




Temizlik Validasyonu ve İlaç Üretiminde Kalıntı Düzeylerinin Toksikolojik Olarak Değerlendirilmesi

Cleaning Validation and Toxicological Evaluation of Residue Levels in Pharmaceutical Manufacturing

 Anıl YİRÜN,^{a,b}
 Pınar ERKEKOĞLU,^a
 Belma KOÇER GÜMÜŞEL^c

^aFarmasötik Toksikoloji AD,
Hacettepe Üniversitesi
Eczacılık Fakültesi,
Ankara, TÜRKİYE

^bFarmasötik Toksikoloji AD,
Çukurova Üniversitesi
Eczacılık Fakültesi,
Adana, TÜRKİYE

^cFarmasötik Toksikoloji AD,
Lokman Hekim Üniversitesi
Eczacılık Fakültesi,
Ankara, TÜRKİYE

Received: 24.04.2018

Accepted: 07.06.2018

Available online: 28.11.2018

Correspondence:

Belma KOÇER GÜMÜŞEL
Lokman Hekim Üniversitesi
Eczacılık Fakültesi,
Farmasötik Toksikoloji AD, Ankara,
TÜRKİYE/TURKEY
belmagumusel@yahoo.com

ÖZET Validasyon, bir ürünün güvenlik ve saflığını garanti etmekte, sürecin kalitesini iç kontrol ve uygunluk bakış açısından güvence altına almaktadır. Temizlik son yıllarda ilaç endüstrisinde giderek önem kazanan bir konu hâline gelmiştir. Temizlik validasyonu ilaç üretiminde riskin azaltılması, kalite güvencesinin sağlanması ve temizlik prosedürlerinin tutarlılığının kanıtlanması için yapılması gereken önemli bir çalışmadır. Validasyon çalışmasının en önemli aşaması üretilen ürün grupları ile ilgili risk analizlerinin yapılması ve temizlik prosedürü için uygun kalıntı limitlerinin belirlenmesidir. Kabul edilebilir kalıntı düzeylerini belirlemek için farklı yaklaşımlar mevcuttur. İlaç üretiminde risk odaklı bir yaklaşım benimsenmeye başlamıştır ve kabul edilebilir kalıntı düzeylerinin toksikolojik verilere dayanarak hesaplanması tercih edilen bir durumdur. Temizlik validasyon çalışmasının yapılması başlangıçta uzun süren ve yorucu bir işlem gibi görünse de etkili bir temizleme işlemi daha fazla verimlilik ve daha düşük maliyetler anlamına gelmektedir. Ürün kalitesinin riskinin değerlendirilmesi, bilimsel bilgiye dayanılarak sonuçta hastanın korunmasıyla bağlantılı olmalıdır. Kabul limitlerinin belirlenmesi düzenleyici bir standarttır, ancak hastanın sağlığını asıl göz önüne alan kalıntıların gerçekten azaltılmasıdır. Bu hususta temizlik validasyonu çalışmaları yol gösterici olmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Temizlik validasyonu; ilaç üretimi; çapraz kontaminasyon; kalıntı limitleri; temizlik ajanları; risk değerlendirmesi

ABSTRACT Validation ensures the safety, identity, strength, and purity of the product with enough confidence that internal control is established properly. Cleaning has become an increasingly important topic in the pharmaceutical industry in recent years. Cleaning validation is an important work that must be done to reduce risk of drug production, to ensure quality assurance, and to demonstrate the consistency of cleaning procedures. The most important step of the validation is to make risk assessments for the product groups being produced and to determine the appropriate residue limits for the cleaning procedure. There are different approaches to determining acceptable levels of residue. A risk-based approach to drug production has begun to be adopted and it is preferable to calculate acceptable levels of residues based on toxicological data. Although the cleaning validation operation may seem like a long and tedious operation at the beginning, an effective cleaning operation means more efficiency and lower costs. The evaluation of the risk of product quality should be based on scientific knowledge. The setting of acceptance limits is a regulatory standard, but it is really reducing residues that take into account the health of the patient. In this respect, cleaning validation is guiding the studies.

Keywords: Cleaning validation; pharmaceutical manufacturing; cross-contamination; residue limits; cleaning agents; risk assessment

Validasyon, bir ürünün güvenlik ve saflığını garanti etmekte, sürecin kalitesini iç kontrol ve uygunluk bakış açısından güvence altına almaktadır.^{1,2} Temizlik validasyonunun amacı; ürün kalıntılarının, bozunma (degradasyon) ürünlerinin, koruyucuların ve/veya temizlik ajanlarının ekipmandan uzaklaştırılması ve potansiyel mikrobiyal kontami-

nasyonun önlenmesi açısından temizlik prosedürünün etkinliğinin doğrulanmasıdır.^{1,3,4} Son yıllarda temizlik, ilaç endüstrisinde giderek önem kazanan bir konu haline gelmiştir.⁵ Çapraz kontaminasyonu önleme yönünde genel kurallar ve yönergeler yayımlanmış ve giderek artan şekilde riske dayalı bir yaklaşım benimsenmiştir.⁶⁻⁹ Şu andaki iyi üretim uygulamaları [iyi üretim uygulamaları “good manufacturing practices (cGMP)"] yönergeleri farmasötik ürünlerin üretimi, depolanması, taşınması ve dağıtımı ile ilgili her faaliyet için temizlik prosedürlerinin uygulanması gerektiğini açıkça göstermektedir.^{2,10} Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi, firmaların her imalat sistemi ve cihaz üzerinde yapılacak çalışmalar için önceden yazılı onaylama protokolleri hazırlamalarını beklemektedir.¹¹

İlaç üretimi sırasında tozlar, gazlar, buharlar, etken maddeler, biyolojik materyaller, organizmalar ve diğer yardımcı maddeler ekipman üzerinde kalıntı olarak kontaminasyona neden olabilmektedir. Temizlik kontaminasyon riskini azaltan bir süreçtir.⁸ Çoklu ürün üretimi yapan kurumlarda temizlik validasyonu yapılması büyük önem taşımaktadır.¹⁰ Çoğu ekipman farklı ürünler üretmek için kullanıldığından, temizleme prosedürü ekipmandaki kalıntıları kabul edilebilir düzeye indirebilmelidir.³ Üreticiler validasyon çalışmaları sırasında bir ekipman için rutin olarak uygulanan temizleme prosedürünün potansiyel kirlilikleri kabul edilebilir seviyeye indirdiğini göstermelidir.^{2,4,6,9} Etkisiz yapılan temizlik uygulaması önceki ürün, temizlik ajanları ve dışarıdan gelen diğer maddelerle kontamine olmuş hatalı ürün üretimine yol açabilmektedir.⁵

Temizlik validasyon çalışmasının yapılması başlangıçta uzun süren ve yorucu bir işlem gibi görünse de etkili bir temizleme işlemi daha fazla verimlilik ve daha düşük maliyetler anlamına gelmektedir.¹² Böyle bir doğrulama çalışması yapılmasının en önemli yararı, ekipman içerisinde üretilen daha sonraki ürün grubunun güvenlik, etkinlik ve/veya kalitesinden ödün verebilecek olan, önceden şüphelenilmemiş potansiyel problemlerin saptanması ve düzeltilmesidir.^{3,13}

Temizlik validasyon çalışmasının aşamaları; kalıntıların belirlenmesi, ekipmanların karakteri-

zasyonu, temizlik ajanının seçilmesi, kabul edilebilir kalıntı limitlerinin belirlenmesi, yürütülecek temizlik prosedürünün belirlenmesi, analizde kullanılacak örnekleme metodu ve analitik yöntemlerin belirlenmesi ve tüm bu aşamaları içeren yazılı validasyon raporunun hazırlanmasını içermektedir (Şekil 1).^{2,3} İleriki bölümlerde bu basamaklar başlıklar hâlinde incelenmiştir.

KALINTI TÜRLERİNİN BELİRLENMESİ

Validasyon çalışması için uygun kalıntı limitlerini uygulamaya koymanın ilk adımı, hangi kalıntıların ölçüleceğinin belirlenmesidir. Bu bağlamda ürünün uygulama yolu, ürün tipi, toksikolojik özellikler be-



ŞEKİL 1: Temizlik validasyonu çalışmasının aşamaları.

lirlemeye yardımcı unsurlardır. Bu değerlendirmeyi yaparken risk odaklı bir yaklaşım benimsenmelidir.¹⁴ Farklı bir temizleme yöntemiyle çıkartılan önemli toksikolojik/farmakolojik aktiviteye sahip birden fazla potansiyel kirletici varsa bunlar dikkate alınmalıdır.⁵ Validasyon çalışmaları sırasında dikkate alınması gereken birkaç kalıntı türü mevcuttur. Bunlar; etken madde, başlangıç maddeleri ve prekürsörleri, ekspiyanlar, tamponlar, hücresel artıklar, temizlik ajanları, endotoksinler, viral partiküller, mikroorganizmalar vb. dir.^{3,8} Birbiriyle benzer ürünler ve işlemler için tek tek yöntem validasyonu yapmak gerekli olmayabilmektedir. Benzer ürünler aynı ekipman içinde üretildiğinde temsili bir aralık seçilerek ürüne göre gruplama yapılmasına izin verilebilmektedir, ancak farklı tedarikçilerden temin edilen ham maddeler farklı fiziksel özelliklere ve safsızlıklara sahip olabileceğinden, bu farklılıklar dikkate alınmalıdır.^{7,10}

Farmasötik ürünlerin üretim süreci için gerekli temizlik seviyesi ekipmanın kullanımı, imalat aşamaları ve potansiyel kirleticilerin özelliklerine bağlıdır. Potansiyel kirleticilerin belirlenmesi temizlik seviyesine karar verilmesi açısından da önem taşımaktadır. Aynı ürünün farklı partileri (batch) arasında birinci seviye temizlik kabul edilebilirken; farklı ürün geçişlerinde veya aynı ürün üretilecek olsa bile imalata belirli bir süre ara verileceği durumlarda ikinci seviye temizlik uygulanması gerekmektedir.^{3,15}

KALINTI LİMİTLERİNİN BELİRLENMESİ

Ürün kalıntıları için rasyonel limitler seçmek için ekipman özellikleri, kirletici türü (çözünürlük, temizleme zorluğu, stabilite, terapötik dozu, toksisitesi, uygulama yolu), aynı ekipman içerisinde üretilen tüm ürünler ve "batch" boyutu dikkate alınmalıdır.¹⁴ Bazı ekspiyanlara kıyasla biyolojik açıdan aktif materyaller için daha sıkı kabul kriterleri gereklidir.^{7,11} Sınırlar pratik, erişilebilir ve bilimsel çalışmalara uygun olarak belirlenmelidir.¹⁶ Kabul edilebilir kalıntı limitlerinin belirlenmesi için farklı yaklaşımlar bulunmaktadır. Bunlar;

a) Görsel temizlik: Resmi temizlik validasyon programlarının geliştirilmesinden önce ekipman temizliğinin belirlenmesinde temel araç görsel

muayene olmuştur. Görsel muayene ile temizliğin doğrulanması yetkin ve eğitilmiş personelin gözlem yapmasını, gözlemin yeterli ışık altında yapılmasını ve ekipmanın bütün yüzeylerinin (alt yüzeyleri dâhil) gözlenmesini içermektedir.¹⁶ Görsel olarak temizliğin doğrulanması temizlik validasyonunun kabul kriterleri açısından şu an için de önemli bir basamaktır.^{9,17} Hiçbir şekilde ekipman üzerinde gözle tayin edilebilir kalıntı olmamalıdır.¹⁴ Bazen proses doz kriterlerini sağlasa da görünürde bir kirlilik mevcut olabilmektedir. Bu durum yine de GMP kriterleri açısından uygunsuz bir durumdur.¹⁸ Genel olarak bu kriter temizliğin doğrulanması için ön şart olarak kullanılmakta ve tek başına yeterli olarak kabul edilmemektedir.⁹ Kirli ekipmanın görsel muayene işleminden geçmesi ve sonuç olarak üretilen ürünün kontamine olması için çeşitli nedenler mümkündür.¹⁶

b) 10 ppm kuralı: Hiçbir madde diğer ürünün içerisinde 10 ppm'den yüksek konsantrasyonda bulunmamalıdır.¹⁴ Genel temizlik limitlerinin kullanılmasının bazı sınırlı yararları mevcuttur, ancak sağlık temelli bir yaklaşım olarak kabul edilmemektedir. Bir ilacın toksikolojik etkisi sadece bir sonraki partideki konsantrasyonuna değil, maddeye özgü doz-yanıt ilişkisine bağlıdır. Bu nedenle yalnızca varsayım üzerine kurulu bir sınırın kullanılması hasta sağlığı açısından risk oluşturabilmektedir. Örneğin; A maddesi oldukça güçlü/toksik bir bileşik ve B ürünü, yüksek bir günlük dozda verilen düşük etkili bir ilaç ise B ürününde 10 ppm konsantrasyonda A maddesi bulunması risk oluşturabilmektedir.¹⁹

c) Terapötik doza göre hesaplama: Sınırların oluşturulmasının bir dayanağı, terapötik dozun belirli bir kısmının bir sonraki dozaj birimine taşınmasını hesaplayan yaklaşımdır. Limitlerin hesaplanmasında terapötik dozu kullanmak maddenin aktif bir bileşen olduğu ve terapötik dozaj verilerinin bilindiği durumlarda uygundur. Bu durumda aşağıdaki denkleme göre hesap yapılabilmektedir.^{5,14}

Eşitlik 1:

$$MACO = \frac{TDxB}{SFxFxMD}$$

MACO: Maksimum izin verilen kalıntı düzeyi (mg)

SF: Güvenlik faktörü,

TD: Temizlenecek maddenin standart günlük dozu,

B: Sonraki ürünün batch (parti) büyüklüğü,

F: Sonraki ürünün maksimum günlük alım miktarı (adet),

MD: Sonraki ürünün dozaj büyüklüğü (tablet ağırlığı gibi).

Terapötik doza göre hesaplama yapmak sağlık temelli koruyucu bir yaklaşım olsa da bazı sınırlamalar bulunmaktadır. Kabul kriterleri verilerin mevcut olması durumunda toksikolojik temellere dayanmalıdır. Aksi durumda karsinojenik, genotoksik, teratojenik ve potansiyel diğer etkiler toksikologlar tarafından değerlendirilmelidir.^{19,20}

d) Günlük alım düzeyi değerine dayanarak hesaplama: Kabul edilebilir günlük alım düzeyi [acceptable daily intake (ADI)] uzun süreli, çoklu doz çalışmalarına dayanarak üretilmekte ve bir maddenin ömür boyu kullanımı için bir emniyet göstergesi sunmayı amaçlamaktadır.²¹ Kabul kriterleri bu verilerin mevcut olması durumunda ADI değerine dayanmalıdır. ADI değerine dayanarak limitlerin belirlenmesi için aşağıdaki eşitlikler kullanılmaktadır.⁶

Eşitlik 2:

$$ADI = \frac{NOEL \times BW}{UF \times MF \times PK}$$

$$MACO = \frac{ADI \times B}{F \times MD}$$

NOEL: Deney hayvanlarında gözlenebilir ters bir etki oluşturmayan maksimum madde miktarıdır (mg/kg/gün),

BW: Vücut ağırlığı,

UF_C: Bileşik belirsizlik faktörü-bireyler arası, cinsiyetler arası farkları kapsar,

MF: Değiştirme faktörü-diğer faktörler tarafından kapsanamayan belirsizlikleri gidermek için kullanılır,

PK: Farmakokinetik düzeltme faktörü,

B: "Batch" büyüklüğü,

F: Sonraki ürünün maksimum günlük alım miktarı (adet),

MD: Sonraki ürünün dozaj büyüklüğü (tablet ağırlığı gibi).

Her ürün için ayrı hesaplama yapmak yerine en kötü durum senaryosu uygulanabilmektedir. Böylece en düşük ADI değerine sahip ürün referans alınarak hesaplama yapılabilmektedir.⁶

e) LD₅₀ değerine göre hesaplama: Tekrarlanan doz (kronik) toksisite verileri mevcut olduğunda kesinlikle akut LD₅₀ değerine tercih edilmelidir.¹⁹ Eğer uzun dönemli çalışmalar mevcut değil ise akut toksisite verilerinden yola çıkarak belirli aşamalarla bu veriyi kronik maruziyete uyarlamak mümkündür.^{6,22}

Eşitlik 3:

$$NOEL = \frac{LD_{50} \times BW}{2000}$$

$$MACO = \frac{NOEL \times B}{SF \times F \times MD}$$

NOEL: Deney hayvanlarında gözlenebilir ters bir etki oluşturmayan maksimum madde miktarıdır (mg/kg/gün).

BW: Vücut ağırlığı,

B: "Batch" büyüklüğü,

SF: Güvenlik faktörü (Tablo 1),

F: Sonraki ürünün maksimum günlük alım miktarı (adet),

MD: Sonraki ürünün dozaj büyüklüğü (tablet ağırlığı gibi).

Eşitlikte kullanılacak güvenlik faktörü değerleri Tablo 1'de görülmektedir.

TABLO 1: Farklı uygulama yollarına sahip ürünler için önerilen güvenlik faktörleri.

Uygulama yolu	Güvenlik faktörü
Topikal	10-100
Oral	100-1000
Parenteral	1000-10000

Akut veriyi kronik toksisiteye uyarlamak konusunda bazı sorunlar yaşanabilmektedir. LD₅₀ sadece bir toksisite son noktasıdır ve etken maddelere maruziyet sonucu meydana gelebilecek birkaç noktadan (genotoksisite, gelişimsel ve üreme sistemi toksisitesi, hipersensitivite, karsinojenite, teratojenite vb.) biridir. Bazı maddeler akut toksisite belirtisi göstermedikleri düşük dozlarda karsinojenik veya teratojenik etkiler gösterebilmektedirler. Toksik etki tanımındaki bu tip farklılıklar dönüştürme faktörlerinde dikkate alınması gereken bir durumdur. Verilerdeki belirsizlik keyfi olarak belirlenecek bir güvenlik faktörünün ciddi sonuçları olabileceğini göstermektedir.^{19,22}

Kabul edilebilir limitler hesaplanırken bazı kombinasyonlar tüm üretim operasyonları için geçerli değildir. Kabul limitleri "batch" büyüklüğü, sonraki ürünün maksimum dozu, toplam ekipman alanı gibi değişkenler ile yakından bağlantılıdır. Bu durumda her süreç kendine özgü limitler olacaktır. Örneğin; aynı ekipmanda üretilen farklı ürünler farklı, farklı ürünlerde üretilen aynı ürünler farklı, farklı ekipmanda üretilen farklı ürünler çok farklı değerlere sahip olacaktır. Aynı ürün aynı ekipmanda üretilse dahi sonrasında gelen ürünün farklı olması bile limitleri değiştirecektir.¹⁸

TEMİZLİK AJANI SEÇİMİ

Temizlik işlemi kontaminasyona neden olan maddelerin kimyasal reaksiyonlar (asit-baz reaksiyonları, misel oluşturma, vs.) sonucu çözünebilir dönüştürülmesi ile dissolüsyonunun kolaylaştırılması işlemi olarak düşünülebilmektedir. Temizlik ajanları ise yüzey kontaminantlarının uzaklaştırılmasını kolaylaştırmayı amaçlayan maddelerdir.²³ Temizlik validasyonunun en önemli adımlarından biri de çıkarılacak kalıntı türü için uygun bir temizleme ajanının seçilmesidir.^{24,25} Temizlik ajanlarının uygun seçimi daha kolay geçerlilik kazanan bir sistem geliştirmede yardımcı olmakta ve bu nedenle temizleme, validasyon çalışmalarını son derece basitleştirmektedir. Ayrıca, temizlik maddeleri ve parametrelerinin geçerliliği onaylandıktan sonra değiştirilmesi zordur. Mevcut opsiyonları erken aşamada anlamak ve değerlendirmek üretim maliyetleri açısından önemlidir.²⁵ Çoğu ürün farklı çö-

zünürlük özelliklerine sahip bileşenlere sahip olduğundan, temizleme maddelerinin uygun bir kombinasyonu daha etkili olacaktır.¹⁴

Deterjanlar imalat sürecinin bir parçası değildirler ve sadece temizleme işlemi sırasında temizliği kolaylaştırmak amacıyla sürece eklenirler. Bu nedenle kolay bir şekilde uzaklaştırılabilirler. Aksi takdirde farklı deterjanlar seçilmelidir.^{14,24,26}

Temizlik için bir deterjan kullanılıyorsa artıkları saptamaya çalışırken ortaya çıkabilecek zorluklar iyice belirlenmeli ve dikkate alınmalıdır.²⁵ Temizlik ajanı etkili bir şekilde ilaç-ürün kalıntısını ortadan kaldırmaktadır ancak kendi kalıntısını geride bırakırsa bir tür kirlilik diğeriyle değiştirilmiş olmakta ve ekipman etkin bir şekilde temizlenmemektedir.²⁴ Deterjan kullanımıyla ilgili yaygın bir sorun onun bileşimidir. Birçok üretici spesifik bir kompozisyon sağlamamaktadır ve bu durum artık madde değerlendirilmesini zorlaştırmaktadır.²⁵ Deterjan bileşimi üreticinin bilgisine sunulmalıdır ve tedarikçinin deterjanın formülasyonundaki kritik değişiklikleri bildirdiğinden emin olunmalıdır.¹⁴

Deterjanların kalıntılarının giderilmesi için temizlik prosedürlerinin etkinliği değerlendirilmelidir. İdeal olarak çok düşük miktardaki kalıntılar bile saptanabilmelidir.¹⁴ Temizlenmiş yüzeyde kalan temizlik maddesi kalıntısının miktarını belirlemek için bir analitik strateji geliştirilmelidir. Analiz metodu ile belirlenen temizlik ürününün tek bir bileşeninin mi, yoksa tüm ürünün mü analiz edileceği belirlenmelidir. Bu duruma göre analiz metodu spesifik veya nonspesifik olarak değerlendirilebilmektedir. Etkif bir temizlik maddesi sadece hedef maddeyi çıkarmamakla kalmamalı, serbestçe durulanabilmelidir. Bu durumda her türlü temizlik maddesi kalıntısının geride kalıp kalmadığını belirlemek için nonspesifik bir yöntemin seçilmesi daha uygun olacaktır. Temizlik maddelerinin kalıntılarını saptamak için yöntem seçerken, maddenin özelliklerini anlamak çok önemlidir. İyonik maddelerin kalıntıları iletkenlik ölçümüyle, güçlü alkali veya asidik ajanlar pH ölçümü ile yüksek oranda yüzey aktif madde (süfaktan) içeren maddeler ise kalıntı köpüklerinin görsel olarak tes-

pit edilmesi ile saptanabilmektedir. Temizlik maddeleri çoğunlukla yüzey aktif maddeler ve diğer bileşiklerden oluşan bir karışım içerdiklerinden kalıntıları belirlemek için birden fazla yöntem kullanılması önerilmektedir.²³⁻²⁵

Deterjanlar kalite güvencesi /kalite kontrol departmanları tarafından belirlenen standartlara uygun olmalıdır. İyi bir temizlik ajanını seçerken şu hususlara dikkat edilmelidir;^{10,14,26}

- Kolayca uzaklaştırılabilir olmalıdır (katyonik deterjanlar gibi bazı maddelerin artıkları camın üzerine kuvvetle yapışır ve çıkartılması zordur).
- Temizleme işlemi sırasında kullanılacak kuvvetli asit ve alkali maddelerin ürünlerle etkileşime girebileceği düşünülmelidir.
- Tespiti kolay olmalı ve tespit için kullanılacak yöntemlerin hassasiyeti yüksek olmalıdır.
- Temizlenecek ekipman ve yüzey malzemelerinin tasarımı ve yapısı dikkate alınmalıdır.
- Önceki formülasyonda (temizlenecek ürün) kullanılan maddelerin çözünürlük özellikleri dikkate alınmalıdır.

■ Toksikitesi düşük olmalıdır.

■ Çevre, sağlık ve güvenlik üzerindeki etkileri göz önünde bulundurulmalıdır.

Aynı farmasötik etken maddelerde olduğu gibi temizlik ajanı kalıntılarının değerlendirilmesi için de kabul limitleri belirlenmelidir. Ancak, temizlik ajanlarının insanda terapötik bir dozu bulunmadığından, etken maddelerde kullanılan terapötik doz yaklaşımına göre belirleme yapmak mümkün olmayacaktır. Temizlemeyi takiben temizlik ajanları için kabul edilebilir limit LD₅₀ değeri (Eşitlik 3) veya 10 ppm kriterine göre hesaplanmakta ve bu değerlerden düşük olan dikkate alınmaktadır.²⁵ LD₅₀ değeri temizlik maddelerinin toksikolojik özelliklerini temsil etmekle birlikte, genel olarak farmasötik üretiminde kullanılan temizlik maddelerinin yüksek LD₅₀ değerine sahip olması kabul edilebilir kalıntı miktarının yüksek hesaplanmasına neden olmaktadır.¹⁴ Bazı kaynaklarda limitlerin kısa süreli kullanım, uzun süreli kullanım ve yaşam boyu kullanım olmak üzere üç kategoriye ayrılması önerilmiştir.²⁷

ÖRNEKLEME YÖNTEMİ

Validasyon çalışmasının ekipmandaki kalıntıların etkili bir şekilde uzaklaştırıldığı kanıtlanması gerekmektedir. Örneklem tekniği ekipmanın yapısı, büyüklüğü ve tasarımına göre seçilmelidir. Aşağıda bahsedilen örneklem tekniklerinden herhangi birinin kullanımı mümkündür.¹ Hangi tekniğin kullanılacağı bilimsel çalışmalara uygun olarak seçilmelidir. Düzenleyici kuruluşlar birden fazla örneklem tekniğinin birlikte kullanılmasını önermektedir.^{2,6}

Swab Analizi: Bu yöntem, temizlendikten sonra bir ekipmanın üzerinde kalan kalıntıların fiziksel olarak uzaklaştırılmasına dayanmaktadır.² Örneklem ekipmanın tüm yüzey alanını kapsamamaktadır. Bu yüzden örnek alınacak bölümler dikkatle seçilmelidir.¹² Swab analizi örneklem yöntemi ile yapılacak analizlerde kalıntı sınırlarının belirlenmesi için aşağıdaki denklem kullanılabilir.^{7,11,18}

Eşitlik 4:

$$R \text{ (mg/cm}^2\text{)} = \text{MACO} \times \frac{S}{T}$$

MACO: Maksimum izin verilen kalıntı düzeyi (mg),

S: Örneklenen alan (cm²),

T: Toplam ekipman alanı (cm²).

Durulama Örnekleme: Temizleme prosedüründe kullanılan son durulama solventinin bir numunesinin analitik olarak tayinine dayanmaktadır.²⁶ Tüm ekipmanın yüzey alanını kapsamaktadır, ancak analiz kirliliğinin olduğu bölge hakkında bilgi vermemektedir.¹ Son yapılan toplam durulama hacmi kirliliğinin nicel analizi için bilinmelidir. Durulama örnekleme ile yapılacak analizlerde kalıntı sınırlarının belirlenmesi için aşağıdaki denklem kullanılabilir.²⁶

Eşitlik 5:

$$R \text{ (mg/ml)} = \text{MACO} \times \frac{1}{V}$$

MACO: Maksimum izin verilen kalıntı düzeyi (mg),

V: Durulama hacmi (mL).

TEMİZLİK PROSEDÜRÜ

Temizleme prosedürleri temizleme işlemi sırasında herhangi bir tutarsızlık ihtimalini ortadan kaldırmak için yeterince ayrıntılı olmalıdır. Kalıntıların ve kontaminantların ekipmandan uzaklaştırılmasına ilişkin temel mekanizmalar mekanik etki, disolüsyon (çözünme), deterjan uygulaması ve kimyasal reaksiyonlardır. Bir temizlik ajanı için temizleme performansını belirleyen en önemli parametreler temizleme süresi, yüzeydeki mekanik etki (akış hızı, basınç vb), temizleme maddesinin konsantrasyonu ve uygulama sıcaklığıdır (Şekil 2).^{10,25}

RİSK DEĞERLENDİRMESİ

Bir maddenin advers etki oluşturma riski; maddenin, bir organizmanın, sistemin veya popülasyonun işlevsel kapasitesinde bozulma ile sonuçlanan morfoloji, fizyoloji, büyüme, gelişme, çoğalma ve yaşam süresinde değişiklik yapma olasılığıdır.²⁸ Risk analizi temizlik validasyonunu bilimsel temele oturtmak açısından önemli bir basamaktır. Temizlik validasyonunda risk; tehlike, kalıntı sıklığı, kalıntı düzeyleri, ADI değerleri, kalıntıların tayin edilebilirliği, temizleme kolaylığı gibi parametrelerin bir fonksiyonu olarak belirlenebilmektedir.¹⁸ Kalite risk yönetimi yaklaşımı bir farmasötik ürünün tüm yaşam döngüsü boyunca uygulanmalıdır. Kalite risk yönetiminin bir parçası olarak, temizlik validasyon çalışmaları temizliğin yeterliliğine yönelik bilimsel risk değerlendirmesine dayanmalıdır.⁹



ŞEKİL 2: Temizlik prosedürünün unsurları.

Temizlik validasyonu maddelerin kontaminasyonunun farmasötik ürün kalitesine en büyük riski yarattığı süreç adımlarına yönlendirilmelidir.¹⁰ Hesaplanan değerler tek başlarına limit değeri belirlemek için değil, bir bütün olarak risk analizi yapmak için kullanılırsa daha doğru bir yaklaşım olacaktır. Kalite riskinin değerlendirilmesi, bilimsel bilgiye dayanılarak sonuçta hastanın korunmasıyla bağlantılı olmalıdır.¹⁷ Validasyon çalışması sırasında risk değerlendirmesi yapılırken üzerinde durulması gereken konulardan bazıları; ekipman karakterizasyonu, en kötü durum senaryosunun belirlenmesi ve özel toksik etkilere sahip maddelerin değerlendirilmesidir.

Ekipman Karakterizasyonu: Üretim süreciyle ilgili her ekipmanın kabul edilebilir seviyelere kadar temizlendiğinden emin olunmalıdır. Ekipmanların karakterizasyonu validasyon çalışmasının kolaylaştırılmasını sağlamaktadır.³ Ekipman içerisinde erişilmesi ve temizlenmesi zor alanların belirlenmesi örnek seçimine yardımcı olmaktadır. Bu basamak validasyon çalışmasının en önemli hususlarından biridir.¹³

Ekipmanların kullanım süresi de dikkat edilmesi gereken bir husustur. Normal kullanım sonucunda ekipman yüzeylerinin pürüzsüzlüğü ve yapısal bütünlüğü zamanla değişebilmektedir. Ekipman yüzeyi aşınıp pürüzlü hâle geldiğinde temizleme zorlaşmaktadır, çünkü kirleticileri adsorb edebilen daha büyük bir temas alanı mevcuttur.¹³

Ekipmanın temizlenmesi ile tekrar kullanılması arasında geçen zamanın de belirlenmesi gerekmektedir. Bu sürenin belirlenmesinin amacı ekipmanın bir sonraki kullanıma kadar temiz olarak kaldığının teyit edilmesidir. Bunun için saklama sırasında ekipmanda mikrobiyal çoğalma olmadığı gösterilmelidir.^{9,26}

En Kötü Durum Senaryosu: Kalıntıların belirlenmesi için en kötü durum senaryoları kullanılabilir. En kötü durum tespiti; ürünün çözünürlüğü, toksisitesi, deteksiyon limiti, minimum "batch" boyutu, güven aralığı, ürünün temas ettiği toplam alan ve maksimum günlük doz gibi özellikler dikkate alınarak hesaplanmalıdır. Kalıntıların özellikleri kadar üretilecek ve potansiyel olarak kirletilecek sonraki ürünün özelliklerinin de de-

ğerlendirilmesi gerekmektedir. Sonuç olarak; temizlik parametrelerinin kabul edildiği ürünler için aynı temizlik malzemeleri, yöntem ve işlem parametreleri kullanılmalıdır.^{7,11,14} Temizlenecek maddenin toksisitesi ve çözünürlük özelliklerine dayanarak risk seviyesinin belirlenmesine yönelik bir örnek Tablo 2'de görülmektedir.

Özel Toksik Etkiler: Bazı maddeler akut toksik etki potansiyelinden bağımsız olarak özel kronik toksik etkilere veya alerjik reaksiyon oluşturma potansiyeline sahip olabilmektedirler. Bu durumlar göz önüne alınmadığında bazı düşük risk grubundaki ilaçlar, yüksek riskli ilaçlardan daha düşük limitlere sahip olabilmektedir. Bu bilimsel temelli yaklaşım anlayışına ters bir durum oluşturmaktadır.^{18,20}

Genotoksisite: Belirgin bir maruz kalma eşiği bulunmayan genotoksik etki potansiyeli bulunan maddeler için herhangi bir maruz kalma seviyesinin risk taşıdığı kabul edilmektedir. Bununla birlikte genotoksik özelliği bulunan maddeler eş zamanlı olarak alınmadıklarında kabul edilebilir risk düzeyinin önceden belirlenmiş bir seviyesi, zehirli kimyasal eşik sınırları üzerindeki, Avrupa İlaç Kurumu kılavuzunda 1,5 µg/gün olarak belirlenmiştir.⁸

Teratojenite: İlaçların güvenlik profilini değerlendirmede bir kriter de ilaçların teratojenik etkileridir. Teratojenik etki potansiyeli için terapötik doza bağlı hesaplar ile kolayca uygulanabilir limitler belirlenmemesi değerlendirilmesi gereken önemli bir faktördür.¹⁸

Alerjik Reaksiyonlar: Hassas kişilerde ilaçlara bağlı aşırı duyarlılık reaksiyonları gelişebilmektedir. Spesifik immün yanıt oluşturabilecek birçok ilaç mevcuttur. Molekül ağırlığı 1.000 daltondan büyük olan ilaçlar kendi başlarına alerjik reaksiyon

oluşturabilmektedirler, ancak bazı küçük moleküllü ilaçlar da haptan olarak davranıp proteinlere bağlanarak etki oluşturabilmektedirler. Gözlemlenen reaksiyonlar hafif kontakt hassasiyet vakalarından potansiyel olarak öldürücü anafilaktik reaksiyonlara kadar değişebilmektedir. Penisilin, düşük dozlarda hipersensitivite oluşturan ilaçlara en bilinen örnektir.^{8,18}

Bu tip maddeler söz konusu olduğunda temizlik prosedürü oluşturulurken ve validasyon programı yapılırken ürün gruplaması yapılması önem kazanmaktadır.

SONUÇ VE TARTIŞMA

Temizlik validasyonu ilaç üretiminde riskin azaltılması, kalite güvencesinin sağlanması ve temizlik prosedürlerinin tutarlılığının kanıtlanması için yapılması gereken önemli bir çalışmadır. Validasyon çalışmasının en önemli aşaması üretilen ürün grupları ile ilgili risk analizlerinin yapılması ve temizlik prosedürü için uygun kalıntı limitlerinin belirlenmesidir. Bu limitler belirlenirken birçok yöntem kullanılabilmesi gibi, toksikolojik temellere dayanan risk odaklı yaklaşımların kullanılmasının pek çok avantajı olduğu görülmektedir. Belirlenecek limitler ürünün güvenliği açısından bir kalite sınırı olarak kullanılmakla birlikte, tüm artıkları uzaklaştırmak için temizleme prosedürünün etkinliği temizleme validasyonu çalışmasıyla sınırlandırılmamalıdır. Yani bir maddenin düşük toksisitesinin olması yüksek limitlerin belirlenmesine ve uygun temizleme yapılmasına neden olmamalıdır. Temel olarak kolayca önlenemediği takdirde hiçbir çapraz kontaminasyon ihtimaline izin verilmemelidir. Ayrıca, üreticiler geçmişteki temizlik performansı deneyimine dayanarak farklı kalıntı limitlerini uygulamayı seçebilmektedir. Örneğin; temizlik sınır limiti bir madde için 5 µg/cm² olarak belirlenmişse ve tüm eski deneyimlerde kalıntı düzeyleri 1 µg/cm²'nin altında saptanmışsa daha düşük bir limit uygulanmalıdır. Yeni kullanılacak limit temizleme performansında bir azalmanın belirlenmesi için uyarı sınırı olarak kullanılabilir. Bu çalışma kapsamında, kabul limitlerinin belirlenmesi konusunda etken maddelere ve temizlik ajanlarına odaklanılmıştır. Temizlik validasyonunu sağlarken

TABLO 2: Maddenin çözünürlüğü ve toksisitesine göre risk analizi.

Risk faktörleri	Çözünürlük			
	Düşük	Orta	Yüksek	Düşük
Toksisite	Yüksek	Yüksek	Yüksek	Orta
	Orta	Yüksek	Orta	Orta
	Düşük	Orta	Orta	Düşük

toksikolojik profillerine bakarak ana ürünlere (etken madde) olduğu kadar yan ürünlere de odaklanmak gerekebilmektedir.

Kabul limitlerinin belirlenmesi düzenleyici standarttır, ancak hastanın sağlığını asıl göz önüne alan kalıntıların gerçekten azaltılmasıdır. Bu da temizlik yöntemlerinin ve kalıntıları tayin etmekte kullanılan yöntemlerinin iyileştirilmesi ile olabilmektedir. Analiz yöntemi seçilirken istenen hedefe ulaşmak için kullanılabilir en basit tekniği seçmek her zaman akıllıca olacaktır. Eğer tek tek her bir kalıntının test edilmesi mümkün değilse total organik karbon ölçümü gibi nonspesifik bir analiz metodu denenebilmekte ve eğer temizlenecek olan ilaç çok toksik ise spesifik bir analiz yöntemi önerilmektedir.^{1,9} Metodun hassaslığı hesaplanan kalıntı limitine uygun olmalıdır. Uygulanan analiz yöntemlerinin hassaslığının geliştirilmesi daha düşük limitlerin belirlenmesi ve temizlik prosedürlerinin geliştirilmesine olanak sağlayacaktır.

Bu çalışmada, genel olarak farmasötik ilaç üretimi konusuna değinilmiş olmakla birlikte, farklı üretim alanlarında (kimyasal ilaç etken maddesi üretimi, biyoteknolojik ilaç üretimi) farklı yaklaşımlar geliştirmek gerekebileceği göz önüne alınmalıdır. Örneğin; biyofarmasötik üretim ekipmanlarının temizliği, tipik olarak, ekipman yüzeylerini aşırı pH ve/veya sıcaklığa maruz bırakan koşullar altında gerçekleştirilmektedir; bu, protein bazlı ürünlerin bozulmasına ve inaktivasyonuna neden olmaktadır. Terapötik makromoleküller ve peptitler yüksek/düşük pH veya ısıya maruz kaldıklarında denatüre olabilmektedirler. Bu durumda farmakolojik olarak inaktif forma geçebilirler. Böyle durumlarda toksikolojik değerlendirmenin buna uygun ayarlanması gerekebilmektedir.^{7,8}

Kabul edilebilir kalıntı limitleri belirlenirken genellikle kirliliğin bir sonraki ürün içerisinde homojen olarak dağıldığı ve her bir birimde aynı konsantrasyonda bulunduğu varsayılır; farmakolojik, ancak kirleticilerin bir sonraki ürün içerisinde homojen olarak dağılmayabileceği de hesaba katılmaktadır. Böyle durumlar için hem önceki (temizlenen) hem de sonraki üretilen ürünün toksikolojik

profilleri detaylı bir şekilde değerlendirilmeli ve her ürün geçişi için risk analizi yapılmalıdır.

Validasyon programı bir kez yapıldığında ve validasyon raporu oluşturulduğunda yöntemin geçerliliği belirli aralıklarla test edilmelidir. Özellikle temizleme prosedürüne yeni ürünler ve ekipmanlar eklendiğinde, orijinal temizlik validasyon çalışmasına katılan tüm ürünler ve ekipmanlar için kabul limitlerinin tekrar gözden geçirilmesi gerekebilmektedir. Kalıntı türlerinin ve kabul edilebilir limitlerin belirlenmesi uzun ve yorucu bir çalışma olsa da bazı ön incelemeler yapmak pratik, ulaşılabilir, doğrulanabilir ve güvenli sınırlar koyulmasını sağlayabilmektedir. İlaç üretiminde riskleri en düşük düzeye indirmek şarttır ve bunun için risk odaklı bir yaklaşımı benimsemek ve çalışmalarla onaylanmış protokolleri uygulamak gerekmektedir. Temizlik validasyonu ilaç üretiminin belirli standartlara uygun olması için uygulanması gereken önemli bir basamaktır ve detaylı çalışmalara dayalı validasyon protokollerinin uygulanması gerekmektedir.

Finansal Kaynak

Bu çalışma sırasında, yapılan araştırma konusu ile ilgili doğrudan bağlantısı bulunan herhangi bir ilaç firmasından, tıbbi alet, gereç ve malzeme sağlayan ve/veya üreten bir firma veya herhangi bir ticari firmadan, çalışmanın değerlendirme sürecinde, çalışma ile ilgili verilecek kararı olumsuz etkileyebilecek maddi ve/veya manevi herhangi bir destek alınmamıştır.

Çıkar Çatışması

Bu çalışma ile ilgili olarak yazarların ve/veya aile bireylerinin çıkar çatışması potansiyeli olabilecek bilimsel ve tıbbi komite üyeliği veya üyeleri ile ilişkisi, danışmanlık, bilirkişilik, herhangi bir firmada çalışma durumu, hissedarlık ve benzer durumları yoktur.

Yazar Katkıları

Fikir/Kavram: Belma Koçer Gümüşel; Pınar Erkekoğlu; **Tasarım:** Anıl Yirün; **Denetleme/Danışmanlık:** Belma Koçer Gümüşel; **Veri Toplama ve/veya İşleme:** Anıl Yirün, Pınar Erkekoğlu; **Analiz ve/veya Yorum:** Anıl Yirün, Pınar Erkekoğlu, Belma Koçer Gümüşel; **Kaynak Taraması:** Anıl Yirün; **Makalenin Yazımı:** Anıl Yirün, Pınar Erkekoğlu, Belma Koçer Gümüşel; **Eleştirel İnceleme:** Belma Koçer Gümüşel; **Kaynaklar ve Fon Sağlama:** Belma Koçer Gümüşel.

KAYNAKLAR

- Kumar VS, Sanjeev T, Sharma PK. Overview of cleaning validation in pharmaceutical manufacturing unit. *IJARPB* 2012;2(2):154-64.
- Venugopal S. Designing of cleaning validation program for active pharmaceutical ingredients. *WJPR* 2014;3(3):3819-44.
- Lodhi B, Padamwar P, Patel A. Cleaning validation for the pharmaceuticals, biopharmaceuticals, cosmetic and nutraceuticals industries. *JIPBS* 2014;1(1):27-38.
- Satinder K, Shashikant, Bharat P. A review on concept of cleaning validation in pharmaceutical industry. *IRJP* 2012;3(7):17-9.
- Lakshmana Prabu S, Suriya Prakash TNK, Thirumurugan R. Cleaning validation and its regulatory aspects in the pharmaceutical industry In: Kohli R, Mittal KL, eds. *Developments in Surface Contamination and Cleaning*. 1st ed. Oxford: Elsevier Inc; 2015. p.129-86.
- Active Pharmaceutical Ingredients Committee (APIC). *Guidance on Aspects of Cleaning Validation in Active Pharmaceutical Ingredient Plants*; 2014. p.57.
- Health Canada/Health Product and Food Branch Inspectorate. *Cleaning Validation Guidelines (GUIDE-0028)*; 2008. p.11.
- European Medicines Agency (EMA). *Guideline on setting health based exposure limits for use in risk identification in the manufacture of different medicinal products in shared facilities*. EMA; 2014. p.11.
- European Commission, Directorate-General for Health and Food Safety. *EU Guidelines for Good Manufacturing Practice for Medicinal Products for Human and Veterinary Use*. Annex 15. Brussels: European Commission; 2015. p.16.
- Manu CN, Gupta V. Review on cleaning validation in pharmaceutical industry. *Int J PharmTech Res* 2016;9(3):415-21.
- American Food and Drug Administration (FDA). *Guide To Inspections of Validation of Cleaning Processes*; 2014.
- Harshavardhan K, Thiruvengada Rajan VS, Amruth Kumar N, Angala Parameswari S, Madhusudhana Chetty C. A review on role of cleaning validation protocol in pharmaceutical unit. *Int J Rev Life Sci* 2011;1(3):151-8.
- Lakshmana Prabu S, Suriyaparakash TNK. Cleaning validation and its importance in pharmaceutical industry. *Pharma Times* 2010;42 (7):21-5.
- Asgharian R, Hamedani FM, Heydari A. Step by step how to do cleaning validation. *IJPLS* 2014;5(3):3345-66.
- Walsh A. Cleaning validation for the 21st century: acceptance limits for active pharmaceutical ingredients (APIs): part II. *Pharmaceutical Engineering* 2011;31(5):46-9.
- Forsyth RJ. Risk-management assessment of visible-residue limits in cleaning validation. *Pharmaceutical Technology* 2006;30(9):1-6.
- Walsh A. Cleaning validation for the 21st century: overview of new ISPE cleaning guide. *Pharmaceutical Engineering* 2011;31(6):1-7.
- Walsh A. Cleaning validation for the 21st century: acceptance limits for active pharmaceutical ingredients (APIs): part I. *Pharmaceutical Engineering* 2011;31(4):74-83.
- Faria EC, Bercu JP, Dolan DG, Morinello EJ, Pecquet AM, Seaman C, et al. Using default methodologies to derive an acceptable daily exposure (ADE). *Regul Toxicol Pharmacol* 2016;79 Suppl 1:S28-38.
- ISPE. *Risk-Based Manufacture of Pharmaceutical Products*. 1st ed. USA: International Society of Pharmaceutical Engineers; 2010. p.152.
- Herrman JL, Younes M. Background to the ADI/TDI/PTWI. *Regul Toxicol Pharmacol* 1999;30(2 Pt 2):S109-13.
- Kramer HJ, van den Ham A, Slob W, Pieters N. Conversion factors estimating indicative chronic no-observed-adverse-effect levels from short-term toxicity data. *Regul Toxicol Pharmacol* 1996;23(3):249-55.
- Wolkoff P, Schneider T, Kildesø J, Degerth R, Jaroszewski M, Schunk H. Risk in cleaning: chemical and physical exposure. *Sci Total Environ* 1998;215(1-2):135-56.
- Milenovic DM, Pesic DS, Mitic SS. Non-specific methods for detecting residues of cleaning agents during cleaning validation. *CI & CEQ* 2011;17(1):39-44.
- Walsh A, Mohammad Ovais MS, Altmann T, Sargent EV. Cleaning validation for the 21st century: acceptance limits for cleaning agents. *Pharmaceutical Engineering* 2013;33(6):1-11.
- Maurya S, Goyal D, Verma C. Cleaning validation in pharmaceutical industry-an overview. *PharmaTutor* 2016;4(9):14-20.
- Conine DL, Naumann BD, Hecker LH. Setting health-based residue limits for contaminants in pharmaceuticals and medical devices. *Qual Assur* 1992;1(3):171-80.
- Benford D. Risk--what is it? *Toxicol Lett* 2008;180(2):68-71.