

Aus dem Arbeitskreis Qualitätskontrolle

Anlage zu den Richtlinien der GTFCh zur Qualitätssicherung bei forensisch-toxikologischen Untersuchungen

Anhang C: Anforderungen an die Durchführung von Analysen.

1. Validierung

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

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

Gemäß Punkt C.1. der "Richtlinien der GTFCh zur Qualitätssicherung bei forensisch-toxikologischen Untersuchungen"¹ müssen Laboratorien Gewähr dafür bieten, dass Analysen nach dem aktuellen und anerkannten Stand der Analysetechnik ausgeführt werden. Im selben Dokument wird unter Punkt C.2. die Validierung analytischer Methoden und die Dokumentation des Ergebnisses der Validierung vorgeschrieben. Dies impliziert, dass auch die Validierung analytischer Methoden sich an dem aktuellen und anerkannten Stand der Wissenschaft orientieren sollte. Im vorliegenden Anhang C werden die Anforderungen an eine Validierung näher spezifiziert. Die enthaltenen Vorgaben orientieren sich am aktuellen wissenschaftlichen Kenntnisstand. Neben den zu bestimmenden Validierungsparametern und ihren jeweiligen Akzeptanzkriterien werden auch statistische Verfahren zur Berechnung der einzelnen Parameter festgelegt.

1. Selektivität (Selectivity)

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

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

Bestimmung in der Praxis:

- Aufarbeitung von mindestens sechs Leerproben aus jeweils verschiedenen Chargen (Leermatrix ohne IS)
- Aufarbeitung von mindestens zwei Nullproben (Leermatrix mit IS)

¹ Toxichem + Krimtech 65 (1):18-24 (1998)

- Aufstockung von Leerproben mit anderen in authentischen Proben zu erwartenden Substanzen/Metaboliten.

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

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

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

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

2.1. Kalibrationsbereich (Range), nach [12]

Der Kalibrationsbereich einer analytischen Methode ist das Intervall zwischen oberer und unterer Konzentration (Menge) des Analyten in der Probe (einschließlich dieser Konzentrationen), für das ein geeignetes Maß an Präzision, Richtigkeit und Linearität gezeigt werden konnte.

Bestimmung in der Praxis:

- Herstellung von Kalibratoren bei mindestens fünf verschiedenen Konzentrationen (möglichst gleichmäßig über den Kalibrationsbereich verteilt) durch Aufstocken von Leermatrix
- sechs Bestimmungen bei jeder Konzentration (Wiederholbedingungen)
- Testen auf Ausreißer mittels Grubbs-Test (Signifikanzniveau: 95%) und ggf. deren Elimination. Insgesamt dürfen nicht mehr als zwei Ausreißer und diese nicht im gleichen Konzentrationsniveau auftreten.
- Test auf Varianzhomogenität mittels F-Test zwischen höchster und niedrigster Konzentration oder mittels Cochran-Test über alle Konzentrationen (Signifikanz: 99%).
- Varianzhomogenität gegeben (Homoskedastizität): einfache lineare Regression; statistischer Test der Anpassung mittels Linearitätstest nach Mandel (Signifikanz: 99%)
- Varianzhomogenität nicht gegeben (Heteroskedastizität): Regelfall für Kalibrationsbereiche, die mehr als eine Zehnerpotenz umfassen: Einschränkung des Kalibrationsbereichs bis Varianzhomogenität besteht.

Alternativ: *Auswahl und statistischer Anpassungstest eines gewichteten Kalibrationsmodells.*

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

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

- Varianzhomogenität der Restvarianzen der beiden Kalibrationsgeraden mittels F-Test (Signifikanz: 99%)

- Regressionsanalyse der Mittelwerte der Meßgrößen von Matrix- und Reinsubstanzkalibration: Sollwert-t-Test (Signifikanz: 99%) für den Achsenabschnitt (Sollwert: 0) und die Steigung (Sollwert: 1) der Regressionsgeraden.

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

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

Bestimmung in der Praxis:

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

3.1. Systematischer Fehler (Bias)

Die Differenz zwischen Meßergebnis und Sollwert.

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

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

\bar{X} Mittelwert aller Bestimmungen
 μ Sollwert

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

3.1.1. Richtigkeit (Trueness), nach [12]

Unter Richtigkeit versteht man den Abstand des Mittelwertes vom Sollwert. Das Ausmaß wird gewöhnlich in Form eines systematischen Fehler (Bias) ausgedrückt.

Zur Bestimmung der Richtigkeit muß eine ausreichend große Anzahl von Meßwerten berücksichtigt werden (z.B. Kontrollwerte aus der Routineanwendung).

3.2. Präzision (Precision), nach [12]

Unter Präzision versteht man den Grad der Streuung der einzelnen Werte um den Mittelwert. Das Maß für die Präzision wird gewöhnlich in Form der „Impräzision“ ausgedrückt und als eine Standardabweichung der Meßergebnisse berechnet. Höhere Impräzision wird durch eine höhere Standardabweichung ausgedrückt.

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

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

Berechnung:

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

- Bestimmung als relative Standardabweichung innerhalb der Tage

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

RSD_r Wiederholpräzision

s_r^2 Wiederholvarianz, zu berechnen nach Anhang I

\bar{X} Mittelwert aller Bestimmungen

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

3.2.2. Laborpräzision

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

3.2.2.1. Tagesverschiedene Laborpräzision (time-different intermediate precision)

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

Berechnung:

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

- Bestimmung als relative Standardabweichung

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

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

s_t^2 Wiederholvarianz, berechnet nach Anhang I

s_r^2 Varianz zwischen den Tagen, berechnet nach Anhang I

\bar{X} Mittelwert aller Bestimmungen

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

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

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

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

Berechnung:

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

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

Die chemische Stabilität eines Analyten in einer gegebenen Matrix unter bestimmten Bedingungen für gegebene Zeitintervalle (z.B. unter Lagerungsbedingungen).

5. Analytische Grenzen

5.1. Nachweisgrenze (Limit of Detection, LOD) nach DIN 32645

Die Nachweisgrenze stellt den kleinsten Analytgehalt dar, der mit einer vorgegebenen Sicherheit (99%)* vom Leerwert unterscheidbar ist. Besitzt eine Probe genau diesen Gehalt des Analyten, so wird in 50% aller Fälle der konkrete Meßwert kleiner sein als die Nachweisgrenze.

* Ausgenommen GC-MS-Bestimmungen entsprechend Anhang A (90%)

5.2. Bestimmungsgrenze (Limit of Quantification, LOQ) nach DIN 32645

Die Bestimmungsgrenze ist der kleinste Gehalt, der mit einer vorgegebenen relativen Ergebnisunsicherheit (33%, Signifikanz: 99%) bestimmt werden kann.

Bestimmung in der Praxis:

- Bestimmung nach DIN 32645 gemäß den „Richtlinien der GTFCh zur Qualitätssicherung bei forensisch-toxikologischen Untersuchungen“

6. Wiederfindungsrate, Extraktionsausbeute

6.1. Wiederfindungsrate (Recovery), frei nach [12]

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

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

Praktische Durchführung:

- Bestimmung von jeweils mindestens sechs Reinsubstanzlösungen und mindestens sechs Extrakten bei hohen und niedrigen Konzentrationen; Angabe der Wiederfindung als Verhältnis der absoluten Signale (Peakflächen) der Extrakten zu denen der Reinsubstanzlösungen in Prozent (incl. Standardabweichung bzw. des 95%-Konfidenzintervalls).
- Bestimmung mittels Regressionsanalyse der absoluten Peakflächen von Extrakten und Reinsubstanzlösungen über den gesamten Meßbereich.

6.2. Extraktionsausbeute (Extraction efficiency)

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

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

Praktische Durchführung:

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

Die Extraktion soll reproduzierbar und mit hohen Wiederfindungsraten bzw. Extraktionsausbeuten, möglichst größer als 50% erfolgen, entsprechend einer Steigung von 0,5 beim Regressionsverfahren. (siehe Anlage zu den Richtlinien der GTFCh zur Qualitätssicherung bei forensisch-toxikologischen Untersuchungen. Anhang A: Anforderung an einzelne Analysemethoden ²⁾)

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

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

Literatur

- [1] Bressolle F, Bromet PM, Audran M (1996) Validation of liquid chromatographic and gas chromatographic methods. Applications to pharmacokinetics. *J.Chromatogr.B* 686:3-10
- [2] Causon R (1997) Validation of chromatographic methods in biomedical analysis. Viewpoint and discussion. *J.Chromatogr.B* 689:175-180
- [3] Dadgar D, Burnett PE (1995) Issues in evaluation of bioanalytical method selectivity and drug stability. *J.Pharm.Biomed.Anal.* 14:23-31
- [4] Dadgar D, Burnett PE, Choc MG, Gallicano K, Hooper JW (1995) Application issues in bioanalytical method validation, sample analysis and data reporting. *J.Pharm.Biomed.Anal.* 13:89-97
- [5] EURACHEM / CITAC. Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement. 2000.
- [6] Hartmann C, Massart DL, McDowall RD (1994) An analysis of the Washington Conference Report on bioanalytical method validation. *J.Pharm.Biomed.Anal.* 12:1337-1343
- [7] Hartmann C, Smeyers-Verbeke J, Massart DL, McDowall RD (1998) Validation of bioanalytical chromatographic methods. *J.Pharm.Biomed.Anal.* 17:193-218
- [8] International Conference on Harmonization (ICH). Validation of Analytical Methods: Definitions and Terminology. ICH Q2 A. 1994.
- [9] International Conference on Harmonization (ICH). Validation of Analytical Methods: Methodology. ICH Q2 B. 1996.

² Toxicchem + Krimtech 67 (1):13-16 (2000)

- [10] International Organization for Standardization (ISO). Accuracy (Trueness and Precision) of Measurement Methods and Results. ISO/DIS 5725-1 to 5725-3. 1994.
- [11] Karnes HT, Shiu G, Shah VP (1991) Validation of bioanalytical methods. *Pharm.Res.* 8:421-426
- [12] Kromidas S (2000) Validierung in der Analytik. Wiley-VCH, Weinheim
- [13] Lindner W, Wainer IW (1998) Requirements for initial assay validation and publication in *J. Chromatography B* [editorial]. *J.Chromatogr.B* 707:1-2
- [14] NCCLS (1999) Evaluation of Precision Performance of Clinical Chemistry Devices; Approved Guideline. NCCLS, Wayne, PA
- [15] Penninckx W, Hartmann C, Massart DL, Smeyers-Verbeke J (1996) Validation of the Calibration Procedure in Atomic Absorption Spectrometric Methods. *J.Anal.At.Spectrom.* 11:237-246
- [16] Peters FT, Maurer HH (2001) Bioanalytical method validation – How, how much and why ? A review. *Toxichem.Krimtech.* 68:116-126 (http://www.gtfc.org/tk/tk68_3/Peters.pdf)
- [17] Peters FT, Maurer HH (2002a) Bioanalytical method validation – How, how much and why ? A review. *TIAFT Bulletin* 32:16-23
- [18] Peters FT, Maurer HH (2002b) Bioanalytical method validation and its implications for forensic and clinical toxicology - A review. *Accred.Qual.Assur.* 7:441-449
- [19] Shah VP, Midha KK, Dighe S, McGilveray IJ, Skelly JP, Yacobi A, Layloff T, Viswanathan CT, Cook CE, McDowall RD, Pittman KA, Spector S (1992) Analytical methods validation: bioavailability, bioequivalence and pharmacokinetic studies. Conference report. *Pharm.Res.* 9:588-592
- [20] Shah VP, Midha KK, Findlay JW, Hill HM, Hulse JD, McGilveray IJ, McKay G, Miller KJ, Patnaik RN, Powell ML, Tonelli A, Viswanathan CT, Yacobi A (2000) Bioanalytical method validation--a revisit with a decade of progress. *Pharm.Res.* 17:1551-1557
- [21] U.S.Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation. <http://www.fda.gov/cder/guidance/index.htm> . 2001.
- [22] Vander-Heyden Y., Nijhuis A, Smeyers-Verbeke J, Vandeginste BG, Massart DL (2001) Guidance for robustness/ruggedness tests in method validation. *J Pharm Biomed Anal* 24:723-753
- [23] Wieling J, Hendriks G, Tamminga WJ, Hempenius J, Mensink CK, Oosterhuis B, Jonkman JH (1996) Rational experimental design for bioanalytical methods validation. Illustration using an assay method for total captopril in plasma. *J.Chromatogr.A* 730:381-394

Inkrafttreten

Diese Anlage wurde gemäß Beschluss des Vorstandes der GTFCh vom 13.11.2004 genehmigt und in Kraft gesetzt.

Anhang

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

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

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

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

1. Wiederholpräzision

- Berechnung der Wiederholvarianz

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

s_r^2 Wiederholvarianz

MS_{wg} Mittleres Abweichungsquadrat innerhalb der Gruppen (Tage)

- Berechnung der Wiederholpräzision aus der Wiederholvarianz

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

RSD_r Wiederholpräzision

s_r^2 Wiederholvarianz

\bar{X} Mittelwert aller Bestimmungen

MS_{wg} Mittleres Abweichungsquadrat innerhalb der Gruppen (Tagen)

2. Tagesverschiedene Laborpräzision

- Berechnung der Varianz zwischen den Tagen

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

s_t^2 Varianz zwischen den Tagen

MS_{bg} Mittleres Abweichungsquadrat zwischen den Gruppen (Tagen)

MS_{wg} Mittleres Abweichungsquadrat innerhalb der Gruppen (Tagen)

n Anzahl der Wiederholbestimmungen pro Tag (für das vorgeschlagene Design gilt $n = 2$)

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

- Berechnung der tagesverschiedenen Laborpräzision

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

$RSD_{(T)}$ tagesverschiedene Laborpräzision

s_t^2 Varianz zwischen den Tagen

s_r^2 Wiederholvarianz

\bar{X} Mittelwert aller Bestimmungen

B. Direkte Berechnung aus den Meßwerten

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

1. Wiederholpräzision

- Berechnung der Wiederholvarianz

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

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

- Berechnung der Wiederholpräzision aus der Wiederholvarianz

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

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

2. Tagesverschiedene Laborpräzision

- Berechnung der Varianz zwischen den Tagen

$$s_t^2 = \frac{\sum_{i=1}^p (\bar{x}_i - \bar{X})^2}{p-1} - \frac{s_r^2}{n}$$

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

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

- Berechnung der tagesverschiedenen Laborpräzision

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

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