

不溶性/難分解性化合物のTOC回収率

Test Report

1. 目的

このテストでは、TOC計 Sievers* M9型を使ってバイオ医薬品/製薬/化粧品業界に関係する不溶性/難分解性物質の溶液（500 ppb ~ 10 ppm）のTOC回収率を求めました。

2. 背景と計算方法

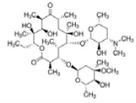
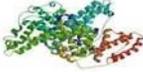
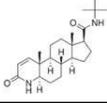
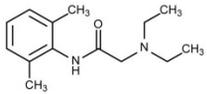
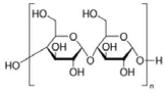
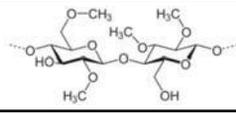
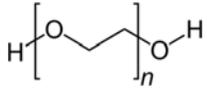
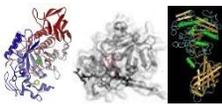
2.1 TOCを使った洗浄バリデーション

TOCは製造設備の残留製品や洗浄剤を検出するために広く採用されている非特異的分析方法です。不溶性/難分解性の製品もあるため、各化合物を検出するためのTOC分析方法が注目されています。TOC計 Sievers M9型を使った不溶性/難分解性化合物の回収率テストにより、TOCを用いた洗浄バリデーションプログラムの設計/検証/継続的監視をサポートできます。

2.2 対象化合物

酸化が困難な化合物や溶解度が非常に低い化合物を対象としました。各化合物の詳細を表1に示します。

表1. 本テストで選択した化合物の詳細

化合物名	分類	構造	詳細
アジスロマイシン	API		水にほとんど溶けない
ウシ血清アルブミン (BSA)	バイオ		高分子化合物、難分解性
フィナステリド	API		水にやや溶ける
リドカイン	API		水にほとんど溶けない
スターチ	賦形剤		冷水に不溶、高分子化合物
メチルセルロース	賦形剤		高分子化合物、難分解性
ポリエチレングリコール 6000	賦形剤		高分子化合物、難分解性
パンクレアチン	API		難分解性 (3種類の酵素の組み合わせ)

2.3 計算

2.3.1 回収率

各化合物の回収率を以下の式を使用して求めました。

$$\text{回収率 (\%)} = \frac{\text{実測値}}{\text{予想値}} \times 100\%$$

各化合物の予想値は各化合物の炭素含有率に基づいて計算されます。回収率が100%に近いほど、TOC計の精度が高く、化合物の回収率が高いことを示します。WHOによると、回収率が80%以上だと良好、50%以上だと合理的、50%未満だと疑わしいと判断されます。¹

2.3.2 再現性 (Precision)

再現性は相対標準偏差 (RSD) として表されます。通常モードで5回繰り返し測定した場合と、ターボモードで20回繰り返し測定した場合のRSDを以下のように求めました。

$$\text{標準偏差 (SD)} = \sqrt{\frac{n \sum x^2 - (\sum x)^2}{n(n-1)}} \quad \text{相対標準偏差 (RSD) (\%)} = \frac{\text{標準偏差 (SD)}}{\text{実測値}} \times 100\%$$

x=各測定結果

n=測定回数

2.3.3 直線性

直線性はTOC計が各化合物のTOC濃度に対して正比例するTOCを測定できる能力です。直線性は、相関係数 (R²)、回帰直線の傾き、y切片を計算することで求められます。R²が1.0に近いほど、直線性が優れています。

3. 目的

以下の化合物を各濃度 (500ppb/1ppm/3ppm/5ppm/10ppm) に調製して測定しました。

- ・ アジスロマイシン
- ・ デンブ
- ・ 牛血清アルブミン (BSA)
- ・ メチルセルロース
- ・ フィナステリド
- ・ ポリエチレングリコール 6000
- ・ リドカイン
- ・ パンクレアチン

各化合物10mgを1Lの純水に溶解させて10ppmストック溶液を調製しました。表2の化合物を溶解させるために、必要に応じてpHと温度を調整しました。次に、TOC計 Sievers M9型で自動試薬モードを使用して10ppm溶液を測定し、各化合物の炭素回収率を計算しました。

10ppmサンプルの炭素回収率を求めた後、残りの濃度 (500ppb/1ppm/3ppm/5ppm) の溶液を500mLフラスコで調製して、Sievers M9型で自動試薬モードを使用して測定しました。通常モードとターボモードで回収率を比較するために、ターボモードでもすべてのサンプルを測定しました。

TOC回収率を求めるために10ppmストック溶液を測定し、直線性を評価するために希釈溶液 (500ppb~10ppm) を測定しました。

各サンプルは室温で保存しました。各化合物を溶解させて10ppmストック溶液を調製するための前処理方法を表2に示します。

表2. 化合物を溶解させるための前処理方法

化合物	前処理方法
アジスロマイシン	超音波処理を1時間実施した後、60℃で加熱しながら1時間攪拌する
BSA	8.3Mリン酸溶液に溶解させる
リドカイン	60℃で約1時間加熱する
デンブ	60℃で約1時間加熱する

不溶性/難分解性化合物のTOC回収率

自動試薬モードを使用して、最適な酸流量と酸化剤流量を決定しました。各化合物の10ppm標準液の最適な試薬流量を表3に示します。

表3. 自動試薬モードによって決定した最適な試薬流量

化合物	酸添加量 ($\mu\text{L}/\text{min}$)	酸化剤添加量 ($\mu\text{L}/\text{min}$)
デンプン	1.0	0.7
フィナステリド	1.0	1.3
メチルセルロース	1.0	0.8
ポリエチレングルコール	1.0	1.0
BSA	1.0	0.7
アジスロマイシン	1.0	1.0
パンクレアチン	1.0	0.5
リドカイン	1.0	1.3

4. 使用した測定器

Sievers M9 ラボ型 シリアル番号：13120039

Sievers オートサンプラー シリアル番号：10040214

DataPro2ソフトウェア

5. 校正 & 校正検証

TOC計 Sievers M9 ラボ型の通常モードはKHPを使用して10ppm1点校正を行いました。10 ppm1点校正は、製薬業界における洗浄バリデーションを含む一般的なアプリケーションに適しています。そして、通常モードの校正検証（500ppb スクロース、10ppm スクロース）を行いました（表4）。ターボモードはKHPを使用して多点校正を行いました。そして、ターボモードの校正検証（2 ppm スクロース）を行いました（表5）。

表4. 通常モード検証結果（500ppb、10ppm）

500ppb検証	TOC平均値	標準偏差	RSD	10ppm検証	TOC平均値	標準偏差	RSD
ブランク	21.7 ppb	0.6 ppb	2.7 %	ブランク	21.3 ppm	1.2 ppb	5.4 %
500ppb TOC	519 ppb	1.2 ppb	0.2 %	10ppm TOC	10.0 ppm	266 ppb	2.7 %
50ppb IC	843 ppb	5.0 ppb	0.6 %	10ppm IC	10.5 ppm	115 ppb	1.1 %

表5. ターボモード検証結果（2ppm）

ターボ 2ppm検証	TOC平均値	標準偏差	RSD
ブランク	24.1 ppb	0.9 ppb	4.0 %
2ppm TOC	2.0 ppm	14.7 ppb	0.7 %
2ppm IC	2.3 ppm	6.8 ppb	0.3 %

6. 結果と考察

6.1 各化合物 10 ppmの回収率

通常モードとターボモードの各化合物 10ppmの回収率を表6と表7に示します。炭素回収率は、各化合物に占める炭素含有率に基づいて計算しました。

表6. 通常モードにおける各化合物 10ppmのTOC回収率

化合物	TOC予想値	TOC測定結果	標準偏差	RSD	炭素回収率
アジスロマイシン	6.09 ppm	6.07 ppm	40.4 ppb	0.7 %	99.8 %
BSA	5.30 ppm	5.27 ppm	36.3 ppb	1.4 %	99.5 %
フィナステリド	7.41 ppm	7.62 ppm	37.4 ppb	0.5 %	102.4 %
リドカイン	7.17 ppm	7.19 ppm	52.6 ppb	0.7 %	100.4 %
デンプン	4.20 ppm	4.15 ppm	5.48 ppb	0.1 %	98.7 %
メチルセルロース	5.48 ppm	5.06 ppm	10.0 ppb	0.2 %	92.3 %
ポリエチレングルコール	5.45 ppm	5.46 ppm	28.8 ppb	0.5 %	100.4 %
パンクレアチン	5.00 ppm*	4.86 ppm	16.4 ppb	0.6 %	97.1 %

※パンクレアチンは炭素含有率50%を想定

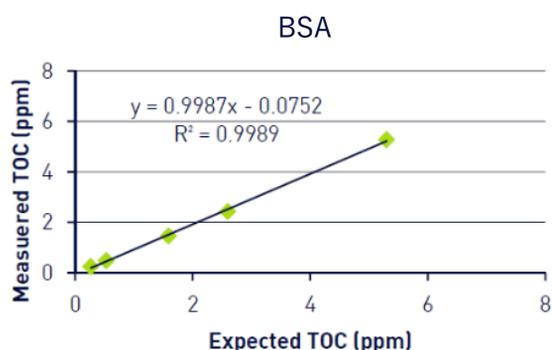
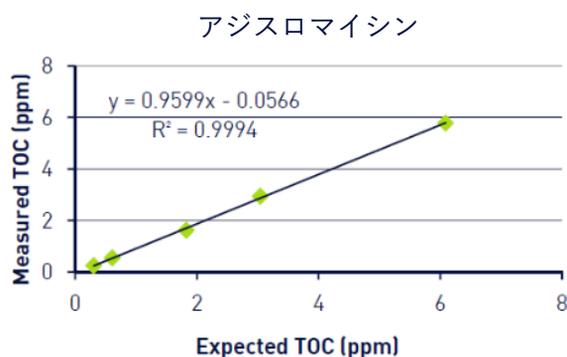
表7. ターボモードにおける各化合物 10ppmのTOC回収率

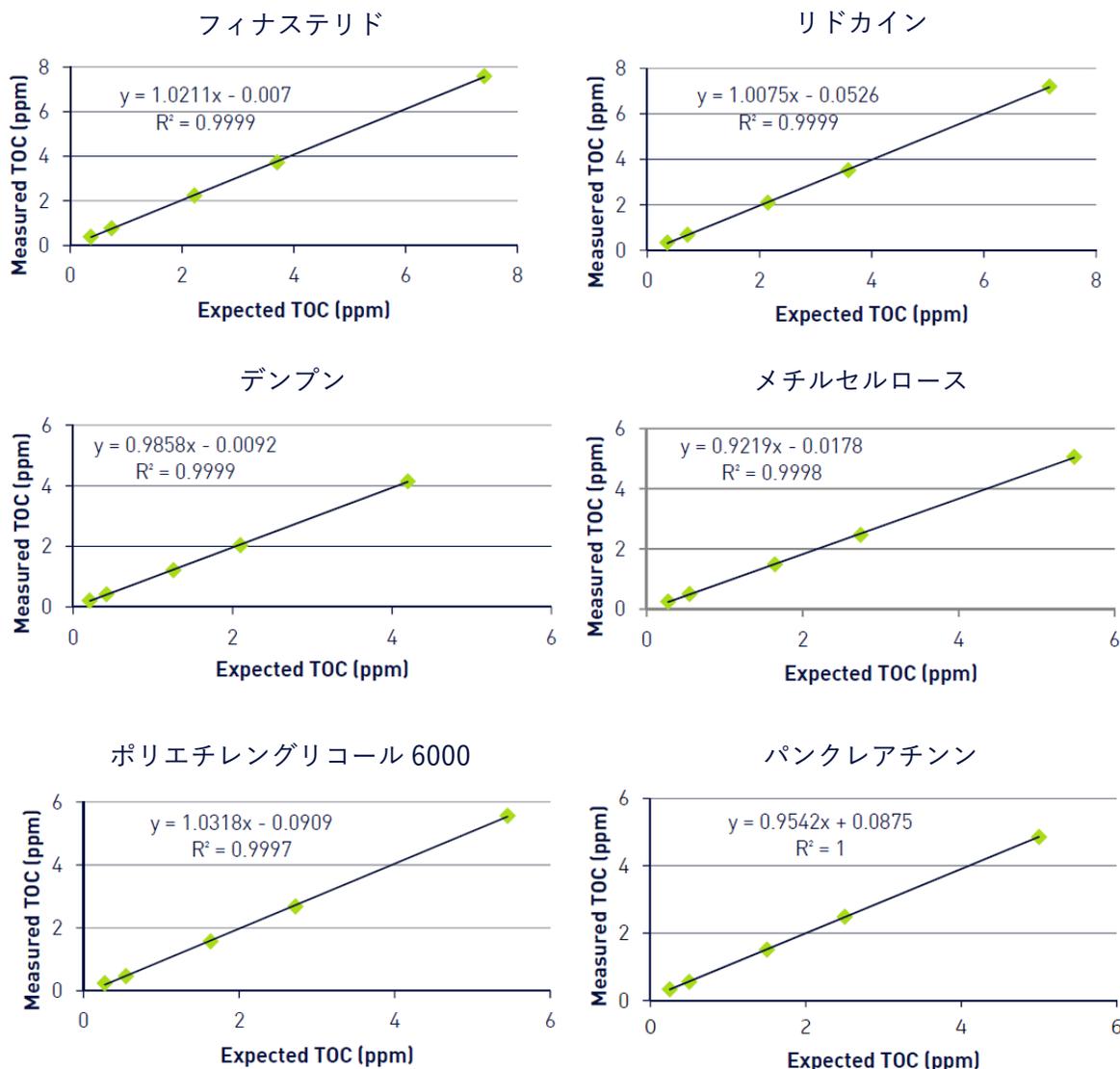
化合物	TOC予想値	TOC測定結果	標準偏差	RSD	炭素回収率
アジスロマイシン	6.09 ppm	5.85 ppm	13.4 ppb	0.2 %	96.2 %
BSA	5.30 ppm	4.88 ppm	62.4 ppb	1.26 %	92.0 %
フィナステリド	7.41 ppm	7.51 ppm	38.7 ppb	0.5 %	101.3 %
リドカイン	7.17 ppm	7.17 ppm	8.94 ppb	0.1 %	100.1 %
デンプン	4.20 ppm	4.16 ppm	5.48 ppb	0.1 %	99.0 %
メチルセルロース	5.48 ppm	5.04 ppm	28.6 ppb	0.6 %	92.0 %
ポリエチレングルコール	5.45 ppm	5.06 ppm	19.5 ppb	0.4 %	92.9 %
パンクレアチン	5.00 ppm*	4.66 ppm	39.9 ppb	0.9 %	93.2 %

※パンクレアチンは炭素含有率50%を想定

6.2 直線性

TOC計 Sievers M9型の通常モードによる、各化合物の直線性を最小二乗回帰直線と相関係数 (R^2) により示します。





TOC計 Sievers M9型は、8種類すべての化合物について、500 ppb～10 ppmの範囲で高い直線性 (R^2 : 0.9989～1.0) を示しました。

7. まとめ

TOC計 Sievers M9型は通常モードとターボモードのどちらにおいても、さまざまな化合物に関して、安定した測定結果と高い回収率を得ることができました。また、テストした濃度範囲内において、各化合物の高い直線性も示されました。ここに示されているデータは不溶性/難分解性の化合物に対しても、洗浄バリデーションのためにTOC計 Sievers M9型を使用できることを示しています。

参考文献

1. World Health Organization. Supplementary Guidelines on Good Manufacturing Practices: Validation; WHO Technical Report Series, No. 937, 2006, Annex 4.

(翻訳：セントラル科学株式会社)