

Richtigkeit und Präzision

Von FDA bis ISO, von Pharma bis Food –
Messungen durch Referenzmaterialien

Dr. Christian Zeine, LGC Standards GmbH

Als wichtige Bezugspunkte sind Referenzmaterialien 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 für sich. Die Arzneibuchstandards nehmen dabei eine besondere Stellung ein.



Das generelle Prinzip

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.

Matrix-Referenzmaterialien sind Materialien, mit denen ein bestimmter Analyt in einer bestimmten Matrix genau ermittelt wurde, z. B. das Pestizid Hexachlorobenzol (Analyt) in Lebertran (Matrix). Matrix-Referenzmaterialien werden in der Methodenvalidierung benutzt. Hierbei machen Richtigkeit und Präzision die Genauigkeit einer Methode aus [1]. Darüber hinaus werden Matrix-Referenzmaterialien auch zur Qualitätskontrolle in der täglichen Routineanalytik eingesetzt.

Je nachdem, mit welcher Dokumentation und welchem „analytischen Stammbaum“ ein Referenzstandard bzw. ein Matrixmaterial ausgestattet ist, kann dieser Standard bzw. dieses Material dann auch den Status eines zertifizierten Referenzmaterials (ZRM) aufweisen.

Referenzmaterial (RM) und zertifiziertes Referenzmaterial (ZRM)

Das VIM (Vocabulaire International de Métrologie, International Vocabulary of Metrology) definiert RM und ZRM wie folgt [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,

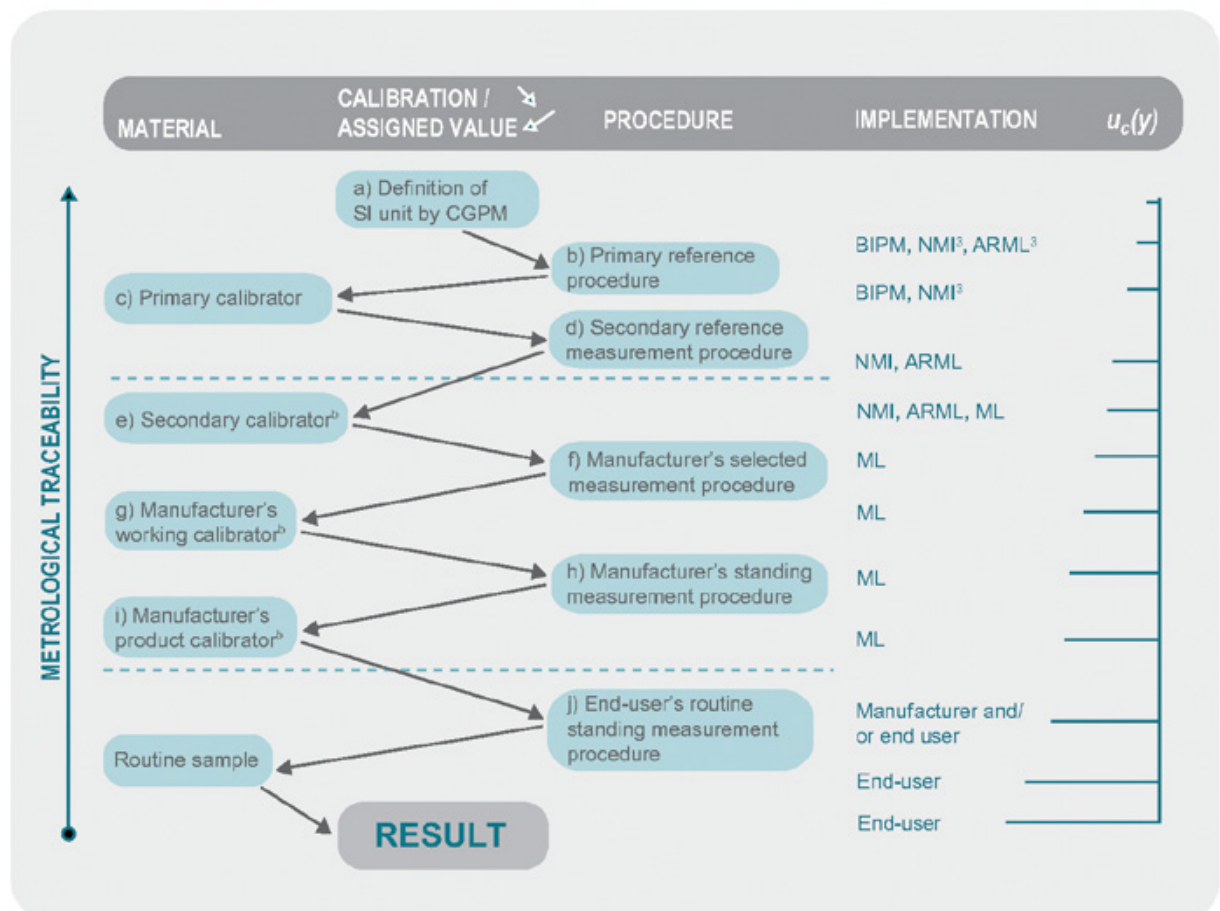


Abb. Rückführbarkeitskette nach ISO-Guide 17511 (ML: Manufacturer Laboratory; ARML: Accredited Reference Measurement Laboratory; NMI: National Metrology Institute; BIPM: Bureau Internationale des Poids et Mesures).

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.

Die beiden ZRM-Merkmale Unsicherheit und metrologische Rückführbarkeit werden im Folgenden genauer betrachtet.

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 ebenso wenig 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 einer statistischen Betrachtung unterzogen. Es kommt jetzt darauf an, aus der in der Regel 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 [3]. 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

Laut Definition der Rückführbarkeit (engl. Traceability) [2] muss das Messergebnis durch eine ununterbrochene Kette von Kalibrationen auf eine Referenz zurückgeführt werden können. Die einzelnen Kalibrationen tragen dabei alle für sich zur Messunsicherheit bei.

Die so genannte Rückführbarkeitskette (traceability chain) veranschaulicht diesen Sachverhalt noch einmal (Abb., in Anlehnung an [4]).

Ein ZRM sollte also bezüglich der Rückführbarkeit Informationen darüber enthalten, wie ein bestimmter Wert durch den Vergleich mit anderen Materialien abgesichert wurde. Diesbezüglich beispielhaft und noch immer unerreicht sind hier einige Analysenzertifikate und Reports des IRMM (Institute for Reference Materials and Measurements). Der folgende zitierte Text [5] gibt ein Beispiel:

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) ...

Tab. 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

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.

Die ISO-Guides 30-35

Die ISO-Guides 30-35 geben eine Orientierungshilfe dazu, auf was alles bei RM und ZRM zu achten ist (Tab.). Dabei ist der Guide 34 das zentrale Dokument. Eine Akkreditierung nach diesem Guide ist möglich und wird mittlerweile von vielen Herstellern von Referenzmaterialien angestrebt.

Die Guides 30-35 finden ihre Anwendung in allen Bereichen der analytischen Chemie. Auch in der Pharmaindustrie werden die Guides 30-35 seit Akkreditierung der USP stärker zur Kenntnis genommen, dennoch hat sich dort im Hinblick auf Referenzstandards eine Parallelwelt gebildet.

Pharmaanalytik

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. 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.

Arzneibuchstandards werden 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, leaflet) mitgeteilt.

Primäre Referenzstandards

Wenn 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].

Die folgende Liste (angelehnt an [8]) gibt Anhaltspunkte, was zur Etablierung eines primären Standards erforderlich sein kann. Sie gilt für Standards für Wirkstoffe:

- Reinheit über 95 %
- Vollständige Überprüfung der Identität
- Reinheit (Prüfung auf organische Verunreinigungen)
- Restlösemittel
- Wasser
- Trocknungsverlust
- Sulfatasche
- Gehaltsberechnung (z. B. aus Reinheit-, Restlösemittel- und Wasseranalyse), zur Plausibilitätsprüfung wird oft auch noch eine zusätzliche, unabhängige Methode gefordert (z. B. Titration oder DSC (Differential Scanning Calorimetry))

Die Analysenergebnisse werden in Form eines Analysenzertifikats dokumentiert.

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 [7].

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.

Referenzstandards für Verunreinigungen

Verunreinigungen (VUs) sind in Anlehnung an die ICH (International Conference on Harmonisation, [9, 10]) alle 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 Monografien 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. Am besten stellt man die korrekte Identifizierung und Quantifizierung durch die Verwendung von genau charakterisierten Referenzstandards für VUs sicher. Diese werden von den Arzneibüchern häufig nicht zur Verfügung gestellt, wohl aber von entsprechend aufgestellten kommerziellen Anbietern [13]. Stattdessen arbeiten viele pharmazeutische Labore nur mit Feinchemikalien, bei denen lediglich die chromatografische 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 Produkt, sodass für den Patienten zu keiner Zeit ein Risiko besteht. Man muss sich aber im Klaren darüber sein, dass diese Herangehensweise dem pharmazeutischen Hersteller entscheidende Nachteile bringt:

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

Fazit

Referenzstandard ist nicht gleich Referenzstandard. Nicht nur in der pharmazeutischen Analytik ist es wichtig,



Christian Zeine studierte Chemie an der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster, wo er auch 1998 promoviert wurde. Nach Projektarbeiten an der Universität folgten ab 1999 Tätigkeiten bei Herstellern von Medizinprodukten und *In-vitro*-Diagnostika, u.a. bei B. Braun Melsungen. Seit 2002 arbeitet er im Produktmanagement für pharmazeutische Referenzmaterialien bei LGC Standards in Wesel. LGC Standards ist ein führendes Unternehmen im Bereich von Referenzmaterialien für verschiedenste analytische Einsatzgebiete und Teil der international tätigen LGC Gruppe.

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.

Literatur beim Autor

■ christian.zeine@lgcstandards.com