
7 Literaturverzeichnis	
7.1 Zitierte Literatur	119
7.2 Eigene Veröffentlichungen und Präsentationen	124
Verzeichnis erhältlichlicher Anhänge	125

Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

Abbildungen:

Abb. 1:	Bezeichnung und Abfolge der Projektabschnitte	17
Abb. 2:	Prinzip des ELISA	20
Abb. 3:	Schematischer Verfahrensablauf eines ELISA	21
Abb. 4:	Strukturen einiger wichtiger (problematischer) Wirkstoffe	25
Abb. 5:	Teilweise HPLC-Trennung von 19 Herbizidwirkstoffen	26
Abb. 6:	Trennung des kritischen Peaktripels Diuron/Isoproturon/Metobromuron	27
Abb. 7:	Auftragungsschema für den Datensatz zur Ermittlung der Uncertainty der Kalibrierfunktion (Terbuthylazin-ELISA)	29
Abb. 8:	Kalibrierkurve für Terbuthylazin	29
Abb. 9:	Verteilung der Werte für den Testmittelpunkt (Variable C) für 275 Kalibrierdatensätze (Terbuthylazin-ELISA)	31
Abb. 10:	Box-Plot für die 4 Parameter des bereinigten Triazin-Testdatensatzes	32
Abb. 11:	Höhenliniendiagramm für die Abhängigkeit des Parameters B von C und D	33
Abb. 12:	Kalibrierung unter Verwendung von Laborstandards bzw. Kitstandards	43
Abb. 13:	Kreuzreaktion anderer Herbizide im Isoproturon-ELISA	45
Abb. 14:	Ortsabhängiges Konzentrationsergebnis einer Kontrolle	46
Abb. 15:	Verteilung der Positivkontrollen	47
Abb. 16:	Pipettierschema für die Experimente zum Positionseffekt	49
Abb. 17:	„Trends“ in der optischen Dichte quer über die Platte, bei unterschiedlichen Vorinkubationszeiten und Konzentrationen	52
Abb. 18:	Auswirkungen von erniedrigtem OD-Wert auf die Konzentration	53
Abb. 19:	Wirkung der Auftragsrichtung auf die Verteilung der Messwerte;	
	a: „Gedrehte“ Platte	54
	b: „Nicht-gedrehte Platte“	54
Abb. 20:	a) Einfluss der Temperatur (19 °C/21 °C) auf die Messwerte	58
	b) Wirkung der Probenauftragsrichtung (-1: her, +1: hin)	59
	c) Einfluss der Spalte	61
	d) Einfluß der Inkubationszeit (60/120 min)	62

Abb. 21: Normalverteilungsplot für die 6 Platten des Temperaturexperiments	65
Abb. 22: Cook'sche Distanzmaße zur Ausreisserermittlung	66
Abb. 23: Korrelation von Messwerten und Schätzwerten nach dem Modell	67
Abb. 24: Vergleich von Messung und Schätzung für 3 Platten	68
Abb. 25: Streuung der Ergebnisse für Operatoren unterschiedlichen Trainings	74
Abb. 26: Normalplot der Residuen zur Prüfung der Übereinstimmung von Modell und Realität bei den Experimenten zur Arbeitsweise	78
Abb. 27: Pipettierschema des Realprobenexperiments I	82
Abb. 28: Korrelation von ELISA- und HPLC-Ergebnissen für die Realproben I	92
Abb. 29 a) Pipettierschema für das Realprobenexperiment II: ganze Platten (Pipettierrichtung in Spalten)	93
b) Pipettierschema für das Realprobenexperiment II: Streifen (Pipettierrichtung in Zeilen)	94
Abb. 30: Kalibrierfunktionen aus dem Realprobenexperiment II	94
Abb. 31: Powerfunktionen für das Realprobenexperiment II	97
Abb. 32: Powerfunktion für das Realprobenexperiment I	98
Abb. 33: Konfidenzprofil bei hohem Qualitätsniveau	101
Abb. 34: Präzisionsprofil bei hohem Qualitätsniveau	101
Abb. 35: Konfidenzprofil bei mittlerem Qualitätsniveau	102
Abb. 36: Präzisionsprofil bei mittlerem Qualitätsniveau	102
Abb. 37: Konfidenzprofil bei niedrigem Qualitätsniveau	103
Abb. 38: Präzisionsprofil bei niedrigem Qualitätsniveau	103
Abb. 39: Pipettierschema für 16 Faktorstufenkombinationen auf zwei Konzentrationsniveaus in Dreifachbestimmung	110
Abb. 40: Pipettierschema für den „inneren Plan“	111

Tabellen:

Tab. 1: Parameter des HPLC-Referenzverfahrens	24
Tab. 2: Übersicht über die erstellten Lösungen der 19 Einzelsubstanzen	25
Tab. 3: Untersuchte Unsicherheitsfaktoren bzw. Uncertainties	40
Tab. 4: Parametrisierung zu untersuchender Faktoren im Experiment „Trend 1“	48
Tab. 5: Regressionsanalyse für Geometriefaktoren und deren Wechselwirkungen (AxB)	50
Tab. 6: Faktoren und Stufen für das Experiment „Temperatur“	56
Tab. 7: Vergleich der Residualstandardabweichungen der verschiedenen Experimente	69
Tab. 8: Kombination von Uncertainties und resultierende Streuungen	80
Tab. 9: Positionseffekte (Spalte) in den Platten des Realprobenexperiments I	84
Tab. 10: Beschreibung der Realproben aus Bonn und Umgebung	89
Tab. 11: Ergebnisse der Bonner Realproben	89
Tab. 12: Faktorstufen und Ergebnisse für das Realprobenexperiment II	95
Tab. 13: Faktorstufenkombination für verschiedene Qualitätsniveaus	100
Tab. 14: Designmatrix eines teilfaktoriellen Versuchsplans für 7 Faktoren	109

Erläuterung der Abkürzungen, Maßeinheiten, Symbole

Abkürzungen:

bzgl.	bezüglich
div.	diverse
ELISA	<u>E</u> nzyme- <u>L</u> inked <u>I</u> mmunosorbent <u>A</u> ssay
HPLC	Abk. für high performance liquid chromatography = Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HPR	horseradish peroxidase (Enzym Meerrettichperoxidase)
IPU	Isoproturon
MTP	Mikrotiterplatte
NG	Nachweisgrenze
POD	Peroxidase (Enzym)
SPE	Festphasenextraktion (von <u>s</u> olid <u>p</u> hase <u>e</u> xtraction)
Std.Abw.	Standardabweichung
TMB	(3,3',5,5'-)Tetramethylbenzidin
u.a.	unter anderem, und andere
UBA	Umweltbundesamt
UOM	Uncertainty of Measurement (Messunsicherheit)
UV	Ultraviolett (bzw. Detektion durch Absorption ultravioletten Lichts)
Vk	Variationskoeffizient

Maßeinheiten:

ng/l	Nanogramm pro Liter: 1 ng/l = 0,001 µg/l = 0,000001 mg/l
nm	Nanometer (10^{-9} m)
M	Mol pro Liter (Stoffmengenkonzentration); auch: mM = Millimol/l
min ⁻¹	„pro Minute“; Frequenzangabe
min	Minute
mbar	Millibar
ppb	part-per-billion (1 Teil auf eine Milliarde Teilchen, z.B. 1 µg/l)
µg/l	Mikrogramm pro Liter: 1 µg/l = 0,001 mg/l
µm	Mikrometer (10^{-6} m)

Symbole:

i	laufende Nummer (i = 1 ... n)
n	Anzahl
OD	Optische Dichte
s	Standardabweichung
[]	einheitenfreie Größe

1 Problem und Aufgabenstellung

Der steigende Bedarf an umweltrelevanten Analysenergebnissen könnte durch eine vermehrte Anwendung von Immunoassays mit abgedeckt werden, wobei gleichzeitig die Budgets entlastet würden. Es hat sich jedoch gezeigt, dass Routinelabors nur in sehr geringem Umfang auf diese Analysenverfahren zurückgreifen. Als wichtigste Gründe für dieses Missverhältnis sind zu nennen:

- (1) mangelnde Verfügbarkeit von Tests
- (2) keine Multianalytfähigkeit
- (3) mangelhafte Dokumentation der Leistungsfähigkeit
kommerziell erhältlicher Immunoassays durch die Hersteller
- (4) schlechte Erfahrungen bei ersten Versuchen mit kommerziellen Tests
- (5) Mangel an allgemein akzeptierten Methoden zur Dokumentation der Nachweisempfindlichkeit, der Präzision und der Genauigkeit und damit keine Justitiabilität der Ergebnisse

Der erste Punkt ist vor allem eine Frage des Marktes, d.h. der Absatzmöglichkeiten, ist also eher eine Folge der geringen Akzeptanz als deren Ursache. Punkt 2 dagegen ist eine systemimmanente Besonderheit, die lediglich besagt, dass Immunoassays nicht in allen Bereichen mit physikalisch-chemischen, vor allem sogenannten "Multi"-Methoden, konkurrieren können und nur dann sinnvoll anwendbar sind, wenn es darum geht,

- in einem längerfristigen Monitoring oder breitflächigen Screening
- in kurzer Zeit
- eine große Anzahl von Proben bzw. Extrakten
- mit geringem finanziellem Aufwand
- und geringem Personaleinsatz
- auf das Vorkommen einer Substanz bzw. einer Leitkomponente

zu untersuchen.

Die Punkte 3 – 5 dagegen sind auf eine unzureichende Validierung von Immunoassays zurückzuführen. Da nach den bisherigen Erfahrungen nicht davon auszugehen ist, dass die Hersteller selbst ernsthafte Schritte in Richtung einer Vereinheitlichung der Dokumentation ihrer Assays unternehmen, ist es erforderlich, von Seiten der Anwender Validierungskriterien zu erarbeiten und festzulegen. Wenn diese Kriterien und die Vorgehensweise in einem allgemein anwendbaren Konzept zur Validierung niedergelegt werden könnten, so wäre dies zum Nutzen aller Anwender derartiger Tests und die Anzahl fehlerhafter Ergebnisse würde reduziert. Dies wiederum brächte die wünschenswerte Verbesserung der Akzeptanz von Immunoassays in der Umweltanalytik und höbe das Vertrauen in Ergebnisse, die mit immunchemischen Verfahren erzielt werden, so dass diese in Zukunft auf einer breiten Basis, auch in gesetzlich geregelten Bereichen, Verwendung finden könnten.

Im Rahmen dieses F+E-Vorhabens sollte ein verallgemeinerungsfähiges statistisches Konzept zur Durchführung laborinterner Validierungen (*in-house Validierung*) für immunchemische Analysenverfahren entwickelt werden, welches auf dem so genannten „Uncertainty“-Konzept basiert. Seine Leistungsfähigkeit war am Beispiel der Validierung eines kommerziell verfügbaren Immunoassays für die quantitative Bestimmung eines relevanten Pflanzenschutzmittels in Oberflächengewässern zu demonstrieren.

2 Stand von Wissenschaft und Technik

2.1 Status quo der Validierung von Immunoassays

In Deutschland wurde der Startschuss für einen kurzzeitigen Anstieg des Interesses an Immunoassays durch die Umsetzung einer EG-Richtlinie zur Einführung des 0,1 µg/l-Grenzwertes für Pflanzenschutz- und -behandlungsmittel im Trinkwasser ausgelöst, da ein steigender Überwachungsbedarf die Entwicklung schneller und kostengünstiger Methoden erforderlich machte (REICHERT ET AL. 1988). In der Folgezeit wurden insbesondere für die Wirkstoffgruppe der Triazinherbizide zahlreiche Antikörper hergestellt und in Messkampagnen verwendet.

Zur Demonstration der *Leistungsfähigkeit* der Tests und der *Validität* der erzeugten Ergebnisse wurden in diesen Studien meist Referenzmessungen mit physikalisch-chemischen Methoden durchgeführt (SCHNEIDER ET AL. 1990, GOOLSBY ET AL. 1990, HARRISON ET AL. 1989, HAMMOCK ET AL. 1989, FERGUSON ET AL. 1990, BUSHWAY ET AL. 1991, DANKWARDT ET AL. 1995). Derartige Vergleichsuntersuchungen liegen auch für kommerzielle Testkits (RUBIO ET AL. 1991, WIEDMAN ET AL. 1991, FLEEKER UND COOK 1991, HAHNAU UND JÜLICHER 1996) vor.

In dieser Art von Studien wurde die *Präzision* der Ergebnisse durch die laborinterne *Wiederholstandardabweichung* von Replikaten, die *Richtigkeit* durch den Regressionskoeffizienten der Ausgleichsgeraden für Werte aus Immunoassaybestimmung bzw. Referenzverfahren und das *Auftreten systematischer Fehler*, etwa durch *Matrixefflüsse* durch die Abweichung der Steigung der Regressionsgeraden vom Idealwert 1 ausgedrückt (z.B. SCHNEIDER 1993).

Vereinzelt wurde in diesen Arbeiten auf den Mangel hingewiesen, dass für die Auswertung der Daten oft *unterschiedliche mathematische Ansätze* (etwa logit-log bzw. logistische Funktion) verwendet wurden und dass keine allgemein akzeptierten Regeln für die Berechnung der *Nachweisgrenze* verfügbar seien.

Zu diesen Themen lagen hauptsächlich Erfahrungen aus den USA vor. Die entsprechenden Arbeiten waren außerdem zum Großteil für den Bereich der klinischen Laboranalytik durchgeführt worden. Insbesondere Rodbard und Mitarbeiter (RODBARD 1974, 1981; RODGERS 1984, DUDLEY ET AL. 1985) hatten Konzepte zur Datenverarbeitung (Anpassung einer 4-Parameter-Gleichung), andere zur Angabe des Fehlers entwickelt (DELAAGE ET AL. 1992, BUNCH ET AL. 1990).

Diese Unsicherheiten waren es wohl, die dazu führten, dass ein Großteil der kommerziell erhältlichen Kits nur mangelhaft dokumentiert war, mit groben Vereinfachungen arbeitete und häufig Daten, wie etwa zur Nachweisgrenze und zu Kreuzreaktivitäten, gänzlich fehlten. In der Folge gab es daher Bestrebungen, Mindestanforderungen für behördlicherseits akzeptable Fertigtests aufzustellen (MASTROROCCO UND BRODSKY 1990, KROTZKY UND ZEEH 1995), die in Deutschland zur Veröffentlichung der Vornorm DIN V 38415-T2 "Rahmenbedingungen für selektive Immuntestverfahren (Immunoassays) zur Bestimmung von Pflanzenbehandlungs- und Schädlingsbekämpfungsmitteln" führten.

Wie auch in der physikalisch-chemischen Analytik, sollte am Ende der Validierung einer analytischen Methode immer auch eine **Laborvergleichsuntersuchung** bzw. ein **Ringversuch** (s.a. DFG 2000) stehen, welche die Streuung der Ergebnisse aus unterschiedlichen Labors, die die gleiche Methode anwenden, erfasst. Dies wurde in Deutschland am Beispiel von Triazin-Immunoassays exemplarisch durchgeführt (HOCK ET AL. 1991a,b). Leider findet bei derartigen Untersuchungen häufig nur eine Beschreibung des status quo statt, aber keine Analyse der Fehlerursachen (GOWIK ET AL. 1998b). Eine regelmäßige Selbstpositionierung eines Labors bezüglich Richtigkeit und Präzision durch Teilnahme an einer Ringanalyse wäre auch im Bereich der Immunoassays wünschenswert. Diese ist aber nicht möglich, da derartige Vergleichsuntersuchungen praktisch nicht angeboten werden. Es bliebe noch die Selbstevaluierung eines Labors anhand von **Standardreferenzmaterialien**, die jedoch für die organische Spurenanalytik kaum erhältlich sind.

Die Qualitätssicherung bei Immunoassay-Anwendern besteht daher meistens lediglich in einer internen Dokumentation der Reproduzierbarkeit und der Präzision der Ergebnisse. Fehlerbereiche und Nachweisgrenzen werden häufig nicht angegeben.

2.2 Messunsicherheits-Konzept

Aufgrund der Tatsache, dass die Fortschreibung des Qualitätsnachweises mit konventionellen statistischen Konzepten in vielen Bereichen nur bedingt möglich ist, fand ein Konzept großes Echo, das aus dem Bereich der *Qualitätssicherung* in der industriellen Produktion stammt und das z.B. bei der Prozessanalytik gestattet, einen Messwert mit einem Schätzwert für den Messfehler zu belegen, der das Ergebnis eines Abwägungs- und Abstimmungsprozesses innerhalb des Labors ist und sowohl die zunehmende Erfahrung mit den Messungen als auch sich ändernde Grundbedingungen zu berücksichtigen in der Lage ist. Es wird als Messunsicherheits-Konzept (*measurement uncertainty concept*) bezeichnet und liegt schriftlich in einer ISO-Richtlinie (ISO 1993) vor, für welche wiederum das EURACHEM-Komitee (EURACHEM 1998) Erläuterungen und Beispiele ausgearbeitet hat. Auch wenn dieses Konzept noch Probleme offen lässt (vgl. z.B. KADIS 1998), so ist damit doch ein Grundgerüst vorgegeben, welches auch bereits in der Praxis (z.B. KÜPPERS 1998, VAN DER VEEN 1998) Anwendung findet. Das Messunsicherheits-Konzept ist auch für die Einbindung in Labor-Qualitätssicherungssysteme geeignet. Neben der Dokumentation der Fehlerquellen und deren Beitrag zum Gesamtfehler ist dabei auch an die Angabe von Ratschlägen zur Fehlerverminderung bzw. -beseitigung gedacht. Jeder einzelnen Fehlerquelle ("Uncertainty-Faktor") soll ein kurzer Aktionsplan zugeordnet werden, der erläutert, wie der Anwender später feststellen kann, ob bei ihm dieser Fehler im akzeptablen Bereich liegt. Beim Messunsicherheits-Konzept wird ein sogenannter "top down" Ansatz gewählt (GOWIK ET AL. 1998a,b) und der Messwert betrachtet als additiv zusammengesetzt aus

- wahren Wert
- Identifikationsfehler
- methodenabhängiger Abweichung
- matrixabhängiger Abweichung
- zeitabhängiger Abweichung
- laborspezifischer Abweichung
- Zufallsabweichung unter Wiederholbedingungen

Das Konzept sieht vor, dass die wesentlichen *Varianzkomponenten (uncertainties u)* ermittelt und bewertet werden (s. z.B. KÜPPERS 1997). Bei geeignetem Versuchsdesign können Matrix-, Zeit-, Wiederhol- und Laborfehler simultan bestimmt werden. Dabei ist nicht nur die Messung selbst Gegenstand der Validierung, sondern auch der mit ihr verbundene Prozess (Auswahl, Transport, Lagerung der Proben).

Dieses Konzept war bisher noch nicht in der Praxis der Immunoassays für die Umweltanalytik angewendet worden, obwohl es z.B. insbesondere bezüglich der Berücksichtigung von Matrixeinflüssen dafür besonders geeignet erscheint. Es wurde daher als Basis für das zu entwickelnde Validierungskonzept ausgewählt.

2.3 Laborinterne Validierung

Da das Messunsicherheits-Konzept es erlaubt, über eine statistische Auswertung von Messwerten hinausgehende spezifische Einflussfaktoren im eigenen Labor mit einzubeziehen, ist damit die Möglichkeit einer *laborinternen Validierung (in-house Validierung)* gegeben. Es erlaubt, innerhalb des eigenen Labors Abweichungen vom zufälligen Fehlerverhalten unter Verwendung der eigenen Matrix zu ermitteln (z.B. JÜLICHER ET AL. 1998). Es gestattet auch die Fortschreibung des Qualitätsniveaus des Labors und kann in laufende Qualitätssicherungssysteme einbezogen werden.

Prämisse dieses Vorhabens war die Annahme, dass mit der Erarbeitung eines Konzepts zur in-house Validierung ein wichtiger Schritt bezüglich der Qualitätssicherung bei Immunoassays getan würde. Mit einem konsensfähigen Konzept, wie solch eine Validierung auszusehen hat, bekämen Entwickler, Vertreiber und Anwender ein Instrument in die Hand, das sie die gleiche Sprache sprechen lässt. Solch eine Validierung im Labor würde immer auf den jeweiligen Testkit bezogen sein, so dass die u.U. schlechtere Qualität eines Testkits nicht gleich die Validität der Daten des gesamten Immunoassay-Labors in Frage stellen könnte. Eine laborinterne Validierung hätte zusätzlich den Vorteil, dass sie mit beliebigen Elementen der bereits existierenden Qualitätssicherungssysteme (z.B. Einschleusen von Kontrollen durch die QS-Abteilung) kombinierbar wäre.

3 Material und Methoden

3.1 Verzahnung von Versuchsplanung, Experiment und Auswertung

Die Entwicklung und Optimierung des Validierungskonzepts erfolgte durch intensive Verzahnung von Versuchsplanung, Experiment und Auswertung. Dazu fanden insgesamt 6 Statustreffen der Analytik-Arbeitsgruppe (Dr. Rudolf J. Schneider und Dipl.-Ing. agr. Martina Becher - Agrikulturchemisches Institut, Universität Bonn), des beauftragten Statistikers, Herrn PD Dr. habil. Steffen Uhlig (quo data GmbH, Dresden) und des fachlichen Begleiters im Umweltbundesamt, Herrn Dr. Peter Lepom (Labor für Wasseranalytik, UBA Berlin), statt.

Der Ablauf der Arbeiten war daher gekennzeichnet durch Arbeitsabschnitte, die in der Regel durch ein Statustreffen begonnen und beendet wurden. Jeder Projektabschnitt hatte eine eigene *Versuchsplanung*, eine analytische Komponente („*Experimente*“, d.h. praktische Arbeiten im Labor) und eine Komponente Datenauswertung („*Statistische Analyse*“).

Während die Basisauswertung der Daten vom Auftragnehmer selbst durchgeführt werden konnte, wurde die statistische Detailanalyse durch Herrn Dr. Uhlig erledigt, der auf diesem Gebiet bereits einschlägige Erfahrungen vorweisen konnte (z.B. UHLIG UND LISCHER 1998, JÜLICHER ET AL. 1998). Zum Projektende wurde über die statistische Auswertung ein detaillierter Bericht erstellt (s. **Anhänge**). Die wesentlichen Ergebnisse sind jedoch in **Kapitel 4** dargestellt.

Die **Abbildung 1** gibt zur Verdeutlichung die Bezeichnung der Projektabschnitte und deren Abfolge wieder.

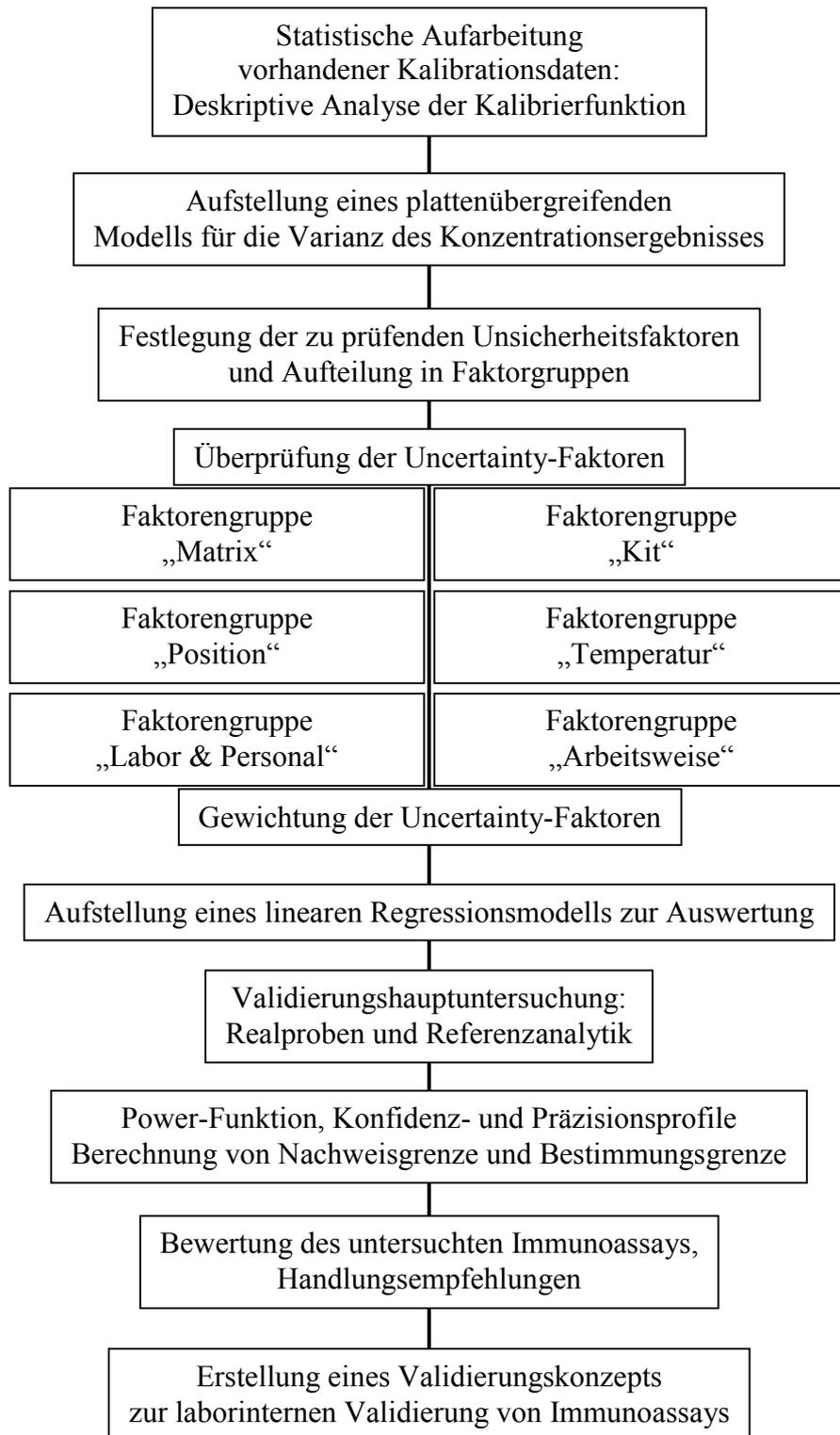


Abb. 1: Bezeichnung und Abfolge der Projektabschnitte

3.2 Modell-Immunoassay

Als Modell-Immunoassay wurde ein Mikrotiterplatten-ELISA zur quantitativen Bestimmung von Isoproturon in Wasser („EnSys EnviroGard™ Isoproturon Plate Kit“) mit einer Nachweisgrenze von 0,02 µg/l ausgewählt.

Isoproturon ist der bzw. einer der aktiven Bestandteile der Getreideherbizide IPU®, Arelon®, Tolkan Fox® u.a., welche in Deutschland seit Jahren eine breite Anwendung finden. Über Isoproturonfunde im Grund- und Oberflächenwasser wurde häufig berichtet (z.B. LEUCHS ET AL. 1990, FISCHER ET AL. 1995).

Das große Interesse an kostengünstigen Nachweisverfahren für Isoproturon wird dadurch unterstrichen, dass auch im nichtkommerziellen Bereich in den letzten Jahren Immunoassays hierfür entwickelt wurden (LIÉGEOIS ET AL. 1992, KATMEH ET AL. 1994, MOUVET ET AL. 1997, BEN REJEB ET AL. 1998, KRÄMER ET AL. 1999).

Insgesamt wurden 40 Testkits verwendet. Der Grossteil der Kits (29 Stück) entstammte einer Produktions*charge* (Batch 8G1158, haltbar bis 4/99). Dadurch sollte ein Einfluss der Charge auf die Qualität der Ergebnisse vermieden werden. Dieser Einfluss wurde durch Einbeziehung zweier weiterer Chargen (Haltbarkeit bis 9/99) geprüft. Die Lagerung der Kits bis zur Verwendung erfolgte entsprechend den Forderungen des Herstellers im Kühlschrank (bei 4 ± 2 °C).

Inhalt der Testkits

- 1 Mikrotiterplatte (8 x 12 Kavitäten, beschichtet mit isoproturonselektiven Antikörpern)
- 1 Negativkontrolle (Reinstwasser, z.B. aus einer MilliQ-Anlage, lt. Vertrieb)
- 3 Standards (0,05; 0,20; 0,50 ppb IPU); Lösungsmittel (lt. Vertrieb): Reinstwasser
- Isoproturon-HRP-Enzym-Konjugat (= Isoproturon-Derivat, gekoppelt an das Enzym Meerrettich-Peroxidase (POD), meist als „Tracer“ bezeichnet)
- 1 Substrat (Wasserstoffperoxid-Lösung)
- 1 Chromogen (Tetramethylbenzidin-Lösung TMB)
- 1 Stopp-Lösung (1,25 M Schwefelsäure)

Geräte für die immunchemischen Untersuchungen

- Universität Bonn

Mikroliterpipette: 10..100 μ l, 100..1000 μ l, Fabrikat Eppendorf

Dispenserpipette: Spitzengröße 2,5 ml, Fabrikat „Multipette“ Eppendorf

Orbitalschüttler: offener, schnellanlaufender Schüttler, ca. 400 Umdrehungen/min

geschlossener, temperierbarer Schüttler: Thermostar (Fa. bmg)

betrieben bei der jeweiligen Raumtemperatur, 200 U/min

Mikrotiterplatten-Waschgerät „Washer“: Flexiwash von Fa. Mikrotek

betrieben mit 12-Kanal-Waschkamm (Manifold)

(12 Kanal-Manifold unabdingbar für Bearbeitung der Platten in „Streifen“)

Mikrotiterplatten-Photometer: Vmax von Molecular Devices Inc.

Auswerte-Software: SoftMax Pro (Molecular Devices Inc.)

- Umweltbundesamt

Mikroliterpipetten: 5..500 μ l, 50..1000 μ l, Fabrikat Eppendorf

8-Kanal-Pipette (5..250 μ l), Fabrikat Biohit

Orbitalschüttler: Hersteller Adolf Kühner AG

Mikrotiterplatten-Waschgerät „Washer“: Columbus, TECAN GmbH (betrieben mit 12-

Kanal-Waschkamm (Manifold)

Mikrotiterplatten-Photometer „Reader“: SPECTRA Thermo, TECAN (450/620 nm)

Auswertesoftware: EasyWINfitting, TECAN GmbH

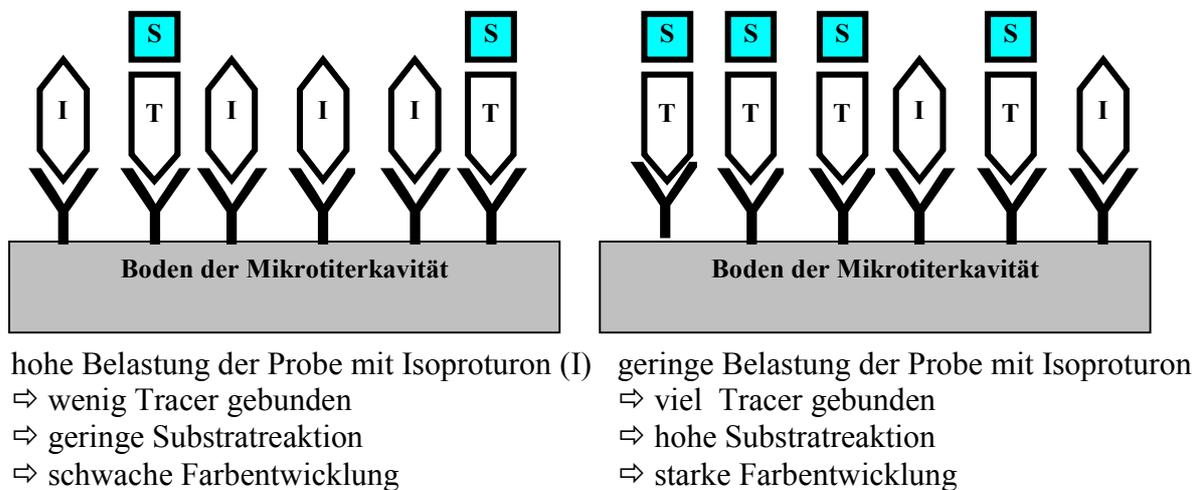
Kalibrierstandards für ELISA

Die Kalibrierung beim Immunoassay wurde in der Regel nicht nach den Herstellerangaben, sondern entsprechend DIN V 38415-T2, 1995 mit 6 Kalibrierstandards zuzüglich Null- und Überschussstandard durchgeführt, um eine statistisch auswertbare Datenbasis zu erzeugen.

Zunächst wurde eine Stammlösung durch Einwiegen von 5,00 mg Isoproturon in 1 Liter Methanol für die HPLC hergestellt (Konzentration 5000 μ g/l). Aus dieser wurde zunächst im Verhältnis 1 : 50 (2 ml in 100 ml) in Reinstwasser auf 100 μ g/l verdünnt und davon ausgehend im Verhältnis 1 : 10 weiter bis auf 0,0001 μ g/l.

Durchführung des ELISA

Das Prinzip des Tests entspricht dem ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay), einem kompetitiven, heterogenen Enzymimmunoassay. In **Abbildung 2** wird verdeutlicht, dass durch die Konkurrenz des Analyten mit dem in konstanter Menge vorhandenen signalgebenden Tracer ein indirekter Zusammenhang zwischen der gemessenen Farbintensität (umgesetztes Substrat) und der Analytkonzentration resultiert.



Symbolerklärung:



Abb. 2: Prinzip des ELISA

Gezeigt sind die Verhältnisse bei 2 unterschiedlichen IPU-Konzentrationen

Im folgenden werden die wichtigsten Schritte bei der Durchführung eines ELISA-Tests kurz beschrieben (Übersicht in **Abbildung 3**):

- *Probe/Standards pipettieren:* Alle Proben und Kitbestandteile wurden vor Durchführung des Tests auf Raumtemperatur gebracht.

Je Probe/Standard wurden 80 µl in die entsprechenden Kavitäten (Pipettierschemata s. bei den jeweiligen Experimenten) pipettiert (10..100 µl Mikroliterpipette) und 1 min auf einem Orbitalschüttler geschüttelt (Vorinkubationszeit). In einem Versuch wurden die Tropffläschchen der Kitstandards verwendet.

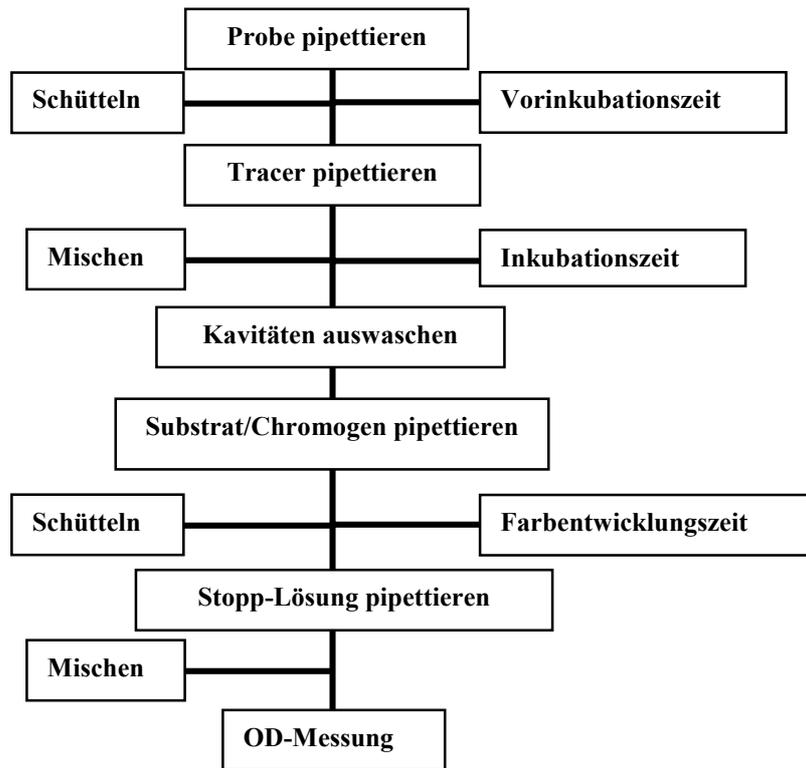


Abb. 3: Schematischer Verfahrensablauf eines ELISA

Auf die Volumina wird im Text hingewiesen; die Zeiten wurden in den Experimenten variiert

- *Tracer pipettieren*: Jeweils 80 µl des Tracers wurden mittels Multipette in jede Kavität pipettiert (Dauer ca. 2 Minuten) und 1 min geschüttelt. Danach wurde die Platte mit Parafilm abgedeckt und auf einem geschlossenen, thermostatisierten Orbitalschüttler mit 200 Umdrehungen pro Minute für 60 min inkubiert.
- *Kavitäten auswaschen*: Das Waschen der Kavitäten erfolgte entsprechend der Herstellerangaben mit Leitungswasser unter Verwendung eines 12-Kanal Mikrotiterplatten-Washers. Das verwendete Waschprogramm füllt die Kavitäten sechsmal komplett auf und saugt dann die Flüssigkeit bis nahezu zur Trockne ab. Eine weitergehende Entleerung der Kavitäten wurde durch mehrfaches Ausklopfen auf Papier erreicht. Beim manuellen Waschen wurde entleert, ausgeklopft und anschliessend wurden ebenfalls sechs Befüllungs-/Entleerungs-Zyklen durchgeführt.

- *Substrat/Chromogen pipettieren:* Die mitgelieferten Lösungen von Substrat und Chromogen wurden exakt im Verhältnis 2 : 1 gemischt (9 ml Substrat : 4,5 ml Chromogen) und jeweils 120 µl dieser Substratmischung mittels Multipette in die Kavitäten pipettiert (Dauer ca. 4 min). Die Platte wurde 1 min auf einem Schüttler kräftig durchmischt, mit Parafilm abgedeckt und anschließend auf dem geschlossenen Schüttler bei 200 min⁻¹ für 30 min geschüttelt. Es entsteht ein blauer Farbstoff.
- *Stopp-Lösung pipettieren.* Je 40 µl der Stopp-Lösung (verdünnte Schwefelsäure) wurden mittels Multipette aufgetragen (Dauer ca. 2 min). Die Blaufärbung in den Kavitäten schlägt nach Gelb um. Zur Homogenisierung wurde 1 min geschüttelt.
- *OD-Messung.* Innerhalb von 30 min nach Zugabe der Stopp-Lösung erfolgte die Bestimmung der optischen Dichte als Differenzmessung bei 450 nm (Messwellenlänge) und 650 nm (Referenzwellenlänge).

3.3 Referenzverfahren

Als Referenzverfahren zur Bestimmung von Isoproturon wurde die Norm „*Bestimmung ausgewählter Pflanzenbehandlungsmittel. Verfahren mit der Hochauflösungs-Flüssigkeitschromatographie mit UV-Detektion nach Fest-Flüssig-Extraktion*“ (DIN EN ISO 11369:1997) ausgewählt. Als europäische und internationale Norm ist dieses Verfahren ausreichend validiert und weithin akzeptiert. Diese Methode gestattet die simultane Bestimmung ausgewählter Triazine, Chloracetamide und Phenylharnstoffherbizide (Isoproturon, Chlortoluron, Diuron, Linuron, Monolinuron, Methabenzthiazuron, Metobromuron, Metoxuron) mittels HPLC/UV.

Probenahme

Die Oberflächenwasserproben wurden entsprechend DIN EN ISO 11369 (1997) in 2,5-Liter-Braunglasflaschen mit Schraubverschluss und Teflonseptum genommen. Die Rei-

nigung der Flaschen erfolgte durch Spülen mit verdünnter HCl (10 %), 2 x 50 ml, destilliertem Wasser, 2 x 100 ml, Methanol, 2 x 50 ml, und Reinstwasser (MilliQ-Wasser), 2 x 100 ml. Es wurden jeweils drei Proben à 2,5 l an einer Probenahmestelle entnommen. Die Aufbewahrung der Proben erfolgte bei 4 °C im Kühlschrank für höchstens eine Woche.

Probenvorbereitung

Die drei 2,5 l-Proben wurden in einer 10 l-Steilbrustflasche gemischt und durch ein Glasfaserfilter (Glasfaserfilter GF 8 aus Borosilikatglas, Ø 100 mm; Faserdurchmesser 0,75 – 1,5 µm) filtriert und jeweils sechs 1100 ml-Laborproben in 1 l-Duran-Standflaschen (Fa. Schott) mit Teflondichtung abgefüllt. Diese wurden mit 1,1 ml der Kalibrationsstandards 0, 50, 140, 140 (Replikate), 320 und 410 µg/l dotiert. Nach dem Vermischen wurden aus diesen Probenflaschen die Proben für die ELISA-Messung (10 ml-Braunglasfläschchen) abgefüllt.

Festphasenextraktion

Die Proben wurden mit Hilfe einer Anlage zur automatischen Festphasenextraktion (AutoTRACE von Zymark/Tekmar) an C₁₈-Glaskartuschen (1 g; Octadecyl, C₁₈ Polar Plus von J.T. Baker) angereichert. Das Programm führt folgende Schritte aus:

- Konditionierung des C₁₈-Materials: 15 ml Methanol, 5 min Einwirkzeit, 15 ml Wasser (Durchfluss 2,5 ml/min)
- Überleiten der Probe: Durchfluss 10 ml/min
- Trocknen des Materials: Stickstoffstrom, mindestens 60 min, Raumtemperatur
- Elution: Mit insgesamt 11,5 ml Methanol (4 ml/min) eluieren; zunächst 4,5 ml Methanol einwirken lassen, dann portionsweise 2 + 3 + 2 ml Methanol zugeben und das gesamte Eluat (ca. 8 ml) in einem 10 ml Spitzkolben auffangen.
- Konzentrierung: Am Rotationsverdampfer bei 30 °C, 120 mbar gerade bis zur Trockne einengen; den Rückstand in 1 ml Eluentengemisch (1 mM Ammoniumacetat/Acetonitril 1 : 9) aufnehmen und 5 min im Ultraschallbad behandeln.

- Filtration: Über GHP ACRODISC Mikromembranfilter (Spritzenvorsatz 13 mm, Porenweite 0,45 µm) direkt in das HPLC-Probengefäß filtrieren.

Die Wiederfindungsrate für IPU betrug $87 \pm 9 \%$ ($n = 15$) bei einem Anreicherungsfaktor von 1100.

HPLC-Methode

Die in der DIN EN ISO 11369 beschriebene HPLC-Methode wurde geringfügig modifiziert. Eine Zusammenfassung der wesentlichen Methodenparameter ist in **Tabelle 1** wiedergegeben.

Tab. 1: Parameter des HPLC-Referenzverfahrens

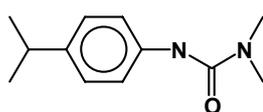
HPLC-Anlage	Hewlett-Packard 1050 mit Autosampler der Serie 1100 und Variable Wavelength Detector (Schichtdicke 10 mm, Bandbreite 8 nm) bei 245 nm
Injizierte Probe	20 µl in Eluenten-Startgemisch
Stationäre Phase	MZ-PBM (Basis: C ₁₈) 3 µm (250 x 2,1 mm) von MZ Analysetechnik, Mainz Säulentemperatur: 48 °C (optimiert)
Mobile Phase	A: 1 mM Ammoniumacetat B: Acetonitril Flußrate 0,2 ml/min
Gradient	10 bis 45 % B in 42,5 min linear, 45 % bis 90 % B in 10 min linear, 90 % B isokratisch 10 min, 10 % B in 0,5 min, 10 % B isokratisch für 22 min; Dauer eines Laufs: 85 min

Die Kalibrierstandards enthielten 19 Substanzen. Sie sind in **Tabelle 2** aufgelistet. Die Liste der Referenzsubstanzen aus der DIN/ISO-Methode wurde um die drei Triazinherbizide bzw. -metaboliten Desethylterbuthylazin, Desisopropylatrazin und Terbutryn erweitert, Sebuthylazin wurde nicht analysiert.

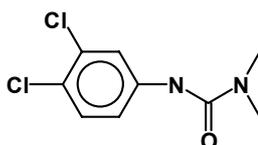
Tab. 2: Übersicht der eingesetzten Kalibrierstandards

Wirkstoff	Konzentration [mg/l]
Atrazin	500
Chlortoluron	500
Cyanazin	500
Desethylatrazin	500
Desethylterbuthylazin	500
Desisopropylatrazin	10
Diuron	500
Hexazinon	500
Isoproturon	500
Linuron	500
Metazachlor	500
Methabenzthiazuron	500
Metobromuron	500
Metolachlor	500
Metoxuron	500
Monolinuron	500
Simazin	100
Terbutryn	500
Terbuthylazin	500

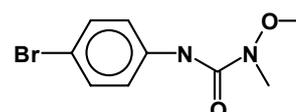
Die **Abbildung 4** zeigt die Strukturen einiger Substanzen, auf die im Verlauf des Textes Bezug genommen wird.



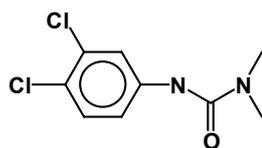
Isoproturon (IPU)



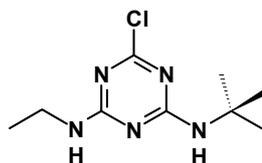
Diuron



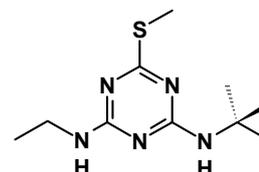
Metobromuron



Linuron



Terbuthylazin



Terbutryn

Abb. 4: Strukturformeln einiger wichtiger (problematischer) Wirkstoffe

Aus den 19 Lösungen an Einzelsubstanzen (Konzentrationen siehe **Tabelle 2**), alle jeweils in Methanol, wurde eine Stammlösung mit einer Konzentration von 5 mg/l aller Komponenten erstellt. Die Kalibrierstandards der Konzentration 50, 140, 230, 320, 410 und 500 µg/l wurden im Eluenten-Startgemisch (1 mM Ammoniumacetat/Acetonitril 1 : 9) angesetzt. Die Verwendung der MZ-PBM-Säule ermöglichte es, die meisten der 19 Substanzen zu trennen (**Abbildung 5**).

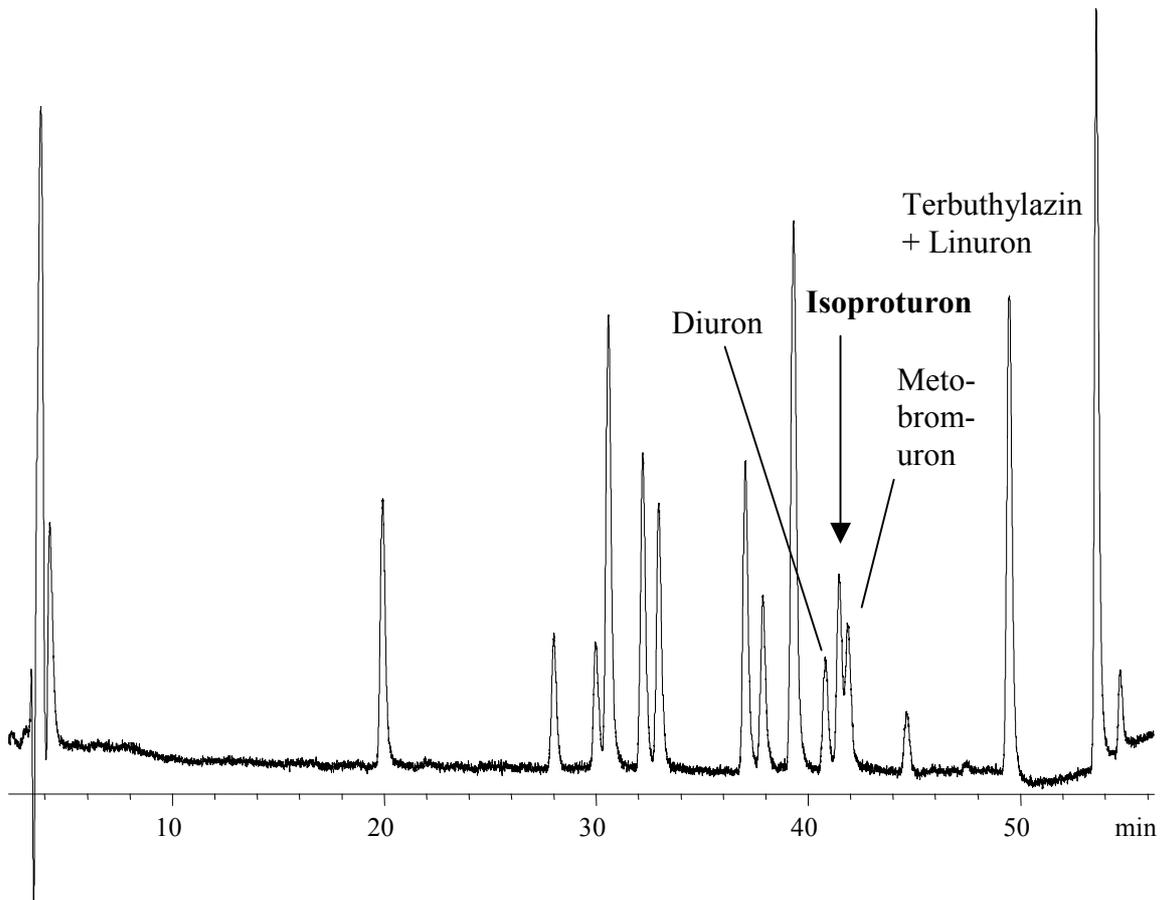


Abb. 5: HPLC-Trennung von 19 Herbizidwirkstoffen
(Kalibrierstandard; Konzentration 500 µg/l)

Auch das kritische Peaktripler Diuron/Isoproturon/Metobromuron (**Abbildung 6**) wurde soweit aufgelöst, dass eine quantitative Auswertung des Isoproturonsignals über die Peakhöhe in angereicherten Proben möglich war.

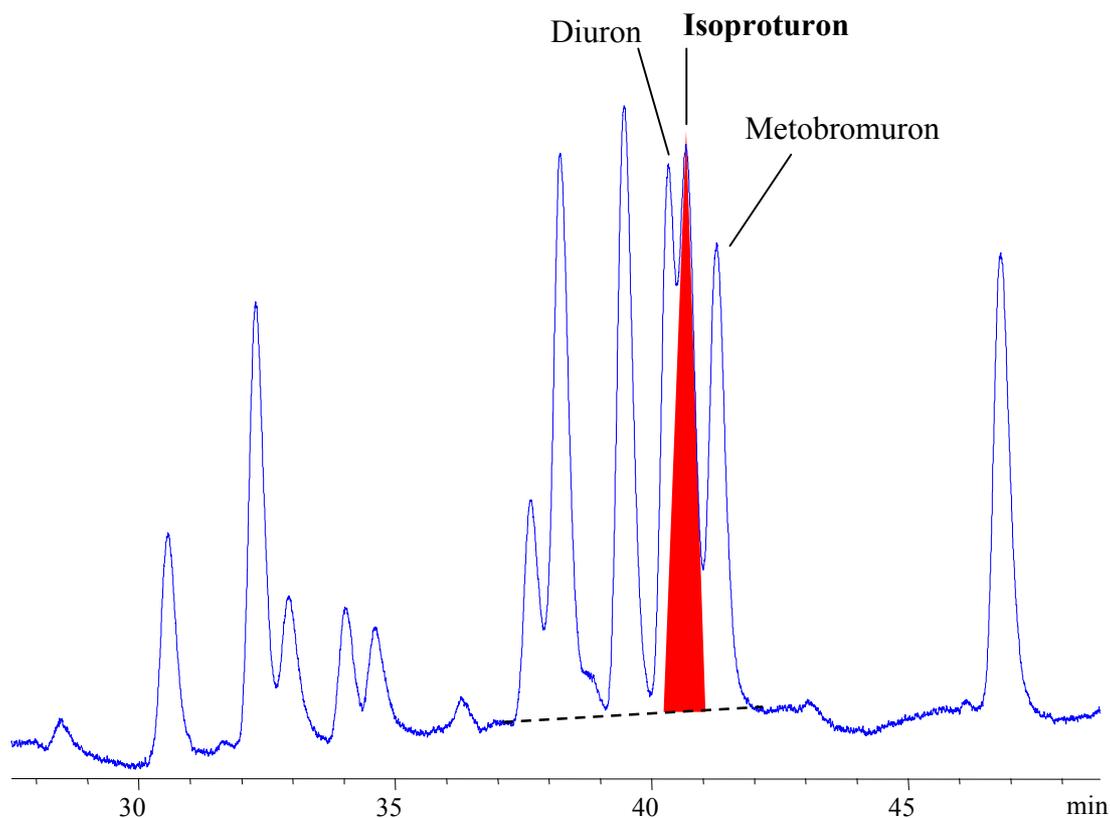


Abb. 6: Trennung des kritischen Peaktripels Diuron/Isoproturon/Metobromuron
(Reinstwasser dotiert auf eine Konzentration von 500 ng/l, nach SPE)

Kalibrierung

Die Kalibrierung erfolgte in jeder Analysenserie auf den o.g. sechs Konzentrationsniveaus über die Peakhöhe. Außerdem wurde stets ein Blindwert für das Eluentengemisch ermittelt. Zunächst wurde zu Beginn und am Ende jeder Probenserie (2 Proben à 7 Konzentrationsstufen, Doppelbestimmung = 28 Läufe) kalibriert. Auf Grund der ausgezeichneten Reproduzierbarkeit wurde im weiteren Verlauf nur noch eine Kalibrierung durchgeführt. Die Kalibrierung erfolgte über die Peakhöhen.

Analyse der Proben

Die Probenextrakte wurden jeweils doppelt analysiert und der Mittelwert der Peakhöhe zur Konzentrationsberechnung verwendet.

4 Ergebnisse

4.1 Uncertainty der Kalibrierfunktion bei Immunoassays

4.1.1 Verteilung und Korrelation der Parameter der Kalibrierfunktion

Die Konzentrationsbestimmung erfolgt auch im Immunoassay aus einer Kalibrierfunktion. Zwischen Analytkonzentration und Messsignal besteht ein nicht-linearer Zusammenhang, der sich durch eine 4-parametrische Funktion beschreiben lässt (vgl. **Abbildung 8** und **Gleichung 1**). Es war unklar, welche Konsequenzen Streuungen der Kalibrierkurve von Platte zu Platte auf die Qualität der Ergebnisse haben. Ziel erster Analysen war daher die Erfassung der Streuung der Kalibrierkurve von Platte zu Platte. Es wurde nach einer einfachen Struktur für ein stochastisches Modell des Zusammenhangs zwischen den 4 Parametern gesucht. Ein robustes Modell hätte den Vorteil, dass Datensätze, die „fehlerhaft“ sind, d.h. nicht zur Grundgesamtheit der Platten mit gesicherten Ergebnissen gezählt werden können, rasch identifiziert werden könnten.

In einem im Auftrag des Ministeriums für Umwelt, Raumordnung und Landwirtschaft des Landes Nordrhein-Westfalen durchgeführten Projekt waren Untersuchungen von Pflanzenschutzmitteln in Oberflächenwasserproben und wässrigen Eluaten von Bodenproben (ca. 5.000 Proben) mittels Immunoassays durchgeführt worden (SCHNEIDER ET AL. 1998). Es handelte sich dabei um einen nichtkommerziellen ELISA-Test unter Verwendung von monoklonalen Antikörpern (Bezeichnung K1F4) mit hoher Spezifität für Terbuthylazin, einem Triazinherbizid. Die Platten waren innerhalb von 6 Monaten gemessen worden und wurden identisch behandelt bezüglich Inkubationszeiten, Serum- und Tracerverdünnung sowie Proben- und Kalibratoranordnung auf der Platte. Letztere ist in der **Abbildung 7** wiedergegeben.

Dieser umfangreiche Datensatz aus ca. 300 ELISA-Platten mit Daten zur Qualitätssicherung (Kontrollen) wurde für diese Studie herangezogen. Eine aus 258 Kalibrierdatensätzen gemittelte Kalibrierkurve für Terbuthylazin zeigt **Abbildung 8**.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1	1	1	8	8	8	0,001	0,001	0,001	14	14	14
B	2	2	2	9	9	9	0,01	0,01	0,01	15	15	15
C	3	3	3	10	10	10	0,03	0,03	0,03	16	16	16
D	4	4	4	KNeg.	KNeg.	KNeg.	0,1	0,1	0,1	17	17	17
E	K0,3	K0,3	K0,3	K0,3	K0,3	K0,3	0,3	0,3	0,3	K0,3	K0,3	K0,3
F	5	5	5	11	11	11	1	1	1	18	18	18
G	6	6	6	12	12	12	3	3	3	19	19	19
H	7	7	7	13	13	13	1000	1000	1000	20	20	20

Abb. 7: Auftragungsschema für den Datensatz zur Ermittlung der Uncertainty der Kalibrierfunktion (Terbuthylazin-ELISA)

K0,3 = 0,3; Konz. 0,3 µg/l als Positivkontrolle; KNeg.: Negativkontrolle (Reinstwasser); 0,001..1000 = Kalibrierstandards (in µg/l); 1..20: Probennummer

$f(x)$: Optische Dichte []

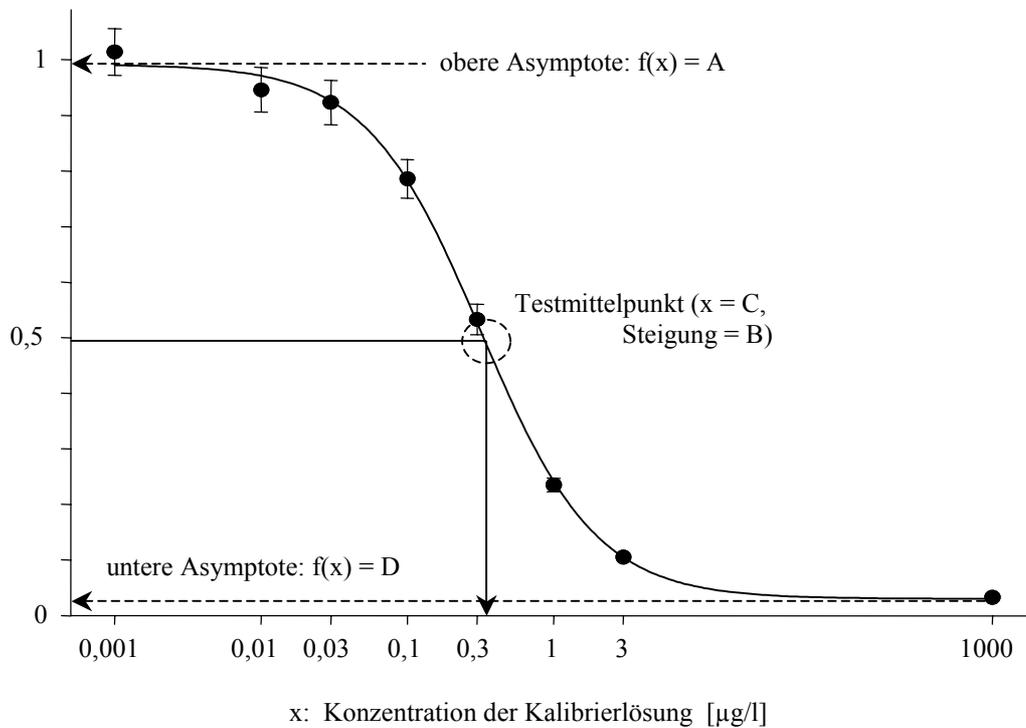


Abb. 8: Kalibrierkurve für Terbuthylazin

Symbole: arithm. Mittel aus 258 Werten; Fehlerbalken: mittlere Standardabweichung

Die **Abbildung 8** zeigt die sigmoidale Ausgleichsfunktion, die sich als Kalibrierkurve ergibt. Die Anpassung der Funktion an die Messwerte erfolgt auf der Basis einer empirischen Funktion, der sogenannten 4-Parameter-Funktion oder auch „logistischen Funktion“ (RODBARD 1974, 1981). Diese lautet (**Gleichung 1**):

$$f(x) = ((A - D) / (1 + (x/C)^B)) + D \quad (\text{Gl. 1})$$

mit

$f(x)$ = OD ... optische Dichte (Signal, Messwert)

x = Konzentration der Kalibrierlösung

A = obere Asymptote

B = Steigungsparameter

D = untere Asymptote

C = Testmittelpunkt (Wendepunkt)

Die Anpassung der Funktion an die Messwerte kann mit jeder Software für Mikrotiterplattenphotometer („Reader“) erfolgen. Die Anpassung geschieht dabei meist durch einen Simplex-Algorithmus.

Wie man der **Abbildung 8** und der Legende zu **Gleichung 1** entnehmen kann, können den 4 Parametern durchaus sinnvolle Entsprechungen zugeordnet werden. Insbesondere der Parameter C („Testmittelpunkt“) wird häufig zum Vergleich der Sensitivität von Tests und zur Berechnung von Kreuzreaktivitäten verwandt.

Da aus den Parametern Abhängigkeiten voneinander abgeleitet werden sollten, wurde zuerst auf **Homogenität** des Gesamtdatensatzes geprüft. Dazu wurden zunächst 275 Kalibrierdatensätze auf ihre **Verteilung** untersucht.

Für den Parameter C wird eine geringe Varianz, d.h. eine enge Verteilung erwartet, da dieser Parameter zumindest nicht direkt von der optischen Dichte abhängig ist. Der Testmittelpunkt ist vielmehr abhängig von der Affinität der Antikörper und sollte bei einem monoklonalen Antikörper eine Konstante darstellen.

Es zeigte sich, dass beim Parameter C offenbar eine bimodale Verteilung vorlag, so dass die Anpassung einer klassischen unimodalen Verteilung problematisch erschien (z.B. wurde auch die Hypothese der Log-Normalverteilung abgelehnt, **Abbildung 9**).

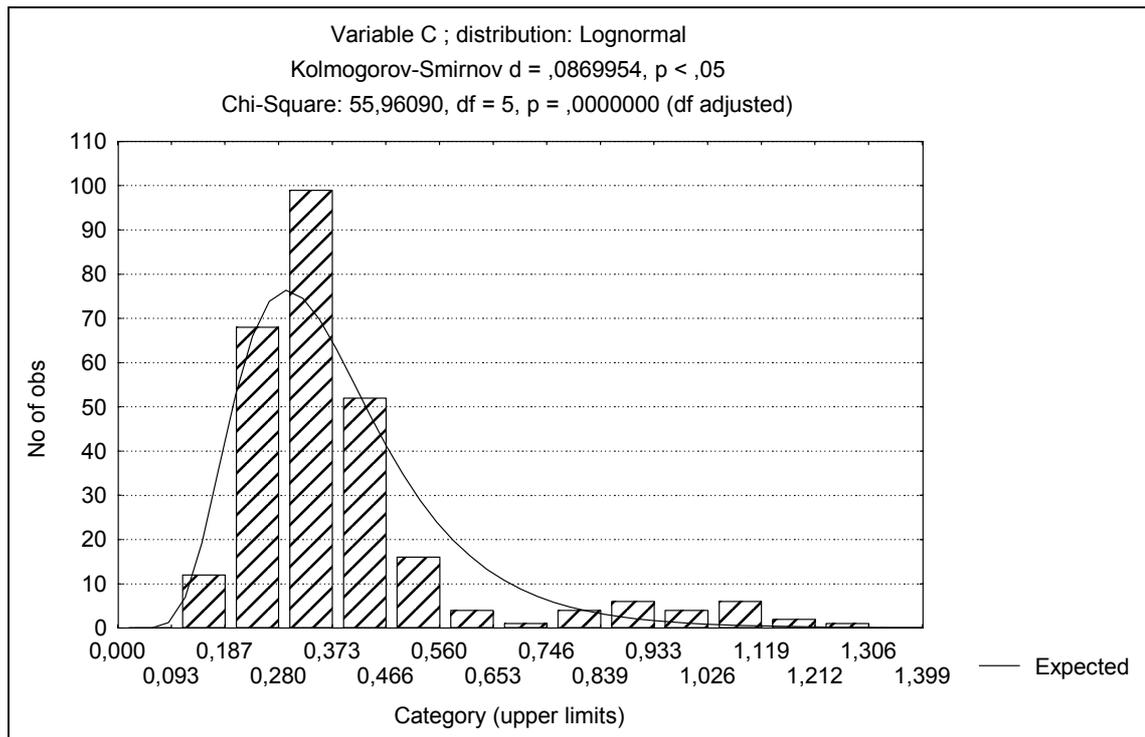


Abb. 9: Verteilung der Werte für den Testmittelpunkt (Variable C) für 275 Kalibrierdatensätze (Terbuthylazin-ELISA)

Da von einer bimodalen Verteilung ausgegangen werden musste, war zu vermuten, dass mindestens zwei unterschiedliche Grundgesamtheiten die Basis der Verteilung bildeten. Analytische Überlegungen veranlassten zu dem Schluss, dass die bei Parameter C festgestellte bimodale Verteilung sich durch eine Mischung zwischen einer regulären Verteilung und einer Ausreißerverteilung erklärt, die für etwa 10 % aller Platten zutraf.

Die Erklärung für die Ausreißerverteilung ergab sich durch eine Auftragung der Daten in einer *Regelkarte*. Es zeigte sich, dass alle Ausreißer aus einer Messkampagne von ca. 14 Tagen Dauer stammten. Eine Analyse der Protokolle der Messungen ergab, dass in dieser Zeit mit einer anderen Charge des Tracers gearbeitet worden war. Daraus ergab sich eine geringere Empfindlichkeit des Tests (größere Werte C). Die weitere statistische Analyse der Datensätze erfolgte dann mit den ausreißerbereinigten Daten (253 bzw. 250 Datensätze). Die Standard-Statistik für die verbleibenden 250 Datensätze lautet:

Parameter	A	B	C	D
Mittelwert (n = 250)	0,969	1,20	0,329	0,035
Standardabweichung (n)	0,553	0,200	0,090	0,016
Variationskoeffizient [%]	57,0	16,7	27,3	46,0

Die deskriptive Analyse für 253 Datensätze zeigte im Box&Whisker-Plot bei Parameter C nun eine nahezu symmetrische Verteilung, während bei den übrigen 3 Parametern A, B und D eine auffällige Rechtsschiefe vorhanden ist. (**Abbildung 10**). Die Rechtsschiefe lag übrigens auch bei den Messwerten für die Kalibratoren vor.

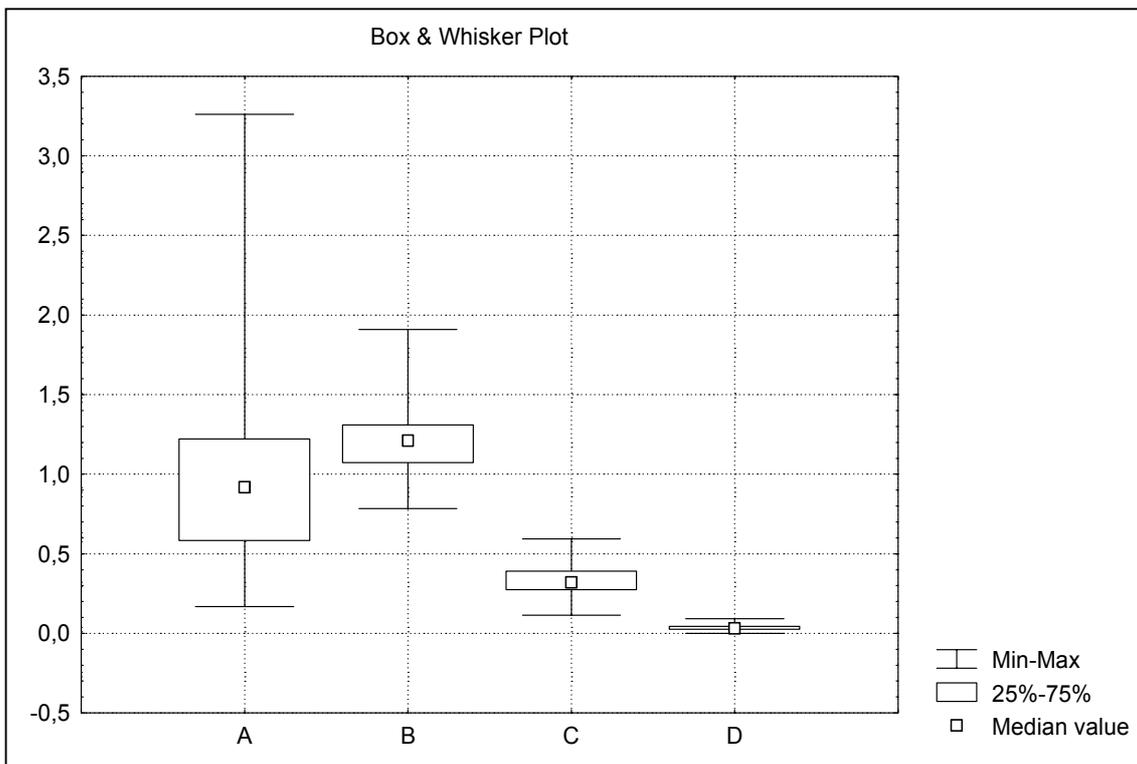


Abb. 10: Box&Whisker-Plot für die 4 Parameter des ausreißerbereinigten Triazin-Testdatensatzes

(Daten von 253 Platten; Datenpunkte: Mediane, Kästen: 25%-75%-Quantile; Balken: Spannweiten)

In allen Fällen wurde die Hypothese der Normalverteilung abgelehnt. Eine akzeptable Anpassung lieferte jedoch die Gamma-Verteilung.

In der **Korrelationsanalyse** ergaben sich interessante Zusammenhänge zwischen den Parametern, vor allem zwischen B und D ($r^2 = 0,52$) und zwischen B und C ($r^2 = 0,42$), nicht jedoch zwischen C und D.

Hilfreich ist in diesem Zusammenhang auch die Berechnung eines Höhenliniendiagramms (contour plot), welches die Abhängigkeit des Parameters B von den Parametern C und D wiedergibt (**Abbildung 11**). Der Betrag von B ist dabei in Graustufen kodiert. Die weißen Punkte markieren die Position von Kalibrierkurven bezüglich der Parameter C und D. Außerhalb des von diesen Punkten aufgespannten Bereiches kann die Splinefunktion nur extrapoliert werden, so dass aus dem Verlauf der Höhenlinien in diesem Bereich keine weiteren Schlüsse gezogen werden können.

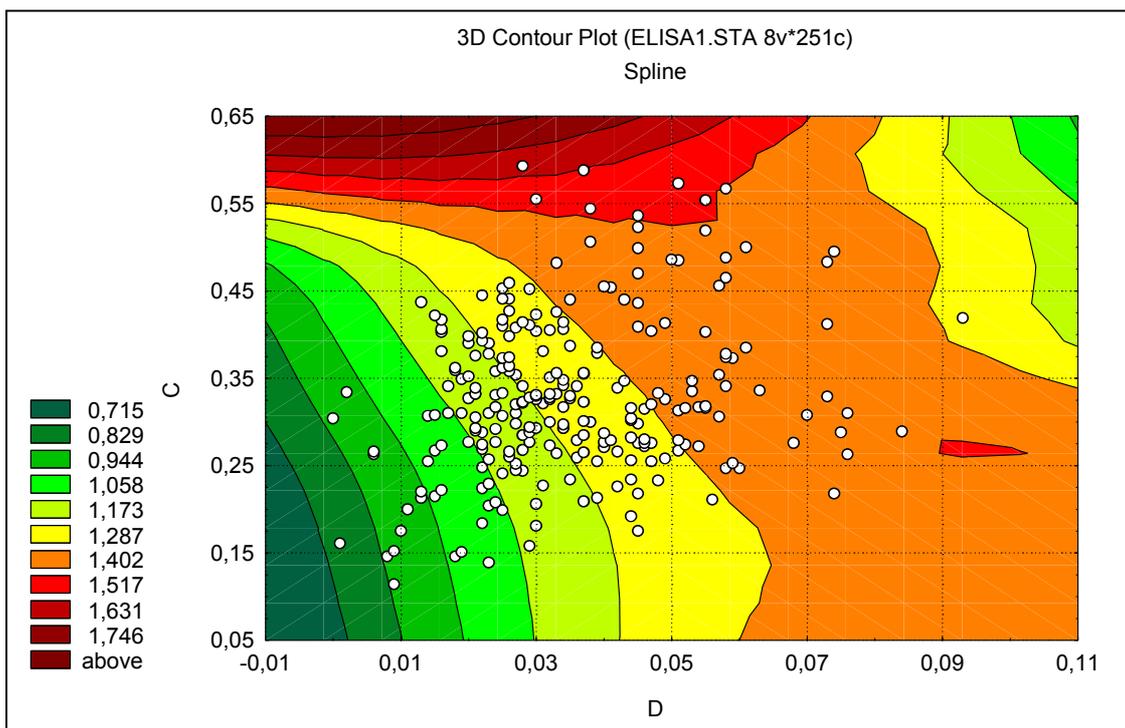


Abb. 11: Höhenliniendiagramm für die Abhängigkeit des Parameters B von C und D

(253 Datensätze; Ordinate: Parameter D (untere Asymptote); Abszisse: C (Testmittelpunkt))

Der Verlauf der Höhenlinien legt nahe, dass zwischen C und D einerseits und B andererseits eine näherungsweise lineare Beziehung vorliegt, wobei zusätzlich ein quadratischer Effekt von D und eine Wechselwirkung zwischen C und D zu beobachten ist.

Somit ergibt sich näherungsweise der Zusammenhang

$$\mathbf{B = 0,50 + 0,53 * C + 1,3 * D - 0,54 * D^2 - 0,48 * C * D} \quad (\text{Gl. 2})$$

Dabei ist allerdings zu beachten, dass im Modell nur etwas mehr als 40 % der Varianz von B durch die Variablen C und D erklärt werden können, so dass es nicht sinnvoll erscheint, B nur als feste Funktion der Zufallsvariablen C und D aufzufassen.

Fazit:

Die *Verteilung der vier Parameter* A_i , B_i , C_i und D_i *weist keine einfache Struktur auf* und kann daher nicht auf ein (robustes) stochastisches Modell mit nur einem oder zwei Parametern zurückgeführt werden. Schlussfolgerungen hinsichtlich möglicher kausaler Zusammenhänge ließen sich nicht ableiten.

4.1.2 Deskriptive Analyse der Kalibrierfunktion

Da kein *stochastisches Modell* für den Zusammenhang zwischen den vier Parametern der logistischen Funktion realer Immunoassay-Datensätze gefunden werden konnte, wurde versucht, für die Funktionswerte selbst ein Modell bzw. eine Verteilung zu finden.

Für eine Grundgesamtheit von Kalibrierfunktionen, z.B. auf verschiedenen Platten, gilt:

$$\mathbf{f_i(x) = ((A_i - D_i) / (1 + (x/C_i)^{B_i})) + D_i} \quad (\text{Gl. 3})$$

Durch *Normierung* der unterschiedlichen Funktionen (Setzen der Konstanten $A_i = 1$ und $D_i = 0$), ergeben sich für $f_i(x)$ standardisierte Werte zwischen 0 und 1:

$$\mathbf{f_i(x) = 1 / (1 + (x/C_i)^{B_i})} \quad (\text{Gl. 4})$$

Es stellt sich nun die Frage, welche Verteilung von $y_i(x)$ für gegebenes x vorliegt. Die Anpassung einer konventionellen Verteilung, wie der Normalverteilung, ist nicht sinnvoll, da nur Werte im Intervall zwischen 0 und 1 angenommen werden. Die Erfahrung zeigt aber, dass nach einer logit-Transformation häufig in guter Näherung eine Normalverteilung angepasst werden kann.

Zunächst wird dazu

$$\ln (f_i(x) / (1 - f_i(x)))$$

bestimmt.

Beispielhaft wurde für drei Konzentrationswerte x die Anpassung der Log-Normalverteilung an die wie oben beschrieben transformierten Daten durchgeführt. Dieses Verfahren ist äquivalent der Anpassung einer Normalverteilung an durch logit-Transformation erhaltene Werte.

Obwohl diese Anpassungen nicht voll befriedigten, so stellten sie doch eine in erster Näherung akzeptable Anpassung dar.

Fazit:

Die sich aus der „4-Parameter-Funktion“ ergebenden Funktionswerte eines Immunoassays können nach logit-Transformation in erster Näherung durch eine Normalverteilung angepasst werden.

4.2 Uncertainty-Funktion der Ergebnisse bei Immunoassays

4.2.1 Plattenspezifische Uncertainty

Die Uncertainty des Analyseergebnisses *innerhalb einer Platte* wird bestimmt durch verschiedene Varianzkomponenten. Es stellte sich daher die Frage nach einer geeigneten Parametrisierung des Gesamtfehlers in Abhängigkeit von der Konzentration x .

Betrachten wir nun eine Platte i mit einer „wahren“ Kalibrierfunktion $f_i(x)$. Es können hier *drei Arten von Unsicherheit* auftreten:

- Streuung der Kalibrierung: die anhand von Standardlösungen geschätzte Kalibrierfunktion $f_{is}(x)$ ist mit einem Zufallsfehler behaftet (vgl. 4.1):
 $f_{is}(x) = 1 / (1 + (x/C_{is})^{B_{is}})$, mit individuellen Parametern B_{is} und C_{is}
- Systematische Abweichung von der ursprünglichen Konzentration: Die Probenvorbereitung bewirkt eine Abweichung e_0 der wirksam werdenden Effektivkonzentration x_e von der ursprünglichen Konzentration x : $x_e = x + e_0$
- Systematische Fehler im Messprozess: z.B. Ablesefehler (etwa durch Geräterift etc.) bewirken einen Fehler e_1 in der optischen Dichte y :
 $y = f_i(x_s) + e_1$

Die genannten Unsicherheiten wirken zusammen und können in ungünstigen Fällen (Wirkung in derselben Richtung) aufgrund der nichtlinearen Struktur der Kalibrierkurve zu beträchtlichen Verzerrungen der Analysenergebnisse führen.

Kennt man nun die wahre Kalibrierfunktion $f_i(x)$, so ergibt sich für den zu schätzenden (bestimmenden) Konzentrationswert x_s der unbekannt Probe aus der Umkehrfunktion zu $f_i(x)$:

$$x_s = f_i^{-1}(y) \quad (\text{Gl. 5})$$

und nach dem Einsetzen der o.g. Beziehungen:

$$x_s = f_i^{-1}(f_i(x_e) + e_1) = f_i^{-1}(f_i(x + e_0) + e_1) \quad (\text{Gl. 6})$$

Der Term lässt sich vereinfachen durch eine Taylorentwicklung um $f_i(x + e_0)$. Es ergibt sich approximativ:

$$x_s = x + e_0 + e_1 / |f_i'(x)| \quad (\text{Gl. 7})$$

Mit dem Term für die Ableitung der Kalibrierfunktion $f_i'(x)$

$$f_i'(x) = - B_i C_i^{B_i} x^{B_i-1} (1 + (x/C_i)^{B_i})^{-2} \quad (\text{Gl. 8})$$

erhält man:

$$x_s = x + e_0 + e_1 / |- B_i C_i^{B_i} x^{B_i-1} (1 + (x/C_i)^{B_i})^{-2}| \quad (\text{Gl. 9})$$

Fazit:

Die Abweichung des Schätzwertes der Konzentration vom wahren Wert wird durch die Fehler in der Probenvorbereitung und im Messprozess, in Abhängigkeit von der individuellen Lage (B_i , C_i) der Kalibrierfunktion, ermittelt durch Kalibrierstandards, bestimmt.

4.2.2 Plattenübergreifende Uncertainty

Aus der **Gleichung 9** ergibt sich, dass die Varianz des Konzentrationsschätzwertes von den Fehlertypen e_0 und e_1 abhängt:

$$\text{Var}(x_s) = e_0 + e_1 / |- B_i C_i^{B_i} x^{B_i-1} (1 + (x/C_i)^{B_i})^{-2}| \quad (\text{Gl. 10})$$

Da die Varianz von e_0 nur von der wahren Konzentration abhängig ist und die Varianz von e_1 durch die zugehörige erwartete optischen Dichte (y) bestimmt ist, liegt es nahe, die **Parametrisierung der Varianzfunktion** mittels geeigneter Annahmen bezüglich beider Zufallsvariablen festzulegen. Daher liegen die Annahmen $\text{Var}(e_0) = g x^2$ und $\text{Var}(e_1) = h$ nahe, mit geeigneten Parametern g und h .

Unter Anwendung dieser Annahmen ergibt sich für das **parametrische Modell der Varianz** die **Gleichung 11**:

$$\text{Var}(x_s) = \text{Var}(e_0 + e_1 / |f_i'(x)|) = g x^2 + h B_i^{-2} C_i^{-2B_i} x^{-2B_i+2} (1+(x/C_i)^{B_i})^4 \quad (\text{Gl. 11})$$

Wenn der Koeffizient h hinreichend klein ist, bedeutet dies, dass die **Varianz bzw. Standardabweichung von x_s näherungsweise proportional zur wahren Konzentration x** ist. Die Standardabweichung der logarithmierten optischen Dichte ist in diesem Falle nahezu unabhängig von x . *Es ist daher zu vermuten, dass in vielen Fällen bei Betrachtung*

ung der logarithmierten Werte eine Parametrisierung der Varianz entfallen kann. Bei plattenübergreifender Betrachtung des Fehlers e_1 ist davon auszugehen, dass es ein gemeinsames Verteilungsmodell für den Fehler in der optischen Dichte gibt, d.h. es gibt eine Uncertainty-Funktion, die von der wahren optischen Dichte abhängig ist. Aufgrund strenger Monotonie ist diese Funktion auch eine Funktion von $f^{-1}(f_1(x) = x_i)$, d.h. jenes Konzentrationswertes, der sich bei Anwendung der Gesamt-Kalibrierfunktion ergeben würde. Mit anderen Worten: *der Fehler in der optischen Dichte wird über die Kalibrationskurve in einen Fehler der Konzentration transformiert und man erhält eine kombinierte Uncertainty $\text{Std.abw.}(x) + \text{Std.abw.}(x_i)$.*

Dabei wird die Verteilung der Werte x_i verändert und es ergibt sich **eine Mischverteilung**, die *erheblich längere Enden aufweisen* wird als die Ausgangsverteilung der Messwerte. Diese Mischverteilungen bewirken u.U. eine wesentliche *Erhöhung der Standardabweichungen*.

Das erarbeitete **Modell für die Kalibrierfunktion** hat den Vorzug, dass es einerseits

- **plattenspezifische** Abweichungen hinsichtlich der Parameter B_i und C_i einbezieht und andererseits
- **plattenübergreifend** die Parameter g und h ermittelt werden können.

Ob es allerdings eine geeignete Approximation der wahren Varianzfunktion darstellt, kann nur **empirisch** für eine Grundgesamtheit von Platten ermittelt werden. Es musste daher zunächst durch Experimente eingehend geprüft und gegebenenfalls verbessert werden. Möglichkeiten der Modellverbesserungen bestehen z.B. darin, für die Varianzfunktionen der beiden Fehlerkomponenten flexiblere Parametrisierungen zu verwenden.

Fazit:

Es wurde ein **plattenübergreifendes Modell für die Varianz** aufgestellt. Es besagt:

- die Varianz des Konzentrationsergebnisses ist größer als die der Messwerte
- die Varianz ist näherungsweise proportional zur wahren Konzentration
- die Standardabweichung der logarithmierten OD ist unabhängig von der Konzentration.

4.3 Festlegung der zu prüfenden Uncertainty-Faktoren

Aufgrund der Vorüberlegungen zur Struktur der Uncertainty-Funktion, sollte ein *hierarchisch geschachtelter fraktionierter faktorieller Versuchsplan* zur Überprüfung der Annahmen entworfen werden. Dieser sollte so beschaffen sein, dass er eine angenommene, modellhafte Population von Messbedingungen und Matrixtypen repräsentiert. Für diese Population kann dann einerseits die Uncertainty-Funktion ermittelt werden; andererseits ist es möglich, spezifische Wirkungen einzelner Faktoren zu untersuchen.

Zunächst mussten die *Faktoren*, die in einen Versuchsplan einbezogen werden sollten, festgelegt werden. Es wurde versucht, eine möglichst vollständige Liste der denkbaren Einflussfaktoren zusammenzustellen. Die Unsicherheiten (uncertainties) können

- methodisch bedingt sein (z.B. Pipettier- und Waschschrirte, Probenvorbereitung)
- in äußeren Faktoren der Durchführung begründet sein, die meist nicht in der Methode aufgeführt sind (z.B. Temperatur, Trainingsstatus des Personals)
- von der unterschiedlichen Probenmatrix herrühren.

Es wurden auch Faktoren auf der Basis früherer Erfahrungen (z.B. SCHNEIDER 1993, WEIL ET AL. 1995, SCHNEIDER ET AL. 1990, SCHNEIDER ET AL. 1993, LAMBRECHT UND SCHNEIDER 1996) einbezogen. Hier hatte sich gezeigt, dass es systematische Abweichungen der Richtigkeit als auch der Präzision „quer über die Platte“, d.h. in der üblichen Pipettierichtung von links nach rechts, gibt, die im weiteren Text als „Trend“ bezeichnet werden.

Schließlich wurden die in **Tabelle 3** zusammengestellten Faktoren geprüft. Es wurden allerdings keine monofaktoriellen Versuche durchgeführt, sondern in den Experimenten stets mehrere Faktoren gleichzeitig und insbesondere in ihren *Wechselwirkungen* geprüft. Außerdem gibt es Störfaktoren, die direkt wirken (zufällige Schwankungen verursachen zufällige Schwankungen der Messwerte), aber auch indirekte Wirkungen (Beispiel: Einstellung eines Faktors A auf eine niedrige Stufe ergibt durch einen Faktor B bewirkte Abweichungen, die größer sind, als bei Einstellung des Faktors A auf eine höhere Stufe (unterschiedlicher Sensitivitätsgrad)).

Tab. 3: Untersuchte Unsicherheitsfaktoren bzw. Uncertainties

Faktoren-Gruppe	UNSICHERHEITS-FAKTOR	Anzahl Stufen	Bereich bzw. Niveau
„MATRIX“	MATRIX-BESTANDTEILE	div.	pH 5-9, Schwermetalle, Cu,Cr,Pb,Zn,Cd,Hg,Ni, Fulvinsäuren,Tenside 18 Proben
	AUSSTATTUNG	div.	Lösungen, Konsistenz etc.
„KIT“	CHARGE	3	4/99, 9/99a, 9/99b
	KALIBRIER-STANDARDS	2	Kitstandards eigene Standards
	SELEKTIVITÄT	2	Isoproturon (IPU) IPU+Herbizid-Mix (DIN)
	RAND	2	am Rand/innen
„POSITION“	ZEILE	8	A – H
	SPALTE	12	1 – 12
	PROBENAUFTRAG	2	von Spalte 1 nach 12 bzw. umgekehrt
	TRACERAUFTRAG	2	von Spalte 1 nach 12 bzw. umgekehrt
	TEMPERATUR	2	niedrig: 19 °C hoch: 26 °C
„TEMPERATUR“	VORINKUBATIONS-ZEIT	2	kurz: 60 min lang: 120 min
	KONZENTRATION	2	niedrig: 0,05 µg/l hoch: 0,5 µg/l
	PLATTE	> 6	Laufende Nummer der durchgeführten Plattentests
„LABOR & PERSONAL“	STRESS	2	schnelles/langsames Pipetieren, „Störungen“
	OPERATOR	3	Ungeübter, Geübter, Experte
„ARBEITS-WEISE“	STREIFEN	2	Platte in Streifen Platte komplett
	PIPETTE	2	Tropffläschchen Mikroliterpipette
	WASHER	2	MTP-Washer manuell
	PROBENVOR-BEHANDLUNG	3	Einfrieren, Erwärmen, Filtration

4.4 Überprüfung der verschiedenen Uncertainty-Faktoren

4.4.1 Faktorengruppe „Matrix“

In der Literatur wurden des öfteren Einflüsse der Matrix auf die Ergebnisse von Immunoassays geschildert (z.B. MOUVET ET AL. 1997). Für eine Überprüfung muss zunächst festgelegt werden, welche Matrixkomponenten für das Anwendungsgebiet des jeweiligen Tests von Bedeutung sind. Als wichtige Matrixbestandteile in Wässern wurde beispielsweise für die USA eine Richtlinie erstellt (APHA 1989). Der Einfluß von Cu^{2+} , SO_4^{2-} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , NO_3^- , $\text{Fe}^{2+/3+}$, Huminstoffe und NaCl ist danach für Gewässer von besonderer Bedeutung und wurde vereinzelt auch in Kit-Validierungen untersucht (RUBIO ET AL. 1991). Auch andere Autoren berichten über den Einfluß von Huminstoffen auf das Analyseergebnis von ELISA-Tests (z.B. RUPPERT ET AL. 1990, RUPPERT ET AL. 1992, KEUCHEL ET AL. 1992a,b).

Vor Projektbeginn wurden im Rahmen einer Diplomarbeit am Umweltbundesamt Untersuchungen zum Einfluss der Matrix auf die Ergebnisunsicherheit des in dieser Studie verwendeten Isoproturon-ELISAs durchgeführt (GÖHRE 1999).

Die Ergebnisse dieser Experimente lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- Der Isoproturon-ELISA ist robust bezüglich der untersuchten **Schwermetallionen**, Hg^{2+} , Pb^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Cr^{3+} . Diese Hypothese wurde anhand synthetischer Wasserproben geprüft, welche die genannten Schwermetalle in Konzentrationen enthielten, die sich an den maximal zulässigen Konzentrationen für Oberflächenwasser (Güteklasse IV) bzw. Abwasser orientierten.
- Ionische und nichtionische Tenside zeigten bei einer Konzentration von 0,2 mg/l nur in Einzelfällen einen Einfluss
- Richtigkeit und Präzision des Isoproturon-ELISAs werden in einem **pH-Bereich von pH 5 bis pH 9** nicht von diesem beeinflusst.
- **Fulvinsäuren** in gewässerrelevanten Konzentrationen (30 mg/l) beeinträchtigen die Ergebnisse des Isoproturon-ELISAs nicht.

Aufgrund der Robustheit des Tests gegenüber Matrixkomponenten wurde auf weitere systematische Untersuchungen zum Einfluss der Matrix auf die Ergebnisunsicherheit verzichtet. Bei den Realproben-Messungen wurden Matrixeffekte aber mit erfasst.

4.4.2 Faktorengruppe „Kit“

4.4.2.1 Charge

Um eine Beeinflussung der Ergebnisse der Experimente durch die Charge zu vermeiden, wurden der Großteil der Experimente mit einer Charge (s. 3.2) durchgeführt. Darüber hinaus wurden auch zwei andere Chargen in die Untersuchung einbezogen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass bei den angestellten Versuchen *kein signifikanter Chargeneffekt* bezüglich Präzision, Richtigkeit oder Sensitivität auftrat.

Fazit:

Kein Chargeneffekt

4.4.2.2 Kalibrierstandards

Es sollte überprüft werden, ob die Auswertung von Messungen anhand einer Kalibriergeraden, die mit den 3 im Testkit enthaltenen Standards erstellt wurde, zu systematischen Fehlern bezüglich der Richtigkeit führt.

Der Vergleich wurde mit selbst bereiteten Kalibrierstandards (= Laborstandards) (siehe **Abschnitt 3.2**) durchgeführt. Eine typische Messreihe ist in **Abbildung 12** dargestellt.

Bei einer linearen Interpolation der OD-Werte der Kitstandards ergibt sich eine Kalibriergerade, die bei Heranziehen zur Auswertung von Proben unbekannter Konzentration zu *Überbestimmungen* führen würde, insbesondere für höhere Konzentrationen.

Bei der Analyse der Realproben (**Abschnitt 4.5**) wurden der Einfluss des Kitstandards auf die Richtigkeit des Analysenergebnisses anhand von 4 MTP ebenfalls quantifiziert.

Es zeigte sich, dass die Auswertung mittels Kitstandards durchschnittlich um ca. 10 % (14, 10, 11,5 und 6,4 %) höhere Werte lieferte.

Fazit:

Das Arbeiten *mit den Kitstandards* ergibt systematische Fehler, die jedoch noch akzeptabel erscheinen. Insbesondere ist es aber von Nachteil, dass bei der Verwendung von lediglich 3 Standards keine sigmoidale Interpolation durchgeführt und somit keine exakte Kalibrierfunktion ermittelt werden kann. Außerdem wird der mögliche Messbereich dadurch im oberen und unteren Konzentrationsbereich erheblich eingeschränkt.

Abhilfe schafft beispielsweise das Arbeiten mit **7 selbst bereiteten Kalibrierlösungen**.

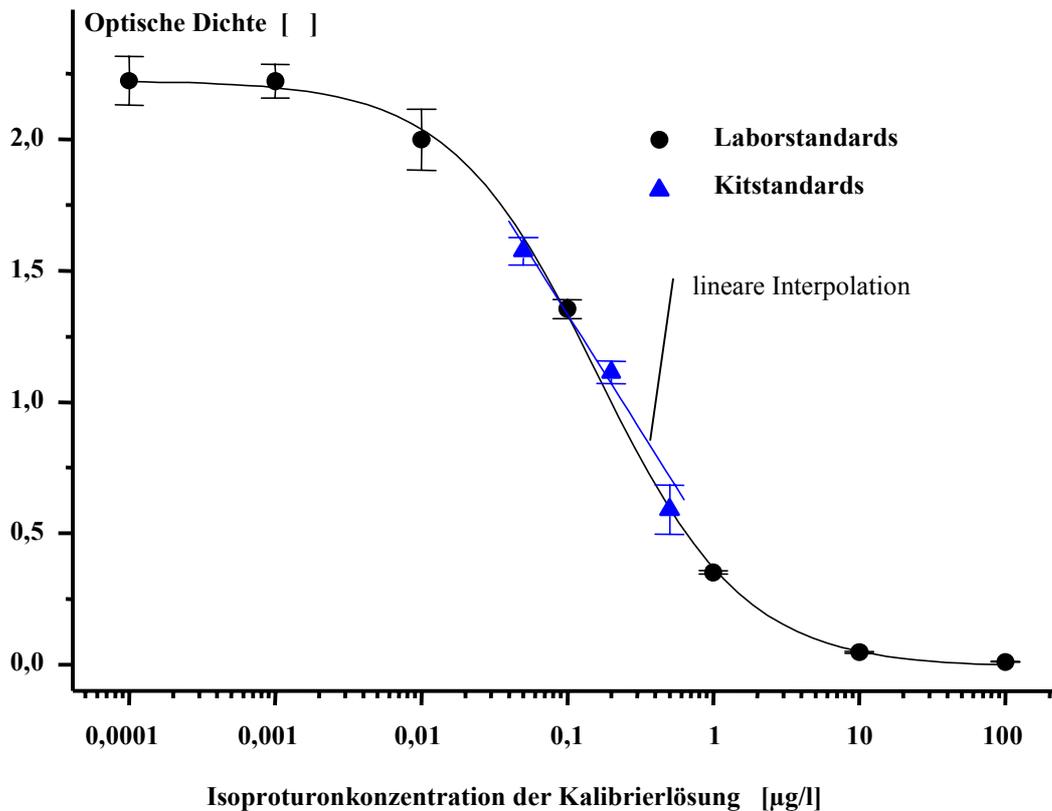


Abb. 12: Kalibrierkurven unter Verwendung von Laborstandards bzw. Kitstandards

4.4.2.3 Selektivität

Es hat sich wiederholt gezeigt, dass die von Testkit-Herstellern angegebenen Kreuzreaktivitäten nicht den tatsächlichen Querempfindlichkeiten der Messung gegenüber verwandten Substanzen entsprechen. Dies kann in Schwankungen der Kalibrationsbeziehung begründet sein, liegt aber auch daran, dass die Kreuzreaktivität eigentlich kein fester Faktor ist, sondern eine über den Messbereich variable Größe (SCHNEIDER 1993, SCHNEIDER ET AL. 1992).

Kreuzreaktivitäten werden errechnet, indem man den C-Wert (Konzentration am Testmittelpunkt, Abb. 8) der Bezugssubstanz (IPU) durch den der kreuzreagierenden Substanz dividiert und mit 100 multipliziert. Häufig wird anstelle des C-Wertes zur Berechnung der Kreuzreaktivität die Konzentration für eine 50 %ige Hemmung der Tracerbin-

dung „50 % B/B₀“ verwendet, was einen ähnlichen Wert ergibt, aber nicht exakt dasselbe ist. Vereinzelt wird propagiert, dass die Kreuzreaktivität für eine bestimmte Konzentration angegeben werden solle (z.B. % B/B₀ bei 0,1 µg/l). Eine andere Angabe als die übliche Prozentangabe wurde daher vereinzelt vorgeschlagen (MILLER UND VALDES 1992, BERZOFSKY UND SCHECHTER 1981, GOOLSBY ET AL. 1990, ULRICH ET AL. 1991, KEUCHEL ET AL. 1992a). Eine Betrachtung der Kalibrierkurven kreuzreagierender Substanzen zeigt jedoch meist deutlich, dass die Kreuzreaktivität variabel über den gesamten Kalibrierbereich ist und ein einzelner Zahlenwert folglich nur eine Orientierungsgröße darstellt.

Die Kreuzreaktivität des Isoproturon-ELISA-Tests wird vom Hersteller angegeben. Sie beträgt laut Spezifikation < 0,3 % für andere Harnstoffherbizide. Die Selektivität wurde in diesem Vorhaben nicht anhand von Einzelsubstanzen überprüft. Es wurden aber über den gesamten Kalibrationsbereich Mischungen angesetzt, welche die in der DIN EN ISO 11396 aufgeführten Herbizide (siehe **Tabelle 2**) in entsprechender Konzentration enthielten.

Die **Abbildung 13** dokumentiert eindrucksvoll, dass andere Herbizide nur eine sehr geringe Kreuzreaktivität besitzen, d.h. das Signal nur geringfügig abschwächen (DIN + IPU-Kurve etwas unter Isoproturon-Kurve). Bei Untersuchung der Mischung der Wirkstoffe allein, ergibt sich in der Summe eine Kreuzreaktivität von nur 2,75 % (DIN – IPU-Kurve, Rauten). Dies bedeutet, dass selbst wenn die Kreuzreaktivität von 2,75 % von einer einzigen Substanz herrühren würde, diese um den Faktor 36 weniger empfindlich nachgewiesen würde als IPU.

Fazit:

Der Isoproturon-Testkit weist eine **hohe Selektivität** für Isoproturon auf. Es ist daher bei den Realprobenanalysen davon auszugehen, dass neben Isoproturon nur Wirkstoffe, die in sehr viel höherer Konzentration vorliegen, das Ergebnis beeinflussen.

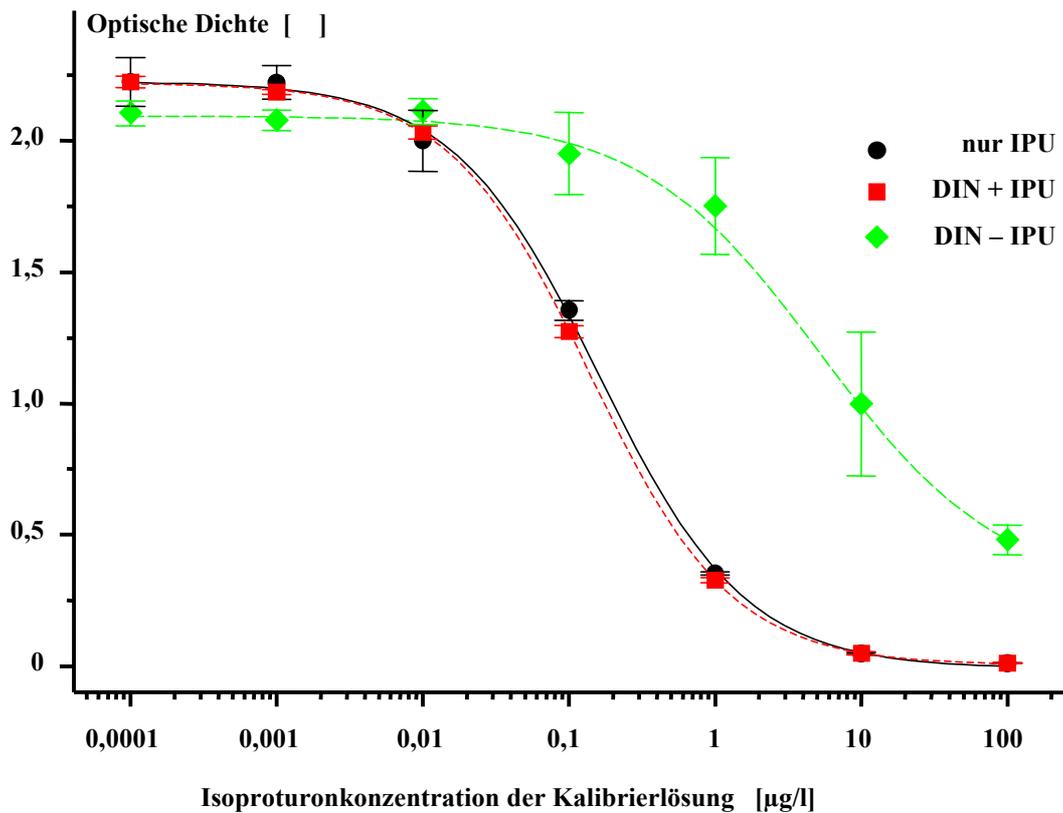


Abb. 13: Kreuzreaktion anderer Herbizide im Isoproturon-ELISA

IPU (A = 2,23; B = 0,868; C = 0,160; D = -0,009); DIN+IPU (A = 2,22; B = 0,898;
C = 0,139; D = 0,004); DIN-IPU (A = 2,10; B = 0,706; C = 5,28; D = 0,278)

4.4.3 Faktorengruppe „Position“

4.4.3.1 Experiment „Trend 1“

Als erstes Experiment zur Ermittlung signifikanter Uncertainty-Faktoren wurde die Positionsabhängigkeit des Analyseergebnisses im Modell-Immunoassay untersucht.

Aus der Auswertung der unter **Abschnitt 4.1.1** beschriebenen Messungen mit einem Triazin-Immunoassay ergab sich, dass die im rechten Bereich der MTP (vgl. **Abbildung 7**) liegenden Kavitäten bei Vorliegen gleicher Konzentrationen niedrigere Extinktionswerte zeigten, und somit höhere Konzentrationen verglichen mit dem linken Bereich der MTP anzeigten. (**Abbildung 14**).

Dies war auch in früheren Untersuchungen ermittelt worden (SCHNEIDER 1993).

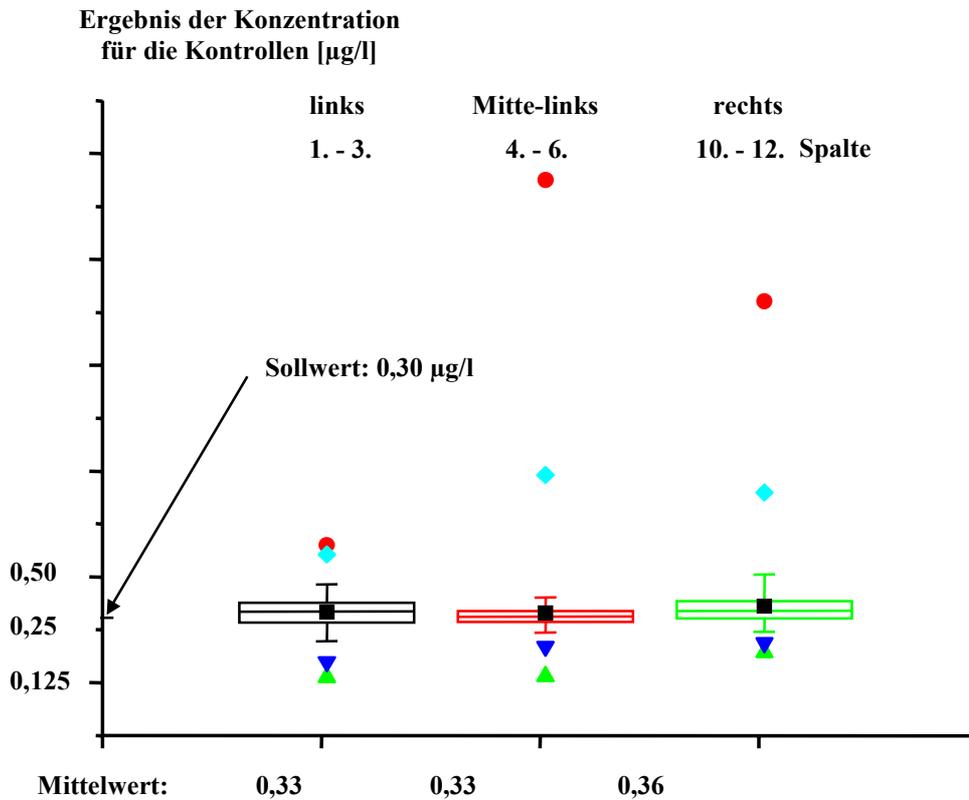


Abb. 14: Ortsabhängiges Konzentrationsergebnis einer Kontrolle (Triazin-ELISA)

Quadrate: Median; Dreiecke: untere beide Extremwerte; Kreise und Rauten: obere beide Extremwerte; Boxes: Vertrauensbereich 1 – 99 %

Eine Prüfung auf Normalverteilung der Ergebnisse ergab keine Auffälligkeiten (**Abbildung 15**). Wenn es sich aber um keinen zufälligen Effekt handelt, müssen die Abweichungen quer über die Platte kontinuierlich verteilt sein.

Zielsetzung des ersten Experimentes war es, diesen „Trend“-Effekt für den Isoproturon-Assay zu überprüfen und darüber hinaus,

- Erfahrungen mit der praktischen Durchführung von geplanten Versuchen zu sammeln, um daraus entsprechende Konsequenzen für das Hauptexperiment ziehen zu können
- gegebenenfalls die Designfaktoren neu zu definieren
- die Brauchbarkeit der Definitionen der Designfaktoren zu prüfen

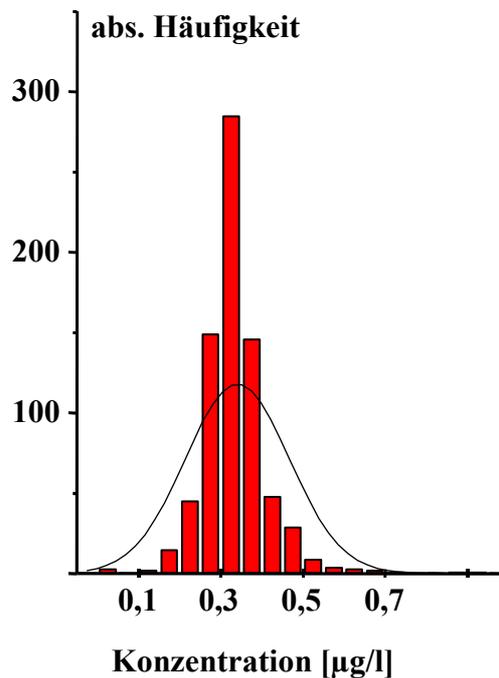


Abb. 15: Verteilung der Positivkontrollen (Triazin-ELISA)

Dargestellt ist die Häufigkeitsverteilung von 750 Positivkontrollen der Konzentration 0,3 µg/l Terbutylazin; Die Linie gibt die Normalverteilung für den Datensatz an.

- die Parametrisierung von Zeilen-, Spalten- und Nachbarschaftseffekten im Hinblick auf ein umfassendes Validierungsexperiment festzulegen (z.B. musste festgelegt werden, ob es sich um lineare Zeilen- oder Spalteneffekte handelt oder ob reine Randeffekte dominieren, weiterhin, ob ein zusätzlicher zufälliger Nachbarschaftseffekt berücksichtigt werden muss, usw.).

An dieser Stelle soll auch beschrieben werden, in welcher Weise die zu untersuchenden Faktoren abgestuft und kodiert wurden und wie beispielhaft ein Versuchsplan zur Durchführung der Validierungsexperimente aussah.

Im Versuchsplan wurden die folgenden Faktoren berücksichtigt und folgendermaßen parametrisiert (**Tabelle 4**)

Tab. 4: Parametrisierung zu untersuchender Faktoren im Experiment „Trend 1“

FAKTOR	Art der Stufen	Parametrisierung	Wert
SPALTE	Spaltennummer der Kavität	1 ... 12	1 – 12
ZEILE	Zeilennummer der Kavität	1 ... 8	A – H
RAND	Kavität im Innern	0	innen
	Kavität am Plattenrand	1	Rand
VORINKUBATIONSZEIT	kurz	-1	60 min
	lang	1	120 min
KONZENTRATION	niedrig	-1	0,05 µg/l
	hoch	1	0,5 µg/l

Es wurden neben einem *linearen Spalten- und Zeileneffekt* (Faktoren SPALTE und ZEILE) auch ein *Randeffekt* (RAND) sowie ein *Zeiteffekt* (Verzögerung des Auftrags: Faktor VORINKUBATIONSZEIT) berücksichtigt. Außerdem sollte auf Konzentrationsabhängigkeit der Effekte (Faktor KONZENTRATION) untersucht werden.

Weiterhin wurden zweifaktorielle *Wechselwirkungen* (A x B) der Faktoren mit den vorgenannten geometrischen Effekten berücksichtigt, da vermutet wurde, dass die verlängerte Vorinkubationszeit, welche sich bei den weiter rechts liegenden Kavitäten ergibt, für den Positionseffekt zumindest mit verantwortlich sein könnte.

Der Auftrag der Proben und des Tracers erfolgte spaltenweise jeweils von links nach rechts. Die Zuordnung der verschiedenen Konzentrationen und Inkubationszeiten zu den Kavitäten lassen sich der **Abbildung 16** entnehmen. Das Experiment wurde durch exaktes, zeitkontrolliertes Pipettieren einer einzigen Platte ausgeführt (ein Mitarbeiter zum Ansagen und zur Hilfestellung, einer zum Pipettieren).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	X1	Y2	Y1	Y2	Y1	X2	X1	Y2	X1	Y1	X2	X2
B	Y1	X2	Y1	X1	Y2	X2	Y2	Y2	Y1	X1	X2	Y2
C	X2	X2	Y2	X1	Y1	Y2	X1	Y1	X2	X1	Y1	Y1
D	X1	X1	Y2	Y1	Y1	X1	Y2	X2	X1	X1	Y1	X1
E	X2	Y1	X1	X2	X2	Y2	X2	Y1	X2	Y2	Y1	Y2
F	Y2	Y1	Y1	X2	Y2	X1	Y2	X2	Y2	Y2	Y2	X2
G	X1	Y2	Y1	X1	X1	X2	X2	X1	X1	X2	Y1	X1
H	X2	Y2	Y2	Y1	X1	Y1	X1	Y1	X2	X2	Y1	Y2

Konzentration X: 0,05 µg/l

Konzentration Y: 0,5 µg/l

Vorinkubationszeit 1: 2:00 h (erste Kavität) bis 2:15:50 h (letzte Kavität)

Vorinkubationszeit 2: 1:00 h (erste Kavität) bis 1:15:50 h (letzte Kavität)

Abb. 16: Pipettierschema für die Experimente zum Positionseffekt

Zur Aufstellung des Versuchsplans wurde ein iterativer stochastischer Maximierungsalgorithmus verwendet. Der Versuchsplan war näherungsweise D-optimal, d.h. die zugehörige Informationsmatrix weist unter allen Versuchsplänen approximativ die höchste Determinante auf. Durch die D-Optimalität ist gewährleistet, dass die Korrelationen zwischen den Schätzungen sehr klein sind und zugleich die Schätzvarianz sehr gering ausfällt.

Eine erste statistische Auswertung erfolgte mit dem Programmpaket SPSS. Ein Beispiel für eine multiple Regressionsanalyse unter Einbeziehung aller geometrischen Variablen, der Konzentration und der Zeit sowie der zweifaktoriellen Wechselwirkungen, ist in **Tabelle 5** angeführt.

Tab. 5: Regressionsanalyse für Geometriefaktoren und deren Wechselwirkungen (A x B)

	B	s von B	t(84)	Vertrauensniveau (P)
ZEILE	0,001634	0,005898	0,27708	0,78
SPALTE	-0,038365	0,003915	-9,79915	0
RAND	-0,096927	0,027887	-3,47567	0
KONZENTRATION	0,529823	0,040606	13,04795	0
ZEIT	-0,014736	0,040569	-0,36322	0,72
ZEILE x KONZ.	0,004932	0,005898	0,83611	0,41
SPALTE x KONZ.	-0,013751	0,003922	-3,50586	0
RAND x KONZ.	-0,030897	0,027923	-1,10650	0,27
ZEILE x INK.ZEIT	-0,000232	0,005895	-0,03942	0,97
SPALTE x INK.ZEIT	0,001677	0,003922	0,42766	0,67
RAND x INK.ZEIT	-0,019940	0,027923	-0,71411	0,48

(B bezeichnet die Parameterschätzung im linearen Modell. s ist die Standardabweichung. t(84) steht für die t-verteilte zugehörige Prüfgröße, die in diesem Falle mittels einer Residualvarianz basierend auf 84 Freiheitsgraden berechnet wurde.)

Durch die Regressionsanalyse werden Faktoren B („Wichtungen“) für die einzelnen untersuchten Einflußparameter („Faktoren“ in **Tabelle 4**) erhalten. Ein großer Wert für B misst diesem Faktor also einen starken Einfluß zu. Wichtig ist zusätzlich die Standardabweichung dieser Gewichte (s von B). Durch Division von B durch s wird der t-Wert erhalten. Ein hoher Betrag von t zeigt einen starken Einfluß des Faktors bzw. der Faktorkombination auf. Dies läßt sich dann durch den P-Wert ausdrücken, wobei ein niedriger Wert für das Vertrauensniveau eine hohe Signifikanz bedeutet. Man erkennt, dass der Einfluß des Faktors SPALTE mit einem t-Wert von $-9,8$ ein Vertrauensniveau von $P = 0$ hat, d.h. hochsignifikant den Messwert beeinflusst. Der Einfluß der Inkubationszeit ($B = -0,014736$; $s = 0,040569$; mit $t = B/s$ ergibt sich $t(84) = -0,36322$ und damit ein Vertrauensniveau für den Einfluss des Faktors von $P = 0,72$) ist nicht signifikant.

Statistisch signifikant sind damit in dieser Analyse folgende Variablen:

- Haupteffekte: SPALTE, RAND, KONZENTRATION
- Wechselwirkungen: SPALTE x KONZENTRATION

Entgegen den ursprünglichen Annahmen war ein Zeiteffekt weder als Haupteffekt noch in Kombination mit anderen Variablen nachweisbar. Der Hersteller geht von einer Gleichgewichtseinstellung in der Kavität innerhalb von 45 Minuten aus, so dass ein *Zeiteffekt* bei einer Inkubationszeit größer 60 Minuten *nicht auftreten* sollte.

Die statistische Analyse der Daten dieser Platte zeigte einige Inkonsistenzen. Es erwies sich daher als notwendig, durch statistische Analysen *Ausreißer zu eliminieren*. Dies geschah z.B. durch Logarithmieren der Messgröße (optische Dichte) und anschließende Regressionsanalyse, sowie Überprüfung der Verteilung (Histogramm) und der Normalplots der Residuen. Ausreißerelimination erfolgte bis letztere keine größeren Abweichungen mehr zeigten (d.h. bis die Residuen normalverteilt waren).

Als Hauptfaktoren ergaben sich in dem oben gezeigten Fall nach Elimination der Ausreißer:

- Hauptfaktor: SPALTE
- weitere Faktoren: RAND, KONZENTRATION, INKUBATIONSZEIT
- Wechselwirkung: SPALTE x INKUBATIONSZEIT

Die Effekte sind in erster Näherung bezüglich der logarithmierten Messgröße (optische Dichte) $\ln(\text{OD})$ additiv wirksam, v.a. der Spalten- und Randeffekt.

In der **Abbildung 17** ist graphisch verdeutlicht, wie sich die unterschiedlichen Konzentrationen und Inkubationszeiten auf den Messwert auswirken. Die Faktorkombinationsstufen waren dabei randomisiert über die Platte verteilt.

Die **Abbildung 18** zeigt, wie relativ kleine Verringerungen der optischen Dichte große Überbestimmungen bewirken können. Bei der niedrigen Konzentration bewirkt eine Verringerung der optischen Dichte um 8 % bereits eine Überbestimmung der Isoproturonkonzentration in der Probe um 41 %.

Für weitere Versuche stand zunächst die Klärung der Frage nach der Ursache des Spalteneffektes an. Denkbare Ursachen sind:

- Zeitgradient beim Pipettieren
- Temperaturgradient beim Schütteln
- Gradient wird vom Washer erzeugt
- Gradient entsteht durch einen Defekt am Photometer
- Gradient stammt bereits von der Plattenherstellung

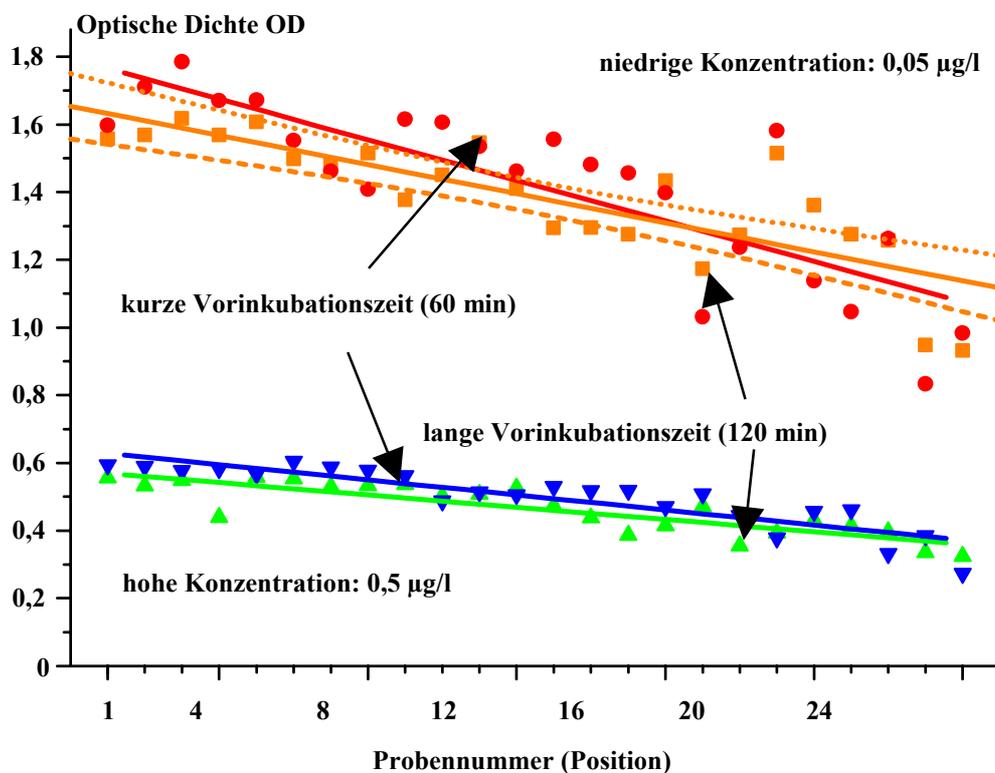


Abb. 17: „Trends“ in der optischen Dichte quer über die Platte, bei unterschiedlichen Vorinkubationszeiten und Konzentrationen (Probennr.: 1 = links oben ... 24 = rechts unten auf der MTP)

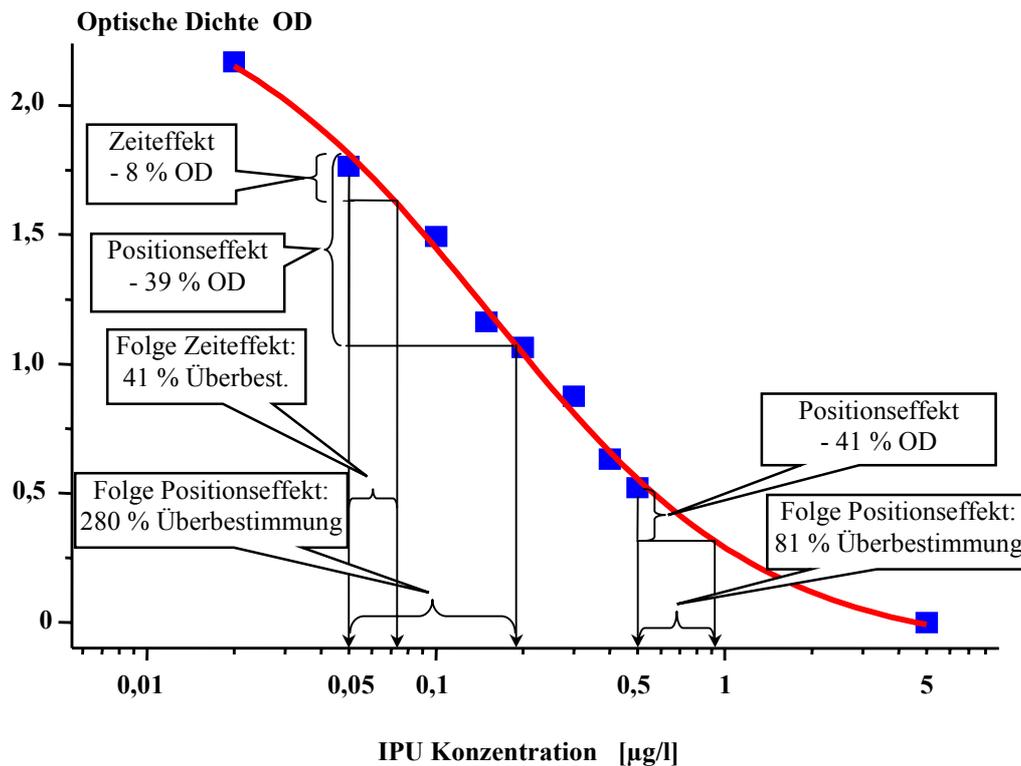


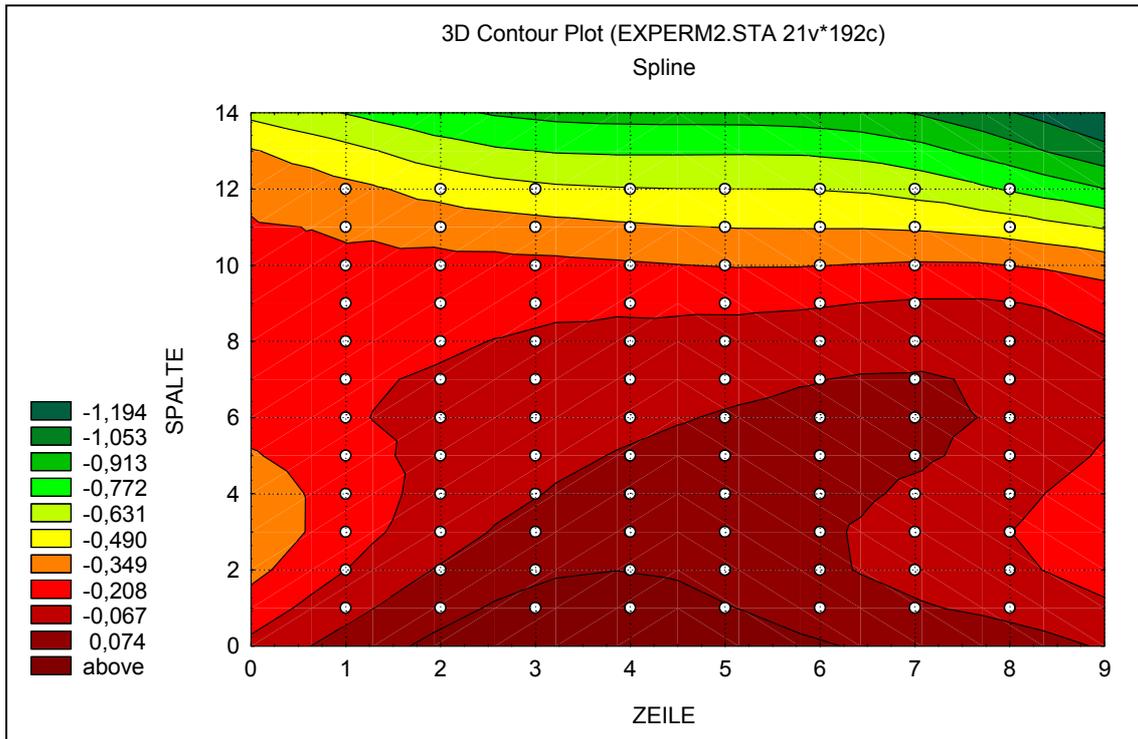
Abb. 18: Auswirkungen von erniedrigtem OD-Wert auf die Konzentration

(Unterschiedliche OD-Werte, wie sie sich aus unterschiedlichen Inkubationszeiten und Auftragspositionen auf der Mikrotiterplatte ergeben, bewirken Überbestimmungen der Isoproturonkonzentration)

4.4.3.2 Experiment „Trend 2“

Im Experiment „Trend 2“ wurden die Auswirkungen der gefundenen geometrischen Wirkungen weiter überprüft. Dazu wurde – insbesondere im Hinblick auf eine mögliche **Korrigierbarkeit** des „Trends“ – der Einfluss der Auftragsrichtung des Tracers (Parameter „TRACERAUFTRAG“) untersucht. In einem ersten Experiment (2 Platten) wurden die Stufen „gedreht/nicht gedreht“ eingeführt. Diese beziehen sich auf die Auftragsrichtung des Tracers, die einmal in der gleichen Richtung wie der Probenauftrag („nicht gedreht“) bzw. entgegengesetzt („gedreht“) erfolgt.

Beim Vergleich der beiden Platten wurde in einem ersten Schritt ohne Berücksichtigung weiterer Einflussfaktoren die Verteilung des Betrags der Messwerte über alle Kavitäten separat für beide Platten untersucht. Lokale Trends wurden hierzu mit einer mathematischen Interpolation („Spline“) in der Art von „Höhenlinien“ sichtbar gemacht (**Abbildung 19 a,b**).



**Abb. 19: Wirkung der Auftragsrichtung auf die Verteilung der Messwerte:
a) „Gedrehte“ Platte**

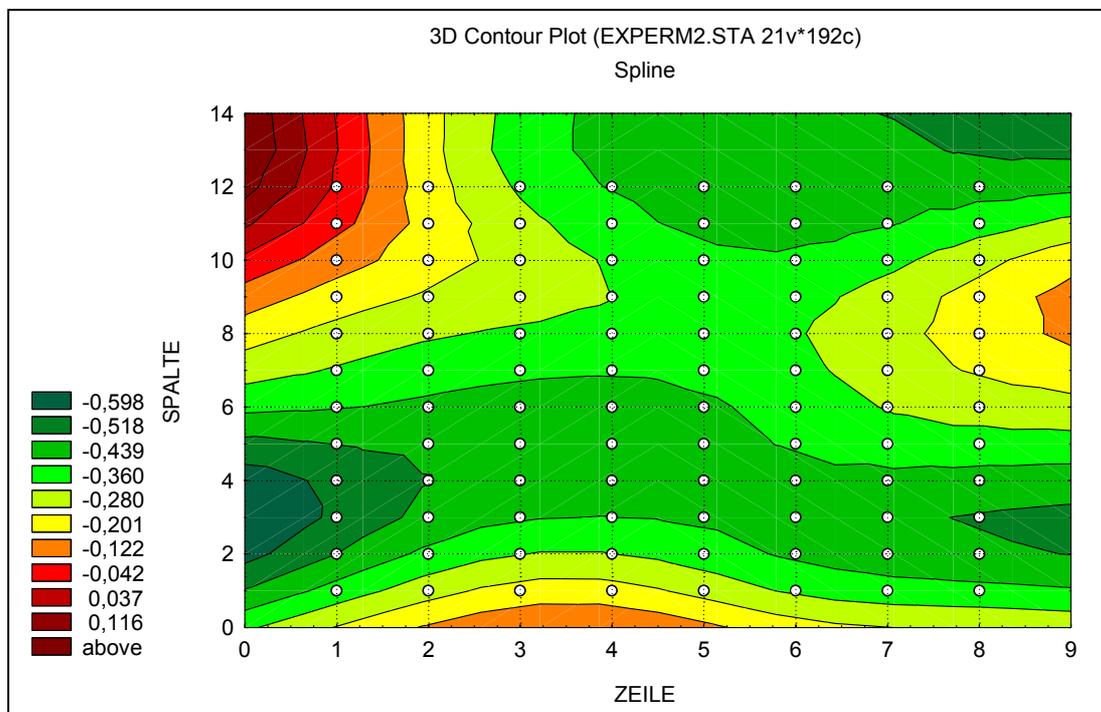


Abb. 19 b: „Nicht-gedrehte Platte“

Die „gedrehte“ Platte zeigte einen deutlichen *Spalteneffekt* (Spalten aufgetragen in y-Richtung), während bei der „nicht-gedrehten“ Platte eine gänzlich andere räumliche Struktur auftrat. Ein einheitlicher Trend war nicht mehr feststellbar. Dies deutet darauf hin, dass der Spaltentrend beim Auftragen des Tracers entgegen der Probenauftragrichtung durch *mindestens zwei Effekte* verursacht sein muss, die sich beim Auftragen von Probe und Tracer in die gleiche Richtung zumindest teilweise kompensieren.

Das Photometer wies keinen Defekt auf. Dies wurde durch Messen, Drehen der Platten und erneutes Messen überprüft. Abweichungen in der Extinktionsmessung, die sich aus der Position der Kavität ergeben könnten, waren stets kleiner 0,4 %.

Fazit:

Die Position einer Kavität hat offenbar zeitunabhängig einen Einfluss auf das Ergebnis.

4.4.4 Faktorengruppe „Temperatur“

4.4.4.1 Faktoren

Zielsetzung des nachfolgend beschriebenen Experiments war es, die ermittelten Positionseffekte zu überprüfen und zugleich deren *Temperaturabhängigkeit* zu erfassen. Der Hersteller gibt an, dass der Test im Bereich 18 – 27 °C validiert ist. Der Versuchsplan sah die Designfaktoren der vorangegangenen Experimente vor und zusätzlich die Parameter der **Tabelle 6**.

Die ersten drei Faktoren lassen mit ihren jeweils 2 Stufen insgesamt 8 Faktorstufenkombinationen zu. Notwendig war die Untersuchung von sieben dieser Kombinationen im Experiment. Eine Kombination konnte aufgrund nicht erfüllter Randbedingungen (Temperatur) bei der Bearbeitung nicht in die Auswertung mit einbezogen werden. Realisiert wurden die Kombinationen hin-hin, her-her, hin-her bei den angegebenen Temperaturen (Labor bzw. Klimakammer). Eine erste Varianzanalyse der logarithmierten OD-Werte unter Einbeziehung aller geometrischen Variablen, der Konzentration, der Zeit, der Richtung des Proben- und Tracerauftrags sowie deren Wechselwirkungen

Tab. 6: Faktoren und Stufen für das Experiment „Temperatur“

FAKTOR	Beschreibung	Parametrisierung	Wert
TEMPERATUR	niedrige bzw.	-1	19 °C
	hohe Raumtemperatur	1	26 °C
PROBEN- AUFTRAG	Auftragungsrichtung Proben hin = von links nach rechts, d.h. Richtung 1 → 12;	1	hin
	her = Richtung 12 → 1	-1	her
TRACER- AUFTRAG	Auftragungsrichtung Tracer hin = 1 → 12, her = 12 → 1	1	hin
		-1	her
PLATTE	Einfluss verschiedener Platten	1 ... 7	1–7

zeigte, dass die Wirkung der KONZENTRATION sowie der TEMPERATUR im Experiment dominieren. Daher wurden in den nachfolgenden Varianzanalysen auch jene zweifaktoriellen Wechselwirkungen berücksichtigt, an denen die Konzentration oder die Temperatur beteiligt sind.

4.4.3.2 Statistische Analyse

Im Folgenden werden die Effekte einzelner Faktoren auf den Extinktionsmesswert und seine Streuung in Graphiken (**Abbildung 20 a – d**) verdeutlicht. Diese zeigen die *Residuen in Abhängigkeit von den vorhergesagten Werten* (Schätzwerte).

A) PLATTE

Bei einer ersten Varianzanalyse dieses Experiments wurde zunächst unterstellt, dass alle Effekte systematischer Natur seien, die sich - bis auf zufällige Abweichungen bei einzelnen Kavitäten - auf jeder einzelnen Platte reproduzieren. Es stellte sich nun die Frage, ob es einen zusätzlichen zufälligen Platteneffekt (PLATTE) gibt. Die Untersuchung dieses Effektes konnte nur in Kombination mit den bereits ermittelten Effekten erfolgen. Hierzu diente eine Varianzanalyse auf der Grundlage eines gemischten Modells, welches zusätzlich zu den systematischen Effekten einen **zufälligen Platteneffekt** einbezieht. Nicht alle Effekte konnten getestet werden, da im Modell zufällige Effekte und

systematische Effekte teilweise vermerkt sind. Für den zufälligen Platteneffekt zeigt sich jedoch auf der Basis von 2 Freiheitsgraden mit einem P-Wert von 0,338 keine Signifikanz. Dies bedeutet, dass in erster Näherung davon ausgegangen werden kann, dass keine plattenspezifischen Unterschiede vorliegen, die nicht bereits durch die vorhandenen Variablen und deren Wechselwirkung erklärbar sind.

Daher wurden die Ergebnisse der Platten für die Analyse zusammengefasst und ein zufälliger Platteneffekt bei weiteren Analysen nicht berücksichtigt.

Fazit:

Der Platteneffekt ist vernachlässigbar.

B) TEMPERATUR

Es bestehen starke Wechselwirkungen der Variablen SPALTE, RAND, VORINKUBATIONSZEIT, PROBENAUFTRAG und TRACERAUFTRAG mit der TEMPERATUR.

Eine höhere Temperatur hat generell beträchtlich höhere Werte der optischen Dichte bei gleicher Konzentration zur Folge (*starker Niveaueffekt*). Die Streuung der optischen Dichte bleibt dabei allerdings unbeeinflusst (*sehr geringer Streuungseffekt*) (**Abbildung 20 a**).

Vernachlässigt man die Kombinationswirkungen von SPALTE und ZEILE mit der TEMPERATUR, so ergibt sich bei einer Standardabweichung der Temperatur von 1 °C ein Wert für die Standardabweichung der Extinktionsmesswerte im Innern der Platten der nicht wesentlich geringer ist als die ermittelte Residualstreuung, was darauf schließen lässt, dass die Temperaturschwankungen eine wesentliche Rolle für die Uncertainty der Ergebnisse spielen.

Fazit:

Die TEMPERATUR ist einer der wichtigsten Parameter für die Uncertainty.

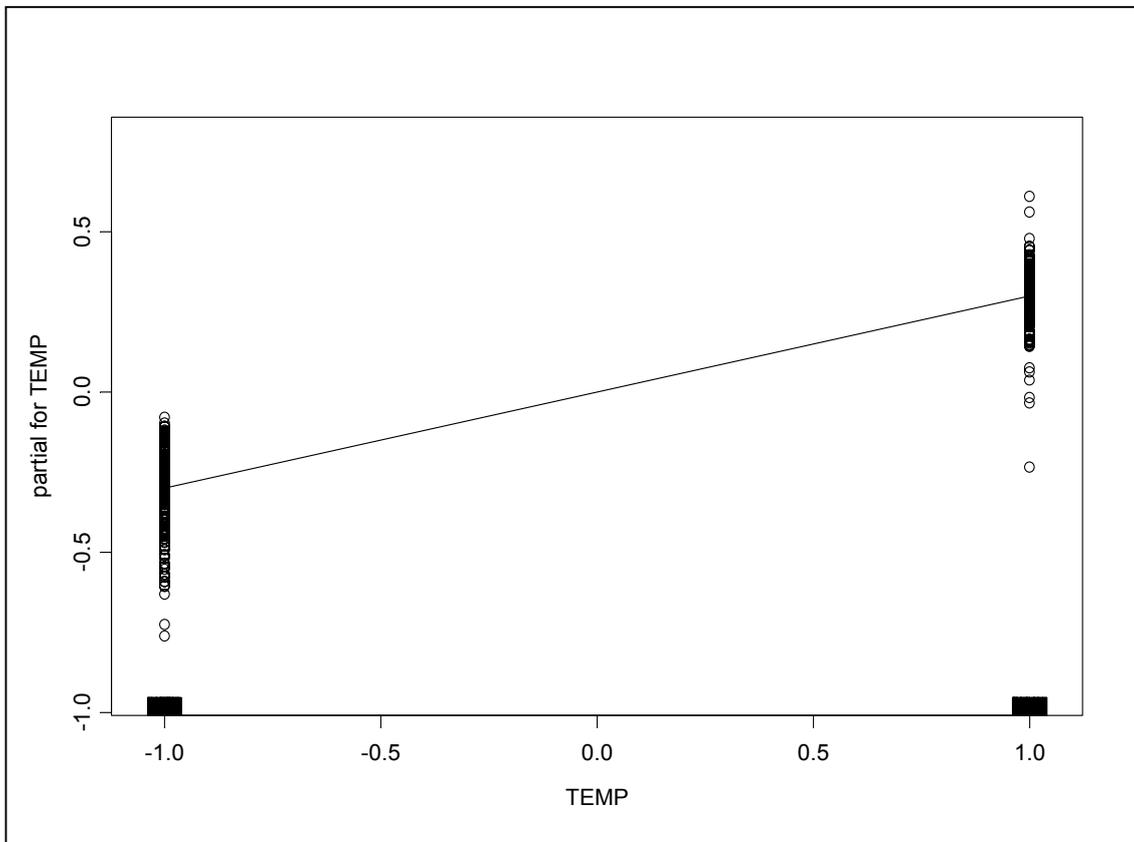


Abb. 20 a: Einfluss der Temperatur (19 °C/21 °C) auf die Messwerte
(Dargestellt ist der Wert und die Streuung der partiellen Residuen der ln(OD)-Schätzwerte)

C) PROBENAUFTRAG

Die Abhängigkeit der partiellen Residuen des Schätzwertes für die Variable PROBENAUFTRAG (Probenauftragsrichtung) als Maß für die Streuung des Ex-tinktionsmesswerts zeigt die **Abbildung 20 b**.

Auf der Stufe -1 („her“) ist die Streuung der Messwerte geringer. Um die Wirkung der Richtung des Probenauftrags auf die Streuung der Residuen zu überprüfen, wurden die Standardabweichung sowie Schiefe und Kurtosis für die entsprechend gruppierten Residuen ermittelt. Es zeigte sich deutlich, dass durch Probenauftrag in der „her“-Richtung eine Reduzierung der relativen Standardabweichung um ca. $1/3$ auf einen Wert von weniger als 8 % erreicht werden kann. Dieser Effekt ist mit einem P-Wert von 0,0017 signifikant.

Die Wirkung der Probenauftragsrichtung ist darüber hinaus auch *temperaturabhängig*.

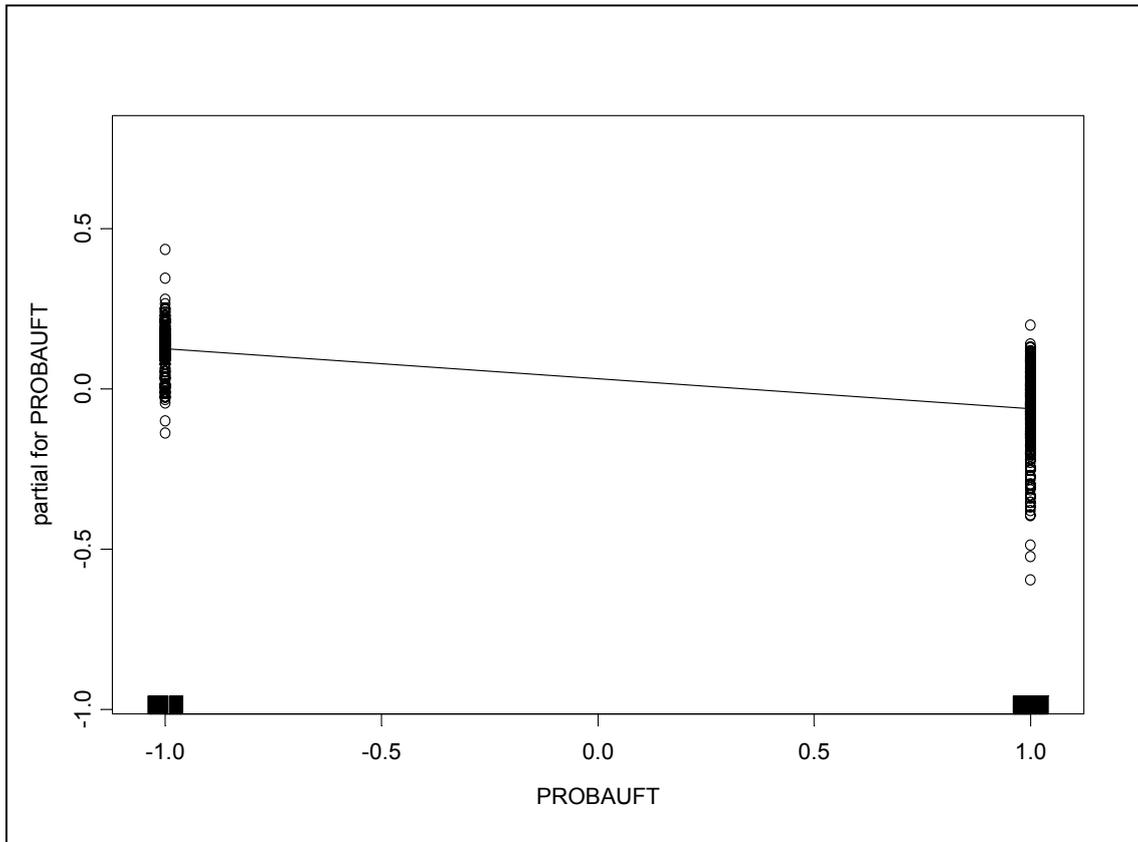


Abb. 20 b: Wirkung der Probenauftragsrichtung (-1: her, +1: hin)
(Dargestellt ist der Wert und die Streuung der partiellen Residuen der $\ln(\text{OD})$ -Schätzwerte)

Fazit:

Der Faktor PROBENAUFTRAG, d.h. die Auftragsrichtung der Proben bezüglich der Plattenorientierung, zeigt deutliche Wirkung bezüglich Niveau und Streuung der partiellen Residuen der Schätzwerte und damit auch auf die Messgröße.

D) TRACERAUFTRAG

Dieser Faktor erwies sich auf dem 1 %-Niveau als nicht signifikant bezüglich seiner Wirkung auf Niveau und Streuung der Messwerte. Eine Wirkung tritt auch innerhalb von Wechselwirkungen mit der Konzentration oder Temperatur nicht in Erscheinung, so dass sie in nachfolgenden Analysen aufgrund der geringen Anzahl verfügbarer Freiheitsgrade nicht mehr berücksichtigt wurde. Gleichwohl ist die **Richtung, in der der Tracer aufgetragen wird für den Spalteneffekt bedeutsam und kann daher bei diesem mit berücksichtigt werden.**

Fazit:

Die Richtung des TRACERAUFTRAGES zeigt keine signifikante Wirkung auf das Ergebnis.

E) RAND

Der Randeffect (also der Einfluss der Lage der Kavitäten – am Rand oder in der Mitte) fiel lediglich durch die ***reduzierte Residualstreuung am Plattenrand*** auf. Dies deutet darauf hin, dass die ***Randkavitäten keinesfalls als unsicher aufzufassen*** sind. (Erklären lässt sich die geringere Streuung am Rand durch die starke Wechselwirkung mit der Temperatur. Temperaturunterschiede haben am Rand eine geringere Wirkung.)

Fazit:

Der Randeffect ist bedeutungslos.

F) ZEILE

Der Faktor ZEILE (d.h. die Abhängigkeit des Ergebnisses von der Lage der Kavitäten auf der MTP, hier der Zeile) war auf dem 1 %-Niveau nicht signifikant. Der Zeileneffekt tritt aber innerhalb von Wechselwirkungen mit der Konzentration oder Temperatur in Erscheinung. Dies bedeutet, dass er bei der Berücksichtigung der Wirkungen der Konzentration und der Temperatur mit berücksichtigt werden kann, da er die Wirkung dieser verstärkt oder schwächt.

Fazit:

Der Zeileneffekt ist im Vergleich zu den anderen Effekten vernachlässigbar.

G) SPALTE

Relevant ist insbesondere der Spalteneffekt (d.h. die Abhängigkeit des Ergebnisses von der Lage der Kavitäten auf der MTP, hier Spalte), der näherungsweise linear ist (**Abbildung 20 c**). Der Effekt kann durch ***Proben- und Tracerauftrag in „her“-Richtung deutlich reduziert*** werden. Wegen der Struktur des effektiven Spalteneffekts ist mit einem sehr geringen Spalteneffekt zu rechnen, wenn die ***Temperatur niedrig*** ist ($\leq 19^\circ\text{C}$). Wenn man jedoch unterstellt, dass die Schwankungen der Temperatur in einem

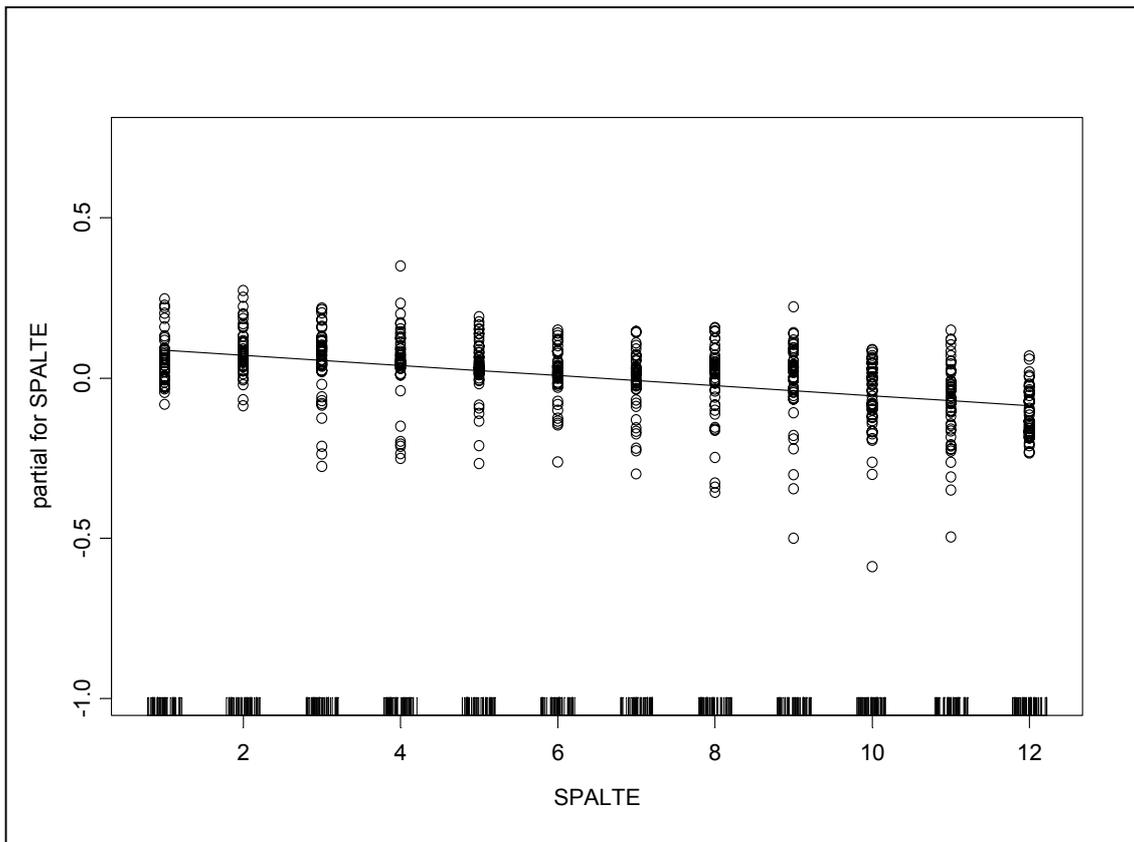


Abb. 20 c: Einfluss der Spalte

(Dargestellt ist der Wert und die Streuung der partiellen Residuen der $\ln(\text{OD})$ -Schätzwerte)

Intervall von $21 \pm 1^\circ\text{C}$ liegen, ergibt sich ein deutlicher Spalteneffekt, der überdies offenbar linear ist. Es erscheint ratsam, vor der Anpassung der Kalibrierfunktion die ermittelten Extinktionsmesswerte entsprechend zu korrigieren.

Für die Berechnung der Probenkonzentration gilt: wenn alle Replikate von Kalibrierlösungen in einer Spalte liegen, genügt es, die Spaltendifferenz zu einer Probe zu ermitteln und den Messwert entsprechend rechnerisch zu anzupassen.

Fazit:

Der Effekt der SPALTE ist offensichtlich linear und daher u.U. korrigierbar.

H) VORINKUBATIONSZEIT

Die Annahme, der Spalteneffekt rührte von unterschiedlichen Vorinkubationszeiten, wurde nicht bestätigt (geringe Wirkung auf Niveau bzw. Streuung) (**Abbildung 20d**).

Fazit:

Die *verschiedenen Vorinkubationszeiten* durch sequentielles Auftragen sind *irrelevant*.

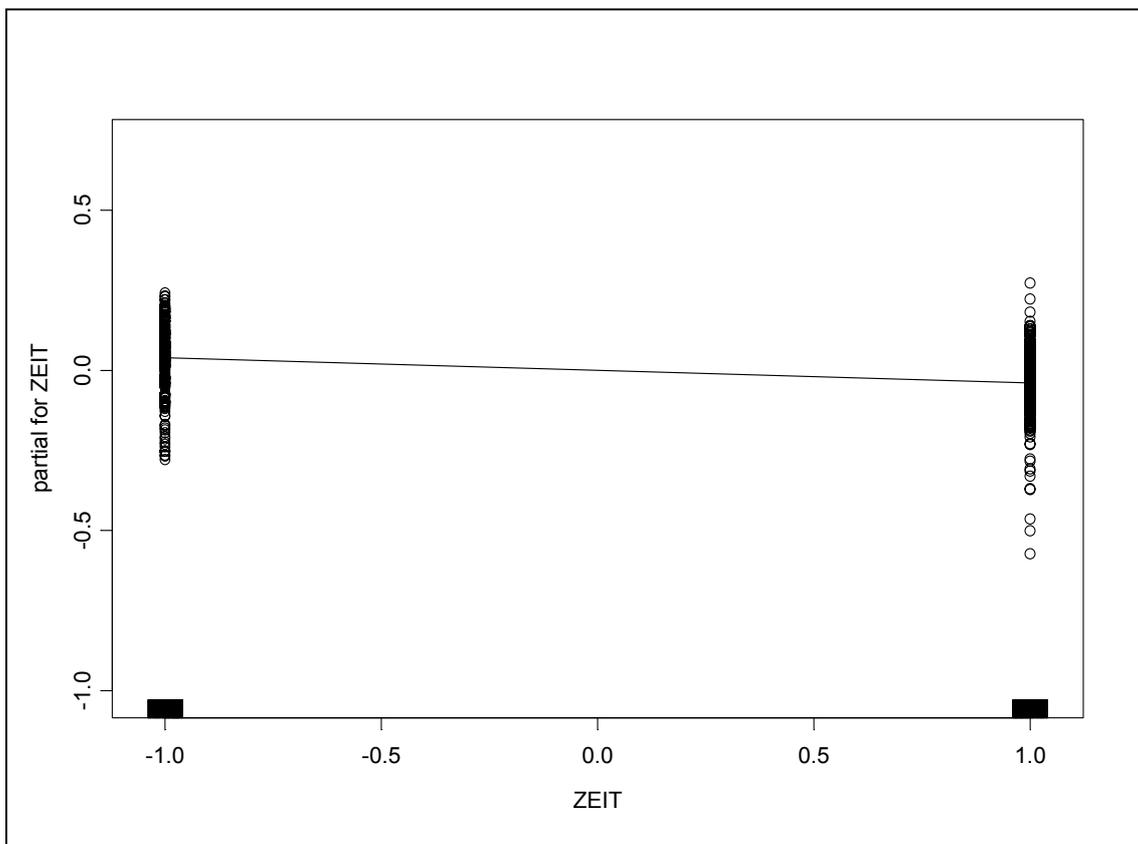


Abb. 20 d: Einfluß der Inkubationszeit (60/120 min)

(Dargestellt ist der Wert und die Streuung der partiellen Residuen der $\ln(\text{OD})$ -Schätzwerte)

I) KONZENTRATION

Hervorzuheben an den Ergebnissen der Varianzanalyse ist weiterhin, dass keinerlei Wechselwirkungen zwischen der Variablen KONZENTRATION und den übrigen Variablen festzustellen war. Dies bedeutet, dass insbesondere der Spalteneffekt, der Randef-

fekt, der Zeiteffekt sowie die Wirkungen, die sich aus der Form des Probenauftrags und Tracerauftrags ergeben, auf der logarithmischen Skala von der Konzentration unabhängig sind.

Fazit:

Die Richtigkeit einer Bestimmung ist nur gering, *die Präzision* überhaupt *nicht konzentrationsabhängig*.

4.4.4.3 Aufstellung und Überprüfung eines Vorhersagemodells

Mit dem Statistikprogramm S-PLUS (Mathsoft International Inc.), auf dessen Basisfunktionen eigene Berechnungsalgorithmen aufgesetzt worden waren, wurden weitere statistische Analysen durchgeführt. Diese führten schließlich zu einem **linearen Regressionsmodell** für die Vorhersage der logarithmierten optischen Dichte (**Gleichung 12, Hinweis: Tabellenform**).

Grundsätzlich sei angemerkt, dass die auf der Basis eines faktoriellen Versuchsplans ermittelte Modellfunktion die Daten nur in einer approximativen Weise reflektiert, wobei möglicherweise einige Aspekte in dieser Modellfunktion noch nicht berücksichtigt sind. So ist zu beachten, dass der Faktor TEMPERATUR nur auf zwei Stufen eingestellt wurde, so dass alle Schlussfolgerungen, die sich auf den Bereich innerhalb dieses Intervalls beziehen, voraussetzen, dass die genannte Modellfunktion auch innerhalb dieses Intervalls linear ist. Diese Annahme bestätigt sich häufig und kann auch theoretisch mittels der Taylor-Formel begründet werden, doch um sicher zu gehen, müssten Experimente auch innerhalb des Temperaturintervalls durchgeführt werden.

Weiterhin sei angemerkt, dass die verwendeten Faktorstufen nicht nur für zwei unterschiedliche Temperaturstufen stehen, sondern auch für zwei unterschiedliche Räumlichkeiten mit unterschiedlicher Feuchte und Luftverhältnissen. Es könnte also sein, dass die im Experiment ermittelten unerwarteten Ergebnisse ein Resultat einer Vermengung der Einflüsse von Temperatur, Temperaturgradient, Luftfeuchte, sonstigen Luftverhältnissen, wie z.B. Luftzug, u.ä. sind.

MODELL**(Gl. 12)**

ln(OD) =

	UNCERTAINTY-KOMPONENTE		KOEFFIZIENT (Gewicht)
	ZEILE	*	- 0,0037
+	SPALTE	*	- 0,0158
+	KONZENTRATION	*	0,5210
+	VORINKUBATIONSZEIT	*	- 0,0389
+	TEMPERATUR	*	0,2997
+	PROBENAUFTRAG	*	- 0,0935
+	TRACERAUFTRAG	*	0,0168
+	RAND	*	0,0561
+	SPALTE x PROBENAUFTRAG	*	0,0006
+	SPALTE x TRACERAUFTRAG	*	- 0,0096
+	KONZENTRATION x TEMPERATUR	*	- 0,0109
+	SPALTE x TEMPERATUR	*	- 0,0075
+	ZEILE x TEMPERATUR	*	0,0058
+	TEMPERATUR x PROBENAUFTRAG	*	0,1165
+	TEMPERATUR x RAND	*	- 0,0457
+	TEMP. x SPALTE x PROBENAUFTRAG	*	- 0,0052
-	0,1505	(Achsenabschnitt)	

Ähnliches gilt auch für den Faktor Richtung des PROBENAUFTRAGs, der in der experimentellen Anordnung mit der Arbeitsrichtung des Washers vermenget ist: es könnte sein, dass die Wirkung dieses Faktors nicht durch die Richtung des Probenauftrags bestimmt ist, sondern durch den Washer. Letzteres wird allerdings als unwahrscheinlich angesehen.

Dennoch wurde hiermit erstmals ein Modell aufgestellt, welches die wichtigsten Einflußfaktoren berücksichtigt. Als empirisches Modell muß es einer Überprüfung unterzogen werden.

Das *Modell* wurde zunächst auf die 6 Datensätze aus dem Experiment „Temperatur“ angewendet. Zuerst wurden die Residuen auf Normalverteilung geprüft (**Abbildung 21**).

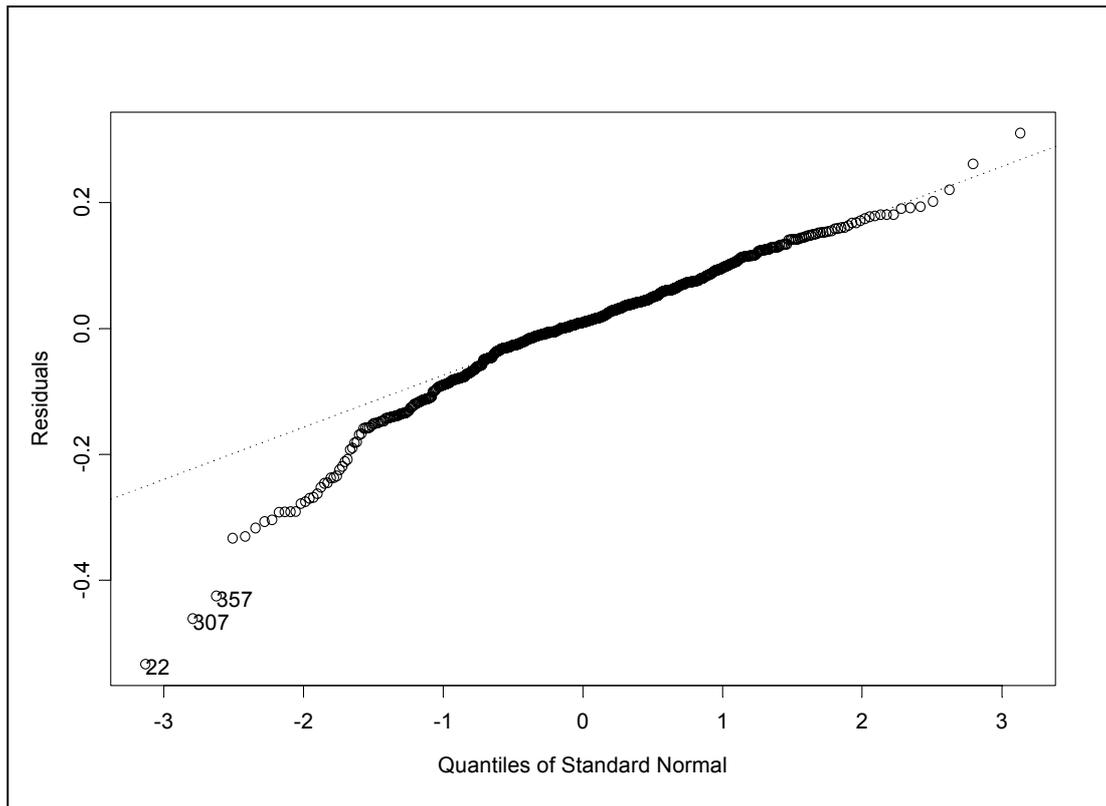


Abb. 21: Normalverteilungsplot für die 6 Platten des Temperaturexperiments

Träfe die Normalverteilungsannahme für die logarithmierten Werte zu, dürften die Werte nur zufällig um die Winkelhalbierende schwanken. **Abbildung 21** zeigt jedoch am unteren Ende der Verteilung eine deutliche Abweichung von der Normalverteilung. Dies kann im Zusammenhang mit einem Heteroskedastieeffekt (eine durch faktorielle Effekte verursachte Inhomogenität der Varianz) stehen, jedoch auch mit dem Umstand, dass eine logarithmische Transformation der Daten nur näherungsweise zur Normalverteilung führt.

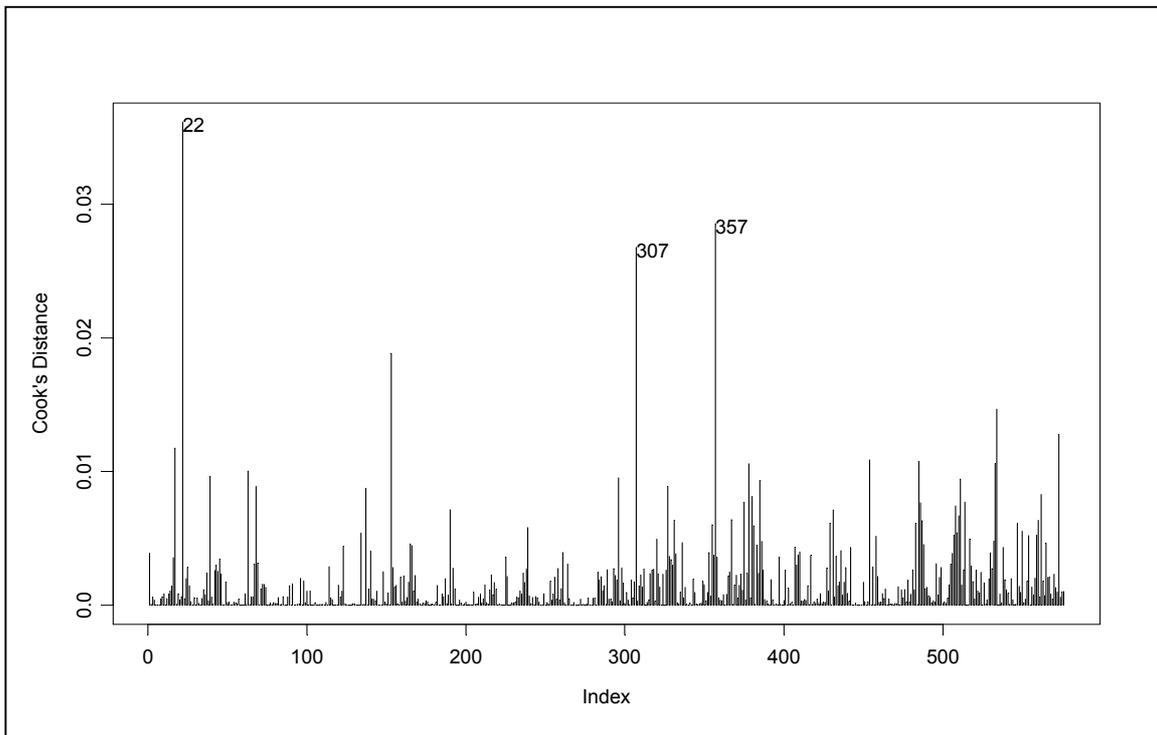


Abb. 22: Cook'sche Distanzmaße zur Ausreisserermittlung

Unter Verwendung des Modells lassen sich über die Bestimmung der Cook'schen Distanzmaße stark abweichende Messwerte lokalisieren (**Abbildung 22**), wodurch Ausreißer eliminiert werden können. Für die vorliegenden 6 Platten erschienen nur 3 Messwerte von unterschiedlichen Platten als Ausreißer. Der direkte Vergleich gemessener und geschätzter Werte zeigt keine Auffälligkeiten (d.h. die Werte korrelieren recht gut) und beweist so die Anwendbarkeit des Modells (**Abbildung 23**).

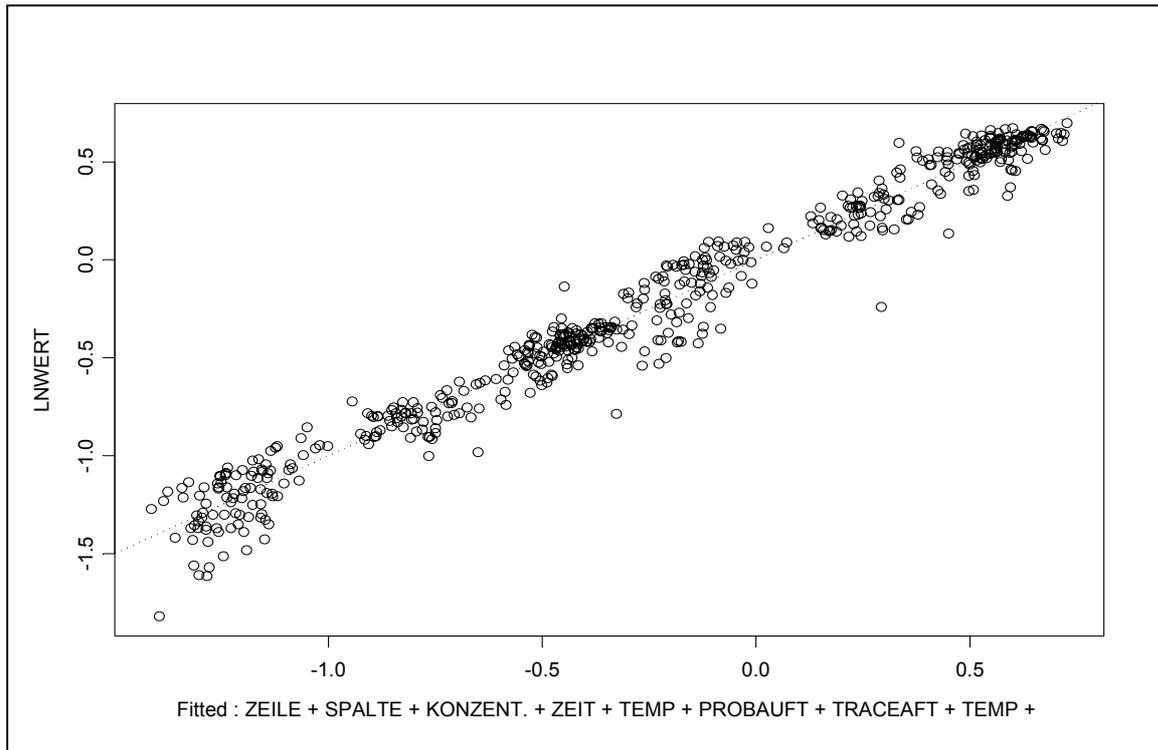


Abb. 23: Korrelation von Messwerten und Schätzwerten nach dem Modell

4.4.4.4 Konfirmationsanalyse

Die im Temperaturexperiment erreichten Residualstandardabweichungen entsprechen im Wesentlichen denen der bisher durchgeführten Experimente. Da diese jeweils auf nur einer Platte durchgeführt wurden, ist die Annahme plausibel, dass *keine wesentlichen zufälligen Platteneffekte* vorliegen. Im Hinblick auf ein plattenübergreifendes Modell stellte sich aber die Frage, ob die ermittelten quantitativen Zusammenhänge auch bei anderen Platten zutreffen. Nur in diesem Falle würde sich eine routinemäßige Korrektur des Spalteneffekts als zweckmäßig erweisen.

Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden die drei Platten der Faktorengruppe „Position“ einer erneuten statistischen Analyse unterzogen, wobei die auf der Basis des Experiments „Temperatur“ ermittelten Parameter verwendet wurden. Da die Temperaturen

bei diesem Experiment nicht genau bekannt waren, wurden sie aus den Messwerten extrapoliert zu 24,4 (Experiment „Trend 1“) und 21,1 °C („Trend 2“).

Auf der Basis dieser Funktion wurden die Messwerte aller 3 Platten unter Verwendung der extrapolierten Temperaturwerte geschätzt. Der Vergleich mit den tatsächlichen Messwerten sollte dann zeigen, ob das Modell tatsächlich plattenübergreifend genutzt werden kann.

Im Streudiagramm (**Abbildung 24**) sind 288 Messwerte den zugehörigen 288 Schätzwerten gegenübergestellt.

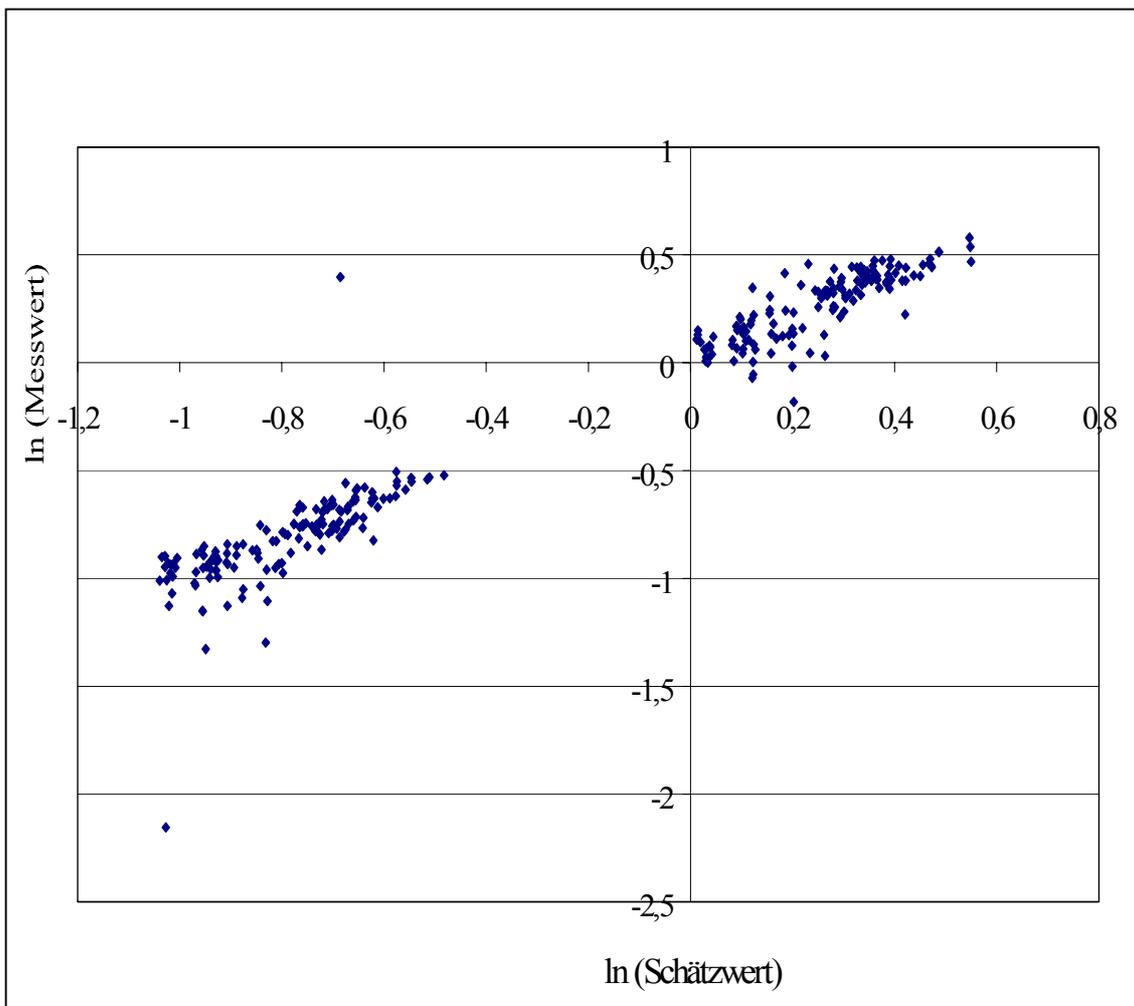


Abb. 24: Vergleich von Mess- und Schätzwerten für 3 Platten

Der Vergleich zeigt eine befriedigende Anpassung, wenn man von zwei stark abweichenden Werten absieht.

Ob das verwendete Modell tatsächlich plattenübergreifend in der betrachteten Charge verwendbar ist, wurde anhand der jeweiligen Residualstandardabweichung überprüft. So sollte die Residualstandardabweichung für die Experimente „Trend 1 und 2“ nicht deutlich größer sein als für das Experiment „Temperatur“. In der **Tabelle 7** sind die Ergebnisse dieser Analyse dargestellt.

Tab. 7: Vergleich der Residualstandardabweichungen der verschiedenen Experimente

Platten	PROBEN- AUFTRAG	TRACER- AUFTRAG	Residual- standardabweichung	
			Experiment Temperatur	Experiment Trend
2,5,8	+1	+1	0,124	0,117
3,6,9	-1	-1	0,078	0,064
4,7,10	+1	-1	0,109	0,084

Die ermittelten Residualstandardabweichungen in den 3er-Plattensets liegen mit Werten von 0,064 bis 0,124 sogar leicht unterhalb dessen, was zu erwarten gewesen wäre. Dies zeigt, dass das Ausmaß der Streuungen offenbar durch das Modell recht gut erfaßt wird. Auch zeigt sich wiederum sehr deutlich, dass die Residualstandardabweichung als Maß für die Streuungen der Messwerte im Verhältnis zu den Schätzwerten von der Art und Weise des Auftrags von Proben und Tracer abhängig ist: bei der Auftragsrichtung -1 des Tracers (entgegen der üblichen Plattenorientierung: „her“), ergeben sich stets Residualstandardabweichungen unter 0,1. Dies gilt ebenso für die Probenauftragsrichtung.

Die Konfirmationsanalyse bestätigte die **Gültigkeit** des auf der Basis des Experiments „Temperatur“ spezifizierten Modells auch für das Experiment „Trend“ ohne Einschränkung. Dies bedeutet insbesondere, dass zumindest für die untersuchte Charge mit hoher Wahrscheinlichkeit von einem **systematischen Temperatur- und Spalteneffekt** (auf die gemessene optische Dichte) ausgegangen werden kann. Somit ist eine **Adjustierung der Messwerte bezüglich des Spalteneffekts sehr ratsam**.

Eine Adjustierung, d.h. Umrechnung der Messwerte bezüglich des Temperatureffekts ist hingegen nicht sinnvoll. Wenn die Temperatur während der Untersuchung konstant gehalten werden kann, ist davon auszugehen, dass Temperaturunterschiede von Platte zu Platte durch die Kalibrierung automatisch berücksichtigt werden. Es ergibt sich daraus allerdings, dass die Platten **unterschiedliche Sensitivität** (Nachweisgrenzen) zeigen.

Fazit:

Es ist von einem **systematischen Trend** der Messergebnisse (optische Dichte) von links nach rechts über die Platte auszugehen. (vermehrt falsch-positive Ergebnisse zur rechten Seite hin). Dieser lässt sich quantifizieren und korrigieren bzw. in einem Validierungsmodell berücksichtigen. Der Trend lässt sich **verringern** durch Pipettieren der Probe und des Tracers in Richtung Spalte 12 → Spalte 1. Dieser Trend wird **beeinflusst durch die Temperatur**. Ein Korrigieren des Temperatureffekts ist aber nicht sinnvoll. Vielmehr lässt sich der Trend durch Arbeiten bei **niedrigeren Temperaturen** (Raumtemperatur ≤ 19 °C) vermindern. Die Temperatur beeinflusst außerdem die Nachweisgrenze (höhere Temperatur \Rightarrow höhere Nachweisgrenze).

4.4.5 Faktorengruppe „Labor und Personal“

4.4.5.1 Faktoren

Nachdem in ersten Experimenten bei einigen Platten auffällig hohe Standardabweichungen der Extinktionsmesswerte und teilweise extrem stark vom Modell abweichende Werte festgestellt wurden, die nicht einer spezifischen Ursache eindeutig zugeordnet werden konnten, wurde entschieden, die für die Faktorengruppe „Labor und Personal“ geplanten Versuche im Umweltbundesamt in Berlin durchzuführen. Dort stand insbesondere ein klimatisierter Raum und ausreichend Personal unterschiedlicher Qualifikation zur Verfügung. Der Wechsel erlaubte es zu prüfen, inwieweit die stark abweichenden Messwerte laborspezifische Ursachen hatten. Es war eine geringfügig andere Ausstattung vorhanden (s. **Abschnitt 3.2**).

Die neuen Faktoren dieses Versuchs waren:

FAKTOR	Stufen
STRESS	„Expertin“ pipettiert sehr schnell (8 Sekunden-Intervall für Pipettierungen) bzw. gemächlich (15 s-Intervall)
OPERATOR	2 Ungeübte, 2 Geübte, 1 Expertin

Zunächst wurden dazu 4 Platten mit einem Pipettierschema in Anlehnung an die **Abbildung 15** bearbeitet. Der Versuchsplan war wieder näherungsweise D-optimal.

4.4.5.2 Statistische Analyse

A) Prüfung auf Verteilung, Ausreißerelimination

Die Ausreißerprüfung lieferte 6 % Ausreißer über fast alle Faktoren und Stufen. Der Median der Betragsresiduen belief sich auf 0,097, und war damit oberhalb dessen, was auf der Basis der Vorexperimente zu erwarten gewesen wäre und dies selbst nach Eliminierung der Ausreißer.

B) STRESS

Da die gefundene hohe Streuung nicht einem einzelnen noch einer Kombination der Faktoren zugeordnet werden konnte, muss davon ausgegangen werden, dass die hohe Variabilität primär andere Ursachen hat. Dabei ist die Annahme plausibel, dass *Störungen* während des Experiments eine wesentliche Ursache gespielt haben.

Tatsächlich traten v.a. am ersten Tag Störungen auf, so dass an diesem Tag auch die Expertin Ausreißerkavitäten pipettierte. Sie führt dies auf die Unruhe durch das neue Raumklima, die Anwesenheit bzw. das Hinzukommen von Personen etc. zurück.

Außerdem wurden am ersten Tag Fehler gemacht, z.B. stand der Schüttler nicht im klimatisierten Raum. Die Störungen wurden als solche erkannt und am zweiten Tag abgestellt, wodurch sich die Qualität der Daten abrupt verbesserte.

Der Faktor STRESS, der im Experiment durch schnelles bzw. langsames Pipettieren definiert war, wurde daher am ersten Tag maskiert durch die zusätzlichen Faktoren, die einen größeren Einfluss hatten.

C) OPERATOR

Ein wichtiger Faktor im Analysenprozess ist das *Personal*. Im allgemeinen ist eine robuste Methode wenig störanfällig gegenüber der unterschiedlichen Erfahrung und Qualifikation des Personals. Daher sollte der Einfluss des Trainingszustands der Testdurchführenden untersucht werden. Gegenübergestellt wurden 3 Gruppen:

- Ungeübte (Personen, die technische Arbeiten im Labor nicht regelmäßig durchführen)
- Geübte (ausgebildete Techniker bzw. Laboranten, die täglich Laborarbeiten durchführen, aber keine Erfahrungen mit Immunoassay besitzen)
- Experten (Immunoassayerfahrung länger als ein Jahr)

Dieses Experiment sollte klären, inwieweit Immunoassays von Laien - wie häufig von den Herstellern propagiert - sicher durchgeführt werden können.

Experte: Für ihn war es leicht, sich schnell in die Anforderungen und Vorgaben des Tests einzuarbeiten. *Stressfaktoren*, die zu Pipettierfehlern führten, waren Arbeiten unter extremen Zeitdruck (Pipettieren im 8-Sekundentakt) sowie Störungen am Arbeitsplatz (Lärm, Ansprechen durch andere Personen, beengter Arbeitsplatz, s.o.). Somit wurde vermutet, dass die messbaren (Pipettiertakt) und zusätzlichen Streßfaktoren mit dem Faktor OPERATOR wechselwirken.

Geübter: Auch die Geübten kamen nach kurzer Erklärung gut mit den Ansprüchen des Tests zurecht. Die Bedienung von Schüttler, Washer und Reader erforderte etwas mehr Zeit und meist auch die Hilfe des Experten. Die Handhabung der Pipetten war nicht ganz so routiniert wie beim Experten, es traten besonders zu Beginn einige Fehler auf. Ebenfalls etwas schwieriger gestaltete sich bei dieser Operatorgruppe die Orientierung auf der gesamten Mikrotiterplatte. Die einzelnen Kavitäten wurden besonders unter Zeitdruck (10-Sekundentakt) nicht so schnell gefunden. Das vorgegebene Pipettierschema konnte jedoch in jedem Fall eingehalten werden. Das Bearbeiten einzelner *Streifen* (s.u.) fiel dieser Gruppe deutlich leichter. Die Stressfaktoren Zeitdruck, Lärm und Ansprechen durch andere Personen treffen ebenso wie beim Experten zu.

Ungeübter: Den Ungeübten fiel besonders die Handhabung der Pipetten sehr schwer, es traten viele Fehler auf. Auf die oben genannten Stressfaktoren reagierten sie besonders empfindlich.

Trotz der hohen Zahl inkonsistenter Ergebnisse wurde versucht, ein möglichst umfassendes Bild von den Wirkungen der untersuchten Einflussfaktoren zu erhalten indem zunächst eine Regressionsanalyse auf der Basis aller Messergebnisse durchgeführt wurde. Ein optischer Vergleich der Residuen vermittelt den Eindruck, dass die Ergebnisse der ungeübten Kräfte weitaus schlechter sind als die der geübten (**Abbildung 25**).

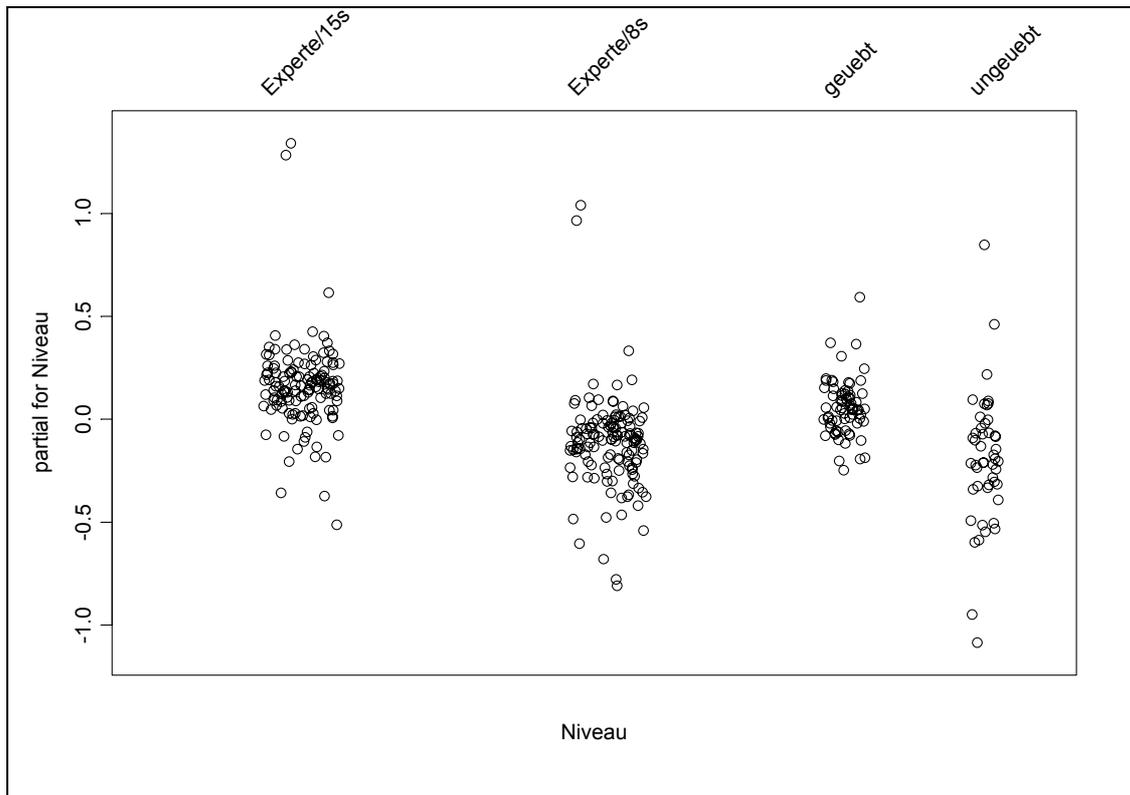


Abb. 25: Streuung der Ergebnisse für Operatoren unterschiedlichen Trainings
 Stufen: Ungeübte, Geübte, Experte/15 sec. = entspannt, Experte/8 sec. = unter Stress

Daraufhin wurde die Analyse ohne die Ergebnisse der ungeübten Kräfte wiederholt. Die Residualstandardabweichungen blieben dennoch auf einem hohen Niveau. Da am ersten Tag eine Reihe von Störungen auftraten, die die Analysenergebnisse beeinflusst haben können, wurde zusätzlich eine Regressionsanalyse ohne die ungeübten Kräfte nur unter Einbeziehung der Resultate vom zweiten Tag durchgeführt. Ausreißer fielen im Normalplot der Residuen nun nicht mehr auf.

Fazit:

Der Einfluss des Testdurchführenden ist groß, Übung macht sich stark bemerkbar.

4.4.6 Faktorengruppe „Arbeitsweise“

4.4.6.1 Faktoren

Die neuen Faktoren dieses Versuchs waren:

FAKTOR	Stufen
STREIFEN	Platte in Streifen, randomisiert Platte komplett
PIPETTE	Tropffläschchen Mikroliterpipette
WASHER	Waschen mit Leitungswasser durch Befüllen/Entleeren bzw. mit automatischem Waschgerät
PROBEN- VORBEHANDLUNG	gekühlt ja/nein, erhitzt ja/nein filtriert ja/nein

Es wurden 8 Platten entsprechend dem Pipettierschemata aus **Abbildung 29 a/b** (s.u.) bearbeitet. Die Proben wurden in zwei Gruppen (mit Matrix/ohne Matrix) unterteilt

- ohne Matrix: Reinstwasser-, Quell- und Trinkwasserproben
- mit Matrix: Proben aus Talsperren, Bächen, Flüssen

A) STREIFEN

Die Mikrotiterplatte des verwendeten Isoproturon-Testkits besteht aus 8 Streifen zu je 12 Kavitäten, die sich leicht aus dem Rahmen herausnehmen lassen. Da Streifen einfacher und schneller zu bearbeiten sind, könnte die Teilbearbeitung einer Platte (in Streifen) zu einer Verbesserung bezüglich der Richtigkeit und Präzision der Bestimmung führen. Eine weitere Besonderheit ist, dass bei Arbeitsweise „in Streifen“ stets zeilenweise pipettiert wird. Bisher wurde spaltenweise aufgetragen.

Ein Nachteil der Arbeitsweise „in Streifen“ besteht darin, dass diese beim Trockenschlagen der Platte nach dem Waschen leicht aus dem Rahmen herausfallen können.

B) PIPETTE

Das Arbeiten mit Pipette wurde im Vergleich zur Verwendung der Tropffläschchen untersucht. Dazu vorweg einige Beobachtungen:

Mikroliterpipette: Die Mikroliterpipette erschien gut geeignet für das Pipettieren der Proben und Standards, jedoch kann es auch hier zu Spritzern und damit Verunreinigungen anderer Kavitäten kommen. Proben lassen sich leichter pipettieren, wenn sie zuvor *filtriert* (s.u.) werden.

Tropffläschchen: Die Tropffläschchen waren ungeeignet für das Pipettieren der Standards und auch der anderen Lösungen. Zum einen waren die Tropfen aus den Tropffläschchen zu groß, um die kleinen Kavitäten damit genau in der Mitte zu treffen. Das führte häufig dazu, dass die Tropfen halb über den Rand der Kavität oder ganz daneben liefen. Ein weiteres Problem bestand darin, dass sich die Tropfen nur sehr schlecht abzählen und in der gewünschten Anzahl abgeben ließen. So passierte es, dass entweder zu viele oder zu wenige Tropfen dosiert wurden.

C) WASHER

Die Verwendung eines automatischen Mikrotiterplatten-Waschgerätes („Washer“) wurde dem manuellen Waschen durch Befüllen und Ausgießen gegenübergestellt.

D) PROBENVORBEHANDLUNG

Um die Robustheit des Messverfahrens zu testen wurden identische Teilproben eingefroren oder auf 30 °C über Nacht erhitzt oder vor der Analyse filtriert.

4.4.6.2 Statistische Analyse

Die statistische Analyse der 4 Platten des Experiments zeigte, dass die Verwendung eines Tropffläschchens eine etwas höhere Streuung der optischen Dichte verursacht als eine Mikroliterpipette. Der Unterschied ist mit einem P-Wert von 0,087 allerdings nicht signifikant, deckt sich aber mit dem subjektiven Eindruck der Bearbeiter, dass die Tropffläschchen hinsichtlich der pipettierten Menge als ungünstiger zu beurteilen sind.

Aus der Differenz der Residualvarianzen erhält man für das Tropffläschchen eine zusätzliche Uncertainty-Komponente in der Form einer Standardabweichung der logarithmierten Extinktion von 0,116. Dieser Wert ist allerdings aufgrund der statistischen Ungenauigkeit nur als Anhaltspunkt zu verstehen.

Die Residuen, die auf der Basis der oben dargestellten Auswertungen ermittelt wurden, wurden einer weiteren Auswertung unterzogen, um festzustellen, ob die übrigen in den Experimenten berücksichtigten Faktoren einen Einfluss auf die Streuung der Analyseergebnisse haben. Mit einem einfachen additiven Modell auf Basis der vierten Wurzel der quadrierten Residuen (d.h. der Quadratwurzel der Betragsresiduen), für die näherungsweise Normalverteilung unterstellt werden kann, ergab sich, dass bei Anwendung eines **WASHERS** und Verwendung von **STREIFEN** mit einer signifikanten Verringerung der Streuung der OD-Messwerte zu rechnen ist, während die Art der **PROBENVORBEHANDLUNG** ohne Wirkung auf die Streuung ist. Auffällig ist auch in diesem Experiment, dass auch hier der *Experte* signifikant bessere Resultate produziert als die *geübten* Operatoren. Eine Wechselwirkung der Effekte von **STREIFEN** und **WASHER** erwies sich als nicht signifikant. Die Verwendung einer **PIPETTE** ist zu empfehlen; dies wurde aber statistisch nicht abgesichert.

Die **Abbildung 26** zeigt die Korrelation zwischen Modell und Beobachtung (Messwert) als sog. Normalplot der Residuen. Die gute Übereinstimmung bestätigt auch in diesem Experiment die Zulässigkeit der Verwendung des aufgestellten Modells.

Um nicht nur Streuungseffekte, sondern auch Lokationseffekte, d.h. systematische Verschiebungen der OD-Messwerte nach oben oder unten feststellen zu können, wurden weitere statistische Analysen durchgeführt.

Es waren aber weder für jene Faktoren, die nicht zwischen den Platten, sondern innerhalb der Platten variiert wurden (**PROBENVORBEREITUNG**), noch für die bezüglich einer ganzen Platte bzw. Plattenhälfte wirksamen Faktoren **OPERATOR**, **WASHER** und **STREIFEN** Lokationseffekte signifikant nachweisbar. Daraus folgt allerdings nur, dass mögliche Wirkungen der genannten Faktoren von der Variabilität innerhalb bzw. zwischen den Platten überdeckt werden.

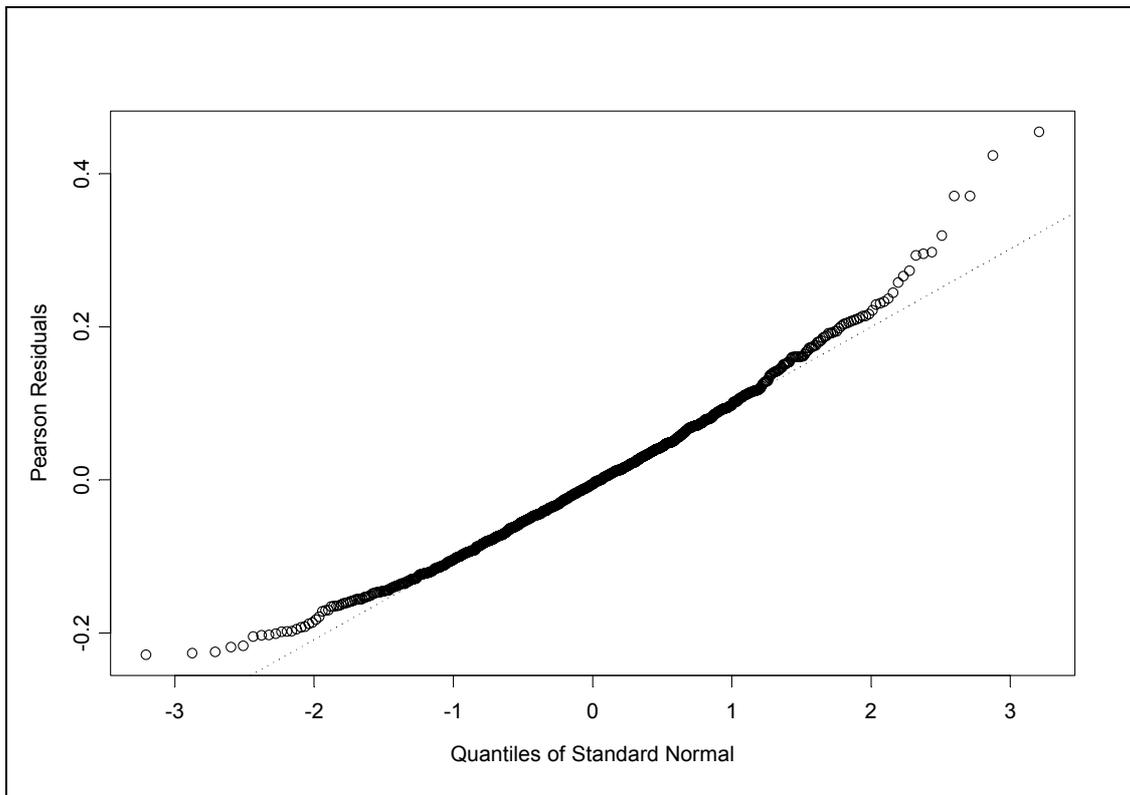


Abb. 26: Normalplot der Residuen zur Prüfung der Übereinstimmung von Modell und Realität bei den Experimenten zur Arbeitsweise

4.4.7 Gewichtung der Uncertainty-Faktoren

Die Experimente hatten gezeigt, dass eine Reihe von Faktoren existiert, welche die Uncertainty beeinflussen. Hierzu gehören die TEMPERATUR, die Ortsabhängigkeit des Ergebnisses („Spalteneffekt), die Erfahrung des OPERATORS, der Einsatz eines WASHERS und einer PIPETTE.

Um zu Maßzahlen für die Streuung zu gelangen, wurde über die Platten der Experimente „Labor und Personal“ und „Arbeitsweise“ gemittelt und die Ergebnisse aus den Experimenten „Trend“ und „Temperatur“ einbezogen. Daraus wurden die Standardabweichungen für die logarithmierte Messgröße (optische Dichte OD) als Schätzwert für die Konzentration ermittelt.

Bei Mittelung über die Platten, die nicht in Streifen geteilt wurden, errechnet sich eine Standardabweichung für $\ln(\text{OD})$ von 0,097, die allein durch den *Spalteneffekt* bewirkt wird (bei zufälliger Auswahl aus den 12 Spalten).

Für den *Temperatureffekt* ermittelt man auf der Basis des Temperaturexperiments den Wert 0,36 (in der Plattenmitte, bei Probenaufrag in hin-Richtung), wobei die Temperaturstufen bei 19 und 26 °C liegen. Dies bedeutet, dass je Grad Celsius die logarithmierte optische Dichte um 0,1 ansteigt. Wenn also die Standardabweichung der Temperatur bei 2 °C liegt, ergibt sich eine Variabilität der logarithmierten optischen Dichte von 0,2.

Die einzelnen Standardabweichungen für $\ln(\text{OD})$ addieren sich mit ihren Quadraten (*Gauß'sche Fehlerfortpflanzung*, vgl. z.B. ROHRER UND WEGSCHEIDER 1994), so dass sich in Kombination die Werte in **Tabelle 8** ergeben.

Die Ergebnisse sollten *v.a. in Relation zueinander gesehen* werden. Außerdem unterliegen sie teilweise erheblichen Zufallsschwankungen, welche die statistische Signifikanz beeinflussen können. So ist beispielsweise der Einsatz von Streifen unter den spezifischen Laborbedingungen, wie sie in Berlin geherrscht haben, offensichtlich etwas weniger fehlerträchtig, als wenn ganze Platten eingesetzt werden.

Fazit:

Anhand von **Tabelle 6** können für die als Hauptfaktoren der Messwertunsicherheit erkannten Einflüsse OPERATOR, WASHER, TEMPERATUR, SPALTE, PIPETTE folgende Aussagen abgeleitet werden:

- Die Streuung von $\ln(\text{OD})$ verdoppelt bis verdreifacht sich, wenn die Temperaturschwankung 3 °C statt 1 °C beträgt.
- Die Streuung des $\ln(\text{OD})$ ist bei Verwendung eines Tropffläschchens mehr als dreimal so groß wie bei Pipettierung mit einer Mikroliterpipette
- Der Einfluss des Washers ist deutlich, aber geringer als bei den anderen Faktoren (Faktor 1,3 – 2 für $\ln(\text{OD})$).

- Durch Berücksichtigung der Position der Probe (SPALTE) und rechnerische Korrektur, kann der $\ln(\text{OD})$ um bis zu 50 % erniedrigt werden.
- Der Experte erzielt beim Arbeiten in einem thermostatisierten Raum und bei Verwendung eines Wahers einen annähernd zehnmal geringere Streuung für $\ln(\text{OD})$ als ein Geübter unter nicht optimalen Laborbedingungen.

Tab. 8: Kombination von Uncertainties und resultierende Streuungen

Szenario	Experte	Washer und Streifen	Standardabw. der Temperatur in °C	Spalteneffekt berücksichtigt	Pipette	Std.abw. von $\ln(\text{OD})$
1	ja	ja	0	ja	Mikroliterp.	0,036
2	nein	ja	0	ja	Mikroliterp.	0,113
3	ja	nein	0	ja	Mikroliterp.	0,076
4	ja	ja	1	ja	Mikroliterp.	0,106
5	ja	ja	3	ja	Mikroliterp.	0,302
6	ja	ja	0	nein	Mikroliterp.	0,102
7	ja	ja	0	ja	Tropffl.	0,116
8	nein	nein	1	nein	Mikroliterp.	0,171
9	nein	nein	3	nein	Mikroliterp.	0,331

In dieser Weise ergeben sich wichtige Anhaltspunkte für die Größenordnung der Uncertainty der aufgelisteten Faktoren.

4.5 Realproben

Ziel der Realprobenexperimente war

- die Überprüfung möglicher Matrixeffekte
- die weitere Abschätzung von Fehlerkomponenten der Kalibrierfunktion (Inter-Platten-Variabilität)
- die Überprüfung der in den Experimenten zu den Faktorengruppen festgestellten Effekte, insbesondere des Spalteneffekts unter Anwendung des erstellten Modells
- Ermittlung der Isoproturongehalte der Realproben und Vergleich mit Ergebnissen von HPLC-Analysen.

4.5.1 Realprobenexperiment I

4.5.1.1 Pipettierschema

In diesem Experiment wurden insgesamt 14 Wasserproben (siehe **Tabelle 10**) im Originalzustand sowie auf 4 Konzentrationsniveaus aufgestockt, untersucht: x , $x + 50$, $x + 140$, $x + 320$ und $x + 410$ ng/l. Die Schätzung der nichtlinearen Kalibrierfunktion erfolgte anhand von 7 Standardkonzentrationen. Negativkontrollen (a: aus dem Testkit, b: Reinstwasser), über die Platte verteilte Kontrollproben (Konzentration 0,1 µg/l, 6-mal) sowie die Kitstandards wurden ebenfalls mitgeführt.

Hierzu wurde ein Pipettierschema erstellt, bei dem wie in den vorangegangenen Experimenten die Befüllung der Kavitäten spaltenweise erfolgt, um einen hohen Grad der Vergleichbarkeit zu gewährleisten. Dabei wurden jeweils zwei der vier Replikate eines Standards oder einer Realprobe in der gleichen Spalte (untereinander) angeordnet. Aus statistischer Sicht hat dieses Vorgehen den Vorteil, dass die Streuung innerhalb einer Doppelbestimmung in benachbarten Kavitäten sowie zwischen Doppelbestimmungen in entfernteren Kavitäten ermittelt werden kann. Da ein Zeileneffekt nicht ausgeschlossen werden konnte, sollten die Konzentrationsstufen der Standards nicht mit den Zeilen korreliert sein. Daher wurden die Niveaus der Standards und der dotierten Proben randomisiert. Das vollständige Pipettierschema hat folgende Form (**Abbildung 27**):

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	K 3	S 2	P A3	P A2	K 2	N B	K 3	S 2	P A3	P A2	K 2	N B
B	K 3	S 2	P A3	P A2	K 2	N B	K 3	S 2	P A3	P A2	K 2	N B
C	S 3	<i>S 4</i>	P A1	P A4	P B3	<i>S 4</i>	S 3	<i>S 4</i>	P A1	P A4	P B3	<i>S 4</i>
D	S 3	<i>S 4</i>	P A1	P A4	P B3	<i>S 4</i>	S 3	<i>S 4</i>	P A1	P A4	P B3	<i>S 4</i>
E	S 7	S 1	P A5	<i>S 4</i>	P B1	P B2	S 7	S 1	P A5	<i>S 4</i>	P B1	P B2
F	S 7	S 1	P A5	<i>S 4</i>	P B1	P B2	S 7	S 1	P A5	<i>S 4</i>	P B1	P B2
G	S 5	S 6	K 1	N A	P B5	P B4	S 5	S 6	K 1	N A	P B5	P B4
H	S 5	S 6	K 1	N A	P B5	P B4	S 5	S 6	K 1	N A	P B5	P B4

Legende:**Grossbuchstabe = Art der Lösung****Zusatz A,B****Ziffern = Konzentrationsniveau**

S = Standard (*kursiv als Positivkontrolle*), P = Probe,
 K = im Kit mitgelieferte Standards, N = Negativkontrolle
 Bei Proben: A = 1. Probe, B = 2. Probe
 Bei Negativkontrollen: A = aus Kit, B = Reinstwasser
 Bei Standards: 1 = 0,0001 µg/l, 2 = 0,001, 3 = 0,01, 4 = 0,1,
 5 = 1, 6 = 10, 7 = 100 µg/l
 Bei Kitstandards: 1 = 0,05, 2 = 0,2, 3 = 0,5 µg/l
 Bei Proben: 1 = 0 ng/l (undotiert), 2 – 5 dotiert:
 2 = + 50 ng/l, 3 = + 140, 4 = + 320 ng/l, 5 = + 410 ng/l

Abb. 27: Pipettierschema des Realprobenexperiments I

Bei diesem Pipettierschema entspricht die Anordnung der Proben auf der rechten Hälfte der Platte exakt der Anordnung auf der linken. Dies hat zur Folge, dass auf der linken Seite in Randkavitäten pipettierte Proben (z.B. S3) sich auf der rechten Plattenhälfte im Innern der Platte befinden (Position C7 und D7). Dadurch wird eine Aussage über den Einfluss der Probenposition auf das Analyseergebnis bei den verschiedenen Probenarten möglich.

Es wurde stets von A1 nach H12 (Standards, Proben, Negativkontrollen, Tracer) jeweils im 10 Sekunden-Takt pipettiert. Die Raumtemperatur wurde möglichst konstant gehalten und betrug ca. 20 °C.

4.5.1.2 Statistische Analyse der Kalibrierung

A) KALIBRIERSTANDARD

Um zu erfassen, welche Gestalt sich für die Kalibrierkurven einer Platte mit diesem Auftragungsschema ergibt und mit welcher Variabilität bei diesem Experiment zu rechnen ist, wenn nur die Standards berücksichtigt werden, wurden zunächst nur jene 36 Kavitäten jeder Platte in die Auswertung einbezogen, welche mit einer Laborstandardlösung (Felder „S“) befüllt worden waren (7 Konzentrationsstufen). Die Berechnung der Kalibrierkurve wurde mittels nichtlinearer Regression durchgeführt. Hierzu wurde das Programm SPLUS™ verwendet, welches eine standardisierte Darstellung der Kalibrierfunktion und ihrer Parameter b_1 , b_2 , b_3 , b_4 vorsieht:

$$\ln(\text{OD}) = \ln\left(b_1 + \frac{1}{b_2 + b_3 * \text{Konzentration}^{b_4}}\right) \quad (\text{Gl. 13})$$

Diese weicht von der üblicherweise verwendeten Darstellung mit den vier Parametern A, B, C, D (vgl. **Abschnitt 4.1.1**) ab, kann jedoch leicht in diese umgerechnet werden. In der Formel steht $\ln(\text{OD})$ für die logarithmierte optische Dichte (Signal, Messwert). Da die Logarithmierung auf beiden Seiten vorgenommen wurde, könnte man aus algebraischer Sicht darauf verzichten. Aus statistischer Sicht erweist sich die Logarithmierung jedoch als erforderlich, **um für die Regressionsrechnung annähernd homogene Varianzen über den gesamten Konzentrationsbereich zu gewährleisten.**

Anhand der logarithmierten OD-Werte wurden die Residualstandardabweichungen ermittelt. Bei Einbeziehung der **Kitstandards** und der Negativkontrollen in die Analyse war eine **deutliche Verschlechterung der Residualstandardabweichung** festzustellen, ein Ergebnis, das die systematischen Untersuchungen in **Abschnitt 4.4.2.2** bestätigt. Die Residualanalyse ergab insbesondere bei den Kitstandards eine erhebliche systematische Überhöhung der Residuen, was darauf hindeutet, dass in den Kitstandards höhere Isoproturonkonzentrationen vorliegen als angegeben. Versucht man diese im Modell zu berücksichtigen, liegt die resultierende Residualstreuung immer noch ca. 8 % höher als im Falle ohne Kitstandards. Daher wurde im folgenden auf die Einbeziehung der Kitstandards und der Negativkontrollen verzichtet.

Fazit:

Die mitgelieferten Kitstandards sind für eine Kalibrierung nicht zu empfehlen.

B) SPALTE

Es zeigte sich, dass ein *linear wirksamer Einfluß der Position der Probe, insbesondere der Spalte der Auftragung bei allen Platten statistisch signifikant* war. Dies ist in **Tabelle 9** für die Bonner Realprobenplatten zusammengefasst:

Tab. 9: Positionseffekte (Spalte) in den Platten des Realprobenexperiments I

Platte	1	2	3	4	5	6	7
t-Wert von SPALTE	5,3	3,1	2,2	5,1	5,5	11	3,3
Wert von SPALTE bzgl. OD	-0,017	-0,008	-0,007	-0,006	-0,010	-0,014	-0,019
Wert von SPALTE [%] bzgl. OD von Spalte 1 bis 12	18	8,9	7,8	7,1	11	15	20
Verringerung der Residualstd.abw. bei Berücksichtigung von SPALTE [%] #	8,4 ↓ 6,2	5,7 ↓ 5,1	26 ↓** 10	5,7 ↓** 4,0	7,0 ↓** 5,7	5,7 ↓** 3,9	19 ↓** 4,1

#Bei den mit ** gekennzeichneten Werten (Platten 3 – 7) wurde zusätzlich eine Ausreißerelimination durchgeführt.

Die **Tabelle 9** gibt die Signifikanz des Spalteneffekts, d.h. die Abhängigkeit des Ergebnisses vom Ort der Auftragung (hier: von der Spalte, in der aufgetragen wurde), auf allen 7 Platten wieder (t-Werte). Der Parameterwert bezüglich der optischen Dichte ist darunter angegeben. Innerhalb der 12 Spalten verstärkt sich der Wert zu einer prozentualen Erniedrigung des OD-Wertes zwischen 7,1 und 20 Prozent (4. Zeile der Tabelle). Berücksichtigt man hingegen den „Spalteneffekt“ im Modell, so kann eine erhebliche Verringerung der Residualstandardabweichung des Datensatzes erreicht werden.

Der *Spalteneffekt* für die Kalibrierlösungen muß also mathematisch *im Modell berücksichtigt* werden. Dies ergibt für die **Gleichung 13** noch einen zusätzlichen Parameter SPALTE und einen Koeffizienten b_5 . Damit lautet das allgemeine *Kalibriermodell*:

$$\ln(\text{OD}) = \ln(b_1 + 1/(b_2 + b_3 * (\text{Konzentration})^{b_4})) + b_5 * \text{SPALTE} \quad (\text{Gl. 14})$$

Die Faktoren $b_1 - b_5$ müssen dabei durch nichtlineare Regression aus den Kalibrierdaten bestimmt werden. SPALTE ist die Nummer der Spalte, in der sich die betreffende Kalibrierlösungs- bzw. Probenkavität befindet.

4.5.1.3 Auswertesystem für Realproben des Experiments I

Die Ermittlung unbekannter Konzentrationen mit dem o.g. Kalibriermodell kann über das Auflösen der Gleichung geschehen:

$$\text{OD} = \exp(\ln(b_1 + 1/(b_2 + b_3 * \text{Konzentration}^{b_4}))) * \exp(b_5 * \text{SPALTE}) \quad (\text{Gl. 15})$$

$$b_1 + 1/(b_2 + b_3 * \text{Konzentration}^{b_4}) = \text{OD} / \exp(b_5 * \text{SPALTE}) \quad (\text{Gl. 16})$$

$$b_2 + b_3 * \text{Konzentration}^{b_4} = 1 / (\text{OD} / \exp(b_5 * \text{SPALTE}) - b_1) \quad (\text{Gl. 17})$$

Schließlich erhält man:

$$\text{Konzentration} = ((1 / (\text{OD} / \exp(b_5 * \text{SPALTE}) - b_1) - b_2) / b_3)^{1/b_4} \quad (\text{Gl. 18})$$

Bei Verwendung dieser durch Invertierung des Modells erhaltenen Beziehung kommt es allerdings aufgrund des Gültigkeitsbereichs der Exponentialfunktion vor, dass sich nicht definierte Resultate ergeben. Man setzt dann für Werte oberhalb der Kalibrierkurve (OD größer als obere Asymptote) den Wert Konzentration = 0, für Werte unterhalb der Kalibrierkurve Konzentration $\rightarrow \infty$.

Aus dem Blickwinkel der Statistik ist es jedoch zweckmäßiger, sowohl die Ergebnisse der dotierten als auch der nichtdotierten Realproben in angemessener Weise zu kombi-

nieren und die Werte für die Probenkonzentrationen über *nichtlineare Regressionsanalyse* unter Verwendung des Prinzips der kleinsten Quadrate zu ermitteln.

Die Auswertung der ersten Realprobenplatten wurde in zwei Schritten vorgenommen. Zunächst wurde anhand der Standards die Kalibrierfunktion ermittelt, bevor in einem zweiten Schritt auf der Basis dieser Kalibrierfunktion aus den dotierten und undotierten Realproben die IPU-Konzentrationen ermittelt wurden.

Im Folgenden wird auf einzelne Besonderheiten bzw. Schwierigkeiten eingegangen.

a) Unterschiedliche Streuung bei Standards und Proben

Die Streuung der Residuen war bei einer Platte im Fall der Proben signifikant höher als im Fall der Standards, was die Frage aufwirft, ob Proben und Standards auf allen Platten gleich behandelt werden dürfen. Auf dieser Platte führte eine weitere Korrektur durch Ausreißereliminierung nur zu einer geringfügigen Reduzierung der Streuung der Residuen.

Als Konsequenz verschlechtert sich die Nachweisgrenze. Auf dieser Platte lag der Gehalt einer Probe von ca. 35 ng/l mit einem t-Wert von 1,7 bereits an der Nachweisgrenze und eine Kontamination konnte nicht sicher festgestellt werden.

Hier könnten z.B. nichtlineare Spalteneffekte, die bei der Aufstellung des Modells keine signifikante Rolle spielten, einen Einfluß gehabt haben.

b) Geringer Spalteneffekt

Bei einer Platte lag die Residualstandardabweichung mit 5,7 % deutlich niedriger als bei den meisten anderen, so dass sich die Berücksichtigung des Spalteneffektes fast erübrigte. Gleichwohl führte die Einbeziehung des Spalteneffektes zu einer weiteren geringfügigen Reduzierung der Residualstandardabweichung auf ca. 5,1 %.

Auf dieser Platte liegt im Vergleich zum vorher beschriebenen Fall a) die Nachweisgrenze viel niedriger, der Gehalt einer Probe von 0,005 µg/l ließ sich aber dennoch nicht absichern.

Anstelle einer Schätzung des Spalteneffektes aus den Daten kann man auch den im Temperaturexperiment ermittelten Wert verwenden. Mit PROBENAUFTRAG = +1 (Pro-

benauftrag in hin-Richtung) und TRACERAUFTRAG = +1 (Tracerauftrag in hin-Richtung) sowie TEMPERATUR = -1 (niedrige Temperatur, 20 °C) ergibt sich der Spalteneffekt zu -0,0071, der sich nicht signifikant von dem aus dem Realprobendatensatz geschätzten Wert (nämlich -0,0081) unterscheidet.

c) Auswertung über alle Kavitäten

Ein Nachteil des für die ersten beiden Platten benutzten Auswertungstyps besteht darin, dass nicht alle auf der Platte verfügbaren Informationen zugleich genutzt werden können, um alle Kalibrierparameter mit möglichst großer Genauigkeit zu bestimmen. Deshalb wurde für die Auswertungen aller weiteren Realprobenplatten eine andere Verfahrensweise gewählt, bei der die Kalibrierparameter und die Konzentrationen der Realproben simultan mittels einer nichtlinearen Regressionsanalyse bestimmt wurden.

d) Ausreißer

Eine nichtlineare Regressionsanalyse aller 96 Werte lieferte bei zwei Platten keine Lösung, d.h. der Algorithmus konvergierte nicht, sondern führte bei den Realproben zu negativen Konzentrationswerten. Dies war z.T. auf eine signifikante Abweichung der Residuen der Kitstandards von derjenigen der Laborstandards zurückzuführen (vgl. **4.5.1.2 A**).

Auf einer Platte bewirkten Ausreißer einen deutlich erhöhten Wert für die Residualstandardabweichung. Dies führte z.B. dazu, dass ein Spalteneffekt nicht mehr signifikant nachgewiesen werden konnte. Diese starke Variabilität war vermutlich auch die Hauptursache für die Divergenz des Berechnungsverfahrens bei Einbeziehung der Realproben. Daher musste ein Verfahren zur Ausreißereliminierung angewendet werden.

Um *Ausreißer* aus den Daten zu entfernen, wurden **für jede Konzentrationsstufe der Median der logarithmierten Messwerte** gebildet. Dann wurden die Residuen sowie der Median des Absolutbetrags der Residuen ermittelt. Jene Residuen, die das **4,5-fache** des Medians überschritten, wurden als Ausreißer aus den Daten entfernt.

Auf einer Platte war auffällig, dass auf diese Weise mehr als 10 % (10 Kavitäten) aller Werte als Ausreißer identifiziert wurden, und weiterhin, dass 8 dieser Kavitäten benachbart waren und stark reduzierte optische Dichten aufwiesen. Ferner waren alle Ka-

vitäten der Standardlösung S3 als Ausreißer ermittelt worden. Der geometrische Zusammenhang der Ausreißer ließ eine großflächige Kontamination vermuten.

Die Zahl der Ausreißer könnte als Parameter für die Zulassung einer Platte zur (Gesamt-)Auswertung herangezogen werden (Qualitätskontrolle).

Im Laufe des gesamten Experiments wurden in der Regel **3 - 4 % der Pipettierungen (entspricht 3 - 4 Kavitäten) als Ausreißer** erkannt, die eliminiert wurden, falls ein systematischer Fehler (z.B. durch Kontamination oder Pipettierfehler) plausibel erschien.

4.5.1.4 Ergebnisse

In der **Tabelle 10** sind die 14 untersuchten Realproben kurz beschrieben und codiert. Es wurde versucht, eine repräsentative Auswahl unterschiedlichster Gewässer zu beproben. So finden sich in der **Tabelle 10** Proben aus Flüssen und kleinen Bächen, die z.T. landwirtschaftlich, z.T. städtisch geprägt sind. Quellen in Reinwassergebieten sind ebenfalls vertreten.

In der **Tabelle 11** sind die Messergebnisse für diese Proben zusammengestellt. Dabei erscheinen zum einen die Ergebnisse der HPLC-Doppelbestimmung und daneben die Ergebnisse des ELISA (4 Replikate), berechnet nach 3 unterschiedlichen Verfahren.

Das erste Verfahren (Spalte 3) verwendet zur Berechnung lediglich die 4 Parameter der üblichen Kurvenanpassung. Die nächste Spalte berücksichtigt noch einen zusätzlichen Parameter für den Einfluss der Spalte. Dabei wurde der Konzentrationswert nach **Gleichung 18** errechnet. Die letzten Spalten beziehen sich auf die Auswertung mittels nicht-linearer Regression, bei der in der Regel sowohl Kalibrations- als auch Probandaten simultan ausgewertet wurden (s.o.). Sie stellen die genaueste Schätzung dar.

Die Werte für die aufgestockten Proben wurden bei dieser Art der ELISA-Auswertung nicht ermittelt, da alle Werte zusammen in die Regression und die Extrapolation auf die Dotierung $\rightarrow 0$ einfließen.

Tab. 10: Beschreibung der Realproben aus Bonn und Umgebung

Code	Beschreibung	Probenahme
P1A	Erlenburquelle; hier handelt es sich um einen Wald-	30.05.1999, 19 Uhr

	brunnen bei Obermendig. Sie ist stark eisenhaltig.	
P1B	Kelbach; der Kelbach liegt in der Nähe stark landwirtschaftlich genutzter Flächen am Ende der Hansastraße in Obermendig.	30.05.1999; 18 Uhr
P2A	Wahnbachtalsperre bei Happerschoss; Trinkwasserreservoir für Bonn und Umgebung	21.06.1999, 15 Uhr
P2B	Sieg, in der Nähe der Siegmündung, bei Bergheim „Siegfähre“ bzw. Bundesstraße	21.06.1999, 17 Uhr
P3A	Siebengebirge, Bach in Nachtigallental, Nähe Bahnhof Königswinter	06.07.1999, 8:30 Uhr
P3B	Mühlenbach in Bonn – Endenich, Flodelingsweg neben Sportplatz	06.07.1999, 12:30 Uhr
P4A	Rhein bei Bonn-Beuel, gegenüber „Langer Eugen“, Nähe Bootshaus der DLRG, Rheinkilometer 654	25.07.1999, 7:30 Uhr
P4B	Rhein bei Bonn, am Bundeshaus „Langer Eugen“	25.07.1999, 8 Uhr
P5A	Glenne (Zufluß der Möhne) bei Suttrop, an der B55 Richtung Rüthen	31.07.1999, 22 Uhr
P5B	Pader, Quellbecken der Masperspader im Paderquellgebiet bei Paderborn	31.07.1999, 20 Uhr
P6A	Ahr in Ahrweiler, Höhe Casinobrücke	08.08.1999, 10 Uhr
P6B	Main in Hochheim, Uferstraße, Höhe Bootsanlage	08.08.1999, 18 Uhr
P7A	Quelle bei Nickenich, am Sportplatz (eisenhaltig)	15.08.1999, 8 Uhr
P7B	Quelle „Am Teich“ in Mendig (Voreifel)	15.08.1999, 10 Uhr

Tab. 11: Ergebnisse der Bonner Realproben

(Gehalte in ng/l)

Code	HPLC	ELISA				
		4 Param.- Funktion	Modell (5 Param.)	nichtlineare Regression (6 Parameter)		
				Konz.	Std.abw.	t-Wert
P1A	22	0	0	10*	7	1,7
+ 50	60	39	37			
+ 140	138	117	124			
+ 320	309	286	294			
+ 410	443	403	421			
P1B	135	93	86	73	13	5,5
+ 50	197	137	126			
+ 140	283	170	167			
+ 320	436	440	422			
+ 410	588	583	568			

Code	HPLC	ELISA				
		4 Param.- Funktion	Modell (5 Param.)	nichtlineare Regression (6 Parameter)		
				Konz.	Std.abw.	t-Wert
P2A	3	1	0	5*	3	1,7
+ 50	52	51	54			
+ 140	141	165	174			
+ 320	313	340	343			
+ 410	429	428	430			
P2B	34	10	7	15	4	3,3
+ 50	49	67	66			
+ 140	146	154	158			
+ 320	291	398	388			
+ 410	412	456	448			
P3A	0	1	0	3*	6	0,45
+ 50	58	15	48			
+ 140	170	81	144			
+ 320	450	342	355			
+ 410	383	465	434			
P3B	0	1	3	7*	7	1,0
+ 50	65	28	67			
+ 140	162	136	191			
+ 320	430	283	308			
+ 410	388	353	359			
P4A	40	22	21	23	3	7,7
+ 50	88	69	69			
+ 140	161	170	169			
+ 320	342	385	363			
+ 410	455	459	434			
P4B	27	22	19	21	3	7,1
+ 50	66	72	69			
+ 140	154	179	173			
+ 320	319	366	340			
+ 410	442	505	465			
P5A	5	4	1	0	**	**
+ 50	58	41	42			
+ 140	177	116	123			
+ 320	286	334	331			
+ 410	441	398	396			
P5B	5	8	4	7	3	1,9
+ 50	62	64	62			
+ 140	150	150	150			
+ 320	284	384	364			
+ 410	448	453	433			

Code	HPLC	ELISA				
		4 Param.- Funktion	Modell (5 Param.)	nichtlineare Regression (6 Parameter)		
				Konz.	Std.abw.	t-Wert
P6A	2	0	0	0	2	0
+ 50	54	50	51			
+ 140	170	137	146			
+ 320	331	320	324			
+ 410	435	400	410			
P6B	48	34	30	33	3	11
+ 50	83	94	90			
+ 140	178	177	178			
+ 320	374	366	352			
+ 410	446	428	419			
P7A	14	0	0	0	**	**
+ 50	64	44	49			
+ 140	169	98	118			
+ 320	368	278	352			
+ 410	436	311	425			
P7B	0	9	6	0	**	**
+ 50	53	58	60			
+ 140	151	123	143			
+ 320	316	265	324			
+ 410	427	316	400			

* = nicht signifikant
 von 0 verschieden: < NG
 ** = Algorithmus
 konvergiert nicht

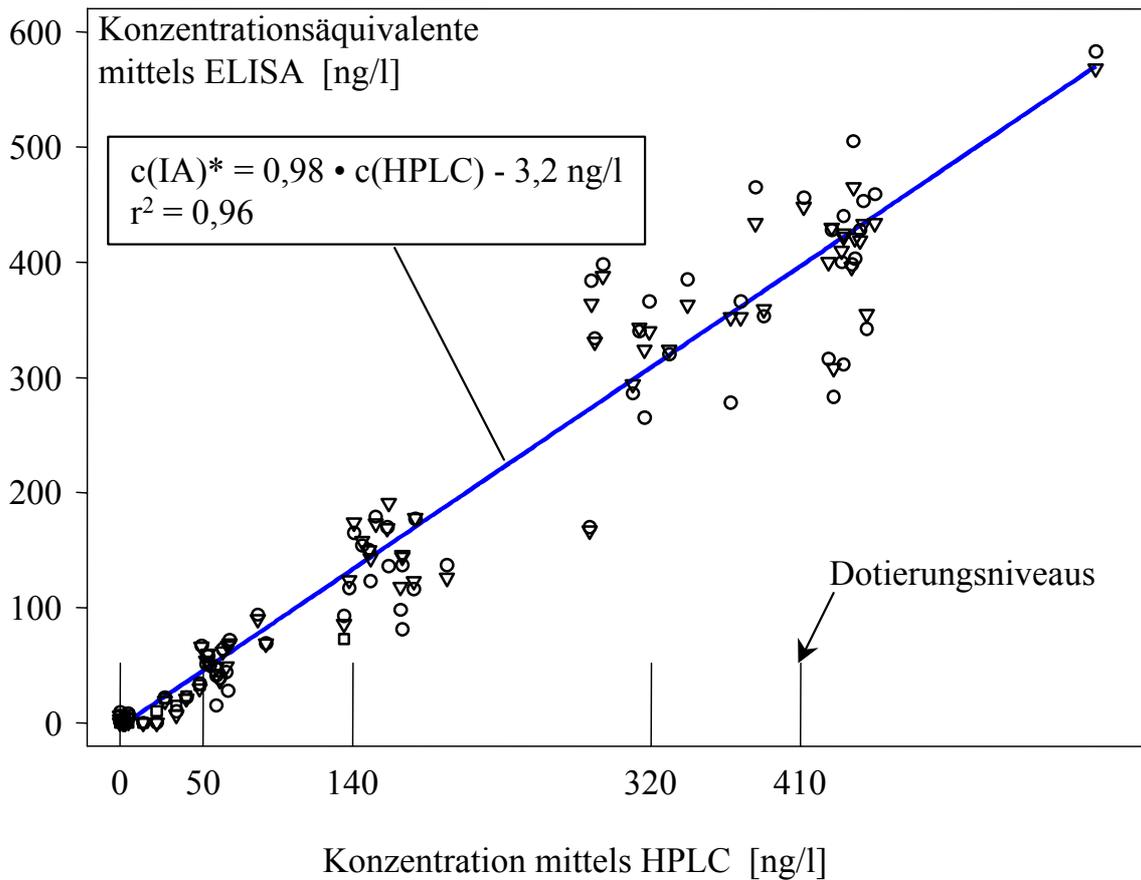
In der **Abbildung 28** sind die Ergebnisse der HPLC-Analysen (x-Achse) korreliert mit den Ergebnissen des ELISA-Tests aus den verschiedenen Auswertesystemen.

Es ergibt sich für alle Auswertemethoden ein recht enger Zusammenhang, was den Abstand zur als auch die Regelmäßigkeit der Streuung um die gedachte Winkelhalbierende ($c(\text{IA}) = c(\text{HPLC})$) betrifft.

Die ELISA-Werte aus der Anpassung über 4-Parameter-Funktion korrelieren gut mit den HPLC-Werten ($c(\text{IA}) = 0,97 * c(\text{HPLC}) - 7,0 \text{ ng/l}$; $r^2 = 0,92$; Linie nicht dargestellt). Der Regressionskoeffizient der linearen Regression ist relativ hoch (0,92), was gleichbedeutend ist mit einer guten Präzision der Ergebnisse. Auch die Richtigkeit ist zufriedenstellend (Idealwert für die Steigung: 1; hier: 0,97), jedoch ist der y-Achsenabschnitt nicht 0, was sich als systematische Unterbestimmung im ELISA bei niedrigen Konzentrationen bemerkbar machen würde.

Abb. 28: Korrelation von ELISA- und HPLC-Ergebnissen für die Realproben I

Berechnung der ELISA(IA)-Werte über 3 unterschiedliche Verfahren: Punkte – über 4-Parameter-Gleichung; Dreiecke – über Modell (d.h. mit Spaltenkompensation);



Quadrate – nichtlineare Regression für die undotierte Probe über sämtliche Dotierungsniveaus; Regressionslinie und Gleichung: Anpassung an die Dreiecke

4.5.2 Realprobenexperiment II

Es standen 4 Realproben zur Verfügung, mit denen insgesamt 8 Platten bestückt wurden. Neben dem bereits seit dem Realprobenexperiment I routinemäßig einbezogenen Faktor SPALTE wurden nun auch noch die als wichtig befundenen Faktoren OPERATOR, STREIFEN und WASHER mit untersucht. Zum Pipettieren wurde stets eine Mikroliterpipette benutzt. Die (Raum-)Temperatur betrug 21 °C.

Eine statistische Überblicksanalyse unter Einbeziehung des gesamten Datensatzes zeigte deutlich, dass bei den ermittelten Kalibrierfunktionen nicht nur von Platte zu Platte, sondern auch von Bearbeiter zu Bearbeiter (OPERATOR) Unterschiede auftreten. Deshalb wurde eine zweite Analyse durchgeführt, bei der die Kalibrierfunktion sich jeweils nur auf die Plattenhälfte bezieht, die vom selben Operator bearbeitet wurde.

Die **Abbildungen 29 a und b** zeigen die verschiedenen Auftragungsschemata und nennen alle Konzentrations- und Dotierungsstufen für Standards bzw. Proben.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	P 1	S 5	P 5	S 4	P 4	P 8	P 1	S 5	P 5	S 4	P 4	P 8
B	P 1	S 5	P 5	S 4	P 4	P 8	P 1	S 5	P 5	S 4	P 4	P 8
C	S 3	P 2	P 7	P 3	S 6	P 6	S 3	P 2	P 7	P 3	S 6	P 6
D	S 3	P 2	P 7	P 3	S 6	P 6	S 3	P 2	P 7	P 3	S 6	P 6
E	P 5	S 0	P 1	S 3	P 8	P 4	P 5	S 0	P 1	S 3	P 8	P 4
F	P 5	S 0	P 1	S 3	P 8	P 4	P 5	S 0	P 1	S 3	P 8	P 4
G	S 2	P 6	P 3	P 7	S 1	P 2	S 2	P 6	P 3	P 7	S 1	P 2
H	S 2	P 6	P 3	P 7	S 1	P 2	S 2	P 6	P 3	P 7	S 1	P 2

Grossbuchstabe = Art der Lösung:

Ziffer = Level:

S = Standard, P = Probe

Bei Standards: 0 = 0 µg/l, 1 = 0,001 µg/l, 2 = 0,01,
3 = 0,1, 4 = 1, 5 = 10, 6 = 100 µg/l

Bei Proben: 1 und 2 = 0 ng/l (undotiert), 3 – 8 dotiert:

3 = 10 ng/l, 4 = 30, 5 = 50, 6 = 100, 7 = 200, 8 = 400 ng/l

**Abb. 29 a: Pipettierschema für das Realprobenexperiment II:
ganze Platten (Pipettierrichtung in Spalten)**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	P 1	P 1	S 5	S 5	P 5	P 5	S 4	S 4	P 4	P 4	P 8	P 8
B	S 3	S 3	P 2	P 2	P 7	P 7	P 3	P 3	S 6	S 6	P 6	P 6
C	P 5	P 5	S 0	S 0	P 1	P 1	S 3	S 3	P 8	P 8	P 4	P 4
D	S 2	S 2	P 6	P 6	P 3	P 3	P 7	P 7	S 1	S 1	P 2	P 2
E	P 1	P 1	S 5	S 5	P 5	P 5	S 4	S 4	P 4	P 4	P 8	P 8
F	S 3	S 3	P 2	P 2	P 7	P 7	P 3	P 3	S 6	S 6	P 6	P 6
G	P 5	P 5	S 0	S 0	P 1	P 1	S 3	S 3	P 8	P 8	P 4	P 4
H	S 2	S 2	P 6	P 6	P 3	P 3	P 7	P 7	S 1	S 1	P 2	P 2

Legende: s.o.

**Abb. 29 b: Pipettierschema für das Realprobenexperiment II:
Streifen (Pipettierichtung in Zeilen)**

In der **Abbildung 30** sind alle 14 Kalibrierfunktionen des Berliner Realprobenexperimentes dargestellt (logarithmische y-Achse!). Es zeigt sich eine relativ hohe Variabilität der $\ln(\text{OD})$ -Werte, insbesondere bei hohen IPU-Konzentrationen.

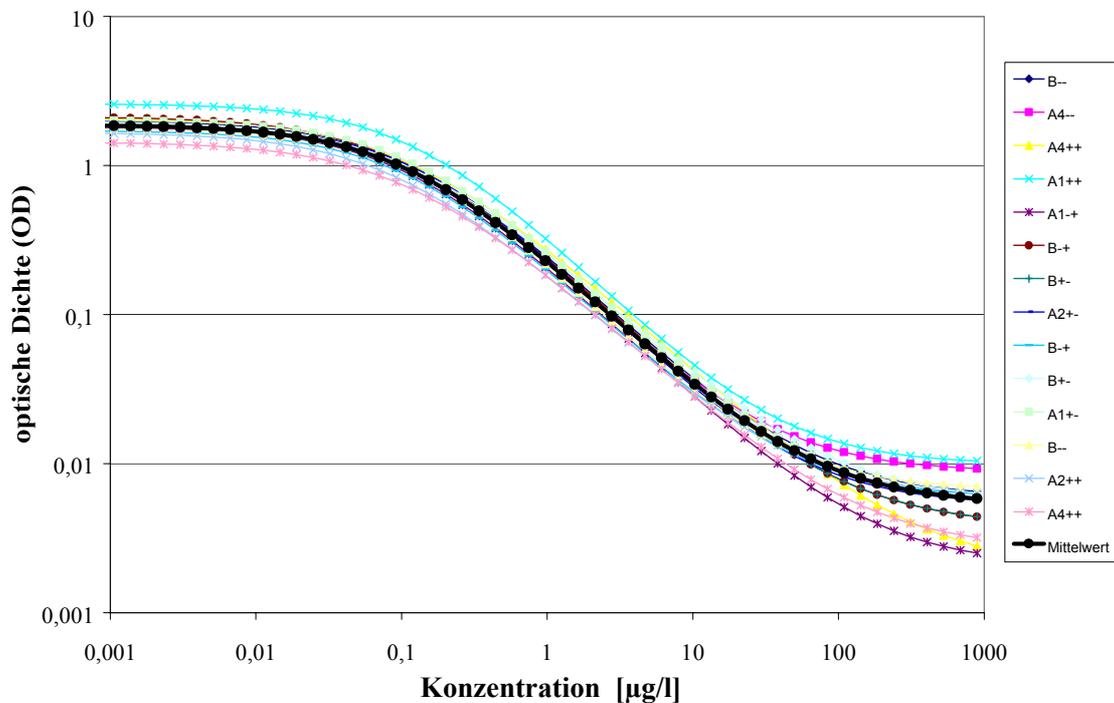


Abb. 30: Kalibrierfunktionen aus dem Realprobenexperiment II

Die **Tabelle 12** gibt einen Überblick über die Ergebnisse der 4 undotierten Wasserproben in Abhängigkeit verschiedener Einflussfaktoren (PLATTE; OPERATOR; STREIFEN; WASHER). Die Ergebnisse der detaillierten statistischen Analyse der Daten wurde bereits in den **Abschnitten 4.4.4 und 4.4.5** dargestellt.

Tab. 12: Faktorstufen und Ergebnisse für das Realprobenexperiment II

Probe	Platte	Operator	Streifen	Washer	Konz. [µg/l]	Std. abw.	t-Wert
Rhein (18.08.1999)	1-l	Experte	nein	Hand	0,012	0,003	4,4
- " -	1-r	Geübter	nein	Hand	0,006 (<NG)	0,003	1,7
- " -	2-o	Geübter	ja	Washer	0,008	0,003	3,0
- " -	2-u	Geübter	ja	Washer	0,006 (<NG)	0,006	1,1
Teltowkanal	3-o	Geübter	ja	Hand	0,002 (<NG)	0,004	0,36
- " -	3-u	Experte	ja	Hand	0,007 (<NG)	0,005	1,5
- " -	4-l	Experte	nein	Washer	0,008	0,001	5,9
- " -	4-r	Geübter	nein	Washer	0,013	0,008	1,7
Leitungswasser	5	Experte	ja	Hand	0	---	---
- " -	6-l	Experte	nein	Washer	0,002 (<NG)	0,002	0,98
- " -	6-r	Geübter	nein	Washer	0,002 (<NG)	0,004	0,51
Halensee	7	Experte	nein	Hand	0,007	0,002	2,8
- " -	8-o	Geübter	ja	Washer	0,012	0,004	3,1
- " -	8-u	Geübter	ja	Washer	0,004 (<NG)	0,005	0,79

Legende: -l/-r = linke/rechte Plattenhälfte; -o/-u = obere/untere Plattenhälfte (Streifen A-D/E-H)
 NG = Nachweisgrenze (variabel zwischen den Kombinationen)
 HPLC-Ergebnis für Rhein über 6 Dotierungsstufen: 0,013 µg/l

4.5.3 Nachweisgrenze

4.5.3.1 Power-Funktion

Im Rahmen des Vorhabens wurde auch eine sogenannte **Power-Funktion** für den untersuchten Immunoassay unter verschiedenen Bedingungen ermittelt. Aus ihr ergeben sich die kritischen Konzentrationen CC_α und CC_β . Diese unterscheiden sich von den Begriffen *Nachweis- und Bestimmungsgrenze* (zu deren Definition, vgl. FLEMING ET AL. 1997, HUBER 1991, VOGELGESANG UND HÄDRICH 1998a,b, FALLER ET AL. 1998, HÄDRICH 1997 a,b; HÄDRICH UND VOGELGESANG 1996), da die Berechnung von CC_α und CC_β unter Einbeziehung unterschiedlicher Fehlerquellen, die sich z.B. aus Lagerung, Probenvorbereitung, Matrixvariabilität etc. ergeben, erfolgt (GOWIK ET AL. 1998c).

Mit der Power-Funktion lässt sich außerdem die Rate falsch negativer Proben in Abhängigkeit von der Konzentration bestimmen. Im Ergebnis der Poweranalyse erhält man die *Abschätzung der Wahrscheinlichkeit, mit der bei einer hypothetischen Probe mit einem Gehalt von $x \mu\text{g/l}$ Isoproturon der Nachweis dieser Substanz gelingt*.

Die Nachweisbarkeit hängt u.a. davon ab, wie viele Bestimmungen der unbekanntes Probe vorgenommen wurden und wie viele Kalibrierstandards vorlagen. Im Folgenden wird davon ausgegangen, dass der Nachweis von Isoproturon dann als erbracht gilt, wenn die *logarithmierte optische Dichte mindestens drei Standardabweichungen unterhalb der oberen logarithmierten Asymptote* liegt, was einer weitverbreiteten Konvention entspricht. Weiterhin wird unterstellt, dass die logarithmierte optische Dichte $\ln(\text{OD})$ sich aus zwei normalverteilten Komponenten additiv zusammensetzt, der zufälligen Messabweichung ε sowie der zufällig realisierten Kalibrierfunktion

$$f(x) = \ln \frac{1}{1 + \left(\frac{x}{c}\right)^b} = -\ln(1 + \beta_3 x^{\beta_4}) \quad (\text{Gl. 19})$$

für die Konzentration x , d.h. $\ln(\text{OD}) = f(x) + \varepsilon$ (wobei vorausgesetzt wird, dass die obere Asymptote bei 1 und die untere bei 0 liegt). Die Annahme der Log-Normalverteilung

erscheint auf der Basis der vorgenommenen Analysen der 253 Kalibrierfunktionen (**Abschnitt 4.1**) sowie der durchgeführten Experimente (**4.4, 4.5.1, 4.5.2**) als akzeptable Approximation der tatsächlichen Verteilung. Die Schätzung der Varianz von ε erfolgt anhand der Residualvarianz, während die Varianzschätzung von $f(x)$ mittels der empirischen Varianz der realisierten Kalibrierfunktionen durchgeführt wird.

Da die Residualvarianz von der Expertise des Bearbeiters, von der Anwendung eines Washers, sowie der Zerlegung der Platte in Streifen abhängig ist, erhält man je nach Spezifizierung eine andere Powerfunktion (**Abbildung 31**).

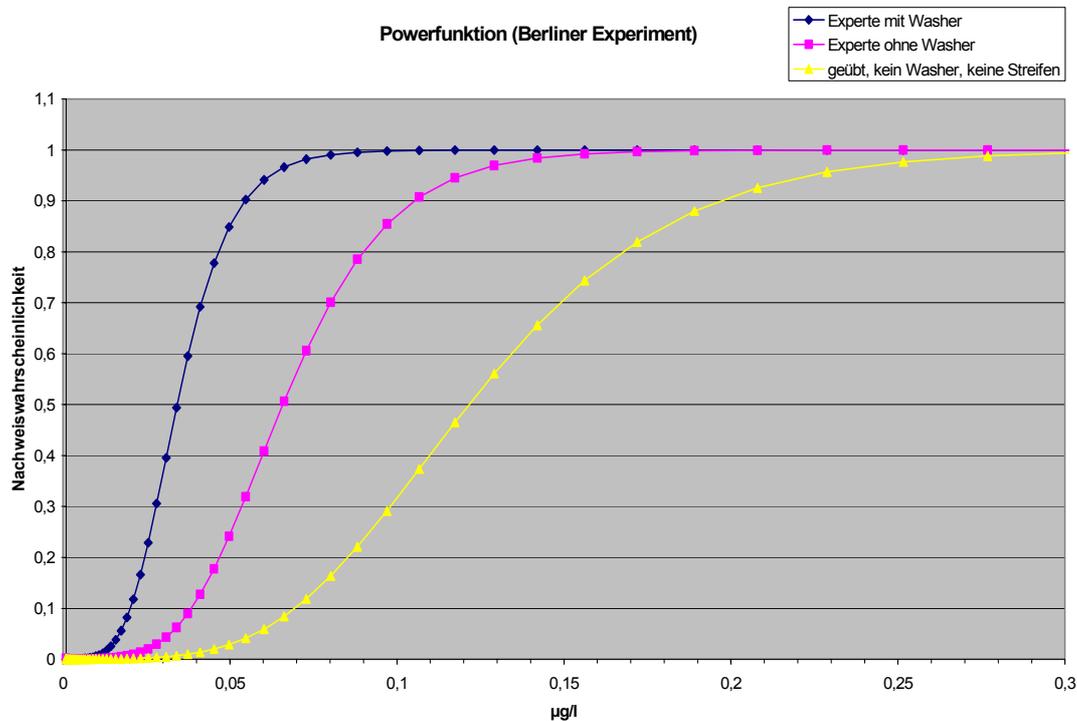


Abb. 31: Powerfunktionen für das Realprobenexperiment II

Der Grafik ist zu entnehmen, dass bei Analyse durch einen Experten unter Verwendung eines Washers sowie Zerteilung der Platte in Streifen bereits bei 50 ng/l die Wahrscheinlichkeit für die statistische Nachweisbarkeit von Isoproturon ca. 90 % erreicht hat, während ohne Washer erst 25 % erreicht werden können. Bei „geübten“ Kräften liegt die Wahrscheinlichkeit bei weniger als 5 %. Bei 100 ng/l ist der Nachweis von

Isoproturon durch einen Experten bei Verwendung eines Washers fast sicher, ohne Washer wird nahezu 90 % Wahrscheinlichkeit erreicht, während für „geübtes“ Personal, ohne Washer erst eine Wahrscheinlichkeit von ca. 30 % erreicht wird.

Eine wesentliche Voraussetzung zur Durchführung dieser Berechnungen besteht darin, dass bis auf die durch spezifizierte Bedingungen verursachten Varianzunterschiede die *Verteilung der Residuen* über alle acht Platten als *homogen* angesehen werden kann und sich insbesondere die Residualvarianzen nur im Rahmen zufälliger Schwankungen unterscheiden. Für das Realprobenexperiment I ist dies nicht der Fall, so dass hier ein *Pseudo-Bootstrap-Verfahren* angewendet werden musste. Hierzu erfolgt die Berechnung einer bedingten Powerfunktion für jede einzelne Platte, und durch Mittelung ergibt sich die kombinierte Powerfunktion, welche die Nachweiswahrscheinlichkeit für eine zufällig ausgewählte Platte beschreibt. Die aus den Ergebnissen der 7 Platten des Realprobenexperiment I (**Abschnitt 4.5.1**) berechnete Powerfunktion ist in **Abbildung 32** dargestellt.

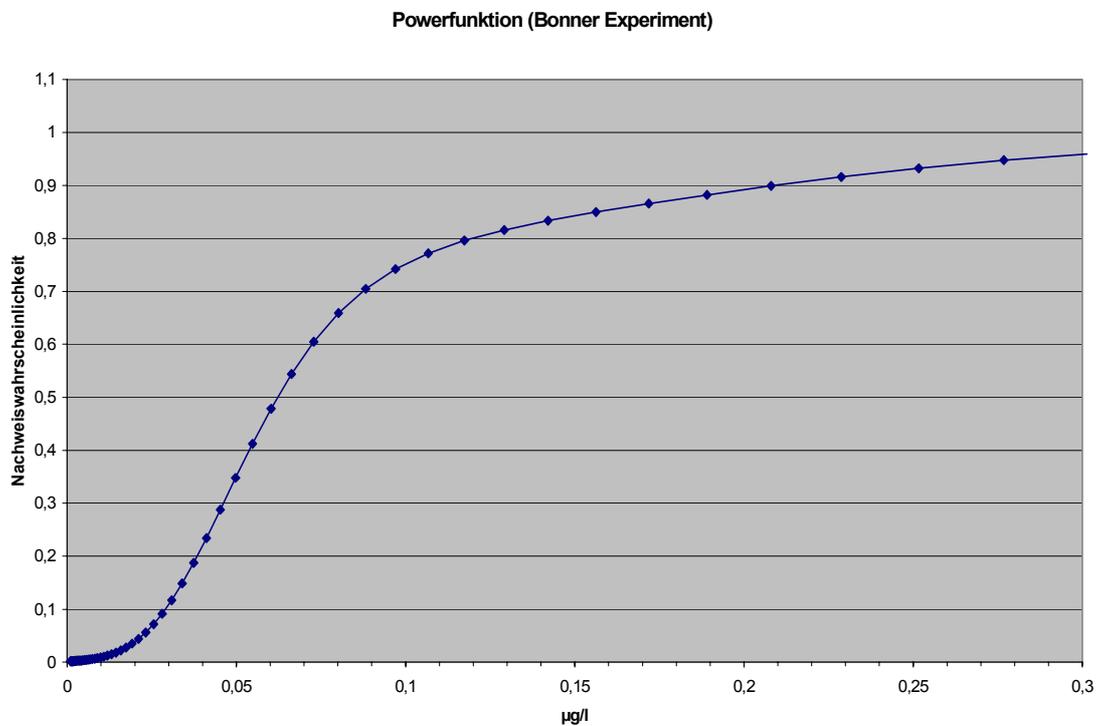


Abb. 32: Powerfunktionen für das Realprobenexperiment I

Die Powerfunktion von Experiment I ist erheblich flacher als die Powerfunktionen des zweiten Experiments. Dabei fällt auf, dass speziell im Bereich sehr geringer Konzentrationen unterhalb von 50 ng/l auch schon beim Experiment I ein Nachweis mit einer gewissen, wenn auch geringen Nachweiswahrscheinlichkeit möglich ist. Andererseits ist bei 300 ng/l der Sättigungsbereich, d.h. eine annähernd hundertprozentige Nachweiswahrscheinlichkeit noch nicht erreicht. Dies bedeutet, dass die Versuchsbedingungen beim ersten Experiment **starken Schwankungen unterlegen** haben. Während in einigen Fällen eine sehr hohe Nachweiswahrscheinlichkeit vorlag, war diese in anderen Fällen sehr viel niedriger, was möglicherweise durch Schwankungen der Labortemperatur während der Untersuchungen, fehlerbehaftetes Pipettieren oder sonstige noch nicht in das Modell einbezogene Unsicherheiten verursacht wurde. Die nicht erfaßten Unsicherheiten bedeuten, dass die Methode in diesem Experiment nicht als „beherrscht“ angesehen werden kann, denn es steht keine definierte statistische Verteilung zur Verfügung, welche die Unsicherheiten beschreiben könnte. Damit muss in Frage gestellt werden, ob ein Nachweis von Isoproturon tatsächlich als erbracht gelten kann, wenn die logarithmierte optische Dichte mindestens drei Residualstandardabweichungen unterhalb der oberen Asymptote liegt. Im Realprobenexperiment II ist diese aber gerechtfertigt, da hier – abgesehen von einer offensichtlich falschen Dotierung einer Probe – keine Ausreißer aufgetreten sind und somit die Annahme der Normalverteilung gerechtfertigt erscheint. Für Experiment I muss gefolgert werden, dass nicht nur die Powerfunktion eine sehr viel ungünstigere Gestalt hat, sondern dass zusätzlich auch das *reale statistische Signifikanzniveau*, d.h. die **Wahrscheinlichkeit für ein falsch positives Ergebnis, erheblich schlechter** ausfällt. Um den gleichen Grad an statistischer Sicherheit zu erhalten, müsste für Experiment I eine konservativere Berechnung angestellt werden, d.h. unter Forderung der Bedingung, dass für einen positiven Nachweis die logarithmierte optische Dichte *mehr als drei Residualstandardabweichungen* unterhalb der oberen Asymptote liegen muss.

Die Poweranalyse zeigt damit in ihrer Gestalt auf, wie die Qualität der Daten eines Experiments, d.h. ihre Geschlossenheit als Grundgesamtheit ohne Ausreißer, sich direkt auf die Nachweisgrenze der Methode bei den zugehörigen Messungen auswirken.

4.5.3.2 Konfidenz- und Präzisionsprofile

Um die Präzision eines Messwertes zu dokumentieren wird häufig nur die mittlere Standardabweichung der Messwiederholungen angegeben. Es ist jedoch unerlässlich, für eine Analysenserie ein **Konfidenzprofil (Vertrauensband)** zu berechnen.

Während die Power-Funktion die Wahrscheinlichkeit für einen Nachweis auf einem bestimmten Konzentrationsniveau für zukünftige Messungen angibt, gibt das Vertrauensband Antwort auf die Frage „Wie groß ist die Streuung (Standardabweichung) zu einem vorliegenden Messwert bzw. an einer bestimmten Stelle des Messbereiches?“.

Für die Praxis im Labor ist es besser, ein sog. **Präzisionsprofil** zu erstellen, welches die Verteilung der Größe des Messfehlers über den gesamten Messbereich beschreibt. Diese Verfahrensweise ist im Bereich der Immunoassays gelegentlich bereits angewendet worden (EKINS 1981, SCHNEIDER 1993).

In diesem Vorhaben wurden Versuchserien (Experimente) durchgeführt, in denen Uncertainty-Faktoren unterschiedlich wirksam waren. Insbesondere im Experiment II wurden unterschiedliche Szenarien erprobt, welche in **Tabelle 13** zusammengestellt sind. Für die Erstellung von Präzisionsprofilen und zur Berechnung der unteren und oberen Nachweisgrenze (**Sättigungsgrenze**) wurden nun 3 Szenarien herausgegriffen, welche 3 verschiedene Qualitätsniveaus in Bezug auf die Nachweissicherheit der Bestimmungen darstellen (**Tabelle 10**). Die **Abbildungen 33 – 38** geben die jeweiligen Konfidenz- und Präzisionsprofile wieder.

Tab. 13: Faktorstufenkombination für verschiedene Qualitätsniveaus

Qualitätsniveau	OPERATOR	WASHER	TEMPERATUR	SPALTE berücksichtigt	Std.abw. von ln(OD)
hoch	Experte	ja	konstant	ja	0,036
mittel	Experte	ja	konstant	nein	0,102
niedrig	Geübter	nein, manuell	sehr variabel	nein	0,331

Die **Abbildung 33/34** zeigt die Verhältnisse bei hohem Qualitätsniveau, d.h. geringer Ausreißeranzahl und geringer Streuung der Residuen.

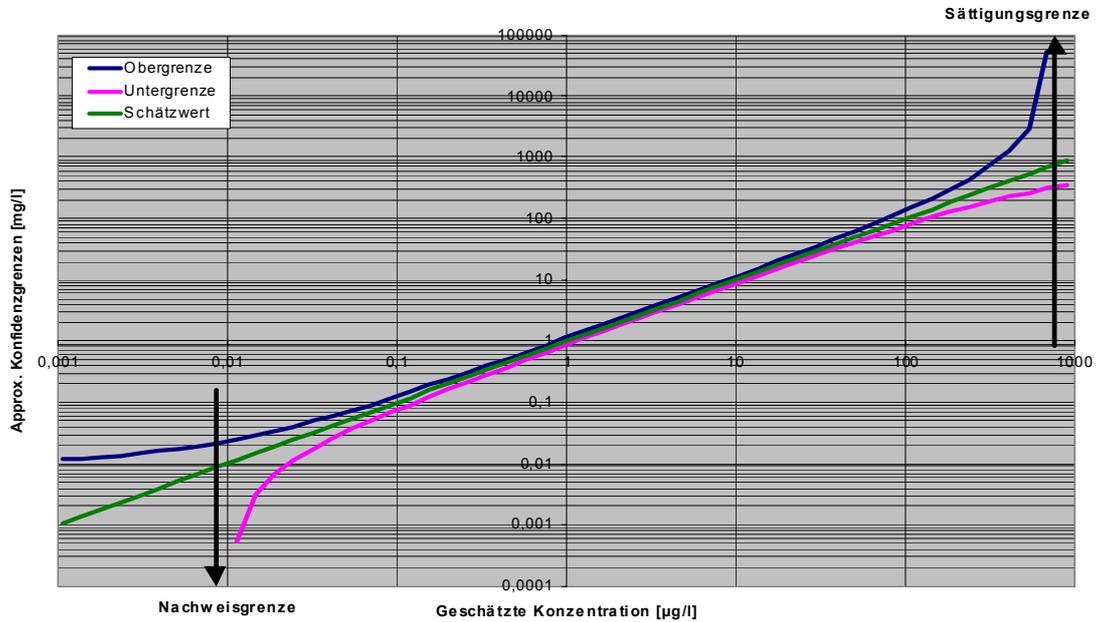


Abb. 33: Konfidenzprofil bei hohem Qualitätsniveau

Es ergibt sich ein weiter Messbereich und eine niedrige Nachweisgrenze (10 ng/l).

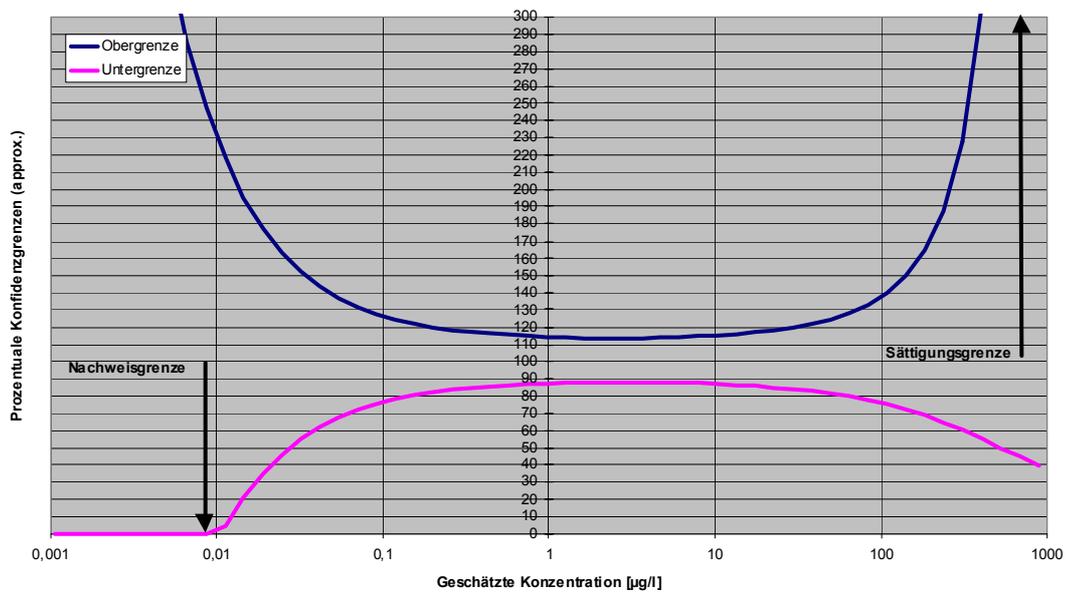


Abb. 34: Präzisionsprofil bei hohem Qualitätsniveau

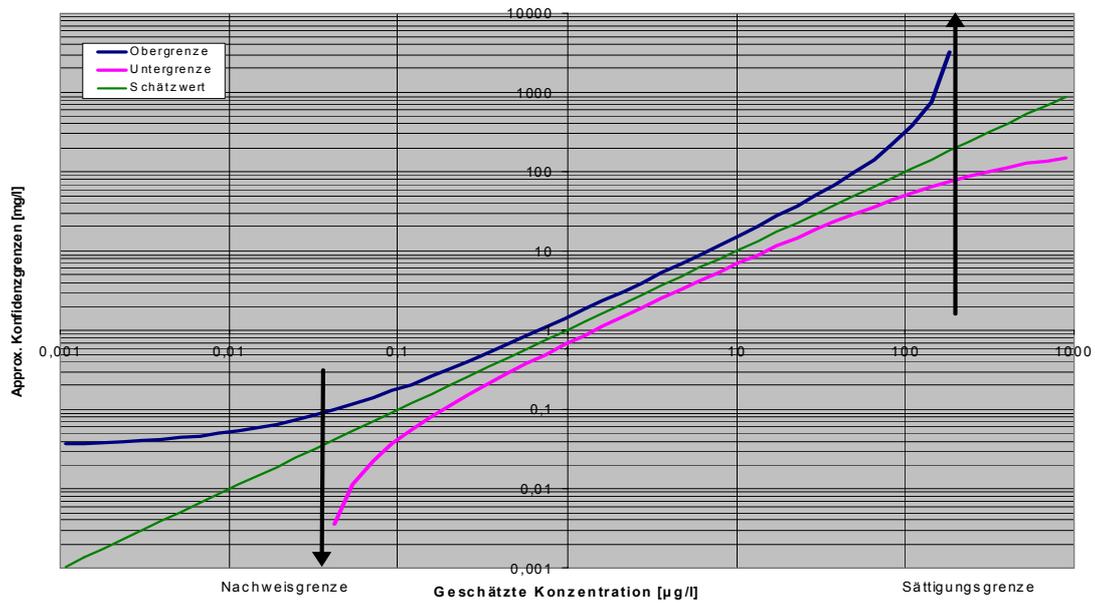


Abb. 35: Konfidenzprofil bei mittlerem Qualitätsniveau

Bei einem mittleren Qualitätsniveau wird der Messbereich enger und die Streuungen sind nur in einem engen Bereich akzeptabel. Die Nachweisgrenze liegt höher.

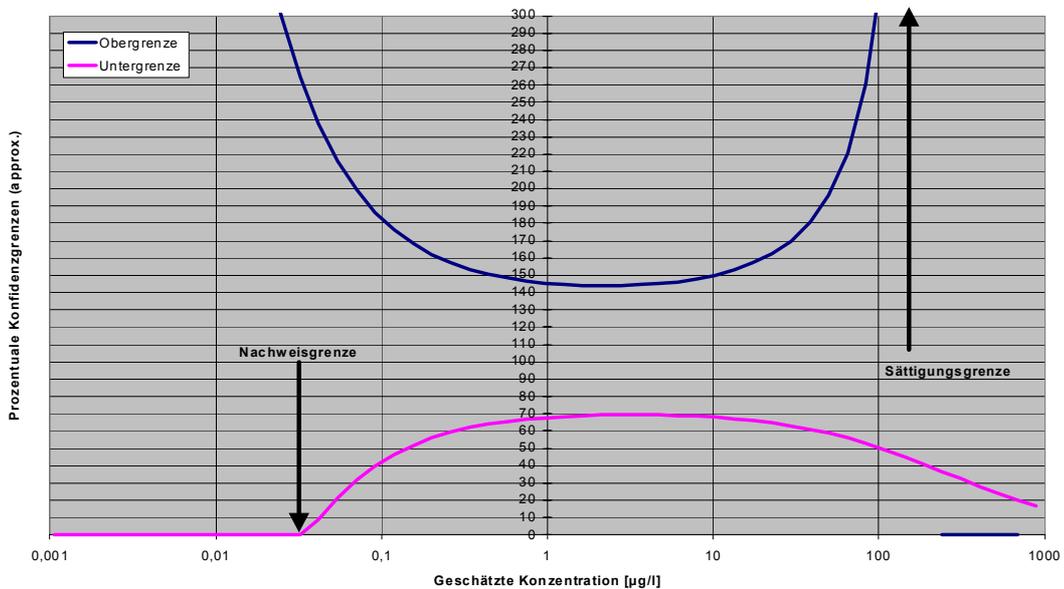


Abb. 36: Präzisionsprofil bei mittlerem Qualitätsniveau

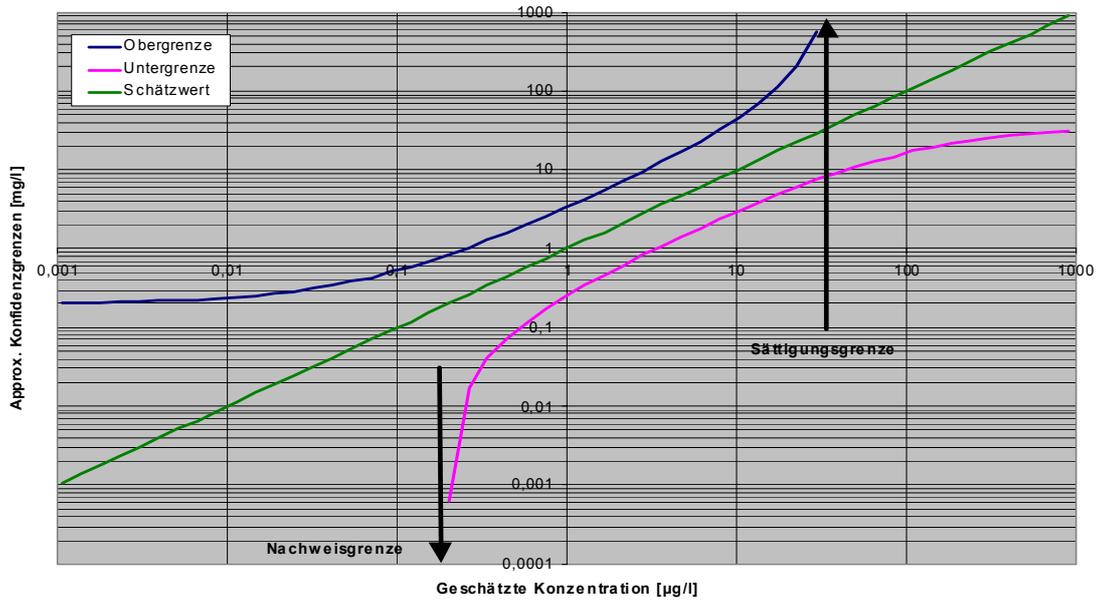


Abb. 37: Konfidenzprofil bei niedrigem Qualitätsniveau

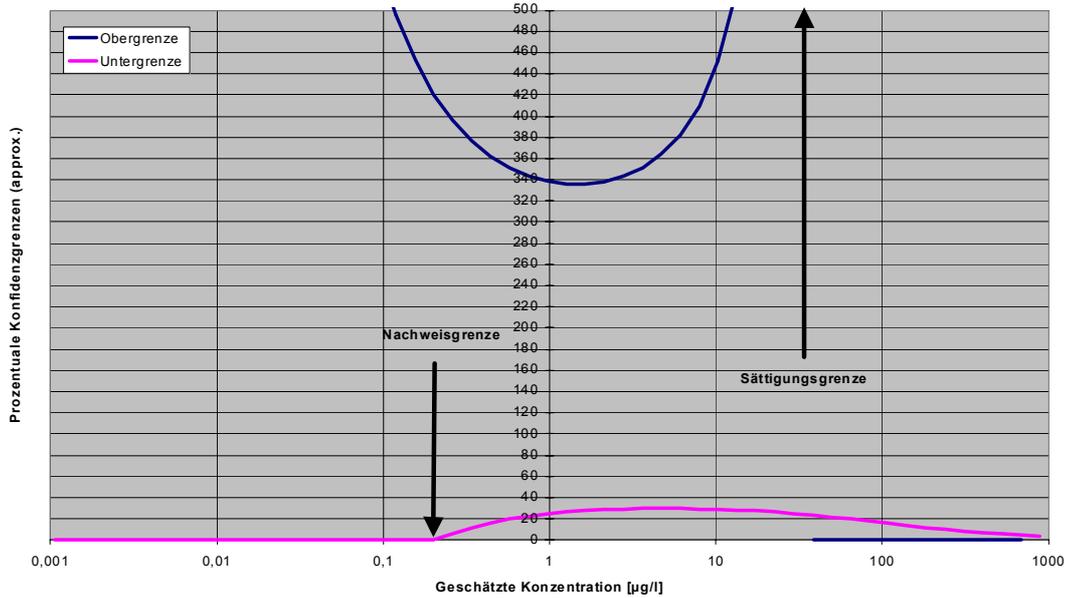


Abb. 38: Präzisionsprofil bei niedrigem Qualitätsniveau

Bei niedrigem Qualitätsniveau der Messungen (d.h. zahlreiche Ausreisser, große Streuungen) ist der Messbereich stark eingeschränkt (auch nach oben). Der Test erreicht nicht mehr die erforderliche Nachweisgrenze $< 0,1 \mu\text{g/l}$.

4.6 Beurteilung des getesteten Immunoassays und Handlungsempfehlungen

In den "Rahmenbedingungen für selektive Immuntestverfahren (Immunoassays) zur Bestimmung von Pflanzenbehandlungs- und Schädlingsbekämpfungsmitteln" (DIN V 38415-T2, 1995) sind folgende Mindestanforderungen bezüglich Präzision und Wiederfindungsrate für quantitative Immunoassays formuliert:

- Variationskoeffizient bei einer Wiederholung < 10 % für die OD-Messung
- Wiederfindungsraten der Positivkontrollen von 70 - 110 %
- Variationskoeffizient von Mehrfachbestimmungen bei N = 4: 5 - 10 %
- Vergleichsvariationskoeffizient von 6,4 - 18,9 %

Aus der vorliegenden Validierungsstudie geht hervor, dass der getestete Isoproturon-ELISA in der Lage ist, diese Anforderungen im Konzentrationsbereich unter 100 ng/l zu erfüllen. Es konnte gezeigt werden, dass die Qualität der Ergebnisse erheblich von einigen Einflussfaktoren, die näher spezifiziert wurden, abhängt.

Nachfolgend werden Möglichkeiten zur Minimierung der ermittelten Fehlerursachen diskutiert.

a) Zeit und Durchsatz

Für die Testdurchführung sollten etwa zwei Stunden Zeit zur Verfügung stehen. Dieser Wert gilt inklusive aller Vorbereitungen bis zum Ausdrucken eines orientierenden Ergebnisses, wenn die Proben bei Raumtemperatur filtriert bereitstehen. Zeitmangel erzeugt STRESS, welcher sich als Uncertainty-Faktor herausgestellt hat.

Mit der Abarbeitung eines ELISA-Tests können beispielsweise 14 Proben in 4-fach-Bestimmung gemessen werden. Die Auftragung sollte randomisiert geschehen, da eine Abhängigkeit der optischen Dichte von der Position der Probe auf der Platte nachgewiesen wurde. Durch die dadurch entstehende hohe Anforderung an die Konzentration des Operators entsteht allerdings zusätzlicher STRESS, so dass der Effekt u.U. geschmälert wird. Dies könnte durch Einsatz eines Pipettierroboters umgangen werden.

b) Faktorengruppen „Kit“

Die Lagerung der Kits sollte entsprechend den Herstellerangaben im Kühlschrank erfolgen, eine Überlagerung bis einige Monate nach Haltbarkeitsdatum zeigte in dieser Studie keine signifikanten Effekte. Eine **Chargenabhängigkeit** der Uncertainty der Messergebnisse konnte nicht nachgewiesen werden, daher können Platten verschiedener Chargen innerhalb einer Messkampagne verwendet werden.

Zur Kalibrierung sollten 7 Standardkonzentrationen und eine Negativkontrolle (alle in 4 Replikaten) herangezogen werden. Die **Kalibratoren aus dem Kit** sollten nicht verwendet werden, da sie in zu geringer Zahl (3) vorliegen und keine optimale Anpassung der Kalibrierfunktion erlauben, den oberen und unteren Arbeitsbereich einschränken, zu höheren Streuungen der Messwerte einer Platte führen und systematisch von den selbst-bereiteten Laborstandards abweichen.

Die Selektivität des Testkits für Isoproturon im Vergleich zu anderen Phenylharnstoff-Herbiziden ist für die Anwendung ausreichend.

c) Faktorengruppe „Position“

Es treten „Trend“-Effekte auf, d.h. die optische Dichte von Replikaten hängt von der Position der Probe auf der Platte ab. Dieser Fehler lässt sich durch randomisierte Auftragung in einen zufälligen Fehler verwandeln, der die Streuungen erhöht und die Nachweisempfindlichkeit beeinträchtigt. Aus der vorliegenden Studie lässt sich ableiten, dass der Spalteneffekt durch Validierungsexperimente quantifiziert und bei der Auswertung berücksichtigt werden kann. Proben- und Tracerauftrag in Richtung Spalte 12 nach 1 verringert diesen Effekt. Die Vorinkubationszeit erwies sich bezüglich des Spalteneffekts als unkritisch. Ein Randeffect war nicht signifikant, d.h. die Randkavitäten sind als vollwertig zu betrachten.

d) Faktorengruppe „Temperatur“

Erhöhte Raumtemperaturen, Temperaturschwankungen und Zugluft haben die stärksten Effekte auf die Streuung der Messwerte. Es ist nicht sinnvoll, diesen Effekt rechnerisch zu berücksichtigen, vielmehr sollte bei relativ niedriger und konstanter Temperatur (ca. 18 – 20 °C), vorzugsweise in einem klimatisierten Raum gearbeitet werden.

e) Faktorengruppe „Labor und Personal“

Es zeigte sich, dass Bearbeiter ohne ausreichende Übung im Umgang mit dem Test und insbesondere im Pipettieren stark fehlerbehaftete Analysenergebnisse erzeugen. Bei ausgebildeten Fachkräften ohne Erfahrungen in der Handhabung von Immunoassays sind die Streuungen der Gesamtheit der OD-Werte einer Platte deutlich (signifikant) größer als bei Personen mit einschlägiger Immunoassay-Erfahrung.

f) Faktorengruppe „Arbeitsweise“

Zur Minimierung der Varianz der Ergebnisse sollten alle Dosierschritte mit Mikroliterpipetten durchgeführt und mit einem Mikrotiterplatten-Waschgerät (Washer) gearbeitet werden. Eine Bearbeitung der MTP in einzelnen Streifen zeigte keine negativen Auswirkungen auf die Ergebnisse.

g) Matrix (Realproben)

Der Test erwies sich als äußerst robust gegenüber Matrixeinflüssen. Bei den Oberflächenwasserproben konnten keine Einflüsse der Herkunft der Proben auf die Richtigkeit und Präzision ermittelt werden. Die Vorbehandlung der Probe hat keinen signifikanten Einfluss auf die Ergebnisunsicherheit. Bei stark matrixhaltigen Proben ist eine Filtration zu empfehlen.

4.7 In-house Validierungskonzept für Immunoassays

Im Gegensatz zu bisherigen Validierungsstudien (z.B. KRÄMER 1998, EIKENBERG 2000) ging es in diesem Vorhaben nicht darum, einen bestimmten Immunoassay-Testkit auf seine Eignung hin zu überprüfen. Vielmehr sollten in dieser Studie Grundsätze für ein In-house Validierungskonzept für Immunoassays erarbeitet werden.

Die in den einzelnen Kapiteln vorgestellten Experimente zur Validierung des ELISA-Testkits für Isoproturon sind relativ umfangreich und aufwendig. Sie dienten dazu, in einem Modellvorhaben Einflussparameter auf ihre grundsätzliche Relevanz für Immunoassays im umweltanalytischen Bereich zu überprüfen und ein Konzept für die Validierung zu entwickeln und zu erproben. Dies bedeutet nicht, dass Versuche in diesem Umfang zur Validierung eines Kits stets notwendig sind.

Es wird daher im Folgenden beschrieben wie, abgeleitet aus den Modelluntersuchungen, die Validierung eines ELISA-Tests mit minimalen Aufwand an Kosten und Zeit vorzunehmen ist, um daraus Verfahrenskenngrößen und Aussagen über Anwendungsmöglichkeiten und -grenzen abzuleiten. Es sind dazu insgesamt 4 Schritte nötig:

1. Schritt: Erstellung einer Liste potentieller Einfluss- bzw. Störfaktoren

Diese **Faktoren** werden im Uncertainty-Konzept als Uncertainty-Komponenten bezeichnet. Sie sollten durch Betrachtung des Arbeitsablaufs, durch Einbeziehung bestehender Erfahrungen der technischen Mitarbeiter und aufgrund von Hinweisen in der Literatur zusammengestellt werden. Die wichtigsten Uncertainty-Komponenten in der durchgeführten Validierungsstudie waren die Abhängigkeit der Ergebnisse von der Position der Probe auf der Mikrotiterplatte, die Temperatur und die Erfahrung des Personals. Bei vielen Immunoassays wird auch die Matrix ein wichtiger Faktor sein.

Für jeden dieser Faktoren ist zu prüfen,

1. ob eine kontrollierte Festlegung oder exakte Erfassung sowohl im Validierungsexperiment als auch unter Routinebedingungen möglich ist (z.B. Zeilen- und Spaltennummer)
2. ob unter Routinebedingungen möglicherweise nur eine teilweise Kontrolle möglich ist (z.B. Proben- und Labortemperatur)
3. ob unter Routinebedingungen nur bei erhöhtem Aufwand eine kontrollierte Festlegung möglich ist (z.B. Erfahrungsniveau des Bearbeiters)
4. ob weder im Validierungsexperiment noch unter Routinebedingungen eine kontrollierte Festlegung realisiert werden kann.

Weiterhin sind für jeden der im Experiment sinnvoll untersuchbaren Faktoren relevante **Faktorstufen** (z.B. Temperaturen, Erfahrungsniveaus der Bearbeiter, Konzentrationsstufen von Störsubstanzen) festzulegen. Dabei sollten nach Möglichkeit jeweils nur zwei Faktorstufen (eine hohe und eine niedrige) ausgewählt werden, welche den als relevant angesehenen Realisierungsbereich abdecken, z.B. eine niedrige Raumtemperatur und eine hohe Raumtemperatur.

2. Schritt: Experimente zur Erfassung möglicher faktorieller Effekte

Sofern die in Schritt 1 erstellte Liste mehr als ca. 8 Faktoren umfasst, sollte zunächst anhand geeigneter Voruntersuchungen ermittelt werden, welche der Faktoren als relevant anzusehen sind, um sich für die Hauptuntersuchung auf diese beschränken zu können. Für die Voruntersuchungen sollten 1 bis 2 Platten eingeplant werden. Da aufgrund der Plattengeometrie kein vollständig orthogonaler Plan realisiert werden kann, wird vorgeschlagen, einen zumindest näherungsweise D-optimalen Plan zu verwenden. Ein solcher Plan wird mittels eines iterativen Optimierungsalgorithmus berechnet; ein Beispiel für einen solchen Plan ist das Experiment „Trend 1“ (**Abbildung 16**). Wenn kein D-optimaler Plan verfügbar ist, empfiehlt es sich, zunächst einen geeigneten teilfaktoriellen Versuchsplan festzulegen (und nach diesem dann in randomisierter Weise die Proben auf der Platte zu verteilen). Sofern beispielsweise 7 Faktoren zuzüglich eines

Matrixfaktors mit jeweils 2 Faktorstufen zu untersuchen sind, bietet sich die Verwendung des in **Tabelle 14** dargestellten teilfaktoriellen 2^{8-3} -Plans an: Dieser Plan berücksichtigt insgesamt 8 Faktoren jeweils auf 2 Stufen, und beinhaltet 2^5 der insgesamt 2^8 unterschiedlichen Faktorstufenkombinationen. Diese 2^5 Faktorstufenkombinationen sind so ausgewählt, dass bei jedem Faktorstufenpaar jede Kombination in der gleichen Häufigkeit auftritt. Zum Beispiel tritt bei den Faktoren 5 und 6 die Kombination **5-6+** insgesamt viermal auf, ebenso wie die Kombinationen 5-6-, 5+6- und 5+6+ (siehe **Tabelle 14**).

Tab. 14: Designmatrix eines teilfaktoriellen Versuchsplans für 7 Faktoren

Matrix	Faktor 1	Faktor 2	Faktor 3	Faktor 4	Faktor 5	Faktor 6	Faktor 7	Nr.
Matrix 1	+	+	+	+	-	+	-	1
Matrix 1	+	+	-	-	+	-	-	2
Matrix 1	+	-	+	-	-	-	+	3
Matrix 1	+	-	-	+	+	+	+	4
Matrix 1	-	+	+	-	+	+	+	5
Matrix 1	-	+	-	+	-	-	+	6
Matrix 1	-	-	+	+	+	-	-	7
Matrix 1	-	-	-	-	-	+	-	8
Matrix 2	+	+	+	+	+	-	+	9
Matrix 2	+	+	-	-	-	+	+	10
Matrix 2	+	-	+	-	+	+	-	11
Matrix 2	+	-	-	+	-	-	-	12
Matrix 2	-	+	+	-	-	-	-	13
Matrix 2	-	+	-	+	+	+	-	14
Matrix 2	-	-	+	+	-	+	+	15
Matrix 2	-	-	-	-	+	-	+	16

Dieser Versuchsplan sollte auf zwei Konzentrationsstufen wiederholt werden, so dass sich insgesamt 32 Einzelversuche ergeben. Bei einer Platte mit 96 Feldern lassen sich diese insgesamt dreimal wiederholen. Auf zusätzliche Standards oder ähnliches kann hierbei verzichtet werden. Wichtig ist nur, dass die Aufteilung der 3 x 32 Einzelversuche zufällig erfolgt.

Im folgenden Beispiel bezeichnet die in den Feldern jeweils eingetragene Zahl die Nummer der Faktorstufenkombination, der Buchstabe (a-c) die jeweilige Parallele und + bzw. – das Konzentrationsniveau (**Abbildung 39**):

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	7a–	10b+	15b+	12a+	13c–	8a–	10c+	15a+	7a–	10b+	15b+	12a+
B	16b–	2b–	9c+	9b+	10a–	1a+	5b+	12c+	16b–	2b–	9c+	9b+
C	5b–	2b+	3b+	6a+	2a+	4c–	14b–	5c+	5b–	2b+	3b+	6a+
D	1c+	7a+	14c+	1b+	13b–	6b–	15c–	11c+	1c+	7a+	14c+	1b+
E	6a–	4b–	7b–	13a–	9b–	1a–	6b+	10a+	6a–	4b–	7b–	13a–
F	14a+	6c–	9a–	1b–	10b–	14b+	11a–	13a+	14a+	6c–	9a–	1b–
G	2c+	11b–	9a+	4c+	3c+	7b+	11a+	8b–	2c+	11b–	9a+	4c+
H	12b–	5a+	11c–	4b+	12c–	16a–	3c–	9c–	12b–	5a+	11c–	4b+

Abb. 39: Pipettierschema für 16 Faktorstufenkombinationen auf zwei Konzentrationsniveaus in Dreifachbestimmung

Die Auswertung dieser Voruntersuchung kann mit Standard-Statistiksoftwarepaketen wie Statistica™, SPSS™ oder ähnlichem erfolgen. Hierzu wird die oben angegebene Designmatrix um weitere Spalten für die jeweilige Spalten- und Zeilennummer, die Konzentration sowie die ermittelte logarithmierte optische Dichte ergänzt und dann regressionsanalytisch ausgewertet.

3. Schritt: Validierungshauptuntersuchung

Die Validierungshauptuntersuchung sollte im Rahmen eines Experiments unter Einbeziehung von **8, 12 oder 16 Platten** durchgeführt werden. Planung und Auswertung las-

sen sich allerdings mit Standard-Statistikpaketen nicht in befriedigender Weise realisieren. Grundsätzlich wird jedoch die folgende Vorgehensweise vorgeschlagen:

Zunächst wird ein Plan zur Behandlung der $n = 8, 12$ oder 16 **Platten** formuliert, wobei die Anwendung eines teilfaktoriellen Planes ratsam ist. Damit lassen sich die Haupteffekte von maximal $n - 1 = 7, 11$ bzw. 15 Faktoren erfassen, wenn diese jeweils 2 Stufen aufweisen. Dieser Plan (outer array) beschreibt jeweils jene Arbeitsschritte, welche die Platte im ganzen betreffen (z.B. Art des Washers, Umgebungstemperatur o.ä.).

Innerhalb der Platten kann ebenfalls ein teilfaktorieller Plan eingesetzt werden, wobei grundsätzlich die beim 2. Schritt skizzierte Vorgehensweise angewandt werden kann, d.h. die den einzelnen Versuchsvarianten entsprechenden Proben des teilfaktoriellen Plans werden in randomisierter oder teilrandomisierter Weise auf die Platte verteilt. Im Unterschied zu Schritt 2 sind allerdings für das Hauptexperiment sowohl Standards als auch aufgestockte Proben (sechs Konzentrationsniveaus) zu berücksichtigen. Schließlich empfiehlt sich im Hauptexperiment die Durchführung von Doppelbestimmungen, wie sie auch in der Routine üblich sind.

Dieser innere Plan (inner array) kann beispielsweise die im Realprobenexperiment II verwendete Struktur aufweisen, wenn acht verschiedene Realproben ohne weitere Modifikationen untersucht werden sollen (**Abbildung 40**):

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	P 1	S 5	P 5	S 4	P 4	P 8	P 1	S 5	P 5	S 4	P 4	P 8
B	P 1	S 5	P 5	S 4	P 4	P 8	P 1	S 5	P 5	S 4	P 4	P 8
C	S 3	P 2	P 7	P 3	S 6	P 6	S 3	P 2	P 7	P 3	S 6	P 6
D	S 3	P 2	P 7	P 3	S 6	P 6	S 3	P 2	P 7	P 3	S 6	P 6
E	P 5	S 0	P 1	S 3	P 8	P 4	P 5	S 0	P 1	S 3	P 8	P 4
F	P 5	S 0	P 1	S 3	P 8	P 4	P 5	S 0	P 1	S 3	P 8	P 4
G	S 2	P 6	P 3	P 7	S 1	P 2	S 2	P 6	P 3	P 7	S 1	P 2
H	S 2	P 6	P 3	P 7	S 1	P 2	S 2	P 6	P 3	P 7	S 1	P 2

Abb. 40: Pipettierschema für den „inneren Plan“

Eine umfassende Bewertung erfordert eine spezielle statistische Analyse der Gesamtheit aller Ergebnisse. Hierzu sind spezielle Algorithmen erforderlich, wie sie allerdings in Standard-Statistikpaketen nicht verfügbar sind. Für eine Vorabauswertung bietet sich jedoch folgende Vorgehensweise an:

1. Um mögliche Platteneffekte zu erfassen, können für jeden Probentyp (z.B. S1, S2, usw.) separate Regressionsanalysen durchgeführt werden.
2. Um mögliche Effekte innerhalb der Platten zu erfassen, bietet es sich an, mittels der 4-Parameter-Methode, die in der Auswerte-Software handelsüblicher Mikrotiterplattenreader verfügbar ist, auf Basis der Standards zunächst eine plattenspezifische Kalibrierkurve zu bestimmen, um daraus für jeden Einzelversuch die zugehörige Konzentrationsschätzung vorzunehmen. Man bildet nun die Differenz zwischen den logarithmierten Sollkonzentrationen und ihren Schätzwerten, um diese ebenfalls regressionsanalytisch zu untersuchen, d.h. man formuliert ein Modell, um geometrische Platteneffekte oder weitere Einflussgrößen zu identifizieren.

4. Schritt: Berechnung der Validierungsparameter

Die Validierungshauptuntersuchung beinhaltet eine umfassende statistische Analyse, bei der in der Regel ein Statistiker beteiligt werden sollte. Im Ergebnis erhält man:

1. ein Kalibrierungsmodell, in dem neben den üblichen vier Parametern gegebenenfalls weitere Parameter (z.B. Spalteneffekt) berücksichtigt sind
2. eine Übersicht über die relevanten Stör- und Einflussfaktoren sowie die von diesen verursachten Effekte
3. eine Übersicht über jene Bedingungen (z.B. zulässige Matrix, Klimatisierung des Labors), welche vorausgesetzt werden müssen, um eine bestimmte Leistungsfähigkeit (bzgl. Sensitivität und Selektivität) des Immunoassays gewährleisten zu können

4. Nachweis- bzw. Bestimmungsgrenze
5. eine Powerfunktion, welche Auskunft darüber gibt, in welchem Konzentrationsbereich ein statistisch gesicherter Nachweis des Analyten möglich ist.
6. Angaben zur Streuung der Messergebnisse innerhalb und zwischen den Platten

Die einzelnen Punkte wurden beispielhaft bei den beschriebenen Experimenten behandelt.

5 Schlussfolgerungen und Ausblick

In diesem Projekt wurde gezeigt, dass Messungen mittels Immunoassays stark von der Auftragsposition einer Probe auf der Mikrotiterplatte, der Pipettiersequenz, der Temperatur sowie der Fachkompetenz des Bearbeiters beeinflusst werden können. Bei anderen Immunoassays sind möglicherweise weitere Einflussfaktoren relevant, so dass zunächst festgehalten werden muss, dass es nicht möglich ist, ein verallgemeinerungsfähiges Validierungsprotokoll, anhand der Untersuchung eines Testkits für einen speziellen Analyten abzuleiten.

1) Bedarf an Untersuchungen anhand weiterer Testkits

Gemäß den Anforderungen der Europäischen Kommission und anderer internationaler Organisationen, die sich mit der Validierung von Testmethoden beschäftigen, hat die Validierung und besonders die Berechnung der Nachweisgrenze alle relevanten Fehlerquellen mit einzubeziehen. Es erscheint somit erforderlich, durch weitere umfassende Validierungsstudien das vorgeschlagene Konzept zu optimieren und eine standardisierte Validierungsprozedur zu entwickeln.

2) Bedarf an Spezialsoftware

Umfassende Validierungsuntersuchungen erfordern die Realisierung **effizienter (D-optimaler) multifaktorieller Versuchspläne**, wobei sich der Einsatz dieser Techniken auch empfiehlt, um vor der eigentlichen Validierung nach dem Vorbild der Optimierung industrieller Fertigungsprozesse eine systematische multifaktorielle Optimierung der Analysenprozedur zu erreichen.

Da die Struktur dieser Pläne je nach Anzahl der Faktoren, nach Anzahl der Faktorstufenkombinationen und nach den zu berücksichtigenden Nebenbedingungen variiert, wäre eine große Hilfe für die Anwender des Validierungskonzepts, wenn eine geeignete **Software zur Versuchsplanung der Validierungsuntersuchungen** zur Verfügung stünde. Diese sollte bei Eingabe der Anzahl der Einflussfaktoren und der zu prüfenden Niveaus direkt die Zahl der zu untersuchenden Mikrotiterplatten inklusive der Pipettierschemata liefern.

Festzuhalten ist außerdem, dass zur **Auswertung der Validierungsuntersuchungen**, insbesondere zur Berechnung der Validierungsparameter (4. Schritt im Abschnitt 4.7), wie der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen und der „Power-Funktion“ umfassende statistische Analysen erforderlich sind, wofür eine praktikable Software nicht kommerziell verfügbar ist. Diese Software müsste insbesondere in der Lage sein, anwendungsspezifische Nachweisgrenzen und entsprechende Powerfunktionen zu berechnen, welche den Anteil der falsch-negativen Messungen mit Hilfe eines umfassenden Messunsicherheits-Modells (UOM model; UOM = Uncertainty of Measurement) ausdrücken. Im Kontext des Validierungskonzepts wird der Immunoassay nicht isoliert betrachtet, sondern auch die Fehler, die bei Routinemessungen zu erwarten sind, wie Matrixeffekte, Pipettierfehler, Temperatureffekte etc., einbezogen.

Auch für Routinemessungen mit Immunoassays gilt, dass diese sehr stark durch den Auftragungsort der Proben auf der Mikrotiterplatte und die Pipettiersequenz bestimmt sein können. Daher empfiehlt sich zur Bestimmung der Konzentrationswerte der Einsatz einer multivariaten nichtlinearen Kalibrierung unter Einbeziehung relevanter Einflussfaktoren wie Pipettiersequenz und Plattengeometrie (Multilevel-Kalibrierung). Es konnte gezeigt werden, dass hierdurch eine deutliche Absenkung der Nachweisgrenze um bis zu 90% möglich ist und damit eine verbesserte Empfindlichkeit des Tests erreicht werden kann. Die o.g. Software sollte auch dies in einer für den gelegentlichen Anwender verständlichen Weise leisten.

Als weiteren sinnvollen Bestandteil sollte diese Software die Führung und Auswertung von Kontrollkarten erlauben. Vielfach hat sich gezeigt, dass auch bei der Anwendung von Immunoassays systematische Fehler oft sehr leicht anhand von Unstetigkeiten in den Kontrollkarten zu entdecken sind. Eine direkte Übernahme von Assaydaten in Kontrollkarten wäre daher eine wichtige, arbeitserleichternde Funktion einer umfassenden Validierungssoftware.

3) Vorteile einer Automatisierung

Da sich bei der Auswertung der Ergebnisse dieses Vorhabens die Nachweisgrenze als stark vom Pipettierschema, der Fachkompetenz und der Laborumgebung abhängig er-

wiesen hat, und da festgestellt wurde, dass die manuelle Probenbearbeitung große analytische Fehler verursachen kann, erscheint ein automatischer Probenauftrag insbesondere dann unvermeidbar, wenn sehr niedrige Nachweisgrenzen garantiert werden sollen und daher komplizierte (randomisierte) Pipettierschemata erforderlich sind. Eine automatische Arbeitsstation zur Standardisierung von Immunoassays könnte dabei einen wichtigen Schritt leisten, um Störungen so weit als möglich zu eliminieren bzw. um sie so exakt zu bestimmen, dass sie auf mathematischem Wege kompensiert werden könnten.

4) Informationsforum

Um den Informationsaustausch zwischen Anwendern von Immunoassays insbesondere zum Thema Validierung zu verbessern, empfehlen wir die Einrichtung einer **Internet-Homepage zu diesem Thema**. Dabei sollte es sich nicht nur um ein eindimensionales Informationsangebot handeln (Problem: Wer betreut dieses über die Jahre?), sondern besser um ein offenes **Diskussionsforum** („Newsgroup“) handeln, in dem ein Austausch stattfinden kann, wie Anwender mit dem Validierungskonzept zurechtkommen, welche Wünsche und Anregungen es dazu gibt und welche Ergebnisse erzielt wurden. Die Erfahrungen mit derartigen Angeboten zeigen, dass dies am besten in Form eines betreuten Forums gelingt (vgl. z.B. www.analytik.de), wobei es schwierig sein kann, eine betreuende Instanz zu finden. Denkbar ist die Ansiedlung des Diskussionsforums z.B. bei den Herstellern von Immunoassay-Testkits, kommerziellen oder universitären Statistikfachleuten oder aber den Herstellern von Validierungssoftware.

Im Hinblick auf die derzeit noch geringe Anwenderzahl für Immunoassays im Umweltbereich ist es kaum vorstellbar, dass die Beauftragung der o.g. Arbeiten durch die Industrie oder öffentliche Einrichtungen (Untersuchungsämter) erfolgt. Andererseits verhindert die unzureichenden Erfahrungen in der Validierung von Immunoassays eine größere Verbreitung der Tests. Der Bund und seine forschungsfördernden Institutionen könnten hier einen wichtigen Beitrag zur besseren Akzeptanz und sachgerechten Anwendung immunchemischer Analysenverfahren im Umweltbereich leisten.

6 Zusammenfassung

Im F+E-Vorhaben wurde ein Validierungskonzept für Immunoassays, einem kostengünstigen Nachweisverfahren, erarbeitet und als Anwendungsbeispiel die Validierung eines ELISA-Testkits für das Getreideherbizid Isoproturon durchgeführt.

Das Vorhaben griff damit eine wichtige Problematik auf, da über den Nutzen immunchemischer Nachweisverfahren in der Umweltanalytik zwar Konsens besteht, es leider aber an validierten Testmethoden mangelt bzw. überhaupt keine allgemein anerkannten und praktikablen Validierungskonzepte vorliegen.

Die Grundlage für die Validierungsuntersuchungen war das Messunsicherheitskonzept (EURACHEM, 1998). Das Ergebnis sollte ein Konzept zur laborinternen Validierung (in-house validation) sein, welches direkt in Qualitätssicherungsprozeduren analytischer Laboratorien Eingang finden könnte.

In einer Vorstudie am Umweltbundesamt hatte sich ergeben, dass Matrixeffekte (Schwermetalle, Tenside und Huminsäuren etc.) nur einen geringen Einfluss auf das Ergebnis des geprüften Immunassays für die Bestimmung von Isoproturon in Wasser hatten. Daher wurden Matrixeffekte in dieser Studie nicht systematisch, sondern anhand der Analyse von Realproben und Vergleich der Ergebnisse mit einem chromatographischen Referenzverfahren (HPLC/UV gemäß DIN EN ISO 11369:1997) erfaßt.

Relevante Varianzfaktoren für eine erste Versuchsreihe wurden aus einem bereits vorliegenden Datensatz von über 250 Platten eines Triazin-ELISAs isoliert (Typ B-Ermittlung von Unsicherheit nach dem EURACHEM-Guide). Anhand dieser Daten wurde ein Modell für die deskriptive Analyse der Kalibrierfunktion erarbeitet. Es zeigte sich, dass als Schätzwert für die Unsicherheit des Konzentrationsergebnisses die Streuung (Standardabweichung) der logarithmierten optischen Dichte, $\ln(\text{OD})$, verwendet werden kann.

Als wichtigste Varianzkomponenten (uncertainty components) innerhalb einer Platte wurden die Raumtemperatur als auch die Position der Probe bzw. der Kalibrierstandards auf der Platte ermittelt.

In den Experimenten "Temperatur" und "Trend" wurden diese Unsicherheitsfaktoren quantifiziert, wobei die Effekte auch in ihren Wechselwirkungen durch einen hierar-

chisch geschachtelten fraktionierten faktoriellen Versuchsplan untersucht wurden (Typ A-Ermittlung von Unsicherheit). Zur Minimierung ihres Einflusses empfiehlt sich ein Arbeiten bei relativ niedriger Raumtemperatur ($< 19\text{ }^{\circ}\text{C}$), in einem klimatisierten Raum, ein weitgehend randomisierter Probenauftrag sowie die Einhaltung eines definierten Zeitschemas beim Probenauftrag, damit eine rechnerische Kompensation der Ortsabhängigkeit der Ergebnisse quer über die Mikrotiterplatte möglich wird. Ein mathematisches Modell hierzu wurde entwickelt.

Aufgrund der Erfahrungen in den ersten Experimenten wurden in einer weiteren Versuchsreihe der Einfluß des Personals und bestimmter technischer Hilfsmittel untersucht. Die Qualifikation und die Erfahrung des Personals im Arbeiten mit Immunoassays hatte einen signifikanten Einfluss auf das Analysenergebnis. Der Einsatz eines automatischen Washers und von Mikroliterpipetten verringerten die Streuung der Analysenergebnisse und werden deshalb für den Routineeinsatz empfohlen.

Parallel dazu wurden in zwei Messkampagnen Oberflächengewässerproben untersucht. Hier ergab sich eine gute Übereinstimmung der Ergebnisse des ELISA-Tests mit dem Referenzverfahren. Matrixeffekte und größere systematische Abweichungen waren nicht nachweisbar.

Es wurde ferner ein In-house Validierungskonzept in mehreren Schritten vorgeschlagen, welches ein Kalibrierungsmodell beinhaltet, das über die 4-Parameter-Funktion hinausgeht. Es liefert darüber hinaus eine Übersicht über Stör- und Einflußfaktoren mit einer Abschätzung ihres Beitrages zur Messunsicherheit und eine Powerfunktion, die Auskunft darüber gibt, in welchem Konzentrationsbereich ein statistisch abgesichertes Ergebnis erhalten werden. Es erlaubt ebenso die Ermittlung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze.

7 Literaturverzeichnis

7.1 Zitierte Literatur

- APHA (1989): *Standard methods for examination of water and wastewater*. American Public Health Association, Washington, DC, USA
- BEN REJEB S, FISCHER-DURAND N, MARTEL A, LE GOFFIC F, LAWRENCE JF, YEUNG JM, ABBOTT MA (1998): *Development and validation of an indirect enzyme immunoassay for the detection of the herbicide isoproturon in water matrices*. Intern J Environ Anal Chem 69: 13-30
- BERZOFSKY JA, SCHECHTER AN (1981): *The concept of crossreactivity and specificity in immunology*. Mol Immunol 18: 751-63
- BUNCH DS, ROCKE DM, HARRISON RO (1990): *Statistical design of ELISA protocols*. J Immunol Meth 132: 247-54
- BUSHWAY RJ, PERKINS LB, FUKAL L, HARRISON RO, FERGUSON BS (1991): *Comparison of enzyme-linked immunosorbent assay and high-performance liquid chromatography for the analysis of atrazine in water from Czechoslovakia*. Arch Environ Contam Toxicol 21: 365-70
- DANKWARDT A, PULLEN S, RAUCHALLES S, KRAMER K, JUST F, HOCK B, HOFMANN R, SCHEWES R, MAIDL FX (1995): *Atrazine residues in soil 2 years after the atrazine ban - a comparison of enzyme-immunoassay with HPLC*. Anal Lett 28: 621-34
- DELAAGE M, COMPIANO JM, BARBET J, ARTUS A, PRINCE P (1992): *Statistical properties of immunoanalytical system*. J Immunol Meth 150: 103-110
- DFG (2000): *Validierung der Verfahren zur Rückstandsanalyse von Pflanzenschutzmitteln*. Senatskommission zur Beurteilung von Stoffen in der Landwirtschaft (Hrsg.). Wiley-VCH, Weinheim 2000
- DIN EN ISO 11369 (1997): *Bestimmung ausgewählter Pflanzenbehandlungsmittel. Verfahren mit der Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie mit UV-Detektion nach Fest-Flüssig-Extraktion*. Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung. Gruppe F: Gemeinsam erfassbare Stoffgruppen, F12. Normenausschuss Wasserwesen (NAW) im DIN Deutsches Institut für Normung e.V. (Hrsg.), 41. Lieferung 1998
- DIN V 38415-T2 (1995): *Rahmenbedingungen für selektive Immuntestverfahren (Immunoassays) zur Bestimmung von Pflanzenbehandlungs- und Schädlingsbekämpfungsmitteln*. Deutsche Einheitsverfahren, Gruppe T: Suborganismische Testverfahren, T2. Normenausschuss Wasserwesen (NAW) im DIN Deutsches Institut für Normung e.V. (Hrsg.), Dezember 1995
- DUDLEY RA, EDWARDS P, EKINS RP, FINNEY DJ, MCKENZIE GM, RAAB GM, RODBARD D, RODGERS RPC (1985): *Guidelines for immunoassay data processing*. Clin Chem 31: 1264-71
- EIKENBERG O (2000): *Validierung immunochemischer Test-Kits zum Nachweis von 2,4,6-Trinitrotoluol (TNT) in Boden*. Dissertation. TU München 2000
- EKINS R (1981): *The "precision profile": its use in RIA assessment and design*. Ligand Quarterly 4: 33-44

- EURACHEM (1998): *Die Ermittlung der Meßunsicherheit in der Analytischen Chemie. „Quantifying uncertainty in analytical measurement“*. EURACHEM 1998
- FALLER C, PODESTAT, HÄDRICH J, SENN J, DIEHL Y (1998): *Detection and quantification of progesterone in serum samples using enzyme-linked immunoassay (ELISA)*. Dt Lebensm-Rundsch 94: 9-12
- FERGUSON BS, FLEEKER JR, COOK LW (1990): *The detection of triazines at part per trillion levels in ground, surface and municipal water by enzyme immunoassay and correlation with gas chromatography*, ImmunoSystems Corp., Biddeford, U.S., Firmenschrift.
- FISCHER P, BACH M, FREDE H-G (1995): *Gewässergefährdung durch Applikationseinträge von Pflanzenschutzmitteln*. Wasserwirtschaft 85: 592 - 5
- FLEEKER JR, COOK LW (1991): *Reliability of commercial enzyme immunoassay in detection of atrazine in water*, in: Immunoassay for trace chemical analysis. M. Vanderlaan, L.H. Stanker, B.E. Watkins, D.W. Roberts (eds.), ACS Symp Ser 451, Chpt. 7, pp. 78-85, ACS, Washington 1991
- FLEMING J, ALBUS H, NEIDHART B, WEGSCHEIDER W (for the EURACHEM Education and Training Working Group) (1997): *Glossary of analytical terms (VII): limit of determination, sensitivity, limit of detection*. Accred Qual Assur 2: 51-2
- GÖHRE T (1999): *Validierung von Immunoassays in der Umweltanalytik am Beispiel von Isoproturon in Wasser*. Diplomarbeit. Fachbereich Chemie, Freie Universität Berlin (Betreuung: Dr. P. Lepom, Dr. S. Uhlig)
- GOOLSBY DA, THURMAN EM, CLARK ML, POMES ML (1990): *Immunoassays as a screening tool for triazine herbicides in streams. Comparison with gas chromatographic-mass spectrometric methods*, in: Immunoassays for trace chemical analysis. ACS Symp Ser 451, M Vanderlaan, LH Stanker, BE Watkins, DW Roberts (eds.), 86-99, ACS, Washington 1990
- GOWIK P, JÜLICHER B, UHLIG S (1998a): *In-house-Validierung in der Spurenanalytik* Nachr Chem Tech Lab 46: 841-844
- GOWIK P, JÜLICHER B, UHLIG S (1998b): *Multi-residue method for non-steroidal anti-inflammatory drugs in plasma using high-performance liquid chromatography photodiode-array-detection – Method description and comprehensive in-house validation*. J Chrom B 716: 221-232
- GOWIK P, JÜLICHER B, UHLIG S (1998c): *In-house-Validierung in der Spurenanalytik (Antwort auf Leserbrief)*. Nachr Chem Tech Lab 47: 49
- HÄDRICH J, VOGELGESANG J (1996): *Further development of methods according to DFG and DIN 32645 with respect to analytic practice*. Dt Lebensm-Rundsch 92: 341-50
- HÄDRICH J (1997a): *Quality assurance guideline: Validation of analytical methods. 1. Definitions and description of the validation strategy*. Dt Lebensm-Rundsch 93: 205-12
- HÄDRICH J (1997b): *Quality assurance guideline: Validation of analytical methods. 2. Practical example*. Dt Lebensm-Rundsch 93: 282-84
- HAHNAU S, JÜLICHER B (1996): *Evaluation of commercially available ELISA test kits for the detection of clenbuterol and other beta-2-agonists*. Food Addit Contam 13: 259-74

- HAMMOCK BD, LI QX, GEE SJ, MCCHESENEY MM, SEIBER JN (1989): *Comparison of an enzyme-linked immunosorbent assay and a gas chromatographic procedure for the determination of molinate residues.* Anal Chem 61: 819-2
- HARRISON RO, BRAUN AL, GEE SJ, O'BRIEN DJ, HAMMOCK BD (1989): *Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the direct analysis of molinate (Ordram) in rice field water.* Food Agric Immunol 1: 37-51
- HOCK B, HANSEN P-D, KANNE R, MÜLLER G, KROTZKY A, OBST U, OEHMICHEN U, SCHLETT C, SCHMID R, KRÄMER P, WEIL L (1991a): *Enzyme immunoassays for the determination of s-triazines in water samples: two interlaboratory tests.* Anal Lett 24: 529-49
- HOCK B, HANSEN P-D, KANNE R, KROTZKY A, OBST U, OEHMICHEN U, SCHLETT C, SCHMID R, WEIL L (1991b): *Anwendung von Enzymimmunoassays zur Bestimmung von s-Triazininen in Wasserproben: Vergleichsuntersuchungen von 13 Laboratorien.* Z Wass Abwass Forsch 24: 20-5
- HUBER W (1991): *Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze: Definitionen und Bedeutung.* Nachr Chem Tech Lab 39: 1007-11
- ISO (1993): *Guide to the expression of uncertainty in measurement*, 2nd edition, ISO, IED, OIML, BIPM, IFCC, IUPAC, IUPAP (eds.), Geneva 1993
- JÜLICHER B, GOWIK P, UHLIG S (1998): *Assessment of detection methods in trace analysis by means of a statistically based in-house validation concept.* Analyst 123: 173-79
- KADIS R (1998): *Evaluating uncertainty in analytical measurements: the pursuit of correctness.* Accred Qual Assur 3: 237-41
- KATMEH MF, FROST G, AHERNE W, STEVENSON D (1994): *Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for isoproturon in water.* Analyst 119: 431-5
- KEUCHEL C, WEIL L, NIESSNER R (1992a): *Enzyme-linked immunosorbent assay for the determination of 2,4,6-Trinitrotoluene and related nitroaromatic compounds.* Anal Sci 8: 9-12
- KEUCHEL C, WEIL L, NIESSNER R (1992b): *Development of an enzyme immunoassay for the determination of 2,4,6-Trinitrotoluene - probing the influence of humic acids*, in: International Conference on Monitoring of Toxic Chemicals and Biomarkers, T. Vo-Dinh, K. Camman (eds.), Proc SPIE 1716
- KRÄMER PM (1998): *A strategy to validate immunoassay test kits for TNT and PAHs as a field screening method for contaminated sites in Germany.* Anal Chim Acta 376: 3-11
- KRÄMER PM, GOODROW MH, BARSİ E, KETTRUP AA, HAMMOCK BD (1999): *Development of a polyclonal antibody-based ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) for the determination of isoproturon.* Poster. XIVth International Plant Protection Congress, 25.- 30. Juli 1999, Jerusalem, Israel
- KROTZKY AJ, ZEEH B (1995): *Immunoassays for residue analysis of agrochemicals: proposed guidelines for precision, standardization and quality control.* Pure Appl Chem 67: 2065-88
- KÜPPERS S (1997): *The application of the measurement uncertainty concept to in-process control in pharmaceutical development.* Accred Qual Assur 2: 30-5

- LAMBRECHT D, SCHNEIDER RJ (1996): *Chromatographic and immunological techniques used complementarily for the determination of triazine herbicides in soil and water*. EUROANALYSIS IX, Bologna 1996, Book of Abstracts, Fr P 47
- LEUCHS W, NIESSNER M, VAN BERK W, SKARK C, OBERMANN P (1990): *Vorkommen von Pflanzenbehandlungs- und Schädlingsbekämpfungsmitteln in Grundwässern Nordrhein-Westfalens und Folgerungen für Sanierungskonzepte*. Wasser + Boden 3: 131-7
- LIEGEOIS E, DEHON Y, DE BRABANT B, PERRY P, PORTETELLE D, COPIN A (1992): *ELISA test, a new method to detect and quantify isoproturon in soil*. Sci Total Environ 123: 17-28
- MASTROROCCHO D, BRODSKY M (1990): *Recommendations on test kit methods: task force report*. J AOAC 73: 331-2
- MILLER JJ, VALDES JR. R (1992): *Methods for calculating crossreactivity in immunoassays*. J Clin Immunoassay 15: 97-107
- MOUVET C, BROUSSARD S, RIOLLAND H, BARAN N, ABUKNESHA R, ISMAIL G (1997): *Evaluation of ELISA microtiter plate-based assay for the direct determination of isoproturon in water samples and soil extracts*. Chemosphere 35: 1099-1116
- REICHERT N, VIETHS S, FRIESEL P, KERNDORFF H (1988): *Literaturstudie zur Anwendbarkeit immunochemischer Methoden in der Pflanzenschutzmittel- und Umweltanalytik*. Institut für Wasser-, Boden- und Lufthygiene des Bundesgesundheitsamtes (Hrsg.), WaBoLu-Heft Nr. 3/1987, Berlin 1988
- RODBARD D (1974): *Statistical quality control and routine data processing for radioimmunoassays and immunoradiometric assays*. Clin Chem 20: 1255
- RODBARD D (1981): *Mathematics and statistics of ligand assays: an illustrated guide*, in: Ligand Assay, J Langan, JJ Clapp (eds.), Kap. 3, 45-101, Masson Publishing, New York 1981
- RODGERS RPC (1984): *Data analysis and quality control of assays: a practical primer*, in: Clinical Immunoassays: The state of the art. WR Butt (Hrsg.), Marcel Dekker, New York 1984
- RUBIO FM, LAWYUK TS, SCUTELLARO AD, LACHMAN CE, SANDBERG RG, HERZOG DP (1991): *Evaluation of a RaPID atrazine immunoassay*. Poster at the 105th AOAC Annual International Meeting and Exposition, Phoenix 1991
- ROHRER C, WEGSCHEIDER W (1994): *Computerunterstützung für die Methodvalidierung in der analytischen Chemie*. GIT Fachz Lab: 688-91
- RUBIO FM, ITAK JA, SCUTELLARO AM, SEISKER MY, HERZOG DP (1991): *Performance characteristics of a novel magnetic-particle-based enzyme-linked immunosorbent assay for the quantitative analysis of atrazine and related triazines in water samples*. Food Agric Immunol 3: 113-25
- RUPPERT T, SCHNEIDER R, WELLER M, WEIL L, NIESSNER R (1990): *Influence of ions, high-molecular components and organic solvents on enzyme-linked immunosorbent assays for herbicides in water*. Abstract. Poster at "Seventh International Congress of Pesticide Chemistry", Hamburg
- RUPPERT T, WEIL W, NIESSNER R (1992): *Influence of water contents on an enzyme immunoassay for triazine herbicides*. Vom Wasser 78: 387-401

- SCHNEIDER, RJ (1993): *Einsatz von Immunoassays in der Rückstandsanalytik von Pflanzenschutzmitteln - insbesondere Triazinherbiziden - im Boden*. Dissertation. Lehrstuhl für Hydrochemie, Hydrogeologie und Umweltanalytik der Technischen Universität München
- SCHNEIDER RJ, RUPPERT T, WELLER M, WEIL L, NIESSNER R (1990): *Comparison of results obtained from enzyme immunoassay and gas chromatography in the determination of some herbicide residues in both water and soil*. Fresenius J Anal Chem 337: 74-5
- SCHNEIDER RJ, WEIL L, NIESSNER R (1992): *Identification of two triazine herbicides in top soil layers using immunoassays of different selectivity*. Fresenius J Anal Chem 343: 145-6
- SCHNEIDER RJ, WEIL L, NIESSNER R (1993): *ELISA und Kapillar-Gaschromatographie: zwei sich ergänzende Methoden in der Bodenanalytik*. Abstract. Poster bei der ANAKON '93, Baden-Baden
- SCHNEIDER RJ, DÜREN-LANCASTER B, WOLLWEBER A (2000): *Dynamik von Pflanzenschutzmitteln im Boden: Räumliche Erfassung durch moderne Hilfsmittel (ELISA, GIS)*. Schriftenreihe des Lehr- und Forschungsschwerpunkts "Umweltverträgliche und Standortgerechte Landwirtschaft" der Landwirtschaftlichen Fakultät, Universität Bonn: im Druck
- SCHNEIDER RJ, WOLLWEBER A, DÜREN-LANCASTER B (1998): *Balancing the fate of pesticides applied in a watershed area by immunochemical screening*. Intern J Environ Anal Chem: 70: 59-74
- UHLIG S, LISCHER P (1998): *Statistically based performance characteristics in laboratory performance studies*. Analyst 123: 167-172
- ULRICH P, WELLER M, WEIL L, NIESSNER R (1991): *Optimierung der immunologischen Bestimmung von Triazin-Herbiziden im Wasser mit Hilfe unterschiedlicher Enzymtracer*. Vom Wasser 76: 251-66
- VAN DER VEEN AMH, BROOS AJM, ALINK A (1998): *Relationship between performance characteristics obtained from an interlaboratory study programme and combined measurement uncertainty: a case study*. Accred Qual Assur 3: 462-67
- VOGELGESANG J, HÄDRICH J (1998a): *In-house Validierung in der Spurenanalytik (Leserbrief)*. Nachr Chem Tech Lab 46: 1099
- VOGELGESANG J, HÄDRICH J (1998b): *Limits of detection, identification and determination: a statistical approach for practitioners*. Accred Qual Assur 3: 242-55
- WEIL L, NIESSNER R, SCHNEIDER R, RUPPERT T, WELLER M (1995): *Validation of Immunoassay for Determination of Triazine Herbicides*, DFG Research Report "Immunochemical Detection of Pesticides". Deutsche Forschungsgemeinschaft (Hrsg.), VCH, Weinheim, S. 43-62
- WIEDMAN SS, TOWNSEND CA, DAUTLICK JX, HERZOG DP (1991): *Inter- versus intra-laboratory evaluation of an atrazine EIA*. Poster at the 105th AOAC Annual International Meeting and Exposition, Phoenix 1991

7.2 Eigene Veröffentlichungen und Präsentationen

Vorträge:

R. J. Schneider:

Analytical Artefacts Occurring During Environmental Immunoanalysis
1st Workshop on Environmental Analytical Artefacts,
Weissenkirchen/Österreich, 1. – 2. März 1999

R. J. Schneider:

(In) Haus-Validierung von Immunoassays am Beispiel der Bestimmung von Isoproturon in Wasser. Teil I: Versuchsplanung und Detailanalysen
DFG-Workshop „Anwendung von Immunoassays in der Rückstandsanalytik von Pflanzenschutzmitteln“, BASF AG, Agrarzentrum Limburgerhof, 3./4. November 1999

S. Uhlig:

In-house Validierung: Isoproturon mit ELISA. Teil II: Statistische Analysen
DFG-Workshop „Anwendung von Immunoassays in der Rückstandsanalytik von Pflanzenschutzmitteln“, BASF AG, Agrarzentrum Limburgerhof, 3./4. November 1999

M. Becher:

Validierung von Immunoassays. Graduiertenseminar des Agrikulturchemischen Instituts der Universität Bonn, 17. Juni 1999

Poster:

R. J. Schneider, M. Becher, S. Uhlig, P. Lepom, H. E. Goldbach:

In-house-Validierung und Uncertainty-Komponenten bei Pestizid-Immunoassays.
ANAKON '99, Konstanz 7. – 10. April 1999
(Dieses Poster wurde im Rahmen der ANAKON '99 von der GDCh prämiert.)

R. J. Schneider, M. Becher, H. E. Goldbach, P. Lepom, S. Uhlig:

Identification of major sources of biased results with immunoassays.
Immunochemical Methods for the 21st century: Immunochemistry Summit VIII,
219th National Meeting of the American Chemical Society (ACS),
San Francisco, 26. – 30. März 2000

Veröffentlichungen:

SCHNEIDER RJ, UHLIG S, LEPOM P, BECHER M., GOLDBACH HE: *Evaluation of uncertainty components with immunoassays for water analysis*. Fresenius J. Anal. Chem., in Vorbereitung

Verzeichnis erhältlichlicher Anhänge

(beim Projektleiter anzufordern)

- Anhang 1: Statistische Analysen zur Validierung neuer kostengünstiger Nachweisverfahren (Immunoassay) für Pestizide
Autor: PD Dr. habil. S. Uhlig
- Anhang 2: Isoproturon Platten ELISA-Test
Autorin: Dipl.-Ing. agr. M. Becher
- Anhang 3: Verfahren zur Bestimmung von Isoproturon in Wasser mittels Hochauflösungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC) und UV-Detektion nach Fest-Flüssig-Extraktion (Fest-Phasen-Extraktion)
Autorin: Dipl.-Ing. agr. M. Becher
- Anhang 4: Zusammenfassung der Experimente in Berlin
Autorin: Dipl.-Ing. agr. M. Becher
- Anhang 5: Bericht zum Projekt „Validierung kostengünstiger Nachweisverfahren“ (UBA)
Autorin: Dipl.-Ing. agr. M. Becher
- Anhang 6: Kopien der Poster und Vortragsfolien
- a) San Francisco
 - b) Konstanz
 - c) Limburgerhof Schneider
 - d) Limburgerhof Uhlig
 - e) Weissenkirchen