



Gesellschaft für Toxikologische und Forensische Chemie

Arbeitskreis
Qualitätssicherung

Anhang B zur Richtlinie der GTFCh zur Qualitätssicherung bei forensisch-toxikologischen Untersuchungen

Anforderungen an die Validierung von Analysemethoden

*Autoren: F. T. Peters, Jena; M. Hartung, Homburg/Saar;
M. Herbold u. G. Schmitt, Heidelberg; T. Daldrup, Düsseldorf;
F. Mußhoff, Bonn*

*Überarbeitung durch
F. T. Peters, Jena und L. D. Paul, München
unter Mitarbeit der übrigen Mitglieder der Untergruppe
Richtlinien des AK Qualitätssicherung:
F. Mußhoff, Bonn; B. Aebi, Bern; V. Auwärter, Freiburg;
T. Kraemer, Homburg; G. Skopp, Heidelberg
Mitglieder des AK Qualitätssicherung*

Seite
1 von 24

Version
01

Änderungshinweise:

Keine – erste überarbeitete Fassung

Datum

01.06.2009

Seite

--

Inhaltsverzeichnis

1	Einführung.....	3
2	Beweisende, identifizierende bzw. Bestätigungsverfahren.....	4
2.1	Selektivität (Selectivity)	4
2.2	Linearität der Kalibration (Linearity of Calibration), nach Ref. [8].....	5
2.2.1	Kalibrationsbereich (Range), nach [12]	5
2.3	Genauigkeit (Accuracy), nach Ref. [12]	6
2.3.1	Systematischer Fehler (Bias) und Richtigkeit, nach [12]	7
2.3.2	Präzision (Precision), nach [12].....	7
2.3.2.1	Wiederholpräzision (Repeatability), nach Ref. [10].....	7
2.3.2.2	Laborpräzision	8
2.3.2.3	Vergleichspräzision (Reproducibility), nach Ref. [10]	9
2.3.3	Gemeinsames Akzeptanzintervall für Bias und Präzision	9
2.4	Stabilität (Stability), nach Ref. [20].....	10
2.4.1	Stabilität aufgearbeiteter Proben (Processed sample stability)	10
2.4.2	Einfrier-/Auftaustabilität (Freeze/thaw stability)	11
2.4.3	Langzeitstabilität (Long-term stability)	11
2.5	Analytische Grenzen	12
2.5.1	Nachweisgrenze (Limit of Detection, LOD).....	12
2.5.2	Bestimmungsgrenze (Limit of Quantification, LOQ)	13
2.6	Wiederfindungsrate, Extraktionsausbeute	14
2.6.1	Wiederfindungsrate (Recovery), frei nach [12]	14
2.6.2	Extraktionsausbeute (Extraction efficiency).....	15
2.7	Matrixeffekte und Wiederfindung bei LC-MS(/MS)-Methoden	16
2.8	Robustheit (Robustness, Ruggedness), frei nach Ref. [20]	17
3	Immunchemische Methoden.....	17
3.1	Selektivität.....	17

3.2	Ausreichende Empfindlichkeit	17
4	Literatur	19
5	Inkrafttreten	20
	Anhang I: Berechnung der Präzisionsdaten	21
	Anhang II: Berechnung des 95% β -Toleranzintervalls gemäß [25]	24

1 Einführung

Die Validierung analytischer Methoden ist eine Grundvoraussetzung für die Qualität und die Vergleichbarkeit von Analyseergebnissen. Sie dient der Dokumentation der Eignung von Analyseverfahren für ihren Bestimmungszweck. Analysebefunde, die mit validierten Methoden erhoben werden, sind daher nicht nur die Basis für eine verlässliche Interpretation, sondern auch im Streitfall nur schwer anfechtbar. Dies spielt auch im forensisch-toxikologischen Bereich eine große Rolle.

Gemäß Kapitel 1 der "Richtlinie der GTFCh zur Qualitätssicherung bei forensisch-toxikologischen Untersuchungen" müssen Laboratorien Gewähr dafür bieten, dass Analysen nach dem aktuellen und anerkannten Stand der Analysetechnik ausgeführt werden. Im selben Dokument wird unter Kapitel 5 die Validierung analytischer Methoden und die Dokumentation des Ergebnisses der Validierung vorgeschrieben. Dies impliziert, dass auch die Validierung analytischer Methoden sich an dem aktuellen und anerkannten Stand der Wissenschaft orientieren sollte. Im vorliegenden Anhang B der Richtlinie werden die Anforderungen an die Validierung regelmäßig in der Routine angewendeter Methoden näher spezifiziert. Die enthaltenen Vorgaben orientieren sich am aktuellen wissenschaftlichen Kenntnisstand. Neben den zu bestimmenden Validierungsparametern und ihren jeweiligen Akzeptanzkriterien werden auch statistische Verfahren zur Berechnung der einzelnen Parameter festgelegt.

Für Methoden, die nur für einen einzigen Fall oder sehr selten zur Anwendung kommen, und Methoden zur Analyse von Postmortem-Material kann gemäß Ref. [1] der Validierungsaufwand u.U. reduziert bzw. auf die Standardadditionsmethode zurückgegriffen werden.

Wird eine bereits validierte Methode modifiziert, so ist zu zeigen, dass die modifizierte Methode für den Bestimmungszweck geeignet ist. Dies kann im Rahmen einer Teilvalidierung erfolgen, in der möglicherweise von der Modifikation betroffene Validierungsparameter in ausgewählten Validierungsexperimenten erneut untersucht werden.

2 Beweisende, identifizierende bzw. Bestätigungsverfahren

2.1 Selektivität (Selectivity)

Selektivität ist die Fähigkeit einer Methode, *verschiedene nebeneinander zu bestimmende Analyten* ohne gegenseitige Störungen oder Störungen durch andere endogene oder exogene Substanzen (Metaboliten, Verunreinigungen, Abbauprodukte, Matrix) zu erfassen und sie somit eindeutig zu identifizieren.

Spezifität ist die Fähigkeit einer Methode, *einen Analyten oder eine Substanzklasse* ohne Verfälschung durch andere in der Probe vorhandene Komponenten (s.o.) zu erfassen und sie somit eindeutig zu identifizieren.

Bestimmung in der Praxis:

- Aufarbeitung von mindestens sechs Leerproben aus jeweils verschiedenen Chargen (Leermatrix ohne Internen Standard (IS), Blank-Probe)
- Aufarbeitung von mindestens zwei Nullproben (Leermatrix mit IS, Zero-Probe)
- Aufarbeitung aufgestockter Leerproben mit anderen in authentischen Proben zu erwartenden Substanzen/Metaboliten
- ggf. zusätzlich Aufarbeitung authentischer Proben, die hohe Konzentrationen potentiell interferierender Substanzen mitsamt ihres charakteristischen Metabolitenspektrums enthalten

Bei keinem der oben genannten Versuche dürfen Interferenzen (z.B. störende Peaks) mit dem Untersuchungsziel (Nachweis und/oder Bestimmung des/der Analyten) auftreten.

Werden in analytisch begründeten Ausnahmefällen nur zwei diagnostische Ionen zur Identifizierung bei Einzelionendetektion verwendet, erhöht sich die Anzahl der zu analysierenden Leerproben aus jeweils verschiedenen Chargen auf mindestens 20. In den Aufstockversuchen ist entsprechend ein weiteres Spektrum von Substanzen/Metaboliten auf mögliche Interferenz zu testen.

Hinweis: *Bei rein quantitativen Methoden kann, wenn die Richtigkeit bereits bewiesen wurde, auf eine gesonderte Aufarbeitung von Leer- und Nullproben verzichtet werden.*

2.2 Linearität der Kalibration (Linearity of Calibration), nach Ref. [8]

Die Linearität einer analytischen Methode ist ihre Fähigkeit, innerhalb eines gegebenen Bereiches Testergebnisse zu liefern, die direkt proportional zur Konzentration (Menge) des Analyten in der Probe sind.

2.2.1 Kalibrationsbereich (Range), nach [12]

Der Kalibrationsbereich einer analytischen Methode ist das Intervall zwischen oberer und unterer Konzentration (Menge) des Analyten in der Probe (einschließlich dieser Konzentrationen), für das ein geeignetes Maß an Präzision, Richtigkeit und Linearität gezeigt werden konnte. Er sollte so gewählt werden, dass er einen möglichst großen Anteil der in authentischen Proben zu erwartenden Konzentrationen abdeckt. Sofern bekannt, sollte der therapeutische Konzentrationsbereich möglichst innerhalb des Kalibrationsbereichs liegen.

Bestimmung in der Praxis:

- Herstellung von Kalibratoren bei mindestens fünf von Null verschiedenen Konzentrationen (möglichst gleichmäßig über den Kalibrationsbereich verteilt) durch Aufstocken von Leermatrix, wobei der niedrigste (nicht Null) Kalibrator größer oder gleich der Bestimmungsgrenze sein muss
- sechs Bestimmungen bei jeder Konzentration (Wiederholbedingungen)
- Auftragen der Peakflächenverhältnisse, ggf. auch Peakhöhenverhältnisse, (Analyt/IS) gegen die Sollkonzentrationen der Kalibratoren
- Testen auf Ausreisser mittels Grubbs-Test (Signifikanzniveau: 95%) und ggf. deren Elimination. Insgesamt dürfen nicht mehr als zwei Ausreisser und diese nicht auf dem gleichen Konzentrationsniveau auftreten.
- Test auf Varianzhomogenität mittels F-Test zwischen höchster und niedrigster Konzentration oder mittels Cochran-Test über alle Konzentrationen (Signifikanz: 99%).
- Varianzhomogenität gegeben (Homoskedastizität): einfache lineare Regression; statistischer Test der Anpassung mittels Linearitätstest nach Mandel (Signifikanz: 99%)
- Varianzhomogenität nicht gegeben (Heteroskedastizität); Regelfall für Kalibrationsbereiche, die mehr als eine Zehnerpotenz umfassen:

Alternative I: Einschränkung des Kalibrationsbereichs bis Varianzhomogenität besteht.

Alternative II: Auswahl und statistischer Anpassungstest eines gewichteten Kalibrationsmodells. In der Regel kann mit den Wichtungsfaktoren $1/x$ oder $1/x^2$ eine ausreichende Kompensation der Heteroskedastizität erreicht werden.

Vor der Ablehnung eines linearen Kalibrationsmodells sollte die praktische Relevanz der Nichtlinearität z.B. an Hand der Richtigkeitsdaten bewertet werden; sind diese akzeptabel, kann man trotzdem das lineare Modell verwenden.

Anmerkung:

Sollen in der Routineanwendung Reinsubstanzlösungen als Kalibratoren eingesetzt werden, so ist in der Validierung zu zeigen, dass die Kalibrationsgeraden von Matrixkalibratoren und Reinsubstanzkalibratoren sich nicht signifikant unterscheiden:

- Varianzhomogenität der Restvarianzen der beiden Kalibrationsgeraden mittels F-Test (Signifikanz: 99%)
- Regressionsanalyse der Mittelwerte der Messgrößen von Matrix- und Reinsubstanzkalibration: Sollwert-t-Test (Signifikanz: 99%) für den Achsenabschnitt (Sollwert: 0) und die Steigung (Sollwert: 1) der Regressionsgeraden.

2.3 Genauigkeit (Accuracy), nach Ref. [12]

Unter Genauigkeit versteht man den Abstand eines einzelnen Wertes vom Sollwert, hervorgerufen durch systematische und zufällige Fehler.

Bestimmung in der Praxis:

- Herstellung homogener Pools von Qualitätskontrollproben (QC-Proben) bei mindestens zwei (niedrig und hoch relativ zum Kalibrationsbereich), möglichst aber drei verschiedenen Konzentrationen (niedrig, mittel, hoch relativ zum Kalibrationsbereich) durch Aufstockung von Leermatrixpools
- Aliquotierung zu einzelnen QC-Proben
- Lagerung bei normalen Lagerungsbedingungen (z.B. -20°C)
- Analyse von mindestens zwei QC-Proben jeder Konzentration an mindestens acht verschiedenen Tagen

Es wird empfohlen, einen zusätzlichen QC-Pool mit Konzentrationen deutlich oberhalb des Kalibrationsbereiches anzusetzen. Diese QC-Proben werden unter Verwendung entsprechend geringerer Probenvolumina oder nach entsprechender Verdünnung aufgearbeitet, so dass die Analytkonzentrationen in der aufgearbeiteten Probe innerhalb des Kalibrationsbereiches liegen. Die für diese QC-Proben erhaltenen Ergebnisse werden mit entsprechenden Korrekturfaktoren multipliziert und analog den übrigen QC-Daten zur Bestimmung von Richtigkeit und Präzision herangezogen.

2.3.1 Systematischer Fehler (Bias) und Richtigkeit, nach [12]

Unter Bias versteht man die Differenz zwischen Messergebnis und Sollwert. Er ist ein Maß für die systematische Fehlerkomponente eines quantitativen Analysenverfahrens.

- Der Bias errechnet sich aus dem Mittelwert aller Bestimmungen und dem Sollwert bei jeder Konzentration nach folgender Formel:

$$\text{Bias [\%]} = \frac{\bar{X} - \mu}{\mu} \cdot 100\%$$

\bar{X} Mittelwert aller Bestimmungen
 μ Sollwert

- Bias-Werte innerhalb eines Intervalls von $\pm 15\%$ ($\pm 20\%$ nahe der Bestimmungsgrenze) gelten als akzeptabel

Unter Richtigkeit (Trueness) versteht man den Abstand des Mittelwertes einer ausreichend großen Anzahl von Messwerten (z.B. Kontrollwerte aus der Routineanwendung) vom Sollwert. Das Ausmaß an Richtigkeit wird gewöhnlich in Form eines systematischen Fehlers (Bias) ausgedrückt.

2.3.2 Präzision (Precision), nach [12]

Unter Präzision versteht man den Grad der Streuung der einzelnen Werte um den Mittelwert. Sie ist ein Maß für die zufällige Fehlerkomponente eines quantitativen Analysenverfahrens. Die Präzision wird gewöhnlich in Form der „Impräzision“ ausgedrückt und als eine Standardabweichung der Messergebnisse berechnet. Höhere Impräzision wird durch eine höhere Standardabweichung ausgedrückt.

2.3.2.1 Wiederholpräzision (Repeatability), nach Ref. [10]

Präzision unter Bedingungen, bei denen unabhängige Messergebnisse mittels derselben Methode mit identischem Probenmaterial im selben Labor von derselben Person mit derselben Gerätschaft innerhalb kurzer Zeitintervalle erhalten werden.

Berechnung:

Bei obiger Versuchsanordnung kann die Berechnung unter Zuhilfenahme der in Anhang I zu dieser Richtlinie aufgeführten Formeln wie folgt erfolgen:

- Bestimmung als relative Standardabweichung (Variationskoeffizient) innerhalb der Tage

$$\mathbf{RSD}_r [\%] = \frac{\sqrt{\mathbf{s}_r^2}}{\bar{\mathbf{X}}} \cdot 100$$

\mathbf{RSD}_r Wiederholpräzision

\mathbf{s}_r^2 Wiederholvarianz, zu berechnen nach Anhang I

$\bar{\mathbf{X}}$ Mittelwert aller Bestimmungen

- $\mathbf{RSD}_r \leq 15\%$ (20% nahe der Bestimmungsgrenze) gelten als akzeptabel

2.3.2.2 Laborpräzision

Präzision bei der Bestimmung derselben Probe innerhalb eines Labors bei bewusster Änderung eines Parameters (z.B. Person, Gerätschaft oder Zeit).

2.3.2.2.1 Tagesverschiedene Laborpräzision (time-different intermediate precision)

Die tagesverschiedene Laborpräzision, bei der der Zeitfaktor „Tag“ zwischen den Bestimmungen variiert, ist die gängigste Variante der Laborpräzision.

Berechnung:

Bei obiger Versuchsanordnung kann die Berechnung der tagesverschiedenen Laborpräzision unter Zuhilfenahme der in Anhang I zu dieser Richtlinie aufgeführten Formeln wie folgt erfolgen:

- Bestimmung als relative Standardabweichung

$$\mathbf{RSD}_{(T)} [\%] = \frac{\sqrt{\mathbf{s}_t^2 + \mathbf{s}_r^2}}{\bar{\mathbf{X}}} \cdot 100$$

$\mathbf{RSD}_{(T)}$ tagesverschiedene Laborpräzision

\mathbf{s}_t^2 Wiederholvarianz, berechnet nach Anhang I

\mathbf{s}_r^2 Varianz zwischen den Tagen, berechnet nach Anhang I

$\bar{\mathbf{X}}$ Mittelwert aller Bestimmungen

- $\mathbf{RSD}_{(T)} \leq 15\%$ (20% nahe der Bestimmungsgrenze) gelten als akzeptabel

Analoge Versuchsanordnungen zur Bestimmung von personen- bzw. equipmentverschiedener Laborpräzision sind möglich.

2.3.2.3 Vergleichspräzision (Reproducibility), nach Ref. [10]

Präzision unter Bedingungen, bei denen Messergebnisse mit derselben Methode mit identischem Probenmaterial in verschiedenen Laboratorien von verschiedenen Personen mit verschiedenem Equipment erhalten werden. Die Vergleichspräzision wird auch häufig Reproduzierbarkeit genannt.

Berechnung:

Die Vergleichspräzision kann aus der obigen Versuchsanordnung nicht berechnet werden. Ihre Bestimmung kann z.B. durch Analyse von QC-Proben in verschiedenen Labors (z.B. in einem Ringversuch, bei dem alle Teilnehmer dieselbe Analysenvorschrift benutzen) erfolgen.

2.3.3 Gemeinsames Akzeptanzintervall für Bias und Präzision

Zusätzlich zu den oben genannten separaten Akzeptanzkriterien für Bias und Präzision sollte die Genauigkeit (Kombination Bias und Präzision), ausgedrückt als so genanntes 95% β -Toleranzintervall, vollständig innerhalb eines Akzeptanzintervalls von $\pm 30\%$ liegen ($\pm 40\%$ nahe der Bestimmungsgrenze).

Wurden der Bias und die tagesverschiedene Laborpräzision mit Doppelbestimmungen an acht verschiedenen Tagen bestimmt, so kann eine Abschätzung des entsprechenden β -Toleranzintervalls mittels folgender Näherungsgleichungen erfolgen:

$$L_u [\%] = \text{Bias} [\%] - 2,508 \cdot \text{RSD}_{(n)} [\%]$$

$$L_o [\%] = \text{Bias} [\%] + 2,508 \cdot \text{RSD}_{(n)} [\%]$$

L_u untere Grenze des 95% β -Toleranzintervalls

L_o obere Grenze des 95% β -Toleranzintervalls

Die mit diesen Näherungsgleichungen ermittelten Grenzen des Toleranzintervalls stellen den ungünstigsten Fall dar. Liegen sie dennoch innerhalb des Akzeptanzintervalls, sind die Kriterien somit erfüllt. Liegen sie außerhalb des Akzeptanzintervalls, ist mittels der in Anhang II gegebenen Gleichung für die genaue Berechnung des jeweiligen 95% β -Toleranzintervalls zu überprüfen, ob die Methode die Akzeptanzkriterien dennoch erfüllt.

Wurden Bias und tagesverschiedene Laborpräzision nicht mit Doppelbestimmungen an acht verschiedenen Tagen bestimmt, so ist das 95% β -Toleranzintervall ebenfalls gemäß Anhang II zu berechnen.

2.4 Stabilität (Stability), nach Ref. [20]

Die chemische Stabilität eines Analyten in einer gegebenen Matrix unter bestimmten Bedingungen für gegebene Zeitintervalle.

Die Stabilität eines Analyten sollte vom Zeitpunkt der Probennahme bis zum Abschluss der Analyse gewährleistet sein. Die Stabilität während der Lagerung und während eventuell wiederholtem Einfrieren und Auftauen ist methodenunabhängig, so dass entsprechende Stabilitätsdaten aus der Literatur übernommen werden können. Sind solche nicht vorhanden, sind sie im Rahmen der Methodvalidierung zu erheben. Die Stabilität der (derivatisierten) Analyten in aufgearbeiteten Proben ist hingegen in hohem Maße methodenabhängig und ihre Überprüfung im Rahmen der Validierung daher zwingend erforderlich.

2.4.1 Stabilität aufgearbeiteter Proben (Processed sample stability)

Die Stabilität der (derivatisierten) Analyten in fertig aufgearbeiteten Proben im Probenhalter des Autosamplers für die Dauer einer regulären Analysenserie.

Bestimmung in der Praxis:

- Aufarbeitung von mindestens 6 QC-Proben bei niedrigen und hohen Konzentrationen relativ zum Kalibrationsbereich
- Poolen der aufgearbeiteten Proben der jeweiligen Konzentration
- Aufteilung der gepoolten Proben der jeweiligen Konzentration auf mindestens 6 Aliquote
- Injektion der Aliquote in regelmäßigen Intervallen über einen Zeitraum, der der erwarteten Dauer einer regulären Analysenserie in der Routine entspricht
- Auftragen der absoluten (!) Peakflächen (ggf. Peakhöhen) für die jeweilige Konzentration gegen die Zeitpunkte der Injektion mit anschließender linearer Regressionsanalyse

Eine signifikant negative Steigung der Regressionsgeraden weist auf Instabilität des entsprechenden (derivatisierten) Analyten in aufgearbeiteten Proben hin. Die maximal akzeptable Abnahme der Peakflächen (ggf. Peakhöhen) über den Testzeitraum beträgt bei Verwendung deuterierter Standards 25% und in anderen Fällen 15% (20% nahe der Bestimmungsgrenze).

2.4.2 Einfrier-/Auftaustabilität (Freeze/thaw stability)

Die Stabilität der Analyten in der Probenmatrix bei wiederholtem Einfrieren und Auftauen.

Bestimmung in der Praxis:

- Analyse von jeweils 6 QC-Proben bei niedrigen und hohen Konzentrationen relativ zum Kalibrationsbereich ohne vorherige Behandlung (Kontrollproben)
- Analyse von jeweils 6 QC-Proben bei niedrigen und hohen Konzentrationen relativ zum Kalibrationsbereich nach mindestens drei Einfrier-/Auftauzyklen (Stabilitätsproben)
- Jeder Einfrier-/Auftauzyklus soll aus mindestens 20-stündigem Einfrieren und mindestens einstündigem Auftauen bestehen.

Der Mittelwert der Stabilitätsproben soll innerhalb von 90-110% des entsprechenden Kontrollprobenmittelwertes, das 90% Konfidenzintervall der Stabilitätsproben innerhalb 80-120% des entsprechenden Kontrollprobenmittelwertes liegen.

2.4.3 Langzeitstabilität (Long-term stability)

Die Stabilität der Analyten in der Probenmatrix während der Lagerung über längere Zeiträume.

Bestimmung in der Praxis:

- Analyse von jeweils 6 QC-Proben bei niedrigen und hohen Konzentrationen relativ zum Kalibrationsbereich ohne vorherige Behandlung (Kontrollproben, können identisch sein mit Kontrollproben für Einfrier-/Auftaustabilität)
- Analyse von jeweils 6 QC-Proben bei niedrigen und hohen Konzentrationen relativ zum Kalibrationsbereich nach Lagerung unter routineüblichen Lagerungsbedingungen möglichst über routineübliche Lagerungszeiträume (Stabilitätsproben)

Der Mittelwert der Stabilitätsproben soll innerhalb von 90-110% des entsprechenden Kontrollprobenmittelwertes, das 90% Konfidenzintervall der Stabilitätsproben innerhalb 80-120% des entsprechenden Kontrollprobenmittelwertes liegen.

2.5 Analytische Grenzen

2.5.1 Nachweisgrenze (Limit of Detection, LOD)

Die Nachweisgrenze ist definiert als die niedrigste Konzentration des Analyten in der Probe, bei der die Identifizierungskriterien erfüllt sind.

Zur Abschätzung können folgende Methoden verwendet werden:

Bestimmung über Signal-Rausch-Verhältnis:

- Herstellung von Proben mit fallenden Analytkonzentrationen im Bereich der erwarteten Nachweisgrenze durch Aufstocken von Leermatrix
- Analyse der Proben und Ermittlung der Signal-Rausch-Verhältnisse.

Die Nachweisgrenze ist hierbei die niedrigste Konzentration des Analyten in der Probenmatrix, bei der das Signal-Rausch-Verhältnis mindestens 3:1 beträgt. Bei MS-Detektion gilt dies sowohl für das Targetion als auch für die Qualifierionen

Als zusätzliches Akzeptanzkriterium müssen die Identifizierungskriterien (siehe allgemeine Richtlinie) auch an der Nachweisgrenze erfüllt sein.

Alternative für MS-basierte Verfahren (Bestimmung nach DIN 32645 [26]):

- Herstellung von Kalibratoren bei mindestens fünf von Null verschiedenen Konzentrationen beginnend im Bereich der erwarteten Nachweisgrenze durch Aufstocken von Leermatrix
- Kalibratorkonzentrationen sollten möglichst gleichmäßig über den Kalibrationsbereich verteilt sein und die Konzentration des höchsten Kalibrators darf maximal das Zehnfache der errechneten Nachweisgrenze sein.

Hinweis: Der Bereich dieser Kalibrationskurve zur Bestimmung der analytischen Grenzen ist damit in der Regel nicht identisch mit dem vollen Kalibrations- bzw. Linearitätsbereich der Methode!

- Analyse der Kalibratoren mit einer Anzahl von Wiederholbestimmungen pro Konzentration, die der Anzahl der Wiederholbestimmungen von Routineproben entspricht (im Regelfall Einfachbestimmungen)
- Auftragen der Peakflächenverhältnisse, ggf. Peakhöhenverhältnisse, (Analyt/IS) des schwächsten Ions gegen die Sollkonzentrationen der Kalibratoren
- Lineare Regression und Ermittlung der Nachweisgrenze nach folgender Formel mit $\alpha = 0,01$ (bei GC-MS Bestimmungen mit $\alpha = 0,1$)

$$X_{NG} = s_{x_0} \cdot t_{f,\alpha} \cdot \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{\bar{X}^2}{Q_x}}$$

s_{x_0} = Verfahrensstandardabweichung Q_x = Summe der Abweichungsquadrate α = Signifikanzniveau (Fehler 1.Art)
 n = Anzahl der Kalibrationsniveaus t = Quantil der t-Verteilung
 m = Anzahl der Messungen X = Gehaltsgröße

2.5.2 Bestimmungsgrenze (Limit of Quantification, LOQ)

Die Bestimmungsgrenze ist die niedrigste Konzentration eines Analyten in der Probenmatrix, die mit akzeptablen Bias- ($\pm 20\%$) und Präzisionsdaten ($RSD \leq 20\%$) bzw. mit einer vorgegebenen relativen Ergebnisunsicherheit (33%, Signifikanz: 99%) bestimmt werden kann.

Bestimmung in der Praxis:

Alternative I (Bestimmung nach DIN 32645 [26])

Die Vorgehensweise entspricht der der Bestimmung der Nachweisgrenze nach DIN 32645. Beide Parameter können im gleichen Experiment ermittelt werden.

- Herstellung von Kalibratoren bei mindestens fünf von Null verschiedenen Konzentrationen beginnend im Bereich der erwarteten Nachweisgrenze durch Aufstocken von Leermatrix
- Kalibratorkonzentrationen sollten möglichst gleichmäßig über den Kalibrationsbereich verteilt sein und die Konzentration des höchsten Kalibrators darf maximal das Zehnfache der errechneten Nachweisgrenze sein.
- **Hinweis: Der Bereich dieser Kalibrationskurve zur Bestimmung der analytischen Grenzen ist damit in der Regel nicht identisch mit dem vollen Kalibrations- bzw. Linearitätsbereich der Methode!**
- Analyse der Kalibratoren mit einer Anzahl von Wiederholbestimmungen pro Konzentration, die der Anzahl der Wiederholbestimmungen von Routineproben entspricht (im Regelfall Einfachbestimmungen)
- Auftragen der Peakflächenverhältnisse, ggf. Peakhöhenverhältnisse, (Analyt/IS) des Targtions gegen die Sollkonzentrationen der Kalibratoren
- Lineare Regression und Ermittlung der Bestimmungsgrenze nach folgender Formel ($k = 3$ und mit $\alpha = 0,01$)

$$X_{BG} = k \cdot s_{x_0} \cdot t_{f,\alpha} \cdot \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{(X_{BG} - \bar{X})^2}{Q_x}}$$

s_{x0} = Verfahrensstandardabweichung
 n = Anzahl der Kalibrationsniveaus
 m = Anzahl der Messungen

Q_x = Summe der Abweichungs-
 t = Quantil der t-Verteilung
 X = Gehaltsgröße

k = relative Ergebnissunsicherheit
 α = Signifikanzniveau (Fehler 1.Art)
 β = Wahrscheinlichkeit (Fehler 2.Art)

- Zusätzlich gilt, dass die Bestimmungsgrenze die Nachweisgrenze nicht unterschreiten darf. Ist die berechnete Bestimmungsgrenze kleiner als die Nachweisgrenze, so wird die Nachweisgrenze automatisch auch die Bestimmungsgrenze.

Alternative II (Bestimmung anhand von Bias- und Präzisionsdaten) nach Ref. [20]

- Herstellung einer von den Kalibratoren unabhängigen QC-Probe, deren Konzentration derer des niedrigsten Kalibrators entspricht, durch Aufstocken von Leermatrix
- Wiederholbestimmung (mindestens n = 5) der QC-Probe
- Bestimmung des Bias und der Wiederholpräzision als RSD der fünf Bestimmungen
- Der Bias muss innerhalb ±20% und die RSD ≤20% liegen

2.6 Wiederfindungsrate, Extraktionsausbeute

2.6.1 Wiederfindungsrate (Recovery), frei nach [12]

Die absolute Wiederfindung ist definiert als kompletter Transfer des Analyten von der Matrix in die zu vermessende Lösung. Sie wird bestimmt aus einem Verhältnis der Signale einer gleich zugesetzten Menge Analyt bzw. Standard zu einer biologischen Probe und einer nicht extrahierten Originallösung (= 100%).

Die Bestimmung der Wiederfindungsrate bezieht sich immer auf die absoluten Messsignale. Sie kann daher nur bei Methoden bestimmt werden, bei denen die letztendlich vermessene Substanz in reiner Form erhältlich ist.

Praktische Durchführung:

Alternative I (Bestimmung der Wiederfindung bei zwei Konzentrationen)

- Bestimmung von jeweils mindestens sechs Reinsubstanzlösungen und mindestens sechs Extrakten bei hohen und niedrigen Konzentrationen
- Angabe der Wiederfindung als Verhältnis der absoluten Signale (Peakflächen, ggf. Peakhöhen) der Extrakte zu denen der Reinsubstanzlösungen in Prozent (inkl. Standardabweichung bzw. des 95%-Konfidenzintervalls).

Alternative II (Bestimmung der Wiederfindung über den gesamten Messbereich)

- Bestimmung von Reinsubstanzlösungen und Extrakten bei mindestens sechs über den Messbereich verteilten Konzentrationen
- Regressionsanalyse der absoluten Peakflächen (ggf. Peakhöhen) von Extrakten und Reinsubstanzlösungen über den gesamten Messbereich
- Angabe der Wiederfindung als Verhältnis der Steigungen der Regressionsgeraden der Extrakte zu denen der Reinsubstanzlösungen.

2.6.2 Extraktionsausbeute (Extraction efficiency)

Die Extraktionsausbeute ist definiert als kompletter Transfer des Analyten von der Matrix in den primären Extrakt. Sie wird bestimmt aus einem Verhältnis der Signale einer gleich zugesetzten Menge Analyt bzw. Standard zu einer biologischen Probe und zu einem Primärextrakt einer Leermatrixprobe (= 100%).

Die Bestimmung der Extraktionsausbeute ist insbesondere bei solchen Methoden durchzuführen, die einen Derivatisierungsschritt enthalten, da die letztendlich vermessenen Derivate in der Regel nicht als Reinsubstanz erhältlich sind.

Praktische Durchführung:**Alternative I (Bestimmung der Extraktionsausbeute bei zwei Konzentrationen)**

- Bestimmung von jeweils mindestens sechs Kontrollproben bei hohen und niedrigen Konzentrationen, bei denen der Analyt und der interne Standard erst nach der Extraktion in den Primärextrakt gegeben werden (100%).
- Bestimmung von mindestens sechs Extrakten bei hohen und niedrigen Konzentrationen, bei denen der Analyt vor der Extraktion in die Matrix, der interne Standard jedoch erst nach der Extraktion in den Primärextrakt gegeben wird.
- Angabe der Wiederfindung als Verhältnis der Peakflächenverhältnisse bzw. ggf. Peakhöhenverhältnisse (Analyt/IS) der Extrakte zu denen der Kontrollproben in Prozent (inkl. Standardabweichung bzw. des Konfidenzintervalls (95%)).

Alternative II (Bestimmung der Extraktionsausbeute über den gesamten Messbereich)

- Bestimmung von mindestens sechs über den Messbereich verteilten Kontrollkalibratoren, bei denen der Analyt und der interne Standard erst nach der Extraktion in den Primärextrakt gegeben werden (100%).
- Bestimmung von mindestens sechs über den Messbereich verteilten Kalibratoren, bei denen der Analyt vor der Extraktion in die Matrix, der interne Standard jedoch erst nach der Extraktion in den Primärextrakt gegeben wird.

- Regressionsanalyse der Peakflächenverhältnisse (ggf. Peakhöhenverhältnisse) von Kontrollkalibratoren und extrahierten Kalibratoren
- Angabe der Extraktionsausbeute als Verhältnis der Steigungen der Regressionsgeraden der Kontrollkalibratoren zu den extrahierten Kalibratoren.

Die Extraktion soll reproduzierbar und mit hohen Wiederfindungsraten bzw. Extraktionsausbeuten, möglichst größer als 50% erfolgen, entsprechend einer Steigung von 0,5 beim Regressionsverfahren.

2.7 Matrixeffekte und Wiederfindung bei LC-MS(/MS)-Methoden

Unter Matrixeffekten versteht man die direkte oder indirekte Veränderung des Messsignals durch die Anwesenheit unbeabsichtigter Analyten (zur Analyse) oder anderer interferierender Substanzen in der Probe. Dabei sind sowohl eine Unterdrückung (Ion suppression) als auch eine Verstärkung (Ion enhancement) des Messsignals möglich.

Praktische Durchführung:

- Bestimmung von jeweils mindestens fünf Reinsubstanzlösungen bei hohen und niedrigen Konzentrationen (Kontrollen)
- Herstellung und Extraktion von jeweils fünf aufgestockten Matrixproben bei hohen und niedrigen Konzentrationen, wobei für jede der fünf Proben eine andere Leermatrixquelle zu verwenden ist (aufgestockte Matrixproben)
- Herstellung von jeweils fünf aufgestockten Leermatrixextrakten bei hohen und niedrigen Konzentrationen, wobei die Extrakte aus den oben genannten unterschiedlichen Matrixproben stammen müssen (aufgestockte Extrakte)
- Analyse der Kontrollproben, aufgestockten Matrixproben und aufgestockten Extrakte mittels LC-MS(/MS)
- Angabe der Wiederfindung als Verhältnis der Peakflächen (ggf. Peakhöhen) der aufgestockten Matrixproben zu denen der entsprechenden aufgestockten Extrakte in Prozent (Mittelwert inkl. Standardabweichung)
- Angabe des Matrixeffektes als Verhältnis der Peakflächen (ggf. Peakhöhen) der aufgestockten Extrakte zu denen der Kontrollproben (Mittelwert inkl. Standardabweichung) in Prozent

Für die Wiederfindung sind die unter Kapitel 2.6 angegebenen Akzeptanzgrenzen anzuwenden. Für den Mittelwert des Matrixeffektes gilt ein Akzeptanzintervall von 75-125%. Bei der Standardabweichung des Matrixeffektes gelten bei Verwendung deuterierter interner Standards 25%, ansonsten 15% (20% nahe der Bestimmungsgrenze) als akzeptabel.

2.8 Robustheit (Robustness, Ruggedness), frei nach Ref. [20]

Die Robustheit einer analytischen Methode ist ein Maß ihrer Fähigkeit, durch kleine, aber bewusste Veränderungen der Methodenparameter unbeeinflusst zu bleiben, und zeigt ihre Verlässlichkeit während der normalen Anwendung.

3 Immunchemische Methoden

Die volle Validierung immunchemischer Methoden ist aufgrund der verfahrensbedingten Nichtlinearität der Kalibrationskurven, des entscheidenden Einflusses des Verlaufs dieser Kalibrationskurven auf die Zuverlässigkeit der positiv-negativ Entscheidung am Cut-off-Wert, sowie der Anfälligkeit gegenüber unerwünschten Kreuzreaktivitäten und unspezifischer Bindung an Matrixkomponenten sehr komplex. Sie wird daher in der Regel vom Herstellern für die von ihm spezifizierten Matrices und Cut-off-Werte validiert, so dass bei einer Anwendung im Rahmen dieser Spezifikationen auf eine weitere Validierung durch den Anwender verzichtet werden kann. Werden die immunchemischen Verfahren jedoch abweichend von den Vorgaben der Hersteller verwendet, z.B. für andere Matrices und/oder mit anderen als den vom Hersteller vorgeschlagenen Cut-off-Werten, oder existieren Grenzwertvorgaben für die Bestätigungsanalysen, sind zumindest die untenstehenden Validierungsexperimente durchzuführen. Bei großen Abweichungen von den Herstellerempfehlungen kann auch eine umfassende Validierung erforderlich werden, die dann nach den Vorgaben der US Food and Drug Administration (FDA) [22] vorgenommen werden sollte.

3.1 Selektivität

Bestimmung in der Praxis:

- Bestimmung von mindestens 10 Leerproben aus jeweils verschiedenen Chargen mit dem entsprechenden immunchemischen Verfahren (ggf. nach Probenvorbereitung wie z.B. enzymatische Hydrolyse, Proteinfällung, Extraktion etc.)

Bei diesen Leerproben sollte möglichst kein positives Ergebnis vorliegen.

3.2 Ausreichende Empfindlichkeit

Da immunchemische Methoden als Vorteste zur Identifizierung potentiell positiver Proben verwendet werden, muss sichergestellt werden, dass bei relevanten Konzentrationen der relevanten Zielanalyten der Probe ein positives Ergebnis erhalten wird.

Bestimmung in der Praxis:

- Auswahl von mindestens 10 authentischen Proben, für die im Bestätigungsverfahren eine Konzentration des Zielanalyten im Bereich der erforderlichen Bestimmungsgrenze des Bestätigungsverfahrens bestimmt wurde
- Analyse der oben genannten Proben mit dem immunchemischen Verfahren (ggf. nach Probenvorbereitung wie z.B. enzymatische Hydrolyse, Proteinfällung, Extraktion etc.)
- bei Gruppentests separate Untersuchung für die relevanten Zielanalyten der Gruppe

In mindestens 90% der Fälle muss ein positives immunchemisches Ergebnis vorliegen.

4 Literatur

- [1] Peters FT, Drummer OH, Musshoff F (2007) Validation of new methods. *For.Sci.Int.* 165:216-224.
- [2] Bressolle F, Bromet PM, Audran M (1996) Validation of liquid chromatographic and gas chromatographic methods. Applications to pharmacokinetics. *J.Chromatogr.B* 686:3-10
- [3] Causon R (1997) Validation of chromatographic methods in biomedical analysis. Viewpoint and discussion. *J.Chromatogr.B* 689:175-180
- [4] Dadgar D, Burnett PE (1995) Issues in evaluation of bioanalytical method selectivity and drug stability. *J.Pharm.Biomed.Anal.* 14:23-31
- [5] Dadgar D, Burnett PE, Choc MG, Gallicano K, Hooper JW (1995) Application issues in bioanalytical method validation, sample analysis and data reporting. *J.Pharm.Biomed.Anal.* 13:89-97
- [6] EURACHEM / CITAC. Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement. 2000.
- [7] Hartmann C, Massart DL, McDowall RD (1994) An analysis of the Washington Conference Report on bioanalytical method validation. *J.Pharm.Biomed.Anal.* 12:1337-1343
- [8] Hartmann C, Smeyers-Verbeke J, Massart DL, McDowall RD (1998) Validation of bioanalytical chromatographic methods. *J.Pharm.Biomed.Anal.* 17:193-218
- [9] International Conference on Harmonization (ICH). Validation of Analytical Methods: Definitions and Terminology. ICH Q2 A. 1994.
- [10] International Conference on Harmonization (ICH). Validation of Analytical Methods: Methodology. ICH Q2 B. 1996.
- [11] International Organization for Standardization (ISO). Accuracy (Trueness and Precision) of Measurement Methods and Results. ISO/DIS 5725-1 to 5725-3. 1994.
- [12] Karnes HT, Shiu G, Shah VP (1991) Validation of bioanalytical methods. *Pharm.Res.* 8:421-426
- [13] Kromidas S (2000) Validierung in der Analytik. Wiley-VCH, Weinheim
- [14] Lindner W, Wainer IW (1998) Requirements for initial assay validation and publication in *J. Chromatography B* [editorial]. *J.Chromatogr.B* 707:1-2
- [15] NCCLS (1999) Evaluation of Precision Performance of Clinical Chemistry Devices; Approved Guideline. NCCLS, Wayne, PA
- [16] Penninckx W, Hartmann C, Massart DL, Smeyers-Verbeke J (1996) Validation of the Calibration Procedure in Atomic Absorption Spectrometric Methods. *J.Anal.At.Spectrom.* 11:237-246
- [17] Peters FT, Maurer HH (2001) Bioanalytical method validation – How, how much and why ? A review. *Toxichem.Krimtech.* 68:116-126 (http://www.gtfc.org/tk/tk68_3/Peters.pdf)
- [18] Peters FT, Maurer HH (2002a) Bioanalytical method validation – How, how much and why ? A review. *TIAFT Bulletin* 32:16-23
- [19] Peters FT, Maurer HH (2002b) Bioanalytical method validation and its implications for forensic and clinical toxicology - A review. *Accred.Qual.Assur.* 7:441-449
- [20] Shah VP, Midha KK, Dighe S, McGilveray IJ, Skelly JP, Yacobi A, Layloff T, Viswanathan CT, Cook CE, McDowall RD, Pittman KA, Spector S (1992) Analytical methods validation: bioavailability, bioequivalence and pharmacokinetic studies. Conference report. *Pharm.Res.* 9:588-592
- [21] Shah VP, Midha KK, Findlay JW, Hill HM, Hulse JD, McGilveray IJ, McKay G, Miller KJ, Patnaik RN, Powell ML, Tonelli A, Viswanathan CT, Yacobi A (2000) Bioanalytical method validation--a revisit with a decade of progress. *Pharm.Res.* 17:1551-1557
- [22] U.S.Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation. 2001. <http://www.fda.gov/CDER/GUIDANCE/4252fnl.pdf>
- [23] Vander-Heyden Y., Nijhuis A, Smeyers-Verbeke J, Vandeginste BG, Massart DL (2001) Guidance for robustness/ruggedness tests in method validation. *J Pharm Biomed Anal* 24:723-753

- [24] Wieling J, Hendriks G, Tamminga WJ, Hempenius J, Mensink CK, Oosterhuis B, Jonkman JH (1996) Rational experimental design for bioanalytical methods validation. Illustration using an assay method for total captopril in plasma. *J.Chromatogr.A* 730:381-394
- [25] Hubert Ph, Nguyen-Huu J-J, Boulanger B, Chapuzet E, Cohen N, Compagnon P-A, Dewe W, Feinberg M, Laurentie M, Mercier N, Muzard G, Valat L, Rozet E (2007) Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures, A SFSTP Proposal - Part III. *J.Pharm.Biomed.Anal.* 45:82-96
- [26] DIN EN ISO/IEC 32645:1994

5 Inkrafttreten

Diese Anlage wurde gemäß Beschluss des Vorstandes der GTFCh vom 01.04.2009 verabschiedet und tritt mit der Publikation im Toxichem + Krimtech in Kraft.

Es gelten Übergangsfristen bis 31.03.2011.

Anhang I: Berechnung der Präzisionsdaten

Beide unten aufgeführten Berechnungsverfahren entsprechen im Prinzip der ISO 5725-2 (Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method). Allerdings wird in dieser Norm statt der Reproduzierbarkeit (reproducibility) die tagesverschiedene Laborpräzision berechnet.

Die aufgeführten Formeln sind teilweise vereinfacht und gelten daher nur für Versuchsdesigns, bei denen an mehreren Tagen jeweils gleich viele Bestimmungen unter Wiederholbedingungen durchgeführt werden. Ist diese Grundvoraussetzung nicht gegeben, müssen die komplexeren, allgemeingültigen Formeln aus der ISO 5725-2 verwendet werden.

A. Berechnung aus Parametern der einseitigen Varianzanalyse (one-way ANOVA, in gängigen Statistikprogrammen, z.B. SPSS, enthalten)

Bei diesem Verfahren werden die Messwerte zunächst einer einseitigen Varianzanalyse (one-way ANOVA) unterworfen. Dabei erhält man in der ANOVA-Tabelle die mittleren Abweichungsquadrate innerhalb der Gruppen (hier Tage) und zwischen den Gruppen. Aus diesen Parametern lassen sich dann Wiederholpräzision und Laborpräzision durch einfache mathematische Operationen bestimmen.

1. Wiederholpräzision

Berechnung der Wiederholvarianz

$$s_r^2 = MS_{wg}$$

s_r^2	Wiederholvarianz
MS_{wg}	Mittleres Abweichungsquadrat innerhalb der Gruppen (Tage)

Berechnung der Wiederholpräzision aus der Wiederholvarianz

$$RSD_r [\%] = \frac{\sqrt{s_r^2}}{\bar{X}} \cdot 100 = \frac{\sqrt{MS_{wg}}}{\bar{X}} \cdot 100$$

RSD_r	Wiederholpräzision
s_r^2	Wiederholvarianz
\bar{X}	Mittelwert aller Bestimmungen
MS_{wg}	Mittleres Abweichungsquadrat innerhalb der Gruppen (Tagen)

2. Tagesverschiedene Laborpräzision

Berechnung der Varianz zwischen den Tagen

$$s_t^2 = \frac{MS_{bg} - MS_{wg}}{n}$$

s_t^2	Varianz zwischen den Tagen
MS_{bg}	Mittleres Abweichungsquadrat zwischen den Gruppen (Tagen)
MS_{wg}	Mittleres Abweichungsquadrat innerhalb der Gruppen (Tagen)
n	Anzahl der Wiederholbestimmungen pro Tag (für das vorgeschlagene Design gilt $n = 2$)

Anmerkung:

Falls sich bei der Berechnung zufallsbedingt ein negatives Ergebnis für s_t^2 ergibt, so ist anzunehmen, dass diese den Wert Null hat.

Berechnung der tagesverschiedenen Laborpräzision

$$RSD_{(T)} [\%] = \frac{\sqrt{s_t^2 + s_r^2}}{\bar{X}} \cdot 100$$

$RSD_{(T)}$	tagesverschiedene Laborpräzision
s_t^2	Varianz zwischen den Tagen
s_r^2	Wiederholvarianz
\bar{X}	Mittelwert aller Bestimmungen

B. Direkte Berechnung aus den Messwerten

Bei diesem Verfahren werden die Wiederholpräzision und die Laborpräzision direkt aus den Messwerten bestimmt. Die entsprechenden Formeln sind zwar erheblich komplexer, mit Programmen wie MS Excel oder Valistat (www.arvecon.de) jedoch durchaus zu bewältigen.

1. Wiederholpräzision

Berechnung der Wiederholvarianz

$$s_r^2 = \frac{\sum_{i=1}^p \sum_{k=1}^n (x_{ik} - \bar{x}_i)^2}{p \cdot (n - 1)}$$

s_r^2	Wiederholvarianz
p	Anzahl der Tage (für das vorgeschlagene Design gilt $p = 8$)
n	Anzahl der Wiederholbestimmungen pro Tag (für das vorgeschlagene Design gilt $n = 2$)
x_{ik}	k -te Bestimmung am i -ten Tag
\bar{x}_i	Mittelwert der Bestimmungen am i -ten Tag

Berechnung der Wiederholpräzision aus der Wiederholvarianz

$$\mathbf{RSD}_r[\%] = \frac{\sqrt{\mathbf{s}_r^2}}{\bar{\mathbf{X}}} \cdot 100 = \frac{\sqrt{\frac{\sum_{i=1}^p \sum_{k=1}^n (\mathbf{x}_{ik} - \bar{\mathbf{x}}_i)^2}{\mathbf{p} \cdot (\mathbf{n} - 1)}}}{\bar{\mathbf{X}}} \cdot 100$$

RSD_r Wiederholpräzision**s_r²** Wiederholvarianz **$\bar{\mathbf{X}}$** Mittelwert aller Bestimmungen**p** Anzahl der Tage (für das vorgeschlagene Design gilt p = 8)**n** Anzahl der Wiederholbestimmungen pro Tag (für das vorgeschlagene Design gilt n = 2)**x_{ik}** k-te Bestimmung am i-ten Tag **$\bar{\mathbf{x}}_i$** Mittelwert der n Bestimmungen am i-ten Tag**2. Tagesverschiedene Laborpräzision****Berechnung der Varianz zwischen den Tagen**

$$\mathbf{s}_t^2 = \frac{\sum_{i=1}^p (\bar{\mathbf{x}}_i - \bar{\mathbf{X}})^2}{\mathbf{p} - 1} - \frac{\mathbf{s}_r^2}{\mathbf{n}}$$

s_t² Varianz zwischen den Tagen **$\bar{\mathbf{x}}_i$** Mittelwert der n Bestimmungen am i-ten Tag **$\bar{\mathbf{X}}$** Mittelwert aller Bestimmungen**p** Anzahl der Tage (für das vorgeschlagene Design gilt p = 8)**s_r²** Wiederholvarianz**n** Anzahl der Wiederholbestimmungen pro Tag (für das vorgeschlagene Design gilt n = 2)*Anmerkung:*

Falls sich bei der Berechnung zufallsbedingt ein negatives Ergebnis für **s_t²** ergibt, so ist anzunehmen, dass diese den Wert Null hat.

Berechnung der tagesverschiedenen Laborpräzision

$$\mathbf{RSD}_{(T)}[\%] = \frac{\sqrt{\mathbf{s}_t^2 + \mathbf{s}_r^2}}{\bar{\mathbf{X}}} \cdot 100$$

RSD_(T) tagesverschiedene Laborpräzision**s_t²** Varianz zwischen den Tagen**s_r²** Wiederholvarianz **$\bar{\mathbf{X}}$** Mittelwert aller Bestimmungen

Anhang II: Berechnung des 95% β -Toleranzintervalls gemäß [25]

Das sogenannte β -Toleranzintervall entspricht dem Intervall, in dem auf der Basis der ermittelten Bias und Präzisionsdaten 95% der künftigen Kontrollmessungen des entsprechenden Konzentrationsniveaus zu erwarten sind. Liegt dieses Toleranzintervall vollständig innerhalb des oben genannten Akzeptanzintervalls, sind somit mindestens 95% der künftigen Kontrollmessungen des entsprechenden Konzentrationsniveaus innerhalb des Akzeptanzintervalls zu erwarten. Das 95% β -Toleranzintervall kann mittels folgender Formeln berechnet werden. Voraussetzung ist allerdings, dass die Anzahl der Wiederholbestimmungen für alle Tage gleich ist.

$$L_u[\%] = \text{Bias}[\%] - t_{f,0,975} \cdot \sqrt{1 + \frac{1}{p \cdot n \cdot B^2}} \cdot \text{RSD}_{(T)}[\%]$$

$$L_o[\%] = \text{Bias}[\%] + t_{f,0,975} \cdot \sqrt{1 + \frac{1}{p \cdot n \cdot B^2}} \cdot \text{RSD}_{(T)}[\%]$$

$$f = \frac{(R + 1)^2}{(R + (1/n))^2 / (p - 1) + (1 - (1/n)) / pn}$$

$$R = \frac{s_t^2}{s_r^2}$$

$$B = \sqrt{\frac{R + 1}{n \cdot R + 1}}$$

L_u	untere Grenze des 95% β -Toleranzintervalls
L_o	obere Grenze des 95% β -Toleranzintervalls
f	Anzahl der Freiheitsgrade
t_{f,0,975}	97.5%-Perzentil der t-Verteilung bei f Freiheitsgraden
RSD_(T)	tagesverschiedene Laborpräzision
p	Anzahl der Tage
n	Anzahl der Wiederholbestimmungen pro Tag
s_r²	Wiederholvarianz
s_t²	Varianz zwischen den Tagen