

Multiwellenlängen UV/DUV Spektroskopie

zur Messung der Biomolekülkonzentration in
GMP- und Non-GMP-Tests



Keine Verdünnungen: Messen Sie hochkonzentrierte Proben ohne Vorbehandlung.

Sofortige Ergebnisse: Echtzeit-Datenerfassung.

Keine Probenahme: Nicht-destruktive Inline-Messung.

Keine Verbrauchsgüter: Keine Reagenzien oder beweglichen Teile.

Niedrige Unterhaltungskosten: Ultra-niedriger Wartungsaufwand.

Totraumfreie Installation: Optimiert für Prozessintegrität und Hygiene.

NIST Rückverfolgbarkeit: Vereinfachte Verifizierung und Einhaltung gesetzlicher Vorschriften.

cGMP-konform: Optimierte IQ-, OQ- und PQ-Protokolle für die Validierung.



Das **Kemtrak SPECTRA Industrie-Prozessphotometer** nutzt mehrwellige ultraviolette (UV) und tiefe ultraviolette (DUV) Technologie zur kontinuierlichen Messung von Biomolekülkonzentrationen in der Bioverarbeitung. Als robuste und zuverlässige Lösung liefert SPECTRA Echtzeit- und genaue Ergebnisse mit außergewöhnlicher System-zu-System-, Operator-zu-Operator- und Site-to-Site-Konsistenz..

Im Gegensatz zu Prozessphotometern mit fester Wellenlänge, die einen einzigen Wert liefern, misst SPECTRA gleichzeitig über ein breites Spektrum von Wellenlängen. Nach dem Beer-Lambert-Gesetz ist der molare Absorptionskoeffizient wellenlängenabhängig; SPECTRA nutzt diese Tatsache, um die Konzentration kontinuierlich zu überwachen, ohne dass Probenverdünnung oder komplexe mechanische Komponenten erforderlich sind.

Das Ergebnis ist eine sofortige, validierte Messung. Das Fehlen beweglicher Teile verringert das Risiko von Messfehlern drastisch und hält gleichzeitig Wartungsanforderungen und Betriebskosten auf einem Minimum.

Konzentrationsmessung von Biomolekülen

Aufgrund ihrer Spezifität, zerstörungsfreien Natur und schnellen Messgeschwindigkeit ist die Multiwellenlängen-UV/DUV-Spektroskopie die bevorzugte Technik zur Messung der Biomolekülkonzentration (Singh et al. 2021; Carvalho et al. 2025). Biomoleküle wie Proteine, Peptide, monoklonale Antikörper, mRNA/DNA und Aminosäuren absorbieren Licht bei spezifischen UV/DUV-Wellenlängen.

Proteine absorbieren überwiegend bei 280 nm und unter 220 nm aufgrund der aromatischen Seitenketten von Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin (Antosiewicz und Shugar 2016). Das Verhältnis der Wellenlängen in diesem Bereich kann verwendet werden, um das Protein für Fraktionierung, Identifikation, Qualitätskontrolle und real-time release Anwendungen zu erfassen (Carvalho et al. 2025; Farag et al. 2022; Schmid (2008); He et al. 2019).

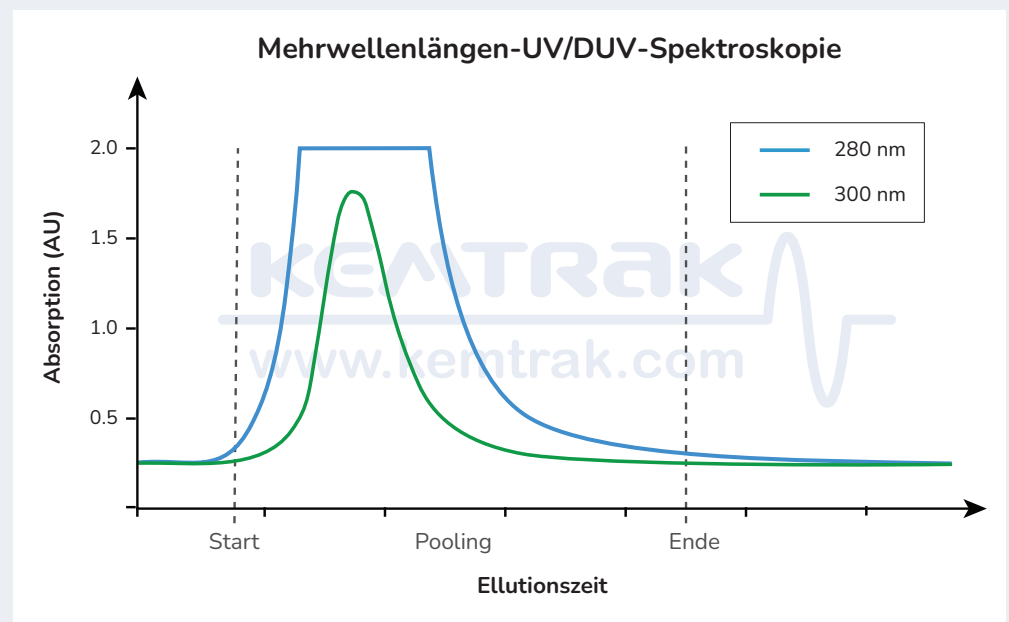
RNA absorbiert überwiegend bei 260 nm, was die Grundlage für die Quantifizierung ihrer Konzentration und die Bewertung der Reinheit aufgrund der konjugierten Doppelbindungen in ihren Nukleotidbasen bildet. Das Verhältnis von Absorption bei 260 nm zur Absorption bei 280 nm (A_{260}/A_{280}) hilft, die RNA-Reinheit zu bestimmen; ein Verhältnis von etwa 2,0–2,1 weist auf hohe Reinheit hin, während niedrigere Werte auf eine Proteinkontamination hindeuten können (Wilfinger et al. 1997; Imbeaud 2005; Gomes 2021).

Die Überwachung von sehr hohen Proteinkonzentrationen in der Biotechnologie

Die genaue Quantifizierung von DNA- oder Proteinwerten in Zellextrakten ist ein Grundpfeiler der modernen Bioprocessing. Während die Branche auf ausgefeilte monoklonale Antikörpertherapien (mAb) und verbesserte Produktionstechnologien umsteigt, war die Nachfrage nach Echtzeit-Online-Überwachung nie größer. Dieser Wandel hat neue Methoden zur Messung außergewöhnlich hoher Proteinkonzentrationen erforderlich gemacht, oft zwischen 40 und 500 mg/mL und manchmal sogar noch höher.

Abb. 1.

Anwendung der Multi-Wellenlängen-Technologie zur Messung sehr hoher Proteinkonzentrationen, um eine genaue Kontrolle der chromatografischen Elution sicherzustellen. In diesem Beispiel wird 280 nm für hochempfindliche Start-/Stopsteuerung der Fraktionierung verwendet, während 300 nm zur Berechnung des gesamten elutierten Volumens verwendet werden.



In einem typischen Chromatographie-Setup sind 215 nm und 280 nm UV-Sensoren der Goldstandard zur Erkennung von kleinstmengen von Proteinen mit hoher Präzision, was diese Wellenlängen ideal macht, um Fraktions-Sammelfenster zu bestimmen. Bei den sehr hohen Konzentrationen, die in der fortgeschrittenen Biofertigung erforderlich sind, wird das Instrument selbst bei deutlich verkürzter optischer Pfadlänge bei diesen Wellenlängen oft vom Maßstab abfallen.

Um sehr hohe Konzentrationen genau zu messen, ist die einfachste Lösung die Verwendung einer zweiten Wellenlänge. Dieser Ansatz stellt sicher, dass das Photometer in seinem idealen linearen Bereich arbeitet und während des gesamten Elutionsprozesses zuverlässige Daten liefert.

Grundlagen für das Verständnis der Absorption, optischer Dichte und ihrer Messung

Die Absorption wird durch das Beer-Lambert-Gesetz definiert, das eine direkte, lineare Beziehung zwischen der Menge an Licht, die eine Substanz absorbiert, und ihren physikalischen Eigenschaften festlegt:

$$A = \log(I_0/I) = \epsilon(\lambda) \cdot l \cdot c$$

In der Bioprozessierung werden "optische Dichte" (OD) und "Absorption" häufig synonym verwendet, um dieselbe logarithmische Messung des Lichtverlusts zu beschreiben, wobei sie je nach Kontext technische Unterschiede aufweisen. Kemtrak und andere Hersteller verwenden OD, um die Absorption zu definieren, die auf eine Pfadlänge von 1 cm normalisiert ist.

$$OD = A / l$$

Dies ermöglicht einen direkten Vergleich zwischen verschiedenen Sensorkonfigurationen, ohne die optische Weglänge kennen zu müssen.

Der optimale Betriebsbereich

Die Absorption wird typischerweise in Absorptionseinheiten (AU) gemessen. Aufgrund elektronischer und optischer Konstruktionsbeschränkungen sollten die Messungen für die meisten Standardinstrumente idealerweise zwischen 0,01 AU und 2,0 AU liegen, um maximale Präzision zu erreichen.

Unterhalb von 0,01 AU kann Instrumentenrauschen oder Nulldrift die Genauigkeit unverhältnismäßig beeinflussen, wenn sich die Signalstärke dem Detektionslimit nähert. Umgekehrt weicht die Antwort des Analysators über 2,0 AU, bei denen nur 1 % des Lichts den Detektor erreicht, oft vom linearen Bereich ab. Bei diesen höheren optischen Dichten wird das Signal schwach, und Streulicht beginnt, die Anzeige zu "stören", was eine negative Abweichung von den mit dem Beer-Lambert-Gesetz berechneten Werten verursacht.

Optimierung der Messung für Prozessanwendungen

Der Nutzen des Beer-Lambert-Gesetzes liegt in seiner Flexibilität: Durch Anpassung der Wellenlänge (der den molaren Absorptionskoeffizienten $\epsilon(\lambda)$) bestimmt, die Weglänge (l) oder die Probenkonzentration (c) kann die Absorption (A) im idealen Betriebsbereich des Analysators gehalten werden. Diese Flexibilität ermöglicht es einem Photometer, Substanzen

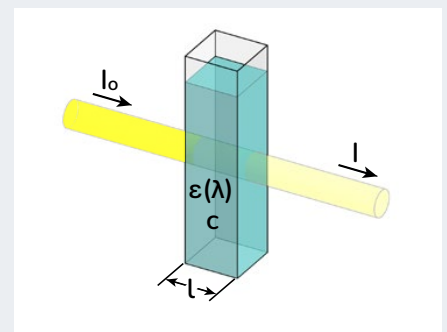


Abb. 2.

Das Beer-Lambert-Gesetz definiert Absorption als proportional zu Konzentration und optischer Weglänge bei einer bestimmten Wellenlänge.

A (Absorbance): Gemessen mit einem Photometer (bei bestimmten Wellenlängen) oder einem Spektrophotometer (über ein kontinuierliches Spektrum).

$\epsilon(\lambda)$ (Molare Absorptivität): Eine substanzspezifische Konstante, die quantifiziert, wie stark ein Molekül Licht bei einer bestimmten Wellenlänge absorbiert.

l (Pfadlänge): Die Entfernung, die das Licht durch die Probe zurücklegt.

c (Konzentration): Die Konzentration der absorbierenden Substanz in der Lösung.

routinemäßig über einen sehr breiten Konzentrationsbereich zu messen, von sehr hohen Proteinkonzentrationen über 500 mg/mL bis hin zu Spurenwerten (0,001 mg/mL).

- **Konzentration (c):** Im Labor ist die Konzentration die häufigste Variable. Proben werden typischerweise verdünnt, um sicherzustellen, dass sie den Designvorgaben des Analysators entsprechen. Für kontinuierliche Inline-Anwendungen ist die Probenverdünnung jedoch im Allgemeinen unpraktisch oder unmöglich.
- **Pfadlänge (l):** Während Labore typischerweise eine feste 1 cm große Küvette verwenden, ist die Auswahl einer optimierten optischen Pfadlänge Standardpraxis bei Prozessphotometern. Die Arbeit mit schmalen Pfadlängen (weniger als 0,5 mm) wird jedoch oft vermieden. Kleine Lücken sind schwer zu füllen, anfällig für Verstopfungen und unterliegen Oberflächenkräften, die den Flüssigkeitsfluss behindern und Luftblasen einschließen. Die In-situ-Anpassung der Pfadlänge führt zu mechanischer Komplexität und Unsicherheit hinsichtlich des exakten Pfadlängenwerts, was zu Konzentrationsberechnungsfehlern führen kann. Um die Datenintegrität zu gewährleisten, ist es empfehlenswert, robuste, feste Weglängen zu verwenden, die so dimensioniert sind, dass die Zielabsorption innerhalb des linearen Dynamikbereichs des Detektors bleibt.
- **Wellenlänge / Molarer Absorptionskoeffizient ($\epsilon(\lambda)$):** Da der molare Absorptionskoeffizient wellenlängenabhängig ist, ist die Wahl einer alternativen Messwellenlänge die einfachste und effektivste Methode für Inline-Anwendungen. Durch die Wahl einer Wellenlänge, bei der die Substanz weniger stark absorbiert wird, können hochkonzentrierte Proben genau und wiederholbar gemessen werden, ohne Verdünnung oder problematische ultrakurze Pfadlängen.

Die Notwendigkeit eines breiten Dynamikumfangs in der Biotechnologie

In der modernen Bioverarbeitung ist es unerlässlich, Analytoren zu verwenden, die einen sehr breiten Konzentrationsbereich abdecken können – von Spurenmengen bspw. während der Reinigung bis hin zu hochkonzentrierten Formulierungen.

Herausforderungen mit bei Photometern mit fester Wellenlänge

Aufgrund der Einfachheit und Robustheit dieser Geräte werden Photometer mit fester Wellenlänge häufig zur Echtzeit-Proteinüberwachung in Produktionsumgebungen verwendet. Allerdings haben Sensoren mit fester Wellenlänge Einschränkungen hinsichtlich des Dynamikbereichs, wenn hohe Probenkonzentrationen vorhanden sind. Typischerweise sind diese Instrumente für hohe Konzentrationen konfiguriert, allerdings auf Kosten der Empfindlichkeit bei niedrigeren Werten. Bei der Erkennung von APIs (Wirkstoffen) nach der Säule kann dieses Ungleichgewicht oft zu suboptimaler Fraktionierung und unerwünschten Ertragsverlust führen.

Herausforderungen mit variabler Pfadlängenspektroskopie

Variable Pfadlängensysteme passen den optischen Weg mechanisch an, um die Absorption innerhalb des linearen Bereichs des Photometers zu erhalten. Diese Systeme bringen jedoch mehrere Nachteile für moderne Anlagen mit sich:

- **Diskontinuierliche Daten:** Die Ausgabe der Messwerte erfolgt nicht in Echtzeit und benötigt oft bis zu 30 Sekunden pro Messung.
- **Mechanische Risiken:** Bewegliche Teile unterliegen mechanischen Toleranzen und Verschleiß, was häufige Wartungen sowie Verbrauchsmaterialien und Überprüfungen erfordert.

- **Sicherheitsbedenken:** Bewegte Glasoptikkomponenten können Schäden verursachen und Glasfragmente in das Prozessmedium einbringen.
- **Validierungshürden:** Der Hauptnachteil besteht darin, dass diese Geräte oft zur Validierung aus der Prozesslinie entfernt werden müssen, was Prozessstörungen verursacht und das Kontaminationsrisiko erhöht. Außerdem garantiert die Offline-Validierung unter tatsächlichen Prozessbedingungen keine identische Leistung.

Vorteile der Multi-Wellenlängen-Technologie

Mehrwellenlängenspektroskopie wurde eingeführt, um Einschränkungen bei höheren Konzentrationen aufgrund der Signalsättigung und der Nichtlinearität des Beer-Lambert-Gesetzes zu überwinden (Chen, Z et al. 2018, Vanderlinde 1982).

Das Kemtrak SPECTRA ist ein industrielles Prozessphotometer, das ein Diodenarray-Spektrophotometer mit fester optischer Weglänge verwendet und durch Einfachheit und Zuverlässigkeit eine überlegene Alternative bietet :

- **Sofortige Messung:** Ohne bewegliche Teile erfolgt die Datenerhebung in Echtzeit und kontinuierlich
- **In-Line Validierung:** Der Analysator kann in-situ mit NIST-nachverfolgbaren Standards validiert werden, ohne das Produkt aus der Prozesslinie zu entfernen.
- **Betriebseffizienz:** Durch die Beseitigung mechanischer Systemkomponenten minimiert das System den Wartungsbedarf und senkt die total cost of ownership (TCO).
- **Unbeeinträchtigte Genauigkeit:** Die Messungen werden mit rückverfolgbaren Standards validiert, was das höchste Maß an Vertrauen sowohl in GMP- als auch in Nicht-GMP-Umgebungen sicherstellt.

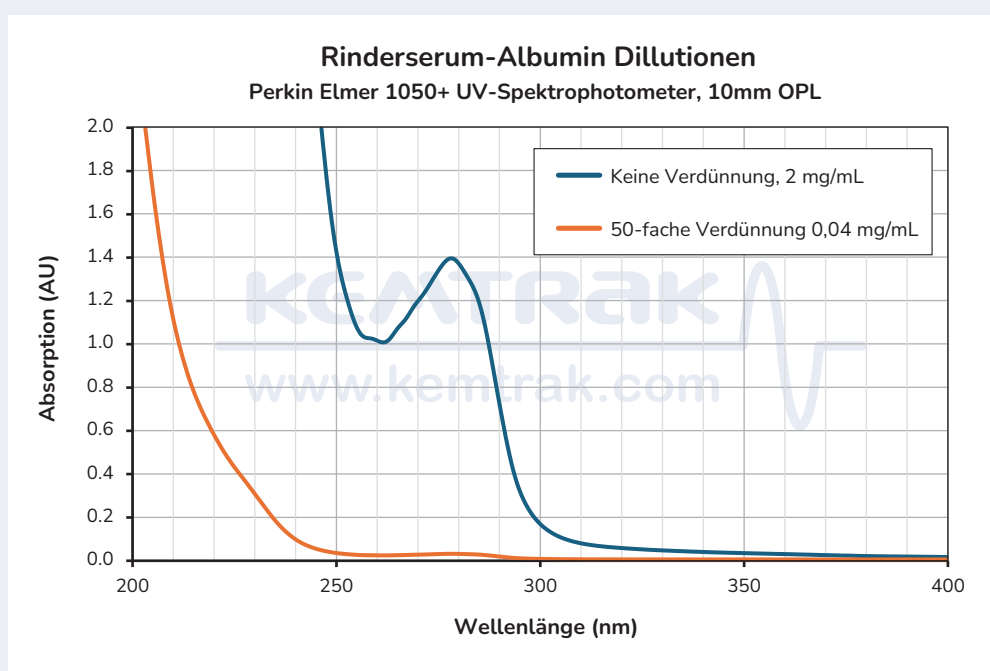
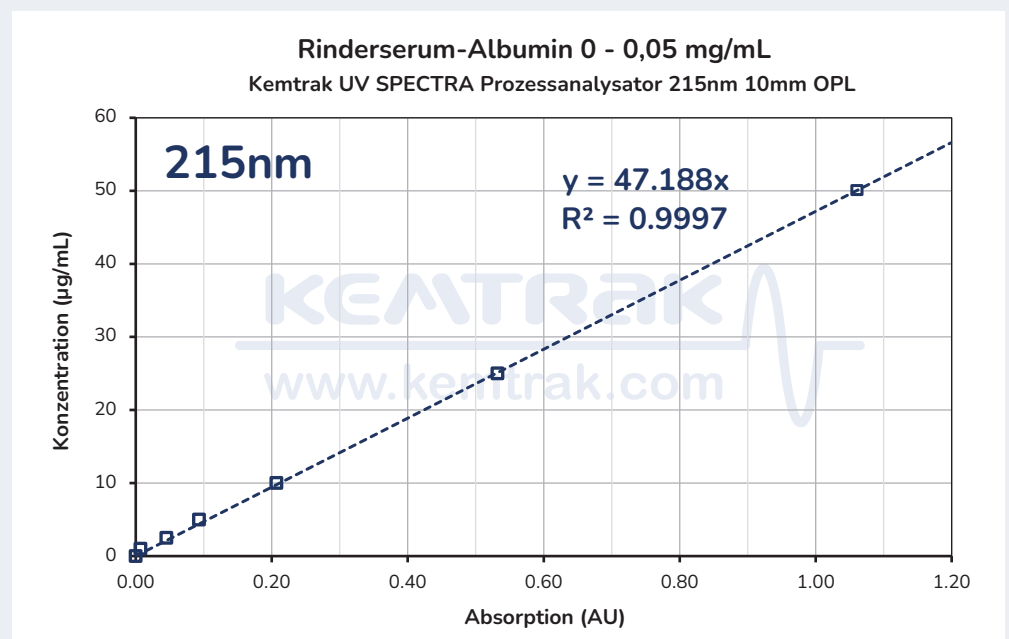
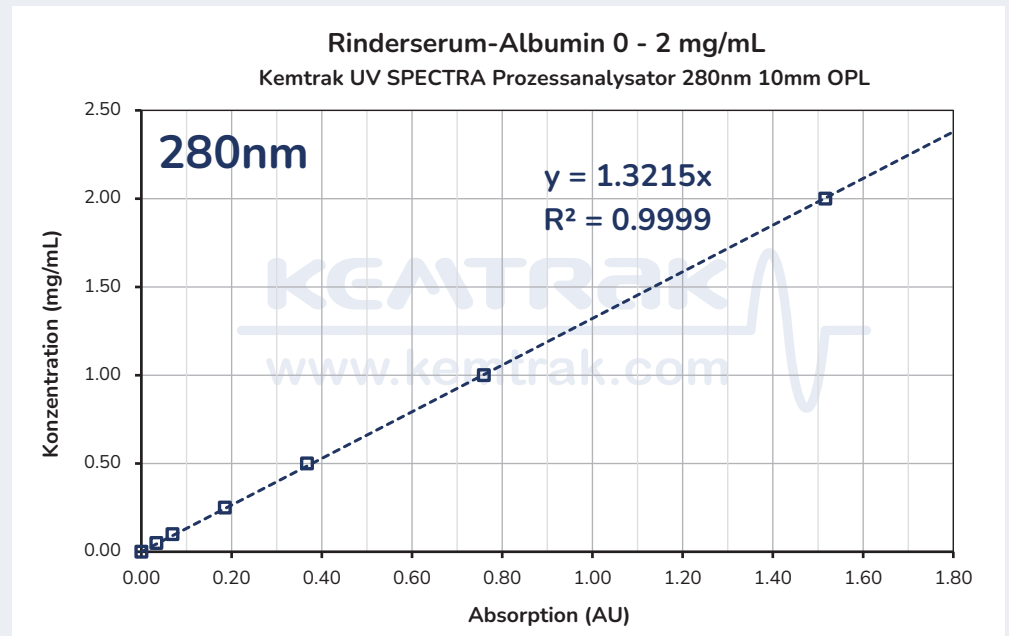


Abb. 3.

Absorptionsspektrum des Bovine Serum Albumin (BSA) Standard, 2 mg/mL (Thermo Scientific Product Number: 23210, Lot: XA341285) mit einem Perkin Elmer Lambda 1050+ UV/Vis/NIR Laborspektrophotometer. Hohe Konzentrationen (2 mg/mL) können nach einer 50-fachen Verdünnung über 250 nm oder unter 250 nm gemessen werden. raktionierung und unerwünschten Ertragsverlust führen.

Abb. 4.

Das Kemtrak SPECTRA ist in der Lage, kontinuierliche Multiwellenlängenmessungen von Bovinem Serumalbumin (BSA) über ein breites Spektrum hinweg durchzuführen, von konzentrierten Werten (2 mg/mL) bis hin zu Spurwerten (0,001 mg/mL). Durch die gleichzeitige Überwachung zweier Wellenlängen, 215 nm und 280 nm, unter Verwendung einer festen optischen Pfadlänge von 10 mm, erhält das System eine hohe Präzision. Bemerkenswert ist, dass der r^2 -Wert 0,999 übersteigt, was eine lineare Reaktion zwischen Absorption und Konzentration über den gesamten Messbereich zeigt.



Überblick über Spektrophotometer-/ Photometer-Designarchitekturen

Spektrophotometer sind in mehreren unterschiedlichen Designs erhältlich, die jeweils für bestimmte Umgebungen optimiert sind:

Rasterspektrophotometer

Dieses Instrument verwendet ein bewegliches Beugungsgitter, um Wellenlängen sequentiell zu isolieren und zu messen. Obwohl sie eine hohe spektrale Auflösung und Empfindlichkeit bieten, sind sie im Allgemeinen für kontinuierliche Prozessanwendungen ungeeignet. Die Abhängigkeit von präzisen beweglichen Teilen führt zu langsameren Datenerfassungsgeschwindigkeiten und hohen Wartungsaufforderungen, was die Implementierung in 24/7-Produktionsumgebungen unmöglich macht.

Photometer mit fester Wellenlänge (Filter)

Dieses Gerät verwendet physikalische optische Filter, um eine oder mehrere spezifische Wellenlängen zu isolieren und bietet so eine robuste, kosteneffiziente Lösung für kontinuierliche Inline-Analysen.

- **Traditionelle Modelle:** Bei Verwendung von Breitbandlichtquellen ist die spektrale Auflösung oft durch Streulicht begrenzt (unerwünschte Wellenlängen, die durch den Filter gelangen). Dieses Leck kann zu nichtlinearer Absorption führen, wodurch der effektive Betriebsbereich typischerweise auf etwa 2 AU begrenzt wird.
- **Moderne LED-Modelle:** LED-basierte Photometer reduzieren Streulicht erheblich, indem sie schmalbandige Lichtquellen verwenden. Dies ermöglicht einen linearen Betrieb über einen viel größeren Bereich, oft vergleichbar mit hochwertigen Laborspektrophotometern, sind jedoch viel robuster.

Diodenarray-Spektrophotometer (Kemtrak SPECTRA)

Dieses System verwendet ein festes Gitter und ein Array von Photodioden, um das gesamte Spektrum gleichzeitig zu messen. Diese Architektur ermöglicht eine extrem schnelle Datenerfassung und hohe Zuverlässigkeit, da keine beweglichen Teile vorhanden sind. Diodenarray-Systeme können anfällig für höhere Streulichtstufen und eine geringere spektrale Auflösung im Vergleich zu Scanmodellen sein und werden daher typischerweise unter 2,0 AU für maximale Genauigkeit betrieben; sie sind die einzige Wahl für die Echtzeit-Prozessüberwachung, bei der sofortige, mehrwellige Daten erforderlich sind.



References

- Carvalho et al. (2025):** "A review on quantitative process analytical technology for continuous downstream processing of monoclonal antibodies." *Biotechnology and Bioengineering*.
- Chen et al. (2018):** "A mathematical analysis of deviations from linearity of Beer's law." *Measurement Science and Technology*.
- Farag et al. (2022):** "UV Fingerprinting Approaches for Quality Control Analyses of Food and Functional Food Coupled to Chemometrics." *Foods*, 11(18), 2867.
- Gomes et al. (2021):** "UV-induced fingerprint spectroscopy: A new tool in a toolbox of analytical methods." *Food Chemistry*, 368, 130830.
- He et al. (2019):** "A method to probe protein structure from UV absorbance spectra." *Analytical Biochemistry*.
- Imbeaud et al. (2005):** "Towards standardization of RNA quality assessment using user-independent classifiers of microcapillary electrophoresis traces." *Nucleic Acids Research*, 33(6), e56.
- Schmid (2008):** "Determining the identity and purity of recombinant proteins by UV absorption spectroscopy." *Current Protocols in Protein Science*.
- Singh et al. (2021):** "Multi-wavelength UV-based PAT tool for measuring protein concentration and monitoring protein aggregation in continuous chromatography". *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 96(10), 2824–2834.
- Vanderlinde (1982):** "Introduction to Multiple-Wavelength Spectrophotometric Analysis." *Clinical Laboratory*.
- Wilfinger et al. (1997):** "Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity." *BioTechniques*, 22(3), 474–481.

Über den Autor

Matthew Rice hat einen PhD in Analytischer Chemie vom Royal Institute of Technology, Stockholm, und einen Abschluss in Chemieingenieurwesen von der Universität Sydney. Matthew ist Gründer und CEO von Kemtrak AB, einem schwedischen Hightech-Unternehmen, das leistungsstarke industrielle Prozessinstrumentierung entwickelt und herstellt.

Unter seiner Führung hat Kemtrak durch Innovation, Qualität und internationales Wachstum weltweite Anerkennung erlangt. Matthew ist außerdem in mehreren Vorständen tätig und trägt zu den industriellen und technologischen Sektoren Schwedens bei.



Für detaillierte Spezifikationen der Kemtrak Spectra besuchen Sie bitte kemtrak.com, um ein Produktblatt herunterzuladen.

Kemtrak AB
Polygonvägen 45
187 66 Täby
Sweden

Phone: +46 10 511 0700
Email: sales@kemtrak.com
Website: www.kemtrak.com