

Валидация очистки технологического оборудования с использованием ВЭТСХ

В процессе производства фармацевтических препаратов не менее важной, чем само изготовление, является очистка производственного оборудования на всех стадиях. Это емкости смешивания, реакторы, буферные емкости, трубопроводы и фасовочные линии. Все поверхности, с которыми соприкасается продукт или полупродукт, должны быть отмыты по окончании производства партии и при переходе на изготовление другого продукта

Как любой процесс производства, в соответствии с требованиями GMP стадия очистки подлежит валидации. Перед запуском новой партии необходимо удостовериться, что на поверхности не осталось следов веществ, использовавшихся в предыдущем процессе. Особенно это критично для активных субстанций сильнодействующих веществ, таких как гормоны, антибиотики и т. д. Для оптимизации производства стадию очистки всегда стараются свести к минимуму, так как это фактически простой оборудования и, как следствие, уменьшение производительности. С другой стороны, тщательная очистка позволяет исключить один из факторов риска, приводящий к производству брака, – наличие примесей. Валидация, как составляющая часть процесса очистки производственного оборудования, состоит из сбора смывов с поверхностей и проведения их анализов. Чем больше точек взятия смывов, тем полнее валидация очистки, но тем большее время будет занимать анализ, то есть увеличивается время простоя оборудования. Уменьшение количества точек контроля может привести к тому, что какие-то из критических мест будут не проверены, а это, в свою очередь, может привести к перекрестному загрязнению продукта. Единственный способ ускорить процесс получения результата очистки без уменьшения количества проб – ускорение времени анализа или/и проведение анализа всех проб одновременно. При использовании ВЭЖХ, как метода количественного определения активных компонен-

тов, все пробы анализируются последовательно. При этом, в зависимости от сложности процесса производства, количество проб может достигать до нескольких десятков. Современные системы ВЭЖХ достаточно быстрые, но все-таки требуют подготовки каждой пробы. Следует помнить: прежде чем ввести пробу в систему ВЭЖХ, ее нужно подготовить – экстрагировать, сконцентрировать, отфильтровать. Зачастую подготовка пробы проводится дольше, чем сам анализ. Для сокращения времени анализа проб стараются заменить ВЭЖХ на спектрометрию в УФ-области, объединить пробы в одну и считать валидацию пройденной, если общее количество активных веществ во всех смывах одновременно не превышает заданной нормы. Не всегда данные компромиссные способы являются приемлемыми.

Альтернативным способом проведения анализа смывов является тонкослойная хроматография, а точнее высокоэффективная ТСХ, или, как ее еще называют, инструментальная тонкослойная хроматография. Современные технические решения для ВЭТСХ ставят этот метод в один ряд с ВЭЖХ. В отличие от привычной нам «классической» ТСХ, ВЭТСХ использует высокоэффективные пластины, размер зерна сорбента которых составляет 7–15 мкм, т. е. близок к 5–10 мкм, используемым в ВЭЖХ. Стационарная фаза современных ВЭТСХ-пластин может быть изготовлена из высокоочищенного силикагеля или из силикагеля с привитыми С18, С8, аминными и диольными груп-



пами. Кроме того, сорбент пластин ВЭТСХ может быть сразу покрыт реагентом, например кофеином. Оборудование для ВЭТСХ также не уступает по своим техническим характеристикам оборудованию ВЭЖХ. Для нанесения пробы на пластину используется или автоматический аппликатор, или полностью автоматический самплер, дозирование в которых происходит с помощью шприцев производства Hamilton. Объемы шприцев такие же, как и для ВЭЖХ: 100, 300, 500 мкл, то есть обеспечивается такая же воспроизводимость, как и при вводе пробы при использовании метода «частичного заполнения петли» в автосамплерах ВЭЖХ, – мало кто пользуется ручным методом полного заполнения петли. В большинстве случаев в ВЭЖХ применяется сканирующий спектрофотометрический детектор в УФ- и видимой области. Он позволяет решать большинство задач. Реже вместо сканирующего используют диодноматричный детектор: удорожая систему, он позволяет снимать спектры веществ; также методом сравнения спектров одного пика можно определить его чистоту.

Вторым по частоте использования является флуоресцентный детектор. Его применяют, если для флуоресцирующего вещества нужно понизить порог определения. Он значительно удорожает систему. Иногда,

чтобы увеличить чувствительность, прибегают к использованию предколоночной или постколоночной дериватизации.

Другие детекторы используются в менее чем 5 % всех случаев и применяются, если ни один из вышеперечисленных методов не дает результата.

Что же предлагает инструментальная тонкослойная хроматография? Возможно применение двух типов детекции – видеоденситометрии и сканирующей денситометрии. Видеоденситометрия позволяет детектировать как поглощение при длине волны 254 нм, так и флуоресценцию при длине волны возбуждения 365 нм, а также вещества и/или их производные в видимой области. Это распространенный и в то же время дешевый способ детектирования в ТСХ и ВЭТСХ.

Но по-настоящему мощным прибором является ТСХ-сканер. Он позволяет сканировать пластины монохромным светом в диапазоне 190–900 нм, при этом варьировать ширину щели как монохроматора, так и облучателя. Отсутствие движения потока растворителя дает возможность как измерять спектр любого вещества для идентификации, так и определять чистоту пика. Таким образом, ТСХ-сканер предоставляет такие же возможности, как и диодноматричный детектор ВЭЖХ. Кроме того, ТСХ-сканер может работать и в режиме флуоресценции, то есть он заменяет сразу два детектора ВЭЖХ – УФ-ВИД диодноматричный и флуоресцентный.

Стадии элюирования в ВЭЖХ и ВЭТСХ значительно отличаются между собой, поэтому параллели провести сложно. Тем не менее стадия элюирования в ВЭТСХ происходит полностью автоматически, при этом, кроме мониторинга перемещения фронта, контролируются насыщение парами растворителя и влажность, как основные критерии хроматографирования. Аналогично ВЭЖХ, возможно проведение градиентного элюирования. Таким образом, мы видим, что ВЭТСХ может полностью заменить ВЭЖХ для анализа смывов при валидации очистки.

Но где же преимущества? Во-первых, ВЭТСХ остается открытой системой, поэтому пользователь может видеть все, что остается на

старте. Во-вторых, на одну пластину ВЭТСХ размером 20x10 см можно нанести до 72 растворов, а это означает не менее 60 анализируемых одновременно проб в течение 1 часа, что не под силу даже самым быстрым ВЭЖХ-системам. В-третьих, пластина ВЭТСХ используется один раз, а значит, и не существует риска ее «убить», как это часто бывает с колонкой. Указанные выше факты доказывают, что ВЭТСХ не только не уступает ВЭЖХ, но и имеет неоспоримые преимущества для анализа большого количества однотипных проб.

Рассмотрим использование ВЭТСХ для валидации очистки на примере компании Bayer Weimar GmbH & Co. KG, которая производит заменители гормонов и активные вещества противозачаточного действия для компании Bayer AG. Компания применяет ВЭТСХ для контроля критических точек в производстве. Для валидации очистки ВЭТСХ применяется с 1998 года. Аргументами для принятия решения в пользу ВЭТСХ стали:

- сопоставимые результаты между ВЭТСХ и ВЭЖХ;
- обработка пластин с помощью сканера и дериватизации;
- низкий предел обнаружения следовых компонентов;
- анализ большого количества образцов;
- значительная экономия времени и средств.

Для валидации очистки проводится смыв с поверхностей оборудования, согласно оговоренной регламентом процедуре, в определенных местах, обычно на площади 100–200 см². Для этого используются предварительно очищенные в экстракторе Сокслета 2–3-сантиметровые кусочки ткани.

Подготовка пробы

Проба трижды экстрагируется 50 мл хлороформа спектроскопической чистоты с применением УЗ-бани. Объединенный экстракт выпаривается до сухого остатка на ротационном испарителе при 60 °С. Остаток смывается хлороформом и на несколько минут помещается в УЗ-баню. Если раствор не прозрачный, то его фильтруют или центрифугируют. Аналогично готовят бланк.

Стандарты

Для калибровки готовят стандартные растворы трех concentra-

ций в пределах границы определения и 20-кратную концентрацию.

Пластины ВЭТСХ

Для анализа использовались пластины Merck ВЭТСХ Силикагель 60 F254, 20x10 см.

Нанесение образцов

Нанесение образцов проводилось с помощью автоматического аппликатора Automatic TLC Sampler (ATS4). В данном случае наносили по 100 мкл образца, бланка и стандартных растворов в виде прямоугольников 4x3 мм. Скорость нанесения – 250 нл/с.

Элюирование

Элюирование с фокусировкой пробы на пластине проводили с помощью смеси «толуол – этилацетат» 3:2 в автоматической камере для элюирования (ADC) после 10-минутного насыщения камеры с пластиной парами растворителя.

Денситометрия

Сканирование проводилось с помощью денситометра TLC Scanner 3 с программным обеспечением winCATS. Идентификация веществ осуществлялась путем снятия спектра в диапазоне 200–350 нм, количественное определение проводилось по расчету 3-уровневой калибровки.

Дериватизация

Для визуализации пятен на пластине ее подвергают опрыскиванию или погружению в проявитель, состоящий из смеси «метанол – серная кислота» 9:1. После нанесения раствора пластину выдерживают при 105 °С в течение 5 минут. Для последующего количественного определения рекомендуется применять погружение, а не опрыскивание, т. к. при этом фон получается более однородным.

Обсуждение полученных результатов

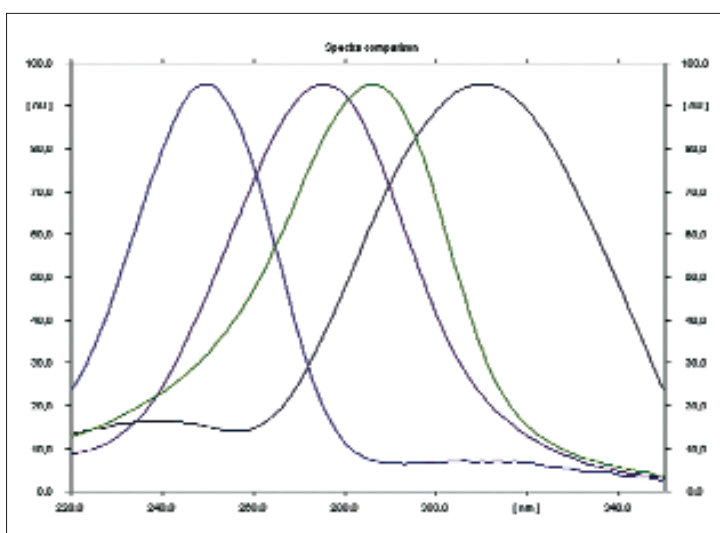
Были получены достоверные результаты при выполнении процедуры валидации с помощью анализа на ВЭТСХ. Значения R_f и спектры поглощения в УФ-области, а также цветовая окраска веществ / флуоресценция после дериватизации являются достаточными для идентификации веществ. Проверка чувствительности и селективности показывает, что активные ингредиенты, а также вспомогательные вещества достаточно хорошо разделены. В за-

висимости от концентраций соотношение концентрация/сигнал может иметь вид как линейный, так и полинома. Приемлемой является функция с коэффициентом корреляции не менее 0,990. При анализе рисков были выявлены места, требующие повторной очистки и проверки. При проведении калибровки и экстраполяции на всю площадь сосуда, которая соприкасается с продуктом, было выявлено, что остаточное количество продукта составляет не более 0,5 % от допустимого.

Выводы

Валидация очистки с применением ВЭТСХ-анализа (т. е. определение следовых количеств активных ингредиентов) может быть проведена с требуемой точностью. Метод прост и быстр. Результаты, полученные при использовании метода количественной денситометрии, точны и достоверны. ■

Camag Bibliography Service (CAMAG, Switzerland)



Спектры поглощения активных ингредиентов Вауер



Вид ВЭТСХ-пластины после дериватизации в видимом свете и при UV 366 нм для проверки селективности



Вид ВЭТСХ-пластины после дериватизации: дорожки 1–3 – калибровки, 4 – бланк, дорожки 5–8 – образцы, взятые с четырех зон



Камера автоматического элюирования CAMAG Automatic Developing Chamber (ADC 2) позволяет полностью автоматически элюировать ВЭТСХ пластины размером 20x10 см, гарантируя высокую воспроизводимость и независимость от условий окружающей среды. Программно устанавливается и контролируется предварительное кондиционирование, контроль относительной влажности и насыщение камеры, а также движение фронта и сушка по достижении заданного уровня фронта элюента. Возможно 2 режима управления: управление и программирование с клавиатуры встроенного контроллера или управление с ПК с помощью программного обеспечения winCATS – операционной системы для всего ВЭТСХ-анализа.

Если образец наносится не в виде полоски, а в виде прямоугольника, то с помощью ADC 2 можно легко и воспроизводимо провести фокусировку места аппликации в тонкую линию перед началом элюирования. Более подробную информацию можно найти в брошюре «Automatic Developing Chamber ADC 2» или на сайте www.camag.com/adc2. ■



Контактная информация:

Компания «Донау Лаб» – эксклюзивный представитель CAMAG в Украине

Тел.: +38 (044) 229-15-31 / -32, -33,
факс: +38 (044) 229-15-30.
office-ua@donaulab.com
www.donaulab.com

