

07/2018:51200
corrige 11.0

5.12. ÉTALONS DE RÉFÉRENCE

Ce chapitre est publié à titre d'information.

1. INTRODUCTION

Le terme « étalon de référence » est employé dans ce chapitre pour désigner l'ensemble des substances, préparations et spectres de référence.

L'emploi d'étalons de référence est souvent nécessaire pour réaliser un contrôle adéquat de la qualité des médicaments et de leurs composants.

Les étalons de référence sont établis selon des procédures appropriées et font l'objet d'un monitoring effectué selon un programme prédéfini pour s'assurer du maintien de leur aptitude à l'emploi. Si un étalon de référence est requis, il fait partie intégrante de la monographie de pharmacopée ou de la spécification du fabricant. Si une monographie ou un chapitre général renvoient à un étalon de référence de la Pharmacopée Européenne, celui-ci constitue l'étalon officiel qui fait seul autorité en cas de doute ou de litige.

2. TERMINOLOGIE

Etalon primaire. Etalon qui est désigné ou largement reconnu comme présentant les plus hautes qualités métrologiques et dont la valeur est acceptée sans référence à d'autres étalons représentant la même propriété ou grandeur, dans un contexte spécifié. Cette définition ne couvre pas les Etalons internationaux.

Etalon international. Etalon primaire établi pour permettre l'expression uniforme, à l'échelle mondiale, des résultats de dosages biologiques ou immunologiques. La valeur qui lui est assignée est exprimée en Unités Internationales (UI) ou dans une autre unité appropriée. La valeur assignée par l'Organisation mondiale de la Santé (OMS) à un premier étalon international est normalement fixée de manière arbitraire sur la base d'une étude inter-laboratoires internationale. L'activité (en Unités Internationales) assignée aux étalons internationaux de remplacement, le cas échéant, est établie par comparaison à un étalon précédent.

Etalon secondaire. Etalon dont la valeur assignée est établie par comparaison à un étalon primaire représentant la même propriété ou grandeur.

Etalon de référence de la Pharmacopée Européenne. Etalon de référence établi sous l'égide de, et adopté par la Commission européenne de Pharmacopée.

Substance chimique de référence de la Pharmacopée Européenne (SCR). Substance ou mélange de substances destinées à être utilisées selon les indications d'une monographie ou d'un chapitre général de la Pharmacopée Européenne. Les SCR sont en général des étalons primaires, à l'exception de celles (notamment les antibiotiques) qui sont étalonnées en Unités Internationales. Ces dernières sont des étalons secondaires reliés à l'étalon international.

Etalon de référence végétal de la Pharmacopée Européenne (ERV). Préparation à base de drogue végétale (généralement un extrait) ou drogue végétale destinée à être utilisée selon les indications d'une monographie ou d'un chapitre général de la Pharmacopée Européenne. Sauf indication contraire, les ERV sont établis comme étalons de référence primaires destinés à un usage pré-établi.

Préparation biologique de référence de la Pharmacopée Européenne (PBR). Substance ou mélange de substances destinées à être utilisées selon les indications d'une monographie ou d'un chapitre général de la Pharmacopée Européenne. Les PBR sont soit des étalons secondaires

étalonnés en Unités Internationales, soit des étalons primaires qui peuvent servir à définir une Unité Pharmacopée Européenne (U. Ph. Eur.). La teneur assignée peut également être, par exemple, un titre en virus ou un nombre de bactéries. *Matériau de référence (MR).* Matériau suffisamment homogène et stable, pour une ou plusieurs propriétés spécifiées, dont on a établi qu'il est approprié à l'usage prévu dans le cadre du processus de mesure.

Matériau de référence certifié (MRC). Matériau de référence qui a été caractérisé par une procédure métrologiquement valide, pour une ou plusieurs propriétés spécifiées, et est accompagné d'un certificat indiquant la valeur de la propriété spécifiée, l'incertitude associée, et une indication de la traçabilité métrologique.

3. UTILISATION DES ÉTALONS DE RÉFÉRENCE DE LA PHARMACOPÉE EUROPÉENNE

Les étalons de référence de la Pharmacopée Européenne sont utilisés dans le cadre des monographies, pour l'identification, le contrôle de la pureté et le dosage des produits couverts par ces monographies, ou dans le cadre des chapitres généraux de la Pharmacopée Européenne. Ces étalons de référence ont été qualifiés pour l'usage auquel ils sont destinés ; ils ne sont pas nécessairement appropriés à d'autres usages. Si un étalon de référence de la Pharmacopée Européenne doit être utilisé pour un usage autre que l'usage pré-établi, il faut apporter et, le cas échéant, faire figurer dans le dossier d'autorisation de mise sur le marché, la démonstration complète qu'il est approprié à cet autre usage. Une valeur assignée à un étalon de référence est valable pour l'usage pré-établi mais ne l'est pas nécessairement pour d'autres usages.

Un étalon de référence de la Pharmacopée Européenne auquel une teneur/activité est assignée aux fins du dosage d'une substance pour usage pharmaceutique (voir monographie générale *Substances pour usage pharmaceutique (2034)*) peut servir à déterminer la teneur/activité de cette substance dans une préparation pharmaceutique si toutes les conditions suivantes sont satisfaites :

- la méthode de dosage chromatographique utilisée est celle décrite dans la monographie de la substance active,
- l'applicabilité de la méthode à la préparation pharmaceutique considérée (absence d'interférence) est vérifiée par l'utilisateur,
- tout traitement préalable de l'échantillon (extraction ou filtration par exemple) est validé pour la préparation pharmaceutique considérée.

La politique de la Pharmacopée Européenne est de fournir les étalons de référence en quantité adéquate pour un usage immédiat après ouverture du récipient (c'est à dire qu'elle fournit la quantité requise pour réaliser l'essai décrit dans la monographie ou le chapitre général). Toute utilisation dans d'autres conditions relève de la responsabilité de l'analyste. Si un récipient non ouvert est conservé dans les conditions recommandées, il reste apte à l'emploi tant que le lot auquel il appartient est en cours de validité. Les informations relatives aux numéros de lots en cours de validité figurent dans la base de données des étalons de référence de la Pharmacopée Européenne (<https://go.edqm.eu/RSfr>). La conservation des solutions d'étalons de référence après dilution ou reconstitution n'est pas recommandée, à moins que l'utilisateur ne démontre qu'elle est appropriée.

Etalons secondaires. Un étalon secondaire est généralement établi pour limiter la quantité d'étalon primaire utilisée, et peut être employé pour les contrôles qualité effectués en routine. Un étalon secondaire doit présenter la ou les mêmes propriétés que l'étalon primaire auquel il est relié. Il doit donc être utilisé aux mêmes fins que cet étalon primaire.

Les étalons internationaux sont généralement disponibles en quantité relativement limitée et sont destinés à la caractérisation et à l'étalonnage d'étalons secondaires ; ceux-ci peuvent alors être utilisés comme étalons de travail.

4. ÉTABLISSEMENT DES ÉTALONS DE RÉFÉRENCE

4-1. ÉTALONS PRIMAIRES

Une substance ou préparation candidate pour l'établissement d'un étalon primaire est caractérisée par un ensemble de techniques analytiques choisies pour démontrer son aptitude à l'emploi.

Dans le cas des étalons de référence utilisés pour le contrôle des médicaments et de leurs composants, on procède généralement en appliquant les parties appropriées du programme d'essai suivant.

Programme d'essai :

- Caractérisation de la substance (élucidation de la structure) via des attributs chimiques appropriés tels que la formule structurale, la formule empirique, la masse ou la composition moléculaires. Diverses techniques peuvent être utilisées à cet effet, notamment :
 - la spectrométrie de résonance magnétique nucléaire,
 - la spectrométrie de masse,
 - la spectrophotométrie infrarouge,
 - l'analyse élémentaire.
- Détermination de la pureté :
 - détermination de la teneur en substances apparentées par une technique de séparation appropriée et/ou une méthode spectrométrique, dans les cas appropriés,
 - détermination de la teneur en eau,
 - détermination de la teneur en solvants résiduels,
 - détermination de la perte à la dessiccation, qui peut, dans certaines circonstances, remplacer les déterminations de la teneur en eau et de la teneur en solvants résiduels,
 - détermination de la teneur en impuretés inorganiques (par exemple cendres sulfuriques, spectrométrie d'absorption atomique, spectrométrie à plasma à couplage inductif, spectrométrie de fluorescence-X) ; les résultats obtenus ne servent généralement pas à déterminer la teneur assignée, sauf s'ils ont un impact appréciable sur elle,
 - détermination de la pureté par une méthode indépendante (par exemple spectrométrie de résonance magnétique quantitative, calorimétrie différentielle à balayage ou titrage, dans les cas appropriés ; les résultats de ces déterminations servent généralement à appuyer et confirmer les résultats obtenus avec les techniques séparatives ; ils ne servent pas au calcul de la teneur assignée).

Pour les produits biologiques, l'OMS fournit des lignes directrices dans ses « *Recommandations pour la préparation, la caractérisation et l'établissement des étalons internationaux et autres substances biologiques de référence* » (Série des rapports techniques de l'OMS).

4-2. SUBSTANCES CHIMIQUES DE RÉFÉRENCE DE LA PHARMACOPÉE EUROPÉENNE

L'étendue des essais à réaliser pour l'établissement d'une SCR et le nombre de laboratoires impliqués dépendent de l'usage de cette SCR, et sont conçus pour établir son aptitude à l'emploi.

Lorsqu'une étude inter-laboratoires est menée dans le cadre des travaux d'établissement, un protocole est fourni à chaque participant et seuls les résultats valides obtenus selon ce protocole sont utilisés pour déterminer une teneur assignée ou confirmer l'aptitude à l'emploi.

On procède typiquement en appliquant les parties appropriées du programme d'essai suivant.

4-2-1. **Identification.** En général, on établit que le lot candidat satisfait aux exigences pertinentes de la monographie ; une élucidation complète de la structure est effectuée pour le premier lot.

4-2-2. **Essai des substances apparentées.** Une SCR correspondant à une impureté est caractérisée en termes d'identité et de pureté. Si une SCR doit servir à déterminer la teneur d'une impureté donnée, sa teneur minimale est, de préférence, de 95,0 pour cent ; si cette teneur est atteinte, il n'est pas attribué de teneur assignée à la SCR, sa teneur étant alors considérée comme égale à 100,0 pour cent ; cette approximation est acceptable car elle est sans effet notable sur le dosage des impuretés. S'il n'est pas possible d'obtenir cette teneur minimale, une teneur assignée est attribuée à la SCR. Les SCR utilisées pour déterminer la teneur d'une impureté donnée ont normalement la même forme (sel, acide ou base) que la substance sur laquelle porte la monographie. Si tel n'est pas le cas, un facteur de conversion stoechiométrique est appliqué, sauf exception justifiée.

Si une impureté n'est pas disponible en quantité suffisante pour l'établissement d'une SCR, d'autres options sont possibles :

- la préparation d'une SCR contenant un mélange du (des) composé(s) à examiner et de l' (des) impureté(s),
- la préparation d'une SCR contenant un mélange d'impuretés spécifiées.

Si le mélange est également utilisé pour déterminer la teneur d'une impureté donnée, la teneur de cette impureté dans la SCR est déterminée par des méthodes de séparation appropriées et une teneur est assignée à l'étalon de référence.

4-2-3. Dosage

4-2-3-1. *Dosage chimique.* Lorsqu'une SCR doit servir à l'analyse quantitative d'une substance pour usage pharmaceutique (étalon de dosage), les essais à réaliser sont plus étendus que pour les SCR destinées à d'autres usages. Sauf si la substance est d'une grande pureté, plusieurs laboratoires travaillent en général en collaboration pour effectuer ces essais. Les résultats obtenus servent à établir une teneur assignée. Il est particulièrement important de quantifier les impuretés si un dosage sélectif est effectué. Dans ce cas, il est préférable de caractériser la substance candidate par des procédures analytiques supplémentaires scientifiquement justifiées comprenant, si possible, des méthodes indépendantes et des méthodes reposant sur des principes différents.

La teneur assignée des SCR utilisées comme étalons de dosage est généralement calculée à partir des résultats des analyses effectuées pour la quantification des impuretés (organiques, inorganiques, eau et solvants), en appliquant le principe du bilan de masse ; d'autres procédés appropriés peuvent également être utilisés. Lorsque cela est possible, la teneur assignée est confirmée par comparaison au résultat obtenu par une méthode indépendante.

Si l'emploi d'une SCR est requis pour une méthode de dosage non chromatographique (colorimétrie ou spectrophotométrie dans l'ultraviolet, par exemple), il faut vérifier la réactivité relative ou l'absorbance relative des impuretés présentes pour s'assurer qu'elles ne sont pas sensiblement différentes de celles de la substance à examiner.

Sauf indication contraire, une teneur assignée est attribuée à la substance ou préparation telle que présentée dans le récipient (« en l'état ») et le contenu ne doit pas être desséché avant utilisation. Pour les étalons de dosage préparés par lyophilisation, la teneur de la substance pure est indiquée en milligrammes ou en Unités Internationales par flacon.

4-2-3-2. *Dosage microbiologique.* L'activité est exprimée en Unités Internationales, ou en Unités Pharmacopée Européenne s'il n'existe pas d'étalon international. L'activité assignée et les limites de confiance associées sont calculées à partir des résultats statistiquement valides d'une étude inter-laboratoires, par les méthodes statistiques habituelles (5.3).

4-2-3-3. *Dosage des composants de drogues végétales et de préparations à base de drogues végétales.* L'étendue des essais à réaliser pour l'établissement des étalons de référence utilisés dans les monographies de drogues végétales dépend du type d'étalon considéré.

S'il s'agit d'un composant actif ou d'un marqueur utilisé comme SCR, il est habituellement caractérisé et évalué en termes d'identité et de pureté ; une teneur lui est assignée sans tenir compte de la pureté.

4-2-4. Rapport d'établissement. Un rapport contenant les résultats de l'étude d'établissement ainsi que des informations sur l'utilisation de la SCR est préparé par l'EDQM, approuvé par le groupe d'experts concerné et adopté par la Commission européenne de Pharmacopée. Pour un étalon de dosage, le rapport indique la teneur assignée ainsi que les éléments en justifiant l'attribution. L'incertitude estimée sur la teneur assignée est calculée et, si elle est inférieure à une valeur prédéfinie considérée comme négligeable par rapport aux critères d'acceptation fixés pour le dosage, l'étude est acceptée. Dans le cas contraire, l'étude peut être répétée, entièrement ou en partie, ou les limites définies pour la substance pharmaceutique peuvent être élargies. L'incertitude sur la teneur assignée ne figure habituellement pas dans les informations fournies avec la SCR, car la ou les limites spécifiées dans les monographies prennent en compte les performances de la méthode et l'incertitude associée à la teneur assignée de la SCR.

4-3. ÉTALONS DE RÉFÉRENCE VÉGÉTAUX DE LA PHARMACOPÉE EUROPÉENNE

Un ERV est utilisé lorsque la quantité disponible du constituant à doser, à l'état pur, apparaît soit insuffisante soit difficile à assurer de façon durable. Des ERV peuvent également être établis à d'autres fins que les dosages, notamment pour la détection de falsifications ou la vérification de la conformité du système. Les ERV sont caractérisés par un ensemble de techniques analytiques choisies pour démontrer leur aptitude à l'emploi. On peut procéder en appliquant les parties appropriées du programme d'essai suivant.

Programme d'essai :

- examen macroscopique,
- examen microscopique,
- chromatographie sur couche mince,
- chromatographie en phase gazeuse,
- chromatographie liquide,
- détermination de la teneur en eau,
- détermination de la teneur en solvants résiduels,
- perte à la dessiccation,
- éléments étrangers,
- dosage de certains constituants (par exemple constituants possédant une activité thérapeutique connue, marqueurs actifs, marqueurs analytiques) pertinents au regard de l'usage prévu de l'étalon.

L'étendue des essais à réaliser pour l'établissement d'un ERV et le nombre de laboratoires impliqués dépendent de l'usage prévu de cet ERV.

Dans le cas des ERV destinés aux dosages, la teneur assignée est généralement établie via une étude inter-laboratoires, en utilisant la méthode de dosage décrite dans la monographie spécifique dans laquelle l'ERV doit être utilisé, et en comparant avec un échantillon pur approprié du (des) constituant(s) pour lesquels une teneur doit être assignée.

Rapport d'établissement. Le rapport d'établissement d'un ERV est préparé de la même manière que pour les SCR (voir section 4-2-4).

4-4. PRÉPARATIONS BIOLOGIQUES DE RÉFÉRENCE ET SUBSTANCES CHIMIQUES DE RÉFÉRENCE DE LA PHARMACOPÉE EUROPÉENNE UTILISÉES POUR LES PRODUITS BIOLOGIQUES

La plupart des PBR et certaines des SCR utilisées pour le contrôle des substances et préparations biologiques sont établies via le Programme de Standardisation Biologique, sous l'égide du Conseil de l'Europe et de la Commission européenne. Ces étalons de référence sont généralement des étalons secondaires établis par rapport à l'Étalon

international correspondant de l'OMS. S'il n'existe pas d'étalon international, il s'agit d'étalons primaires auxquels est assignée une teneur/activité en Unités Pharmacopée Européenne ou une autre unité appropriée. Ils sont établis via des études inter-laboratoires lors desquelles les laboratoires participants testent le(s) produit(s) candidats(s), et les données valides sont utilisées pour assigner à l'étalon une teneur/activité officielle. Certaines de ces études sont organisées conjointement avec d'autres organisations, afin d'établir comme étalon un produit ou lot de produit commun. Dans ce cas, même si le produit qui constitue l'étalon de référence de la Pharmacopée Européenne est identique à l'étalon international et si son aptitude à l'emploi a été validée par la même étude inter-laboratoires, il est considéré comme un étalon secondaire à utiliser comme étalon de travail.

Les rapports d'établissement sont analysés par les participants à l'étude, puis approuvés par le groupe d'experts concerné de la Pharmacopée Européenne – le cas échéant – et par le Comité Directeur du Programme de Standardisation Biologique. Les résultats de l'étude sont ensuite présentés à la Commission européenne de Pharmacopée, à qui incombe l'adoption officielle des étalons/matériaux de référence établis dans le cadre du Programme de Standardisation Biologique. Les rapports d'établissement sont publiés dans *Pharmeuropa Bio & Scientific Notes* (<https://pharmeuropa.edqm.eu/app/BioSN/search/>).

4-5. ÉTALONS SECONDAIRES

Un étalon secondaire doit présenter la (les) même(s) propriété(s) que l'étalon primaire en ce qui concerne le ou les essai(s) pour le(s)quel(s) il a été établi. L'étendue des contrôles peut ne pas être aussi importante que celle qui est exigée pour l'établissement d'un étalon primaire. L'étalon secondaire est établi par comparaison avec l'étalon primaire auquel il est relié. Chaque fois que possible, un étalon primaire officiel est utilisé pour l'établissement d'étalons secondaires.

5. FABRICATION, ÉTIQUETAGE, CONSERVATION ET DISTRIBUTION DES ÉTALONS DE RÉFÉRENCE DE LA PHARMACOPÉE EUROPÉENNE

5-1. FABRICATION

Toutes les opérations sont effectuées conformément aux bonnes pratiques, de façon à assurer la traçabilité et l'intégrité de l'étalon de référence. Le dossier de fabrication comprend des informations relatives au remplissage, à l'étiquetage et à la conservation. Les étalons de référence sont répartis en récipients dans des conditions appropriées de remplissage et de fermeture afin de garantir l'intégrité de l'étalon de référence. Les récipients peuvent être réutilisables ou non, mais l'emploi de récipients non réutilisables est préférable pour réduire les risques de décomposition, de contamination ou d'introduction d'humidité.

5-2. ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique le nom de l'étalon de référence, le nom et l'adresse du fournisseur, le numéro de lot et la quantité unitaire (quantité par flacon/ampoule).

Une notice, considérée comme faisant partie de l'étiquetage, est normalement jointe.

Si l'étalon de référence est utilisé comme étalon de dosage, les informations suivantes sont également fournies :

- la teneur pour cent assignée,
- ou la teneur en milligrammes ou millilitres de l'entité chimique contenue dans le récipient,
- ou l'activité assignée (pour les titrages biologiques ou microbiologiques) en unités par milligramme, par millilitre ou par flacon/ampoule.

Les étalons de référence de la Pharmacopée Européenne ne portent pas de date de recontrôle ou de péremption, car un programme de recontrôle (voir section 6) permet de vérifier régulièrement le maintien de leur aptitude à l'emploi. Une déclaration de validité de lot (BVS pour *batch validity*

statement) est disponible pour chaque étalon dans la base de données des étalons de référence de la Pharmacopée Européenne (<https://go.edqm.eu/RSfr>).

5-3. CONSERVATION ET DISTRIBUTION

Les étalons de référence doivent être conservés et distribués dans des conditions appropriées pour garantir une stabilité optimale.

Les étalons de référence de la Pharmacopée Européenne sont pour la plupart conservés en chambre froide à une température contrôlée de 5 ± 3 °C. Cependant, certains d'entre eux sont conservés à -20 ± 5 °C et quelques-uns (les préparations de virus vivants par exemple) à -80 ± 10 °C ou entre -196 °C et -170 °C, sous azote liquide.

Un conditionnement approprié est utilisé de façon à réduire autant que possible le risque de détérioration lors du transport, maintenir si nécessaire l'étalon de référence à la température requise et se conformer à la réglementation en vigueur en matière de transport.

Les étalons de référence conservés à 5 ± 3 °C sont normalement transportés sans réfrigération lorsque de brefs écarts par rapport aux conditions de conservation à long terme n'ont pas d'effet délétère. Certains peuvent cependant être expédiés à $+5$ °C, emballés avec des accumulateurs de froid, si une augmentation de température risque d'affecter leur stabilité. Les étalons de référence conservés à -20 °C sont conditionnés avec des accumulateurs de froid ou dans de la glace carbonique et expédiés en express ou par avion. Les étalons de référence conservés à -80 °C ou sous azote liquide sont conditionnés dans de la glace carbonique.

Les conditions d'expédition, de distribution et de conservation sont indiquées dans le Catalogue des étalons de référence, les Conditions générales de vente et la base de données des étalons de référence de la Pharmacopée Européenne (<https://go.edqm.eu/RSfr>).

6. PROGRAMME DE RECONTRÔLE DES ÉTALONS DE LA PHARMACOPÉE EUROPÉENNE

Un système est établi et mis en application pour s'assurer du maintien de l'aptitude à l'emploi des étalons de référence de la Pharmacopée Européenne. Un programme de recontrôle est normalement appliqué, en tenant compte des propriétés physicochimiques de l'étalon de référence et des données de stabilité connues. Les étalons de référence font l'objet de contrôles de stabilité périodiques en cours de conservation. Un programme de monitoring visant à déceler à un stade précoce tout signe de dégradation, à l'aide de techniques analytiques appropriées, est appliqué. Les méthodes employées sont le plus souvent choisies parmi celles utilisées lors de l'établissement de l'étalon, afin de disposer de données de référence.

La périodicité et l'étendue du recontrôle des étalons de référence dépendent de divers facteurs comme :

- la stabilité,
- le récipient et son système de fermeture,
- les conditions de conservation,
- l'hygroscopicité,
- la forme physique,
- l'utilisation prévue,
- la présentation (réutilisable ou non).

La période de recontrôle peut être allongée si des données suffisantes le justifient. Il convient de prédefiner la variation maximale autorisée par rapport à la teneur assignée et, en cas de dépassement, de rétablir ou remplacer le lot.