



## Standardarbeitsvorschrift im Rahmen des BMBF Verbundvorhabens

Validierungsstudie zur Prüfung auf Hautpenetration mit Hilfe von  
 biotechnologisch hergestellten Hautmodellen

### Standard Operating Procedure (SOP)

<b>Titel</b> Validierung von Methoden bei der Substanzbestimmung mittels HPLC		<b>Version</b> 04	<b>Dokumentennr.:</b> SOP_AL_VAL_HPLC_TIHO_04	
<b>Erstausgabedatum</b> 15.9.2003		<b>gültig ab</b> 12.01.2004	<b>Ersteller</b> Dr. Frank Niedorf	
			<b>Seite</b> 1	<b>von</b> 16
<b>Ausgabe</b>	<b>gültig ab</b>	<b>Beschreibung der Änderung</b>		
01	15.9.2003	Erste Ausgabe		
02	12.1.2004	Errechnung kritischer Werte und statistische Tabellen zugefügt		
03	07.03.2005	Formale Anpassung der Seite 1		
04	11.02.2008	Redaktionelle Anpassung		
<b>Genehmigung:</b> Prof. Dr. Monika Schäfer-Korting				
<b>Erstellt:</b> Dr. Frank Niedorf		<b>Geprüft:</b> Prof. Dr. Manfred Kietzmann		<b>Genehmigt:</b> Prof. Dr. Monika Schäfer-Korting
<b>Verteiler: BMBF-Partner der Phase 1 und 2</b> Freie Universität Berlin (FU), Tierärztliche Hochschule Hannover (TiHo), Universität des Saarlandes (US), Ludwig-Maximilians-Universität München (LMU), ZEBET Berlin, Across Barriers (ACB), Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik, Fraunhofer (IGB), BASF AG (BASF), Beiersdorf AG (BDF), Cognis Deutschland GmbH & Co.KG (CND)				

<b>Titel</b> Validierung von Methoden bei der Substanzbestimmung mittels HPLC		<b>Version</b> 04	<b>Dokumentennr.:</b> SOP_AL_VAL_HPLC_TIHO_04	
<b>Erstausgabedatum</b> 15.9.2003	<b>gültig ab</b> 12.01.2004	<b>Ersteller</b> Dr. Frank Niedorf		<b>Seite von</b> 2 16

## Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	2
1 Zweck.....	3
2 Einsatzbereich.....	3
3 Gewinnung von Leermatrixproben.....	3
4 Validierungskriterien.....	3
4.1 Selektivität.....	3
4.2 Linearität.....	4
4.3 Nachweis-, Erfassungs- und Quantifikationsgrenze.....	7
4.4 Richtigkeit.....	8
4.5 Präzision / Reproduzierbarkeit.....	9
4.6 Stabilität.....	11
5 Literatur.....	12
6 Anhang: statistische Tabellen.....	14
6.1 R/s-Test nach David et al.....	14
6.2 Neumann-Test.....	15
6.3 Bartlett-Test.....	16

<b>Titel</b> Validierung von Methoden bei der Substanzbestimmung mittels HPLC		<b>Version</b> 04	<b>Dokumentennr.:</b> SOP_AL_VAL_HPLC_TIHO_04	
<b>Erstausgabedatum</b> 15.9.2003	<b>gültig ab</b> 12.01.2004	<b>Ersteller</b> Dr. Frank Niedorf		<b>Seite von</b> 3 16

## 1 Zweck

Diese Standardarbeitsanweisung definiert Anforderungen und beschreibt die Durchführung von Verfahren zur Validierung der Substanzanalytik im Rahmen des BMBF-Verbundprojektes „Validierungsstudie zur Prüfung auf Hautpenetration mit Hilfe von biotechnologisch hergestellten Hautmodellen“.

## 2 Einsatzbereich

Bestimmung der Konzentration von Testsubstanzen in Donor- und Akzeptormedien mittels HPLC.

## 3 Gewinnung von Leermatrixproben

Zur Gewinnung von Leermatrixproben werden Hautproben in Franzzellen eingespannt, die Donor- und Akzeptorkammer mit der Matrix befüllt, die auch bei der Gewinnung der zu messenden Proben benutzt wird und das Akzeptormedium nach 24 Stunden gewonnen. Das Akzeptormedium wird aliquotiert und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

## 4 Validierungskriterien

### 4.1 Selektivität

Die Selektivität ist ein Maß für die Güte einer HPLC-Methode, zwischen zwei Substanzen zu unterscheiden bzw. diese zu trennen. Sie ist durch eine ausreichende Trennung des Analyten von coeluerenden Störpeaks im Chromatogramm an der Retentionszeit des Analyten gekennzeichnet.

<b>Titel</b> Validierung von Methoden bei der Substanzbestimmung mittels HPLC		<b>Version</b> 04	<b>Dokumentennr.:</b> SOP_AL_VAL_HPLC_TIHO_04	
<b>Erstausgabedatum</b> 15.9.2003	<b>gültig ab</b> 12.01.2004	<b>Ersteller</b> Dr. Frank Niedorf		<b>Seite von</b> 4 16

Zur Sicherung der Selektivität ist die Analytik an Leermatrixproben sowie mit ausreichend hohen Konzentrationen dotierten Proben von mindestens n=6 Individuen / Chargen durchzuführen. Die chromatographische Auflösung  $R_S$  zwischen Analyt und eventuell vorhandenen Störpeaks ist wie folgt zu errechnen:

[1]

$$R_S = \frac{t_2 - t_1}{0.85 \cdot (W_{0.5,1} + W_{0.5,2})}$$

$t_1 / t_2$ : Retentionszeit des ersten / zweiten Peaks

$W_{0.5,1} / W_{0.5,2}$ : Peakbreite am Halbmaximum des ersten / zweiten Peaks

Eine ausreichende Trennung ist durch eine Auflösung  $R_S > 1.5$  in allen Leermatrixproben gekennzeichnet (DOLAN, 2000).

## 4.2 Linearität

Zur Überprüfung der Linearität der Methode werden mindestens n=10 Leermatrixproben mit unterschiedlichen Mengen des Analyten dotiert. Diese sind so zu wählen, daß sie den gesamten Messbereich abdecken, äquidistant sind und aus mindestens zwei Wiederholungen pro Stützpunkt bestehen (DIN 38402 A51, 1986). Werte unterhalb der Nachweisgrenze sind nicht zulässig (DIN 32645, 1994). Das Bestimmtheitsmaß der linearen Regression sollte >0.99 sein. Die erhaltenen Rohwerte werden gegen die Konzentration der Kalibratoren aufgetragen und standardmäßig visuell auf Ausreißer und Linearität untersucht (U.S. department of health and human services 1999).

Eine statistische Absicherung der Residuen der linearen Kalibration auf Normalverteilung, Ausreißer und Vorliegen eines Trends (= Unabhängigkeit) ist wünschenswert.

Die Normalverteilung wird mittels des R/s-Tests nach David et al. (1954) geprüft. Dazu ist der Range R sowie die Standardabweichung s beider Messreihen zu ermitteln und die Prüfgröße  $PG_{David}$  als Quotient aus R und s zu bilden:

<b>Titel</b> Validierung von Methoden bei der Substanzbestimmung mittels HPLC		<b>Version</b> 04	<b>Dokumentennr.:</b> SOP_AL_VAL_HPLC_TIHO_04	
<b>Erstausgabedatum</b> 15.9.2003	<b>gültig ab</b> 12.01.2004	<b>Ersteller</b> Dr. Frank Niedorf		<b>Seite von</b> 5 16

[2]

$$PG_{David} = \frac{R}{s}$$

Von einer Normalverteilung der Residuen ist auszugehen, wenn die Prüfgröße zwischen den tabellarischen Werten a und b liegt (s. Anhangstabelle 6.1).

Im zweiten Schritt werden die Daten mittels des Ausreißer-Tests nach Grubbs (1969) untersucht. Dazu wird für jedes Residuum  $X_i$  unter Verwendung des arithmetischen Mittelwertes  $\bar{X}$  und der Standardabweichung  $s$  aller Residuen die Prüfgröße  $PG_{Grubbs}$  wie folgt gebildet:

[3]

$$PG_{Grubbs} = \frac{|X_i - \bar{X}|}{s}$$

Die ermittelten Prüfgrößen werden in absteigender Größe sortiert und die erste mit dem kritischen Wert  $KW_{Grubbs}$  verglichen. Dieser wird wie folgt errechnet:

[4]

$$KW_{Grubbs} = \frac{(n-1)}{n} \cdot \sqrt{\frac{t\left(\frac{\alpha}{2n}, n-2\right)^2}{n-2 + t\left(\frac{\alpha}{2n}, n-2\right)^2}}$$

Dabei entspricht  $\alpha$  der vorzugebenden Fehlerwahrscheinlichkeit (am sinnvollsten 0.05),  $n$  der Anzahl der zu prüfenden Werte und der Term  $t\left(\frac{\alpha}{2n}, n-2\right)$  dem Wert der t-Verteilung bei einseitiger Fragestellung. Dieser kann in Excel wie folgt errechnet werden:

[5]

$$t\left(\frac{\alpha}{2n}, n-2\right) = (TINV((\alpha * 2)/(n * 2); n - 2))^2$$

Ist die Prüfgröße  $PG_{Grubbs}(\max) < KW_{Grubbs}$  liegt kein Ausreißer vor.

<b>Titel</b> Validierung von Methoden bei der Substanzbestimmung mittels HPLC		<b>Version</b> 04	<b>Dokumentennr.:</b> SOP_AL_VAL_HPLC_TIHO_04	
<b>Erstausgabedatum</b> 15.9.2003	<b>gültig ab</b> 12.01.2004	<b>Ersteller</b> Dr. Frank Niedorf		<b>Seite von</b> 6 16

Das Vorliegen eines Trends in den Residuen wird mittels des Neumann-Tests untersucht. Dazu wird die Prüfgröße  $PG_{\text{Neumann}}$  als Quotient aus der Differenzstreuung  $\Delta^2$  und der Varianz  $s^2$  gebildet:

[6]

$$PG_{\text{Neumann}} = \frac{\Delta^2}{s^2} \quad \Delta^2 = \frac{\sum (X_i - X_{i+1})^2}{(n-1)}$$

Das Vorliegen eines Trends ist anzunehmen, wenn die Prüfgröße kleiner als der Wert aus der Anhangstabelle 6.2 zu entnehmende kritische Wert ist.

Bei der Frage nach der günstigsten Kalibrierfunktion können geeignet erscheinende Regressionsmodelle mittels des Fisher-Tests verglichen werden. Dazu werden die Residuen beider zu vergleichender Regressionskurven daraufhin untersucht, ob ein Regressionsmodell deutlich geringere Residuen liefert. Dazu wird die Prüfgröße  $PG_{\text{Fisher}}$  als Quotient der größeren Varianz  $s^2_{\text{max}}$  mit der kleineren Varianz  $s^2_{\text{min}}$  gebildet

[7]

$$PG_{\text{Fisher}} = \frac{s^2_{\text{max}}}{s^2_{\text{min}}}$$

Der kritische Wert  $KW_{\text{Fisher}}$  richtet sich nach der Fehlerwahrscheinlichkeit  $\alpha$  sowie nach den Freiheitsgraden der zu vergleichenden Regressionsmodelle und kann aus statistischen Tabellen abgelesen oder wie folgt in Excel errechnet werden:

[8]

$$KW_{\text{Fisher}} = FINV(\alpha; f_{s^2_{\text{max}}}; f_{s^2_{\text{min}}})$$

Ein Regressionsmodell wird dann als besser bewertet, wenn die Prüfgröße kleiner als der kritische Wert ist. Grundsätzlich sollte das einfachste Regressionsmodell verwendet werden.

<b>Titel</b> Validierung von Methoden bei der Substanzbestimmung mittels HPLC		<b>Version</b> 04	<b>Dokumentennr.:</b> SOP_AL_VAL_HPLC_TIHO_04	
<b>Erstausgabedatum</b> 15.9.2003	<b>gültig ab</b> 12.01.2004	<b>Ersteller</b> Dr. Frank Niedorf		<b>Seite von</b> 7 16

### 4.3 Nachweis-, Erfassungs- und Quantifikationsgrenze

Die Nachweisgrenze (= Detektionsgrenze, limit of detection, LOD) beschreibt die niedrigste Konzentration eines Analyten, die unter den beschriebenen Bedingungen ein vom Leerwert unterscheidbares Instrumentensignal ergibt. Sie kann auf zweierlei Weise bestimmt werden.

**a) Leerwertmethode** (U.S. department of health and human services 1999)

Bei dieser Methode werden wird das Instrumentensignal an mindestens n=10 Leermatrixproben erfasst. Die Nachweisgrenze errechnet sich aus Mittelwert  $\bar{X}$  und Standardabweichung s der Messreihe wie folgt:

[9]  

$$LOD = \bar{X} + 3 \cdot s$$

**b) Kalibrationskurvenmethode** (nach DIN 32645)

Bei dieser Methode wird aus den Residuen der linearen Regression zunächst die Reststandardabweichung  $s_{x0}$  aus der Summe der Abweichungsquadrate  $Q_x$  und den Freiheitsgraden der linearen Kalibration f errechnet:

[10]  

$$s_{x0} = \sqrt{\frac{Q_x}{f}}$$

Mit Hilfe dieser Standardabweichung  $s_{x0}$  und dem Mittelwert  $\bar{X}$  aller Kalibrationskonzentrationen kann, unter Annahme der t-Verteilung für eine vorgegebene Fehlerwahrscheinlichkeit  $\alpha$  (in der Regel 0.05), das (1- $\alpha$ )-Konfidenzintervall (Vertrauensbereich VB) für den Merkmalswert Null errechnet werden:

[11]  

$$VB_0 = s_{x0} \cdot t_{f,\alpha} \cdot \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{\bar{X}^2}{Q_x} + 1}$$

Der Term  $t_{f,\alpha}$  kann aus statistischen Tabellen entnommen oder wie folgt in Excel errechnet werden:

<b>Titel</b> Validierung von Methoden bei der Substanzbestimmung mittels HPLC		<b>Version</b> 04	<b>Dokumentennr.:</b> SOP_AL_VAL_HPLC_TIHO_04	
<b>Erstausgabedatum</b> 15.9.2003	<b>gültig ab</b> 12.01.2004	<b>Ersteller</b> Dr. Frank Niedorf		<b>Seite von</b> 8 16

[12]

$$t_{f,\alpha} = TINV(\alpha, f)$$

Mit Hilfe der Steigung  $a$  der linearen Regressionsgeraden kann die Nachweisgrenze mit einer Fehlerwahrscheinlichkeit von  $\alpha$  wie folgt errechnet werden:

[13]

$$NG = \frac{VB_0}{\alpha}$$

Während man den  $\alpha$ -Fehler (= Nachweis, obwohl kein Analyt vorhanden ist) frei festlegen kann, ist der  $\beta$ -Fehler (= kein Nachweis, obwohl ein Analyt vorhanden ist) unbekannt. Zur Verminderung des  $\beta$ -Fehlers wurde die Erfassungsgrenze eingeführt. Sie gibt die Konzentration des Analyten an, bei welcher die Methode in  $(1-\beta) \cdot 100$  % aller Fälle unterschiedliche Messwerte wie ein Leerwert ergibt. Der  $\beta$ -Fehler sollte in der Regel dem  $\alpha$ -Fehler entsprechen ( $\alpha = \beta$ ), mindestens aber 0.05 betragen. Die Erfassungsgrenze EG errechnet sich als:

[14]

$$EG = 2 \cdot NG$$

Die Bestimmungsgrenze BG (=Quantifikationsgrenze) errechnet sich näherungsweise als:

[15]

$$BG \approx 3 \cdot NG$$

Für Standards im Bereich der Bestimmungsgrenze gelten die unter Richtigkeit und Präzision behandelten Anforderungen.

## 4.4 Richtigkeit

Die Richtigkeit beurteilt die Übereinstimmung zwischen einem mittleren Messergebnis und dem erwarteten Referenzwert. Zur Überprüfung der Richtigkeit werden jeweils mindestens  $n=10$  Leermatrixproben mit der höchsten (high quality control standard, HQC), der niedrigsten (low quality control standard, LQC) sowie einer mittleren Kalibrationskonzentration (midrange quality



<b>Titel</b> Validierung von Methoden bei der Substanzbestimmung mittels HPLC		<b>Version</b> 04	<b>Dokumentennr.:</b> SOP_AL_VAL_HPLC_TIHO_04	
<b>Erstausgabedatum</b> 15.9.2003	<b>gültig ab</b> 12.01.2004	<b>Ersteller</b> Dr. Frank Niedorf	<b>Seite</b> 9	<b>von</b> 16

control standard, MQC) des Analyten dotiert und chromatographisch quantifiziert (U.S. department of health and human services 2001).

Die Daten werden wie beschrieben auf Normalverteilung, Ausreißer und Trend untersucht. Sind alle Tests erfüllt, wird der Mittelwert  $\bar{X}$  der gemessenen Werte mit dem erwarteten Wert  $X_{SW}$  mittels des Sollwert-t-Tests verglichen. Dazu wird die Prüfgröße  $PG_{Sollwert-t}$  wie folgt gebildet:

[16]

$$PG_{Sollwert-t} = \frac{|\bar{X} - X_{SW}| \cdot \sqrt{n}}{s}$$

Ist dieser Wert kleiner als der kritische Wert  $t_{f,\alpha}$  (Errechnung gemäß [12]), so liegt auf dem vorgegebenen Signifikanzniveau keine Abweichung des gemessenen vom erwarteten Wert vor (Herbold u. Schmitt, 2000).

Sollten Abweichungen vorliegen, sind diese bis zu einem gewissen Maße akzeptabel. Als Grenzen gelten 15% Abweichung des gemessenen vom erwarteten Wert bei HQCs und MQCs sowie 20% Abweichung bei LQCs (U.S. department of health and human services 2001).

Abschließend kann die Varianzhomogenität zwischen HQCs und LQCs mittels des Fisher-Tests untersucht werden. Ist die nach Gleichung [7] errechnete Prüfgröße kleiner als der nach Gleichung [8] errechnete kritische Wert so sind die Varianzen auf dem Signifikanzniveau von 99% homogen.

## 4.5 Präzision / Reproduzierbarkeit

Die Präzision beschreibt die Übereinstimmung zwischen wiederholten Messungen an Aliquots identischer Proben. Man unterscheidet Wiederholpräzision  $s_w$  (Tagespräzision, intraday / within batch reproducibility), Zwischenpräzision  $s_b$  (interday / between batch reproducibility) und totale Präzision  $s_t$ .

Zur Bestimmung der Präzision werden jeweils 10 HQC, MQC und LQC-Proben an 5 unterschiedlichen Tagen hergestellt und chromatographisch quantifiziert. Alle Messwerte jeder Tagesreihe werden auf Normalverteilung, Ausreißer und Trend untersucht. Die Homogenität der Varianzen wird mittels des Bartlett-Tests untersucht.

<b>Titel</b> Validierung von Methoden bei der Substanzbestimmung mittels HPLC		<b>Version</b> 04	<b>Dokumentennr.:</b> SOP_AL_VAL_HPLC_TIHO_04	
<b>Erstausgabedatum</b> 15.9.2003	<b>gültig ab</b> 12.01.2004	<b>Ersteller</b> Dr. Frank Niedorf		<b>Seite von</b> 10 16

Dazu wird die Prüfgröße  $PG_{\text{Bartlett}}$  aus den Standardabweichungen  $s_i$  und den Freiheitsgraden  $f_i$  (Anzahl der Messungen  $-1$ ) der einzelnen Messreihen wie folgt gebildet:

[17]

$$PG_{\text{Bartlett}} = 2.303 \cdot (G_1 - G_2)$$

[18]

$$G_1 = \sum f_i \cdot \log \left( \frac{\sum f_i \cdot (1000 \cdot s_i)^2}{\sum f_i} \right)$$

[19]

$$G_2 = \sum f_i \cdot \log((1000 \cdot s_i)^2)$$

Ist die Prüfgröße  $PG_{\text{Bartlett}}$  kleiner als der aus Anhangstabelle 6.3 zu entnehmende kritische Wert, sind die Varianzen der Messreihen auf dem vorgegebenen Signifikanzniveau homogen.

Wenn alle Messreihen die Tests bestanden haben, können oben erwähnte Präzisionen wie folgt berechnet werden (Herbold u. Schmitt, 2000):

[20]

$$s_w = \sqrt{\frac{\sum (f_{\text{Tagesserie}} \cdot s_{\text{Tagesserie}}^2)}{\sum f_{\text{Tagesserie}}}}$$

[21]

$$s_b = \sqrt{\frac{\sum (\bar{X}_{\text{Tagesserie}} - \bar{X}_{\text{gesamt}})^2}{f_{\text{Tagesserie}}}}$$

[22]

$$s_t = \sqrt{\frac{f_{\text{Tagesserie}} \cdot s_b^2 + \sum f_{\text{Tagesserie}} \cdot s_w^2}{f_{\text{Tagesserie}} + \sum f_{\text{Tagesserie}}}}$$

Relativ zum gemessenen Mittelwert dürfen die Präzisionen nicht mehr als 10% bei HQC's und MQC's bzw. nicht mehr als 20% bei LQC's abweichen (Lindner u. Wainer 1998).

<b>Titel</b> Validierung von Methoden bei der Substanzbestimmung mittels HPLC		<b>Version</b> 04	<b>Dokumentennr.:</b> SOP_AL_VAL_HPLC_TIHO_04	
<b>Erstausgabedatum</b> 15.9.2003	<b>gültig ab</b> 12.01.2004	<b>Ersteller</b> Dr. Frank Niedorf		<b>Seite von</b> 11 16

## 4.6 Stabilität

Die Stabilität des Analyten ist für jede Testsubstanz während des gesamten Zeitraumes des Versuches, der Lagerung sowie der Analyse zu gewährleisten.

Zur Ermittlung der Stabilität sind jeweils 6 HQCs und LQCs durch Dotierung von Leermatrixproben herzustellen. Jeder QC wird in drei Aliquots aufgeteilt.

Ein Aliquot jeder Probe wird direkt nach Herstellung mittels HPLC quantifiziert, ein zweites nach 24 Stunden Inkubation bei 37°C. Die bei den einzelnen Proben ermittelten Instrumentensignale werden wie beschrieben auf Normalverteilung, Ausreißer, Trend und Varianzhomogenität (F-Test) untersucht. Die Mittelwerte beider Messreihen werden mit dem T-Test bei einseitiger Fragestellung verglichen. Dazu werden von beiden Messreihen die Mittelwerte ( $\bar{X}_1$  und  $\bar{X}_2$ ), die Standardabweichungen ( $s_1$  und  $s_2$ ), die Anzahl der Messungen  $n_1$  und  $n_2$  und die Freiheitsgrade  $f_1$  und  $f_2$  bestimmt. Die Prüfgröße  $PG_T$  kann dann wie folgt errechnet werden:

[23]

$$PG_T = \frac{|\bar{X}_1 - \bar{X}_2|}{\sqrt{\frac{s_1^2 \cdot f_1 + s_2^2 \cdot f_2}{f_1 + f_2}}} \cdot \sqrt{\frac{n_1 \cdot n_2}{n_1 + n_2}}$$

Der kritische Wert  $KW_t$  kann aus statistischen Tabellen entnommen oder wie folgt in Excel errechnet werden:

[24]

$$KW_t = TINV(\alpha * 2; f_1 + f_2)$$

Ist die Prüfgröße kleiner als der kritische Wert, liegen zwischen den Mittelwerten beider Messreihen mit einer Fehlerwahrscheinlichkeit von 0,01 keine Unterschiede vor. Das dritte Aliquot wird unter denselben Lagerungsbedingungen und für einen Zeitraum, welcher der

<b>Titel</b> Validierung von Methoden bei der Substanzbestimmung mittels HPLC		<b>Version</b> 04	<b>Dokumentennr.:</b> SOP_AL_VAL_HPLC_TIHO_04	
<b>Erstausgabedatum</b> 15.9.2003	<b>gültig ab</b> 12.01.2004	<b>Ersteller</b> Dr. Frank Niedorf		<b>Seite von</b> 12 16

maximalen Lagerungsdauer später zu messender Proben entspricht, aufbewahrt. Anschließend werden die Proben mittels HPLC quantifiziert und die Instrumentensignale mit denen des ersten Aliquots verglichen. Dazu dient oben beschriebenes Verfahren.

Der Analyt gilt als stabil, wenn sich bei den Tests keine statistisch signifikanten Unterschiede zeigen, oder wenn ein statistisch signifikanter Abfall der Instrumentensignale innerhalb der Grenzen der Interday-Reproduzierbarkeit liegt.

## 5 Literatur

Bartlett, M. S. (1937)

Properties of sufficiency and statistical tests.

Proc Roy Stat Soc Series A 160, 268–282

David H., Hartley H., Pearson E. (1954)

The distribution of the ratio, in a single normal sample, of range to standard deviation.

Biometrika 41, 482-493

DIN 32645 (1994)

Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze.

Beuth Verlag, Berlin

Dolan, J.W. (2000)

Starting out right, part II – measuring satisfaction.

LCGC Europe Feb 2000, 72-76

Lindner, W., Wainer, I.W. (1998)

Requirements for initial assay validation and publication in J. Chromatography B

J. Chrom B 707, 1-2

<b>Titel</b> Validierung von Methoden bei der Substanzbestimmung mittels HPLC		<b>Version</b> 04	<b>Dokumentennr.:</b> SOP_AL_VAL_HPLC_TIHO_04	
<b>Erstausgabedatum</b> 15.9.2003	<b>gültig ab</b> 12.01.2004	<b>Ersteller</b> Dr. Frank Niedorf		<b>Seite von</b> 13 16

Grubbs, F. (1969)

Procedures for detecting outlying observations in samples.

Technometrics 11, 1-21

Herbold, M., Schmitt, G. (2000)

Validierung von Analysenverfahren – Theorie und Praxis.

GTFCh-Weiterbildung Kirkel 2000

U.S. department of health and human services (1999)

Guidance for industry # 64 – Validation of analytical procedures: methodology

<http://www.fda.gov/cvm/guidance/guida64.pdf>

U.S. department of health and human services, food and drug administration, center of drug administration and research, center for veterinary medicine (2001)

Guidance for industry – bioanalytical method validation

<http://www.fda.gov/cder/guidance/4252fnl.pdf>

<b>Titel</b> Validierung von Methoden bei der Substanzbestimmung mittels HPLC		<b>Version</b> 04	<b>Dokumentennr.:</b> SOP_AL_VAL_HPLC_TIHO_04	
<b>Erstausgabedatum</b> 15.9.2003	<b>gültig ab</b> 12.01.2004	<b>Ersteller</b> Dr. Frank Niedorf		<b>Seite von</b> 14 16

## 6 Anhang: statistische Tabellen

### 6.1 R/s-Test nach David et al.

n	$\alpha = 0.01$		$\alpha = 0.05$		$\alpha = 0.1$	
	a	b	a	b	a	b
3	1.737	2.000	1.758	1.999	1.782	1.997
4	1.870	2.445	1.980	2.429	2.040	2.409
5	2.020	2.803	2.150	2.753	2.220	2.712
6	2.150	3.095	2.280	3.012	2.370	2.949
7	2.260	3.338	2.400	3.222	2.490	3.143
8	2.350	3.543	2.500	3.399	2.590	3.308
9	2.440	3.720	2.590	3.552	2.680	3.449
10	2.510	3.875	2.670	3.685	2.760	3.570
11	2.580	4.010	2.740	3.800	2.840	3.680
12	2.640	4.134	2.800	3.910	2.900	3.780
13	2.700	4.244	2.860	4.000	2.960	3.870
14	2.750	4.340	2.920	4.090	3.020	3.950
15	2.800	4.440	2.970	4.170	3.070	4.020
16	2.840	4.520	3.010	4.240	3.120	4.090
17	2.880	4.600	3.060	4.310	3.170	4.150
18	2.920	4.670	3.100	4.370	3.210	4.210
19	2.960	4.740	3.140	4.430	3.250	4.270
20	2.990	4.800	3.180	4.490	3.290	4.320

<b>Titel</b> Validierung von Methoden bei der Substanzbestimmung mittels HPLC		<b>Version</b> 04	<b>Dokumentennr.:</b> SOP_AL_VAL_HPLC_TIHO_04	
<b>Erstausgabedatum</b> 15.9.2003	<b>gültig ab</b> 12.01.2004	<b>Ersteller</b> Dr. Frank Niedorf		<b>Seite von</b> 15 16

## 6.2 Neumann-Test

<b>n</b>	<b><math>\alpha = 0.01</math></b>	<b><math>\alpha = 0.05</math></b>
4	0.6252	0.78
5	0.5379	0.82
6	0.5600	0.89
7	0.6100	0.94
8	0.6628	0.98
9	0.7058	1.02
10	0.7518	1.06
11	0.7915	1.1
12	0.8260	1.13
13	0.8618	1.16
14	0.8931	1.18
15	0.9221	1.2
16	0.9491	1.22
17	0.9743	1.24
18	0.9979	1.26
19	1.0199	1.28
20	1.0406	1.29

<b>Titel</b> Validierung von Methoden bei der Substanzbestimmung mittels HPLC		<b>Version</b> 04	<b>Dokumentennr.:</b> SOP_AL_VAL_HPLC_TIHO_04	
<b>Erstausgabedatum</b> 15.9.2003	<b>gültig ab</b> 12.01.2004	<b>Ersteller</b> Dr. Frank Niedorf		<b>Seite von</b> 16 16

### 6.3 Bartlett-Test

<b>f</b>	<b><math>\alpha = 0.01</math></b>	<b><math>\alpha = 0.05</math></b>
2	9.21	5.99
3	11.34	7.81
4	13.28	9.49
5	15.09	11.07
6	16.81	12.59
7	18.48	14.07
8	20.09	15.51
9	21.67	16.92
10	23.21	18.31