

制药行业中的清洁验证样品的总有机碳(TOC)分析

应用文档 29890807

关键字

21 CFR 211.67

活性制药成分

Aurora 1030W TOC 分析仪

BSA

牛血清白蛋白

清洁验证样品

现场清洁验证

加热的过硫酸盐氧化技术

NDIR

非分散红外检测

制药行业验证

简介

总有机碳(TOC)分析为制药行业的清洁验证提供了一条快速以及有效的分析手段。当在一个制药生产厂内需要利用一台设备处理不同的活性制药成分(API)的时候,将产品之间的交叉污染维持在一个极低的水平是必需的。清洁验证就是确认去除产品并且将残留的物质清除到预先确定的可接受的范围,这样一个确认设备清洁的完整的过程。在 21 CFR 211.67 中规定,“设备和器具必须是干净、一致以及清洁的,以适当的时间间隔避免设备和器具的功能失效或者污染,从而保证制药产品的安全性、一致性、能效、品质以及纯度,由于官方或者其它已经建立起来的规定要求。”¹

实验

发展清洁验证过程

在清洁验证过程的发展中,主要集中于过程的验证:用数据证明过程中的每个步骤能够去除产品以及将残留物质清除到预先确定的可接受的范围。FDA 1993 年的大纲中规定,任何可接受限值的基础必须是“科学且合理的”。根据所使用的清洁过程的不同(例如,就地清洁[CIP]或者拆卸至清洁室清洁[COP]),以及清洁过程是对于更换产品类型还是在一个产品中间更换批次,这些限值会有所不同。而且了解分析物的类型以及用户是测试哪一种清洁的残留物质(例如,蛋白质发酵液还是阳离子表面活性剂),也是十分重要的。这些参数决定了验证过程的检测方法。

清洁验证的 TOC 分析

由于几个原因,TOC 分析已经快速地并且大量地作为清洁验证的分析方法。很多制药公司正在根据整个产品的生产顺序制定清洁验证的方法:不管其来源(包括产品、清洁剂、化学品、溶剂、副产物、讲解吴仪及微生物污染),要判断出任何残留物质是否存在。采用 TOC 分析能够地很好完成这一任务,只要其分子结构中包含碳,就能够检测出任何的活性制药成分或者清洁用的残留物质。

Jenkins et al.² 强烈推荐在清洁验证中采用 TOC 分析:“TOC 能够执行低浓度的检测,快速的分析时间,相比于其它的方法成本极低并且能够检测所有含碳类的残留物质”。与 TOC 比较而言,HPLC、薄层色谱、光谱(UV)、酶链接免疫吸收测试、电泳、pH、电导率和表观分析,他们发现 TOC 能够与 HPLC 以及光谱方法执行相同的、甚至更好的分析。

还有其它几个原因使 TOC 的分析快速地流行起来:



- 相对较低的初期投资以及很低的操作和维护的费用
- 使用方便
- 极高的灵敏度
- 对于很难分析的物质具有很高的回收率
- 干扰极小

方法

当制定清洁验证的方法时，了解这项分析技术对于要测试的潜在分析物质的检测性能、准确度和精密密度，也是很重要的。换句话说，在制定阶段用于测试这项技术的模型物质，必须能够代表在实际的验证方法中将要面临的活性物质的类型。

牛血清白蛋白

牛血清白蛋白（BSA）是一种可以作为其它蛋白质模型物质，难以氧化的活性制药成分。血清白蛋白，存在于所有哺乳动物血浆中一种普通的蛋白质，是最常用的以及已知很有代表性的蛋白质。通过核磁共振和 X-射线分析，指定的 BSA 已经被确认为是一种大致心形的结晶结构，包含 607 个氨基酸残留物质，分子质量大约为 66,317.25 原子质量单位（图 2）。BSA 作为在制药行业广泛使用的活性物质，同时它也是制定有效的验证分析方法的极好的模型物质。蛋白质是公认的难以氧化的物质，当制定 TOC 检测方法采用蛋白质物质作为测试目标之时，我们检测其它活性物质以及一些不难以检测的分析物的时候，对于分析结果就完全可以放心了。



图 1 Aurora 1030W TOC 分析仪和 1088 自动进样器

仪器设备

这项研究的目的在于采用 BSA 作为模型物质检测 TOC 分析仪响应的线性范围，用于开发清洁验证方法。在这项研究中采用 OI 分析仪器公司的 Aurora 1030W TOC 分析仪和一台 1088 型自动进样器。

溶液制备

按照规定，采用试剂水溶解冻干的 BSA 粉末（Bio-Plus 实验室）配制成一份储备溶液（100mg/L 碳）。BSA 样品则通过稀释这份储备溶液得到。由于 BSA 的蛋白质特性，在配制之前轻轻搅动这份储备标液是必要的，因为其将会附着在玻璃器皿上，从而导致回收率下降。稀释的时候，在加入 BSA 之前将去离子水盛至接近满的程度。在分析之前需要执行混匀的操作。

TOC 分析仪采用邻苯二甲酸氢钾（ $C_8H_5O_4K$ ）或 KHP 进行校准。采用试剂水将预先制备的 1,000mg/L 碳的储备溶液配制成工作储备溶液（100mg/L C）。然后由工作储备溶液配制成一系列标准。

为了消解样品中的 TIC，配制 85% 的磷酸（ H_3PO_4 ）作为酸试剂。TOC 氧化试剂采用溶解 200 克过硫酸钠（ $Na_2S_2O_8$ ）于 1 升试剂水配制而成。TOC 分析仪按照列在表 1 中的方法参数设置，用于 BSA 样品的分析。

在试验中，样品重复分析三次（每次重复取样 9 mL），每次重复和每个样品的数据以面积值、碳量($\mu\text{g C}$)和碳浓度(mg/L)显示。统计的数据包括样品的标准偏差和百分相对标准偏差。

结果和讨论

校准曲线

图 2 显示了这个试验中得到的校准曲线，证明 Aurora 1030W TOC 分析仪能够在很宽的碳浓度范围内进行校准，并且具有极高的准确度和精密度。仪器采用 KHP，一个广泛使用而且很容易氧化的标准进行校准。图 2 中的校准曲线采用计算机的操作软件生成，同时在 Aurora 1030W 分析仪的触摸屏操作软件中有一个完全一样的操作界面。响应因子代表仪器的响应，以 $\mu\text{g C}$ 对每 1,000 面积值为单位。

表 1 Aurora 分析 BSA 样品的参数

参数	数值
样品体积	9 mL
酸体积	0.4 mL
过硫酸钠体积	1.2 mL
TIC 反应时间	2:00 min
TIC 检测时间	3:00 min
EPC	20 psi
TOC 反应时间	4:30 min
TOC 检测时间	3:30 min
每重复清洗次数	1
每样品清洗次数	0
清洗体积	20 mL

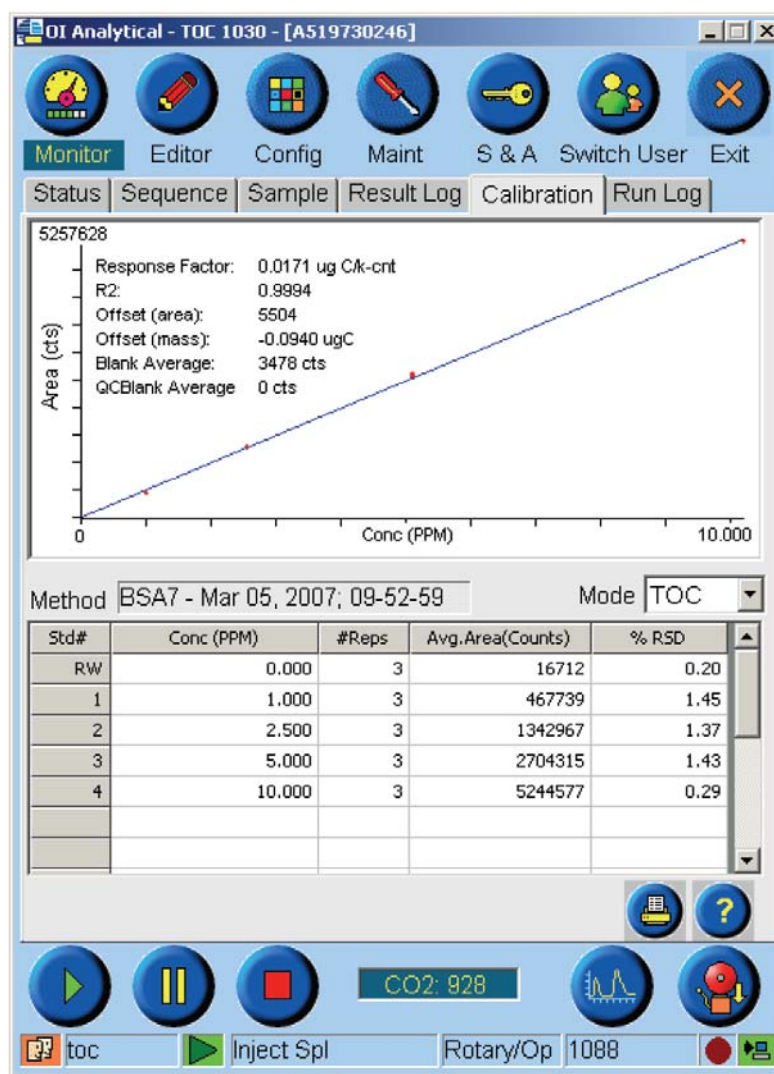


图 2 Aurora 1030W TOC 分析仪采用 KHP 得到的校准曲线

测试结果

这个试验的第一个目的在于检测 1030W TOC 分析仪对于 BSA 响应的线性范围。这个概念与校准仪器相同，揭示了仪器能够给定线性响应的 BSA 的工作浓度范围。测试结果显示于图 3，由 TOC 分析仪得到每个样品的面积值响应与 BSA 的浓度曲线。数据显示，Aurora 1030W TOC 分析仪能够分析从大约 0.5 到 20 ppm 的 BSA。

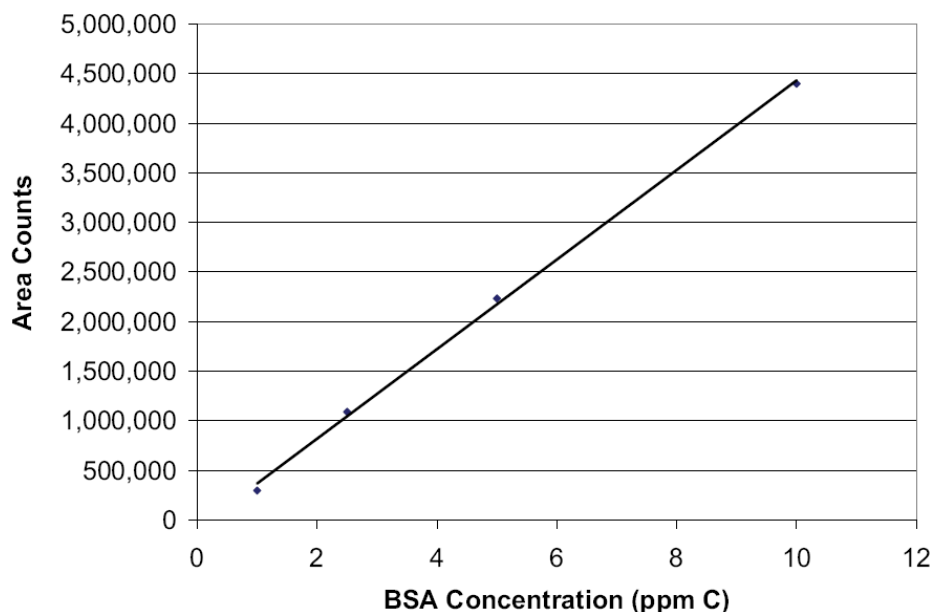


图 3 由 TOC 浓度与得到的 TOC 面积值绘制的 BSA 样品的浓度曲线

作为一种难以氧化的蛋白质，在其它一些研究中 BSA 显示出差的回收率和仪器响应。上面这些数据证明：加热的过硫酸盐氧化技术能够在极宽的工作浓度范围内彻底地消解以及完全回收 BSA 样品中的碳浓度。简单的绘制一条二次拟合曲线只能表明仪器不能得到 BSA 样品的好的回收率。也就是说，这些数据表明：这已经是分析仪消解 BSA 的上限了；当样品浓度增加时，而仪器的响应却保持相对一致。

最后，表 2 也证实了，当分析类似 BSA 的蛋白质样品时，Aurora 1030W 分析仪能够得到很好的精密度和准确度。对于分析，样品按照 BSA 的已知浓度进行制备。这样，能够得到理论的碳浓度，然后与测量到的碳浓度相比较。根据 BSA 的分子质量，66,317.25 原子质量单位和百分碳的质量，53.065%，得到下面的 BSA 碳浓度与浓度的关系式：

$$\text{ppm C} = \frac{\text{ppm BSA} * 53.065}{100}$$

表 2 来自 BSA 样品的数据

理论碳浓度(ppm)	测量到的碳浓度(ppm)	% RSD	% 回收率
1	0.791	5.55	79 %
2.5	2.267	1.76	91 %
5	4.495	1.54	90 %
10	8.787	1.15	88 %

这些数据表明：加热的过硫酸盐技术能够以极高的准确度（平均相对标准偏差为 2.5%）和精密密度（平均百分回收率为 87%）分析 BSA 样品。

得到碳浓度的适当回收率对于清洁验证是十分必要的。理论对实际浓度的斜率必须进行研究以保证系统回收率的准确评估。在图 4 中，根据表 2 中的回收率结果绘制得到一根斜率曲线。

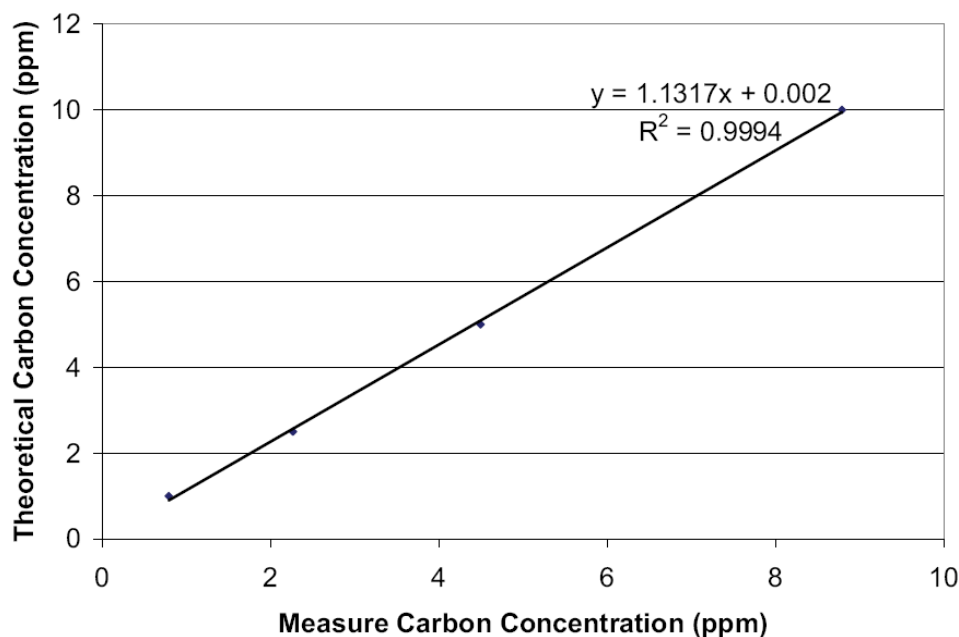


图 4 BSA 的碳回收率

因为 BSA 的理论碳的含量为 53.065%，根据公式（理论浓度/曲线的斜率=实际浓度）我们可以计算得到碳的含量；对于 BSA， $53.065/1.1317=46.8896\%$ 碳。

有这个分析仪得到的回收率，可以建立起来一个适当的范围，用于未来检测未知样品中的 BSA 的含量。

结论

制定一个完整的清洁验证方法是一套真实的、详细的操作过程，用于检测残留物质的分析方法只是其中的一小部分。采用 BSA 作为模型分析物，能够很好的表达那些在制药行业公认的最难以氧化的物质，这个试验已经证实 OI 分析仪器公司的 Aurora 1030 TOC 分析仪完全能够胜任就地清洁和拆卸至清洁室清洁样品的实验室分析。

Aurora 1030W 分析仪所采用的加热的过硫酸盐技术以及红外检测技术，再加上很多其它的性能---例如，软件符合 21 CFR Part 11 的要求，以及内置的报告生成程序，为制药行业提供了一台对于清洁验证测试具有极高可信度的 TOC 分析仪。

参考书目

1. “当前好的制造操作规定”，*联邦法规*, Title 21, 食品和药品（常规维护管理部门，华盛顿特区，1973 年 4 月 1 日），Part 211.67。
2. Jenkins, K. M., et al., “总有机碳分析在清洁验证中的应用”，*PDA J. Pharm. Sci. & Tech* 50 (1), 6-15 (1996)。
3. Carter, D.C.; Ho, J.X.,“血清白蛋白的结构”，*Adv. Protein Chem.* 1994 年，45，153-203。



出版编号 29890807



P.O. Box 9010
College Station, TX 77842-9010
Tel: (979) 690-1711 • FAX: (979) 690-0440 • www.oico.com