

GE

水处理及工艺过程处理集团

论文

分析仪器公司

正确的分析方法应用于合适的应用——TOC分析法在清洁验证中的应用

工艺技术的进步和生产成本的提高,促使全球医药行业寻求新的方法来获取更高的效率和生产率。对于这个高度竞争性的行业,在竭力确保药品质量最优化的同时,平抑高额的生产成本、简化冗长的清洁验证程序是至关重要的。最近几年,作为一种非专属的清洁验证方法,总有机碳(TOC)分析法引起人们越来越浓厚的兴趣,这是因为诸如高效液相色谱(HPLC)法之类的专一性分析方法,已被证明是清洁验证过程中的瓶颈,是导致设备在清洁验证过程中停车时间较长的原因。

本文对采用非专属方法,相比传统分析方法进行清洁验证的优越性加以研究。同时对TOC方法予以关注并阐述了Sievers* TOC 技术极为适合清洁验证应用的缘由。其目的在于帮助药品制造商了解为什么采用TOC能够提高资源生产率,提高产量,缩短设备停工时间,增强盈利能力。

采用非专属方法(TOC)进行清洁验证的优点

越来越多的公司采用TOC分析法进行清洁验证,这是因为该方法相比其它分析方法更加快捷、简便和经济。TOC法能够快速分析样品,缩短清洁验证方案的执行时间。即使对于通常认为是不溶于水的化合物,或者是在生物技术行业中常见的大分子蛋白质,情况亦如此。此外,美国食品及药物管理局(FDA)在其关于残留污染物测定的监管指南中认可了TOC法^[1]。

在清洁验证研究中,常常需要根据一种以上的目标残留物或化合物来确立接受标准的范围。HPLC的局限性在于,在一次给定的分析中它只能测定一种残留物。因此,在清洁验证过程中,多个化合物需要进行多次分析测试。由于是多次测试,就有可能忽略不可预测的污染物或清洁剂,在色谱图上可能会出现未知峰。而作为一种非专属方法,TOC可同时检测一种以上的目标化合物。

HPLC的主要缺点:未知峰、监管性复查和维护成本高昂

因为HPLC的设定时间和分析时间较长,所以生产设备常常需要停车一至两天来确保其能够通

过清洁度的鉴定。未知峰的鉴别和昂贵的仪器维护成本一直是造成类似停工的根本原因。此外,在FDA对制药设备检查之后发出的警告信中,HPLC法是最常被列举的分析方法。在最近涉及HPLC的警告信中提到的问题是:检测效率不够高,无法识别未知峰,无法在使用之前校正仪器,分析结果缺乏线性,仪器准确度不高,无法在分析前证实系统的适用性等。^[2]

HPLC仪器的实验室操作员培训不当或不具备资质,也是审查的重点。在最近的一封警告信中指出:“……进行HPLC分析的程序不当,因为在获得批准的试验方法中并未确定……样品的运行时间和保留时间。我们的调查人员发现,您实验室的雇员在活性峰洗脱后立即按照惯例停止了色谱仪的运行,如此一来,在活性峰后洗提的任何峰都将无法被检测到。^[3]”

从这种更加严格的监管性复查可以看出,FDA已经意识到HPLC检测法的缺陷。这种意识在FDA《药品生产质量控制实验室检验指南》中进一步得到体现:“有时该公司的雇员没有接受充分的培训或没有足够的时间来辨识需要进一步研究和解释的情况。相反,他们在未作任何努力加以鉴别的情况下就接受了色谱图上未被解释的峰像。^[4]”

众所周知采用HPLC法进行清洁验证可能带来某种程度的不确定度。未知峰,也称为“假峰”,正是由于这些不确定性而产生的,从而导致冗长的排查时间甚至是验证操作的失败。由于前几次的进样、污染物、气泡、柱结垢、无保护柱和样品中痕量污染物或清洁剂而产生的峰,是导致HPLC装置零件更换费用高昂的部分原因。例如,磨损的聚合物配件或导管和污染的保护柱会影响峰的形状,因而需要更换。根据峰状的扭曲程度,保护柱可能需要每周、甚至每天更换一次,这将大大提高非计划维护的成本。

业主成本

根据不同业界专家的介绍,一台TOC分析仪的平均投资比HPLC仪器低30%或40%。大多数制药厂都配备一台TOC分析仪,用于制药用水的合规分析。该分析仪可同时作为制药用水和清洁

验证的分析仪，因而有可能完全免去一台仪器的购置费用。此外，据行业数据估计，TOC分析的操作成本比HPLC仪器的低40%-80%。这其中还未考虑用于频繁的维护、通过重新调节柱子除去污染物、使用充分脱气的溶剂、每天一次的柱平衡和每天一次的检测器校正所需要的额外时间。不可靠的部件，加上为实现仪器高效运行而需要的多个外部零件，使得HPLC的操作成本增加。

与HPLC有关的停机损失

表 1 是一张“停机损失计算表”，其中比较了制药行业与最常使用的两种清洁验证分析方法有关的停机损失。该停机损失计算表列举了HPLC法和TOC法在一家制药公司的实际使用情况，该公司正在生产一种治疗用“畅销药”，以全年315天/每天24小时/每周7天的模式运行^[5]。据称产品的年总收入为25亿美元，有750种因素影响该药品的生产。通过使用TOC进行清洁验证，该制药公司的停机损失几乎降低了100%。

非专属方法使用简便

HPLC操作要求精心地分析样品和对操作员进行特殊的培训；而TOC分析不需要任何特殊的培训，并可使分析方法的开展时间缩短60%-70%。使用TOC还可减少终端用户的决策判断，从而避免停车，消除人为误差，实现清洁验证或检验过程的优化。TOC分析文档经过简化可确保合规性并可生成实时文档，因此有利于对分级设备的实验室结果进行快速审批。这样可缩短设备的周转时间，这对于药品生产商是至关重要的。

不溶性有机化合物的回收率

一直以来对使用非专属方法的争议是：在不溶性有机物的清洁验证研究期间，使用TOC进行清洁验证不能提供良好的回收率。一些人士指出，采用非专属方法分析不溶性化合物的回收率超过50%的可能性不大。表2列出了用HPLC法和TOC法分析三种“不溶性化合物”的棉签擦拭样品的回收率比较。TOC回收率是采用加标浓度4 μg/cm²或约2ppm/20mL水的试样而获得的，结果证明其反应效率远高于50%。

表1 停机损失计算表

HPLC		TOC		因素和假设
公司小时产值（公司1小时创造的价值） 每年产品的总收入 ÷ 总的生产小时 = 公司小时产值	2,500,000,000.00美元	2,500,000,000.00美元		假设为诺贝尔的畅销药品 假设按全年315天/每天24小时/每周7天模式生产
	7560	7560		
	330,687.83美元	330,687.83美元		
雇员小时产值（1个雇员1小时为企业创造的平均价值） 公司小时价值 ÷ 公司雇员数 = 雇员小时产值	330,687.83美元	330,687.83美元		与工艺有关的人员数
	750	750		
	440.92美元	440.92美元		
因设备未解禁而造成的雇员停工损失（因任何因素造成的设备停机时间） 排除故障/操作仪器所需的工时 × 平均雇员小时产值 = 雇员停工损失	16.75	0.75		
	440.92美元	440.92美元		
	7,385.36美元	330.69美元		

生产停机损失（公司因等待恢复正常生产而增加的损失） 生产设备停机小时×平均公司小时产值=生产停机损失	25.75	0.75
	330,687.83 美元	330,687.83美元
	8,515,211.64美元	248,346.56美元
总停机损失	8,522,597.00美元	248,346.56美元

数据来源：药品生产商。

表2 棉签擦拭样品的回收率^[6]

活性组分	《默克索引》溶解度	实际溶解度	以TOC计溶解度	HPLC法回收率	TOC法回收率
磺胺乙酰	难溶	> 10,000ppm	>5000ppm	91.0%	83.1%
磺胺苯酰	易溶	300ppm	127ppm	71.2%	78.0%
磺胺噻唑	易溶	600ppm	254ppm	82.4%	86.5%

采用Sievers分析仪进行清洁验证

一般TOC原理

所有TOC分析仪均可履行两个功能：一是将水中的有机碳氧化成二氧化碳（CO₂），二是测定所产生的二氧化碳（CO₂）量。TOC可用于定量测定未适当清洗设备中的大部分杂质和残留物，以及测定所有含碳化合物：原料药（API）、清洁试剂、蛋白质和中间体。用于测定TOC的分析技术所承担的任务是：将水样中的有机分子氧化为CO₂，测定所产生的CO₂含量，以碳浓度表示响应结果。所有技术都必须能够识别无机碳，无机碳可能是由于源物质（例如溶解的CO₂和碳酸氢盐、在样品有机分子氧化过程中产生的CO₂）而存在于水中。从所测定的总碳（TC，有机碳和无机碳的总和）中扣除所测定的无机碳（IC），即得到总有机碳（TOC）： $TOC = TC - IC$ ^[7]

根据用于氧化水样品中有机物的方法，以及用于测量样品中所生成的CO₂浓度的方法，TOC分析仪会有所不同。不同的检测方法对于待分析样品的准确度可能会有相当大的影响，继而影响清洁验证的测试过程。

TOC氧化技术

所有市售TOC分析仪均采用以下两种方法之一来氧化有机化合物，使其转化为CO₂气体：燃烧法和紫外/过硫酸盐氧化法。在燃烧法技术中，氮、氧或空气流路的最低温度为600℃。采用燃烧法时，在氧化阶段也可使用催化剂来促进反应。在这种方法中使用的催化剂一般为氧化铜、

铂或氧化钴。

紫外/过硫酸盐氧化法利用紫外光分解有机物，使其充分氧化成CO₂。将样品暴露在从仪器内汞蒸气光源发出的紫外光下，使有机物转化为CO₂气体。对于含量高于1ppm的样品或化合物，在样品溶液中加入过硫酸盐，混合，以确保能在辐照产生的带负电荷的羟基（HO⁻）的作用下发生氧化反应。过硫酸盐是强氧化剂，在紫外光的辐照下能够生成硫酸盐和羟基自由基，羟基自由基可使有机化合物完全氧化成CO₂。

TOC检测方法

为了检测CO₂浓度，TOC分析仪需要使用一种检测方法将样品中存在的其它分子与CO₂区别开来。目前的两种检测方法包括：非色散红外法（NDIR）和电导率测量法。

用于气体分析的NDIR技术依赖于各种气体在红外光谱区的能量吸收特征。在采用NDIR技术的TOC分析仪中，红外光通过两根完全相同的导管进入一台检测器。第一根导管作为参比池，其中充满非吸收性气体，如氮。第二根导管作为气体样品测量池。

电导率检测技术采用电导率传感器测定样品的电导率，然后通过电导率的计算确定CO₂浓度。为了计算TCO，将水溶液通入两个电导率传感器，测量一个传感器内的总碳浓度（TC）和另一个传感器内的无机碳（IC）浓度。然后计算样品的TOC浓度。

NDIR法可定量测定样品中0.004 - 50,000 ppm

的碳浓度，而电导率法可定量测定低至ppb（十亿分之一）级的碳浓度。一般说来，NDIR和电导率检测器对于低含量TOC很敏感，但容易受离子的干扰。通过使用只允许CO₂选择性通过的半渗透膜，可以弱化这个因素的影响。

Sievers TOC技术的差异化特质

紫外光过硫酸盐氧化法与一种独特的选择性CO₂薄膜技术相结合，是Sievers TOC 系列分析仪不同于传统TCO技术（如燃烧NDIR技术）的众多特质之一。Sievers技术始终如一地生成更准确的TOC数据。

在Sievers薄膜电导率法中，设置在CO₂输送模块内的选择性CO₂薄膜构成一个阻隔干扰离子的保护屏障，它可使CO₂自由地穿过薄膜而将干扰化合物和氧化副产物阻隔在外。选择性薄膜消除了背景干扰的可能性，也避免了非含碳化合物和副产物造成的堵塞。

因为各种样品的TOC浓度常常是未知的，所以很难达到最佳分析条件，这是清洁验证应用提出的一个挑战。以下一些差异化特质可确保采用紫外过硫酸盐薄膜电导率技术获得无可比拟的分析结果。

试剂自适应特点可确保氧化完全

为了确保清洁验证样品的氧化完全，Sievers

900系列TOC分析仪包含了一种试剂自适应（Autoreagent）特点，可对酸和过硫酸盐氧化剂的加入量进行优化。

非催化燃烧法

非催化燃烧法无需确定必须在燃烧反应器中加入的催化剂量（取决于样品中的碳浓度），因而可排除这方面的人为误差。燃烧氧化法可能会产生有毒气体。对于因清洁验证样品中存在氯化物而产生的有害气体，一些TOC分析仪可能无法捕获。

不使用NDIR检测器

NDIR检测器需要一定的时间（30-40分钟）来暖机，因而进一步延长了设备停工时间，增加了样品积压量。NDIR技术需要经常校正（每小时或每天一次），其频次取决于清洁验证样品中的碳浓度。对于这类检测器，一般可观察到校正漂移。NDIR仪器的操作时间有6%-10%是专供校正使用的。

不使用载气

由于泄漏和校正的不稳定性，NDIR检测器使用的载气可能费用高昂，并有可能造成较高的TOC背景。载气的污染也可能是一个挑战，它会造成高碳环境。

测量浓度, ppb TOC

Sievers 900 分析仪
 $y = 75.393 + 0.91425 \times$
 $R^2 = 1.000$

燃烧/NDIR
 $y = -358.60 + 0.42923 \times$
 $R^2 = 0.965$

理论浓度, ppb TOC

图1.牛血清白蛋白 (BSA)TOC回收率的对比研究

Sievers TOC分析仪内的电导率测量池由优质石英制作，灵敏度好，回收率高，从而可提供更

高的稳定性和0.03 ppb的检出浓度。图1和表3利用牛血清白蛋白（BSA）的灵敏度和回收率试

验，对Sievers TOC技术与传统的燃烧-NDIR TOC技术进行了比较。

表3. 牛血清白蛋白（BSA）TOC 回收率的对比研究结果

理论浓度,ppb TOC	Sievers 900 的结果 TOC平均回收率	燃烧/NDIR 的结果 NPOC平均回收率
100ppb	74.4ppb=75%	339.7ppb=340%
250ppb	264.7ppb=105%	173.0ppb=70%
500ppb	564.3ppb=113%	323.8ppb=64%
750ppb	7512ppb=100%	402.1ppb=54%

1000ppb	968.7ppb=97%	556.3pb=56%
5000ppb	4506.7ppb=93%	1508ppb=30%
10000ppb	9390ppb=94%	3285ppb=33%
25000ppb	23266.7ppb=93%	7183ppb=29%
50000ppb	4600ppb=92%	23025ppb=46%

注：对比研究是采用全面校正后的仪器进行的。在分析之前进行并通过了系统适用性试验。对于两种仪器，配制并使用了相同的BSA储备溶液。研究是在受控的分析环境内进行的，分析期间未出现仪器偏差。

表4. TOC方法的比较

用于清洁验证的TOC分析仪	Sievers* 900	燃烧/催化剂 NDIR	燃烧NDIR
氧化方法	紫外光过硫酸盐	燃烧（580-1000℃）催化氧化	680℃燃烧氧化
检测方法	薄膜电导率	NDIR	NDIR
检测范围	0.03ppb-50ppm	TC:0-25,000ppm TC:0-30,000ppm	4ppb-25,000ppm(TOC) 4ppb-4,000ppm(TC-IC)
检出限	0.03ppb	4ppb	4ppb
准确度	±2%	CV±1.5%	--
精确度	1% RSD	--	--
测量项目	TOC, TC, IC	TC, IC, TOC, NPOC	TOC, (NPOC), TC-IC, IC
样品体积	0.5?L/min	10-20000? L	<2mL
分析时间	4min	TC: 3min以上 IC: 3min以上	9-12min
校正	每年一次	每小时/天/周一次	每小时/天/周一次
校正所需时间	单点: 1.5h 多点: 5.5h	3h	5h
校正时间/年	单点: 1.5h 多点: 5.5h	150h	250h
载气	不适用	高纯度空气1,440L/月 (在8小时/天×5天/周的情况下)	高纯度空气(>99.98%) 或高纯度干燥N ₂
试剂	酸, 氧化剂	盐酸, IC试剂	盐酸
在线测量	是	否	否
离线测量	是	是	是
便携式	是	否	否
耗材	酸, 氧化剂, UV灯, 去离子树脂床、泵及导管	铂催化剂, 载气, 酸, IC试剂等	载气, 酸等
月操作成本	175美元	530美元	540美元

结论

HPLC是一种耗时较长的分析方法，会推延实验室内的清洁验证分析。这可能导致数小时或数日

的设备停车，从而造成无法容忍的高成本和减少产量。实例表明，一些制药商每天的停机费用超过100万美元。表4列举了Sievers 900 TOC分析仪与燃烧/催化剂NDIR和燃烧NDIR的详细数据

比较，其中包括所估计的月操作成本。

TOC是一种检测低含量有机化合物的快速而简便的分析方法，可以检测出由HPLC不可能检测出的污染物。与传统方法相比，TOC可以缩短70%-80%的设备停机时间和方法校正时间。在按照FDA的最新指南（21世纪的现行《药品生产管理规范》）来加强药品生产管理并使之现代化的过程中，作为清洁验证的分析方法，TOC法凭借较HPLC等专一性分析方法的更优越的品质和效率正引起人们日益浓厚的兴趣。

参考文献

1 美国食品与药物管理局（FDA）网站：
www.fda.gov/cder/guidance/cGMPs/equipment.htm#TOC

2 "The Gold Sheet." FDC Reports, March 2005
“金色数据表”。国际医药（FDC）报告，2005年3月

3 美国食品及药物管理局（FDA）网站：
www.accessdata.fda.gov/scripts/wlcfm/indexdate

4 美国食品与药物管理局（FDA）指导文件：药品质量控制实验室检查指南

5 此处假设装置停车是为了制药设备的例行维护。

6 Andrew W. Walsh

7 美国药典<643> 总有机碳

* 通用电气公司的商标，可能在一个或多个国家注册。

更多的信息，敬请登陆网站：www.geinstruments.com。点击“联系我们”工具条查找附近的销售合作伙伴。

美国
GE分析仪器公司
6060 Spine Road
Boulder, CO 80301-3687
美国
电话： +1 800 255 6964
+1 303 444 2009
传真： +1 303 444 9543
E-mail: geai@ge.com
www.geinstruments.com

欧洲
Unit 3 Mercury Way
Urmston, Manchester, M41 7LY
英国
电话： +44 (0) 161 864 6800
传真： +44 (0) 161 864 6829
E-mail:
generaluk.instruments@ge.com

中国
上海南京西路1468号
中欣大厦 5 楼
电话： +86 21 3222 4555
传真： 86 21 6279 3066
E-mail: geai@ge.com
www.geinstruments.com

©2007年通用电气公司版权所有，保留所有权利。