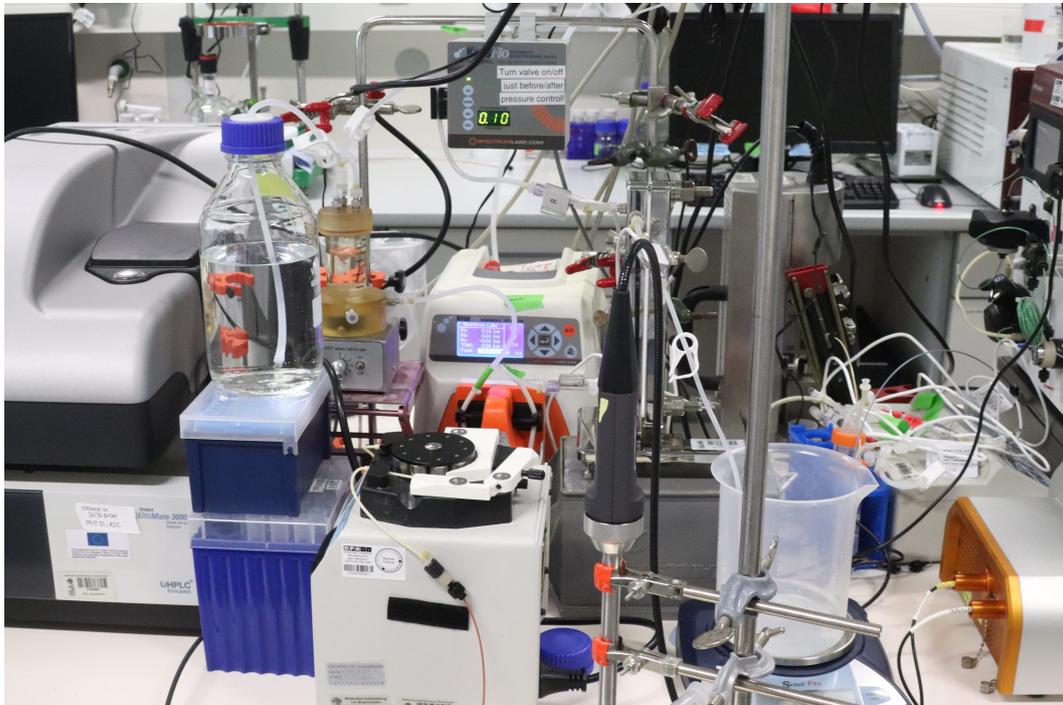


Untersuchung einer Querstromfiltration mit Hilfe von Ramanspektroskopie



Abschlussdokumentation der Kooperationsphase 2021/22

Durchgeführt am Institut für Bio- und Lebensmitteltechnik
Betreut durch Annabelle Dietrich, Jan Weggen, Christina Wegner

Frederike Dasselaar, Kurs KA 16
Xinyuan Wang, Kurs KA 16

Abstract

Ever since Covid-19 has had such a large impact on our society, we are much more aware of the significance of vaccines.

As their production is difficult and strictly controlled, it contains lots of production and cleansing method. One of those being the tangential flow filtration. The aim of the project described in the following article was to monitor such a filtration, using Raman spectroscopy as an analysis method.

Therefore, two proteins were separated with a tangential flow filtration. The results of the Raman spectroscopy were compared to UV/VIS spectroscopy examining the same process.

Although the efficiency of the tangential flow filtration was evident in the results, the examined proteins could not be detected in the Raman spectra.

As a result, concentration and combination of a filtered substance must be adjusted to Raman spectroscopy to get usable results with it.

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|--|------------|
| 1 | Einleitung | 1 |
| 2 | Theorie | 1 |
| 2.1 | Proteine | 1 |
| 2.2 | Querstromfiltration | 2 |
| 2.3 | Analytik | 2 |
| 2.4 | Ramanspektroskopie | 3 |
| 2.4.1 | Rayleigh-Streuung | 3 |
| 2.4.2 | Raman Effekt | 3 |
| 2.4.3 | Ramanspektrum | 3 |
| 2.5 | UV/VIS-Spektroskopie | 4 |
| 3 | Material und Methoden | 5 |
| 3.1 | Experiment | 5 |
| 3.1.1 | Versuchsvorbereitung | 5 |
| 3.1.2 | Kalibriergerade | 6 |
| 3.1.3 | Durchführung des Versuchs | 6 |
| 3.1.4 | Prozessanalytik | 7 |
| 3.2 | Prozesssteuerung und Benutzeroberfläche | 8 |
| 3.2.1 | Modbus | 8 |
| 3.2.2 | Matlab | 8 |
| 4 | Ergebnisse | 8 |
| 4.1 | Programmablauf | 8 |
| 4.2 | Experiment | 10 |
| 4.2.1 | Ramanspektroskopie | 10 |
| 4.2.2 | Querstromfiltration | 11 |
| 4.2.3 | Auswertung NWP-Test | 12 |
| 5 | Diskussion | 12 |
| 5.1 | Auswertung der Messergebnisse | 12 |
| 5.2 | Fehlerbetrachtung | 12 |
| 5.2.1 | Messfehler | 12 |
| 5.2.2 | Fehler in der Schnittstellenbeschreibung | 13 |
| 5.3 | Fazit und Ausblick | 13 |
| 6 | Danksagung | 14 |
| 7 | Literatur | III |
| 8 | Selbstständigkeitserklärung | IV |

1 Einleitung

Impfungen spielen heutzutage in unserem Leben eine sehr große Rolle. Neugeborene werden ab der sechsten Lebenswoche mit einer Reihe von verschiedenen Impfstoffen vor Infektionen und Krankheiten geschützt. Vor allem durch die Corona-Pandemie rücken Impfungen und Impfstoffen immer mehr in den Fokus der Öffentlichkeit. Die Pandemie zeigte dabei, dass die Entwicklung eines geeigneten Impfstoffes oft sehr schwierig und auch langwierig ist. Dabei muss der Impfstoff zusätzlich passend dem Patienten verabreicht werden können. Während der Herstellung von Impfstoffen sind die Wirkstoffe oft in Puffern gelöst, die schädlich für den Menschen sind, oder der Wirkstoff ist in zu geringer Konzentration gelöst. Ein möglicher Prozess zur Behebung dieser Probleme ist die Querstromfiltration. Die Querstromfiltration kann sowohl den Wirkstoff aufkonzentrieren als auch den Puffer, in dem der Impfstoff gelöst oder suspendiert ist, austauschen. Der Pufferaustausch ist zum Beispiel immer dann nötig, wenn der vorherige Puffer bei der Impfstoffherstellung benötigt wurde, jedoch nicht in den menschlichen Körper injiziert werden darf.

Zur Untersuchung der Querstromfiltration werden eine Reihe von Sonden und Sensoren verwendet, zum Beispiel pneumatische Sonden oder eine Waage zur Bestimmung der Menge der filtrierten Flüssigkeit. Ein spezielles Messgerät ist dabei die Raman-Sonde, die für die Konzentrationsbestimmung von verschiedenen Stoffen verwendet wird. Die Konzentrationsbestimmung ist für die Untersuchung der Querstromfiltration von großer Bedeutung, weshalb sich diese Arbeit genauer damit beschäftigen wird.

2 Theorie

2.1 Proteine

Proteine sind Makromoleküle aus Aminosäuren, die durch Peptidbindungen verknüpft sind. Sie erfüllen in Organismen unterschiedliche Funktionen, so sind sie z.B. Biokatalysatoren, Botenstoffe, Antikörper oder Muskelfasern. Sie werden in Zellen über die Proteinbiosynthese aus der durch die DNA gegebenen Information hergestellt. Die räumliche Struktur eines Proteins kann mithilfe von vier Ebenen beschrieben werden:

- Die Primärstruktur beschreibt die Abfolge der Aminosäuren in der Polypeptidkette eines Proteins.
- In der Sekundärstruktur wird die räumliche Anordnung der Primärstruktur dargestellt. Dabei wird unterschieden zwischen ungeordneten und geordneten Strukturen. Zu den geordneten Strukturen gehören z.B. die α -Helix und das β -Faltblatt, die durch Wasserstoffbrücken zwischen den Peptidgruppen der Aminosäuren zustandekommen.
- Die Tertiärstruktur beschreibt die räumliche Anordnung, die durch Wechselwirkungen und Bindungen zwischen den Resten der Aminosäuren verursacht wird.
- In der Quartärstruktur wird die übergeordnete räumliche Anordnung der Tertiärstrukturen wiedergegeben. Die Wechselwirkungen und Bindungen bilden sich hierbei wieder zwischen den Resten der Aminosäuren der Tertiärstrukturen.

Proteine können daher eine sehr große Vielfalt an Strukturen und damit verbunden auch eine große Variabilität an Eigenschaften und Funktionen aufweisen. Allein schon die Anzahl der Aminosäuren variiert zwischen >50 und <1000 .

2.2 Querstromfiltration

Charakteristikum einer Querstromfiltration, einer speziellen Art der Filtration, ist der parallel zur Filtermembran verlaufende Flüssigkeitsstrom. Nur durch angelegten Druck kommt es zur Filtration der Partikel an den Seiten des Stroms. Der Teil der Probe, der durch den Filter gedrückt wird, nennt sich Permeat, ist bei einer Querstromfiltration aber meist nicht das Zielprodukt. Die nicht filtrierte Probenanteile nennen sich Retentat und können wiederholt parallel am Filter vorbeigeleitet werden. Eine Zirkulation des Retentats ist nötig, um am Ende ein nahezu reines Retentat zu erhalten, denn pro Filterdurchlauf wird nur ein Bruchteil des zu filtrierenden Permeats wirklich filtriert.

Eine Querstromfiltration kann sowohl der Aufkonzentrierung als auch der Änderung der Zusammensetzung einer Suspension dienen. Soll beispielsweise in der Pharmazie ein Puffer ausgetauscht werden, nutzt man die sogenannte Diafiltration. Bei dieser wird ein neuer Puffer kontinuierlich zum Retentat hinzugefügt. Gleichzeitig wird mit jedem Durchlauf der alte Puffer durch die Membran filtriert. Aus diesem Grund bleibt das Volumen des Retentats bis zum Ende der Querstromfiltration dasselbe.

Bei der Diafiltration besitzt das (konstante) Volumen des Retentats eine Aussagekraft, es wird Diavolumen genannt. Ändert sich das (nicht konstante) Volumen des Permeats einmal um das Volumen des Retentats, ändert es sich um ein Diavolumen. Ist das Ziel der Querstromfiltration allerdings die Aufkonzentrierung eines Stoffes, wird das Volumen des Retentats vermindert. Dies nennt sich Ultrafiltration.

Die Querstromfiltration stellt eine Alternative zur herkömmlichen Dead-End-Filtration dar, bei welcher ein Strom orthogonal auf eine Membran geleitet wird. Hauptnachteil der Dead-End-Filtration ist, dass sich bei dieser mit der Zeit Partikel auf der Membran ablagern, die diese verstopfen. Das wird bei der Querstromfiltration durch den parallel zur Membran verlaufenden Strom verhindert. Ein fortlaufender Pufferaustausch wie bei der Querstromfiltration ist folglich bei einer Dead-End-Filtration durch genannte Ablagerungen auch nicht möglich. Des Weiteren kann bei der Dead-End-Filtration auch keine Aufkonzentrierung stattfinden, da diese primär größere Partikel aus einer Suspension filtriert.

2.3 Analytik

Echtzeitüberwachung Echtzeitüberwachung bedeutet, dass eine Probe bereits während eines Experimentes oder eines Prozesses auf ihre physikalischen und chemischen Eigenschaften untersucht wird. Echtzeitüberwachung bietet die Möglichkeit, die Qualität eines Endprodukts oder die Effizienz der Herstellung dessen zu verbessern und Herstellungsprozesse zu kontrollieren.

Referenzanalytik Die traditionellere Methode der Untersuchung von Proben aus Experimenten ist die Laboranalyse. Echtzeitüberwachung und Referenzanalytik unterscheiden sich in wichtigen Punkten. So ist ein Hauptziel der Referenzanalytik die Überprüfung der Qualität des Endproduktes. Die Referenzanalytik vermittelt folglich weniger Daten über den Herstellungsprozess als die Echtzeitüberwachung. Hierdurch eignet sich die Referenzanalytik nicht zur Optimierung von Prozessen.

Vergleich Es lassen sich weitere Unterschiede zwischen den beiden Untersuchungsmethoden feststellen. Die Echtzeitüberwachung ist verglichen mit der Referenzanalytik deutlich schneller. Da die Untersuchung der Probe bereits im Prozess erfolgt, wird außerdem eine mögliche Verfälschung der Probe durch das Entnehmen ausgeschlossen. Weiterhin erfolgen Prozessanalysen zumeist digital, eine ständige Beobachtung durch Menschen, wie sie für die Referenzanalytik notwendig ist, braucht man daher in der Echtzeitüberwachung nicht. Gleichzeitig bringt die Echtzeitüberwachung auch einige Nachteile. So sind viele Technologien komplizierter und aufwändiger als in der Referenzanalytik. Dazu kommt, dass es besonders in der pharmazeutischen Analyse strikte gesetzliche Vorgaben zur Qualitätsuntersuchung

gibt, die noch nicht vollständig an die Echtzeitüberwachung angepasst sind.

Zur Analyse einer Querstromfiltration eignet sich Echtzeitüberwachung allerdings besser als Referenzanalytik, da hier die Herstellung eines Produktes und nicht ein Endprodukt untersucht werden soll.

2.4 Ramanspektroskopie

Ramanspektroskopie kann sowohl Methode der Echtzeitüberwachung als auch der Referenzanalytik sein. Die Raman-Spektroskopie ist eine Möglichkeit die Zusammensetzung einer Lösung oder Suspension zu untersuchen. Man untersucht dabei von der Probe gestreutes Licht auf seine spektrale Zusammensetzung. Dabei muss man physikalisch zwischen Rayleigh-Streuung und Raman-Effekt unterscheiden.

2.4.1 Rayleigh-Streuung

Wenn Licht auf ein Molekül trifft, wird ein sehr kleiner Teil dieses Lichtes gestreut. Diesen Effekt nennt man Rayleigh-Streuung. Treffen Lichtwellen auf ein Molekül, bewegen sich die Elektronen dieses Moleküls periodisch im elektromagnetischen Feld der Lichtwellen. Es entstehen temporäre Dipole und die Lichtwelle bringt so das Molekül zum Schwingen. Die Amplitude dieser Schwingung ist abhängig von der Polarisierbarkeit der Elektronenwolken im Molekül.

Diese Molekülschwingungen erzeugen nun wiederum selbst Lichtwellen mit derselben Frequenz wie der Schwingungsfrequenz. Da diese Frequenz ihrerseits gleich der zuvor eintreffenden Lichtwellen war, haben eintreffendes und gestreutes Licht dieselbe Frequenz und somit dieselbe Farbe.

2.4.2 Raman Effekt

Der Raman-Effekt ist eine Sonderform der Rayleigh-Streuung. Beim Raman-Effekt wird zusätzliche Energie zwischen Probe und Licht ausgetauscht. Er tritt ungefähr 10^8 Mal weniger häufig wie der Rayleigh-Effekt auf. Der Raman-Effekt entsteht durch die periodische Änderung der Polarisierbarkeit der Elektronenwolken im Molekül, welche durch die Eigenschwingung des Moleküls verursacht wird. Diese Änderung beeinflusst die Schwingungsfrequenz der vom eintreffenden Licht angeregten Elektronenwolken und ändert dadurch auch die Frequenz der gestreuten Lichtwellen.

Eintreffende Lichtwellen und gestreute Lichtwellen haben beim Raman-Effekt also unterschiedliche Frequenzen und somit unterschiedliche Farben.

Hat die gestreute Lichtwelle eine niedrigere Frequenz als die eintreffende, nennt man dies Stokes-Verschiebung. Hat sie eine höhere Frequenz, handelt es sich um eine Anti-Stokes-Verschiebung. Kommt es bei einem spezifischen Molekül zu Stokes-Verschiebungen um eine bestimmte Frequenz, gibt es bei diesem Molekül auch Antistokes-Verschiebungen mit derselben Frequenzdifferenz.

2.4.3 Ramanspektrum

Bei jedem Molekül treten mehrere Stokes- bzw. Antistokes-Verschiebungen auf, diese sind spezifisch für das Molekül. Anhand der Verschiebungen lässt sich die Zusammensetzung eines Stoffgemisches bestimmen. Man hält die Stokes- und Antistokes-Verschiebungen eines Stoffes bei einer bestimmten eintreffenden Lichtfrequenz in einem sogenannten Raman-Spektrum fest.

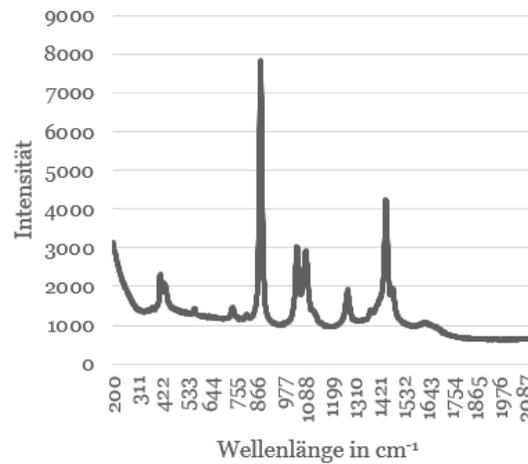


Abbildung 1: Ramanspektrum von Ethanol

In Abb. 1 ist als Beispiel ein Teil des Ramanspektrums von Ethanol abgebildet.

Die x-Achse des Diagramms beschreibt die Verschiebung der Wellenzahl von der Wellenzahl des eintreffenden Lichts. Die Wellenzahl ist die Anzahl der Wellen auf einem Meter. Die y-Achse beschreibt die Intensität der Stokeslinien. Da das Stokes- und das Antistokes-Diagramm bei Änderungen der Intensität proportional das gleiche abbilden, werden in einem typischen Raman-Spektrum nur die Stokes-Verschiebungen abgebildet.

2.5 UV/VIS-Spektroskopie

Mit Hilfe von UV/VIS-Spektroskopie lässt sich die Konzentration eines bestimmten Stoffes in einer Lösung über den absorbierten Anteil des durch den Stoff geleiteten Lichts feststellen. Dieser Anteil, auch Extinktion genannt, ist unter anderem von dem Stoff abhängig.

Wird ein Lichtstrahl über eine bestimmte Strecke durch eine Probe geleitet, wird ein Anteil des Lichts absorbiert. Berechnen lässt sich diese Extinktion nach dem Lambert-Beerschen Gesetz.

$$E_{\text{Extinktion}} = \epsilon \cdot c \cdot d \quad (1)$$

Ein UV/VIS-Spektrometer misst das ausgesendete und das nach dem Probendurchlauf vorhandene Licht und errechnet daraus die Extinktion E . Sind der molare Extinktionskoeffizient ϵ sowie die im Stoff zurückgelegte Strecke d bekannt, lässt sich die Konzentration c des Stoffes berechnen.

Ist der molare Extinktionskoeffizient unbekannt, lässt sich mithilfe einer Kalibriergerade das Verhältnis von Konzentration des Stoffes und Extinktion aufstellen. Hierzu stellt man vor dem Versuch mehrere Proben her, für welche man die Konzentration des Stoffes bereits kennt. Deren Extinktion misst man. Trägt man die Werte nun in ein Diagramm mit der sich ändernden Konzentration auf der einen und der gemessenen Extinktion auf der anderen Achse ein, erhält man eine Gerade deren Steigung das Verhältnis von Extinktion und Konzentration angibt. Mit Hilfe der so ermittelten Kalibriergerade lassen sich schnell aus der gemessenen Extinktion die entsprechende Konzentration berechnen.

3 Material und Methoden

3.1 Experiment

3.1.1 Versuchsvorbereitung

Puffervorbereitung Bei der von uns durchgeführten Diafiltration, das ist eine Filtration, bei der ein Puffer durch einen anderen ausgetauscht wird, wurde zur Untersuchung des Prozesses mit einer Puffer-Protein-Lösung gearbeitet. In der durchgeführten Querstromfiltration wurde ein Natriumchlorid-Puffer (NaCl) durch einen Dinatriumhydrogenphosphat-Puffer (Na_2HPO_4) ersetzt.

Der pH-Wert beider Puffer sollte nahe bei $\text{pH} = 7$ liegen, damit die Proteine nicht dadurch beeinflusst werden.

Die Konzentration des Proteins darf beim Erstellen dieser Lösung weder zu hoch noch zu niedrig sein, da sich sehr niedrige Konzentrationen auf dem UV/VIS-Spektrometer nicht adäquat anzeigen lassen und auch zu hohe Konzentrationen nicht abbildbar sind.¹

Membranvorbereitung Bei der Durchführung unserer Querstromfiltration wurde ein Proteingemisch aus den beiden Proteinen CytC und BSA aufgetrennt. Damit diese Auftrennung möglich ist, müssen die Membranporen groß genug für CytC, jedoch zu klein für BSA sein. Da BSA ein Molekulargewicht von 66 kDa besitzt und CytC ein Molekulargewicht von 12 kDa, wurde eine Membran gewählt, die ein MWCO (molecular weight cut-off) von 30 kDa besitzt.²

Zur Säuberung wird die Membran nach der Montage mehrmals durchspült, erst mit 20%-Ethanol, dann mit doppelt-destilliertem Wasser und zum Schluss mit dem Natriumchlorid-Puffer, da dieser Puffer anschließend verwendet wird und somit eine Verunreinigung der Filtration minimiert wird.



Abbildung 2: links: Membran mit geöffnetem Gestell, rechts: Membran angeschlossen

¹Der UV/VIS-Spektrometer kann die Extinktion nur in einem bestimmten Bereich anzeigen. Der messbare Bereich bei diesen Messungen ging von 0,01 - 3,4

²Das Optimum für eine Querstromfiltration mit BSA wäre eine Membran mit einem MWCO von 10 kDa, jedoch würde diese Membran auch das CytC nicht durchlassen.

Bevor die Membran benutzt wird, wird der sogenannte normalized water permeability test (NWP-Test) durchgeführt. Der NWP-Test ist ein Test für die Durchlässigkeit der Membran. Dadurch wird garantiert, dass die Membran intakt ist. Gemessen wird dabei die Menge an Wasser, die in einem bestimmten Zeitraum bei konstantem Druck durch die Membran gelangt. Der Wert wird dann mit dem Standardwert verglichen, um Hinweise darauf zu erhalten, ob die Membran verwendbar ist oder nicht.

3.1.2 Kalibriergerade

Während der Querstromfiltration werden zu verschiedenen Zeitpunkten Proben genommen. Diese Proben können jedoch mit einem Spektrometer nur auf ihre Extinktion untersucht werden. Daher fertigt man vor der Durchführung Proben an, bei denen man die Konzentration kennt (Kalibrierdiagramme). Dazu verwendeten wir in unserem Experiment Probenkonzentrationen von 0,5 g/l, 1 g/l, 2 g/l, 3 g/l und 4 g/l bei BSA und 0,1 g/l, 0,2 g/l, 0,3 g/l, 0,4 g/l und 0,5 g/l bei CytC. Für diese Konzentrationen kann man dann die Extinktion bestimmen und die Extinktion gegen die Konzentration in einem Koordinatensystem auftragen. Da die Extinktion direkt proportional zur Konzentration ist, erhält man eine Ursprungsgerade. Mit Hilfe dieser Kalibriergeraden lässt sich aus der gemessenen Extinktion die Konzentration der jeweiligen Proteinprobe bestimmen.

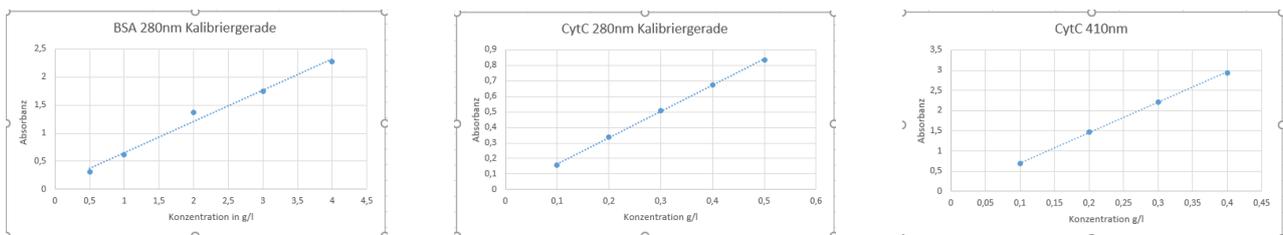


Abbildung 3: Kalibriergeraden; links: BSA 280nm, Mitte: CytC 280nm, rechts: CytC 410nm

3.1.3 Durchführung des Versuchs

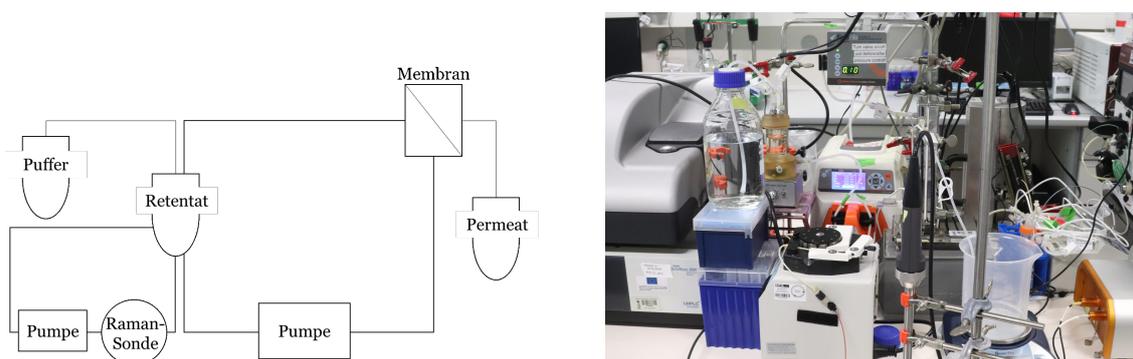


Abbildung 4: Versuchsaufbau

Zu Beginn des Versuchs wird das gesamte System nochmal mit Natriumchlorid-Puffer zur Reinigung durchspült. Anschließend wird dann die Proteinmischung aus BSA und CytC angeschlossen und die

Raman-Sonde integriert. Die Filtration wurde in zwei Schritten durchgeführt: eine Diafiltration von 5 Diavolumen³ und eine Ultrafiltration von 20 ml⁴. Die Diafiltration ersetzt den Natriumchlorid-Puffer durch den Dinatriumhydrogenphosphat-Puffer und filtert gleichzeitig CytC aus dem Retentat. Die Ultrafiltration dient der Aufkonzentration. Während der Durchführung des Versuchs werden Proben jeweils vom Retentat und vom Permeat genommen. Nach dem Versuch wird die Extinktion der Proben untersucht und daraus die Konzentration der Proben bestimmt

3.1.4 Prozessanalytik

Ramanspektroskopie Parallel zum Filterkreislauf fließt ein Teil des Puffers durch die Ramansonde. Diese erstellt kontinuierlich Ramanspektren der Zusammensetzung des Retentats. Die Messungen lassen sich hinsichtlich ihrer Dauer und der Pausen dazwischen beeinflussen. Auch die eingestellte Laserleistung verändert das finale Ramanspektrum.

So ist die Intensität der verschiedenen Wellenlängen im Ramanspektrum höher, wenn eine einzelne Messung über einen längeren Zeitraum geht und in der Folge mehr Ramanstrahlung detektiert wird, aber auch wenn eine höhere Laserleistung die Atome stärker zu Schwingungen anregt.

- Dauer einer Messung: 3s
- Pause zwischen den Messungen: 1 s
- Laser Stärke: 495 mW

Um kleine Veränderungen möglichst stark wahrnehmen zu können, ist es sinnvoll die Laserleistung möglichst hoch zu setzen. 495 mW ist bei der genutzten Ramansonde die höchstmögliche Laserleistung. Des weiteren wurden jeweils 15 Spektren gemittelt, um das Signal-Rausch-Verhältnis zu verbessern. Dadurch erhält man alle 45 s ein neues Spektrum.

UV/VIS-Spektroskopie Um Vergleichswerte zur Ramanspektroskopie zu haben, eignet sich die UV/VIS-Spektroskopie. Für diese Art der Untersuchung ist es nötig während der Querstromfiltration Proben zu entnehmen, um diese auswerten zu können.

Hat sich das Retentat einmal um das Volumen des Permeats geändert, nennt man dies ein Diavolumen. Um den Zusammenhang von Diavolumen bzw. Filtrationsdurchläufen und Zusammensetzung des Stoffgemisches herauszufinden ist es sinnvoll, die Probenahme an den Diavolumen zu orientieren anstatt sie in konstanten Zeiträumen durchzuführen.

Im beschriebenen Experiment wurden die Proben sowohl aus dem Permeat als auch aus dem Retentat genommen. Die Proben am Retentat wurden so genommen, dass die Zusammensetzung des Retentats zu diesem Zeitpunkt gemessen wurde. Gleichzeitig bilden die Proben aus dem Permeat die Zusammensetzung der zu dem Zeitpunkt ins Permeat strömenden Lösung ab.⁵ Dies führt zwar nicht zu verschiedenen Erkenntnissen, hilft aber beim Verständnis der Daten. Des weiteren orientierte sich die Probeentnahme am Diavolumen.

³Ein Diavolumen ist erreicht, wenn das Volumen des Permeats dem des Retentats entspricht. Bei unserem Experiment wurde das Permeat in einem Becherglas gesammelt. Dieses stand auf einer Waage. Die Diavolumen wurden an der Waage abgelesen.

⁴Bei der Ultrafiltration kommt im Gegensatz zur Diafiltration kein weiteres Retentat hinzu. Das Volumen im System nimmt ab, wodurch das Permeat aufkonzentriert wird. Eine Ultrafiltration von 20 ml bedeutet, dass 20 ml Permeat während der Ultrafiltration entstehen

⁵Das Permeat floss während des Versuchs in ein Becherglas; Proben die mit dem UV/VIS-Spektrometer gemessen wurden, sind nicht aus der Flüssigkeit im Becherglas genommen, sondern direkt am Membranausgang.

Es wurden Proben genommen bei:

- 0; 0,5; 1; 1,5; 2; 3; 4; 5 Diavolumen und nach der Aufkonzentrierung

Diese Proben wurden anschließend mit einem Spektrometer ausgewertet.

3.2 Prozesssteuerung und Benutzeroberfläche

3.2.1 Modbus

Modbus ist eine 1979 entwickelte Richtlinie, durch die sich verschiedene Messgeräte an einem Computer steuern und gemessene Daten einlesen lassen.

Modbus ist mit Befehlen in anderen Programmiersprachen nutzbar.

Mit Modbus lässt sich auch eine Ramansonde steuern. Für die Steuerung in einem anderen Programm können verschiedene Befehle vom Benutzer aufgerufen werden.⁶

3.2.2 Matlab

Die Programmiersprache, mit der die Befehle zur Steuerung der Ramansonde geschrieben wurden, ist MatLab. MatLab ist eine mathematisch orientierte Programmiersprache, die besonders in der Datenanalyse vorteilhaft ist. Daneben besitzt MatLab Erweiterungen, unter anderem den App Designer. Mit dem App Designer wurde die App programmiert, über die sich die Ramansonde steuern lässt.⁷

4 Ergebnisse

4.1 Programmablauf

Ziel des erstellten Programms soll die Messung und Auswertung des Ramanspektrums einer Probe sein. Hierzu muss die Kommunikation mit der Sonde aufgebaut werden. Dieser sollen Einstellungswerte übergeben werden. Daten, welche die Ramansonde zurückgibt, sollen geplottet werden. Da dies nicht automatisch, sondern benutzergesteuert passieren soll, braucht es eine Benutzeroberfläche. Diese beinhaltet verschiedene Steuerelemente, über welche der Benutzer die genannten Schritte von der Sonde ausführen lassen kann. Dieser Programmablaufplan ist in Abb. 5 dargestellt.

Das im Zuge dieses Projektes erstellte Programm kann sich mit der Ramansonde verbinden. Es kann auch die Laserleistung einstellen und die Messung beginnen und beenden. Außerdem können gespeicherte Datenreihen in Diagrammform dargestellt werden.

⁶<https://www.modbus.org/>

⁷<https://de.mathworks.com/products/matlab.html>

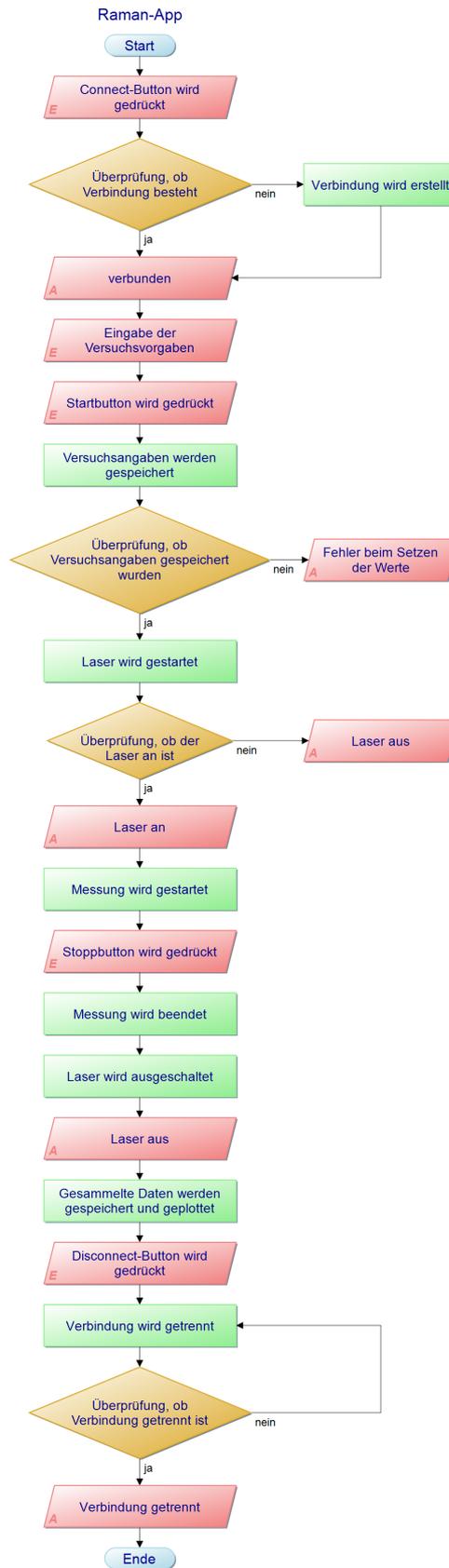


Abbildung 5: Programmablaufplan

4.2 Experiment

4.2.1 Ramanspektroskopie

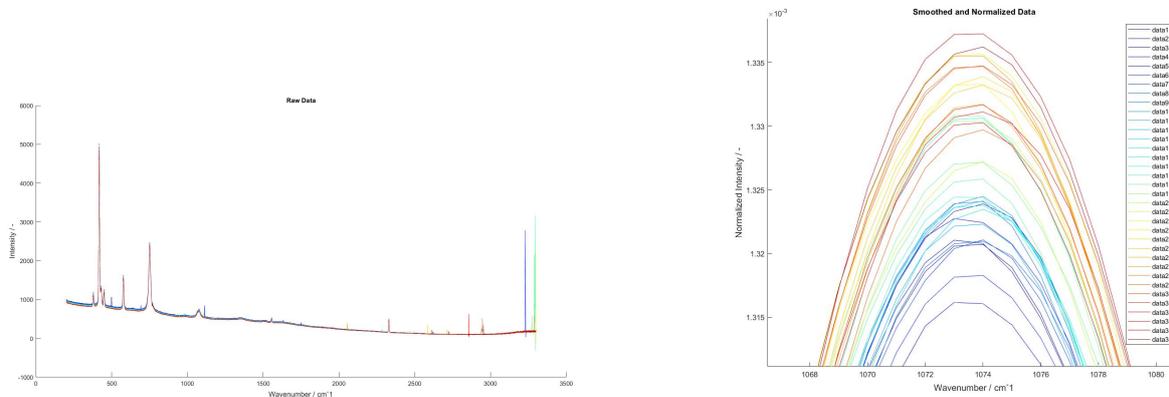


Abbildung 6: Ramanspektren

In Abb. 6 sind die, über den gesamten Zeitraum des Experiments aufgezeichneten, Ramanspektren zu sehen. Die linke Abbildung zeigt dabei die vollständigen Spektren. Bei der rechten Abbildung wurde die Darstellung der Spektren vergrößert, wodurch eine zeitliche Änderung der Intensität der Ramanstrahlung sichtbar ist. Hierbei sind zeitlich frühere Spektren blau, zeitlich spätere Spektren rot dargestellt. An den aufgezeichneten Spektren ist erkennbar, dass die Intensität der Ramanstrahlung mit der Zeit zunimmt. Dies bedeutet, dass der Raman-aktivste Stoff mit der Zeit stärker konzentriert wird.

Das Ramanspektrum kann, da es am Retentat aufgenommen wurde, weder das Protein CytC noch BSA im Besonderen abbilden. Während CytC durch die Membran gelangt und damit die Konzentration im Retentat abnimmt, ist die Konzentration von BSA im Retentat konstant.

So können die aufgenommenen Ramanspektren nur den Puffer beschreiben. Beide bestehen aus ähnlichen Bindungen, bilden ein ähnliches Ramanspektrum und nehmen in der Summe in der Konzentration im Retentat zu.

Des Weiteren ist zu erkennen, dass die Konzentration des aufgezeichneten Stoffes zu Beginn der Querstromfiltration stärker ansteigt als zum Ende hin. Dies lässt sich dadurch erklären, dass in den ersten Diavolumen mehr CytC durch die Membran ins Permeat gelangt. Nach mehreren Durchläufen ist weniger CytC vorhanden und nur ein geringerer Teil CytC wird noch gefiltert. Wenn die Konzentration des CytC im Retentat in einer bestimmten Zeitspanne langsamer sinkt, steigt auch die Konzentration des Puffers langsamer.

Weil die Proteine in den Ramanspektren nicht deutlich abgebildet werden, lässt sich die nur kurze Ultrafiltration in den Ramanspektren nicht gut erkennen. Bei der Ultrafiltration sinkt die Pufferkonzentration mit der Zeit. Dadurch, dass kein neuer Puffer nachfließt und da auch die CytC Konzentration sinkt, ist dies aber zu Anfang und auch in den dargestellten Spektren nicht eindeutig.

4.2.2 Querstromfiltration

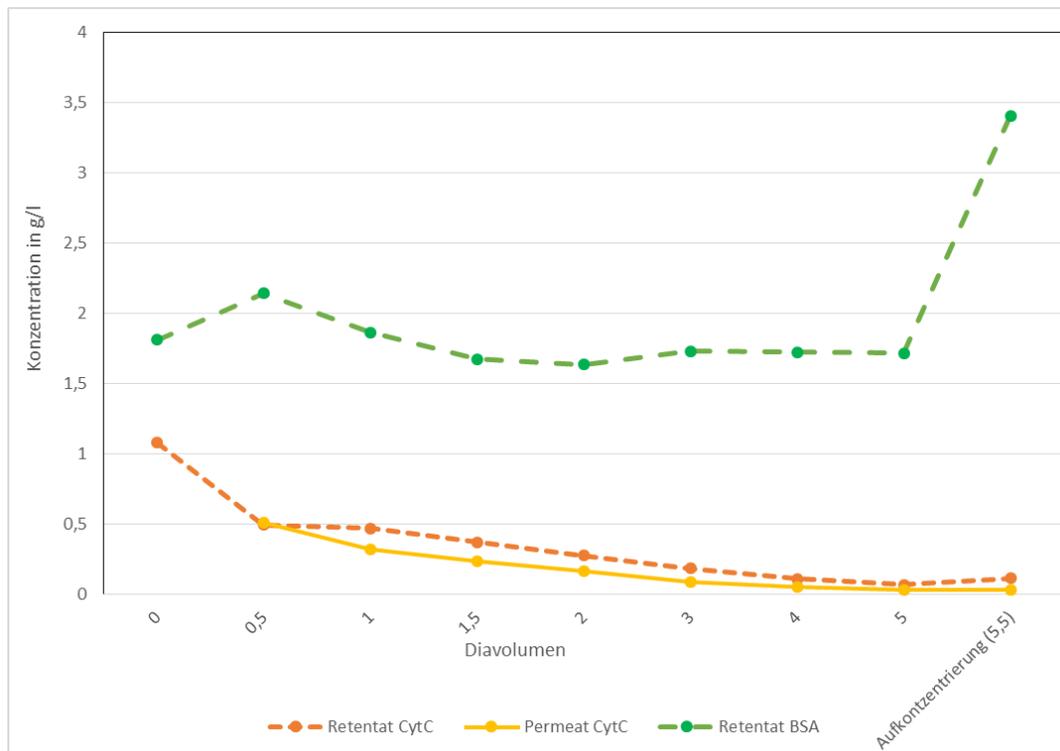


Abbildung 7: Konzentration der Proteine, UV/VIS Spektrometer

In Abb. 7 ist zu erkennen, dass die Konzentration von BSA über die Diafiltration hinweg konstant bleibt.⁸ Dies liegt daran, dass BSA nicht ins Permeat gelangt und sich das Gesamtvolumen des Permeats nicht ändert.

Die Konzentration von CytC im Retentat hingegen nimmt anfangs stark ab, die Abnahme verringert sich jedoch im Laufe des Filtrationsprozesses. Diese Abnahme ist dadurch zu erklären, dass sich anfangs viel CytC im Retentat befindet und somit auch viel CytC durch die Membran gelangt.

Die Konzentration von CytC im Permeat nimmt ähnlich wie im Retentat ab. Diese Abnahme lässt sich dadurch erklären, dass bei weniger CytC im Retentat der prozentuale Anteil an filtriertem CytC gleich bleibt. Die absolute Menge, die filtriert wird, wird dadurch im Verlauf des Experiments geringer. Die Menge an Puffer, die durch die Membran gelangt, bleibt jedoch konstant. Deshalb verringert sich auch die Abnahme von CytC im Permeat.

Auffällig in Abb. 7 ist gleichzeitig die plötzliche Zunahme der Konzentration von BSA im Retentat in der letzten Probe. Diese plötzliche Zunahme ist bedingt durch die Umstellung der Filtration von einer Diafiltration zu einer Ultrafiltration nach 5 Diavolumen. Bei einer Ultrafiltration kommt kein weiterer Puffer in das Retentat, wodurch das Volumen im Filtrationskreislauf abnimmt. Dadurch nimmt die Konzentration von BSA sehr stark zu (ungefähr um das zweifache). Gleichzeitig nimmt die Konzentration von CytC im Retentat auch sehr stark zu (ungefähr das 1,7fache). Diese Zunahme ist auch mit der Volumenabnahme im Filtrationskreislauf zu begründen, da sich nach 5 Diavolumen

⁸Der Wert bei 0,5 DV wird hierbei als Messfehler betrachtet.

immer noch CytC im Retentat befindet⁹. Auch im Permeat ist bei der Konzentration von CytC ein Abweichen vom bisherigen Verlauf zu erkennen. Die Konzentration nimmt nicht weiter ab, sondern bleibt gleich bzw nimmt leicht zu. Dies lässt sich dadurch erklären, dass die Menge an Puffer, die durch die Membran gelangt, aufgrund der Ultrafiltration nicht mehr gleichbleibt, sondern abnimmt.

4.2.3 Auswertung NWP-Test

Der Vergleich des NWP-Wertes der Membran vor und nach der Filtration zeigt auf, dass auch bei einer Querstromfiltration Filtrat an der Membran hängen bleibt, wenn auch weniger als bei einer Dead-End-Filtration.

Während der NWP-Wert vor der Querstromfiltration bei 413 LMH/bar ($l/m^2/h/bar$)¹⁰ liegt, hat er sich danach bereits auf 318 LMH/bar verringert. Die Membran ist folglich deutlich weniger durchlässig. Dies lässt sich dadurch erklären, dass Poren der Membran durch die größeren Proteine verstopft werden. Sinkt der NWP-Wert einer Membran auf die Hälfte des Originalwerts ab, gilt die Membran als nicht mehr sinnvoll nutzbar. Die Abnahme des NWP-Wertes von ca. einem Viertel wirkt in diesem Kontext zwar drastisch, ist aber dadurch bedingt, dass die benutzte Membran zum ersten Mal eingesetzt wurde. Derartige prozentuale Veränderungen des NWP-Wertes einer Membran treten erfahrungsgemäß nur beim ersten Benutzen auf.

5 Diskussion

5.1 Auswertung der Messergebnisse

Vergleicht man die Ergebnisse der Raman- und der UV/VIS-Spektroskopie, wird sichtbar, dass die Ramanspektroskopie weniger über den Ablauf der Filtration zeigt.

Während mit Hilfe der UV/VIS-Spektroskopie die Konzentrationen der einzelnen Proteine zu bestimmten Zeitpunkten genau nachvollziehbar sind, ist anhand der Ramanspektroskopie nur die Veränderung der Pufferkonzentration erkennbar.

Dies liegt zum einen daran, dass die Konzentration der Proteine so gering ist, dass sie im gesamten Ramanspektrum keine besonderen Veränderungen hervorruft. Zum anderen sind die beiden benutzten Puffer sich so ähnlich, dass sich zwischen diesen auch keine Unterschiede feststellen lassen.

Die Deutung der Ramanspektren aus unseren Experimenten war letztendlich nur mithilfe der UV/VIS-Spektren möglich. Um auch den Konzentrationsverlauf der Proteine aus den Ramanspektren lesen zu können, wären höhere Proteinkonzentrationen nötig.

5.2 Fehlerbetrachtung

5.2.1 Messfehler

Bei der Durchführung der Querstromfiltration ließen sich einige Fehler leider nicht vermeiden. Ein häufiger und schwer einzuschätzende Fehler ist die Pipettierungenauigkeit sowohl bei der Erstellung der Kalibriergerade, als auch bei während der Experimente genommenen Proben. Hierbei können einerseits Luftblasen entstehen, welche die Spektrometermessungen verfälschen. Zum anderen sind die pipettierten Mengen teils ungenau. Für die Spektroskopie nach dem Lambert-Beerschen Gesetz ist ein konstantes

⁹5 Diavolumen reichen nicht aus, um CytC vollständig aus dem Retentat zu filtrieren

¹⁰LMH/bar ist eine Einheit für die Wasserdurchlässigkeit einer Membran. Sie beschreibt die Durchlässigkeit in Form von Flussrate (LMH) pro Druck (bar).

Volumen der Proben aber notwendig damit die Proben in baugleichen Gefäßen, durch welche das Licht von oben nach unten strömt, auch den selben Durchmesser haben. Dieser Fehler ist allerdings nicht besonders groß und kann vernachlässigt werden.

Die Kalibriergerade ist zwar zur Bestimmung der Konzentrationen im Experiment nutzbar, da sie das Verhältnis von Konzentration und Extinktion bestimmt.

Der aus diesem Verhältnis mit dem Lambert-Beerschen Gesetz errechnete molare Extinktionskoeffizient von BSA stimmt allerdings nicht mit dem fachliterarischen überein. Es muss somit ein Fehler in der Durchmesserbestimmung der Proben vorliegen. Abschließend geklärt werden konnte diese Unstimmigkeit aber nicht. Ein Fachliteraturwert für den Extinktionskoeffizienten für CytC liegt nicht vor, daher ist auch keine sichere Aussage über dessen Genauigkeit möglich. Ein weiterer systematischer Fehler, welcher aber wegen seiner Geringfügigkeit in Kauf genommen wurde, trat bei der Probennahme auf. Für jede Probe wurden 0,5 ml Flüssigkeit aus dem Filtrationskreislauf entnommen. Dies veränderte das Volumen im Filtrationskreislauf. Da die Menge an Gesamtvolumen sehr viel größer ist als das entnommene Probenvolumen, ist der Einfluss dieses Messfehlers im Vergleich zu den anderen Fehlerquellen gering.

5.2.2 Fehler in der Schnittstellenbeschreibung

Wie aus dem Programmablaufplan erkennbar ist, ist das zu erstellende Programm in der Theorie nicht komplex, die Umsetzung gestaltete sich jedoch schwierig. So zeigten sich Fehler und Schwierigkeiten im Befehlsverzeichnis von Modbus.

Beispielsweise war die Nummerierung der Befehle anders in der Matlab-Schnittstellenbeschreibung angegeben. Somit rief man über Matlab einen anderen Befehl als erwartet auf. Erst nach mehreren fehlerhaften Versuchen gelang es die richtige Zuordnung zu ermitteln.

Des Weiteren war es uns nicht möglich, obgleich sich die Laserleistung über Matlab einstellen ließ, weitere zur korrekten Benutzung nötige Voreinstellungen aus der Benutzeroberfläche fehlerfrei auf die Sonde zu übertragen.

Letztendlich können das geschriebene Programm und die erstellte Benutzeroberfläche zwar eine Raman-Messung starten und deren Daten in Diagrammform darstellen, aber Einstellungen, beispielsweise zur Dauer der Messung oder der Anzahl der Messungen, konnten über die Programmoberfläche nicht festgelegt werden.

5.3 Fazit und Ausblick

Die Querstromfiltration bewies ihre Effizienz im durchgeführten Versuch, als die Konzentration des CytC in dem Retentat schon nach einem halben Diavolumen erheblich abnahm.

Für die Untersuchung dieses Filtrationsprozesses mit der Ramanspektroskopie muss allerdings die Konzentration des Zielstoffes genauestens auf die Ramanspektroskopie abgestimmt sein. Gleichzeitig muss auch garantiert werden, dass sich ramanaktive Stoffe in der Probe nicht überlagern. Auch wenn wir in unserem Experiment letztendlich hauptsächlich die UV/VIS-Spektroskopie zur Untersuchung benutzt haben, so bietet die Ramanspektroskopie eine höhere Genauigkeit als die UV/VIS-Spektroskopie. Die Raman-Spektroskopie ist auch spezifischer als die UV/VIS-Spektroskopie, da sich das Spektrum leichter bestimmten Substanzen zuordnen lässt.

Es zeigte sich, dass es günstig ist, die Ramanspektroskopie mit anderen Messmethoden parallel zu benutzen. Insbesondere dann, wenn es sich dabei um Proben mit Stoffgemischen handelt.

Aus den Messungen ergibt sich, dass sich der Querstromfiltrationsprozess mit Hilfe der Ramanspektroskopie nachvollziehen lässt. Für eine sinnvolle Anwendung der Ramanspektroskopie ohne Hilfsmessungen, wie im beschriebenen Fall die UV/VIS-Spektroskopie, müssen die zu messenden Stoffe

allerdings in ihrer Konzentration und Zusammensetzung verändert werden, damit die untersuchten Stoffe, im beschriebenen Fall die Proteine, im Ramanspektrum erkennbar sind. Gegebenenfalls sollte folglich die Trennung von Proteinen mittels eines anderen Messgeräts überwacht werden sollte.

6 Danksagung

Wir möchten uns herzlich bei allen bedanken, die uns die Arbeit an diesem Projekt ermöglicht haben.

Insbesondere bei Annabelle Dietrich, Christina Wegner und Jan Tobias Weggen, die dieses Projekt gestaltet und betreut haben. Auch für die stets freundliche Unterstützung bei zahlreichen Problemen, welche besonders während dem Schreiben des Programmes austraten.

Auch möchten wir uns bedanken bei Herrn Professor Doktor Jürgen Hubbuch, ohne den die Verwirklichung dieses Projektes nicht möglich gewesen wäre.

Gleichzeitig möchten wir uns bei Herrn Krieg und Herrn Gruber bedanken, die uns über die gesamte Kooperationsphase hinweg begleitet und beraten haben und mit Rat und Tat zur Seite standen. Unser Dank gilt auch allen KursleiterInnen des Hector-Seminars. Wir sind dankbar für die letzten sechs interessanten und prägenden Jahren im Hector-Seminar.

Zuletzt gilt unser Dank dem Ehepaar Josephine und Dr. Hans-Werner Hector, deren Förderung des Hector-Seminars zahlreichen Jugendlichen wie uns Einblicke in die wissenschaftliche Arbeit ermöglicht hat.

7 Literatur

- [1] Musumeci,T; Leonardi,A; Bonaccorso,A; Pignatello,R; Puglisi,G. (2018). Tangential Flow Filtration Technique: An Overview on Nanomedicine Applications. *Pharmaceutical Nanotechnology. Bentham Science*. 2018(6). 48-60
- [2] Gordon, K.C.; Fraser-Miller, S. (2016). Raman Spectroscopy. *Analytical techniques in the pharmaceutical sciences. Advances in Delivery Science and Technology. Springer*. 139-167
- [3] Guenard, R; Thurau, G. (2005) Implementation of Process Analytical Technologies. *Process Analytical Technology. Blackwill Publishing*. 13-37
- [4] Jestel, N.L. (2005) Process Raman Spectroscopy. *Process Analytical Technology. Blackwill Publishing*. 133-169
- [5] Analytik in Chemie- und Pharmaindustrie (2020, 29. Januar). Chemietechnik. <https://www.chemietechnik.de/anlagentechnik/mess-analysetechnik/analytik-in-chemie-und-pharmaindustrie-364.html>
- [6] Lambert-Beersches Gesetz (letzter Aufruf: 15.09.22). Chemie. https://www.chemie.de/lexikon/Lambert-Beersches_Gesetz.html

8 Selbstständigkeitserklärung

Hiermit bezeugen wir, die vorliegende Arbeit selbstständig und nur mit den angegebenen Quellen unter der Betreuung von Annabelle Dietrich, Christina Wegner und Jan Tobias Weggen verfasst und unter dem Lektorat von Norbert Krieg haben.

Karlsruhe, den

Frederike Dasselaar

Xinyuan Wang