

Methodenvalidierung in der Analytik

Autor: Dr. Stavros Kromidas

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 die einzelnen Validierungselemente vor und zeigt pragmatische Wege zur Durchführung.

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

Inhaltsangabe

Abschnitt	Thema	Seite
1.0	Was versteht man unter Validierung?	4
2.0	Validierung und Analytik	5
3.0	Validierungselemente und deren Überprüfung	6
3.1	Richtigkeit	9
3.2	Selektivität	11
3.3	Wiederfindungsrate	14
3.4	Präzision	15
3.5	Genauigkeit	16
3.6	Nachweis- und Bestimmungsgrenze	18
3.7	Robustheit	19
4.0	Umfang der Methodenvalidierung	20
5.0	Grundbegriffe der Methodenvalidierung	28
6.0	Schema: Umfang der Methodenvalidierung in der	29

	Analytik	
6.1	Extreme Beispiele für den Umfang einer Methodvalidierung	30
7.0	Fließschema zur Methodvalidierung	
8.0	Qualitätsregelkarten	
9.0	Literatur	

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. Besonders die Einführung der Akkreditierung nach EN 45001 und die Forderungen der amerikanischen Gesundheits- und Umweltbehörden (FDA, EPA) sind als Anstoß zu bewerten. Interessierten Analytikern sei auf die ISO-EN 17025 hingewiesen. Im Folgenden werden die Elemente der Validierung vorgestellt und eine pragmatische Umsetzung im analytischen Labor vorgeschlagen.

Wer fordert Validierung

Validierung und Analytik

Es fehlt eine verbindliche Definition des Begriffes Validierung speziell für die Analytik, auch der Umfang wird unterschiedlich festgelegt. Bei Spucker¹⁾ finden sich sieben Validierungsthemen für die Analytik abgewandelt, könnten diese Thesen wie folgt lauten:

Validierungsthemen 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.
- Methodvalidierung 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 sind 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.

In der ISO-17025 werden folgende 4 Punkte, die eine Validierung einschließen soll, genannt:

1. Beschreibung der individuellen Anforderungen an die Methode
2. Bestimmung der Verfahrensmerkmale, die geeignet sind, diese Anforderungen zu überprüfen
3. Prüfung, ob die Anforderungen durch Anwendung betroffener Methode erfüllt werden
4. Aussage zu der Gültigkeit, d.h. ob diese Methode den Anforderungen genügt

statistische Daten

Ausreisser-tests

Überprüfung des Messgeräts

Prüfmittelüberwachung

Verfahrensvalidierung

kritische Schritte einer Validierung

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 festgelegt und zwingend befolgt werden (z. B. mittels Dixon, Grubbs-Test oder 20% Abweichung vom Mittelwert). Sonst ist eine wichtige Voraussetzung der Vergleichbarkeit von Ergebnissen nicht erfüllt. 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 einfachen Geräten gegebenenfalls die aufwendigeren Gerätetests ersetzen. Auf die Gerätetests wird hier nicht näher eingegangen werden. In der Zwischenzeit bieten mehrere Hersteller entsprechende Softwaremodule an, welche die Durchführung dieser Tests erleichtern.

Die Einbeziehung aller relevanten Einflüsse auf das Ergebnis (Probenvorbereitung, Messung, Messgerät, Datengenerierung) wird durch den Begriff Verfahrensvalidierung unterstrichen. Doch scheint sich in der Analytik der Begriff der Methodvalidierung durchzusetzen.

Bei der Validierung sollten gerade die kritischen Schritte der Methode überprüft werden. Wenn möglich und sinnvoll, sollte in besonderen Fällen die Probennahme in die Methodvalidierung aufgenommen werden. Eine nicht repräsentative Probe kann das Ergebnis einer sonst hervorragenden Methode zunichte machen. Hat der Anwender im Labor keinen Einfluss auf die Probennahme, so sollten diese und

eventuell auch der Proben-transport sowie die Lagerung genau beschrieben und dokumentiert werden.

Folgende Voraussetzungen gelten für die Methodvalidierung:

- Der Zweck ist unmissverständlich definiert und allen Beteiligten vermittelt worden.
- 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, Methodenfähigkeit, Prozesstabilität. Der tatsächlich notwendige Umfang hängt von Art und Zweck der Analytik ab. Wenn beispielsweise die Selektivität in der Produkanalytik (bekannter Wirkstoff in einer bekannten Formulierung) vermutlich keinen kritischen Punkt darstellt, ist deren Überprüfung in der Umweltanalytik (Identifizierung des Analyten) mit oft komplexen und unbekanntem Matrices eminent. Die Messpräzision und die Robustheit 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 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

Spezifität Selektivität

Oft werden die Begriffe Spezifität und Selektivität für den gleichen Sachverhalt verwendet, daher sei hier die korrekte Definition der beiden Begriffe aufgeführt:

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

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

Prüfung auf Selektivität

Prüfung auf Selektivität

* 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 Chromato- graphie

Spezialfall Chromatographie

Vergleichs- chromato- gramm

- Ein pragmatischer (und gleichzeitig der sicherste!) Weg ist der Vergleich des erhaltenen Chromatogramms mit einem „Muster“-Chromatogramm, das sämtliche Nebenkomponenten, Verunreinigungen etc. enthält. Die Aussage zur Selektivität kann durch den Vergleich von chromatographischen Kenngrößen unterstützt werden (z. B. relative Retention).

Spiken

- Sukzessive Zugabe der einzelnen Analyten und Überprüfung der chromatographischen Auflösung.

Kopplung

- Wechsel der Säule/DC-Platte und/oder der mobilen Phase.
- Erhöhung der Peakkapazität, z. B. durch on-line Kopplung, verschiedener chromatographischer Verfahren (LC-GC, LC-DC, SFC-GC) oder im off-line Modus: „Schneiden“ und Untersuchen der Fraktionen mit anderen Trennmethoden und/oder Spektroskopie.

Ratio Plot

- Ratio-Plot: Detektion bei zwei Wellenlängen, Prüfung der Konstanz der Extinktionsverhältnisse.

Spektren

- On-line-Spektrenaufnahmen und -vergleich (UV, MS) in aufsteigender/abfallender Peakflanke und im Maximum (ggf. Spektrendatenbank).

Peakformen- vergleich

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

Wiederfindungsrate

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

Überprüfung der Wiederfindungsrate

Vorschlag zur Überprüfung der Wiederfindungsrate 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:

$$W = (S1-S2)/S3 \times 100$$

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 als 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 Probenvorbereitung bis zu der Messung und Befund ermittelt (sechs Einwaagen realer Proben).

Wiederholpräzision 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 durchgeführt wird.

Akzeptanz- Die Akzeptanzkriterien hängen stark von den Forderungen bei der

kriterien 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. 10% und in der Medizin von 20% durchaus akzeptabel.

Reproduzierbarkeit

Genauigkeit

Genauigkeit Die Genauigkeit ist kein Validierungselement, sondern der Oberbegriff für Richtigkeit und Präzision. Ein Ergebnis ist genau, wenn es frei von zufälligen und systematischen Fehlern ist. Angemerkt sei an dieser Stelle, dass die Begriffe „Genauigkeit“ und „Präzision“ in der Literatur oft als synonyme Terme verwendet werden.

Linearität

Kalibrierfunktionen 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 „Analysefunktion“ oder Kalibrierfunktion treffender sein. Kalibrierfunktionen zweiten Grades können und sollten gegebenenfalls verwendet werden. Ähnlich der Messpräzision kann hier mit einer Standardlösung die Linearität des Gerätes (Detektor) bestimmt werden. Die Linearität der Methode ist meist kleiner (selten gleich) als die Linearität des Detektorsystems. Gleichheit bedeutet, dass die Matrix und die Probenvorbereitung keine systematischen Fehler verursachen.

Linearität des Gerätes

Linearität der Methode

Prüfung der Methode

Prüfung auf Linearität

Einpunkt-Kalibrierung

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 (Sensitivitätsplot); Verdünnungsfehler im unteren Bereich werden so einfacher erkannt. Im Zusammenhang mit der Linearität wird oft der Arbeitsbereich „range“ genannt. Dieser ist der zwischen der niedrigsten und der höchsten Konzentration (Menge) des Analyten in der Probe, für den die geforderte Präzision und Genauigkeit bewiesen wurden.

Auftragung S/c gegen c

Arbeitsbereich

Nachweis- und Bestimmungsgrenze

Bestimmungsgrenze	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.
Erfassungsgrenze	Sie gibt die Konzentration (Menge) an, die mit einer 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 dreifache Rauschen als Nachweisgrenze und das 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

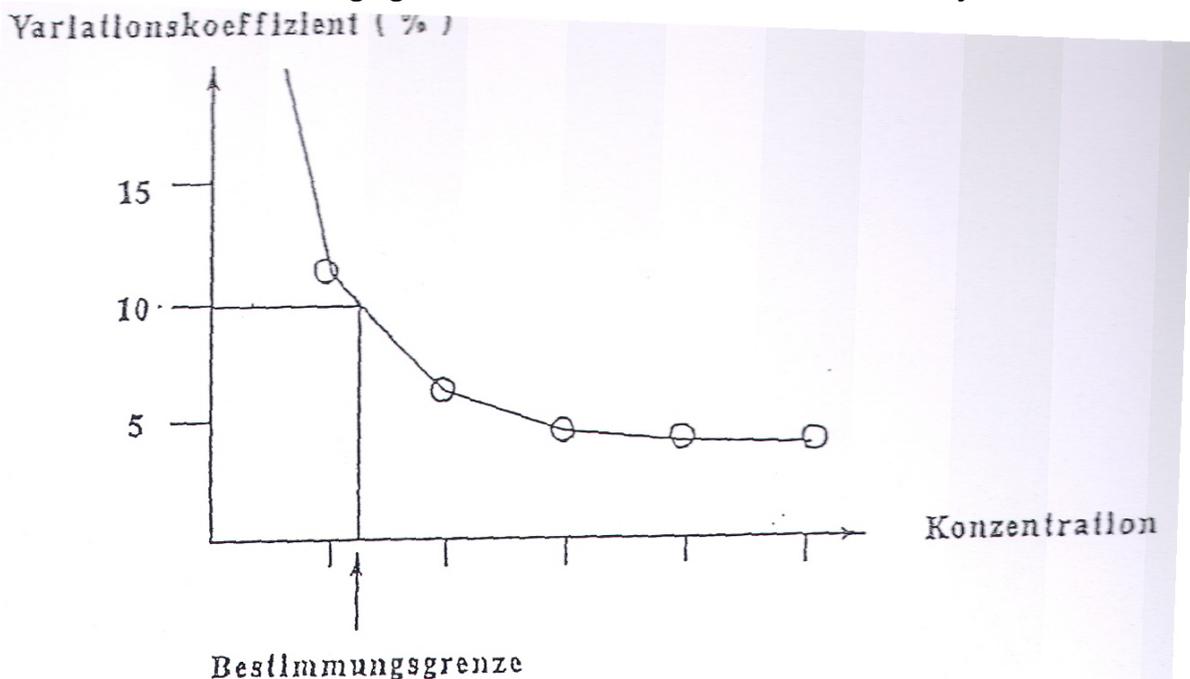


Abbildung 1. Bestimmungsgrenze in der instrumentellen Analytik ²⁾.
Verdünnungsreihe aus Kalibrierlösungen, je sechsmal analysiert.

Robustheit

Eine Methode ist robust, wenn durch 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 30° C und 35° C, pH 5 bis 7, 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 wie pH-Wert, Temperatur, Probenlösung.

Methodenfähigkeit

Eine Methode ist „fähig“ (geeignet), wenn ihre Streuung zu den Anforderungen, d. h. zu der geforderten Toleranzbreite klein genug ist. Ein Maß dafür ist der sogenannte Methodenfähigkeitsindex. Ist dagegen die Streuung zu groß, besteht die Gefahr, dass Werte erzeugt werden, die sich außerhalb der Spezifikationsanforderungen befinden. In diesem Fall wäre diese Methode ungeeignet, z. B. einen Produktionsprozess zu überwachen. Zu Details, s. Literatur.

Prozessstabilität

Hier wird überprüft, ob eine Abhängigkeit des Ergebnisses von der Zeit vorliegt. Ein hervorragendes Tool für diese Überprüfung stellen die Qualitätsregelkarten dar.

Umfang der Methodvalidierung

Warum Validierung

Die Methodvalidierung ist eine notwendige, qualitätssichernde Maßnahme, sie muss allerdings schnell 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. Ein (aufwendiger) Ringversuch wiederum

ermöglicht die Beurteilung einer Methode; hiermit werden die Präzision sowie die Robustheit der gesamten Methode überprüft.

Dringende Empfehlung: Die Validierung sollte unter realen(!), nicht unter optimalen Bedingungen durchgeführt werden. Man sollte allen Parametern, die einen Einfluß auf das Ergebnis haben könnten, auch die Chance geben, auf das Ergebnis einzuwirken – und das ist selten innerhalb einer oder zweier Wochen möglich. Hat die Validierung lediglich eine Alibifunktion und wird sie demensprechend durchgeführt, sind die Probleme im späteren Routinebetrieb unausweichbar.

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

Grundbegriffe der Methodvalidierung

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. <ul style="list-style-type: none"> • 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 Analyse, d. h. der Probenvorbereitung, der

Messung und der Befundung.

Wiederhol- präzision	repeatability	Laborinterne Präzision (Wiederholbedingungen: ein Labor, ein Prüfer, ein Gerät)
Laborpräzi- sion Vergleichs- präzision	intermediate precision reproducibilit y	Ein Labor, zwei Prüfer, zwei Geräte, zwei Tage Präzision im Vergleich Labor zu Labor (Vergleichbedingungen: mehrere Labors, mehrere Prüfer, mehrere Geräte)
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 Probenvorbereitung Überprüfung, ob bei der Probenaufarbeitung (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
Bestimmungs- -grenze	limit of quantitation	kleinste quantifizierbare Menge ,Wieviel“-Entscheidung. Mindestkonzentration (-Menge), die mit vorgegebener Wahrscheinlichkeit nachgewiesen werden kann.
Erfassungs- grenze	(deutsche „Er- findung“)	

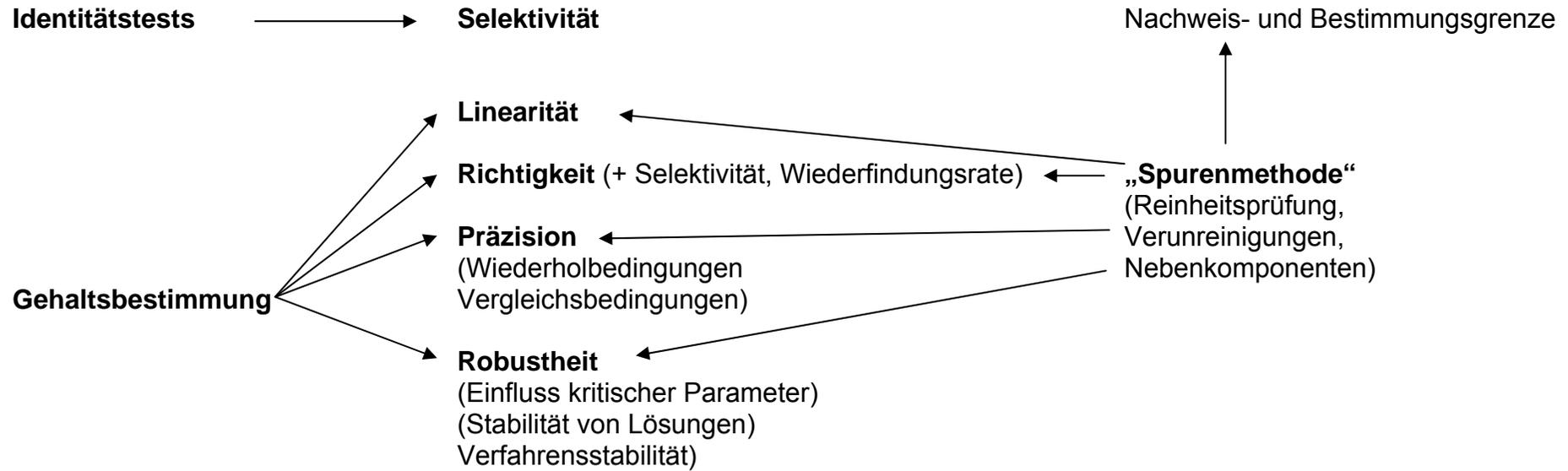
Methodenvalidierung in der Analytik I Prüfparameter

<u>Bezeichnung</u>	<u>Aussage über</u>
Richtigkeit	systematische Fehler
Präzision <ul style="list-style-type: none">• Wiederholbarkeit (Wiederholpräzision)• Vergleichbarkeit (Vergleichspräzision)	zufällige Fehler laborintern verschiedene Labors
Robustheit <ul style="list-style-type: none">• Verfahrensstabilität („robustness“)• Übertragbarkeit („regeedness“) (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)

Methodenvalidierung in der Analytik II Prüfparameter

<u>Bezeichnung</u>	<u>Aussage über</u>
Spezifität	Störanfälligkeit gegenüber Begleitkomponenten
Messbereich, („range“) dynamischer Arbeitsbereich	Konzentrationsbereich für erlaubte quantitative Aussagen
Unsicherheit, Vertrauensintervall	Schwankungsbereich des Analysergebnisses (Messwertes)
Reproduzierbarkeit	Wiederholpräzision innerhalb kurzer Zeitabstände
Genauigkeit	Oberbegriff für Richtigkeit und Präzision

Umfang der Methodvalidierung in der Analytik



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

Dringender Hinweis: Bei Bedarf Probennahme, -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 Steuerung meiner Ergebnisse
(2) Wie ist die Steuerung meiner Ergebnisse bedingt durch das Gerät plus Methode?

Selektivität

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, spezielle Sensoren, Gen-Antigen-Wechselwirkungen	Orthogonale Trenntechniken, off-line/on-line Kopplungen, z. B. Chromatographie/Spektroskopie
---	---	--	--

Ist die Methode überhaupt selektiv für meine Probe?

Robustheit I (Methodenrobustheit)

Δ pH; Δ Temperatur, Δ I, usw.

Wie beeinflussen kleine Änderungen in der Methode mein Ergebnis?

Stufe 2, Wiederhol-
präzision, z. B. 6
Einwaagen Doppel-
bestimmung

Bestimmungsgrenze

Signal/Rausch- Verhältnis 9:1 (NWG: 3:1)	Leerwertmethode oder Kalibriermethode	niedrigste Konzen- tration für die ge- wünschte Wieder- holpräzision
--	--	---

Diese Menge an Ver-
unreinigungen kann
ich noch quantifizieren

Linearität
(Analysefunktion)

Nein

Linearität im relevan-
ten Bereich gege-
ben?

Ja

Signal/Rausch- Verhältnis 9:1 (NWG: 3:1)	Leerwertmethode oder Kalibriermethode	niedrigste Konzen- tration für die ge- wünschte Wieder- holpräzision
--	--	---

Konzentrations-
bereich für beschreib-
baren
mathematischen
Zusammenhang
zwischen Signal und
Konzentration
Liefert die Methode
ein richtiges Ergebnis,
sind also
systematischer Fehler
nicht vorhanden?

Richtigkeit

Vergleich mit unab- hängiger, validierter Methode	Soll-/Ist-Vergleich mit einer möglichst zertifizierten oder synthetischen Probe	Aufstockverfahren (Spiken)	Indirekte Überprüfung über Stoff-/Massenbi- lanzen	Of in der Praxis: Selektivität gege- ben + Linearität gegeben + Gerade durch den Null- punkt → Ergebnis richtig
---	--	-------------------------------	--	---

Systematische Fehler gefunden?

Ja

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

Nein

Stufe 3

Robustheit II (Anwendbarkeit)

Methode nur für laborinterne Zwecke

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

Methode wird auch außerhalb des eigenen Labors eingesetzt

- Vergleichspräzision (Übertragbarkeit)
- Ringversuche

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

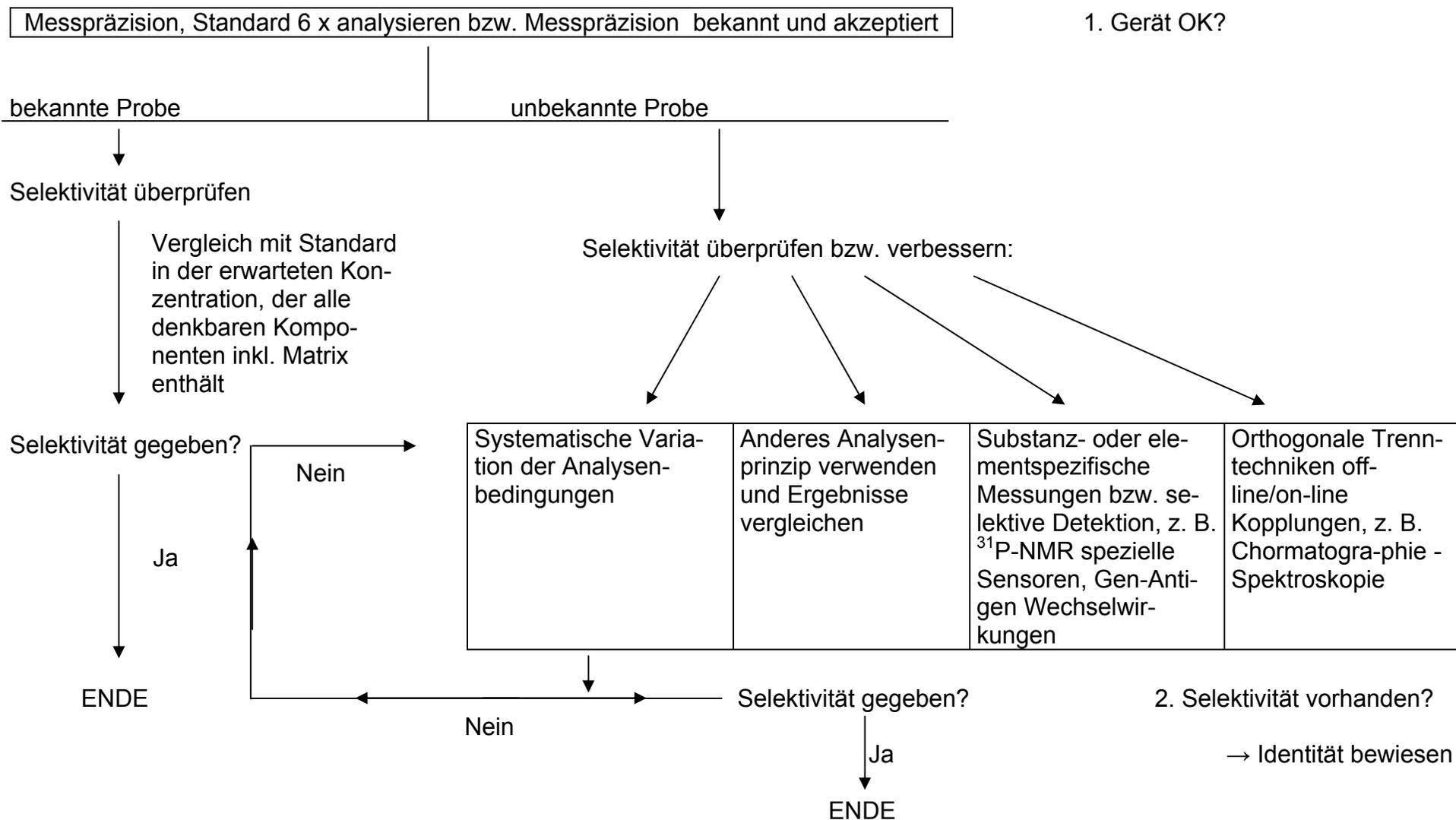
ENDE DER MESSUNG

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

- Ist die Methode für den beabsichtigten Zweck geeignet, z. B. Steuerung 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 Punkte der Methode identifiziert und herausgestellt? Empfehlungen für die Routineanwender?

ENDE DER VALIDIERUNG

Fließschema zur Methodvalidierung von Identitätstests in der Chromatographie

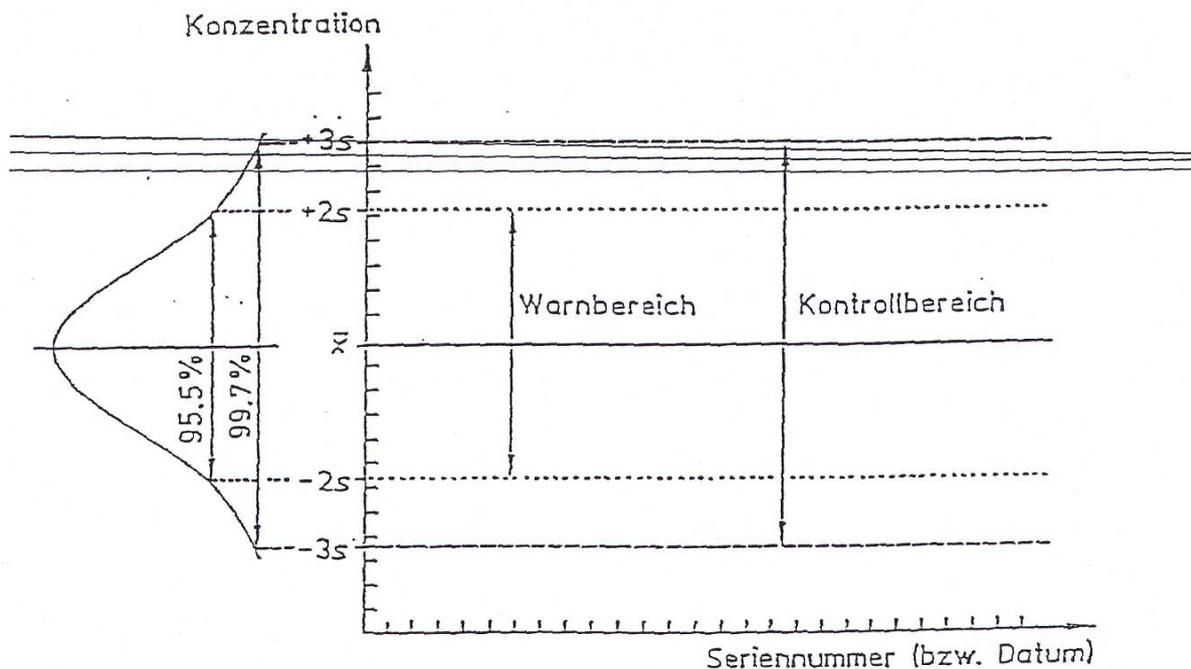


Qualitätsregelkarten

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 unten zeigt beispielhaft den Aufbau einer Qualitätsregelkarte.



Prinzipieller Aufbau einer Kontrollkarte

Prinzipieller Aufbau einer Qualitätsregelkarte³⁾.

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
Vorteile einer Kontrollkarte

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:

- 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 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 Kontrollkarten

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.)

Präzisionskontrolle

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 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.

Richtigkeitskontrolle

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

Kontroll- periode Warngrenze Eingriffs- grenze	<p>Kontrollperiode vergleichbar sind.</p> <p>Als Warngrenze wird zumeist ein Band der Breite $4s$ (Mittelwert $\pm 2s$, mit s als Standardabweichung der Vorperiode), als Eingriffsgrenze ein Band der Breite $6s$ (Mittelwert $\pm 3s$) festgelegt.</p>
Annahme- karten Außer- Kontroll- Situation	<p>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.</p> <p>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:</p> <ul style="list-style-type: none"> • 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	<p>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 befindet⁴⁾.</p>
periodische Schwank- ungen	<p>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 wird man also in Zukunft umfassende Möglichkeiten zum Führen von Kontrollkarten erwarten, wie die online-Datenübernahme von</p>
retrospektive Überprüf- ungen	

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. Probenvorbereitung, Messung, Befundung. Der Fachmann/-frau 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: S. Kromidas, Validierung in der Analytik, Wiley-VCH.

Literaturliste zum Thema (Auswahl)

1. Funk, Damman, Vonderheid, Oehlmann:
Statistische Methoden in der Wasseranalytik
VCH-Verlag Weinheim (1989)
2. Funk, Damman, Donneveert:
Qualitätssicherung in der Wasseranalytik
VCH-Verlag Weinheim (1992)
3. Gottwald:
Statistik für Anwender
VCH-Verlag, Weinheim (1999)
4. Kromidas (Hrsg.):
Validierung in der Analytik
VCH-Verlag, Weinheim (1999)
5. Kromidas (Hrsg.):
Handbuch Validierung in der Analytik
VCH-Verlag Weinheim (2000)
6. Sachs, Lothar:
Angewandte Statistik
Springer-Verlag Berlin (1975)
7. Doerffel:
Statistik in der Analytik
VEB Grundstoff-Verlag Leipzig (1984)

8. Ehrenberg:
Statistik oder der Umgang mit Daten
VCH-Verlag Weinheim (1993)
9. Qualitätssicherung und angewandte Statistik (ISO-Normen)
Taschenbuch 223: Begriffe, Normen
 224: Verfahren, 1. Normen
 225: Probenahme und Annahmestichproben DIN 53803T
 226: QS-Systeme, Normen
Beuth-Verlag Berlin, Köln (1995)
10. ICH
International Conference on the Harmonization of Technical Requirements for the
Registration of Pharmaceuticals for Human Use (1990)
11. Hilfe-Index des analytischen Statistikprogramms MVA (Novia GmbH)
12. J. Ermer und J.H. Miller, Method Validation in Pharmaceutical Analysis, Wiley-
VCH Weinheim

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

ISO 17025

Richtlinien zum Betreiben von Prüf- und
Kalibrierlaboratorien