

## 生物过程中溶液中浓度测量技术比较

编辑: Jessie Date: 2023.3

生物制药制造涉及复杂的工艺步骤，严格的生产条件能最大限度地提高生物产品的产量、纯度和质量。近年来，过程分析技术(PAT)越来越多地被用于实时监控关键的过程和性能参数。PAT技术能更好地控制生产条件，工艺流体中的溶液浓度是许多生物处理步骤中实现成品质量一致性所需的重要参数。

### 浓度测量的关键需求

许多生物制药制造工艺步骤需要测量溶液中溶质的浓度。对于上游过程，进料和生物反应器中成分的浓度对于细胞代谢和生长非常重要，同时要确保可重复操作；在下游过程中，需要大量的溶液(包括缓冲液)来进行层析和超滤/透析(UF/DF)步骤。制备不当的溶液可能会对下游过程产生严重的负面影响(例如，产品无法与色谱柱结合或不正确地配制原料药)。

因此，溶质浓度的测量是溶液制备过程中的一个关键步骤，确保溶液在引入过程之前已经被正确地配制。此外，在色谱运行期间，通过对溶液进行在线监测，可以提供用于生成盐梯度的输入控制参数，进行在线稀释缓冲液，并监测在色谱运行的每个步骤(例如平衡、洗涤和洗脱)中是否使用了正确的溶液。

工艺过程中流体浓度的测量在清洁操作中十分重要，对清洁液进行浓度测量以确定清洁溶液中酸、碱或清洁剂浓度是否处于适当水平。未进行该测量可能会导致清洁不充分、系统组件损坏以及系统停机时间延长。浓度测量还用于监测清洁过程所需要冲洗系统的水中的溶质浓度，可以检测清洗过程中清洁剂是否完全去除。

### 浓度测量技术概览

要让生物制药制造商完全相信上游和下游生产过程中使用和产生的工艺流体是符合规定的浓度，拥有易于使用、有效且高效的浓度测量方法非常重要。理想的技术必须是可靠的，并且提供高精度和可重复性以及快速响应时间。

#### 电导率

电导率是衡量溶液传导电流能力的指标(1)。它可以通过在电极之间施加电压，测量产生的电流，并确定溶液的电阻率(由此计算电导率)来测量。溶质在溶液中导电的程度取决于其离子特性和浓度。因此，测量电导率是确定离子溶液浓度的好方法。

但是这种方法在测量含有非离子和弱离子物质的溶液浓度的能力方面受到一定限制，包括许多生物处理溶液中的成分。使用电导率来精确测定许多生物制药溶液中成分的浓度相对困难。

#### pH值

溶液的pH值是衡量溶液酸度或碱度的指标。具体来说，pH值测量水合氢离子的浓度(2)。因此，它是解离时产生水合氢离子的物质的水溶液浓度的有效指标。但对于不产生水合氢离子的工艺流体，它的用途有限。



## 渗透压

渗透压是一种基于由于给定溶质(3)的存在而导致的溶液凝固点变化(或凝固点降低)的浓度测量方法。溶质使溶液的凝固点降低到比纯溶剂的凝固点低的值。一般情况下,溶质浓度越大,凝固点降低越大;因此,浓度的大小与抑制程度相关。与电导率和pH值通常用作在线技术不同,渗透压是一种离线测量技术,不能提供实时信息。

## 折射率

折射率:当光线从一种介质进入另一种介质时,由于光在每种介质中传播速度的变化,光线会弯曲成一定角度。一种介质的折射率(IoR)是真空中光速与该介质中的光速之间的比率(4)。不同浓度的溶质溶液具有不同的折射率。因此,确定溶液的IoR可以直接测量溶液的浓度。

在传统的折射计中,光源照射在样品上,然后光线穿过溶液。这样,分析人员就可以确定光的传输。然而,使用这种方法的结果可能会受到溶液中的浊度以及光的衍射和吸收的影响(1)。

一种较新的使用发光二极管(LED)反射IoR技术。来自LED的光线照射到光学窗口上,该光学窗口与待分析的工艺流体或产品溶液接触。光在临界角( $\theta_c$ )反射出光学窗口,在那里它被折射到流体。这个角度可以通过使用光电二极管阵列探测器分析反射光来确定。临界点取决于溶液浓度。因此,分析人员可以迅速检测到浓度的变化。使用这种方法测试的结果不受溶液浊度或衍射和光吸收的影响。

与电导率和pH值不同,溶液的折射率与它的电荷情况或酸性无关。由于该技术可以非常快速地确定溶液的IoR,所以适用于实时数据的在线分析,可以对工艺变化立即做出响应。此外,IoR监测很容易从实验室扩展到商业生产,而不会对精度有所损伤。这使得该技术适用于需要浓度监测的生物制药应用。

## 研究目的、材料和方法

这项研究的主要目的是比较电导率、IoR和渗透压的性能,以测量生物制药生产中经常使用的不同类型溶液的浓度。北卡罗来纳州立大学的生物制造培训与教育中心(BTEC)进行了这项分析技术评估。

为了评估,我们准备了几种生物制药加工中常用的不同水溶液(表1)。我们测量了每种溶液的电导率、IoR和渗透压。我们选择的溶液包括一系列不同浓度的含有不同溶质的液体。这些溶质可分为离子型、非离子型和有机缓冲液。我们在生物制药过程中可能使用的pH值条件下制备有机缓冲溶液,不需要调整pH值。

对于每种溶液,我们分别使用220型电导率仪(Denver Instruments)、BT128型IoR浓度监测仪(Entegris)和3320型微渗透仪(Advanced Instruments)测量电导率、折射率和渗透压。我们绘制了每种测试方法(电导率,IoR和渗透压)对每种溶液浓度的响应。线性响应是一个重要的方法属性,因为它允许简单地量化溶液浓度。因此,我们使用响应的线性度来评估方法的有效性。

## 结果与讨论

我们将在下面讨论实验结果。

**离子浓度:**图1和图2显示了NaCl溶液在0.1M到2M浓度范围内的结果,每种方法都给出了合理的线性响应。但是,由于样品的凝固点过低(超出了本研究所用的渗透计的测量范围),高浓度NaCl(2M)溶液的渗透压无法测定。

我们对氢氧化钠溶液进行了类似的测量(数据未显示)。然而,与NaCl的结果一样,NaOH(2 M)的最高浓度的渗透压超出了渗透计的范围。此外,2M NaOH的电导率也超出了量程(300 mS/cm)的范围。因此,无论是电导率还是渗透性都无法提供所研究的浓度范围内的读数。相比之下,IoR在整个浓度范围内呈线性响应。

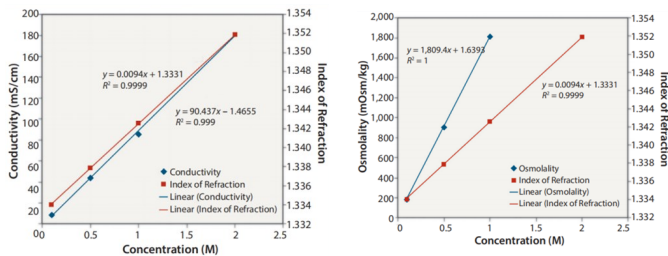


图1: NaCl: 电导率和折射率性能

图2: NaCl: 渗透压和折射率性能

| 类型    | 溶液                                                                                                                                                                                              |
|-------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 离子    | 氢氧化钠(Fisher Scientific, 目录号S320-10)<br>氯化钠(Fisher Scientific, catalog number S642-500)                                                                                                          |
| 非离子   | 乙醇(Koptec, 目录号v100r001)<br>聚氧乙烯(20)山梨醇单油酸酯(TWEEN 80)(Sigma-Aldrich, 目录号P8074-500ML)                                                                                                             |
| 有机缓冲液 | 2-氨基-2-羟甲基丙烷-1,3-二醇(Tris)(Sigma-Aldrich, 目录号T-6066-5KG)<br>2-[4-(2-羟乙基)哌嗪-1-基]乙磺酸(HEPES)(SigmaAldrich, 目录号RES6003H-B103X和RES6003H-B701X)<br>2-(N-吗啉基)乙磺酸(MES)(Sigma-Aldrich, 目录号RESO113M-A701X) |

表1: 进行浓度分析的溶液

**非离子溶液:** 图3和图4显示了乙醇溶液的电导率、IoR和渗透压测量。没有一种检测方法在研究的浓度范围内(10-75v/v)提供完全线性响应。然而，IoR方法提供了三种测试方法中最好的结果。正如预期的那样，乙醇溶液的电导率值相当低，与浓度不是线性相关。当酒精浓度  $\geq 0.25$  v/v时，溶液不结冰。所以我们无法确定它们的渗透压。与离子溶液一样，IoR在整个浓度范围内具有最佳的线性响应。

对聚山梨酯80溶液的测量结果与乙醇溶液相似。在0.5-5v/v浓度范围内，聚山梨酯80溶液的IoR和渗透压测量值呈线性(数据未显示)。与乙醇的结果不同，聚山梨酯80的电导率和浓度的图根据线性最小二乘拟合的决定值系数显示出一定的线性。由于聚山梨酯80是非离子型的，这个结果是出乎意料的。然而，测量的电导率值较低(均为 $5\mu\text{S}/\text{cm}$ 以下)，在这个低范围内的测量精度相当低。

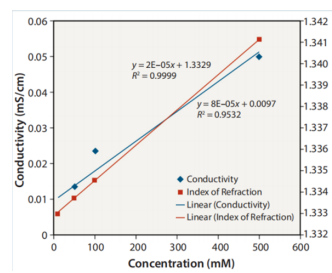


图5: Tris无pH调节: 电导率和折射率性能

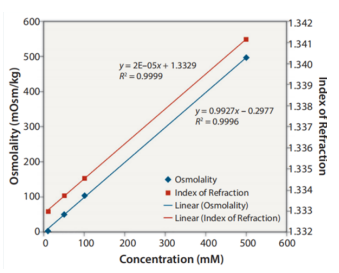


图6: Tris无pH调节: 渗透压和折射率性能

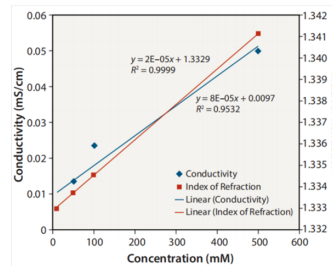


图7: Tris pH值8: 电导率和折射率性能

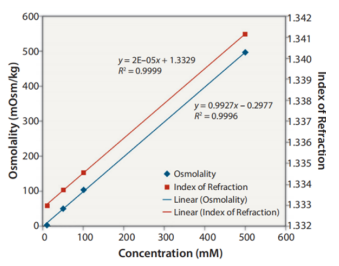


图8: Tris pH值8: 渗透压和折射率性能

**有机缓冲液:** 在不同的pH值下，3种有机缓冲液(2-(N-吗啉基)乙磺酸(MES)、2-氨基-2-羟甲基丙烷-1,3-二醇(Tris)和2-[4-(2-羟乙基)哌嗪-1-基]乙磺酸(HEPES))的测定结果相似。图5-8显示了未调整和调整到pH 8的Tris溶液的数据。在10-500 mM的浓度范围内，pH为8的Tris溶液对所有测量方法都呈线性响应。值得注意的是，在没有调整pH的情况下，电导率和浓度之间的关系不是线性的。这些有机缓冲液只是弱离子的，在低电导值时，准确度和精密度会受到影响。用酸调节pH到8，此时的Tris溶液的电导率数据与浓度呈线性关系，这是由于调节pH用的酸的关系(HCl)。

表2: 本研究获得的折射率、电导率和渗透压数据的决定系数: 离子、非离子、有机

| Solution                  | R <sup>2</sup> Value |              |            |
|---------------------------|----------------------|--------------|------------|
|                           | Index of Refraction  | Conductivity | Osmolality |
| NaCl                      | 0.9999               | 0.9990       | 1.0000     |
| NaOH                      | 0.9988               | 0.9973       | 1.0000     |
| EtOH                      | 0.9396               | 0.0027       | NA         |
| Polysorbate 80            | 0.9931               | 0.9327       | 9842       |
| MES* pH 6.5               | 1.0000               | 0.9961       | 1.0000     |
| Tris* no pH adjustment    | 0.9999               | 0.9532       | 0.9996     |
| Tris pH 7.0               | 1.0000               | 0.9978       | 0.9999     |
| Tris pH 8.0               | 1.0000               | 0.9969       | 0.9996     |
| Tris pH 9.0               | 1.0000               | 0.9968       | 0.9998     |
| Tris MES no pH adjustment | 1.0000               | 0.9518       | 1.0000     |
| MES pH 5.5                | 1.0000               | 0.9845       | 0.9999     |
| MES pH 6.0                | 1.0000               | 0.9928       | 0.9997     |
| HEPES* no pH adjustment   | 1.0000               | 0.9997       | 0.9998     |
| HEPES pH 7.0              | 1.0000               | 0.9856       | 0.9999     |
| HEPES pH 7.5              | 1.0000               | 0.9959       | 0.9995     |
| HEPES pH 8.0              | 0.9997               | 0.9962       | 0.9994     |

\*MES为2-(N-吗啉基)乙磺酸; Tris为2-氨基-2-羟甲基丙烷-1,3-二醇; HEPES是2-[4-(2-羟乙基)哌嗪-1-基]乙磺酸

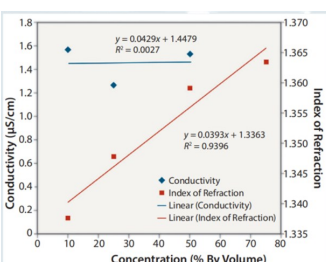


图3: 乙醇: 电导率和折射率性能

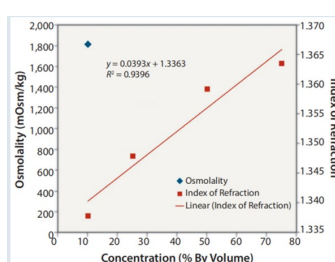


图4: 乙醇: 渗透压和折射率性能

表2: 本研究获得的折射率、电导率和渗透压数据的决定系数

表2总结了所使用的每种分析方法的决定系数 ( $R^2$ )。

$R^2$ 是数据与拟合线性回归线的接近程度的统计度量 (5)。该表清楚地表明，电导率是确定离子溶液和有机缓冲液浓度的合适方法。然而，这不是一种适合于测定非离子溶液浓度的方法。

表2中的结果还表明，虽然渗透压适用于本研究评估的大多数溶液，但由于缺乏冻结，较高的溶质浓度可能导致渗透压值不确定。还应该注意的，渗透压是一种离线方法，不能用于在线分析。值得注意的是，表2表明，在所有浓度下，只有IoR对所有溶液都有线性响应。

我们观察到所有方法都有良好的精度，尽管导电性能测试的重复性略低于IoR和渗透性测试，特别是在低导电性能值时。具体来说，电导率测量需要频繁校准，读数稳定需要时间。

### 有效的浓度测量与IoR法

生物制药生产中的质量控制是生产安全有效的生物药物的关键。生物制药生产中使用的工艺流体的准确浓度测量对于确保一致的加工，产品质量和产量至关重要。在线PAT方法的开发提高了公司实时监测和控制生物过程的能力。

对于浓度测量，本研究表明IoR技术优于传统的浓度测量方法，如电导率和渗透压。IoR方法对所有测试溶液的浓度都产生了优秀的线性相关性。由于IoR能够对生物制药生产中常用的许多不同类型的试剂在更宽的浓度范围内进行有效的实时浓度测量，具有很高的准确度和精度，因此，它在实时在线测量工艺流体浓度方面具有很大的潜力。

### 参考文献

1 Electrical Conductivity( $\kappa$ ) and Resistivity ( $\rho$ ).US Environmental Protection Agency.

[www.epa.gov/esd/cmb/GeophysicsWebsitepages/reference/properties/Electrical\\_Conductivity\\_and\\_Resistivity](http://www.epa.gov/esd/cmb/GeophysicsWebsitepages/reference/properties/Electrical_Conductivity_and_Resistivity).

2 CADDIS:The Causal Analysis/Diagnosis Decision Information System, Volume 2:Sources, Stressors, and Responses; pH.US Environmental Protection Agency; [www.epa.gov/caddis/ssr\\_ph\\_int.html](http://www.epa.gov/caddis/ssr_ph_int.html).

3 Lobdell DH.Osmometry Revisited; [www.osmolality.com/pdf/Lobdell-Osmo-Revisit.pdf](http://www.osmolality.com/pdf/Lobdell-Osmo-Revisit.pdf).

4 Refractive Index Theory. University of Toronto Scarborough; <http://webapps.utoronto.ca/chemistryonline/refractive.php>.

5 Frost J. Regression Analysis: How Do I Interpret R-squared and Assess the Goodness-of-Fit? The Minitab Blog 30 May 2013; <http://blog.minitab.com/blog/adventures-in-statistics/regression-analysis-how-do-i-interpret-r-squared-and-assess-the-goodness-of>



上海奥法美嘉科技有限公司

上海市 闵行区 浦江镇 浦江高科技园F区  
新骏环路 588 号 23 幢 402 室

Customer Service

Tel: 400-829-3090

Email: [info@Alpharmaca.com](mailto:info@Alpharmaca.com)



官方公众号



官方服务号

[www.Alpharmaca.com](http://www.Alpharmaca.com)