

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2021.11.015

总有机碳分析方法用于复方氨基酸(19)丙谷二肽注射液 清洁验证效果考察

张 振^{1,2}, 申京建², 赵 明^{1△}

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

摘要:目的 探讨总有机碳分析法用于复方氨基酸(19)丙谷二肽注射液清洁验证的效果。方法 采用棉签擦拭法擦取清洁验证样品;采用总有机碳分析法测定复方氨基酸(19)丙谷二肽注射液中污染物的含量,氧化剂流速为 0.1 $\mu\text{L}/\text{min}$ 。结果 N(2)-L-丙氨酰-L-谷氨酰胺质量浓度在 0.199~2.988 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内与总有机碳响应值线性关系良好;检测限和定量限分别为 0.018 19 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 0.054 47 $\mu\text{g}/\text{mL}$;精密度试验结果的 RSD 为 2.92% ($n=6$);平均擦拭回收率为 104.73%, RSD 为 3.83% ($n=9$);供试品溶液在室温下放置 12 h 稳定。结论 该方法分析时间短、灵敏度高、结果准确,可用于复方氨基酸(19)丙谷二肽注射液生产后的清洁验证。

关键词:总有机碳分析法;棉签擦拭法;清洁验证;复方氨基酸(19)丙谷二肽注射液;残留限度

中图分类号:R917

文献标志码:A

文章编号:1006-4931(2021)11-0053-03

Application of Total Organic Carbon Method in Cleaning Validation of Compound Amino Acid(19) and N(2)-L-Alanyl-L-Glutamine Injection

ZHANG Zhen^{1,2}, SHEN Jingjian², ZHAO Ming¹

(1. School of Pharmaceutical Sciences, Capital Medical University, Beijing, China 100069; 2. Beijing Sciecare Pharmaceutical Co., Ltd., Beijing, China 101301)

Abstract: Objective To investigate the application effect of total organic carbon(TOC) method in the cleaning validation of new type Compound Amino Acid(19) and N(2)-L-Alanyl-L-Glutamine Injection. **Methods** Swab wiping method was used to wipe cleaning validation samples, and TOC analyzer was used for the content determination of pollutants in Compound Amino Acid(19) and N(2)-L-Alanyl-L-Glutamine Injection. The flow rate of oxidant was 0.1 $\mu\text{L}/\text{min}$. **Results** There was a good linear relationship between N(2)-L-alanyl-L-glutamine concentration and TOC response value in the range of 0.199~2.988 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The limit of detection (LOD) and limit of quantification(LOQ) were 0.018 19 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 0.054 47 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively. RSD of stability tests was 2.92% ($n=6$). The average wipe recovery was 104.73% with RSD of 3.83% ($n=9$). The test solution was stable within 12 h at room temperature. **Conclusion** The method has the advantages of short analysis time, high sensitivity and good accuracy, which can be used to evaluate the cleaning effect of the equipment after the production of Compound Amino Acid(19) and N(2)-L-Alanyl-L-Glutamine Injection.

Key words: total organic carbon analysis method; swab wiping method; cleaning verification; Compound Amino Acid(19) and N(2)-L-Alanyl-L-Glutamine Injection; residue limit

《口服固体制剂:药品 GMP 指南》^[1]中对清洁验证提出要求,以避免与设备表面接触的活性药物成分和其他药品产生交叉污染,最大限度地保证患者的用药安全。目前,多采用高效液相色谱(HPLC)法测定单组分药品的含量,以进行清洁验证。但对于复方制剂,尤其是多组分复方制剂,如采用 HPLC 法,需保证所有组分能有效分离,且各组分均有足够灵敏度才能保证残留物质的有效检出和定量^[2]。总有机碳(TOC)法^[3]在清洁验证中,特别是在复方制剂、中药制剂^[4]、生物制品^[5]的应用中越来越广泛。相比 HPLC 法,TOC 法灵敏度更高,分析时间短,且对辅料、清洁剂及未知物质均具有检出能力^[6]。此外,TOC 法属非专属性方法,只需测定 TOC 的含量,无需进行各组分的分离,方法更简易。复方氨基酸(19)

丙谷二肽注射液中共有 20 种氨基酸物质^[7],均可溶于水,由于注射液中 N(2)-L-丙氨酰-L-谷氨酰胺的浓度占比最大,故本研究中以 N(2)-L-丙氨酰-L-谷氨酰胺为指标物,建立了该注射液生产后清洁验证样品的 TOC 分析法。现报道如下。

1 仪器、试药与材料

1.1 仪器

TOC900 型总有机碳分析仪(美国 GE 公司); BP211D 型电子天平(德国赛多利斯公司,精度为 0.01 mg); KH-500DE 型超声波清洗机(昆山市超声仪器有限公司,功率为 500 W,频率为 40 kHz)。

1.2 试药

N(2)-L-丙氨酰-L-谷氨酰胺对照品(中国食

第一作者:张振,男,硕士研究生,研究方向为药物分析,(电子信箱)zhangz@sciecare.com。

△通信作者:赵明,女,博士研究生,教授,研究方向为小分子纳米药物,(电子信箱)maozhao@126.com。

品药品检定研究院,批号为140702-201102,纯度为99.8%);聚酯纤维棉签(深圳市华晨阳科技有限公司,批号为CY715A)。

1.3 材料

10 cm × 10 cm 的不锈钢板。

2 方法与结果

2.1 溶液及样品制备

稀释剂检查:量取40 mL 稀释剂(水,TOC的质量浓度小于0.1 μg/mL),加入一个TOC小瓶中,并测定TOC。

空白棉签预处理:取20支棉签,置1 000 mL 烧杯中,量取稀释剂400 mL 浸没棉签,密封,超声10 min,静置30 min,振摇洗涤1 min,甩去遗留水分,加入稀释剂400 mL,浸没棉签,再振摇洗涤1 min,甩去遗留水分,重复上述操作5次,即得处理过的棉签(棉签TOC的质量浓度应小于0.25 μg/mL)。

空白棉签样品制备:取1根处理过的棉签,切除末端,放入TOC小瓶中,加入40 mL 稀释剂,放置1 h,取出,测定。

样品制备:取1根处理过的棉签,加稀释剂浸湿,用1根取样棉签按擦拭取样规程擦拭100 cm²的取样部位,擦拭路线及方法见图1。按图1 A 的路线,用棉签的一侧擦拭,擦拭时尽量覆盖全部面积,用力均匀;使用同1根棉签的另一面,按图1 B 的路线擦拭;依次按图1 C 和图1 D 的路线,用同1根棉签的不同侧面擦拭。擦拭完毕后,将棉签末端切除,放入装有40 mL 稀释剂的TOC小瓶中,静置1 h,取出棉签,将该溶液稀释10倍后进行测定。

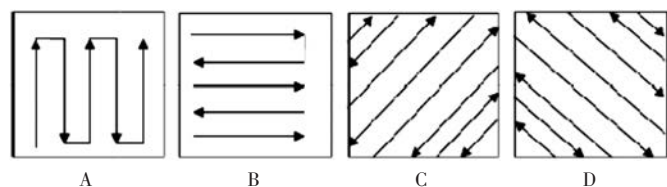


图1 棉签擦拭路线及方法

Fig.1 Swab wiping route and method

2.2 方法学考察^[8-9]

检测限和定量限考察:将处理过的棉签(切除末端)放入TOC小瓶中,用40 mL 稀释剂浸泡,静置1 h,制备10份,取出,测定,记录TOC响应值。结果响应值的平均值为0.058 23 μg/mL,标准偏差为5.60;当相对自由度为n-1、自由度为9、置信度为99%时,t为3.25(n=10)。按公式分别计算检测限和定量限。检测限=t×标准偏差,定量限=3×检测限。结果检测限和定量限分别为0.018 19 μg/mL 和0.054 47 μg/mL。

线性关系考察:取N(2)-L-丙氨酸-L-谷氨酰胺对照品适量,精密称定,配制质量浓度分别为0.199, 0.498, 0.996, 1.494, 1.992, 2.988 μg/mL 的系列对照品溶液,进样测定,并记录TOC响应值,以对照品质量

浓度(X, mg/mL)为横坐标、TOC响应值为纵坐标(Y)进行线性回归,得回归方程 $Y = 362.8625X + 277.7363$, $r = 0.9968$ (n=6)。结果表明,N(2)-L-丙氨酸-L-谷氨酰胺的质量浓度在0.199~2.988 μg/mL 范围内与TOC响应值线性关系良好。

擦拭回收试验^[10-11]:取N(2)-L-丙氨酸-L-谷氨酰胺对照品9.96 mg,精密称定,用稀释剂稀释成质量浓度为1 mg/mL 的溶液,作为标准添加液。取3块10 cm × 10 cm 的洁净不锈钢板,用微量注射器分别均匀滴加标准添加液400, 600, 800 μL,自然风干,平行制备3份,取1根预处理过的棉签,按2.1项下方法制备样品,并提取擦拭回收样品,进样测定,根据回归方程计算测得量,依法计算回收率。结果见表1。

表1 擦拭回收试验结果(n=9)

Tab.1 Results of the wipe recovery test(n=9)

标准添加 液量(μL)	TOC (μg/mL)	加入量 (μg)	测得量 (μg)	回收率 (%)	$\bar{X}$ (%)	RSD (%)
400	0.664	397.60	425.80	107.03	104.73	3.83
	0.643	397.60	402.65	101.21		
	0.678	397.60	441.23	110.91		
600	0.835	596.40	614.30	102.92		
	0.820	596.40	597.76	100.15		
	0.824	596.40	602.17	100.88		
800	1.020	795.21	818.23	102.79		
	1.070	795.21	873.35	109.72		
	1.050	795.21	851.30	106.95		

精密密度试验:按擦拭回收试验平行制备6份添加600 μL 标准添加液的样品,进样测定。结果TOC响应值的RSD为2.92% (n=6),表明仪器精密密度良好。

稳定性试验:取稀释剂、空白棉签溶液及样品溶液,分别于0和12 h 时进样测定,并依次记录TOC响应值,考察各溶液的稳定性。结果见表2。

表2 稳定性试验结果(×10⁻³ μg/mL)

Tab.2 Results of the stability test(×10⁻³ μg/mL)

时间(h)	稀释剂	空白棉签溶液	样品溶液
0	53.10	153.00	772.00
12	54.10	148.00	773.00

2.3 清洁验证样品测定结果

为了确认样品直接接触的设备、系统或设施清洁后能保证化学成分和上一批产品可能的残留物在可接受范围内^[12],采用风险评估法选取取样位置^[13],并按2.1项下取样方式取样,测定TOC响应值。按照生产流程,涉及设备清洁验证样品结果见表3。

3 讨论

3.1 允许残留限度^[14]确定

按10 μg/mL 标准计算,允许残留限度为12.04 μg/cm²,

表3 清洁验证样品检测结果

Tab. 3 Results of cleaning validation of the samples

设备名称	取样点	测试结果 ($\times 10^{-3} \mu\text{g/mL}$)
称量铲	称量铲	128
DEC型真空吸料系统	吸枪内表面	124
	物料输送管密封圈	103
混料罐	混合罐内壁	153
	物料混料管路	132
	物料输送管路	304
配液罐	入口	123
	罐内壁	108
	喷淋球上方	86.4
脱氧罐	入口	176
	喷淋球上方	112
	罐内壁	121
过滤器	0.45 μm 过滤器滤壳内壁	93.0
	0.22 μm 过滤器滤壳内壁	432
产品罐	入口	122
	罐内壁	111
	喷淋球上方	115
过滤器	0.22 μm 过滤器滤壳内壁	86.4
灌装系统	计量储罐药液输送管路	176
	计量储罐内壁	181
	喷淋球上方	122
	罐后管道	148
	分配器内壁	278
	药液针头快接口	128
	针头套管表面	217

TOC 分析结果使用 TOC 评判,故需将残留限度转换为 TOC 限值,20 种氨基酸中牛磺酸的含碳量最低为 19.2%,则 TOC 限值= $12.04 \mu\text{g}/\text{cm}^2 \times 19.2\% = 2.31 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 。根据样品制备过程进行折算,则允许残留限度为 $2.31 \mu\text{g}/\text{cm}^2 \times 100 \text{ cm}^2 \div 40 \text{ mL} \div 10 = 0.578 \mu\text{g}/\text{mL}$ 。

3.2 氧化剂流速^[15]确定

在 TOC 试验中,TOC 分析仪通过使用紫外线辐射和化学氧化剂(过硫酸铵),使有机化合物因氧化反应而产生二氧化碳,再分别测定无机碳和总碳以确定 TOC。而氧化剂的流速决定了反应中氧化剂用量,流速过低导致分析物不完全氧化;流速过高,可能导致测得的 TOC 值较低。为了确定最优氧化剂流速,分别考察了氧化剂流速为 0,0.1,0.2,0.3,0.4 $\mu\text{L}/\text{min}$ 时的 TOC 响应值,结果各条件下所得 TOC 值基本一致。为保证试验结果的准确性,故将氧化剂流速设置为 0.1 $\mu\text{L}/\text{min}$ 。

3.3 实验室条件要求

清洁验证允许的残留限度很低,同时 TOC 又具有高灵敏度,一般实验室条件下有许多有机试剂(如甲醇、

乙腈等)易挥发小分子,若试剂挥发到空气中,并溶解到 TOC 样品中,可能导致假阳性。故 TOC 试验应避免在含有易挥发有机试剂的同一实验室内进行。

综上所述,该方法分析时间短、灵敏度高、结果准确,可用于复方氨基酸(19)丙谷二肽注射液生产后的清洁验证。

参考文献

- [1] 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,2011:182-183.
- [2] ZAHEER Z, ZAINUDDIN R. Analytical Methods for Cleaning Validation[J]. Der Pharmacia Lettre, 2011, 3(6):232-239.
- [3] 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.
- [4] 王 炯,郑世新,林富平. 中药制剂清洁验证中的 TOC 残留标准的确定方法[J]. 海峡药学, 2015, 27(12):64-66.
- [5] 李 昕,钱浩洲,孙非非,等. 总有机碳(TOC)测定方法在疫苗生产企业清洁验证中的初步应用研究[J]. 药物分析杂志, 2016, 36(8):1465-1469.
- [6] 佚 名. 与 HPLC 相比,用 TOC 分析进行清洁验证的优势[J]. 中国医药工业杂志, 2017, 48(5):789-790.
- [7] 张文辉. 新型复方氨基酸注射液的内包相容性研究[D]. 北京:北京化工大学, 2016.
- [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, 2015:374-377.
- [9] ICH. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1). [EB/OL]. (1994-10-27) [2020-04-04]. <https://database.ich.org/sites/default/files/Q2%28R1%29%20Guideline.pdf>.
- [10] 庄目德. 清洁验证 TOC(总有机碳)取样回收率研究[J]. 海峡药学, 2017, 29(7):73-75.
- [11] AHMAD IAH, TAM J, LI, X, et al. Cleaning verification: Exploring the effect of the cleanliness of stainless steel surface on sample recovery[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2017, 134:108-115.
- [12] 贾 佳. 制药设备的清洁验证分析[J]. 化工管理, 2019(11):158.
- [13] 姜 彬. 质量风险管理在非无菌原料药清洁验证评估中的应用[J]. 中国药师, 2017, 20(12):2281-2285.
- [14] 王守斌,聂 杰,陈如柳,等. 浅析药品生产设备的清洁验证[J]. 天津药学, 2014, 26(5):72-76.
- [15] LI X, AHMAD IAH, TAM J, et al. Cleaning verification: A five parameter study of a Total Organic Carbon method development and validation for the cleaning assessment of residual detergents in manufacturing equipment[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2018, 149:33-39.

(收稿日期:2020-08-04;修回日期:2020-10-27)