

# Leitfaden für die Qualitätssicherung (Validierung und Anwendung) von Untersuchungsverfahren im Bereich der klinischen Chromatografie und Massenspektrometrie

Carsten Müller, Köln (DGPT/DGKlipha)  
Harald Ertl (DGKL/GTFCh)  
Dennis Klimpel  
Kathrin Koch, Karlsruhe (GTFCh)  
Stefan Neubeck (GTFCh/DGKL)  
Martin Wiesen, Köln (DGKliPha)  
Max Kurlbaum (DGKL)

28.03.2022

# Inhalt

A – Beschreibung eines massenspektrometrischen/chromatografischen Untersuchungsverfahrens .....	3
Beschreibung eines chromatographischen bzw. massenspektrometrischen Untersuchungsverfahrens ...	3
B - Standardproben „Kalibratoren und Kontrollen“ und Verfahren für die metrologische Rückführbarkeit	4
Einwiegen von Reinsubstanzen.....	4
Angaben zum Spiken biologischer Matrices .....	4
Herstellungsprozess für Kalibrations- und Kontrollproben.....	4
Metrologische Rückführbarkeit.....	5
Verfahren zur Zielwert und Zielbereichs Ermittlung.....	6
Dokumentation der metrologischen Substanzcharakteristika.....	6
Dokumentation der Qualitätskontrollen/Kalibratoren. ....	6
C- Validierung eines Untersuchungsverfahrens .....	7
Geltungsbereich.....	7
Arbeitsbereich/Messbereich.....	7
Kalibrationsmodell .....	7
Linearität der Kalibration (Linearity of Calibration) .....	7
Analytische Spezifität / Interferenzen (potentiell störende Matrix-Eigenschaften, Störsubstanzen).....	9
Nachweis- und Bestimmungsgrenze: LOD und LLOQ.....	10
Obere Grenze des Arbeitsbereichs (ULOQ), Verdünnungsoption .....	11
Intra-day-assay / Inter-day-assay (Genauigkeit und Messunsicherheit: Präzision und Richtigkeit) .....	12
Wiederfindungsrate (Extraktionsausbeute) .....	12
Matrix-Effekte (z. B. Ionensuppressions-Enhancement-Experiment bei massenspektrometrischen Verfahren).....	13
Stabilität (präanalytisch, während Analyse, Bench-, Freeze-/Thaw-, Langzeit-Stabilität) .....	15
Anforderungen an die Probennahme .....	16
D - Überwachung eines Untersuchungsverfahrens im laufenden Betrieb .....	17
E - Veränderung eines Untersuchungsverfahrens .....	19
Probenverdünnung:.....	19
Matrix:.....	19
Säulentyp in der chromatografie:.....	19
Veränderung von MS-Messparametern: .....	20
Veränderung des Massenüberganges:.....	20
Gerätereparatur/Wartung:.....	20
Ausgangssubstanzen: .....	21
Einrichten bzw. austausch eines Back-up Systems:.....	21

Technische Dokumentation.....	22
Literatur.....	0

# A – Beschreibung eines massenspektrometrischen/chromatografischen Untersuchungsverfahrens

## BESCHREIBUNG EINES CHROMATOGRAPHISCHEN BZW. MASSESPEKTROMETRISCHEN UNTERSUCHUNGSVERFAHRENS

Bei einem chromatografischen bzw. massenspektrometrischen Untersuchungsverfahren, das im Bereich der medizinischen Diagnostik zur Anwendung kommt, ist es wichtig, dass nicht nur die technischen Merkmale des Verfahrens beschrieben sind, sondern auch der spezielle klinische Kontext berücksichtigt wird [1]. In diesem Kapitel geht es ausnahmslos um die *Beschreibung* eines chromatografischen bzw. massenspektrometrischen Verfahrens, nicht darum, wie dieses kalibriert und validiert wird.

Generell müssen beschrieben werden:

- **der Analyt/ die Analyten:** z. B. Meropenem
- **die Probenmatrix:** z. B. Serum, incl. ggf. benötigten Zusätzen im Probenröhrchen (z.B. EDTA-Plasma, Serum ohne/mit Gel, Urin angesäuert), ungeeignete Probenmatrix: Serum aus Gelgefäßen
- **die Testprinzip:** z. B. LC-MS/MS nach SPE, TOF
- **die Zweckbestimmung:** z. B. zur Therapiesteuerung bei Intensivpatienten
- **der therapeutische Bereich/ der Erwartungsbereich (hiervon leitet sich die klinische Leistungsfähigkeit des Verfahrens ab)**
- **Geforderter Cut-Off bei forensischen Untersuchungsmethoden:** z. B. „> 8 ng/ml“ oder „der gemessene Wert sollte viermal so hoch sein wie die MHK des jeweiligen Keims“
- **ggf. Gefahren-/ Sicherheitshinweise**
- **präanalytische Maßnahmen von der Patientenvorbereitung und der Probengewinnung am Patienten über Lagerung/Transport außerhalb des Labors bis zu Maßnahmen im Labor**

Die Probenvorbereitung:

- **die genaue Art der Probenvorbereitung (einschließlich Derivatisierung):** z. B. SPE, l/l-Extraktion, ...
- **die verwendeten Verbrauchsmaterialien und Chemikalien**
- **das (Mindest-) Probenvolumen**
- **gegebenenfalls Angaben zu internen Standards**
- **die Lagerung der Proben vor der Analyse:** z. B. bei 4 – 8°C

Das chromatografische Verfahren:

- **das verwendete Gerät:** z. B. LaChrom Ultra, Fa. XY
- **die verwendeten Laufmittel:** nach Möglichkeit mit Angaben zur Reinheit, z. B. Acetonitril (HPLC-grade)
- **die verwendete Analysensäule:** z. B. TDM Master Column A, Fa. XY
- **das Injektionsvolumen, die Flussrate, die Säulenofentemperatur, das Gradientenprogramm:** bei GC entsprechend Temperaturprogramm

Das massenspektrometrische Verfahren:

- **das verwendete Analysengerät:** API 4000, Fa. XY
- **die Ionisationsart:** z. B. Electrospray Ionization
- **spezielle Angaben für das jeweilige massenspektrometrische Verfahren:** z. B. Declustering Potential
- **die gemessenen Ionen (gegebenenfalls Precursor- und Produktionen):** z. B. MRM

# B - Standardproben „Kalibratoren und Kontrollen“ und Verfahren für die metrologische Rückführbarkeit

## EINWIEGEN VON REINSUBSTANZEN

Zum Herstellen von Reinsubstanz-Lösungen, die im Rahmen der klinischen oder forensischen Analytik eingesetzt werden, sollte soweit verfügbar ausschließlich Referenzmaterial verwendet werden, dessen Qualität durch ein Analysenzertifikat (Certificate of analysis, COA) und Eigenschaften (Sicherheitsdatenblatt) dokumentiert ist.

Die Einwaage sollte prinzipiell als Rückwaage erfolgen: Rückwaage eines Wägeschiffchens bzw. Wägepapiers und Ermittlung der Differenz zwischen Rückwaage und Einwaage. Dieser Vorgang ist mittels Einwaage-Protokoll zu dokumentieren, in dem folgende Informationen enthalten sind:

Projekt bzw. Methodename (optional), Substanzname, Summenformel, mittlere Molmasse, Einwaage, Hersteller, Charge bzw. LOT-Nummer, Reinheit, Wassergehalt, verwendetes Lösemittel und Volumen, Datum und Signatur des Mitarbeiters. Die Angabe von Raumtemperatur [°C], Luftdruck [mbar] und Luftfeuchtigkeit [%] ist bei speziellen Substanzen (z.B. hygroskopische Analyte) zu empfehlen. Es ist darauf zu achten, dass nur Reinsubstanzen mit optimaler Qualität und höchstem Reinheitsgrad auszuwählen sind. (<https://www.bipm.org/jctlm/>; Database of higher-order reference materials, measurement methods/procedures and services, JCTLM).

Weitere ergänzende Substanz-Informationen wie die Strukturformel, die monoisotopische Masse, der pKs-Wert und der logKow-Wert erleichtern die Arbeit im Rahmen der Methodenentwicklung wie beispielsweise das „Tuning“ (Ermittlung stabiler Übergänge mit Optimum an Signalintensität) von Substanzen an der LC-MS, oder die Wahl einer geeigneten Chromatographie-Säule.

## ANGABEN ZUM SPIKEN BIOLOGISCHER MATRICES

Zum Spiken biologischer Matrices (insbesondere Blut und Serum bzw. Plasma) empfiehlt es sich den Anteil organischer Lösungsmittel so gering wie möglich zu halten, um die Fällung darin enthaltener Proteine zu vermeiden.

Ein Lösemittelanteil von 5% des Gesamtvolumens der Spike-Probe sollte nicht überschritten werden.

Für das praktische Vorgehen beim Spiken einer Matrix ist es sinnvoll, zunächst den organischen Anteil mit den zu spikenden Analyten vorzulegen und anschließend mit dem Restvolumen an Matrix aufzufüllen, da so ein punktueller Fällungsprozess in der Probe am besten vermieden werden kann.

## HERSTELLUNGSPROZESS FÜR KALIBRATIONS- UND KONTROLLPROBEN

Sofern keine andere Absicherung des Messverfahrens über die Teilnahme an z.B. Ringversuchs- oder Laborvergleichsmessungen erfolgt, sollten Kalibrations- und Kontrollproben einer Analysenmethode nach Möglichkeit aus unterschiedlichen Chargen eines zertifizierten Referenzmaterials unabhängig voneinander hergestellt werden. Damit werden die Sicherheit und Zuverlässigkeit eines Messverfahrens deutlich erhöht, da hierdurch interne Fehlerquellen besser erkannt und abgestellt werden können.

Hierfür gibt es je nach Spezifikation und Zweckbestimmung der Methode grundsätzlich verschiedene Möglichkeiten.

Wenn für die zu bestimmenden Analyten bereits kommerzielles Kalibrationsmaterial erhältlich ist, sollte auf dieses zurückgegriffen werden, sofern es den Spezifikationen der Methode (Anzahl der Kalibrationspunkte, Messbereich etc.) genügt.

Andernfalls sollte das Kalibrationsmaterial durch Aufstocken von Leermatrix mit der Lösung eines zertifizierten Referenzmaterials selbst hergestellt werden. Diese Vorgehensweise wird beispielsweise bei vielen seltenen, vor allem aber bei neu zugelassenen Medikamenten notwendig sein. Kalibrationsproben sollten im Allgemeinen so hergestellt werden, dass der beabsichtigte Messbereich für Methoden im klinischen Bereich mit mindestens drei Kalibrationspunkten und bei Methoden im forensischen Bereich mit mindestens 6 Kalibrationspunkten abgedeckt ist, damit ausreichend Daten für das jeweils verwendete Kalibrationsmodell zur Verfügung stehen.

Die Herstellung von Verdünnungsreihen aus gespikter biologischer Matrix mit verdünnter Stocklösung (Arbeitslösung) sollte mit konstantem Volumenanteil (range 2-5vol%) der Arbeitslösung durchgeführt werden.

Für die Herstellung und den Gebrauch von geeigneten Kontrollmaterial gilt Ähnliches: Auch hier sollte auf kommerziell verfügbares Material zurückgegriffen werden, sofern dieses den Spezifikationen der Methode entspricht.

Andernfalls sollten Kontrollproben durch Aufstocken von Leermatrix mit der Lösung eines zertifizierten Referenzmaterial aus einer anderen Charge als derjenigen der Kalibrationsproben hergestellt werden sofern vorhanden.

Ist dies nicht möglich, kann die Herstellung von Poolproben aus Patientenmaterial in Erwägung gezogen werden, sofern hierfür ausreichend Material vorhanden ist.

Da insbesondere bei neu zugelassenen Medikamenten in der Phase der Methodenentwicklung die oben genannten Möglichkeiten häufig ausscheiden, kann in begründeten Fällen auch die Möglichkeit einer Tabletten-Lösung bzw. Ampulle oder pharmazeutische Präparationen des Analyten o.ä. in Betracht gezogen werden, um Matrix-Material aufzustocken.

Generell ist für Kontrollproben Folgendes zu beachten: Für Methoden im klinischen Bereich sind mindestens 2 Kontrollpunkte so zu wählen, dass die niedrigste Kontrolle bei höchstens 25% des Messbereichs und die höchste Kontrolle bei mindestens 75% des Messbereichs liegt. Für Methoden im forensischen Bereich sollte der Messbereich durch mindestens zwei Kontrollpunkte abgedeckt werden.

Kalibrations- und Kontrollpunkte sind innerhalb eines Messbereiches immer so zu wählen, dass sich ihre Werte stets unterscheiden.

## METROLOGISCHE RÜCKFÜHRBARKEIT

Die metrologische Rückführbarkeit von Analyseergebnissen im Allgemeinen sowie bei Anwendung von In-House Methoden im Speziellen soll im Laboralltag durch folgende praktische Maßnahmen gewährleistet werden:

- Verwendung von zertifizierten Referenzmaterial (Dokumentation mittels Analysenzertifikat)
- Genaue Dokumentation von Einwaagen bei der Herstellung von Reinsubstanz-Lösungen (Dokumentation mittels Einwaage-Protokoll)
- Regelmäßige Prüfung und Kalibration von Laborwaagen mittels rückgeführter Gewichte.
- Regelmäßige Prüfung bzw. Kalibration von Pipetten. (Rückführung der Kalibration auf das Normal)

- Temperaturüberwachung sämtlicher Kühlgeräte mittels Thermometer, welches mit einem rückgeführten Thermometer verglichen wird.

## VERFAHREN ZUR ZIELWERT UND ZIELBEREICHS ERMITTLUNG

Bei der Verwendung von selbst hergestelltem Standardmaterial (insbesondere Kontrollproben in Form selbst dotierter Matrixproben oder in Form von Poolkontrollen) sollte diese auf Richtigkeit und Präzision geprüft werden [2]. Bei Poolkontrollen mit a priori unbekanntem Zielwert sollte dieser zunächst durch mind. 6 Aliquote oder 6 einzeln aufgearbeiteter Messproben durch Mittelwertbildung bestimmt werden. Ist der Zielwert der Kontrollprobe bekannt, so werden aus den Messergebnissen von 6 Aliquoten oder 6 einzeln aufgearbeiteten Messproben Richtigkeit und Präzision der Kontrollprobenmessergebnisse berechnet. Der Mittelwert der Messungen darf hierbei höchstens  $\pm 15\%$  vom dotierten Zielwert abweichen ( $\pm 20\%$  im Bereich der Bestimmungsgrenze). Der Variationskoeffizient der Messungen soll  $\leq 15\%$  ( $\leq 20\%$  im Bereich der Bestimmungsgrenze) betragen.

## DOKUMENTATION DER METROLOGISCHEN SUBSTANZCHARAKTERISTIKA

- Analysenzertifikate/Sicherheitsdatenblatt
- Einwaage-Protokolle
- Gerätehandbücher und Listen

## DOKUMENTATION DER QUALITÄTSKONTROLLEN/KALIBRATOREN.

Für die Verwendung von Qualitätskontrollproben und Kalibratoren (Eigenherstellung und kommerziell erhältlich) sind folgende Dokumente und QM-relevante Informationen vorzuhalten:

- Eingangs- bzw. Herstellungsdatum
- Chargendokumentation auf allen Probengefäßen und Aufbewahrungsboxen
- Gebrauchsanweisung
- Mindesthaltbarkeiten der biologischen Matrices
- Sicherstellung der Rückführung sämtlicher Aliquotierungen

## C- Validierung eines Untersuchungsverfahrens

### GELTUNGSBEREICH

Der vorliegende Leitfaden dient der Beschreibung eines standardisiertes Verfahrens zur Validierung analytischer Methoden unterschiedlicher Detektionsmethoden und schafft die Grundvoraussetzung für die Qualität und die Vergleichbarkeit von Analyseergebnissen auf der Basis der aktuellen RiLiBÄK und nationalen und internationalen Richtlinien [3-6]. Die Methodvalidierung dient der Dokumentation der Eignung von Analysenverfahren für ihren Bestimmungszweck.

Grundsätzlich sollte zwischen zwei Arbeitsprozessen unterschieden werden:

- a.) Validationsprozeß
- b.) Anwendungsbezogener Routineprozess

Die Anzahl der zu verwendenden Kalibrations- und Qualitätskontrollprobenlevel während der Validation ist in diesem Zusammenhang davon abhängig, ob es sich um eine klinische Messmethode z.B. für den Einsatz in einem TDM-Labor, oder um eine Methode für den Einsatz im forensisch-toxikologischen Bereich handelt. Es sollten nicht weniger als 5 verschiedene Konzentrationslevel für Kalibratoren, und nicht weniger als 2 verschiedene Konzentrationslevel für den Einsatz von Qualitätskontrollproben verwendet werden.

Im Routinemessbetrieb kann eine Anzahl  $n=1$  für die Kalibration nur unter Maßgabe einer während des Validationsprozesses nachgewiesenen Linearität eingesetzt werden. In allen anderen Fällen (z.B. Vorliegen quadratischen Regression der Kalibrationskurve) sind mindestens  $n=3$  bis maximal  $n=6$  verschiedene Konzentrationslevel zu empfehlen.

### ARBEITSBEREICH/MESSBEREICH

Der Arbeitsbereich (Messbereich) sollte so gewählt werden, dass er einen möglichst großen Anteil der in authentischen Proben zu erwartenden Konzentrationen abdeckt. Sofern bekannt, sollte der therapeutische Konzentrationsbereich (Arbeits-/Messbereich) möglichst innerhalb des Kalibrationsbereichs liegen.

### KALIBRATIONSMODELL

#### Linearität der Kalibration (Linearity of Calibration)

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.

#### Kalibrationsbereich (Range)

Der Kalibrationsbereich einer analytischen Methode ist dabei 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.



## Bestimmung in der Praxis:

- Herstellung von Kalibratoren bei mindestens sechs von Null verschiedenen Konzentrationen (möglichst gleichmäßig über den Kalibrationsbereich verteilt) durch Aufstocken von Leermatrix (z.B. Blankserum bzw. -plasma), wobei der niedrigste (nicht Null) Kalibrator größer oder gleich der unteren Bestimmungsgrenze (LLOQ) sein muss.
- fünf (max. sieben) Bestimmungen bei jeder Konzentration (Wiederholbedingungen)
- Auftragen der Messsignale (z.B. Messsignalverhältnisse, ggf. auch „Peakhöhenverhältnisse“, (Analyt/ISTD) 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.

$$Q = \frac{|x_1 - \bar{x}|}{s} \quad \text{[Formel 1]}$$

mit  $x_1$  = ausreißverdächtiger Wert;  $\bar{x}$  = Mittelwert;  $s$  = Standardabweichung

Der Wert  $x_1$  gilt als Ausreißer, wenn die berechnete Größe  $Q$  größer ist als der entsprechende Tabellenwert bei einem Signifikanzniveau

- 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%)

## Püfung auf Linearität:

Für die lineare Anpassung gilt folgender Zusammenhang:

$$y = b \cdot x + a$$

mit  $y$  = Messsignalverhältnis (Analyt:ISTD);  $x$  =  $c_{\text{soll}}$ ;  $b$  = lineare Steigung;  $a$  = y-Achsenabschnitt

## Reststandardabweichung der linearen Anpassung:

$$s_{yL} = \sqrt{\frac{Q_{xx} - \frac{Q_{xy}^2}{Q_{yy}}}{N-2}} \quad \text{[Formel 2]}$$

mit den Quadratsummen:

$$Q_{xx} = \sum x_i^2 - \frac{(\sum x_i)^2}{N} \quad Q_{yy} = \sum y_i^2 - \frac{(\sum y_i)^2}{N} \quad Q_{xy} = \sum x_i \cdot y_i - \frac{(\sum x_i)(\sum y_i)}{N}$$

Formel im Excelformat: =STFEHLERYX(y-Werte; x-Werte)

Für die quadratische Anpassung gilt folgender Zusammenhang:

$$y = n \cdot x^2 + b \cdot x + a$$

mit  $y$  = Flächenverhältnis (Analyt:ISTD);  $x$  =  $c_{\text{soll}}$ ;  $n$  = quadratische Steigung;  $b$  = lineare Steigung  
 $a$  = y-Achsenabschnitt

### Reststandardabweichung der quadratischen Anpassung:

$$s_{yQ} = \sqrt{\frac{\sum y_i^2 - a \cdot \sum y_i - b \cdot \sum x_i \cdot y_i - \sum x_i^2 \cdot y_i}{N-3}} \quad \text{[Formel 3]}$$

### Formel für Varianzendifferenz

Rechnerische Überprüfung:

Aus den zwei Reststandardabweichungen wird die Differenz der *Abweichungsvarianzen*  $DS$  berechnet:

$$Ds^2 = (N - 2) \cdot s_{yL}^2 - (N - 3) \cdot s_{yQ}^2 \quad \text{[Formel 4]}$$

$N$  = Anzahl der Messungen, d.h. Anzahl der Konzentrationen, bei Doppel- oder Dreifachbestimmungen Anzahl der Mittelwerte

Anschließend wird der Prüfwert, PW, berechnet:

$$PW = \frac{Ds^2}{s_{yQ}^2}$$

Dieser Wert wird mit dem Tabellenwert aus der F-Tabelle (Freiheitsgrad  $f_1 = 1$ ,  $f_2 = N-3$ ,  $P=99\%$ ) verglichen. Wenn  $PW \leq F$ , ist die Kalibrierfunktion linear, bei  $PW > F$  ist die Kalibrierfunktion in diesem Bereich nicht linear.

## ANALYTISCHE SPEZIFITÄT / INTERFERENZEN (POTENTIELL STÖRENDE MATRIX-EIGENSCHAFTEN, STÖRSUBSTANZEN)

### 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 (Specificity)

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.

## Interferenzen

Zur Beurteilung eines möglicherweise auftretenden Einflusses von üblicherweise vorkommenden Störquellen, z.B. ungewöhnlicher Urin-pH-Wert, Serum-Hämolyse oder Arzneimittel als Komedikation werden Matrix-Blanks mit den entsprechenden Substanzen bzw. Eigenschaften gespickt, und unter identischen methodischen Bedingungen

- a.) als Mix (Analyt der Messmethode plus jeweilige potentielle Störquelle z.B. Einzelsubstanz der Komedikation)
- b.) als Mono-Analytmethode (Analyt der Methode) analysiert, und die Ergebnisse miteinander verglichen.

## NACHWEIS- UND BESTIMMUNGSGRENZE: LOD UND LLOQ

Die **Nachweisgrenze (limit of detection)** ist der kleinste, mit einer festzulegenden statistischen Aussagewahrscheinlichkeit erkennbare Gehalt eines Stoffes, der bei einmaliger Messung qualitativ nachgewiesen werden kann. Die Nachweisgrenze ist eine Entscheidungsgrenze für das Vorhandensein eines Bestandteils. An der Nachweisgrenze besteht eine Wahrscheinlichkeit von 50%, den Bestandteil zu finden bzw. nicht zu finden. Die Ermittlung kann über das Signal/Rausch-Verhältnis oder gemäß DIN 32645 nach dem Leerwert- oder dem Kalibrierkurvenverfahren erfolgen. Nach der ICH-Richtlinie kann die Nachweis- und Bestimmungsgrenze basierend auf der Standardabweichung des Signals und der Kalibrierfunktion (Steigung) ermittelt werden.

Die Bestimmung der Nachweisgrenze über das Signal-Rausch-Verhältnis (direkte Methode) kann erfolgen durch Herstellung von Proben mit fallenden Analytkonzentrationen im Bereich der erwarteten Nachweisgrenze. Nach Messung der Proben ergibt sich die Nachweisgrenze als die niedrigste Konzentration des Analyten in der Probenmatrix, bei der das Signal-Rausch-Verhältnis mindestens 2:1 beträgt. Voraussetzung für dieses Verfahren ist aber zwingend mit einer Änderung des Messbereichs und damit auch der Herstellung neuer Kalibrationsproben verbunden.

Anders verhält es sich bei Verwendung des sogenannten Kalibrierverfahrens. Das Kalibrierverfahren bzw. das Kalibriergeradenverfahren (indirekte Methode) ist ein anerkanntes mathematisches Verfahren zur exakten Bestimmung der **Nachweisgrenze, sowie untere Bestimmungsgrenze** unter Verwendung folgender Formeln nach :

$$LOD = \frac{3,3 \cdot s_{blind}}{s} \quad \text{[Formel 5]}$$

$$LLOQ = \frac{10 \cdot s_{blind}}{s} \quad \text{[Formel 6]}$$

mit

$s_{blind}$  = Standardabweichung des „Grundrauschens“ (analytischer Signalhintergrund) unter Verwendung eines ISTD (internen Standards)

Die Bestimmungsgrenze kann auch direkt bestimmt werden. Dazu wird mindestens eine von den Kalibratoren unabhängige Probe hergestellt. Mittels Wiederholbestimmung (mindestens  $n = 5$ ) der Proben werden Bias und Wiederholpräzision als RSD ermittelt. Die kleinste Konzentration mit Bias innerhalb  $\pm 20\%$  und RSD  $\pm 20\%$  ist die Bestimmungsgrenze.

## OBERE GRENZE DES ARBEITSBEREICHS (ULOQ), VERDÜNNUNGSOPTION

Beinhaltet der Anwendungsbereich einer Methode auch Konzentrationen oberhalb des Kalibrationsbereiches, was zum Beispiel durch das Verdünnen von Proben möglich ist, so muss in der Validierung gezeigt werden, dass (und bis zu welcher Analyt-Konzentration) die Verdünnung zu korrekten Ergebnissen führt.

Die Probenverdünnung beeinflusst eine Reihe von Parametern und ist damit von zentraler Bedeutung zur Erstellung eines korrekten Ergebnisses. Bei Überschreiten des Kalibrationsbereichs etwa sollte optimalerweise mit Leermatrix vorverdünnt werden. Wird ein ebenfalls in der Leermatrix vorhandener endogener Parameter bestimmt, so sollte mit mobiler Phase verdünnt werden. Wird dabei die Zusammensetzung der zu injizierenden Probe über eine Änderung der organischen Anteile im Vergleich zu Wasser verändert, kann ein abweichendes chromatographisches Verhalten, mit resultierender veränderter Peakbreite und somit beeinflusster Nachweis- und Bestimmungsgrenze auftreten.

Wird der Verdünnungsfaktor im Sinne einer Nachverdünnung erhöht, so resultieren bei ursprünglich schwacher Verdünnung weniger Matrixeffekte, was die theoretisch niedrigere Signalintensität teilweise kompensiert. Dies hat dann entsprechend direkten Einfluss auf Nachweis- und Bestimmungsgrenze. Außerdem reduziert eine höhere Verdünnung das Risiko der Übersättigung und damit das Verlassen des linearen Bereiches. Neben der Kalibrierfunktion kann dieser Effekt auch durch veränderte Verhältnisse des Quantifier-MRMs zu den Qualifier-MRMs beobachtet werden. Eine Überprüfung des Verdünnungseffektes ist durch Erfassung der absoluten Signalintensitäten von Analyt und internem Standard in Relation zum Verdünnungsfaktor möglich. Der maximale Verdünnungsfaktor sollte an dem zu erwarteten klinisch auftretenden Konzentrationsbereich angelehnt sein.

### Qualitative Methoden / Cutoff:

Bei qualitativen Methoden kann die Notwendigkeit einer Kalibration entfallen, in der Regel beinhalten aber auch qualitative Methoden eine Kalibration von mindestens 1-2 Kalibrierpunkten (z.B. einer unterhalb des Cutoff, einer oberhalb oder am Cutoff). Qualitative Methoden können aber auch vollkommen ohne Kalibration ausfallen z.B. bei datenbankbasierten qualitativen Suchanalysen.

Bei Methoden mit Cutoff erfolgt die Festlegung des Cutoffs nach diagnostischer Notwendigkeit. Es muss sichergestellt werden, dass bei relevanten Konzentrationen der relevanten Zielanalyten der Probe ein positives Ergebnis erhalten wird.

Die Notwendigkeit zum Nachweis von Linearität und zur Ermittlung von Nachweis- und Bestimmungsgrenze entfällt.

Zur Überprüfung einer qualitativen Methode ist ein Methodenvergleich (Qualitative Methode vs. Referenzmethode oder Dotierung) mit mindestens 20 verschiedenen Matrix-Proben durchzuführen. Die Auswertung erfolgt als 4-Felder-Tafel zur Ermittlung von Sensitivität und Spezifität der qualitativen Methode (Angabe in Prozent).

## INTRA-DAY-ASSAY / INTER-DAY-ASSAY (GENAUIGKEIT UND MESSUNSICHERHEIT: PRÄZISION UND RICHTIGKEIT)

### Variabilität innerhalb eines Tages (Intra-day-assay)

In Abhängigkeit von der Zweckbestimmung werden jeweils mindestens fünf (n=5), maximal jedoch sieben (n=7) Proben mit drei Konzentrationsniveaus [Untere Quantifizierungsgrenze (LLOQ); Mittlerer Konzentrationsbereich (MLOQ); Obere Quantifizierungsgrenze (ULOQ)] gemeinsam aufbereitet und in einem Messvorgang bestimmt und ausgewertet.

Ermittelt werden Mittelwert, Median, Standardabweichung, relative Standardabweichung, Minimalwert, Maximalwert, sowie Präzision (als RSD in %) und Richtigkeit (als BIAS in %)

### Variabilität an verschiedenen Tagen (Inter-day-assay)

An mindestens fünf bis maximal sieben verschiedenen Tagen sollten Proben mit unteren, mittleren und hohen Konzentrationsniveaus gemeinsam aufbereitet und mit einer gleichbleibenden Messvorrichtung und –methode in Mehrfachbestimmung (mindestens n=5, maximal n=7) bestimmt und ausgewertet.

Ermittelt werden jeweils Mittelwert, Median, Standardabweichung, relative Standardabweichung, Minimalwert, Maximalwert, sowie Präzision (als RSD in %) und Richtigkeit (als BIAS in %)

### Experimentelles Procedere

Da die einmalige Bestimmung der Variabilität innerhalb eines Tages bzw. an verschiedenen Tagen keine verlässliche Schätzung dieser Eigenschaften einer Methode darstellt, werden an zumindest sieben verschiedenen Tagen je zwei Proben in den unter Abschnitt X. angegebenen Konzentrationen aufgearbeitet und quantifiziert.

RSD ≤ 15% (20% nahe der Bestimmungsgrenze) gelten als akzeptabel.

## WIEDERFINDUNGSRATE (EXTRAKTIONSAUSBEUTE)

Die absolute Wiederfindung (engl. recovery) ist definiert als kompletter Transfer des Analyten von der Matrix in die zu vermessene Lösung. Sie wird bestimmt aus einem Verhältnis der Detektorsignale (z. B. Peak-Area bzw. Peak-Height) einer gleich zugesetzten Menge Analyt zu einer **biologischen Probe** („spike“ von Blank-Matrix) und einer **extrahierten Originallösung** (entspricht 100%, nach „spike“ einer vorher aufgearbeiteten Matrixprobe). Die extrahierte biologische Probe und die extrahierte Originallösung werden analysiert und miteinander verglichen.

Die Bestimmung der Wiederfindungsraten bezieht sich immer auf die absoluten Messsignale. Ein interner Standard wird hier nicht verwendet.

Zur Ermittlung der Wiederfindung sollten bis zu sechs (mindestens fünf) verschiedene Leermatrixquellen verwendet und nach Hinzufügen einer entsprechenden Menge Acetonitril (s. separate Analysen-SOP) je eine (n=1) vergleichende Messung bei niedrigen (QC1), mittleren (QC2) und hohen Konzentrationen (QC3) sowohl der aufgestockten Matrixproben, als auch der entsprechend aufgestockten Extrakte durchgeführt.

Beispiel:

Blank1	Blank2	Blank3	Blank4	Blank5	Blank6	Anzahl
--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------

QC1: Matrix (n=1) Primärextrakt (n=1)	QC1: Matrix (n=1) Primärextrakt (n=1)	QC1: Matrix (n=1) Primärextrakt (n=1)	QC1: Matrix (n=1) Primärextrakt (n=1)	QC1: Matrix (n=1) Primärextrakt (n=1)	QC1: Matrix (n=1) Primärextrakt (n=1)	12
QC2: Matrix (n=1) Primärextrakt (n=1)	QC2: Matrix (n=1) Primärextrakt (n=1)	QC2: Matrix (n=1) Primärextrakt(n =1)	QC2: Matrix (n=1) Primärextrakt (n=1)	QC2: Matrix (n=1) Primärextrakt (n=1)	QC2: Matrix (n=1) Primärextrakt (n=1)	12
QC3: Matrix (n=1) Primärextrakt (n=1)	QC3: Matrix (n=1) Primärextrakt (n=1)	QC3: Matrix (n=1) Primärextrakt (n=1)	QC3: Matrix (n=1) Primärextrakt (n=1)	QC3: Matrix (n=1) Primärextrakt (n=1)	QC3: Matrix (n=1) Primärextrakt (n=1)	12
<b>GESAMT</b>						<b>36</b>

$$W = \frac{\bar{x}}{x_R} \cdot 100\%$$

**[Formel 7]**

mit  $W$  = Wiederfindungsrate in %;  $\bar{x}$  = gemessener Mittelwert;  $x_R$  = richtiger Wert  
Die Wiederfindungsrate sollte mindestens 50% betragen.

### MATRIX-EFFEKTE (Z. B. IONENSUPPRESSIONS-ENHANCEMENT-EXPERIMENT BEI MASSENSPEKTRIMETRISCHEN VERFAHREN)

Es existieren zwei Verfahren zur Ermittlung von Matrix-Effekten, die rechnerische Ermittlung mittels eines speziellen Aufarbeitungs-Schemas und bei chromatographischen Methoden die die Post-Column-Infusionsmethode.

Rechnerische Ermittlung mittels spezieller 3-stufiger Aufarbeitung (Die Ermittlung der Wiederfindungsrate gemäß dem vorherigen Abschnitt entfällt dann):

- Bestimmung von jeweils mindestens fünf Reinsubstanzlösungen bei hohen und niedrigen Konzentrationen (Kontrollen ohne Matrix)
- -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)

Die Auswertung erfolgt in zwei Teilen:

- Wiederfindung: Verhältnis der absoluten Messsignale der aufgestockten Matrixproben zu denen der entsprechenden aufgestockten Extrakte in Prozent (Mittelwert inkl. Standardabweichung)
- - Matrixeffekt: Verhältnis der absoluten Messsignale der aufgestockten Extrakte zu denen der Kontrollproben in Prozent (Mittelwert inkl. Standardabweichung)

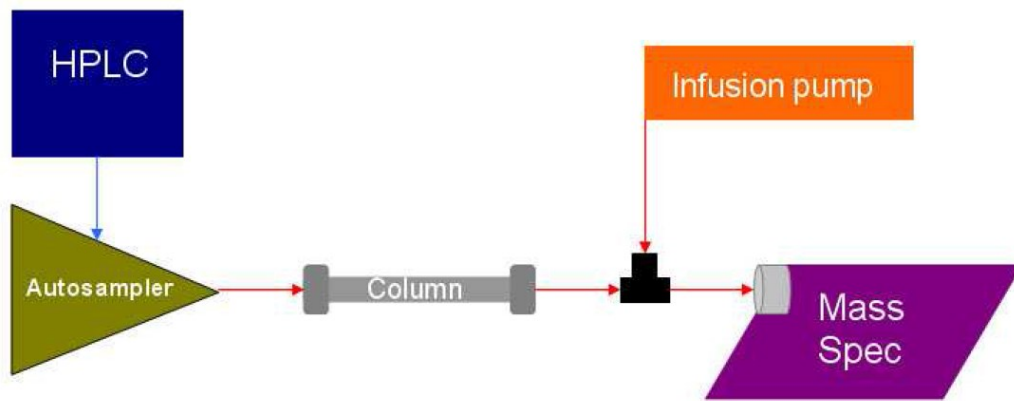
Die Wiederfindungsrate sollte für jede Matrixprobe mindestens 50% betragen. Der Mittelwert des Matrixeffektes sollte im Bereich von 50-150 % liegen. Wird das Ziel für den Matrixeffekt verfehlt, so soll die Berechnung unter Verwendung der Analyt/IS-Verhältnisse wiederholt werden, für die dann der gleiche Akzeptanzbereich gilt sofern auch an der Untergrenze des Messbereiches ein Signal oberhalb der Bestimmungsgrenze erhalten wird.

### Experimentelle Ermittlung:

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 bzw. Probenmatrix. Dabei sind sowohl eine Unterdrückung (Ion suppression) als auch eine Verstärkung (Ion enhancement) des Messsignals möglich.

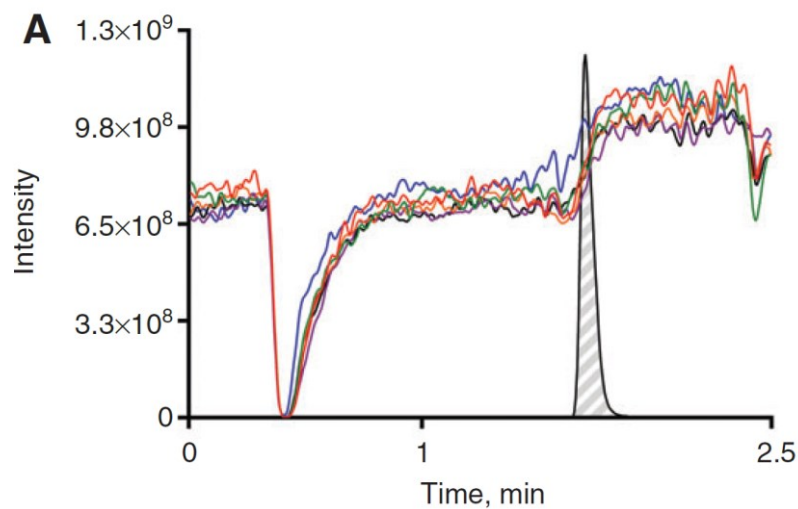
### Ablauf des Experiments:

Die Matrixeffekte werden mittels T-Stück und einer sog. „post-column-infusion“ unter Verwendung einer pumpengesteuerten Infusionssysteme (z.B. Hamiltonspritze) ermittelt.



**Abbildung 1:** post-column-infusion

Die Flussgeschwindigkeit der Infusionspumpe der Hamiltonspritze liegt näherungsweise bei etwa 8-10% der durch die Messmethode vorgegebenen Flussgeschwindigkeit.



**Abbildung 2:** Beispielhafte Darstellung eines Ionensuppressionsexperiments nach Messung von insgesamt 6 extrahierten Blankproben und „post-column-infusion“ des Analyten (bunte Linien), sowie erwartetes Analytensignal nach Ablauf der Chromatografie.

Das Analyt-Messsignal sollte maximal 50 % verändert werden. Analyt-Retentionszeiten innerhalb von Zeitfenstern mit starker Variation der Störeinflüsse sollten vermieden werden.



## STABILITÄT (PRÄANALYTISCH, WÄHREND ANALYSE, BENCH-, FREEZE-/THAW-, LANGZEIT-STABILITÄT)

Einleitung:

Die Stabilität der biologischen Proben und Kalibrierlösungen (Standardproben und Qualitätskontrollproben) ist im Rahmen der zugrundeliegenden Anwendungsbedingungen zu belegen. Die Stabilität wird meist im Rahmen der Robustheit (Fähigkeit eines Verfahrens/einer Methode, Ergebnisse zu liefern, die nicht oder unwesentlich durch Veränderung der Umgebung verfälscht werden).

Nach Möglichkeit sollten dotierte Matrix-Realproben verwendet werden, da kommerziell erhältliche Kontrollprobenmaterialien künstlich verändert sind (v.a. durch Lyophilisationsprozesse). Hinweis auf die Option frische QCs und flexible Handhabung des Auswertestrategie

### **Stabilität während der Aufarbeitung (Bench-Stabilität)**

Es werden jeweils mindestens fünf ( $n=5$ ) Proben mit festgelegter Konzentrationen (hoch/mittel/gering,  $n_{\text{total}}=15$ ) für die Dauer der maximalen Probenbearbeitungszeit bei Raumtemperatur für z.B. 12 Stunden und 24 Stunden gelagert und dann im Vergleich zu frischen oder frisch aufgetauten Proben aufgearbeitet und vermessen. Eine Abweichung der Konzentrationsangaben von weniger als  $\pm 15\%$  weist auf eine Stabilität der Analyten hin.

### **Stabilität aufgearbeiteter Proben (Autosampler-Stabilität)**

Es werden jeweils mindestens fünf ( $n=5$ ) Proben mit festgelegten Konzentrationen (hoch/niedrig) zur Messung aufbereitet, dann mit Kalibratoren vermessen und nach Ablauf der maximalen erwarteten Lagerungsdauer von Proben im Autosampler gegen frisch extrahierte Kalibratoren ( $n=2$ ) erneut vermessen.

Die Konzentrationsergebnisse der initial gemessenen QCs werden mit den frisch extrahierten und anschließend analysierten QCs verglichen. Eine Abweichung der Konzentrationsangaben von weniger als  $\pm 15\%$  weist auf eine Stabilität der Analyten hin.

### **Freeze-Thaw-Stabilität**

Es werden jeweils drei Proben mit festgelegten Konzentrationen (hoch/mittel/gering) dreimal von der Lagerungstemperatur ( $-20^{\circ}\text{C}$  oder  $-80^{\circ}\text{C}$ ) auf Raumtemperatur aufgetaut (nicht übermäßig erwärmen), wieder eingefroren und anschließend zusammen mit frisch extrahierten und anschließend analysierten QCs vermessen.

Die Konzentrationsergebnisse der initial gemessenen QCs werden mit den frisch extrahierten und anschließend analysierten QCs verglichen. Eine Abweichung der Konzentrationsangaben von weniger als  $\pm 15\%$  weist auf eine Stabilität der Analyten hin.

### **Präanalytische Stabilität (Longterm-Stabilität)**

Es werden jeweils drei Proben mit festgelegten Konzentrationen (hoch/mittel/gering) für die vorgesehenen Lagerungsbedingungen und für die vorgesehene Lagerungszeit oder zumindest einen wesentlichen Anteil davon eingelagert. Die Proben werden vor und nach Ende der Lagerzeit im Vergleich mit neu angesetzten Proben aufgearbeitet und vermessen.

Ermittelt werden jeweils Mittelwert, Median, Standardabweichung, relative Standardabweichung, Minimalwert, Maximalwert, sowie Präzision (als RSD in %) und Richtigkeit (als BIAS in %).

Eine Abweichung der Konzentrationsangaben von weniger als  $\pm 15\%$  weist auf eine Stabilität der Analyten hin.

Daten zur präanalytischen Stabilität müssen nicht selbst ermittelt werden, auch Literaturdaten sind zulässig sofern sie für den jeweiligen Analyten im jeweiligen Material publiziert wurden.



## ANFORDERUNGEN AN DIE PROBENNAHME

Die anfordernde Stelle sollte aufgeklärt über die Gründe der einer Analysen-Anforderung, die Gewinnung des Probenmaterials (Patientenvorbereitung, Art und Menge des Materials, Behältnisse und Zusätze), bezüglich Lagerung und Versand, sowie Angaben zur Kennzeichnung der Probe (Patienten-Name, -Initialen oder -Code, Tag der Probennahme):

Beispiel:

Lagerung und Versand Die Serum- oder Plasma-Proben können bei Bedarf dunkel und im Kühlschrank (4° C) für 24 Stunden gelagert werden. Versand (normaler Postversand) innerhalb von zwei Tagen ist ohne Kühlung möglich. Ausnahme ist Olanzapin, welches in Serum oder Plasma nur begrenzt stabil ist (Versand ohne Kühlung innerhalb eines Tages). Die Proben in Behältern für diagnostische Proben versenden, die die DIN EN 829 erfüllen (geeignet sind z.B. Materialien der Firma Sarstedt, Best.-Nr. 78.898 für Gefäße, 65.679 für Deckel und 95.103 für Versandhüllen). Die Verantwortung für die Einhaltung der Sicherheitsvorschriften für den Versand von potentiell infektiösem Material (Bundesgesetzbl- Gesundheitsforsch-Gesundheitsschutz 8 2001) liegt beim Absender. Der Probe ist der Anforderungsschein beizufügen. Der Probe ist der Anforderungsschein beizufügen.

Mündliche Anforderungen sollten nur als Nachforderung möglich sein und möglichst in einem Zeitrahmen von 24h nachgefordert werden.

## D - Überwachung eines Untersuchungsverfahrens im laufenden Betrieb

D - Überwachung eines Untersuchungsverfahrens im laufenden Betrieb			
Praktische Empfehlungen für einen standardisierten Batch-Aufbau (CLI Paper, Vogeser, 2020, Tabelle 2)	Ja <input type="checkbox"/>	Nein <input type="checkbox"/>	
Ringversuche, Laborvergleichsmessungen			
Messunsicherheit (z. B. aus Kontrollkarten und Ringversuchsdaten)	Ja <input type="checkbox"/>	Nein <input type="checkbox"/>	
Empfehlungen zur Überwachung der Haltbarkeit von Chemikalien, Kontrollen, Kalibratoren (Hinweis: ISTD isotopenmarkiert..., Verwendung nach Ablauf der gesetzlichen ? Haltbarkeit, Umgang mit Herstellerhaltbarkeit)	Ja <input type="checkbox"/>	Nein <input type="checkbox"/>	
Risikomanagement....			

Zur Sicherstellung der Qualität eines Untersuchungsverfahrens ist dessen Funktion im laufenden Betrieb zu überwachen und zu dokumentieren. Dies ist unabhängig davon, ob das Untersuchungsverfahren laborintern entwickelt wurde oder als kommerzieller Kit erworben wird.

Die Dokumentation der Qualität erfolgt typischerweise durch Ringversuche (bzw. wenn es diese nicht gibt Laborvergleichsmessungen) mindestens 2x/Jahr und der periodischen Ermittlung der Messunsicherheit z.B. aus Ergebnissen der Kontrollproben- und Ringversuchsmessungen.

Die Sicherstellung der Qualität erfolgt zeitlich engmaschiger innerhalb jeder Messserie, egal ob im Batch- oder Random Access-Modus. Die Details hängen vom verwendeten Analysensystem ab und die dazu verwendeten Kenngrößen sind bei der Routineeinführung festzulegen. Die für die Kenngrößen ermittelten Werte sind im zeitlichen Verlauf zu dokumentieren, und zwar bevorzugt zusammen mit der Dokumentation der geplanten und ungeplanten Gerätewartungen und anderer besonderer Ereignisse am Gerät (z.B. Reparatur, Software-Upgrade, ...) bzw. beim Untersuchungsverfahren (z.B. Erneuerung von HPLC-Trennsäule, neue Charge des Internen Standards, ...). Für die Kenngrößen sind Akzeptanz- bzw. Warn Grenzen zu definieren, und Maßnahmen, die bei Grenzüberschreitungen zu ergreifen sind.

Dabei sind 3 Ebenen zu beachten:

1.

Der Aufbau der Messserie hat einen entscheidenden Einfluss auf die Qualität, z.B. durch die Positionierung von Kontrollproben und Blindwert-Proben nicht nur am Anfang sondern auch in regelmäßigen Abständen innerhalb der Serie. Der Aufbau der Messserie ist stark geräte- und verfahrensabhängig, so dass allgemeine Vorgaben nicht möglich sind. Die Vorgaben für das konkrete Untersuchungsverfahren sind in der SOP zu beschreiben. Wichtige Aspekte sind dabei insbesondere Blindwert und Probe-zu-Probe-Verschleppung, die beide in Form von Kenngrößen gemonitort werden können.

2.

Kenngrößen der Qualität innerhalb einer Messserie sind z.B. die Signalgröße und Signalform des kleinsten Standards, bei chromatographischen Systemen auch dessen Retentionszeit, und generell

das Signal-/Rausch-Verhältnis oder die Signalgröße eines internen Standards (IS). Auch Quotienten aus Kenngrößen können verwendet werden, z.B. das IS-Signal jeder Patientenprobe geteilt durch das mittlere IS-Signal der Kalibration. Ein Monitoring eines IS-Signal aller Proben im zeitlichen Verlauf der Messung kann gerade bei Verfahren mit konstanter Zufuhr zum Detektionssystem sinnvoll sein (z.B. ICP-MS). Bei Verfahren mit konstantem Fluss wichtiger Komponenten ist die Dokumentation des Systemdrucks sinnvoll (z.B. HPLC). Bei Verfahren mit Massen-Hochauflösung ist ein konstantes Monitoring der Massengenauigkeit empfehlenswert.

3.

Kenngrößen der Qualität der einzelnen Patientenprobe dienen dazu zu belegen, dass die Messung ordnungsgemäß verlaufen ist, z.B. das Quantifier/Qualifier Verhältnis bei Verfahren mit massenspektrometrischer Detektion, die Elutions- bzw. Retentionszeit bei Trennverfahren (z.B. HPLC) und die IS-Signalgröße.

Anmerkungen:

Unabhängig vom oben beschriebenen hat eine Bewertung der Kontrollproben-Messungen (z.B. Abweichung vom Zielwert) und der Kalibrationsproben (z.B. Abweichung vom Zielwert, Kenngrößen der Kalibrationsfunktion usw.) zu erfolgen. Das oben beschriebene Monitoring innerhalb einer Serie ist mehr als die Messung und Bewertung von Kontrollproben und Kalibratoren und kann dadurch nicht ersetzt werden.

Bereits zeitlich vor dem instrumentellen Teil der Messung gibt es mit Bezug auf den laufenden Betrieb wichtige Faktoren, insbesondere die Sicherstellung der korrekten Funktion aller verwendeten Geräte (z.B. Pipetten, Waagen, ...) und Chemikalien (z.B. Wasser, Lösungsmittel, Salze, Lösungen, Referenzstandards, aus Referenzstandards hergestellte Lösungen und kommerziell verfügbare Reagenzien).

Zu den Geräten sind die Vorgaben in Teil B zum Thema metrologische Rückführbarkeit zu beachten.

Bei den Chemikalien ist neben dem korrekten Umgang damit (d.h. die Einhaltung der SOP und Chargendokumentation) deren Haltbarkeit ein wichtiger Faktor. Diese Haltbarkeit ist innerhalb der SOP zu nennen, entweder indem Haltbarkeitsangaben auf kommerziellen Produkten übernommen werden (z.B. „Haltbarkeit der nicht aufgelösten Kontrolle bei +4-8°C: siehe Produktetikett“) oder indem durch eigene Testung ermittelte Haltbarkeiten verwendet werden (z.B. „Haltbarkeit der rekonstituierten Kontrolle bei -80°C: 6 Monate“). Dabei ist zu berücksichtigen, dass die Haltbarkeitsangabe auf einem kommerziellen Produkt in der Regel der längste erfolgreich vom Hersteller getestete Zeitraum ist. Längere Zeiträume können Stabilität zeigen, die durch laborinterne Testung ermittelt werden kann. Das ist insbesondere plausibel wenn die Lagerung im Labor bei stärker stabilisierenden Bedingungen erfolgt als vom Hersteller spezifiziert, z.B. bei -80°C statt bei -20°C. Bei Verwendung kommerzieller Produkte bei Lagerungsbedingungen wie vom Hersteller spezifiziert, aber zeitlich über die Herstellerangaben hinaus, ist es ein Monitoring des Zustandes des Produktes in der Routine zu etablieren, z.B. in Form einer spezifischen Kenngröße wie oben zum Thema Qualität innerhalb einer Messserie beschrieben.

Als Teil des labordiagnostischen Risikomanagements (auf der Ebene der technischen Freigabe) sind die Aspekte eines Untersuchungsverfahrens von besonderer Bedeutung, die die Validität eines Ergebnisses gefährden können. Es ist sicherzustellen, dass die verwendeten Kenngrößen der Qualität des Untersuchungsverfahrens im Fall von manuellen oder technischen Fehlern mit einem ernsthaften bis kritischen Schweregrad in Bezug auf das labordiagnostische Ergebnis stets Werte außerhalb der Akzeptanzbereiche der Kenngrößen ergeben.

## E - Veränderung eines Untersuchungsverfahrens

Empfehlungen zur Notwendigkeit von Teil- oder Kompletvalidierungen bei Modifikation des Verfahrens// Beispiele für Revalidierungsumfang bei:

### PROBENVERDÜNNUNG:

Die Probenverdünnung beeinflusst eine Reihe von Parametern und ist damit von zentraler Bedeutung zur Erstellung eines korrekten Ergebnisses. Bei Überschreiten des Kalibrationsbereichs etwa sollte optimalerweise mit Leermatrix vorverdünnt werden. Wird ein ebenfalls in der Leermatrix vorhandener endogener Parameter bestimmt, so sollte mit mobiler Phase verdünnt werden. Wird dabei die Zusammensetzung der zu injizierenden Probe über eine Änderung der organischen Anteile im Vergleich zu Wasser verändert, kann ein abweichendes chromatographisches Verhalten, mit resultierender veränderter Peakbreite und somit beeinflusster Nachweis- und Bestimmungsgrenze auftreten.

Wird der Verdünnungsfaktor im Sinne einer Nachverdünnung erhöht, so resultieren bei ursprünglich schwacher Verdünnung weniger Matrixeffekte, was die theoretisch niedrigere Signalintensität teilweise kompensiert. Dies hat dann entsprechend direkten Einfluss auf Nachweis- und Bestimmungsgrenze. Außerdem reduziert eine höhere Verdünnung das Risiko der Übersättigung und damit das Verlassen des linearen Bereiches. Neben der Kalibrierfunktion kann dieser Effekt auch durch veränderte Verhältnisse des Quantifier-MRMs zu den Qualifier-MRMs beobachtet werden. Eine Überprüfung des Verdünnungseffektes ist durch Erfassung der absoluten Signalintensitäten von Analyt und internem Standard in Relation zum Verdünnungsfaktor möglich. Der maximale Verdünnungsfaktor sollte an dem zu erwarteten klinisch auftretenden Konzentrationsbereich angelehnt sein.

Soll eine Probe ad hoc in Verdünnung analysiert werden und wurde der Vorgang der Verdünnung nicht in der Validierung getestet, dann soll der Vorgang der Verdünnung analog zu dem in Abschnitt C beschriebenen überprüft werden. Neben der Überprüfung der gewählten Verdünnungstechnik durch eine systematische Erfassung wie im Rahmen einer Validierung ist dazu auch die Verdünnung einer Probe mit bekannter hoher Konzentration im Kalibrationsbereich mit der identischen Verdünnungstechnik geeignet.

### MATRIX:

Soll innerhalb einer Matrixgruppe beispielsweise neben Serum auch Plasma als Matrix genutzt werden, so sollten Vergleichsmessungen durchgeführt werden. Eine Überprüfung sollte an mindestens 10 Proben durchgeführt werden.

Wird eine weitere Matrix aufgenommen, die physiologisch stark von den bisher validierten Matrices abweicht z.B. Urin, so sollte das Verfahren für diese Matrix validiert werden.

### SÄULENTYP IN DER CHROMATOGRAPHIE:

Der Säulentyp spielt trotz der hohen Spezifität von massenspektrometrischen Verfahren eine entscheidende Rolle bei der korrekten Erstellung von Analyseergebnissen. Entsprechend der Struktur des/der Analyten wird hier im Rahmen der Methodenentwicklung eine geeignete Phase ausgewählt, die eine gewisse Retention und Auftrennung verschiedener Analyten bzw. störender Signale sowie Abtrennung von Matrixkomponenten gewährleistet. Eine Änderung des Säulentyps führt u.a. zu Veränderungen des Retentionsverhaltens (absolute Retentionszeit, Peakform) und somit auch zu veränderten Matrixeffekten. Da die Signalintensität i.d.R. mit höherem organischen

Anteil durch bessere Verdampfbarkeit des organischen Lösungsmittels zunimmt, ist hier auch mit veränderten Signalintensitäten zu rechnen. Neben dem positiven Effekt auf die Nachweis- und Bestimmungsgrenze durch erhöhte Signale kann es aber auch zum Erreichen eines Sättigungseffektes kommen. Neben der Kalibrierfunktion (linear/ nicht linear) zeigt sich dieser Effekt ebenso bei den Intensitätsverhältnissen zwischen unterschiedlichen massenspektrometrischen Messsignalen im Vergleich zwischen einer Probe mit niedrigen und hohen Konzentrationen.

Eine Änderung des Säulenmaterials macht dementsprechend eine vollständige Revalidierung der Methode notwendig.

### VERÄNDERUNG VON MS-MESSPARAMETERN:

Aufgrund der sich verändernden Leistungsfähigkeit eines Massenspektrometers kann eine Optimierung/Anpassung der analytspezifischen MS-Messparameter nötig sein, soweit dieses bei der Methodenetablierung noch nicht vollumfänglich durchgeführt wurde. Die Auswirkung durch die resultierende, veränderte Signalintensität sollte dann im Rahmen einer Überprüfung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze, der Linearität sowie Vergleichsmessungen von mindestens 20 Realproben verifiziert werden. Eine maximale Abweichung von höchstens 15 % der Ergebnisse im Vergleich zu den ursprünglichen Ergebnissen ist tolerabel.

Werden zentrale Parameter des Massenspektrometers verändert, so zieht dies eine Vollvalidierung nach sich.

Im Falle einer Erweiterung einer Methode ohne Änderung jeglicher MS-Parameter wie z.B. die Aufnahme eines weiteren Analyten in eine scheduled MRM-Methode, so sollten lediglich die Nachweis- und Bestimmungsgrenze der Analyten erneut verifiziert werden, die durch die Aufnahme direkt betroffen sind, im Falle des scheduled MRM also die, der Zeitfenster mit der neuen Substanz überlappen.

Werden in einer statischen MRM-Methode Platzhalter-MRM durch neue Analyt-MRM ersetzt, so ist eine Validierung nur für die neu hinzugefügten Analyt-MRM notwendig, sofern die restliche Methode unverändert bleibt.

### VERÄNDERUNG DES MASSENÜBERGANGES:

MRM-Übergänge werden im Rahmen der Validierung ausgewählt. Es empfiehlt sich in diesem Stadium mindestens 2, optimalerweise 3 MRM-Übergänge auszuwählen und zu validieren. So kann im Einzelfall auf einen anderen MRM ausgewichen werden, wenn der Routine-Quantifier MRM gestört ist. Wird in einer statischen MRM-Methode ein MRM-Übergang verändert, so ist eine Validierung nur für den veränderten MRM notwendig, sofern die restliche Methode unverändert bleibt.

### GERÄTEREPARATUR/WARTUNG:

Nach Gerätereparatur/-wartung sollte die Leistungsfähigkeit des Messgerätes geprüft werden. In diesem Zusammenhang, aber auch im Rahmen der kontinuierlichen Überwachung des Systems, kann der Einsatz von Checklisten zum Monitoring beispielsweise der absoluten Signalintensität und/oder der Verhältnisse der MRMs von Realproben hilfreich sein.

## AUSGANGSSUBSTANZEN:

Für Kontrollen und Kalibratoren sollte wenn möglich auf zertifiziertes Referenzmaterial zurückgegriffen werden. Vornehmlich geeignet sind NIST-Standards, „European Reference Material“ (ERM) und certified reference material“ (CRM), (s. auch metrologische Rückführbarkeit).

Für Isotopenstandards, die als interne Standards Verwendung finden, sind zwar derartige Referenzsubstanzen nicht verfügbar aus analytischer Sicht aber auch nicht notwendig. Sollten keine Referenzstandards verfügbar sein, sollte die Ergebnisse analytischer Verfahren, die zur Identitäts- und Reinheitsprüfung der Substanzen verwendet wurden inklusive der jeweiligen Ergebnisse dokumentiert werden. Idealerweise sollten NMR oder massenspektrometrische Methoden hierbei Verwendung gefunden haben.

Werden Ausgangssubstanzen eingesetzt, die nicht als Referenzmaterialien anzusehen sind, so ist eine unabhängige Überprüfung im Hinblick auf eine korrekte Quantifizierung empfehlenswert. Dies kann z.B. im Rahmen von Laborvergleichsuntersuchungen oder falls verfügbar Ringversuchen durchgeführt werden. (Ist ein Konzentrationsbereich angegeben (+/-), so kann die tatsächliche vorliegende Konzentration aus den Ergebnisse der unabhängigen Kontrolle über Laborvergleichsmessungen oder Ringversuche ermittelt werden.)

## EINRICHTEN BZW. AUSTAUSCH EINES BACK-UP SYSTEMS:

Beim Einrichten (bzw. auch für Austausch des Systems/des Massenspektrometers gegen ein gleichartiges System/Massenspektrometers) eines Back-Up Systems auf einem vergleichbarem Gerät ist keine Vollvalidierung notwendig. Soweit möglich sollte beim Einrichten der Methode von der Ausgangsmethode ausgegangen werden und nur dringend benötigte geräteindividuelle Adaptionen vorgenommen werden. Zur Prüfung der Leistungsfähigkeit und Vergleichbarkeit der Systeme sollten folgende Messungen durchgeführt werden.

- Überprüfung der LLOQ
- Überprüfung des LOD
  - Überprüfung der Linearität, wenn von einem linearem Konzentrations-/Signal Verhältnis ausgegangen wird
- Vergleichsmessung zwischen etabliertem System und Back-up System von mindestens 20 Realproben und Ringversuchsproben über einen weiten Konzentrationsbereich (erlaubte Abweichung  $\leq 15\%$ ).

## Technische Dokumentation

Link zur Technischen Dokumentation, Internetauftritt der AWMF 2022 (Autoren: P. Hoffmüller; F. Spitzenberger):

[https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&ved=2ahUKEwjP3ZLx2uj2AhV2R\\_EDHZSUCw8QFnoECAgQAQ&url=https%3A%2F%2Fwww.awmf.org%2Ffileadmin%2Fuser\\_upload%2FMedizinische\\_Versorgung%2FIVD%2FBereitstellung\\_von\\_Informationen\\_des\\_IH-IVD\\_v.01.docx&usg=AOvVaw1CEHo-qpuTHOF5AwadHB7u](https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&ved=2ahUKEwjP3ZLx2uj2AhV2R_EDHZSUCw8QFnoECAgQAQ&url=https%3A%2F%2Fwww.awmf.org%2Ffileadmin%2Fuser_upload%2FMedizinische_Versorgung%2FIVD%2FBereitstellung_von_Informationen_des_IH-IVD_v.01.docx&usg=AOvVaw1CEHo-qpuTHOF5AwadHB7u)





## Literatur

1. Vogeser, M., C. Schuster, and A.L. Rockwood, *A proposal to standardize the description of LC-MS-based measurement methods in laboratory medicine*. Clin Mass Spectrom, 2019. **13**: p. 36-38.
2. F., P.L.D.M., *Richtlinie zur Qualitätssicherung bei forensisch-toxikologischen Untersuchungen, Version 02, 2016; Untergruppe „Richtlinienerstellung“ des Arbeitskreises Qualitätssicherung, GTFCh*. 2016.
3. (FDA), F.a.D.A., *Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry, May 2018*. Available from: <https://www.fda.gov/files/drugs/published/Bioanalytical-Method-Validation-Guidance-for-Industry.pdf>, 2018.
4. Funk, W.D.V.D.G., *Qualitätssicherung in der Analytischen Chemie Anwendungen in der Umwelt-, Lebensmittel- und Werkstoffanalytik, Biotechnologie und Medizintechnik*. 2012.
5. Guideline ICH, E.M.A.E., *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, Q2 (R1)*. Available from: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q-2-r1-validation-analytical-procedures-text-methodology-step-5\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q-2-r1-validation-analytical-procedures-text-methodology-step-5_en.pdf), 2005. 20.
6. Kromidas, S., *Handbuch Validierung in der Analytik*. 2011, Weinheim, Bergstr: Wiley-VCH.