

Blindproben in der Verfahrensvalidierung

**Ergänzung zum Eurachem-Leitfaden
Die Eignung von Analyseverfahren**

**Erste deutsche Ausgabe 2021
Übersetzung der englischen Originalausgabe
2019**

Blindproben in der Verfahrensvalidierung Ergänzung zum Eurachem-Leitfaden Die Eignung von Analysenverfahren Erste deutsche Ausgabe 2021 Übersetzung der englischen Originalausgabe von 2019

Danksagung

Dieses Dokument ist von Mitgliedern der Eurachem Working Group Method Validation erarbeitet worden.

Aufgeführt sind hier diejenigen, die zu dieser Ergänzung beigetragen haben.

Projektgruppe

Vicki Barwick	LGC (UK)
Burçu Biniçi	UME (TR)
Helen Cantwell (Redakteur)	The State Laboratory (IRL)
John Clancy	Henkel Ireland (IRL)
Pieter Dehouck	Europäische Kommission (EU)
Elin L. F. Gjengedal	Norwegian University of Life Sciences (NO)
Emanuela Gregori	Istituto Superiore di Sanità (IT)
Anders Karlsson	RISE Research Institute of Sweden (SE)
Guy Lamon	SGS (BE)
Pedro P. Morillas Bravo	Canal de Isabel II (ES)
Ulf Örnemark	Emendo Dokumentgranskning (SE)
Marina Patriarca	Istituto Superiore di Sanità (IT)
Francisco Raposo	CSIC (ES)
Lorens P. Sibbesen (Vorsitzender)	Labquality International (DK)
Isabelle Vercauysse	BELAB (BE)
Perihan Yolci Ömeroglu	Bursa Uludag University (TR)

Übersetzung ins Deutsche

Die Übersetzung erfolgte durch Susanne Stobbe, Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung, Berlin, unter Mitwirkung von Michael Koch, Universität Stuttgart, im Auftrag von EuroLab-D

Zitierempfehlung

Diese Publikation sollte wie folgt zitiert werden*: "H. Cantwell (ed.) Blanks in Method Validation - Supplement to Eurachem Guide The Fitness for Purpose of Analytical Methods, (1st ed. 2019). Bezug über www.eurachem.org."

**Vorbehaltlich der Anforderungen der Zeitschrift*

Blindproben in der Verfahrensvalidierung

Deutsche Übersetzung 2021 der ersten englischen Ausgabe 2019

Copyright © 2019

Das Urheberrecht an diesem Dokument liegt bei den mitwirkenden Autoren. Alle Anfragen bezüglich Wiedergabe und Reproduktion in jedem beliebigen Medium, einschließlich der Übersetzung, sollten an das Eurachem-Sekretariat gerichtet werden.

Inhalt

Vorwort	1
1 Einführung und Anwendungsbereich	3
2 Arten von Blindproben und deren Verwendung in der Verfahrensvalidierung	4
2.1 Kalibrier-Blindprobe	4
2.2 Verfahrens-Blindprobe	4
2.3 Reagenzien-Blindprobe	4
2.4 Lösemittel-Blindprobe	4
2.5 Leerprobe	4
2.6 Herangehensweisen zum Umgang mit Situationen, in denen keine geeignete Leerprobe zur Verfügung steht.	5
Literatur	7

Vorwort

Die Eignung von Analysenverfahren – Ein Leitfaden für Laboratorien zur Verfahrensvalidierung und zu verwandten Themen (2. Ausgabe) wurde 2014 veröffentlicht. Seitdem hat die Arbeitsgruppe Verfahrensvalidierung Bereiche identifiziert, in denen zusätzliche Leitfäden angebracht wären. Diese zusätzliche Anleitung wurde in Form von ergänzenden Dokumenten erstellt. Dieses ergänzende Dokument ist nicht für den isolierten Gebrauch bestimmt; es sollte in Verbindung mit dem Leitfaden verwendet werden.

1 Einführung und Anwendungsbereich

Blindproben sind ein wichtiges Instrument und werden während eines Validierungsprozesses zur Bestimmung der meisten Leistungsmerkmale verwendet (siehe Abschnitt 5.4.1 im Leitfaden [1]). Sie werden auch oft bei jedem Analyselauf während der routinemäßigen Anwendung des Messverfahrens mit einbezogen. Es gibt viele verschiedene Arten von Blindproben; bei der Erstellung des Validierungsplans muss der Analytiker berücksichtigen, welche Blindproben aufzunehmen sind. Ziel dieses Dokuments ist es, die verschiedenen Arten von Blindproben, die bei der Verfahrensvalidierung verwendet werden können, zu beschreiben und Anleitung für Situationen zu geben, in denen es schwierig sein kann, eine geeignete Blindprobenmatrix zu erhalten. Nicht alle in diesem Dokument behandelten Blindproben sind für jede Validierung notwendig; Blindproben, die während der routinemäßigen Anwendung des Verfahrens verwendet werden, z. B. zur Grundlinienkorrektur, fallen nicht in den Anwendungsbereich dieses Dokuments. Es ist anzumerken, dass bestimmte Techniken, wie z. B. die Chromatographie, darauf angewiesen sind, einen Peak oberhalb des Rauschens nachzuweisen. Für die Ermittlung bestimmter Leistungsmerkmale, wie z. B. der Nachweisgrenze und der Bestimmungsgrenze, ist es daher notwendig, anstatt einer Blindprobe eine Probe zu verwenden, die einen niedrigen Analytengehalt aufweist. Weitere Anleitung hierzu finden Sie im Leitfaden in Abschnitt 6.2.2. Abbildung 1 zeigt die verschiedenen Arten von Blindproben, die nach ihrem allgemeinen vorgesehenen Verwendungszweck (Kalibrierblindproben, Verfahrensblindproben) und nach ihrer Zusammensetzung (Reagenzien-, Lösemittel- und Leerproben) klassifiziert sind, zusammen mit ihren Einsatzmöglichkeiten bei der Verfahrensvalidierung. Diese werden in den folgenden Abschnitten erläutert.

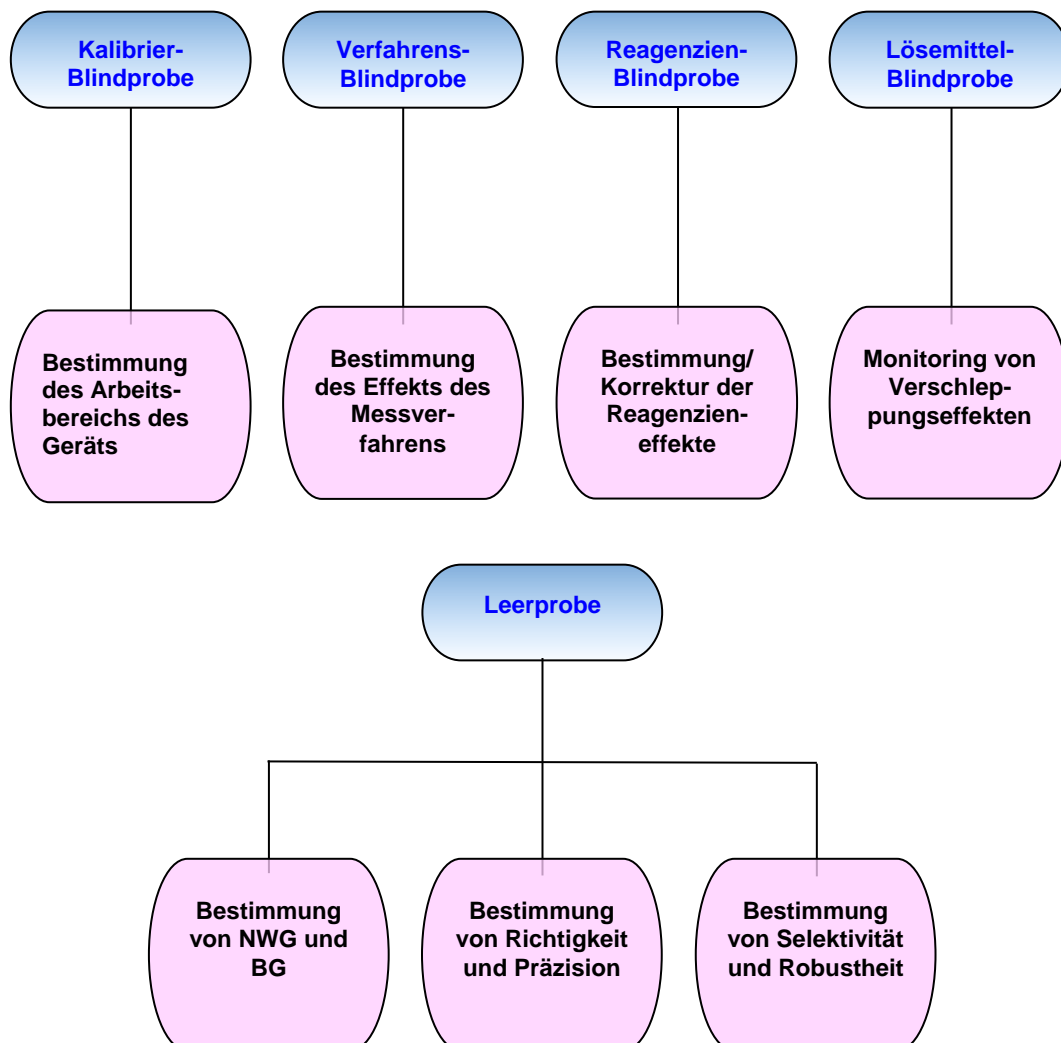


Abbildung 1 – Arten von Blindproben und deren Verwendung in der Verfahrensvalidierung

2 Arten von Blindproben und deren Verwendung in der Verfahrensvalidierung

2.1 Kalibrier-Blindprobe

Abschnitt 6.3 des Leitfadens behandelt das Leistungsmerkmal Arbeitsbereich. Bei der Bestimmung des Arbeitsbereichs des Gerätes (d.h. des Konzentrationsbereichs in vorbereiteten Proben, die dem Gerät zur Messung zugeführt werden können) ist es notwendig, eine Kalibrier-Blindprobe sowie die Kalibrierstandards vorzubereiten und zu messen. Eine Kalibrier-Blindprobe ist ein Kalibriernormal, das den/die interessierenden Analyten nicht auf nachweisbarem Niveau enthält. Es ist notwendig, jedes Signal zu bestimmen, das am Detektor erzeugt werden könnte, das nicht auf die Anwesenheit des/der Analyt(en) zurückzuführen ist (dieses Signal wird als Blindwertsignal bezeichnet). Bei der Bestimmung des Arbeitsbereichs des Verfahrens ist es notwendig, Referenzmaterialien oder aufgestockte Proben zu verwenden, die das gesamte Messverfahren durchlaufen haben. In diesem Fall sollte die verwendete Blindprobe eine Leerprobe sein, siehe Abschnitt 2.5.

2.2 Verfahrens-Blindprobe

Eine Verfahrens-Blindprobe ist eine Probe, die keine Matrix enthält, aber das gesamte Messverfahren durchläuft und wie eine Prüfprobe [2] analysiert wird. Bei der Vorbereitung von Verfahrens-Blindproben wird anstelle der Matrix häufig Wasser verwendet. Verfahrens-Blindproben können verwendet werden, um Verunreinigungen oder Störungen zu bewerten, die beispielsweise durch Reagenzien oder Probenröhrchen verursacht oder in einem beliebigen Teil des Messverfahrens eingebracht werden.

2.3 Reagenzien-Blindprobe

Eine Reagenzien-Blindprobe ist eine Mischung aus einem beliebigen Lösemittel und/oder Reagenz, die dem Detektor zur Analyse einer Prüfprobe zugeführt wird und die analysiert wird, um zu ermitteln, ob sie zum Messsignal beiträgt. Reagenzien-Blindproben werden oft bei Techniken wie der Spektrophotometrie verwendet, um das Gerät vor der Messung von Prüfproben und anderen Blindproben auf Null zu setzen. Eine Reagenzien-Blindprobe sollte

auch dann einbezogen werden, wenn eine Reaktion (Derivatisierung, Komplexierung usw.) mit dem Analyten in den Prüfproben vor der Analyse notwendig ist. Die Reagenzien-Blindprobe kann zur Ermittlung jeglicher durch das Reaktionsverfahren verursachten Störungen verwendet werden und sollte sowohl in den Validierungsprozess als auch während der Routineanwendung des Verfahrens einbezogen werden. Eine Reagenzien-Blindprobe enthält keine Matrix.

2.4 Lösemittel-Blindprobe

Eine Lösemittel-Blindprobe besteht aus dem/den Lösemittel(n), das/die in der dem Gerät zugeführten Lösung enthalten ist/sind. Sie kann während der Validierung eingesetzt werden, um jegliche Störungen, die im Lösemittel vorhanden sein können, zu bewerten. Die Analyse von Lösemittel-Blindproben direkt nach Kalibriernormalen, Referenzmaterialien oder aufgestockten Blindproben kann dazu verwendet werden nachzuweisen, ob es zu einer Verschleppung von einer Probe zur nächsten kommt. Sie werden häufig in chromatographischen Verfahren eingesetzt.

2.5 Leerprobe

Der Leitfaden stellt das Konzept der Leerproben in Abschnitt 5.4.1 vor, wo es heißt:

Dies sind im Wesentlichen Probenmatrices, ohne dass Analyten vorhanden sind, z. B. eine menschliche Urinprobe ohne eine bestimmte Droge oder eine Fleischprobe ohne Hormonrückstände. Es ist möglicherweise schwierig, Leerproben zu erhalten; aber solche Materialien sind notwendig, um Störungen, zu denen es bei der Analyse von Prüfproben kommen könnte, realistisch einzuschätzen.

Leerproben, auch Matrix-Blindproben genannt, können:

- in Experimente zur Bestimmung der Selektivität des Verfahrens einbezogen werden. Die Analyse von Leerproben kann verwendet werden, um festzustellen, ob es Matrixkomponenten gibt, die die Eignung der Prüfmethode zur Messung des interessierenden Analyten stören

könnten [3]. (Die Selektivität wird in Abschnitt 6.1 des Leitfadens behandelt);

- in Experimente zur Schätzung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze des Verfahrens einbezogen werden (für Verfahren, bei denen ein messbares Signal für die Blindprobe erhalten wird, z.B. Atomspektroskopie, siehe Abschnitt 6.2 des Leitfadens);
- in Experimente zur Bestimmung des Arbeitsbereichs des Verfahrens einbezogen werden (siehe Abschnitt 6.3.5 des Leitfadens);
- bei der Herstellung von aufgestockten Proben (wenn keine Referenzmaterialien zur Verfügung stehen) für Experimente zur Schätzung der Richtigkeit, Präzision und Robustheit des Verfahrens verwendet werden (siehe Abschnitte 6.5, 6.6. und 6.8 des Leitfadens);

Leerproben können auch Teil der laufenden internen Qualitätskontrollverfahren sein, die vorhanden sein müssen, um die Gebrauchstauglichkeit des Messverfahrens im Routineeinsatz nachzuweisen,

Es gibt jedoch Situationen, in denen ein Labor keine Leerprobe erhalten kann. Die Analyse von Pestizidrückständen in Lebens- und Futtermitteln beispielsweise erfordert oft den Einsatz von Multi-Analytverfahren, mit denen das Vorhandensein von Hunderten von Analyten geprüft wird. Eine Matrix, die keine messbaren Mengen aller dieser Analyten enthält, ist möglicherweise nicht verfügbar, und Laboratorien müssen möglicherweise eine Matrixprobe verwenden, die geringe Mengen einiger Analyten enthält. Andere Verbindungen sind so weit verbreitet, dass sie in der gesamten Umwelt vorhanden sind und es einfach keine Leerproben-Matrices gibt [4, 5].

In einigen analytischen Anwendungen beeinflussen Matrixkomponenten das Detektorsignal [6, 7, 8]. Um diese Matrixeffekte zu berücksichtigen, wird die Kalibrierkurve in der Regel unter Verwendung der Leerprobe erstellt. Schwierigkeiten entstehen, wenn die Matrix variabel ist - z.B. bei verarbeiteten Lebensmitteln, bei denen sich die Matrixkomponenten von Probe zu Probe unterscheiden.

Eine alternative Herangehensweise kann erforderlich sein, wenn keine Leerprobe vorhanden ist.

2.6 Herangehensweisen zum Umgang mit Situationen, in denen keine geeignete Leerprobe zur Verfügung steht

2.6.1 Blindwertkorrektur

Wir betrachten den im obigen Abschnitt 2.5 genannten Fall des Multi-Analytverfahrens für die Pestizidanalyse. Ein Labor, das die Selektivität des Verfahrens nachweisen möchte, muss dies mit einer Probe tun, die einige Analyten enthält. Das Problem, eine Leerprobe ohne jeglichen Analyten zu erhalten, ist bekannt. Die von einer Akkreditierungsstelle angegebene Beschreibung der Leerprobe ist *die reine (bzw. entsprechende) Matrix oder eine natürliche Probe mit dem geringstmöglichen bekannten Gehalt* [9]. Wenn der Gehalt an Analyten bekannt ist, dann können alle während des Validierungsprozesses durchgeführten Messungen mit dem Gehalt des Analyten in der Probe, die anstelle einer Leerprobe verwendet wird, korrigiert werden. Das Labor muss daher den Analytgehalt in der Probe, die es anstelle einer Leerprobe verwenden möchte, bestimmen, um *eine natürliche Probe mit dem geringstmöglichen bekannten Gehalt* zu erhalten. Die dem Laboratorium zur Verfügung stehenden Optionen schließen ein:

- wiederholte Analyse der Probe, die anstelle einer Leerprobe verwendet werden soll, die zwecks Nachweises der Selektivität in die Versuchsplanung integriert ist; ein Schätzwert für den Analytgehalt in dieser Probe kann dann bestimmt werden;
- ggf. Bestimmung nach dem Standardadditionsverfahren;
- Analyse mit einem alternativen, validierten Verfahren (mit einer niedrigeren Bestimmungsgrenze);
- Analyse mit einem alternativen Verfahren (mit einer niedrigeren Bestimmungsgrenze) in einem anderen Laboratorium.

Unabhängig davon, welche Herangehensweise verwendet wird, muss das Laboratorium sicherstellen, dass diese es dem Labor ermöglicht, die Eignung des Verfahrens für den beabsichtigten Zweck nachzuweisen.

2.6.2 Verwendung von Korrekturfaktoren für Kalibrierkurven

In Fällen, in denen Matrix-Leerproben nicht erhältlich sind, wurden Kalibrierkurven verwendet, die mit Verfahrens-Blindproben und nicht mit der Matrix erstellt wurden, gefolgt von der Anwendung eines Korrekturfaktors auf die resultierende Kalibrierkurve. [5]. Die Implementierung dieses Verfahrens erfordert den Nachweis, dass:

- sowohl die matrixfreie als auch die an die Matrix angepasste Kalibrierkurven (Funktionen) linear sind;
- die Beziehung zwischen der matrixangepassten und matrixfreien Kalibrierkurve über einen Zeitraum bzw. einer Reihe von Probeninjektionen konsistent ist [7];

Dann kann ein Korrekturfaktor berechnet und die Analyse anhand von Kalibrierkurven durchgeführt werden, die mit Lösemittel und nicht mit einer Matrix [10] erstellt wurden.

Dieser Korrekturfaktor muss während der routinemäßigen Anwendung des Verfahrens überwacht werden, um sicherzustellen, dass er gültig bleibt.

2.6.3 Simulierte Leerprobe

Ist eine Leerprobe nicht zu erhalten, so kann sie in bestimmten Fällen simuliert werden. Matrices wie Meerwasser eignen sich zur Herstellung einer simulierten Leerprobe durch Auflösen geeigneter Mineralsalze in Wasser [11, 12]. Für die Analyse von Pflanzenmaterial kann aschefreies Filterpapier zur Verwendung als Blindprobe geeignet sein [2].

2.6.4 Alternative Verfahren

Sind die oben genannten Herangehensweisen nicht geeignet, kann es erforderlich sein, dass das Labor das im Verfahren verwendete Kalibrierverfahren erneut prüft und eine alternative Technik wie die der Standardaddition [13] in Betracht zieht.

Der Prozess zur Auswahl einer Leerprobe oder einer geeigneten alternativen Herangehensweise ist in Abbildung 2 dargestellt.

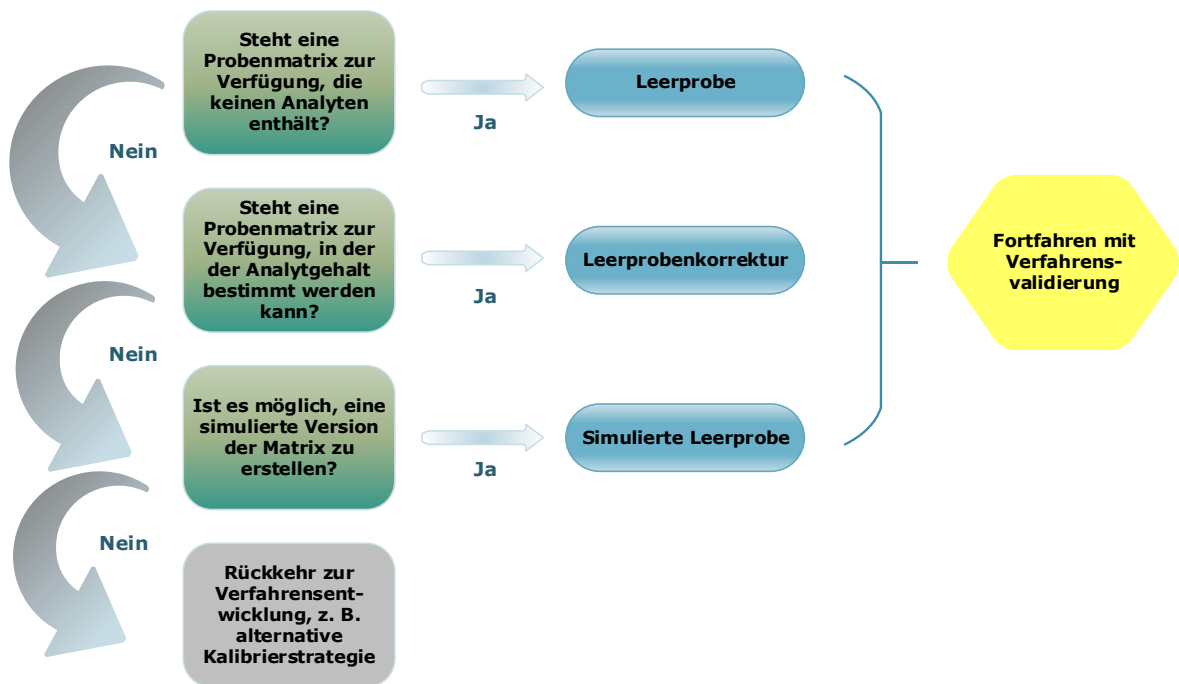


Abbildung 2 – Auswählen einer Leerprobe für die Verfahrensvalidierung

Literatur

Eine Liste aktueller Literaturstellen zum Thema Qualität bei analytischen Messungen finden Sie in der Eurachem-Reading list, die unter der Rubrik *Publications* auf der Eurachem-Website unter www.eurachem.org verfügbar ist.

1. B. Magnusson and U. Örnemark (eds.) Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, (2nd ed. 2014). ISBN 978-91-87461-59-0. Available from www.eurachem.org.
2. IUPAC Analytical Chemistry Division, Compendium of Analytical Nomenclature (The IUPAC 'Orange Book'), 3rd edition. Prepared for publication by J. Inczédy, T. Lengyel, A.M. Ure. Blackwell Science, Ltd., Oxford, UK (1998). http://www.iupac.org/publications/analytical_compendium/
3. Commission Decision of 14 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results, (2002/657/EC)
4. S. Net, A. Delmont, R. Sempéré, A. Paluselli, B. Ouddane, Reliable quantification of phthalates in environmental matrices (air, water, sludge, sediment and soil): A review, *Sci. Total Environ.*, **515-516**, 162-180 (2015).
5. Vavrous, J. Pavloušková, V. Ševčík, K. Vrbík, R. Čabala, Solution for blank and matrix difficulties encountered during phthalate analysis of edible oils by high performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry, *J. Chrom. A*, **1456**, 196-204, (2016).
6. M. J. Gardner and A. M. Gunn, Approaches in GFAAS: direct or standard additions, *Fresenius J. Anal Chem*, **330**, 103-106 (1988).
7. C. F. Poole, Matrix-induced response enhancement in pesticide residue analysis by gas chromatography, *J. Chrom. A*, **1158**, 241-250 (2007).
8. R. B. Hoff, G. Rübensam, L. Jank, F. Barreto, M. C. R. Peralba, T. M. Pizzolato, M. S. Díaz-Cruz and D. Barceló, Analytical quality assurance in veterinary drug residue analysis methods: Matrix effects determination and monitoring for sulfonamides analysis, *Talanta*, **132**, 443-450 (2015).
9. Guide to method validation for quantitative analysis in chemical testing laboratories (ISO 17025), INAB Guide PS15, Issue 4, February 2016. Available from www.inab.ie.
10. F. J. Egea González, M.E. Hernández Torres, E. Almansa López, L. Cuadros-Rodríguez, J. L. Martínez Vidal, Matrix-Effects of vegetable commodities in electron-capture detection applied to pesticide multiresidue analysis, *J. Chrom. A*, **966**, 155-165 (2002).
11. Standard Practice for the Preparation of Substitute Ocean Water. ASTM International. ASTM D1141 – 98 (2013)
12. D. R. Kester, I. W. Duedall, D. N. Connors, D. N. and R. M. Pytkowicz, Preparation of Artificial Seawater, *Limnology & Oceanography*, **12**, 176–179 (1967).
13. S. L. R. Ellison and M. Thompson, Standard additions: myth and reality, *Analyst*, **133**, 992-997 (2008).

