



## MÉTODO ANALÍTICO TOC EN VALIDACIONES DE LIMPIEZA

El objetivo de un proceso de limpieza en la industria farmacéutica es reducir la posibilidad de contaminación cruzada en cambios de fabricación de diferentes productos, eliminando o reduciendo la presencia de posibles contaminantes. La validación de procesos de limpieza en los cambios de fabricación de diferentes productos presenta como dificultad el amplio espectro de posibles impurezas y contaminantes, y la limitación de las técnicas analíticas. El análisis de TOC (Carbono Orgánico Total) mide todos los residuos orgánicos en función de la propiedad de su contenido en carbono, y proporciona una información necesaria para evaluar el estado validado del proceso de limpieza.



El análisis de TOC (Carbono Orgánico Total) mide todos los residuos orgánicos en función de su contenido en carbono, y proporciona una información necesaria para evaluar el estado validado del proceso de limpieza.

El TOC es un método analítico específico a Carbono e inespecífico a moléculas. Es una técnica analítica muy sensible y con bajo límite de cuantificación, capaz de medir cualquier compuesto que contenga Carbono en su molécula, y por tanto capaz de medir múltiples residuos potenciales de componentes celulares tales como proteínas, ácidos nucleicos, carbohidratos, endotoxinas, así como principios activos, detergentes y degradados del proceso de limpieza. Cuando utilizemos el método analítico TOC en las actividades de verificación y validación de limpiezas debemos realizar una validación del método de análisis con unos límites de detección y cuantificación adecuados.

### Aspectos importantes a tener en cuenta en el método analítico TOC.

En ocasiones no prestamos suficiente atención a detalles importantes que afectan e interfieren en la medida de TOC y que son fácilmente evitables.

#### 1. **Contaminación.**

Resultados anormalmente altos en la medida de los blancos o una tendencia a incrementar los valores de TOC en sucesivas repeticiones de la medida, indican una contaminación de las muestras, si bien las causas pueden ser diferentes.



Los disolventes orgánicos tienen un alto contenido en carbono. Se debe evitar la presencia de vapores orgánicos en el área de muestreo y preparación de blancos y disoluciones. No ubicar el analizador TOC próximo a zonas donde se realicen extracciones orgánicas o próximas a equipos que usen disolventes orgánicos.

Los recipientes y viales para la preparación de disoluciones y muestreo TOC deben estar limpios. Esto significa que se deben limpiar teniendo un procedimiento de limpieza adecuado para el TOC o bien usar viales con certificado de limpieza que garantizan un aporte mínimo de TOC a la medida.

En la preparación de las disoluciones para el estudio de exactitud, precisión y linealidad se debe utilizar material volumétrico limpio dedicado específicamente al TOC.

En el muestreo SWAB las torundas y los viales deben ser de bajo contenido en TOC. Se preparará un blanco que nos dé una medida del aporte de TOC de todos los materiales usados en el muestreo (vial, tapón, torunda, agua). Conviene agitar o sonicar las muestras para facilitar la liberación de los productos de la superficie de la torunda, y analizar la muestra sin extraer la cabeza de la torunda del vial. El tapón de los viales debe tener la superficie interior teflonada para evitar el aporte de C del elastómero.

Los blancos de TOC para el muestreo SWAB en unas condiciones ambientales adecuadas suelen ser inferiores a 200 ppb de C.

## 2. **Bajas recuperaciones en la medida de los compuestos**

En biotecnología, donde las muestras de limpieza pueden contener diversos componentes celulares, podemos tener baja recuperación con proteínas que se pegan a las superficies del vial y de la torunda. El uso de viales preacidificados mejora considerablemente las recuperaciones al facilitar la extracción de los swabs y de la superficie del vial.

El TOC es un método adecuado para medida de trazas de detergentes usados en la limpieza. Es necesario realizar un estudio de recuperación y validar la exactitud y linealidad del método para el detergente. La acidificación de las muestras de detergente mejora la recuperación.

La oxidación completa produce la rotura de todos los enlaces del C a CO<sub>2</sub>. Debemos optimizar las condiciones de oxidación del equipo TOC para conseguir que la oxidación sea completa. La oxidación por radiación UV tiene una capacidad de oxidación limitada. Es necesario asegurar la alta capacidad de oxidación del analizador y validar la recuperación de los productos en el rango que abarque el límite de arrastre. Analizadores con fundamento de detección de CO<sub>2</sub> basado en medida de conductividad pueden tener interferencias por presencia de especies iónicas generadas en la oxidación que producen resultados inexactos o fuera de especificaciones de difícil explicación. En este caso, es necesario separar el CO<sub>2</sub> de la muestra antes de medirlo.

## 3. **Instrumentación.**

Los diferentes analizadores TOC del mercado comparten un fundamento común de oxidación de los compuestos orgánicos y medida del CO<sub>2</sub> generado en la oxidación, aunque usan diferentes tecnologías para la oxidación y para la medida del CO<sub>2</sub>. La cualificación funcional de la técnica analítica es necesaria para garantizar que la oxidación es completa, que no hay interferencias en la detección del CO<sub>2</sub>, que la recuperación de diferentes compuestos es correcta y que la modificación de parámetros como la conductividad o el pH no afectan a la medida del Carbono.

Una cualificación del equipo con desarrollo de protocolos IQ, OQ y PQ es imprescindible para cumplir con los requerimientos GMP, y verificar que el analizador es específico a carbono y robusto de acuerdo a requerimientos USP, EP e ICH Q2R1. Se deben realizar los siguientes test de verificación funcional:

Test de exactitud y precisión, test de linealidad en el rango de medida, test de idoneidad (system suitability),





determinación de límites de detección y cuantificación, test de robustez modificando parámetros de la muestra como pH o conductividad, test de especificidad comprobando la correcta recuperación del carbono con diferentes compuestos orgánicos.

Una vez cualificada la técnica analítica es necesario demostrar que el método analítico es adecuado para la medida de los productos de interés por encima y por debajo de los límites de aceptación para arrastre establecidos, mediante un estudio de linealidad, exactitud y precisión preparando diferentes concentraciones de producto que abarquen el límite de arrastre.

## **Determinación de los límites de aceptación para el arrastre en TOC en base a un criterio toxicológico**

El enfoque convencional para determinar los límites de aceptación para los residuos de un proceso de limpieza parte de la consideración de que el principio activo (API) permanece químicamente o funcionalmente intacto tras el proceso de limpieza. Este enfoque requiere incluir el concepto MAC y valores de referencia como la PDE (dosis diaria permitida).

La necesidad del cálculo del valor MAC (Maximum Allowable Carryover) parte de la práctica de cambios de productos en las instalaciones de fabricación. Un cambio de producto ocurre cuando un reactor es vaciado de un producto A y posteriormente se llena con un producto B.

El valor MAC indica cuanto producto A del último lote fabricado puede estar presente de forma segura en el primer lote del siguiente producto B, sin resultar peligroso para el paciente.

Los cálculos del MAC comienzan partiendo de valores de referencia para cada producto. Algunos valores de referencia son la dosis terapéutica diaria, la dosis de exposición diaria permitida o dosis aceptable diaria y la dosis letal para la mitad de la población.

Los límites de aceptación para el arrastre de residuos deben establecerse en base a criterios toxicológicos, y deben también establecerse los límites para la eliminación de los productos de limpieza. Partiremos de la PDE (dosis específica de una sustancia que no causa efecto adverso si un individuo está ex- puesto a dicha dosis o inferior durante todos los días de su vida) como valor de referencia de los productos para el cálculo del MAC.

Necesitamos conocer la identidad de los productos, el mínimo tamaño de lote del producto siguiente B y crearemos una matriz basada en los valores de referencia toxicológicos (PDE) de los productos para determinar el valor MAC. El límite de aceptación se basará en la matriz de datos para el caso más desfavorable, para cada equipo de producción.

El MAC en sí mismo no es un valor suficiente para liberar el equipo para su uso. Necesitamos determinar el límite de aceptación como producto a partir del valor MAC. Para transformar el MAC en límite de producto (ppm) se debe tener en cuenta el método de muestreo.

Los métodos de muestreo habituales son:

- Muestreo SWAB o con torunda de un área determinada del interior del equipo
- Muestreo de agua de aclarado





### Ejemplo para muestreo de superficies con torundas

$$\begin{aligned}
 &\text{Datos: MAC= 400 mg} \\
 &\text{Superficie contacto del equipo= 100000 cm}^2 \\
 &\text{Área muestreada con torunda= 25 cm}^2 \\
 &\text{Volumen de extracción de la torunda = 40 ml} \\
 &\text{Límite de producto en muestreo SWAB (mg/cm}^2\text{) =} \\
 &= \frac{\text{MAC (mg)}}{\text{Superficie equipo (cm}^2\text{)}} \\
 &\text{Límite de producto =} \\
 &= \frac{400 \text{ mg}}{100000 \text{ cm}^2} = 0,004 \text{ mg/cm}^2 = 4 \text{ }\mu\text{g/cm}^2 \\
 &4 \text{ }\mu\text{g/cm}^2 \times 25 \text{ cm}^2 = 100 \text{ }\mu\text{g} \\
 &100\mu\text{g}/0,004\text{L} = 2500 \text{ }\mu\text{g/L (ppb)} = 2,5 \text{ ppm}
 \end{aligned}$$

Para convertir el límite de producto a límite de TOC tenemos en cuenta el contenido en carbono de la molécula a partir de la fórmula química del compuesto.

Ejemplo:

$$\%C = 50\% \rightarrow \text{Límite como TOC} = 1,25 \text{ ppm (C)}$$

Concluimos que, partiendo de valores de referencia defendibles, el valor MAC para el producto A en producto B es 4  $\mu\text{g/cm}^2$ . Cuando usamos la tecnología TOC en validación de procesos de limpieza, basándonos en el MAC y el método de muestreo, el valor límite de TOC de producto A en producto B es de 1,25 mg/L (ppm).

### Determinación del límite de aceptación para limpiezas en procesos biotecnológicos en base a la capacidad del proceso de limpieza

El concepto de límite de aceptación de limpiezas basado en el producto intacto procede de la fabricación fármacos con moléculas pequeñas. Sin embargo, los productos en biotecnología son moléculas grandes que tienden a degradarse e inactivarse en las condiciones del proceso de limpieza. Los posibles enfoques alternativos para la determinación de los límites de aceptación se fundamentan sobre la base de que el API se inactiva en el proceso de limpieza.

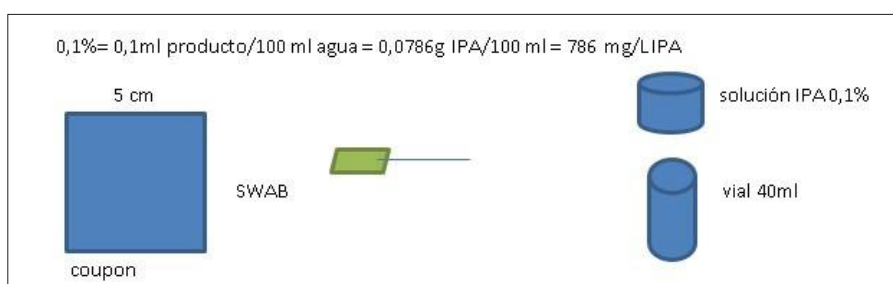
Aunque los límites de aceptación se determinan habitualmente en base al API intacto, en procesos biotecnológicos los API normalmente se degradan a productos farmacológicamente inactivos durante las limpiezas. Por ello el límite de aceptación necesita establecerse sobre los residuos potenciales del proceso basándonos en los aspectos del proceso de limpieza.

En biotecnología se trabaja con moléculas grandes (anticuerpos monoclonales, proteínas con acción terapéutica...) que son producidas en reactores por organismos vivos en lugar de ser extraídas de fuentes naturales o sintetizadas. Los ciclos de limpieza de los equipos están diseñados para exponer las áreas de contacto con el producto a la acción de detergentes con pH ácidos y alcalinos. En estas condiciones de exposición los detergentes ácidos y alcalinos hidrolizan los enlaces peptídicos generando productos biológicamente inactivos por degradación y desnaturalización, y por tanto no hay riesgo de arrastre de producto activo.



El paso final de los procesos de limpieza es un enjuague con agua calidad WFI (agua para inyección). Los volúmenes y caudales de este enjuague final se diseñan para asegurar la eliminación de los residuos de detergentes a unos niveles de TOC y conductividad del orden del agua WFI empleada en el enjuague. La eliminación en el enjuague del producto inactivado o fragmentos de producto puede ser evaluada en un estudio de limpieza en el que el producto inactivado es añadido a una superficie y se simula un enjuague en las condiciones de los ciclos de limpieza prácticos.

El estudio de inactivación demuestra que el residuo no es activo en las condiciones del proceso de limpieza. El estudio de limpieza (cleanability) demuestra que los fragmentos generados en las condiciones de la limpieza no tienen riesgo de arrastre.



Preparación de Solución IPA

La mayoría de compuestos en procesos biotecnológicos (ej. API, proteínas celulares, medio nutritivo, detergentes) contienen carbono en su composición. La aplicación del método analítico TOC para detección de restos de productos es más estricta que otros métodos específicos y detecta todos los posibles residuos que contengan carbono en su molécula, incluyendo compuestos potencialmente difíciles de eliminar. El método analítico TOC es sensible (con límites de detección y cuantificación de ppb) y puede ser usado para muestreos de superficies, aguas de enjuague y monitorización en continuo. Existen diferentes enfoques alternativos al cálculo del MAC (el cual tiene una aplicabilidad limitada para productos biofarmacéuticos) para la determinación de los límites de aceptación. Desarrollaremos el criterio basado en la capacidad del proceso de limpieza. Se asume la inactivación del producto en las condiciones establecidas para proceso de limpieza.

Se determina el límite de aceptación en base a la demostración de que todos los productos que contienen carbono son eliminados por debajo del límite de la capacidad del proceso de limpieza. El TOC es el método analítico más idóneo para demostrar la eliminación de los residuos, y el límite de la capacidad del proceso se basa en la contribución de TOC del agua WFI del enjuagado final. Para el cálculo del límite se tendrá en cuenta la superficie del equipo en contacto con el producto, el menor volumen de producto procesado en el equipo, el TOC del agua WFI, y el área frotada mediante el muestreo con torunda.



Es importante recordar que el producto activo no es una preocupación debido a que no estará presente tras el proceso de limpieza. Los fragmentos de producto no proteicos se eliminarán durante el proceso de purificación, y los fragmentos de proteínas serán fácilmente eliminados de las superficies por el proceso de limpieza.

$$\begin{aligned} \text{Límite de residuo como TOC } (\mu\text{g}/\text{cm}^2) &= \\ &= \frac{\text{Mínimo volumen} \times \text{TOC agua WFI}}{\text{Superficie del equipo}} \end{aligned}$$

Para el método de muestreo en superficies con torunda, teniendo en cuenta la superficie muestreada y el volumen de agua usado en la extracción del swab determinaremos el límite de limpieza aceptable como TOC. Los límites calculados según este criterio son bajos y por tanto es un límite conservativo que asegura la eliminación de todos los compuestos que contengan carbono y de los detergentes de limpieza.

### Estudio de recuperación

El estudio de validación diseñado para el método analítico TOC debe demostrar la exactitud, precisión y linealidad en el rango de la medida que abarque el umbral de seguridad. Estableceremos la sensibilidad del método determinando los límites de detección y cuantificación.

#### Ejemplo de recuperación para el desinfectante IPA ( $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}$ ), 2 propanol

$$\text{Densidad IPA} = 786 \text{ kg}/\text{m}^3 \rightarrow 786 \times 1000 \text{ g}/\text{Kg} \times 1/106 \text{ m}^3/\text{cm}^3 = 0,786 \text{ g}/\text{mL}$$

Se prepara una disolución madre al 0,1% a partir del producto.

Se añade uniformemente una alícuota de 0,1 ml al coupon de superficie 25 cm<sup>2</sup>; se deja secar en las mismas condiciones del proceso. Se recoge con la torunda siguiendo un modelo establecido y se realiza la extracción con 40 ml de agua.

$$\begin{aligned} 0,1 \text{ ml} \times 786 \text{ mg}/\text{l} &= 1,96 \\ 0,04 \text{ L} & \\ \text{Pureza del IPA} &= 70\%; \\ \% \text{C IPA} &= 60\% \\ 1,96 \times 0,7 \times 0,6 &= 825 \text{ ppb } (\mu\text{g}/\text{L}) \text{ como C} \end{aligned}$$

Las torundas, placas, viales y el agua aportan TOC. Es necesario determinar realizar un blanco para determinar el aporte de carbono de todos los materiales en contacto con el producto. La determinación del blanco se realizará rellenado un vial con agua purificada y cerrando el vial con un tapón con septum de teflón. Se pasa la torunda humedecida sobre la superficie de la placa del mismo material que el equipo, usando una técnica de frotado determinada. Se corta la cabeza de la torunda y se introduce en el vial de agua. Se agita o sonica y se mide el TOC. Este valor del blanco se restará del resultado de TOC de las disoluciones de producto para determinar la recuperación de la técnica de muestreo, respecto al valor esperado de 825 ppb.





## Conclusión

Los analizadores de TOC oxidan los compuestos orgánicos y miden selectivamente el CO<sub>2</sub> producido en la oxidación. Determinan el TOC como diferencia entre el Carbono Total y el Carbono Inorgánico. Presenta como ventaja la sensibilidad a todos los compuestos orgánicos en medio acuoso, incluyendo degradados del proceso de limpieza y compuestos inesperados. Es un método sencillo y aplicable en todas las fases del proceso (diseño, validación y verificación continua).

## Referencias

- (1) "Guidance for Industry. Process Validation: General Principles and Practices". FDA Pharmaceutical Quality/ Manufacturing Standards (CGMP).
- (2) Cleaning verification: A five parameter study of a Total Organic Carbon method development and validation for the cleaning assesment of residual detergents in manufacturing equipment. "Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis".

Artículo realizado por el dpto. de Farma de instrumentación analítica, s.a.



**Soluciones  
para quienes  
mueven el mundo**

c/ Penedés, 46  
08820 El Prat de Llobregat  
Barcelona · Tel. +34 934 787 161  
barcelona@instru.es

c/ Isabel Colbrand, 10  
Nave 89 · 28050 Madrid  
Tel. +34 913 588 879  
madrid@instru.es



[www.instru.es](http://www.instru.es)