

Aino Parta

JOHTOKYKY- JA PH-MITTAUS OSANA PUHDISTUSVALIDOINTIA

Kandidaatintyö
Lääketieteen ja terveysteknologian tiedekunta
Minna Veiranto
Huhtikuu 2024

TIIVISTELMÄ

Aino Parta: Johtokyky- ja pH-mittaus osana puhdistusvalidointia
Kandidaatintyö
Tampereen yliopisto
Bioteknologia ja biolääketieteen tekniikka
Huhtikuu 2024

Lääketeollisuudessa on olennaista pyrkiä takaamaan lääkkeiden puhtaus ja turvallisuus. Tavoitteen saavuttamiseksi lääkkeiden hyvät tuotantotavat (GMP, Good Manufacturing Practices) on asettanut valmistajille vaatimuksen valvoa tuotantoprosessejaan validoinnin ja verifiointin avulla tuotteen ja prosessin koko elinkaaren ajan. Validointeihin kuuluvat muun muassa puhdistusvalidointi, prosessivalidointi sekä analyysimenetelmien validointi, ja ne keskittyvät varmistamaan, että prosessit tuottavat oikeanlaista tuotetta. Verifiointi taas keskittyy varmistamaan, että prosessin aikana käytetyt menetelmät ja laitteet toimivat oikein tuottaen odotetun tuloksen.

Lääketeollisuudessa puhdistusvalidointi on keskeinen osa tuotantoprosessin validointia. Se on dokumentoitu näyttö siitä, että valittu puhdistustoimenpide poistaa tuotantotiloista ja -laitteistosta kontaminaatiotekijät kuten tuote- tai pesuainejäämät, edellisen erän aktiivisen lääkeaineen (API, Active Pharmaceutical Ingredient) jäämät, tuotantolaitteiston puhdistamiseen käytetyn pesuaineen tai mikrobit toistettavasti noudattaen standardeja ja viranomaisten sekä valmistajan asettamia rajoja. Lisäksi puhdistusvalidointi takaa yhdessä esimerkiksi muiden validointien ja henkilöstön kouluttamisen kanssa valmistettavan tuotteen turvallisuuden ja API:n puhtauden ja oikean vahvuuden. Kuten muihinkin validointiprosesseihin, puhdistusvalidointiprosessin suorittamiseen kuuluu validointisuunnitelman laatiminen, validoinnin suorittaminen sekä validointiraportin laatiminen. Jotta puhdistusvalidointi pystytään suorittamaan, tarvitaan avuksi erilaisia puhtauden arviointimenetelmiä. Näitä ovat esimerkiksi johtokykymittaus, orgaanisen kokonaishiilen (TOC, Total Organic Carbon) analysointi ja erilaiset kromatografiamenetelmät.

Tämän kandidaatintyön tarkoituksena on perehtyä lääketehaalta vaadittuun puhdistusvalidointiprosessiin Suomessa sekä tutkia kahden analyysimenetelmän sopivuutta pesuainejäämien määrittämiseen. Työhön sisältyy kokeellinen osuus, jonka tarkoituksena on tutkia, onko johtokykymittaus luotettava, toistettava ja tarpeeksi herkkä menetelmä pesuainejäämien analysointiin lääketehaassa. Lisäksi tutkitaan, pystyykö pH-mittausta käyttämään tukena puhtauden arvioinnille. Saatuja tuloksia käytetään suomalaisen lääketehaan puhtaudenanalysointimenetelmän verifiointissa sekä prosessin puhdistusvalidoinnissa.

Kokeellisessa osuudessa valmistettiin laimennossarja emäspesuaineliuoksesta sekä puhdistetusta vedestä. Sarjan jokaisesta näytteestä mitattiin johtokyky, sekä pH-arvo, ja saatuja tuloksia taulukoitiin ja analysoitiin. Saatujen tulosten pohjalta todettiin, että johtokykymittaus on luotettava, toistettava sekä tarpeeksi herkkä menetelmä pesuainejäämien analysointiin. Lisäksi todettiin pH-mittauksen olevan hyvä menetelmä tukemaan johtokykymittausta, mutta itsenäisenä menetelmänä se ei kuitenkaan ole tarpeeksi luotettava.

Avainsanat: lääketehdas, validointiprosessi, puhdistusvalidointi, verifiointiprosessi, johtokykymittaus, pH-mittaus

Tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu Turnitin OriginalityCheck -ohjelmalla.

SISÄLLYSLUETTELO

1. JOHDANTO	1
2. PUHTAUS JA SEN OSOITTAMINEN LÄÄKETEHTAASSA	2
2.1 Puhdistusvalidointi	2
2.1.1 Validointisuunnitelman laatiminen	3
2.1.2 Validoinnin suorittaminen	3
2.1.3 Validointiraportin laatiminen	3
2.2 Puhtauden arviointimenetelmät	4
2.2.1 Johtokykymittaus	5
2.2.2 pH-mittaus	6
2.2.3 Puhdistetun veden vaatimukset	7
3. KOKEELLINEN OSUUS	9
3.1 Materiaalit	9
3.2 Menetelmät	9
4. MITTAUSTULOKSET JA TULOSTEN ANALYSOINTI	10
4.1 Johtokykymittauksen tulokset ja niiden analysointi	10
4.2 pH-mittauksen tulokset ja niiden analysointi	13
5. YHTEENVETO	15
LÄHTEET	16

1. JOHDANTO

Lääketeollisuudessa on olennaista pyrkiä minimoimaan tai jopa eliminoimaan mahdolliset esimerkiksi ympäristön tai puhdistusprosessin aiheuttamat kontaminaatoriskit, jotka voivat vaarantaa lääkkeiden puhtauden ja turvallisuuden. Tavoitteen saavuttamiseksi lääkkeiden hyvät tuotantotavat (GMP, Good Manufacturing Practices) on asettanut valmistajille vaatimuksen valvoa tuotantoprosessejaan validoinnin ja verifiointin avulla tuotteen ja prosessin koko elinkaaren ajan. [1] Validointi on dokumentoitu näyttö siitä, että käytössä olevat prosessit ja menetelmät toimivat halutulla tavalla sekä johtavat johdonmukaiseen ja toistettavissa olevaan lopputulokseen. Validointeihin kuuluvat muun muassa puhdistusvalidointi, prosessivalidointi sekä analyysimenetelmien validointi.

Verifiointi on osa validointiprosessia. Se on prosessi, jolla varmistetaan, että esimerkiksi käytössä olevat laitteet, instrumentit ja järjestelmät toimivat suunnitellusti ja suorittavat tehtävänsä oikein. Verifiointiprosessi koostuu monesta eri vaiheesta, joita ovat muun muassa suunnitteluverifiointi, laitteen tai järjestelmän asennuksen verifiointi ja laitteen tai järjestelmän suorituskyvyn verifiointi. [2] Yhteenvedona voidaan todeta, että validointi keskittyy varmistamaan, että tietty prosessi tuottaa johdonmukaisesti tuotteen, joka täyttää sille ennalta määritetyt spesifikaatiot ja laatuominaisuudet, kun taas verifiointi keskittyy varmistamaan, että prosessin aikana käytetyt menetelmät ja laitteet toimivat oikein tuottaen odotetun tuloksen.

Yksi validoinnin osa-alueista on puhdistusvalidointi, jonka tarkoituksena on todistaa, että valittu puhdistustoimenpide poistaa tuotantotiloista ja -laitteistosta kontaminaatiotekijät kuten tuote- tai pesuainejäämät toistettavasti noudattaen standardeja ja viranomaisten sekä valmistajan asettamia rajoja. [1] Puhtauden arvioinnissa hyödynnetään monenlaisia analyttisiä menetelmiä, joille on myös suoritettava validointi ja verifiointi. Puhdistusvalidoinnin avulla, yhdessä muiden validointien kanssa, pystytään takaamaan, että valmistettu tuote on turvallinen käyttää ja se täyttää asiakkaalle annetut lupaukset.

Tämän kandidaatintyön tarkoituksena on perehtyä lääketehaalta vaadittuun puhdistusvalidointiprosessiin Suomessa sekä tutkia kahden analyysimenetelmän sopivuutta pesuainejäämien määrittämiseen. Työn kokeellisessa osuudessa tutkitaan, onko johtokykymittaus luotettava, toistettava ja tarpeeksi herkkä menetelmä pesuainejäämien analysointiin lääketehaassa. Lisäksi tutkitaan, pystyykö pH-mittausta käyttämään tukena puhtauden arvioinnille. Saatuja tuloksia käytetään suomalaisen lääketehaan puhtaudenanalysointimenetelmän verifiointissa sekä prosessin puhdistusvalidoinnissa.

2. PUHTAUS JA SEN OSOITTAMINEN LÄÄKE- TEHTAASSA

2.1 Puhdistusvalidointi

Puhdistusvalidointi on dokumentoitu näyttö siitä, että puhdistustoimenpide poistaa laitteistosta tuote- tai pesuainejäämät toistettavasti tieteellisesti asetettujen rajojen mukaisesti. Puhdistusvalidointi on tärkeä osa GMP:tä, joka asettaa vaatimuksia sille, että valmistajat ovat velvollisia valvomaan tiettyjä prosessejaan kriittisesti verifiointin sekä validoinnin avulla tuotteen ja prosessin koko elinkaaren ajan. Kaikki suunnitellut tilat, laitteet ja prosessit, jotka voivat vaikuttaa tuotteen laatuun, on dokumentoitava muodollisesti ja niiden vaikutusta validointiin on arvioitava. Lisäksi verifiointin ja validoinnin tulisi perustua perusteltuun ja dokumentoituun riskinarvioon. [1]

Puhdistusvalidoinnin avulla saadaan varmistettua, ettei esimerkiksi edellisen erän aktiivisen lääkeaineen (API, Active Pharmaceutical Ingredient) jäämät, ympäristöpöly, jäänöshuhteluvesi, puhdistamiseen käytetty pesuaine tai mikrobit aiheuta kontaminaatio-riskiä seuraavaan erään. Puhdistusvalidoinnin avulla valmistaja saa todistettua, että käytössä oleva puhdistusprosessi on kaikkien lakien ja määräysten mukainen. Lisäksi se takaa yhdessä muun muassa muiden osa-alueiden validoinnin, henkilöstön kouluttamisen sekä säännöllisten auditointien kanssa tuotteen turvallisuuden, API:n oikean vahvuuden ja puhtauden sekä antaa valmistajalle varmuuden siitä, että tuotannon sisäinen valvonta on toteutettu asianmukaisesti. [3,4]

Euroopan lääkevirasto (EMA, European Medicine Agency) on lääkevalmisteiden arviointiin perustettu virasto, joka toimii Euroopan Unionin alueella. EMA seuraa EU:ssa myyntiluvan saaneiden lääkkeiden turvallisuutta niiden koko elinkaaren ajan esimerkiksi kehittämällä ohjeita ja asettamalla standardeja lääketeollisuuden käyttöön ja valvomalla lääketeollisuuden yrityksiä. Lääketeollisuuden lakeja asettaa puolestaan Euroopan komissio. [5] Suomessa noudatetaan Euroopan komission asettamien lakien lisäksi lääkelaia, jonka tarkoituksena on potilasturvallisuuden lisäksi varmistaa lääkkeiden asianmukainen valmistus ja saatavuus maassa. [6] Suomessa lääkealaa ja lääkkeiden turvallisuudelle ja laadulle asetettuja vaatimuksia valvoo Lääkealan turvallisuus- ja kehittämiskeskus Fimea [7].

2.1.1 Validointisuunnitelman laatiminen

Validointisuunnitelman avulla määritetään, miten puhdistusprosessi tullaan validoimaan. Se on kirjoitettava ennen kuin validoinnin käytännön työ voidaan aloittaa. Suunnitelman tulee sisältää muun muassa seuraavat asiat: validoinnin tarkoitus, kuvaus puhdistukseen käytettävistä välineistä, henkilökunnan kouluttaminen puhdistuksiin liittyen, valittu puhdistusmetodi, selkeästi määritellyt näytteenottoapaikat ja -menotit sekä näytteenanalysointimenetelmä, mukaan lukien perustelut sille, miksi tiettyä näytteenottomenetelmää käytetään ja kuinka monta näytettä otetaan, valitut näytteiden analysointimenetelmät sekä asetetut raja-arvot ja hyväksymiskriteerit perusteluineen. Lisäksi suunnitelmasta tulee käydä ilmi, että validointiraportti laaditaan, kun validointiprosessi on saatu päätökseen. Lopuksi validoinnista vastuussa oleva henkilö tarkistaa validointisuunnitelman, usein yhdessä laadunvalvontaosaston kanssa, ja hyväksyy sen. Näin varmistetaan, että kaikki validoinnin suorittamiseen liittyvät asiat on huomioitu ja että esimerkiksi validointiin valitut menetelmät ovat hyväksyttäviä ja yleisesti tiedossa. [4]

2.1.2 Validoinnin suorittaminen

Validointi suoritetaan validointisuunnitelmaan kirjatun ohjeistuksen mukaisesti. Puhdistettavasta laitteistosta otetaan esimerkiksi sively- tai huuhtelunäytteitä ja saatuja näytteitä analysoidaan sopivalla verifioidulla analyttisellä menetelmällä. Näytteenottomateriaalien ja -menotien ei tulisi vaikuttaa saataviin tuloksiin. Puhdistusprosessi ja näytteenotto tulee suorittaa useamman kerran riskinarvioon pohjautuen. Sen tulee täyttää asetetut hyväksymiskriteerit, jotta voidaan osoittaa, että puhdistusmenetelmä on validoitu. [1]

2.1.3 Validointiraportin laatiminen

Validointiraportti tarvitaan puhdistusvalidoinnin tulosten ja johtopäätösten esittämiseen sekä validoinnin lopulliseen hyväksymiseen. Raporttiin kirjattujen tulosten tulisi osoittaa, että tuotantolaitteiden ja -tilojen puhtaus on hyväksytyllä tasolla. Raportissa tulisi selkeästi todeta, että vastuhenkilö on hyväksynyt puhdistusprosessin ja että kaikki validointisuunnitelmasta poikenneet asiat on käsitelty asianmukaisesti. Lisäksi raportissa tulee huomioida tarve uudelleenvalidoinnille. Tämä tarkoittaa sitä, että kaikki muutokset, jotka voivat vaikuttaa puhdistusvalidoinnin laatuun tulee arvioida ja dokumentoida asianmukaisesti. Uudelleenvalidointia voidaan suorittaa joko aina muutoksenteon yhteydessä tai tietyin väliajoin, vaikka muutoksia ei olisi välttämättä havaittu. Tietyin väliajoin suoritettava uudelleenvalidointi on hyvä vaihtoehto esimerkiksi silloin, kun käytössä on automatisoituja puhdistuslaitteita, joiden suorituskyky voi heikentyä ajan kuluessa. [4]

2.2 Puhtauden arviointimenetelmät

Jotta puhdistusvalidointi pystytään suorittamaan, tarvitaan avuksi erilaisia puhtauden arviointimenetelmiä. Niiden avulla pystytään näyttämään ja todistamaan, että tuotantolaitteiden tai -tilojen puhtaus on tavoitellulla tasolla. Valitun arviointimenetelmän tulee perustua tieteelliseen teoriaan, ja sen tulee osoittaa, että laitteessa olevan tuote- tai pesuainejäämän määrä on hyväksyttävällä tasolla [8]. Puhdistettavasta laitteistosta voidaan ottaa sivelynäytteitä tai huuhtelunäytteitä puhdistuksen viimeisestä huuhteluvedestä. Myös visuaalinen tarkastus on tärkeä osa puhtauden arviointimenetelmiä, vaikka se ei yksin käytettynä ole hyväksyttävä arviointikriteeri. [1]

Sivelynäyte otetaan suoraan laitteiston pinnalta. Menetelmä perustuu laitteen pinnoille jääneen jäämän fyysiseen poistoon laitteen puhdistamisen ja kuivaamisen jälkeen. Näyte otetaan ennalta määritellyltä alueelta, minkä seurauksena kontaminaatio- tai jäämätaso saadaan määritettyä perusteellisesti tiettyä pinta-alaa kohti. Menetelmän etuna on, että näyte voidaan ottaa suoraa vaikeammin puhdistettavasta ja saavutettavasta alueesta. Lisäksi sivelynäytteellä voidaan tutkia kuivuneita tai veteen liukenemattomia jäämiä. Sivelymenetelmän haittoina on, että saatu extrapoloitu tulos perustuu vain pienen pinta-alan tutkimiseen ja että menetelmää on hankala soveltaa suuriin ja monimutkaisiin tuotantolaitteisiin. [9,10]

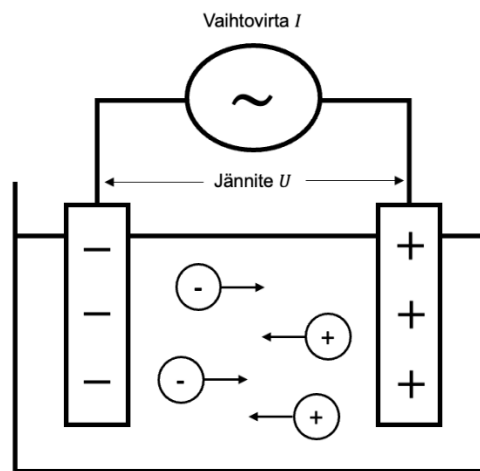
Sivelynäytteen sijasta laitteistosta voidaan ottaa huuhtelunäyte. Huuhtelunäyte otetaan suoraan puhdistuksen viimeisistä huuhteluvesistä eli loppuhuuhtelusta. Menetelmän etuna on, että näyte saadaan otettua suurelta pinta-alalta sekä myös niistä laitteen osista, joihin on muuten hankala päästä tai joita ei voi purkaa. Asianmukaisesti suoritettuna menetelmä antaa perusteellisen käsityksen laitteeseen jäävien jäämien kokonaismäärästä. Huuhtelunäytteiden haittapuolena on, että jäämät tai epäpuhtaudet eivät välttämättä ole vesiliukoisia tai ne voivat olla fyysisesti tukkeutuneena laitteeseen. [9]

Laitteiden ja säiliöiden loppuhuuhtelussa tulisi käyttää samaa veden laatua kuin mitä käytetään valmistettavan lopputuotteen valmistuksessa [11]. Tämä tarkoittaa sitä, että jos tuotteessa käytetään esimerkiksi puhdistettua vettä, loppuhuuhtelusta saadun vesinäytteen tulee täyttää puhdistetun veden vaatimukset. Laitteistosta otettu sively- tai huuhtelunäyte arvioidaan sopivalla verifioidulla analyttisellä menetelmällä. Näitä ovat esimerkiksi orgaanisen kokonaishiilen (TOC, Total Organic Carbon) analysointi, erilaiset kromatografiset menetelmät, johtokykymittaus sekä pH-mittaus. [9] Tämän kandidaatintyön kokeellisessa osuudessa puhtauden analysoinnissa hyödynnetään johtokyky- ja pH-mittausta, jonka takia seuraavaksi keskitytään tarkastelemaan vain kyseisten menetelmien teoriaa.

2.2.1 Johtokyky-mittaus

Johtokyky kuvaa nesteen tai muun aineen kykyä johtaa sähkövirtaa. Nesteissä varauksenkuljettajina toimivat ionit, kun taas esimerkiksi metalleissa varausta kuljettavat elektronit. Nesteen johtokykyyn vaikuttavat monet tekijät, kuten nesteessä olevien ionien konsentraatio, liikkuvuus ja valenssi sekä nesteen lämpötila. [12]

Nesteen johtokyky mitataan kytkemällä kahden elektrodin välille vaihtovirta, upottamalla elektrodit tutkittavaan nesteeseen ja mittaamalla syntyvä jännite. Mittauksen aikana nesteeseen liuenneet kationit liikkuvat kohti negatiivista elektrodia ja anionit kohti positiivista elektrodia ja liuos toimii sähköjohtimena. Tilannetta havainnollistetaan kuvassa 1.



Kuva 1. Nesteen johtokyvyn mittaaminen pohjautuen lähteeseen [12]

Jännitteen ja sähkövirran suhteesta saadaan Ohmin lailla resistanssi

$$R = \frac{U}{I} \quad [\Omega], \quad (1)$$

jossa R on resistanssi, U on jännite ja I on virta [12].

Konduktanssi ilmaisee sähköjohtimen kyvyn johtaa sähkövirtaa [13]. Se määritellään elektrodien välisen liuoksen resistanssin vastalukuna

$$G = \frac{1}{R} \quad [S], \quad (2)$$

jossa G on konduktanssi ja R resistanssi. Konduktanssin yksikkö on siemens. Johtokyky-mittarin toiminta perustuu pohjimmiltaan nesteen konduktanssin mittaamiseen. Laitte mittaa konduktanssin ja näyttää lukeman muutettuna johtokyvyksi. [12]

Elektrodien välillä kulkeva virta riippuu myös kennovakioista (cell constant), joka määritellään elektrodien välisen etäisyyden ja elektrodien pinta-alan suhteena

$$K = \frac{d}{a} \quad [cm^{-1}], \quad (3)$$

jossa d on elektrodien välinen etäisyys (distance) ja a on elektrodien pinta-ala (area) [12]. Johtokykymittaria kalibroidaan tietyin väliajoin tietyn lämpöisellä standardielektrolyytillä, jonka konduktanssi tunnetaan. Näin saadaan määritettyä kennovakio, johon mittari vertaa tutkittavan näytteen kennovakiota. [12]

Lopulta johtokyky κ saadaan konduktanssin ja kennovakion tulona

$$\kappa = G \cdot K \quad [S/cm]. \quad (4)$$

Koska tutkittavan nesteen lämpötila vaikuttaa nesteen johtokykyyn, mittaukset suoritetaan ja ilmoitetaan usein referenssilämpötilassa, joka on yleensä 20 °C tai 25 °C. [12] Näin saatuja tuloksia pystytään vertailemaan luotettavasti.

2.2.2 pH-mittaus

pH-arvo kuvaa nesteen happamuutta tai emäksisyyttä. Sen mittaaminen perustuu näytteessä olevien hydroksi-ionien aktiivisuuden määrittämiseen

$$pH = -\log \alpha_{H^+}, \quad (5)$$

jossa α_{H^+} on näytteessä olevien hydroksi-ionien aktiivisuus. pH on aktiivisuuden kymmenkantaisen logaritmin vastaluku, joka noudattaa logaritmista asteikkoa. Tämä tarkoittaa sitä, että hydroksi-ionien aktiivisuuden pienentyessä kymmenyksellä, pH-arvo kasvaa yhdellä ja aktiivisuuden kymmenkertaistuessa pH-arvo pienenee yhdellä. pH-arvo ilmoitetaan välillä 0–14, eikä sillä ole yksikköä. [14]

Hydroksi-ionien aktiivisuus saadaan määritettyä kaavalla

$$\alpha_{H^+} = f_{H^+} C_{H^+}, \quad (6)$$

jossa f_{H^+} on aktiivisuuskerroin ja C_{H^+} on hydroksi-ionien konsentraatio [14]. Aktiivisuuskerroimen ollessa yksi, hydroksi-ionien konsentraatio on sama kuin niiden aktiivisuus ja pH-arvo voidaan laskea

$$pH = -\log C_{H^+}, \quad (7)$$

mikä on yleistä useimmissa laimeiden liuosten tapauksissa, joissa ionivoimakkuus on matala [14,15].

pH-mittauksessa pH-mittarin lasinen elektrodi upotetaan tutkittavaan nesteeseen, jolloin nesteen hydroksi-ionien ja lasielektrodin sisällä olevien ionien välille syntyy tasapaino. Joko erillisen tai lasielektrodiin sisään rakennetun referenssielektrodin avulla saadaan muodostettua suljettu sähköpiiri ja tasapainotilanteen seurauksena syntynyt potentiaali voidaan määrittää. Laite mittaa potentiaalin ja näyttää lukeman muutettuna pH-arvoksi. Muutos perustuu Nernstin yhtälöön

$$E = E^0 - \frac{RT}{nF} \ln Q, \quad (8)$$

jossa E on kennon elektrodipotentiaali, E^0 on kennon standardielektrodipotentiaali, R on kaasuvakio, T on kennon lämpötila, n on reaktiossa siirtyvien elektronien lukumäärä, F on Faradayn vakio ja Q on reaktio-osamäärä [16].

pH-mittaria kalibroidaan tietyin väliajoin tietyn lämpöisillä puskuriliuoksilla, joiden pH tunnetaan. Kalibrointi suoritetaan joko yhdellä tai yleisimmin kahdella tunnetulla liuoksella. Mittari vertaa tutkittavia näytteitä kalibrointinäytteisiin. [14]

Koska tutkittavan nesteen lämpötila vaikuttaa mittauksen aikana syntyvään tasapainotilanteeseen ja edelleen mitattuun pH-arvoon, pH-mittarin kalibroinnit sekä näytteiden mitaukset pyritään suorittamaan aina samoissa lämpötiloissa. Lisäksi tulos ilmoitetaan aina lämpötilan kanssa. [17] Näin saatuja tuloksia pystytään vertailemaan luotettavasti.

2.2.3 Puhdistetun veden vaatimukset

Puhdistettua vettä käytetään sellaisten lääkkeiden valmistuksessa, joiden valmistukseen ei tarvitse käyttää steriiliä tai apyrogeenistä vettä. Puhdistettua vettä valmistetaan esimerkiksi tislauksen, ioninvaihdon tai käänteisosmoosin avulla vedestä, joka täyttää ihmisille tarkoitetun juomaveden vaatimukset. Valmistettu puhdistettua vettä säilytetään ja jaetaan olosuhteissa, joiden tarkoituksena on estää mikro-organismien kasvu sekä välttää muunlainen kontaminaatio. Veden laatua tutkitaan tietyin väliajoin esimerkiksi mikrobiologisilla testeillä, jolloin varmistetaan, että mikrobien määrä pysyy asetetuissa rajoissa. Näytteitä otetaan sekä veden valmistuksen että säilytyksen yhteydessä. [18]

Euroopan farmakopea (Ph. Eur.) on määrittänyt vaatimuksia puhdistetun veden johtokykyyn liittyen. Koska johtokyky on lämpötilasta riippuvainen suure, puhdistetulle vedelle on määritetty johtokyvyn maksimiraja-arvot eri lämpötiloissa. Puhdistettu vesi vastaa asetettuja vaatimuksia, jos sen johtokyky tietyssä lämpötilassa ei ylitä määritettyjä arvoja. Puhdistetun veden vaatimukset johtokyvylle on esitetty taulukossa 1. [18]

Taulukko 1. *Puhdistetun veden vaatimukset johtokyvyille tietyissä lämpötiloissa pohjautuen lähteeseen [18]*

Lämpötila (°C)	Johtokyky ($\mu\text{S}/\text{cm}$)
0	2,4
10	3,6
20	4,3
25	5,1
30	5,4
40	6,5
50	7,1
60	8,1
70	9,1
75	9,7
80	9,7
90	9,7
100	10,2

Tislauksen, ioninvaihdon tai käänteisosmoosin avulla valmistetun puhdistetun veden pH-arvon tulee olla välillä 5,0–7,5. Muilla menetelmillä, kuten monivaihetislauksella, suolanpoistolla tai usean menetelmän yhdistelmällä, valmistetuille puhtaammille puhdistetun veden laaduille pH-vaatimukset on jätetty usein määrittelemättä veden pH-mittauksiin liittyvien vaikeuksien vuoksi sekä arvon kyseenalaisen merkityksen vuoksi. [19]

3. KOKEELLINEN OSUUS

3.1 Materiaalit

Kokeellisessa osuudessa tutkittiin eri vahvuisia emäspesuaineliuoksia, jotka koostuivat 2 % emäspesuaineen käyttöliuoksesta sekä lääketehaassa käänteisosmoosin ja UV-valon avulla valmistetusta puhdistetusta vedestä. Tutkittavat näytteet valmistettiin laimennossarjana, jonka laimennossuhde oli 1:10. Laimennossarjan ensimmäinen näyte (näyte 1) koostui 10 grammasta emäspesuaineen käyttöliuosta ja 90 grammasta puhdistettua vettä. Seuraava näyte (näyte 2) koostui 10 grammasta näytettä 1 ja 90 grammasta vettä, ja niin edelleen. Näin seuraavan näytteen emäspesuaineen pitoisuus oli aina kymmenesosa edellisestä. Laimennossarjaa valmistettiin niin pitkälle, kunnes laitteet eivät enää havainneet kunnolla tai ollenkaan näytteessä olevaa emäspesuainetta. Tässä koeksessa sarjaa valmistettiin näytteeseen 7 asti.

3.2 Menetelmät

Emäspesuaineliuosten analysoinnissa käytettiin Consort C830 johtokyky- ja pH-mittaria ja tulosten taulukoinnissa ja analysoinnissa käytettiin Microsoft Excel -ohjelmistoa.

Koe aloitettiin kalibroimalla mittauksessa käytettävä johtokyky- ja pH-mittari sekä tarkistamalla laimennossarjan valmistamisessa käytetyn vaa'an kalibrointistatus. Tämän jälkeen valmistettiin laimennossarja hyödyntäen laboratorioissa yleisesti käytettyjä instrumentteja kuten dekantterilaseja, pipettejä sekä spaatteleita.

Mittaukset aloitettiin määrittämällä puhdistetun veden johtokyky sekä pH-arvo (näyte 0). Tämän jälkeen mitattiin laimennossarjan näytteet vahvimasta pitoisuudesta laimeimpaan ja saadut tulokset merkattiin ylös. Koska käytettävässä mittarissa oli mahdollista pitää yhtä aikaa kiinni sekä johtokykyyn että pH-mittaukseen käytettävää elektrodia, näytteistä mitattiin aina peräkkäin johtokyky ja pH-arvo. Näytteiden välillä elektrodit huuhdeltiin puhdistetulla vedellä. Arvot mitattiin laimennossarjasta yhteensä kolme kertaa. Mittausten aikana näytteitä pidettiin noin 25 °C:ssa vesihauteessa, jossa käytetty vesi oli ei-puhdistettua hanavettä.

Kolmen mittauksen pohjalta laskettiin keskiarvot ja keskihajonnat näytteiden johtokyvyille ja pH-arvoille. Lisäksi saatujen arvojen pohjalta sovitettiin käyrät sekä johtokyvyille että pH-arvolle pesuaineliuoksen massaprosenttisen osuuden funktiona.

4. MITTAUSTULOKSET JA TULOSTEN ANALYYSOINTI

4.1 Johtokykymittauksen tulokset ja niiden analysointi

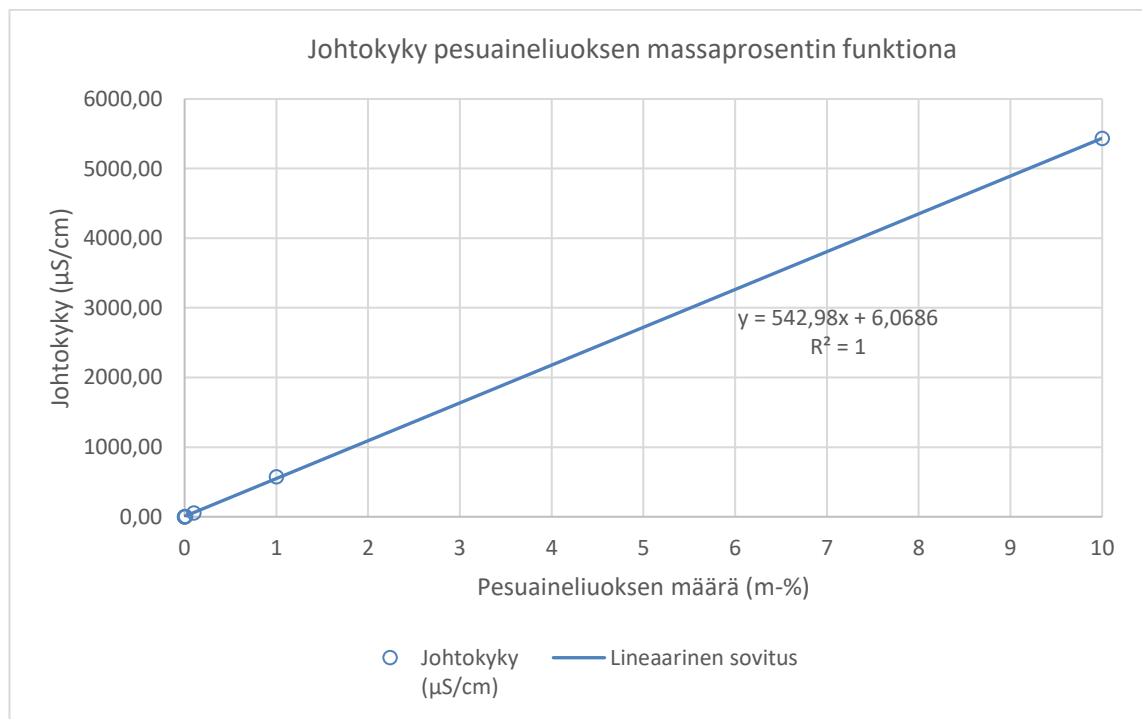
Tuloksia saatiin kaikista kolmesta johtokykymittauksesta välillä 5520–1,2 $\mu\text{S}/\text{cm}$ niin, että laimennossarjan seuraavan näytteen johtokyky oli aina noin kymmenesosan edellisestä, kunnes arvot alkoivat vakiintua lähelle puhdistetulle vedelle mitattua johtokyvyn arvoa 1,1 $\mu\text{S}/\text{cm}$. Esimerkiksi mittauksessa 1 näytteen 1 johtokyky oli 5520 $\mu\text{S}/\text{cm}$, näytteen 2 590 $\mu\text{S}/\text{cm}$, näytteen 3 60,3 $\mu\text{S}/\text{cm}$, ja molempien näytteiden 6 ja 7 johtokyky oli 1,2 $\mu\text{S}/\text{cm}$. Näytteen 5 kohdalla johtokyvyn tuloksessa oli huomattavissa selkeä ero mittauksissa 2 ja 3 mittaukseen 1 verrattuna. Mittauksessa 1 näytteen 5 johtokyky oli 1,5 $\mu\text{S}/\text{cm}$, kun taas mittauksessa 2 johtokyky oli 16 $\mu\text{S}/\text{cm}$ ja mittauksessa 3 17,4 $\mu\text{S}/\text{cm}$. Muiden näytteiden mittaustulokset olivat kuitenkin linjassa jokaisessa mittauksessa, joten voidaan epäillä, että näyte 5 on mahdollisesti kontaminoitunut kokeen aikana mittauksen 1 jälkeen. Kontaminaation syynä saattoi olla esimerkiksi epähuomiossa huonosti puhdistettu elektrodi tai instrumentti, josta väkevämpää näytettä olisi päässyt sekoittumaan laimeampaan näytteeseen tai todennäköisempänä se, että ei-puhdistettua hanavettä olisi päässyt sekoittumaan vesihauteesta näytteeseen.

Mittauksista saadut tulokset johtokyvylle sekä niiden pohjalta lasketut keskiarvot ja keskihajonnat on esitetty taulukossa 2. Poikkeavat mittaustulokset on jätetty huomioimatta keskiarvon ja keskihajonnan laskemisessa ja tulosten analysoinnissa. Kaikki mittaukset on suoritettu 25 °C lämpötilassa.

Taulukko 2. Johtokyky mittauksen tulokset 25 °C lämpötilassa. Näytteen 5 mittauksesta 2 ja 3 saadut tulokset ovat poikkeavia ja ne on jätetty huomioimatta keskiarvon ja keskihajonnan laskemisessa.

Näyte	Pesuaineliuoksen määrä (m – %)	Johtokyky ($\mu\text{S}/\text{cm}$)				
		Mittaus 1	Mittaus 2	Mittaus 3	ka.	σ
0	0	1,1				
1	10	5520	5470	5310	5433	89,6
2	1	590	566	569	574	10,6
3	0,1	60,3	53,3	53,8	55,8	3,2
4	0,01	5,5	6,6	6,6	6,2	0,5
5	0,001	1,5	16	17,4	1,5	0
6	0,0001	1,2	2,2	3,0	2,1	0,7
7	0,00001	1,2	1,8	1,8	1,6	0,3

Saatujen keskiarvojen pohjalta sovitettiin käyrä johtokyvylle pesuaineliuoksen massaprosenttisen osuuden funktiona, joka on esitetty kuvassa 2.



Kuva 2. Mittaustuloksista piirretty kuvaaja johtokyvylle pesuaineliuoksen massaprosenttisen osuuden funktiona

Saaduista tuloksista nähdään, että emäspesuaineliuoksen massaprosenttisen osuuden pienentyessä kymmenesosaan, johtokyky pienenee myös noin kymmenesosaan näytteissä 1–4. Sama lineaarinen riippuvuus voidaan nähdä kuvassa 2, josta ilmenee johtokyvyn ja pesuaineliuoksen massaprosenttinen osuuden olevan suoraan verrannollisia. Kuvaan 2 on laskettu taulukkolaskelmaohjelmalla lineaarisen sovituksen R²-arvo, joka kertoo, kuinka hyvin mittapisteet sopivat valittuun sovitukseen. Arvo annetaan välillä 0–1, jossa 0 kertoo huonosta sopivuudesta ja 1 hyvästä. Sovituksen R²-arvo on 1, mikä vahvistaa, että pistejoukko noudattelee erittäin hyvin lineaarista sovitusta.

Näytteestä 5 eteenpäin emäspesuainetta on 100 gramman liuoksessa erittäin vähän, vain alle mikrogramma, ja mitattu johtokyky alkaa vakioitua lähelle puhdistetun veden johtokykyä. Tuloksista voidaan päätellä, että näin pienet emäspesuainemäärät eivät juurikaan enää vaikuta puhdistetun veden johtokykyyn.

Kaikkien näytteiden kohdalla saatiin kaikista kolmesta mittauksesta johdonmukaiset ja toistensa kanssa linjassa olevat tulokset, mikä nähdään myös taulukkoon 2 kirjatuihin keskihajonnan tuloksista. Tämän perusteella menetelmän voidaan sanoa olevan toistettava ja luotettava, sillä kaikista kolmesta mittauksesta saadut tulokset olivat hyvin lähellä toisiaan. Vaikka kontaminaatioepäily ei ollut toivottu, voidaan sanoa sen kertovan menetelmän luotettavuudesta. Koska näytteen 5 johtokyky poikkesi sekä mittauksessa 2 että mittauksessa 3, kyseessä ei ollut mittarin virhe vaan poikkeava tulos johtui näytteestä. Vikaa mittarissa olisi voitu epäillä, jos esimerkiksi vain mittaus 2 olisi antanut poikkeavan tuloksen. Johtokyvylle saatiin luotettavat tulokset myös erittäin pienissä pesuainepitoisuuksissa, joten johtokykymittauksen voidaan sanoa olevan menetelmänä tarpeeksi tarkka pesuainejäämien analysointiin.

Johtokykymittausta tullaan hyödyntämään jatkossa lääkevalmistuksen puolivalmistestien puhtauden varmistamisessa pesun jälkeen. Tämän takia on tärkeää, että johtokykymittauksen avulla pystytään varmistamaan, että loppuhuuhtelusta saatu vesinäyte täyttää Ph. Eur.:n vaatimukset puhtaalle vedelle, jotka on esitetty taulukossa 1. Vaatimusten mukaan lämpötilassa 25 °C johtokyky saa olla enintään 5,1 µS/cm. Saaduista tuloksista nähdään, että kyseinen arvo saavutetaan käytetyllä johtokykymittarilla helposti ja tuloksia saadaan myös huomattavasti tämän arvon alapuolelta. Johtokykymittauksen voidaan siis sanoa olevan soveltuva analyysimenetelmä haluttuun tarkoitukseen.

4.2 pH-mittauksen tulokset ja niiden analysointi

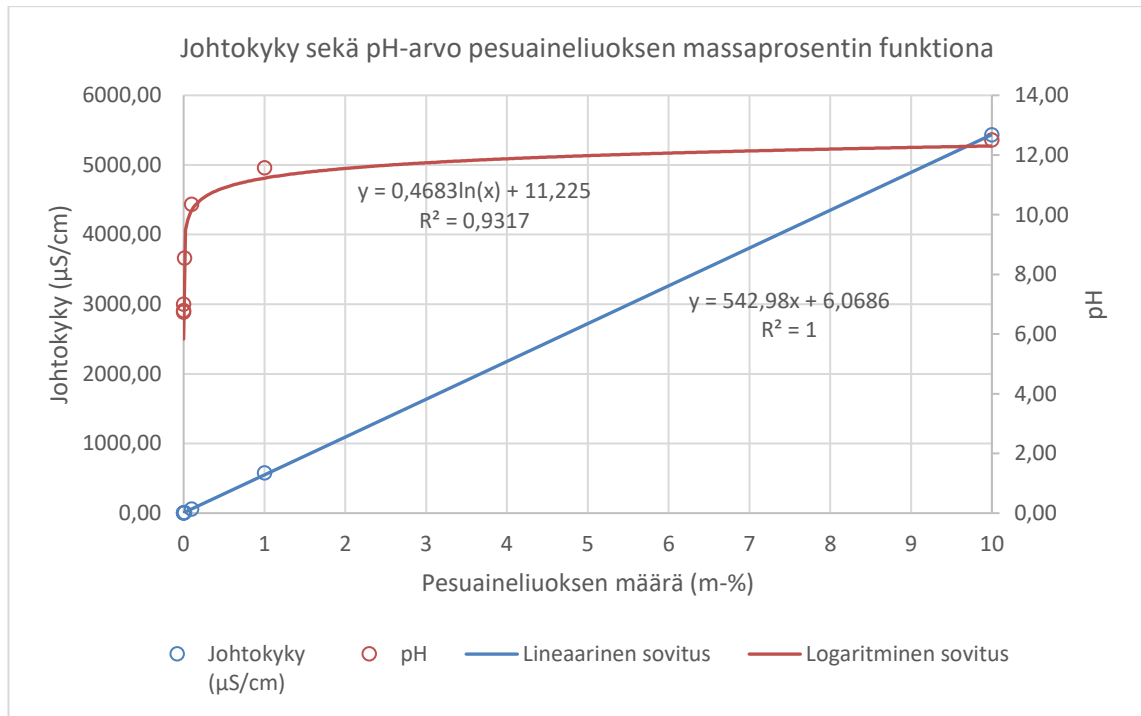
Tuloksia saatiin kaikista kolmesta pH-mittauksesta välillä 12,57–6,13 niin, että laimennosarjan seuraavan näytteen pH-arvo oli aina noin yhden pienempi kuin edellinen, kunnes arvot alkoivat vakiintua lähelle puhdistetulle vedelle mitattua pH-arvoa 6,45. Esimerkiksi mittauksen 1 näytteen 1 pH-arvo oli 12,44, näytteen kaksi 11,57 ja näytteen 3 10,48 ja näytteen 7 pH-arvo oli 6,68. Mittauksessa 2 ei saatu määritettyä pH-arvoa näytteelle 7. Tämä johtuu siitä, että pienissä emäspesuainepitoisuuksissa lähes neutraalin näytteen pH-arvon määrittäminen oli erittäin vaikeaa, sillä mittarin lukema ei vakioitunut yhteenkään tiettyyn arvoon.

Mittauksista saadut tulokset pH:lle sekä niiden pohjalta lasketut keskiarvot ja keskihajonnat on esitetty taulukossa 3. Tulosten analysoinnissa on käytetty saatavilla olevia tuloksia. Kaikki mittaukset on suoritettu 25 °C lämpötilassa.

Taulukko 3. pH-mittauksen tulokset 25 °C lämpötilassa. Keskiarvon ja keskihajonnan laskemisessa on hyödynnetty saatavilla olevia tuloksia.

Näyte	Pesuaineliuoksen määrä (m – %)	pH				
		Mittaus 1	Mittaus 2	Mittaus 3	ka.	σ
0	0	6,45				
1	10	12,44	12,57	12,51	12,55	0,05
2	1	11,57	11,57	11,56	11,57	0,005
3	0,1	10,48	10,32	10,24	10,35	0,01
4	0,01	9,12	8,51	8,00	8,54	0,46
5	0,001	7,68	6,35	6,96	7,00	0,54
6	0,0001	7,74	6,34	6,13	6,74	0,71
7	0,00001	6,68		6,7	6,78	0,08

Saatujen keskiarvojen pohjalta sovitettiin käyrä pH-arvolle pesuaineliuoksen massaprosenttisen osuuden funktiona, joka on esitetty kuvassa 3. Käyrä on sovitettu samaan kuvaan johtokykymittauksen käyrän kanssa, jotta tulosten analysointi olisi helpompaa.



Kuva 3. Mittaustuloksista piirretty kuvaaja sekä johtokyvylle että pH-arvolle pesuaineliuoksen massaprocenttisen osuuden funktiona

Taulukosta 3 nähdään, että emäspesuaineliuoksen massaprocenttisen osuuden pienentyessä kymmenesosaan, pH-arvo pienenee noin yhdellä. Tämä on odotettu tulos, sillä emäspesuaineen pitoisuuden pienentyessä kymmenesosaan, liuoksen aktiivisuuden tulisi kymmenkertaistua ja pH-arvo pienentyä yhdellä. Sama riippuvuus näkyy tuloksissa näytteeseen 5 asti, jonka jälkeen pH-arvo arvo alkaa vakioitua lähelle puhdistetun veden pH-arvoa. Kuten johtokykymittauksen tapauksessa, erittäin pienet emäspesuainepitoisuudet eivät näytä enää vaikuttavan liuoksen pH-arvoon. Kuvassa 2 pistejoukkoon on sovitettu logaritminen sovitus, jonka R²-arvo on 0,9317. Arvo on erittäin lähellä yhtä, mikä vahvistaa, että koko pistejoukko noudattelee erittäin hyvin logaritmistä sovitusta.

Sekä liuoksen johtokyky että pH-arvo ovat riippuvaisia emäspesuaineen massaprocenttisestä osuudesta. Molemmat arvot pienenevät loogisesti ja vakioituvat lähelle puhdistetun veden arvoja sekä mittarin mittauskyvyn alarajoja samoissa laimennossuhteissa. Tulosten pohjalta voidaan päätellä pH-mittauksen olevan hyvä menetelmä tukemaan johtokykymittausta. Itsenäisenä menetelmänä se on suuntaa antava, mutta ei luotettava, sillä erityisesti pienissä emäspesuainepitoisuuksissa pH-mittarin lukema vaihteli isolla välillä eikä vakioinut yhteenkään tiettyyn arvoon.

5. YHTEENVETO

Puhdistusvalidointi on olennainen osa lääketeollisuuden tuotantoprosessia, joka varmistaa yhdessä muiden osa-alueiden kanssa lääkkeiden turvallisuuden ja puhtauden. Analyttiset menetelmät, kuten johtokykymittaus ja pH-mittaus, ovat tärkeitä työkaluja puhtauden arvioinnissa ja puhdistusvalidoinnissa. Lisäksi kyseiset menetelmät ovat yksinkertaisia käyttää ja tulokset saadaan näytteistä nopeasti, joten ne soveltuvat hyvin jokapäiväiseen käyttöön lääketehtaassa.

Kokeellisessa tutkimuksessa tutkittiin johtokyky- ja pH-mittauksen soveltuvuutta puhtauden arvioinnissa ja pesuainejäämien analysoinnissa. Mittaukset suoritettiin laimennos-sarjalla, joka koostui emäspesuaineliuksesta ja puhdistetusta vedestä. Kokeellinen tutkimus sujui suunnitelmien mukaisesti johtaen onnistuneisiin ja käyttökelpoisiin tuloksiin lukuun ottamatta yhtä kontaminaatioepäilyä. Vaikka mahdollinen kontaminaatio ei ollut toivottu, tarjosi se myös hyvää varmistusta johtokyky-mittauksen luotettavuudesta. Kokeellisesta tutkimuksesta saatujen tulosten perusteella voidaan sanoa, että johtokyky-mittaus on luotettava, toistettava ja tarpeeksi herkkä menetelmä kyseiseen tarkoitukseen ja pH-mittauksella saatiin tukea puhtauden arvioinnille.

Työstä saadut tulokset ovat osa suomalaisen lääketehtaan puhdistusvalidointia. Pesuainejäämien analysoimisesta saadut tulokset ja johtopäätökset kirjataan lääketehtaan puhdistusvalidointiraporttiin. Jatkossa johtokyky-mittausta ja tämän kandidaatintyön kokeellista tutkimusta vastaavaa koejärjestelmää voidaan soveltaa myös muihin puhdistusvalidointiprosessin vaiheisiin, esimerkiksi erivahvuisten lopputuoteliuosten analysointiin. Lisäksi johtokyky-mittaus soveltuu jatkossa lääketehtaan laitteistosta otettavien huuhtelunäytteiden analysointiin.

LÄHTEET

- [1] EU Guidelines for Good Manufacturing Practice for Medicinal Products for Human and Veterinary Use, European Commission Annex 15: Qualification and Validation, Brussel, Mar 2015
- [2] D. Fitzgerald, C. Wilson, Qualification vs Validation, GetReskilled, (viitattu 16. helmikuuta 2024), Saatavissa: <https://www.getreskilled.com/validation/qualification-validation/>
- [3] S. Dahiya, D. Chand, Y. Goyal, C. Sharma, Cleaning Validation: A Crucial Step in Assuring Quality During Pharmaceutical Manufacturing, International Journal of Pharmaceutical Quality Assurance, Vol.13, Iss.4, Oct-Dec 2022, pp. 484-489
- [4] R. Asgharian, F.M. Hamedani, A. Heydari, Step by Step How to Do Cleaning Validation, International Journal of Pharmacy & Life Sciences, March 2014, pp. 3345-3366
- [5] What we do, European Medicines Agency, (viitattu 27. maaliskuuta 2024, Saatavissa: <https://www.ema.europa.eu/en/about-us/what-we-do>
- [6] Lääkelaki 395/1987, Finlex, (viitattu 27. maaliskuuta 2024), Saatavissa: <https://www.finlex.fi/fi/laki/ajantasa/1987/19870395>
- [7] Fimea ja potilaat, Fimea, (viitattu 12. tammikuuta 2024), Saatavissa: <https://fimea.fi/valvonta/gmp-todistukset>
- [8] D. Salade, K. Arote, P.H. Patil, P.S Patil, A. Pawar, A Review on Pharmaceutical Cleaning Validation, Asian Journal of Pharmaceutical Analysis, Vol.12, Iss.3, Sep 2022, Saatavissa: <https://ajpaonline.com/AbstractView.aspx?PID=2022-12-3-7>
- [9] S. Ramandi, R. Asgharian, Evaluation of Swab and Rinse Sampling Procedures and Recovery Rate Determination in Cleaning Validation Considering Various Surfaces, Amount and Nature of the Residues and Contaminants. Iranian Journal of Pharmaceutical Research, Vol.19, Iss.3, Jul 2020, pp. 383-390, Saatavissa <https://doi.org/10.22037/ijpr.2020.1101173>
- [10] S. Maurya, D. Goyal, C. Verma, Cleaning Validation in Pharmaceutical Industry- An Overview, PharmaTutor, Vol.4, Iss.9, 2016, pp. 14-20
- [11] Guideline on the quality of water for pharmaceutical use, European Medicines Agency, Jul 2020
- [12] Hach Company/Hach Lange GmbH, Conductivity of Water Based on ISO standard 7888:1985, 2nd Ed, Apr 2015
- [13] TEPA-termipankki (erikoisalojen sanasto- ja sanakirjakokoelma), konduktanssi, (viitattu 3. tammikuuta 2024), Saatavissa: <https://termipankki.fi/tepa/fi/haku/konduktanssi>
- [14] C. Westcott, Ph Measurements. Elsevier, 2012. 185 s.

- [15] Hach Company/Hach Lange GmbH, pH Determination in Water Based on ISO standard 10523:2008, 2nd Ed, Mar 2015
- [16] 16.4: The Nernst Equation, Chemistry LibreTexts, 2013, (viitattu 8. tammikuuta 2024), Saatavissa: [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/General_Chemistry/Chem1_\(Lower\)/16%3A_Electrochemistry/16.04%3A_The_Nernst_Equation](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/General_Chemistry/Chem1_(Lower)/16%3A_Electrochemistry/16.04%3A_The_Nernst_Equation)
- [17] Water quality. Determination of pH, SFS-EN ISO 10523:2008, Helsinki, 2012
- [18] European Pharmacopoeia 11.0, Water, Purified, Jul 2022, pp. 4391-4393
- [19] Water for analytical laboratory use – Specification and test methods, SFS-EN ISO 3696:1987, Helsinki, 1995