Methodenvalidierung in der Analytik

Stavros Kromidas, Blieskastel
(www.kromidas.de)

Zum Dokument

Die Methodenvalidierung ist ein wichtiges Instrument der Qualitätssicherung. Sie soll Auskunft darüber geben, ob eine Analysenmethode geeignet ist, eine vorgegebene spezifische Aufgabe zu erfüllen. Umfang und Durchführungsmodus einer Validierung hängen vom beabsichtigten Zweck ab.
Dieses Dokument stellt in vereinfachter und komprimierter Form die einzelnen Validierungselemente vor und zeigt pragmatische Wege zur Durchführung.

Leser*, die an detaillierten Ausführungen interessiert sind, seien auf die Literatur am Ende des Dokumentes verwiesen.

*Aus Gründen der Vereinfachung wird ausschließlich die männliche Form verwendet. Personen jedweden Geschlechts sind darin gleichermaßen eingeschlossen.

Inhaltsangabe

Thema	Seite
Was versteht man unter Validierung?	2
Validierung und Analytik	2
Validierungselemente und deren Überprüfung	4
Richtigkeit	4
Selektivität	4
Wiederfindungsrate	5
Präzision	6
Genauigkeit	6
Linearität	7
Nachweis- und Bestimmungsgrenze	7
Robustheit	8
Umfang der Methodenvalidierung	9
Grundbegriffe der Methodenvalidierung, Kurzdefinitionen	9-12

Fließschemata: Umfang der Methodenvalidierung in der Analytik 13-16

Beispiel: Methodenvalidierung von Identitätstests 17

Qualitätsregelkarten 18-21

Trends auf dem Gebiet der analytischen Validierung 21-22

Literaturliste und Regelwerke zum Thema 23-24

Was versteht man unter Validierung?

Begriffsbeschreibung Validierung

Unter Validierung versteht man den Nachweis und die Dokumentation der Zuverlässigkeit einer Methode. Die Definition nach DIN ISO 8402 lautet: *Bestätigen aufgrund einer Untersuchung und durch Bereitstellung eines objektiven Nachweises, dass die besonderen Forderungen für einen speziellen beabsichtigten Gebrauch erfüllt worden sind*. Diese Definition ist sehr allgemein gehalten und lässt dem Fachmann freie Entscheidungsräume. Leider wird zunehmend seitens der Inspektoren und der Behörde bei Inspektionen oder Anmeldungen eine Liste mit Maximalforderungen stur „abgehakt“. Mit der Validierung beschäftigt man sich intensiver seit dem verstärkten Einzug von QS-Systemen in die Laboratorien.

Wer fordert Validierung

Besonders die Einführung der Akkreditierung nach EN 45001 und die Forderungen der amerikanischen Gesundheits- und Umweltbehörden (FDA, EPA), sowie die DIN EN ISO/IEC 17025: 2018 sind als Anstoß zu bewerten. Im Folgenden werden die Elemente der Validierung vorgestellt und eine pragmatische Umsetzung im analytischen Labor vorgestellt.

Validierung und Analytik

Es fehlt eine verbindliche Definition des Begriffes Validierung speziell für die Analytik, auch der Umfang wird unterschiedlich festgelegt. Bei Sucker[2)] finden sich sieben allgemeine Validierungsthesen. Für die Analytik abgewandelt, könnten diese Thesen wie folgt lauten:

Validierungsthesen für die Analytik

- Validierung ist ein Arbeitsinstrument zur Qualitätssicherung neben anderen wie SPC (Statistical Process Control)
- Validierung ist produkt- und zweckspezifisch auszuführen. Die Verantwortung über Ausmaß und Art liegt beim Analytiker
- Validierung heißt, das Notwendige tun, um eine Eskalation zu vermeiden. Alle kritischen Schritte müssen validiert werden, aber nicht wahl- und kritiklos alles
- Methodenvalidierung beginnt am Besten beim Endergebnis und geht im Analysenablauf bis zum ersten Schritt zurück
- Validierung kann nicht durch Abhaken von Resultaten mittels Checkliste erfolgen

- Nach Möglichkeit ist die statistische Relevanz und damit die Messunsicherheit zu ermitteln. Eine fehlerhafte Analytik („wahrer“ Wert) gibt es nicht
- Für Ergebnisse aus validierten Methoden sind Art und Häufigkeit der notwendigen Kontrollen festzulegen mit dem Ziel, den Gesamtanalysenaufwand zu minimieren, aber dennoch die erforderliche Ergebnissicherheit zu erzielen

statistische Daten

Im Rahmen der Validierung werden statistische Daten ermittelt. Oft muss der Anwender entscheiden, ob ein Wert nun ein Ausreißer ist oder nicht. Eine nicht zu empfehlende Praxis ist die subjektive Beurteilung. Nicht nur in einer Abteilung, sondern in ganzen Bereichen müssen objektive Kriterien zu einer Ja/Nein-Entscheidung

Ausreißer-tests

festgelegt und zwingend befolgt werden (z. B. mittels Dixon, Grubbs-Test oder 20% Abweichung vom Mittelwert). Sonst ist eine wichtige Voraussetzung für die Vergleichbarkeit von Ergebnissen nicht erfüllt.

Überprüfung des Messgeräts

Eine gute Methode kann nur in einem „guten“ Gerät „gute“ Ergebnisse liefern. Die Messpräzision, d. h. die Güte der verwendeten Apparatur muss bekannt sein. Diese kann durch entsprechende Gerätetests ermittelt werden. Die im Rahmen der Prüfmittelüberwachung durchzuführende Kalibrierung kann bei

Prüfmittel-überwachung

einfachen Geräten gegebenenfalls die aufwendigeren Gerätetests ersetzen. Auf die Gerätetests wird hier nicht näher eingegangen (siehe Dokument ALC 00297). In der Zwischenzeit bieten mehrere Hersteller entsprechende Softwaremodule an, welche die Durchführung dieser Tests erleichtern.

Verfahrens-validierung

Die Einbeziehung aller relevanten Einflüsse auf das Ergebnis (Probevorbereitung, Messung, Messgerät, Datengenerierung) wird durch den Begriff Verfahrensvalidierung unterstrichen. Doch scheint sich in der Analytik (vorerst) der Begriff „Methodenvalidierung“ durchgesetzt zu haben. Dennoch: Immer häufiger ist in jüngster Zeit von „Verfahren“ („process“) die Rede, siehe weiter unten „Trends auf dem Gebiet der Validierung“, siehe Seite 21.

kritische Schritte einer Validierung

Bei der Validierung sollten gerade die kritischen Schritte der Methode überprüft werden. Wenn möglich und sinnvoll, sollte in besonderen Fällen die Probenahme in die Methodenvalidierung aufgenommen werden. Eine nicht repräsentative Probe kann das Ergebnis einer sonst hervorragenden Methode zunichte machen. Hat der Anwender im Labor keinen Einfluss auf die Probenahme, so sollten diese und eventuell auch der Probetransport sowie die Lagerung genau beschrieben und dokumentiert werden.

Folgende Voraussetzungen gelten für die Methodenvalidierung:

- Der Zweck ist unmissverständlich definiert
- Die Validierung erfolgt unter realen und nicht unter optimalen Bedingungen
- Es liegt eine ausgereifte, bereits optimierte Methode schriftlich vor. Diese Forderung ist nicht immer realisierbar. In der Praxis sind oft Methodenentwicklung und einzelne Schritte der Validierung (Selektivität, Linearität, Robustheit) miteinander verknüpft
- Das Gerät hat eine bekannte und akzeptierte Präzision

(Messpräzision)
- Das Personal ist mit der Methode vertraut
- Die verwendeten Chemikalien (chromatographische Säulen, Referenzsubstanzen, Lösungsmittel, Reagenzien etc.) sind von guter (und bekannter) Qualität

Validierungselemente und deren Überprüfung

Maximal-umfang einer Validierung

Der Maximalumfang einer Validierung umfasst Richtigkeit, Präzision (Wiederhol-, Labor- und Vergleichspräzision), Linearität, Wiederfindungsrate, Selektivität, Robustheit, Nachweisgrenze und Bestimmungsgrenze. Der tatsächlich notwendige Umfang hängt von Art und Zweck der Analytik ab. Stellt beispielsweise die Selektivität in der Produktanalytik (bekannter Wirkstoff in einer bekannten Formulierung) vermutlich keinen außergewöhnlich kritischen Punkt dar, so ist deren Überprüfung in der Umweltanalytik (Identifizierung des Analyten) in oft komplexen und womöglich auch unbekannten Matrices schwierig jedoch eminent. Die Messpräzision und die Robustheit (Routinemethoden!) der Methode sind elementare Forderungen für jede Art von Analytik.

Richtigkeit

Richtigkeit

Die Richtigkeit ist ein Maß für die Abweichung des Messwertes vom richtigen Wert (manchmal als „wahrer“ Wert bezeichnet) aufgrund eines systematischen Fehlers.
Das Fehlen von systematischen Fehlern ist somit eine Grundvoraussetzung für die Richtigkeit. Weitere Voraussetzungen sind:
- Die Methode ist selektiv.
- Die Wiederfindungsrate beträgt nach jedem Schritt der Probenvorbereitung 100 % oder ist konstant oder bekannt und rechnerisch korrigierbar.

Prüfung auf Richtigkeit
- Vergleich mit einem Referenz- oder Arbeitsstandard (Soll/Ist-Vergleich)
- Vergleich mit einer unabhängigen, möglichst validierten Methode.
- Aufstocken („Spiken“ einer Probe)

Wenn bei bestimmten Proben (z. B. Wirkstoffe) keine der drei Methoden anwendbar ist, kann als Kriterium für die Richtigkeit folgendes gelten:
Die Selektivität ist erwiesen, Linearität ist vorhanden, und die Kalibriergerade geht durch den Nullpunkt

Selektivität

Oft werden die Begriffe Spezifität und Selektivität für den gleichen

Sachverhalt verwendet, daher sei hier die korrekte Definition der beiden Begriffe aufgeführt:

Spezifität

- Eine Methode arbeitet spezifisch, wenn sie *die zu bestimmende Komponente* ohne Verfälschung durch andere in der Probe vorhandenen Komponenten erfasst

Selektivität

- Eine Methode arbeitet selektiv, wenn sie *verschiedene, nebeneinander zu bestimmenden Komponenten* ohne gegenseitige Störungen erfasst

Prüfung auf Selektivität

Prüfung auf Selektivität

- Prüfung auf Richtigkeit: Da Selektivität eine der Voraussetzungen für Richtigkeit ist, ist eine richtige Methode automatisch auch selektiv
- Vergleich mit einem Standard, der *alle* denkbaren Komponenten inkl. Matrix erhält
- Systematische Variation der Analysen- bzw. Messbedingungen
- Vergleich mit dem Ergebnis nach einem anderen Analysenprinzip

Selektivität in der Chromatographie

Spezialfall Chromatographie

Vergleichschromatogramm

- Ein pragmatischer (und gleichzeitig der sicherste!) Weg ist der Vergleich des erhaltenen Chromatogramms mit einem „Muster"-Chromatogramm, das <u>*sämtliche*</u> Nebenkomponenten, Verunreinigungen etc. enthält. Die Aussage zur Selektivität kann durch den Vergleich von chromatographischen Kenngrößen unterstützt werden (relative Retention, Peakbreite, Asymmetriefaktor)

Spiken

- Sukzessive Zugabe der einzelnen Analyten und Überprüfung der chromatographischen Auflösung
- Wechsel der Säule/DC-Platte und/oder der mobilen Phase

Kopplung

- Erhöhung der Peakkapazität, z. B. durch Online-Kopplung, verschiedener chromatographischer Verfahren (LC-GC, LC-DC, SFC-GC) oder im Offline-Modus: „Schneiden" des Peaks oder einer Peakfraktion und Untersuchen der Fraktionen mit anderen Trennmethoden und/oder Spektroskopie

Ratio Plot

- Ratio-Plot: Detektion bei zwei Wellenlängen, Prüfung der Konstanz der Extinktionsverhältnisse (nicht sicher)

Spektren

- Online-Spektrenaufnahmen und -vergleich (UV, MS) in aufsteigender/abfallender Peakflanke und im Maximum (ggf. Spektrendatenbank) (üblich und gut, nicht 100% sicher)

Peakformenvergleich

- Peakformvergleich des Analyten in der Kalibrierlösung und der Probe (Peakbreite, Asymmetrie, Ableitungen)

<u>Wiederfindungsrate</u>

Wiederfindungsrate

Mittels der Wiederfindungsrate wird überprüft, ob bei der Probeaufarbeitung (z. B. Extraktion, Derivatisierung, Injektion) möglicherweise ein Teil der Substanz „verschwindet"

Überprüfung der Wiederfindungsrate

Vorschlag zur Überprüfung der Wiederfindungs-rate

Es werden insgesamt drei Lösungen hergestellt und analysiert:
Lösung 1: zu V1 ml Probenlösung V2 ml Kalibrierlösung geben, man erhält Signal S1
Lösung 2: zu V1 Probenlösung V2 Lösungsmittel geben, man erhält Signal S2
Lösung 3: zu V1 Lösungsmittel V2 Kalibrierlösung geben, man erhält Signal S3

Die Wiederfindungsrate W errechnet sich wie folgt:

W = (S1-S2)/S3 x 100

Präzision

Man unterscheidet zwischen Systempräzision (Messpräzision) und Methodenpräzision.

Messpräzision

- Die **Messpräzision** ist ein Maß für die Schwankungen, die durch das Analysengerät selbst verursacht werden. Sie wird durch die Mehrfachanalyse (z. B. sechsfach) eines Standards ermittelt. Die Forderung an die Messpräzision hängt vom Analysengerät ab. Bei der HPLC und GC sollte der Variationskoeffizient (Quotient aus Standardabweichung und Mittelwert) V_K kleiner ca. 1% sein
- Die **Methodenpräzision** beschreibt die zufällige Streuung der Analysenergebnisse. Sie wird durch eine mehrfache (meist sechsfache) Durchführung der gesamten Analyse, d. h. vom Abwiegen über die Probevorbereitung bis zu der Messung und Befundung ermittelt (sechs Einwaagen *realer* Proben)

Wiederhol-präzision

Vergleichs-präzision

Es wird zwischen Präzision unter **Wiederholbedingungen** (Wiederholpräzision, Wiederholbarkeit: Ein Labor, ein Gerät, ein Prüfer) und Präzision unter **Vergleichsbedingungen** (Vergleichspräzision, Vergleichbarkeit, Übertragbarkeit, Reproduzierbarkeit: Mehrere Labors, mehrere Prüfer, mehrere Geräte) unterschieden.

Laborpräzision

Das ist die Präzision innerhalb eines Labors, wenn die Bestimmung von verschiedenen Personen an verschiedenen Geräten und an unterschiedlichen Tagen evtl. mit unterschiedlichen Chemikalien etc. durchgeführt wird.

Akzeptanz-kriterien

Reproduzierbarkeit

Die Akzeptanzkriterien hängen stark von den Forderungen bei der speziellen Fragestellung ab. Wird beispielsweise im Pharmabereich in der Regel für die Vergleichspräzision ein V_K < 2% verlangt, so sind in der Umweltpolitik V_K-Werte von ca. 5-10% und in der Medizin von 10-20% durchaus akzeptabel.

Genauigkeit

Genauigkeit

Die Genauigkeit ist kein Validierungselement, sondern der Oberbegriff für Richtigkeit und Präzision. Ein Ergebnis ist genau,

wenn es frei von zufälligen (Ergebnis ist richtig) und systematischen Fehlern (Ergebnis ist präzise) ist. Angemerkt sei an dieser Stelle, dass in der Literatur die Begriffe „Genauigkeit“ und „Richtigkeit“ oft als synonyme Terme verwendet werden.

Linearität

Kalibrier-funktionen

Linearität des Gerätes

Linearität der Methode

Eine Methode ist in einem bestimmten Konzentrationsbereich linear, wenn das Messsignal direkt proportional zu der Analytkonzentration in der Probe ist (nicht im Standard!). „Direkt proportional“ bedeutet nicht zwingend eine lineare Abhängigkeit zwischen Messsignal und Analytkonzentration! Aus diesem Grunde mag der Begriff „Analysenfunktion“ oder Kalibrierfunktion treffender sein. Kalibrierfunktionen zweiten Grades können und sollten bei Bedarf verwendet werden. Ähnlich der Messpräzision kann hier mit einer Standardlösung die Linearität des Gerätes bzw. des Detektors bestimmt werden. Die Linearität der Methode ist meist kleiner (selten gleich) als die Linearität des Detektorsystems. Gleichheit bedeutet, dass die Matrix und die Probevorbereitung keine systematischen Fehler verursachen.

Prüfung der Linearität

Prüfung der Methode

Einpunkt-Kalibrierung

Auftragung S/c gegen c

Arbeitsbereich

Üblicherweise wird das Signal S gegen die Konzentration c aufgetragen. Die Steigerung dS/dc ist ein Maß für die Empfindlichkeit der Methode. Wenn die Steigerung dS/dc konstant (linearer Bereich) und das Signal s bei c = 0 ebenfalls gleich Null ist, ist eine Einpunktkalibrierung zulässig. Ansonsten sollten mindestens fünf Konzentrationen vermessen werden, um den mathematischen Zusammenhang zwischen Masse und Signal (Regressionsmodell) genau ermitteln zu können. Es ist nicht immer zweckmäßig, eine Gerade durch den Nullpunkt zu zwingen. Neben der klassischen Auftragung, Signal gegen Konzentration (S/c), hat sich die Auftragung des Quotienten aus Signal und Konzentration gegen die Konzentration c bewährt; Verdünnungsfehler im unteren Bereich werden einfach erkannt. Im Zusammenhang mit der Linearität wird oft der Arbeitsbereich „range“ genannt. Dieser ist der Bereich zwischen der niedrigsten und der höchsten Konzentration (Menge) des Analyten in der Probe, für den die geforderte Präzision und Genauigkeit bewiesen wurden.

Nachweis- und Bestimmungsgrenze

Bestimmungs-grenze

Die Nachweisgrenze ist die kleinste Konzentration (Menge) des Analyten in der Probe, die qualitativ noch erfasst werden kann (Ja/Nein-Entscheidung). Die Bestimmungsgrenze ist die kleinste Konzentration (Menge) des Analyten in der Probe, die mit gegebener Präzision und Richtigkeit quantitativ bestimmt werden kann. Das zugrunde liegende mathematische Modell und die Bestimmungsmethoden sind in der DIN 32645 beschrieben.

Erfassungs-

Sie gibt die Konzentration (Menge) an, die mit einer

grenze Wahrscheinlichkeit von 50 % nachgewiesen werden kann. Somit kann die Erfassungsgrenze vereinfacht als die doppelte Nachweisgrenze angesehen werden.

Überprüfung der Grenzen

Überprüfung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze
Mit Hilfe von Makros in käuflichen (z. B. Excel) oder selbst geschriebenen Softwareprogrammen ist die Überprüfung in Anlehnung an die DIN-Norm 32645 möglich.

Vereinbarungen über die Grenzen

In der chromatographischen Praxis gelten zumeist das zwei- bis dreifache Rauschen als Nachweisgrenze und das neun- bis zehnfache Rauschen als Bestimmungsgrenze. Selbstverständlich entsprechen die ermittelten Werte einer Momentaufnahme; sie geben den aktuellen Gerätezustand wieder (Lampe, Güte der eingesetzten Chemikalien, etc.). Nach jedem Wechsel im System sollte die Bestimmung wiederholt werden. Ein pragmatischer Vorschlag zur Ermittlung der Bestimmungsgrenze stammt von Eurachem/D[2)] (Abbildung 1). Durch eine Verdünnungsreihe wird die kleinste Konzentration ermittelt, für die der Variationskoeffizient noch tolerierbar ist.

Bestimmungsgrenze in der instrumentellen Analytik

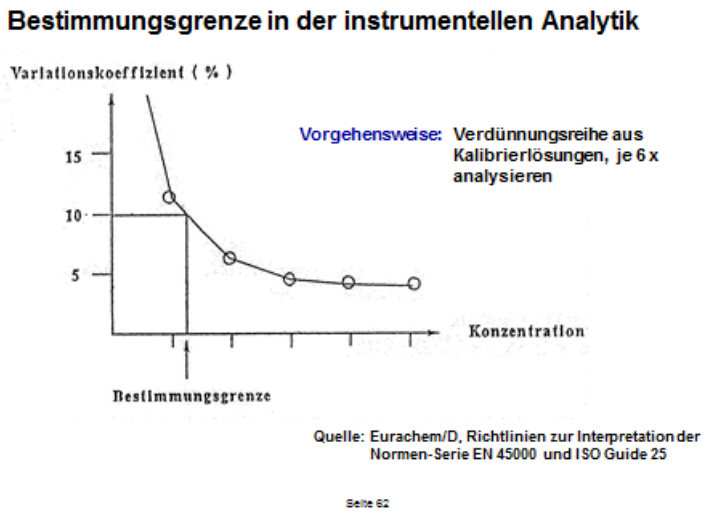


Abbildung 1. Bestimmungsgrenze in der instrumentellen Analytik [2)].
Verdünnungsreihe aus Kalibrierlösungen, je sechsmal analysiert.

Robustheit

Eine Methode ist robust, wenn durch (ungewollte) Änderung der Testbedingungen das Endergebnis nicht, oder nur unwesentlich verfälscht wird. Als Maß für die Robustheit wird der Bereich genannt, in dem das Ergebnis von der Änderung eines oder mehrerer Parameter unabhängig ist, z. B. „Messergebnis konstant zwischen 29° C und 31° C, pH 4,9 bis 5,1, gemessen an den Geräten A, B und C“.

Überprüfung der Robustheit	• Vergleich der Messergebnisse zu Beginn und am Ende einer Analysenserie (Verfahrensstabilität). • Vergleich von Messergebnissen laborintern (Laborpräzision) und zwischen unterschiedlichen Labors (Vergleichbarkeit, Übertragbarkeit). Die Weiterführung dieses Gedankens, nämlich der Überprüfbarkeit als Kriterium der Robustheit, führt zu den Ringversuchen (ab ca. 30 bis 40 Labors). • Systematische Variation der Einflussparameter in einem relevanten (!) Bereich.

Umfang der Methodenvalidierung

Warum Validierung?	Die Methodenvalidierung ist eine notwendige, qualitätssichernde Maßnahme, sie muss allerdings effektiv durchzuführen sein und somit bezahlbar bleiben. Es gilt folgender Grundsatz: Der Aufwand und der Umfang der Validierung sollten in einem angemessenen Verhältnis zu den Forderungen stehen. Deswegen ist es wichtig, sich über Art und Ziel der Analytik im Klaren zu sein. So kann beispielsweise – wenn der Aufwand vertretbar ist – durch den Vergleich mit einer unabhängigen Methode die Richtigkeit der zu validierenden Methode belegt werden. Die Validierung wäre bereits damit erfolgreich beendet (Ergebnisvalidierung). Ein (aufwendiger) Ringversuch wiederum ermöglicht die Beurteilung einer Methode; hiermit werden die Präzision sowie die Robustheit des gesamten Verfahrens überprüft.

In der pharmazeutischen Analytik kann man grob folgende Methodentypen unterscheiden: Identitätstests, Gehaltsbestimmung, quantitative Spurenmethode (ICH-Richtlinien). Reicht beispielsweise im ersten Fall eine – allerdings sehr gründliche – Überprüfung der Selektivität aus, wären bei der quantitativen Bestimmung von z. B. Neben- oder Abbauprodukten sämtliche Validierungselemente zu überprüfen.

Grundbegriffe der Methodenvalidierung (Auswahl, Definitionen)

Bezeichnung	**englische Bezeichnung**	**Aussage über:**
Genauigkeit	**accuracy**	**systematische und zufällige Fehler** Die Genauigkeit ist der Oberbegriff für Richtigkeit und Präzision.
Richtigkeit	**trueness, accuracy of the mean**	**systematische Fehler** Die Richtigkeit ist das Maß für die Abweichung vom richtigen Wert (manchmal als “wahrer” Wert bezeichnet) aufgrund eines systematischen

		Fehlers. Belegt werden kann die Richtigkeit über die Wiederfindungsrate, internen Kontrollproben, ein zweites Verfahren oder zertifizierte Referenzproben
Präzision	**precision**	**zufällige Fehler** Die Präzision ist ein Maß für die Streuung der Analysenwerte. Man unterscheidet zwischen Messpräzision (Systempräzision) und Methodenpräzision. • **Messpräzision**: Maß für die Schwankungen, die durch das Analysengerät selbst verursacht werden. Die Ermittlung dieser Schwankungen erfolgt durch die Mehrfachanalyse (sechsfach) eines Standards • **Methodenpräzision**: Maß für die Streuung der Analysenergebnisse. Die Ermittlung dieser Schwankungen erfolgt durch mehrfache (sechsfache) Durchführung der gesamten Analysen, d. h. der Probevorbereitung, der Messung und der Befundung
Wiederhol-präzision	**repeatability**	(Wiederholbedingungen: Ein Labor, ein Prüfer, ein Gerät)
Laborpräzi-sion	**intermediate precision**	**Ein Labor, zwei Prüfer, zwei Geräte, zwei Tage usw.**
Vergleichs-präzision	**reproducibility**	**Präzision im Vergleich „Labor zu Labor“** (Vergleichbedingungen: Mehrere Labors, mehrere Prüfer, mehrere Geräte, also: Unterschiedliche Rahmenbedingungen)
Linearität	**linearity**	**Zusammenhang zwischen Signal und Konzentration** Das Messsignal muss proportional zu der Analyt-konzentration in der Probe (nicht im Standard!) sein, wobei eine lineare Abhängigkeit nicht zwingend ist. Zur Prüfung der Linearität wird üblicherweise das Signal S gegen die Konzentration c aufgetragen
Wieder-findungsrate	**recovery**	**Ausbeute der Probevorbereitung** Überprüfung, ob bei der Probeaufarbeitung (z. B. Derivatisierung, Extraktion, Injektion etc.) ein Teil

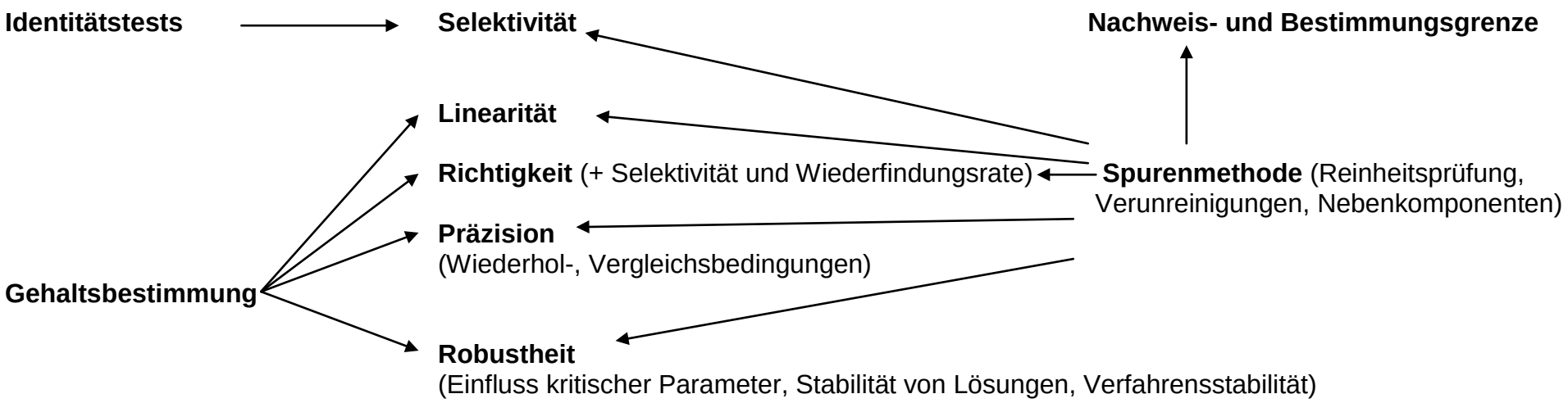
		der Substanz “verschwindet“
Selektivität	**selectivity**	**Störung durch Begleitstoffe** Fähigkeit eines Analyseverfahrens verschiedene Komponenten nebeneinander zu bestimmen
Robustheit	**robustness**	**Störanfälligkeit durch veränderte Bedingungen (Analysenparameter, Gerät, Labor usw.)**
Nachweis-grenze	**limit of detection**	**Kleinste nachweisbare Menge** „Ja/Nein“-Entscheidung
Bestimmung sgrenze	**limit of quantitation**	**kleinste quantifizierbare Menge** „Wieviel“-Entscheidung: Mindestkonzentration (-Menge), die mit vorgegebener Wahrscheinlichkeit nachgewiesen werden kann

Kurzdefinitionen Prüfparameter

Bezeichnung	**Aussage über**
Richtigkeit	systematische Fehler
Präzision • Wiederholbarkeit (Wiederholpräzision) • Vergleichbarkeit (Vergleichspräzision)	zufällige Fehler laborintern verschiedene Labors
Robustheit • Verfahrensstabilität („robustness“) • Übertragbarkeit („regedness“) (Wiederholbarkeit, Vergleichbarkeit)	Abhängigkeit von variierenden Bedingungen Störanfälligkeit durch veränderte Parameter (pH, Temperatur usw.) Störanfälligkeit durch Wechsel von Anwender, Gerät, Labor
Selektivität	Fähigkeit zur Bestimmung mehrerer Komponenten nebeneinander
Wiederfindungsrate	Ausbeute der Probenvorbereitung
Linearität	Abhängigkeit Signal/Konzentration
Nachweisgrenze	kleinste nachweisbare Menge (Konzentration)
Bestimmungsgrenze	kleinste quantifizierbare Menge (Konzentration)

Spezifität	Störanfälligkeit gegenüber Begleitkomponenten
Messbereich, („range“) dynamischer Arbeitsbereich	Konzentrationsbereich für erlaubte quantitative Aussagen
Unsicherheit, Vertrauensintervall	Schwankungsbereich des Analysenergebnisses (Messwertes)
Reproduzierbarkeit	Wiederholpräzision innerhalb kurzer Zeitabstände
Genauigkeit	Oberbegriff für Richtigkeit und Präzision

<u>Umfang der Methodenvalidierung in der Analytik</u> (beispielhaft; quantitative Spurenmethode: Größter Umfang)



Fließschema zur Methodenvalidierung einer „Spurenmethode“ mittels Chromatographie (Reinheitsprüfung, Neben- und Abbauprodukte)

Dringender Hinweis: Bei Bedarf Probenahme, -Transport und Lagerung validieren oder zumindest sorgfältig dokumentieren.

Stufe 1 | **Prüfpunkt/Vorgehen** | **Erkenntnisse/Aussage Über:**

Messpräzision/Methodenpräzision
6 x Standard (1) bzw. 6 reale Proben (2) unter Wiederholbedingungen analysieren

(1) Wie ist die Streuung meiner Ergebnisse bedingt durch das Gerät?

(2) Wie ist die Streuung meiner Ergebnisse bedingt durch das Gerät *plus* Methode?

Selektivität

Ist die Methode überhaupt selektiv für meine Probe?

bekannte Probe

Vergleich mit einem Standard, der *alle* denkbaren Komponenten enthält

unbekannte Probe

Systematische Variation der Analysenbedingungen	Zweites Analysen- bzw. Trennprinzip verwenden	Substanz- oder elementspezifische Messung, bzw. selektive Detektion, z. B. ^{31}P-NMR, spezifische Sensoren, Gen-Antigen-Wechselwirkungen	Orthogonale Trenntechniken, Offline/Online Kopplungen, z. B. Chromatographie/Spektroskopie

Robustheit I (Methodenrobustheit)

Δ pH; Δ Temperatur, Δ Pufferstärke, usw.

In wie weit beeinflussen kleine Veränderungen von Methodenparametern mein Ergebnis?

Stufe 2,Wiederholpräzision, z. B. 6 Einwaagen Doppelbestimmung

Bestimmungsgrenze

Signal/Rausch-Verhältnis 9:1 (NWG: 3:1)	Leerwertmethode oder Kalibriermethode	Niedrigste Konzentration für die gewünschte Wiederholpräzision

Diese Menge an Verunreinigungen kann ich noch quantifizieren

Linearität
(Analysenfunktion)

Linearität im relevanten Bereich gegeben?

Nein

Einengen des Konzentrationsbereiches	Mathematische Anpassung, z. B. Gleichung 2. Grades	Befindet man sich noch im linearen Bereich des Detektors? Ist das Gerät in Ordnung?

Konzentrationsbereich für einen mathematischen Zusammenhang zwischen Signal und Konzentration

Ja

Richtigkeit

Liefert die Methode ein richtiges Ergebnis, sind also systematischer Fehler nicht vorhanden?

Vergleich mit unabhängiger, validierter Methode	Soll-/Ist-Vergleich mit einer möglichst zertifizierten oder synthetischen, gut charakterisierten Probe	Aufstockverfahren (Spiken)	Indirekte Überprüfung über Stoff-/Massenbilanzen (sehr selten)	Oft in der Praxis: Selektivität gegeben + Linearität gegeben + Gerade durch den Nullpunkt → Ergebnis richtig

Systematische Fehler gefunden? — Ja →

- Selektivität verbessern, s. o.
- Wiederfindungsrate überprüfen
- Sonstige systematische Fehler?

↓ Nein

Stufe 3 **Robustheit II (Anwendbarkeit)**

Wie zuverlässig, wie stabil ist meine Methode gegenüber verschiedenen Einflüssen (Δ Gerät, Δ Anwender, Δ Labor?)

Methode nur für laborinterne Zwecke

- Schwachstellenanalyse durch systematische Variation von kritischen Parametern
- Stabilität von Lösungen, Verfahrensstabilität, zeitabhängige Streuung der Messwerte?
- Laborpräzision

Methode wird auch außerhalb des eigenen Labors eingesetzt

- Vergleichspräzision (Übertragbarkeit)
- Ringversuche

↓

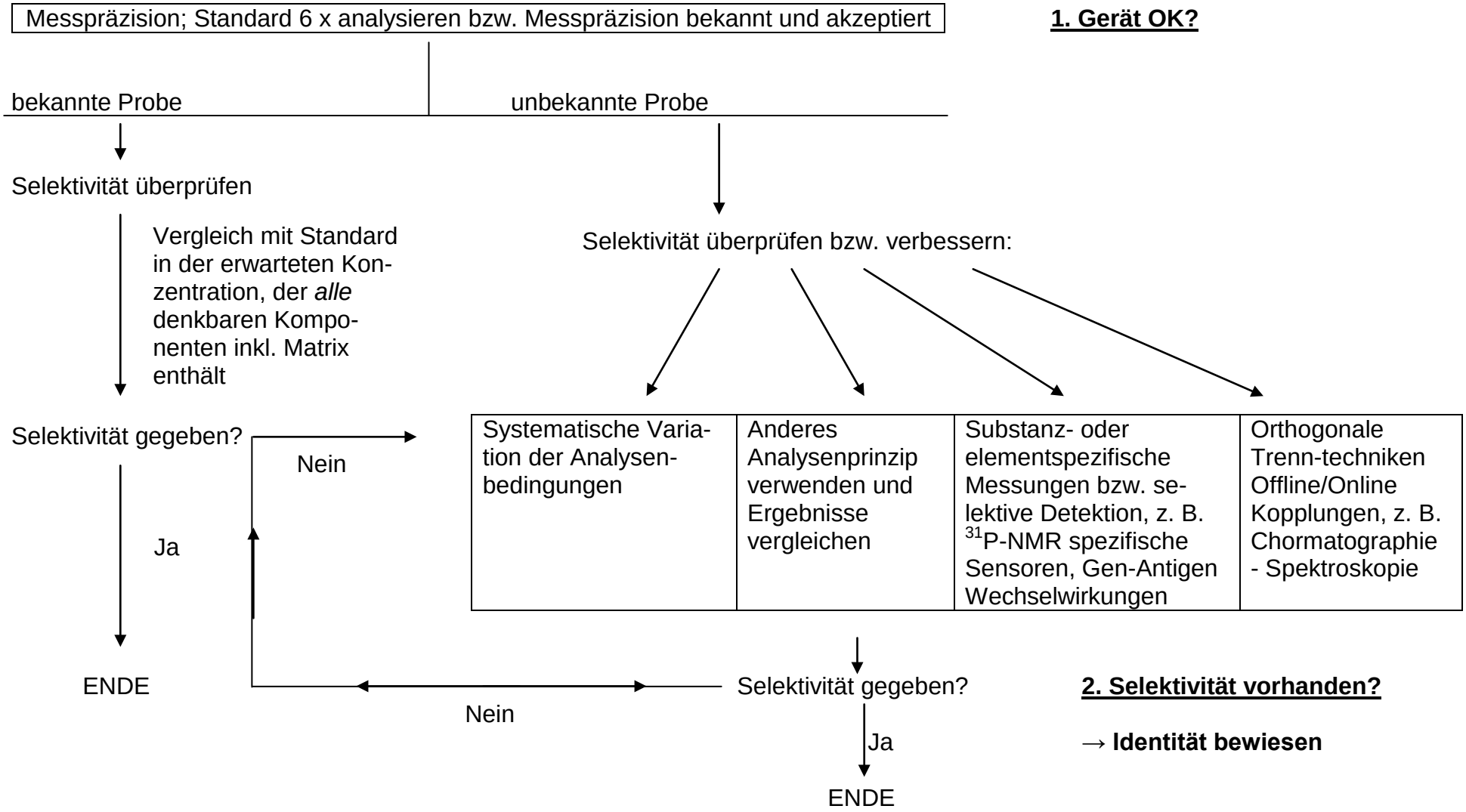
ENDE DER MESSUNG

Nach den Messungen gilt nun, Antworten auf folgende Fragen zu geben:

- Ist die Methode für den beabsichtigten Zweck geeignet, z. B. Streuung der Methode mit den Spezifikationsanforderungen vereinbar (Methodenfähigkeit)? Wie viel Prozent der Gesamtstreuung der Werte fällt auf die Analytik?
- Für welchen Konzentrationsbereich (range) sind obige Aussagen gültig?
- Wie ändern sich die erhaltenen Werte in Abhängigkeit von der Zeit? Trends erkannt? Soll SPC-Einführung empfohlen werden?
- Sind die kritischen Punke der Methode identifiziert und herausgestellt worden? Empfehlungen für die Routineanwender?

ENDE DER VALIDIERUNG

Fließschema zur Methodenvalidierung von Identitätstests in der Chromatographie



Qualitätsregelkarten

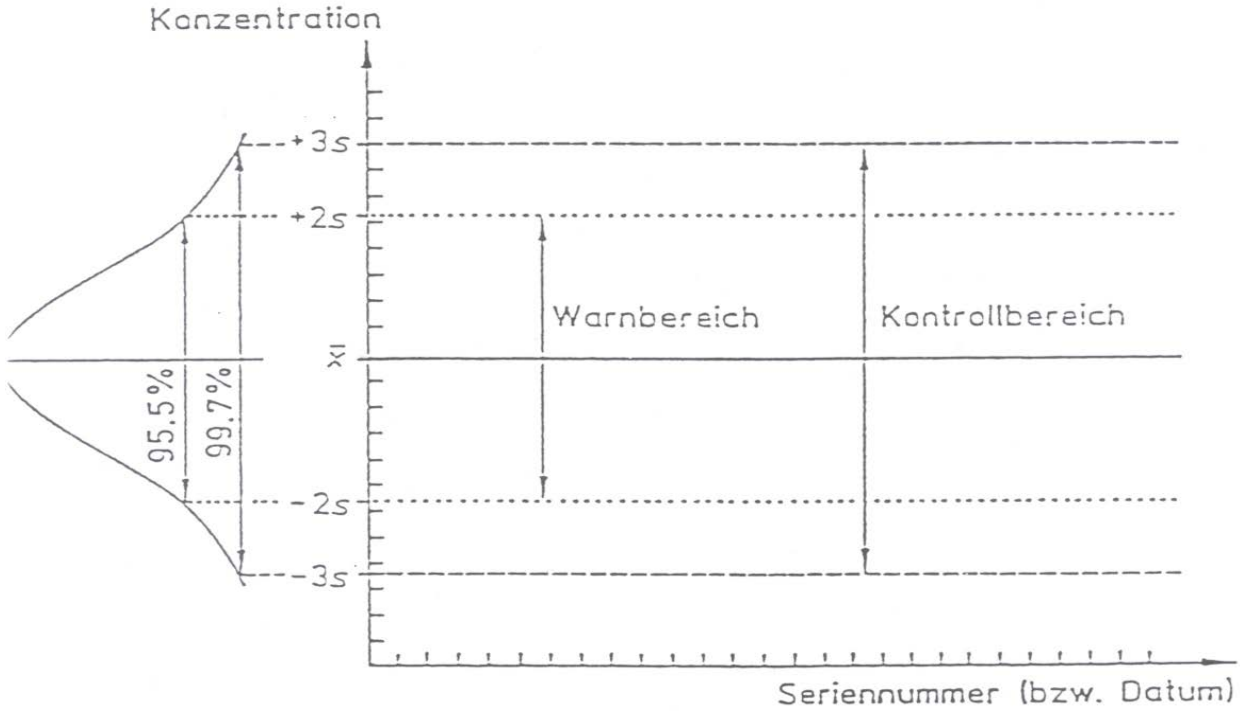
Kontrollkarten als Qualitätssicherungselement

Jedes Routinelabor muss seine Befähigung und Eignung nachweisen, indem es aufzeigt, dass es zuverlässig „richtige“ Werte mit einer bekannten und akzeptablen Präzision bestimmt. Dieser Nachweis kann sowohl durch die Teilnahme an Ring bzw. Vergleichsversuchen (externe Qualitätssicherung) als auch durch Führen von Kontrollkarten (interne Qualitätssicherung) erbracht werden.

Qualitätssicherung im Labor

Zur Überwachung der Zuverlässigkeit von Prozessen, insbesondere im Produktionsbereich, werden diese so genannten Regelkarten schon seit langem verwendet. Mit der zunehmenden Bedeutung der Qualitätssicherung im Labor werden sie immer stärker auch in der Analytik eingesetzt. Der zu überwachende Prozess ist hier das analytische Messverfahren selbst.
Die Abbildung zeigt beispielhaft den Aufbau einer Qualitätsregelkarte.

Prinzipieller Aufbau einer Qualitätsregelkarte (oder einfach: Kontrollkarte)



Prinzipieller Aufbau einer Qualitätsregelkarte.

Was kann in eine Kontrollkarte eingetragen werden

In dieser Karte können die Messergebnisse einer stets gleichen Kontrollprobe, die zusammen mit den Routineproben analysiert wird, eingetragen werden. Messwerte oder daraus ermittelte Kennwerte, wie z. B. Streubreite aus Mehrfachbestimmungen, werden gegen die Zeit aufgetragen. So wird anhand weniger „Spielregeln“ die visuelle

Nachweis der Funktion eines Prozesses

Beurteilung des Prozesses und gegebenenfalls die Einleitung von Überprüfungs- oder Korrekturmaßnahmen ermöglicht. Gleichzeitig kann das Funktionieren eines Prozesses nachgewiesen und damit das System im aktuellen Zustand validiert werden.
Die entscheidenden Vorteile der Kontrollkartentechnik sind:

Vorteile einer Kontrollkarte

- Alle Mitarbeiter treffen ohne subjektive Einflüsse dieselben Entscheidungen
- Korrigierende Einflüsse können schnellstmöglich veranlasst werden
- Retrospektive Beurteilungen des Systemzustandes sind leicht möglich (Qualitätsnachweis)
- Das Auftreten von systematischen Fehlern und Trends kann visuell leicht und zeitnah erkannt werden

Voraussetzungen für das Führen einer Kontrollkarte

Selbstverständlich ist für den Einsatz von Kontrollkarten in der Analytik Voraussetzung, dass die Analysenprozesse sich sporadisch oder regelmäßig wiederholen, d. h. dass derselbe Analyt in einer möglichst wenig veränderten Matrix in einem überschaubaren Konzentrationsbereich immer wieder bestimmt wird. Einsatzgebiete sind daher vor allem die Freigabe von Chargen eines Produktionsprozesses, die routinemäßige Analytik in medizinischen Laboratorien und die regelmäßige Kontrolle bestimmter Abwässer.

Einsatzgebiete wichtigste Arten von Kontroll-karten

Es gibt verschiedene Arten von Kontrollkarten. Im analytischen Labor sind neben der mit Abstand am wichtigsten Mittelwertkontrollkarte außerdem die Wiederfindungs-, die Blindwert- sowie die Spannweitenkontrollkarte von Bedeutung. (Im Folgenden sei mit dem Begriff Kontrollkarte stets die Mittelwertkontrollkarte gemeint, sowie nicht anderes erwähnt.)

Präzisions-kontrolle

Grundsätzlich können Kontrollproben sowohl zur Erkennung zufälliger Fehler (Präzisionskontrolle) als auch systematischer Fehler (Richtigkeitskontrolle) verwendet werden. Bei der Präzisionskontrolle werden die Werte der Kontrollprobe mit den zuvor gemessenen Werten der Kontrollprobe mit den zuvor gemessenen Werten

Richtigkeits-kontrolle

derselben Probe verglichen. Bei der Richtigkeitskontrolle werden die Werte mit einem gegebenen Bezugswert verglichen. Der zu überprüfende Messwert (meist der Gehalt an Analyt) muss bei einer Richtigkeitskontrolle also bekannt sein. Wegen des dazu erforderlichen Messaufwandes bei der Herstellung sind Richtigkeitskontrollproben grundsätzlich teurer als Präzisionskontrollproben.

Vorperiode

Während einer Vorperiode werden zunächst Daten gesammelt, aus denen über Mittelwerte und Standardabweichung die Warn- und Eingriffsgrenzen ermittelt werden. Diese Daten können auch zur Validierung der Methode verwendet werden. Üblicherweise umfasst eine Vorperiode zwanzig Werte. Erst danach kann eine Qualitätsregelkarte genutzt werden. Wichtig ist, dass die Prüfbedingungen in der Vor- und der anschließenden

Kontrollperiode vergleichbar sind.

Kontroll-periode

Warngrenze

Eingriffs-grenze

Als Warngrenze wird zumeist ein Band der Breite 4s (Mittelwert ± 2s, mit s als Standardabweichung der Vorperiode), als Eingriffsgrenze ein Band der Breite 6s (Mittelwert ± 3s) festgelegt.
Im Idealfall, d. h. der Prozess befindet sich unter statistischer Kontrolle, und lediglich zufällige, aber keine systematischen Fehler sind wirksam, befinden sich im ersten Band 95,5 % und im letzteren 99,7 % aller Messwerte. Sind bereits Forderungen, z. B. aus Spezifikationen, vorhanden, so werden durch diese die Eingriffsgrenzen bzw. Grenzwerte festgelegt während die Warngrenzen entfallen. Man spricht in diesem Fall von Annahmekarten bzw. Annahme-Qualitätsregelkarten.

Annahme-karten

Außer-Kontroll-Situation

Beim Auftreten von Außer-Kontroll-Situationen müssen besondere Maßnahmen ergriffen werden. Dies kann im einfachsten Fall eine visuelle Systemüberprüfung oder eine Plausibilitätsprüfung der Ergebnisse sein, in schweren Fällen aber auch zum Sperren bzw. der Reparatur eines Gerätes führen. Die Außer-Kontroll-Situationen stellen also die Spielregeln dar, die besondere Maßnahmen unabhängig vom persönlichen Ermessen des Operators auslösen.
Als Außer-Kontroll-Situationen gelten:

- ein Wert außerhalb der Kontrollgrenzen
- sieben Werte in Folge ansteigend bzw. abfallend
- sieben Werte in Folge über bzw. unter dem Mittelwert
- zwei von drei Werten in Folge außerhalb der Warngrenzen

Average Run Length

Treten solche Situationen auf, so sollte – selbst wenn keine Ursache gefunden werden kann – eine schriftliche Bewertung der Qualitätsdokumentation erfolgen. Es ist nämlich durchaus nicht zwingend, dass Außer-Kontroll-Situationen auf Unregelmäßigkeiten oder Fehler hinweisen. Rein statistisch bedingt führen zufällige Fehler von Zeit zu Zeit ebenfalls zu Außer-Kontroll-Situationen, obwohl alles in bester Ordnung ist. Quantifiziert wird dieses „Risiko“ durch die Average Run Length (ARL), also die Laufzeit bis zum Auftreten einer Außer-Kontroll-Situation, wenn der Prozess sich vollkommen unter statistischer Kontrolle befindet[4)].

periodische Schwank-ungen

retrospektive Überprüf-ungen

Eine Kontrollkarte verhält sich sozusagen wie eine Alarmanlage, bei der eine hohe Ansprechempfindlichkeit stets durch die ebenfalls erhöhte Gefahr von Fehlalarmen erkauft wird. Der Wert einer Kontrollkarte erweist sich aber nicht erst im Auftreten von Außer-Kontroll-Situationen. Nützliche Informationen z. B. über periodische Schwankungen oder eine Verringerung der Streubreite lassen sich aus ihnen ablesen. Gerade bei der retrospektiven Überprüfung von Vermutungen („Sind die Messwerte seit dem Wechsel der Kalibriersubstanz erhöht?“) zeigen Kontrollkarten ihren praktischen Nutzen. Zweifellos bedeutet das Führen von Kontrollkarten einen zusätzlichen Aufwand, der finanzierbar sein muss. Die zweitaufwenige Erstellung per Hand wird aber mehr und mehr durch Computerprogramme abgelöst. Von einem modernen LIMS – im Zusammenhang mit Smart Data Analysis – wird man also in Zukunft umfassende Möglichkeiten zum Führen von Kontrollkarten erwarten, wie die online-Datenübernahme von Messgeräten und eine

automatische Steuerung von Maßnahmen bei Außer-Kontroll-Situationen, beispielsweise Alarmauslösung, Wiederholung einer Analyse oder Sperren eines Gerätes. Neben den Kontrollkarten ist das Schätzen der Messunsicherheit ein bewährtes, billiges, schnelles und bereits akzeptiertes Werkzeug der Qualitätssicherung.
Eine Methode wird in einzelne Schritte zerlegt, z. B. Probevorbereitung, Messung, Befundung. Der Fachmann schätzt aus den gemachten Erfahrungen usw. den Fehler der einzelnen Schritte. Hier wird zwischen zwei Extremen, dem günstigsten und dem ungünstigsten Fall, unterschieden („best/worst case"). Die geschätzten Fehler der einzelnen Schritte werden zum Quadrat genommen, die Quadrate addiert und aus der Summe die Wurzel gezogen. Der geschätzte Fehler der Methode liegt zwischen den zwei extremen Fällen („best case", „worst case"). Diese in Kürze beschriebene Möglichkeit eignet sich für einmalige Fragestellungen, z. B. im F+E-Bereich. Genaueres zum Schätzen der Messunsicherheit findet sich in: Kromidas, Validierung in der Analytik, Wiley-VCH.

Trends auf dem Gebiet der analytischen Validierung

Fazit:

- Verstärkter Fokus auf praxisnahe Prüfung, ob also besagte Methode für die Routine tatsächlich geeignet ist. Das bedeutet beispielsweise, dass Risikobewertung und Robustheit immer wichtiger werden. Auch eine kontinuierliche Überprüfung (Monitoring) während des gesamten Lebenszyklus der Methode wird immer mehr verlangt
- Gegenläufige Tendenzen: Während seitens bestimmter Organisationen einerseits ein pragmatischer Blick (siehe erster Punkt) forciert wird, wird andererseits gleichzeitig von bestimmten nationalen Behörden eine sture, oft unsinnige Validierungs-Praxis verlangt

Kommentare, Hinweise
Zwei Zitate/Textpassagen bzw. häufig verwendete Begriffe, welche den stärker werdenden pragmatischen Ansatz untermauern:

1. *„**continual** assurance that the **process** (analytical procedure) remains in a **state of control** (the validate state) during commercial manufacture"*

2.

- Analytical Procedure Lifecycle Management (APLM)
- Procedure Performance Qualification (PPQ)
- Process stability and capability
- Requirements for routine process monitoring of analytical procedures
- Trending as part of the analytical control strategy and confirmation of the ATP

- „matrixbased“ calibration
- „matrixbased“ quality control

Zur Praxis der Validierung heute

Bis dato: Methode gut? Ergebnis gut
Zukünftig: Anforderungen klar definiert? Eine Methode, die den Anforderungen genügt, ist gut (geeignet)
Merke: Der Formulierung der „Anforderungen“ fällt eine gewichtige Bedeutung zu! So gehört u. a. folgendes dazu:

- Risikobewertung (z. B. Änderungen-Auswirkungen)
- Methode bedeutet: Vollständiges (!) Verfahren
- fundiertes Wissen über Robustheit
- Geeignete Systemeignungstests
- Analytischer Transfer ist der selbstverständliche Schritt nach einer Validierung: Eine Selbstverständlichkeit
- Monitoring („Continued Method Performance Verification“)

Über eine zeitgemäße Validierung – das „4-Phasen-Modell“

1. Was soll die Methode können?
2. Auswahl der Methode, evtl. Methodenentwicklung und Optimierung

   Merke: - Methode bedeutet „Prüfverfahren“
   - Risikobewertung, Robustheit etc. d.h. Charakteristika des Verfahrens kennen lernen, klar identifizieren (optimal)

3. Methoden-Qualifizierung (ehemals „Validierung“)

   Merke:
   - Überprüfung unter Routinebedingungen
   - analytischer Transfer – welcher Art auch immer – gehört in diese Phase

4. Kontinuierliche Methoden-Verifizierung

   - Monitoring; Absicherung, dass Methode weiterhin „OK“ ist z. B. SST-Daten, SPC mit Präzisionsdaten aus Stabilitätsstudien, haben etwaige Änderungen einen (signifikanten!) Einfluss auf das Ergebnis?

Literaturliste zum Thema (Auswahl)

- Lothar Sachs, Jürgen Hedderich: „Angewandte Statistik“, Springer Verlag, ISBN 3540321608
- Herbert Feltkamp, Peter Fuchs, Heinz Sucker: „Pharmazeutische Qualitätskontrolle“, Thieme Georg Verlag, ISBN 3136115015
- Werner Funk, Vera Dammann, Gerhild Donovert: „Qualitätssicherung in der Analytischen Chemie“, Wiley-VCH Verlag, ISBN 3527311122
- Stavros Kromidas: „Validierung in der Analytik“, Wiley-VCH Verlag, 2. überarbeitete Auflage, ISBN 3527329390
- Stavros Kromidas (Hrsg,): „Handbuch Validierung in der Analytik“, Wiley-VCH Verlag, aktualisierte und stark erweiterte Auflage, ISBN 3527329390
- Thomas Schreppe, Rainer H. Müller: „Qualitätsmanagement und Validierung in der pharmazeutischen Praxis“, Editio Cantor Verlag, ISBN 3871932698
- Joachim Ermer, John Miller (Eds.): „Method Validation in Pharmaceutical Analysis“, Wiley-VCH, ISBN 3527312552
- Michael Hiob, Qualifizierung und Validierung aus Behördensicht: GMP-konforme Umsetzung des Annex 15 (GMP-Fachwissen), GMP Verlag, ISBN 3958070744
- Anforderungen der US-FDA an die Computervalidierung, GMP Verlag, ISBN 978-3-95807-082-0
- Stephen Robert Goldman: „Handbook of Computer and Computerized System Validation for the Pharmaceutical Industry“, Kindle Edition, ASIN B0017GTRTG
- Gil Bismuth, Shosh Neumann: „Cleaning Validation: A Practical Approach“, Informa HealthCare, ISBN 1574911082

Regelwerke in der AQS und Statistik (Auswahl)

DIN 32645	Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenzen
DIN 38402 A41	Ringversuche

DIN 38402 A42	Ringversuche und statistische Auswertung
DIN 38402 A51	Kalibrierung von Analysenverfahren
DIN 38402 A51	Gleichwertigkeit zweier Analysenverfahren
DIN 55350	Begriffe des QS und Statistik
ISO 5725	Accuracy (trueness and precision)
ISO 8402	Qualität , Begriffe
ISO 9000	Qualitätsmanagement
ISO 9001	QS-System – Modell zur Darlegung von QS in Entwicklung, Produktion und Kundendienst
ISO 9002	QS-System-Modell in der Montage und Produktion
ISO 9003	QS-System – Modell in der Endprüfung
ISO 9004	Qualitätsmanagement und Elemente der QS – ein Leitfaden
DIN ISO 17025:2018	Richtlinien zum Betreiben von Prüf- und Kalibrierlaboratorien