

CO₂

СЕРИЯ «РАСТВОРЕННЫЙ CO₂»:

**Анализ современных технологий
измерения содержания
растворенного CO₂**



Содержание

Аннотация.....	3
1. Как должно контролироваться содержание растворенного CO ₂ в соответствии с принципами PAT	4
2. Косвенные методы измерения через расчеты (виртуальные датчики)	6
3. Лабораторные измерения и измерения у линии с помощью эталонных анализаторов.....	7
4. Измерения в байпасном канале с использованием анализаторов газа в пространстве над жидкостью	8
5. Измерения в потоке	9
5.1 Электрохимические датчики на основе детекторов pH: принцип Северингхауса.....	9
5.2 Оптохимические и спектроскопические датчики	11
6. Заключение.....	13
Глоссарий.....	14
Список литературы	16

Аннотация

Уже доказано, что в биофармацевтике содержание растворенного CO_2 является критическим параметром процесса (КПП). Измерение и регулирование этого параметра может быть очень полезным для оптимизации процесса, включая повышение выхода и качества продукции. Существует несколько распространенных методов измерения содержания CO_2 в биореакторе, каждый из которых имеет свои преимущества и недостатки. В этом информационном документе обсуждаются факторы, которые следует учитывать при выборе метода измерения содержания CO_2 , а также основные особенности и проблемы при использовании различных методов для управления ходом биопроцесса.

В этой статье также описаны расчетные методы на базе подхода с использованием, так называемых, «виртуальных» датчиков, автономные анализаторы, например, анализаторы газов крови (BGA), измерения в байпасном канале с помощью датчиков отходящих газов, измерения в потоке по принципу Северингхауса и возможности других технологий, например, оптических/ спектроскопических методов.

Ключевые слова:

растворенный углекислый газ, CO_2 , pCO_2 , биопроцессы, биореактор, PAT, измерения в потоке, измерения в реальных условиях, измерения в байпасном канале, лабораторные измерения, критический параметр процесса, управление в режиме реального времени, Северингхаус, недисперсионная инфракрасная спектроскопия (NDIR-спектроскопия), виртуальные датчики, анализ газа в пространстве над жидкостью, анализатор газов крови (BGA).

1. Как должно контролироваться содержание растворенного CO₂ в соответствии с принципами PAT

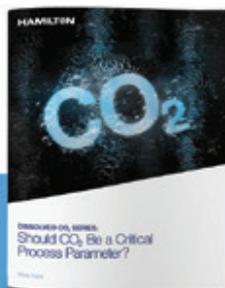


Рис. 1 Различные методы мониторинга параметров процесса, разрешенные директивой по PAT (2004 г.)¹ и рекомендуемые в современной научно-технической литературе.³

Углекислый газ оказывает многостороннее влияние на ход типичного биопроцесса. Будучи одновременно продуктом и реагентом метаболических процессов, а также неотъемлемым компонентом наиболее часто используемых буферных систем, он требует строгого поддержания его содержания на оптимальном уровне. Практически доказано, что это существенно увеличивает выход и качество конечного продукта.

Для определения оптимального профиля изменения содержания растворенного CO₂ (DCO₂) в биопроцессе, чтобы обеспечить непрерывное получение данных из реактора необходимо осуществлять измерение в потоке. Разработка такого оптимального профиля (или «золотой партии») на стадии НИОКР обеспечивает максимальную

производительность и качество продукции. DCO₂ является критическим параметром процесса (КПП), как определено руководящими принципами процессно-аналитической технологии (PAT) FDA¹. И, как КПП, для повышения эффективности биопроцесса он подлежит регулированию в режиме реального времени. Сочетание измерения в потоке с автоматическим управлением во время масштабирования процесса является ключевым моментом для его оптимизации и сокращения числа итераций при масштабировании в любую сторону. Чтобы получить полное представление о важности и преимуществах измерения и регулирования значения DCO₂, см. Часть 1 информационных материалов Hamilton серии «Растворенный CO₂»: «Почему содержание CO₂ является критическим параметром процесса».^A



Для получения дополнительной информации и примеров, демонстрирующих важность измерения DCO₂ в потоке, щелкните здесь, чтобы скачать Часть 1 информационных материалов серии «Растворенный CO₂».^A

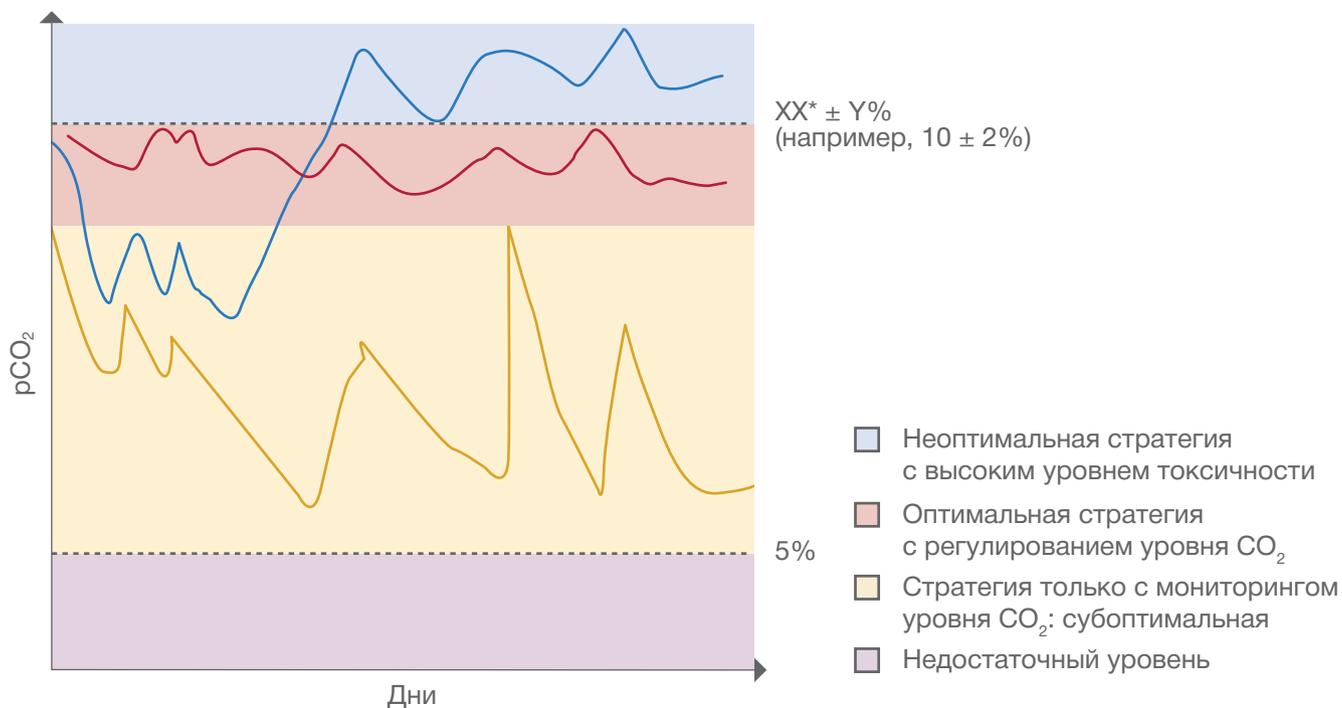
Существует несколько широко используемых подходов к измерению содержания DCO_2 в биореакторе. В этом информационном материале они приведены во всем разнообразии, включая те, которые используются при измерениях в лаборатории, в байпасном канале и в потоке.

При выборе наиболее подходящего метода измерения для конкретного случая необходимо учитывать несколько факторов. Как и любое аналитическое устройство, идеальный датчик DCO_2 должен быть в состоянии обеспечивать достоверные и высокоточные результаты при разумной стоимости. Рабочий диапазон должен охватывать типичные требования для условий культивирования, например, по давлению – от 30 до 110 мм рт. ст. (50–150 мбар) для клеточных культур млекопитающих. Ресурсостойкости технологии также очень важен. Устройство имеет ограниченное применение, если оно не может выдержать весь рабочий цикл биопроцесса, включая этапы очистки, в том числе, автоклавирование, безразборную стерилизацию (SIP) и/или мойку (CIP). Одно из самых сложных требований к процессно-аналитическим устройствам – селективность. Углекислый газ имеет очень сходные свойства с другими присутствующими в биореакторе летучими веществами, поэтому критически важно, чтобы выбранный метод измерений был нечувствительным к другим анализируемым веществам. Определение того, должно ли измерение выполняться в лаборатории, в байпасном канале, в потоке или при какой-либо их комбинации, является очень важным решением, которое слишком часто не зависит от пользователей. Например, содержание многих метаболитов было бы полезно измерять в потоке, но

в настоящее время не существует ни одной общепринятой технологии, способной обеспечить такое измерение именно в биопроцессах. Для измерения содержания DCO_2 в разных случаях имеются различные методы, достоинства и недостатки каждого из которых приведены ниже. Однако для того, чтобы в полной мере реализовать все преимущества мониторинга содержания DCO_2 , его, по крайней мере, необходимо осуществлять при измерениях в потоке и, при возможности, в автоматическом режиме (см. пример ниже). Это подробно продемонстрировано в научной литературе, первом томе этого информационного материала, и соответствует руководящим принципам PAT. С практической точки зрения, подходящий датчик DCO_2 , помимо необходимого быстродействия, должен иметь размеры и пригодность к стерилизации, соответствующие области применения. Наконец, идеальные средства измерения должны иметь низкие расходы на техническое обслуживание и обеспечивать надежность и безошибочность измерений, включая сохранение достоверности и точности в ходе множества различных процессов.

Абсолютно совершенной технологии измерения содержания DCO_2 для типичных биофармацевтических производств, которая бы удовлетворяла всем этим требованиям, не существует. Этот информационный материал призван дать представление о достоинствах и недостатках нескольких доступных методов измерения, включая метод «виртуальных» датчиков и использование лабораторных анализаторов, анализаторов в байпасном канале, анализаторов газа в пространстве над жидкостью и работающих в потоке датчиков.

Пример: Упрощенный пример использования регулирования уровня pCO_2 в режиме реального времени для максимального повышения продуктивности биопроцесса.^A



2. Косвенные методы измерения через расчеты (виртуальные датчики)



Математическое моделирование или многопараметрический анализ данных (MVDA) можно использовать для приблизительной оценки значения в отсутствие физических показаний. По этой причине их часто называют методами «программных» или «виртуальных» датчиков. Математическое моделирование включает заранее определенные и неизменяемые уравнения, относящиеся к механизму химических реакций, в то время как в MVDA используются алгоритмы непрерывного обучения, основанные на статистических данных. В обоих подходах для создания расчетной модели берется несколько переменных. Чтобы приблизительно определить уровень растворенного углекислого газа (DCO_2) в среде биореактора, необходимо принять во внимание множество факторов, особенно, если модель будет использоваться в экспериментах с масштабированием в большую сторону.² Использования только газовых законов, например, закона Генри,

Уравнение закона Генри:

$$H_{\text{CO}_2} = \frac{C_{\text{CO}_2\text{L}}}{P_{\text{CO}_2}} \left[\frac{\text{ммоль}}{\text{л бар}} \right]$$

недостаточно с учетом сложности взаимодействий DCO_2 в реакторе, поэтому требуется более сложное моделирование. Параметры, обычно учитываемые при расчетах DCO_2 с помощью MVDA, могут включать измерения уровня CO_2 в отходящих газах в соответствии с положениями закона Генри. Для успешного учета этого фактора необходимо создать модель фазового перехода CO_2 из жидкой среды в паровую фазу над жидкостью.³

Данные от установленного в потоке датчика pH используются из-за влияния CO_2 на pH и его участия в буферной системе.⁴

Должны также учитываться любые параметры, которые могут влиять на массоперенос, такие, например, как характеристики буфера и среды. Наконец, должна быть учтена вся доступная информация о клетках. В эти расчеты включаются респираторные данные, уровни содержания кислорода и другая информация, непосредственно относящаяся к популяции жизнеспособных клеток.⁵

В некоторых случаях MVDA или механистические расчеты могут дать максимально точное представление о содержании DCO_2 , но следует учитывать и недостатки этих методов. Их основной недостаток – сложность и необходимость приложения больших усилий для создания моделей и учета всех действующих факторов. Эти многочисленные факторы, каждый из которых имеет свои погрешности, влияют на расчеты. При этом итоговый расчет имеет точность, определяемую суммой этих погрешностей. Результат расчета сильно зависит от матрицы и, следовательно, привязан к конкретной установке. Выращивание клеточной культуры или ферментация – это органический процесс, идущий с непрерывными изменениями. Несмотря на все усилия по созданию постоянных условий и стабильной окружающей среды, хорошо известно, что содержимое реактора изменяется на протяжении всего процесса, и это неизбежно. Метод виртуальных датчиков хорошо подходит для налаженных процессов, которые очень хорошо исследованы, но такие изменения окружающей среды чрезвычайно затрудняют точное определение содержания DCO_2 в реакторе в ходе всего процесса. В ряде случаев такие расчеты могут быть выполнены достаточно быстро, чтобы можно было реализовать стратегию управления, даже если используются ручные настройки, но достоверность расчетов ставит под сомнение целесообразность такого подхода. Ограничения при определении критического параметра процесса, такого, например, как содержание растворенного CO_2 , от других параметров, наверное, наиболее очевидны при использовании расчетных методов для регулирования при планировании экспериментов, поскольку КПП сильно варьируются при разработке профиля золотой партии (иногда называемой «золотым стандартом»)⁶ При наличии соответствующей возможности, независимая от конкретной матрицы технология всегда является более надежным и часто более точным методом.

3. Лабораторные измерения и измерения у линии с помощью эталонных анализаторов

Достаточно распространенный подход к измерению содержания CO_2 в образце из биореактора – использование автономного анализатора газов крови (BGA).⁷ Анализаторы BGA особенно широко применяются на этапе НИОКР и в лабораторных экспериментах, поскольку их можно использовать в качестве эталонного инструмента при измерении многих параметров. Они также могут размещаться прямо на производственных площадках, например, для выполнения измерений у линии, но такое их применение встречается реже. Сравнительно редкое использование BGA на производстве объясняется тем, что они занимают много места и должны соответствовать всем нормативам по очистке и совместимости, действующим на производственном предприятии. Поддержание стерильности всего этого сложного прибора в целом может быть чрезвычайно обременительным, особенно с учетом процедур отбора проб и технического обслуживания. Гораздо чаще осуществляется отбор проб в производственной зоне с последующей передачей образца и зонда в лабораторию для автономной проверки, хотя также возможно использование пробоотборного зонда с автоматическим анализом прямо у производственной линии. Проверка в лабораторных условиях обеспечивает приемлемые, хотя и подверженные погрешности измерения, которые можно использовать при стандартном аналитическом методе анализа, но его сложность слишком велика для осуществления управления в режиме реального времени, как уже отмечалось в этой части.

Настольные лабораторные анализаторы обеспечивают возможность измерений без необходимости иметь дополнительные порты на биореакторе. Это очень удобно, поскольку ограниченное количество портов и/или малая свободная площадь на верхней крышке реактора – это основные причины отказа от использования полезной процессно-аналитической технологии. Помимо измерения содержания CO_2 , многие BGA могут быть объединены с другой технологией, которая позволяет параллельно анализировать pH, DO, метаболиты и даже количество клеток, например, плотность жизнеспособных клеток. В этом случае BGA является одной из технологий, встроенных в многоцелевой анализатор для лабораторных измерений/ измерений у линии. Когда имеется совпадение с параметрами, измеряемыми в потоке (обычно это pH и DO), эти анализаторы можно использовать в качестве эталонного прибора. Еще одним преимуществом их использования является то, что одно устройство может обслуживать несколько биореакторов, хотя это связано с некоторыми ограничениями в отношении доступности для многих образцов и эксплуатационных расходов (подробнее обсуждается ниже). Однако к этому методу измерений следует подходить с осторожностью, поскольку он имеет ряд недостатков и источников погрешностей.

Один из самых больших вкладов в расхождение между данными датчиков, установленных в потоке, и данными, получаемыми от BGA, вносится процессом обработки проб. Это особенно справедливо для измерения содержания CO_2 и других летучих анализируемых веществ. Отбор проб



Наивысшая точность измерений BGA



± 5 мм рт. ст. в диапазоне 30–60 мм рт. ст.

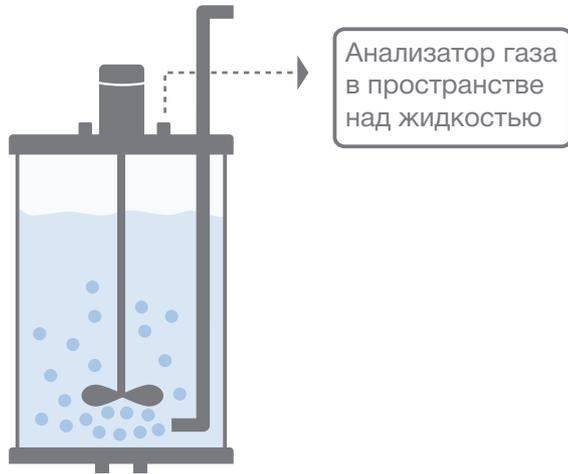
неизбежно приводит к изменению давления и температуры образца, что влияет на результаты измерения параметров CO_2 . Поскольку уровень DCO_2 обычно определяется по значению парциального давления, разница в температурах и общем давлении в системе может привести к значительным различиям результатов измерения в потоке и в лабораторных условиях. Как следует из названия приборов, анализаторы газов крови изначально использовались для определения pO_2 и pCO_2 в образцах крови. Такие приборы демонстрируют наивысшую точность в диапазонах величин, близких к их физиологическим значениям для человека (например, ± 5 мм рт. ст. в диапазоне 30–60 мм рт. ст.), в то время как при более высоких значениях измеряемых параметров (например, 100–200 мм рт. ст.) погрешность измерения может достигать ± 15 мм рт. ст.⁸ Как уже отмечалось выше, подобные анализаторы обычно используются для автономных лабораторных измерений, когда проба отбирается вручную, и затем образец переносится к анализатору. Для уменьшения ошибки выборки, экономии времени и трудозатрат в некоторых случаях может использоваться автоматизированный отбор образцов (например, при измерениях у линии), но у этого подхода, по-прежнему, имеются недостатки.

Независимо от метода измерений (в лаборатории или у линии), многоцелевой анализатор может использоваться только для относительно низкой плотности дискретных точек данных. На основе этих данных разработать способ управления очень сложно, а организовать автоматизированное управление в режиме реального времени в соответствии с нормативами PAT практически невозможно. Увеличить частоту отбора проб практически нереально, особенно в реакторах малого размера, из-за объема среды, забираемой с каждой пробой. Это справедливо даже в случае пробоотборных зондов для ультрафильтрации и диализа, где объем пробы относительно невелик. Для анализаторов также характерна большая стоимость приобретения и очень высокие затраты на обслуживание, что связано с использованием дорогих сменных картриджей. Стоимость проведения измерений с частотой, достаточной для реализации управления, непомерно высока. С точки зрения аналитики и статистики, чтобы считаться надежным, измерение должно проводиться в три раза. По причинам, обсуждаемым здесь, анализатор, как правило, будет использоваться для исследования только трех отобранных из одного биореактора образцов в день. Автономные устройства остаются основным эталонным инструментом анализа данных, но они имеют существенные ограничения по использованию для организации управления в режиме реального времени.

4. Измерения в байпасном канале с использованием анализаторов газа в пространстве над жидкостью

Измерения данных газов, находящихся над жидкостью, важны для определения содержания CO_2 в паровом пространстве биореактора и могут использоваться в сочетании с измерениями уровня DCO_2 для расчета таких параметров, как скорость выделения углекислого газа (СВУГ).^{3, 19} Основным преимуществом таких датчиков является то, что они могут быть установлены за стерильной стенкой реактора, что позволяет избежать необходимости выполнения любых требований по стерилизации, которым должны соответствовать датчики, размещаемые внутри реактора. Они также не подвержены проблемам ухода характеристик, присущих другим типам технологий измерения уровня CO_2 , поскольку работают по принципу измерения инфракрасного излучения, а не на основе косвенного электрохимического метода. Измерения инфракрасного излучения позволяют получать дополнительные данные, например, о кислороде в отходящих газах, а также о доле присутствующей воды. Эти достоинства делают измерение содержания CO_2 в пространстве над жидкостью ценным дополнением к другим методам анализа уровня CO_2 .

Анализ содержания газов в пространстве над жидкостью обеспечивает определение среднего по реактору



уровня CO_2 . Такой метод анализа уровня CO_2 отличается от метода, в котором измерения проводятся в местной среде (например, откуда была взята проба). Хотя эти методы измеряют два разных параметра, измерение уровня CO_2 в газовой фазе над жидкостью обеспечивает определенное дублирование по DCO_2 , поскольку предполагаемая взаимосвязь между фазами может дать некоторую аналитическую информацию. Эта ожидаемая взаимосвязь часто приводит к тому, что данные измерения в газовом пространстве над жидкостью используются в качестве

приближенного значения для уровня растворенного CO_2 , но это следует делать с осторожностью.

Предполагаемая эквивалентность этих двух типов измерений основана на предположении, что парциальное давление жидкой среды находится в равновесии с паровой фазой над жидкостью. Равновесие перехода может быть рассчитано с использованием закона Генри, но оно не обязательно является точным отображением состояния в реальном реакторе. Это связано с множеством факторов, которые могут влиять на постоянную Генри, с высокой вероятностью того, что равновесие не установилось в ходе процесса, и десорбцией, зависящей от фазовых условий. Как правило, парциальное давление CO_2 в жидкости будет выше, чем в газе, в противном случае десорбция в газовую фазу невозможна. Это может привести к значительному занижению уровня DCO_2 , если используются одни только измерения в газовой фазе над жидкостью.¹⁰ В ряде источников показано, что это может быть приемлемо только при определенных ограниченных условиях: при низких скоростях массопереноса и нестабильном состоянии¹¹ или в бесклеточных биопроцессах.¹² Различия между DCO_2 и содержанием CO_2 в газовой фазе над жидкостью могут стать критическими, особенно для биореакторов большого объема, где отношение площади поверхности к объему намного ниже, чем в реакторах малого размера. Большие различия между жидкой и газовой фазами также возникают в процессах с ограниченным количеством пеногасителя или вообще без него. Пена образуется на границе раздела между жидкостью и паровой фазой над ней, приводя к большому накоплению CO_2 и других газов в жидкости, чем это определяется законом Генри. Удержание газов в жидкой фазе препятствует их обнаружению анализаторами газа в пространстве над жидкостью.

В целом, анализ газа в пространстве над жидкостью может быть пригоден для регулирования уровня растворенного CO_2 в режиме реального времени только при определенных условиях, что ограничивает его применимость. Самый серьезный риск – недооценка уровня pCO_2 в биореакторе. Его обязательно следует учитывать. Исследования показывают, что даже кратковременное превышение допустимых пределов по CO_2 для культуры на ранних стадиях процесса может иметь долгосрочные пагубные последствия, даже при условиях, что pCO_2 возвращается к эталонным значениям.¹¹ По этой причине измерения в потоке/в реальных условиях всегда, когда это возможно, должны являться предпочтительным методом анализа для контроля уровня DCO_2 .

5. Измерения в потоке

5.1 Электрохимические датчики на основе детекторов pH: принцип Северингхауса

Как указано во введении и в рекомендациях ПАТ, измерение содержания растворенного CO_2 в биореакторе наиболее полезно, когда может быть реализована система управления для поддержания уровня DCO_2 в соответствии с «золотым» профилем. Лабораторные методы измерения давно и успешно используются для мониторинга уровня CO_2 в среде биореактора, но они не обеспечивают достаточной частоты замеров, необходимой для реализации автоматизированного управления. Электрохимические датчики, подобные тем, которые разработаны для измерения содержания растворенного кислорода, не могут использоваться при измерении DCO_2 , поскольку уровень CO_2 в воде не будет уменьшаться. Поэтому датчики DCO_2 для измерения в потоке работают по принципу Северингхауса, подходят для применения в жидких средах и разработаны под требования биофармацевтического производства.¹⁴

Эта технология была предложена доктором Джоном В. Северингхаусом в 1957 году¹⁶, и, несмотря на многочисленные исследования и разработки, основной принцип Северингхауса для потенциометрических датчиков CO_2 остался практически неизменным с момента его появления. Например, этот принцип, по-прежнему, лежит в основе большинства лабораторных анализаторов BGA, что позволяет легко сравнивать полученные при измерениях в потоке данные с эталонными. Работающие по принципу Северингхауса датчики позволяют измерять уровень CO_2 в реальных условиях и в режиме реального времени и могут использоваться для анализа газов и жидкостей. В этих датчиках используется метод косвенных измерений, в котором CO_2 проникает через проницаемую для CO_2 мембрану (обычно ПТФЭ или силикон) в раствор электролита (обычно бикарбонат). Повышенная концентрация CO_2 подкисляет этот раствор. Произошедшее снижение pH может быть использовано для расчета парциального давления DCO_2 . Расчеты могут выполняться автоматически в дополнительном ПО, но взаимосвязь CO_2 и pH должна быть хорошо изучена перед использованием этих данных.¹⁷ Этот принцип показал свою эффективность в типичных биопроцессах, но требует умелого обращения и строгого соблюдения рекомендаций.

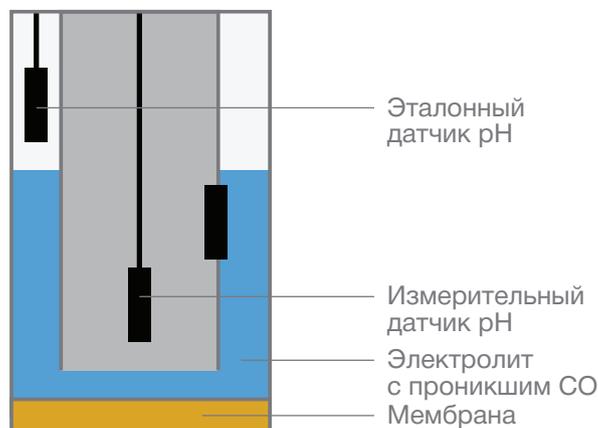


Рис. 2 Основные компоненты и порядок работы датчика Северингхауса для измерения содержания углекислого газа. Иллюстрация из раздела «Основы контроля углекислого газа».¹⁵

Наиболее существенные трудности при использовании датчика DCO_2 на базе принципа Северингхауса представляют вопросы обслуживания и калибровки. Эти датчики состоят из нескольких работающих вместе различных компонентов, которые часто нуждаются в замене или ремонте. Компонент, чаще всего требующий внимания, – это раствор электролита. На результат измерения уровня DCO_2 может влиять загрязнение или концентрация электролита, поэтому раствор необходимо часто пополнять и заменять при каждой калибровке. Мембрана этих датчиков также должна заменяться перед каждой калибровкой и не должна использоваться повторно. Для многих пользователей это означает замену мембраны для каждого процесса, партии или прогона. Самый дорогой и трудоемкий в обслуживании и при замене компонент – внутренний датчик pH. Его не нужно заменять так часто, как мембрану или электролит, но он подвержен тем же проблемам, что и обычный датчик pH, особенно когда он подвергается нескольким циклам автоклавирования. Кроме того, стеклянный электрод для измерения pH требует исключительно осторожного обращения. Контакт с чем-либо, кроме предполагаемых

компонентов (например, электролита, буферов или мембраны), может вызвать непоправимый ущерб, поэтому квалифицированные специалисты должны следить за тем, чтобы не касаться стекла руками или каким-либо предметом.

Калибровка датчиков Северингхауса может быть достаточно сложной и не исключает ошибок. Одним из первых шагов процедуры калибровки является осторожное снятие корпуса мембраны, не касаясь стеклянного электрода для измерения pH. Затем внутренний датчик pH необходимо откалибровать так же, как и традиционный датчик pH, хотя рекомендации производителя включают выдержку в течение не менее 10 минут в буфере с pH 7. Эта часть калибровки также может использоваться для определения необходимости замены датчика pH, например, если крутизна не соответствует спецификации. Сразу после калибровки датчика новый корпус мембраны необходимо заполнить электролитом (по возможности, необходимо удалить все воздушные пузырьки) и осторожно поместить его поверх стеклянного pH-электрода. Наконец, после замены втулки колпачка датчика, последний готов к установке. Калибровка электрохимических датчиков CO₂ особенно затрудняется, если необходимо проводить измерения во внелабораторных условиях и в растворах неизвестного и изменяющегося состава. Было обнаружено, что аналитически определенные концентрации CO₂ и концентрации, измеренные датчиком, могут значительно отличаться, если измерительный и калибровочный растворы существенно различаются по своему составу.¹⁵

Даже при идеально выполненной калибровке необходимо учитывать несколько факторов, влияющих на точность измерения. Как уже упоминалось, процедуры стерилизации, например, могут значительно повлиять на показания датчика. Автоклавирование и другие протоколы стерилизации (например, SIP) могут привести к смещению результата измерения, которое подлежит компенсации на этапе калибровки продукта с использованием параметров газа в реакторе. Если датчик какое-то время хранится на воздухе, часть электролита может испариться через мембрану. В этом случае его концентрация изменится, что приведет к смещению показаний при измерении. Тогда раствор



электролита необходимо будет заменить. При большой продолжительности процесса также может наблюдаться значительное смещение показаний из-за нестабильности электролита и тела мембраны. Летучие компоненты и слабые кислоты (например, легкоиспаряющаяся муравьиная кислота) могут взаимодействовать с электролитом, уменьшая его концентрацию и, тем самым, изменяя результат измерения (это довольно редкое явление, поскольку в большинстве процессов с клетками млекопитающих недопустимо низкие уровни pH не достигаются). Многие потенциальные причины ухода показаний приводят к необходимости повторной калибровки датчиков, даже в середине технологического процесса, что часто требуется для сохранения точности измерений, не соответствующих спецификациям.

И последнее, но не менее важное: как и датчик pH, датчики, построенные на основе принципа Северингхауса, необходимо устанавливать под правильным углом, чтобы обеспечивался надлежащий контакт с электролитом, и этому необходимо уделять особое внимание, особенно в биореакторах промышленного масштаба.

5.2 Оптохимические и спектроскопические датчики

Устанавливаемые в потоке датчики обладают присущими им преимуществами, связанными с возможностью измерений в режиме реального времени, как это предусмотрено инициативой PAT, но в настоящее время датчики на базе принципа Северингхауса являются единственным типом контрольных приборов, действительно подходящим для проведения измерений в биореакторе. Опволоконные зонды можно использовать для подключения к крупному спектрометру, но высокая стоимость и сложность этого типа измерений не позволяют в большинстве случаев считать такое решение подходящим для биореактора.

Ранее была доступна альтернатива в виде спектроскопических волоконно-оптических (оптохимических) датчиков типа зондов, но вариант с этой интересной технологией сейчас довольно сложно найти на рынке. В снятых с производства датчиках для измерения концентрации CO_2 в биореакторе использовался метод флуоресцентной спектроскопии (в УФ и видимой области спектра). Съёмные капсулы, содержащие раствор электролита и красителя (HPTS), вставляются в корпус датчика перед его последующей интеграцией в биореактор. Как и во всех датчиках Северингхауса, электролит в капсуле подкисляется в присутствии CO_2 . Краситель, содержащийся в растворе, имеет две длины волны флуоресценции. Соотношение интенсивности излучения этих двух пиков меняется в зависимости от уровня pH. Поэтому анализ спектра флуоресценции методом измерения соотношений может использоваться для определения pH раствора и, следовательно, концентрации DCO_2 в среде.

В известном исследовании Паттисон с соавторами обнаружили, что эта технология обладает многими привлекательными достоинствами для датчиков

растворенного CO_2 .¹⁸ Как обсуждалось в главе 1, подходящий датчик должен иметь соответствующие диапазон измерения, время отклика и точность и нечувствительность к изменениям в технологическом процессе. Было определено, что время отклика, равное 6 минутам, соответствует скорости изменения и частоте проведения корректировки, типичных для клеточных культур млекопитающих. Этот временной интервал, безусловно, короче, чем длительность процесса отбора проб и анализа при измерениях с использованием анализаторов BGA, и позволяет управлять процессом на основе данных находящегося в потоке датчика. Диапазон измерений был определен на уровне давления CO_2 0–180 мм рт.ст., что соответствует типичному рабочему диапазону для DCO_2 в клеточных культурах млекопитающих. Это исследование также показало отсутствие значительного дрейфа показаний или потери точности, связанных с продолжительностью процесса (хотя для разных по масштабу установок эффект различался), изменениями температуры или изменениями концентрации метаболитов. Проводился сравнительный анализ оптической технологии с красителем с двумя анализаторами BGA. Разница между результатами измерений в потоке и лабораторными измерениями оставалась относительно постоянной.

BGA часто калибровались с помощью газовых стандартов, поэтому предполагалось, что дрейф показаний у них незначительный. Различия между типами измерений следует ожидать в связи эффектами, связанными с отбором проб, такими, например, как выделение газов. Если смещение показаний между измерениями в потоке и лабораторными измерениями постоянно, то можно считать, что измерения в потоке более точно отображают условия процесса.



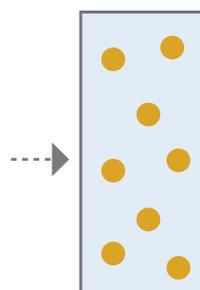
Рис. 3 Основные компоненты и схема работы датчика углекислого газа на базе метода NDIR-спектроскопии.

Другие достоинства датчиков этого типа вытекают из неотъемлемых преимуществ логометрического анализа, включая внутреннюю защиту от ошибок, связанных с фотообесцвечиванием, изменениями интенсивности источника, изменениями длины пути и разброса других показателей. Спектроскопические датчики этого типа сочетают в себе принцип Северингхауса и оптические методы и, таким образом, обладают недостатками обеих технологий. Датчики, работающие на базе принципа Северингхауса, подробно описаны в разделе 5.1. Спектроскопические (или оптохимические) датчики обычно требуют сложной обработки данных и наличия отдельного юстировочного стола для правильного приема и интерпретации сигнала. Такие дополнительные сложности могут привести к росту затрат, увеличению количества критических точек и необходимости обучения персонала методам устранения неполадок. Также было определено, что калибровка датчика этого типа для реактора объемом 30 л может занимать до 4 часов.¹⁸

В оптохимических и спектроскопических датчиках средней ИК-области спектра используется перспективная технология, имеющая множество достоинств, позволяющих применять ее в биопроцессах. В этом смысле технология недисперсионной инфракрасной спектроскопии (NDIR) без использования красителя является крайне многообещающей. Датчики на основе технологии NDIR работают на явлении зависимости поглощения электромагнитного излучения ИК-диапазона от концентрации, но, в отличие от традиционных спектрометров, используемых для определения состава материалов или газовых смесей, эти датчики не имеют никаких дисперсионных оптических компонентов (см. рис. 3, стр. 11). Этот компонент является одним из самых дорогостоящих составляющих спектрометра, поэтому недисперсионные ИК-датчики (NDIR-датчики) намного дешевле традиционных спектрометров. В этом методе анализа используется только одна определенная, прошедшая через среду длина волны, соответствующая полосе поглощения исследуемого газа (в данном случае CO_2), а не весь излучаемый источником спектр. В соответствии с законом Бера-Ламберта, по мере увеличения концентрации CO_2 происходит поглощение все большей доли излучения на указанной длине волны. Данные об ослаблении излучения

Закон Бера-Ламберта

$$A = \epsilon \ell c$$



- A = поглощение
- ϵ = коэффициент молярной экстинкции, или поглощающая способность ослабляющих излучение соединений
- ℓ = оптическая длина пути, см
- c = концентрация ослабляющих излучение соединений

с данной длиной волны затем можно использовать для определения концентрации CO_2 .

Такие сенсорные технологии обеспечивают возможность точного измерения уровня CO_2 в режиме реального времени. Кроме того, эти датчики практически всегда являются твердотельными, поэтому их можно устанавливать под любым углом. В настоящее время имеется множество NDIR-датчиков CO_2 , но направление их применения связано, в основном, с контролем качества воздуха, управлением вентиляцией в инкубаторах или теплицах, экологическим контролем и регулированием процессов горения, автомобильным транспортом, а также с измерением содержания растворенного CO_2 в пресной воде.²⁰ Наиболее сложной проблемой при адаптации этой технологии для использования в биореакторе является удаление воды с пути распространения излучения. Насколько нам известно, в настоящее время не существует датчика для измерений в линии, способного использовать преимущества NDIR или оптической технологии в целом для измерения содержания растворенного CO_2 , который соответствовал бы действующим в биофармацевтической промышленности требованиям, таким, например, как миниатюризация в формате 12 мм (технологическое соединение PG 13.5) и стойкость к процедурам безразборной мойки и стерилизации.

6. Заключение

В настоящее время существует множество способов мониторинга содержания растворенного CO₂ в биореакторе и множество факторов, которые следует учитывать при выборе наиболее подходящего метода для этого (см. табл. 1). Во многих случаях наиболее выгодным будет сочетание нескольких различных методов. Метод виртуальных датчиков, основанный на использовании результатов измерений различных других параметров, достаточно сложен и трудоемок для точного и независимого от матрицы определения уровня CO₂. Лабораторные измерения могут быть очень полезны для сравнения с эталонными стандартами, но не в состоянии обеспечить достаточную частоту получения данных для организации реальной стратегии управления. Измерения в байпасном канале и, в частности, в газовом пространстве над жидкостью, дают более регулярную информацию, но не позволяют достаточно точно определить уровень растворенного CO₂. Максимальное повышение эффективности технологического процесса за счет регулирования уровня CO₂ возможно только при использовании измерений в потоке. Непрерывное поступление данных по DCO₂ в режиме реального времени обеспечивают датчики Северингхауса, и в настоящее время они являются единственной доступным средством для измерений в потоке.

К сожалению, они требуют большого объема работ по техническому обслуживанию и, в большинстве случаев, обладают недостаточной точностью и стойкостью для использования в системах управления биопроцессами.^B Оптические ИК-датчики для измерений в потоке демонстрируют хороший потенциал в плане преодоления этих недостатков, но сейчас нет их доступных вариантов, пригодных для повторного использования и подходящих для применения в биофармацевтике.

Поэтому усилия по совершенствованию технологии измерения DCO₂ должны быть направлены на создание датчика для измерений в потоке, не требующего трудоемкого обслуживания и обладающего достаточными для организации управления технологическим процессом точностью и надежностью. Он также должен сохранять характеристики, необходимые для биофармацевтических датчиков, должен быть выполнен в санитарном исполнении и выдерживать процедуру стерилизации. Конечная цель – это решение, которое позволяет надлежащим образом регулировать содержание CO₂, являющееся критическим параметром процесса, проходящего в биореакторе.

Табл. 1 Достоинства и недостатки наиболее распространенных технологий измерения содержания CO₂

	Мониторинг в режиме реального времени	Мониторинг в реальных условиях	Точный контроль процесса при давлении 50–150 мбар	Стойкость при контроле процесса (в отношении SIP)	Селективность для растворенного CO ₂	Не требуется особого ухода/простота эксплуатации	Любой угол размещения
Виртуальный датчик	+	н/п	+	н/п	+	-	н/п
Измерения в байпасном канале (в пространстве над жидкостью)	+	н/п	+	н/п	+	+	+
Лабораторные измерения, анализатор BGA, принцип Северингхауса	-	н/п	+	н/п	-	++	н/п
Электрохимический метод, принцип Северингхауса	++	+	+	+	-	-	-
Оптический метод, принцип Северингхауса	++	+	+	+	-	+	+
Измерения в реальных условиях/в потоке, оптический метод, NDIR	++	н/п	++	++	++	++	++

Глоссарий

Определения для этого глоссария взяты из информационных материалов Hamilton Whitepapers ^{A, B} или руководящих указаний PAT, если не указано иное.

Закон Бера-Ламберта

Закон Бера-Ламберта, также известный как закон Бера, закон Ламберта-Бера или закон Бера-Ламберта-Бугера, определяет зависимость ослабления пучка света от свойств среды, через которую он распространяется. ²³ Этот закон обычно используется при измерениях, связанных с химическим анализом, и в физической оптике – для объяснения ослабления потоков фотонов и нейтронов, а также распространения излучения в разреженных газах.

Общеизвестное и практическое выражение закона Бера-Ламберта связывает ослабление распространяющегося через физическую среду, содержащую один поглощающий компонент (например, CO₂) с равномерной концентрацией, оптического излучения с длиной оптического пути через образец и поглощающей способностью молекул этого компонента. Закон выражается следующим уравнением:

$$A = \epsilon l c$$

A – поглощение

ϵ – коэффициент молярной экстинкции, или поглощающая способность ослабляющих излучение соединений

l – оптическая длина пути, см

c – концентрация ослабляющих излучение соединений

Скорость выделения углекислого газа (СВУГ)

Этот параметр относится к CO₂, выделяемому клеточной культурой или в результате микробиологической ферментации (моль/л ч). СВУГ рассчитывается путем вычитания постепенно накапливающегося пула неорганического углерода (соответствующего постепенному образованию NaHCO₃) из СПУ.²⁹

$$\text{СВУГ} = \text{СПУ} - \text{Постепенно накапливающийся пул неорганического углерода}$$

Критический параметр процесса (КПП)

Критический параметр процесса определяется в соответствии с терминологией процессно-аналитической технологии (PAT). Это параметр технологического процесса, изменения которого влияют на критический показатель качества (КПК) и который поэтому должен контролироваться или регулироваться для обеспечения необходимого качества в данном процессе.

Примеры КПП: pH, содержание растворенного кислорода и CO₂

Критический показатель качества (КПК)

Критический показатель качества определяется в соответствии с терминологией процессно-аналитической технологии (PAT). Это физическое, химическое, биологическое или микробиологическое свойство или характеристика, которое должно находиться в допустимых пределах или иметь определенное распределение для обеспечения необходимого качества продукта.

Пример КПК: профили гликолизирования моноклональных антител. Если профили гликозилирования неправильные, то сворачивание белков происходит не так, как требуется, что ведет к потере терапевтического эффекта.

Скорость переноса углерода (СПУ)

Скорость переноса углерода соответствует скорости перехода CO₂ в биореакторе из газовой в жидкую фазу (моль/л ч).

Растворенный CO₂

Уровень растворенного CO₂ (или DCO₂) – критический параметр биопроцесса. Повышенный уровень растворенного углекислого газа вреден и может подавлять рост клеток и снижать выработку метаболитов, таких, например, как моноклональные антитела (mAb). Уровень растворенного CO₂ обычно характеризуется парциальным давлением CO₂ (pCO₂). При анализе процессов величина pCO₂ может выражаться в различных единицах. Для облегчения сравнения данных поставщиков и научно-технической литературы ниже представлена таблица соотношений наиболее распространенных единиц измерения pCO₂.

Ед. изм.	pCO ₂	мбар	кПа	мм рт. ст.	об. %
мбар		1	0,1	0,750	0,1
кПа		10	1	7,50	1
мм рт. ст.		1,33	0,133	1	0,13
об. %		10	1	7,5	1

*При температуре 25С и атмосферном давлении P = 1,013 мбар

Растворенный O₂

Уровень растворенного кислорода (DO или pO₂) – еще один критический параметр биопроцесса. С целью поддержания жизнеспособности клеток в биореактор подается обычный или обогащенный кислородом воздух. Кислород служит для клеточного дыхания и способствует ускоренному росту клеток. Следует отметить, что уровень DO можно регулировать в более широком диапазоне, чем pH; при этом значительного влияния на интенсивность роста клеток и качество конечного продукта не происходит. Типичные значения уровня насыщения растворенным кислородом для аэробных культур находятся в диапазоне от 30 до 40%. Значения DO, лежащие ниже этого диапазона, приводят к снижению жизнеспособности клеток, а находящиеся выше него способствуют окислению конечного продукта.

Управление США по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств (FDA)

FDA несет ответственность перед правительством США за защиту здоровья населения, обеспечивая безвредность, эффективность и безопасность лекарств для человека и ветеринарных препаратов.

Закон Генри

В водном растворе с pH 7 растворенный CO₂ присутствует, в основном, в двух неорганических формах: в форме свободного водного диоксида углерода (CO₂ (водн.)) и в форме бикарбонат-иона (HCO₃⁻). Согласно закону Генри, растворимость CO₂ в водных растворах зависит от pCO₂ в паровой фазе над жидкостью.

$$H_{CO_2} = \frac{C_{CO_2L}}{P_{CO_2}} \left[\frac{\text{ММОЛЬ}}{\text{Л БАР}} \right]$$

Закон Генри помогает проиллюстрировать, почему DCO₂ обычно выражается в единицах парциального давления CO₂ (pCO₂), а не молекулярной концентрации.^A

К_LA

К_LA соответствует объемному коэффициенту массопереноса кислорода или CO₂ биореактора и является одним из параметров, характеризующих его.⁶

Ключевой производственный индикатор (КПИ)

Ключевой производственный индикатор определяется в соответствии с терминологией процессно-аналитической технологии (РАТ). КПИ отражает результат работы каждого этапа производственного цикла. Показатели КПИ связаны с КПК и поэтому зависят также от КПП. Когда КПП остается в допустимых пределах, КПИ будет показывать, что каждый этап производства проходит правильно, а КПК конечного продукта будет также находиться в допустимом диапазоне.

Примеры КПИ: плотность жизнеспособных клеток, жизнеспособность культуры, титр продукта Мониторинг/измерение у производственной линии

Измерение, при котором образец отбирается, изолируется и анализируется в непосредственной близости от технологического потока.

Мониторинг/измерение в потоке/в реальных условиях

Измерение, при котором образец не удаляется из технологического потока и которое может быть инвазивным или неинвазивным.

Мониторинг/измерение в байпасном канале

Измерение, при котором образец выводится из производственного процесса и может быть возвращен обратно в технологический поток.

Мониторинг/измерение в лабораторных условиях

Образец отбирается из реактора в стерильных условиях и после предварительной обработки (например, фильтрации или разведения) проходит исследование в лаборатории.

Скорость переноса кислорода (СПК)

Скорость переноса кислорода соответствует скорости перехода CO_2 в биореакторе из газовой в жидкую фазу (моль/л ч).

Скорость усвоения кислорода (СУК)

Этот параметр относится к кислороду, поглощаемому клеточной культурой или при микробиологической ферментации (моль/л ч).

Процессно-аналитическая технология (РАТ)

Руководящие материалы по процессно-аналитической технологии выпущены в 2004 году FDA. Они предназначены для описания нормативной базы, которая будет стимулировать добровольную разработку и внедрение инновационных решений в области фармацевтики, производство и обеспечение необходимого качества.

Дыхательный коэффициент (ДК)

Дыхательный коэффициент (ДК) представляет собой количество молей углекислого газа, выделяемого на моль кислорода, потребляемого клеточной культурой в ходе биопроцесса. Это косвенный, но довольно быстрый способ определения нехватки субстрата в питательной среде.²⁸ Он выражается следующим образом:²⁹

$$ДК = \text{СВУГ/СУК}$$

Увеличение/уменьшение масштаба

Увеличение и уменьшение масштаба – это термины, относящиеся к переводу биопроцесса со стадии НИОКР на стадию опытного образца или промышленной установки (увеличение масштаба) или наоборот (уменьшение масштаба). Экспериментальные и промышленные реакторы обычно сильно отличаются по устройству от лабораторных. Увеличение объема биореактора при масштабировании снижает СПК и влияет на СВУГ, что дополнительно приводит, например, к более медленному обнаружению DO. Если алгоритмы ПИД-регулирования рассчитаны на меньший масштаб установки, реакция будет неточной.

Коэффициент массопереноса для кислорода, K_{La}, должен оставаться постоянным в процессе масштабирования, чтобы можно было точно предсказать величину СПК или СВУГ. Для настройки алгоритмов регулирования содержания растворенного кислорода требуется проводить частые пробные запуски.

Список литературы

1. U.S. Department of Health and Human Services: *Guidance for Industry. PAT - A Framework for Innovative Pharmaceutical Development, Manufacturing, and Quality Assurance*. Rockville, 2004.
 2. C. He, P. Ye, H. Wang, X. Liu, F. Li, A systematic mass-transfer modeling approach for mammalian cell culture bioreactor scale-up, *Elsevier, Biochemical Engineering Journal*, Volume 141, p. 173-181, 2019.
 3. A. W. Nienow, *Mass Transfer and Mixing Across the Scales in Animal Cell Culture*, Springer, *Animal Cell Culture*, p. 137-167.
 4. B. Blombach, R. Takors, CO₂ - Intrinsic product, essential substrate, and regulatory trigger of microbial and mammalian production processes. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, Volume 3, Article 108, <http://www.frontiersin.org/>, 2015. M. Brunner, J. Fricke, P. Kroll, C. Herwig, Investigation of the interactions of critical scale-up parameters (pH, pO₂, and pCO₂) on CHO batch performance and critical quality attributes, Springer, *Bioprocess and Biosystems Engineering*, October 2016.
 5. J. Glassey (coordinator), *General framework for data representation with small batch numbers, across process scales, EU-Horizon 2020 - Marie Curie ITN project BIORAPID*, Ref. Ares(2017) 3271006 - 29/06/2017.
 6. C. Klinger, V. Trinkaus, T. Wallocha, Novel Carbon Dioxide-Based Method for Accurate Determination of pH and pCO₂ in Mammalian Cell Culture Processes, MDPI, *Processes*, 28 April 2020.
 7. Stat Profile® PRIME™ CCS Analyzer - Prime CCS Instructions for Use Manual, Nova Biomedical Corporation, 2014.
 8. B. Frahm, HC. Blank, P. Cornand P, IN. Oelssner, U. Guth, P. Lane, A. Munack, K. Johannsen, R. Portner, Determination of dissolved CO₂ concentration and production rate of mammalian cell suspension culture based on off-gas measurement, Elsevier, *Journal of Biotechnology*, Volume 99, Issue 2, p. 133-148, 23 October 2002.
 9. H. Buhler, R. Bucher, Application of electrochemical sensors, *Dissolved Carbon Dioxide*, *Bioprocess Technology*: p. 158-167, 1990.
 10. Frahm B., Portner R. CO₂ - off-gas measurements for animal cell culture processes, Technische Universitat Hamburg-Harburg, *Bioprozess- und Bioverfahrenstechnik*, 13th ESACT UK Meeting, January 2003.
 11. C. Klinger, H. Muller, Carbon dioxide driven pH reference method for transfer and scaling of fermentation processes, Application report, <https://www.bluesens.com/>.
 12. M. Becker, L. Junghans, A. Teleki, J. Bechmann, R. Takors, The Less the Better: How Suppressed Base Addition Boosts Production of Monoclonal Antibodies With Chinese Hamster Ovary Cells, *Frontiers, Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, Vol. 7 Article 76, 2019.
 13. W. OelBner, J. Zosel, CO₂ Measurement in Biotechnology and Industrial Processes, Wiley-VCH, *Carbon Dioxide Sensing*: p. 349-366, 2019.
 14. M. Deckter, W. OelBner, J. Zosel, Electrochemical CO₂ Sensors with Liquid or Pasty Electrolyte, Wiley-VCH, *Carbon Dioxide Sensing*: p. 87-116, 2019.
 15. J. W. Severinghaus, The invention and development of blood gas analysis apparatus, *Anesthesiology*, 97(1)253-6, July 2002.
 16. J. Zosel, W. OelBner, M. Decker, G. Gerlach, U. Guth, The measurement of dissolved and gaseous carbon dioxide concentration, IOP Publishing, *Measurement Science Technology*, Vol 22, 2011.
 17. R. N. Pattison, J. Swamy, B. Mendenhall, C. Hwang, B. T. Frohlich, Measurement and control of dissolved carbon dioxide in mammalian cell culture processes using an in situ fiberoptic chemical sensor, Wiley, *Biotechnology Progress* 16, p. 769-774, 2000.
 18. S. Winckler, R. Krueger, T. Schnitzler, W. Zang, R. Fischer, M. Biselli, A sensitive monitoring system for mammalian cell cultivation processes: a PAT approach, Springer, *Bioprocess Biosyst Engineering*, September 2013.
 19. G. Gerlach, *Non-dispersive Infrared Sensors*, Wiley-VCH, *Carbon Dioxide Sensing*: p. 157-190, 2019.
 20. A.K. Srivastava, S. Gupta, *Comprehensive Biotechnology*, Academic Press, 2011.
 21. S. Rameez, Establishing improved O₂ supply, lower dCO₂ built up and pH control in large scale Single-Use BioReactors (SUBR), 45 th ACS National Meeting & Exposition, New Orleans, <https://www.slideshare.net/kbibioharma/establishing-improved-o2-supply-lower-dco2-built-up-and-ph-control-in-large-scaie-singleuse-bioreactors>, 2013.
 22. https://en.wikipedia.org/wiki/Beer-Lambert_Law, February 2021.
- Публикации Hamilton, упомянутые в настоящем документе, доступны для скачивания на сайте www.hamiltoncompany.com.
- A. Почему содержание CO₂ является критическим параметром процесса, REF. 1110031179, 2021.
 - B. Процессно-аналитическая технология в фармацевтике. Показатели качества, критические параметры процесса и ключевые производственные индикаторы для биореакторов, REF. 695237, 2018.

000 «Диаэм»

Москва

ул. Магаданская, д. 7, к. 3 ■ тел./факс: (495) 745-0508 ■ sales@dia-m.ru

www.dia-m.ru

С.-Петербург

+7 (812) 372-6040
spb@dia-m.ru

Новосибирск

+7(383) 328-0048
nsk@dia-m.ru

Воронеж

+7 (473) 232-4412
vrn@dia-m.ru

Йошкар-Ола

+7 (927) 880-3676
nba@dia-m.ru

Красноярск

+7(923) 303-0152
krsk@dia-m.ru

Казань

+7(843) 210-2080
kazan@dia-m.ru

Ростов-на-Дону

+7 (863) 303-5500
rnd@dia-m.ru

Екатеринбург

+7 (912) 658-7606
ekb@dia-m.ru

Кемерово

+7 (923) 158-6753
kemerovo@dia-m.ru

Армения

+7 (094) 01-0173
armenia@dia-m.ru

