

# Methodenvalidierung im analytischen Labor

**Validierung tut not, sollte aber auf pragmatische Weise in Angriff genommen werden, damit der Aufwand angemessen bleibt. Der Autor diskutiert den notwendigen Validierungsumfang und schlägt ein Schema der praktischen Vorgehensweise vor.**

Die intensive Diskussion der letzten Jahre zum Thema „Validierung“ führte zu konkreten Ergebnissen. Seit 1994 existiert eine ISO-Definition zur Validierung, und es herrscht weitgehender Konsens über die in Frage kommenden Validierungselemente. Aktuelle Themen sind nun der sinnvolle Validierungsumfang und eine ökonomische Vorgehensweise. Der Tenor demnach lautet: „Validierung ja, aber sie muß bezahlbar bleiben“.

## Validierung: Kenngrößen, Zweck und Analysenziel

Die einzelnen Validierungselemente und deren Bedeutung sind bereits vielfach Gegenstand von Publikationen gewesen<sup>1-4</sup>, wenn

auch Anzahl und begriffliche Inhalte nicht immer übereinstimmen. In Tabelle 1 sind die wichtigsten, im Zusammenhang mit der Validierung verwendeten Begriffe und deren Bedeutung zusammengefaßt. Die willkürliche Trennlinie trennt die wichtigen Validierungsgrößen von im Alltag weniger relevanten Begriffen.

Die Definition der Validierung in der ISO 8402 aus dem Jahre 1994 lautet: „Bestätigen aufgrund einer Untersuchung und durch Bereitstellen eines Nachweises, daß die besonderen Forderungen für einen speziellen, beabsichtigten Gebrauch erfüllt worden sind.“ Die Validierung ist somit eine zweckspezifische Prüfung, stark an der Anwendung orientiert. Somit hängen Validierungsumfang und -tiefe vom Zweck ab. Der Aufwand beispielsweise für

- eine Methode mit einem Gefährdungspotential für Mensch, Tier und Umwelt,
- eine im eigenen Hause entwickelte Methode mit wenigen Erfahrungswerten
- oder eine Methode im Zusammenhang mit einem umsatzstarken Produkt ist folglich größer als der für einen „Schnell-

schuß“ bei einer einmaligen Fragestellung aus der Forschung.

Es gibt keine bindende Forderung über den Umfang der Validierung – mit Ausnahme der Pharmaindustrie (FDA, ICH). Es existieren lediglich Diskussionspapiere und Empfehlungen von Gremien und Verbänden. Der Analytiker kann und muß über Umfang, Tiefe und Modus der Validierung entscheiden. Die in letzter Zeit verstärkt diskutierten Möglichkeiten zur schnellen Abschätzung der Meßunsicherheit bis hin zur „Schnellvalidierung“<sup>5,6</sup> werden in naher Zukunft einen Teil der klassischen Validierungsprozedur ersetzen<sup>7</sup>. Schnelle Methoden sind für einmalige Fragestellungen, für Validierungsaussagen in einer frühen Entwicklungsphase eines Wirkstoffs, für eine „unwichtige“ oder unkritische Methode – oft in Kombination mit knappen Terminvorgaben – die einzige vernünftige Alternative.

Wenn man von zerstörungsfreien Prüfungen und Spezialtechniken wie Dissolutionstests absieht, sind die wichtigsten Prüfarten in der Analytik folgende:

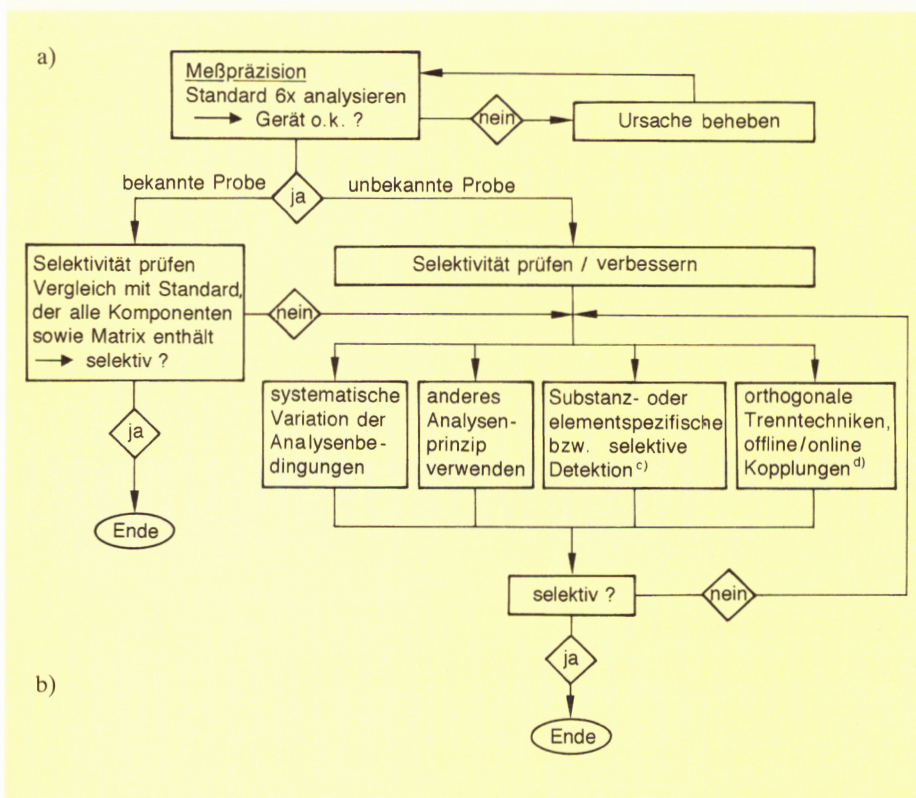
- Identitätstests,
- physikalisch-chemische Verfahren,
- Gehaltsbestimmungen,
- quantitative Spurenmethoden.

Während bei einem Identitätstest das Ziel ist, den Analyten eindeutig zu charakterisieren, gilt es bei der Analyse eines Wirkstoffs mit Nebenkomponenten und Metaboliten, zuverlässige quantitative Aussagen für nahezu jede detektierbare Komponente zu machen. In der Natur der Sache liegt auch, daß bei Gehaltsbestimmungen die Präzision sehr wichtig ist, bei chromatographischen Verfahren die Selektivität generell den kritischen Punkt darstellt und bei Spurenmethoden die Ermittlung der Bestimmungsgrenze bedeutsam ist. Die Aufmerksamkeit bei der Validierung gilt dem schwächsten Glied der (Analysen)-Kette. Tabelle 2 gibt einen möglichen Umfang der Methodenvalidierung – abhängig vom Analysenziel – wieder.

## Validierungsumfang und Vorgehensweise

Der geringste Aufwand ist bei den Identitätstests notwendig (Abbildung 1). Bei den anderen Analysenarten gibt es bestimmte Größen, deren Kenntnis in der Regel unabdingbar zur Beurteilung einer Methode ist:

- Die Güte der Meßapparatur (Meßpräzision) sollte bekannt sein bzw. überprüft werden<sup>8</sup>.
- Die Selektivität ist eine Grundvoraussetzung für die Richtigkeit.



**Abb. 1. Validierung von Identitätstests, a) 1. Stufe: Geräteverifizierung; b) 2. Stufe: Selektivitätsnachweis → Identitätsbeweis; c) z.B. <sup>1</sup>H-NMR, Spezielle Sensoren, Gen-Antigen-Wechselwirkungen; d) z.B. Chromatographie/Spektroskopie.**

Tabelle 1. Begriffe der Methodenvalidierung.

Begriff	englische Bezeichnung	Aussage über
Richtigkeit	trueness, accuracy of the mean	systematische Fehler
Präzision: ● Präzision unter Wiederholbedingungen, Wiederholbarkeit, Wiederholpräzision (im Laborjargon: Reproduzierbarkeit) ● Laborpräzision	precision repeatability  intermediate precision	zufällige Fehler laborintern, kurze Zeitabstände, 1 Anwender, Gerät  laborintern, kurze Zeitabstände, $\Delta$ Anwender, $\Delta$ Gerät
● Präzision unter Vergleichsbedingungen, Vergleichbarkeit, Vergleichspräzision, Übertragbarkeit	reproducibility	verschiedene Laboratorien, identische Probe
Robustheit: ● Methodenrobustheit	robustness	Störanfälligkeit durch veränderte Methodenparameter, z.B. pH, Temperatur, Salzgehalt
● Verfahrensstabilität	robustness	Stabilität eines Verfahrens in Abhängigkeit von der Zeit; hierher gehört auch die Stabilität von Lösungen
● Übertragbarkeit	ruggedness (wird immer seltener benutzt, dem Sinne nach identisch mit „reproducibility“)	Störanfälligkeit durch Wechsel von Anwender, Gerät, Labor
Selektivität	selectivity	Fähigkeit zur Bestimmung mehrerer Komponenten nebeneinander
Wiederfindungsrate	recovery	Ausbeute der Probenvorbereitung
Linearität <sup>a)</sup>	linearity	Abhängigkeit Signal/Konzentration
Bestimmungsgrenze	quantitation limit	kleinste quantifizierbare Menge (Konzentration)
Meßbereich, (dynamischer) Arbeitsbereich	range	Konzentrationsbereich für erlaubte quantitative Aussagen
Meßunsicherheit, Vertrauensintervall	uncertainty of the measurement	Schwankungsbereich des Analyseergebnisses (Meßwerts)
Spezifität	specificity	Störanfälligkeit der Methode gegenüber Begleitkomponenten
Genauigkeit	accuracy	Oberbegriff für Richtigkeit und Präzision (systematische und zufällige Fehler)
Erfassungsgrenze	(deutsche „Erfindung“) DIN-Entwurf 32645	Kleinste Menge, die mit einem Fehlerrisiko von 5 % qualitativ bestimmt werden kann; sie ist zwischen Nachweis- und Bestimmungsgrenze angesiedelt.

<sup>a)</sup> Da mit dem Begriff „Linearität“ ein zwingender linearer Zusammenhang zwischen Signal und Konzentration suggeriert wird, empfiehlt sich eher der Terminus „Analysen-“ oder „Kalibrierfunktionen“.

● Die Streuung der Methode (*Methodenpräzision*) ist ein wichtiges Kriterium.

● Es muß untersucht werden, inwieweit variierende Bedingungen das analytische Ergebnis beeinflussen (*Robustheit*). Welche „variierenden Bedingungen“ im konkreten Fall relevant sind und in der Zukunft sein könnten, gilt es zu klären.

Die Überprüfung der vier Elemente Präzision, Selektivität, Richtigkeit und Robustheit kann als Minimalforderung angesehen werden und stellt die Grundvalidierung dar. Das Analysenziel bestimmt den endgültigen Umfang der Validierung.

Aus ökonomischen Gründen sollten die Stufen einer Validierung in einzelnen Schüben zusammengefaßt werden, in denen mehrere Validierungselemente bestimmt werden können.

### 1. Schritt: Methodenpräzision, Linearität, Wiederfindungsrate, Nachweis und Bestimmungsgrenze

Wenn die Meßpräzision bekannt oder deren genaue Kenntnis unwichtig ist, sollten zu Beginn nicht der Standard, sondern sechs reale Proben (sechs Einwaagen!) analysiert werden.

Man ermittelt die Methodenpräzision und erhält einen ersten Hinweis auf eine mögliche Inhomogenität des Probenmaterials.

Werden weiterhin – wenn man denn schon an der Waage ist – sechs unterschiedliche Konzentrationen von realen Proben eingewogen, kann die Linearität ermittelt werden. Bei Bedarf wird hier durch Vergleich mit Standardlösungen oder durch die Additionsmethode die Wiederfindungsrate überprüft. Schließlich kann bei entsprechenden Einwaagen im Rahmen der Linearitätsüberprüfung die Nachweis- oder/und Bestimmungsgrenze bestimmt werden. Es sollten jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt werden.

### 2. Schritt: Selektivität, Methodenrobustheit

Wird die Selektivität durch Variation von Analysenbedingungen überprüft oder optimiert, ist das gleichzeitig eine hervorragende Gelegenheit, auch die Methodenrobustheit gegenüber etwaigen Variationen festzustellen (Verfahrensstabilität). Dieser Schritt erfolgt in der Regel bereits bei der Methodenentwicklung oder generell in einem frühen Stadium.

### 3. Schritt: Laborpräzision, Vergleichspräzision

Falls Methodenpräzision, Methodenrobustheit und Verfahrensstabilität als nicht ausreichend in puncto Robustheit erscheinen, käme als nächster Schritt vor der aufwendigeren Vergleichspräzision und einem Ringversuch die Laborpräzision in Frage. Es sollten mehrere realistische Variationen in Betracht gezogen werden. So können beispielsweise sechs Analysen vom Anwender A mit Gerät B und Lösungsmittel vom Hersteller C durchgeführt werden, oder Anwender B analysiert sechsmal mit Gerät A und Lösungsmittel von D usw.

Stavros Kromidas, Saarbrücken