

滲透壓作為生物製程中關鍵緩衝液的濃度測量方法

介紹

生物製劑 (Biologics) 的製造是一個複雜且花費甚高的過程，通過該過程可以回收並純化蛋白質，去除污染物，以生產最終藥物產品。這是通過一系列過濾和層析過程完成的。實現和保持所需的產品質量和純度需要優化製程參數以及精確控制這些參數。

隨著生物製藥行業的發展，人們越來越重視開發穩健的分析方法，以提供更準確和可靠的測量來鑑定下游過程。這需要密切的監測以維持純化條件和穩定蛋白質¹的緩衝液。緩衝液成分的標準化測試可確保過程的一致性並降低批次失敗的風險，從而提高製造的整體成功率。

Buffer component	Applications in Downstream Bioprocessing
Tris	pH Neutralization, Chromatography
Tris-HCl	Chromatography
Phosphate Buffer	Chromatography, UF/DF
Citrate Buffer	Chromatography, UF/DF
Acetic Acid	pH Acidification, Protein A Chromatography Elution
Citric Acid	pH Acidification, Chromatography, UF/DF
Phosphoric Acid	pH Acidification, Chromatography

表1. 下游生物製程中的常見緩衝液及其應用。本篇中對這些緩衝液的滲透壓、電導率和 pH 值進行了測試。

表1列出了一些用於生物製劑下游製程常見的緩衝液及其成分。緩衝液製備和評估不當會在過濾和層析步驟中產生負面影響(例如，降低製程表現或結果不合規格)^{2,3}。

在整個下游製程中，測試和釋放緩衝液的傳統測量包括 pH 值和電導率。目前，通過程序控制(例如標準操作程序SOP)以及通過結合 pH 值的間接測量來確保緩衝液成分濃度和電導率。pH 值和電導率都是相互關聯的⁴，具有分子特異性，並且取決於條件下分子的解離程度。

雖然這些測量對於確保蛋白質穩定性和與層析樹脂的適當相互作用，它們對電離 (Ionization，離子游離作用) 有很大的依賴性^{5,6}。這使得它們作為弱解離緩衝液中的濃度測量不可靠。此外，pH 測量計和電導率計都會受到溫度的影響^{5,6}。對於在室溫以下製備和儲存的緩衝液，這些方法可能需要額外的計算和預防措施。

滲透壓在本研究中被評估為[正交測量\(Orthogonal Measurement\)](#)，具有增加一致性和改進生物製程控制策略的潛力。滲透壓是每千克水中溶質摩爾數的量度，因此相對不受分子類型、電離度或 pH 值的影響。進行這項研究是為了了解滲透壓如何進行濃度測量，以及它如何與 pH 值和電導率的測量進行比較。

材料與方法

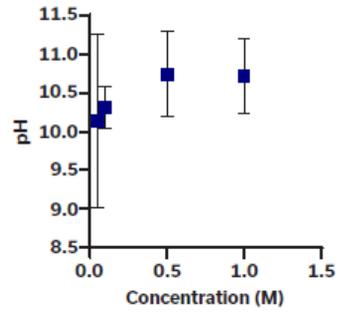
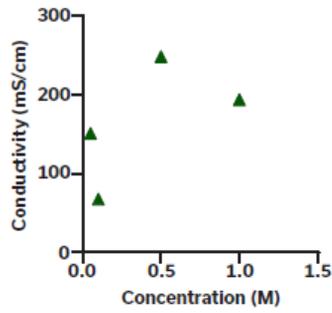
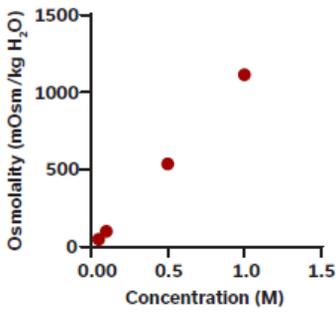
表1中的緩衝液是使用重量分析法單獨製備的。所有緩衝液均按0.05 M、0.1 M、0.5 M、1 M、1.25 M、1.5 M、1.75 M和2 M製備，並在製備後24小時內進行測試。較低的濃度(0.05 M至1 M)在生物製程中的使用最具代表性。在儀器允許的情況下，加入濃度大於1 M的溶液，以應對在線稀釋(In-line Dilution)前測試緩衝液濃縮物的日益增長的生物製程趨勢²。

本篇研究中使用 [Advanced Instruments 的 OsmoTECH[®]](#) 單樣品微滲透壓計測量滲透壓，該滲透壓計採用冰點降低法(Freezing point depression method)。使用 Hanna Instruments HI5321 實驗室研究等級台式電導率/電阻率/TDS/鹽度/溫度計測量電導率。使用 Thermo Scientific Orion[®] 8157BNUMD Ross[™] Ultra Refillable Triode[™] 結合 Orion Star[™] A211 pH 台式計測量 pH 值。每個濃度皆測量10次，記錄數據並計算平均值和變異係數(%CV)。

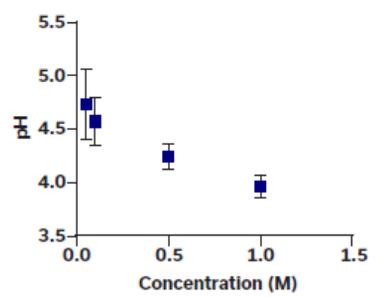
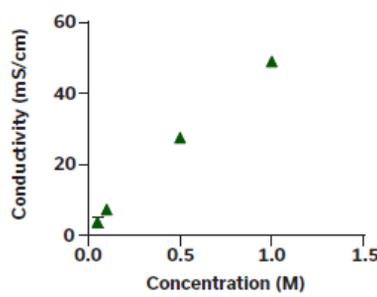
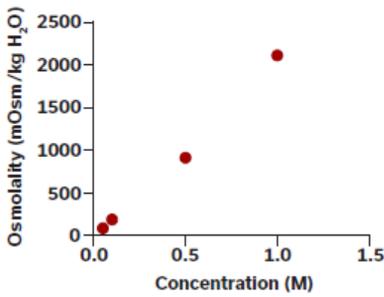
結果

下面的七組圖顯示了每組溶液三個屬性的平均值和 %CV (標示 error bar)。Error bar 表示極小 CV 不可見。每組圖表的軸都進行了調整以突出趨勢。

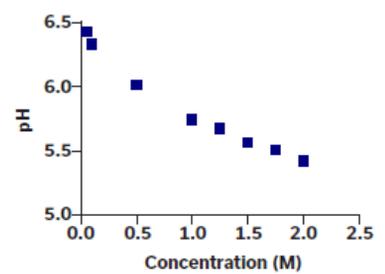
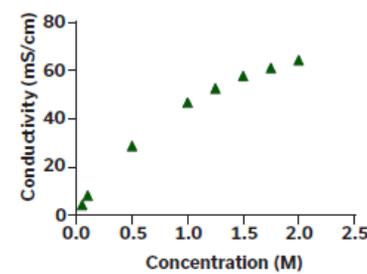
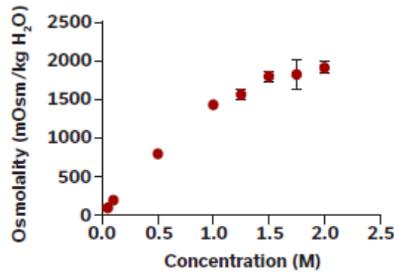
Tris



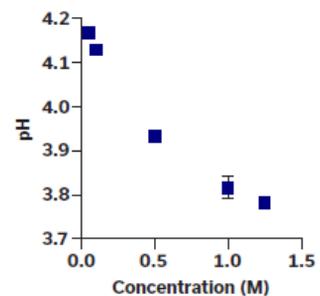
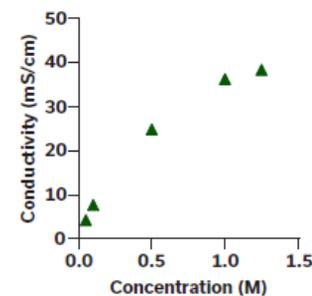
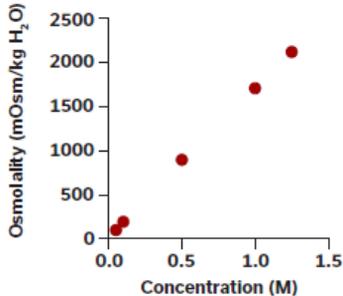
Tris-HCl



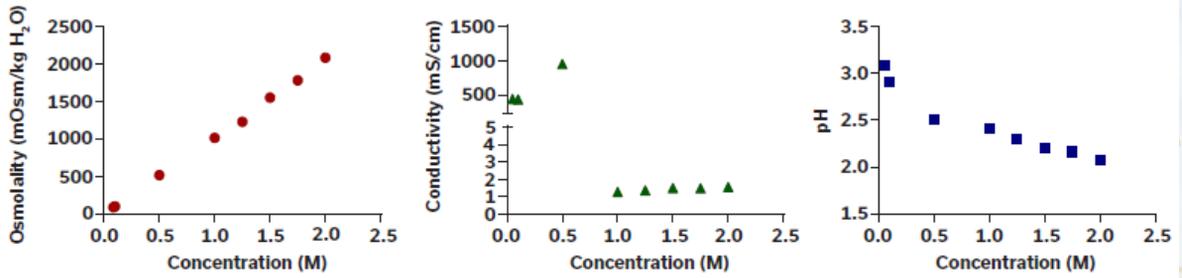
Phosphate Buffer



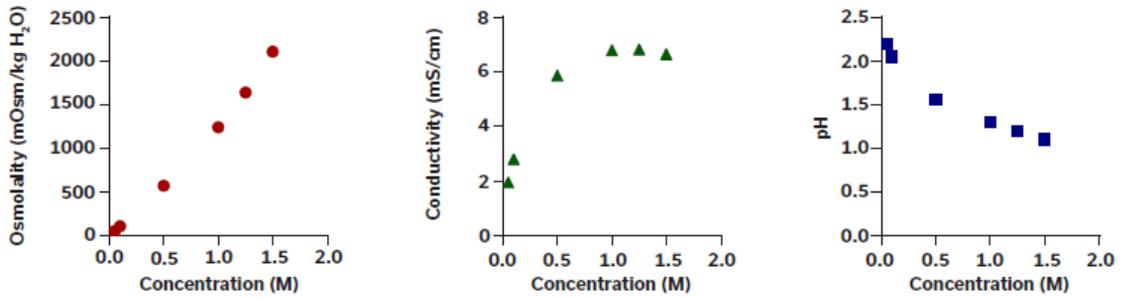
Citrate Buffer



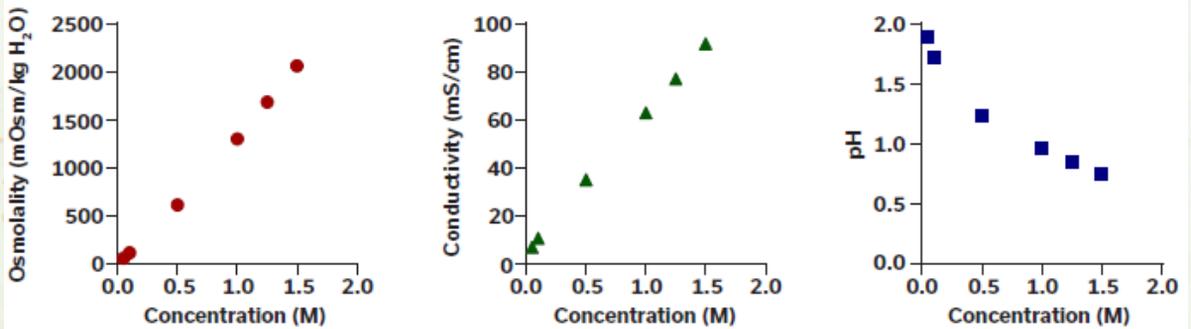
Acetic Acid



Citric Acid



Phosphoric Acid



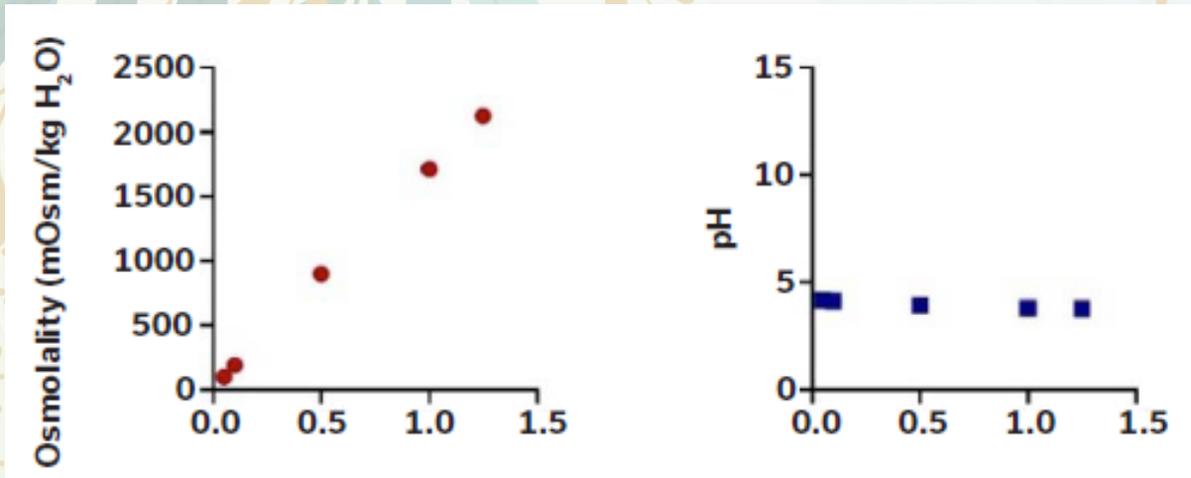


圖1. 檸檬酸鹽緩衝液濃度曲線上滲透壓和 pH 值的比較。Y 軸擴展了整個 pH 範圍，以突出顯示檸檬酸鹽緩衝液濃度之間相對較小的變化。滲透壓計的靈敏度遠高於 pH 探針，如 pH 濃度曲線的低斜率所示。

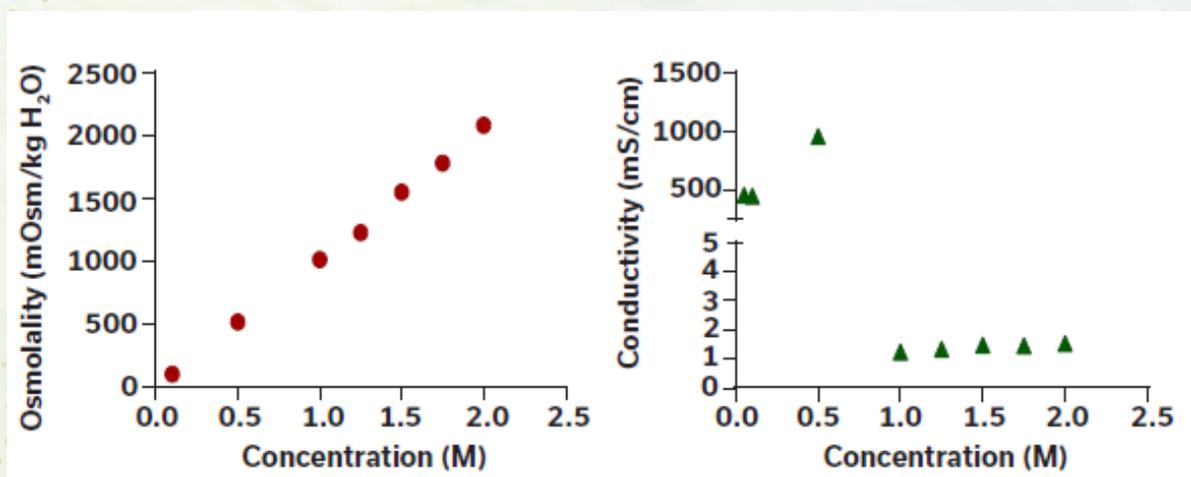


圖2. 乙酸 (弱離子溶液) 的電導率在濃度為1 M 時急劇下降，並隨著濃度的增加而保持恆定。

討論

數據顯示，pH 值和電導率不能提供 Tris、乙酸、檸檬酸和檸檬酸鹽等緩衝液濃度的最佳測量值範圍。另一方面，滲透壓為上述緩衝液提供了成比例的廣泛測量值範圍。雖然電導率和 pH 值在下游生物製程中具有明確的價值，但滲透壓可以提供有關緩衝液濃度的更多信息。測量 pH 值在下游生物製程中至關重要；然而，它缺乏靈敏度，因為範圍在緩衝液濃度範圍內變化很小。

例如，檸檬酸鹽緩衝液 (圖1) 的 pH 的測量範圍為0.5，而滲透壓的測量曲線則約500 mOsm/kg H₂O。這是普遍趨勢，表明滲透壓提供了比單獨測量 pH 值更寬的動態範圍和更高的靈敏度。電導率通常在下游緩衝液和試劑中測量，因為它提供了離子溶液濃度的概念。它對非離子和弱離子溶液 (如乙酸) 不可靠。在1 M 濃度以上，乙酸的電導率保持在1 mS/cm 左右 (圖2)，但這種影響並未反應在滲透壓測量中。

本研究證明了滲透壓作為常見下游緩衝液濃度測量的敏感性。這些數據支持滲透壓作為電導率和 pH 值的一個有價值的正交特性。由於滲透壓的敏感性增加，這將是幫助檢測緩衝液濃度或配方潛在問題的理想方法。鑑於測量的簡單性及其增加的價值，應考慮在下游製程工作流程中進行滲透壓測試，以提供更完整和全面的下游緩衝液製程數據。

References

1. Bratt, Jennifer, et al. Buffers in Biologics Manufacturing. BioProcess International 15.2(2017).
2. Challener, Cynthia. Behind the Scenes with Buffers. BioPharm International 28.2(2015).
3. Gronemeyer, Petra, et al. Trends in Upstream and Downstream Process Development for Antibody Manufacturing. Bioengineering 1.4(2014).
4. Leveling, Tony. The relationship between pH and Conductivity in a Lithium Contaminated, Deionized Water System. Pbar Note 675: The relationship between pH and Conductivity. Fermilab 2002.
5. West, Jonathan, et al. "PH Measurement." Visual Encyclopedia of Chemical Engineering, University of Michigan College of Engineering, 2018, encyclopedia.che.engin.umich.edu/Pages/ProcessParameters/pHMeasurement/pHMeasurement.html.
6. Manns, Reinhard and Jurgen Schleicher. Information on Conductivity Measurement. JUMO GmbH & Co. KG FAS 624 04.07(2007).
7. 原始文章：[Osmolality as a concentration measurement method for key buffers in bioprocessing](#)