Ứng Dụng Phân Tích Tổng Carbon Hữu cơ (TOC) Cho Thẩm Định Vệ Sinh Trong Ngành Dược

Giới thiệu

Phân tích TOC giúp tạo ra một quy trình thẩm định vệ sinh nhanh chóng và hiệu quả trong ngành Dược. Bất kỳ một thành phần đơn lẻ của thiết trong cnhà máy Dược xử lý các hoạt chất dược phẩm (APIs) khác nhau thì việc nhiễm chéo giữa các sản phẩm phải được hạn chế tối đa. Việc xác nhận đạt tiêu chuẩn vệ sinh là quá trình được thực hiện từ đầu đến cuối để đảm bảo phương pháp và quá trình vệ sinh thiết bị phải loại bỏ dư lượng sản phẩm và chất tẩy rửa đến mức chấp nhận được theo yêu cầu của 21 CFR 211.67, trong đó, nêu rõ rằng "các thiết bị và dụng cụ phải được làm sạch, bảo trì và vệ sinh theo chu kỳ phù hợp để ngăn ngừa sự cố hoặc khả năng nhiễm có thể làm thay đổi tính an toàn, tính chất, công dụng, chất lượng hoặc độ tinh sạch của sản phẩm thuốc vượt quá các tiêu chuẩn".[1]

Thí nghiệm

Xây dựng quy trình đánh giá mức độ đạt tiêu chuẩn vệ sinh.

Trong khi xây dựng quy trình đánh giá mức độ đạt tiêu chuẩn vệ sinh, mục tiêu chính của quá trình là: chứng minh bằng dữ liệu phân tích rằng mỗi bước trong quy trình đã loại bỏ cả sản phẩm và các chất tẩy rửa đến mức chấp nhận được theo quy định. Tiêu chuẩn của FDA năm 1993 yêu cầu: nền tảng của bất kỳ giới hạn chấp nhận nào cũng phải "chính xác về mặt khoa học". Những giới hạn này khác nhau tùy thuộc vào loại quy trình làm sạch được sử dụng (ví dụ: clean-in-place (CIP) hoặc clean-out-of-place (COP) và quy trình làm sạch được thực hiện giữa các lô sản phẩm cùng loại hay giữa các lô sản phẩm khác loại. Việc hiểu các loại chất phân tích và dư lượng chất tẩy rửa được kiểm tra cũng rất quan trọng (ví dụ: mẫu chất đạm lên men có nguồn gốc động vật và chất hoạt động bề mặt cation). Các thông số này sẽ quyết định phương pháp của quá trình đánh giá.

Phân tích TOC để đánh giá mức độ vệ sinh.

Phân tích TOC đang nhanh chóng trở thành phương pháp phân tích được lựa chọn để đánh giá mức độ vệ sinh vì nhiều lý do. Nhiều công ty dược phẩm đang phát triển phương pháp đánh giá mức độ vệ sinh dựa trên cách tiếp cận sản phẩm: xác định xem có bất kỳ dư lượng không liên quan đến nguồn gốc sản phẩm còn tồn tại hay không (bao gồm các sản phẩm, chất tẩy rửa, hóa chất, dung môi, sản phẩm phụ, chất khử và vi khuẩn). Phương pháp này sẽ đạt hiệu quả cao bằng cách sử dụng phân tích TOC để có thể phát hiện bất kỳ dư lượng hoạt chất dược phẩm hoặc chất tẩy rửa nào có chứa carbon trong cấu trúc phân tử.

Jenkins và cộng sự [2] đã tìm ra sự hỗ trợ đắc lực cho trong thẩm định vệ sinh bằng cách phân tích TOC: "có thể phát hiện TOC ở nồng độ rất thấp, thời gian phân tích nhanh chóng, ít tốn chi phí hơn so với các phương pháp khác và có thể phát hiện tất cả các dư lượng chứa carbon". Bằng cách so sánh TOC, HPLC, sắc ký lớp mỏng, đo quang phổ (UV), ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), điện di, pH, độ dẫn điện và phân tích trực quan, họ thấy rằng phân tích TOC hiệu quả tương đương hoặc hơn cả phương pháp HPLC và đo quang phổ.

Các lý do nên lựa chọn phân tích TOC khác như:

- Chi phí đầu tư, chi phí vận hành và bảo trì thấp so với HPLC
- Dễ sử dụng
- Độ nhạy cao
- Có độ phục hồi cao kể cả đối với các chất khó phân huỷ
- Tối thiểu các yếu tố gây nhiễu

Từ khóa:
21 CFR 211.67, Thẩm Định Vệ Sinh, Phân Tích TOC,Vệ sinh hệ thống, Thẩm Định, Sản Xuất Dược Phẩm, Active Pharmaceutical Ingredients, **Aurora 1030W TOC Analyzer**, Bovine Serum Albumin, Clean In Place, NDIR

© 2019 Xylem Inc.

Phương pháp

Việc kiểm tra kỹ thuật phân tích với (các) hợp chất mẫu đại diện cho các loại hoạt chất thường dùng trong quá trình thẩm định vệ sinh thực tế sẽ chứng minh tính mạnh mẽ, đúng đắn và chuẩn xác của kỹ thuật.

Albumin huyết thanh bò.

Albumin huyết thanh bò (Bovine serum albumin - BSA) là một chất có thể được sử dụng như một chất mô hình tốt cho các protein và hoạt chất dược phẩm (API) khó oxy hóa khác. Albumin huyết thanh, một protein phổ biến trong huyết thanh máu của tất cả động vật có vú, là một trong những protein được mô tả chi tiết và nhiều người biết đến nhất. Đặc biệt, Albumin huyết thanh bò (BSA) được định dạng bằng HNMR và tinh thể học tia X có hình dạng trái tim với 607 amino acid và khối lượng phân tử xấp xỉ 66,317.25 amu.[3] Được sử dụng rộng rãi trong ngành dược phẩm như một tác nhân hoạt động, Albumin huyết thanh bò cũng là một hợp chất mô hình tốt để phát triển phương pháp thẩm định vệ sinh đáng tin cậy. Protein rất khó bị oxy hóa, và khi phương pháp phát hiện TOC được phát triển bằng cách sử dụng hợp chất protein làm tác nhân thử nghiệm, có thể đạt được độ tin cậy cao trong các kết quả phân tích vì chúng liên quan đến các chất hoạt động khác và các chất phân tích chống oxy hóa ít hơn.

Thiết bị.

Mục tiêu của nghiên cứu này là xác định khoảng đáp ứng tuyến tính của thiết bị phân tích TOC sử dụng BSA làm hợp chất mô hình để phát triển phương pháp thẩm định vệ sinh. Một thiết bị phân tích TOC OI Analytical Aurora 1030W và bộ lấy mẫu tự động 1088 (Hình 1) được sử dụng trong nghiên cứu này.

Hình 1. Thiết bị phân tích TOC Aurora 1030W

Chuẩn bị dung dịch.

Bột đông khô BSA (Bio-Plus Laboratories) được hoà tan với nước TOC thấp (<100 ppb) theo hướng dẫn để tạo ra dung dịch gốc (100 mg / L Carbon). Các mẫu BSA được chuẩn bị bằng cách pha loãng dung dịch gốc.

BSA là protein tự nhiên, do đó, nên việc hạn chế tối đa việc lắc dung dịch chuẩn gốc là rất quan trọng, vì việc này sẽ làm BSA dính vào những phần khác của dụng cụ thủy tinh, làm giảm độ phục hồi. Cho nước DI gần đầy bình định mức trước khi thêm BSA vào để pha loãng. Chỉ thực hiện hòa trộn ngay trước khi phân tích.

Thiết bị phân tích TOC được hiệu chuẩn bằng cách sử dụng potassium hydrogen phthalate (C_9HO_4K), hay KHP. Một dung dịch gốc ban đầu có nồng độ carbon 1,000 mg/L được pha loãng với nước TOC thấp (<100 ppb) để chuẩn bị dung dịch gốc dùng trong phân tích. Các dung dịch chuẩn được chuẩn bị bằng cách pha loãng các dung dịch gốc.

Để loại bỏ TIC có trong mẫu, acid phosphoric (H_3PO_4) 5% được chuẩn bị để làm thuốc thử acid. Chất oxy hóa TOC được điều chế bằng cách hòa tan 200 g sodium persulfate (Na_2SO_8) vào 1 L nước TOC thấp. Thiết bị phân tích TOC được cài đặt phương pháp với các thông số được liệt kê trong Bảng 1 để phân tích BSA.

Bảng 1. Các thông số Aurora của một mẫu đối với phân tích BSA

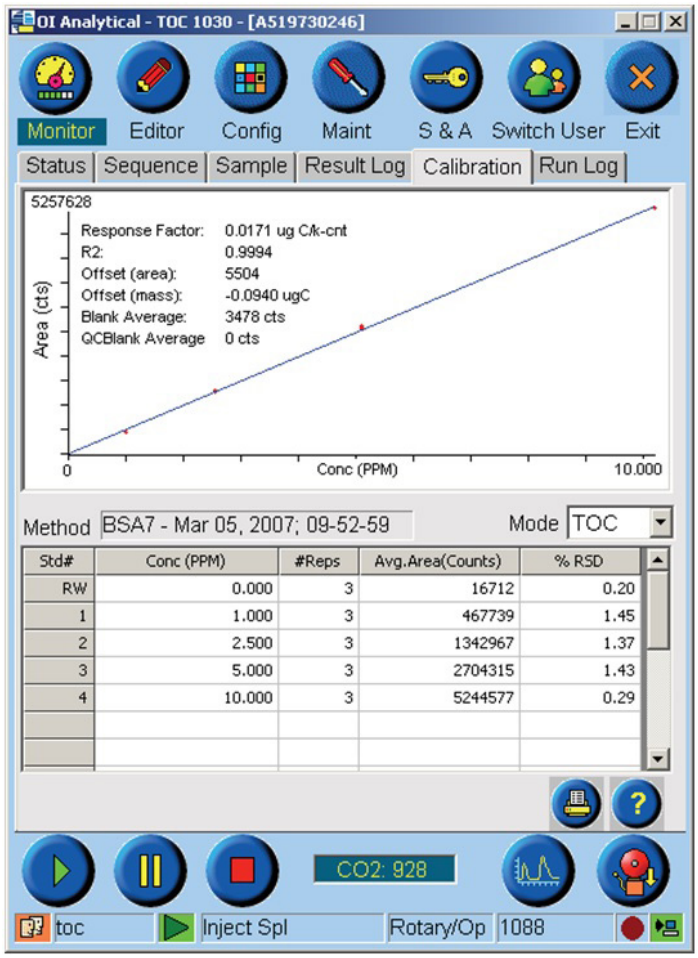
Thông số	Giá trị
Thể tích mẫu	9 mL
Thể tích acid	0.4 mL
Thể tích sodium persulfate	1.2 mL
Thời gian phản ứng TIC	2:00 phút
Thời gian phát hiện TIC	3:00 phút
EPC	20 psi
Thời gian phản ứng TOC	4:30 phút
Thời gian phát hiện TOC	3:30 phútt
Thể tích rửa cho một lần lặp lại	1
Thể tích rửa cho một mẫu	0
Thể tích rửa	20 mL

Các mẫu được phân tích lặp lại 3 lần (mỗi lần sử dụng 9 mL) và các dữ liệu được báo cáo dưới dạng phổ hấp thụ hồng ngoại (đơn vị: area counts), khối lượng carbon (µg C) và nồng độ carbon (mg/L) mỗi lần phân tích và mỗi mẫu. Dữ liệu thống kê được báo cáo gồm độ lệch chuẩn mẫu và độ lệch chuẩn tương đối được thể hiện dưới dạng phần trăm.

Kết quả

Đường cong hiệu chuẩn.

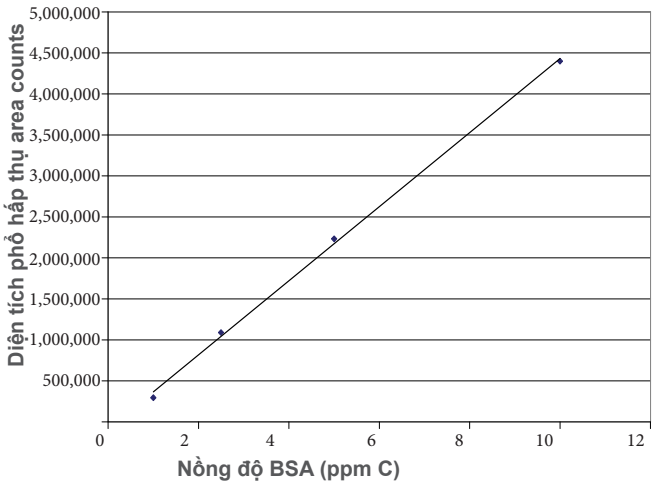
Đường cong hiệu chuẩn được sử dụng trong nghiên cứu này (Hình 2) cho thấy khả năng của thiết bị phân tích TOC Aurora 1030W được hiệu chuẩn trên một phạm vi nồng độ carbon tương đối rộng với độ chính xác cao. Thiết bị được hiệu chuẩn bằng cách sử dụng KHP, dung dịch chuẩn có khả năng oxy hóa dễ dàng và được sử dụng rộng rãi. Đường cong hiệu chuẩn trong Hình 2 được vẽ bằng phần mềm trên máy tính, cùng phiên bản và giao diện với phần mềm sử dụng trên thiết bị Aurora 1030W. Hệ số đáp ứng thể hiện sự phản hồi của thiết bị theo đơn vị µg C trên 1,000 area counts.



Hình 2. Đường cong hiệu chuẩn của thiết bị phân tích TOC Aurora 1030W sử dụng KHP

Kết quả kiểm tra.

Mục tiêu của nghiên cứu này là xác định khoảng tuyến tính về sự phản hồi của thiết bị phân tích TOC 1030W đối với BSA. Khái niệm này tương tự như hiệu chỉnh một thiết bị và cho thấy phạm vi hoạt động của nồng độ BSA trong đó thiết bị cho đáp ứng tuyến tính. Kết quả kiểm tra được thể hiện trong Hình 3 dưới dạng biểu đồ nồng độ BSA trên mỗi mẫu so với sự phản hồi của thiết bị phân tích TOC theo đơn vị area counts. Dữ liệu cho thấy thiết bị Aurora 1030W có khả năng phân tích BSA trong khoảng từ 0.5 đến 20 ppm.



Hình 3. Biểu đồ Nồng độ mẫu BSA được phân tích nồng độ TOC so với phổ hấp thụ area counts

Vì là một protein khó bị oxy hóa, các nghiên cứu khác cho thấy BSA có độ phục hồi và độ đáp ứng của thiết bị thấp. Những dữ liệu này cho thấy kỹ thuật oxy hóa persulfate ở nhiệt độ cao có khả năng phá mẫu triệt để và thu hồi hoàn toàn carbon trong mẫu BSA trong phạm vi hoạt động rộng. Trong khi đó, với những thiết bị có độ phục hồi không hoàn toàn, một đồ thị dạng đường cong bậc hai được sử dụng. Trong những trường hợp đó, dữ liệu thường đại diện cho giới hạn trên của thiết bị dùng để phân tích BSA; khi nồng độ tăng, đáp ứng (kết quả đo) của thiết bị vẫn gần như không đổi.

Bảng 2 càng cho thấy độ đúng đắn và chuẩn xác có thể đạt được với thiết bị Aurora 1030W khi phân tích các mẫu protein như BSA. Để phân tích, các mẫu được chuẩn bị với nồng độ BSA đã biết. Từ đó, nồng độ carbon lý thuyết có thể được tính toán và so sánh với nồng độ carbon đo được. Dựa trên khối lượng phân tử của BSA là 66,317.25 amu và phần trăm carbon theo khối lượng 53,065%, người ta có thể tương quan nồng độ carbon với nồng độ BSA theo công thức sau:

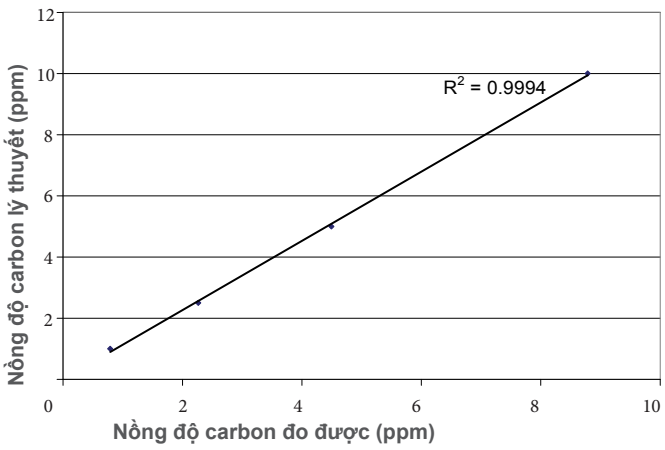
$$\text{ppm C} = \frac{\text{ppm BSA x } 53.065}{100}$$

Bảng 2. Dữ liệu từ các mẫu BSA

Nồng độ carbon lý thuyết (ppm)	Nồng độ carbon đo được (ppm)	% RSD	% Độ phục hồi
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%

Dữ liệu cho thấy khả năng phân tích mẫu BSA với độ chính xác cao (2.5% phần trăm RSD trung bình) và độ lặp lại (87% phần trăm độ phục hồi trung bình).

Xác định độ phục hồi carbon thích hợp là điều cần thiết trong quá trình thẩm định vệ sinh. Độ dốc lý thuyết dựa trên nồng độ phải được xác định để có được đánh giá chính xác về độ phục hồi của hệ thống. Độ phục hồi BSA đã xác định trong Bảng 2 được vẽ thành biểu đồ trên Hình 4, thu được một đường thẳng.



Hình 4. Độ phục hồi carbon BSA

Vì nồng độ carbon lý thuyết trong BSA dự kiến là 53.065%, chúng tôi có thể tính toàn nồng độ carbon thực tế dựa trên phương trình:

$$\frac{\text{(Nồng độ TOC lý thuyết)}}{\text{(Hệ số góc của đường thẳng)}} = \text{Nồng độ TOC thực tế}$$

cho BSA,

$$\frac{53.065}{1.1317} = 46.8896\% \text{ carbon}$$

Việc hiểu rõ độ phục hồi thu được nhờ thiết bị phân tích sẽ có thể thiết lập một phạm vi phù hợp cho các lần vận hành kế tiếp để xác định hàm lượng BSA của các mẫu chưa biết.

Tóm tắt và kết luận

Phát triển một phương pháp thẩm định vệ sinh tổng thể là một hoạt động quan trọng và đòi hỏi sự tỉ mỉ; phương pháp phân tích được sử dụng để phát hiện dư lượng chỉ là một phần nhỏ. Sử dụng BSA như một chất phân tích mô hình có đặc tính tốt và đại diện cho một trong những hợp chất khó oxy hóa nhất được tìm thấy trong ngành dược phẩm, nghiên cứu này đã xác định rằng thiết bị phân tích Aurora 1030 TOC rất phù hợp cho các phân tích trong phòng thí nghiệm cho các mẫu rửa trong và ngoài hệ thống (Clean-In Place và Clean-Out of-Place).

Kỹ thuật oxy hóa persulfate ở nhiệt độ cao và đầu dò hồng ngoại NDIR được sử dụng trong thiết bị Aurora 1030W cùng với những tính năng như phần mềm tuân thủ 21 CFR Part 11 và một chương trình tạo báo cáo tích hợp, kết hợp lại để cung cấp cho ngành dược một thiết bị phân tích TOC giúp các nhà phân tích có thể sử dụng với độ tin cậy cao để thực hiện công tác thẩm định vệ sinh.

Tài liệu tham khảo

1. "Current Good Manufacturing Practice Regulations," Code of Federal Regulations, Title 21, Food and Drugs (General Services Administration, Washington, D.C., 1 April 1973), Part 211.67.
2. Jenkins, K. M., et al., "Application of Total Organic Carbon Analysis to Cleaning Validation," PDA J. Pharm. Sci. & Tech. 50 (1), 6-15 (1996).
3. Carter, D.C.; Ho, J.X., "Structure of Serum Albumin." Adv. Protein Chem. 1994, 45, 153–203.

Nếu có bất kỳ câu hỏi nào thêm?
Vui lòng liên hệ Trung tâm Chăm sóc Khách hàng:

Xylem Analytics - Vietnam
Ho Chi Minh City, Vietnam
Tel: +84 938800104
Email: analytics.vietnam@xyleminc.com
Web: www.xylem-analytics.vn

xylem
Let's Solve Water

O·I·Analytical
a xylem brand