

タンパク質サンプルの洗浄バリデーションにおけるTOC計の比較

Application Note

ウシ血清アルブミン分析における燃焼酸化+NDIR方式と湿式紫外線酸化+ガス透過膜式導電率測定方式の比較

TOCに関する一般的な理論

すべてのTOC計は、水中の有機炭素を二酸化炭素 (CO_2) に酸化し、発生した CO_2 を測定する2つの機能で構成されます。TOCは、炭素を含むすべての有機化合物 (API/洗浄剤/タンパク質/中間体など) を測定するため、適切に洗浄されなかった装置内の不純物や残留物の定量に使用できます。TOC計は、サンプル中の有機化合物を CO_2 に完全酸化させて発生する CO_2 を測定し、炭素濃度として表します。また、水中に存在する無機炭素 (溶存 CO_2 や重炭酸塩) と、サンプル中の有機化合物が酸化して発生した CO_2 を識別する必要があります。TOCは、有機炭素と無機炭素の合計である全炭素 (TC) から、無機炭素 (IC) を差し引くことで求められます¹。

TOC計は、有機物の酸化方法と CO_2 濃度の検出方法により区別されます。検出方法の違いにより測定精度が大きく異なるため、洗浄バリデーションプロセスに影響を与えます。

TOCの酸化方法

市販のTOC計は、燃焼酸化法や酸化剤+紫外線酸化法などの方法により、有機化合物を酸化して CO_2 ガスに変換します。

燃焼酸化法は、窒素/酸素/空気の流れの中で、 600°C 以上の温度で有機化合物を酸化します。また、酸化を助けるために触媒 (酸化銅/白金/酸化コバルトなど) も使用されます。

湿式紫外線酸化法は、紫外線で有機物を溶解し、 CO_2 に完全酸化させます。装置内のUVランプでサンプルに紫外線を照射し、有機物を CO_2 ガスに変換します。1ppm以上のサンプルには、酸化剤を添加/混合して発生する負電荷のヒドロキシルラジカル ($\text{HO}\cdot$) により酸化を確実にします。強力な酸化剤として過硫酸塩が使われ、紫外線照射時に硫酸ラジカルとヒドロキシルラジカルを生成し、有機化合物を CO_2 に完全酸化します。

TOCの検出方法

CO_2 濃度を検出するために、サンプル中に存在する CO_2 と他の分子を区別する検出方法が必要です。一般的な検出方法には、非分散形赤外線吸収 (NDIR) 法と導電率法があります。

NDIR法によるガス測定は、スペクトルの赤外線領域における各ガスのエネルギー吸収特性を利用します。NDIR法のTOC計は、2本の同じ管を通して検出器に赤外線を送ります。最初の管はリファレンスセルで、窒素のような赤外線を吸収しないガスで満たされています。もう一方のセルはガスサンプルの測定に使用されます。

導電率法は、導電率センサーを使用して CO_2 濃度を計算します。サンプルは2つの導電率センサーを通過し、一方では全炭素濃度 (TC) を測定し、もう一方では無機炭素 (IC) 濃度を測定し、TOC濃度が計算されます。

NDIR法の測定範囲が0.004~50,000ppmであるのに対し、導電率法はppb (10億分の1) レベルまで定量できます。一般に、NDIR法と導電率法は微量のTOCに感度がありますが、イオン干渉の影響を受けます。この要因は、 CO_2 のみを選択的に透過する半透膜を使用することで軽減されます。

Sievers*の測定技術の特長

湿式紫外線酸化+ガス透過膜式導電率測定方式の組み合わせは、Sievers TOC計と従来のTOC計 (燃焼酸化+NDIR方式) を差別化する要因の一つです。Sieversの測定技術は一貫して、より正確な測定結果をもたらします。

Sieversのガス透過膜式導電率測定方式では、 CO_2 を選択的に取り出すガス透過膜により共存イオンによる干渉を排除します。ガス透過膜は、炭素以外の化合物や副生成物によるバックグラウンド干渉や目詰まりを防止します。

洗浄バリデーションでは、サンプルのTOC濃度が未知であり、最適な分析条件を達成することが困難です。Sieversの湿式紫外線酸化+ガス透過膜式導電率測定方式は以下の特長により、優れた分析結果が保証されます。

自動試薬機能による完全酸化

洗浄バリデーションサンプルの完全酸化を確実にするため、Sievers TOC計には酸と酸化剤の流量を最適化する自動試薬機能があります。

燃焼触媒酸化法ではない

燃焼炉に触媒を添加する際の人為的エラーを排除します。燃焼酸化法では有毒ガスが発生する可能性があります。塩化物から発生する有害ガスをトラップできないTOC計もあります。

NDIR検出器を使用しない

NDIR検出器は立ち上げに時間がかかります（30～45分）。NDIR法の校正はサンプルの炭素濃度に応じて、都度実施する必要があります。一般的にNDIR検出器では、校正のドリフトが観察されます。NDIR方式の稼働時間の6～10％は校正に費やされます。

キャリアガスが不要

NDIR検出器のキャリアガスはコストがかかり、ガスリーク/不安定な校正/キャリアガスの汚染などによりTOCバックグラウンドが高くなる可能性があります。

優れた感度と回収率

Sieversの導電率セルは高純度の石英製で、安定性に優れ、0.03ppbレベルの検出が可能です。従来の燃焼酸化+NDIR法と比較したウシ血清アルブミンの測定結果を図1と表1に示します。

表1. ウシ血清アルブミン（BSA）のTOC回収率試験* *

理論TOC濃度（ppb）	Sievers TOC計の平均TOC回収率	燃焼酸化/NDIR検出方式の平均TOC回収率
100 ppb	74.7 ppb = 75 %	339.7 ppb = 340 %
250 ppb	264.7 ppb = 105 %	173.0 ppb = 70 %
500 ppb	564.3 ppb = 113 %	323.8 ppb = 64 %
750 ppb	751.2 ppb = 100 %	402.1 ppb = 54 %
1000 ppb	968.7 ppb = 97 %	556.3 ppb = 56 %
5000 ppb	4646.7 ppb = 93 %	1508 ppb = 30 %
10000 ppb	9390 ppb = 94 %	3285 ppb = 33 %
25000 ppb	23266.7 ppb = 93 %	7183 ppb = 29 %
50000 ppb	46000 ppb = 92 %	23025 ppb = 46 %

* **校正済みのTOC計で比較試験を実施しました。分析前にシステム適合性試験を実施して合格しました。同じBSA原液を調製し、両方のTOC計で測定しました。本試験は管理された分析環境下で実施され、分析中に機器に偏差は生じませんでした。

洗浄バリデーションをSievers TOCに切り替えるべき理由

湿式紫外線酸化+ガス透過膜式導電率測定方式の組み合わせは、燃焼酸化+NDIR方式のような従来のTOC技術とSievers TOC計を差別化する多くの要因の一つです。Sieversの技術は一貫して、より正確なTOC測定結果をもたらします。

HPLCは分析時間がかかり、洗浄バリデーションのための分析が遅れます。これは数時間～数日のダウンタイムにつながり、コスト高を招き、患者に届く医薬品を制限します。製薬会社によっては、1日あたり100万ドルを超えるダウンタイムコストを実証した例もあります。Sievers TOC計と燃焼触媒+NDIR方式および燃焼酸化+NDIR方式の比較表を表2に示します。

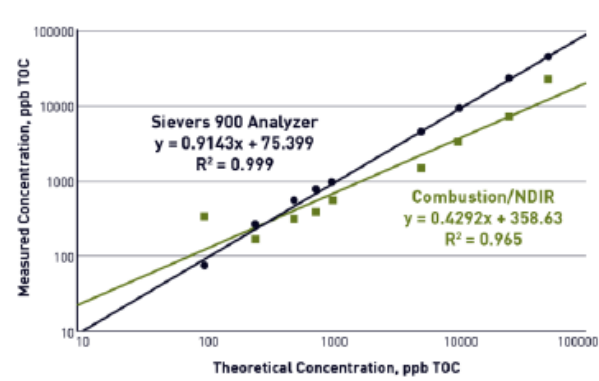


図1. ウシ血清アルブミン（BSA）のTOC回収率試験

タンパク質サンプルの洗浄バリデーションにおけるTOC計の比較

TOCは低レベルの有機化合物を検出できる迅速でシンプルな分析法であり、HPLCでは不可能な汚染の検出が可能です。TOCは従来法に比べ、ダウンタイムと分析法バリデーションの時間を75%以上短縮できることが示されています。医薬品製造の規制を強化し近代化するFDAの最近のガイダンス（cGMP）に伴い、品質と効率の向上により、洗浄バリデーションにHPLCのような特異的分析法よりも、TOCを使用することへの関心が高まっています²。

参考文献

1. USP <643> Total Organic Carbon.
2. Andrew W. Walsh contributed to the content of this application note.

（翻訳：セントラル科学株式会社）

表2. TOC測定法の比較

TOC計の測定技術	Sievers TOC計	燃焼触媒酸化/NDIR方式	燃焼酸化/NDIR方式
酸化方式	湿式UV酸化	触媒 + 燃焼酸化（680～1000℃）	燃焼酸化（680～1000℃）
検出方式	ガス透過膜式導電率測定	NDIR	NDIR
測定範囲	0.03 ppb～50 ppm	TC：0～25000 ppm IC：0～30000 ppm	4ppb～25000 ppm（TOC） 4 ppb～4000 ppm（TC-IC）
検出下限（LOD）	0.03 ppb	4 ppb	4 ppb
精度	±2%	CV ±1.5%	-
再現性	RSD 1%	-	-
測定項目	TOC、TC、IC	TC、IC、TOC、NPOC	TOC（NPOC）、TC-IC、TC、IC
サンプル流量	0.5 μL/min	10～2000 μL/min	2 mL未満
測定時間	2分	TC：3分以上 IC：3分以上	9～12分
校正頻度	12ヶ月	都度	都度
校正の所要時間	1点校正：50分間 多点校正：2時間10分	3時間	5時間
年間で校正に使う時間	1点校正：50分間 多点校正：2時間10分	150時間	250時間
キャリアガス	不要	高純度ガス	高純度ガス（99.98%以上） または窒素ガス
試薬	酸、酸化剤	塩酸、IC試薬	塩酸
オンライン測定	可能	不可	不可
オフライン測定	可能	可能	可能
携帯性	可能	不可	不可
消耗品	酸、酸化剤、UVランプ、イオン交換樹脂、サンプルポンプヘッド	白金触媒、キャリアガス、酸、IC試薬など	キャリアガス、酸など