

Joonas Räsänen

# Pesuainejäämien määritysmenetelmien kehitys ja validointi puhdistusvalidointitarkoitukseen

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Laboratorioanalyttikko (AMK)

Laboratorioala

Opinnäytetyö

4.9.2017

Tekijä(t) Otsikko  Sivumäärä Aika	Joonas Räsänen Pesuainejäämien määritysmenetelmien kehitys ja validointi puhdistusvalidointitarkoitukseen  30 sivua + 2 liitettä 4.9.2017
Tutkinto	Laboratorioanalyttikko (AMK)
Koulutusohjelma	Laboratorioalan koulutusohjelma
Ohjaaja(t)	Laboratoriopäällikkö Tuula Hauta-aho Yliopettaja Jukka Niiranen
<p>Työn tarkoituksena oli kehittää ja validoida analyttinen menetelmä puhdistusvalidointitarkoitukseen pesuainejäämien määrittämiseksi. Menetelminä käytettiin johtokyky- ja TOC-mittauksia ja molemmat menetelmät kehitettiin sively ja huuhtelunäytteiden analysointiin. Johtokyky menetelmän avulla määritettiin epäorgaaniset epäpuhtaudet ja TOC-menetelmällä orgaaniset epäpuhtaudet.</p> <p>Validointisuunnitelmassa asetettiin jäämäraajat ja validoinnin hyväksymiskriteerit. Jäämäraajat perustuvat Euroopan farmakopean puhtaan veden laatuvaatimuksiin. Molemmilla menetelmillä validoitiin menetelmien lineaarisuus, detektointi- ja kvantitointiraja, tarkkuus sekä haavoittuvuus näytteiden säilymisen osalta.</p> <p>Työn tuloksena kehitettiin toimivat menetelmät, joilla voidaan mitata huuhtelu- ja sivelynäytteiden pesuainejäämät.</p>	
Avainsanat	puhdistusvalidointi, TOC

Author(s) Title	Joonas Räsänen Method Development and Validation for Determination of Traces of Detergent in Cleaning Validation Purposes
Number of Pages Date	30 pages + 2 appendices 4 September 2017
Degree	Bachelor of laboratory services
Degree Programme	Laboratory sciences
Instructor(s)	Tuula Hauta-aho, Laboratory Manager Jukka Niiranen, Principal Lecturer
<p>The purpose of this study was to develop and validate a method, as a part of cleaning validation, for the determination of traces of cleaning detergent.</p> <p>The used methods were conductivity and TOC measurements and both methods contained swab samples and rinse water samples. Conductivity method was designed to determine the inorganic impurities and TOC method organic impurities.</p> <p>In the objective of this validation, residue limits and validation acceptance criteria were set. Residue limits are based on the European Pharmacopoeia purified water quality requirements. The validated parameters on both methods were linearity, limit of detection, limit of quantification, accuracy and robustness regarding the preservation of the samples.</p> <p>As the result of this work, methods were successfully developed to measure cleaning detergent residues in rinse water samples and swab samples.</p>	
Keywords	cleaning validation, TOC

# Sisällys

## Lyhenteet

1	Johdanto	1
2	Puhdistusvalidointi	1
2.1	Validointisuunnitelma	3
2.2	Validoinnin suorittaminen	4
2.2.1	Visuaalinen puhtaus	4
2.2.2	Huuhtelunäytteet	4
2.2.3	Sivelynäytteet	5
2.3	Näytteiden analysointi	6
2.4	Validointiraportti	7
3	Orgaanisen kokonaishiillen (TOC) analysointi	7
3.1	Orgaaninen kokonaishiili	8
3.2	Kokonaishiili ja epäorgaaninen hiili	9
3.3	Nestemäisten näytteiden mittaaminen TOC-analysaattorilla	9
3.3.1	Erotusmenetelmä	10
3.3.2	NPOC-menetelmä	11
4	Materiaali ja laitteisto	11
4.1	Reagenssit ja tarvikkeet	11
4.2	Laitteet	12
5	Työn suunnittelu ja menetelmänkehitys	12
5.1	Sivelynäytteiden käsittely johtokykymittauksiin	12
5.2	Sivelynäytteiden käsittely TOC-mittauksiin	13
5.3	TOC-menetelmän kehitys	13
5.4	Deconex CIP seven –pesuaine	13
5.5	Validointisuunnitelma	14
6	Johtokyky menetelmän validointi	15
6.1	Lineaarisuus	15
6.2	Tarkkuus (saanto ja toistettavuus)	16
6.3	Detektointiraja	18
6.4	Kvantitointiraja	18

6.5	Haavoittuvuus	19
6.5.1	Sivelynäytteiden säilyvyys	19
6.5.2	Huuhtelunäytteiden säilyvyys	20
7	TOC-menetelmän validointi	21
7.1	Lineaarisuus	21
7.2	Tarkkuus (saanto ja toistettavuus)	23
7.3	Detektointiraja	25
7.4	Kvantitointiraja	25
7.5	Haavoittuvuus	26
7.5.1	Sivelynäytteiden säilyvyys	26
7.5.2	Huuhtelunäytteiden säilyvyys	27
8	Johtopäätökset	27
	Lähteet	30
	Liitteet	
	Liite 1. TOC-metodi	
	Liite 2. TOC-analysaattorin kalibrointi	

## Lyhenteet

Aq.purif.	Ph.Eur:n laatuvaatimukset täyttävä puhdas vesi (Aqua purificata)
H <sub>2</sub> O R	Hiilidioksidivapaa reagenssivesi (Ph.Eur.)
IC/TIC	Epäorgaaninen hiili (Inorganic carbon/Total inorganic carbon)
NDIR	Infrapunadetektor (Non-dispersive infrared)
NPOC	Haihtumaton orgaaninen hiili (Non-purgeable organic carbon)
Ph.Eur.	Euroopan farmakopea
POC	Haihtuva orgaaninen hiili (Purgeable organic carbon)
TC	Kokonaishiili (Total carbon)
TOC	Orgaaninen kokonaishiili (Total organic carbon)

## 1 Johdanto

Työn tarkoituksena oli kehittää ja validoida puhdistusvalidointitarkotukseen pesuainejäämien määrittäminen uudelle pesuaineelle. Puhdistusvalidoinnilla tarkastetaan puhdistuksen riittävyys takaamaan käytettyjen laitteiden puhtaus ja estämään haitallisten jäämien siirtyminen seuraavaan tuoteeseen.

Pesuaine on helposti veteen liukeneva ja koska siitä ei tarvitse kvantitoida yksittäisiä yhdisteitä, voidaan sen kokonaisjäämiä mitata ilman spesifistä analyysimenetelmää. Tässä työssä menetelminä käytettiin johtokyky- ja TOC-mittauksia. Menetelmänkehityksessä mallinnettiin huuhtelu- ja sivelynäytteitä.

Työ suoritettiin Yliopiston Apteekin analyttisessä laboratoriossa 10.8.2015 – 13.11.2015 välisenä aikana. Laboratorio tutkii oman valmistuksen valmisteet, raaka-aineet, apuaineet ja pakkausmateriaalit. Tämän lisäksi laboratorio tarjoaa analyysipalveluita ulkopuolisille asiakkaille.

Hieman aiemmin laboratorioon oltiin hankittu TOC-analysaattori vesimäärittäystä ja puhdistusvalidointeja varten. TOC-analysaattoria ei oltu aiemmin käytetty muutamaa kokeilua lukuunottamatta, joten työn suorittaminen palveli erityisesti laitteen käyttöönottoa, hallintaa ja käytännön testausta. Työ painottui siis vahvasti TOC-mittauksiin ja menetelmänkehitykseen.

## 2 Puhdistusvalidointi

Puhdistusvalidointeja tehdään lääketieteellisyydessä, lääkevalmistuksessa käytettävillä laitteilla, astioilla ja laitelinjoilla. Tarkoituksena on kontrolloida ristikontaminaation riskiä, ja näin taata potilasturvallisuus ja tuotteen laatu. Puhdistusvalidoinnin yleisiä asetuksia ja ohjeita Euroopassa antaa Eudralexin GMP-ohjeistus (Eudralex Volume 4; EU Guidelines for Good Manufacturing Practice for Medicinal Products for Human and Veterinary Use). Suomessa puhdistusvalidointien tarvetta ja toteutumista valvoo lääkealan turvallisuus- ja kehittämiskeskus Fimea.

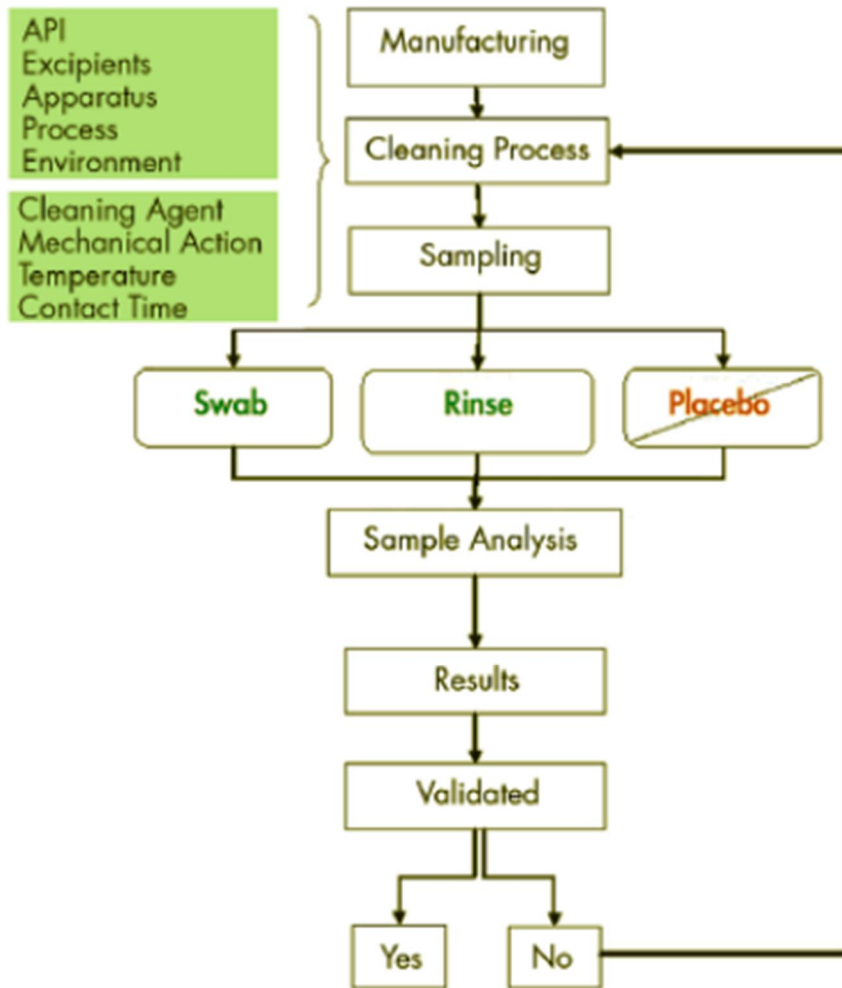
Puhdistusvalidointi todistaa dokumentoidusti, että käytettävä puhdistusmenetelmä poistaa toistettavasti edellisen tuotteen tai käytetyn puhdistusaineen sisältämät yhdisteet alle tieteellisesti asetetun pitoisuusrajan. Puhdistusvalidoinnin avulla tarkistetaan puhdistuksen riittävyys ja estetään mahdolliset ristikontaminaatiot, kun samalla laitteistolla valmistetaan eri tuotteita. Näin voidaan todistaa, että lääkevalmistuksessa käytettävät tuotantolaitteet ovat asianmukaisesti puhdistettu. [1; 2; 3.]

Puhdistusvalidoinnin vaiheet ovat seuraavat:

1. Validointisuunnitelman laatiminen
2. Validoinnin suorittaminen ja analysointi validoidulla analyysimenetelmällä
3. Validointiraportin laatiminen

Puhdistusvalidointi suoritetaan yleensä vähintään kolme erillistä kertaa (tuotteen kolmesta eri valmistuserästä), jolloin päästään varmuuteen puhdistuksen toistettavuudesta. Analysointitulosten perusteella puhdistusvalidointi joko hyväksytään tai hylätään. Validoinnin vaiheita on havainnollistettu kuvassa 1. [1; 3; 4.]





Kuva 1. Puhdistusvalidoinnin vaiheet kaaviokuvana [4.]

Kun samalla laitteistolla valmistetaan useampia tuotteita, voidaan validoitava yhdiste, aktiivinen aine valita ns. worst-case-periaatteella. Kaikista laitteistolla valmistettavista tuotteista tehdään riskiarvio, joista valitaan hankalimmin puhdistuva, eli Worst-case-tuote validoitavaksi. Valintaan vaikuttavat muun muassa aktiivisen aineen liukoisuus ja toksisuus, pienin laitteistolla valmistettava eräkoko ja tämän tuotteen maksimi päiväänos, sekä koko laitteiston pinta-ala. Riskiarvion perusteella laitteistolle lasketaan worst-case-tuotteen jäämäraja yleensä pinta-alaa kohden. [3.]

## 2.1 Validointisuunnitelma

Validointisuunnitelmassa selvitetään validoinnin tarkoitus ja kaikki suoritettavat toimenpiteet hyväksymiskriteereineen. Se sisältää tiedot validoitavasta laitteistosta, laitteistol-

la prosessoitavista valmisteista ja yksittäisistä vaikuttavista aineista, joita puhdistusvalidointi koskee. Suunnitelmaan kirjataan myös tiedot näytteenotosta ja käytettävistä (validoidusta) analysointimenetelmistä. [3.]

## 2.2 Validoinnin suorittaminen

Validointi suoritetaan validointisuunnitelman sisältämän ohjeistuksen mukaan. Puhdistettavasta laitteistosta voidaan ottaa sivelynäytteitä (pyyhintänäyte) ja/tai huuhtelunäytteitä. Puhtaus tarkistetaan aina myös visuaalisesti. Lisäksi voidaan ottaa myös mikrobiologisia näytteitä. [3.]

### 2.2.1 Visuaalinen puhtaus

Visuaalinen puhtaus on erittäin tärkeä hyväksymiskriteeri puhdistusvalidoinnille. Visuaalinen puhtaus tarkistetaan puhdistuksen jälkeen laitteen kaikilta pinnoilta (mahdollisuuksien mukaan), missä se on kontaktissa aktiivisen aineen kanssa. Näin saadaan jo varhaisessa vaiheessa paikallistettua ja identifioitua mahdolliset puutteet puhdistusmenetelmässä. [1; 3.]

Koska visuaalinen puhtaus on kvalitatiivinen ja subjektiivinen määritelmä – riippuen tarkastelijasta, ei se yksistään riitä validoinnin hyväksymiskriteeriksi. Visuaalisella tarkastelulla saadaan kuitenkin jo varhaisessa vaiheessa tietoa puhtaudesta. [1;3.]

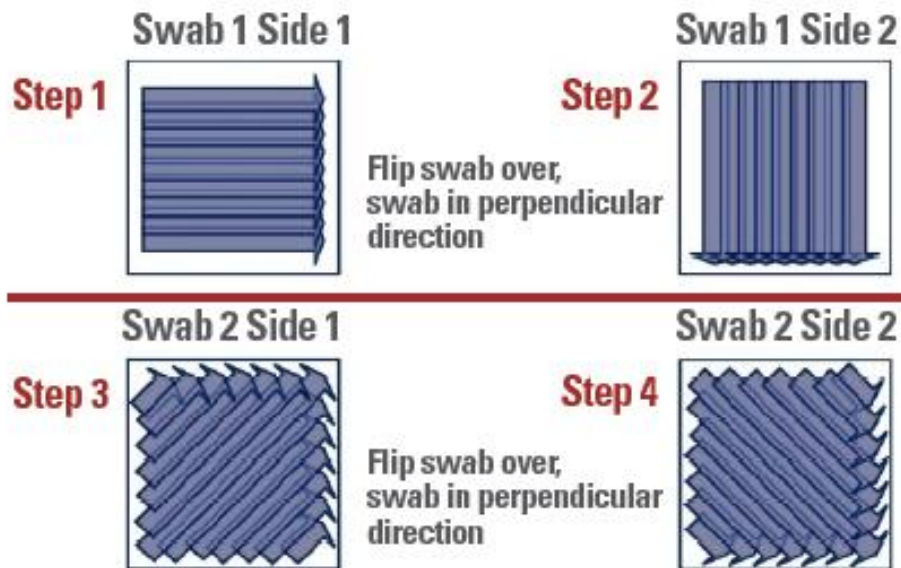
### 2.2.2 Huuhtelunäytteet

Huuhtelunäytteitä voidaan ottaa suoraan puhdistuksen viimeisistä huuhteluvesistä. Huuhtelunäytteen etuja ovat, että näyte saadaan suurelta kontaktipinnalta ja näyte saadaan myös ahtaista ja muuten luoksepääsemättömistä kohdista. Huuhtelunäytteet voidaan analysoida kvantitatiivisesti, esimerkiksi mittaamalla liuoksen pH, johtokyky, TOC, tai mittaamalla näyte spektrofotometrisesti. Huuhtelunäytteiden haittapuolia ovat epäselvä saantokerroin ja laimennoskerroin. [3.]

### 2.2.3 Sivelynäytteet

Sivelynäytteitä otetaan suoraan laitteen kontaktipinnoilta puhdistuksen jälkeen. Näytteitä pyritään ottamaan mahdollisimman kattavasti, joka tapahtuu purkamalla laitteistoa mahdollisuuksien mukaan. Siveltävä pinta-ala täytyy olla tiedossa, ja se voi olla esimerkiksi 10 x 10 cm:n kokoinen alue. Tarkan sivelyalan saamiseksi apuna voidaan käyttää sapluunaa. Ennen sivelyä sivelytikku kostutetaan liuottimeen, joka tarkoitukselta riippuen voi olla esimerkiksi steriiliä vettä tai etanolia. Liuotin ei kuitenkaan saa vahingoittaa laitteistoa. [3.]

Sively suoritetaan aina samalla tavalla, esimerkiksi sivelemällä ensin kahdesti vaakasuoraan kääntäen välissä sivelytikkuja ja sitten kahdesti pystysuoraan kääntäen välillä sivelytikkuja. Tyypillinen sivelytekniikka on esitetty kuvassa 2. [3; 5.]



Kuva 2. Tyypillinen sivelytekniikka [5.]

Näytteenoton jälkeen sivelytikku laitetaan välittömästi puhtaaseen näytepulloon, koeputkeen tai muuhun astiaan, jossa se uutetaan analysoinnin yhteydessä.

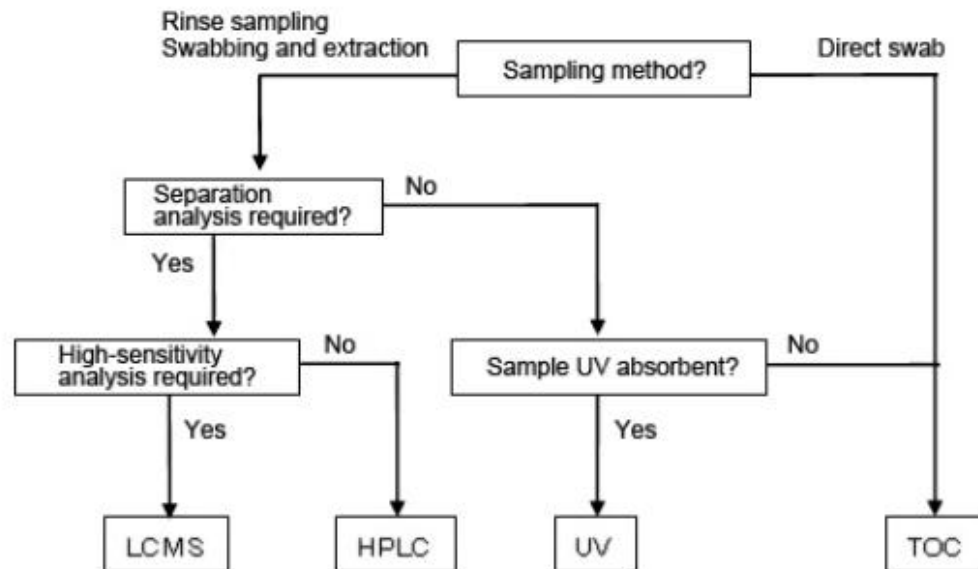
Näytteenottoon tarkoitettuja sivelytikkuja on tarjolla kymmeniä erilaisia. Esimerkiksi TOC-analyysiä varten on tarjolla sivelytikkuja, joiden TOC-pitoisuus on häviävän pieni. Näin minimoidaan taustan vaikutus näytettä analysoidessa. Kuvassa 3 on esitetty eräitä Texwipen sivelytikkuja. [5.]

**TX714K** Low TOC Alpha® Sampling Swab**TX761K** Low TOC Alpha® Swab with Long Handle

Kuva 3. Texwipen sivelytikkuja [5.]

### 2.3 Näytteiden analysointi

Näytteet analysoidaan validoiduilla menetelmillä. Menetelmän on oltava riittävän herkkä pienien pitoisuuksien määrittämiseen. Menetelmät voivat olla puhdistusvalidoinnin tarkoituksesta riippuen spesifisiä tai ei-spesifisiä. Tyypillisimpiä spesifisiä menetelmiä ovat esimerkiksi nestekromatografia, UV-spektrofotometria, ioniselektiiviset elektrodit ja entsymaattiset määritysmenetelmät. Epäspesifisiä yleisesti käytettyjä menetelmiä ovat esimerkiksi TOC (Total organic carbon) ja johtokykyyn perustuvat menetelmät. Menetelmän valintaan vaikuttaa validoitavan yhdisteen lisäksi näytteenottotapa. Kuvassa 4 on havainnollistettu analysointimenetelmän valintaa. [3; 9.]



Kuva 4. Analyysimenetelmän valintaan vaikuttavia tekijöitä [9.]

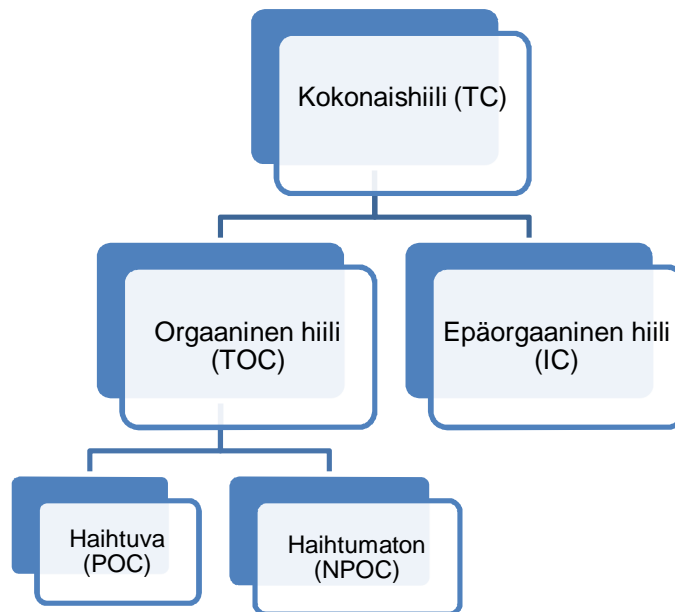
## 2.4 Validointiraportti

Validointiraporttiin kirjataan tulokset ja poikkeukset validointisuunnitelmasta. Raportista pitää myös selvittää, hyväksytäänkö puhdistusvalidointi vai ei. Lisäksi raportissa tulisi huomioida uudellevalidoinnin tarve.

On käytännössä mahdotonta osoittaa, että tuotantolaitteet ovat 100 % puhtaita. Siitä huolimatta on mahdollista osoittaa, että aktiivisen aineen jäämät ympäri laitteistoa ovat hyväksyttävissä rajoissa, ja että näitä jäännöspitoisuuksia pystytään detektoimaan ja kvantitoimaan. [3.]

## 3 Orgaanisen kokonaishiillen (TOC) analysointi

Hiilen muodostamat yhdisteet jaetaan epäorgaanisiin ja orgaanisiin yhdisteisiin. Orgaaniset yhdisteet muodostuvat hiilirungosta ja siihen sitoutuneista vedyistä ja funktionaalisisista ryhmistä. Hiilimäärittysten kannalta on oleellista, onko hiili orgaanista vai epäorgaanista. Kuvassa 4 on havainnollistettu, miten hiili jaetaan sen mitattavuuden suhteen.



Kuva 5. Hiilen jaottelu mitattavuuden mukaan [6; 7.]

### 3.1 Orgaaninen kokonaishiili

Orgaanisella kokonaishiilellä (TOC) tarkoitetaan kaikista orgaanisista yhdisteistä peräisin olevaa hiiltä. Vesinäytteistä mitattavaa orgaanisen kokonaishiilen määrää käytetään veden puhtauden arviointiin. Se on yksi tärkeimmistä veden saastumista kuvaavista parametreista, koska se sisältää kaikki orgaaniset yhdisteet yhtenä määritettävänä massana. [6.]

Orgaaninen kokonaishiili voidaan jaotella vielä kahteen alaryhmään, haihtumattomaan orgaaniseen hiileen (NPOC) ja haihtuvaan orgaaniseen hiileen (POC). Haihtuvat orgaaniset hiilyhdisteet voidaan poistaa vesinäytteistä kuplittamalla. Haihtumattomat orgaaniset hiilyhdisteet voivat olla liuenneena ja/tai liukenemattomana (partikkeleina), eivätkä nämä yhdisteet poistu kuplittamalla.

TOC-pitoisuuksia mitataan esimerkiksi talous- ja jätevesistä, ympäristövesinäytteistä, lääketeollisuuden tuotantovesistä ja muista puhtasvesistä. Taulukkoon 1 on koottu eri käyttösovelluksia ja niiden keskimääräisiä TOC-pitoisuuksia. [7.]

Taulukko 1. Erilaisten vesien TOC-pitoisuuksia [7.]

Vesinäyte	TOC (mg/l)
Ultrapuhdas vesi	< 0,01
Injektiovesi (WFI)	< 0,50
Pohjavesi	< 1
Merivesi	< 1
Juomavesi	< 4
Pintavesi	< 10
Jätevesi	> 10

### 3.2 Kokonaishiili ja epäorgaaninen hiili

Kokonaishiili (TC) muodostuu orgaanisesta- ja epäorgaanisesta hiilestä (IC tai TIC) ja on yksiselitteisesti niiden summa. Vesinäytteissä epäorgaaninen hiili sisältää liuenneen hiilidioksidin ja muut liuenneet ja liukenemattomat epäorgaaniset hiilyhdisteet, joita ovat pääasiassa karbonaatit ja bikarbonaatit. [6; 11.]

### 3.3 Nestemäisten näytteiden mittaaminen TOC-analysaattorilla

TOC-analysaattoreita on saatavilla sekä jatkuvatoimisen prosessin suoraan monitorointiin, eli on-line mittauksiin, että perinteiseen laboratoriomalliin, yksittäisten näytteiden mittaamiseen. Useimmilla hiilianalysaattoreilla voidaan mitata nestemäisistä näytteistä TOC, IC, TC ja NPOC. Myös POC voidaan mitata, mutta se saattaa vaatia erillisen lisävarustuksen, POC-kitin.

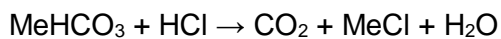
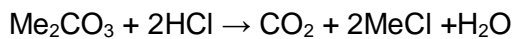
Analysaattoreilla mittaaminen perustuu näytteen sisältämän hiilen täydelliseen hapettamiseen hiilidioksidiksi, joka puolestaan pystytään detektoimaan. Hapetusmenetelmiä on useita erilaisia ja tässä tulevat suurimmat erot eri laitteiden välillä. Yleisimpiä hapetusmenetelmiä ovat esimerkiksi katalyyttinen poltto (engl. combustion), UV-säteilytys ja

UV/persulfaattihapetus. Detektointi tapahtuu laitteesta riippuen joko NDIR- tai johtokykydetektorilla.

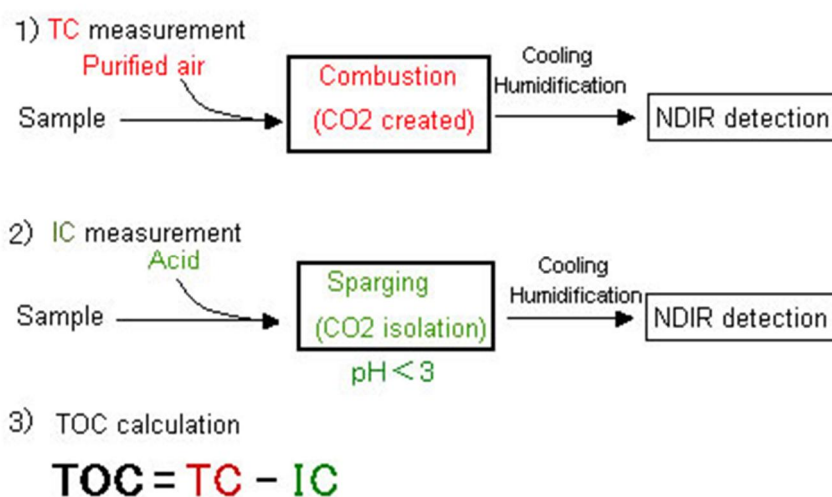
Näytteen sisältämä orgaanisen hiilen pitoisuus voidaan mitata TOC-analysaattorilla kahdella eri tavalla: Erotusmenetelmällä tai NPOC-menetelmällä. [6; 7; 11; 12.]

### 3.3.1 Erotusmenetelmä

Erotusmenetelmässä näytteestä mitataan erikseen TC ja IC, jolloin TOC on näiden erotus. Menetelmää on havainnollistettu kuvassa 6. Näytteen epäorgaaninen hiili koostuu karbonaateista ja liuenneesta hiilidioksidista. IC mitataan lisäämällä näytteeseen pieni määrä happoa (esim. HCl), jolloin kaikki karbonaatit muuttuvat hiilidioksidiksi:



Tämän jälkeen näytettä kuplitetaan synteettisellä ilmalla, joka syrjäyttää hiilidioksidin ja haihtunut hiilidioksidi voidaan detektoida. TC mitataan hapettamalla näyte hiilidioksidiksi, joka voidaan detektoida. TOC-pitoisuus saadaan erotuksena:  $\text{TOC} = \text{TC} - \text{IC}$ . Erotusmenetelmää voidaan käyttää näytteille, joissa on vähemmän epäorgaanista kuin orgaanista hiiltä. [7; 11; 12.]

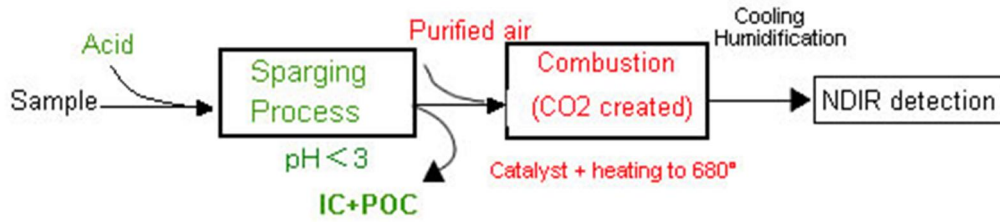


Kuva 6. TOC-määritys erotusmenetelmällä [12.]



### 3.3.2 NPOC-menetelmä

NPOC-menetelmässä näyte käsitellään IC:n poistamiseksi jo ennen mittausta. Näytteeseen lisätään pieni määrä happoa (esim. HCl) ja sitä kuplitetaan synteettisellä ilmal-  
la, jolloin IC poistuu näytteestä hiilidioksidina. Näin kaikki jäljelle jäävä hiili on orgaanis-  
ta ja se mitataan kuten TC. Menetelmää on havainnollistettu kuvassa 7. [11; 12.]



Kuva 7. TOC-määritys NPOC-menetelmällä [12.]

Kuplitus poistaa näytteestä myös haihtuvia orgaanisia yhdisteitä. Puhdistetuissa vesis-  
sä näiden yhdisteiden määrä on kuitenkin merkityksetön, ja esimerkiksi Euroopan far-  
makopea hyväksyy menetelmän käytön vesien TOC-määrityksiin. [10, luku 2.2.44.]

## 4 Materiaali ja laitteisto

### 4.1 Reagenssit ja tarvikkeet

#### Johtokyky mittaukset

- Steriili vesi, Baxter
- Sivelytikku Large Alpha Swap TX714A, ITW Texwipe, Kernesville, USA
- Deconex CIP seven pesuaine, Borer Chemie AG, Sveitsi
- Johtokykystandardi, 84  $\mu\text{S}/\text{cm}$ , Reagecon

#### TOC-mittaukset

- Sivelytikku Large Alpha Swap TX714K, ITW Texwipe, Kernesville, USA
- Deconex CIP seven pesuaine, Borer Chemie AG, Sveitsi
- Potassium phthalate monobasic, Sigma-Aldrich

## 4.2 Laitteet

### Johtokykymittaukset

- Johtokykymittari: Mettler-Toledo, Seven Multi S47
- Ultraäänihaude: Sonorex Super
- Tasoravistelijä: TR225
- Vesihaude: Lauda E225

### TOC- mittaukset

- TOC-analysaattori: Shimadzu, TOC-L CSH
- Näytteensyöttäjä nesteille: Shimadzu, ASI-L
- Ultraäänihaude: Finnsonic W-181
- Koeputkiravistelijä: Vortex Genie 2

## 5 Työn suunnittelu ja menetelmänkehitys

Lähtökohtana oli kehittää ja validoida analyttinen menetelmä pesuainejäämien määrittämiseen puhdistusvalidoinnissa. Validoitava pesuaine on Borer Chemie AG:n valmistama Deconex CIP seven. Menetelmiksi haluttiin johtokyky ja TOC. Johtokyvyn avulla voidaan mitata pesuaineesta jääviä epäorgaanisia epäpuhtauksia ja TOC:n avulla orgaanisia epäpuhtauksia. Tämän työn yhteydessä ei mitattu ainoatakaan puhdistusvalidointinäytettä, tarkoitus oli ainoastaan kehittää ja validoida menetelmä niiden mittaamiseen.

Menetelmät kehitettiin sively- ja huuhtelunäytteille. Huuhtelunäytteet voidaan mitata sellaisenaan, eivätkä ne tarvitse erillistä näytteenkäsittelyä. Sivelynäytteille kehitettiin mahdollisimman yksinkertaiset uuttomenetelmät.

### 5.1 Sivelynäytteiden käsittely johtokykymittauksiin

Kehitettiin menetelmä, jossa sivelytikku laitetaan 100 ml:n erlenmeyeriin ja lisätään 50,0 ml steriiliä vettä. Pidetään 10 minuuttia ultraäänihauteessa ja 20 minuuttia tasoravistelijassa. Näyte termostoidaan vesihauteessa 26 °C ja mitataan johtokyky 25 °C:ssa.

## 5.2 Sivelynäytteiden käsittely TOC-mittauksiin

Kehitettiin menetelmä, jossa sivelytikku taitetaan taittokohdasta poikki TOC-vialliin ja lisätään 30,0 ml H<sub>2</sub>O R. Pidetään 10 minuuttia ultraäänihauteessa ja 20 minuuttia vortexissa. Mitataan TOC-analysaattorilla, metodilla NPOC Aq.purif.met.

## 5.3 TOC-menetelmän kehitys

TOC-analysaattorille luotiin uusi metodi mittauksia varten, joka perustuu NPOC-mittaukseen (Non-Purgeable Organic Carbon). Menetelmässä näytteen epäorgaaninen hiili (karbonaatit ja liuennut hiilidioksidi) eliminoidaan näytteestä lisäämällä näytteeseen happoa ja kuplittamalla näytettä. Laite tekee hapon lisäyksen ja kuplituksen automaattisesti. Tämän jälkeen laite polttaa näytteen katalyyttisesti 680 °C:ssa, muuttaen jäljellä olevan orgaanisen hiilen hiilidioksidiksi. Hiilidioksidi detektoidaan NDIR-detektorilla. Metodin tiedot löytyvät liitteestä 1.

Metodin kalibrointiin käytettiin kaliumvetyftalaattiliuosta, jonka hiilipitoisuus oli 1 mg/l. Kalibrointi tallennettiin nimellä NPOC30 mg.cal ja sen tiedot löytyvät liitteestä 2. Sama kalibrointi oli käytössä kaikissa mittauksissa.

TOC-mittauksia varten testattiin eri vesiä näytteiden laimentamista varten. Vaihtoehtoina olivat tuotannon RO-vesi, tuotannon tislattu vesi ja laboratorion vesi (H<sub>2</sub>O R). Pienimmät TOC-pitoisuudet mitattiin laboratorion vedellä, joka valittiin laimennosvedeksi. Johtokykymittausten taustana käytettiin steriiliä vettä.

## 5.4 Deconex CIP seven –pesuaine

Deconex CIP seven on emäksinen pesuaine, jonka käyttöliuoksen (~1 % V/V) pH on noin 8,8. Se sisältää emäksisiä kompleksinmuodostajia ja muita emäksiä. Pesuaine on erityisesti suunniteltu lääketeollisuuteen, jossa sen käyttö on yleistä [8]. CIP (Clean in place) -termillä viitataan pesumenetelmään, jossa pesu tapahtuu erillisen pesurin avulla paikalla, purkamatta suljettua systeemiä.

Pesuaineesta tehtiin erivahvuisia liuoksia ja tutkittiin johtokykymittarin ja TOC-analysaattorin herkkyyttä pesuaineelle. Etsittiin pesuainepitoisuudet farmakopean Aq.purif. -veden hyväksymisrajojen kohdalta (johtokyky = 5,1  $\mu\text{S}/\text{cm}$ , TOC = 0,5 mg/l), joiden perusteella lähdettiin tekemään menetelmien kalibrointisuoria [10].

## 5.5 Validointisuunnitelma

Tässä työssä validoitavat parametrit olivat lineaarisuus, detektointi- ja kvantitointiraja, tarkkuus ja haavoittuvuus. Haavoittuvuudella tarkoitetaan näytteen säilyvyyttä, tarkkuudella saantoa ja toistettavuutta. Kriittiset rajat johtokyvyille 5,1  $\mu\text{S}/\text{cm}$  ja TOC:lle 0,5 mg/l tulevat Ph.Eur:sta Aq.purif. -monografiasta, ja ne ovat maksimiarvoja puhtaalle vedelle. Validointisuunnitelmassa asetettuja vaatimuksia on koottu taulukkoon 2.

Taulukko 2. Validointisuunnitelman vaatimuksia

	Johtokyky menetelmä	TOC-menetelmä
<i>Detektointiraja</i>	Nollanäytteen lukema	Nollanäytteen lukema
<i>Kvantitointiraja</i>	Pienin pitoisuus, jonka kuuden näytteen RSD % $\leq$ 15,0 %. Sivelynäytteelle käytetään samaa kvantitointirajaa kuin huuhtelunäytteelle	Pienin pitoisuus, jonka kuuden näytteen RSD % $\leq$ 15,0 %. Sivelynäytteelle käytetään samaa kvantitointirajaa kuin huuhtelunäytteelle
<i>Lineaarisuus</i>	Vähintään 5 standardia, vaatimus korrelaatiokertoimelle $> 0,95$	Vähintään 5 standardia, vaatimus korrelaatiokertoimelle $> 0,95$
<i>Tarkkuus</i>	Kuuden sivelynäytteiden saanto $> 80$ %, jos saanto jää alle käytetään korjauskerrointa. Huuhtelunäytteiden saantoa ei tutkita. Näytteiden RSD % $\leq 15,0$ %	Kuuden sivelynäytteiden saanto $> 80$ %, jos saanto jää alle käytetään korjauskerrointa. Huuhtelunäytteiden saantoa ei tutkita. Näytteiden RSD % $\leq 15,0$ %
<i>Haavoittuvuus</i>	Tutkitaan säilyvyyttä kolmen ja viiden vuorokauden jälkeen. Kolme näytettä per mittausajankohta. Verrataan johtokyvyn muutosta alkutilanteeseen.	Tutkitaan säilyvyyttä kolmen ja viiden vuorokauden jälkeen. Kolme näytettä per mittausajankohta. Verrataan TOC-pitoisuuden muutosta alkutilanteeseen.

## 6 Johtokyky menetelmän validointi

### 6.1 Lineaarisuus

#### Kantaliuos 1 µl/ml:

Laimennettiin Deconexista steriiliin veteen liuos, jonka pitoisuus oli 10 µl/ml (1000 µl / 100 ml). Tästä liuoksesta laimennettiin edelleen kantaliuos, jonka pitoisuus oli 1 µl/ml - (10 ml / 100 ml).

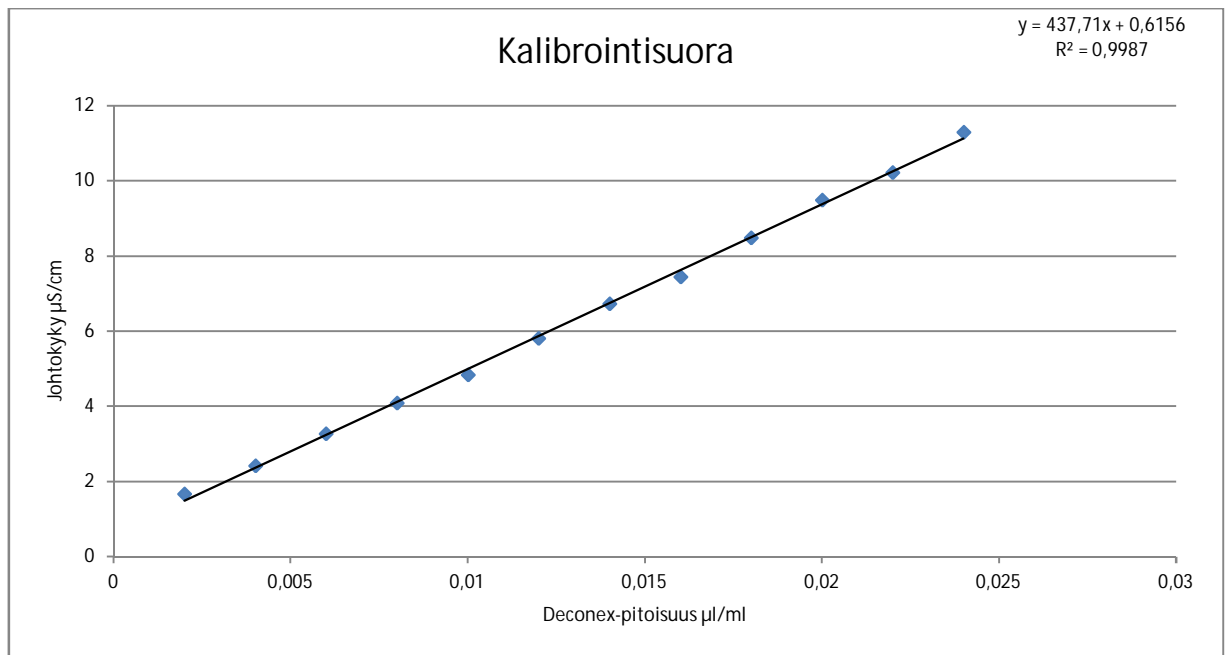
#### Kalibrointiliuokset:

Kantaliuoksesta laimennettiin 12 eri vahvuista kalibrointiliuosta 50 ml:n mittapulloihin ja täytettiin steriilillä vedellä merkkiin. Laimennokset, kalibrointiliuosten pitoisuudet ja mitatut johtokyvyt näkyvät taulukossa 3.

Kalibrointisuoran yhtälöksi saatiin  $y = 437,71x + 0,6156$  ja korrelaatiokerroimeksi  $R = 0,99935$ . Korrelaatiokerroin täyttää validointisuunnitelman vaatimuksen  $R > 0,95$ , joten menetelmän mittaosaluetta voidaan pitää lineaarisena. Kalibrointisuora on esitetty kuvassa 8.

Taulukko 3. Kalibrointiliuosten johtokyky

Laimennos kantaliuoksesta ml/ml	Deconex-pitoisuus µl/ml	Johtokyky µS/cm
0,1/50	0,002	1,66
0,2/50	0,004	2,41
0,3/50	0,006	3,27
0,4/50	0,008	4,08
0,5/50	0,010	4,83
0,6/50	0,012	5,80
0,7/50	0,014	6,72
0,8/50	0,016	7,43
0,9/50	0,018	8,48
1,0/50	0,020	9,49
1,1/50	0,022	10,22
1,2/50	0,024	11,28



Kuva 8. Johtokykymittausten kalibroitisuora

## 6.2 Tarkkuus (saanto ja toistettavuus)

Menetelmän tarkkuutta tutkittiin sivelynäytteiden saantokokeiden ja toistettavuuden perusteella.

Tarkkuuskokeita tehtiin pipetoimalla pesuainenäytettä 10 x 10 cm:n alueelle teräslevylle. Pesuaine kuivattiin levylle hiustenkuivaajalla ja pyyhittiin steriiliin veteen kostutetulla sivelytikulla (TX714A). Kuivattu tikku uutettiin 50 ml:aan vettä ultraäänihauteessa.

Toistettavuus määritettiin laskemalla kuuden rinnakkaisen tarkkuustuloksen RSD %. Validointisuunnitelmassa toistettavuuskokeen vaatimus on  $\leq 15$  %.

### **Kantaliuos 5,2 µl/ml:**

Kantaliuos valmistettiin pipetoimalla Deconexia 52 µl/ 10 ml steriiliin veteen (pitoisuus 5,2 µl/ml).

**Sivelynäytteet:**

Kantaliuosta pipetoitiin 0,1 ml (= 0,52 µl Deconexia) teräslevylle 10 x 10 cm:n alueelle, kuivattiin hiustenkuivaajalla ja annettiin jäähtyä. Alue siveltiin steriiliin veteen kostutetulla sivelytikulla. Sivelytikun kärki leikattiin 100 ml:n erlenmeyeriin, johon lisättiin 50 ml steriiliä vettä. Erlenmeyeria pidettiin ultraäänihauteessa 10 minuuttia ja sen jälkeen tasoravistelijalla 20 minuuttia. Lopuksi sivelynäyteliuosta termostoitettiin vesihauteessa, ja siitä mitattiin johtokyky 25 °C:ssa. Sivelynäytteitä tehtiin yhteensä kuusi.

**Vertailuliuos:**

Saantoprosentin laskemista varten tehtiin vertailuliuos. Kantaliuosta pipetoitiin 0,1 ml erlenmeyeriin, johon lisättiin 50 ml steriiliä vettä. Näyte käsiteltiin, kuten sivelynäytteet. Vertailuliukuksia tehtiin kaksi, joiden johtokyvyiksi mitattiin 4,94 µS/cm ja 4,90 µS/cm → keskiarvo 4,92µS/cm.

Mitatut johtokyvyt muutettiin pitoisuuksiksi kuvan 8 kalibrintisuoranyhtälön  $y = 437,71x + 0,6156$  avulla. Saatu pitoisuus kerrottiin vielä laimennoskertoimella 50 (koska sivelytikku uutettiin 50 ml:aan vettä, jotta saataisiin laskettua pesuaineenmäärä/tikku).

esim. näytteen 1 johtokyvyksi mitattiin 4,89 µS/cm. Pitoisuudeksi saadaan:

$$\frac{(4,89\mu S / cm - 0,6156\mu S / cm)}{437,71 \frac{\mu S / cm}{\mu l / ml}} * 50ml = 0,488\mu l / tikku$$

Vertailuliuksen pitoisuus on 0,4917 µl/50 ml

Saantoprosentti on tällöin:

$$saanto - \% = \frac{0,488\mu l}{0,4917\mu l} * 100\% = 99,3\%$$

Saantokokeiden mittaustulokset on koottu taulukkoon 4.

Taulukko 4. Saantokokeiden tulokset

	Johtokyky $\mu\text{S}/\text{cm}$	Pitoisuus $\mu\text{l}/\text{tikku}$	Saanto- %
Sively 1	4,89	0,488	99,3
Sively 2	4,74	0,471	95,8
Sively 3	4,74	0,471	95,8
Sively 4	4,66	0,462	94,0
Sively 5	4,60	0,455	92,6
Sively 6	5,21	0,525	106,7
Keskiarvo		0,479	97,4
Keskihajonta		0,03	5,1
RSD %			5,3

Validointisuunnitelman vaatimukset saantoprosentille oli  $\geq 80\%$  ja kuuden rinnakkaisnäytteen toistettavuudelle (RSD %)  $\leq 15\%$ , jotka molemmat täyttyivät, eikä analyysimenetelmässä tarvitse huomioida saantoprosenttia laskuissa.

### 6.3 Detektointiraja

Detektointiraja määritettiin nollanäytteiden avulla. Steriili vesi antoi johtokyvyksi noin  $1,1\ \mu\text{S}/\text{cm}$ . Puhdas sivelytikku, joka uutettiin näytteenkäsittelyohjeen mukaisesti antoi johtokyvyksi noin  $1,5\ \mu\text{S}/\text{cm}$ . Näytteistuksen yhteydessä käsitellään aina puhdas sivelytikku nollanäytteeksi.

### 6.4 Kvantitointiraja

Kvantitointirajan määrittämistä varten etsittiin pienintä näytepitoisuutta, joiden rinnakkaismääritysten ( $n \geq 6$ ) johtokykyarvot täyttävät ehdon:  $\text{RSD \%} \leq 15,0\%$ . Pienin liuospitoisuus, jolla ehto täyttyy oli  $0,002\ \mu\text{l}/\text{ml}$  ( $\text{RSD \%} < 3\%$ ). Kvantitointirajan johtokyky on noin  $1,7\ \mu\text{S}/\text{cm}$ . Tulokset on koottu taulukkoon 5.



Taulukko 5. Kvantitointirajat

Deconex-liuos	Johtokyky $\mu\text{S}/\text{cm}$
0,002 $\mu\text{l}/\text{ml}$	1,721
0,002 $\mu\text{l}/\text{ml}$	1,647
0,002 $\mu\text{l}/\text{ml}$	1,704
0,002 $\mu\text{l}/\text{ml}$	1,677
0,002 $\mu\text{l}/\text{ml}$	1,608
0,002 $\mu\text{l}/\text{ml}$	1,628
<i>Keskiarvo</i>	1,7
<i>Keskihajonta</i>	0,044
<i>RSD %</i>	2,7

## 6.5 Haavoittuvuus

Menetelmän haavoittuvuudessa tutkittiin näytteiden säilyvyyttä. Säilyvyyden tutkiminen on tärkeää, jos näytteitä ei pystytä analysoimaan heti.

### 6.5.1 Sivelynäytteiden säilyvyys

Laimennettiin Deconexista steriiliin veteen liuos, jonka pitoisuus oli 5,2  $\mu\text{l}/\text{ml}$  (52  $\mu\text{l}/10\text{ml}$ ). Tätä liuosta pipetoitiin 100  $\mu\text{l}$  yhdeksään steriiliin veteen kostutettuun sivelytikuun (TX714A). Sivelytikut kuivattiin ja laitettiin koeputkiin. Näytteet analysoitiin näytteenkäsittelyohjeen mukaisesti, kolmessa vaiheessa: 3 x heti, 3 x kolmen vuorokauden kuluttua ja 3 x viiden vuorokauden kuluttua. Koeputkia säilytettiin pimeässä, huoneenlämmössä. Johtokykyjen keskiarvoja verrattiin alkuperäisiin tuloksiin. Mittaustulokset on koottu taulukkoon 6.

Taulukko 6. Sivelynäytteiden säilyvyys

Sivelytikut	Alkuperäinen $\mu\text{S}/\text{cm}$	+3 vrk $\mu\text{S}/\text{cm}$	+5 vrk $\mu\text{S}/\text{cm}$
Näyte 1	4,98	5,55	5,06
Näyte 2	4,92	5,02	5,06
Näyte 3	4,86	5,64	4,90
Keskiarvo	4,92	5,40	5,01
Keskihajonta	0,06	0,34	0,09
RSD %	1,2	6,2	1,8
Keskiarvojen ero alkuperäiseen verrattuna (%)		9,8	1,8

## 6.5.2 Huuhtelunäytteiden säilyvyys

Laimennettiin Deconexista steriiliin veteen liuos, jonka pitoisuus oli 5,2  $\mu\text{l}/\text{ml}$  (52  $\mu\text{l}/10\text{ml}$ ). Tätä liuosta pipetoitiin 100  $\mu\text{l}$  yhdeksään 50 ml:n ruskeaan mittapulloon ja täytettiin vedellä merkkiin. Näytteiden johtokyvyt mitattiin kolmessa vaiheessa: 3 x heti, 3 x kolmen vuorokauden kuluttua ja 3 x viiden vuorokauden kuluttua. Johtokykyjen keskiarvoja verrattiin alkuperäisiin tuloksiin. Mittaustulokset on koottu taulukkoon 7.

Taulukko 7. Huuhtelunäytteiden säilyvyys

Huuhtelunäytteet	Alkuperäinen $\mu\text{S}/\text{cm}$	+3 vrk $\mu\text{S}/\text{cm}$	+5 vrk $\mu\text{S}/\text{cm}$
Näyte 1	4,99	5,03	5,08
Näyte 2	5,07	5,02	5,08
Näyte 3	5,01	5,08	5,12
Keskiarvo	5,02	5,04	5,09
Keskihajonta	0,04	0,03	0,02
RSD %	0,8	0,6	0,5
Keskiarvojen ero alkuperäiseen verrattuna (%)		0,4	1,4

## 7 TOC-menetelmän validointi

### 7.1 Lineaarisuus

Lineaarisuusmittauksia tehtiin kolmena eri päivänä. Jokaisena päivänä tehtiin uusi kalibrointisuora. Lopullinen kalibrointisuora muodostui mittausten keskiarvoista. Liuokset laimennettiin aina samalla tavalla.

#### **Kantaliuos 1 µl/ml:**

Laimennettiin Deconexista veteen (H<sub>2</sub>O R) liuos, jonka pitoisuus oli 100 µl/ml (10 ml/100ml). Tästä liuksesta laimennettiin edelleen 1µl/ml-pitoinen liuos (1ml / 100 ml).

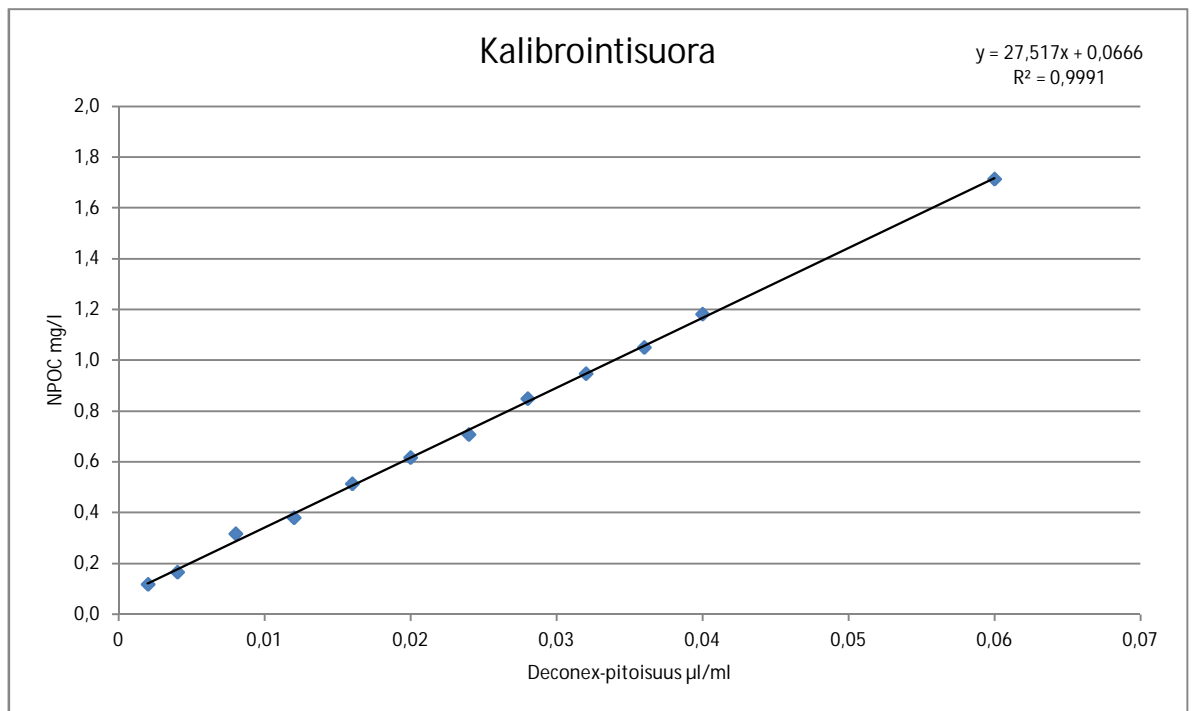
#### **Kalibrointiliuokset:**

Kantaliuksesta laimennettiin 12 eri vahvuista kalibrointiliuosta 100 ml:n mittapulloihin ja täytettiin vedellä merkkiin. Laimennokset, kalibrointiliuosten pitoisuudet ja mitatut johtokyvyt näkyvät taulukossa 8.

Lineaarisuussuoran yhtälöksi saatiin  $y = 27,517x + 0,0666$  ja korrelaatiokerroimeksi  $R = 0,99955$ . Korrelaatiokerroin täyttää validointisuunnitelman vaatimuksen  $R > 0,95$ , joten menetelmän mittausaluetta voidaan pitää lineaarisena. Kalibrointisuora on esitetty kuvassa 9.

Taulukko 8. Kalibrintiliuosten TOC-pitoisuudet

Laimennos kantaliuoksesta (ml/ml)	Deconex µl/ml	NPOC mg/l
0,2/100	0,002	0,1164
0,4/100	0,004	0,1663
0,8/100	0,008	0,3178
1,0/100	0,012	0,3796
1,6/100	0,016	0,5143
2,0/100	0,020	0,6177
2,4/100	0,024	0,7067
2,8/100	0,028	0,8480
3,2/100	0,032	0,9475
3,6/100	0,036	1,0507
4,0/100	0,040	1,1803
6,0/100	0,060	1,7135



Kuva 9. TOC-mittausten kalibrintisuora

## 7.2 Tarkkuus (saanto ja toistettavuus)

Menetelmän tarkkuutta tutkittiin sivelynäytteiden saantokokeiden ja toistettavuuden perusteella. Huuhtelunäytteiden saantoa ei tutkittu (oletus 100 %).

Tarkkuuskokeita tehtiin pipetoimalla pesuainenäytettä 10 x 10 cm:n alueelle teräslevylle. Pesuaine kuivattiin levyille hiustenkuivaajalla ja pyyhittiin steriiliin veteen kostutetulla sivelytikulla (TX714K). Kuivattu tikku uutettiin 30 ml:aan vettä ultraäänihauteessa.

Taustan poistamiseksi tehtiin myös nollanäytteitä. Saantoja laskettaessa nollanäytteen tulos vähennetään pesuainesivelyiden tuloksista.

Toistettavuus määritettiin laskemalla kuuden rinnakkaisen tarkkuustuloksen RSD %. Validointisuunnitelmassa toistettavuuskokeen vaatimus on  $\leq 15\%$ .

### **Kantaliuos 5,0 µl/ml:**

Laimennettiin Deconexista veteen (H<sub>2</sub>O R) liuos, jonka pitoisuus oli 100 µl/ml (10 ml/100 ml). Tästä liuksesta laimennettiin edelleen liuos, jonka pitoisuus oli 5,0 µl/ml (5 ml/100 ml).

### **Sivelynäytteet:**

Kantaliuosta pipetoitiin 0,1 ml (= 0,50 µl Deconexia) teräslevylle 10 x 10 cm:n alueelle, kuivattiin hiustenkuivaajalla ja annettiin jäähtyä. Alue siveltiin veteen kostutetulla sivelytikulla. Sivelytikku taitettiin taittokohdasta poikki TOC-näytepulloon, johon lisättiin 30,0 ml H<sub>2</sub>O R. Pidettiin ultraäänihauteessa 10 minuuttia, vortexissa 20 minuuttia ja mitattiin TOC-analysaattorilla. Sivelynäytteitä tehtiin yhteensä kuusi.

### **Nollanäytteet:**

Tehtiin kolme sivelynollanäytettä. Nollanäytteet tehtiin sivelemällä puhdasta teräslevyä 10 x 10 cm:n alueelta, ja uutettiin kuten varsinaiset sivelynäytteet. TOC-pitoisuuksiksi mitattiin 0,2569 mg/l; 0,2498 mg/l ja 0,2249 mg/l → keskiarvo 0,2439 mg/l.

### **Vertailuliuos:**

Saantoprosentin laskemista varten tehtiin vertailuliuos. Kantaliuosta pipetoitiin 0,1 ml TOC-näytepulloon, johon lisättiin 30,0 ml H<sub>2</sub>O R. Uutettiin, kuten sivelynäytteet.

**Saantoprosentin laskenta:**

Mitatut TOC-pitoisuudet muutettiin deconex-pitoisuuksiksi kuvan 2 kalibroitaisuoranyhtälön  $y = 27,517x + 0,0666$  avulla. Saatu pitoisuus kerrottiin vielä laimennoskertoimella 30 (koska sivelytikku uutettiin 30 ml:aan vettä, jotta saataisiin laskettua pesuaineen määrä/tikku).

esim. näytteen 1 TOC-pitoisuudeksi mitattiin 0,6778 mg/l. Pitoisuudeksi saadaan:

$$\frac{(0,6778 \text{ mg/l} - 0,0666 \text{ mg/l})}{27,515 \frac{\text{mg/l}}{\mu\text{l/ml}}} * 30 \text{ ml} = 0,66635 \mu\text{l/tikku}$$

vertailuluoksen pitoisuus on 0,45397  $\mu\text{l/tikku}$ , ja nollanäytteen keskiarvo 0,19328  $\mu\text{l/tikku}$ . Saantoprosentti on tällöin:

$$\text{saanto - \%} = \frac{(0,66635 \mu\text{l} - 0,19328 \text{ ml})}{0,45397 \mu\text{l}} * 100\% = 104,2\%$$

Saantokokeiden mittaustulokset on koottu taulukkoon 9.

Taulukko 9. Saantokokeiden tulokset

	NPOC mg/l	Pitoisuus $\mu\text{l/tikku}$	Saanto-%
Sively 1	0,6778	0,66635	104,2
Sively 2	0,6544	0,64084	98,6
Sively 3	0,6910	0,68074	107,4
Sively 4	0,7033	0,69415	110,3
Sively 5	0,7360	0,72980	118,2
Sively 6	0,7186	0,71083	114,0
Keskiarvo		0,68712	108,8
Keskihajonta			7,00
RSD %			6,4

Validointisuunnitelman vaatimukset saantoprosentille oli  $\geq 80\%$  ja kuuden rinnakkaisnäytteen toistettavuudelle (RSD %)  $\leq 15\%$ , jotka molemmat täyttyivät, eikä analyysimenetelmässä tarvitse huomioida saantoprosenttia laskuissa.

### 7.3 Detektointiraja

Detektointiraja määritettiin nollanäytteiden avulla. Puhtaalla vedellä mitattiin TOC-pitoisuuksia noin 0,010 mg/l – 0,080 mg/l välillä. Keskiarvopitoisuus on noin 0,030 mg/l. Puhdas sivelytikku, joka on uutettu näytteenkäsittelyohjeen mukaisesti antaa TOC-pitoisuudeksi noin 0,070 mg/l – 0,090 mg/l → keskiarvo noin 0,080 mg/l. Näytteistyksen yhteydessä käsitellään aina puhdas sivelytikku nollanäytteeksi.

### 7.4 Kvantitointiraja

Kvantitointirajan määrittämistä varten etsittiin pienintä näytepitoisuutta, jonka rinnakkaismääritysten ( $n \geq 6$ ) TOC-pitoisuudet täyttävät ehdon:  $RSD \% \leq 15,0 \%$ . Pienin liuospitoisuus, jolla ehto täyttyy on 0,002 µl/ml ( $RSD \% = 13,0 \%$ ). Kvantitointirajan TOC-pitoisuus on noin 0,11 mg/l. Mittaustulokset näkyvät taulukossa 10.

Taulukko 10. Kvantitointirajat

Deconex-liuos	NPOC mg/l
0,002 µl/ml	0,1053
0,002 µl/ml	0,1243
0,002 µl/ml	0,0906
0,002 µl/ml	0,1002
0,002 µl/ml	0,1066
0,002 µl/ml	0,0843
0,002 µl/ml	0,1092
0,002 µl/ml	0,1235
0,002 µl/ml	0,1185
<i>keskiarvo</i>	0,11
<i>keskihajonta</i>	0,014
<i>RSD%</i>	13,0

## 7.5 Haavoittuvuus

Tutkittiin sively- ja huuhtelunäytteiden säilyvyyttä.

### 7.5.1 Sivelynäytteiden säilyvyys

#### **Kantaliuos 5 µl/ml:**

Laimennettiin Deconexista veteen (H<sub>2</sub>O R) liuos, jonka pitoisuus oli 100 (10 ml/100 ml). Tästä liuksesta laimennettiin edelleen liuos, jonka pitoisuus oli 5,0 µl/ml (5 ml/100 ml).

Kantaliuosta pipetoitiin 100 µl yhdeksään steriiliin veteen kostutettuun sivelytikkuun (TX714K). Sivelytikut kuivattiin ja katkaistiin sivelyosat TOC-näytepulloihin. Näytteet analysoitiin näytteenkäsittelyohjeen mukaisesti, kolmessa vaiheessa: 3 x heti, 3 x kolmen vuorokauden kuluttua ja 3 x viiden vuorokauden kuluttua. Näytepulloja säilytettiin pimeässä, huoneenlämmössä. TOC-pitoisuuksien keskiarvoja verrattiin alkuperäisiin tuloksiin. Mittaustulokset on koottu taulukkoon 11.

Taulukko 11. Sivelynäytteiden säilyvyys

Sivelytikut	Alkuperäinen mg/l	+3 vrk mg/l	+5 vrk mg/l
Näyte 1	0,5602	0,5658	0,5969
Näyte 2	0,5426	0,5529	0,5806
Näyte 3	0,5489	0,5764	0,5694
Keskiarvo	0,5506	0,5650	0,5823
Keskihajonta	0,0089	0,0118	0,0138
RSD %	1,6	2,1	2,4
Keskiarvojen ero alkuperäiseen verrattuna (%)		2,6	5,8



### 7.5.2 Huuhtelunäytteiden säilyvyys

Deconexliuosta, jonka pitoisuus oli 5 µl/ml pipetoitiin 140 µl yhdeksään 50 ml:n ruskeaan mittapulloon ja täytettiin H<sub>2</sub>O R:llä merkkiin. Näytteet analysoitiin kolmessa vaiheessa: 3 x heti, 3 x kolmen vuorokauden kuluttua ja 3 x viiden vuorokauden kuluttua. Pulloja säilytettiin pimeässä, huoneenlämmössä. TOC-pitoisuuksien keskiarvoja verrattiin alkuperäisiin tuloksiin. Mittaustulokset on koottu taulukkoon 12.

Taulukko 12. Huuhtelunäytteiden säilyvyys mittapulloissa

Huuhtelunäytteet	Alkuperäinen mg/l	+3 vrk mg/l	+5 vrk mg/l
Näyte 1	0,4606	0,4757	0,5056
Näyte 2	0,4411	0,5602	0,478
Näyte 3	0,4681	0,5328	0,5063
Keskiarvo	0,4566	0,5229	0,4966
Keskihajonta	0,0139	0,0431	0,0161
RSD %	3,1	8,2	3,3
Keskiarvojen ero alkuperäiseen verrattuna (%)		14,5	8,8

## 8 Johtopäätökset

Menetelmien kehitys ja validointi onnistuivat. Pesuainejäämiä voidaan tutkia johtokyky- ja TOC-menetelmillä huuhtelu ja/tai sivelynäytteistä. Validoinnin keskeiset tulokset on koottu taulukkoon 13.

Helpoin tapa tutkia pesuainejäämiä on mitata näytteitä suoraan viimeisistä huuhteluve-sistä. Tässä työssä haluttiin kuitenkin tutkia myös sivelynäytteitä, ja niiden soveltuvuutta varsinkin TOC-mittauksiin. Pesuaineen saantoprosentit teräslevyltä sivelytikkuun täyttivät validointisuunnitelman saantokokeen vaatimuksen  $\geq 80$  % ja tulokset olivat toistettavia. Näin ollen lopullisia analyysituloksia ei tarvitse korjata saantoprosentilla. Laatuvaatimukset puhtaalle vedelle (Aq.purif.) Euroopan farmakopeassa on johtokyvyll-le 5,1 µS/cm, 25 °C, ja TOC-pitoisuudelle 0,5 mg/l. Deconex-pitoisuudeksi muutettuna,

käyttäen lineaarisuusmittauksissa määritettyjä kalibroituisuoria hyväksymisrajat ovat sivelynäytteille:

- Johtokyky:  $50 \text{ ml} * 0,010245 \text{ } \mu\text{l/ml} = \mathbf{0,512 \text{ } \mu\text{l/tikku}}$
- TOC:  $30 \text{ ml} * 0,01571 \text{ } \mu\text{l/ml} = \mathbf{0,471 \text{ } \mu\text{l/tikku}}$

TOC-menetelmää kehitettäessä huomattiin astioista ja välineistä irtoavan TOC-jäämiä, jotka vaikuttavat mittaustuloksiin. TOC-sivelynäytteet otetaan sivelytikuilla, joiden TOC-pitoisuus on alle 0,05 mg/l. Mikäli mahdollista, näytteet olisi hyvä ottaa suoraan näytepulloihin joiden TOC-pitoisuus on alle 0,01mg/l. Lasiastioista irtoaa jonkin verran epäpuhtauksia, jotka näkyvät myös johtokyvyssä.

Validointisuunnitelmassa ei asetettu vaatimusta näytteiden säilyvyydelle. Yleisesti rajana voidaan pitää pitoisuuden keskiarvon muutosta  $\pm 5 \%$  alkuperäiseen verrattuna. Tämä raja ylittyy TOC-sivelynäytteiden osalta viiden vuorokauden jälkeen, jonka vuoksi sivelynäytteet olisi hyvä analysoida mahdollisimman pian näytteenotosta. Myös huuhtelunäytteillä raja ylittyi. Tämä saattaa selittyä myös astioista liukenevista epäpuhtauksista, testinäytteitä ei otettu suoraan TOC-näytepulloihin. Johtokykynäytteillä säilyvyys oli parempaa, poikkeuksena 3 vuorokauden sivelynäytteet.

Taulukko 13. Validoinnin tulokset

Johtokyky-menetelmä			
Testi	Tulokset	Tutkittu alue	Hyväksymisrajat
Lineaarisuus suoranyhtälö korrelaatiokerroin	$y = 437,71x + 0,6156$ $R = 0,99935$	(0,002-0,024) µl/ml (1,66-11,28) µS/cm	[R> 0,95]
Detektointiraja	1,1 µS/cm 1,5 µS/cm	steriili vesi puhdas, uutettu sivelytikku	
Kvantitointiraja	1,7 µS/cm RSD % = 2,7 %	0,002 µl/ml	[Kuuden määrittelyn RSD % ≤ 15,0 %]
Tarkkuus  Saantokoe: sively- näyte, 10 x 10 cm teraslevy	97,4% RSD % = 5,3 %	0,48 µl/tikku	[Saanto ≥ 80 %] [Kuuden määrittelyn RSD % ≤ 15,0%]
Haavoittuvuus huuhtelunäyte sivelynäyte	ero alkuperäiseen 3 vrk 0,4 % ; 5 vrk 1,4 % 3 vrk 9,8 % ; 5 vrk 1,8 %	0-3-5 vrk 0-3-5 vrk	
TOC- Menetelmä			
Testi	Tulokset	Tutkittu alue	Hyväksymisrajat
Lineaarisuus suoranyhtälö korrelaatiokerroin	$y = 27,517x + 0,0666$ $R = 0,99955$	(0,002-0,060) µl/ml (0,1164-1,7135) mg/l	[R> 0,95 ]
Detektointiraja	0,030 mg/l 0,080 mg/l	puhdas vesi puhdas, uutettu sivelytikku	
Kvantitointiraja	0,11 mg/l RSD % = 13,0 %	0,002 µl/ml	[Kuuden määrittelyn RSD % ≤ 15,0 %]
Tarkkuus  Saantokoe: sively- näyte, 10 x 10 cm teraslevy	108,8% RSD % = 6,4 %	0,69 µl/tikku	[Saanto ≥ 80 %] [Kuuden määrittelyn RSD % ≤ 15,0%]
Haavoittuvuus huuhtelunäyte sivelynäyte	ero alkuperäiseen 3 vrk 14,5% ; 5 vrk 8,8 % 3 vrk 2,6 % ; 5 vrk 5,8 %	0-3-5 vrk 0-3-5 vrk	

## Lähteet

- 1 Eudralex. Volume 4.  
<[https://ec.europa.eu/health/sites/health/files/files/eudralex/vol-4/2015-10\\_annex15.pdf](https://ec.europa.eu/health/sites/health/files/files/eudralex/vol-4/2015-10_annex15.pdf)>. Luettu 15.6.2017.
- 2 ICH.  
<[http://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Quality/Q7/Step4/Q7\\_Guideline.pdf](http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q7/Step4/Q7_Guideline.pdf)>. Luettu 15.6.2017.
- 3 Journal of Validation Technology, August 2005, Volume 11, Number 4
- 4 J-M. Cardot & E. Beyssac. 2008. Standardized Cleaning Approach For A New Pharmaceutical Compound. Controlled Environments.  
<<http://www.cemag.us/articles/2008/06/standardized-cleaning-approach-new-pharmaceutical-compound>>. Luettu 16.6.2017.
- 5 Texwipe.  
<[https://www.texwipe.com/Content/Images/uploaded/documents/Technical-Data/TechNote\\_Swabbing.pdf](https://www.texwipe.com/Content/Images/uploaded/documents/Technical-Data/TechNote_Swabbing.pdf)>. Luettu 16.6.2017.
- 6 LAR. <<https://www.lar.com/products/toc-analysis/toc-total-organic-carbon.html>>. Luettu 9.8.2017.
- 7 GlobalSpec.  
<[http://www.globalspec.com/learnmore/sensors\\_transducers\\_detectors/gas\\_sensing/total\\_organic\\_carbon\\_analyzers](http://www.globalspec.com/learnmore/sensors_transducers_detectors/gas_sensing/total_organic_carbon_analyzers)>. Luettu 9.8.2017.
- 8 Borer.  
<[http://www.borer.ch/pdf\\_files.php?type=prodinfo&file=pdf\\_files/Pharma/english/Product%20datasheets/deconex\\_CIP\\_seven\\_EN.pdf](http://www.borer.ch/pdf_files.php?type=prodinfo&file=pdf_files/Pharma/english/Product%20datasheets/deconex_CIP_seven_EN.pdf)>. Luettu 15.6.2017.
- 9 Shimadzu.  
<<http://www.shimadzu.com/an/industry/pharmaceuticallifescience/manufacturing0403005.htm>>. Luettu 9.8.2017.
- 10 European Pharmacopoeia, 8<sup>th</sup> Ed. Online versio.
- 11 Käyttömanuaali, Total Organic Carbon Analyzer TOC-Lcph/cpn User's manual, Shimadzu Corporation 2011-2014
- 12 Shimadzu. <<http://www.shimadzu.com/an/toc/lab/toc-l4.html>>. Luettu 10.8.2017.

**TOC-metodi**

Käytetyn TOC-metodin tiedot.

TOC-L Method Information  
NPOC Aq.purif..met

[General Information]

System	TOC
User	
Date of Creation	24. 9. 2015 10:27:27
Analysis	NPOC
Sample Name	Untitled
Sample ID	Untitled
Manual Dilution	1,000000
No of Determ.	1
Pharmaceutical water testing	None
Origin	NPOC Aq.purif..met

[NPOC]

Unit	mg/L
No. of Inj.	2/3
No of Washes	2
SD Max	0,100000
CV Max	2,000000%
Acid Add	1,500000%
Sparge Gas Flow	80ml
Sparge Time	600sec
Auto Dil.	0
Inj Vol	408uL
Multiple Inj	Yes
At. Correct. InjVol/DiFkt.	No
Use blank Area	No
UV Oxid Vol	0,000000mL
Min. integration time	0sec
Max. integration time	290sec
Cal. Curve1	NPOC30 mg_l.cal
Cal. Curve2	None
Cal. Curve3	None

## TOC-analysaattorin kalibrointi

### Kalibrointisuoran tiedot.

TOC-L Cal Curve Information  
C:\TOC-L\CalCurves\NPOC30 mg 1.2015 09 24 09 55 06.cal

Date of Creation 24.9.2015 11:05:25  
User  
System TOC

#### Cal. Curve

Sample Name: Untitled  
Sample ID: Untitled  
Object ID: 0L-10000102895-H54425200298-1337A8C1713F-0000  
Cal. Curve: NPOC30 mg 1.2015 09 24 09 55 06.cal  
Status: Completed  
Comment:

Type	Anal.
Standard	NPOC

Conc: 0,000mg/L

No.	Area	Inj. Vol.	Aut. Dil.	Rem.	Ex.	Date / Time
1	2,692	408uL	1,000	*****	E	24.9.2015 10:12:09
2	0,9473	408uL	1,000	*****		24.9.2015 10:15:36
3	1,747	408uL	1,000	*****		24.9.2015 10:19:26

Acid Add. 1,500%  
Spurge Gas Flow 80ml  
Sp. Time 600,0sec  
Mean Area 1,347  
SD Area 0,5655  
CV Area 41,98%  
Vial 11

Conc: 0,5000mg/L

No.	Area	Inj. Vol.	Aut. Dil.	Rem.	Ex.	Date / Time
1	21,85	408uL	2,000	*****		24.9.2015 10:39:15
2	21,52	408uL	2,000	*****		24.9.2015 10:43:14

Acid Add. 1,500%  
Spurge Gas Flow 80ml  
Sp. Time 600,0sec  
Mean Area 21,69  
SD Area 0,2333  
CV Area 1,08%  
Vial 10

Conc: 1,000mg/L

No.	Area	Inj. Vol.	Aut. Dil.	Rem.	Ex.	Date / Time
1	40,58	408uL	1,000	*****		24.9.2015 11:01:17
2	40,02	408uL	1,000	*****		24.9.2015 11:05:25

Acid Add. 1,500%  
Spurge Gas Flow 80ml  
Sp. Time 600,0sec  
Mean Area 40,30  
SD Area 0,3960  
CV Area 0,98%  
Vial 10

Slope: 38,95  
Intercept 1,634  
r<sup>2</sup> 0,9993  
r 0,9997  
Zero Shift No

