

## Von FDA bis ISO, von Pharma bis Food Die Welt der Referenzmaterialien

Juli 2010

*Dr. Christian Zeine, Global Product Manager Pharmaceutical Reference Materials,  
LGC Standards GmbH, Mercatorstr. 51, 46485 Wesel  
Tel.: +49 (0)281 - 9887 275, Email: christian.zeine@lgcstandards.com*

### Zusammenfassung

Referenzmaterialien sind aus der analytischen Chemie nicht mehr wegzudenken. Aufgrund einer Vielzahl von Institutionen, Richtlinien, Anwendern und Anwendungen existiert eine breite Palette von verschiedensten Materialien. In der pharmazeutischen Analytik sind solche Materialien – oft auch Standards genannt – noch einmal ein spezielles Feld in sich. Dieser Artikel erläutert Definitionen und Anforderungen, die es im korrekten Gebrauch von pharmazeutischen Referenzstandards zu beachten gilt. Auch die besondere Stellung des Arzneibuchstandards wird erörtert.

---

### 1. Das generelle Prinzip

Die Überlegungen, die hinter dem Gebrauch eines Referenzstandards – oder allgemeiner eines Referenzmaterials – stehen, sind simpel. Eine bestimmte Eigenschaft eines bestimmten Materials wird mit einer sehr genauen Methode, oder evtl. auch aus einer sinnvollen Kombination verschiedener Methoden untersucht, und die Messergebnisse in Form eines Analysenwerts dann auf einem Analysenzertifikat (AZ) dokumentiert.

Es gibt zwei große Gruppen von Referenzmaterialien: Referenzstandards und Matrix-Referenzmaterialien.

Referenzstandards sind möglichst reine Referenzmaterialien, die dazu benutzt werden, eine analytische Methode zu kalibrieren. Man kennt den Gehalt des Standards und kann das erhaltene Messsignal dazu in Beziehung setzen. Die unbekannte, zu messende Probe liefert ebenfalls ein Messsignal, und über eine Verhältnisrechnung können Rückschlüsse auf den Gehalt der unbekannt Probe gezogen werden. Dieses Verfahren ist als Einpunkt-Kalibration bekannt. Analysenlösungen des Standards und der unbekannt Substanz weisen dabei im Idealfall ähnliche Konzentrationen auf, oder stehen im betrachteten Konzentrationsbereich in einem linearen Verhältnis zueinander. Will man eine analytische Methode gleich über einen größeren Konzentrationsbereich benutzen, führt man mit Analysenlösungen unterschiedlicher Konzentrationen Zwei- oder Mehrpunktkalibrationen durch.

Matrix-Referenzmaterialien sind Materialien, bei denen ein bestimmter Analyt in einer bestimmten Matrix genau ermittelt wurde, z. B. das Pestizid Hexachlorobenzol (Analyt) in Lebertran (Matrix). Diese werden in der Methodvalidierung benutzt, um die Richtigkeit (und Präzision) einer analytischen Methode zu beurteilen. Wenn der mit der eigenen Methode bestimmte Wert des Matrixmaterials im Rahmen der Fehlergrenzen mit dem auf dem Zertifikat ausgewiesenen Wert übereinstimmt, kann man dadurch die Richtigkeit der eigenen Methode belegen. Ermittelt man bei Wiederholungsmessungen eng zusammenliegende Werte, ist das ein Maß für die Präzision einer Methode. Richtigkeit und Präzision machen die Genauigkeit einer Methode aus [1]. Darüber hinaus werden Matrix-Referenzmaterialien auch zur Qualitätskontrolle in der täglichen Routineanalytik eingesetzt.

In einigen seltenen Fällen wird ein Referenzmaterial nicht durch eine genaue Analytik etabliert, sondern lediglich per Definition. Dies war z. B. der Fall, als die metrische Konvention im Jahr 1875 festlegte, dass die Masse von 1 Kilogramm derjenigen entsprechen soll, welche ein Zylinder aus Platin-Iridium-Legierung aufweist, der beim BIPM (Bureau International des Poids et Mesures) in Sèvres nahe Paris aufbewahrt wird.

Je nachdem mit welcher Dokumentation und welchem "analytischen Stammbaum" ein Referenzstandard bzw. ein Matrixmaterial ausgestattet ist, kann es dann auch den Status eines zertifizierten Referenzmaterials (ZRM) aufweisen.

## 2. Referenzmaterial (RM) und zertifiziertes Referenzmaterial (ZRM)

Ein ZRM ist dabei nicht einfach nur ein Referenzmaterial mit einem Zertifikat. Es müssen weitere Voraussetzungen erfüllt sein. Das VIM (Vocabulaire International de Métrologie, International Vocabulary of Metrology) gibt die folgenden zwei Definitionen [2].

### *Reference Material*

*Material, sufficiently homogeneous and stable with respect to one or more specified properties, which has been established to be fit for its intended use in a measurement process.*

### *Certified Reference Material*

*A reference material characterized by a metrologically valid procedure for one or more specified properties, accompanied by a certificate that states the value of the specified property, its associated uncertainty, and a statement of metrological traceability.*

Drei wesentliche Punkte unterscheiden somit ein RM von einem ZRM:

- Eine validierte Messmethode,
- eine Angabe der dazugehörigen Unsicherheit,
- eine Stellungnahme zur metrologischen Rückführbarkeit.

Über Methodenvalidierung wollen wir an dieser Stelle nicht sprechen, sondern die beiden ZRM-Merkmale Unsicherheit und metrologische Rückführbarkeit genauer betrachten.

### **Unsicherheit**

Keine noch so genaue Methode ist in der Lage, den wahren Wert einer bestimmten Eigenschaft zu liefern. Es wird während einer Messung immer Faktoren geben, die das Messergebnis vom wahren Wert abweichen lassen. Da das Ausmaß zufälliger Fehler von Messung zu Messung ebenfalls variieren kann, ist es ebensowenig möglich, genaue Angaben zu solchen Abweichungen zu machen. Es ist aber durchaus möglich, durch gründliche Betrachtung der einzelnen Messkomponenten eine Abschätzung der Unsicherheit (standard uncertainty) jeder einzelnen Messkomponente vorzunehmen. Die Komponenten mit den größten Beiträgen zur Unsicherheit werden dann mit den Regeln der Fehlerfortpflanzung zu einer Gesamtunsicherheit (combined standard uncertainty) zusammengefasst. Abschließend wird diese Gesamtunsicherheit noch einer statistischen Betrachtung unterzogen. Denn in der Regel hat man seine Informationen zum Messwert nur aus einer sehr begrenzten Anzahl von Stichproben gezogen. Es kommt jetzt darauf an, aus dieser begrenzten Anzahl von Stichproben ein so genanntes Konfidenzintervall zu ermitteln, von dem man mit einer bestimmten Wahrscheinlichkeit annehmen kann, dass der tatsächliche ("wahre") Wert in diesem Intervall liegt. Die statistischen Überlegungen dazu laufen darauf hinaus, dass man die Gesamtunsicherheit – in Abhängigkeit von der Stichprobenanzahl – mit einem mehr oder weniger großen Coverage Factor multipliziert. Die Vorgehensweise dazu ist z. B. unter [3] nachzulesen.

Diese hier stark vereinfacht dargestellten Prozeduren stecken dann am Ende z. B. in der folgenden Messwertangabe (ebenfalls aus [3]):

*Total nitrogen: (3.52 ± 0.14) %w/w \**

*\*The reported uncertainty is an expanded uncertainty calculated using a coverage factor of 2 which gives a level of confidence of approximately 95%.*

## Rückführbarkeit

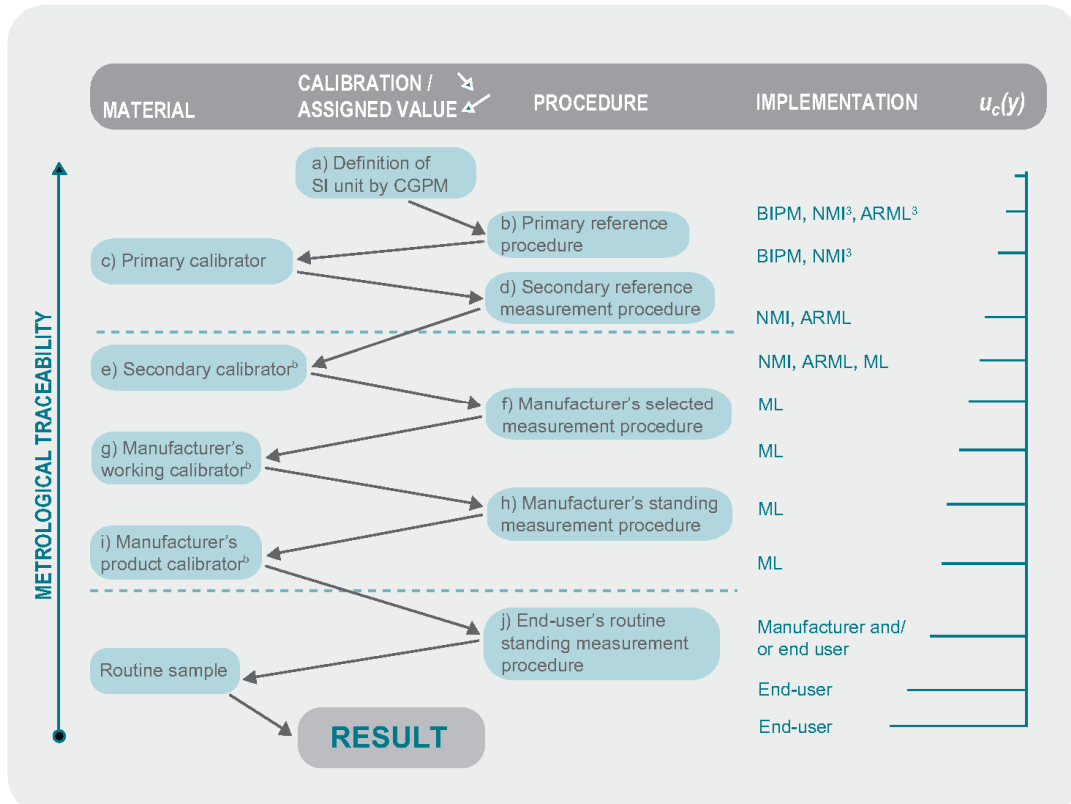
Die Rückführbarkeit (*engl. traceability*) ist wie folgt definiert [2]:

### *Metrological traceability*

*Property of a measurement result whereby the result can be related to a reference through a documented unbroken chain of calibrations, each contributing to the measurement uncertainty.*

Das Messergebnis muss also auf eine Referenz zurückgeführt werden können, durch eine ununterbrochene Kette von Kalibrationen. Die einzelnen Kalibrationen tragen dabei alle für sich zur Messunsicherheit bei.

Die sogenannte Rückführbarkeitskette (*traceability chain*) veranschaulicht diesen Sachverhalt noch einmal (Abbildung 1, in Anlehnung an [4]).



**Abb. 1:** Rückführbarkeitskette nach ISO Guide 17511 (ML: Manufacturer Laboratory; ARML: Accredited Reference Measurement Laboratory; NMI: National Metrology Institute; BIPM: Bureau Internationale des Poids et Mesures).

Ein ZRM sollte also bezüglich der Rückführbarkeit Informationen enthalten, wie ein bestimmter Wert durch Vergleich mit anderen Materialien abgesichert wurde. Beispielhaft diesbezüglich und noch immer unerreicht sind hier einige Analysenzertifikate und Reports des IRMM (*Institute for Reference Materials and Measurements*), der folgende kursive Text z. B. ist aus [5] zitiert:

*The measurements of A2M, **AAG**, AAT, ALB, C3c, C4, HPT, IgA, IgG, IgM, TRF, and TTR were calibrated with ERM-DA470 ... .*

*...*

*The certified values for **AAG**, AAT, TRF, and TTR in ERM-DA470 were obtained by calibration with pure proteins ... . Consequently, the certified mass concentrations, for AAG, AAT, TRF and TTR in ERM-DA470k/IFCC are traceable to the International System of Units (SI) ... .*

Für das Protein **AAG** im zertifizierten Referenzmaterial ERM-DA470k/IFCC wurde die Kalibration der Messmethode mit dem älteren ZRM ERM-DA470 durchgeführt. Für die Ermittlung von AAG in ERM-DA470 wiederum wurde die Messmethode mit dem reinen Protein kalibriert, was letztendlich für AAG – über Umrechnungen über die Molmasse – die Rückführbarkeit auf die SI-Einheiten Mol bzw. Kilogramm erlaubt.

Für das Protein **A2M** im zertifizierten Referenzmaterial ERM-DA470k/IFCC hingegen endet die Rückführbarkeit – ebenfalls über das ältere ZRM ERM-DA470 – beim USNRP 12-0575C, da die Proteine in USNRP 12-0575C in einem Prozess bestimmt wurden, bei dem eine weitere Rückführung nicht vorgesehen war [5]:

*The value assignment measurements of A2M, ALB, C3c, C4, HPT, IgA, IgG, and IgM in ERM-DA470 had been calibrated with USNRP 12-0575C ... .*  
*The values of the proteins in the calibrant USNRP 12-0575C had been assigned on the basis of measurements by 24 laboratories using different in-house calibrants of unspecified origin and purity ... . Therefore the traceability chain cannot be extended further than to the USNRP 12-0575C ... .*

### 3. Die ISO Guides 30-35

Zu Anfang hatten wir das Grundprinzip des Referenzmaterials zu Recht als simpel bezeichnet. Im vorherigen Abschnitt ist allerdings schon deutlich geworden, dass die Umsetzung alles andere als einfach ist. Tatsächlich ist das Vorgehen sehr komplex.

Die ISO Guides 30-35 geben dabei eine Orientierungshilfe, auf was alles bei RM und ZRM zu achten ist (siehe Tab. 1). Dabei ist der Guide 34 das zentrale Dokument. Im letzten Jahr (2009) ist die dritte Edition erschienen. Eine Akkreditierung nach diesem Guide ist möglich, und wird mittlerweile von vielen Herstellern von Referenzmaterialien angestrebt.

**Tab. 1: ISO Guides Serie 30-35**

ISO Guide 30, Second Edition 1992	Terms and definitions used in connection with reference materials
ISO Guide 31, Second Edition 2000	Reference materials – contents of certificates and labels
ISO Guide 32, Second Edition 1997	Calibration in analytical chemistry and use of certified reference materials
ISO Guide 33, Second Edition 2000	Uses of certified reference materials
ISO Guide 34, Third Edition 2009	General requirements for the competence of reference material producers
ISO Guide 35, Third Edition 2006	Reference materials – general and statistical principles for certification

Die Guides 30-35 finden ihre Anwendung in allen Bereichen der analytischen Chemie: In der industriellen Analytik (z. B. Bestimmung von Metallgehalten in Erzen), der Umweltanalytik, der klinischen Chemie usw. Auch in der Pharmaindustrie werden die Guides 30-35 seit Akkreditierung der USP stärker zur Kenntnis genommen, dennoch hat sich dort bzgl. Referenzstandards eine Parallelwelt gebildet, die immer noch Bestand hat.

### 4. Arzneibuchstandards

Arzneibuchstandards haben einen offiziellen Status, und müssen von den Regulierungsbehörden, wenn sie gemäß Arzneibuch eingesetzt werden, nicht mehr gesondert anerkannt werden. Bei unsachgemäßem Gebrauch außerhalb der Methoden des Arzneibuchs erlischt jedoch der offizielle Status, und genau genommen hat man dann nur noch eine Feinchemikalie vor sich, deren Eignung für den nicht-offiziellen Zweck erst noch einmal komplett zu überprüfen ist.

Mit Ausnahme der Standards des Internationalen Arzneibuchs werden Arzneibuchstandards ohne ein Analysenzertifikat geliefert. Alle wichtigen Informationen, um den Standard gemäß Arzneibuch zu verwenden, werden nur auf dem Label, manchmal auch auf einem Beiblatt (information sheet), mitgeteilt. Messunsicherheiten werden bei Arzneibuchstandards ebenfalls nicht angegeben. Der ISO Guide 34 bietet den Arzneibuchkommissionen Rückendeckung für dieses Vorgehen (Abschnitt 5.17, Certificates or documentation for users [6]):

*The reference material producer shall issue a certificate for certified reference materials ... in the form of a statement, analysis report, or information sheet howsoever named.*

...

*NOTE In some cases which are covered by specific legislation (e.g. most pharmacopoeia assay standards), the uncertainties of the assigned values are not stated since they are considered to be negligible in relation to the defined limits of the method-specific assays for which they are used.*

## 5. Primäre Referenzstandards

Wenn nun für eine analytische Fragestellung in der Pharmazie kein Arzneibuchstandard zur Verfügung steht, ist der Anwender aufgefordert, anderweitig für Vergleichsstandards zu sorgen. In der Regel wird das erreicht, indem der Anwender sich für den jeweiligen analytischen Zweck einen Primärstandard auflegt, den er

- entweder direkt in der Analytik verwendet (z. B. wenn diese Analytik nicht häufig durchgeführt wird),
- oder mit dem er dann noch – mit relativ geringem weiteren Aufwand – einen Sekundärstandard abgleicht, den er dann in größerer Menge vorhält und – anstelle des kostbaren Primärstandards – für die häufige Routineanalytik einsetzen kann.

Die FDA beschreibt dieses Vorgehen recht gut in einer ihrer Guidances for Industry [7]:

*A reference standard (i.e., primary standard) may be obtained from the USP/NF or other official sources ...*

*When there is no official source, a reference standard should be of the highest possible purity and be fully characterised ...*

*A reference standard that is not obtained from an official source should be of the highest purity that can be obtained by reasonable effort, and it should be thoroughly characterised to ensure its identity, strength, quality, purity and potency.*

Die folgende Liste gibt Anhaltspunkte, was zur Etablierung eines primären Standards erforderlich sein kann. Sie gilt für Standards für Wirkstoffe. In speziellen Fällen können weitere Tests diese Liste ergänzen. Für die überwiegende Mehrheit chemisch definierter Wirksubstanzen (small molecules) lassen sich aber hiermit Primärstandards hinreichend charakterisieren:

- Reinheit über 95%
- Vollständige Überprüfung der Identität (mit mehreren Techniken, z. B. NMR, MS, IR, UV/VIS, Elementaranalyse, evtl. Röntgenstrukturanalyse)
- Reinheit (per HPLC, liefert auch das Verunreinigungsprofil, hierbei sollten VUs mit mehr als 0,1% Anteil an Gesamtpeakfläche identifiziert werden, ggfls. muss die unterschiedliche analytische Response in die Berechnung mit einbezogen werden)
- Restlösemittel (per GC-Headspace)
- Wasser (z. B. Karl-Fischer-Titration)
- Trocknungsverlust (Summe Restlösemittel u. Wasser, kann u.U. diese beiden Tests ersetzen)
- Sulfatasche (Abwesenheit nennenswerter anorg. Verunreinigungen)
- Schmelzpunkt (grobe Information zu Reinheit/Identität)
- Gehaltsberechnung (z. B. aus HPLC-, Restlösemittel-, Wasseranalyse), zur Plausibilitätsprüfung wird oft auch noch eine zusätzliche, unabhängige Methode gefordert (z. B. Titration oder DSC (Differential Scanning Calorimetry)) [8]

Die Analysenergebnisse werden in Form eines Analysenzertifikats dokumentiert.

## 6. Sekundäre Referenzstandards

Sie leiten sich von den Primärstandards durch analytische Vergleiche ab, und werden – vor allem für häufig durchgeführte Routineanalytik – anstelle des mühsam und aufwändig charakterisierten Primärstandards verwendet. Die FDA schreibt in [7]:

*A working standard (meaning in-house or secondary standard) is a standard that is qualified against and used instead of the reference standard.*

Die von den Behörden oft verlangten Qualifizierungen sind:

- Kein ausführlicher Identitätsbeweis nötig, oft reicht Vergleich mit Primärstandard durch eine Methode (z. B. durch IR)
- Bestimmung des Gehalts durch Peakflächenvergleich mit Primärstandard.

Oft wird die Etablierung eines Referenzstandards an externe Dienstleister vergeben. Dabei ist die Beauftragung mit einem Primärstandard natürlich mit höheren Kosten verbunden, da der damit verbundene analytische und dokumentarische Aufwand ungleich größer ist.

## 7. Referenzstandards für Verunreinigungen

Verunreinigungen (VUs) sind in Anlehnung an die ICH (International Conference on Harmonisation, [9, 10]) jegliche Substanzen im Arzneimittel, die nicht der eigentliche Wirkstoff oder ein Hilfsstoff zur Herstellung des Arzneimittels sind. Sowohl die FDA [11] als auch die EMA (European Medicines Agency, [12]) haben in ihren Guidances bzw. Guidelines klargestellt, dass die Monographien der USP und der Ph.Eur. oftmals nicht ausreichen, die Qualität eines generischen Wirkstoffs in Bezug auf VUs zu gewährleisten, und schreiben eventuell zusätzlich durchzuführende Prüfungen in Anlehnung an ICH vor.

Der korrekten Identifizierung und Quantifizierung einer VU im pharmazeutischen Produkt kommt dabei immense Bedeutung zu. Unter Umständen können dadurch sogar teure und zeitaufwändige Qualifizierungsstudien nach ICH (z. B. durch Tierversuche) vermieden werden.

Die Arzneibuch-Monographien geben auch dort nur begrenzte Hilfestellung. Korrekte Identifizierung und Quantifizierung wird daher am besten sichergestellt durch die Verwendung von genau charakterisierten Referenzstandards für VUs, wie sie von den Arzneibüchern nicht zur Verfügung gestellt werden, wohl aber von entsprechend aufgestellten kommerziellen Anbietern [13].

Der Aufwand zur Charakterisierung eines VU-Standards unterscheidet sich dabei nur wenig von dem eines Primärstandards. Die Identifizierung muss genauso detailliert stattfinden, lediglich für die Ermittlung des Gehalts kann auf die Plausibilitätsmethode verzichtet werden. Viele pharmazeutische Labore arbeiten sogar nur mit Feinchemikalien, bei denen lediglich die chromatographische Reinheit bekannt ist. Von regulatorischer Seite wird diese Vorgehensweise oft akzeptiert, solange nur die Identität gesichert ist. Grund dafür ist die bei dieser Vorgehensweise fast sichere Überschätzung der VU im eigentlichen Produkten, so dass für den Patienten zu keiner Zeit ein Risiko besteht. Man muss sich aber im Klaren darüber sein, dass Berechnungen nur aufgrund der chromatographischen Reinheit dem pharmazeutischen Hersteller entscheidende Nachteile bringen:

- Überschätzung des Levels der VU im Produkt und dadurch
- wahrscheinlich häufigeres Überschreiten des ICH-Schwellenwerts zur Qualifizierung (mit der Konsequenz von evtl. unnötigen Tox-Studien),
- unnötig kurz angelegtes Shelflife des Produkts,
- in der Qualitätskontrolle evtl. Sperren von Batches, die durchaus noch akzeptabel sein könnten, sowohl bei Eingang- als auch Ausgangskontrolle.

Bei der Ph.Eur. ist das systematische Überschätzen von VUs sogar Programm. In ihrem General Chapter 5.12. steht:

*Where a reference standard is used to determine the content of a given impurity, the preferred minimum content is 95 per cent; where this is achieved no assigned value is given, the content being considered as 100 per cent; this approximation is acceptable since there will be no appreciable effect on the determination of impurities. When this minimum content cannot be obtained, the standard has an assigned content.*

## 8. Abschließende Schlussfolgerungen

Referenzstandard ist nicht gleich Referenzstandard. Nicht nur in der pharmazeutischen Analytik ist es wichtig, genau zu wissen, für welche Anwendung man welchen Referenzstandard benutzen kann. Vor allem Arzneibuchstandards sollte man tunlichst nur so einsetzen, wie die jeweils gültige Version des Arzneibuchs es vorschreibt, da ansonsten der offizielle Status des Standards erlischt.

FDA und EMA haben weiterhin beschlossen, dass auf VUs oft zusätzlich zum Arzneibuch zu prüfen ist. Spezielle Referenzstandards für Verunreinigungen helfen immens bei der korrekten Identifizierung und Quantifizierung dieser Substanzen in Wirkstoff und Arzneimittel.

## 9. Literatur

Eine Liste der für diesen Artikel verwendeten Literatur kann beim Verfasser angefordert werden.