



Peakflächenvariationen des Internen Standards (IS)

W. Feser-Zügner

Merz Pharmaceuticals GmbH





Curriculum Vitae

Studium:	Lebensmittelchemie (Würzburg)
Promotion:	1990 – 1993 Institut für Pharmakologie und Toxikologie (Würzburg)
Junior Scientist:	1994 – 1997 Institut für Pharmakokinetik Schering AG, Berlin
Abteilungsleitung:	1997 – 2006 A&M Labor (Bergheim)
Research Scientist:	2007 – 2008 elbion AG (Radebeul)
Seit April 2008:	CRO-Manager Biological Analytics Merz Pharmaceuticals (Frankfurt)



Einleitung

Peakflächenvariationen des IS sind normal.....

- **dafür ist der IS da (Methode IS normiert)**
- **wir verwenden stabil Isotopen markierten IS**

ABER.....



Einleitung

- **Variieren Analyte und IS im gleichen Ausmaß (Peak Area Ratio)?**
- **Deckt die bioanalytische Methodvalidierung (BMV) starke IS Variationen ab?**

Einzelproben mit sehr niedrigem IS: Präzision, Richtigkeit
Analyte Peak Area < LLOQ

Einzelproben mit sehr hohem IS: Linearität?

- **Systematische Unterschiede zwischen Studienproben und Kalibrier-/QC Proben**
- **Sehr starke IS Variationen bei analytischen Batchen;
„normale“ IS Variationen bei BMV**



Regulatorische Anforderungen

- **FDA Guidance for Industry: BMV (2001):**

Recovery of the analyte must not be 100%, but the extent of recovery of an analyte and of the internal standard should be consistent, precise, and reproducible.

- **Crystal City III (2007):**

Validation topics without consensus: Acceptance criteria for internal standards:

No agreement was reached on the inclusion of internal standard criteria or on their magnitude of acceptable internal standard precision.



Regulatorische Anforderungen

- M. F. Skelly, CDER, FDA (EBF Meeting 2008):

..ISTD recovery between spiked and incurred samples ca. 35%...

- Draft EMEA Guideline on BMV (Nov. 2009):

5.4 Reanalysis of study samples

Internal standard response significantly different from the response for the calibration standard and QC samples, if such criteria have been pre-defined in a SOP, ...

- Olivier Le Blaye afssaps (EBF 2009):

..No limit set for maximum variability...



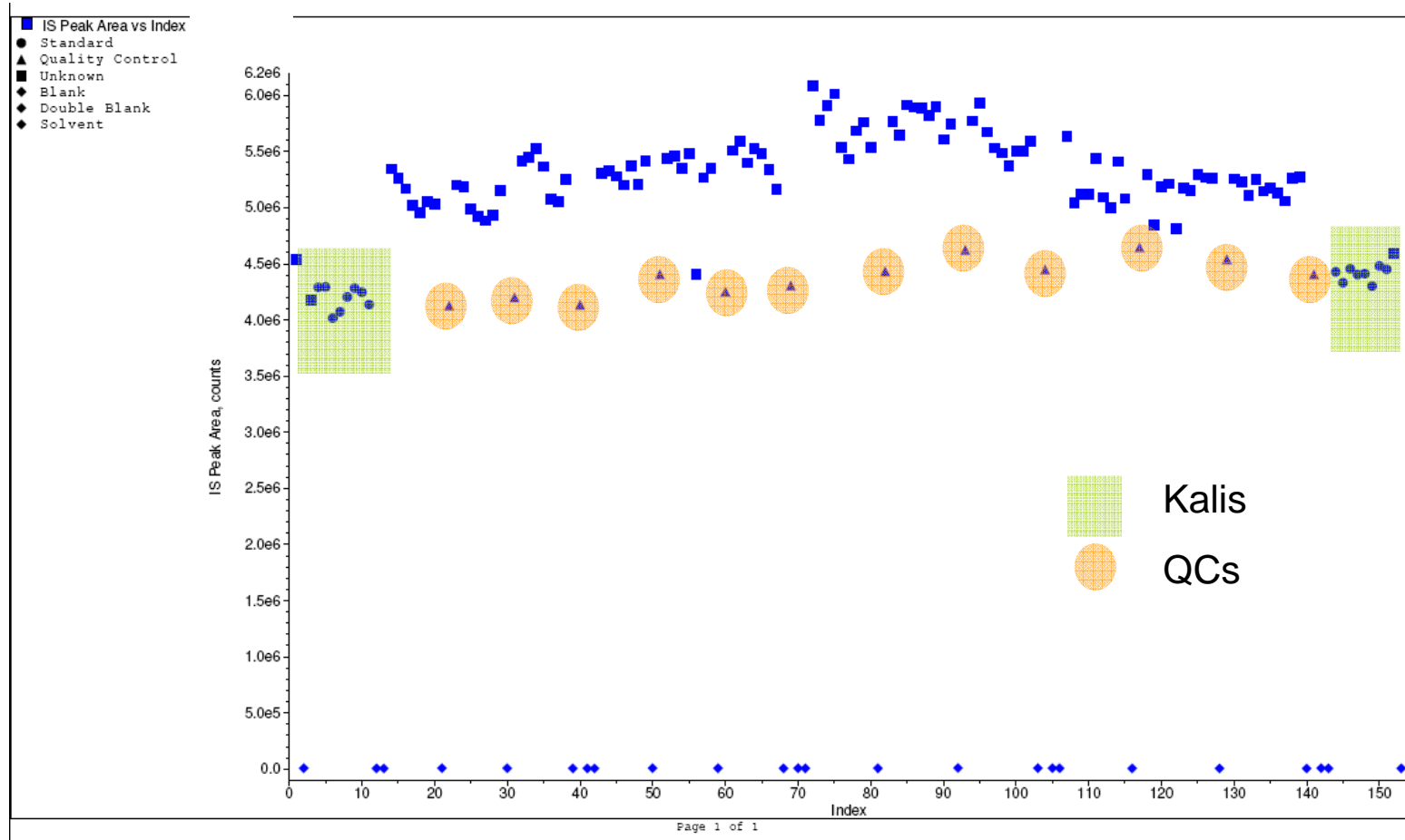
Fallbeispiele

Fall #1-5:

- Li-Hep Plasma
- Verum-Proben: Phase 1 und Phase 3
- Kalis/QC's: gepooltes Plasma von Kaukasiern (Deutschland)
- Methode: Proteinfällung
- Kein stabil-isotopen markierter interner Standard
- Tool: interne Standard Peakflächen Plot von Analyst

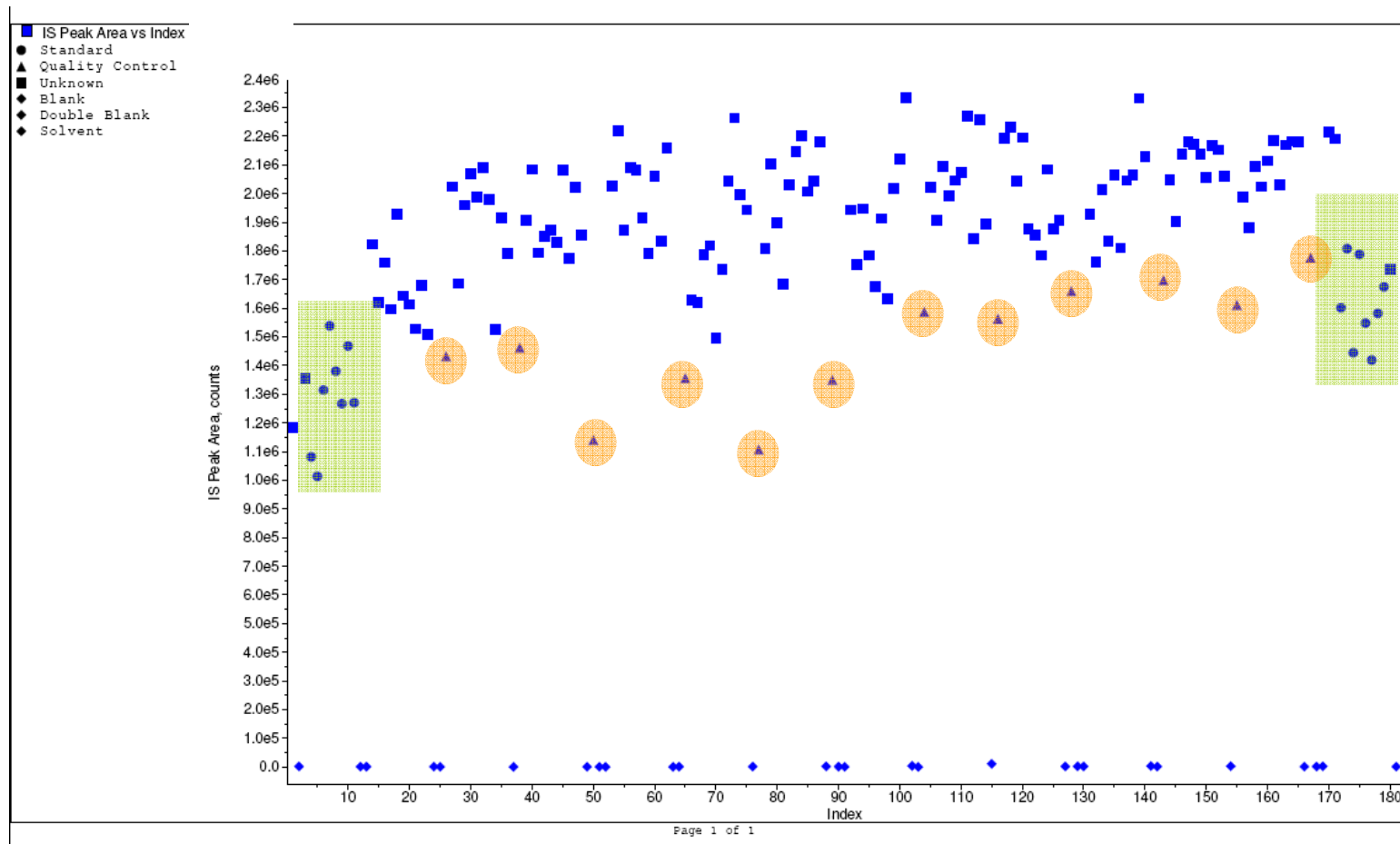


Fall #1: DDI-I



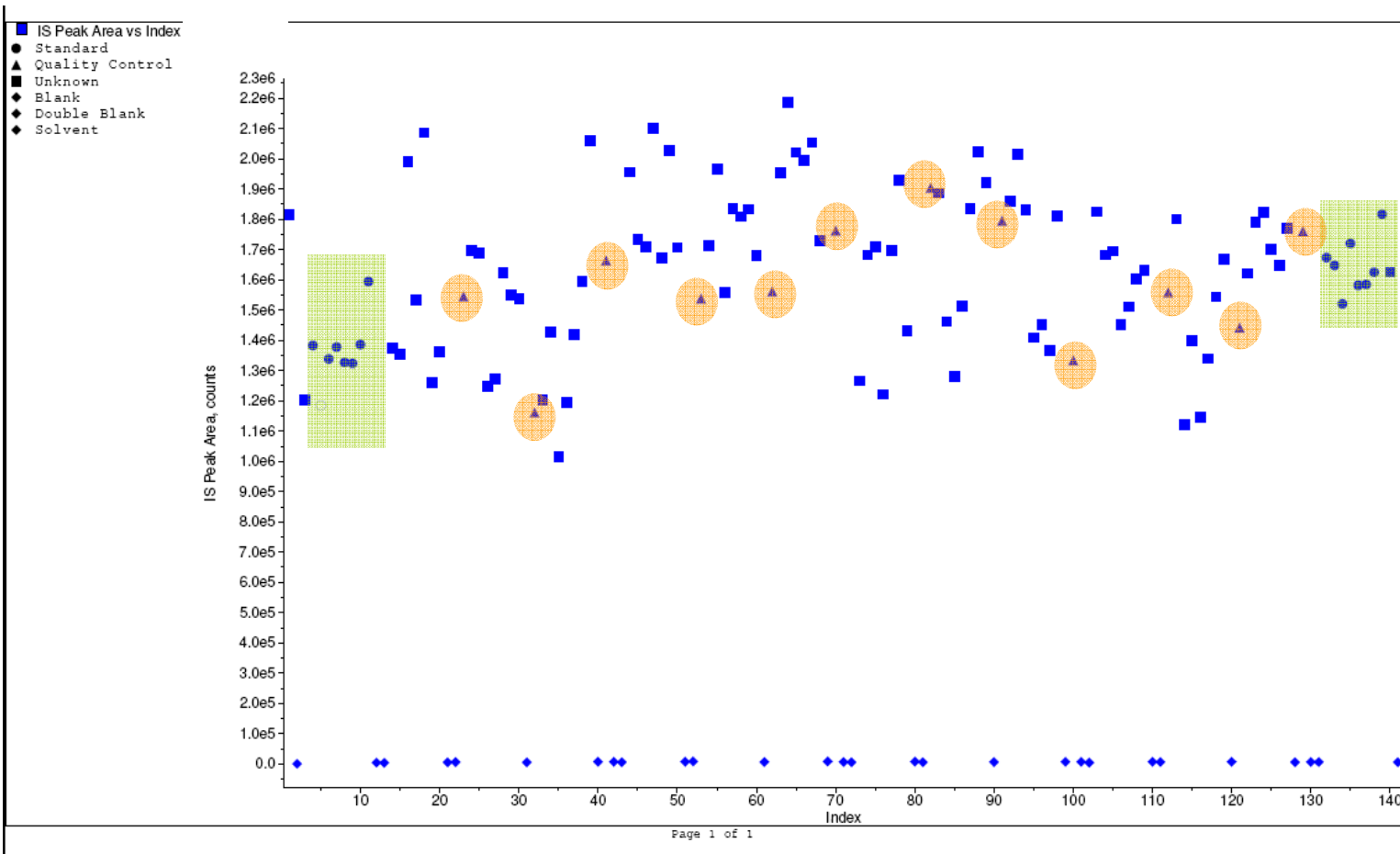


Fall #2: DDI-II



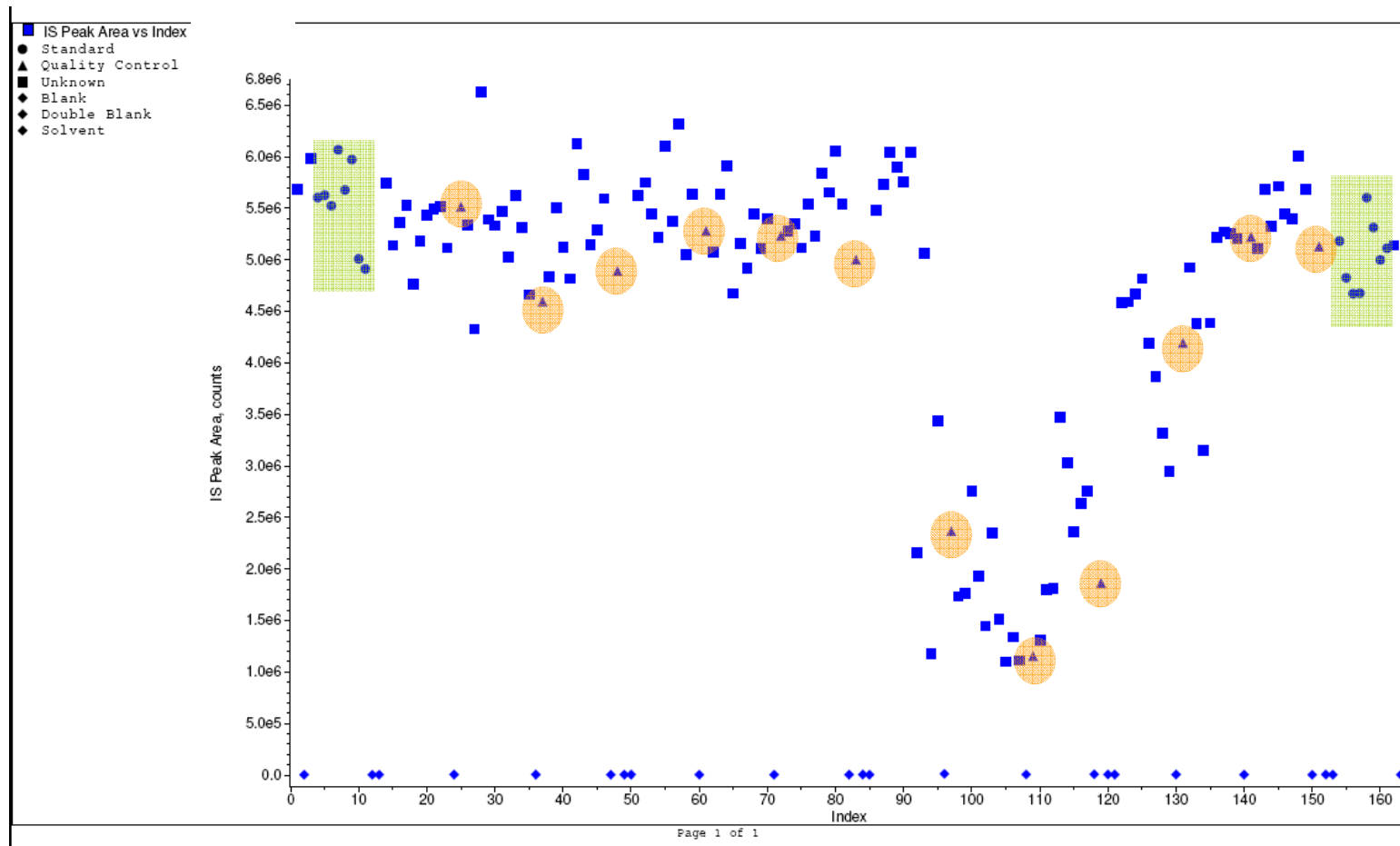


Fall #3: DDI-II



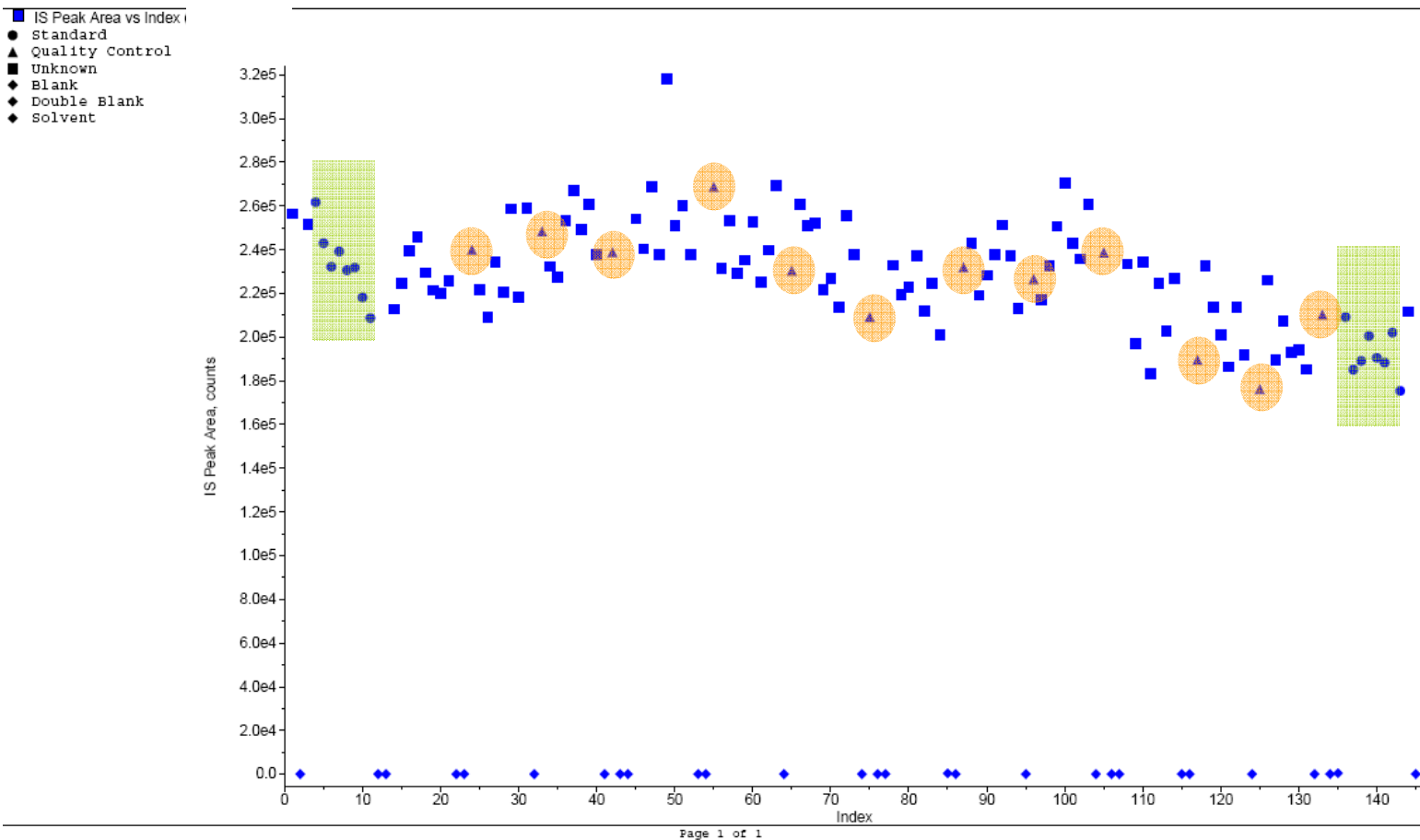


Fall #4: DDI-III





Fall #5: Phase III





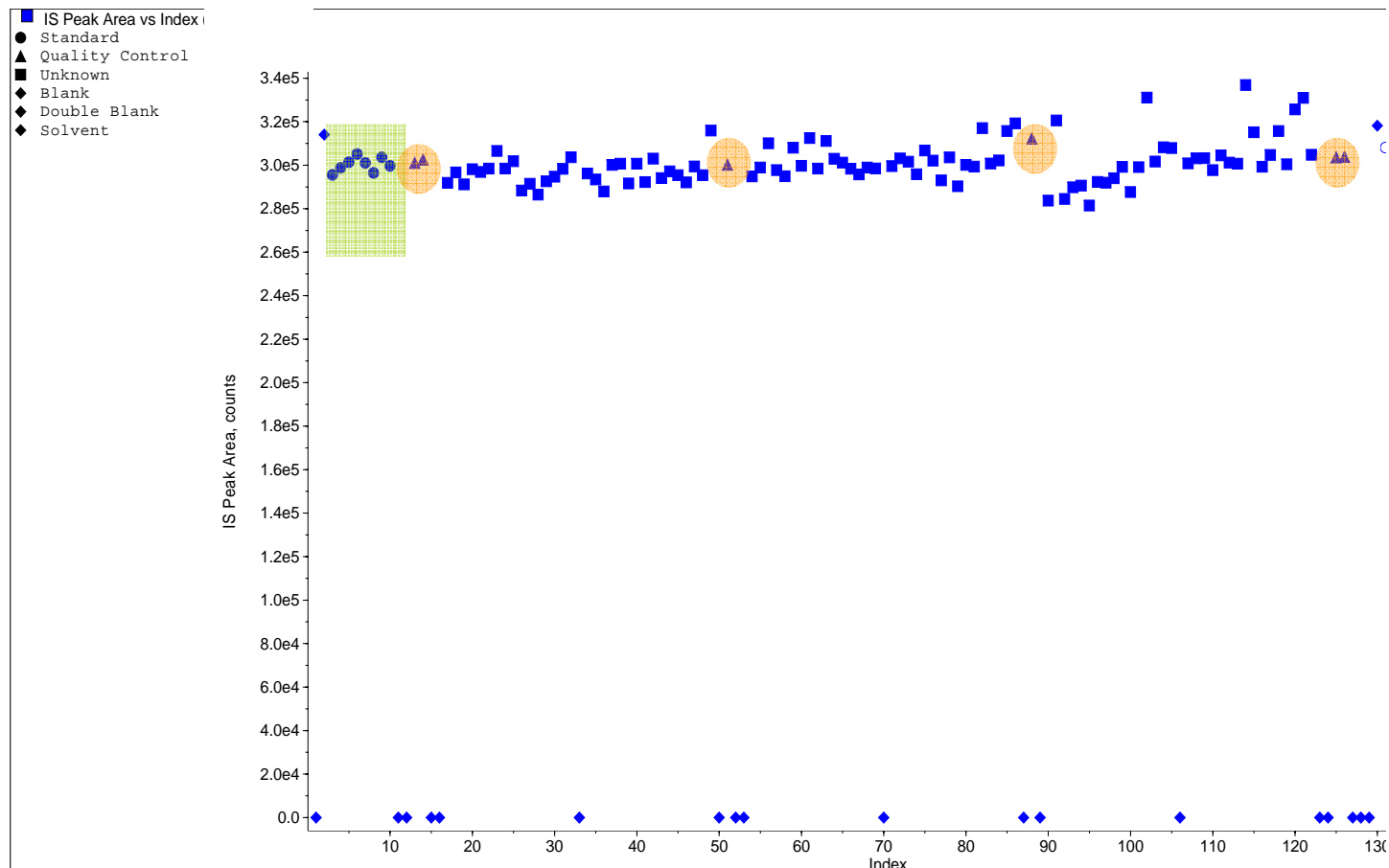
Fallbeispiele

Fall #6: DDI Studie-IVa

- K₃-EDTA-Plasma
- Verum-Proben: Phase 1
- Kalis/QC's: EDTA-Plasma Blutspendedienst
- Methode: SPE (Analyt 1)
- Stabil-isotopen markierter interner Standard (d₄-)
- Methode: Flüssig/flüssig Extraktion + Derivatisierung (Analyt 2)
- Stabil-isotopen markierter interner Standard (d₄-)

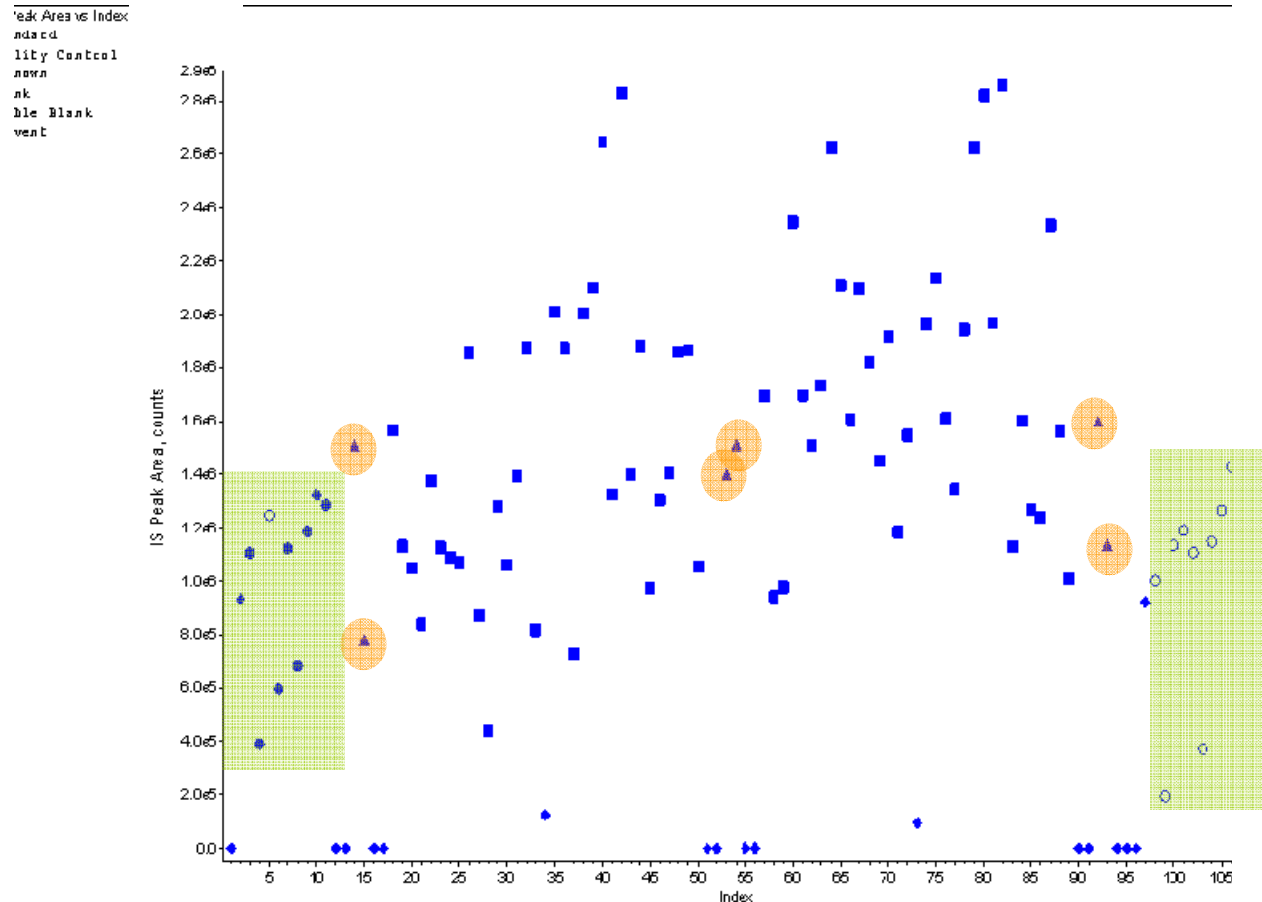


Fall #6: DDI-IVa





Fall #6: DDI-IVb





Anmerkungen

⇒ **Integrität der Ergebnisse?**

⇒ **Handlungsbedarf (SOP; Einzelfallentscheidung)**

Differenzierung:

- analogen IS (nicht koeluierend)
- stabil isotopen markierter IS (nicht koeluierend)
- stabil isotopen markierter IS (koeluierend)

Bsp.: Vgl. gegen andere Blank-Matrix
Lineare Bereich des IS, Präzision

Literatur: A. Tan et al., J. Chromatogr. B 877 (2009) 3201-3209