



Reinigingsvalidatie van bereidingsvaten: een praktijkvoorbeeld

L.A.A. van Gendt - de Jong, H.T. Wolters, E.J.H. Olyslager,
J. Wierferink, A. Moret, L. van Tent, H. Wilkes, R.M. Posthuma
Ziekenhuisapotheek Gelre Ziekenhuizen Apeldoorn/Zutphen

Samenvatting

Reinigingsvalidatie is een integraal deel van de GMP in de farmaceutische industrie en bereidings-/ziekenhuisapotheek. Om de reiniging van de bereidingsvaten in onze ziekenhuisapotheek te valideren is bupivacaïne als “worst-case” genomen en gemeten met behulp van een gevalideerde LCMSMS-methode in de laatste spoelgang en/of na een additionele spoelstap van 10L. Daarnaast zijn er ook TOC-metingen verricht en is de reiniging tevens beoordeeld op fysische en microbiologische gronden. De LCMSMS-methode voor bupivacaïne is gevalideerd met natriumchloride als matrix. De monsters hoeven niet opgewerkt te worden, verdunning met WFI/0,1% mierenzuur volstaat. De calibratiecurve is lineair over een bereik van 0,15 µg/l tot 1,5 µg/l. De juistheid, intra-dag en inter-dag precisie zijn kleiner dan 5%, voor de LLOQ is dit kleiner dan 15%. De recovery van bupivacaïne van RVS-vaten na spoelen is 106%, wat het nemen van alleen spoelmonsters rechtvaardigt. Het 50L vat is na reiniging schoon op basis van zowel de TOC-waarden, de bupivacaïne concentraties als fysische en microbiologische gronden. In het 400L vat worden bupivacaïne concentraties teruggevonden met behulp van LCMSMS boven de gestelde ACTION-level, die echter in de patiënt niet zullen leiden tot toxiciteit. Ook in het 400L vat voldoen de gevonden TOC-gehalten, de geleidbaarheid, het kiemgetal en de endotoxinen aan hun gestelde limieten.

Lijst met gebruikte afkortingen

CIP	Cleaning-In-Place
ACN	Acetonitril
ESI	ElectroSpray Ionisation
FA	Formic Acid (mierenzuur)
GMP	Good Manufacturing Practice
LCMSMS	Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry
LLOQ	Lower Limit Of Quantification
MS	Mass Spectrometry

QC	Quality Control
SIP	Steam-In-Place
TOC	Total Organic Carbon
UPLC	Ultra Performance Liquid Chromatography
WFI	Water For Injection

Introductie

De bereidingsvaten (50L en 400L) waarvan de reinigingen gevalideerd zijn, worden gebruikt voor de productie van vloeibare geneesmiddelen die in de regel worden onderworpen aan een sterilisatieproces of kiemreducerende behandeling in de eindverpakking. Het oppervlak van de installatie dat in contact komt met het product bestaat voor het overgrote deel uit roestvrij staal 316L met een oppervlakte ruwheid Ra < 0,8 µm. De te valideren reinigingsprocedure betreft een gedeeltelijk geautomatiseerde “cleaning-in-place” (CIP) proces gevolgd door “steam-in-place” (SIP), waarbij geen reinigingsmiddelen worden toegepast. Bupivacaïne is gekozen als “worst-case” voor beide vaten op basis van de toxiciteit en een reeds bestaande analysemethode voor kwaliteitscontrole. Er is gekozen voor het nemen van spoelmonsters omdat alle bereide producten goed water oplosbaar zijn. Om de reiniging van het vat te valideren zijn er monsters gemeten met behulp van TOC en een gevalideerde LCMSMS methode. Daarnaast zijn de vaten visueel geïnspecteerd en zijn geleidbaarheid, kiemgetal en endotoxinen in de monsters bepaald.

Experimenteel

Chemicaliën en apparatuur

Alle chemicaliën zijn analytisch zuiver. Ammoniumformiaat en mierzuur zijn ingekocht bij Fluka (Buchs, Zwitserland), acetonitril bij Riedel de Haen (Honeywell, Seelze, Duitsland) en bupivacaïne is verkregen bij BUFA/Spruyt Hillen (IJsselstein, Nederland). Een stockoplossing van een 0,5 mg/ml bupivacaine is gemaakt in WFI en de standaarden zijn verdund in WFI met 0,1% mierenzuur. De reinigingsvalidatie monsters zijn gemeten op een Acquity UPLC systeem en een Quattro Premier XE massa spectrometer met electrospray ionisatie van Waters (Milford, MA, USA). Tabel 1 geeft een overzicht van de parameters van zowel de UPLC als de massa spectrometer. In de MS-methode is als MRM overgang in de onderstaande tabel

alleen de overgang voor bupivacaïne meegenomen. De methode is in eerste instantie opgezet als screenings-methode en bevat daarom overgangen van in totaal 18 componenten, waaronder mepivacaïne. Het meten van de TOC-gehalten is uitbesteed aan Beun de Ronde (Analytik Jena Multi N/C UVHS; Abcoude, Nederland) en de Isala klinieken (Zwolle, Nederland). De geleidbaarheid is gemeten op een 712 Conductometer van Metrohm (Herisau, Zwitserland) en de endotoxinen op de Cambrex ELX 808 met WinKQCL software (Cambrex, NJ, USA).

Validatie van de analysemethode

De analysemethode is gevalideerd over een bereik van 0,15 tot 1,5 µg/l gemeten met vijf standaarden in drievoud. QC monsters zijn gespiked met bupivacaïne op 20% (QC-1), 50% (QC-2) en 80% (QC-3) van de calibratiecurve en gemeten in 3-voud op 3 opeenvolgende dagen. Daarnaast

zijn het matrix effect, de stabiliteit en LLOQ van de methode bepaald, zoals beschreven door Wieling e.a. [1]. Deze methode is een afgeleide van de methode die gebruikt wordt voor de kwaliteitscontrole, vandaar dat er over 3 dagen gemeten is in plaats van 5.

Bepaling van de recovery

Twee coupures van 10x10 cm RVS 316L (Ra < 0,4 µm) zijn voor aanvang van de recovery bepaling gereinigd gedurende 5 min in 5% zwavelzuur, afgespoeld met WFI en daarna gedroogd in een stoof bij 35°C. Een oppervlak van 81 cm2 is vervolgens besmet met 0,5 ml van een oplossing met daarin 420 µg/l bupivacaïne. Beide coupures zijn gedroogd in een oven bij 60°C en na afkoelen gespoeld met 220 ml heet WFI. Deze monsters zijn vervolgens verdund naar een eindconcentratie van 0,95 µg/l bupivacaïne en gemeten ten opzichte van de spike oplossing op de LCMSMS.

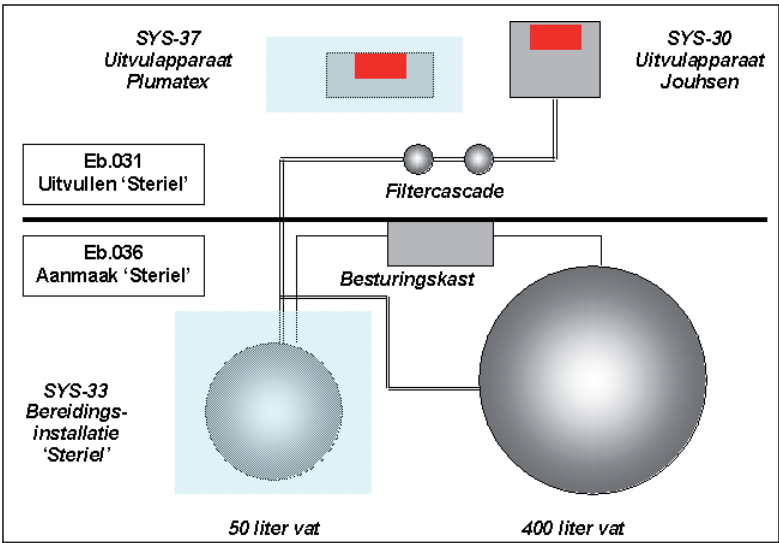
Tabel 6 samenvatting van de ingestelde parameters van de LCMSMS methode

Chromatografische condities						
	Kolom	Waters Acquity UPLC HSS C ₁₈ kolom 1,8 µm 2,1x150 mm				
	Kolom temperatuur	50°C				
	Mobiele fase	A: 5 mM ammoniumformiaat pH 3,0				
		B: 100% ACN + 0,1 % FA				
			Tijd (min)	%A	%B	Gradient:
			0,00	95,0	5,0	
			0,50	50,0	50,0	
			7,00	50,0	50,0	
			7,50	5,0	95,0	
			8,75	5,0	95,0	
			9,00	95,0	5,0	
			10,00	95,0	5,0	
	Flow rate	0,400 ml/min				
	Injectievolume	5 µl				
MS condities						
	MS systeem	Waters Quattro Premier XE				
	MS software:	MassLynx				
	Ionization mode:	ESI positief				
	Capillary voltage:	1,2 kV				
	Desolvation	400°C				
	temperatuur:					
	Desolvation gas:	900 l/uur				
	Source temperature:	140°C				
	MRM	289,26 > 140,2		289,26 > 84,1		
	Cone	37 V		37 V		
	Collision Energy	26 V		40 V		
	Retentie tijd (R _t)	4,4 min				

Bepaling van spoelmonsters

Tijdens de reiningsvalidatie worden tegelijkertijd de uitvulleringen en uitvulapparatuur gecontroleerd op reiniging. Een overzicht van de te reinigen apparatuur inclusief het monsterafname punt is weergegeven in Figuur 2. Monsternamen voor beide vaten vindt plaats bij de uitvulmachine voor infuuszakken (PP-Jouhsen). Dit uitvulpunt is tevens representatief voor de uitvulmachine voor infuusflessen (Plumatex).

Figuur 2 overzicht van de bereidingsvaten 50L en 400L. Aangegeven in rood zijn de monsterafnamepunten. ►



Naast het meten van het laatste spoelwater zijn er ook monsters gemeten na een additionele spoelgang van 10L. De bereiding van bupivacaïne in het 400L vat verloopt via het vigerende protocol. Voor het 50L vat is dit protocol aangepast naar de minimale batchgrootte van 15L, welke in dit vat bereid wordt.

Resultaten en discussie

Acceptatielimieten

De acceptatielimiet voor de actieve component, gemeten met de LCMSMS, is berekend op zowel de doserings-, de toxicologische als de 10 ppm limiet. In onderstaande tabel is voor de strengste limiet gekozen (voor beide vaten de toxicologische limiet). Tevens staan in deze tabel (zie Tabel 2) de limieten weergegeven voor de geleidbaarheid, het kiemgetal, de endotoxinen en het TOC-gehalte.

Tabel 7 acceptatielimieten per vat tijdens de reinigingsvalidatie

Vat	Visueel	LCMSMS (MACO)	TOC	Geleidbaarheid	Kiemgetal	Endotoxinen
50L	schoon	≤ 28,98 mg	≤ 500 µg/l	≤ 5 µS/cm	≤ 10 KVE/100 ml	≤ 0,25 EU/ml
400L	schoon	≤ 0,135 mg	≤ 500 µg/l	≤ 5 µS/cm	≤ 10 KVE/100 ml	≤ 0,25 EU/ml

Er is gekozen voor de TOC-limiet van WFI uit de Europese Pharmacopee Ed. 7.0 en niet voor het omrekenen van de MACO waarde van bupivacaïne naar de overeenkomstige TOC-waarde. In het vat wordt namelijk niet alleen bupivacaïne bereid en de TOC-waarde is een weergave van alle koolstof aanwezig in het spoelwater. Ook de eisen voor het kiemgetal en de endotoxinen komen uit de Europese Pharmacopee Ed. 7.0, waarbij de eis voor WFI in bulk is aangehouden. Vanwege het feit dat de geleidbaarheidseis voor WFI dermate laag is (< 1,1 µS/cm bij 20°C) en off-line bepaald wordt door opgelost CO2 is de acceptatielimiet gebaseerd op de kwantificeringslimiet voor natriumchloride in WFI.

Validatie van de LCMSMS-methode

Tabel 3 laat een overzicht zien van de gevonden validatie parameters voor bupivacaïne gemeten met de LCMSMS. Bereidingen bevatten vaak hulpstoffen. De bepaling van bupivacaïne is gevalideerd voor bereidingen die natriumchloride als matrix bevatten. Als monstervoorbewerking is alleen verdunning met water/0,1% mierenzuur noodzakelijk. Vanuit de validatie is gebleken dat het kleine percentage natriumchloride als matrix

niet zorgt voor ion suppressie of ion enhancement. De bupivacaïne standaarden verdund in WFI/0,1% mierenzuur zijn in de sample tray echter géén dag houdbaar. De methode is lineair over een bereik van 0,15 - 1,5 µg/l en heeft voldoende juistheid en precisie met waarden kleiner dan 5%, waar als eis 10% gesteld is. De kwantificeringslimiet (LLOQ) is 0,15 µg/l met een juistheid en precisie lager dan de gestelde eis van 15%.

Tabel 8 overzicht validatie data van de analyse van bupivacaïne op LCMSMS

Statistische parameters	Niveau	Waarde	
Bereik	-	0,15 – 1,5 µg/l	
Correlatie coëfficiënt	-	0,9976	
Stabiliteit sample tray	-	< 12u	
Matrix effect	-	< 5%	
Juistheid (N = 9)	LLOQ	8,49%	
	OC-1	2,74%	
	QC-2	0,62%	
	QC-3	1,17%	
Precisie (N = 9)	LLOQ	Intra-dag = 6,79%	Inter-dag = 13,00%
	QC-1	Intra-dag = 2,54%	Inter-dag = 2,33%
	QC-2	Intra-dag = 1,56%	Inter-dag = 4,34%
	QC-3	Intra-dag = 2,41%	Inter-dag = 1,82%

Bepaling van de recovery

De recovery is bepaald op de 2 coupures afzonderlijk en bedraagt 105,7% ± 1,18%. Het alleen nemen van de spoelmonsters (en dus geen swab-monsters) is geborgd door een goede recovery en het feit dat de producten die bereid worden in het vat goed wateroplosbaar zijn.

Reinigingsvalidatie van de bereidingsvaten

De reiniging van het 50L bereidingsvat bestaat uit het spoelen van het vat met 25L heet WFI, daarna een filtertest met 25L koud WFI en vervolgens het spoelen van het vat inclusief de uitvulmachine met drie keer 50L heet WFI. Tabel 4 laat de resultaten zien na elke spoelgang van 50L. Hieruit blijkt dat na een eerste spoelstap van 50L de acceptatielimieten zowel fysisch-chemisch als microbiologisch worden gehaald. Hierop is de spoelprocedure aangepast naar twee keer 50L in plaats van drie keer.

Tabel 9 reinigingsvalidatie van het 50L vat

Spoelstap	Visueel	LCMSMS (mg)	TOC (µg/l)	Geleidbaarheid (µS/cm)	Kiemgetal (KVE/ml)	Endotoxinen (EU/ml)
1 ^{ste} 50L	schoon	4,25 ± 3,32	145,6 ± 87,4	1,94 ± 1,36	0	< 0,005
2 ^{de} 50L	schoon	0,94 ± 0,08	104,5 ± 65,6	0,96 ± 0,11	0	< 0,005
3 ^{de} 50L	schoon	0,68 ± 0,12	61,8 ± 33,3	0,85 ± 0,02	0	< 0,005

De reiniging van het 400L vat is gevalideerd in twee configuraties. Configuratie 1 bestaat uit 4 spoelstappen van elk 25L via vat en uitvulmachine. In deze opstelling is gebruik gemaakt van een filtercascade. Tabel 5 laat de resultaten zien die verkregen zijn na een additionele spoelgang van 10L. Hieruit blijkt dat de concentraties bupivacaïne gemeten met de LCMSMS ongeveer een factor 25 boven de acceptatielimiet ligt. Het TOC-gehalte is in de additionele spoelgang niet gemeten, echter mepivacaïne (bereidt in hetzelfde vat) is wel teruggevonden in zeer lage concentraties met behulp van LCMSMS. Om te achterhalen waar de verontreinigingen vandaan komen, is de filtercascade op verschillende punten bemonsterd, waarbij zowel verhoogde TOC-waarden als verhoogde bupivacaïne concentraties zijn teruggevonden (resultaten niet getoond).

Naar aanleiding van deze tegenvallende resultaten, het feit

dat het niet geheel duidelijk is waar de verontreinigingen precies vandaan zijn gekomen (afsluiters, filterhuizen, etc.) en het tevens terugvinden van mepivacaïne wat met TOC nooit gelukt zou zijn, is besloten om de configuratie te vereenvoudigen. De filtercascade is vervangen door een “disposable” eindfilter en het spoelvolumen is aangepast. In deze configuratie is ook het 50L bereidingsvat gevalideerd, zoals hierboven beschreven. De reiniging van het 400L vat in configuratie 2 verloopt als volgt: spoelen van het vat met 200L heet WFI, drainage via uitvulslang en opnieuw spoelen van het vat inclusief uitvulmachine met 150L heet WFI. Tussen de spoelstappen door wordt er gedurende 5 minuten gemengd in het vat. De geleidbaarheid, het kiemgetal en de endotoxinen zijn niet meer gemeten, omdat deze al voldoen in de eerste configuratie met veel minder spoelen.

Tabel 10 resultaten van de 10L additionele spoelstap in de reinigingsvalidatie van het 400L vat volgens configuratie 1 en 2

Spoelstap	Visueel	LCMSMS (mg)	TOC (µg/l)	Geleidbaarheid (µS/cm)	Kiemgetal (KVE/ml)	Endotoxinen (EU/ml)
Configuratie 1	schoon	3,68 ± 0,40	NB*	1,17 ± 0,11	0	< 0,005
Configuratie 2	schoon	1,40 ± 0,04	200,4 ± 6,78	NB	NB	NB

* NB = niet bepaald

Zoals getoond in Tabel 5, voldoet de TOC-waarde aan de gestelde eisen voor configuratie 2. De hoeveelheid bupivacaïne gemeten met de LCMSMS is significant verbeterd in vergelijking met configuratie 1, maar is nog steeds een factor 10 te hoog t.o.v. de acceptatielimiet. Omdat het TOC-gehalte voldoet en de aanpassingen hebben geleid tot een verbeterde reiniging is er een risicoanalyse uitgevoerd wat de consequenties zijn van deze hoeveelheid bupivacaïne nog aanwezig na reiniging. Naast het feit dat de toxicologische limiet zeer streng is, in vergelijking tot de 10 ppm en doseringslimiet (deze zijn 664 mg en 86 mg, respectievelijk), is er ook gekeken naar de hoeveelheid bupivacaïne, die overgedragen kan worden in alle bereidingen die in het 400L vat worden gemaakt. Als maximum per aflevering is 11 µg gevonden, waar een plasma concentratie van bupivacaïne van boven de 4 µg/ml toxisch is [2]. De toediening van één van de producten bereid in het 400L vat zal nooit leiden tot een hoeveelheid van meer dan 11 µg bupivacaïne in de patiënt. Hiermee is de reiniging van het 400L vat geborgd gebruikmakend van configuratie 2.

Conclusie

De gevalideerde LCMSMS methode is gevoelig en nauwkeurig genoeg om gebruikt te worden als methode om reiniging van apparatuur te valideren. De LCMSMS-methode kan gebruikt worden als screeningstechniek en is specifiek voor de actieve component(en) in tegenstelling tot TOC, waar alle koolstof-bevattende verontreinigingen worden gemeten. Ook de TOC-methode kan goed ingezet worden voor reinigingsvalidatie, echter TOC is alleen geschikt voor water-oplosbare componenten. De hier gepresenteerde

resultaten laten zien dat de reinigingsvalidatie voor zowel het 400L vat als het 50L vat geborgd zijn. Hierbij moet echter wel opgemerkt worden dat een risico-analyse noodzakelijk is geweest voor het 400L vat op basis van een MACO die 10 keer te hoog is ten opzichte van de gestelde acceptatielimiet. De reinigingsvalidatie heeft geleid tot aanpassing van de bereidingsopstelling, waarbij nu het eindfilter onder LAF-condities geplaatst kan worden en er alleen nog filters voor eenmalig gebruik ingezet worden.

Dankwoord

Peter ter Horst, ziekenhuisapotheker laboratorium Isala klinieken en Ronald van de Laak en Zeger de Vente van Beun - De Ronde worden bedankt voor de bepaling van de TOC-gehaltenes.

Reference List

- 1 Wieling, J. e.a. Rational experimental design for bioanalytical methods validation. Illustration using an assay method for total captopril in plasma. *Journal of Chromatography A* 730(1-2) 381-394 1996
- 2 Ellenhorn's Medical Toxicology. Diagnosis and Treatment of Human Poisoning. M.J. Ellenhorn 2nd edition 1997

