Herausforderung
TN-Proben aus der Reinigungsvalidierung erfordern auf Grund ihrer stark wechselnden Konzentrationen ein verschleppungsfreies und nachweisstarkes Analysegerät.

Lösung
Anhand von Messserien mit Proben unterschiedlicher Konzentrationsniveaus wird die Leistungsfähigkeit der Hochtemperatur-Analysatoren der multi N/C x300 Serie für diese Anwendung demonstriert.

Zielpublikum
Pharmazeutische und biopharmazeutische Industrie, Auftragslabore für pharmazeutische Analytik.

GMP-gerechte TN-Reinigungsvalidierung in der biopharmazeutischen Industrie

Einleitung

Im Gegensatz zur klassischen pharmazeutischen Produktion, die chemische Reaktionen nutzt, um Wirkstoffe herzustellen, werden in biopharmazeutischen Produktionsprozessen häufig gentechnisch veränderte Organismen (Bakterien, Pilze etc.) zur Wirkstoffproduktion eingesetzt oder Wirkstoffe aus pflanzlichen bzw. tierischen Materialien gewonnen. Diese Wirkstoffe sind meist Polypeptide oder auch Proteine, die sich aus verschiedenen Aminosäuren zusammensetzen. In allen biopharmazeutisch hergestellten Wirkstoffen und Arzneimitteln ist also neben dem Kohlenstoff auch Stickstoff vorhanden. Daher eignet sich der Parameter TN (Total Nitrogen – Gesamtstickstoff), welcher deutlich Wirkstoff-spezifischer ist als der Parameter TOC (Total Organic Carbon – Gesamter organischer Kohlenstoff) hervorragend, um ihn als Leitparameter für die Reinigungsvalidierung in der Biopharmazie zu nutzen. Neben der inzwischen weit verbreiteten TOC-Bestimmung als unspezifisches Analyseverfahren für organische Verunreinigungen in der Reinigungsvalidierung bietet sich die Bestimmung des TN vor allem auch deshalb an, weil die Kontaminationsgefahr für Proben durch äußere Einflüsse bedeutend geringer ist als beim TOC. Gewonnene Proben aus dem post-final Rinse-Prozess oder der Swab-Extraktion enthalten oft sehr niedrige Konzentrationen an organischen Verbindungen, die im Falle der Kohlenstoff-Bestimmung rasch durch Belastungen aus der Umgebungsluft oder den Probenahmegefäßen selbst verunreinigt und damit verfälscht werden können. Dies trifft für die Stickstoff-Bestimmung nur in seltensten Fällen und in viel geringerem Maße zu.

Verfahren zur instrumentellen Stickstoffbestimmung sind in verschiedenen Pharmakopöen beschrieben (EP 2.5.33, Methode 7B[1]; USP <1057>, Methode 7.2[2]; JP XVII, Methode 7B[3]) und damit allgemein anerkannt.

Grundlage des Verfahrens zur Ermittlung des TN bildet eine katalytisch unterstütze Hochtemperatur-Oxidation der Probe bei hohen Temperaturen bis 1000 °C in einer sauerstoffreichen Atmosphäre. Der anschließende Nachweis des dabei gebildeten NO erfolgt mit Hilfe eines Chemolumineszenzdetektors (CLD). Instrumentelle Stickstoffanalysatoren ermöglichen in der Regel die parallele Bestimmung des TOC, was für biopharmazeutische Labore einen Vorteil darstellen kann, wenn in den für die Produktion eingesetzten Wässern auch Verunreinigungen an organischen Kohlenstoffverbindungen untersucht werden müssen. Mit der TN-Bestimmung steht für den Nachweis der Wirksamkeit eingesetzter Reinigungsprozesse in Produktionsanlagen gemäß dem GMP-Leitfaden ICH Q71 ein einfaches und effektives analytisches Messverfahren zur Verfügung.

In der vorliegenden Arbeit wird aufgezeigt, wie TN-Analysatoren der multi N/C x300 Serie die Anforderungen der Pharmakopöen hinsichtlich der Stickstoffbestimmung in der Reinigungsvalidierung nicht nur erfüllen, sondern mit sehr guten Leistungsmerkmalen in Bezug auf Nachweisstärke und verschleppungsfreie Analytik bei wechselnden Stickstoffkonzentrationen überzeugen.

Material und Methoden

Die TN-Bestimmungen wurden an den TOC/TN-Analysatoren multi N/C 3300 bzw. multi N/C 3300 HS durchgeführt. Die Proben und Standards wurden ohne zusätzliche Probenvorbereitung direkt in das mit Katalysator gefüllte Verbrennungsrohr des Analysators injiziert. Die in der Probe enthaltenen Stickstoffverbindungen werden dort bei hohen Temperaturen vollständig oxidiert. Die hierbei gebildeten Stickoxide werden anschließend zur Quantifizierung durch einen Chemolumineszenzdetektor (CLD) geführt. Für die automatische Probenzuführung wurde der Probengeber AS vario in Kombination mit einem Tablett für 72 Proben zu je 40 ml verwendet.
Die beiden Messgeräte unterscheiden sich lediglich in ihrer Probeninjektionstechnik. Beide Geräte dosieren die Flüssigprobe über eine Spritzenpumpe. Am multi N/C 3300 wird die Probe allerdings in eine Probenschleife aufgezogen, wodurch eine Kontamination der Spritzenpumpe mit der Probe verhindert wird. Durch Rückspülen der Probenschleife und größere Schlauchdurchmesser können dadurch auch Proben mit anspruchsvoller Matrix (z.B. hohe Partikelfracht) verschleppungsfrei mittels Fließinjektion analysiert werden. Der multi N/C 3300 HS ist für die Reinstwasseranalyse optimiert. Die Probe wird direkt in die Spritzenpumpe aufgezogen, wodurch höhere Probenvolumina injiziert (bis zu 3 ml) und niedrigere Nachweisgrenzen erreicht werden.

Proben und Reagenzien

- Stickstoff-Kalibrierlösungen im Konzentrationsbereich 0,1 mg/l bis 10 mg/l, hergestellt aus Rinderserumalbumin (BSA) (Sigma Art.Nr. A-7906, Albumin, Bovine mit N-Gehalt von 15,60 % und einem Reinheitsgrad von 98 %)
- BSA-Referenzlösungen der Fa. Reagecon für den Systemtest, Konzentrationen 1 mg/l und 10 mg/l N
- Kontrollstandardlösungen aus BSA, Konzentrationen 0,5 mg/l und 10 mg/l
- 2 Proben mit stickstofforganischen Verbindungen aus der Reinigungsvalidierung (A, B)

Probenvorbereitung

Sämtliche Proben und Standards wurden bis zu ihrer Messung bei ca. 4 °C im Kühlschrank aufbewahrt. Nach entsprechender Erwärmung auf Raumtemperatur wurden die Proben in 40 ml-Probengläschen abgefüllt, mit Aluminiumfolie abgedeckt und auf dem Tablett des Probengebers platziert.
Sämtliche Kalibrier- und Kontrollstandardlösungen wurden aus ihren entsprechenden Stammlösungen am Messtag frisch hergestellt.

Kalibrierung

Für beide Analysengeräte wurde jeweils eine Mehrpunktkalibrierung im Konzentrationsbereich von 0,1 bis 10 mg/l N durchgeführt. Hierfür wurden, um eine möglichst matrixnahe Kalibrierung zu gewährleisten, BSA-Kalibrierlösungen verwendet. Die Lösungen wurden aus einer BSA-Stammlösung mit 100 mg/l hergestellt. Für die Stammlösung wurden 64,1 mg BSA in 100 ml Reinstwasser aufgelöst. Auch eine Kalibrierung mit einem TN-Mischstandard (gleiche Teile N aus KNO_3 und $(NH_4)_2SO_4$) wäre an dieser Stelle möglich.

Die Auswertung der Kalibrierkurven erfolgte mittels linearer Regression. Der Kalibrierbereich wurde in zwei Abschnitte aufgeteilt, um eine höchstmögliche Genauigkeit an jedem Kalibrierpunkt zu gewährleisten.

Die Kalibrierparameter am Beispiel des multi N/C 3300 sind in Tabelle 1 aufgelistet und die Kalibrierkurve ist in Abbildung 1 dargestellt.

Tabelle 1: Kalibrierparameter

Bereich	k0	k1	R^2	Nachweisgrenze [mg/l]	Bestimmungsgrenze [mg/l]
1	-0,64	960,46	0,99992	0,02	0,07
2	-105,07	890,02	0,99965	0,10	0,37

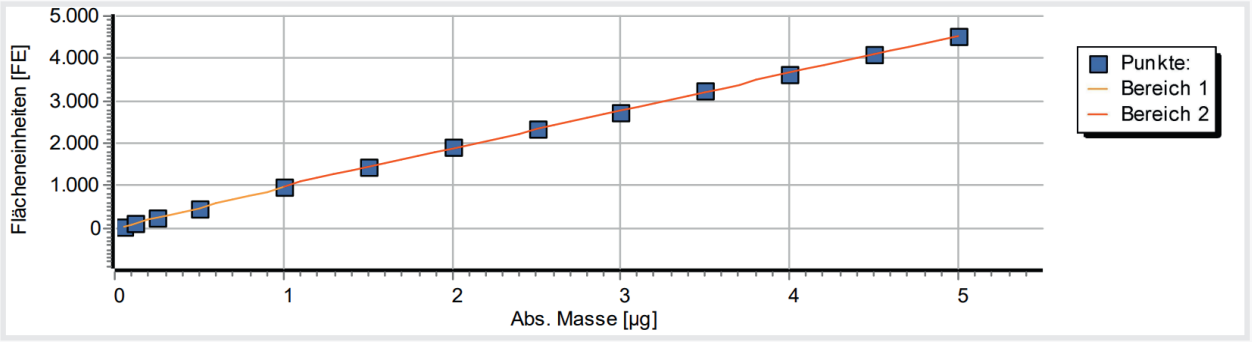

Abbildung 1: Kalibrierkurve mit zwei Kalibrierbereichen im Bereich von 0,1–0,5 mg/l und 0,5–10 mg/l TN

Geräte- und Methodenparameter

Die Geräte- und Methodenparameter sind für beide Messsysteme in Tabelle 2 aufgelistet.

Tabelle 2: Geräte- und Methodeneinstellungen für die Standard- und Probemessungen

Parameter	multi N/C 3300	multi N/C 3300 HS
Verfahren	TN	
Aufschlussmethode	Hochtemperaturverbrennung mit Platin-Katalysator	
Aufschlusstemperatur	750 °C	
Trägergas	synthetische Luft	
Anzahl der Wiederholmessungen pro Gefäß	min. 3, max. 4	
Autosampler, Tablett und Gefäßgrößen	AS vario, Tablett mit 72 Positionen, 40 ml Probengefäße	
Anzahl der Spülzyklen mit Probe vor der 1. Injektion	3	
Injektionsvolumen	500 µl	1000 µl

Ergebnisse und Diskussion

Eine definierte Messsequenz wurde parallel auf beiden Messgeräten abgearbeitet. Hierzu wurden die Proben, verschiedene Kontrollstandards und Reinstwasserproben im Wechsel gemessen.
Die Messserie bestand aus jeweils 29 Probegefäßen, entweder mit Proben oder mit Standards befüllt. Aus jedem Vial erfolgte mindestens eine Dreifachinjektion.
Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 zusammengefasst. Die Messreihenfolge entspricht nicht der Darstellung in der Tabelle, sondern stellt eine Zusammenfassung der über das Probenrack verteilt gemessenen Kontrollstandards und Proben dar. In der Messsequenz wurden zuerst die Kontrollstandards gefolgt von den Proben gemessen. Durch eine Reinstwasserbestimmung im Anschluss wurde auf eine mögliche Verschleppung überprüft. Zuletzt wurden jeweils die Standards für den Systemtest analysiert.

Tabelle 3: Ergebnisse TN-Bestimmung

Probenbezeichnung	Soll-Konzentration TN [mg/l]	Anzahl der Vials á 3 bis 4 Injektionen	gemessene Konzentration Mittelwert TN [mg/l]	RSD [%]	Wiederfindung [%]
Probe A	-	5	2,97	0,46	-
Probe B	-	5	0,57	1,40	-
Kontrollstandard BSA, Sigma-Aldrich	0,5	5	0,48	0,83	95,7
Kontrollstandard BSA, Sigma-Aldrich	10,0	5	10,32	0,49	103,2
Systemtest BSA, Reagecon	1,0	3	0,98	2,28	97,8
Systemtest BSA, Reagecon	10,0	3	10,37	0,39	103,7
Reinstwasser	-	5	<NWG	-	-

In den nachfolgen Abbildungen 2 bis 5 sind typische Stickstoffmesskurven anhand ausgewählter Beispiele dargestellt.

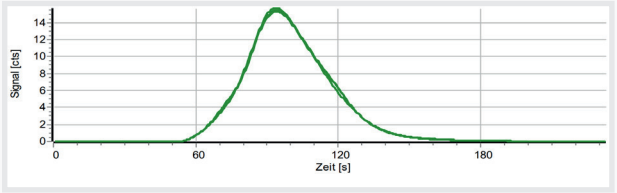

Abbildung 2: TN-Messkurve Probe A

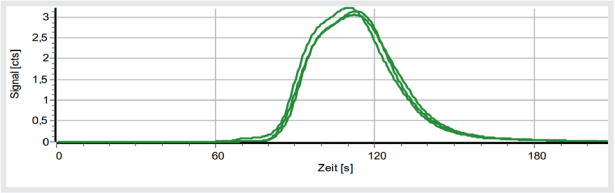

Abbildung 3: TN-Messkurve Probe B

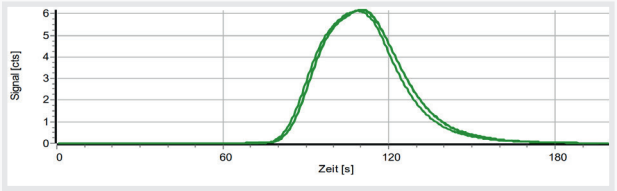

Abbildung 4: TN-Messkurve Systemtest 1 mg/l

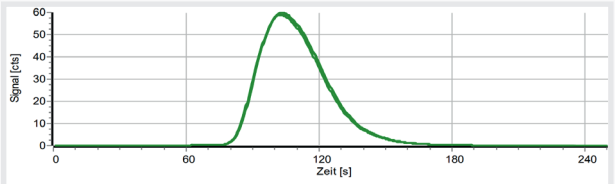

Abbildung 5: TN-Messkurve Kontrollstandard 10 mg/l

Durch die Untersuchung der Reinstwasserproben konnte an beiden Messgeräten gezeigt werden, dass die Proben zu keiner Verschleppung von TN-Verbindungen führen. Betrachtet man insbesondere die Ergebnisse für die BSA-Lösungen von Reagecon mit den Stickstoffkonzentrationen 1 mg/l und 10 mg/l, die im Rahmen des Systemtests gemessen wurden, wird deutlich, dass beide Kalibrierbereiche gültig sind. Die Messwerte zeigen zum einen eine Abweichung kleiner ± 5 % zum theoretischen Wert. Die Wiederfindung liegt bei 98 % bzw. 104 %. Zum anderen belegt die hervorragende Reproduzierbarkeit der Stickstoffmesswerte der Systemtestlösungen die Stabilität des Analysensystems. Es wurden relative Standardabweichungen von 2,3 % bzw. 0,4 % erzielt. Diese wurden aus mindestens 9 Probeinjektionen (Einzelmesswerte) eines Standards errechnet, wobei die Standards über die gesamte Messsequenz verteilt waren.

Des Weiteren konnten sehr gut reproduzierbare Probenergebnisse erzielt werden. Die Proben waren dabei ebenso wie die Systemtestlösungen in Blöcken über die gesamte Messserie verteilt und sollten u.a. auch dazu dienen, das Verbrennungsrohr einer gewissen Matrixlast auszusetzen. Zur Kontrolle der Kalibrierstabilität wurden in der Messreihe stetig Kontrollstandards aus BSA mit analysiert. Auch hier belegen die Wiederfindungsraten von 97 % bzw. 103 % die Zuverlässigkeit und Stabilität des Analysators bzw. der Kalibrierung.
Abschließend kann festgestellt werden, dass aus den mit zwei unterschiedlichen Geräten erzeugten Messdaten keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Qualität der Messwerte ableitbar sind. Beide Messgeräte erfüllen uneingeschränkt die Anforderungen nach EP 2.5.33, Methode 7B; USP <1057>, Methode 7.2 und JP XVIII <G3-12-172>, Methode 7B für die Stickstoffbestimmung.

Zusammenfassung

Die Systeme der multi N/C x300 Serie zeichnen sich durch hervorragende Leistungskenndaten bei der Bestimmung von Stickstoffverbindungen zum Zweck der Reinigungsvalidierung aus (EP 2.5.33, Methode 7B; USP <1057>, Methode 7.2; JP XVIII <G3-12-172>, Methode 7B). Hierfür können zwei gleichwertige Messgeräte eingesetzt werden, der multi N/C 3300 und der multi N/C 3300 HS. Beide Geräte erreichen niedrige Nachweisgrenzen (<0,05 mg/l) und liefern sowohl für die Proben als auch für die Kontrollstandards übereinstimmende Messergebnisse.
Eine intuitive Bedienung der Geräte mittels einer modernen Software ist selbstverständlich.
Zusätzlich zur TN-Reinigungsvalidierung können mit den beiden TOC/TN-Analysatoren der multi N/C x300 Serie auch Messungen zur Reinstwasser-Überwachung auf die organische Kohlenstoffbelastung (TOC) oder für die TOC-Reinigungsvalidierung nach EP 2.2.44., USP <643> und JP 2.59 durchgeführt werden.

Abbildung 6: multi N/C 3300 mit AS vario

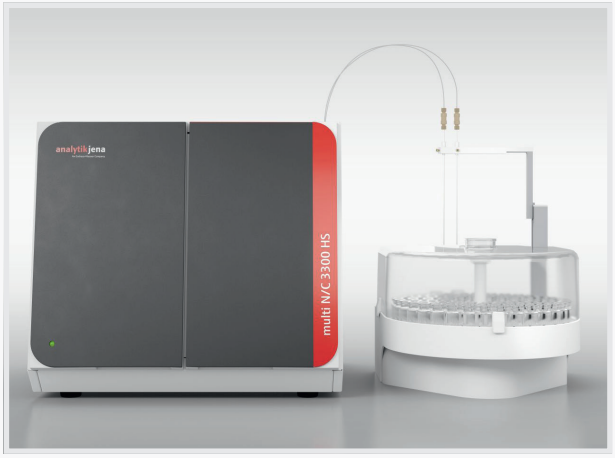

Abbildung 7: multi N/C 3300 HS mit AS vario

Empfohlene Gerätekonfiguration

Tabelle 4: Übersicht benötigter Geräte, Zubehöre und Verbrauchsmaterialien

Artikel	Artikelnummer	Beschreibung
multi N/C 3300 CLD	450-500.502	TOC/TN_b-Analysator mit Fließinjektions-Technik und Chemolumineszenzdetektor für die N-Bestimmung
multi N/C 3300 HS	450-500.600	TOC/TN_b-Analysator mit Fließinjektions-Technik und aufrüstbaren Chemolumineszenzdetektor für die N-Bestimmung
CLD-300	450-500.650	Aufrüstbarer Chemolumineszenzdetektor für die N-Bestimmung
AS vario	450-900.140	Probengeber für multi N/C x300
Probentablett 72 Positionen	450-900.141	Zubehör für AS vario

Referenzen

[1] EP 2.5.33 Total Protein, Method 7, Procedure B
[2] USP <1057> BIOTECHNOLOGY-DERIVED ARTICLES—TOTAL PROTEIN ASSAY, Method 7, Procedure 2
[3] JP XVIII <G3-12-172> Total Protein Assay, Method 7, Procedure B

Dieses Dokument ist zum Zeitpunkt der Veröffentlichung wahr und korrekt; die darin enthaltenen Informationen können sich ändern. Dieses Dokument kann durch andere Dokumente ersetzt werden, einschließlich technischer Änderungen und Korrekturen.
Markenrechtlicher Hinweis: Die in der Applikationsschrift genannten Markennamen von Drittprodukten sind in der Regel eingetragene Marken der jeweiligen Unternehmen.

Unternehmenshauptsitz
Analytik Jena GmbH+Co. KG
Konrad-Zuse-Straße 1
07745 Jena · Deutschland

Tel. +49 3641 77 70
Fax +49 3641 77 9279

info@analytik-jena.com
www.analytik-jena.com

Version 1.0 · Autor: TK
de · 03/2025
© Analytik Jena GmbH+Co. KG | Pictures ©: AdobeStock/ Ivan Traimak