

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2020.01.021

帕立骨化醇残留清洁分析方法的验证及应用

张 振^{1,2}, 汪广厚^{1△}

(1. 北京世桥生物制药有限公司, 北京 101301; 2. 首都医科大学, 北京 100069)

摘要:目的 确定帕立骨化醇注射液在制药设备上的最大允许残留限度,并建立检测帕立骨化醇清洁残留分析方法。方法 色谱柱为Kromasil 100-C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为15%乙腈-乙腈(梯度洗脱),流速为1.0 mL/min,柱温为25℃,检测波长为252 nm。结果 确定最大允许残留限度为0.13 ng/cm²,检测限和定量限分别为0.059 ng和0.198 ng。帕立骨化醇质量浓度在1.98~33.02 ng/mL范围内与峰面积线性关系良好($r=0.999\ 9$, $n=6$),采用相同的擦拭方式擦拭不同材质(包括不锈钢、有机玻璃、钢化玻璃和聚四氟乙烯),回收率为62.4%~98.2%;精密度、重复性、重现性试验的RSD均小于10.0%;对照品溶液和样品溶液在5℃下储存7 d稳定。结论 该方法灵敏度高,专属性强,准确度高,可用于帕立骨化醇注射液生产后设备清洁效果的评估。

关键词:帕立骨化醇;残留限度;分析方法验证

中图分类号:R927.1

文献标识码:A

文章编号:1006-4931(2020)01-0067-04

Validation and Application of Residual Cleaning Analytical Method for Paricalcitol

ZHANG Zhen^{1,2}, WANG Guanghou¹

(1. Beijing Scieure Pharmaceutical Co., Ltd., Beijing, China 101301; 2. Capital Medical University, Beijing, China 100069)

Abstract: Objective To determine the maximum allowable residue limit of Paricalcitol Injection on pharmaceutical equipment and to develop a new cleaning analytical method for testing the paricalcitol residual. **Methods** The chromatographic column was Kromasil 100-C₁₈ column(250 mm×4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was 15% acetonitrile-acetonitrile, with a gradient elution rate of 1.0 mL/min, the column temperature was 25℃, and the detection wavelength was 252 nm. **Results** The maximum allowable residue limit was 0.13 ng/cm²; the limits of detection and quantitation were 0.059 ng and 0.198 ng, respectively, the mass concentration of paricalcitol had good linear relationship with the peak area in the range of 1.98~33.02 ng/mL ($r=0.999\ 9$, $n=6$). Different materials(including stainless steel, plexiglass, tempered glass, and polytetrafluoroethylene) were wiped with the same wiping method and recovered. The recovery rates were 62.4%~98.2%, the RSDs of the precision, repeatability, and reproducibility tests were all less than 10.0%, the reference solution and the sample solution were stable at 5℃ for 7 d. **Conclusion** This method has high sensitivity, strong specificity and good accuracy, which can be used to evaluate the cleaning effect of equipment after the production of Paricalcitol Injection.

Key words: paricalcitol; residue limit; validation of analytical method

第一作者:张振,男,蒙古族,大学本科,主要从事药物分析工作,(电子信箱)zhangz@scieure.com。

△通信作者:汪广厚,男,硕士研究生,主要从事药物分析工作,(电子信箱)wanggh@scieure.com。

参考文献:

- 北京:中国医药科技出版社,2010:181-182.
- [1] 张 杰,李 立,王海玉. 羊胎素对小鼠免疫功能促进作用的研究[J]. 中国卫生检验杂志,2005,15(9):1142-1149.
- [2] 陈新霞,石根勇,吕中明. 羊胎素抗氧化作用的研究[J]. 中国生化药物杂志,2002,23(6):291-292.
- [3] 刘少娟,陈冠敏,何 聆. 羊胎素延缓衰老作用的实验研究[J]. 环境与职业医学,2002,19(3):196-197.
- [4] 艾春媚,崔 燎,魏泉德. 羊胎素对体外成骨细胞增殖、分化及矿化功能的影响[J]. 中国骨质疏松杂志,2004,10(4):495-497.
- [5] 杨秀芳,许牡丹,吴明鑫. 活化羊胎素的提取与应用开发[J]. 宝鸡文理学院学报(自然科学版),1999(1):40-41.
- [6] 李培兵,王永辉,邓炳楠. 羊胎素中氨基酸测定与评价[J]. 氨基酸和生物资源,2009,31(3):20-22.
- [7] 陆 晖,闫晓梅,张双全. 羊胎盘活细胞素微量元素和氨基酸组成的分析[J]. 南京师大学报:自然科学版,2001,24(1):79-82.
- [8] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(四部)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:88-89.
- [9] 中国药品生物制品检定所. 中国药品检验标准操作规范[M].
- [10] 严志强,熊耀康,吴巧凤. 茶薪菇总氮含量的测定研究[J]. 浙江中医药大学学报,2007,31(5):622-623.
- [11] 韦 锋,王 琳,闭潇予. 非分散红外法测定水中总氮含量的比较研究[J]. 化学工程师,2019,33(1):23-26.
- [12] 王 键,汪六三,王儒敬. 基于优选波长的复合肥总氮含量可见/近红外光谱分析[J]. 发光学报,2018,39(12):1785-1791.
- [13] 刘丰奎,李云华,刘 聪. 气相分子吸收光谱法测定大量元素水溶肥中的总氮含量[J]. 分析仪器,2018,37(5):61-63.
- [14] 冯芷媚,袁 秦,黄敏菊. 凯氏定氮法对几种胶原类产品中蛋白质含量测定结果分析[J]. 中国医疗器械信息,2018,24(9):26-27.
- [15] 李文韬,周 燕,胡 佳. 凯氏定氮法测定某未知含氮化合物氮含量[J]. 中国卫生标准管理,2016,7(24):110-112.
- [16] 邹显蕾. 抗衰胶囊的质量标准研究[J]. 河南中医,2013,33(7):1154-1155.
- [17] 杨映霞,仇一品,孙玉滨. 鹿哈胶囊中总氮量测定方法研究[J]. 特产研究,2015(2):49-51.

(收稿日期:2019-05-23;修回日期:2019-06-27)

帕立骨化醇(19-去甲-1,25-二羟维生素D₂)是一种选择性维生素D受体激动剂(VDRA),可激发维生素D反应通路产生生物学效应。该药主要用于治疗接受血液透析的慢性肾功能衰竭患者的继发性甲状旁腺功能亢进^[1]。因帕立骨化醇注射液在本公司生产车间存在其他共线产品,为避免交叉污染,需对帕立骨化醇残留物进行检测。本研究中参考药品生产质量管理规范(GMP)指南确定帕立骨化醇注射液在制药设备上的最大允许残留限度为0.13 ng/cm²^[2],参考药典要求^[3],以此限度采用反相液相色谱法^[4]和外标定量的方式,建立帕立骨化醇注射液残留清洁分析方法,并对该方法进行验证^[5-7],以确保此方法能有效地检测清洁帕立骨化醇注射液的生产设备表面残留物,以防止帕立骨化醇对后续产品造成交叉污染^[8]。现报道如下。

1 仪器、试剂与材料

1.1 仪器

1260型高效液相色谱仪(美国Agilent公司);XPE205型电子分析天平(瑞士梅特勒-托利多公司);3-5N型离心机(湖南恒诺仪器设备有限公司);XH-C型旋涡混合器(新宝仪器厂);KH500DE型超声波清洗机(昆山禾创超声仪器有限公司)。

1.2 试剂与材料

帕立骨化醇乙醇溶液对照品(USP对照品,批号为R016S0,含量为508 μg/mL);聚酯纤维棉签(深圳市华晨阳科技有限公司,批号为CY715A);乙腈、乙醇均为色谱纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Kromasil 100-C₁₈柱(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:15%乙腈(A)-乙腈(B),梯度洗脱(见表1);检测波长:252 nm;流速:1.0 mL/min;进样量:100 μL;柱温:25℃;样品室温度:5℃;稀释剂、擦拭溶剂:50%乙醇;擦拭材料:不锈钢板10 cm×10 cm,有机玻璃板,钢化玻璃板和聚四氟乙烯板。

表1 流动相梯度洗脱程序

时间(min)	流动相 A(%)	流动相 B(%)	时间(min)	流动相 A(%)	流动相 B(%)
0	65	35	40.1	65	35
40	20	80	50	65	35

2.2 溶液制备

空白棉签液:预处理中,将100根棉签置500 mL烧杯中,加约250 mL甲醇,超声(功率250 W,频率40 kHz,下同)处理20 min,倒掉甲醇,用250 mL新鲜甲醇重复该步骤2次,再用250 mL水重复该步骤1次,最后用250 mL新鲜乙醇重复该步骤2次。将棉签置60℃烘箱

中烘干或自然风干。将包裹在2根预处理过的干净棉签顶端的棉布剪下,放入离心管中,用1 mL擦拭剂和1 mL稀释剂浸湿,加塞后超声15 min,涡旋2 min,取出棉布,3 000 r/min离心5 min,收集上清液,置自动进样瓶中。

空白辅料液:精密移取6.5 mL帕立骨化醇注射液辅料,置200 mL容量瓶中,用稀释剂定容,摇匀,精密移取1 mL置10 mL容量瓶中,用稀释剂定容,摇匀。

表面干扰溶液:移取1 mL擦拭剂置15 mL塑料离心管中,2根棉签浸湿稀释剂,然后在清洁后的设备表面进行擦拭,取样框范围10 cm×10 cm,在擦拭过程中用棉签蘸少量清洁溶液,首先用1根棉签横向擦拭,翻转棉签再纵向擦拭;然后用另外1根棉签沿对角线擦拭,翻转棉签再沿另一方向对角线擦拭,在擦拭时注意棉签一定沿一个方向擦拭,不可来回擦拭。擦拭过程中要求取样框范围内都要擦到,详见图1。擦拭后按样品溶液配制方法提取,即得。

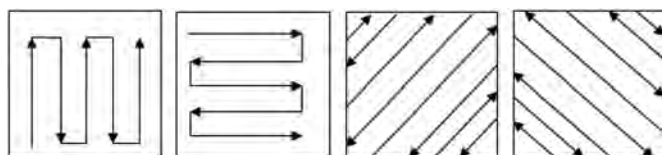


图1 棉签擦拭过程

对照溶液:精密移取帕立骨化醇 USP 对照品溶液,用稀释剂稀释成质量浓度为6.5 ng/mL的溶液,即得。

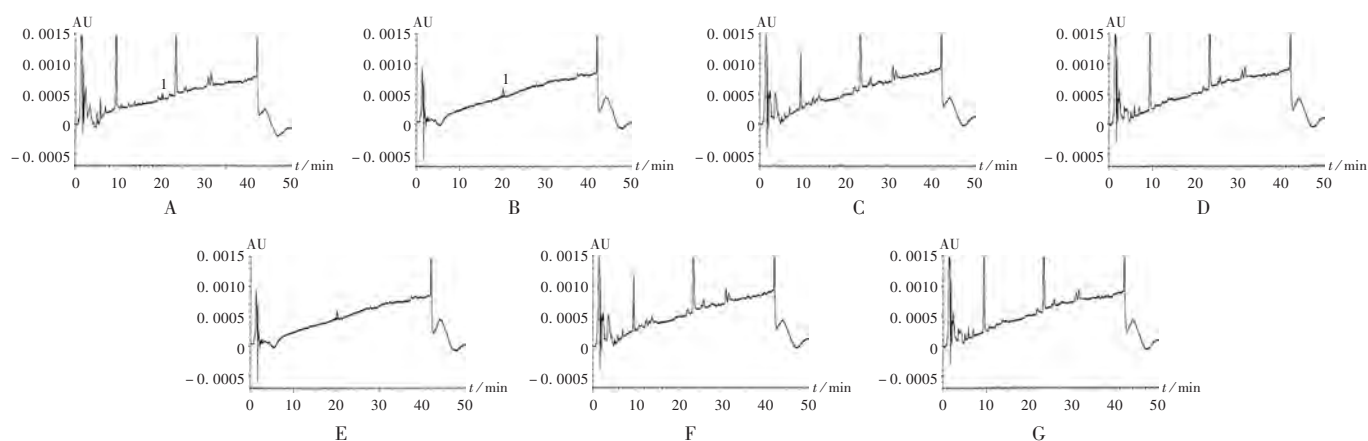
标准添加溶液:精密移取帕立骨化醇 USP 对照品溶液适量,用稀释剂稀释成质量浓度约为0.13 μg/mL的溶液,即得。

样品溶液:用微量注射器分别在3块清洁过的10 cm×10 cm不锈钢板均匀滴加标准添加液100 μL,让其自然风干。用2根预处理过的棉签按棉签擦拭过程擦拭,然后将棉签顶端包裹的棉布剪下,放入上述装有1 mL擦拭剂的离心管中,加入1 mL稀释剂,盖紧盖子。超声处理15 min,再涡旋2 min,取出棉布,3 000 r/min离心5 min,收集上清液。

2.3 方法学考察

专属性试验:分别取稀释剂、擦拭剂、空白棉签液、空白辅料液、对照溶液、表面干扰溶液和样品溶液各100 μL注入液相色谱仪,按拟订色谱条件进样,记录色谱图(见图2),可见,稀释剂、擦拭剂、空白棉签、空白辅料、表面干扰溶液在主峰位置均无干扰。

检测限和定量限测定:取帕立骨化醇对照品适量,并用稀释剂稀释。取信噪比(S/N)约为3的溶液作检测限溶液,按拟订色谱条件进样测定,得检测限为0.059 ng。取S/N约为10的溶液作定量限溶液并测定,得定量限为0.198 ng。



1. 帕立骨化醇

A. 样品溶液 B. 对照溶液 C. 表面干扰溶液 D. 空白棉签液 E. 空白辅料液 F. 擦拭剂 G. 稀释剂

图2 高效液相色谱图

线性关系考察:精密移取帕立骨化醇 USP 对照品溶液,用稀释剂稀释得质量浓度分别为 1.98, 6.60, 13.21, 19.81, 26.42, 33.02 ng/mL 的对照品系列溶液,分别精密量取 100 μ L,以上述色谱条件测定其峰面积,以溶液的质量浓度(X , ng/mL)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程 $Y = 474.02X - 49.72$, $r = 0.9999$ ($n = 6$)。结果表明,帕立骨化醇质量浓度在 1.98 ~ 33.02 ng/mL 范围内与峰面积线性关系良好。

回收试验:取 3 块洁净的 10 cm $\times$ 10 cm 擦拭材料,用微量注射器分别均匀滴加标准添加溶液 50, 100, 150 μ L,让其自然风干,每个水平平行制备 3 份。然后用 2 根预处理过的棉签按棉签擦拭过程擦拭并提取棉签,按上述色谱条件检测,并计算回收率和校正因子。结果见表 2。

表2 回收试验结果($n = 3$)

材质	水平 (%)	回收率(%)			$\bar{X}$ (%)	RSD (%)	校正因子
		1	2	3			
不锈钢	50	98.7	94.7	101.2	98.2	3.4	1.0
	100	93.5	89.4	94.1	92.3	2.8	
	150	93.7	92.8	96.4	94.3	2.0	
钢化玻璃	50	88.9	90.8	85.9	88.5	2.8	1.1
	100	81.7	89.0	90.8	87.2	5.5	
	150	91.6	92.8	91.5	92.0	0.8	
有机玻璃	50	67.2	63.8	67.4	66.1	3.1	1.6
	100	61.5	61.9	63.8	62.4	1.9	
	150	63.7	83.1	68.2	71.7	14.2	
聚四氟乙烯	50	83.8	61.7	66.8	70.8	16.4	1.4
	100	71.8	75.9	72.0	73.2	3.2	
	150	89.2	93.0	81.3	87.8	6.8	

精密密度试验:取 100 μ L 对照溶液,按色谱条件分别在同一时间重复进样 6 次,考察日内精密密度,连续 3 d 重复进样 6 次,考察日间精密密度,并记录峰面积。结果

RSD 均小于 2.0% ($n = 6$),表明仪器精密密度良好,详见表 3。

表3 仪器精密密度试验结果($n = 6$)

进样次数	日内精密密度	日间精密密度		
		第 1 天	第 2 天	第 3 天
1	2 720	2 720	2 747	2 887
2	2 722	2 722	2 701	2 814
3	2 763	2 763	2 770	2 796
4	2 746	2 746	2 722	2 811
5	2 753	2 753	2 729	2 828
6	2 792	2 792	2 738	2 849
$\bar{X}$	2 749		2 772	
RSD(%)	1.0		1.8	

重复性试验:依法制备并测定 6 份 100% 准确度水平样品。结果各样品的取样回收率均在 87.6% ~ 93.5% 之间, RSD 为 2.9%, 表明方法重复性良好。

重现性试验:由另外一名试验员在不同日期,使用不同的液相系统和不同的色谱柱,按 100% 准确度水平样品的制备方法制备 6 份不锈钢样品溶液,并与重复性结果进行比较。经计算,样品取样回收率均在 105.5% ~ 125.7% 之间, RSD 均不超过 7.0%, 2 名试验员差值为 16.5%, 表明方法重现性良好。

稳定性试验:将对照品和样品溶液储存于 5 $^{\circ}$ C 条件下,并分别于 0, 1, 2, 3, 5, 7 d 测定。经计算,与 0 d 回收率的差值均不超过 10.0%, 表明对照品溶液和样品溶液在 5 $^{\circ}$ C 条件下存储 7 d 稳定。

2.4 残留量检测

采用该清洁分析方法对我厂车间生产帕立骨化醇注射液后并完成清洁的设备进行擦拭取样,共评估 27 个点,编号为 SC1 - SC27,其中 SC26 的检测结果为 0.08 ng/cm²,其他点均未检测出残留。

3 讨论

目前车间生产的产品为共线生产,存在产品间的交叉污染风险。控制交叉污染的有效措施之一就是对产品进行清洁验证,目的是证明所有与产品接触的设备所使用的清洗程序能有效地除去产品残留,达到预先确定的限度,从而达到对下批产品无影响的目的。目前计算残留限度的方法为 $1/1\,000$ 日剂量,半数致死量(LD_{50})和 10×10^{-6} 。上述判定是根据基于风险防止药品生产中交叉污染及“共用设施中不同药品生产风险识别所用基于健康的暴露限设定指南”实施问题的征求意见稿^[9]。2018年4月,该指南最终稿发布,第4季度做出相应的修订,所有产品的清洁限度均需用每日允许暴露量(PDE)进行计算,应根据所涉及物料,合理确认产品残留。故本研究的最大允许残留限度分别采用了 10×10^{-6} 、最低日治疗剂量、 LD_{50} 和PDE 4种方式进行计算,限度分别为1.58,0.13,0.15,0.16 ng/cm²。可见基于最低日治疗剂量,帕立骨化醇注射液的最大允许残留限度最低,风险最大,因此采用该限度作为限度水平。试验过程中取样面积为100 cm²,故标准溶液浓度为6.5 ng/mL($100\text{ cm}^2 \times 0.13\text{ ng/cm}^2 \div 2\text{ mL} = 6.5\text{ ng/mL}$)。2 mL为样品总体积,包括1 mL的擦拭剂及1 mL稀释剂。

清洁分析方法开发过程中,关键点分别为样品的擦拭提取和分析方法的专属性、灵敏度和可重复性。经多次试验最终选取了50%乙醇作为擦拭溶剂^[10-11]和稀释溶剂。为消除空白棉签的干扰,将方法设置为梯度洗脱,为增加灵敏度,降低了样品的稀释倍数,增加了样品的进样量,同时需要保证良好的峰形。由于在清洁擦拭取样过程中,人员操作非常关键,为保证方法的可重复性及重现性^[12],文中进行相应考察,结果良好。

由于在生产过程中物料会与不同材质的生产设备相互接触,不同的材质对帕立骨化醇的吸附能力存在差异,采用相同的擦拭回收方法,可能会出现取样回收结果不一致的情况,故对不同材质均进行了回收率研究^[13],包括不锈钢、钢化玻璃、有机玻璃和聚四氟乙烯。结果4种材质所得结果均符合标准,但不同材质间的回收率有明显差异。

因为制药设备清洁验证过程中,样品并不能一起送至实验室,有时间隔会很长,为了节约时间和成本,需要尽量将样品一起检测,所以稳定性研究非常必要。不同

液稳定性研究时,如果药品不具备良好的稳定性,可在低温下进行研究;如果药品非常不稳定,那么应同时考察残留的药品降解产物,避免残留的降解产物对其他产品造成污染。

综上所述,该方法灵敏度、准确性、重复性和稳定性均良好,适用于帕立骨化醇注射液清洁残留样品的检测。在清洁验证取样时,应采用50%乙醇作为擦拭溶剂,为降低风险,最后结果应用最大校正因子值1.6进行校正^[14],以有效控制交叉污染。

参考文献:

- [1] 黄仲义,黄嘉骅,赵永红. 帕立骨化醇的临床药理学[J]. 中国新药与临床杂志,2013,32(11):859-864.
- [2] 国家食品药品监督管理局药品认证管理中心. 口服固体制剂:药品GMP指南[M]. 北京:中国医药科技出版社,2011:181-193.
- [3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(四部)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:374-377.
- [4] 管玉华,徐春明. 药品清洁验证中残留物检测的分析方法选择[J]. 中国医疗前沿,2013,8(22):92-96.
- [5] 陈妍纯,吴岩平. 制药设备清洁残留物的分析方法验证[J]. 中国现代药物应用,2013,7(6):139-140.
- [6] 张婷,孙大鹏,肖俊杰,等. 格列美脲片清洁验证分析方法研究[J]. 北方药学,2012,9(1):9-10.
- [7] 刘浩,薛瑾,郭金丽. HPLC法测定头孢地嗪钠清洁残留物[J]. 药物分析杂志,2009,29(7):1213-1215.
- [8] 陈雯秋. 清洁验证中的分析方法验证[J]. 中国药业,2005,14(4):17-19.
- [9] EMA. Questions and answers on implementation of risk-based prevention of cross-contamination in production and 'Guideline on setting health-based exposure limits for use in risk identification in the manufacture of different medicinal products in shared facilities' (EMA/CHMP/CVMP/SWP/169430/2012) [EB/OL]. (2018-04-19) [2019-05-20]. https://www.ema.europa.eu/documents/other/questions-answers-implementation-risk-based-prevention-cross-contamination-production-guideline_en.pdf
- [10] 沈莉,余宝锋. 清洁验证中盐酸胺碘酮残留物分析方法的验证[J]. 中国药业,2005,14(4):54-55.
- [11] 梁毅,丁越. 药品生产设备清洁验证关键点的研究[J]. 中国药房,2012,23(33):3073-3075.
- [12] 张璇,于庆华,王自远,等. 生产过程清洁验证残留物阿哌沙班的HPLC法测定[J]. 上海医药,2016,37(9):76-78.
- [13] 刘华本,陈晓平,范愿军. 制药设备清洁验证的关键步骤[J]. 医药导报,2009,28(5):681-683.
- [14] 王思寰,吴越,王玉,等. 药品分析方法验证要点的讨论[J]. 药物分析杂志,2018,38(9):1646-1651.

(收稿日期:2019-06-10;修回日期:2019-07-04)

本栏目由

国药控股云南有限公司

协办