

Empfehlungen der Gesellschaft für Toxikologische und Forensische Chemie (GTFCh) zur Validierung von Methoden für die toxikologische Analytik im Rahmen der Hirntod-Feststellung

Bearbeitet von Frank T. Peters, Jürgen Hallbach und Hans H. Maurer unter Mitarbeit des Arbeitskreises Klinische Toxikologie der GTFCh

Verabschiedet vom Arbeitskreis Klinische Toxikologie am 11.05.2004

Genehmigt vom Vorstand der GTFCh am 05.06.2004

1. Empfehlungen

Der Arbeitskreis Klinische Toxikologie der Gesellschaft für Toxikologische und Forensische Chemie (GTFCh) hat 2002 Empfehlungen für die toxikologische Analytik im Rahmen der Hirntod-Feststellung veröffentlicht [1]. Hierin wurde die Notwendigkeit der Methoden-Validierung verankert. Da es mehrere, zum Teil sehr umfangreiche Validierungsempfehlungen für verschiedene Bereiche der Bioanalytik gibt [2], hat sich der Arbeitskreis Klinische Toxikologie auf einen Minimalkonsens verständigt, der Laboratorien empfohlen wird, die toxikologische Analytik im Rahmen der Hirntod-Feststellung durchführen. In Tabelle 1 sind die einzelnen Validierungsschritte, die für essentiell befunden wurden, zusammengefasst.

Tabelle 1: Validierungsparameter und minimale Anforderungen

Selektivität (Ausschluss von Interferenzen)

Zehn unterschiedliche Leerseren/-plasmen sind zu untersuchen.

Zwei Nullproben (Leerseren/-plasmen plus internem Standard) sind zu untersuchen.

Linearität

Kalibration (matrixbasiert)

- Niedrigster Kalibrator: ein Viertel der Untergrenze des therapeutischen Bereichs
- Höchster Kalibrator: mindestens Obergrenze des therapeutischen Bereichs
- Jeweils sechs Bestimmungen bei fünf verschiedenen Konzentrationen
- Annähernd äquidistante Verteilung der Kalibratoren

Statistische Auswertung

- Prüfung auf ausreichende Linearität
- Überprüfung des y-Achsenabschnitts
- Ggf. Verwendung eines nichtlinearen Kalibrationsmodells

Präzision und Richtigkeit

Herstellung von zwei aufgestockten Kontrollproben

- Konzentration an der Unter- und Obergrenze des therapeutischen Bereichs

Je zwei Bestimmungen an acht verschiedenen Tagen mit täglicher Vollkalibration und jeweils frisch hergestellten Kalibratoren

- Berechnung der Konzentrationen in den Kontrollproben über Ein-Punkt-Kalibrierung
- Auswahl des optimalen Ein-Punkt-Kalibrators
- Wenn Akzeptanzgrenzen bei Ein-Punkt-Kalibration nicht erfüllt, Berechnung über Vollkalibration

Akzeptanzgrenzen

- 99%-Konfidenzintervall innerhalb $\pm 50\%$ des Sollwertes (beinhaltet Präzision und Richtigkeit)

2. Begründung

2.1. Selektivität (Ausschluss von Interferenzen)

Ziel der Analyse von Leermatrixproben verschiedener Quellen ist das Aufspüren bzw. der Ausschluss möglicher Interferenzen durch in der Matrix vorhandene, endogene (oder exogene) Substanzen. Grundsätzlich steigt mit der Anzahl der untersuchten Leermatrixproben die Wahrscheinlichkeit auch seltener Matrixinterferenzen, die aber später in der Routine zu erheblichen Problemen führen können, bereits in dieser frühen Validierungsphase aufzuspüren. Zu diesem Zeitpunkt können noch Modifikationen des Verfahrens vorgenommen werden, bevor die übrigen Validierungsexperimente durchgeführt werden. Die im vorliegenden Minimumkonsens empfohlene Analyse von mindestens 10 verschiedenen Leermatrixproben stellt lediglich einen Kompromiss zwischen Arbeitsaufwand und dem Risiko, seltener Interferenzen möglicherweise zu übersehen, dar. Die Analyse weiterer Leermatrixproben über diese Mindestanforderung hinaus ist jedoch empfehlenswert.

Ziel der Analyse von Nullproben ist das Aufspüren bzw. der Ausschluss von Interferenzen durch den internen Standard. Dies ist vor allen Dingen bei massenspektrometrischen Verfahren erforderlich, wenn deuterierte Analoge der Analyten als interne Standards verwendet werden, da diese chromatographisch nicht vollständig von den Analyten getrennt werden können.

2.2. Linearität

Bei toxikologischen Analysen im Rahmen der Hirntod-Feststellung werden in der Regel nur Einzelproben analysiert, da die Anforderungen von solchen Analysen eher selten sind. Die Durchführung einer vollen Kalibration für jede dieser Einzelproben ist daher aus zeitlichen und ökonomischen Gründen nicht sinnvoll bzw. nicht möglich. Letztlich wird es das Ziel sein, Methoden zu entwickeln, die in Routineanwendung auch mit einer Ein-Punkt-Kalibrierung zu brauchbaren Ergebnissen führen. Das setzt allerdings voraus, dass im relevanten Konzentrationsbereich ein linearer Zusammenhang zwischen der Konzentration des Analyten in Probe und Messgröße besteht und dass der y-Achsenabschnitt vernachlässigbar klein ist.

Die Wahl der Konzentration des niedrigsten Kalibrators am 0,25-fachen der Untergrenze des therapeutischen Bereichs ist erforderlich, um die Linearität bis über die in den Empfehlungen für die toxikologische Analytik im Rahmen der Hirntod-Feststellung [1] empfohlene Messbereichsgrenze (das 0,5-fache der Untergrenze des therapeutischen Bereichs) hinaus zu testen. Die Konzentration des höchsten Kalibrators sollte mindestens der Obergrenze des therapeutischen Bereichs entsprechen, um Konzentrationen im therapeutischen Bereich verlässlich bestimmen zu können, und so bei noch nicht subtherapeutischen Konzentrationen in authentischen Proben ggf. eine Abschätzung des Verlaufs zu erlauben. Allerdings kann die Wahl einer Konzentration des höchsten Kalibrators deutlich über der Obergrenze des therapeutischen Bereichs sinnvoll sein, z.B. wenn die Methode auch zur Analyse im Rahmen von Vergiftungen eingesetzt werden soll.

Die jeweils sechsfache Analyse von fünf Kalibratoren (ohne Null-Kalibrator) verschiedener Konzentrationen, die möglichst äquidistant über den oben genannten Kalibrationsbereich verteilt sein sollten, ist erforderlich, um Messwerte zu erhalten, die in Art und Menge (30 Bestimmungen) eine sichere Beurteilung der Linearität erlauben. Da insbesondere beim Fehlen deuterierter Standards die Probenmatrix einen erheblichen Einfluss auf die Kalibrationsfunktion haben kann, ist es erforderlich die Linearitätsexperimente mit aufgestockten, matrixbasierten Kalibratoren durchzuführen, wobei die hierbei verwendete Matrix der Matrix der später zu analysierenden Proben möglichst ähnlich sein sollte. Zur statistischen Überprüfung der Linearität sind in der Literatur eine Reihe von Verfahren beschrieben. Das Programm VALISTAT (<http://www.pts-gtfch.de/ben/b513.htm>) verwendet hierfür den Linearitätstest nach Mandel, der allerdings die Homogenität der Varianzen über den Kalibrationsbereich voraussetzt. Diese Bedingung ist jedoch in der Regel nur für Kalibrationsbereiche erfüllt, die nicht

mehr als eine Zehnerpotenz umfassen. Im Fall der Varianzeninhomogenität muss auf andere statistische Verfahren ausgewichen werden. Grundsätzlich muss beachtet werden, dass bei sehr präzisen Bestimmungsmethoden eine statistisch signifikante Abweichung von einem linearen Kalibrationsmodell nicht notwendigerweise auch von praktischer Relevanz ist. Letztere kann im Zweifel über die Daten für Präzision und Richtigkeit beurteilt werden. Liegen diese bei Annahme eines linearen Modells innerhalb der Akzeptanzgrenzen, können geringe Abweichung vom linearen Modell vernachlässigt werden.

Von besonderer Wichtigkeit im Hinblick auf die spätere Verwendung einer Ein-Punkt-Kalibration ist die Überprüfung des y-Achsenabschnitts, da eine Ein-Punkt-Kalibration nur bei einem Durchgang der Kalibrationsgeraden durch den Nullpunkt möglich ist. Allerdings gilt auch hier, dass bei sehr präzisen Methoden eine statistisch signifikante Abweichung des y-Achsenabschnitts von Null nicht unbedingt von praktischer Relevanz ist. Auch hier sind die Erfüllung der Akzeptanzgrenzen der Daten für Präzision und Richtigkeit entscheidend.

2.3. Präzision und Richtigkeit

Die Auswertung von Präzisions- und Richtigkeitsdaten bei zwei Konzentrationen entsprechend den Unter- und Obergrenzen des therapeutischen Bereichs erlaubt die Abschätzung der Leistungsfähigkeit der Methode über den gesamten therapeutischen Bereich hinweg. Durch die Herstellung einer ausreichend großen Charge von Kontrollproben bei jeder der beiden Konzentrationen können Präzision und Richtigkeit durch wiederholte Analyse des gleichen Probenmaterials erfolgen.

Durch das Versuchsdesign von Doppelbestimmungen an acht verschiedenen Tagen wird eine ausreichende Menge von Daten für eine statistische Auswertung erhoben. Außerdem erlaubt es eine getrennte Abschätzung der Wiederhol- und der Laborpräzision (Zwischenpräzision) aus dem gleichen Datensatz mit Hilfe einer Varianzanalyse (z.B. mit VALISTAT).

Die Vollkalibration (mit Einzelmessungen pro Kalibrator) an jedem der acht Tage ist aus mehreren Gründen sinnvoll. Erstens sollte eine Richtigkeitsabschätzung nicht auf einer einzigen Kalibration beruhen. Zweitens kann aus den Kalibratoren der Vollkalibration der optimale Ein-Punkt-Kalibrator ausgewählt werden. Drittens kann bei Nichterfüllung der Akzeptanzgrenzen bei Berechnung über Ein-Punkt-Kalibration eine erneute Berechnung aus den bereits vorhandenen Daten über die Vollkalibrationen erfolgen. Dadurch kann überprüft werden, ob das Problem lediglich auf der Ein-Punkt-Kalibration beruht und durch eine Vollkalibration behoben werden kann, oder ob es sich um ein grundsätzlich methodisches Problem handelt.

Als Akzeptanzkriterium wurde festgelegt, dass das 99%-Konfidenzintervall des gemessenen Wertes (Mittelwert \pm dreifache Laborpräzision) vollständig innerhalb eines Intervalls von $\pm 50\%$ des entsprechenden Sollwerts liegen muss. Die Erfüllbarkeit dieses Kriteriums wurde von mehreren Mitgliedern des Arbeitskreises Klinische Toxikologie durch exemplarische Validierung ihrer Verfahren zur Bestimmung von Midazolam, dem Analyten mit niedrigster Messbereichsgrenze, gezeigt. In der Praxis bedeutet das Akzeptanzkriterium, dass eine Konzentration im untersten therapeutischen Bereich von einer Konzentration unterhalb der Messbereichsgrenze mit einer 99%-igen Wahrscheinlichkeit unterschieden werden kann.

3. Literatur

- [1] Hallbach J, von Meyer L, Maurer HH (2002) Empfehlungen des Arbeitskreises Klinische Toxikologie der Gesellschaft für Toxikologische und Forensische Chemie (GTFCh) für die toxikologische Analytik im Rahmen der Hirntod-Feststellung. *Toxichem.Krimtech.* 69:124-127 (http://www.gtfch.org/tk/tk69_3/Hallbach.pdf)
- [2] Peters FT, Maurer HH (2002) Bioanalytical method validation and its implications for forensic and clinical toxicology - A review. *Accred.Qual.Assur.* 7:441-449