

关键字

活性制药成分
 清洁验证样品
 现场清洁验证
 定制方法参数
 加热的过硫酸盐技术
 红外检测
 1010 型 TOC 分析仪
 验证

在 2003 年匹兹堡分析化学和应用实验室光谱会议上展出，奥兰多市，佛罗里达州，2003 年 3 月 9-14 日



利用总有机碳分析制药行业中的现场清洁验证样品

简介

当在一个制药生产厂内需要利用一台设备处理不同活性制药成分（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须的。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。

在清洁验证的过程中，主要集中在验证过程的目标：用数据证明过程中的每个步骤能够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。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。

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，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。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



图 1 1010 型 TOC 分析仪

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（BSA）是一种可以作为其它蛋白质模型的物质，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¹H 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）。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。

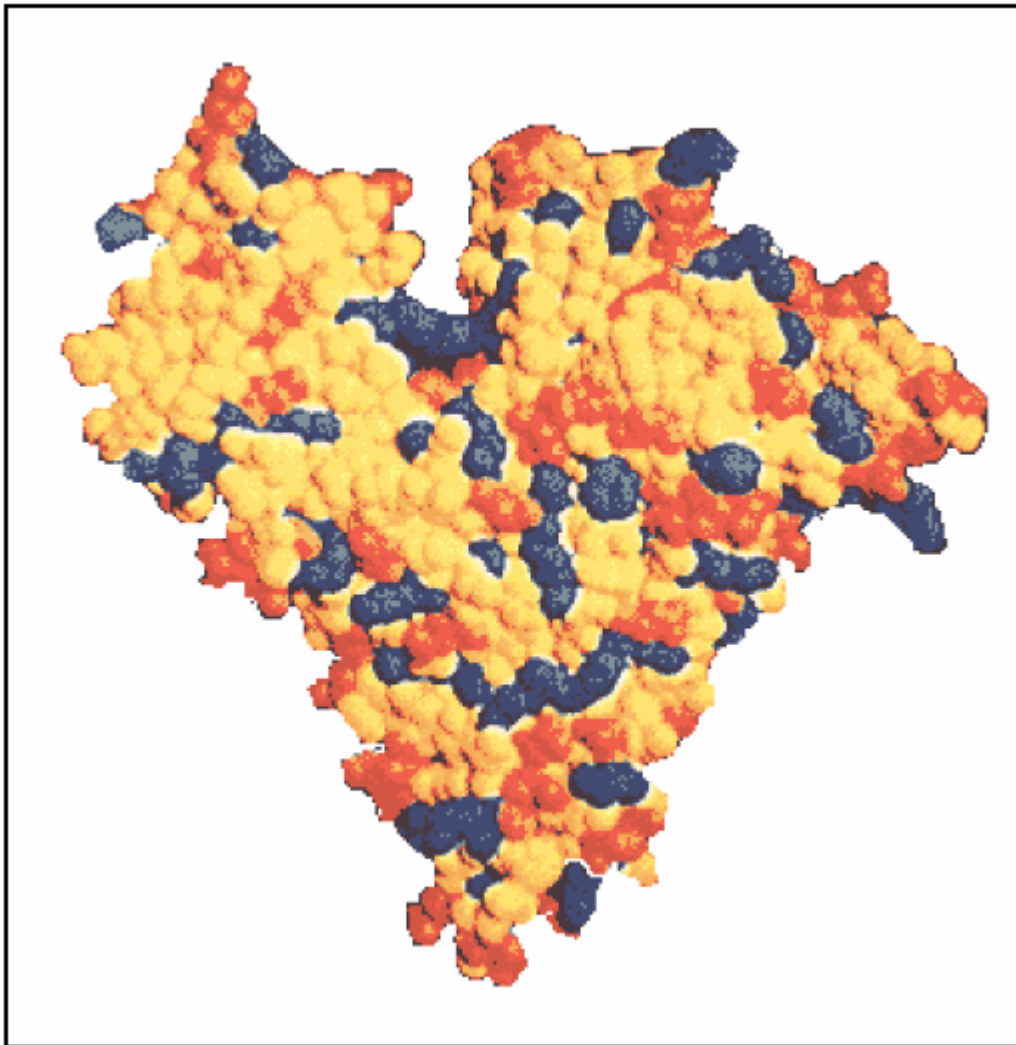


图 2 牛血清白蛋白（BSA）的空间填充模型。碱性的氨基酸以蓝色表示，酸性残留物质以红色表示，中性的残留物质以黄色表示

这项试验分为三个部分。首先，采用 BSA 作为模型物质制定一项清洁验证的方法，决定 TOC 分析仪对于 BSA 响应的线性范围。通过分析一系列不同浓度的 BSA 样品，然后绘出这些样品的浓度与峰面积关系的图形。第二，测试 1010 型分析仪准确分析 BSA 样品，而且不存在样品之间残留效应的能力。要达到这个目的，样品序列的设置按照：首先分析从最低浓度到最高浓度的 BSA 样品，然后分析从最高浓度

到最低浓度的样品。第三，通过分析已知浓度的 BSA 样品，测试仪器的准确度和精密度，计算理论的碳浓度并比较这个数值与每个样品测量得到的碳浓度的偏差。

方法

在这个试验中，使用 OI 分析仪器公司生产的一台 1010 型 TOC 分析仪和一台 1051 型自动进样器。按照规定的方法，采用试剂水水合冻干的牛血清白蛋白 (BSA) 粉末 (Bio-Rad 实验室)，配制成一份储备溶液 (浓度为 1.36mg/mL 的 BSA)。这个储备溶液可以用试剂水进一步稀释，配制成一个工作储备溶液 (50 μg/mL 的 BSA)。通过稀释这个工作储备溶液，得到一系列 BSA 样品。

TOC 分析仪采用邻苯二甲酸氢钾 (C₈H₆O₄K) 或 KHP 进行校准。采用试剂水将预先制备的 1,000 μg/mL 碳的储备溶液配制成工作储备溶液。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 (H₃PO₄) 作为酸试剂。TOC 氧化试剂采用溶解 100 克过硫酸钠 (Na₂S₂O₈) 于 1 升试剂水配制而成。TOC 分析仪按照如下的方法参数设置，用于每个 BSA 样品的分析：

样品体积 = 10 mL	TOC 反应时间 = 7:00 分钟
酸试剂体积 = 400 μL	TOC 检测时间 = 1:30 分钟
过硫酸钠试剂体积 = 1,200 μL	每次重复之间的清洗次数 = 1
TIC 反应时间 = 3:00 分钟	每个样品之间的清洗次数 = 1
TIC 检测时间 = 1:30 分钟	清洗体积 = 25 mL

表 1 样品序列表

样品序号	样品名称	样品类型
1	清洗空白	样品
2	0.200 ppm C KHP	标准
3	1.000 ppm C KHP	标准
4	5.000 ppm C KHP	标准
5	6.000 ppm C KHP	标准
6	8.000 ppm C KHP	标准
7	清洗空白	样品
8	0.503 ppm BSA	样品
9	0.754 ppm BSA	样品
10	1.006 ppm BSA	样品
11	2.515 ppm BSA	样品
12	5.030 ppm BSA	样品
13	7.545 ppm BSA	样品
14	10.06 ppm BSA	样品
15	12.58 ppm BSA	样品
16	15.09 ppm BSA	样品
17	20.12 ppm BSA	样品
18	清洗空白	样品
19	20.12 ppm BSA	样品
20	15.09 ppm BSA	样品
21	12.58 ppm BSA	样品

22	10.06 ppm BSA	样品
23	7.545 ppm BSA	样品
24	5.030 ppm BSA	样品
25	2.515 ppm BSA	样品
26	1.006 ppm BSA	样品
27	0.754 ppm BSA	样品
28	0.503 ppm BSA	样品
29	清洗空白	样品

在我们实验室以前的试验中已经显示：重复分析 BSA 和类似的蛋白质样品导致样品传输管线中使用的 Teflon®管内表面张力的减小。由于一些物质残留在管内，导致到达消解罐的样品不完全传输。同时也显示采用酸化的清洗水（大约 1 升清洗水含有 100mL 的 H₃PO₄），在每次重复之间和每个样品之间清洗一次样品管线和消解罐，能够维持正常的表面张力，使样品能够完全传输到消解罐。在整个试验中一直使用酸化的清洗水。

在试验中，样品重复分析三次（每次重复取样 10 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（ $\mu\text{g/mL}$ ）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

图 3 显示了这个试验中得到的校准曲线，证明 1010 型 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。校准曲线由 TOC Reporter——一个报告编辑软件，内置于 WinTOC™ 软件中——生成。RF 代表仪器的响应，以 $\mu\text{g C}/1,000$ 面积值为单位。

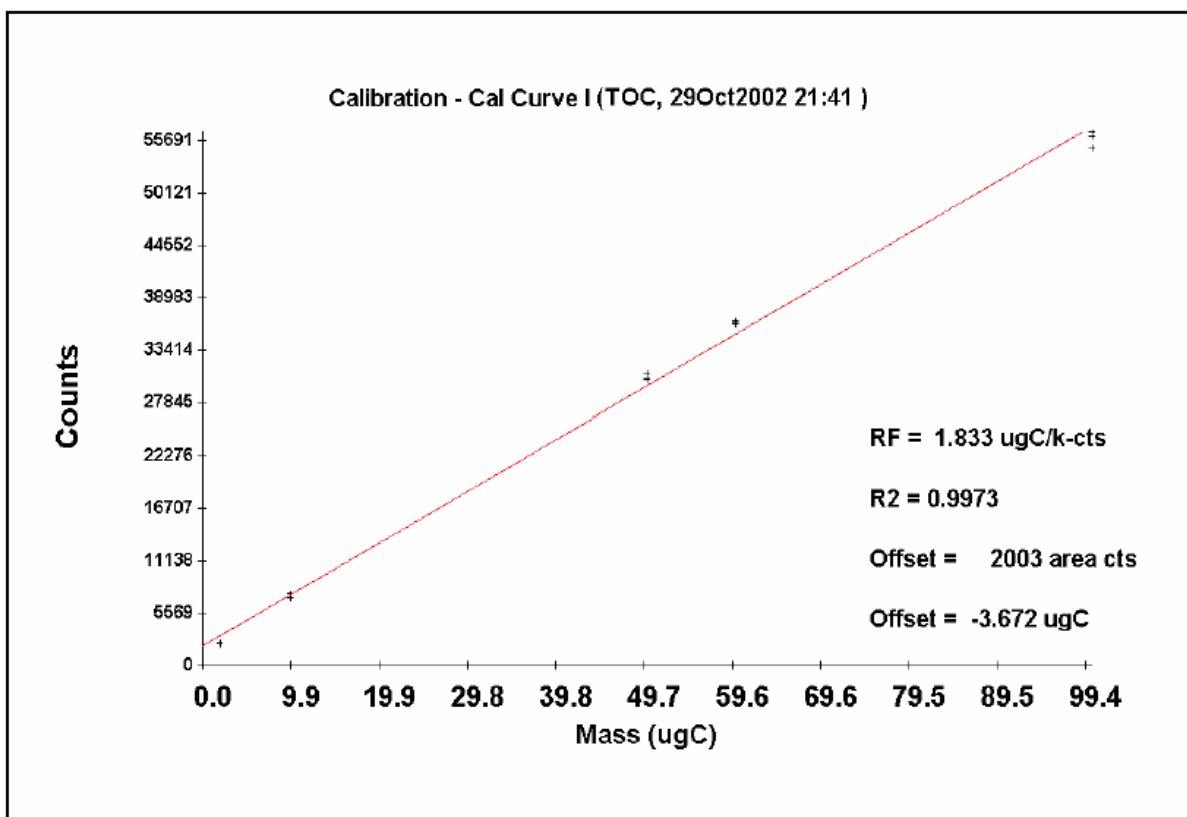


图 3 1010 型 TOC 分析仪采用 KHP 得到的校准曲线

这个试验的第一个目的在于检测 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 4，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，1010 型分析仪能够分析从大约 0.5 到 20 ppm 的样品。这些数据证实：虽然在其它研究中，BSA 是一个难以氧化的蛋白质，只能得到很差的回收率和仪器的响应，但是加热的过硫酸盐技术却能够在整个工作范围内全部消解并且能够得到 BSA 样品的极佳的回收率。而采用二次拟合曲线的仪器，表明其对于 BSA 不能够得到很好的回收率。这些数据表明，在这种情况下，分析仪消解 BSA 的能力已经达到了上限，而且随着样品浓度的增加，而仪器却只能维持相对一致的响应。

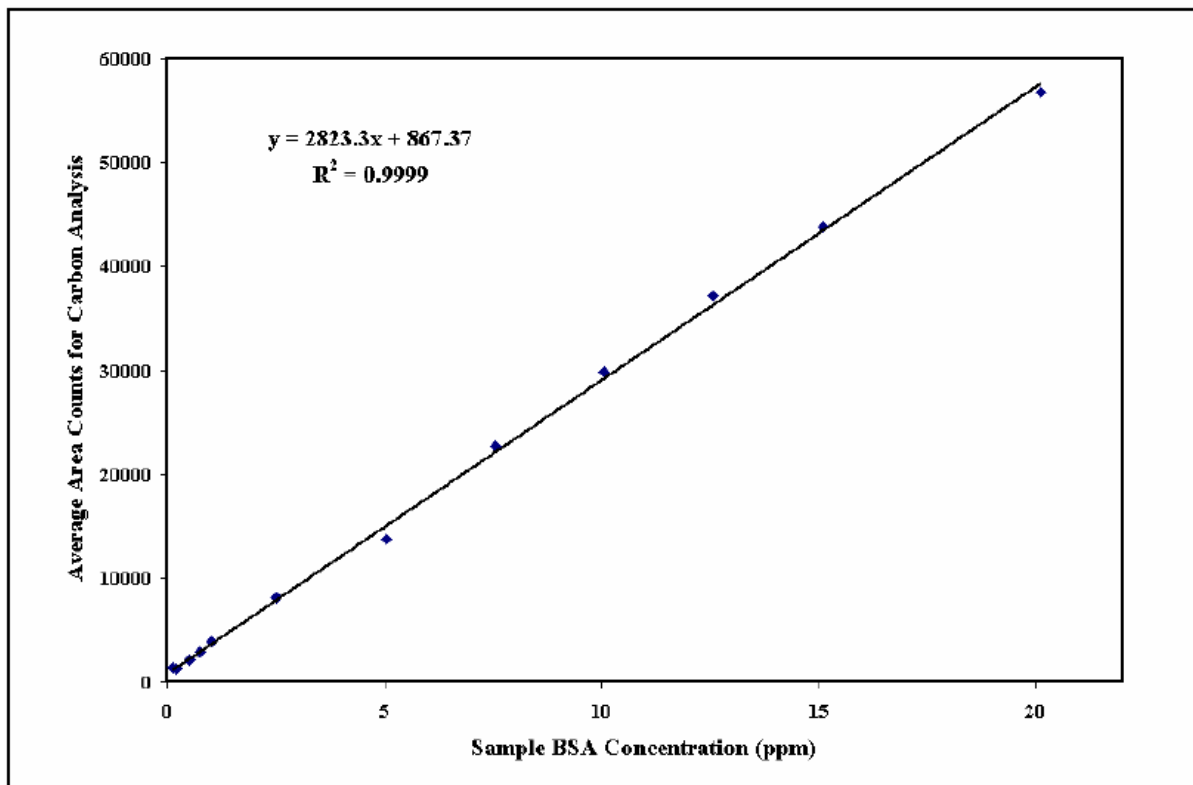


图 4 由 TOC 的浓度与得到的 TOC 面积值绘制的 BSA 样品的浓度曲线

第二个目的在于测试 1010 型分析仪分析 BSA 时不存在样品之间残留影响的能力。了解仪器具有的残留影响的程度是十分重要的，因为这能够为以后的分析结果提供一些解释。例如，在一个实际的清洁残留物样品的序列中，采用不存在残留问题的仪器得到了一个高于规定清洁限值的分析结果，分析人员就能够确认需要再次执行清洁，而不会浪费资源。而来自于已知或怀疑存在残留影响的仪器得到的同样的分析结果将使人产生怀疑，是否需要花费更多的时间或者真的有必要再次清洗设备呢，或者是否是由于仪器的问题而导致结果偏高呢？通过编辑一个在“方法”中讲述的样品序列以证实 1010 型分析仪的能力。样品首先以从低到高的浓度顺序分析，然后按照从高到低的顺序分析。结果显示于表 2 和图 5。基于样品中 BSA 的已知浓度，计算出理论的碳浓度，并与测量到的碳浓度绘制一条曲线。图 5 显示了 1010 型分析仪不存在残留影响。这可以通过几组几乎重合的样品数据以及具有相同的相关系数和线性的最小二元回归曲线得到证实。对于从低到高浓度分析的样品的回归曲线，具有明显残留效应的仪器将有更高的斜率。

最后，表 2 也证实了，当分析类似 BSA 的蛋白质样品时，1010 型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。报告包括 BSA 的理论浓度、理论碳浓度、测量到的碳浓度、百分 RSD 和百分回收率

样品序号	BSA 理论浓度 ppm	理论浓度 ppmC	测量到的浓度 ppmC	% RSD	% 回收率
8	0.503	0.267	0.323	2.314	121.011
9	0.754	0.400	0.448	2.915	111.895
10	1.006	0.534	0.633	1.716	118.576
11	2.515	1.335	1.431	1.598	107.224
12	5.030	2.669	2.452	3.606	91.864
13	7.545	4.004	4.118	2.894	102.853
14	10.06	5.338	5.419	1.647	101.511
15	12.58	6.676	6.788	2.384	101.684
16	15.09	8.008	7.992	0.922	99.806
17	20.12	10.677	10.400	0.678	97.409
18	清洗水				
19	20.120	10.677	10.415	1.645	97.549
20	15.090	8.008	8.134	1.088	101.580
21	12.580	6.676	6.745	1.127	101.040
22	10.060	5.338	5.514	1.424	103.291
23	7.545	4.004	4.212	1.385	105.201
24	5.030	2.669	2.835	1.349	106.213
25	2.515	1.335	1.427	0.732	106.925
26	1.006	0.534	0.610	0.831	114.268
27	0.755	0.400	0.492	1.905	122.885
28	0.503	0.267	0.294	0.380	110.147

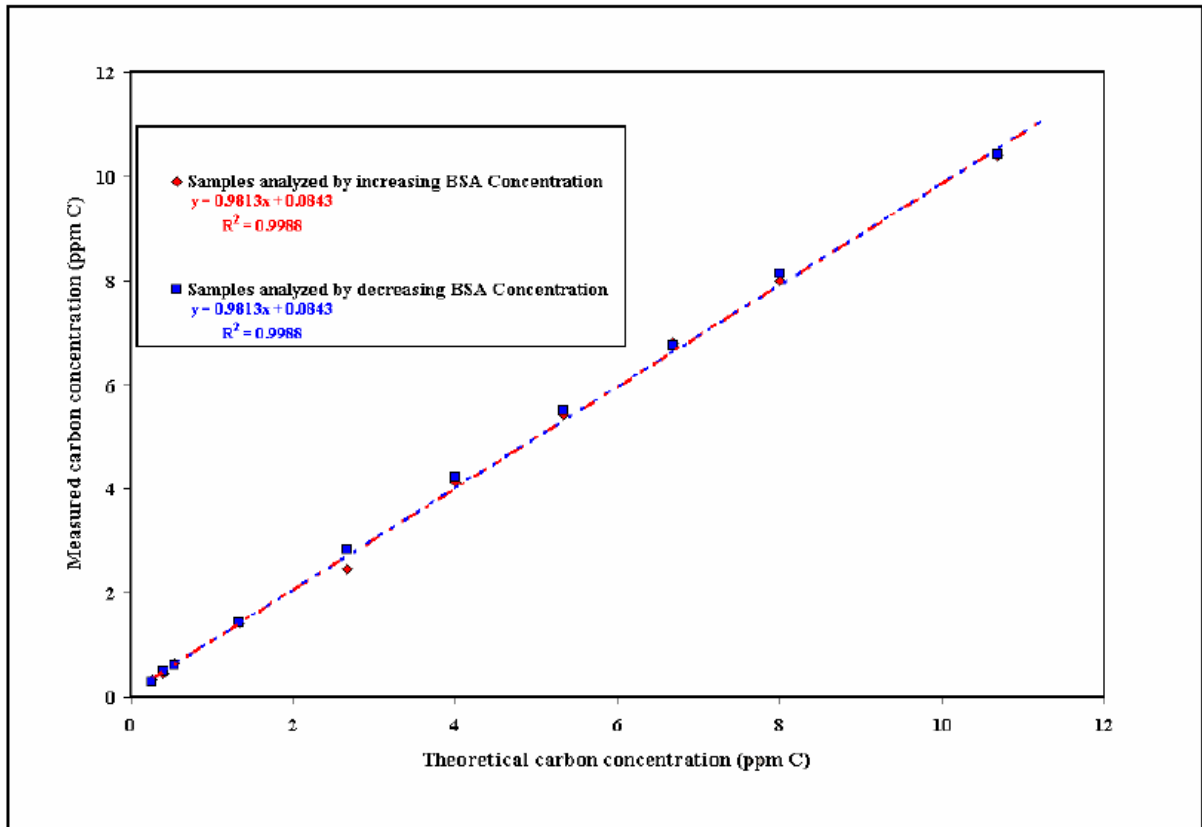


图 5 BSA 样品中的理论碳浓度与测量到的碳浓度的关系图。菱形标志的表示 8-17 号 BSA 样品，方形标记的表示 19-28 号 BSA 样品，对应于表 2 中的样品序列。

这些数据表明：加热的过硫酸盐技术能够以极高的准确度（平均的% RSD 为 1.627）和精密度（平均的%回收率为 106.147）分析 BSA 样品。

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 1010 型 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。1010 型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，用户可以定义方法和样品序列的参数，WinTOC™ 软件完全满足 21 CFR Part 11 的要求，以及内置的报告制作程序——TOC Reporter，这些集于一身的功能为制药行业提供了一台对于报告的数据具有极高可信度的、用于实验室分析的 TOC 分析仪。

参考书目

1. Carter, D. C. ; Ho, J. X., “血清白蛋白的结构”, *Adv. Protein Chem.* 1994 年, 45, 153-203。

Teflon 是 E. I. DuPont De Nemours 公司的注册商标
WinTOC 是 OI 分析仪器公司的商标



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