



Ihr Partner für Analytik

Methodenvalidierung in der Analytik

Autor: Dr. Stavros Kromidas

Novia

Chromatographie- und Messverfahren GmbH
Industriepark Höchst
Gebäude B 845
D-65926 Frankfurt am Main

Tel. +49 (0) 69 305-43843
Fax +49 (0) 69 30 9159

info@novia.de
www.novia.de

Zum Dokument

Die Methodvalidierung 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 Methodvalidierung	20
5.0	Grundbegriffe der Methodvalidierung	28
6.0	Schema: Umfang der Methodvalidierung in einer Analytik	29
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. 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 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.
- 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.

**statistische
Daten**

**Ausreisser-
tests**

**Überprüfung
des
Messgeräts**

**Prüfmittel-
überwachung**

**Verfahrens-
validierung**

**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 (siehe Dokument ALC 00297). 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 Methodenvvalidierung 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 Methodenvvalidierung 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 Methodenvvalidierung:

- Der Zweck ist unmissverständlich definiert.
- 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. 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

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 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 (relative Retention, Peakbreite und Asymmetriefaktor).

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 Analyseergebnisse. 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.

Akzeptanzkriterien 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 und in der Medizin von 10 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 und systematischen Fehlern ist. Angemerkt sei an dieser Stelle, dass die Begriffe „Genauigkeit“ und „Präzision“ 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 „Analysenfunktion“ 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

Einpunkt-Kalibrierung

Auftragung S/c gegen c

Arbeitsbereich

Prüfung der Linearität

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 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

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

Erfassungsgrenze kann. Das zugrunde liegende mathematische Modell und die Bestimmungsmethoden sind in der DIN 32645 beschrieben. 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

Vereinbarungen über die 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.

In der chromatographischen Praxis gelten zumeist das zwei- bis dreifache Rauschen als Nachweisgrenze und das fünf- bzw. 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/D²⁾ (Abbildung 1). Durch eine Verdünnungsreihe wird die kleinste Konzentration ermittelt, für die der Variationskoeffizient noch tolerierbar ist.

Bestimmungsgrenze in der instrumentellen Analytik

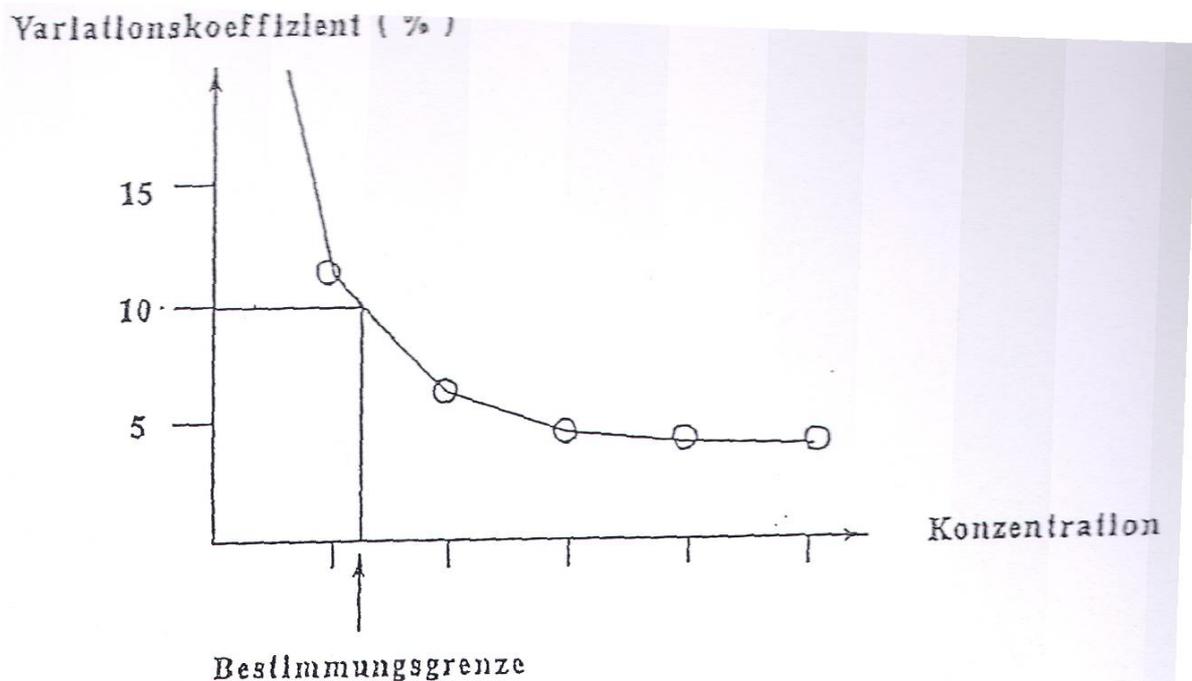


Abbildung 1. Bestimmungsgrenze in der instrumentellen Analytik ²⁾. Verdünnungsreihe aus Kalibrierlösungen, je sechsmal analysiert.

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.

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.

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 Analyseergebnisse. Die Ermittlung dieser Schwankungen erfolgt durch mehrfache (sechsfache) Durchführung der gesamten Analysen, d. h. der Probenvorbereitung, der Messung und der Befundung.
Wiederholpräzision	repeatability	laborinterne Präzision (Wiederholbedingungen: ein Labor, ein Prüfer, ein Gerät)
Laborpräzision Vergleichspräzision	intermediate precision reproducibility	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 Analytkonzentration 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.

Wiederfindungsrate

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 (Analyseparameter, Gerät, Labor usw.)

Nachweisgrenze

limit of detection

Kleinste nachweisbare Menge

„Ja/Nein“-Entscheidung

Bestimmungsgrenze

limit of quantitation

kleinste quantifizierbare Menge

„Wieviel“-Entscheidung.
Mindestkonzentration (-Menge), die mit vorgegebener Wahrscheinlichkeit nachgewiesen werden kann.

Erfassungsgrenze (deutsch Erfindung)

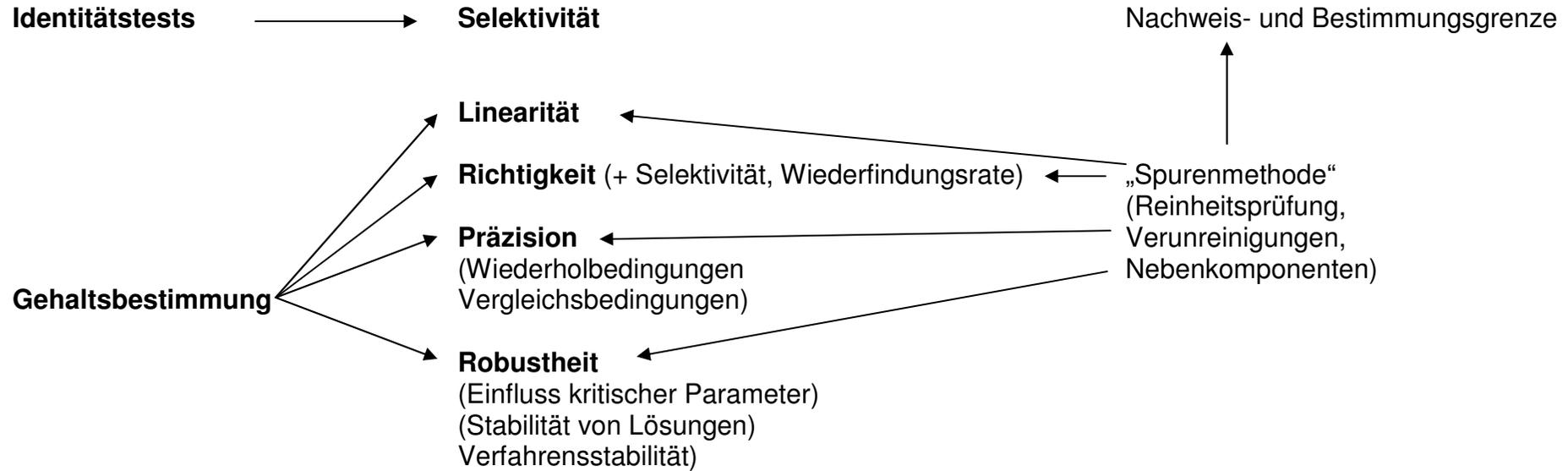
Methodenvalidierung in der Analytik I Prüfparameter

<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 („repeatability“) (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 Analyseergebnisses (Messwertes)
Reproduzierbarkeit	Wiederholpräzision innerhalb kurzer Zeitabstände
Genauigkeit	Oberbegriff für Richtigkeit und Präzision

Umfang der Methodvalidierung in der Analytik



Fließschema zur Methodenvalidierung 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

- (1) Wie ist die Steuerung meiner Ergebnisse bedingt durch das Gerät?
- (2) Wie ist die Steuerung meiner Ergebnisse bedingt durch das Gerät plus Methode?

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

Selektivität

bekannte Probe

Vergleich mit einem Standard, der alle denkbaren Komponenten enthält

unbekannte Probe

Systematische Variation der Analysbedingungen
Zweites Analysen- bzw. Trennprinzip verwenden

Substanz- oder elementspezifische Messung, bzw. selektive Detektion, z. B. ³¹P-NMR, spezielle Sensoren, Gen-Antigen-Wechselwirkungen

Orthogonale Trenntechniken, off-line/online Kopplungen, z. B. Chromatographie/Spektroskopie

Δ pH; Δ Temperatur, Δ I, usw.

Robustheit I (Methodenrobustheit)

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)

Linearität im relevan-
ten Bereich gege-
ben?

Nein

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?

Ja

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	Oft 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?)

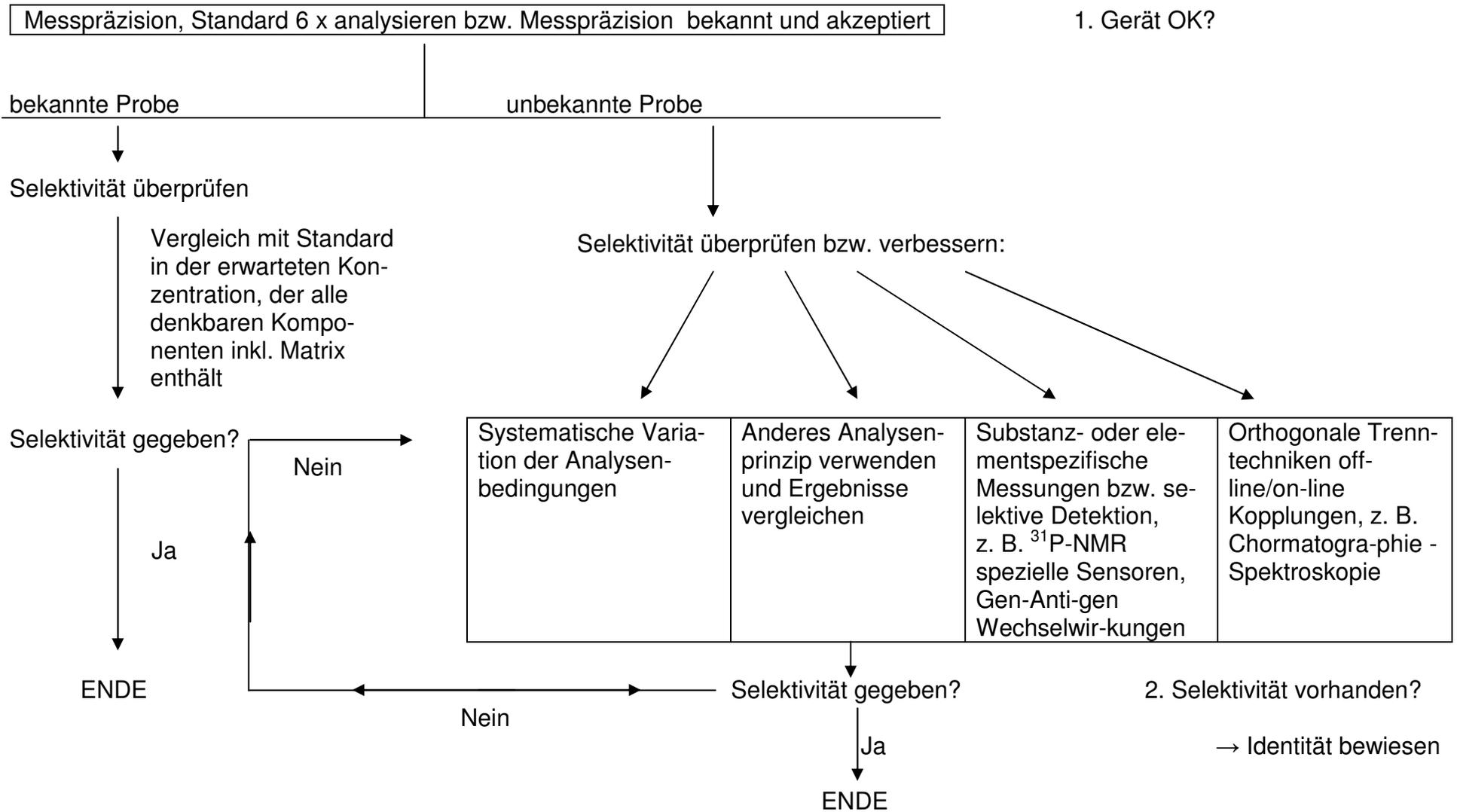
ENDE DER MESSUNG

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

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

ENDE DER VALIDIERUNG

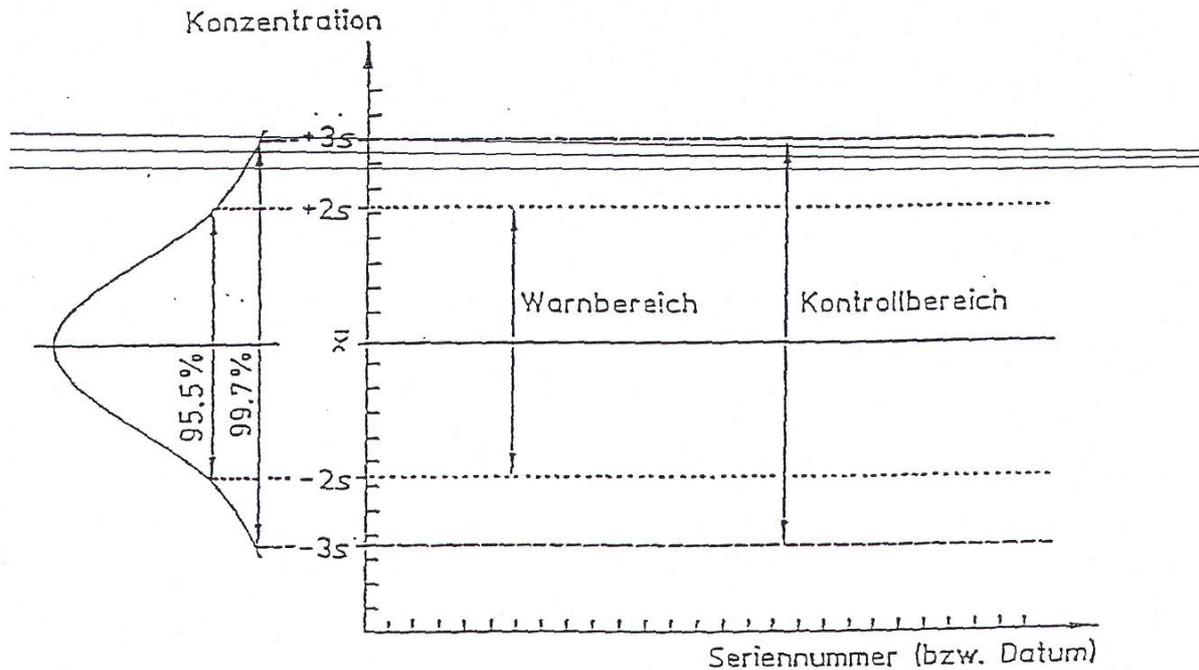
Fließschema zur Methodvalidierung von Identitätstests in der Chromatographie



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 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 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.

**Nachweis der Funktion eines Prozesses
Vorteile einer Kontrollkarte**

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 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
Einsatzgebiete	Laboratorien und die regelmäßige Kontrolle bestimmter Abwässer.
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 Kontrollperiode vergleichbar sind.
Kontrollperiode	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.
Warngrenze	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.
Eingriffsgrenze	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.
Annahmekarten	
Außer-Kontroll-Situation	

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 befindet⁴⁾.

periodische Schwankungen

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 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.

retrospektive Überprüfungen

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: 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. Kromidas (Hrsg.):
Qualität im analytischen Labor
VCH-Verlag Weinheim (1995)
 4. Gottwald:
Statistik für Anwender
VCH-Verlag, Weinheim (1999)
 5. Kromidas (Hrsg.):
Validierung in der Analytik
VCH-Verlag, Weinheim (1999)
 6. Kromidas (Hrsg.):
Handbuch Validierung in der Analytik
VCH-Verlag Weinheim (2000)
 7. Sachs, Lothar:
Angewandte Statistik
Springer-Verlag Berlin (1975)
 8. Doerffel:
Statistik in der Analytik
VEB Grundstoff-Verlag Leipzig (1984)
 9. Ehrenberg:
Statistik oder der Umgang mit Daten
VCH-Verlag Weinheim (1993)
 10. 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)
 11. ICH
International Conference on the Harmonization of Technical Requirements for the
Registration of Pharmaceuticals for Human Use (1990)
 12. Hilfe-Index des analytischen Statistikprogramms MVA (Novia GmbH)
- © by NOVIA, Alle Rechte bei NOVIA GmbH

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

Validierung von Analysemethoden

Qualitätsmanagementsysteme sind heute ebenso selbstverständlich wie der Führerschein im Straßenverkehr. Qualitätsbewusste Laboratorien weisen eine Akkreditierung nach EN 45001 auf. Die Anwendung dieser Norm und Ihrer Guidelines fordert zwingend die Validierung der eingesetzten Analysemethoden. Eine Validierung ist eben kein Luxus mehr.

HANS LASKA, MICHAEL BERGER

Unter einer validierten Analyse-
methode versteht man ganz allge-
mein, daß sie zuverlässige und re-
produzierbare Resultate liefert. Die Va-
lidierung gibt Auskunft über die Eigen-
schaft einer Analysemethode für ihre

*H. Laska und M. Berger, Interlabor Belp AG,
Birkenweg 5, CH-3123 Belp

analytische Aufgabenstellung. Die Vali-
dierung ist als Freigabeverfahren für eine
Analysemethode im eigenen Labo-
ratorium zu verstehen (Validität =
Rechtsgültigkeit). Bei der Validierung einer
Analysemethode muß sich der
Analytiker darüber im klaren sein, daß
er nur einen Teil des gesamten Analy-
senverfahrens geprüft hat und über ge-

wisse Verfahrensgrößen keine Aussage
machen kann.

Voraussetzungen für eine gültige Va-
lidierung ist daher ein definiertes und
homogenes Untersuchungsgut gleicher
Charge; eine ausgearbeitete, in schrift-
licher Form vorliegende Analyseme-
thode; genau charakterisierte Referenz-
substanzen bekannter Reinheit

Prüfparameter einer Validierung

Spezifität:

Unter Spezifität versteht man die
Anfälligkeit eines Analyseverfahrens
gegenüber Störkomponenten.

Der Analytiker muß unter dem Ab-
schnitt Spezifität in seinem Validie-
rungsdossier den Beweis erbringen,
daß das gewählte Analyseverfahren
für den Analyten (Wirksubstanz) spe-
zifisch ist. Der Analyt darf nicht durch
Störkomponenten überlagert werden.

Zum einen kann der Analytiker da-
zu eine sehr spezifische Methode der
Aufarbeitung und Aufreinigung seines
Probenextraktes verwenden. Die Spe-
zifität einer Methode läßt sich bei
Rückstandsuntersuchungen mittels
Blindwerten belegen. Bei den Blind-
proben handelt es sich um Proben, die
den Analyten nicht enthalten. Einige
sehr spezifische Verfahren sind die mi-
krobiologischen und enzymatischen
Analysesysteme. Zum anderen kann
ein sehr spezifisches Detektionsver-
fahren verwendet werden. Hier bieten
sich Fluoreszenz, Nach- oder Vorsäu-
lenderivatisierungen, Massenspektro-
meter, Ionenselektive Elektroden, FPD
(Flammenphotometrischer Detektor
z.B. für Schwefel oder Phosphor), oder
ECD (Elektronen-anlagerungsdetek-
tor für Halogene) an.

Selektivität:

Unter Selektivität versteht man die
Fähigkeit eines Analyseverfahrens,
verschiedene Komponenten oder ver-
schiedene Zustandsformen einer Ver-
bindung nebeneinander zu bestim-
men.

Hier gilt es wieder zu beachten, daß
sowohl die Aufarbeitung als auch die
Endbestimmung selektiv sein kann.
Wenn bei einer Eisenbestimmung alle
Oxidationsstufen des Metalles ge-
trennt erfasst werden, so handelt es
sich um eine selektive Analyseme-
thode. Anders kann auch das Bestim-
mungssystem selektiv sein, indem es
verschiedene Komponenten auftrennt
und sie nebeneinander bestimmt. Da-
zu gehören alle chromatographischen
Bestimmungsverfahren. Es gibt ver-
schiedene Möglichkeiten, die Selekti-
vität zu charakterisieren, z.B. in der
Potentiometrie durch den Selekti-
vitätskoeffizienten oder in der Chro-
matographie durch die Auflösung.

Richtigkeit:

Unter der Richtigkeit versteht man
die Fähigkeit der Analysemethode,
den wahren Wert des Analyten in der
Probe zu bestimmen. Abweichungen
vom wahren Wert des Analyten wer-

den als systematischer Fehler einer
Analysemethode bezeichnet.

Der Analytiker hat die Möglichkeit,
über Wiederfindungen die Richtigkeit
zu belegen. Desweiteren läßt sich die
Richtigkeit aus internen Kontrollpro-
ben, Ringversuchen oder, die teuerste
Alternative, aus zertifiziertem Referenz-
probenmaterial belegen. Als Maß
für die Richtigkeit wird die Wiederfin-
dungsrate verwendet.

Präzision:

Die Präzision gibt an, wie stark die
Analysenwerte für einen Analyten
streuen. Sie läßt sich in zwei Aussa-
gen aufteilen. Zum einen in die Wie-
derholbarkeit und zum anderen in die
Vergleichbarkeit. Man spricht hier
vom zufälligen Fehler, den ein Verfah-
ren aufweist. Die Präzision läßt sich
durch die wiederholte Analyse einer
Probe bestimmen. Die Präzision kann
auch durch das Führen von Wieder-
findungsregelkarten über einen län-
geren Zeitraum erfaßt werden.

Wiederholbarkeit:

Die Wiederholbarkeit ist ein Maß für
die Übereinstimmung von Analyser-
resultaten innerhalb kurzer Zeital-
stände bei gleicher Probenmatrix und

gleichen Analysenbedingungen (Analytiker, Labor, Geräte und Chemikalien).

Vergleichbarkeit:

Die Vergleichbarkeit ist ein Maß für die Übereinstimmung von Analyseergebnissen innerhalb eines längeren Zeitabstandes bei gleicher Probenmatrix und unterschiedlichen Analysenbedingungen (Analytiker, Labor, Geräte und Chemikalien).

Die Präzision kann durch eine Mehrfachbestimmung (in der Regel $n=6$ Aufarbeitungen) belegt werden. Die Präzision wird mathematisch durch die Standardabweichung vom Mittelwert (SD) ausgedrückt.

Unsicherheit:

Die Unsicherheit oder das Vertrauensintervall gibt an, in welcher Größenordnung das Analyseergebnis schwankt.

Die Meßunsicherheit kann aus der Standardabweichung einer Analysemethode berechnet werden.

Linearität:

Die Kalibration zeigt die Abhängigkeit vom Messsignal (z.B. in mV) zur Meßgröße (z.B. in mg) der Bestimmung. Bei der Kalibration muß der Analytiker den Verlauf seiner Kalibrationskurve belegen. Um den Verlauf sicher belegen zu können, benötigt er mindestens fünf Kalibrationspunkte. Das Resultat der Kalibration läßt sich in einer mathematischen Funktion ausdrücken (z.B. lineare Regression) und dokumentieren. Die Kalibration eines Meßsystems vor jeder Analysensequenz kann unter anderem auch zur Geräteüberprüfung (Funktionskontrolle des Analysensystems) genutzt werden.

Messbereich:

Der Messbereich gibt den Konzentrationsbereich an, innerhalb dessen man quantitative Aussagen über den Analyten machen darf. Dieser Bereich wird auch als dynamischer Arbeitsbereich bezeichnet.

Der Meßbereich wird durch die obere und untere Bestimmungsgrenze festgelegt. Die Bestimmungsgrenzen werden beim praktischen Meßbereich durch die Analyse einer realen Matrix

ermittelt. Bei dem theoretischen Meßbereich handelt es sich um die x -fachen Standardabweichungen vom Rauschen des Meßsignals in der Blindprobe oder um den obersten und untersten Kalibrationspunkt. Der theoretische Meßbereich sollte durch Richtigkeitsversuche im oberen wie auch im unteren Bereich überprüft werden.

Nachweisgrenze:

Die Nachweisgrenze ist die unterste Grenze des Meßsystems, unterhalb dieser Grenze läßt sich kein Signal mehr erkennen. Im Bereich der Nachweisgrenze läßt sich zwar ein Signal erkennen, doch der Analytiker ist nicht in der Lage, dieses Signal zu quantifizieren.

Die Nachweisgrenze läßt sich praktisch durch die Analyse in realer Matrix ermitteln. Man kann auch die Daten für die Ermittlung des unteren Meßbereiches zu Hilfe nehmen. Bei der theoretischen Nachweisgrenze handelt es sich um die x -fachen Standardabweichungen vom Rauschen des Meßsignals in der Blindprobe.

Robustheit:

Die Robustheit zeigt die Anwendbarkeit einer Analysemethode unter variierenden Bedingungen, z.B. von Analytiker zu Analytiker, Labor zu Labor, auf. Es soll sichergestellt werden, daß das Resultat von kleineren Schwankungen der Analysemethode unabhängig ist. Da es sich bei einer Analysemethode um ein mehrstufiges Verfahren handelt, empfiehlt es sich, die kritischen Punkte (wichtige Verfahrensschritte) zu überprüfen.

Die Überprüfung geschieht durch geringfügige Veränderungen der Methode, z.B. der Wellenlänge, des Lösungsmittels, der Chromatographiesäule usw. Die auftretenden Abweichungen lassen sich durch Richtigkeitsversuche bestimmen.

Beurteilung:

Die Beurteilung gibt Auskunft über die Anwendbarkeit des Analyseverfahrens aufgrund der erarbeiteten Kenndaten. Sie sollte auch auf den wirtschaftlichen und umwelttechnischen Aspekt der Analysemethode eingehen.

Vorgehensweise bei der Validierung

Systematisierung:

Als erstes werden alle Einzelschritte einer Analysenmethode chronologisch aufgeführt. Nun werden die von den Einzelschritten verursachten Beiträge an der Gesamtunsicherheit abgeschätzt. Die Abschätzung erfolgt auf Grundlage des theoretischen Verständnisses und der praktischen Erfahrung beim Umgang mit der Analysenmethode.

Abschätzung:

Bei der Abschätzung ist immer von zwei Fällen auszugehen. Im günstigen Fall A (siehe Tabelle) wird das Verfahren beherrscht; es fließt beispielsweise nur der Volumenfehler der Pipette in die Fehlerabschätzung ein. Im ungünstigsten Fall B: Hier wird das Verfahren nicht beherrscht und es schleichen sich Fehler ein; beispielsweise das ungenaue Ablesen einer Bürette.

Zusammenfassung:

Nun werden alle Einzelschritte des Verfahrens in Verfahrensmodule zusammengefasst. So ist z. B. ein Verfahrensmodul die Probenhomogenisierung, Einwaage und Extraktion. Ein weiteres Verfahrensmodul wäre Messung, Auswertung und Berichterstattung usw.

Berechnung:

Aus den in einem Verfahrensmodul abgeschätzten Einzelunsicherheiten wird nun nach der Fortpflanzungsregel normalverteilter Fehler, die für das Verfahrensmodul spezifische Gesamtunsicherheit berechnet. Die spezifische Unsicherheit für ein Verfahrensmodul wird berechnet durch das Ziehen der Quadratwurzel aus der Summe der quadrierten zur Unsicherheit beitragender Einzelschritte. Die Gesamtunsicherheit wird berechnet durch das Ziehen der Quadratwurzel aus der Summe der quadrierten zur Gesamtunsicherheit beitragenden Verfahrensmodule.

und Herkunft und ein funktionstüchtiges Meßsystem. Darüber hinaus muß vollständige Klarheit zu übergeordneten Fragen wie Toleranzwert, Grenzwert, Schwankungsbreiten und dem Zweck eines Analysenverfahrens herr-

Tafel 1: Anforderungen an verschiedene Analysenmethoden

	Qualitative Analysen	Gehaltsanalysen	Spurenanalysen	Physikalisch-chemische Kenndaten
Spezifität/Selektivität	erforderlich	erforderlich	erforderlich	-
Richtigkeit	-	erforderlich	erforderlich	erforderlich
Präzision	-	erforderlich	erforderlich	erforderlich
Linearität	-	erforderlich	erforderlich	erforderlich
Meßunsicherheit	-	erforderlich	erforderlich	erforderlich
Meßbereich	-	-	erforderlich	-
Nachweisgrenze	erforderlich	-	erforderlich	-
Robustheit	erforderlich	erforderlich	erforderlich	erforderlich

Tafel 2: Schätzvalidierungsdatenblatt

Verfahrensmodule	Fehler in % vom Endergebnis	
	A	B
1. Probenahme Bohrungen, Abfüllen der Probe, Kennzeichnen, Lagerung und Transport	-	-
2. Probenvorbereitung Lufttrocknung, Homogenisierung (Sieben) Einwaage ca. 5 g ± 0,01 g Zweimalige Extraktion im Ultraschallbad Überführen in einen 100 ml ± 0,1 ml Meßkolben Aliquot von 20 ml ± 0,03 ml aufkonzentrieren Rückstand mit 2 ml ± 0,01 ml aufnehmen Spezifische Unsicherheit des Moduls	0,1 0,2 4,0 0,1 0,2 0,5 4	0,7 2,0 20,0 0,5 0,5 1,0 20
3. Messung Injektion (Peakfläche/-höhe) Chromatographie (Retentionszeit/Selektivität) Detektion (Identifikation) Quantifizierung über externem Standard Spezifische Unsicherheit des Moduls	0,8 0,9 2,0 2	2,0 2,0 10 10
4. Gesamtunsicherheit in %	5	22
5. Ergebnis mit der geschätzten Meßunsicherheit in mg/kg	4,0 ± 0,2	4,0 ± 0,9

A = günstigster Fall B = ungünstigster Fall. Die Probenahme konnte nicht in das Modell einfließen, da wir keinen Einfluß auf deren Durchführung hatten. Das zweite Modul, die Probenvorbereitung mit der Extraktion, weist die größten Unsicherheiten von 4 bis 20 % auf. Bei der Beurteilung des Extraktionsprozesses wurde die Wiederfindungsrate zu Hilfe genommen.

Es ist unabdingbar, daß sich der Analytiker über die oben genannten Punkte im klaren ist und darauf aufbauend, einen Projektplan mit den zu validierenden Parametern erstellt.

Gruppen von Analysenmethoden

Alle Analysenmethoden lassen sich in drei Gruppen unterteilen. Die erste ist die der genormten Methoden, z.B. DI AOAC, EPA Methoden. Bei der zweit-

Gruppe handelt es sich um die aus der Fachliteratur stammenden Methoden, z.B. aus dem Journal of Chromatography. Die dritte Gruppe schließlich, ist die der internen Methoden, die im eigenen Labor entwickelt wurden. Der Aufwand einer Validierung ist naturgemäß abhängig von der Wahl der Analyse-methode. Auch genormte Analyseverfahren müssen, wenn sie im eigenen Labor eingesetzt werden, einer Überprüfung unterzogen werden. Wurde das genormte Verfahren abgeändert, so ist je nach Umfang der Änderung eine Nachvalidierung notwendig.

Möglichkeit einer Kurzvalidierung

Eine Möglichkeit der Kurzvalidierung einer Analyse-methode bietet die Abschätzung der Gesamtunsicherheit. Wo die experimentelle Validierung aus Zeit-, Kosten- oder Verfahrensgründen nicht möglich ist, empfiehlt sich eine Abschätzung der Gesamtunsicherheit nach J. Markowski EMPA. Eine Schätz-

validierung ist kein langfristiger Ersatz für eine vollständige Validierung der Analyse-methode. Doch für eine kurzfristige Beurteilung eines Analyse-ergebnisses kann sie sicherlich hilfreich sein. Voraussetzung einer solchen Vorgehensweise ist allerdings eine ausgearbeitete und in schriftlicher Form vorliegende Analyse-methode, sowie eine gute Ausbildung und fundierte praktische Erfahrung.

Fazit:

Eine Fülle analytischer Verfahren und Methoden stehen zur Validierung an: Mikrobiologie und enzymatische Testverfahren, Instrumentelle Analytik und Schnelltests, naßchemische Bestimmungen und andere Verfahren haben jeweils individuelle Problemstellungen. Die vorliegende Arbeit kann daher nicht auf alle Fragen eine Antwort geben. Der gesunde Menschenverstand für Mach- und Wünschbares ist hier gefragt. Die Validierung sollte nicht mehr, aber auch nicht weniger sein, als eine Absicherung

der Analyse-methode. Sie ist vergleichbar mit einem Crashtest in der Autoindustrie, und wer fährt schon gerne mit einem nicht validierten Auto?

Weitere Information über Kennziffer: 618

Literatur:

1. Matthias Otto, Analytische Chemie, 1. Auflage, VCH-Verlagsgesellschaft, Weinheim, 1995.
2. W. Funk, V. Dammann u. G. Donnevert, Qualitätssicherung in der Analytischen Chemie, 1. Auflage, VCH-Verlagsgesellschaft, Weinheim, 1992.
3. V. Neizel u. K. Middeke, Praktische Qualitätssicherung in der Analytik, 1. Auflage, VCH-Verlagsgesellschaft, Weinheim, 1994.
4. H. Günzler (Herausgeber), Akkreditierung und Qualitätssicherung in der Analytischen Chemie, 1. Auflage, Springer Verlag, Berlin, 1994.
5. J.S. Markowski, Schrittweise Abschätzung der Unsicherheiten von Prüfergebnissen, Version März 1994.
6. G. Rey u. U. Kreuter, Statistik im Laboratorium, 2. Auflage, Separatdruck der Schweizerischen Laboratoriums-Zeitschrift, Basel, 1986.

bei und verhalf ihm zum Friedensnobelpreis im Dezember desselben Jahres. Pauling kämpfte später auch mutig gegen den Krieg in Vietnam, unbeirrt davon, daß man ihn deshalb einen Verräter nannte.

Vitamin C

Im Jahre 1966 gab jemand Pauling die Idee, daß große Dosen Vitamin C für die Gesundheit wichtig seien und auch Schnupfen oder sogar Krebs heilen könnten. Englische Apotheken verkauften noch immer Vitamin C als „Linus Pulver“, und Pauling selbst verschlang täglich 18 Gramm davon; davon absorbierte er wahrscheinlich kaum mehr als 100 Milligramm, während er den Rest wohl unverändert wieder ausschied. Vitamin C neutralisiert freie Radikale, weshalb ein Mangel die Krebsgefahr erhöhen könnte, aber es besteht kein Beweis, daß Riesendosen davor schützen. Es scheint mir tragisch, diese Chimäre während seiner letzten 25 Jahre zu Paulings Hauptbeschäftigung wurde und sich damit seinen großen Ruhm als Chemiker verlor. Vielleicht hing dies mit

seiner größten Schwäche, nämlich seiner Eitelkeit, zusammen. Wenn jemand Einstein widersprach, überlegte er es sich, und wenn er darauf kam, daß er unrecht hatte, dann freute er sich, einem Fehler entgangen zu sein und es jetzt besser zu verstehen. Pauling aber gab nie zu, daß er unrecht haben könnte. Nachdem ich 1951 Paulings und Coreys Veröffentlichung über die α -Spirale gelesen hatte, entdeckte ich einen Röntgenreflex mit einem Gitterabstand von 1,5 Å von Ebenen senkrecht zur Achse der Proteinfasern, der alle Konformationen der Proteinkette außer Paulings α -Spirale ausschloß. Ich dachte, Pauling würde sich darüber freuen, aber im Gegenteil, er griff mich wütend an, weil es ihm unerträglich war, daß jemand anderer an einen Test für seine α -Spirale dachte, der ihm selbst nicht eingefallen war. Ich war froh, daß er später seinen Ärger vergaß und zum guten Freund wurde.

Fazit

Paulings Beiträge zur Chemie umfassen ein riesiges Gebiet und hatten einen enormen

Einfluß auf Generationen junger Chemiker. Zwischen 1930 und 1950 gelang es ihm, die Chemie von einem mehr oder weniger phänomenologischen Fach in eine fest auf strukturelle und quantenmechanische Prinzipien begründete Wissenschaft zu verwandeln. Später wurden seine Bindungswalenz- und Resonanztheorien durch R. S. Mullikens Molecular Orbital-Theorie ergänzt, die zu einem tieferen Verständnis der chemischen Bindung führte. Beispielsweise ermöglichte sie es C. Longuet Higgins und W. Lipscomb, die Strukturen der Borane vorherzusagen und zu erklären, was aufgrund von Paulings Vorstellungen unmöglich gewesen wäre. Trotzdem bleiben die Begriffe Resonanz und Hybridisierung der chemischen Bindungen im täglichen chemischen Gebrauch und werden zum Beispiel noch immer zur Erklärung der ebenen Peptidbindung angewandt. Paulings Kombination von enzyklopädischer Kenntnis der Chemie und phantasievoller Intuition war einzigartig; viele von uns halten ihn für den größten Chemiker dieses Jahrhunderts.

Max F. Perutz, Cambridge/England

Methodenvalidierung im analytischen Labor

Die Methodenvalidierung hält nun auch verstärkt Einzug in den Bereich analytischer Laboratorien. Umfang und Modus sind jedoch bisher nicht vereinheitlicht. Dieser Artikel stellt die einzelnen Validierungselemente vor – aus einem pragmatischen Blickwinkel.

Unter Validierung versteht man den Nachweis und die Dokumentation der Zuverlässigkeit einer Methode. Validierungen werden in bestimmten Bereichen, wie z.B. pharmazeutischen Herstellungsprozessen, seit langem vom Gesetzgeber gefordert (Good Manufacturing Practice, GMP), der Umfang ist weitgehend vorgegeben. In der Analytik dagegen herrscht noch keine einheitliche Regelung. Einzelne Validierungselemente werden zwar in den meisten Laboratorien seit jeher als Kriterien zur Beurteilung einer Methode benutzt. Mit der Validierung beschäftigte man sich jedoch erst intensiver seit dem verstärkten Einzug von QS-Systemen in die Laboratorien. Besonders die Einführung der Akkreditierung nach der EN 45001 und die Forderungen der amerikanischen Gesundheits- und Umweltbehörden (FDA, EPA)

sind als Anstoß zu bewerten. Im folgenden werden die Elemente der Validierung vorgestellt und eine pragmatische Umsetzung im analytischen Labor vorgeschlagen.

Validierung und Analytik

Wie bereits angemerkt, fehlt eine verbindliche Definition des Begriffs Validierung speziell für die Analytik, auch der Umfang wird unterschiedlich festgelegt. Die Veröffentlichung des ICH-4 Textes der International Conference for Harmonization im Oktober 1994 könnte immerhin zu einer Vereinheitlichung der Begriffe beitragen. Der „Text on Validation of Analytical Procedures“ wurde von Experten aus der EU, den USA und Japan verfaßt und enthält verbindliche Begriffsdefinitionen zur Validierung im Rahmen von Registrierungen. In diesem Papier sind allerdings keine Angaben zum Validierungsmodus enthalten.

Bei Sucker¹⁾ finden sich sieben Validierungsthesen für die Herstellpraxis. Für die Analytik abgewandelt, könnten diese Thesen wie folgt lauten:

• Validierung ist ein Arbeitsinstrument zur Qualitätssicherung neben anderen wie SPC

(statistical process control) und Kontrollkarten (siehe Kasten).

• Validierung ist produkt- und zweckspezifisch auszuführen. Die Verantwortung über Ausmaß und Art liegt beim Analytiker.

• Validierung heißt, das Notwendige tun, aber eine Eskalation 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 sind die statistische Relevanz und damit die Meßunsicherheit zu ermitteln. Eine fehlerfreie Analytik („wahrer Wert“) gibt es nicht.

• Für Ergebnisse aus validierten Methoden sind Art und Häufigkeit der notwendigen Kontrollen festzulegen mit dem Ziel, den Gesamtanalytischen Aufwand zu minimieren, aber dennoch die erforderliche Ergebnis-sicherheit zu erzielen.

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

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 gewesen¹⁻³, 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“^{4,5,6} werden in naher Zukunft einen Teil der klassischen Validierungsprozedur ersetzen⁷. 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 (Analyse-, 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 werden⁸.
- ⊗ Die Selektivität ist eine Grundvoraussetzung für die Richtigkeit.

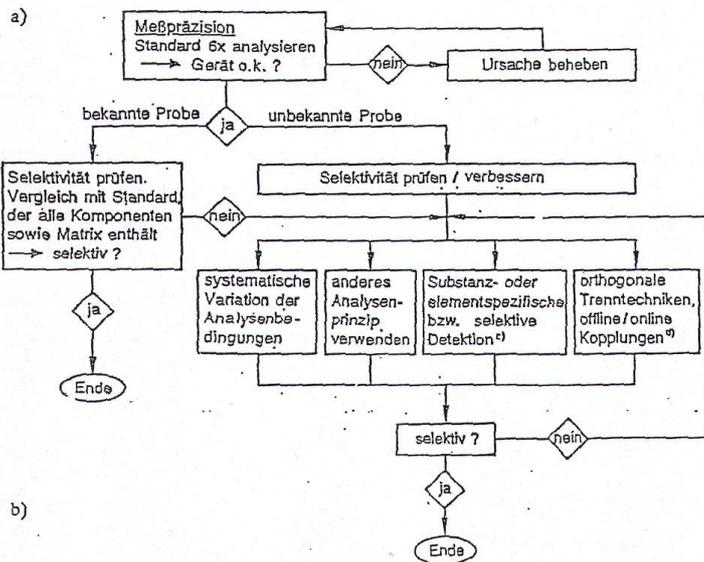


Abb. 1. Validierung von Identitätstests, a) 1. Stufe: Geräteverifizierung; b) 2. Stufe: Selektivitätsnachweis → Identitätsbeweis; c) z.B. ³¹P-NMR, Spezielle Sensoren, Gen-Antigen-Wechselwirkungen; d) z.B. Chromatographie/Spektroskopie.