

# Abschlussbericht FKZ 2515

## Quantifizierung von 2D Fluoreszenzspektren mit Hilfe datengetriebener und theoretischer Modelle

Bearbeitet von: D. Geissler, G. Erbach, C. Klockow, B. Hitzmann

### Zielsetzung

Im Rahmen dieses Projektes sollte ein System aufgebaut werden, das die Auswertung von 2D-Fluoreszenzspektren ohne vorangegangene Kalibration ermöglicht. Dadurch wird der experimentelle Aufwand erheblich vermindert. Die Methode, die in diesem Bericht vorgestellt wird, basiert auf einem theoretischen (kinetischen) Modell sowie auf der Optimierung eines chemometrischen Modells und kann auf verschiedenste experimentelle Konzepte angewendet werden.

Die Methode wurde anhand einer Modellreaktion entwickelt und getestet. Als Modellreaktion wurde die enzymatische Spaltung von L-Phenylalanin-7-Amido-4-Trifluormethylcoumarin durch  $\alpha$ -Chymotrypsin gewählt, da sowohl Edukt als auch Produkt fluoreszieren und der Verlauf des Experiments somit gut via Fluoreszenzmessungen verfolgt werden kann. Die Ergebnisse werden mit HPLC-Messungen, für die ein spezifisches Messverfahren etabliert werden sollte, verifiziert.

### Theorie

Voraussetzung für die hier vorgestellte Methode ist ein kinetisches Modell, das die Umsetzung beschreibt. Modelle dieser Art sind für die meisten Anwendungen bereits bekannt. Für die hier betrachtete Enzymreaktion gilt das in Gleichung 1 dargestellte Michaelis-Menten-Modell.

$$\begin{aligned}\frac{dS}{dt} &= -\frac{v_{max} \cdot S}{K_M + S} + \frac{\dot{V}_{feed} S_0}{V} - \frac{\dot{V}_{feed}}{V} \cdot S \\ \frac{dP}{dt} &= +\frac{v_{max} \cdot S}{K_M + S} \cdot Y_{PS} - \frac{\dot{V}_{feed}}{V} \cdot P \\ \frac{dV}{dt} &= \dot{V}_{feed}\end{aligned}\quad \text{Gleichung 1}$$

Die Michaelis-Menten-Kinetik wurde durch Terme, die den Zufluss von Substrat beschreiben, ergänzt. Die Parameter  $v_{max}$  und  $K_M$  werden mittels modellbasierter Kalibration bestimmt. Der Ausbeutekoeffizient ergibt sich aus den stöchiometrischen Koeffizienten und beträgt für die Modellreaktion eins.

Bei dem chemometrischen Modells handelt es sich um eine PLS Regression, eine multivariate Regression, bei der die Anzahl der Parameter auf die sogenannten Hauptkomponenten reduziert werden. Für die Berechnung werden drei Hauptkomponenten verwendet.

Die in Abbildung 1 dargestellte Bestimmung der Parameter für das theoretische Prozessmodells und die Erstellung des chemometrischen Modells erfolgt iterativ. Als Input werden Startparameter für das theoretische Modell und die 2D-Fluoreszenzspektern benötigt. Mit dem theoretischen Modell wird dann der Prozessverlauf simuliert. Der Datensatz wird gesplittet, um sowohl für die Kalibration als auch für die Validation Daten zur Verfügung zu haben. Die simulierten, für die Kalibration bestimmten Daten werden dann gemeinsam mit den Spektren zur Kalibration des chemometrischen Modells herangezogen. Der Fehler zwischen der Vorhersage des chemometrischen Modells und des simulierten Prozessverlaufes (nur Validationsdatensatz) wird dann mittels RMSE (Root Mean Square Error) berechnet. Im nächsten Schritt werden neue Parameter für das theoretische Modell ausgewählt und der Zyklus von neuem Durchlaufen. Dies wird so lange wiederholt, bis der Fehler minimal ist. Für die Optimierung wurden der Simplex-Algorithmus nach Nelder und Mead bzw. der genetische Algorithmus verwendet.

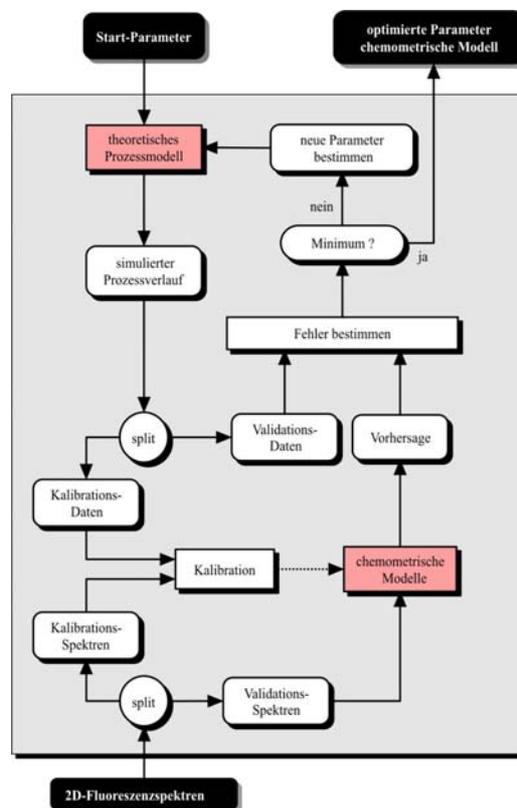


Abbildung 1: Schematische Ablauf einer modelbasierten Kalibration

## Material und Methoden

Die Modellreaktion, eine enzymatische Spaltung von L-Phenylalanin-7-Amido-4-Trifluormethylcoumarin ist in Abbildung 2 dargestellt. Das katalysierende Enzym ist  **$\alpha$ -Chymotrypsin**.

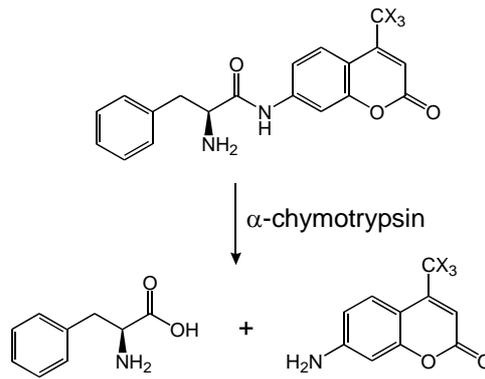


Abbildung 2: Modellreaktion. Enzymatische Spaltung von L-Phenylalanin-7-Amido-4-Trifluormethylcoumarin mittels  $\alpha$ -Chymotrypsin

Verwendet wurde der in Abbildung 3 gezeigte 15 mL Rührkesselreaktor, der über einen Doppelmantel temperiert werden kann und über einen Anschluss für den Lichtleiter verfügt. Die Durchmischung im Reaktor wird durch einen Magnetrührer realisiert. Die Messung der Fluoreszenz erfolgte mit Hilfe eines Fluorimeter 'BioView' der Firma Delta Light and Optics (Dänemark). Das Gerät verfügt über Filter in 20 nm Intervallen und einer Bandbreite von je 20 nm. Mit einem Anregungsbereich von 270 nm bis 550 nm und gemessener Fluoreszenz in dem gewünschten Bereich von 310 nm bis 590 nm resultieren daraus 120 Einzelmessungen.

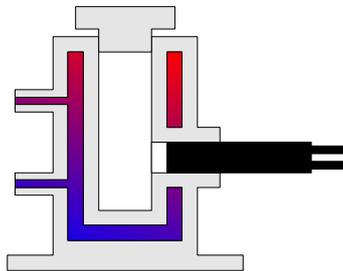


Abbildung 3: 15 ml Rührkesselreaktor mit Wasserkühlkreislauf und Lichtleiteranschluss

Sowohl das Substrat und Produkt als auch das Enzym fluoreszieren, wobei sich allerdings der Fluoreszenzbereich von Substrat und Produkt überlagern. Deshalb ist es nicht möglich, direkt aus dem Spektrum Rückschlüsse auf die Stoffkonzentrationen zu ziehen.

Um die Simulationen zu überprüfen, wurden die Substrat- und Produktkonzentrationen mittels HPLC (Vakuumentgaser: Techlab TS505, Gradientenpumpe: Techlab LPC 4100, Säule: Inertsil ODS 2-5  $\mu$ m, Spark Triathlon Autosampler, Fluoreszenzdetektor: Shimadzu RF-10AXL, Eluent: 0,1 M KPP-Puffer) gemessen. Die Reaktion wurde direkt nach der Probennahme durch Zugabe von Methanol abgestoppt und bei 10°C gelagert.

Es wurden zahlreiche Prozesse durchgeführt. Zwei davon sollen hier exemplarisch diskutiert werden. Mit Hilfe von Prozess A wurde die Modellbildung durchgeführt und das Modell auf Prozess B angewandt.

# Ergebnisse

## HPLC

Die HPLC-Messungen bereiteten anfangs Probleme, da die Retentionszeit nicht reproduzierbar war und die Peakbreite stark variierte. Nach dem Austausch von Eluent und Säule gelang die quantitative Messung von Edukt und Produkt jedoch sehr gut, wie die Darstellung der Peaks in Abbildung 4 und die Kalibrationsgeraden in Abbildung 5 belegen.

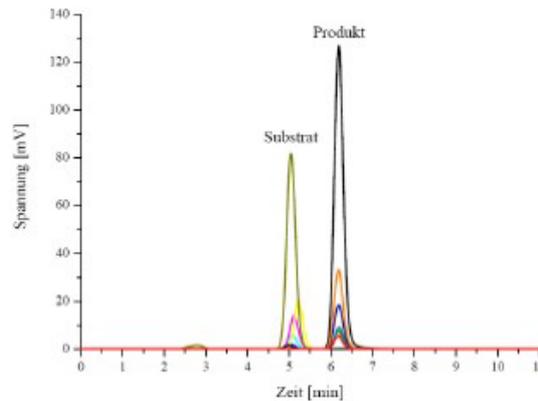


Abbildung 4: HPLC-Peaks für Substrat und Produkt

Die beiden Peaks sind sauber getrennt, zeigen eine klare Form ohne Schultern und sind ausreichend weit voneinander entfernt. Die Grafik belegen außerdem, dass die Retentionszeit nun reproduzierbar ist.

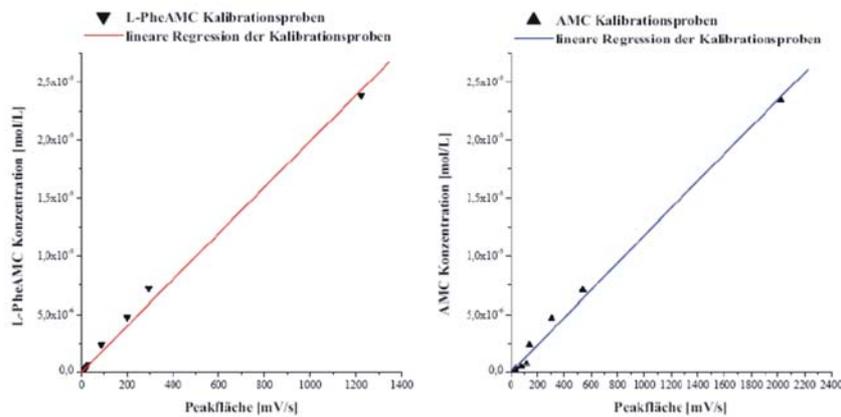


Abbildung 5: Kalibrationsgeraden für Substrat und Produkt

Zwischen der Peakfläche und der Konzentration des jeweiligen Cumarinderivats besteht eindeutig ein linearer Zusammenhang.

## PLS

Abbildung 6 stellt das Ergebnis der PLS für den Modellprozess B dar. Gezeigt werden die Score-Plots der ersten vier Hauptkomponenten. Die erste Hauptkomponente spiegelt grob die Produktkon-

zentration, die zweite die Substratkonzentration wieder. Auch die dritte Komponente beinhaltet vermutlich die Substratkonzentration, jedoch spielen Überlagerungen mit anderen Faktoren hier eine Rolle. Denkbar sind beispielsweise Einflüsse von Temperatur, Rührerdrehzahl oder Störung durch Luftblasen. Im chemometrischen Modell wurden nur die ersten drei Hauptkomponenten weiterverwendet.

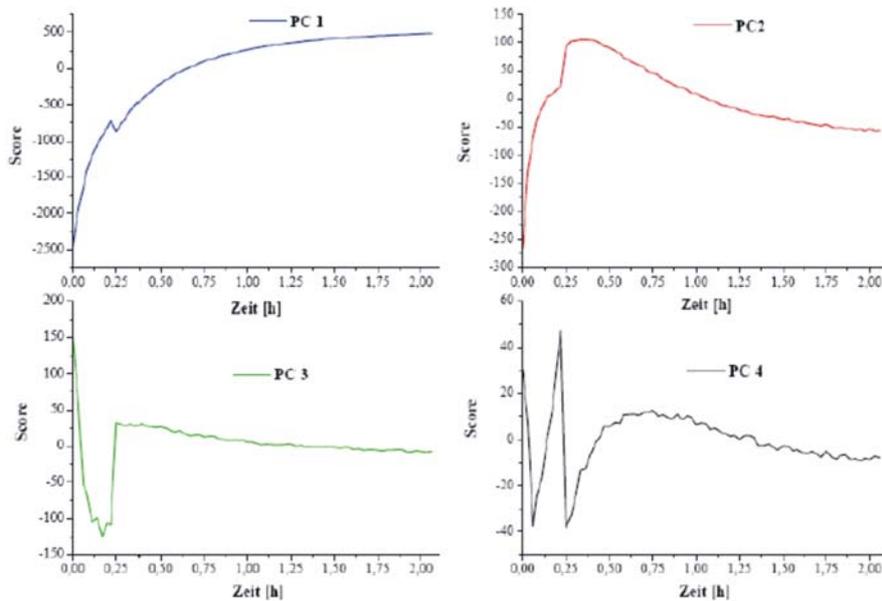


Abbildung 6: Score Plots der ersten vier Hauptkomponenten für Prozess B

### Anwendung der Methode auf die Modellreaktion

Die enzymatische Modellreaktion konnte mit der entwickelten Methode gut beschrieben werden. Abbildung 7 zeigt exemplarisch für den Prozess A die Simulationsergebnisse des theoretischen Modells, die Vorhersage des chemometrischen Modells und die per HPLC gemessenen Werte. Simulation und Vorhersage stimmen gut mit den Offline Messwerten überein. Auch die plötzliche Erhöhung der Substratkonzentration durch den Feed wird gut wiedergegeben. Die Fehler sind niedrig und liegen zwischen 2,9 % und 3,5 %. Die Offline Messwerte dienen lediglich zur Überprüfung der Methode und wurden nicht zur Kalibration herangezogen. Die ermittelten Parameter für das theoretische Modell sind in Tabelle 1 angegeben. Umsetzung A wurde für die Modellbildung herangezogen.

Tabelle 1: Modellparameter und Fehler von Umsetzung A

$V_{\text{mxa}}$ [mol/Ls]	$K_M$ [mol/L]	RMSE 1-PheAMC [%]	RMSE AMC [%]
$1,7 \cdot 10^{-4}$	$2,6 \cdot 10^{-4}$	3,5	2,9

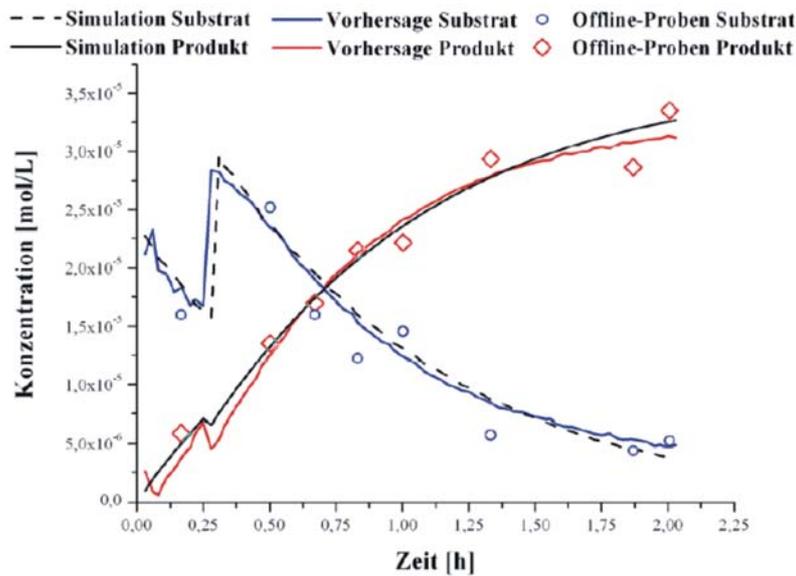


Abbildung 7: Simulation, Vorhersage und Offline Messung von Prozess A

Um die Reproduzierbarkeit und Übertragbarkeit zu überprüfen, wurden die Modelle auf einen Prozess angewandt, der nicht für die Modellbildung verwendet wurde. Wie aus Abbildung 8 zu entnehmen ist, wurde auch der Verlauf von Prozess B gut beschrieben. Lediglich die Vorhersage des Substrats in den ersten 0,25 h ist suboptimal, was jedoch auf eine Störung bei der Fluoreszenzmessung zurückzuführen ist. Die Fehler betragen 2,2 % bzw. 3,5 %.

Dies zeigt die erfolgreiche Anwendung dieser Auswertemethode, mit der chemometrische Modelle erstellt werden können, ohne aufwendige Kalibrationsmessungen durchzuführen.

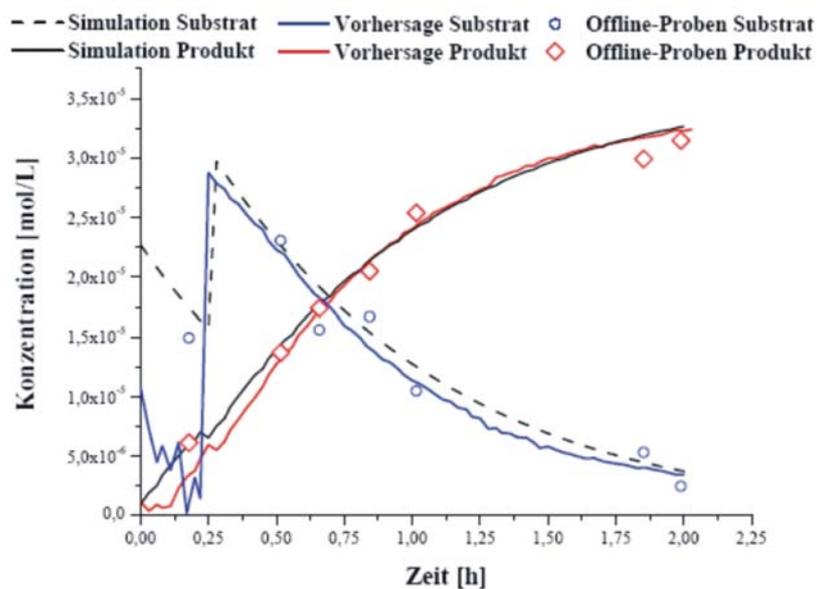


Abbildung 8: Simulation, Vorhersage und Offline Messungen für Prozess B