



Détermination rapide et fiable des protéines totales dans les produits pharmaceutiques avec un analyseur TOC/TN_b

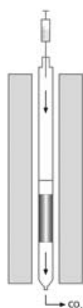
Auteur : Bernd Bletzinger, Analytik Jena AG - www.analytik-jena.com - info@analytik-jena.com
Contact France : SERLABO Technologies - Tél.: +334 9023 7720 - info@serlabo.fr - www.serlabo.eu

Introduction

Dans l'industrie pharmaceutique, la teneur en protéines des milieux de culture (par ex. d'un vaccin) doit être souvent déterminée dans le cadre des contrôles de qualité des produits non manufacturés, intermédiaires et manufacturés. Il existe aujourd'hui un grand nombre de méthodes à cet effet. La Pharmacopée européenne à elle seule contient la description de sept méthodes différentes (Ph. Eur. 2.5.33) qui se basent sur des principes de réaction et de détection différents. La plupart de ces méthodes réalisent les tests de quantification des protéines selon Lowry, Bradford, BCA et Biuret, qui se basent sur des réactions de coloration diverses avec les restes d'acides aminés définis, avec ensuite une mesure par absorption à des longueurs d'onde définies dans le domaine spectral visible. La méthode d'absorption UV directe, une méthode d'analyse par fluorescence, ainsi que deux méthodes se basant sur la mesure de la teneur en azote sont décrites dans ce qui suit.

Il convient de faire ici une petite parenthèse sur la chimie protéinique. Les protéines sont des macromolécules constituées d'acides aminés et font partie en tant que telles des éléments essentiels de toute cellule animale ou végétale. Les protéines sont formées de divers acides aminés. Les chaînes d'une longueur inférieure à 100 acides aminés peuvent cependant être désignées comme peptide. Nombre de protéines, comme par ex. les virus ou les anticorps (immunoglobulines), présentent des structures protéiques complexes et sont constituées de plusieurs protéines simples reliées entre elles par des liaisons d'hydrogène, chlorhydriques et de bisulfure.

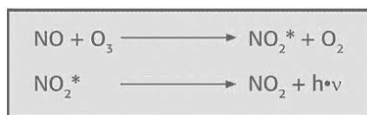
Ces liaisons ont toutefois en commun qu'elles contiennent des atomes d'azote en grand nombre et peuvent de ce fait également être facilement déterminées de manière analytique par une somme grâce à une méthode de quantification de l'azote. Il s'agit d'une attaque des acides sulfuriques selon la méthode Kjeldahl ou, d'une manière quelque peu plus élégante, d'une combustion catalytique à haute température dans un courant d'oxygène. Celle-ci est décrite dans la norme DIN EN 12260 et plus en détails dans le cadre de cet article.



La procédure de mesure
Un appareil de mesure à injection directe d'une aliquote d'échantillon est nécessaire pour déterminer la teneur en azote des solutions ou des suspensions à base de protéines du fait des quantités d'échantillons disponibles souvent extrêmement faibles. À des volumes d'injection de 50 à 100 µl, quelques 100 µl d'échantillon suffisent déjà à réaliser une détermination multiple.

Selon la norme DIN EN 12260 – qui existe depuis environ 15 ans – sur la détermination de l'azote total lié (TN_b) dans les échantillons aqueux, des températures de combustion supérieures à 700°C sont nécessaires pour attaquer les échantillons en présence d'un catalyseur. Lors de cette attaque thermocatalytique de l'échantillon, le monoxyde d'azote résulte en grande partie des liaisons d'azote de l'échantillon et, en plus petite partie, des liaisons d'azote plus oxydées. Le NO généré est acheminé au détecteur de luminescence chimique (DLC) par

le débit du gaz porteur associé. Les molécules de NO réagissent ensuite avec l'ozone généré dans le DLC grâce auquel des molécules de NO₂ excitées énergétiquement se forment. Selon le principe de réaction illustré, ces molécules de NO₂ excitées, et soumises à un rayonnement par luminescence détecté par un photomultiplicateur, retournent à l'état fondamental du NO₂.



Cette méthode convient à déterminer toute liaison à base d'azote, pas toutefois l'azote moléculaire (N₂). Ceci signifie cependant que la présence de liaisons d'azote inorganiques, ainsi que de liaisons d'azote organiques non protéinogènes peut perturber la détermination de la teneur en protéines en cas d'utilisation de cette méthode. Cette méthode de quantification de l'azote total séduit toutefois par sa disparition lors de toute préparation d'échantillon, ainsi que ses temps de mesure extrêmement courts de seulement 3-5 minutes par injection d'échantillon.

Mesure du TN_b dans les vaccins avec le multi N/C® 2100 S

Avec le multi N/C® 2100 S de Analytik Jena AG, il est possible de déterminer les teneurs en protéines de tout type de matrice liquide de manière efficace et automatisée. D'autres paramètres comme TOC, TIC ou TC peuvent également être mesurés.

Le multi N/C® 2100 S est un analyseur TOC/TN_b fonctionnant selon le principe d'injection directe de l'échantillon liquide dans un tube de combustion en verre de quartz rempli par le catalyseur.

L'utilisation de différentes seringues d'injection pour des volumes de 100, 250 ou 500 µl avec différents racks de passeurs automatiques pour des flacons de 2 ml ou également de 8 ml permet d'adapter la distribution des échantillons de manière optimale aux exigences d'application sur le multi N/C® 2100S. Les suspensions à particules peuvent être mesurées de manière représentative avec des canules d'un diamètre intérieur large, ainsi que l'homogénéisation standard des échantillons, avec un agitateur magnétique sur le passeur. Le principe d'injection sans septum permet d'atteindre des résultats de mesure hautement reproductibles sur l'appareil d'analyse, indépendamment du diamètre des canules de seringues utilisées. La température de combustion habituelle est de 800°C en présence de catalyseurs en plastique et lors de l'utilisation d'air synthétique comme gaz porteur. L'analyseur offre une sensibilité de mesure, avec une plage de mesure de 0,1 à 200 µg/ml de TN, comparable au test ultra-sensible de quantification des protéines selon la méthode BCA (0,2 – 50 µg/ml de protéines).



Lors de cette procédure de mesure pour déterminer la teneur en protéines, l'étalonnage constitue le point essentiel de cette procédure, ainsi que la conversion des résultats obtenus sous forme de teneur en azote total dans la teneur en protéines totales de l'échantillon. En général, il est toujours recommandé d'étalonner une procédure la plus près possible de la matrice i.e. un étalon de protéines doit être également utilisé pour l'étalonnage lors d'une détermination de teneur en TN dans des solutions à base de protéines. Ceci diffère de la procédure habituelle conforme à la norme qui décrit un étalonnage avec un étalon de mélange de gaz d'ammonium / nitrate.

Pour réaliser les mesures de la teneur en azote dans les vaccins décrites

SIMPLIFIEZ VOUS LA VIE AVEC LES GENERATEURS DE GAZ F-DBS !

Plein de nouveautés vous attendent !

- Sécurité accrue
- Simple d'utilisation
- Gaz de haute pureté
- Maintenance réduite

- Nouveau Générateur H2 : CPG, gaz collision ICP-MS
- Nouveau Générateur Combiné H2/AIR zéro : CPG-FID
- Générateurs N2 : LCMS, ICP, CPG, COT, ELSD, Corona
- Nouveaux Générateur Air Zéro et Ultra Air Zéro : CPG, COT
- Nouveaux Générateurs d'AIR TOC : COT, Nez Electronique
- Nouveaux Sécheur d'air sans CO2 et purificateur d'air : FT-IR, RMN, AA

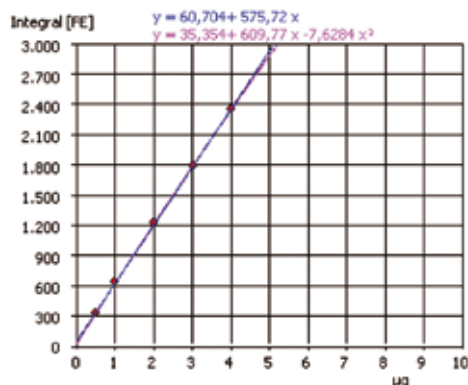
Contact commercial : fabienne.palge@f-dbs.com Site Internet : www.f-dbs.com



ici, de l'albumine sérique bovine (« Bovine Serum Albumin », BSA) (Sigma n° art. A-7906) a été utilisée avec une teneur spécifiée en azote de 15,87 % et d'une pureté supérieure à 98 %. Un facteur de conversion d'azote a été fixé à 6,30 pour cet étalon de BSA.

Le facteur de conversion le plus souvent trouvé dans les publications pour convertir la concentration de N en concentration est 6,25.

$$\text{Teneur en protéines [mg/ml]} = \text{facteur azote (6,25)} * \text{teneur en TN [mg/ml]}$$



Rest-Standardabwg.:	14,381FE	Linearität:	OK
Verf.-Standardabwg.:	124,90µg/l	Varianzhomogenität:	OK
Verf.-Variationskoeff.:	1,1895%	Nachweisgrenze:	304,16µg/l
Best.-maß:	0,99977	Erfassungsgrenze:	608,32µg/l
Korrel.-koeff.:	0,99989	Bestimmungsgrenze:	1,18mg/l

Étalonnage plusieurs points avec un étalon de BSA de 2,5 à 20 mg/l de TN_b

Dans la série de mesure réalisée, une solution aqueuse de sérum hyperimmun 1-3, canine 37 avec une concentration donnée d'IgG de 8,3 mg/ml a été utilisée comme étalon de contrôle et en outre comme matériel de référence en plus des solutions de BSA. Ceci correspond après conversion, à une teneur en N de 1,328 mg/ml, en appliquant le facteur N pour protéines de 6,25. Une dilution adaptée de cette solution mère a été mesurée comme étalon de contrôle indépendant.

Les résultats des mesures de plusieurs vaccins analysés sont repris dans le tableau suivant. Ces résultats ont été obtenus suite à 5 injections de 200 µl d'échantillon non dilué.

En résumé

Lors de l'analyse de la teneur en protéines, l'utilisation d'un analyseur TN_b conformément à la norme DIN EN 12260 – par ex. le multi N/C® 2100S de Analytik Jena AG – permet de remplacer les procédures de contrôle de la teneur en protéines établies, souvent complexes, peu reproductibles et sujettes aux perturbations par une méthode d'analyse instrumentale rapide, fiable et automatisable. Cette méthode est caractérisée par une grande plage de mesure linéaire, une haute sensibilité et sélectivité, ainsi que la suppression des étapes inutiles de préparation des échantillons. L'influence du facteur humain sur les résultats de l'analyse est ici nettement minimisée.

Cette méthode est décrite dans la Pharmacopée européenne et peut être relativement simplement validée. Les facteurs perturbateurs, ainsi que les sels azotés inorganiques ou les liaisons d'azote organiques non protéinogènes – qui sont également identifiées comme perturbatrices lors de nombreux tests de quantification des protéines – peuvent être également ici exclus si nécessaire grâce à une précipitation des protéines et une séparation. En résumé, la détermination de la teneur en azote total avec un analyseur TOC/TN_b représente un gros potentiel pour simplifier les tâches et augmenter la qualité du contrôle de la qualité de différents produits pharmaceutiques.

Et vous ? À quand l'utilisation de cette procédure de mesure moderne d'analyse instrumentale dans votre laboratoire ?

Désignation de l'échantillon	Concentration en TN [µg/ml]	RSD [%]	Teneur en protéines calculée avec le facteur N 6,25 [µg/ml]
Étalon de BSA (10 mg/l)	10,23	0,86	63,9
Vaccin 1	9,32	1,23	58,3
Vaccin 2	6,83	1,81	42,7
Vaccin 3	4,48	1,50	28,0
Sérum hyperimmun 1-3 (5 mg/l)	5,03	1,39	31,4

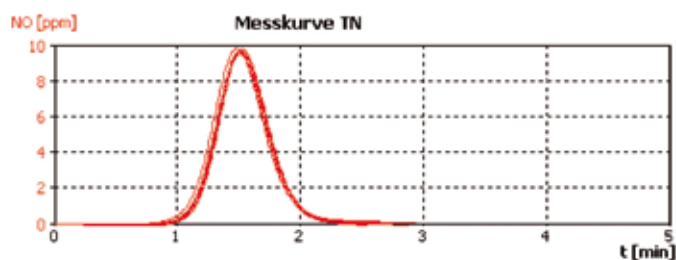
AnalysenReport

Proben-ID:	3	Methode:	TN_Protein
Analysenzeitpunkt:	16.02.2010 15:28:09 +0100	Probenvolumen:	200,00µl
Benutzer:	Admin	Verdünnung:	1 in 1
Probenotyp:	Probe	Bestimmungen:	5-6
Status:	Messung erfolgreich abgeschlossen	Ofentemperatur:	800°C

	c	I	SD	VK	k0	k1	k2	TF
TN	4,48mg/l	577,6FE	67,43µg/l	1,50%	-0,10652	1,737E-3	-	1

Einzelresultate der Parallelbestimmungen:

Best.	1	2	3	4	5	6
TN c [mg/l]	4,47	4,70	4,44	4,59	4,48	4,42
TN I [FE]	576,3	602,3	572,4	590,5	577,8	570,9



Courbe de mesure TN d'un vaccin

Refroidisseurs à circulation

Pour des Applications de refroidissement en Laboratoire & Industrie!



Refroidisseurs d'une capacité de refroidissement jusqu'à 50 kW. Technologie modulaire • Grande efficacité • Petites dimensions

Les refroidisseurs de la gamme Unichiller® sont des solutions idéales pour un environnement agréable et un refroidissement économique en laboratoire et dans l'industrie. Au choix plus de 50 modèles refroidis à l'air ou à l'eau d'une capacité de refroidissement de 0.3 à 50 kW.

- Gamme de températures de -20 °C à +40 °C
- Grandes capacités de refroidissement jusqu'à 50 kW
- Pompes de circulation puissantes 220 l/min
- Gestion d'énergie moderne
- Peu encombrant grâce à une conception en hauteur
- Fabrication robuste en inox
- Fonctionnement fiable avec contrôle de sécurité
- Contrôle précis de la température
- Technologie modulaire avec des fonctions adaptables (selon le modèle, connexion sonde Pt100, interface RS232, 5-points d'étalonnage, élément chauffant en option, extension de la gamme de température jusqu'à +100 °C, etc.)

Pour plus d'information, contactez nous au +49 781 9603-0 ou visitez www.huber-online.com.

huber

high precision thermoregulation