



UNIVERSITÄT ZU LÜBECK

Institut für Medizintechnik
Direktor: Prof. Dr. rer. nat. Torsten Buzug

Polarimetrische Bestimmung von Glucose in Anwesenheit von Störstoffen

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck

- Aus der Sektion Informatik/Technik -

vorgelegt von
Christian Stark
aus Bad Oldesloe

Lübeck, 2020

1. Berichtstatter: Prof. Dr. rer. nat. Torsten Buzug

2. Berichtstatter: Prof. Dr. rer. nat. Robert Huber

Tag der mündlichen Prüfung: 14.10.2020

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 20.10.2020

Kurzfassung

Die Blutzucker-Bestimmung nimmt bei der Therapie von Diabetes-Patienten eine zentrale Rolle ein. Da bei den aktuell gebräuchlichen enzymatisch-amperometrischen Messverfahren Nachteile wie Temperaturempfindlichkeit und benötigte Verbrauchsmaterialien bestehen, wird seit vielen Jahren an alternativen, vorzugsweise optischen Messverfahren geforscht. Grundsätzlich sind hierfür absorptionsspektroskopische und polarimetrische Ansätze geeignet, die jedoch individuelle Nachteile wie geringe Sensitivität oder Empfindlichkeit gegenüber Streuung aufweisen. In dieser Arbeit wurden daher beide Messverfahren miteinander kombiniert, um mittels multivariater Datenanalyse anhand breitbandig gemessener Rotationsdispersionen zwischen Glucose und Störstoffen, wie zum Beispiel Eiweißen, unterscheiden zu können.

Hierzu wurde ein mit der Frequenz ω optisch moduliertes Breitbandpolarimeter entwickelt und die einzelnen Baugruppen wie Lichtquelle, Detektor und der optische Modulator hinsichtlich ihrer Eigenschaften optimiert. Neben dem stets im Messsignal vorhandenen Intensitätsanteil $I(2\omega)$ finden sich bei Anwesenheit einer optisch aktiven Substanz auch Anteile mit der Modulationsfrequenz $I(\omega)$ im Messsignal wieder, die durch Fouriertransformation extrahiert und aufgezeichnet wurden. Dabei konnte gezeigt werden, dass der Einfluss der absoluten Lichtintensität auf die Anteile $I(\omega)$ und $I(2\omega)$ gleich ist, jedoch nur $I(\omega)$ von der optischen Aktivität der Probe beeinflusst wird. Hieraus folgt, dass das Intensitätsverhältnis $\frac{I(\omega)}{I(2\omega)}$ zwar linear von der Rotationsdispersion abhängt, jedoch unabhängig von Einflüssen auf die absolute Lichtintensität ist.

Sämtliche Störeinflüsse, die aus der Anmischung der Proben sowie der Stabilität der optischen Modulation beziehungsweise der einzustellenden Messparameter resultieren, wurden evaluiert und ihr Beitrag als ausreichend gering nachgewiesen. In diesem Zusammenhang erfolgte auch eine Untersuchung des Temperatur- und pH-Wert-Einflusses auf die Proben von Glucose und Albumin, der sich ebenfalls als niedrig herausstellte.

Es wurde experimentell nachgewiesen, dass sich die Glucose-Vorhersagegenauigkeit in Anwesenheit von Störeinflüssen wie schwankender Lichtquellenintensität, Probenabsorption oder -streuung durch Verwendung des Verhältnisses $\frac{I(\omega)}{I(2\omega)}$ im Vergleich zum konventionell verwendeten $I(\omega)$ erheblich verbessern lässt. Solange noch Restpolarisation messbar ist, wurden hier mit eingebrachten Störquellen nahezu identische Genauigkeiten erreicht wie ohne [1].

Zur Untersuchung der Überlagerung der Rotationsdispersionen verschiedener Stoffe wurden Glucose und Albumin, das am stärksten vertretenen Bluteiweiß, miteinander vermischt und mittels Partial Least Squares (PLS) Regression im Wellenlängenbereich von 380 – 680 nm evaluiert. Dabei zeigte sich, dass die Vorhersagegenauigkeit im Vergleich zu den aus der Literatur bekannten Verfahren um etwa den Faktor 10 verbessert werden konnte [7, 46]. Bei physiologischer Variation der Albumin-Konzentration von 0 – 1000 mg/dl wurde eine Vorhersagegenauigkeit von ± 16 mg/dl erreicht [2].

Abschließend erfolgte eine Konzentrationsbestimmung von Glucose in humanen Blutplasma-Proben. Dafür wurden dem Blutplasma verschiedene Glucose-Konzentrationen im Bereich 0 – 500 mg/dl zugesetzt. Es konnte demonstriert werden, dass auch in diesem Fall die Glucose-Konzentration mit klinisch ausreichender Genauigkeit vorhergesagt wird.

Die Erkenntnisse dieser Arbeit zur polarimetrischen Glucose-Bestimmung eröffnen nicht nur in der Medizintechnik sondern auch in anderen Feldern wie zum Beispiel der Lebensmittelindustrie viele neue Anwendungsfelder, bei denen eine präzise und zuverlässige Bestimmung von Glucose oder anderen optisch aktiven Substanzen in Anwesenheit von Störstoffen nötig ist.

Abstract

Blood glucose determination plays a central role in therapy for diabetes patients. Since disadvantages like temperature dependence and the demand for consumables exist in the currently used enzymatic-amperometric measuring methods, alternative preferably optical methods have been investigated for many years. Basically, absorbance spectroscopy and polarimetry are suitable for this, but they suffer from individual disadvantages such as low sensitivity or interferences caused by scattering effects. Therefore, in this thesis both measurement methods were combined with each other in order to distinguish between glucose and impurities, like proteins, using multivariate data analysis on broadband rotatory dispersions.

For this purpose, an optically modulated broadband polarimeter, operated at frequency ω , was designed while the individual components such as light source, detector or the optical modulator were optimized with respect to their properties. In addition to the intensity component $I(2\omega)$ which is always present in the measurement signal, components with the modulation frequency component $I(\omega)$ can be found as well if an optically active substance is present. These components were extracted by Fourier transform and recorded subsequently. In this context, it could be demonstrated that the influence of the absolute light intensity on $I(\omega)$ and $I(2\omega)$ is similar, while $I(\omega)$ depends on the optical activity of the sample exclusively. Consequently, the intensity ratio $\frac{I(\omega)}{I(2\omega)}$ still depends linearly on the rotatory dispersion but is independent from the absolute light intensity.

All interferences resulting from sample preparation or stability of the optical modulation and the measurement parameters to be set respectively were evaluated in detail and proved that their contribution was sufficiently small. In this regard an investigation of temperature and pH influence on the samples of glucose and albumin was performed, which also turned out to be of minor importance.

It was experimentally shown, that the glucose predictability in the presence of interferences like fluctuating light source emission, sample absorption or scattering could be substantially improved utilizing the ratio $\frac{I(\omega)}{I(2\omega)}$ instead of conventionally used $I(\omega)$. As long as parts of the light are still polarized, glucose predictability with additional introduced disturbances is similar to those without [1].

In order to investigate the spectral overlap of optical rotatory dispersions, glucose and albumin as the most present blood protein were mixed and evaluated using partial least squares regression in the wavelength range of 380 – 680 nm. It was shown that the predictability of glucose could be improved by a factor of 10 in comparison to conventional two-wavelength determination. In the presence of physiological variation of albumin concentration in the range of 0 – 1000 mg/dl, a prediction accuracy of ± 16 mg/dl was achieved [2].

Subsequently, a concentration determination of glucose was performed in real human blood samples. For this purpose the blood plasma was spiked with different glucose concentrations in the range of 0 – 500 mg/dl. It could be demonstrated that even in this case, the glucose concentration could be predicted with sufficient clinical accuracy.

The scientific results of this thesis about polarimetric glucose determination open many opportunities, not only in medical technology, but also in other fields of research e.g. food industry, where a precise and reliable determination of glucose or other optically active substances is demanded.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	ix
Formelverzeichnis	xi
1 Einleitung und Motivation	1
1.1 Medizinischer Hintergrund	1
1.2 Glucose-Messverfahren - Stand der Technik	2
1.2.1 Enzymatische Sensoren	5
1.2.2 Physikalische Messverfahren	7
1.2.3 Absorptionsspektroskopie	10
1.2.4 Polarimetrie	14
1.3 Zieldefinition	18
2 Theoretischer Hintergrund	20
2.1 Optische Aktivität	20
2.1.1 Optische Rotationsdispersion (ORD)	20
2.1.2 Rotationsdispersionen verschiedener Moleküle	23
2.2 Polarimeterprinzip/Polarisationszustände	24
2.2.1 Grundlegendes Polarimeterprinzip	24
2.2.2 Optische Modulation	26
2.2.3 Herleitung der zeitlich modulierten Intensität	28
2.3 Konzentrationsbestimmung	31
2.3.1 Multivariate Datenanalyse	31
2.3.2 Praktische Anwendung	33
3 Material und Methoden	35
3.1 Messaufbau	36
3.1.1 Lichtquellen	37
3.1.2 Polarisationsfilter	39
3.1.3 Faraday-Rotator	42
3.1.3.1 Optisches Glas	43
3.1.3.2 Spule zur Magnetfelderzeugung	46
3.1.4 Küvette	48
3.1.5 Spektrometer	49
3.1.6 Elektrische Ansteuerung	50
3.1.7 Automatische Probenmischung	52
3.1.8 Temperaturstabilisierung	54
3.2 Charakterisierung der Messparameter	55
3.2.1 Signalform	56
3.2.2 Modulationsfrequenz	56
3.2.3 Messzeit	57
3.3 Messdurchführung	59
3.3.1 Messvorbereitung	59
3.3.2 Steuerung des Messaufbaus	61
3.3.3 Datenauswertung	65
3.4 Untersuchung von Störeinflüssen	69
3.4.1 Mechanische Einflüsse	69

3.4.2	Probeneigenschaften	72
3.4.2.1	Rotationsdispersion optisch aktiver Blutinhaltsstoffe . . .	72
3.4.2.2	pH-Einfluss	74
3.4.2.3	Temperatureinfluss	75
3.4.2.4	Probenabsorption	77
3.4.3	Probenmischung	78
3.4.4	Faraday-Rotator	81
3.4.5	Spektrometer-Timing	85
4	Ergebnisse	87
4.1	Kompensation von Störeinflüssen	87
4.1.1	Monochromatische Konzentrationsbestimmung	87
4.1.1.1	Glucose-Bestimmung ohne Störeinflüsse	88
4.1.1.2	Variation der Lichtquellenintensität	92
4.1.1.3	Schwankung der Probenabsorption	93
4.1.1.4	Einfluss der Streuung	95
4.1.2	Breitbandige Bestimmung der Glucose-Konzentration	98
4.1.2.1	Glucose-Bestimmung ohne Störeinflüsse	98
4.1.2.2	Variation der Lichtquellenintensität	101
4.1.2.3	Schwankung der Probenabsorption	102
4.1.2.4	Einfluss von Streueigenschaften	105
4.2	Messung von Stoffgemischen optisch aktiver Substanzen	107
4.2.1	Glucose und Albumin Gemische	107
4.2.1.1	Glucose-Bestimmung	109
4.2.1.2	Eiweiß-Bestimmung	113
4.2.1.3	Kombination von Rotation und Absorption	115
4.2.2	Glucose gemischt mit sonstigen optisch aktiven Stoffen	120
4.3	Glucose-Bestimmung in humanen Proben	123
4.3.1	Anpassung des Messaufbaus	123
4.3.2	Konzentrationsbestimmung in Blutplasma	127
5	Zusammenfassung, Diskussion und Ausblick	130
5.1	Zusammenfassung	130
5.2	Diskussion	131
5.3	Abschließende Bewertung	136
5.4	Ausblick	137
	Literaturverzeichnis	139
6	Anhang	161

Abbildungsverzeichnis

1	Clarke's Error Grid	5
2	Reaktionsgleichung Glucose-Oxidase	5
3	Schematische Darstellung der optischen Kohärenztomographie	8
4	Schematische Darstellung eines Absorptionsspektroskopie-Messaufbaus	10
5	Allgemeine schematische Darstellung eines Polarimeter-Messaufbaus	15
6	Schematische Darstellung der Polarimetrie an der Augenflüssigkeit	16
7	Strukturformen von Glucose	21
8	Spezifische Drehung verschiedener Moleküle	24
9	Schematische Darstellung des Polarimeterprinzips	25
10	Detektorintensität in Abhängigkeit von der Probenkonzentration	26
11	Schematische Darstellung der Polarimeter-Intensität ohne Probe	27
12	Schematische Darstellung der Polarimeter-Intensität mit Probe	28
13	Darstellung der Konzentrationsbestimmung mittels multivariater Datenanalyse	31
14	Faktorenzerlegung der Hauptkomponentenanalyse	33
15	Schematische Darstellung des Messaufbaus	35
16	Schematische Darstellung des Messaufbaus	36
17	Vergleich Lichtintensität LED vs LDLS	39
18	Verdet-Konstante und Transmission optischer Gläser	45
19	Normierte Verdet-Konstante und Transmission optischer Gläser	45
20	Spule des Faraday-Rotators	47
21	Durchflussküvette	49
22	Schematische Darstellung der elektrischen Ansteuerung	51
23	Schematische Darstellung der Probenmischung	53
24	Darstellung des vollständigen Messaufbaus	55
25	Signalform des Spektrometers mit und ohne Probe	56
26	S/N in Abhängigkeit der Modulationsfrequenz	57
27	S/N in Abhängigkeit der Anzahl der Messzeit	58
28	Funktionsweise der Steuerungssoftware	62
29	Einstellungsmenü der Steuerungssoftware	62
30	Zeitlicher Ablauf einer Messung zur Konzentrationsvorhersage	63
31	Anzeige der Messdaten aus der Steuerungssoftware	65
32	Schematische Darstellung der Datenauswertung	66
33	Polarisationsfilterhalter	70
34	Auswirkungen von Temperaturschwankungen auf die Filterhalter	71
35	Temperaturstabilität des Messaufbaus	71
36	Spezifische ORD verschiedener Blutinhaltsstoffe	73
37	Spezifische ORD in Abhängigkeit vom pH-Wert	74
38	Spezifische Glucose-Rotation in Abhängigkeit der Temperatur	76
39	Transmission verschiedener Albumin-Konzentrationen	78
40	Schematische Darstellung der Überprüfung des Dosierungsfehlers	79
41	Dosiergenauigkeit NeMESYS jeweilige Schritte	80
42	Standardabweichungen der NeMESYS Dosiergenauigkeiten	80
43	Modulationstiefe des Fararaday Rotators	82
44	Relative Stromstabilität des Faraday-Rotators	84
45	Stromstabilität des Faraday-Rotators	85

46	Frequenzanteile in Abhängigkeit der Glucose-Konzentration	89
47	Glucose-Vorhersage ohne Störstoffe für $I(\omega)$ und $\frac{I(\omega)}{I(2\omega)}$	90
48	Vorhersagefehler vs. Messwert Nummer	91
49	Vorhersagefehler vs. Abweichung zu vorheriger Konzentration	91
50	Frequenzanteile in Abhängigkeit des LED-Stroms	92
51	Glucose-Vorhersage für $I(\omega)$ und $\frac{I(\omega)}{I(2\omega)}$ bei Variation der Lichtquellenintensität	93
52	Frequenzanteile in Abhängigkeit von Probenabsorption	94
53	Glucose-Vorhersage für $I(\omega)$ und $\frac{I(\omega)}{I(2\omega)}$ bei Variation der Probenabsorption	95
54	Frequenzanteile in Abhängigkeit des Streukoeffizienten	96
55	Glucose-Vorhersage ohne Störstoffe für $I(\omega)$ und $\frac{I(\omega)}{I(2\omega)}$	97
56	Breitbandige Frequenzanteile in Abhängigkeit von der Glucose-Konzentration	99
57	Glucose-Vorhersage ohne Störstoffe	100
58	Breitbandige Frequenzanteile in Abhängigkeit des LED-Stroms	101
59	Glucose-Vorhersage für $I(\omega)$ und $\frac{I(\omega)}{I(2\omega)}$ bei Variation der Lichtintensität . .	102
60	Breitbandige Frequenzanteile in Abhängigkeit der Allura Red AC Konzen- tration	103
61	Glucose-Vorhersage für $I(\omega)$ und $\frac{I(\omega)}{I(2\omega)}$ bei Variation der Probenabsorption	104
62	Allura Red AC-Vorhersage für $I(\omega)$ und $\frac{I(\omega)}{I(2\omega)}$ bei Variation der Probenab- sorption	105
63	Breitbandige Frequenzanteile in Abhängigkeit des Streukoeffizienten	106
64	Glucose-Vorhersage bei Variation des Streukoeffizienten	106
65	Rohsignale für Glucose und Albumin 0-1000 mg/dl	110
66	Glucose-Bestimmungsgenauigkeit in Anwesenheit von Albumin, 532 nm und 635 nm	111
67	Glucose-Bestimmungsgenauigkeit in Anwesenheit von Albumin, 380-680 nm	112
68	Glucose Vorhersage für 0-500 mg/dl und Albumin 0-1000 mg/dl	112
69	Albumin Bestimmungsgenauigkeit in Anwesenheit von Glucose	114
70	Glucose 0-500 mg/dl und Albumin 0-1000 mg/dl Vorhersage bei 405 nm, korrigiert mit Messwerten	117
71	Glucose 0-500 mg/dl und Albumin 0-1000 mg/dl Vorhersage bei 405 nm, korrigiert mit Referenzwerten	118
72	Kombination von Rotation und Absorption	119
73	Rohsignale für Glucose 0-500 mg/dl und Albumin 0-250 mg/dl	121
74	Glucose-Vorhersage bei Variation der Laktat-Konzentration	121
75	Transmission von Blutplasma bei 50 mm Pfadlänge	124
76	Abschwächungskoeffizient von Blutplasma und Transmission bei 10 mm Pfadlänge	125
77	Transmission von Blutplasma bei 10 mm Pfadlänge	125
78	Glucose-Vorhersage bei Albumin-Variation mit reduzierter Pfadlänge . . .	126
79	Glucose-Vorhersage in Blutplasma für 532nm+635nm bzw. 380-640nm . . .	128
80	Glucose-Vorhersage in Blutplasma im Clarke's Error Grid	129
81	Stromversorgung der Steuerungseinheit	161
82	Stromtreiber der LED-Lichtquelle	161
83	Stromtreiber für Faraday-Rotator Spule	162
84	Mikrocontroller der Ansteuerungseinheit	163
85	Signalgleichrichter	164
86	Nullpunkt-Detektor	164
87	Sinusgenerator	164

88	Mischer für Sinus- und DC-Signal	165
89	Vollständige Elektronik-Einheit	166
90	Vollständiges Platinen-Layout	167
91	Einstellungsmenü der Steuerungssoftware (EEPROM)	168
92	Anzeige der Messdaten (Status)	168
93	Anzeige der Messdaten (Darstellung der Ergebnisse)	169
94	Anzeige der Messdaten (Konzentrationsvorhersage)	169
95	Signal-Rausch-Verhältnis in Abhängigkeit der Anzahl aufgenommener Spek- tren	170
96	Rohsignale für Glucose 0-500 mg/dl und Albumin 0-250 mg/dl	171
97	Glucose-Vorhersage bei 0-250 mg/dl Albumin	171
98	Rohsignale für Glucose 0-500 mg/dl und Albumin 0-500 mg/dl	172
99	Glucose-Vorhersage für 0-500 mg/dl Glucose und 0-1000 mg/dl Albumin .	172
100	Albumin-Vorhersage für Glucose 0-500 mg/dl und Albumin 0-250 mg/dl .	173
101	Albumin-Vorhersage für Glucose 0-500 mg/dl und Albumin 0-500 mg/dl .	173
102	Albumin-Vorhersage für Glucose 0-500 mg/dl und Albumin 0-1000 mg/dl .	174
103	Stellungnahme der Ethikkommission der TH Lübeck	175
104	Stellungnahme der Ethikkommission der Uni Lübeck	176

Tabellenverzeichnis

1	Konzentrationen ausgewählter Inhaltsstoffe im Blutplasma.	3
2	Drude-Parameter verschiedener Blutinhaltsstoffe	23
3	Gegenüberstellung ausgewählter Polarisationsfilterarten	40
4	Spulenparameter	48
5	Eigenschaften des Spektrometers	50
6	Übersicht der verwendeten Substanzen	60
7	Überblick über die in Abschnitt 4.1 durchgeführten Messungen.	87
8	Überblick über die in Abschnitt 4.1.2 durchgeführten Messungen.	98
9	Überblick über die in Abschnitt 4.2.1 durchgeführten Messungen.	109
10	Ergebnisse für Glucose-Bestimmung in Anwesenheit von Albumin	113
11	Ergebnisse für Albumin-Bestimmung in Anwesenheit von Glucose	115
12	Bestimmungsfehler für monochromatische Kombination von Rotation und Absorption	119
13	Übersichtstabelle der verwendeten Hardware	177
14	Übersichtstabelle über die Parameter anderer Arbeiten	178

Abkürzungsverzeichnis

Einheit	Beschreibung
ADA	American Diabetes Association
ATR	gedämpfte Totalreflexion
BBO	Bariumborat
CPD	Citrat Phosphat Dextrose
FDA	U.S. Food and Drug Administration
FOV	Öffnungswinkel, engl. Field of View
FT	Fouriertransformation
FTIR	Fourier Transform Infrarotspektrometer
IC	Integrierter Schaltkreis
LDLS	Laser Driven Light Source
LED	Leuchtdiode
MARD	mittlere absolute relative Differenz zum Referenzwert
MIR	mittlerer Infrarot-Bereich
MOSFET	Metall Oxid Halbleiter Feldeffekttransistor, engl. metal oxide semiconductor field effect transistor
MSC	multiple scattering correction
NAS	Net Analyte Signal
NIPALSR	Nonlinear Iterative Partial Least Squares Regression
NIR	naher Infrarot-Bereich
OCT	optische Kohärenz Tomographie
ORD	Optische Rotationsdispersion
ORDs	Optische Rotationsdispersionen
PCA	Principal Component Analysis
PEM	Photoelastische Modulatoren
PLS	Partial Least Squares
PLSR	Partial Least Squares Regression
S/N	Signal-Rausch-Verhältnis, engl. signal-to-noise ratio

SEP	Standard Error of Prediction
TGG	Terbium Gallium Granat
UV	ultravioletter Wellenlängenbereich
VIS	sichtbarer Wellenlängenbereich
YSI	Yellow Springs Instruments
ZnSe	Zinkselenit

Formelverzeichnis

Symbol	Einheit	Beschreibung
A	$\frac{\text{mdeg}\cdot\text{ml}\cdot\text{nm}^2}{\text{m}\cdot\text{g}}$	Literaturkonstante der Drude-Gleichung
α	$^\circ$	Spezifischer Drehwinkel
B	T	Magnetfeld des Faraday Rotators
c	m s^{-1}	Lichtgeschwindigkeit
d	m	Länge des Faraday Rotators
e	A s	Elementarladung
E_0	1	E-Feld vor 1. Polarisationsfilter
E_t	1	E-Feld nach 2. Polarisationsfilter
I	1	Intensität nach 2. Polarisationsfilter
I_0	1	Intensität vor 1. Polarisationsfilter
L	H	Induktivität
λ	nm	Wellenlänge
λ_0	nm	Zentralwellenlänge
m_e	kg	Masse eines Elektrons
n	1	Brechungsindex
ω	s^{-1}	Modulationsfrequenz des Faraday-Rotators
ϕ	$^\circ$	Winkel zwischen Polarisationssebene und 2. Polarisationsfilter
Θ	$^\circ$	Modulationstiefe des Faraday-Rotators
R	Ω	Widerstand
t	s	Messzeit
V	$^\circ\text{T}^{-1}\text{m}^{-1}$	Verdetkonstante des Faraday-Rotators

1 Einleitung und Motivation

Die Blutanalytik und die damit verbundene Überwachung wichtiger Vitalfunktionen des Menschen ist in der Medizintechnik seit jeher von starkem Interesse. Einer der wichtigsten Blutparameter in der medizinischen Diagnostik ist die Glucose-Konzentration. In den letzten Jahren haben sich hier erhebliche Fortschritte ergeben, bei denen eine Vielzahl unterschiedlicher, insbesondere optischer Messverfahren vorgestellt und erforscht wurden. Die wichtigsten dieser Verfahren sollen in diesem Abschnitt vorgestellt werden. Aus deren individuellen Vor- und Nachteilen leitet sich die Zielstellung dieser Dissertation ab, zwei dieser Verfahren miteinander zu kombinieren.

1.1 Medizinischer Hintergrund

In der Medizintechnik spielt die Bestimmung verschiedener Blutparameter eine große Rolle. Deren Überwachung gibt Aufschluss über den Zustand wichtiger Körperfunktionen und dient zudem der Diagnose von Krankheiten oder Fehlfunktionen des Körpers. Nach erfolgreicher Diagnose können dann geeignete Gegenmaßnahmen zur Behandlung eingeleitet werden.

Als relevante Blutparameter sind in diesem Zusammenhang zum Beispiel der Hämokritwert zu nennen, also der Anteil der Erythrozyten (rote Blutkörperchen) am Volumen des Blutes. Wichtig sind zudem der pH-Wert und die Sauerstoffsättigung, die Aufschluss über die Sauerstoffversorgung des Körpers gibt. Eine andere Messgröße ist die Laktatkonzentration, die Rückschlüsse auf die Leistungsfähigkeit des Stoffwechsels zulässt [3–5]. Einer der wichtigsten Blutparameter ist jedoch die Glucose-Konzentration, auch Blutzucker genannt. Beim Stoffwechsel werden durch Nahrung aufgenommene Kohlenhydrate zunächst in kurzkettige Monosaccharide wie Glucose umgewandelt. Die Regulierung der Verstoffwechslung von Glucose zu Energie erfolgt dann durch die in der Bauchspeicheldrüse gebildeten Hormone Insulin und Glucagon [6]. Insulin signalisiert dabei den Muskeln, Glucose aufzunehmen und fördert die Glykogensynthese in der Leber, wodurch Glucose in Form von Glykogen gespeichert werden kann [6]. Ist die Regulierung des Blutzuckerspiegels gestört, spricht man von Diabetes. Ein Blutglucose-Wert von 100 – 115 mg/dl gilt je nach Quellenangabe als normal [7, 8] und kann auf 140 mg/dl nach Mahlzeiten ansteigen [9]. Es können jedoch im Fall einer gestörten Regulierung auch wesentlich höhere Blutzuckerspiegel von manchmal 600 mg/dl [7, 9] auftreten. Dieser Zustand wird Hyperglykämie genannt. Aber auch zu niedrige Werte von ≤ 70 mg/dl sind möglich, was als Hypoglykämie bezeichnet wird [33].

Diabetes Mellitus, kurz Diabetes, umfasst eine Gruppe von Stoffwechselkrankheiten resultierend aus einer zu niedrigen oder falschen Insulinproduktion oder einer unzureichenden Reaktion der Zellen darauf [10]. Grundsätzlich wird zwischen zwei verschiedenen Arten von Diabetes unterschieden.

Diabetes vom Typ 1 ist die seltenere Variante und tritt nur in etwa 5 – 10% der Fälle und meist bereits im Kindes- oder Jugendalter auf [10]. Im Fall von Typ 1 ist die Bauchspeicheldrüse nicht in der Lage, die richtige Insulinmenge für die Regulierung des Blutzuckerspiegels zu produzieren. In der Folge steigt der Blutzuckerspiegel unkontrolliert an. Als Behandlungsmethode können Insulinpumpen oder kontinuierliche Injektionen bei bekannter Insulindosis angewendet werden [11]. Auch kann die Gabe eines Langzeitinsulins spät abends und Altinsulin zu den Mahlzeiten, in Abhängigkeit von Blutzuckerspiegel, Tageszeit oder zu erwartender Belastung Abhilfe schaffen [12].

Diabetes vom Typ 2 ist mit einem Anteil von 90 – 95 % die mit Abstand häufigste Diabetesvariante und tritt oft im fortgeschrittenen Lebensalter auf, wodurch sie daher auch als Altersdiabetes bezeichnet wird [10]. Hierbei kommt es zu einer verminderten Reaktion der Zielzellen auf das Insulin (Insulinresistenz), die sich aus einer genetischen Disposition entwickelt, deren Mechanismen allerdings noch nicht vollständig erforscht sind. Als Folge kann der Körper nicht mehr schnell genug auf veränderte Blutzuckerspiegel reagieren [12]. Weitere Folgen sind für beide Typen von Diabetes schlechte Wundheilung, Übelkeit, Schwäche oder schlechte Durchblutung [11]. Begünstigt wird Diabetes Typ 2 von Übergewicht, also einem Body-Mass-Index (BMI) über $25 \frac{\text{kg}}{\text{m}^2}$ [13]. Eine Diät [12] oder orale Medikation können hier für Besserung sorgen [11].

Als generelle Folgen von dauerhaft zu hohen Blutzuckerspiegeln sind potentielle Schäden an Augen, Nerven, Herz, Nieren oder Blutgefäßen zu nennen [11, 14]. In extremen Fällen kann sogar die Amputation von Gliedmaßen erforderlich werden [11]. Als Folge von Nierenschädigungen kann außerdem die Abhängigkeit von Dialysemaßnahmen entstehen [11]. Verschiedene Studien haben zudem gezeigt, dass die Mortalitätsrate für Diabetiker stark erhöht ist. So lag die Todesrate für Patienten 90 Tage nach Einlieferung mit einer Lungenentzündung für Diabetiker mit 14,5 % mehr als doppelt so hoch wie bei Patienten ohne Diabetes mit 6,1 % [15]. In dieser Studie wurden die Blutzuckerwerte zudem direkt mit der Todesrate in Verbindung gebracht. So lag die Todesrate für Blutzuckerwerte von 72 – 108 mg/dl bei 3,7 %, für 108 – 198 mg/dl bei 10,2 %, für 198 – 252 mg/dl bei 13,5 % und für ≥ 252 mg/dl schließlich bei 19,8 %.

Zu niedrige Blutzucker-Werte von unter 70 mg/dl können aber auch schädlich sein. In diesem Fall verfügt der Körper nicht über genügend Energie, was dazu führen kann, dass die Personen nervös, zittrig und verwirrt sind und eventuell sogar ins Koma fallen können [7]. Abhilfe kann die unverzügliche Aufnahme von zuckerhaltiger Nahrung schaffen oder in extremen Fällen die direkte Injektion von Glucose [7].

In den vergangenen Jahren hat sich der Anteil der an Diabetes leidenden Menschen weltweit von 4 % im Jahr 1980 auf 8 % in 2014 etwa verdoppelt [16]. Im Jahr 2015 litten weltweit 415 Mio. Menschen an Diabetes, während sich dieser Anteil bis 2040 auf 642 Mio. weiter erhöhen soll [17]. Die damit verbundenen Kosten für das Gesundheitssystem lagen im Jahr 2015 bei 673 Mrd. \$. Für 2040 werden 802 Mrd. \$ prognostiziert [17]. Die direkten Kosten liegen in Europa im Schnitt jährlich bei 519 Euro bei ambulanter und 1.584 Euro bei stationärer Behandlung. Berücksichtigt man auch Folgekosten wie Berufsunfähigkeit und Frühberentung, so liegen die Gesamtkosten pro Patient in Deutschland bei 10.281 Euro pro Jahr [12].

1.2 Glucose-Messverfahren - Stand der Technik

Aufgrund der beschriebenen möglichen Auswirkungen durch zu hohe Blutzuckerspiegel ist eine möglichst schnelle Diagnose und anschließende Behandlung von Diabetes erforderlich, da es sonst zu Stoffwechselstörungen, Dehydrierung oder kardiovaskulären Komplikationen kommen kann. Nach erfolgter Diagnose von Diabetes besteht die Notwendigkeit der regelmäßigen Überwachung des Blutzuckerspiegels. Es konnte gezeigt werden, dass selbst sieben Blutglucose-Messungen pro Tag nicht ausreichen, um die täglichen Schwankungen ausreichend abzutasten [18]. In der Folge wird seit vielen Jahren an kontinuierlich messenden Glucose-Systemen gearbeitet, bei denen Messintervalle von z.B. 15 min [19] erreicht werden. Eine Übersicht über die gängigsten Verfahren sowie Schwierigkeiten dabei und die physiologischen Zusammenhänge soll dieses Kapitel vermitteln.

Blut ist ein hochkomplexes Medium, das aus einer Vielzahl unterschiedlicher Substanzen besteht, wodurch eine Glucosebestimmung erschwert wird. Es besteht sowohl aus festen als auch aus flüssigen Bestandteilen. Der Hämatokrit beziehungsweise der Anteil roten Blutkörperchen am menschlichen Blut liegt bei Männern bei etwa 45 % und bei Frauen bei circa 41 % [20]. Diese zellulären Bestandteile setzen sich aus drei Zellarten zusammen. Die weißen Blutkörperchen, auch Leukozyten genannt, sind die Grundlage des Immunsystems zur Bekämpfung von Krankheitserregern oder Fremdkörpern. Die Thrombozyten bewirken eine Blutgerinnung für den Fall einer Verletzung und einen Verschluss der Wunde. Und schließlich sind die Erythrozyten für den Sauerstofftransport im Blut verantwortlich. Sie haben einen Anteil von 99 % an den Blutzellen und bewirken eine starke Streuung, was einen großen Einfluss auf die im Verlauf dieses Abschnitts beschriebenen optischen Messungen hat [21].

Das übrige Blutplasma besteht zu circa 90 % aus Wasser. Die verbleibenden etwa 10 % setzen sich größtenteils aus Eiweißen zusammen, wovon Albumin einen Großteil repräsentiert [22, 23]. Das Albumin hat grundsätzlich zwei Aufgaben: es hält den kolloidosmotischen Druck im Blut aufrecht und stabilisiert den pH-Wert [24]. Hinzu kommen neben Glucose weitere Bestandteile wie z.B. Laktat, Ascorbinsäure, Harnstoff, und andere. Eine Auflistung ausgewählter Inhaltsstoffe mit den jeweiligen Konzentrationswerten findet sich in Tabelle 1. Die Werte in den Literaturangaben unterscheiden sich dabei leicht voneinander. Deshalb wird in dieser Tabelle stellvertretend für jede Komponente nur ein Bereich erwähnt.

Tabelle 1: Konzentrationen ausgewählter Inhaltsstoffe im Blutplasma.

Stoff	Konzentration in mg/dl	Quellen	Art
Glucose	90 – 600	[7, 9, 25]	Kohlenhydrat
Laktat	4,5 – 225	[7, 8, 26]	Salz/Ester
Ascorbinsäure	0,7 – 1,1	[7, 8]	Vitamin
Harnstoff	7 – 18	[27]	Amid
Albumin	3660 – 4740	[22, 23]	Eiweiß
Globuline	2330 – 3270	[22, 23]	Eiweiß
Fibrinogen	255 – 345	[22, 23]	Eiweiß
Gesamteiweiß	6000 – 8300	[27]	Eiweiß

Die Eiweißkonzentration übersteigt dabei den Blutzuckerspiegel um ein Vielfaches. Unter den Eiweißen ist Albumin besonders hervorzuheben, da es die höchste Konzentration aufweist und mehr als 50 % der absoluten Eiweißkonzentration ausmacht [28]. Die Globulin-Konzentration stellt dabei die Zusammenfassung vieler einzelner Globuline mit jeweils geringerer Konzentration dar [25, 29]. Insgesamt wurden 341 verschiedene Bluteiweiße identifiziert, wobei die zehn am stärksten vertretenen Proteine circa 90 % und die 22 häufigsten 99 % des Blutplasmas repräsentieren [28].

Die zuverlässige Messung von Glucose in gleichzeitiger Anwesenheit anderer Blutinhaltsstoffe stellt daher eine große Herausforderung dar. Hierfür wurden in der Vergangenheit

verschiedenste Messkonzepte vorgestellt und weiterentwickelt [40, 41, 46, 55, 68]. Für eine Zulassung dieser Verfahren sind entsprechende Messgenauigkeiten einzuhalten, die in verschiedenen Richtlinien geregelt sind. So entstand von der American Diabetes Association (ADA) im Jahr 1987 die Vorgabe, dass für alle Glucose-Level ohne spezifische Einschränkungen die Messungenauigkeit maximal $\pm 15\%$ betragen soll. 1994 wurde dies dann auf $\pm 5\%$ reduziert [30]. Diese Vorgabe würde jedoch bedeuten, dass für eine Glucose-Konzentration von 0 mg/dl der Fehler auch bei ± 0 mg/dl liegen müsste, was messtechnisch nicht realisiert werden kann.

Die U.S. Food and Drug Administration (FDA) gibt daher vor, dass unter 70 mg/dl mindestens 85 % der Werte innerhalb eines Fehlerintervalls von ± 15 mg/dl liegen müssen und 98 % der Werte höchstens um ± 40 mg/dl abweichen dürfen. Im Bereich 70 – 180 mg/dl wird eine prozentuale Vorgabe von $\geq 70\%$ der Werte innerhalb eines Intervalls von $\pm 15\%$ und $\geq 99\%$ unterhalb $\pm 40\%$ gemacht. Bei Werten über 180 mg/dl sollen $\geq 80\%$ im Fehlerintervall von $\pm 15\%$ und $\geq 99\%$ eine Abweichung von höchstens $\pm 40\%$ aufweisen [31]. Die Richtlinie der Internationalen Organisation für Normung (ISO) 15197 von 2013 gibt vor, dass bei Vergleichsmessungen mindestens 95 % der Messwerte innerhalb eines Intervalls von ± 15 mg/dl fallen sollen [32]. Es existieren noch weitere Richtlinien von der Canadian Standards Association (CSA), dem Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), dem Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) und dem Nederlandse Organisatie voor Toegepast Natuurwetenschappelijk Onderzoek (TNO), die alle nach eigener Definition arbeiten, jedoch nicht so gebräuchlich wie die oben genannten sind [30].

Die meisten dieser Richtlinien bewerten jedoch nicht oder nur unzureichend die Auswirkungen von Messungenauigkeiten in verschiedenen Bereichen. So kann eine Abweichung von zum Beispiel +20 mg/dl bei einem tatsächlichen Blutzuckerwert von 70 mg/dl zu einem fehlerhaften Wert von 90 mg/dl führen. Der zu niedrige Blutzuckerwert würde aufgrund der falschen Diagnose als akzeptabel interpretiert und eine potentielle Unterzuckerung nicht erkannt werden. Ein Fehler von +20 mg/dl hätte an dieser Stelle also gravierende Auswirkungen. Der gleiche Fehler von +20 mg/dl würde bei in einem hyperglykämischen Zustand mit zum Beispiel tatsächlichen 400 mg/dl zu einem Wert von 420 mg/dl führen. Die Auswirkungen würden sich in diesem Fall jedoch in Grenzen halten, denn sowohl für 400 mg/dl als auch für 420 mg/dl läge die Diagnose Hyperglykämie vor und es könnten Maßnahmen zur Senkung des Blutzuckerspiegels eingeleitet werden.

Um die Szenarien zu berücksichtigen, wurde ein nach dem Erfinder Clark benanntes Clarke's Error Grid entwickelt, das eine Bewertung von Messungenauigkeiten für den Glucose Konzentrationsbereich abdeckt [33]. Eine entsprechende Darstellung findet sich in Abbildung 1.

Der Messbereich ist in Felder von *A* bis *E* unterteilt, welche mit aufsteigender alphabetischer Reihenfolge zunehmend gravierendere Auswirkungen auf die Gesundheit des Patienten haben [33, 35, 36]. Idealerweise liegen die Messwerte im Bereich *A*, welcher über 70 mg/dl mit einer Abweichung von $\pm 20\%$ definiert ist. Unterhalb von 70 mg/dl wird unabhängig von der tatsächlichen Konzentration ein Vorhersagewert von 70 mg/dl toleriert. So ist sichergestellt, dass eine Unterzuckerung in jedem Fall als Unterzuckerung diagnostiziert wird. Wird trotz Unterzuckerung ein akzeptabler oder sogar zu hoher Blutzuckerwert bestimmt, werden die gravierenden Auswirkungen durch den Bereich *D* bzw. *E* wiedergegeben. *B* und *C* sind zwar nicht ideal, deren Auswirkungen jedoch weniger schlimm als *D* oder *E*. Zwar wurde mittlerweile eine Erweiterung vorgestellt [37], die auf den Daten von 206 Patienten basiert, mit Farben arbeitet und feinere Abstufungen bietet. Jedoch ist das Clarke's Error Grid nach wie vor ein etabliertes Instrument, um die Genauigkeit

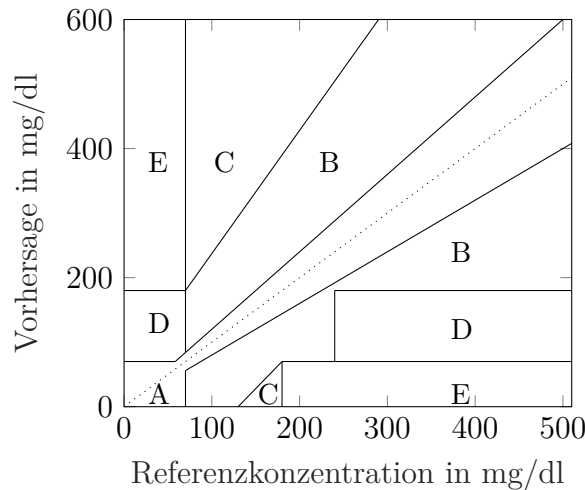


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Clarke's Error Grid [34]. Die Buchstaben *A* bis *E* stehen dabei für die unterschiedlichen Auswirkungen bei Abweichungen der Vorhersage von den Referenzwerten. *A* ist dabei ideal, während bei *E* die Auswirkungen auf den Patienten am gravierendsten wären.

von Blutzucker-Messverfahren zu bewerten.

1.2.1 Enzymatische Sensoren

Das am weitesten verbreitete Verfahren zur Blutzuckerspiegel-Messung basiert auf einer enzymatischen Reaktion, bei der Glucose durch ein Enzym, meist Glucose-Oxidase oder Glucose Dehydrogenase, zunächst zu Gluconlacton und Wasserstoffperoxid oxidiert wird, siehe Abbildung 2 [12, 32]. In einer nachgeschalteten elektrochemischen Reaktion wird letzteres dann zu Wasser und Sauerstoff umgesetzt, wobei der dabei fließende Strom als Maß für die Glucosekonzentration dient.

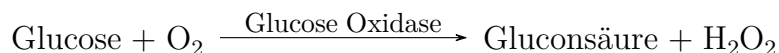


Abbildung 2: Reaktionsgleichung bei der enzymatischen Oxidation von Glucose durch Glucose Oxidase zu Gluconsäure [7].

Diese Messmethode hat sich über viele Jahre hinweg zum Standardmessverfahren für den menschlichen Blutzuckerspiegel entwickelt. Vorteilhaft ist die konstant hohe Messgenauigkeit bei richtiger Handhabung und regelmäßigem Austausch der Sensoren. Zudem ermöglicht das Funktionsprinzip den kompakten Aufbau der Geräte. Ein weiterer Vorteil dieser Methode ist die nicht nötige Blutvorbehandlung, da in Vollblut gemessen werden kann. Zudem lassen sich mit dieser Methode unter Verwendung anderer Enzyme auch weitere Blutinhaltsstoffe wie zum Beispiel Laktat messen [38].

Das erste Glucose-Messgerät war das Ames Reflectance Meter, welches 1970 von Anton H. Clemens entwickelt wurde und die Farbänderungen von enzymbasierten Reagenzstreifen maß [35, 39]. Der Kaufpreis lag bei 650 \$ [30]. Als erster Biosensor wurde im Jahr 1973 das Yellow Springs Instruments (YSI) 23A vorgestellt [39]. Dieses Gerät misst die

Oxidation von Glucose amperometrisch und ist auch heutzutage noch Grundlage für die gängigen enzymatischen Blutzucker-Messgeräte. Mittlerweile hat sich der YSI Analyzer zu einem Referenzgerät entwickelt, das auch als Goldstandard bei wissenschaftlichen Untersuchungen verwendet wird [3, 34, 40–47, 47–52]. Eine kontinuierliche Überwachung ist mit entsprechender Probenentnahme möglich, sodass auch Langzeitstudien durchgeführt werden können [53, 54]. Es gibt jedoch auch Ansätze, bei denen die eigentliche Bestimmung mittels Fluoreszenzmessung erfolgt [55].

In den letzten Jahren wurde eine Vielzahl unterschiedlicher kompakter Glucose-Messgeräte entwickelt, die primär auf dem enzymatischen Messprinzip beruhen. Grundsätzlich unterscheiden sich die Systeme in ihrer Messart. So dominieren seit Jahren auf Teststreifen basierende Messgeräte den Markt, bei denen zu jeder Messung die Haut verletzt und ein Blutropfen für die jeweilige Messung entnommen werden muss. An dieser Stelle sind zum Beispiel von der Firma Abbott die Geräte FreeStyle Freedom Lite und Freedom Lite beziehungsweise die Modelle Aviva Plus und Nano der Firma Roche Diabetes Care GmbH zu nennen.

Mittlerweile werden diese Geräte zunehmend von kontinuierlich messenden Sensoren verdrängt, die auf die Haut geklebt werden und die mit einer feinen Nadel die Haut zur Messung punktieren. Exemplarisch sind an dieser Stelle von der Firma Dexcom die Geräte G4TM Platinum, G5TM Mobile und SEVEN zu nennen. Weitere gebräuchliche Geräte sind zum Beispiel das Guardian[®] Sensor 3 (Medtronic plc) oder der Navigator[®] II beziehungsweise der FreeStyle Libre[®] der Abbott GmbH & Co. KG.

Bei einem Vergleich der Genauigkeiten von 17 verschiedenen Glucose Messgeräten wurde eine mittlere absolute Differenz vom Referenzwert (MARD) von $\pm 5,6 - 20,8$ mg/dl, beziehungsweise eine Standardabweichung von $\pm 6,1 - 16,6$ mg/dl ermittelt [56]. Andere Quellen berichten von $\pm 15,2 - 21,2$ % beziehungsweise $\pm 10,3 - 21,5$ % bei ähnlichen Studien für Hyperglykämie [57].

Besonders in jüngster Vergangenheit ist vermehrt der Trend zu implantierbaren Sensoren beziehungsweise Messungen an interstitieller Flüssigkeit zu beobachten. Hierzu zählen zum Beispiel verschiedene Ansätze zur Miniaturisierung enzymatischer Sensoren, welche in eine Kontaktlinse integriert werden und die Daten drahtlos an ein Messgerät übertragen [58–60]. Diese Messung erfordert zwar keine Verletzung der Haut mehr, die Entwicklung wurde jedoch im Jahr 2018 aufgrund ungenügend erreichter Genauigkeiten eingestellt [61].

Neben den Vorteilen wie kompakter Bauform, etablierter Messtechnik und hoher Genauigkeit der enzymatischen Messung gibt es allerdings auch einige Nachteile. So erfordert die Messung auch bei kontinuierlich messenden Systemen immer noch eine Verletzung der Haut. Dies mag für einige Patienten aufgrund potentieller Angst vor Nadeln unangenehm sein und birgt außerdem ein gewisses Infektionsrisiko. Die als Vorteil genannte hohe Genauigkeit der Sensoren wird jedoch nur unter bestimmten Voraussetzungen erreicht. Andere Parameter wie Hämatokrit, Sauerstoffsättigung, Harnstoff, Aminosäuren oder pH-Wert können bereits einen Einfluss auf die Bestimmungsgenauigkeit haben [7, 30, 62]. Auch Ascorbinsäure (Vitamin C) stört die Messung, da es mit Wasserstoffperoxid reagiert und einen zu geringen Blutzucker vortäuscht [12]. Ein weiterer Nachteil dieser Methode ist, dass im Blut zwei Arten von Glucose vorliegen, die sogenannte α - und die β -Glucose, die enzymatische Reaktion aber nur mit der β -Glucose stattfindet [63, 64]. Eine detaillierte Beschreibung der beiden Glucose-Formen findet sich in Abschnitt 2.1.

Einer der größten Nachteile der enzymatischen Blutzuckerbestimmung ist jedoch, dass es sich sowohl bei den Sensoren als auch bei den Enzymen um Verbrauchsmaterialien handelt.

Je nach Gerät kostet ein Sensor für kontinuierlich messende Systeme circa 50 – 100 \$, der meist ein Mal pro Woche ausgetauscht werden muss [65, 66]. Dies bedeutet etwa 10 \$ pro Tag an laufenden Kosten, beziehungsweise bei Teststreifen-basierten Geräten 0,20 – 1,50 \$ pro Messung [56]. Hinzu kommen für die kontinuierlich messenden Geräte einmalige Anschaffungskosten in Höhe von 1.000 – 1.500 \$ für das Gerät [65, 66]. Hohe Temperaturen oder ungünstige Luftfeuchtigkeit können den Verfall der Enzyme beschleunigen und diese unter Umständen noch vor Benutzung unbrauchbar machen [30]. Weiterhin ist eine regelmäßige Kalibrierung der Geräte nötig [67], die meistens alle 12 h durchgeführt werden muss [66].

Eine Vielzahl von Arbeitsgruppen ist daher auf der Suche nach alternativen Verfahrensansätzen um insbesondere die Kostenproblematik zu entschärfen.

1.2.2 Physikalische Messverfahren

Impedanzspektroskopie

Eines der in wissenschaftlichen Studien untersuchten Verfahren ist die Impedanzspektroskopie. Hierbei wird der Wechselstromwiderstand des Gewebes, also die Impedanz für verschiedene Frequenzen im Bereich 100 Hz bis 100 MHz gemessen [68–70].

Änderungen in der Glucose-Konzentration bewirken eine Salz-Ionen-Produktion in den roten Blutzellen und einen Anstieg der Kalium-Ionen Konzentration [68]. Als Folge dessen ändert sich das Membranpotential der Zellen, was sich in einer Veränderung der Impedanz bemerkbar macht. Anhand des charakteristischen Impedanzspektrums lassen sich dann Rückschlüsse auf die Glucose-Konzentration ziehen.

Ein Gerät, welches in diesem Zusammenhang zu nennen ist, ist die Gluowatch (Cygnus Inc., USA). Die Gluowatch versagte jedoch letztendlich als Produkt, da eine regelmäßige Kalibrierung nötig war, Schweiß einen erheblichen Messfehler verursachte und zudem bei einigen Patienten Hautschädigungen oder ungewöhnliches Kribbeln auftrat [69, 71].

Ein weiterer Nachteil dieser Methode ist, dass Schwankungen des Wassergehalts im Körper oder Dehydrierung die Messergebnisse verfälschen können [68, 69]. Zudem müssen Krankheiten, die die Zellmembranen beeinflussen, beachtet werden [68]. Die Impedanzspektroskopie ist als Verfahren zur Blutzuckerspiegel-Bestimmung daher nur bedingt geeignet [72].

Ultraschall

Eine ähnliche Messmethode basierend auf Ultraschall wurde von anderen Arbeitsgruppen ebenfalls evaluiert. Dabei wird ein Körperteil, zum Beispiel das Ohrläppchen, mit einem Ohrclip versehen, bei dem auf der einen Seite ein Ultraschallsignal in das Ohrläppchen eingebracht und auf der anderen Seite das resultierende Signal gemessen wird. Die Glucose-Konzentration hat dabei einen Einfluss auf die Schallgeschwindigkeit im Gewebe, welche zur Konzentrationsbestimmung genutzt wird.

Allen voran lässt sich in diesem Zusammenhang als Messgerät der GlucoTrackTM (Integrity Applications, Ltd.) nennen. Dieses Gerät nutzt zudem sowohl die Impedanz, als auch die Wärmekapazität für eine Verbesserung der Bestimmungsgenauigkeit. Der GlucoTrackTM wurde bereits intensiv von Boehm et. al [73] untersucht. Dabei wurde eine Genauigkeit von etwa $\pm 22\%$ erreicht. Dieses Gerät wird bereits in einigen Ländern vermarktet, jedoch bestand noch keine FDA-Zulassung [74].

Photoakustik

Photoakustik wurde in verschiedenen wissenschaftlichen Arbeiten verwendet, um die Glucose-Konzentration im menschlichen Körper zu bestimmen. Dabei wird Gewebe mittels eines kurzen Laserimpulses im Bereich einiger ps bis ns bestrahlt, wodurch es zu einer schlagartigen und lokalen thermischen Ausdehnung kommt. Der dabei entstehende Ultraschall-Druck wird mit einem Mikrophon gemessen. Das gemessene Signal ist abhängig von der Laser-Energie, thermischer Ausdehnung, spezifischem Absorptionskoeffizienten und Schallgeschwindigkeit im jeweiligen Medium [68]. Ein Vorteil dieser Methode liegt in der nichtinvasiven Arbeitsweise, wodurch keine Verbrauchsmaterialien benötigt werden [65, 75]. Außerdem hat der Streukoeffizient des Gewebes kaum einen Einfluss auf die akustischen Signale [68]. Hinzu kommt wegen der geringen photoakustischen Reaktion von Wasser eine hohe Sensitivität [68].

Temperatur- oder Druckschwankungen können jedoch die Messergebnisse verfälschen [68]. Außerdem überlagern einige andere Blutkomponenten das Signal und verursachen möglicherweise Messungenauigkeiten. Zwar wird die akustische Antwort des Gewebes auf den Laserpuls kaum durch Streuung beeinflusst, jedoch dringt der Laserpuls selbst in das Gewebe ein und wird dadurch sehr wohl von den optischen Eigenschaften und dem Streuverhalten beeinflusst. Der größte Nachteil ist jedoch, dass für jeden Patienten eine individuelle Kalibration notwendig ist [65, 69].

Optische Kohärenztomographie

Ein optisches Verfahren, das neben der Gewinnung von Tiefeninformationen über Gewebematerial auch zur Glucose-Bestimmung eingesetzt wurde, ist die optische Kohärenztomographie (OCT). Eine prinzipielle Darstellung des Funktionsprinzips ist in Abbildung 3 zu finden.

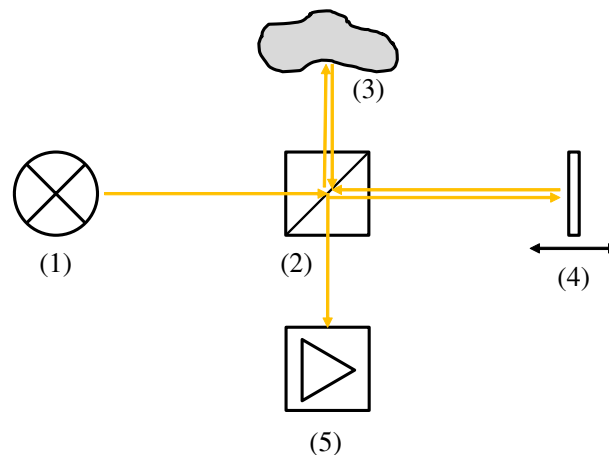


Abbildung 3: Schematische Darstellung der optischen Kohärenztomographie. (1) Lichtquelle, (2) Strahlteiler, (3) Messziel, (4) Verschiebbarer Spiegel, (5) Detektor

Grundbestandteil dieses Verfahrens ist ein Interferometer mit breitbandiger Lichtquelle, einem verschiebbaren Spiegel, einem Strahlteiler, einer Kamera sowie einer Irisblende samt Bauteilen zur optischen Abbildung. Das von der Lichtquelle ausgesendete Licht trifft auf einen Strahlteiler, der den Lichtstrahl auf den verschiebbaren Spiegel und das zu untersuchende Ziel, in diesem Fall Gewebe, leitet. Das von der Probe diffus reflektierte Licht überlagert sich dann mit dem vom verschiebbaren Spiegel auf der Kamera reflektierten Anteil. Aus dem durch Verschieben des Spiegels entstehenden Interferogramm lässt sich

durch Fouriertransformation (FT) ein Spektrum berechnen, aus dem dann die Glucose-Konzentration bestimmt werden kann. [68].

Nachteilig an dieser Methode ist die hohe Empfindlichkeit gegenüber Bewegungsartefakten. Zudem haben Oberflächentemperatur-Schwankungen einen erheblichen Einfluss auf die Messgenauigkeit. Außerdem bietet optische Kohärenz Tomographie (OCT) zur Blutzuckerspiegel-Messung keine nennenswerten Vorteile gegenüber anderen Rückstreuungsmessverfahren [68, 69].

Refraktometrie

Ein gängiges Verfahren zur Glucose-Bestimmung ist die Refraktometrie. Sie gehört zum Beispiel zum Standard-Repertoire bei der Weinherstellung, da der spätere Alkoholgehalt maßgeblich von dem im Most enthaltenen Zucker abhängig ist. In Wasser gelöste Glucose ändert den Brechungsindex der Lösung. Hierdurch nimmt schräg auf die Grenzschicht von Luft zur Lösung einfallendes Licht aufgrund des snelliusschen Brechungsgesetzes dann einen veränderten Weg, woraus sich auf die Glucose-Konzentration schließen lässt. Diese Methode wurde von Zirk et. al [76] auch für die Blutzucker-Bestimmung in ultrafiltrierten Blutproben eingesetzt.

Auch wenn dieses Verfahren zum Beispiel für die Weinherstellung etabliert ist und zuverlässig funktioniert, ist es für die Blutzuckerbestimmung eher unhandlich. Einerseits ist die Zucker-Konzentration im Blut um ein Vielfaches niedriger als in Wein. Zum anderen ist Blut ein stark streuendes Medium, was für die Refraktometrie sehr hinderlich ist. Daher bedarf es einer Probenvorbehandlung in Form von Ultrafiltration bis zu einer Molekülgröße von 3 – 30 kDa [76]. Außerdem kann der Brechungsindex von anderen Stoffen ebenfalls verändert werden, was zu potentiellen Fehlerquellen führt. Daher ist dieses Verfahren eher als exotisch zu betrachten.

Fluoreszenz

Eine andere Messmethode funktioniert per Fluoreszenz. Hierbei wird die entsprechende Probe mit einem Laser mit der Wellenlänge 405 nm bestrahlt und die resultierende Fluoreszenz gemessen [55]. Dabei ist jedoch zu erwähnen, dass die eigentliche Fluoreszenz auf einer chemischen Reaktion des verwendeten Enzyms Glucose-Oxidase basiert, wodurch es sich bei diesem Ansatz nicht um eine reagenzienfreie Messmethode handelt.

Mit dem Eversense[®] XL wurde ein Gerät vorgestellt, dessen eigentlicher Sensor unter der Haut implantiert wird und die Messdaten drahtlos an eine Smart-Watch überträgt. Die Tragedauer ist mit 180 Tagen deutlich größer als bei den enzymatischen Sensoren aus Abschnitt 1.2.1 mit üblicherweise 7 Tagen. Allerdings ist für den Austausch der Sensoren jeweils ein chirurgischer Eingriff nötig [77].

Ramanspektroskopie

Eine weitere optische Messmethode ist die Ramanspektroskopie, basierend auf dem Raman-Effekt, entdeckt von C.V. Raman im Jahr 1928 [78]. Dabei wird Licht in eine Probe eingebracht, wodurch es zu einer inelastischen Streuung an den Molekülen kommt. Im Zuge dieses Vorgangs wird die gestreute Strahlung in ihrer Frequenz beziehungsweise Wellenlänge leicht verändert. Dieser Vorgang wird Raman-Effekt oder Raman-Shift genannt. Die Veränderung der Frequenz ist abhängig von der Art der zu analysierenden Moleküle [78]. Anschließend wird die gestreute Strahlung gemessen, wodurch auf unbekannte Stoffe wie zum Beispiel Glucose geschlossen und die jeweilige Konzentration bestimmt werden kann [68]. Normalerweise finden derartige Messungen im Wellenlängenbereich von

$200 - 1.800 \text{ cm}^{-1}$ ($5,55 - 50 \mu\text{m}$) statt.

Ein nach diesem Prinzip arbeitendes Messgerät zur Glucose-Bestimmung ist das C8 MediSensors HG1-c, welches nichtinvasiv durch die Haut misst und für 4.000 \$ erhältlich war. Allerdings war es nur für Forschungszwecke in den USA zugelassen [65]. C8 Medisensors erhielt in der Entwicklungsphase zwischen 2011 und 2013 mehr als 60 Mio. \$ und erlangte 2012 die CE-Kennzeichnung [79], geriet jedoch in finanzielle Schwierigkeiten und musste letztendlich im Februar 2013 schließen [80].

Ein wesentlicher Vorteil dieser Methode liegt in den sehr differenzierten Spektren der jeweiligen Blutkomponenten [81], die zudem weniger mit denen anderer Inhaltsstoffe als zum Beispiel in der Absorptionsspektroskopie überlappen [68], siehe Abschnitt 1.2.3. Die Problematik sich überlagernder spektraler Informationen bei Anwesenheit mehrerer Komponenten, wie dies zum Beispiel im Blut der Fall ist, kann durch den Einsatz sogenannter multivariater Datenanalyse wie der Partial Least Squares Regression (PLSR) deutlich verbessert werden [82, 83], siehe Abschnitt 1.2.3 und 2.3.1. Durch den Einsatz dieser Technik lassen sich auch mehrere Inhaltsstoffe gleichzeitig in Art und Konzentration bestimmen. Dennoch offenbart die Ramanspektroskopie einige Schwierigkeiten speziell in der Handhabung. Dies betrifft zum einen die Intensitätsstabilität der Laser [68]. Zum anderen stellt der Wellenlängenbereich im mittleren Infrarot-Bereich die Messtechnik vor eine Herausforderung [84]. Aufgrund der geringen Photonenenergie muss die Detektionsschwelle der Detektoren klein sein, was automatisch zu erhöhtem Rauschen führt, das bei steigender Temperatur aufgrund der thermischen Energie noch verstärkt wird [84, 85]. Hauptsächlich wegen der besonderen Hardware sind solche Systeme zudem entsprechend kostenintensiv, weshalb alternativ in vielen Ansätzen die Absorptionsspektroskopie zur Glucose-Bestimmung verwendet wird.

1.2.3 Absorptionsspektroskopie

In der Absorptionsspektroskopie wird die Tatsache genutzt, dass alle Stoffe energetische Übergänge besitzen, die durch Photonen einer geeigneten Energie beziehungsweise Wellenlänge angeregt werden können. Dies können beispielsweise elektronische Übergänge aber auch mechanische Schwingungsmodi sein. Wird eine Probe mit weißem Licht der Energie I_0 durchstrahlt und befindet sich ein Stoff im Strahlengang, der aufgrund seiner inneren Struktur Resonanzen aufweist, die mit einem spektralen Anteil der angeregten Strahlung wechselwirken können, wird der Strahlung bei dieser Wellenlänge Energie entzogen, was zu einer reduzierten Intensität I führt. Eine Darstellung eines solchen allgemeinen Messaufbaus findet sich in Abbildung 4.

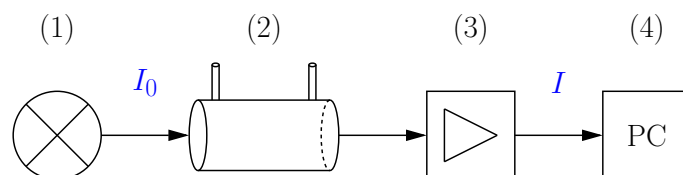


Abbildung 4: Schematische Darstellung eines Absorptionsspektroskopie-Messaufbaus: (1) Lichtquelle, (2) Küvette/Probe, (3) Spektrometer, (4) Datenauswertung

Grundsätzlich wird die Absorptionsspektroskopie neben medizinischen Anwendungen auch in vielen anderen Feldern zur Identifikation unbekannter Stoffe oder Konzentrationen eingesetzt. Zu diesen zählen zum Beispiel die Astronomie, die Lebensmittelindustrie oder

die Gasmesstechnik. Ein Photon kann dann von der Probe absorbiert werden, wenn seine Energie mit der Energie übereinstimmt, die für die Anregung des Probenatoms erforderlich ist. Eine Anregung kann dann in elektronischer Form erfolgen oder die Atome in Schwingung oder Rotation versetzen. Je nach chemischer Struktur dieser Atome lassen sich mit unterschiedlichen eingestrahnten Energien bestimmte Anregungszustände erreichen. Hieraus ergibt sich dann ein für jeden Stoff charakteristisches Absorptionsspektrum. Einen Zusammenhang zwischen Absorption und Stoffkonzentration liefert das Lambert-Beer Gesetz für nicht streuende Medien. Es beschreibt die Abschwächung der eingestrahnten Intensität I_0 durch ein Medium mit dem wellenlängenabhängigen Absorptionskoeffizienten $\epsilon(\lambda)$, der Pfadlänge d und der Konzentration c [86, 87]:

$$\frac{I}{I_0} = e^{-\epsilon(\lambda) \cdot c \cdot d} \quad (1)$$

Durch Referenzmessung kann bei Einstrahlung mit weißem Licht ermittelt werden, wie stark das Licht bei der entsprechenden Wellenlänge absorbiert wurde. Da auch Glucose ein eindeutiges Absorptionsspektrum besitzt, wurde die Absorptionsspektroskopie bereits eingesetzt, um deren Konzentration im Blut zu bestimmen.

Grundsätzlich lassen sich in der Absorptionsspektroskopie zwei Anwendungsfelder unterscheiden: Die invasive und die nichtinvasive Messung. Während zunächst invasive Messungen durchgeführt und an entnommenen Blutproben spektroskopisch die Glucose-Konzentration bestimmt wurde, werden in den letzten Jahren vermehrt Ansätze zur nichtinvasiven Messung entwickelt. Diese Ansätze lassen sich zudem jeweils in zwei Wellenlängenbereiche eingruppiert. Als naher Infrarot-Bereich (NIR) wird der Bereich von 780 – 2500 nm [27] bezeichnet, als mittlerer Infrarot-Bereich (MIR) der zwischen 2,5 μm und 25 μm [27, 88].

Invasive Messungen

Zu Beginn der Entwicklung einer optischen Messmethode zur Bestimmung der Glucose-Konzentration in Blutproben wurde damit begonnen, Blutproben NIR spektroskopisch zu untersuchen. Zur Messung wurde hier meist auf kommerziell erhältliche Fourierspektrometer (FT-IR) wie das Nicolet 550 [44, 84], Nicolet 670 [89], Nicolet 740 [40, 41, 43, 48, 90–94], Nicolet 800 [91], Digilab FTS-60A [45], beziehungsweise Mattson Infinity [95]) zurückgegriffen. Ein solches Fourierspektrometer erzeugt durch Verschieben eines Spiegels ein Interferogramm, aus dem per Fouriertransformation das entsprechende Spektrum errechnet wird.

Die Hauptschwierigkeiten bei der spektroskopischen Analyse der Blutproben bestehen hier in den schwachen und durch andere Blutkomponenten überlagerten Absorptionsspektren. Eine Evaluation der Spektren erfolgt üblicherweise mittels multivariater Datenanalyse, mit der spektral zwischen verschiedenen Blutinhaltsstoffen unterschieden werden kann [40, 41, 44, 45, 84, 92, 95–105]. Eine weitere Einschränkung besteht in der vergleichsweise starken Wasserabsorption wodurch der mögliche Messbereich auf zwei optische Fenster von 1540 – 1850 nm [26, 93, 101] und 2000 – 2500 nm [26, 48, 93, 101] limitiert ist. Dadurch existiert eine optimale Pfadlänge [106–108], bei der der zu bestimmende Stoff bereits messbar absorbiert, das Signal durch das in der Probe enthaltene Wasser jedoch noch nicht zu stark abgeschwächt ist. Dieser Wert ist erreicht, sobald die Resttransmission auf etwa 33 % [108] beziehungsweise 37 % [106] gefallen ist. Für den Bereich um 1540–1850 nm wurden daher Pfadlängen von circa 5 – 10 mm [43, 94, 105, 106] beziehungsweise 0,4 – 2,5 mm für 2000 – 2500 nm [40, 41, 44, 45, 48, 84, 92, 93, 95, 105, 106] verwendet.

Der hohe Absorptionskoeffizient des Wassers im NIR von etwa $10 - 10.000 \text{ m}^{-1}$ ruft neben der Limitation der Pfadlänge auch ein weiteres Problem hervor. Je nach Wellenlängenbereich ändert sich die Wasserabsorption mit der Temperatur und überlagert sich mit dem Glucose-Signal. Während die Transmission oberhalb von circa 2190 nm mit steigender Temperatur auch ansteigt, fällt diese hingegen unterhalb von 2190 nm [109] ab. Daher ist eine sehr genaue Kontrolle der Proben temperatur nötig [110]. Diese Regelungen hatten in den meisten Fällen eine Genauigkeit von $\leq \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$ [40, 41, 45, 89, 95, 106]. Für die absolute Temperatur sind neben $37 \text{ }^\circ\text{C}$ [40, 41, 47, 95] auch Werte wie $37,1 \text{ }^\circ\text{C}$ [93], $35 \text{ }^\circ\text{C}$ [111], $32 \text{ }^\circ\text{C}$ [106], $25 \text{ }^\circ\text{C}$ [112] und $23 \text{ }^\circ\text{C}$ [113] zu finden.

Ein weiterer Effekt der sich bezüglich der Absorptionsspektren beobachten lässt, ist die Wasserverdrängung. Eine Erhöhung der Glucose-Konzentrationen in einer Probe reduziert gleichzeitig den Wasseranteil, was aufgrund des höheren Absorptionskoeffizienten des Wassers statt der erwarteten Zunahme zu einer Verringerung der Absorption führt [114, 115]. Dieser Effekt wurde in den Arbeitsgruppen um L. Ben Mohammadi et. al. [19, 115, 116] und Y. Jung et. al [117] untersucht, um die Glucose-Konzentration über die Wasserverdrängung im Wellenlängenbereich 1300 – 1550 nm beziehungsweise 2100 – 2500 nm zu ermitteln. Durch Mohammadi et. al [19, 115, 116] wurde zunächst ein kompaktes Modul mit drei infrarote LEDs mit Zentralwellenlängen von 1300 nm, 1450 nm und 1550 nm entwickelt. Dieses Modul verfügt über einen Referenzpfad, da eine mögliche Temperaturschwankung einen ähnlichen Effekt auf die Wassertransmission hätte [118] und so zu zusätzlichen Messungenauigkeiten führen würde. Im Rahmen dieser Untersuchungen wurde sechs Patienten kontinuierlich Blut abgenommen und mit einem Mikrodialysefilter mit einer Porengröße von $\leq 20 \text{ kDa}$ und $\leq 10 \text{ kDa}$ gefiltert. Hierbei wurde eine Standardabweichung von $\pm 8,5 \%$ erreicht [19].

Nachteilig an diesem Verfahren jedoch, dass auch andere Blutkomponenten das Wasser verdrängen [89] und dies zu Querempfindlichkeiten führen kann. Zudem stellen die benötigten Mikrodialysefilter wiederum ein benötigtes Verbrauchsmaterial dar und die Temperatur hat einen erheblichen Einfluss auf die Messgenauigkeit.

Ein generelles Problem bei der Glucose-Bestimmung mittels Absorptionsspektroskopie sind die durch das Hämoglobin hervorgerufenen Streueffekte [102]. Aus diesem Grund wurden die Proben in den meisten anderen Ansätzen zunächst zentrifugiert, um nicht streuendes Plasma zu erhalten [40, 91, 119] oder mittels kommerziell erhältlicher Blutstoffe in Pulverform entsprechend dotiert [41, 45, 89, 94, 95, 120]. Es gibt zwar Algorithmen für die Korrektur von Mehrfachstreuung (multiple scattering correction (MSC)), jedoch wurden die Vorhersagegenauigkeiten nicht oder nur kaum verbessert [102, 121]. Für die zuverlässige Messung der Streueigenschaften an Blut wird komplexere Hardware benötigt. Dabei wurden Messungen an fließendem Blut mit einem Doppelulbrichtkugelsystem gemacht [21] oder die Rückstreuungseigenschaften von entnommenem Blut in einem Becherglas untersucht [102].

Mit der kontinuierlichen Verbesserung der Messtechnik wurde mit der Zeit auch der MIR-Bereich für die Blutanalytik interessant. Dieser bietet verglichen mit dem NIR die deutlich stärkeren und charakteristischeren Absorptionsspektren [27]. Jedoch erfordert die Messung dort den Einsatz aufwändigerer Messtechnik [88, 100, 122–130]. Einerseits kommen dafür wegen ihrer hohen Leistung oft durchstimmbare Quantenkaskadenlaser [125–127, 131] zum Einsatz, andererseits Fourierspektrometer [123, 124, 132]. Letztere werden jedoch aufgrund von geringer Sensitivität im MIR [85] mit flüssigem Stickstoff gekühlt, um Rauschen zu reduzieren [123, 124, 132]. Hinzu kommen weitere technische Schwierigkeiten wie die Verfügbarkeit geeigneter Materialien für den Bau von Küvetten

mit ausreichender Transparenz. Auch hier limitiert die hohe Wasserabsorption die mögliche Pfadlänge, im Fall des MIR auf etwa $50\ \mu\text{m}$ [99, 126]. Daher bietet sich die gedämpfte Totalreflexion (ATR) an [27, 88, 99, 128, 132], bei der ein evaneszentes Feld zu einem geringen Teil in die Probe eindringt. Aufgrund der technischen Herausforderungen ist diese Methode zum jetzigen technischen Stand für eine klinische Anwendung oder im Home-Care-Bereich eher ungeeignet.

Nichtinvasive Messungen

Neben den invasiven Messungen wurde der Fokus in den letzten Jahren verstärkt auf die nichtinvasive Glucose-Bestimmung gelegt. Ähnlich der Konzentrationsbestimmung an entnommenen Proben wurde hierbei an verschiedenen Körperteilen die Transmission im Wellenlängenbereich von circa $1500 - 1850\ \text{nm}$ gemessen, an denen ein geringer Fettgehalt herrscht und die Pfadlänge circa $5\ \text{mm}$ aufweist [43, 94]. Die Messorte umfassten hierbei Wange [94], Unterlippe [94], Oberlippe [94], Zunge [43, 94] sowie Gewebe zwischen Daumen und Zeigefinger [94]. Dieses Verfahren kann auch zur so genannten 2D-Korrelationsspektroskopie erweitert werden, indem die Rückstreuung mit der Transmission kombiniert wird [119, 133]. Ein Nachteil dabei ist jedoch, dass die Pfadlänge aufgrund physiologischer Toleranzen nicht immer konstant und die Absorptionsmessung somit fehlerbehaftet ist [94].

In einem alternativen Ansatz wurde zur zeitlich aufgelösten Messung eine Art breitbandiges Pulsoxymeter vorgestellt, das im Bereich von $900 - 1700\ \text{nm}$ misst [134], wodurch sich so die vom pulsierenden Blut kommenden Signale von den statischen optischen Eigenschaften des Gewebes trennen ließen.

Ein ähnliches Messprinzip ist die sogenannte Verschlusspektroskopie (engl. occlusion spectroscopy). Hierbei wird der Pulsschlag an einem Körperteil, zum Beispiel Finger [135], durch eine Manschette gestoppt und dahinter die Transmission des Fingers zeitlich aufgelöst gemessen. Zu diesem Zweck wurde das NBM (OrSense Ltd.) entwickelt, das die durch Glucose beeinflusste Streuung und somit resultierende Transmission mit Hilfe von drei LEDs bei $610\ \text{nm}$, $700\ \text{nm}$ und $940\ \text{nm}$ misst [135]. Neben dem Blutzuckerspiegel lässt sich so auch die Konzentration von Hämoglobin oder die Sauerstoffsättigung in unter 1 Minute messen [65, 69]. In einer Studie an 23 Patienten erzielte dieses Gerät eine Standardabweichung von $\pm 17,2\%$ [135]. Zwar ist dieses Gerät CE-geprüft, wurde jedoch bisher nicht kommerzialisiert und wird nur für Forschungszwecke eingesetzt [65, 69].

Die durch die Glucose-Konzentration beeinflussten Streueigenschaften können unter bestimmten Voraussetzungen auch nutzbar gemacht werden. Da der Blutzucker unter anderem den Brechungsindex der Erythrozyten bestimmt [86, 134, 136, 137], werden dadurch auch die Streueigenschaften beeinflusst [21, 21, 135, 138]. Da sich die diffuse Reflexion stärker als die diffuse Transmission ändert [102, 114], wird die Reflexion im NIR [42, 119] und MIR [124] bevorzugt gemessen. Dies geschieht normalerweise direkt an der Haut, zum Beispiel über Fasern, in denen Beleuchtungs- und Detektorkanal kombiniert angeordnet sind [111, 137]. Vorteilhaft ist dabei, dass die Temperatur kaum einen Einfluss auf die Signale hat [102] und die Körpertemperatur ohnehin geregelt ist. Auch hat die Glucose-Konzentration einen höheren Einfluss auf die Streuung als auf die Absorption [114], da die Konzentration von Hämoglobin um mehr als den Faktor 100 über der von Glucose liegt [121].

Ein Störfaktor bei der Messung durch die Haut sind jedoch deren Reflexion [114], generelle Streueffekte durch Erythrozyten oder Zellstrukturen [40, 91, 119], sowie die Abhängigkeit des Signals von den darunter liegenden Muskeln [114] und dem geweblichen

Fettanteil [111]. Zudem hat ein hoher Blutzuckergehalt auch einen Einfluss auf die Haut selbst [68] und es ist eine individuelle Kalibration nötig [68]. Zwar kann diese unter bestimmten Voraussetzungen für die nichtinvasive Konzentrationsbestimmung nutzbar gemacht werden, es treten allerdings auch neue Schwierigkeiten wie Streueffekte auf. Auch ein potentieller Gerätedrift [139] oder der Temperatureinfluss auf die Wassertransmission [140, 141] kann die Messungen verfälschen. Je nach Messansatz stört zudem die Überlappung von Spektren unterschiedlicher Inhaltsstoffe [27] sowie die Wasserverdrängung durch unterschiedliche Blutkomponenten [116]. Zu diesem Messprinzip existieren zwar Geräte wie der Diasensor[®] (Biocontrol Technology) oder der SugarTrac[™] (LifeTrac Systems). Deren Genauigkeit wird jedoch noch immer von Umgebungseinflüssen und physiologischen Aspekten beeinträchtigt [142]. So wurde dem Diasensor[®] zum Beispiel bereits mehrfach eine Zulassung durch die FDA wegen Sicherheitsbedenken verweigert [79].

Als Fazit bleibt festzuhalten, dass der wesentliche Vorteil der Absorptionsspektroskopie darin liegt, dass durch die spektrale Auflösung und die Evaluation mittels multivariater Datenanalyse selbst aus verrauschten Spektren noch wertvolle Informationen gewonnen werden können [143]. Außerdem lassen sich durch diese Auswertung auch mehrere Probenbestandteile gleichzeitig messen [25, 40, 88].

Ein grundsätzliches Problem stellt jedoch in diesem Zusammenhang die sehr schwache Glucose-Absorption dar [27, 40, 114]. Die im Vergleich dazu sehr hohe Wasserabsorption im IR [93, 104, 106] begrenzt nicht nur die Pfadlänge sondern auch die Empfindlichkeit. Einen weiteren Nachteil ist zudem die mit steigender Wellenlänge sinkende Sensitivität der Detektoren sowie die Schwierigkeit, passende Emitter mit ausreichender Intensität zu finden. So ist im sichtbaren Wellenlängenbereich (VIS) eine im Vergleich zum NIR- und MIR-Bereich um mehrere Größenordnungen gesteigerte Sensitivität zu erwarten [85].

Wünschenswert wäre daher eine Methode, die breitbandige Informationen nutzt und multivariat zur simultanen Bestimmung mehrerer Komponenten auswertet, jedoch nicht unter den Nachteilen der hohen Wasserabsorption oder der geringen Sensitivität im IR leidet. Im wesentlich empfindlicheren sichtbaren Wellenlängenbereich sind jedoch leider keine Glucose-Absorptionen zu erwarten.

1.2.4 Polarimetrie

Die Polarimetrie ist ein Verfahren, bei dem im Gegensatz zur Absorptionsspektroskopie nicht die Absorption, sondern die Drehung der Polarisationsrichtung des einfallenden Lichts genutzt wird. Als Folge dessen wird nicht die Amplitude sondern die Orientierung der Lichtwellen gemessen, woraus sich wiederum auf die Glucose-Konzentration schließen lässt.

Bei Glucose handelt es sich um ein sogenanntes optisch aktives Molekül [22, 29, 144], das in der Lage ist, die Polarisationsrichtung einer elektromagnetischen Welle zu drehen. Eine detaillierte Beschreibung dazu ist in Abschnitt 2.1 zu finden. Um diesen Effekt zu nutzen, wird die zu messende Probe zwischen zwei senkrecht zueinander ausgerichteten Polarisationsfiltern lokalisiert. Eine prinzipielle Darstellung des Funktionsprinzips zeigt Abbildung 5.

Das vom ersten Filter linear polarisierte Licht trifft ohne optisch aktive Substanz in der Probe senkrecht auf das zweite Filter, wodurch kein Licht auf den dahinter liegenden Detektor fallen kann. Ist die Probe dagegen optisch aktiv, dreht sich die Polarisationsrichtung und trifft nach der Polarisation durch das erste Filter nicht mehr senkrecht auf das zweite Filter, wodurch die detektierte Intensität abhängig von Wellenlänge, Kon-

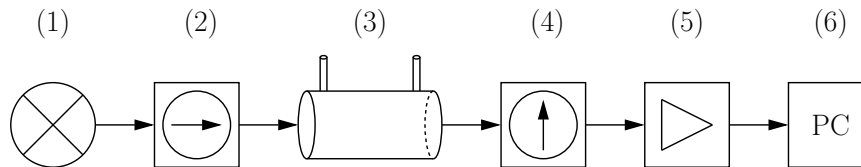


Abbildung 5: Schematische Darstellung eines Polarimeter-Messaufbaus: (1) Lichtquelle, (2) erstes Filter, (3) Küvette/Probe, (4) zweites Filter, (5) Detektor, (6) Datenauswertung

zentration und Pfadlänge steigt. Aus den so gewonnenen Informationen kann dann die Glucose-Konzentration bestimmt werden.

In einigen Ansätzen findet sich zur Verbesserung der Signalqualität ein zusätzliches Bauelement zur optischen Modulation der Intensität, wodurch eine Verbesserung der Signalqualität erreicht wird. Neben Pockelszellen [112, 145] werden in den meisten Ansätzen sogenannte Faraday Rotatoren eingesetzt [7, 34, 46, 49, 50, 112, 145–157]. Eine Erläuterung der Wirkprinzipien findet sich in Abschnitt 2.2.

Ein wesentlicher Unterschied im Vergleich zur Absorptionsspektroskopie ist, dass polarimetrische Messungen gewöhnlicherweise im sichtbaren Wellenlängenbereich durchgeführt werden. Üblicherweise werden hierfür aufgrund ihres sehr kollimierten Lichtes Laser verwendet. Gebräuchliche Wellenlängen sind zum Beispiel 532 nm [50, 152, 157] oder 633 nm [49, 112, 145, 146, 149, 155]. Ein wesentlicher Vorteil im Vergleich zum infraroten Wellenlängenbereich ist, dass der Absorptionskoeffizient des Wassers als Hauptbestandteil der Probe um etwa drei bis vier Größenordnungen geringer ist [140]. Zum einen entfällt dadurch die Notwendigkeit auf einem hohen Absorptionsuntergrund messen zu müssen [141]. Zum anderen lassen sich so wesentlich größere Pfadlängen realisieren, die nur noch durch das vorhandene Probenvolumen begrenzt werden. Diese Eigenschaft macht das Verfahren für die Konzentrationsbestimmung von Glucose in Wasser besonders geeignet [34]. Daher hat sich die Polarimetrie im Laufe der Jahre auch zu einem Standardverfahren in der chemischen Analyse entwickelt.

Es gibt in der Polarimetrie jedoch zwei grundsätzliche Probleme. Zum einen rufen Streueffekte durch Erythrozyten bei der Glucose-Bestimmung ähnlich große Probleme wie bei der Absorptionsspektroskopie hervor [101, 138], da es in der Probe zwischen den Polarisationsfiltern zu Depolarisation kommt. Zum anderen sind auch andere Blutkomponenten wie zum Beispiel die im Blut vorhandenen Eiweiße optisch aktiv [22, 29, 112]. Die messbare optische Drehung ist daher eine Überlagerung von verschiedenen Blutkomponenten [22]. Eine theoretische Betrachtung der Auswirkungen von Streueffekten auf das Polarimeter-signal erfolgte durch die Arbeitsgruppen um Nirmalaya Ghosh, Alex Vitkin und Steven Jacques [158–163]. Praktische Untersuchungen mittels Intralipid [164] und Polystyrene Kugeln [159, 163, 165–168] als Streupartikel folgten dann mit photoelastisch modulierten Polarimetern. Dabei wurde eine gute Übereinstimmung von Theorie und Praxis erreicht [159]. Die Arbeitsgruppe um Alex Vitkin hat in diesem Zusammenhang gezeigt, dass eine gewisse Restpolarisation auch bei anwesender Streuung verbleibt und diese linear proportional zur Glucosekonzentration ist. Allerdings ist dieses Signal auch abhängig von der absoluten Stärke der Streuung [158, 165, 169]. Schwankt die Streuung, ändert sich auch das Signal, was zu einer fehlerhaften Glucose-Bestimmung führen kann. Zu berücksichtigen ist zudem, dass diese Messungen mit extrem hohen Glucose-Konzentrationen von 16.200 mg/dl [163], 21.600 mg/dl [158] und 180.000 mg/dl [159] durchgeführt wurden. Diverse weitere Untersuchungen zur Rückstreuung von Polarimetersignalen wurden von

weiteren Wissenschaftlern durchgeführt [103,170,171]. So konnte gezeigt werden, dass bereits 4 mm Gewebestärke das eingestrahlte Licht zu etwa 95 % depolarisiert [11].

Das große Hindernis der spektralen Überlagerung von anderen optisch aktiven Substanzen ist mit diesen Ansätzen jedoch noch nicht gelöst. In besonderem Maße sind dies die Bluteiweiße [112], die ebenso optisch aktiv sind [22,29] und in einer Konzentration von bis zu 7.000 mg/dl im Plasma vorhanden sind, siehe Tabelle 1 auf Seite 3. Bereits bei kleinen Eiweißkonzentrationen können hierdurch große Fehler bei der Glucose-Bestimmung entstehen [147].

Es konnte jedoch gezeigt werden, dass nach Abtrennen der Eiweiße durch Ultrafiltration des Blutplasmas mit einer Filter-Trenngrenze von ≤ 10 kDa und einem konventionellen Polarimeter sowie einer monochromatischen Messwellenlänge von 589 nm eine gute Korrelation zwischen der Glucose-Konzentration und dem Polarisationsignal besteht [172]. Allerdings ist hierfür durch die Ultrafiltration wiederum Verbrauchsmaterial erforderlich, da die Filter sich mit der Zeit durch Ablagerungen zusetzen und so regelmäßig ausgetauscht werden müssen. Ein weiteres Medium, in dem die Eiweißkonzentration etwa um den Faktor 400 geringer als im Plasma ist und keine Streuung durch Erythrozyten aufweist, ist die Augenflüssigkeit [7]. Da zudem bereits 1966 eine Korrelation zwischen der Glucose-Konzentration von Auge und Blut nachgewiesen werden konnte [173], wurden in der Vergangenheit Anstrengungen unternommen, um den Blutzucker am Auge zu bestimmen. Die ersten Untersuchungen wurden 1979 von W. March durchgeführt [174] und später weiter verfolgt [175,176]. Einen besonderen Fokus legt die Arbeitsgruppe um Brent D. Cameron und Gerard L. Cote auf diese Messtechnik [7, 34, 49, 177–179].

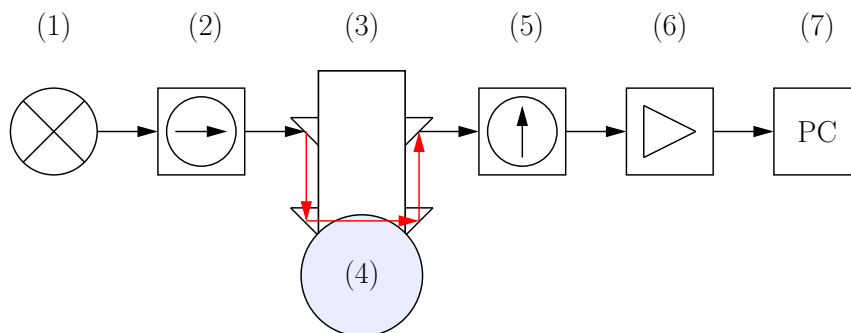


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Polarimetrie an der Augenflüssigkeit ohne optische Modulation nach [49, 50, 157]: (1) Lichtquelle, (2) Polarisator, (3) Einkopplungsprisma, (4) Augapfel, (5) Polarisator, (6) Detektor, (7) Datenauswertung

Bei dieser Methode wird linear polarisiertes Licht seitlich in den Augapfel eingekoppelt [180] oder durch Aufsetzen einer speziellen Optik auf das Auge durch den Augapfel geleitet [49]. Das wieder austretende Licht trifft dann auf das zweite Polarisationsfilter und wird gemessen. In diesem Zusammenhang wurden mehrere Studien an betäubten Hasen durchgeführt und die über einen gewissen Zeitraum ermittelten Glucose-Konzentrationswerte mit denen eines Referenzgerätes verglichen [7, 46, 49, 178, 179, 181]. Auch wenn die Augenflüssigkeit aufgrund der vernachlässigbaren Eiweißkonzentration und der nicht vorhandenen Erythrozyten als idealer Messort erscheinen mag, ergeben sich dennoch Schwierigkeiten [34].

So stellt speziell die bei der Einkopplung in den Augapfel auftretende Brechung ein Problem dar. Daher wurde bei diesem Messverfahren verstärkt Wert darauf gelegt, die Folgen

der dabei auftretenden Doppelbrechung zu reduzieren [50, 153, 154, 157, 181–186]. Zu diesem Zweck wurden Studien an Nachbildungen von Augäpfeln erstellt, um die Effekte beim Ein- und Austritt des Lichtes zu simulieren [154, 157, 181]. Unter anderem wurde durch die Kombination der Laserwellenlängen 532 nm und 635 nm [50, 157, 182, 184, 184] sowie 635 nm und 830 nm [154, 181] eine Verbesserung erreicht. Zudem wurde gezeigt, dass ein closed-loop System mit einem elektrooptischen Retarder Erfolge diesbezüglich erzielen konnte [183]. Außerdem werden die Einflüsse von Bewegungsartefakten reduziert, wenn die Einkopplung 1,5 mm unterhalb der Hornhautspitze erfolgt [157].

Ein weiterer Nachteil der Glucose-Messung am Auge ist, dass die Glucose-Konzentration dort in Bezug auf die Konzentration im Blut verzögert ist (je nach Quelle 2,9–5,4 min [49], 30 min [187] beziehungsweise 3,4 min [177], 10–15 min [188]). Außerdem hat das Lebensalter einen Einfluss auf die Korrelation zwischen Glucose in Auge und Blut [173]. Zudem beschränken sich diese Studien auf die Messung an betäubten Hasen oder Augenmodellen und sind in der klinischen Medizin aufgrund des Augenaufsatzes nicht praktikabel.

Ähnlich wie bei der Absorptionsspektroskopie stellt die spektrale Überlagerung der spezifischen Drehwinkel, auch Optische Rotationsdispersion (ORD) genannt, einen störenden Einflussfaktor dar. Die verschiedenen Rotationsdispersionen sind jedoch ähnlich wie die Absorptionsspektren für jedes Molekül charakteristisch und unterscheiden sich spektral voneinander [22, 29, 144, 189]. Hierauf wird in Abschnitt 2.1.1 näher eingegangen.

Erste Untersuchungen zum Einfluss von Bluteiweißen auf die polarimetrische Bestimmungsgenauigkeit der Glucose-Konzentration wurden mit Rinderaugenwasser durchgeführt, das mit Glucose dotiert wurde [148]. Die hierbei verwendeten Konzentrationen von 152 mg/dl [147] entsprachen jedoch nicht annähernd den im menschlichen Blut vorhandenen 3680 – 4720 nm aus Tabelle 1. Die Standardabweichungen im Vergleich zu reinen Glucose-Lösungen stiegen dabei von $\pm 6,91 - 8,84$ mg/dl [147, 148] auf $\pm 20,25 - 27,47$ mg/dl [147, 148].

Aufgrund der charakteristischen Rotationsdispersion wurde vorgeschlagen, die üblicherweise nur mit einer Wellenlänge arbeitenden Polarimeter spektral zu erweitern [112, 150]. Zu diesem Zweck wurden die Laserwellenlängen 532 nm und 635 nm kombiniert und auf eine Konzentrationsmatrix bestehend aus 0, 50, ..., 600 mg/dl Glucose und 0, 25, ..., 100 mg/dl Rinderalbumin angewendet, welche zuvor in Wasser gelöst wurden [46]. Der Vorhersagefehler betrug für die Nutzung des 532 nm Lasers ± 140 mg/dl im Fall der Variante ohne closed-loop System und ± 40 mg/dl mit closed-loop System. Die Kombination beider Wellenlängen reduzierte den Fehler auf ± 20 mg/dl [46]. Die Albumin-Konzentration von 0 – 100 mg/dl ist jedoch auch hier weit entfernt von der physiologischen Konzentration im Blut von 3680 – 4720 nm [22, 23]. Zudem verwendet dieser Ansatz nur zwei Wellenlängen, die aus zwei unterschiedlichen Lichtquellen kommen. Individuelles Driften dieser Geräte könnte so zu einem Fehler führen. Weiterhin lassen sich mit zwei Wellenlängen maximal zwei verschiedene Stoffe voneinander unterscheiden.

Daher wurde vorgeschlagen, eine multispektrale Messung der Rotationsdispersion durchzuführen [112, 150, 190]. Von einer breitbandigen Messung ähnlich der Absorptionsspektroskopie wird daher erwartet, dass diese die Ergebnisse noch verbessern kann [22, 68, 150]. Außerdem soll hiermit eine Unterscheidung einzelner Inhaltsstoffe möglich sein [23]. Die Kombination aus Rotationsdispersion und Absorption kann die Messergebnisse noch weiter verbessern [22, 23].

Für eine zuverlässige Konzentrationsbestimmung sind jedoch nicht nur die direkten optischen Eigenschaften von Bedeutung. Weitere Parameter, die bei sämtlichen polarimetrischen Untersuchungen Beachtung finden sollten, sind sowohl der pH-Wert als auch die

Temperatur der Probe. Hierzu finden sich in der Literatur jedoch widersprüchliche Angaben. So wird berichtet, dass eine Temperaturänderung von $\pm 1^\circ\text{C}$ oder eine pH-Wert Änderung um $\pm 0,1$ die Stärke der Rotationsdispersion um etwa 10 % ändert [150, 191]. Diese Ergebnisse werden jedoch an anderer Stelle sowohl aufgrund der Probenvorbereitung durch Zugabe von reinen Säuren und Laugen als auch wegen der starken qualitativen Abweichung der gemessenen Rotationsdispersion von den Literaturwerten in Frage gestellt [34]. Besonders erwähnenswert ist dabei die qualitative Abweichung der Rotationsdispersionen von anderen Literaturwerten [29]. An anderer Stelle wird berichtet, dass sowohl die Temperatur als auch der pH-Wert einen vernachlässigbaren Einfluss auf die Stärke der Rotationsdispersion haben [190, 192].

Grundvoraussetzung für eine Untersuchung der Rotationsdispersionen ist jedoch die präzise Auflösung der durch die niedrigen physiologischen Glucose-Konzentrationen bedingte geringe Drehung. So ist das Messsignal direkt von der Drehung des polarisierten Lichts abhängig. Glucose weist bei einer Pfadlänge von 10 mm und einer Wellenlänge von 670 nm jedoch nur eine Drehung von 0,4 Milligrad pro 10 mg/dl auf beziehungsweise 5 Milligrad an absoluter Drehung bei 589 nm für physiologische Konzentrationen [147]. Da die detektierte Intensität maßgeblich vom Auftreffwinkel der von der Probe beeinflussten Polarisationsrichtung auf das zweite Polarisationsfilter abhängt, ist zudem höchste mechanische Langzeitstabilität zwingend notwendig, um die geringe Drehung durch die Probe auflösen zu können.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Polarimetrie als Verfahren zur Bestimmung von Glucose im Vergleich zur Absorptionsspektroskopie sowohl Vor- als auch Nachteile mit sich bringt.

Als Vorteil ist zunächst der verbesserte Dynamikbereich zu nennen. Durch die gekreuzten Polarisationsfilter kann der Messaufbau so eingestellt werden, dass zwischen geringster und höchster Konzentration eine maximale Trennung der Intensitätswerte vorliegt. In der Absorptionsspektroskopie muss aufgrund der hohen Wasserabsorption auf einem entsprechend hohen Hintergrund gemessen werden. Zudem kommt es zu keiner nennenswerten spektralen Überlagerung mit dem Wasseranteil [141]. Ein ganz entscheidender Vorteil ist jedoch die Nutzung des sichtbaren Wellenlängenbereiches, in dem eine um drei bis vier Größenordnungen bessere Sensitivität als im NIR erreicht wird [85]. Zudem ist die Hardware im VIS-Bereich wesentlich günstiger in der Anschaffung sowie einfacher in der Handhabung. Durch geeignete Modulation des Signals mit Faraday-Rotatoren kann eine weitere Verbesserung der Signalqualität erreicht werden.

1.3 Zieldefinition

Die in Abschnitt 1.2 vorgestellten Messverfahren weisen jeweils individuelle Stärken und Schwächen auf. Insbesondere zur Absorptionsspektroskopie und Polarimetrie wurden viele Ansätze unternommen, die jedoch meist aufgrund der jeweiligen Schwächen der Verfahren nicht zielführend waren oder unzureichende Genauigkeiten aufwiesen.

Es liegt daher nahe, die Vorteile dieser beiden Verfahren miteinander zu kombinieren. Ein breitbandiges Polarimeter könnte einerseits im sichtbaren Wellenlängenbereich mit hoher Sensitivität und geringer Wasserabsorption arbeiten und andererseits genügend spektrale Informationen der überlagerten Rotationsdispersionen liefern [68, 112, 150], um diese mit den in der Absorptionsspektroskopie etablierten multivariaten Datenauswertungsverfahren zu verarbeiten [22, 23].

Ein solches Polarimeter zu konstruieren, aufzubauen, zu stabilisieren und zu evaluieren soll daher Gegenstand dieser Dissertation sein. In diesem Zusammenhang soll auch untersucht werden, ob optisch aktive Substanzen anhand ihrer Rotationsdispersion auseinander gehalten werden können. Dabei gilt es, die bisherigen Schwierigkeiten bei der optischen Glucose-Messung zu überwinden, die Vorteile beider Messverfahren zu kombinieren und die Schwachstellen soweit wie möglich zu beseitigen. Im Detail geht es dabei u.a. um die folgenden Teilaspekte beziehungsweise Arbeitspakete:

- Entwurf eines Breitbandpolarimeters zur Messung der Rotationsdispersion
- Stabilisierung der Messbedingungen bezüglich Temperatur und pH-Wert
- Reduktion der Störeinflüsse folgender Parameter
 - Intensitätsschwankungen der Lichtquelle
 - Absorptionseffekte in der Probe
 - Streueffekte
 - polarimetrische Drehung anderer optisch aktiver Substanzen
- Automatisierung der Messprozesse zur Erhöhung der Reproduzierbarkeit
- Untersuchung der spektralen Überlagerung von Glucose und Bluteiweiß
- Messung der Eiweißabsorption im sichtbarer Wellenlängenbereich (VIS) [193] und Kombinationsmessung von Rotationsdispersion und Absorption der Proben

Neben der Entwicklung und der Dimensionierung des Messaufbaus steht damit die Reduktion der Störeinflüsse im Vordergrund, die in bisherigen Arbeiten zu ungenauen Messungen geführt haben. Da die bisher erreichten Glucose-Bestimmungsgenauigkeiten in Anwesenheit nicht physiologischer Albumin-Konzentrationen für zwei Wellenlängensysteme nicht zufriedenstellend war, bedarf es hinsichtlich der Stabilisierung des Aufbaus weiterer Verbesserungen. Diese zu erreichen ist ebenso einer der zentralen Bestandteile dieser Arbeit. Sobald diese Voraussetzungen geschaffen sind, erfolgt dann eine Untersuchung, inwieweit sich die Glucose-Konzentration in Abhängigkeit anderer anwesender optisch aktiver Substanzen bestimmen lässt. Konkret geht es dabei darum, um welchen Anteil sich die Genauigkeit im Vergleich zu einem konventionellen, monochromatischen Polarimeter steigern lässt und ob sich mit physiologischer Variation der Eiweißkonzentration gängige Zulassungskriterien erfüllen lassen. Weiterhin ist in diesem Zusammenhang auch von Interesse, ob sich gleichzeitig die Eiweiß-Konzentration bestimmen lässt und ob als Ausblick eine spätere Miniaturisierung des Aufbaus für die klinische Anwendung denkbar ist.

2 Theoretischer Hintergrund

Dieser Abschnitt beschäftigt sich mit den Grundlagen, die zum besseren Verständnis dieser Arbeit dienen sollen. Zunächst werden in Abschnitt 2.1 die Hintergründe optischer Aktivität erläutert und auf die Rotationsdispersion verschiedener Blutinhaltsstoffe eingegangen. Dem folgt in Abschnitt 2.2 eine Beschreibung der Funktion eines gebräuchlichen Polarimeters mit optischer Modulation und den sich dabei ergebenden Signalen. Am Ende dieses Kapitels in Abschnitt 2.3.1 erfolgt dann eine kurze Erläuterung multivariater Datenanalyse und eine Beschreibung wie sie für die Konzentrationsbestimmung eingesetzt wird.

2.1 Optische Aktivität

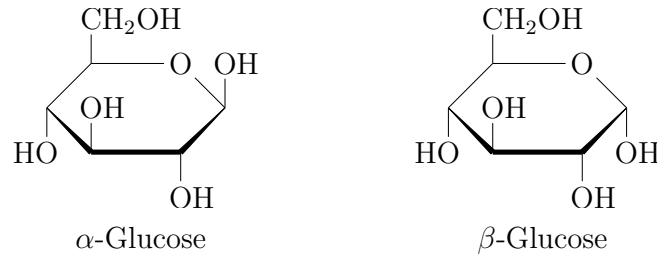
Der Begriff der optischen Aktivität beschreibt die Fähigkeit eines Stoffes, die Polarisations Ebene von linear polarisiertem Licht zu drehen [194]. Je Konzentration kommt es für jeden optisch aktiven Stoff zu einer charakteristischen Drehung, die in der Polarimetrie zur Konzentrationsbestimmung genutzt wird. Dabei gibt es eine Wellenlängenabhängigkeit der Drehung, die für jedes Molekül ebenso charakteristisch ist. Eine Konzentrationsbestimmung wird jedoch meistens nur unter Verwendung einer diskreten Wellenlänge wie zum Beispiel 589 nm (Natriumdampflampe) oder 532 nm (frequenzverdoppelter Nd:YAG Laser) durchgeführt.

2.1.1 Optische Rotationsdispersion (ORD)

Die polarisierenden Eigenschaften bestimmter Stoffe wurden bereits im Jahr 1808 von Etienne-Louis Malus entdeckt [195]. Er beobachtete, dass ein doppelbrechendes Material den Lichtstrahl in zwei zueinander senkrecht stehende Polarisations Ebenen aufteilt. Mit dieser Entdeckung war die Grundlage für die Untersuchung von optischer Aktivität gelegt. 1818 zeigten Jean-Baptiste Biot und Thomas Johann Seebeck, dass viele Stoffe die Polarisations Ebene im gelösten Zustand drehen, im kristallinen Zustand jedoch nicht [196]. Um zu verstehen, warum manche Stoffe optisch aktiv sind und andere nicht, muss zunächst deren Struktur betrachtet werden.

Erste Arbeiten hierzu führte Louis Pasteur im Jahr 1848 durch. Er beobachtete, dass das Natrium-Ammonium-Salz der Weinsäure optisch inaktiv war, jedoch zwei unterschiedliche Kristallmodifikationen ausgebildet hat. Nach mechanischer Trennung und anschließender separater Lösung in Wasser zeigten sich diese Lösungen optisch aktiv. Nach dem Vermischen beider Lösungen war die optische Aktivität dann wieder verschwunden [194]. Es musste also zwei Stoffanteile geben, die sich chemisch ähnlich verhielten, deren optische Aktivität jedoch unterschiedlich war und sich so überlagerte, dass sich die Summe der Rotationen aufhob.

Die Moleküle solcher Stoffe lassen sich nicht mit ihrem Spiegelbild zur Deckung bringen, man bezeichnet sie dann als chiral. Sie verhalten sich chemisch gleich und drehen die Polarisations Ebene um den gleichen Betrag, jedoch aufgrund ihres Ladungsschwerpunktes in unterschiedliche Richtung [194]. In einer Mischung mit jeweils gleichen Anteilen hebt sich die Drehung genau auf. Einer dieser chiralen Stoffe ist Glucose, welche als rechtsdrehende D- und linksdrehende L-Glucose auftritt. Klinisch relevant ist jedoch nur die D-Glucose, weshalb im Folgenden mit Glucose stets die D-Glucose gemeint ist. Die Moleküle der D-Glucose kommen dabei jeweils als α - und β -Glucose vor. Eine schematische Darstellung dieser beiden Glucose-Formen ist in Abbildung 7 zu sehen.

Abbildung 7: Verschiedene Strukturformen von α - und β -Glucose [7].

Als sichtbarer Unterschied zwischen α - und β -Glucose ist die jeweils rechts dargestellte OH-Gruppe zu nennen, welche gespiegelt ist. Die beiden Moleküle lassen sich in keiner Art zur Deckung bringen. Zwar sind die physikalischen Eigenschaften dieser Moleküle (Schmelzpunkt, Siedepunkt, Brechungsindex) identisch, jedoch weisen beide unterschiedliche Brechungsindices n_L und n_R für links- und rechtspolarisiertes Licht auf, was sich in einem jeweils spezifischen Drehwinkel $[\alpha]_{\lambda, \text{pH}}^T$ bemerkbar macht [11]. Eine Angabe dieses Drehwinkels erfolgt gewöhnlicherweise spektral gesehen an der Natrium D-Spektrallinie bei 546,1 nm und einer Temperatur von 20 °C [194]. Für in Wasser gelöste α -Glucose wird ein spezifischer Drehwinkel von $[\alpha]_D = 112,2^\circ$ angegeben und für β -Glucose $[\alpha]_D = 18,7^\circ$. Zwischen beiden Molekülen stellt sich nach einiger Zeit ein Gleichgewicht ein, bei der α -Glucose zu 36 % und β -Glucose zu 64 % vorkommt. Dieser Vorgang wird als Mutarotation bezeichnet und wird durch Temperaturerhöhung oder durch alkalische Lösungen ($\text{pH} \geq 7$) beschleunigt [194]. Im Gleichgewicht resultiert ein Drehwinkel von $[\alpha]_D = 52,6^\circ$ [7, 11]. Zu diesem Thema wurden in der Vergangenheit einige Untersuchungen durchgeführt, um die Drehwinkel für diverse Stoffe zu bestimmen [197].

Die Darstellung des spezifischen Drehwinkels bei einer einzigen Wellenlänge ist jedoch für die vollständige Charakterisierung eines Stoffes nicht ausreichend. Mit der Beschreibung nach Moffitt-Yang [198, 199] und Drude [22, 189] gibt es prinzipiell zwei verschiedene Methoden, die Wellenlängenabhängigkeit, auch optische Rotationsdispersion (ORD) genannt, zu beschreiben. Diese Arbeiten basieren auf den quantenmechanischen Erkenntnissen von Leon Rosenfeld aus dem Jahr 1928. Danach ist die optische Aktivität eines Moleküls davon abhängig, ob bestimmte Elektronenübergänge sowohl elektrisch als auch magnetisch erlaubt sind [200].

Moffitt-Yang-Beschreibung

Eine Herleitung der Rotationsdispersion aus der Quantentheorie fand im Jahr 1956 durch William Moffitt und Jen Tsi Yang statt [198, 199]. Ihnen gelang es, eine Formel zu entwickeln, mit der sich der spektrale Verlauf der Rotationsdispersion in Abhängigkeit von der Wellenlänge λ näherungsweise beschreiben lässt. Sie beinhaltet die stoffspezifischen Literaturkonstanten a_0 , b_0 und die Resonanz- beziehungsweise Zentralwellenlänge λ_0 und ist gegeben durch Gleichung 2

$$[\alpha]_{\text{pH}}^T(\lambda) = \frac{a_0 \cdot \lambda_0^2}{\lambda^2 - \lambda_0^2} + \frac{b_0 \cdot \lambda_0^4}{(\lambda^2 - \lambda_0^2)^2}. \quad (2)$$

Der spektrale Verlauf wird dabei maßgeblich durch den ersten Term und a_0 und λ_0 bestimmt, während der zweite Term und b_0 als Korrekturfaktor dienen. Die Auswirkung des zweiten Terms ist besonders für den Bereich um die Resonanzwellenlänge wirksam. Durch das Quadrieren des Nenners wird erreicht, dass im Gegensatz zum a_0 -Term mit Über-

schreiten der Resonanzwellenlänge kein plötzlicher Vorzeichenwechsel des Terms stattfindet. In Abhängigkeit von b_0 wird so ein Korrekturfaktor erreicht, der den Verlauf der Rotationsdispersion näherungsweise wiedergibt. Mit steigender Wellenlänge wird der Ergänzungsterm zunehmend vernachlässigbar.

Dennoch wird aus dieser Gleichung ersichtlich, dass der Nenner der Brüche im Bereich der üblicherweise im UV-Bereich liegenden Resonanzwellenlänge λ_0 [29] gegen Null läuft, sobald $\lambda \approx \lambda_0$ ist. Folglich würde der Wert des Bruches gegen ∞ laufen, während sich gleichzeitig das Vorzeichen des Bruches und somit die Drehrichtung ändert. Als Konsequenz würde der Wert der beiden Terme im Bereich der Polstelle gegen ∞ laufen, wodurch sich eine Singularität ergibt. Diese Gleichung kann daher nur als Näherung betrachtet werden, mit der sich der Verlauf der Rotationsdispersion außerhalb des Bereichs der Resonanzwellenlänge beschreiben lässt.

Seit den 60er Jahren des 20. Jahrhunderts erfolgten viele Untersuchungen zur Rotationsdispersion verschiedener Substanzen [29, 144, 201, 202]. Oft wird in jüngeren wissenschaftlichen Arbeiten mit der vereinfachten Drude-Gleichung gearbeitet [7, 22, 23, 150].

Drude-Beschreibung

Eine ähnliche Formel zur Beschreibung der Rotationsdispersionen wurde durch Paul Drude gefunden. Bei dieser Gleichung handelt es sich um eine empirische Formel, die aus Beobachtungen abgeleitet und als Ersatz für die Moffitt-Yang-Gleichung vorgeschlagen wurde [203]. Die Zweiterm-Drude-Gleichung ähnelt dabei stark dem von Moffitt und Yang formulierten Zusammenhang.

$$[\alpha]_{\text{pH}}^{\text{T}}(\lambda) = \frac{A_0 \cdot \lambda_0^2}{\lambda^2 - \lambda_0^2} + \frac{A_1 \cdot \lambda_1^2}{\lambda^2 - \lambda_1^2} \quad (3)$$

Diese Gleichung wurde später von anderen Autoren modifiziert [203, 204] und unter anderem zur Bestimmung der Rotationsdispersionen von Polypeptiden eingesetzt [205]. Weitere Vereinfachungen führten schließlich zur Einterm-Drude-Gleichung [204, 206], in der nur noch eine Konstante A Richtung und Stärke der Drehung vorgibt, während die Resonanzwellenlänge λ_0 den spektralen Verlauf beschreibt [7, 22, 23, 189].

$$[\alpha]_{\text{pH}}^{\text{T}}(\lambda) = \frac{A}{\lambda^2 - \lambda_0^2} \quad (4)$$

Gleichung 4 zeigt dabei die am weitesten gehende Vereinfachung [7, 22, 23, 150, 183], die sich jedoch wie alle anderen nicht für den Bereich um λ_0 eignet.

Eine alternative Betrachtung muss berücksichtigt werden, sobald in der Nähe der Resonanzwellenlänge λ_0 gemessen wird. Eine Erklärung hierfür liefert der sogenannte Cotton-Effekt, bei dem eine Absorption im UV-Bereich zu einer Anomalie der Rotationsdispersion führt [207]. Neben Eiweißmolekülen werden auch bei Glucose [155] oder Laktat [208] solche sehr schwachen Absorptionen beobachtet. So wird in der Literatur über Absorptionsmaxima bei ca. 235 nm [209] beziehungsweise 268 nm [155] und Absorptionsflanken bei 215 nm und 325 nm berichtet [155]. Mit der Halbwertsbreite $\Delta\lambda_j$ lässt sich die Drehung im UV-Bereich abhängig von der Wellenlänge λ_j , dem Übergang vom Grundzustand zum angeregten Zustand j , berechnen [155, 210].

$$[\alpha]_{\text{pH}}^{\text{T}}(\lambda) = \sum_j \frac{A_j}{\left(\lambda^2 - \lambda_j^2\right) + \left(\frac{\lambda_j^4}{\lambda^2 \cdot (\lambda^2 - \lambda_j^2)} \cdot \frac{\Delta\lambda_j}{2}\right)} \quad (5)$$

Der Wellenlängenbereich nahe der stoffspezifischen Resonanzwellenlänge bietet zwar besonders charakteristische, spektrale Stoffinformationen und weist eine sehr hohe spezifische Rotationsdispersion auf, ist jedoch aufgrund zahlreicher messtechnischer Schwierigkeiten nur schlecht abzudecken, wie in Abschnitt 3.1 näher erläutert ist. Daher wird für die späteren Messungen der VIS-Bereich verwendet. Hier kann näherungsweise Gleichung 5 anstatt Gleichung 4 verwendet werden [7, 22, 23, 189].

2.1.2 Rotationsdispersionen verschiedener Moleküle

Wie in Abschnitt 2.1.1 erwähnt, existieren für jedes optisch aktive Molekül charakteristische Parameter, mit denen sich der Verlauf der Rotationsdispersion unter Verwendung der Moffitt-Yang- oder der Drude-Gleichung beschreiben lässt. Da der Bereich der Resonanzwellenlänge messtechnisch schwierig zu erfassen ist, wird für Messungen im VIS-Bereich üblicherweise auf die vereinfachte Form der Drude-Gleichung (Gleichung 4) zurückgegriffen. Die dafür nötigen Parameter sind in Tabelle 2 exemplarisch für einige Blutkomponenten dargestellt. Zwar hängt die Rotationsdispersion nach den Quellen einiger Autoren auch von pH-Wert und Temperatur ab [150, 191], jedoch gibt es in der Literatur zu diesen Parametern oft keine Informationen [211].

Tabelle 2: Drude-Parameter verschiedener Blutinhaltsstoffe [22].

Stoff	A in $\frac{\text{mdeg}\cdot\text{ml}\cdot\text{nm}^2}{\text{m}\cdot\text{g}}$	λ_0 in nm
Glucose	$1,72 \cdot 10^7$	150
Albumin	$-1,75 \cdot 10^7$	264
Globulin	$-1,48 \cdot 10^7$	211
Fibrinogen	$-1,37 \cdot 10^7$	260

Der Parameter A , der Richtung und Stärke der Drehung angibt, zeigt, dass Glucose das Licht in eine andere Richtung als die Bluteiweiße Albumin, Globulin sowie Fibrinogen dreht. Positive Werte geben dabei eine Drehung im VIS nach rechts und negative nach links an. Weiterhin ist zu erwähnen, dass sich die Zentralwellenlängen λ_0 , die den spektralen Verlauf wiedergeben, zwischen Glucose und den Eiweißen unterscheiden. Einen Eindruck davon, welchen Einfluss die Parameter auf die Rotationsdispersion der in Blut am häufigsten vorkommenden optisch aktiven Moleküle haben, vermittelt Abbildung 8. Hierbei fällt zunächst auf, dass es im sichtbaren Wellenlängenbereich für alle relevanten Blutinhaltsstoffe zu abklingenden Funktionen der Rotationsdispersion kommt. Glucose ist dabei rechtsdrehend, während die Bluteiweiße linksdrehend sind. Aufgrund der jeweils individuellen Zentralwellenlängen λ_0 aus Tabelle 2 kommt es jedoch zu einem für jeden Stoff charakteristischen Verlauf. Dies zeigt das Verhältnis der spezifischen Drehung der Bluteiweißen Albumin, Globulin und Fibrinogen zu Glucose, das zu jeder Wellenlänge einzigartig ist und hin zu kurzen Wellenlängen spezifischer wird.

Für die Differenzierung der Stoffe bietet es sich an, im Bereich der Resonanzwellenlänge λ_0 zu messen, wo die größten Signaländerungen auftreten. Da dies wegen der mit dem ultravioletten Wellenlängenbereich verbundenen technischen Schwierigkeiten nicht möglich ist, wird auf den VIS-Bereich ausgewichen, weil hier die Polarisierungseffekte auch noch messbar sind. Die Quotientenbildung macht deutlich, dass sich auch im Bereich der abklingenden ORD die charakteristischen Verläufe für die jeweilige Substanz bemerkbar

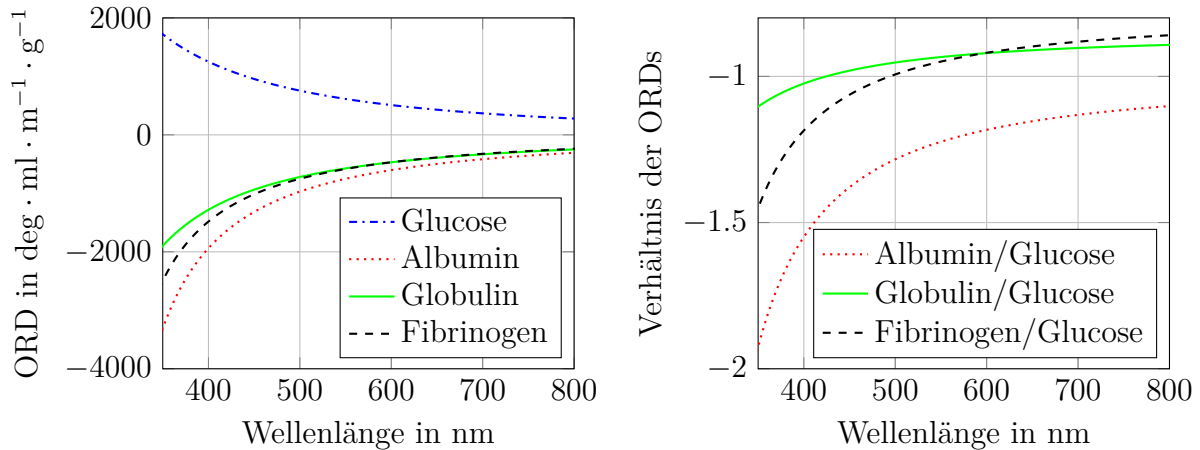


Abbildung 8: Links: Spezifische optische Drehung durch verschiedene optisch aktive Moleküle im Vergleich [29]. Rechts: ORD-Verhältnis ausgewählter Bluteiweiße zu Glucose.

machen. Dadurch erhält man für jede Wellenlänge eine Überlagerungsgleichung mit unterschiedlichen Stoffkoeffizienten. Im Gegensatz zu den Absorptionsspektren von Glucose bilden sich jedoch keine lokalen Maxima oder Minima aus, sondern es ist lediglich ein unterschiedlich abklingender Verlauf zu erkennen [29]. Das Auflösen dieser ähnlichen, jedoch leicht verschiedenen Rotationsdispersionen ist eine der Herausforderungen, mit denen sich diese Arbeit beschäftigt.

2.2 Polarimeterprinzip/Polarisationszustände

Die Messung der optischen Aktivität einer Probe erfolgt gewöhnlicherweise mit einem Polarimeter, bestehend aus Lichtquelle, Detektor, Küvette sowie zwei Polarisationsfiltern. Das entsprechende Funktionsprinzip wird in diesem Abschnitt erläutert.

2.2.1 Grundlegendes Polarimeterprinzip

Die Grundlage zu polarimetrischen Untersuchungen lieferte Erasmus Bartholin, der im Jahr 1669 entdeckte, dass Calcit doppelbrechende Eigenschaften aufweist [212]. Christiaan Huygens fand zudem Beweise, dass die zwei durch den Calcit entstandenen Strahlen polarisiert sind [212]. Jedoch konnte erst Etienne-Louis Malus im Jahr 1808 zeigen, dass Licht beim Durchgang durch ein doppelbrechendes Material in zwei Strahlen mit zueinander senkrecht stehenden Polarisations Ebenen aufgeteilt wird [87, 195]. Hieraus entwickelte Etienne-Louis Malus dann das nach ihm benannte Gesetz, das die Abschwächung einer linear polarisierten elektromagnetischen Welle der Amplitude I_0 beim Durchgang durch ein lineares Polarisationsfilter unter dem Winkel Φ beschreibt [213]:

$$I = I_0 \cdot \cos^2(\Phi). \quad (6)$$

Trifft Licht dessen Polarisations Ebene parallel zum Filter ausgerichtet ist auf dieses ($\Phi = 0$), resultiert maximale Transmission. Bei senkrechtem Auftreffen ($\Phi = 90^\circ$) erfolgt vollständige Auslöschung. Weitere allgemeine Erklärungen für das Verhalten von Licht beim Auftreffen auf eine Grenzschicht konnte Augustin Fresnel liefern. Mit den nach ihm benannten Fresnel-Formeln lassen sich Reflexion und Transmission parallel (p-) oder senkrecht (s-) polarisierter Strahlen getrennt beschreiben [212, 214], besonders dann, wenn

diese nicht senkrecht auf eine Grenzschicht treffen.

Die vom Menschen als Umgebungslicht wahrgenommenen elektromagnetischen Wellen besitzen meist aufgrund zahlreicher Ursprungsorte, Richtungen oder Reflexionen keine spezifische Polarisation. Man nennt dieses Licht, wie es auch von Glühlampen oder Leuchtdioden (LEDs) ausgesendet wird, unpolarisiert, weshalb sich eine Drehung der jeweiligen Polarisationsebenen nicht bemerkbar macht. Das Licht, welches die Probe durchstrahlen soll, muss also zuerst linear polarisiert werden. Aus Gründen der besseren Darstellbarkeit wird zunächst monochromatisches Licht betrachtet. Eine Darstellung des Polarimetergrundprinzips zeigt Abbildung 9.

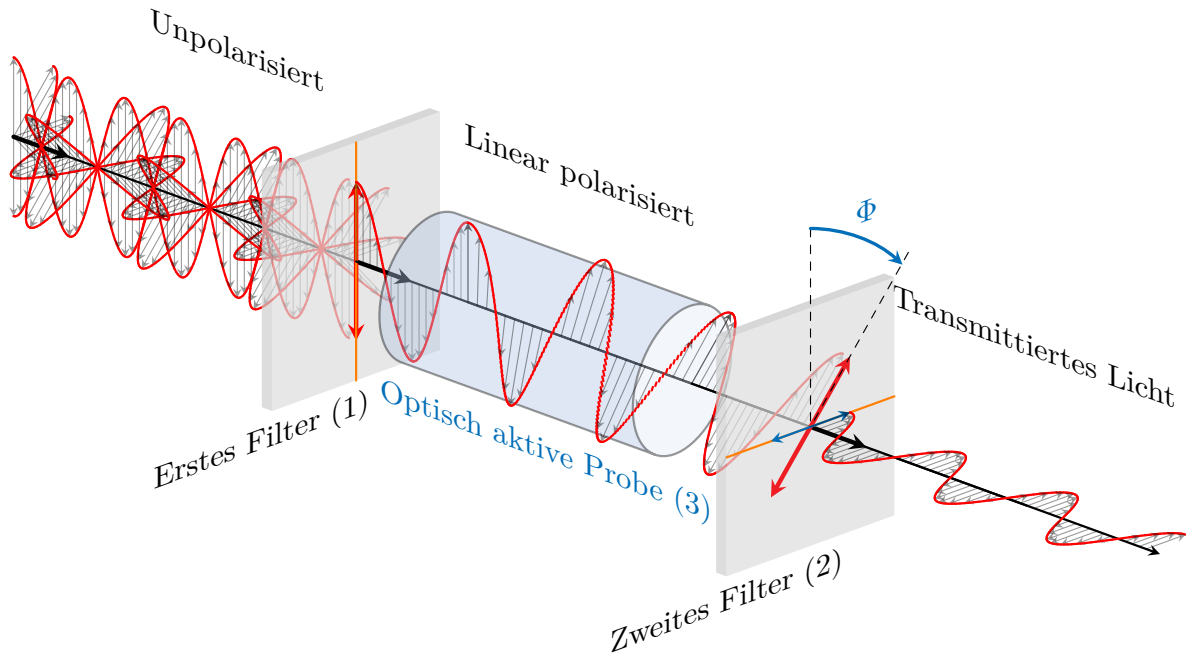


Abbildung 9: Schematische Darstellung des Polarimeterprinzips. Unpolarisiertes Licht wird durch das erste Filter linear polarisiert und trifft nach Drehung durch die Probe unter dem Winkel Φ auf das zweite Filter, wobei nur die von den Filtern transmittierten Komponenten dargestellt sind.

Das unpolarisierte Licht durchläuft ein erstes Polarisationsfilter, auch Polarisator genannt. Hierfür gibt es verschiedene Typen, deren Vor- und Nachteile für den Messaufbau dieser Arbeit in Abschnitt 3.1.2 diskutiert werden. Das anschließend von der Probe in Abhängigkeit von Stoff, Pfadlänge, Temperatur, pH-Wert und Konzentration um den Winkel Φ gedrehte Licht trifft auf das senkrecht zum ersten Filter stehende zweite Polarisationsfilter, den Analysator. In Abhängigkeit vom Auftreffwinkel Φ lässt sich nach dem Gesetz von Malus gemäß Gleichung 6 die Transmission durch den Analysator berechnen. An dieser Stelle ist jedoch zu erwähnen, dass basierend auf der Literatur [49, 147, 150] ein Winkel von $\Phi = 0^\circ$ senkrecht und $\Phi = 90^\circ$ paralleles Auftreffen auf das zweite Polarisationsfilter bedeutet. Nach der Definition von Malus bedeutet $\Phi = 0^\circ$ paralleles und $\Phi = 90^\circ$ senkrecht Auftreffen. Dies wird im Folgenden dadurch berücksichtigt, dass der Cosinus durch den Sinus ersetzt wird, wodurch sich auf Abbildung 9 das Gesetz von Malus verändert zu:

$$I = I_0 \cdot \sin^2(\Phi) \quad (7)$$

Oft wird jedoch mit kleinen Drehwinkeln von wenigen Grad oder Bruchteilen davon gearbeitet. Da für kleine Winkel Φ näherungsweise gilt $\sin(\Phi) \propto \Phi$, vereinfacht sich Gleichung 7 in diesen Fällen zu Gleichung 8.

$$I \propto \Phi^2 \quad (8)$$

Eine weitere Darstellung zu diesem Zusammenhang liefert Abbildung 10. Aus ihr geht hervor, dass die detektierte Intensität für kleine Winkel quadratisch vom Drehwinkel Φ abhängt. Dieser quadratische Zusammenhang zwischen Intensität und Drehwinkel würde eine darauf basierende Konzentrationsbestimmung erschweren.

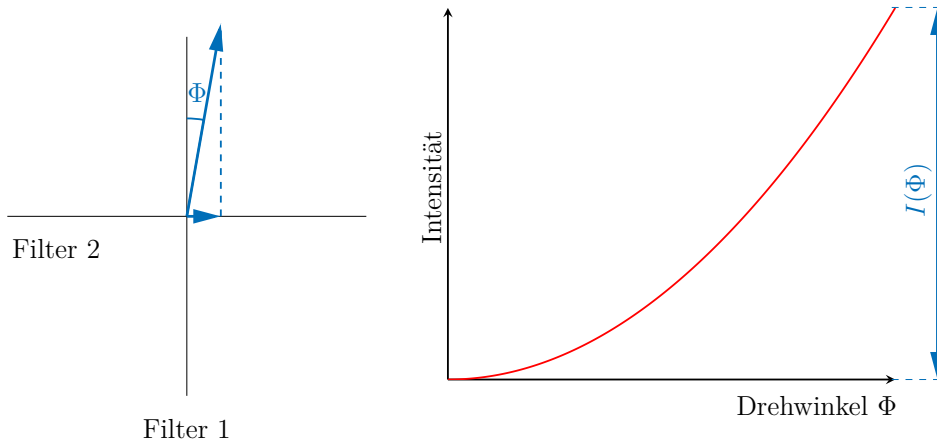


Abbildung 10: Detektorintensität eines Polarimeters in Abhängigkeit der Polarisationsdrehung Φ durch die optisch aktive Probe für kleine Φ nach [215].

Da im Allgemeinen gilt, dass die Intensität I einer elektromagnetischen Welle proportional zum Quadrat ihrer Amplitude beziehungsweise E-Feldes E ist, gilt, basierend auf dem Gesetz von Malus aus Gleichung 7 folglich auch:

$$E = E_0 \cdot \cos(\Phi) \quad (9)$$

Gemäß Abbildung 10 lässt sich diese als Projektion in Transmissionsrichtung verstehen. Der absolute Drehwinkel Φ ergibt sich dabei aus der stoffspezifischen Rotationsdispersion $[\alpha]_{\text{pH}}^T(\lambda)$ aus Abschnitt 2.1.1, welche sowohl von der Temperatur als auch dem pH-Wert abhängt. Werden pH-Wert und Temperatur der Probe konstant gehalten, ist der spezifische Drehwinkel lediglich von der Probe und der Wellenlänge abhängig. Zudem bestimmen Pfadlänge d und Konzentration c das Polarisationsmaß, sodass sich für den Gesamtdrehwinkel Φ folgende Gleichung ergibt:

$$\Phi = [\alpha]_{\lambda} \cdot d \cdot C \quad (10)$$

Bei konstanter Pfadlänge ergibt sich dadurch für die zu erwartenden kleinen Winkel ein linearer Zusammenhang zwischen Probenkonzentration und gemessener Intensität. Auf dieser Basis kann dann nach vorheriger Kalibration die Konzentration einer unbekannt Probe vorhergesagt werden.

2.2.2 Optische Modulation

Ein Problem bei statischen Messungen des Drehwinkels ist jedoch die Empfindlichkeit gegenüber Störeinflüssen. Wie bei vielen anderen Anwendungen auch, kann eine geeignete

Modulation des Signals Vorteile bringen. Hierdurch wird das Nutzsignal in einen Frequenzbereich verschoben, in dem zum einen die elektrischen Signalverarbeitungskomponenten ein günstiges Signal-Rausch-Verhältnis aufweisen. Zum anderen wird das Signal auf zeitlicher Basis so von den Störeinflüssen getrennt, dass es mit frequenzselektiven Verfahren wie zum Beispiel dem Lock-In-Verstärker störungsarm weiterverarbeitet werden kann.

Die Lichtintensität wird daher üblicherweise in den wissenschaftlichen Polarimetern moduliert [7, 34, 46, 49, 50, 147–157]. Für diesen Zweck können verschiedene Arten von Modulatoren verwendet werden, die vor oder hinter der Küvette, jedoch zwischen den Polarisationsfiltern platziert werden. Die Vor- und Nachteile der möglichen Modulatoren werden in Abschnitt 3.1.3 diskutiert. Die erste optische Modulation in einem Polarimeter wurde von E. J. Gillham im Jahr 1956 durchgeführt, der den Faraday Effekt nutzte [216]. Nach diesem Effekt sind bestimmte Materialien in der Lage, die Polarisationssebene in Abhängigkeit von einem Magnetfeld zu verändern. 1979 konnte W. March dieses Prinzip für seine Glucose-Konzentrationsmessungen nutzen [174]. Die Methodik wurde in späteren Jahren von verschiedenen Autoren weiter verbessert [175, 176]. Alternativ wurde im Jahr 1990 von J. Badoz ein photoelastischer Modulator zur Verwendung in einem Polarimeter vorgeschlagen, der eine Phasenverzögerung entlang der optischen Achse erzeugt [217]. Timothy W. King verwendete in seinem Polarimeteraufbau Pockelszellen, in denen ein doppelbrechender Kristall durch Anlegen eines elektrischen Feldes in seinen Polarisationsseigenschaften gesteuert wird [112, 145].

Als eine Gemeinsamkeit dieser verschiedenen Ansätze ist die sinusförmige Modulation der Polarisationssebene mit der Frequenz ω zu nennen. Mit der maximalen Modulation Θ_m , auch Modulationstiefe genannt, ergibt sich die Drehung $\Theta(t)$ bei der Zeit t zu:

$$\Theta(t) = \Theta_m \cdot \sin(\omega \cdot t) \quad (11)$$

Um zu verstehen, welchen Einfluss die Modulation auf das Signal hat, wird zunächst der in Abbildung 11 dargestellte Fall betrachtet, dass sich keine optisch aktive Probe in der Küvette befindet und die beiden Polarisationsfilter senkrecht zueinander angeordnet sind.

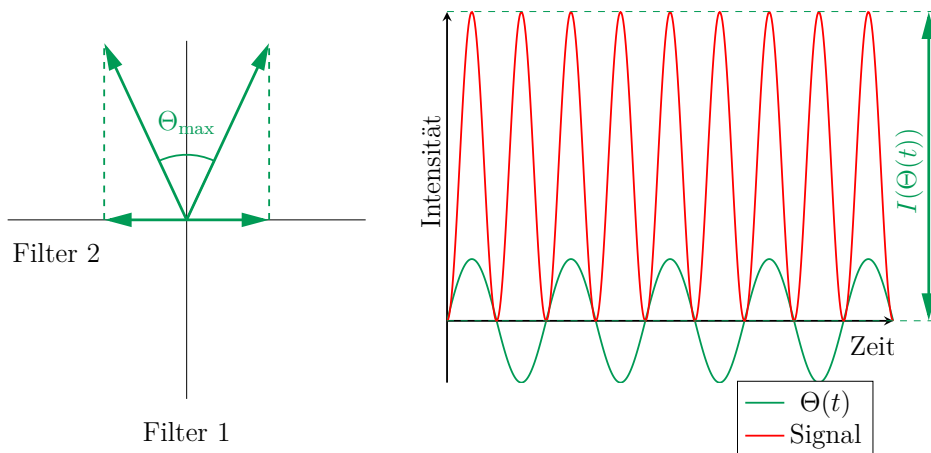


Abbildung 11: Schematische Darstellung der Polarimeter-Intensität: Bei sinusförmiger Modulation durch den Faraday-Rotator mit der Modulationstiefe Θ_m ohne Probe ergibt sich ein symmetrischer Intensitätsverlauf [215, 218].

Links in Abbildung 11 ist die Orientierung der Polarisationssebene zu den beiden Filtern zu sehen, rechts die resultierende Intensität in Abhängigkeit vom Modulationswinkel. Durch

die sinusförmige Modulation der Polarisationssebene kommt es zu einer symmetrischen Auslenkung nach links und rechts. Die resultierende Intensität lässt sich nach dem Gesetz von Malus aus Gleichung 8 berechnen. Es folgt:

$$I \propto \sin^2(\Theta_m \cdot \sin(\omega \cdot t)) \quad (12)$$

Durch Quadrieren des $\sin(\Theta_m)$ -Terms wird das Ergebnis positiv und besitzt die doppelte Frequenz des Modulationsstroms. Eine vollständige Betrachtung der theoretischen Herleitung der Intensität folgt in Abschnitt 2.2.3.

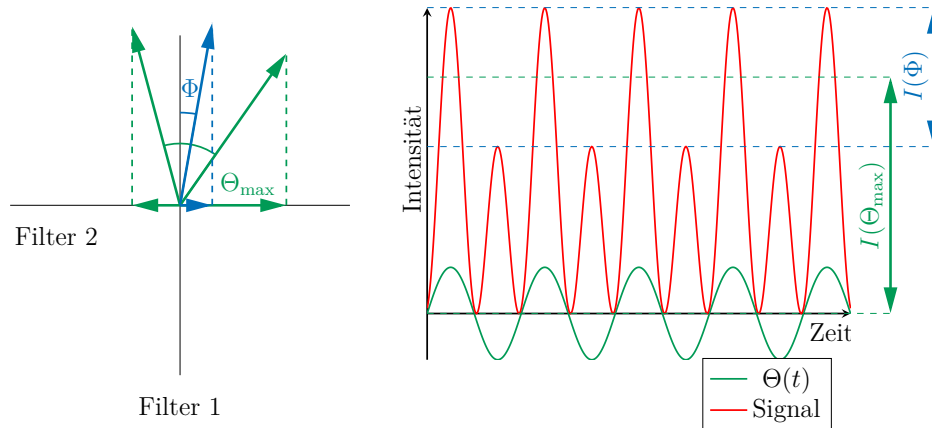


Abbildung 12: Schematische Darstellung der Intensität: Bei sinusförmiger Modulation durch den Faraday Rotator mit der Modulationstiefe Θ_m und optisch aktiver Probe und Drehung um den Winkel Φ ergibt sich ein asymmetrischer Intensitätsverlauf Φ [215, 218].

Dreht nun eine optisch aktive Probe im Strahlengang die Polarisationssebene um den Winkel Φ , so ergeben sich die in Abbildung 12 links dargestellten Verhältnisse. Die nach wie vor vorhandene Modulation mit $\Theta_m \cdot \sin(\omega \cdot t)$ überlagert sich mit der Drehung durch die Probe. Als Resultat oszilliert die Intensität um den Winkel Φ und wird asymmetrisch. Aus diesem Signal lassen sich sowohl die Modulationstiefe als auch die Drehung durch die Probe ablesen. Für die detektierte Intensität gilt anschließend:

$$I \propto \sin^2(\Theta_m \cdot \sin(\omega \cdot t) + \Phi) \quad (13)$$

Eine detaillierte Herleitung der Intensität sowie der sich daraus ergebenden Frequenzanteile folgt in Abschnitt 2.2.3.

2.2.3 Herleitung der zeitlich modulierten Intensität

Jones-Formalismus

Eine häufig verwendete Methode zur Beschreibung der Einflüsse auf eine elektromagnetische Welle beim Durchlaufen verschiedener Bauelemente wurde 1941 von R. Clark Jones eingeführt [219]. Er stellte dabei für jedes Bauelement wie zum Beispiel Polarisationsfilter jeweils eine eigene Matrix auf.

Im Allgemeinen werden diese Matrizen auch Jones-Matrizen genannt, beziehungsweise die Methode als Jones-Formalismus bezeichnet. Hiermit lässt sich die Auswirkung von mehreren räumlich hintereinander angeordneten optischen Bauelementen auf einen durchlaufenden Lichtstrahl durch Matrix-Multiplikation berechnen. Dieser Formalismus bietet

sich daher auch zur Beschreibung eines Polarimeters mit zwei Polarisationsfiltern, einer optisch aktiven Probe sowie einem Modulator an [7]. Die Beschreibung der Feldamplitude erfolgt im zweidimensionalen Raum mit den Dimensionen x und y . Als Grundlage dient die von der Lichtquelle emittierte Feldamplitude E_0 mit den Teilkomponenten $E_{0,x}$ und $E_{0,y}$.

$$E_0 = \begin{bmatrix} E_{0,x} \\ E_{0,y} \end{bmatrix} \quad (14)$$

In der Literatur wurde hier ein vereinfachter Fall betrachtet, bei dem die Eingangsamplitude auf einen Wert von 1 normiert ist [7, 46, 147, 148, 150, 152, 183]. Durch solch eine Vereinfachung würde jedoch nicht deutlich werden, wie sich die Grundintensität auf die jeweiligen Teile der folgenden Gleichungen auswirken würden, wie in diesem und Abschnitt 4.1 gezeigt. Teile der folgenden Herleitung sowie eine Methode zur Verbesserung der Robustheit des Aufbaus wurden im *Biomedical Optics Express*-Journal veröffentlicht [1].

Der Einfluss des horizontalen Polarisationsfilters P_1 und des vertikalen Filters P_2 sowie der Drehung Φ durch die optisch aktive Probe (Drehung im Uhrzeigersinn) und des Faraday-Rotators auf die emittierte elektrische Feldamplitude kann durch die Anwendung von Jones Vektoren ausgedrückt werden [7]. Mit der maximalen Modulationstiefe Θ_m des Faraday Rotators hat der Winkel α zur Zeit t den Wert $\alpha(t) = \Theta_m \cdot \sin(\omega \cdot t)$. Mit diesem Ausdruck lässt sich das Ergebnis der Transmissionsmatrix T zusammenfassen als:

$$T = \underbrace{\begin{bmatrix} 1 & 0 \\ 0 & 0 \end{bmatrix}}_{P_1} \cdot \underbrace{\begin{bmatrix} \cos(\Phi) & -\sin(\Phi) \\ \sin(\Phi) & \cos(\Phi) \end{bmatrix}}_{\text{Probe}} \cdot \underbrace{\begin{bmatrix} \cos(\Theta_m \cdot \sin(\omega \cdot t)) & -\sin(\Theta_m \cdot \sin(\omega \cdot t)) \\ \sin(\Theta_m \cdot \sin(\omega \cdot t)) & \cos(\Theta_m \cdot \sin(\omega \cdot t)) \end{bmatrix}}_{\text{Faraday-Rotator}} \cdot \underbrace{\begin{bmatrix} 0 & 0 \\ 0 & 1 \end{bmatrix}}_{P_2} \quad (15)$$

Ausmultipliziert ergibt sich die Matrix:

$$T = \begin{bmatrix} 0 & -\sin(\Theta_m \cdot \sin(\omega \cdot t) + \Phi) \\ 0 & 0 \end{bmatrix} \quad (16)$$

Im Hinblick auf die emittierte elektrische Feldamplitude E_0 kann die transmittierte elektrische Feldamplitude E nach dem zweiten Polarisationsfilter allgemein ausgedrückt werden als:

$$E = T \cdot E_0 = \begin{bmatrix} 0 & -\sin(\Theta_m \cdot \sin(\omega \cdot t) + \Phi) \\ 0 & 0 \end{bmatrix} \cdot \begin{bmatrix} E_{0,x} \\ E_{0,y} \end{bmatrix} \quad (17)$$

Somit fällt die x -Komponente der Intensität in Gleichung 17 weg und E , E_0 und T lassen sich als Skalare ohne Richtungskomponente darstellen. Es folgt:

$$E = -[\sin(\Theta_m \cdot \sin(\omega \cdot t) + \Phi)] \cdot E_0 \quad (18)$$

Durch die geringe Drehung physiologischer Proben von wenigen Milligrad [147] und Modulationstiefen von etwa 1° vereinfacht sich die Näherung $\sin(x) \propto x$ Gleichung 18 zu [7]:

$$E = -[\Theta_m \cdot \sin(\omega \cdot t) + \Phi] \cdot E_0 \quad (19)$$

Wird die Gleichung nun durch Einführung der Proben Transmission T_P allgemeiner betrachtet und wegen $I \propto E^2$ umgeformt, kann die detektierte Intensität I ausgedrückt

werden als:

$$I_t \propto E^2 = \left[\underbrace{\Theta_m^2 \cdot \sin^2(\omega \cdot t) + 2 \cdot \Phi \cdot \Theta_m \cdot \sin(\omega \cdot t) + \Phi^2}_{\frac{\Theta_m^2}{2} [2 \sin^2(\omega \cdot t)]} \right] \cdot E_0^2 \cdot T_P \quad (20)$$

Mit $2 \sin^2(x) = [1 - \cos(2x)]$ kann Gleichung 20 dann in die finale Gleichung 21 überführt werden, die die erfasste Intensität I_t zu einer bestimmten Zeit t in Abhängigkeit von der Drehung durch die Probe Φ und der maximalen Faraday-Modulationstiefe $\pm \Theta_m$ beschreibt [49, 147, 150]:

$$I_t \propto E^2 = \left[\underbrace{\left(\frac{\Theta_m^2}{2} + \Phi^2 \right)}_{DC} + \underbrace{2 \cdot \Phi \cdot \Theta_m \cdot \sin(\omega \cdot t)}_{\omega} - \underbrace{\frac{\Theta_m^2}{2} \cdot \cos(2 \cdot \omega \cdot t)}_{2\omega} \right] \cdot E_0^2 \cdot T_P \quad (21)$$

Die detektierte Gesamtlichtintensität I_t setzt sich aus drei Frequenzanteilen zusammen, die jeweils proportional zur Proben Transmission T_P beziehungsweise zur quadrierten emittierten elektrischen Feldamplitude E_0 sind. Diese wiederum werden durch das Emissionsverhalten der Lichtquelle, die Detektorsensitivität und die Probenabsorption beziehungsweise -streuung beeinflusst. Der erste Summand der Summe ist konstant in der Zeit, der zweite oszilliert mit der Faraday Modulationsfrequenz ω während der dritte die doppelte Frequenz 2ω aufweist. Die Amplituden der drei Frequenzanteile können extrahiert und ausgedrückt werden als:

- $I_t(DC) \propto \left(\frac{\Theta_m^2}{2} + \Phi^2 \right) \cdot E_0^2 \cdot T_P$
- $I_t(\omega) \propto 2 \cdot \Phi \cdot \Theta_m \cdot E_0^2 \cdot T_P$
- $I_t(2\omega) \propto \frac{\Theta_m^2}{2} \cdot E_0^2 \cdot T_P$

Im Gegensatz zu $I_t(\omega)$ wird $I_t(2\omega)$ nicht durch die Probendrehung Φ beeinflusst [150, 220]. Da $I_t(DC)$ quadratisch vom Probendrehwinkel abhängt und vom Offset $\frac{\Theta_m^2}{2}$ überlagert ist, ist dieser für eine Konzentrationsbestimmung schlecht geeignet. Weil alle Frequenzanteile von der Modulationstiefe Θ_m abhängen, bedeutet ein maximaler Wert auch ein maximales Signal. Ist die Modulationstiefe Θ_m jedoch groß im Vergleich zum Probendrehwinkel Φ , so würde der probenunabhängige $I_t(2\omega)$ -Frequenzanteil aufgrund seiner quadratischen Abhängigkeit vom Modulationswinkel Θ_m die detektierte Intensität dominieren und der probenabhängige $I_t(\omega)$ Anteil kaum messbar sein.

Müller Matrizen

Im Jahr 1943 wurde von Hans Müller eine weitere Möglichkeit zur Berechnung von Auswirkungen auf das Polarimetersignal vorgestellt [221, 222]. Bei den nach ihm benannten Matrizen handelt es sich um eine Abstraktion des Jones-Formalismus, der sich auf einen allgemeineren Fall bezieht. Die 2x2 Matrizen des Jones-Formalismus werden hierbei auf eine 4x4 Matrix erweitert [7, 221]. Besonders geeignet ist dieser Formalismus, um Streueffekte zu berücksichtigen oder die Intensität unter bestimmten Winkeln zu beschreiben [7, 223, 224].

In der Literatur wird dieser Formalismus unter anderem bei der Berechnung von rück-

gestreuten [161, 223] oder schräg unter einem bestimmten Winkel gemessenen Polarimetersignalen [159, 162, 163] verwendet. Auch für eine Beschreibung der Doppelbrechung am Augapfel wurde diese Methodik bereits eingesetzt [7]. Ein Nachteil ist jedoch, dass sich die Berechnung durch die 4x4 Matrix im Vergleich zu 2x2 Jones Matrizen erheblich komplizierter gestaltet. Daher wird für Faraday-modulierte Polarimeter ohne Messung der Rückstreuung üblicherweise auf die Beschreibung durch den Jones-Formalismus zurückgegriffen [7].

2.3 Konzentrationsbestimmung

Mit der stetig zunehmenden Menge zu analysierender Daten ist auch der Bedarf an geeigneten Auswertungsalgorithmen stark gestiegen. Dank der ebenfalls deutlich verbesserten Rechnerleistung haben sich insbesondere im Bereich der Spektroskopie statistische Verfahren wie die multivariate Datenanalyse durchgesetzt. Mit ihrer Hilfe gelingt es, große Datenvolumina zu reduzieren, Messinformationen von Störeinflüssen zu trennen und Konzentrationswerte anhand von spektralen Informationen zu bestimmen [225]. Einen maßgeblichen Einfluss auf die Bestimmbarkeit hat dabei die Datenvorbehandlung.

2.3.1 Multivariate Datenanalyse

Der Begriff der multivariaten Datenanalyse umfasst eine Vielzahl von Verfahren. "Multivariat" bedeutet, dass die Abhängigkeit von mehreren Variablen gleichzeitig untersucht wird. Das Ziel in der Spektroskopie ist es, anhand eines Spektrums, welches von vielen Größen beeinflusst wird, die Konzentration des gesuchten Analyten zu bestimmen. Die grundsätzliche Vorgehensweise ist schematisch in Abbildung 13 dargestellt.

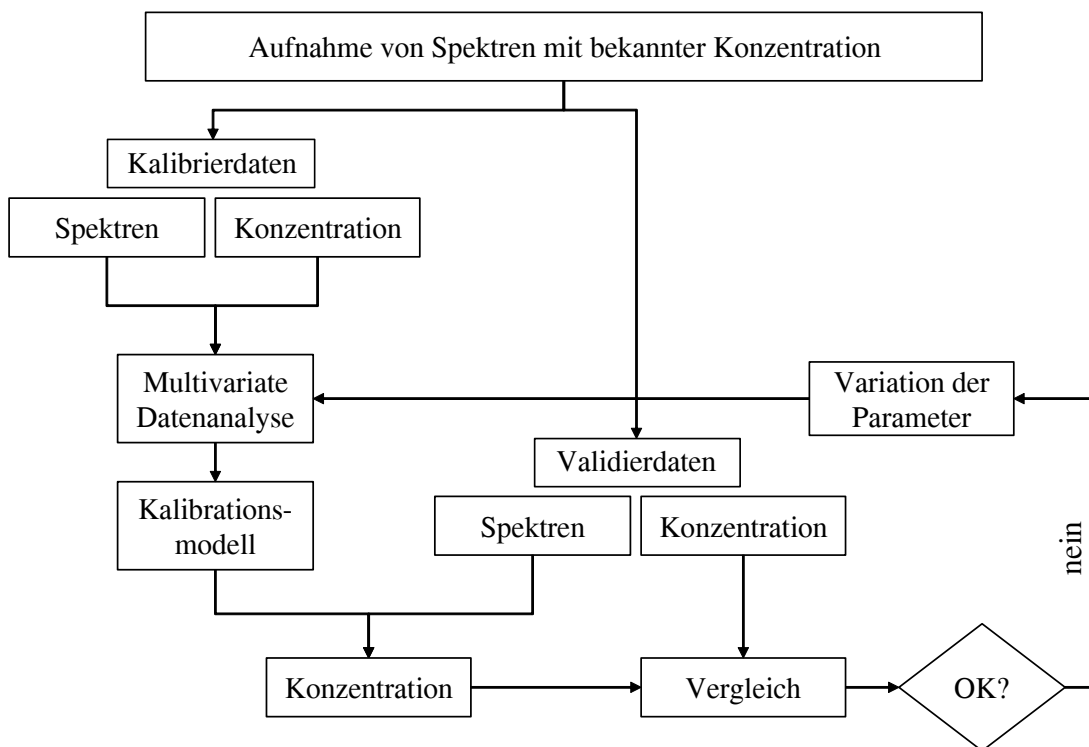


Abbildung 13: Darstellung der Konzentrationsbestimmung: Aus den Kalibrierdaten wird ein Regressionsmodell erstellt, das mit den Validierdaten überprüft wird.

Zunächst muss der Zusammenhang zwischen spektraler Informationen und zu bestimmender Konzentration ermittelt werden. Dieser Vorgang erfolgt durch die multivariate Datenanalyse, die im Laufe dieses Abschnitts vorgestellt wird. Dazu wird ein Teil des aufgenommenen Datensatzes in Kalibrier- und der Rest in Validierspektren aufgeteilt [97]. Die Konzentrationswerte der jeweils zugehörigen Spektren werden dabei mit einem Referenzgerät bestimmt. Bei der Konzentration handelt es sich um eine unabhängige x-Variable, während die Spektren als y-Variable bezeichnet werden und von x, also der Konzentration, abhängig sind [225]. Zwischen den x-Werten (Konzentration) und den y-Werten (Spektren) werden dann Korrelationen gesucht, die in einem Kalibrationsmodell zusammengefasst werden. Dieses Kalibrationsmodell ist folglich die Übersetzung von Konzentration in Spektren oder umgekehrt. Anhand dieses Zusammenhangs kann schließlich aus den Validierspektren auf die jeweilige Konzentration geschlossen werden. Die vorhergesagten Konzentrationswerte werden dann mit den Werten aus dem Referenzgerät verglichen [40, 41]. Bei zu großen Abweichungen kann gegebenenfalls ein neues Kalibrationsmodell mit anderen Einstellungen erstellt werden [26]. Wie ein solches Modell berechnet wird, welche Verfahren am häufigsten verwendet werden und worauf zu achten ist, wird im Folgenden erklärt.

Üblicherweise fallen in der Spektroskopie aufgrund der spektralen Auflösung große Datenmengen an [134]. Die aufgenommenen Spektren sind dabei oft verrauscht [143], mit den spektralen Informationen anderer Probeninhaltsstoffe überlagert [22, 143] oder durch Drifteffekte verzerrt [139]. Die multivariate Datenanalyse wird eingesetzt, um Messinformationen von Störeinflüssen zu trennen [226]. Die Auswirkungen der jeweiligen Störeinflüsse müssen hierzu nicht bekannt sein.

Das bekannteste dieser Verfahren ist die *Partial Least Squares Regression (PLSR)*, also die Regression der kleinsten Quadrate. Die PLSR wurde zuerst 1974 von Herman Wold entwickelt, um ökonomische Daten auszuwerten [225]. Von ihm folgte später eine Erweiterung auf nichtlineare Anwendungen, die sogenannte *Nonlinear Iterative Partial Least Squares Regression (NIPALSR)*. Mittlerweile hat sich die PLSR-Regression zu einer Standardanalyse-Methode entwickelt, die bereits sehr genau untersucht und optimiert wurde [40, 41, 44, 45, 84, 92, 95, 97, 99–104].

Grundbestandteil der Partial Least Squares (PLS)-Regression ist zunächst die Hauptkomponentenanalyse, engl. *Principal Component Analysis (PCA)*. Ihr Ziel ist die Datenreduktion und die Transformation von Informationen zu neuen latenten Variablen, auch Hauptkomponenten oder Faktoren genannt. Diese beschreiben das System genauso gut, führen jedoch zu einer Reduzierung der Dimensionalität [225]. Eine schematische Darstellung dieses Vorgangs findet sich in Abbildung 14.

Die Rohdatenmatrix X enthält M Wellenlängen und N verschiedene Proben. Sie wird durch die Hauptkomponentenanalyse in die Hauptkomponenten- oder Faktorenmatrix P^T zerlegt, die die Korrelation der Hauptkomponenten und der Konzentrationen angibt. Zusätzlich wird noch die Gewichts- oder sogenannte Scorematrix T berechnet, die eine Gewichtung der Hauptkomponentenmatrix P^T vornimmt. Die Faktoren sind dabei nach absteigender Reihenfolge der Varianz der y-Werte in Abhängigkeit der x-Werte geordnet [26]. Die ersten Komponenten besitzen dabei die größte Varianz und erklären die stärksten Auswirkungen der Konzentration auf das Signal. Alle Komponenten sind unabhängig voneinander, das heißt sie stehen im Faktorenraum orthogonal zueinander. Übrig bleibt der Messfehler in der Residuenmatrix E . Es werden genau so viele Faktoren berechnet, wie Konzentrationen zum Kalibrieren vorhanden sind. Die Rohdaten können also

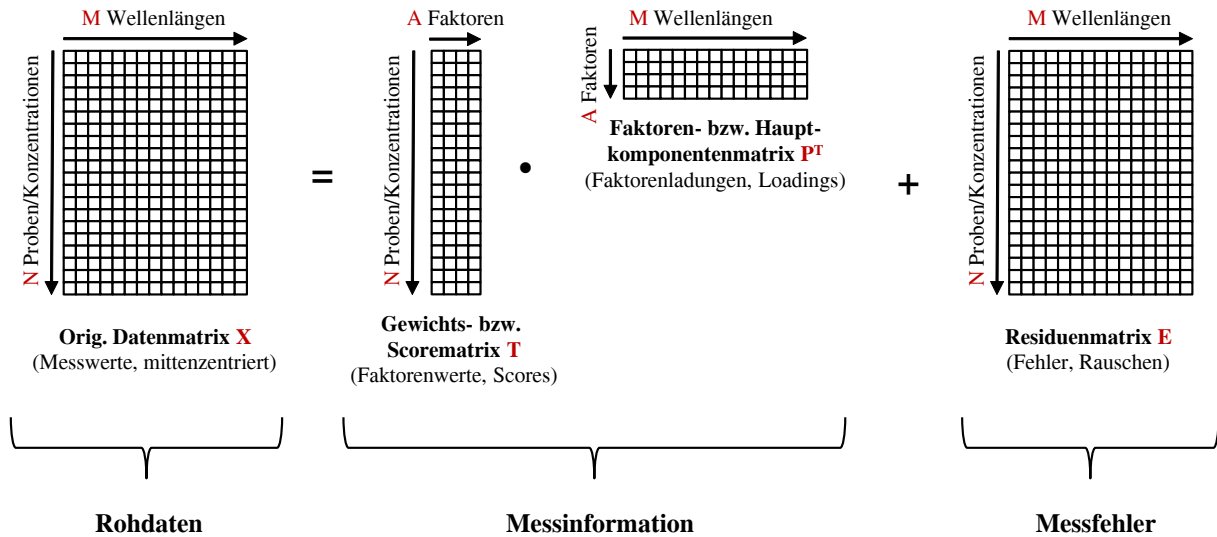


Abbildung 14: Faktorenerlegung der Hauptkomponentenanalyse [225]: Die Messinformationen werden aus den Rohdaten extrahiert.

folgendermaßen rekonstruiert werden

$$\mathbf{X} = \mathbf{T} \cdot \mathbf{P}^T + \mathbf{E} \quad (22)$$

Bei der Transformation der Originalmatrix in Gewichtsmatrix und Hauptkomponentenmatrix kann entschieden werden, wie viele der N möglichen Komponenten für die Rekonstruktion verwendet werden. Je mehr Komponenten berücksichtigt werden, desto mehr Varianz wird erklärt, jedoch nimmt auch der Anteil des Messfehlers zu. Idealerweise wird ein Kompromiss gefunden, bei dem ein Großteil der durch die Konzentration verursachten Variation erklärt wird, Hauptkomponenten mit hohem Rauschanteil aber nicht berücksichtigt werden. Es existiert in der Regel also ein Optimum bezüglich der Anzahl der Komponenten [26].

Zur Konzentrationsvorhersage wird das so erstellte Kalibrationsmodell auf die Spektren des Validierdatensatzes angewendet, die Konzentration bestimmt und mit dem Konzentrationsreferenzwert verglichen. Als ein Maß für die Genauigkeit einer Vorhersage wird oft der Standardvorhersagefehler, engl. Standard Error of Prediction (SEP) verwendet [26,40]. Dieser errechnet sich bei einer Anzahl von i Messwerten aus der aufsummierten quadratischen Abweichung der Vorhersagekonzentrationen y_i von den Referenzwerten $y_{\text{ref},i}$ durch Gleichung 23 folgendermaßen [227, 228].

$$\text{SEP} = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (y_i - y_{\text{ref},i})^2} \quad (23)$$

2.3.2 Praktische Anwendung

In der Praxis wird anstatt der Principal Component Analysis (PCA) meist die Partial Least Squares Regression (PLSR) verwendet, die im Gegensatz zur PCA bereits die Struktur der y -Daten für die Findung der x -Daten nutzt [225]. Dies äußert sich dadurch, dass die PLSR oft einen geringeren Vorhersagefehler als die PCA aufweist [229, 230] und weniger Komponenten benötigt werden [225, 229]. Daher ist die PLSR in sehr vielen spektroskopischen Analysen ein Standardanalyseverfahren [40, 41, 44, 45, 84, 92, 95, 97, 99–104]. Zur

Optimierung des PLS-Regressionsmodells wird einerseits die Anzahl der Komponenten variiert, um den besten Kompromiss zwischen Variation der latenten Variablen und dem Rauschen zu finden [26]. Andererseits hat der Wellenlängenbereich in der Spektroskopie zusätzlich einen großen Einfluss auf die Vorhersagegenauigkeit [229]. Neben der Auswahl des Wellenlängenbereichs und der Anzahl der Komponenten kann die Vorbehandlung der Daten eine Verbesserung der Genauigkeit bewirken [230, 231].

Eine Voraussetzung für die PLSR beziehungsweise die Hauptkomponentenanalyse ist ein linearer Zusammenhang zwischen x- und y-Daten. Ist dies nicht gegeben, kann die NIPALSR verwendet werden. Diese Art der Regression wurde als Erweiterung der PLSR entwickelt, um nichtlineare Zusammenhänge zu berücksichtigen [225]. Eine weitere Methode ist die Verwendung der PLSR mit zuvor linearisierten Daten. Bei exponentiellen Zusammenhängen wie in der Absorptionsspektroskopie bei großen Absorptionen üblich, kann durch Logarithmieren ein linearer Zusammenhang hergestellt werden [86]. Oft handelt es sich in der Absorptionsspektroskopie jedoch um kleine Absorptionen, bei denen das Lambert-Beer-Gesetz aus Gleichung 1 näherungsweise linear ist. Für kleine optische Drehungen gilt bei polarimetrischen Messungen ebenfalls näherungsweise ein linearer Zusammenhang, wie in Abschnitt 2.2.1 gezeigt.

Aus der Korrelation zwischen den Spektren und der Referenzkonzentrationen kann deren direkter Zusammenhang für das entsprechende Regressionsmodell bestimmt werden [232]. Dieser wird *Net Analyte Signal (NAS)* genannt und ist die senkrechte Komponente zu allen Störeinflüssen [97], beziehungsweise entspricht mit Ausnahme eines Skalierungsfaktors dem idealen, rauschfreien PLS-Regressions-Vektor [233].

In manchen Anwendungen kann die Kombination von verschiedenen Messgrößen einen Genauigkeitsvorteil bringen [230]. So wurden zum Beispiel Informationen über die Rotationsdispersion, Raman-Spektren und Absorptionsspektren als Kombination in einem sogenannten Multiblock für eine Konzentrationsvorhersage von Glucose in Blutplasma zusammengefasst [22, 23]. Die Zusätzliche Verwendung von Rotationsdispersionen brachte dort jedoch keinen Vorteil [23].

Ein Problem bei der Konzentrationsvorhersage können Streueinflüsse auf die Absorptionsspektren sein [110, 138]. Als Methode zur Datenvorbehandlung kann die Korrektur von Mehrfachstreuung, engl. *multiple scattering correction (MSC)* genannt werden [121, 136, 234]. In verschiedenen Anwendungen wurde jedoch gezeigt, dass diese Art der Datenvorbehandlung kaum eine Verbesserung bewirkt [102, 121].

3 Material und Methoden

Mit dem in diesem Kapitel vorgestellten Messaufbau sollen die einzelnen Einflüsse auf das Polarimetersignal untersucht und Möglichkeiten zur Reduzierung ihrer störenden Einwirkung auf die Glucose-Bestimmung gefunden werden. Neben solchen Einflüssen, die die absolute Signalintensität verändern, gehören hierzu auch mechanische Drifteffekte und spektrale Überlagerungen der Rotationsdispersionen durch weitere optisch aktive Substanzen im Analyten. Mit einem Breitbandpolarimeter werden die Rotationsdispersionen extrahiert und durch die spektrale Information kann zwischen Glucose und anderen Störstoffen unterschieden werden. Beim Aufbau und der Dimensionierung gilt es unter anderem die folgenden Anforderungen zu erfüllen:

- Ausgleich von Intensitätsschwankungen der Lichtquelle und Absorptionseffekten
- Reduktion der Auswirkung von Streueffekten auf das Polarimetersignal
- Verbesserung der Signalqualität durch optische Modulation
- Möglichkeit der präzisen Probenmischung
- Stabilisierung von pH-Wert und Temperatur der Proben
- Automatisierung der Messprozedur für hohe Reproduzierbarkeit

Eine schematische Darstellung des Messaufbaus zur Erfüllung dieser Aufgaben befindet sich in Abbildung 15.

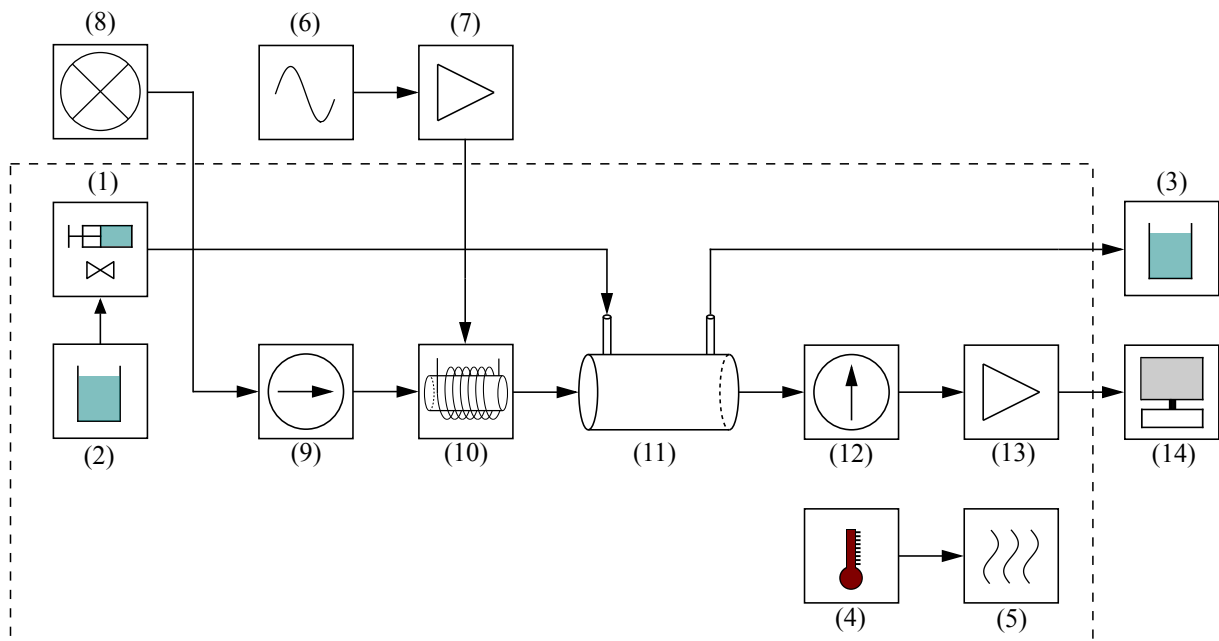


Abbildung 15: Schematische Darstellung des Messaufbaus: (1) Spritzenpumpensystem, (2) Stammlösungen, (3) Abfallbehälter, (4) Temperatursensor, (5) Temperaturregler, (6) Funktionsgenerator, (7) Stromtreiber, (8): Lichtquelle, (9) Polarisationsfilter, (10) Optischer Modulator, (11) Durchflussküvette, (12) Polarisationsfilter, (13) Spektrometer, (14) Datenauswertung, geregelte Umgebungstemperatur innerhalb der gestrichelten Linie.

Der Messaufbau kann in verschiedene Bestandteile unterteilt werden. Einerseits ist hier die Einheit zur Probenmischung mittels Spritzenpumpensystems (1-3) zu nennen, welche in Abschnitt 3.1.7 näher erläutert wird. Sie dient dazu, die gewünschten Gemische aus den jeweiligen Stammlösungen bereitzustellen. Zur Stabilisierung der Temperatur wurde die in Abschnitt 3.1.8 beschriebene Temperaturregelung integriert (4-5), deren Einflussbereich durch die gestrichelte Linie dargestellt wird. Schließlich bildet das eigentliche Polarimeter (8-14) den zentralen Bestandteil des Messaufbaus. Eine detaillierte Beschreibung erfolgt in den Abschnitten 3.1.1 bis 3.1.7. Welche Schritte zur Durchführung einer Messung nötig sind und was dabei zu beachten ist, wird in Abschnitt 3.3 beschrieben. Sämtliche Komponenten wurden zur Schwingungsdämpfung auf einem optischen Tisch (VIS IsoStation, Newport Spectra-Physics GmbH, Deutschland) angeordnet.

3.1 Messaufbau

Aufgrund der ähnlichen Rotationsdispersionen von Glucose und Bluteiweißen (siehe Abschnitte 2.1.1 und 2.1.2) ist deren möglichst präzise Messung Bedingung für eine spektrale Unterscheidung und somit zuverlässige Konzentrationsbestimmung. Dazu muss der Messaufbau nicht nur über eine zuverlässige optische Modulation verfügen und unempfindlich gegenüber Lichtintensitätsschwankungen und Streu- oder Absorptionseffekten sein, sondern auch einen möglichst breiten Wellenlängenbereich abdecken. Es gilt daher, die Messkomponenten des Aufbaus optimal aufeinander abzustimmen. Warum die Wahl auf welche Bauteile fiel und worauf bei deren Auswahl zu achten ist, wird in diesem Kapitel in den jeweiligen Unterabschnitten erläutert. Eine Übersicht über die Polarimeterbestandteile sowie eine dreidimensionale Darstellung des Breitbandpolarimeters ist in Abbildung 16 zu finden.

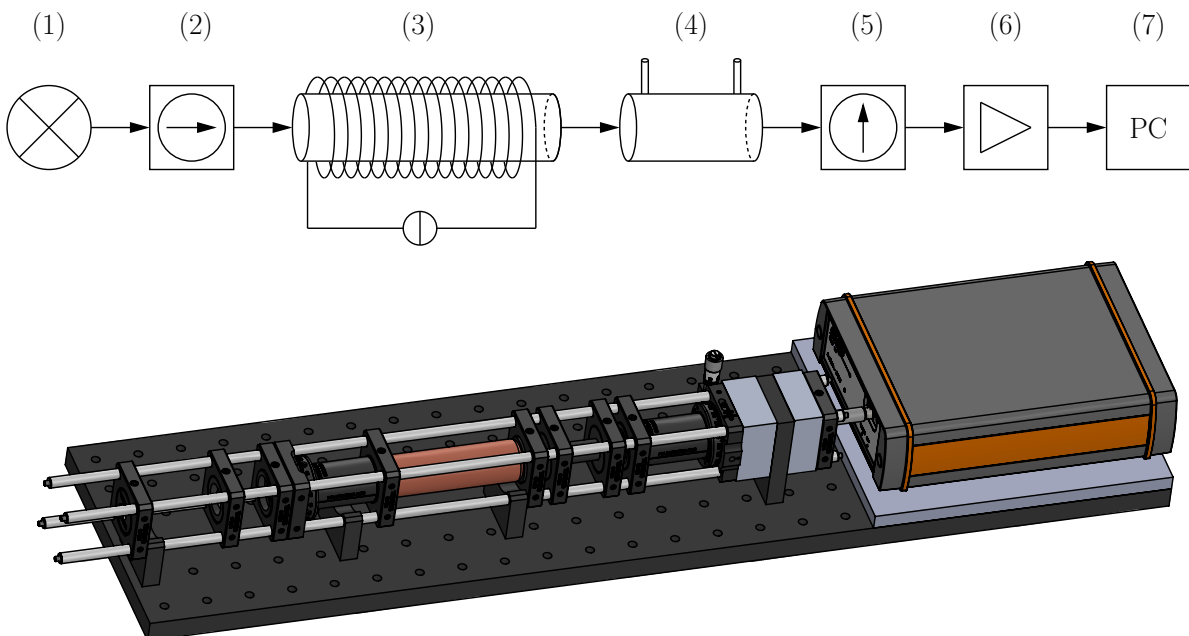


Abbildung 16: Schematische Darstellung des Messaufbaus: (1) Lichtquelle, (2) Erstes Polarisationsfilter, (3) optischer Modulator, (4) Durchflussküvette, (5) Zweites Polarisationsfilter, (6) Spektrometer, (7) Datenauswertung [235, 236]

Zur Realisierung des Aufbaus bietet sich aufgrund seiner mechanischen Stabilität sowie

des geringen Platzbedarfs das 30 mm Käfigsystem (Thorlabs GmbH, Deutschland) an, bei dem die einzelnen Bauelemente modular hintereinander aufgebaut werden können. Eine fasergekoppelte Lichtquelle (1) emittiert einen möglichst breitbandigen und gleichmäßig ausgeleuchteten Wellenlängenbereich. Dieses Licht wird von einem ersten Polarisationsfilter (2) linear polarisiert und trifft dann auf den optischen Modulator (3). Anschließend wird die Küvette (4) durchstrahlt und das Licht vom zweiten, drehbaren Polarisationsfilter (5) erneut linear polarisiert. Schließlich erfolgt eine Messung der verbleibenden Lichtintensität mit einem Spektrometer (6) an das sich die Datenverarbeitung (7) anschließt.

3.1.1 Lichtquellen

Bei der Auswahl einer geeigneten Lichtquelle steht zunächst der Wellenlängenbereich und die absolute Intensitätsverteilung im Vordergrund. Wie in Abbildung 8 in Abschnitt 2.1.2 gezeigt, bietet die Rotationsdispersion den höchsten Informationsgehalt im sichtbaren (VIS)- und ultravioletten (UV)-Bereich. Außerdem wird eine hohe Intensität benötigt, da durch die gekreuzte Anordnung der Polarisationsfilter ein Großteil der Intensität verloren geht, siehe Abschnitt 2.2. Ein weiterer wichtiger Parameter ist die Homogenität des Spektrums. Intensitätsspitzen, wie sie typischerweise bei Gasentladungslampen auftreten, können zur Übersteuerung einzelner Detektorpixel des Spektrometers führen und so den Dynamikbereich limitieren.

Einen Überblick über in polarimetrischen Anwendungen bereits verwendete Wellenlängen erhält man nach Durchsicht der zu diesem Thema bereits erfolgten Veröffentlichungen, die üblicherweise auf der Verwendung einzelner oder miteinander kombinierter Laserlichtquellen basieren. In diesem Zusammenhang wurden folgende Wellenlängen genannt:

- 532 nm [7, 46, 50, 152, 157]
- 633 nm [112, 145, 146, 149, 155]
- 635 nm [7, 46, 50, 152–154, 157]
- 670 nm [147, 148]

Vereinzelt finden sich auch Werte wie 543 nm [34] oder 780 nm [156]. Eine Zusammenfassung ist in Tabelle 14 im Anhang zu finden. Alle diese Wellenlängen sind jedoch diskret und die Kombination von maximal zwei Lasern [46, 50, 112, 152, 154, 157] lässt eine sinnvolle Verwendung multivariater Regression noch nicht zu, obwohl diese zur Verwendung in Polarimetern zur Unterscheidung verschiedener optisch aktiver Substanzen vorgeschlagen wurde [22, 23]. In der Vergangenheit wurde jedoch auch gezeigt, dass es prinzipiell möglich ist, mit einer Xenon-Lampe Rotationsdispersion zu messen [150]. Im Folgenden werden daher die verschiedenen Arten von Lichtquellen für das Breitbandpolarimeter diskutiert.

Halogenlampen

In der Absorptionsspektroskopie haben sich Halogenlampen bereits bewährt, weil sie ein kontinuierliches und breites Spektrum emittieren. Da es sich bei Halogenlampen um thermische Strahler handelt, folgt ihre spektrale Emission dem Planckschen Strahlungsgesetz. Bei üblichen Temperaturen von 3000 K erreicht das Emissionsspektrum sein Maximum bei etwa 1000 nm [237, 238]. Besonders zum UV-Bereich hin ist kaum Intensität vorhanden. Daher eignen sich solche Lichtquellen nicht für dieses Breitbandpolarimeter.

Xenonlampen

Ein mehr in den sichtbaren und in den UV-Bereich reichendes Emissionsspektrum kann mit Xenonlampen erreicht werden, mit denen bereits erfolgreich qualitative Untersuchungen der Rotationsdispersion durchgeführt wurden [150]. So decken moderne Xenonlampen den Wellenlängenbereich von etwa 185 – 2000 nm ab [239]. Ein Nachteil dieser Lampen ist jedoch, dass es sich um Gasentladungslampen handelt, deren Spektrum sich aus mehreren diskreten Wellenlängen zusammensetzt. Zwar kann durch Druckverbreiterung ein quasi kontinuierliches Spektrum erzeugt werden, jedoch bleiben Anteile dieser Emissionslinien bestehen. Selbst bei solchen Lichtquellen beträgt das Emissionsmaximum der einzelnen Spektrallinien teils mehr als das Zehnfache der mittleren, spektral verteilten Intensität [239], was wiederum den Dynamikbereich einschränkt.

Weißlicht-LEDs

In den letzten Jahren haben Leuchtdioden (LEDs) massiv an Bedeutung gewonnen. Besonders die Intensität, der abgedeckte Spektralbereich und der Wirkungsgrad konnten bei gleichzeitig deutlich reduzierten Herstellungskosten erheblich gesteigert werden. Durch Kombination verschiedener Materialien wurden weitgehend kontinuierliche Emissionsspektren erreicht, die im Vergleich zu den Halogenlampen weiter im Sichtbaren liegen, jedoch nicht ganz so weit in den nahen UV-Bereich wie die Xenonlampen reichen. Als vorteilhaft erweist sich bei LEDs die relativ einfache Steuerbarkeit der Lichtintensität und die kleine realisierbare Chipfläche, was sich positiv auf die Kollimation auswirkt.

Eine LED, die diese Anforderungen erfüllt, ist die XM-L (Cree Inc., USA) [240]. Diese ist in drei verschiedenen Versionen erhältlich, wobei die Kaltweiß-Variante die höchste Intensität im nahen UV-Bereich bringt. Um die LED mit einem möglichst stabilen Strom zu betreiben, wurde eine entsprechende Stromtreiberschaltung entwickelt, siehe Abschnitt 3.1.6. Diese Schaltung ermöglicht auch die Verwendung anderer LEDs, sofern diese für spezielle Zwecke benötigt werden.

Laser Driven Lightsource

Mit der EQ-99XFC wurde von der Firma Energetiq Inc. während dieses Projektes eine neue Art von Lichtquelle vorgestellt. Hierbei handelt es sich um eine so genannte Laser Driven Light Source (LDLS). Bei ihr wird mittels eines Lasers ein 100 μm großes Plasma erzeugt, welches Strahlung im Bereich von 170 – 2100 nm emittiert [241]. Ein wesentlicher Unterschied im Vergleich zu Xenonlampen ist das deutlich kontinuierlichere Spektrum. Dies resultiert in einer erheblich verbesserten Ausnutzung des Dynamikbereichs des Spektrometers. Ein weiterer Vorteil wird durch das nur 100 μm große Plasma erreicht, wodurch sich eine sehr gute Einkopplung in einen Lichtwellenleiter realisieren lässt. Neben hoher Lichtintensität kann somit auch eine gute Kollimation erreicht werden, was für polarimetrische Anwendungen wichtig ist.

Aufgrund der genannten Vorteile wurde im Laufe des Projektes die weiße Cree XM-L LED durch die EQ-99XFC LDLS ersetzt.

Vergleich von LED und LDLS

Um einen Eindruck von der spektralen Verteilung der Intensität von LED und LDLS zu erhalten, wurden diese miteinander verglichen. Dabei wurde die LED mit einem Strom von 1 A betrieben, was einen guten Kompromiss zwischen Auslastung und Abwärme darstellt. Die LDLS wurde mit einem Lichtwellenleiter in den optischen Aufbau eingekoppelt. Zur besseren Aussteuerung des Spektrometers wurden beide Messungen mit der jeweils optimalen Integrationszeit aufgenommen. Anschließend fand eine Normierung der gemessenen Counts auf die Integrationszeit statt. Die absoluten und relativen Intensitätswerte sind in Abbildung 17 dargestellt.

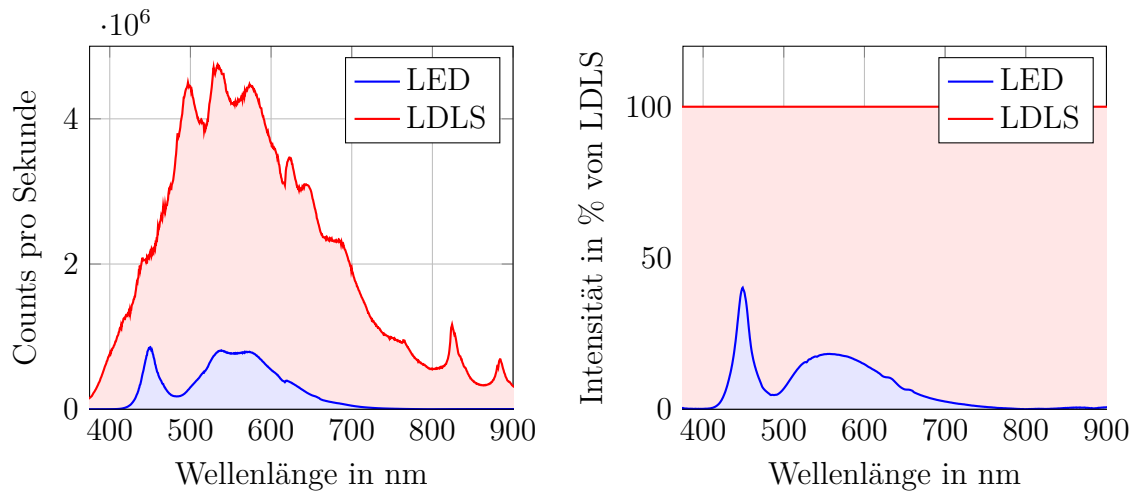


Abbildung 17: Spektraler Vergleich der Intensitäten von Cree XM-L LED und EQ99-XFC Laser Driven Light Source.

Hierbei ist zu erkennen, dass die LDLS über den gesamten Wellenlängenbereich deutlich mehr Intensität als die LED bietet. Die LED emittiert dabei nur im Bereich von etwa 425 – 700 nm messbare Intensität, welche im Mittel nur etwa 20 % der LDLS erreicht. Außerdem kommt es bei der LED um 500 nm zu einem Einbruch der Intensität, welcher der Bauweise geschuldet ist. Eine Stärke der LDLS wird beim Blick unter 425 nm und über 700 nm deutlich. Dort, wo die LED keine messbare Intensität mehr bereitstellt, kann die LDLS immer noch ein deutliches Signal vorweisen.

Bezüglich des UV-Bereichs sei jedoch angemerkt, dass das Spektrometer aus Abschnitt 3.1.5 nicht für den tiefen UV-Bereich optimiert ist, da dies andere Nachteile wie zum Beispiel eine geringere Sensitivität im Sichtbaren mit sich bringen würde. Deshalb konnte unterhalb von etwa 360 nm kaum noch Intensität nachgewiesen werden. Im weiteren Verlauf zeigte sich jedoch, dass die Limitierung der kurzwelligen Intensität an anderer Stelle liegt.

3.1.2 Polarisationsfilter

Zentrale Elemente des Polarimeters sind seine Polarisationsfilter, siehe Abbildung 16. Bei senkrechter Anordnung zueinander lassen sich die Einflüsse von der optischem Modulator und der Probe auf die Polarisationsebene messen, die in Abschnitt 2.2 beschrieben wurden. Ohne optische Modulation und ohne Probe beträgt die transmittierte Lichtintensität dann im Idealfall 0. Dies setzt eine perfekte Auslöschung von senkrecht auftreffender Strahlung voraus, was in der Realität jedoch nicht erreichbar ist. Das Auslöschungsverhältnis gibt bei Polarisationsfiltern das Verhältnis von ausgelöschter zu transmittierter Strahlung an.

Idealerweise ist dieser Wert dabei so groß wie möglich. In anderen Arbeiten wurden zu diesem Zweck Polarisationsfilter mit einem Auslöschungsverhältnis von 100.000 : 1 verwendet [49, 50, 148, 148, 150–155, 157].

Eine weitere Anforderung ergibt sich aus der Verwendung einer breitbandigen Lichtquelle. Die meisten der in der Literatur beschriebenen Messaufbauten verwenden Laser als Lichtquellen, die eine sehr gute Kollimation ermöglichen und bei denen nur sehr geringe Divergenz vorzufinden ist. Da sich sowohl LEDs als auch eine Laser-Driven-Lightsource nicht perfekt kollimieren lassen, ist mit auftretender Divergenz zu rechnen. Die Polarisationsfilter sollten demgegenüber daher möglichst tolerant sein. In der Regel wird diese Toleranz mit dem sogenannten Öffnungswinkel, engl. Field of View (FOV) angegeben, das den maximalen Winkel angibt, unter dem Strahlung einfallen kann und für den die Spezifikationen noch gelten.

Weiterhin wünschenswert ist eine breitbandige Transmission im VIS- und nahen UV-Bereich, um den von der Lichtquelle bereitgestellten Wellenlängenbereich nicht zu sehr einzuschränken. Eine zusammenfassende Gegenüberstellung der gängigsten Polarisationsfiltertypen ist in Tabelle 3 zu finden.

Tabelle 3: Gegenüberstellung ausgewählter Polarisationsfilterarten [87, 155, 195, 238, 242–244]. *: E- und O-Strahl kaum getrennt; **: hygroskopisch.

Modell	Auslöschung	Transmission	Ablenkung	FOV
Drahtgitter	1.000 : 1	UV-IR	nein	
Nicol	10.000 : 1	VIS-NIR	ja	
Wollaston	100.000 : 1	VIS-NIR	ja	
Rochon*	100.000 : 1	VIS-NIR	nein	
Glan-Taylor	100.000 : 1	350 – 2200 nm	nein	8°
Glan-Thompson	100.000 : 1	350 – 2200 nm	nein	26°
BBO**	100.000 : 1	200 – 3500 nm	nein	

Grundsätzlich gibt es verschiedene Arten von Polarisationsfiltern, die nach unterschiedlichen Prinzipien funktionieren und alle individuelle Vor- und Nachteile besitzen. Daher folgt eine detaillierte Diskussion ihrer jeweiligen Eigenschaften für den hier realisierten Messaufbau.

Drahtgitter-Polarisatoren

Zu den einfachsten Polarisationsfiltern zählen die Drahtgitterpolarisatoren. Sie bestehen, wie der Name vermuten lässt, aus einem Drahtgitter und lassen primär Strahlung mit einer parallel zum Gitter ausgerichteten Polarisationsebene transmittieren. Außerdem sind sie für einen sehr breiten Wellenlängenbereich geeignet und daher besonders für den Einsatz im Infraroten interessant [195]. Ein sehr gravierender Nachteil und Ausschlusskriterium ist jedoch das geringe Auslöschungsverhältnis von lediglich etwa 1.000 : 1 [195].

Nicolsches Prisma

Eine große Gruppe, zu der die nachfolgenden Polarisatoren zählen, sind die Doppelbrechungsprismen. Unter Doppelbrechung versteht man die Fähigkeit eines Materials wie zum Beispiel Kalzit, einen einfallenden Lichtstrahl in zwei Teilstrahlen unterschiedlicher Polarisation zu trennen. Eins dieser Doppelbrechungsprismen ist das Nicolsche Prisma, das 1828 von William Nicol erfunden wurde [196]. Es besteht aus einem doppelbrechenden Material mit zwei Hälften deren Winkel 68° , 90° und 22° betragen [242]. Der ordentliche Strahl (O-Strahl), dessen Schwingungsebene senkrecht zur Einfallsebene schwingt [238], wird an der Grenzschicht totalreflektiert und tritt aus [242]. Der außerordentliche Strahl (E-Strahl) schwingt in der Einfallsebene [238] und wird versetzt transmittiert, was sich für die nachfolgende Strahlführung ebenso als Nachteil erweist wie das mit $10.000 : 1$ relativ geringe Auslöschungsverhältnis.

Wollaston-Prisma

Auch das Wollaston-Prisma basiert auf dem Prinzip der Doppelbrechung. Zwei Hälften doppelbrechender Materialien werden dabei aufeinander geklebt und der Lichtstrahl fällt senkrecht auf die erste Grenzschicht. Das Wollaston-Prisma teilt das Licht in zwei orthogonale Strahlen auf, jedoch werden beide gegenüber dem Eingangsstrahl abgelenkt [242]. Zwar ist das Auslöschungsverhältnis besser als beim Nicol-Prisma, doch aufgrund des ohne Ablenkung transmittierten Lichtstrahls kommen auch diese Prismen für den Messaufbau nicht in Frage.

Rochon-Prisma

Eine ähnliche Funktionsweise wie die bereits beschriebenen Doppelbrechungsprismen weist auch das Rochon-Prisma auf. Ein senkrecht einfallender Lichtstrahl wird in einen gerade transmittierten O-Strahl und einen abgelenkten E-Strahl aufgeteilt. Der O-Strahl ist dabei achromatisch, der E-Strahl nicht. Prinzipiell sind beide Strahlen nutzbar [195], jedoch sind E- und O-Strahl räumlich nur gering getrennt, was ein Problem für die Messungen sein kann, da es zu einer Vermischung oder Überlagerung beider Signale kommen kann.

Glan-Taylor-Prisma

Das Glan-Taylor-Prisma besteht aus zwei Prismenhälften aus doppelbrechendem Material. Diese sind jedoch nicht verklebt, sondern durch einen sehr kleinen Luftspalt getrennt [242]. Durch senkrechte Ein- und Austrittsflächen besteht eine maximale räumliche Trennung von E- und O-Strahl [195]. Zudem kommt es zu keinem lateralen Versatz des Strahles wie beim Nicolschen Prisma [195]. Weitere Vorteile sind, dass es durch den Luftspalt zwischen den Prismenhälften im Wellenlängenbereich $350 - 2200$ nm keine nennenswerte Absorption gibt und die Zerstörungsschwelle hoch ist [242]. Zudem ist das Auslöschungsverhältnis mit $100.000 : 1$ ebenfalls hoch. Ein Nachteil ist jedoch der kleine Akzeptanzwinkel von maximal 8° [195], was bei divergentem Licht zu Problemen führen kann.

Glan-Thompson-Prisma

Ein dem Glan-Taylor-Prisma sehr ähnliches Polarisationsfilter ist das Glan-Thompson-Prisma. Es unterscheidet sich dadurch, dass die beiden Prismenhälften mit einem Kanada-Balsam-Kleber verklebt sind [243]. Wie auch beim Glan-Taylor-Prisma wird der E-Strahl gerade ohne lateralen Versatz transmittiert, der O-Strahl abgelenkt [242]. Auch das Auslöschungsverhältnis ist mit $100.000 : 1 - 1.000.000 : 1$ ähnlich hoch. Oberhalb von 350 nm ist die Transmission des Glan-Thompson-Prismas etwas höher als die des Glan-Taylor-

Prismas [195]. Hauptunterschied ist jedoch, dass das FOV mit 26° deutlich über dem des Glan-Taylor-Prismas liegt [195, 243, 245]. Ein Nachteil ist jedoch die etwas größere Bauform.

BBO Polarisationsfilter

Auch die Bariumborat (BBO) Polarisationsfilter bestehen aus zwei doppelbrechenden Prismen, wobei das Material β -Bariumborat Namensgeber ist [87]. Es bietet speziell für den Wellenlängenbereich von 200 – 390 nm eine deutlich höhere Transmission als andere Polarisatoren [155]. Allerdings ist dieses Material hygroskopisch [244] und ist nicht langzeitstabil. Deshalb kommt eine Verwendung in diesem Aufbau nicht in Frage.

Fazit

Der Vergleich der Polarisationsfilterarten liefert ein eindeutiges Ergebnis: Gitterpolarisatoren haben ein zu schlechtes Auslöschungsverhältnis, bei Nicol- und Wollaston-Prismen werden die transmittierten Strahlen schief abgelenkt. BBO-Filter sind nicht langzeitstabil und Glan-Taylor-Prismen haben kein optimales FOV. Die Wahl fällt für diesen Aufbau daher auf Glan-Thompson-Prismen, die auch in vielen anderen Arbeiten zu diesem Thema verwendet wurden [49, 50, 148, 148, 150–155, 157].

Insbesondere die gut dokumentierten GT10H-Filter (Thorlabs GmbH, Deutschland) erscheinen für diese Anwendung gut geeignet [245]. Mit 10 mm wurde die größte mögliche Apertur für maximale Lichtintensität gewählt. Sie sind aus Kalzit gefertigt und bieten im Wellenlängenbereich von 350 – 2300 nm eine Transmission von durchgehend circa 90 %. Ein FOV im VIS-Bereich von über $\pm 10^\circ$ kann als vorteilhaft für die späteren Messungen angesehen werden. Auf eine Antireflex-Beschichtung wurde verzichtet, da diese für einen schmalen Wellenlängenbereich optimiert ist. Bei einer breitbandigen Messung könnte diese Schicht zu nachteiligen Effekten innerhalb des Wellenlängenbereichs führen.

3.1.3 Faraday-Rotator

Zur Erzeugung der in Abschnitt 2.2.3 beschriebenen Polarisationsmodulation bieten sich beispielsweise Photoelastische Modulatoren (PEM), Pockels-Zellen oder Faraday-Rotatoren an. Hierzu sogenannte zählen PEM, Pockels-Zellen sowie Faraday-Rotatoren.

PEM sind piezoelektrische Kristalle, die in Abhängigkeit einer angelegten Spannung eine Phasenverzögerung entlang der Modulationsachse bewirken [217]. Sie wurden in Aufbauten zur Untersuchung von Streueffekten auf ein Polarimetersignal eingesetzt [158, 159, 163, 165, 246]. Eine Phasenverschiebung ist jedoch gerade bei den geplanten Messungen aufgrund des breiten Wellenlängenbereichs nicht wünschenswert.

Eine weitere Möglichkeit zur Modulation ist durch Pockels-Zellen gegeben. Hierbei handelt es sich um ein doppelbrechendes Material, bei dem ein elektrisches Feld von außen angelegt wird. Pockelszellen können zur Modulation von Phase und Polarisation eingesetzt werden [87]. Durch die Erzeugung von elektrischen Feldern ohne große Ströme sind hohe Modulationsfrequenzen von zum Beispiel 12,5 kHz [112, 145] möglich. Die Auflösung einer solch hohen Modulationsfrequenz wäre jedoch aufgrund der begrenzten Integrationszeit des Spektrometers in Abschnitt 3.1.5 nicht nutzbar. Da es bei Pockelszellen auch zu Phasenverschiebungen zwischen E- und O-Strahl kommt [87], eignen sich diese aufgrund spektraler Überlagerungen und Interferenzeffekte im zu messenden Wellenlängenbereich für die breitbandige Messung in dieser Arbeit nicht.

Eine Alternative zur Verbesserung der Signalqualität stellt der Faraday-Rotator dar, bei

dem es zu keiner Phasenverschiebung kommt [247]. Er basiert auf dem Faraday Effekt, der von Michael Faraday im Jahr 1845 entdeckt wurde [87, 196, 248]. Ein spezielles optisches transparentes Medium ist dabei in der Lage, die Polarisationsrichtung in Abhängigkeit eines Magnetfeldes zu drehen [7]. Üblicherweise werden für diesen Zweck optische Gläser verwendet. Das hierzu nötige Magnetfeld wird üblicherweise von einer Spule erzeugt, in der sich das optische Glas befindet. Als Nachteil erweist sich die mit steigender Frequenz ebenfalls steigende Impedanz der Spule, wodurch die maximale nutzbare Modulationsfrequenz begrenzt ist. Da jedoch das verwendete Spektrometer ohnehin eine begrenzte Integrationszeit aufweist, können nur niedrige Frequenzen gewählt werden, wodurch sich der induktive Lastanteil verringert. Daher wird in diesem Messaufbau ein Faraday-Rotator zur optischen Modulation verwendet, wie dies auch in den meisten anderen Polarimetern der Fall ist [7, 34, 46, 49, 50, 147–154, 156, 157, 249].

Die Modulationstiefe Θ_m eines Faraday-Rotators ergibt sich einerseits aus der material-spezifischen Verdet-Konstante V , die angibt, wie stark ein optisches Glas die Polarisation in Abhängigkeit eines Magnetfeldes dreht. Andererseits gehen Pfadlänge d und Magnetfeld B in die Modulationstiefe ein. Dieser Zusammenhang wird aus Gleichung 24 ersichtlich.

$$\Theta_m = V \cdot d \cdot B \quad (24)$$

Wie in Abschnitt 2.2.3 beschrieben, bewirkt eine hohe Modulationstiefe auch ein starkes Signal. Nach Gleichung 24 ist die Modulationstiefe maximal, wenn Verdet-Konstante, Pfadlänge und Magnetfeld möglichst groß sind. Daher wird zunächst ein Material gesucht, welches eine große Verdet-Konstante besitzt. Um eine möglichst große Intensität zur Messung zur Verfügung zu haben, ist zudem eine hohe Transmission des Materials vorteilhaft.

3.1.3.1 Optisches Glas

Grundsätzlich gibt es viele verschiedene optische Gläser, die mit unterschiedlichen Materialien wie zum Beispiel Blei dotiert sind und jeweils eine charakteristische Verdet-Konstante aufweisen. Die entsprechenden Vor- und Nachteile werden im Folgenden betrachtet.

Die physikalischen Hintergründe sowie der spektrale Verlauf der Verdet-Konstante sind dabei der optischen Aktivität beziehungsweise der Rotationsdispersion aus Abschnitt 2.1.1 sehr ähnlich [248]. Je nachdem, welche Literaturkonstanten zur Verfügung stehen, lässt sich die Verdet-Konstante auf verschiedene Arten berechnen.

Allgemein erfolgte zunächst eine Herleitung durch Henri Becquerel, der die Verdet-Konstante in Abhängigkeit von der Elementarladung e , der Lichtgeschwindigkeit c , der Elektronenmasse m_e , der Wellenlänge λ und der Dispersion des Brechungsindex $\frac{dn}{d\lambda}$ aufstellte [250].

$$V(\lambda) = \frac{-e}{m_e} \cdot \frac{\lambda}{2 \cdot c} \cdot \frac{dn}{d\lambda} \quad (25)$$

Diese Gleichung ermöglicht mit Kenntnis der Brechungsindexdispersion für eine Vielzahl von Materialien die Berechnung der jeweiligen Verdet-Konstanten. In der Vergangenheit hat sich jedoch gezeigt, dass es zwischen den theoretischen und experimentell bestimmten Werten zu Abweichungen kommt. Aus diesem Grund haben Westenberger et al. eine alternative Formel zur besseren Beschreibung der Verdet-Konstante entwickelt, die statt des wellenlängenabhängigen Brechungsindex ein von der Wellenlänge unabhängiges Näherungssystem mit den Konstanten a , b und λ_0 verwendet [250, 251].

$$V = \frac{\pi}{\lambda} \cdot \left(a + \frac{b}{\lambda^2 - \lambda_0^2} \right) \quad (26)$$

Eine weitere Variante dieser Formel unter Berücksichtigung des wellenlängenabhängigen Brechungsindex findet sich mit den entsprechenden Materialkonstanten A und B im *Handbook of Optical Materials* von Marvin J. Weber [252].

$$V = \frac{\pi}{\lambda} \cdot \frac{n^2(\lambda) - 1}{n(\lambda)} \cdot \left(A + \frac{B}{\lambda^2 - \lambda_0^2} \right) \quad (27)$$

Beide Formeln liefern sehr ähnliche Werte, so dass sie sich gleichermaßen zur quantitativen Beschreibung der Verdet-Konstanten eignen.

Die Transmission des Materials ist ebenfalls ein entscheidender Punkt. Eine hohe Verdet-Konstante ist von geringem Nutzen, wenn das Material eine zu große Absorption aufweist. Das in der Literatur oft verwendete Terbium Gallium Granat (TGG) [50, 157] besitzt zum Beispiel eine starke Absorption bei etwa 480 – 490 nm [253] und würde daher die breitbandige Messung der Rotationsdispersion im VIS-Bereich erheblich stören. In der Vergangenheit wurden dazu verschiedene Dotierungen von Flintglas mit Barium, Aluminium oder Blei evaluiert [254].

Dabei sei angemerkt, dass die gesetzlichen Grenzwerte der mit Blei dotierten optischen Gläser in den letzten Jahren verschärft wurden, was zu einer geringeren Verdet-Konstante führt. Zu erkennen ist dies bei den Materialbezeichnungen an einem vorangestellten “ N –“. $N - SF6$ ist zum Beispiel die neue Version des $SF6$. Vorteilhaft sind daher im Bezug auf die Verdet-Konstante alte Materialien mit höheren Bleianteilen. Teilweise sind noch alte Lagerbestände erhältlich, jedoch sind die verfügbaren Dimensionen nicht mehr frei wählbar. Verfügbar war zum Zeitpunkt des Aufbaus noch eine Pfadlänge von 65 mm mit einem Durchmesser von 10 mm.

Für einen theoretischen Vorab-Vergleich wird eine Datenquelle benötigt, die neben Informationen zur Verdet-Konstante auch die Transmissionswerte für verschiedene optische Gläser bereitstellt. Die Firma Schott GmbH stellt eine solche Datenbank für über 100 verschiedene Gläser zur Verfügung [255]. Dort wird der wellenlängenabhängige Brechungsindex sowie die Transmission bei einer Pfadlänge von 5 mm angegeben, die jedoch aufgrund der Verfügbarkeit mit dem Lambert-Beer-Gesetz auf 65 mm umgerechnet wurde. Da die für die Beschreibung gemäß Gleichung 26 oder Gleichung 27 erforderlichen Parameter a , b , A , B und λ_0 nur für einen Teil der in dem Schott Datenblatt aufgeführten Materialien zur Verfügung stehen, wurde der Vergleich unter Verwendung von Gleichung 25 durchgeführt. Eine Gegenüberstellung der Verdet-Konstante und Transmission ausgewählter Materialien ist in Abbildung 18 zu finden.

Es zeigt sich, dass $SF59$ die größte Verdet-Konstante besitzt, jedoch zeitgleich auch die höchste Absorption. Materialien wie $FK5$, $LAK7$, $LAK34$ und $LAF21$ oder $BAF51$ haben zwar eine hohe Transmission bis in den UV-Bereich, jedoch ist ihre Verdet-Konstante auch am kleinsten. Generell ist zu sagen, dass sich die Transmissionseigenschaften mit zunehmender Verdet-Konstante verschlechtern. Es muss daher ein Kompromiss gefunden werden.

Zu diesem Zweck wurden die einzelnen Frequenzanteile des Polarimetersignals in Gleichung 21 auf Seite 30 betrachtet. Bei konstantem Magnetfeld B und konstanter Pfadlänge d hängt die Modulationstiefe Θ_m nach Gleichung 24 linear von der Verdet-Konstante V

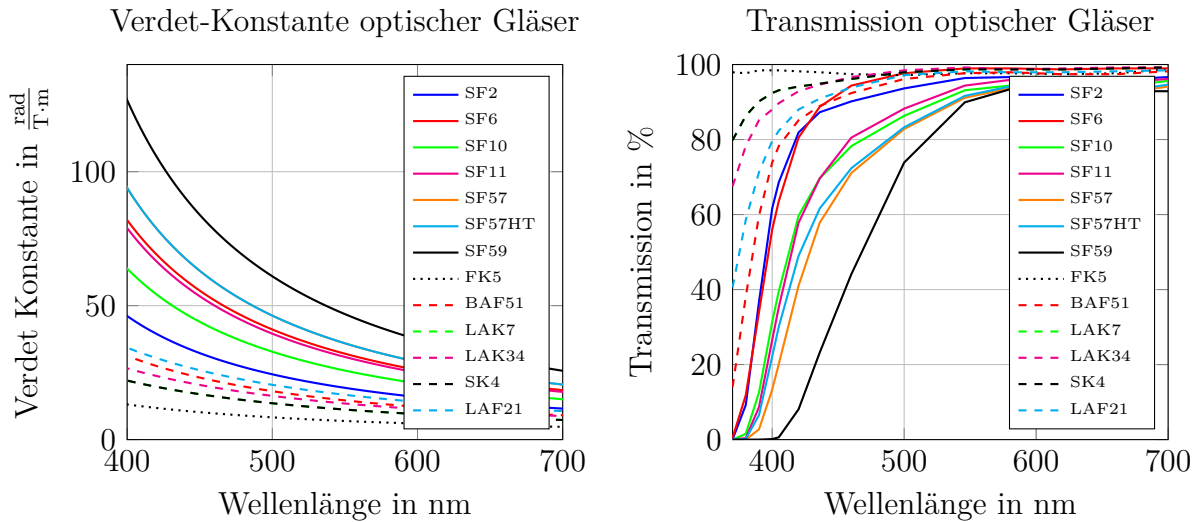


Abbildung 18: links: Wellenlängenabhängige Verdet-Konstante verschiedener optischer Gläser [255]. Rechts: Transmission eines 65 mm langen Stabes aus optischem Glas [255].

ab. Bei fester Eingangsintensität E_0 und konstanter Probendrehung Φ vereinfachen sich die Frequenzanteile aus Gleichung 21 zu:

- $I(\omega) \propto T \cdot V$
- $I(2\omega) \propto T \cdot V^2$

Beide Frequenzanteile hängen dabei linear von der Transmission ab. Im Gegensatz zu $I(\omega)$ hängt der $I(2\omega)$ -Anteil quadratisch von der Verdet-Konstante V ab. Diese Abhängigkeiten werden zur Kompromissfindung von Transmission und Verdet-Konstante in Abbildung 19 berücksichtigt. Relevant ist dabei der relative Vergleich der Materialien zueinander.

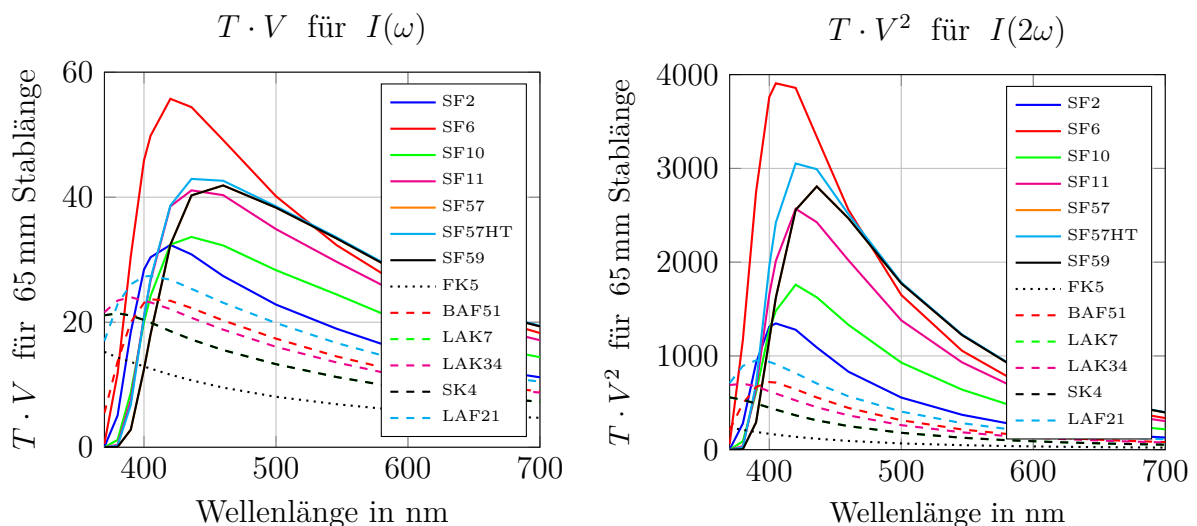


Abbildung 19: links: Normierte Darstellung von Verdet-Konstante und Transmission optischer Gläser für den $I(\omega)$ -Frequenzanteil. Rechts: Die gleiche Darstellung für den $I(2\omega)$ -Anteil mit quadratischer Abhängigkeit von der Verdet-Konstante V .

Es wird deutlich, dass die meisten Gläser mit hoher Transmission aus Abbildung 18 einen schlechten Kompromiss bilden. Als wesentlich besser präsentieren sich dabei die Materialien SF6, SF59 und SF57HT. SF57HT war jedoch zum Zeitpunkt der Konstruktion bereits nicht mehr erhältlich. Aufgrund der hohen Verdet-Konstante wurde zur Charakterisierung des Systems zunächst mit SF59 gearbeitet. Der Glasstab aus diesem Material wurde jedoch während der Messungen beschädigt. Da dieses Material nicht mehr verfügbar war wurde anstatt dessen SF6 mit den gleichen Dimensionen verwendet, weil es sowohl für $I(\omega)$ als auch für $I(2\omega)$ einen guten Kompromiss bildet und insbesondere für die späteren Messungen mit Bluteiweiß hinsichtlich der Transmission im kurzwelligen Wellenlängenbereich deutliche Vorteile bietet.

Ein alternativer Ansatz, der in der Literatur diskutiert wird, ist die Ausnutzung der Verdet-Konstante des Wassers, dem Hauptbestandteil von biologischen Proben. Hierbei wird die Probe selbst als Faraday-Rotator genutzt [156]. Die Verdet-Konstante von Wasser ist jedoch einerseits etwa um den Faktor 10 geringer als die von optischen Gläsern in Abbildung 18 [256]. Andererseits kann durch die für das Magnetfeld nötige Spule eine Erwärmung der Probe nicht ausgeschlossen werden.

Neben der Stablänge von 65 mm wird ein Durchmesser von 10 mm festgesetzt, was der Apertur der Polarisationsfilter aus Abschnitt 3.1.2 entspricht. Da die Stablänge im Vergleich zum Durchmesser groß ist, kann ein weitgehend homogenes Magnetfeld erreicht werden [257].

3.1.3.2 Spule zur Magnetfelderzeugung

Das für den Faraday-Rotator nötige Magnetfeld wird durch eine Spule erzeugt, in der sich das optische Glas befindet. Für das Magnetfeld B einer langen und vom Strom I durchflossenen Spule der Länge l mit der Windungszahl N gilt mit der magnetischen Permeabilität μ und der magnetischen Feldkonstante μ_0 [257]:

$$B = \mu_0 \cdot \mu_r \cdot I \cdot \frac{N}{l} \quad (28)$$

Ein hohes Magnetfeld wird dabei durch einen hohen Spulenstrom, eine hohe Windungszahl sowie eine geringe Spulenlänge erzeugt. Die Länge wird jedoch gemäß Gleichung 24 mit der Verdet-Konstante kompensiert. Somit sind ein hoher Modulationsstrom sowie eine hohe Windungszahl wünschenswert. Beides lässt sich jedoch nicht beliebig steigern, da mit zunehmender Windungszahl auch der Widerstand erhöht und somit elektrische Verluste und Eigenerwärmung unvermeidbar wären.

Die Gesamtimpedanz der Spule setzt sich abhängig von der Modulationsfrequenz ω aus ohmschem und induktivem Anteil zusammen. Für die Induktivität L von langen Spulen der Länge l mit der Windungszahl N und der Stirnfläche A gilt näherungsweise [257]:

$$L = \frac{\mu_0 \cdot N^2 \cdot A}{l} \quad (29)$$

Der ohmsche Widerstand R lässt sich aus der Querschnittsfläche A , der Drahtlänge l_D sowie dem spezifischen Widerstand für Kupfer ρ von $1,725 \cdot 10^{-2} \frac{\Omega \cdot \text{mm}}{\text{m}}$ bei 300 K [257] berechnen. Mit dem mittleren Spulendurchmesser d , der Windungszahl N und $l_D \approx 2 \cdot \pi \cdot d \cdot N$ ergibt sich:

$$R = \frac{\rho \cdot l_D}{A} \approx \frac{\rho \cdot 2 \cdot \pi \cdot d \cdot N}{A} \quad (30)$$

Resultierend kann die Gesamtimpedanz bei der Modulationsfrequenz ω berechnet werden zu:

$$\underline{Z} = \underbrace{\frac{\rho \cdot 2 \cdot \pi \cdot d \cdot N}{A}}_{Z_{\text{Re}}} + j \cdot \underbrace{2 \cdot \pi \cdot \omega \cdot \frac{\mu_0 \cdot N^2 \cdot A}{l}}_{Z_{\text{Im}}} \quad (31)$$

In den meisten aus der Literatur bekannten Ansätzen wird mit hohen Modulationsfrequenzen von 150 Hz [151], 976 Hz [49], 1 kHz [112], 1,09 kHz [7, 46, 50, 147, 148, 152–154, 157], 1,073 kHz [34] beziehungsweise 1,2 kHz [149] gearbeitet. Dies ist möglich, da die Messungen überwiegend bei einzelnen diskreten Wellenlängen erfolgen, was vergleichsweise geringe Anforderungen an das Frequenzverhalten der verwendeten Empfängerphotodioden stellt. Eine Zusammenfassung der Parameter anderer Arbeiten findet sich im Anhang in Tabelle 14. Das in diesem Aufbau verwendete und in Abschnitt 3.1.5 beschriebene Spektrometer besitzt eine minimale Integrationszeit von 1,11 ms und kann daher nach dem Nyquist-Shannon-Theorem eine maximale Frequenz von 450 Hz erfassen [258], was einer oberen Modulationsfrequenz des Faraday-Rotators von 225 Hz entsprechen würde. Die Ermittlung der optimalen Modulationsfrequenz wird in Abschnitt 3.2.2 diskutiert und zeigt, dass diese deutlich tiefer liegt. Die elektrische Ansteuerung aus Abschnitt 3.1.6 bietet jedoch genug Leistungsreserven, sodass mit der Spule auch Modulationsfrequenzen im Bereich von 1 kHz realisiert werden könnten.

Eine weitere Limitation ist der für das Magnetsystem zur Verfügung stehende Bauraum. Dieser wird nach außen durch das Stangensystem auf circa 35 mm begrenzt, während die Abmessungen des SF6-Glases von 65 mm Länge und 10 mm Durchmesser die inneren Dimensionen bestimmen.

Um ein eventuelles Wechseln des optischen Glases zu ermöglichen und gleichzeitig eine zentrierte Halterung im Messaufbau zu gewährleisten, wurde der SF6-Stab in eine Kunststoffröhre mit einem Außendurchmesser von 13 mm geschoben. Anschließend wurde die Spule mit einem Drahtdurchmesser von *0BalseiroInstituteatBarilocheAtomicCenter* 63 mm um die Kunststoffröhre in 5 Lagen mit je 95 zu insgesamt 475 Windungen gewickelt. Dies resultiert in einer Induktivität von 682 μH und einem Widerstand von 1,61 Ω . Nach Gleichung 31 ergibt sich daraus eine Gesamtimpedanz von

$$\underline{Z} = 1,61 \Omega + j \cdot 2 \cdot \pi \cdot \omega \cdot 682 \mu\text{H} \quad (32)$$

Selbst für die maximal mögliche Modulationsfrequenz von 225 Hz ist die induktive Last nur etwa halb so groß wie die Ohmsche, weshalb auch höhere Modulationsfrequenzen für die Treiberschaltung kein Problem darstellen. Eine zusammenfassende Übersicht über die Spulenparameter gibt Tabelle 4.

Die für die Messungen verwendete Spule ist in Abbildung 20 dargestellt.

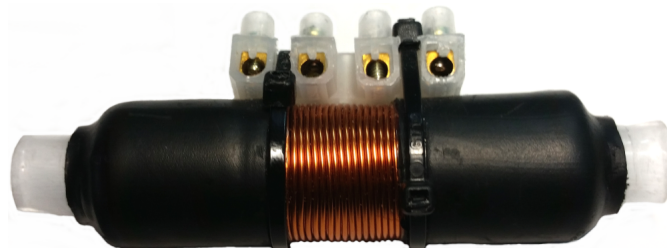


Abbildung 20: Spule des Faraday-Rotators.

Tabelle 4: Übersicht der einzelnen Spulenparameter.

Eigenschaft	Wert
Lagen / Windungen	5x95 / 475
Spulenlänge	65 mm
Ø Innen/Außen	13/19 mm
Induktivität	682 μ H
Ohmscher Widerstand	1,61 Ω
Drahtdurchmesser	0,63 mm

Um ein Verrutschen der Windungen zu verhindern, wurden die Enden mit Schrumpfschlauch fixiert. Eine Lüsterklemme ermöglicht eine flexible Kontaktierung mit der Stromtreiber-Schaltung.

3.1.4 Küvette

Ein weiteres zentrales Bauelement des Polarimeters ist die Durchflussküvette. Sie beinhaltet die Probe und soll verschiedene Anforderungen erfüllen. Dazu zählen das Erreichen einer möglichst großen Sensitivität des Messaufbaus durch ein eindeutiges Signal, geringe Depolarisationseffekte an den Wänden, ein möglichst kleiner Einfluss von eventuell auftretenden Luftblasen sowie gute Reinigungs- und Spüleigenschaften.

Wie bereits in Gleichung 21 auf Seite 30 gezeigt und in Abschnitt 2.2.3 diskutiert, bedeutet eine große optische Drehung auch ein starkes Signal. Zur spektralen Unterscheidung verschiedener Moleküle ist eine große Pfadlänge daher sinnvoll. In der Literatur wurde über zylinderförmige Küvetten mit 10 mm Pfadlänge berichtet [34, 147, 148, 150–152, 156]. In anderen Ansätzen wurde eine Pfadlänge von 50 mm für eine höhere Sensitivität verwendet [112, 145]. Da in dieser Arbeit nicht nur reine Glucose-Lösungen, sondern auch Gemische aus verschiedenen optisch aktiven Substanzen untersucht werden, ist maximale Sensitivität zwingend erforderlich. Daher wird im Messaufbau dieser Arbeit eine Küvette mit einer Länge von 50 mm verwendet.

Damit hängt das Probenvolumen im Wesentlichen vom Durchmesser der Küvette ab. Zu klein darf der Durchmesser jedoch nicht sein, da sich eventuell auftretende Luftblasen wegen der Oberflächenspannung an den Wänden festsetzen und zu Signalverfälschungen führen können. Außerdem werden in diesem Messaufbau breitbandige Lichtquellen verwendet, die sich im Gegensatz zu Lasern nicht so gut kollimieren lassen. Deshalb bewirkt ein größerer Durchmesser auch ein stärkeres Signal. Um trotz vorhandener Divergenz die Wahrscheinlichkeit von Reflexionen an den Küvettenwänden zu reduzieren, wird der Durchmesser der Küvette mit 12 mm größer als der durch Blenden auf 6 mm begrenzte Strahldurchmesser gewählt. Hierdurch ergibt sich ein Küvettenvolumen von 5,6 ml. Die in diesem Messaufbau verwendete Küvette ist in Abbildung 21 dargestellt.

Um eine Reinigung der Küvette bei zu starker Verschmutzung zu ermöglichen, wurde diese aus einem Messingrohr mit einem Innendurchmesser von 12 mm und einer Länge von 50 mm gefertigt, dessen Enden mit runden Objektträgern der Stärke 0,2 – 0,23 mm (Plano GmbH, Deutschland) verschlossen wurden. Sollten sich eventuelle Verschmutzungen durch Spülen nicht ausreichend entfernen lassen, so kann die Küvette im Inneren manuell



Abbildung 21: Durchflussküvette mit 50 mm Pfadlänge und 12 mm Innendurchmesser.

gereinigt und mit neuen Objektträger versehen werden.

An den oberen Enden wurden Schlauchanschlüsse eingelötet, so dass kontinuierlich neue Proben eingebracht werden können. Um eventuell auftretende Luftblasen zu entfernen, wird das gesamte Polarimeter (Abbildung 16) um 15° geneigt, sodass sich der Auslass auf einem höheren Niveau befindet als der Einlass, siehe auch Abbildung 24. Luftblasen bewegen sich somit zum Auslass und werden durch die Probenzuführung aus der Küvette abgeführt.

Auch wenn der Küvettendurchmesser größer als der Strahldurchmesser ist, kann nicht ausgeschlossen werden, dass geringe Teile der Strahlung an den Küvettenrändern reflektiert und mit verfälschter Polarisierung detektiert werden. Um dem entgegenzuwirken, sind die Küvettenwände mit schwarzem Mattlack beschichtet. Die Verwendung einer transparenten Küvette zum Beispiel aus Glas hätte dabei den Nachteil, dass auf die Wände auftreffendes Licht in das Glas hinein gebrochen und Verfälschungen der Messung hervorgerufen werden

3.1.5 Spektrometer

Das für die Messungen benötigte Spektrometer sollte für den Transmissionsbereich des Messaufbaus empfindlich sein, der hin zum ultravioletten Wellenlängenbereich (UV)-Bereich in erster Linie durch den Faraday-Rotator ab etwa 370 nm begrenzt ist, siehe Abschnitt 3.1.3. Dabei ist jedoch zu beachten, dass die Sensitivität eines Quanten-Detektorchips hauptsächlich von der maximal zu erfassenden Wellenlänge abhängt. Je größer die Maximalwellenlänge, desto schlechter ist die Sensitivität [85]. Daher sollte die Maximalwellenlänge so groß wie nötig, aber so klein wie möglich gewählt werden.

Die wichtigste Anforderung ist jedoch die zeitliche Zuordnung der aufgenommenen Spektren. Die Faraday-Modulation führt zu zeitlich veränderlichen Spektren mit den in Abschnitt 2.2.3 beschriebenen Frequenzanteilen $I(DC)$, $I(\omega)$ und $I(2\omega)$. Um diese auflösen zu können, müssen kontinuierlich Spektren in äquidistanten Zeitabständen aufgenommen werden. Anschließend können dann per Fourier-Transformation oder Lock-In-Verstärkung die entsprechenden Intensitäten bei den Frequenzanteilen DC , ω und 2ω extrahiert werden, siehe Abschnitt 3.3.2. Die wichtigste Anforderung ist jedoch die korrekte zeitliche Zuordnung der Spektren. Um dies zu erreichen, ist entweder eine echtzeitfähige Schnittstelle zur Datenübertragung an den PC oder ein interner Speicher nötig.

Das einzige Spektrometer, welches diese Anforderungen zum Konstruktionszeitpunkt erfüllte, war das ULS2048-EVO (Avantes BV, Niederlande). Es bietet neben einem internen Speicher auch eine Ethernet- und eine USB3.0-Schnittstelle. Tabelle 5 zeigt eine Übersicht der Spektrometereigenschaften.

Tabelle 5: Eigenschaften des verwendeten Avantes ULS2048L-EVO Spektrometers.

Eigenschaft	Wert
Wellenlängenbereich	200 – 1100 nm
Sensitivität	470 000 $\frac{\mu\text{W}}{\text{ms}}$
Integrationszeit	1, 11 ms - 10 Minuten
Gitter	300 $\frac{\text{Linien}}{\text{mm}}$
Eingangsspalt	25 μm
Auflösung	1, 4 nm
Speicher	512 MB
speicherbare Spektren	5000

Mit einem nutzbaren Wellenlängenbereich von 200 – 1100 nm deckt das Avantes ULS2048-EVO die Anforderungen für die Rotationsdispersion ideal ab. Je nach ausgewähltem Gitter und Eingangsspalt ergeben sich jedoch auch unterschiedliche Sensitivitäten und Auflösungen. Da mit der Laser-Driven-Light-Source aus Abschnitt 3.1.1 genügend Intensität zur Verfügung steht, wird ein kleiner Eingangsspalt mit 25 μm verwendet. Das eingebaute VIS-Gitter mit 300 $\frac{\text{Linien}}{\text{mm}}$ ist auf den sichtbaren Wellenlängenbereich optimiert und ermöglicht eine maximale Auflösung von 1,4 nm. Durch die zwischen 1,11 ms und 10 Minuten einstellbare Integrationszeit sowie dem internen RAM-Speicher lässt sich das Spektrometer in diesem Messaufbau sehr flexibel einsetzen. Eine Überprüfung des Zeitstempels und der Auswirkung von schwankender Modulationsfrequenz wird in Abschnitt 3.2.2 auf Seite 56 durchgeführt.

3.1.6 Elektrische Ansteuerung

Als zentraler Bestandteil des Messaufbaus wurde eine elektrische Ansteuerung des Faraday-Rotators entwickelt [259]. In erster Linie soll damit eine sinusförmige und möglichst driftarme Modulation des Magnetfeldes gewährleistet werden. Weiterhin ist ein Stromtreiber für die Versorgung der alternativ zur Laser-Driven-Light-Source verwendbaren LED implementiert. Zudem bietet die Schaltung die Möglichkeit, zukünftig eine Steuerung per Mikrocontroller zu implementieren um die Anwendung zu vereinfachen. Die wichtigsten Einzelabschnitte der Schaltung werden im Folgenden erklärt, während sich der gesamte Schaltplan sowie das Platinenlayout im Anhang in Abbildung 89 sowie Abbildung 90 befindet. Eine schematische Darstellung der einzelnen Elemente der Schaltung ist in Abbildung 22 zu finden.

Die Netzteile Hewlett Packard E3631A und Voltcraft Plus VSP 2206HE (1) stellen die nötige Versorgung der Spannungsreglereinheit (2) sicher, die in Abbildung 81 dargestellt ist. Der Strom durch die LED (5) wird mit einem Hewlett Packard E3620A (3) Netzteil über den spannungsgesteuerten Stromtreiber (4) aus Abbildung 82 realisiert. Der Schaltungsteil (3, 4, 5) entfällt, sofern die Laser-Driven-Light-Source anstatt der LED verwendet wird. Mit dem Hewlett Packard 33120A Funktionsgenerator wird der ebenfalls spannungsgesteuerte Spulen-Stromtreiber (7) aus Abbildung 83 und somit der Faraday-Rotator (8) kontrolliert. Es folgt eine detaillierte Beschreibung der einzelnen Komponenten der Treiberschaltung (2, 4, 7).

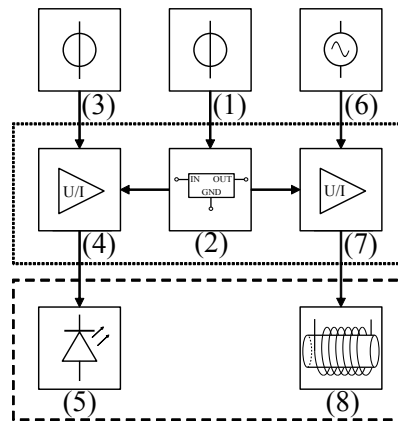


Abbildung 22: Schematische Darstellung der elektrischen Ansteuerung: (1) Netzteile Hewlett Packard E3631A und Voltcraft Plus VSP 2206HE, (2) Spannungsreglereinheit, siehe Abbildung 81, (3) Netzteil Hewlett Packard E3620A, (4) LED-Stromtreiber, siehe Abbildung 82, (5) LED, (6) Funktionsgenerator Hewlett Packard 33120A, (7) Spulen-Stromtreiber, (8) Faraday-Rotator.

Spannungsreglereinheit

In der elektrischen Ansteuerung der einzelnen Bauelemente befindet sich eine Vielzahl von integrierten Schaltkreisen (ICs) wie Operationsverstärker, Audioverstärker, etc. Da diese in der Regel mit verschiedenen Spannungen versorgt werden, wurde eine Spannungsreglereinheit in der Schaltung implementiert, die die gebräuchlichen Versorgungsspannungen wie $\pm 12\text{ V}$ und $\pm 5\text{ V}$ bereitstellt. Diese Spannungen können dann von den einzelnen Untermodulen der Steuerungselektronik abgegriffen werden. Eine ausführliche Darstellung des elektrischen Schaltplans der Reglereinheit ist im Anhang auf Seite 161 zu finden.

Lichtquelle

Neben der LDLS wurde im Messaufbau auch die Möglichkeit zur Verwendung von LEDs als Lichtquellen vorgesehen. Dies dient Evaluationszwecken zur Untersuchung des Einflusses schwankender Lichtintensität in Abschnitt 4.1.1.2 und 4.1.2.2. Dabei kamen eine Cree XM-L als Weißlichtquelle und eine Osram LT W5SM als grüne Lichtquelle zum Einsatz. Da die Helligkeit einer LED maßgeblich vom durchfließenden Strom abhängt, hat seine Stabilität Vorrang. Aufgrund der Diodenkennlinie bewirken kleine Änderungen bei der LED-Versorgungsspannung jedoch bereits große Änderungen des LED-Stroms und somit erhebliche Intensitätsschwankungen. Daher ist eine genaue Regelung des Stroms nötig. Hierzu wurde ebenfalls ein entsprechender Schaltungsteil entworfen, in dem über eine externe Referenzspannung der LED-Strom eingestellt und gezielt variiert werden kann. Der Schaltplan dieser Einheit befindet sich ebenfalls im Anhang auf Seite 161 in Abbildung 82.

Faraday-Rotator

Wichtigster Bestandteil der Ansteuerung ist jedoch der Stromtreiber für den in Abschnitt 3.1.3 beschriebenen Faraday-Rotator, an den einige spezielle Anforderungen gestellt werden. Hierzu zählen ein hoher Modulationsstrom mit guter Stabilität, ein möglichst oberwellenfreies sinusförmiges Modulationssignal sowie die Möglichkeit der Einstellung einer Offsetspannung.

Sinusgenerator: Optional wurde für die Erzeugung des Stromsignals ein Sinusgenerator in die Schaltung integriert. Alternativ besteht die Möglichkeit zur Einspeisung einer externen Signalquelle. Da die Verwendung eines kommerziellen Funktionsgenerators (33120A, Hewlett Packard, USA) ein höheres Maß an Flexibilität bietet, wurde dieser für die folgenden Messungen verwendet. Der Schaltplan dieses Bauteils befindet sich im Anhang in Abbildung 87.

Spulentreiber: Das zentrale Bauelement der elektrischen Ansteuerung ist der Spulentreiber des Faraday-Rotators. Der Treiber soll in der Lage sein, einen möglichst großen Strom durch die Spule zu treiben. Dies ist besonders bei hohen Frequenzen schwierig, da sich die induktive Last mit steigender Modulationsfrequenz vergrößert. Um diesem Problem zu begegnen, wurde in der Literatur bereits die Verwendung eines Schwingkreises für den Faraday-Rotator vorgeschlagen [154]. Die Steuerung eines Schwingkreises in Bezug auf seine Amplitude und seine Frequenz ist jedoch sehr aufwändig und stellt hohe Anforderungen an die Synchronisierung der nachfolgenden Schaltungsteile. Da die Modulationstiefe Θ_m nach Gleichung 21 einen direkten Einfluss auf das Messsignal hat, wird die relative Stabilität der Modulationstiefe dem absoluten Wert der Modulationstiefe vorgezogen und auf die Verwendung eines Schwingkreises verzichtet. Eine ausführliche Darstellung des elektrischen Schaltplans des Spulentreibers ist in Abbildung 83 im Anhang auf Seite 162 zu finden.

Als zusätzliche Maßnahme für die Messung von Glucose-Konzentrationen wurde bereits 1992 eine Rückführung des Messsignals vorgeschlagen [260] und später in zahlreichen Ansätzen von anderen Arbeitsgruppen verwendet [34, 46, 49, 50, 145, 147, 149, 152, 153, 153, 157, 224, 249, 261]. In diesen Arbeiten wird in die Spule ein DC-Stromanteil eingebracht, der durch die daraus resultierende optische Drehung die Rotation durch die Probe gerade kompensiert, beziehungsweise den $I(\omega)$ Anteil zu Null werden lässt. Anhand des dafür nötigen Stroms lässt sich dann auf die Konzentration schließen. Da die $I(\omega)$ -Intensität auf 0 geregelt wird, ist dieses Verfahren unabhängig von der absoluten Lichtintensität. Diese Methode wurde im Rahmen der aktuellen Arbeit jedoch nicht gewählt, da der Intensitätsabgleich für ein Mehrwellenlängenpolarimeter bei Messung von Stoffgemischen wesentlich komplizierter als für die monochromatischen Ansätze in der Literatur ist. Zudem beansprucht der Abgleich zusätzliche Messzeit. Außerdem wurde in dieser Arbeit in Abschnitt 4.1.1 durch Bildung des Intensitätsverhältnisses $\frac{I(\omega)}{I(2\omega)}$ ein vielversprechender Ansatz zur Kompensation des Einflusses der absoluten Lichtintensität gefunden und publiziert [1].

3.1.7 Automatische Probenmischung

Zur Untersuchung der spektralen Überlagerung verschiedener Blutkomponenten ist die genaue Kenntnis der Referenzkonzentrationen essentiell. Zwar kann die Glucose-Konzentration in Blutproben zum Beispiel mit dem *Biochemistry Analyzer* (Yellow Springs Instruments (YSI), USA) genau bestimmt werden, weswegen es auch von der FDA akzeptiert ist [56]. Jedoch stand dieses Gerät für die Messungen nicht zur Verfügung. Zudem ist es nicht in der Lage, Eiweißkonzentrationen zu messen.

Weiterhin ist es für die Durchführung der Messungen sehr hilfreich, wenn die Konzentrationsbereiche der jeweiligen Stoffe frei gewählt werden können. Zu diesem Zweck bietet es sich an, die entsprechenden Substanzen in einer synthetischen Matrix zusammenzumischen [46]. Ein automatisches, auf Rollenpumpen basierendes System zur Probenmischung wurde von Clarke et al. in ihrer Arbeit vorgestellt, um beliebige Glucose-Konzentrationen

polarimetrisch zu charakterisieren [34].

Eine solche Probenmischung aus Stammlösungen wird daher auch für den Messaufbau dieser Arbeit vorgesehen, um die bestmögliche Kontrolle über die Konzentrationswerte der Referenzmischungen zu haben und die Genauigkeitsanforderungen an die Referenzkonzentration zu erfüllen. Zum anderen ist eine hohe Automatisierungsrate und eine Synchronisation mit der restlichen Messtechnik wünschenswert. Dadurch werden einerseits Langzeitmessungen möglich, andererseits lassen sich so menschliche Fehler bei der Probengenerierung vermeiden und die Reproduzierbarkeit erhöhen.

Daher wurde ein automatisches Proben-Mischungs-System aus mehreren Spritzenpumpen aufgebaut, das in Abbildung 23 dargestellt ist.

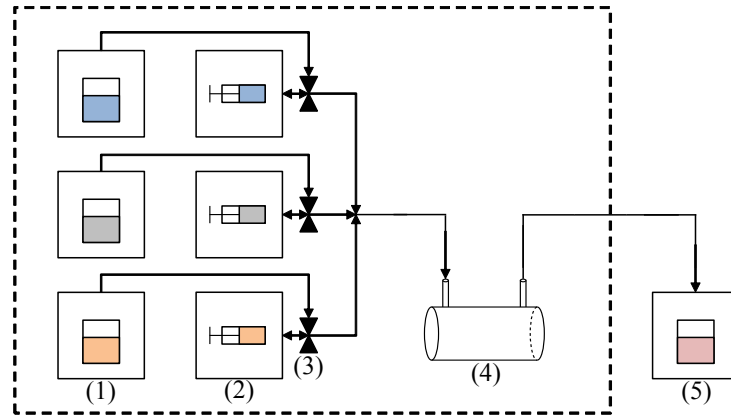


Abbildung 23: Schematische Darstellung der Probenmischungseinheit: (1) Behälter mit Stammlösungen, (2) neMESYS Spritzenpumpensystem mit ILS Glasspritzen, (3) Zweiwegeventile, (4) Durchflussküvette, (5) Abfallbehälter

Das System besteht aus drei Spritzenpumpen (neMESYS 290N, Cetoni GmbH, Deutschland), deren Kolbenbewegung durch eine präzise Schrittmotorsteuerung kontrolliert wird. Um diese Bewegung für eine hohe Dosiergenauigkeit nutzen zu können, wurden die Module jeweils mit einer 25 ml Glasspritze (ILS GmbH, Deutschland) bestückt. Durch das im Vergleich zu Kunststoff weniger verformbare Glas der Spritzen kann sich keine Druckkapazität aufbauen, wodurch ein Nachlaufen verhindert wird und sich die zu dosierende Stoffmenge nicht ändern kann.

Jedes der Module ist an ein Zweiwegeventil (3) angeschlossen. Durch jeweils einen der Ausgänge sind die Module miteinander und mit der Durchflussküvette (4) verbunden. Über die individuelle Flussrate lassen sich die entsprechend gewünschten Konzentrationen der einzelnen Stoffe herzustellen. In der temperaturgeregelten Kammer befinden sich zudem die Stammlösungen (1) aus destilliertem Wasser, Glucose-Lösung sowie Protein-Lösung. Eine Sedimentation der Stammlösungen ist zu vernachlässigen, da der Sedimentationskoeffizient von Eiweiß-Lösungen etwa 5 Größenordnungen unterhalb der von Blutkörperchen liegt [262]. Für Albumin liegt dieser bei $4,6 \cdot 10^{-13}$ s, für Globuline bei $6,3 - 19 \cdot 10^{-13}$ s und Fibrinogen bei $7,3 \cdot 10^{-13}$ s [20]. Nach der Dosierung können die Spritzen über das Zweiwegeventil wieder mit den Stammlösungen aufgefüllt werden. Eine Steuerung der Module erfolgt über ein spezielles Programm und dafür erstellte Ablaufskripte. Eine detailliertere Beschreibung findet sich in Abschnitt 3.3.2.

Um auch bei den Leitungen keine Druckkapazitäten und damit ein Nachlaufen hervorzurufen und um chemische Verträglichkeit mit den Proben sowie Gasdichtheit zu gewährleisten, wurden Schläuche aus PEEK (IDEX Health & Science, LLC, USA) verwendet. Der

Durchmesser von $1/16'' \approx 1,6\text{ mm}$ stellt einen Kompromiss aus geringem Totvolumen und ausreichender maximaler Flussrate zur zeitlichen Begrenzung des Anmischvorgangs dar.

Bezüglich der Genauigkeit des Pumpensystems ist zu erwähnen, dass die Reproduzierbarkeit wichtiger als die absolute Genauigkeit ist. Absolute Fehler würden in Kalibrier- und Validierdaten gleichzeitig vorhanden sein, und so in dem Regressionsmodell zu keinem erhöhten Bestimmungsfehler führen. Eine Betrachtung der Genauigkeit ist in Abschnitt 3.4.3 auf Seite 78 zu finden.

3.1.8 Temperaturstabilisierung

In der Literatur wird über einen Temperatureinfluss auf die Stärke der Rotationsdispersion der einzelnen optisch aktiven Substanzen von etwa $10\%/K$ im Bereich der Raumtemperatur berichtet [150]. Außerdem kann eine Temperaturänderung eine Drift des Messaufbaus bewirken, insbesondere bei der Polarisationsfilterhalterung, wie in Abschnitt 3.4.1 auf Seite 69 näher erklärt ist. Daher bietet sich der Einsatz einer Temperaturregelung zur Stabilisierung der Umgebungstemperatur an.

Zu diesem Zweck wird der Messaufbau zunächst von der Umgebung abgeschirmt, wie in Abbildung 15 auf Seite 35 dargestellt. Neben dem eigentlichen Polarimeter, bestehend aus Polarisationsfiltern, Faraday-Rotator, Küvette und Spektrometer befinden sich auch die Stammlösungen zur Probenmischung (weitere Informationen in Abschnitt 3.1.7) im temperaturstabilisierten Bereich. Die Laser-Driven-Light-Source ist aufgrund der starken Abwärme außerhalb angeordnet und wird mittels Lichtwellenleiter in den Aufbau eingekoppelt. Auch die elektrische Ansteuerung sowie der Abfallbehälter und der Computer zur Datenauswertung befinden sich außerhalb.

Zur Abschirmung wurde zunächst ein Gerüst aus Aluminiumprofilen mit den Maßen $75 \times 90 \times 40\text{ cm}^3$ ($L \times B \times H$) konstruiert, welches den gesamten optischen Tisch (VIS IsoStation, Newport Spectra-Physics GmbH, Deutschland) abdeckt. In den Rahmen wurden 3 mm starke Plexiglas-Scheiben eingesetzt, um den Aufbau gegen Luftbewegungen abzuschirmen und weiterhin Sichtkontrollen zu ermöglichen. Zum vereinfachten Zugriff auf den Messaufbau wurden an zwei Doppeltüren eingesetzt. Da Plexiglas eine hohe Wärmeleitfähigkeit von $\lambda = 0,19 \frac{\text{W}}{\text{m}\cdot\text{K}}$ [263] besitzt, würde ein Temperaturunterschied von $\Delta T = 10^\circ\text{C}$ zur Raumtemperatur bei idealer Wärmeleitung bereits zu einem Wärmefluss von $\dot{Q} = 1263\text{ W}$ führen. Um dem entgegenzuwirken, wurden 10 mm starke Styroporplatten von außen auf dem Plexiglas befestigt, sodass sich die für eine konstante Temperatur benötigte Heizleistung einerseits deutlich reduziert und sich andererseits nach Abnehmen einer Platte noch das Innere des Aufbaus betrachtet werden kann.

Kernstück der Temperaturregelung ist ein T1641100 PID-Temperaturregler (Red Lion Controls Inc., USA). Dieser Regler ist in der Lage, durch messtechnische Erfassung seiner Umgebung in Bezug auf das Wärmeverhalten seine Proportional-, Integral und Differentialanteile automatisch einzustellen, was seinen Einsatz erheblich vereinfacht. Die Temperatur wird mit einem PT1000 Widerstand gemessen. Das Heizsignal wird im Aufbau an zwei HVL031 Heizlüfter (STEGO Elektrotechnik GmbH, Deutschland) mit einer maximalen Heizleistung von 150 W geleitet [264]. Einen Eindruck der Abschirmung sowie die räumliche Anordnung von Spritzenpumpensystem, Stammlösungen sowie Polarimeter gibt Abbildung 24.

Die Abschirmung ist aus Gründen der besseren Darstellung ohne die Wärmedämmung transparent dargestellt. In der oberen linken Ecke befinden sich die Stammlösungen der

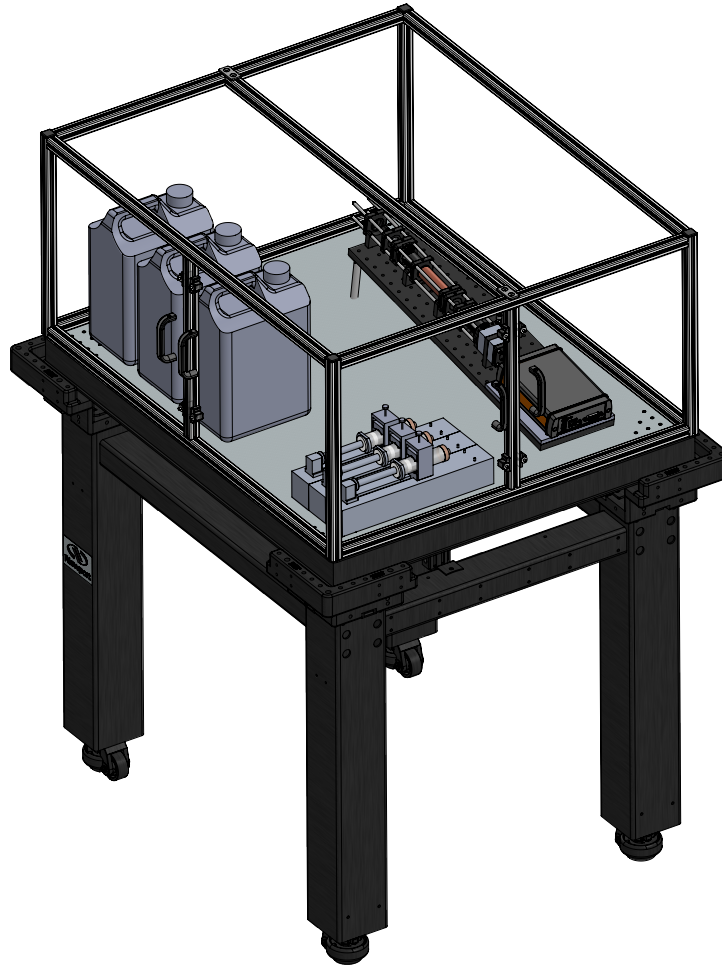


Abbildung 24: Vollständiger Messaufbau mit Haube auf optischem Tisch. Links: Stamm-lösungsbehälter, unten: NeMESYS Spritzenpumpen, rechts: Polarimeter nach Abbil-dung 16 [235, 236, 265].

Probenmischung aus Abschnitt 3.1.7. Das Polarimeter befindet sich auf der rechten Seite und ist um 15° geneigt um das Ansammeln von Luftblasen in der Küvette zu verhindern. Insgesamt verfügt die Abschirmung über zwei Doppeltüren zur Wartung oder Einstellung der Komponenten.

Um sicherzustellen, dass die Umgebungstemperatur während der Messungen konstant ist, wird die Temperatur mittels der in Abschnitt 3.3.2 beschriebenen Steuerungssoftware überwacht. Die daraus ermittelte Temperaturschwankung während einer Messreihe liegt deutlich unter $\pm 0,1\text{ K}$ und ist in Abbildung 35 in Abschnitt 3.4.1 dokumentiert.

3.2 Charakterisierung der Messparameter

Vor der Durchführung der eigentlichen Messungen muss zunächst geklärt werden, welchen Einfluss die Messparameter wie Modulationsfrequenz, Integrationszeit oder Anzahl der aufgenommenen Spektren auf die Signalqualität haben und wie das Signal beschaffen ist. Anhand der Ergebnisse lassen sich diese Parameter dann für die nachfolgenden Messungen festlegen. Außerdem bedarf es einer Vermessung der Rotationsdispersionen der jeweiligen Proben, um entscheiden zu können, welche Substanzen für die späteren Messungen relevant sind.

3.2.1 Signalform

Um einen Eindruck zu vermitteln, wie sich der in Abbildung 11 und 12 auf Seite 27 dargestellte Intensitätsverlauf multispektral verhält, ist dieser in Abbildung 25 für eine Glucosekonzentration von 0 mg/dl beziehungsweise 500 mg/dl aufgetragen. Als Initialparameter wurde dabei eine Modulationsfrequenz von 7 Hz gewählt.

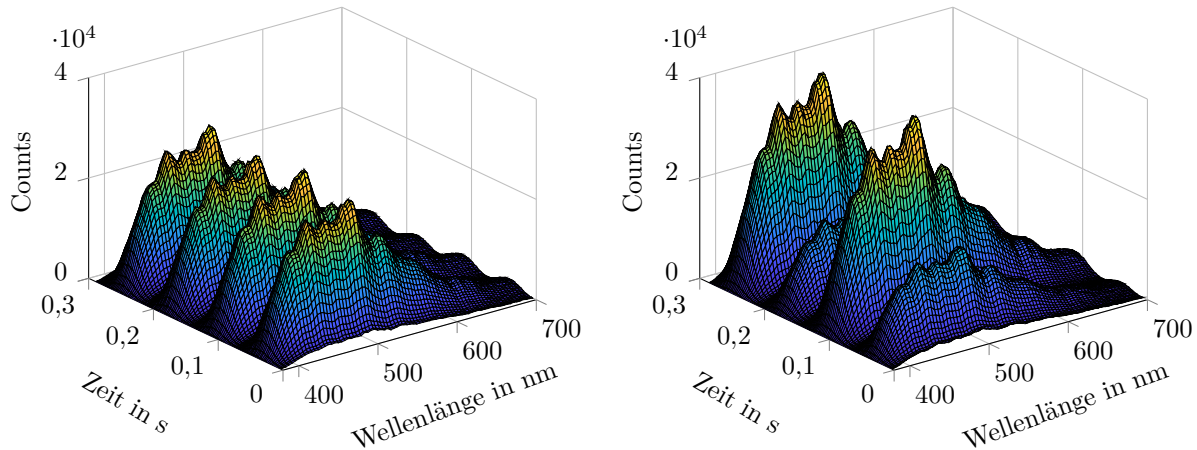


Abbildung 25: Signalform für 0 mg/dl (links) und 500 mg/dl (rechts)

Die Lichtintensität wurde dabei über einen erfassbaren Wellenlängenbereich von circa 370 – 750 nm aufgenommen. Diese resultiert aus einer Überlagerung von spektraler Emission der Laser-Driven-Light-Source, der Transmission des Faraday-Rotators sowie der Transmission der Glan-Thompson-Polarisationsfilter und der Sensitivität des Spektrometers. Weiterhin wird der Einfluss einer optisch aktiven Probe deutlich, der das ursprünglich symmetrische Intensitätssignal für $I(\omega)$ mit Probe asymmetrisch werden lässt. In der Folge steigt der $I(\omega)$ -Frequenzanteil, während $I(2\omega)$ konstant bleibt (wie in Abschnitt 2.2.3 gezeigt). Dieser Umstand spielt eine ganz entscheidende Rolle bei der Verbesserung der Messstabilität, siehe Abschnitt 3.3.3. Welchen Einfluss bestimmte Störfaktoren auf die Frequenzanteile $I(DC)$, $I(\omega)$ und $I(2\omega)$ haben, wird in Abschnitt 4.1 untersucht.

3.2.2 Modulationsfrequenz

Zunächst erfolgte die Festlegung der optimalen Modulationsfrequenz. Als Grundlage zur Beurteilung dient das Signal-Rausch-Verhältnis, engl. signal-to-noise ratio (S/N). Es ergibt sich aus dem Verhältnis des eigentlichen Messsignals zum Rauschen. In der Spektroskopie wird es üblicherweise berechnet, indem zwei Spektren unmittelbar nacheinander unter identischen Bedingungen aufgenommen werden [43]. Dann werden beide Spektren ins Verhältnis gesetzt, was näherungsweise zu einem Ergebnis von 1 beziehungsweise 100 % führt. Lediglich Driften zum Beispiel durch Intensitätsschwankungen der Lichtquelle und Rauschen bewirken eine Abweichung. Anschließend wird zur Kompensation der Drift ein Polynomfit 2. Ordnung durch einen Ausschnitt des Spektrums gelegt, um die spektrale Drift ohne Rauschen nachzubilden [43]. Die Abweichungen des Verhältnisses vom Polynomfit werden quadratisch aufsummiert und entsprechen dem Rauschen eines auf 100 % normierten Signals. Der Kehrwert ergibt dann direkt das S/N [43]. Da der $I(2\omega)$ -Anteil bei konstantem Faraday-Modulationsstrom der stabilste Frequenzanteil ist, wird dieser für die Berechnung herangezogen.

Die Signal-Rausch-Bestimmung wurde sowohl für die zunächst verwendete Weißlicht-LED als auch für die im Laufe des Projektes verfügbare LDLS durchgeführt. Die Integrationszeiten wurden dabei so eingestellt, dass eine optimale Aussteuerung des Spektrometers erfolgt. Dies sind bei Verwendung der LED 8 ms und für die LDLS aufgrund ihrer hohen Intensität 2 ms. Eine Variation der Integrationszeiten ist insbesondere für die LDLS nicht sinnvoll, da das Spektrometer über 2 ms übersteuert wäre und das Spektrometer keine Werte unter 1,11 ms verarbeiten kann. Für die Messung wurden jeweils 1000 Spektren aufgenommen und die Modulationsfrequenz im Bereich von 1 – 25 Hz variiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 26 zu finden.

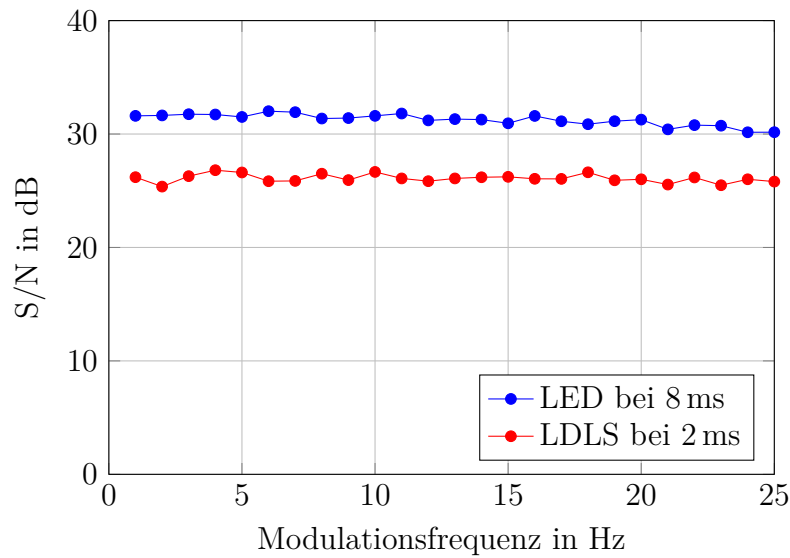


Abbildung 26: Signal-Rausch-Verhältnis in Abhängigkeit von der Modulationsfrequenz.

Zur besseren Darstellung wurde für das S/N der Dezibel-Maßstab verwendet, bei dem in der Intensitätsbetrachtung der Umrechnungsfaktor mit $10 \cdot \log\left(\frac{S}{N}\right)$ gegeben ist. Es ist zu erkennen, dass das S/N von etwa 30 dB nur schwach von der Modulationsfrequenz abhängig ist und mit steigender Frequenz leicht sinkt. Grundsätzlich wäre aufgrund des $1/f$ -Rauschens ein Anstieg des S/N zu erwarten. Jedoch ist dies in der Regel über einen wesentlich breiteren Frequenzbereich zu beobachten. Außerdem können sich leichte Frequenzjitter des Spektrometers bei höheren Modulationsfrequenzen relativ gesehen stärker bemerkbar machen. Aus diesem Grund wurde eine verhältnismäßig niedrige Modulationsfrequenz von 7 Hz gewählt, da diese außerdem keine harmonische Oberwelle von bekannten Störquellen wie der Netzfrequenz mit 50 Hz ist. Das indes niedrigere S/N der LDLS im Vergleich zur LED ist einerseits durch die längere Integrationszeit bei Verwendung der LED bedingt. Andererseits wird bei der LDLS ein Plasma verwendet, das durch diverse Intensitätsspitzen gekennzeichnet ist, was sich bei Ermittlung des S/N negativ auswirkt. Die LDLS bringt jedoch im Bezug auf die spektrale Verteilung erhebliche Vorteile, wie in Abschnitt 3.1.1 beschrieben.

3.2.3 Messzeit

Nach Festlegung der Integrationszeit über die Aussteuerung und bereits bestimmter Faraday-Modulationsfrequenz bleibt als zu optimierender Parameter die Anzahl der aufzunehmenden Spektren. Generell gilt, dass eine vergrößerte Anzahl an Spektren einen positiven

Einfluss auf das S/N hat. Andererseits bewirkt eine höhere Spektrenanzahl auch eine längere Messzeit und führt bei einer Fouriertransformation gleichzeitig zu einer höheren Frequenzauflösung, die das System wiederum anfälliger gegen Frequenzjitter des Spektrometers machen. Um dies zu untersuchen, wurden die Messzeiten von 1 – 20 s variiert. Bei der maximalen Messzeit von 20 s und optimalen Aussteuerung des Dynamikbereichs ergeben sich für die LED mit 8 ms Integrationszeit 2.500 Spektren, während bei Verwendung der LDLS mit 2 ms Integrationszeit 10.000 Spektren anfallen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 27 zu finden.

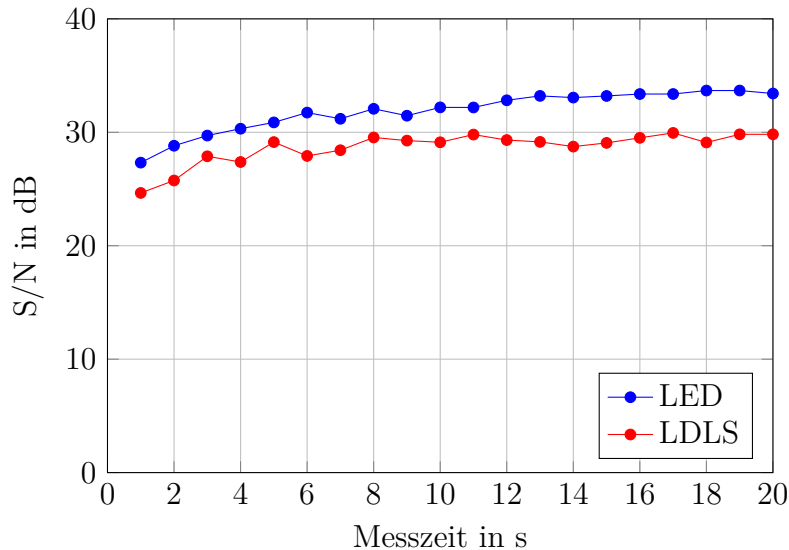


Abbildung 27: Signal-Rausch-Verhältnis in Abhängigkeit von der Messzeit.

Es zeigt sich, dass das S/N wie erwartet mit zunehmender Messzeit leicht ansteigt. Im Fall der LED mit ihrem etwas glatteren S/N-Verlauf lässt sich im Bereich von 1 – 20 Hz eine S/N-Zunahme von etwa 5 – 6 dB abschätzen. Dies ist ein Indiz dafür, dass es sich hierbei um einen reinen Integrationseinfluss handelt ($N \propto 1/\sqrt{t}$). Aufgrund der um Faktor vier größeren Spektrenanzahl müsste bei der LDLS die S/N-Kurve noch um circa 3 dB nach unten korrigiert werden, um vergleichbare Voraussetzungen zu schaffen. Angemerkt sei, dass die Gesamtmesszeit jedoch begrenzt ist, da sich die Integrationszeit wegen eventueller Übersättigung nicht beliebig erhöhen lässt und die Gesamtanzahl der speicherbaren Spektren auf dem internen Spektrometerspeicher limitiert ist. Zudem steigt bei einer größeren Datenmenge die Zeit zur Signalverarbeitung an, vergleiche Abschnitt 3.3.2. Für die S/N ist daher eine Verwendung von unter 2.500 Spektren empfehlenswert. Gegebenenfalls kann bei Intensitätsverlust durch zum Beispiel hohe Probenabsorption oder stark streuende Medien die Integrationszeit des Spektrometers entsprechend angepasst werden, um den Signalverlust auszugleichen. Um auch mit einer niedrigeren Anzahl an Spektren zuverlässig arbeiten zu können, kann eine spektrale Mittelung durchgeführt werden. Der sich dadurch sonst in der Absorptionsspektroskopie ergebende Nachteil von Informationsverlust durch geringeres Auflösungsvermögen etwaiger Absorptionspeaks kann in der Polarimetrie als gering angesehen werden. Die zu messenden Rotationsdispersionen weisen, wie in Abschnitt 2.1.2 beschrieben, im sichtbaren Wellenlängenbereich keine charakteristischen Merkmale auf, die ein besonders hohes Auflösungsvermögen erfordern.

3.3 Messdurchführung

Die Durchführung einer Messung erfordert eine Vielzahl von Einzelschritten sowie eine Vorbereitung der Proben. Um den eigentlichen Prozess der Messdurchführung zu vereinfachen, die einzelnen Vorgänge zu synchronisieren und aufgrund zeitaufwändiger Messungen weitestgehend zu automatisieren, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Software in der Programmiersprache C++ programmiert, die die Steuerung dieser Vorgänge übernimmt. Ziel ist die autarke Durchführung großer Messreihen, bei denen am Anfang nur Stammlösungen aufgefüllt und gewünschte Messbereiche eingestellt werden. Nach entsprechender Bearbeitung werden die Messwerte gespeichert und schließlich in MATLAB[®] ausgewertet.

3.3.1 Messvorbereitung

Ein nötiger Bestandteil zur Durchführung einer Messung ist die Vorbereitung des Messaufbaus mit der Einstellung von Lichtquelle, Faraday-Rotator etc. Wie in Abschnitt 3.1.7 bereits erläutert bedarf es außerdem einer entsprechenden Präparation der Stammlösungen, aus denen die jeweiligen Proben angemischt werden.

Probenvorbereitung

Als Basis für sämtliche in dieser Arbeit verwendeten Lösungen wird destilliertes Wasser (C+V Pharma-Depot GmbH, Deutschland) verwendet, welches entionisiert ist und *VDE 0510* sowie *DIN 43530* entspricht. Einer der Stammlösungsbehälter enthält reines destilliertes Wasser, das mit Phosphatpuffer (Morphisto GmbH, Deutschland) versetzt und auf den pH-Wert 7,4 stabilisiert wurde. Dies entspricht dabei dem pH-Wert von menschlichem Blut ($7,4 \pm 0,02$ [20], beziehungsweise $7,4 \pm 0,05$ [266]).

Die Konzentration der benötigten Glucose-Stammlösung hängt von der Anzahl der für die Messung verwendeten Stoffe ab. Werden durch das Spritzenpumpensystem zum Beispiel Glucose und Albumin gemischt, kommt es jeweils zu einer Verdünnung. Die Glucose-Stammlösung muss in diesem Fall dann die doppelte Konzentration des maximal in der Messung verwendeten Glucose-Wertes haben. Dafür wurde eine Stammlösung aus 1000 mg/dl hergestellt. Es wurden $50 \pm 0,001$ g D-Glucose Pulver (Sigma Aldrich, Deutschland) mit einer Präzisionswaage (Kern EW120-4NM, Kern & Sohn GmbH, Deutschland) abgewogen und in $5 \pm 0,0002$ Liter destilliertem Wasser gelöst, welches ebenfalls mit einer Waage (PCE-BSH 10000, PCE Instruments GmbH, Germany) abgewogen wurde. Hieraus resultiert ein absoluter Konzentrationsfehler von $\pm 0,012$ %. Zur Stabilisierung des pH-Wertes wurde die Stammlösung mit Phosphatpuffer versetzt. Wegen der auftretenden Mutarotation wird zum Erreichen des thermodynamischen Gleichgewichts zwischen α - und β -Glucose in der Literatur eine Zeit von 5 h [7] beziehungsweise 24 h [34] vorgeschlagen. Diese Zeit sollte eingehalten werden, um zusätzliche Driften zu verhindern.

Ähnlich wird auch bei der Anmischung von Eiweißlösungen verfahren. Stellvertretend für die Bluteiweiße wird Albumin verwendet, das mehr als 50 % der 341 im Blut vorhandenen Eiweiße ausmacht [28]. Aufgrund seiner dem menschlichen Albumin ähnlichen Eigenschaften [29] wird, wie bisher bereits in anderen Arbeiten geschehen [46, 147, 148], Rinderalbumin (Sigma Aldrich, Deutschland) verwendet. Besonders bei den Bluteiweißen ist jedoch zu beachten, dass bei steigender Temperatur eine zunehmende Denaturierung stattfindet, die ab 45 °C irreversibel ist [267, 268]. Aufgrund der mitunter langen Exposition der Eiweiß-Stammlösungen gegenüber der Umgebungstemperatur ist daher darauf zu achten, dass deren Temperatur nicht zu groß gewählt wird, um Denaturierungsvorgän-

gen vorzubeugen. Zur für die Messungen gewählten Temperatur werden in der Literatur generell wenig Angaben gemacht [34, 46, 145, 147–149, 151, 153, 154, 249]. Eine Zusammenfassung der Temperaturangaben liefert Tabelle 14 im Anhang. Eine grobe Orientierung geben die an anderer Stelle genannten Werte von 15 °C [150], 25 °C [112], 26 °C [150] oder Hasenkörpertemperatur [49]. Aufgrund der unterschiedlichen oder komplett fehlenden Angaben der Literatur ist davon auszugehen, dass die absolute Temperatur für die Durchführung der Messungen zweitrangig ist, solange keine Denaturierung der Eiweiße erfolgt. Zur längeren Haltbarkeit der Eiweiß-Stammlösungen wurde daher eine Temperatur von 32 °C gewählt.

Ein weiterer Faktor, der die Verwendbarkeit der Eiweiße einschränken kann, ist eventuell auftretendes Bakterienwachstum. Dem kann zum Beispiel mit 0,01 % Natriumazid entgegen gewirkt werden [269]. Dabei ist jedoch zu erwähnen, dass dessen extreme Toxizität eine Durchführung der Messungen erheblich aufwändiger macht. Neben der Entwicklung sehr giftiger Gase bei Berührung mit Säure müssten sämtliche bei den Messungen entstehende Flüssigkeiten gesondert entsorgt werden. Aus diesem Grund wurde auf eine Verwendung bei der Durchführung der Messungen verzichtet. Eine Übersicht über alle in den Messungen verwendeten Stoffe, ihre Reinheiten sowie ihre jeweiligen Hersteller ist in Tabelle 6 zu finden.

Tabelle 6: Übersicht der verwendeten Substanzen, ihrer Hersteller und der jeweiligen Reinheiten.

Stoff	Konzentration	Hersteller	Kommentar
Glucose	$\geq 99,5\%$	Sigma Aldrich	D-Glucose
Albumin	$\geq 98\%$	Sigma Aldrich	Rinderalbumin
Laktat	$\geq 99\%$	Sigma Aldrich	Natrium L-Laktat
Harnstoff	$\geq 99,5\%$	Merck	-
Ascorbinsäure	$\approx 100\%$	AmosVital	Vitamin C
Kochsalz	0,9 %	Braun	Infusionslösung
ClinOleic	20 %	Baxter	Infusionslösung
Allura Red AC	$\geq 80\%$	Sigma Aldrich	roter Farbstoff
Phosphatpuffer	10-fach	Morphisto	pH 7,4
Destilliertes Wasser	-	C+V Pharma Depot	-

Sind alle Stammlösungen befüllt, müssen die Glasspritzen der jeweiligen Pumpenmodule mit den entsprechenden Lösungen befüllt und entlüftet werden, da sonst durch die eventuell auftretende Druckkapazität Ungenauigkeiten entstehen könnten.

Einstellung des Aufbaus

Vor dem Start der Messung müssen noch einige Voraussetzungen erfüllt werden. Einer der wichtigsten Parameter ist die Orientierung der beiden Polarisationsfilter zueinander. Wird nur eine optisch aktive Substanz gemessen, werden die Filter üblicherweise nach Gleichung 21 senkrecht zueinander abgeglichen, sodass der $I(\omega)$ -Anteil ohne Probe Null beträgt.

Ein Sonderfall tritt jedoch ein, wenn Glucose und Eiweiße miteinander gemischt werden. Da D-Glucose rechts- und Eiweiße linksdrehend sind, kann es zu vom Betrag her gleichen Werten von Φ kommen, die jedoch durch völlig unterschiedliche Konzentrationsgemische verursacht wurden. Durch Einsatz eines Lock-In-Verstärkers könnte über die zusätzliche Phaseninformation das Vorzeichen des Winkels Φ aus Gleichung 21 auf Seite 30 ermittelt werden. Die verwendete Fouriertransformation aus Abschnitt 3.3.2 kann diese Information jedoch nicht liefern. Daher muss verhindert werden, dass es während einer Messung sowohl positive als auch negative Winkel Φ gibt. Eine Möglichkeit, dies zu realisieren, ist die Generierung eines Offsetwinkels Φ_{Offset} durch gezielte Verstellung der Polarisationsfilter, wie in Gleichung 33 gezeigt.

$$\Phi = \Phi_{\text{Glucose}} - \Phi_{\text{Eiweiss}} + \Phi_{\text{Offset}} \geq 0 \quad (33)$$

In diesem Fall werden immer in Summe positive Winkel erreicht (Drehung nach rechts), da der Offsetwinkel die Drehung durch die Eiweiße kompensiert. Um diesen zu bestimmen, wird die maximale Eiweißkonzentration ohne Glucose gemessen, die Filter abgeglichen und die Küvette anschließend wieder mit Wasser gefüllt. In dieser Konfiguration bedeutet eine hohe Glucose-Konzentration ein hohes und eine hohe Eiweiß-Konzentration ein niedriges $I(\omega)$ -Signal.

Als weitere Anforderung sollte das Spektrometer möglichst gut angesteuert sein, jedoch darf es zu keiner Übersteuerung des Detektorsignals kommen. Dies geschieht in der Regel dann, wenn die höchste Asymmetrie des Signals durch den höchsten $I(\omega)$ -Anteil vorhanden ist, was wiederum durch die höchste Glucose- bei gleichzeitig kleinster Eiweißkonzentration hervorgerufen wird. Daher wird die höchste während der Messreihe dosierte Glucose-Konzentration ohne Eiweiße gemessen und damit die Intensität der Lichtquelle durch die vorhandenen Lochblenden so eingestellt, dass der Dynamikbereich optimal ausgenutzt wird.

3.3.2 Steuerung des Messaufbaus

Um den Ablauf der Messungen zu vereinheitlichen, potentielle Fehlerquellen zu reduzieren und um autarke Langzeitmessreihen durchführen zu können, wurde eine Steuerungssoftware erstellt, mit der sowohl die jeweiligen Konzentrationen durch das Pumpensystem aus Abschnitt 3.1.7 angemischt werden, als auch die Frequenzanteile $I(DC)$, $I(\omega)$ und $I(2\omega)$ zeitlich synchronisiert mit dem Spektrometer aufgenommen und gespeichert werden können. Zudem ermöglicht die Software die Erstellung von Messreihen beliebiger Konzentrationsbereiche, die automatische Berechnung der dafür jeweils benötigten Volumina, die Überwachung der Umgebungsparameter sowie Teile der späteren Datenverarbeitung. Eine schematische Darstellung der einzelnen Aufgaben des Programms findet sich in Abbildung 28.

Zunächst können in der Software Einstellungen der Messparameter vorgenommen werden. Hierzu zählen zum Beispiel die Auswahl des Wellenlängenbereichs, die Integrationszeit des Spektrometers oder die Anzahl der aufzunehmenden Spektren. Eine Abbildung dieses Menüs zeigt Abbildung 29.

Im obersten Feld können die für den Betrieb des Spektrometers wichtigen Parameter wie der Wellenlängenbereich, die Anzahl der aufzunehmenden Spektren, die jeweilige Integrationszeit und eine mögliche Bildung eines Mittelwerts eingetragen werden. Auch kann die am Funktionsgenerator zur Steuerung des Faraday-Rotators eingestellte Modulationsfrequenz an das Programm übertragen werden, um in der Fouriertransformation die

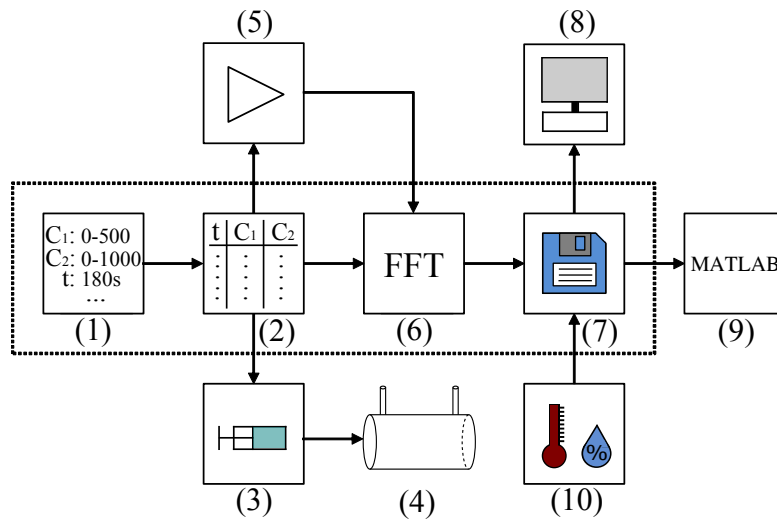


Abbildung 28: Funktionsweise der Steuerungssoftware (gestrichelter Kasten) und damit zusammenhängende Hardware-Komponenten: (1) Einstellung der Parameter, (2) Erstellung der Ablaufskripte, (3) Spritzenpumpe, (4) Durchflussküvette, (5) Spektrometer, (6) Fouriertransformation, (7) Abspeichern der Messwerte, (8): Anzeige der Werte, (9) Datenauswertung mit Matlab®, (10) Temperatur- und Luftfeuchtigkeitssensor.

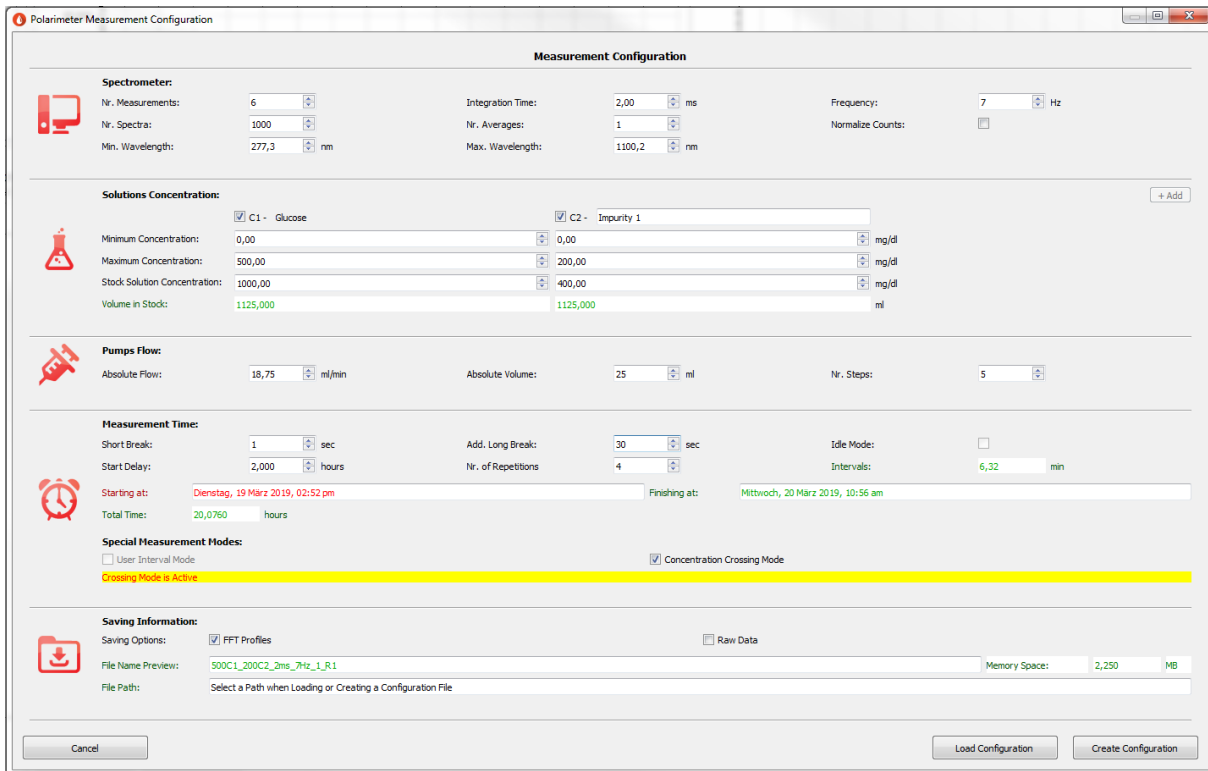


Abbildung 29: Einstellungsmenü zur Erstellung der Ablaufskripte der Steuerungssoftware.

Frequenzanteile $I(\omega)$ und $I(2\omega)$ korrekt zu bestimmen.

Zwar wird in der Literatur zur Identifikation von $I(\omega)$ meist ein Lock-In-Verstärker verwendet [34, 49, 50, 145, 147–154, 181, 249, 270–272], jedoch gestaltet sich dies bei dem verwendeten Spektrometer schwierig, da die Signale mit einer Referenzfrequenz multipli-

ziert werden müssten. Ein solches Signal steht zwar mit der Modulationsfrequenz ω des Faraday-Rotators zur Verfügung, jedoch müsste dieses für $I(2\omega)$ erzeugt und synchronisiert werden. Es wird daher eine Fouriertransformation verwendet, die in der Software nach Aufnahme der gewünschten Spektrenanzahl für jede Wellenlänge $I(DC)$, $I(\omega)$ und $I(2\omega)$ automatisch extrahiert. Wie sich das Signal mit den Frequenzanteilen $I(\omega)$ und $I(2\omega)$ stabilisieren lässt, wird in Abschnitt 3.3.3 ausführlich beschrieben.

Das Eingabefeld „*Solution Concentration*“ ist für die Parametrisierung der Mischungskomponenten vorgesehen. Hier wird für jeden Stoff der entsprechende Konzentrationsbereich und die Konzentration der Stammlösung eingestellt, aus denen das Programm automatisch die jeweiligen benötigten Volumina berechnet. Zur Kontrolle wird das benötigte Gesamtvolumen angezeigt, sodass gewährleistet werden kann, dass genügend Stammlösung vorhanden ist. Sind die Konzentrationsbereiche eingestellt, werden gleichmäßig über diesen Bereich in zufälliger Reihenfolge Konzentrationswerte erzeugt. Um bei Mischungen mit mehreren Substanzen lineare Abhängigkeit zu vermeiden, wird der Vorgang solange wiederholt, bis der Korrelationskoeffizient $R^2 \geq 0,01$ ist. Alternativ kann der *Crossing-Mode* gewählt werden, bei dem eine Matrix mit allen möglichen Konzentrationskombinationen erzeugt wird. Eine derartige Konzentrationsmatrix wird auch in anderen Arbeiten zur Evaluation des Einflusses einer Störsubstanz auf die Konzentrationsvorhersage verwendet [46, 120]. Diese Art der Konzentrationsanordnung eignet sich jedoch nur für eine kleine Anzahl an Stoffen, da die Anzahl möglicher Kombinationen exponentiell ansteigen würde. In Abbildung 30 ist der zeitliche Ablauf einer solchen Messung exemplarisch für jeweils 6 verschiedene Konzentrationen der Stoffe C_1 und C_2 dargestellt.

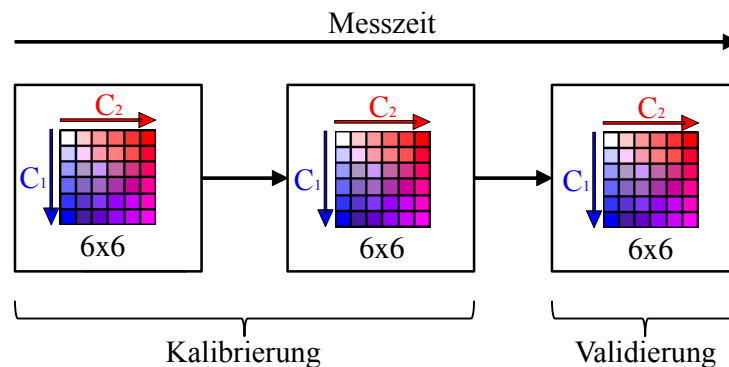


Abbildung 30: Ablauf einer Messung zur Konzentrationsvorhersage einer Substanz C_1 in Anwesenheit eines variierenden Störstoffs C_2 .

Die Konzentrationsmatrix der Größe 6x6 wird in diesem Fall 3 mal gemessen, sodass die ersten beiden Datensätze zur Erstellung des Kalibrationsmodells verwendet werden können und der letzte Datensatz, um das Kalibrationsmodell zu validieren. Alle Konzentrationen oder Stoffgemische werden innerhalb der Matrizen immer in zufälliger Reihenfolge gemessen, um eine Korrelation mit zeitabhängigen Störgrößen wie zum Beispiel Driften zu verhindern, was andernfalls mit in das Kalibrationsmodell übernommen werden würde [48]. Zur Kontrolle wird nach Einstellung aller Parameter die benötigte Menge der jeweiligen Stammlösungen angezeigt.

Das Eingabefeld „*Pump Flow*“ des Steuerungsprogramms beschäftigt sich explizit mit dem Küvettenfüllvorgang und der Pumpenansteuerung. Neben dem absoluten Probenvolumen lässt sich die Flussrate einstellen, mit der die Küvette befüllt wird. Außerdem kann die Anzahl der Schritte eingestellt werden, mit denen die Probe in die Küvette eingebracht

wird. Dieser Schritt ist einerseits nötig, da die Spritzen nur ein eingeschränktes Volumen bieten und wieder befüllt werden müssen. Andererseits lässt sich so der Spülvorgang verbessern und eine homogenere Mischung erreichen.

Im Feld „*Measurement Time*“ sind alle zeitlichen Einstellungen zusammengefasst. Dies beinhaltet einerseits die Länge der Pausen beim Spülen. Eine kurze Pause wird nach der Dosierung eingefügt, bevor das Zweiwegeventil umgeschaltet wird, um eventuelle Druckkapazitäten abzubauen. Die lange Pause erfolgt nach Einbringen der Probe, bevor die Messung der Intensität mit dem Spektrometer beginnt, um das Abklingen eventuell vorhandener Turbulenzen in der Küvette abzuwarten. Um nach dem Befüllen der Stammlösungen zunächst eine ausreichende Zeit abzuwarten, bis sich die Innentemperatur des Aufbaus nach dem Schließen der Türen wieder stabilisiert hat, lässt sich eine Verzögerung einstellen, nach der die Messung automatisch beginnt. Zu Kontrollzwecken werden die absolute Messzeit, der Startzeitpunkt sowie das Ende der Messung angezeigt.

Eine weitere Funktion, die über die Konfigurationsmaske aktiviert werden kann, ist der Leerlaufmodus, bei dem die Spritzenpumpen mit den gleichen Geschwindigkeiten wie in der Messung laufen, die Stammlösungen jedoch nur zwischen Vorratsbehälter und Spritzen hin und her gepumpt werden. Dies verbessert die Umgebungstemperaturstabilität, da die Spritzenpumpen durch elektrische Versorgung Abwärme erzeugen, die dadurch konstant gehalten wird. Diese Option kann für den Zeitraum des verzögerten Messstarts gewählt werden. Zudem kann wie bereits beschrieben mit dem *Crossing-Mode* eine Möglichkeit gewählt werden, im Rahmen der vorgesehenen Konzentrationsstufen jede mögliche Kombination der Einzelstoffe miteinander zu mischen.

Im Eingabefeld „*Saving Information*“ lassen sich die Speicherungsparameter einstellen. Hier ist wählbar, ob nur die aus den Rohdaten extrahierten Spektren der Frequenzanteile $I(DC)$, $I(\omega)$ und $I(2\omega)$ oder sämtliche Rohdaten gespeichert werden sollen. Zur Vorschau wird auch hier der zu erwartende Speicherbedarf ebenso angezeigt wie exemplarisch die Dateinamen, in denen sich neben den Konzentrationen auch die Integrationszeit, die Modulationsfrequenz sowie die Messwertnummer ablesen lassen. Zusätzlich wird zu jedem Messwert die aktuelle Innentemperatur sowie die Luftfeuchtigkeit gespeichert. Weitere Einstellmöglichkeiten finden sich im Anhang in Abbildung 91 auf Seite 168.

Aus diesen Einstellparametern werden dann zwei Ablaufskripte erstellt: Eines, wonach dieses Programm das Spektrometer steuert, die Frequenzanteile $I(DC)$, $I(\omega)$ und $I(2\omega)$ berechnet, sowie alle nötigen Informationen abspeichert. Das andere Skript wird von der Pumpensoftware neMESYS UserInterface der Spritzenpumpe aus Abschnitt 3.1.7 geladen. Beide Abläufe werden zeitgleich gestartet und laufen daraufhin synchron.

Um schon während der Messung einen vorläufigen Blick auf die Ergebnisse zu ermöglichen, sowie Informationen über den jeweiligen Messstatus zu erhalten, werden die aktuellen Messwerte in Echtzeit angezeigt. Exemplarisch ist die Anzeige der wichtigsten Informationen in Abbildung 31 dargestellt. Neben den Spektrometereinstellungen (oben links) wird in der linken Spalte die aktuelle Temperatur des Messaufbaus sowie die Luftfeuchtigkeit ausgegeben. Darunter erfolgt zur Orientierung die Anzeige des Messablaufs mit den aktuell dosierten Konzentrationswerten.

Im Hauptfenster befinden sich vier Diagramme. Oben links können die Rohdaten des Spektrometers angezeigt werden. Unten links sind die Spektren der Frequenzanteile $I(DC)$, $I(\omega)$ und $I(2\omega)$ dargestellt. Oben rechts befindet sich das Intensitätsverhältnis $\frac{I(\omega)}{I(2\omega)}$, das später in Abschnitt 4.1 im Hinblick auf eine erhöhte Messstabilität genauere Beachtung findet. Schließlich sind unten rechts die spektral gemittelten Intensitäten aller Frequenzanteile zu finden. Dieses Diagramm ist besonders wichtig, um bereits möglichst frühzeitig

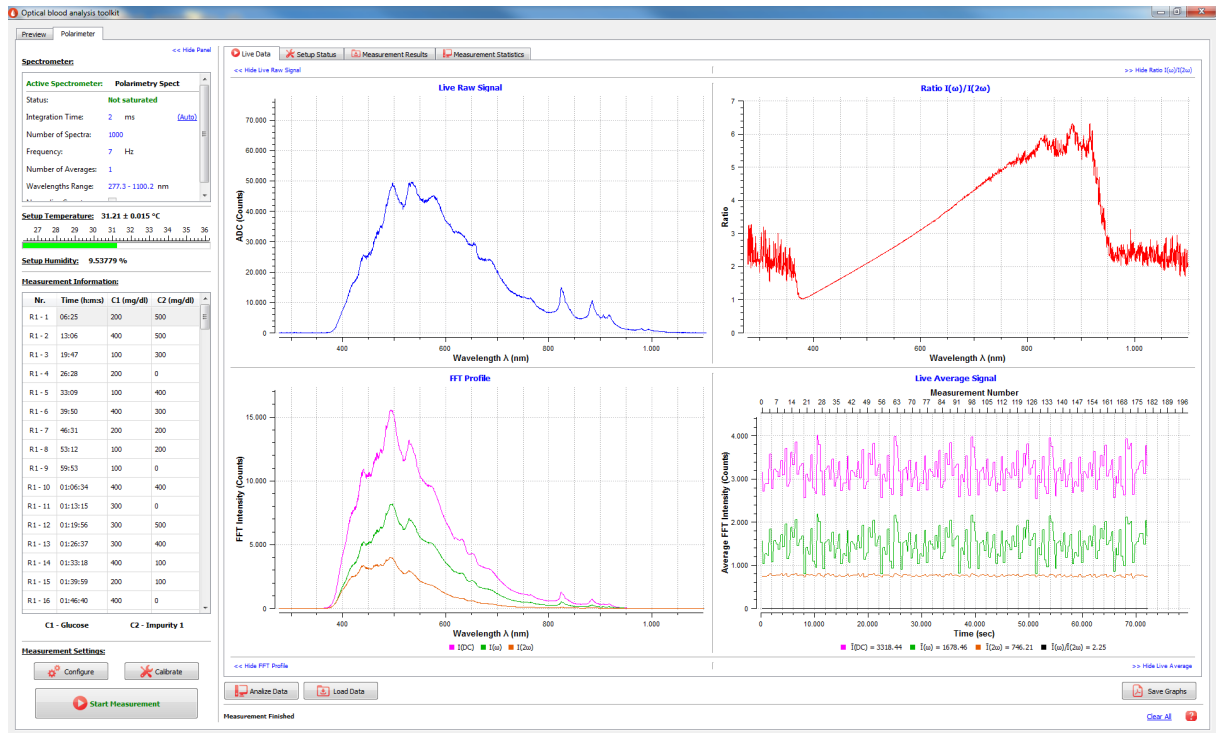


Abbildung 31: Anzeige der Messdaten aus der Steuerungssoftware.

während der Messung potentiell Driften des Messaufbaus, eine mögliche Fehlfunktion in der Magnetfeldsteuerung oder etwa eine Reduktion der Intensität durch zum Beispiel Verschmutzung der Küvette erkennen zu können.

Zudem bietet das Programm die Möglichkeit der zeitlichen Darstellung von Temperatur und Luftfeuchtigkeit mittels eines im Aufbau verwendeten Sensors (SHT75, Sensirion AG, Schweiz), wie in Abbildung 92 im Anhang zu sehen. Ebenfalls möglich ist die spätere Implementierung der aktuell in Matlab[®] realisierten Konzentrationsbestimmung, siehe Abbildung 93 und 94 auf Seite 169.

3.3.3 Datenauswertung

Die Auswertung der Daten erfolgt in mehreren Schritten. Eine Übersicht dieser Schritte zeigt Abbildung 32.

Bei Durchführung der Messung werden zunächst die Frequenzanteile $I(\omega)$ und $I(2\omega)$ betrachtet und durch Bildung des Verhältnisses $\frac{I(\omega)}{I(2\omega)}$ eine Stabilisierung des Messsignals erreicht (1). Anschließend erfolgt eine Datenvorbehandlung (2) mit Einstellung verschiedener Parameter wie dem Wellenlängenbereich, der vorherzusagenden Konzentration und der Anzahl der Hauptkomponenten für die multivariate Datenanalyse. Zu diesem Zweck wurde ein Auswertungsskript in Matlab[®] erstellt, welches neben der Datenvorbehandlung auch die Datensätze in Kalibrier- und Validierdaten aufteilt und die PLS-Regression durchführt (3). Die Grundlagen hierzu sind in Abschnitt 2.3 beschrieben, wo sich in Abbildung 13 auch ein schematisches Ablaufdiagramm hierzu befindet. Das daraus erstellte Kalibrationsmodell wird dann auf die Validierdaten angewandt und die vorhergesagte Konzentration mit der Referenzkonzentration verglichen. Unter Umständen werden diese Schritte mehrfach mit unterschiedlichen Parametern wiederholt, um eine optimale Vor-

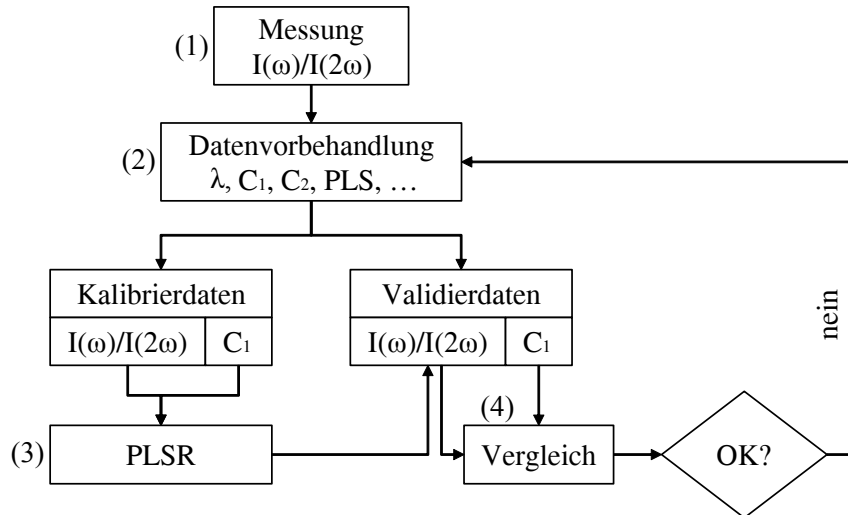


Abbildung 32: Schematische Darstellung der Datenauswertung: (1) Aufnahme der Messdaten mit Bildung des Intensitätsverhältnisses $\frac{I(\omega)}{I(2\omega)}$, (2) Datenvorbehandlung mit Auswahl verschiedener Parameter, (3) Durchführung der PLS-Regression, (4) Anwendung auf Validierdaten, Vergleich mit Referenzkonzentration.

hersagegenauigkeit zu erreichen.

Stabilisierung des gemessenen Intensitätssignals

Bevor das Signal des Spektrometers ausgewertet und zur Konzentrationsbestimmung verwendet wird, bietet es sich zum besseren Verständnis des Intensitätsverlaufs an, sich erneut mit der in Abschnitt 2.2.3 hergeleiteten Gleichung 21 für die transmittierte Intensität I zu befassen. Diese wurde angegeben mit:

$$I = \left[\underbrace{\left(\frac{\Theta_m^2}{2} + \Phi^2 \right)}_{DC} + \underbrace{2 \cdot \Phi \cdot \Theta_m \cdot \sin(\omega \cdot t)}_{\omega} - \underbrace{\frac{\Theta_m^2}{2} \cdot \cos(2 \cdot \omega \cdot t)}_{2\omega} \right] \cdot I_0 \cdot T_P \quad (21)$$

Üblicherweise wird in anderen Polarimetern der Frequenzanteil $I(\omega)$ wegen seiner linearen Abhängigkeit von der Polarisationsdrehung Φ durch die Probe für die Konzentrationsbestimmung verwendet. Eine Fehlerquelle, die sich hierbei offenbart, ist jedoch die Abhängigkeit des Frequenzanteils auch von der absoluten Lichtintensität I_0 und der Proben­transmission T_P . Um dem entgegenzuwirken, wurde in der Literatur ein Regelkreis (closed loop system) vorgeschlagen [260] und anschließend von zahlreichen anderen Autoren übernommen [34, 46, 50, 147, 149, 152, 153, 153, 249, 261, 273]. Bei diesen Regelkreisen wird die Drehung durch die Probe bei $I(\omega)$ per Lock-In gemessen und durch einen Offset im Faraday-Rotator abgeglichen, wobei der dafür nötige Strom als Messsignal erfasst wird.

Durch dieses Kompensationsverfahren kann der Einfluss der absoluten Lichtintensität minimiert werden. Jedoch ist zusätzlicher technischer Aufwand nötig und die Messzeit wird durch den Abgleichvorgang verlängert. Außerdem wurde diese Methode bisher nur für Laserlichtquellen eingesetzt. Φ ließe sich nur für eine Wellenlänge simultan abgleichen. Eine Verwendung im hier vorgestellten Breitbandpolarimeter wäre daher äußerst umständlich, weshalb eine effizientere Methode benötigt wird.

Beim Blick auf Gleichung 21 fällt auf, dass nicht nur $I(\omega)$, sondern auch $I(DC)$ und $I(2\omega)$ linear von der absoluten Lichtintensität I_0 und der Probenabsorption T_p abhängen. $I(2\omega)$ ist hingegen unabhängig von der Drehung Φ durch die Probe und wurde daher in der Literatur als Maß für die absolute Lichtintensität und die Absorption vorgeschlagen [220]. Da durch Anwendung der Fouriertransformation zur Extraktion der Frequenzanteile des Signals (siehe Abschnitt 3.3.2) sämtliche Frequenzanteile zur Verfügung stehen, bietet es sich an, für die folgenden Messungen das Verhältnis aus dem probenabhängigen $I(\omega)$ und dem probenunabhängigen $I(2\omega)$ zu bilden.

$$\frac{I(\omega)}{I(2\omega)} \propto \frac{2 \cdot \Phi \cdot \Theta_m}{\Theta_m^2} \cdot \frac{I_0 \cdot T_P}{I_0 \cdot T_P} = 4 \cdot \frac{\Phi}{\Theta_m} \quad (34)$$

Im Vergleich mit dem üblicherweise verwendeten $I(\omega)$ ist das Verhältnis $\frac{I(\omega)}{I(2\omega)}$ zwar immer noch linear abhängig von der Drehung Φ durch die Probe, jedoch unabhängig von der absoluten Lichtintensität I_0 und der Probenabsorption T .

Das Verhältnis $\frac{I(\omega)}{I(2\omega)}$ kann auch für die Verwendung einer Laserlichtquelle vorteilhaft sein. Da das erste Polarisationsfilter in Abbildung 24 linear polarisiertes Licht transmittiert, wird eine dazu senkrechte Amplitude des von der Lichtquelle emittierten Lichts um den Faktor des Polarisationsfilter-Auslöschungsverhältnisses abgeschwächt. Für die verwendeten Glan-Thompson-Filter liegt dieses bei 1 : 100.000, siehe Abschnitt 3.1.2. Dies führt zu einem vernachlässigbaren Einfluss der senkrecht zum Polfilter stehenden Amplitude auf das Signal und nur die parallele Komponente trägt messbar zur absoluten Lichtintensität I_0 bei. Eine Schwankung der Ausgangspolarisation der Lichtquelle, welche ein allgemein bekanntes Problem bei Lasern ist, kann daher ähnlich wie eine absolute Schwankung der absoluten Lichtquellenintensität behandelt werden. Daher ist davon auszugehen, dass das Verhältnis $\frac{I(\omega)}{I(2\omega)}$ auch in der Lage ist, einen solchen Drift des Polarisationszustands der Lichtquelle zu kompensieren [1].

Verglichen mit anderen in der Literatur beschriebenen Verfahren zur Kompensation von Intensitätsschwankungen nutzt diese Methode die im Signal enthaltenen Informationen vollständiger aus. Da die Frequenzanteile $I(\omega)$ und $I(2\omega)$ stets zeitgleich gemessen werden, bedarf es keiner zusätzlichen Messzeit und die in dieser Arbeit entwickelte Methode kann als Echtzeit-Intensitätskompensation bezeichnet werden. Außerdem wird keine zusätzliche Hardware für einen strombasierten Winkelabgleich benötigt. Da die beiden Frequenzanteile für die gleichen Wellenlängen extrahiert werden, kann das Verhältnis $\frac{I(\omega)}{I(2\omega)}$ für alle Wellenlängen gleichzeitig gebildet werden, was als einer der größten Vorteile angesehen werden kann. Die spektrale Auflösung hat daher keinen Einfluss auf die für die Intensitätskompensation benötigte Zeit. Die Auswirkungen auf das Signal in Abhängigkeit von schwankender Lichtquellenintensität, variierender Probenabsorption sowie auftretenden Streueffekten in der Probe sind in Abschnitt 4.1 beschrieben und wurden veröffentlicht [1].

Datenvorbehandlung

Nachdem die zu jedem Messwert erzeugten Messdaten in das Matlab[®] Programm übertragen wurden, beginnt die Datenvorbehandlung, die einen maßgeblichen Einfluss auf die Bestimmbarkeit der jeweiligen Konzentration hat [230, 231]. Bei Stoffgemischen ist durch die Steuerungssoftware zu jedem Messwert die jeweilige Konzentration der Einzelstoffe als x -Wert hinterlegt. In der Regel erfolgt eine Konzentrationsbestimmung für Glucose bei Vorhandensein anderer Stoffe wie zum Beispiel Albumin als Störstoff. Es ist jedoch auch möglich, das Kalibrationsmodell mit Konzentrationswerten des Störstoffs - in diesem Fall Albumin - zu kalibrieren. Dadurch wird eine simultane Bestimmung beider Stoffe möglich.

Zwar wird für die folgenden Messungen als Standard das Intensitätsverhältnis $\frac{I(\omega)}{I(2\omega)}$ zur verbesserten Messstabilität und Reproduzierbarkeit verwendet. Da jedoch die Frequenzanteile $I(DC)$, $I(\omega)$ und $I(2\omega)$ auch separat aufgezeichnet werden, ist zur Konzentrationsbestimmung auch eine nachträgliche Variation der Eingangsdaten möglich. Dies ist insbesondere dann interessant, wenn zum Beispiel eine Absorptionsbestimmung mit dem Frequenzanteil $I(2\omega)$ durchgeführt werden soll. Auch kann bei Instabilitäten des Messaufbaus das relative Verhalten der Frequenzanteile zueinander Aufschluss über die Ursachen geben, da sich bestimmte Störeinflüsse auf charakteristische Weise äußern, siehe Gleichung 21. Mehr Informationen zur Untersuchung von Störeinflüssen finden sich in Abschnitt 3.4. Ebenfalls eingestellt werden kann im Programm der bei der Auswertung verwendete Wellenlängenbereich. Zwar ist es mit dem Spektrometer möglich, Daten im Wellenlängenbereich von 277 – 1100 nm aufzunehmen, jedoch sind die Signale im UV- und NIR-Bereich stark verrauscht und weisen keine nutzbaren Informationen mehr auf. Es muss daher ein Kompromiss aus Signalstärke und spektraler Information gefunden werden, der an dieser Stelle evaluiert werden kann. Eine spektrale Mittelwertbildung kann hier bedingt sinnvoll sein, sofern die Daten stark verrauscht sind und durch die Mittelung keine spektralen Informationen verloren gehen.

Eine bekannte Schwierigkeit bei der Konzentrationsbestimmung sind nichtlineare Zusammenhänge zwischen Konzentration und Spektren. Dies ist in der Absorptionsspektroskopie aufgrund des Lambert-Beer-Gesetzes ein übliches Phänomen. Abhilfe kann hier eine Logarithmierung der Daten schaffen [86], die in Abschnitt 4.2.1.2 zum Einsatz kommt. Für Messungen, die auf der Rotationsdispersion basieren, herrschen jedoch näherungsweise lineare Zusammenhänge, wie in Gleichung 21 gezeigt.

Nach diesen Schritten werden die aufgenommenen Daten wie in Abschnitt 2.3.1 beschrieben, in Kalibrier- und Validierdaten aufgeteilt. Je nachdem, welche Daten ausgewählt werden, kommt es zu unterschiedlichen Bestimmungsgenauigkeiten. Auch kann entschieden werden, ob einzelne Daten als offensichtliche Ausreißer, wie zum Beispiel durch Luftblasen in der Küvette verursacht, von der Regression ausgeschlossen werden. Es besteht ebenfalls die Möglichkeit, zum Beispiel Anfangswerte, bei denen noch Drift auf, nicht zu berücksichtigen.

Multivariate Datenauswertung

Unter den Verfahren der multivariaten Datenanalyse hat sich in den letzten Jahren die PLS-Regression in besonders vielen spektroskopischen Anwendungen bewährt [41, 45, 48, 88, 97, 99–101, 105, 118, 121, 124, 139, 274, 275]. Grundsätzlich ist die PLS-Regression in der Lage, den Einfluss von Drifteffekten zu reduzieren [139], auch aus schwachen Signalen noch akzeptable Korrelationen zu extrahieren [143] und spektral zwischen verschiedenen Stoffen zu unterscheiden. Die Grundlagen hierzu wurden in Abschnitt 2.3.1 behandelt.

Bei der Auswahl der Spektren muss zunächst unterschieden werden, ob eine retrospektive oder eine prospektive Konzentrationsbestimmung erfolgen soll. Retrospektiv bedeutet in diesem Zusammenhang, dass in der Vergangenheit liegende Konzentrationswerte bestimmt werden und die Spektren gleichmäßig über den Zeitbereich in Kalibrier- und Validierdaten aufgeteilt werden. Für die Praxis relevanter sind jedoch prospektive Bestimmungen, bei denen eine gewisse Anzahl Kalibrierspektren aufgenommen werden, daraus das Kalibrationsmodell erstellt wird und anschließend eine Validierung mit ebenfalls einer gewissen Anzahl zeitlich zusammenhängender Spektren erfolgt. Eine solche prospektive Bestimmung nach Abbildung 30 ist das Ziel der Arbeit.

Neben der Datenvorbehandlung ist die Anzahl der für die Modellbildung verwendeten

Komponenten wichtig, siehe Abschnitt 2.3.1. Je mehr Komponenten verwendet werden, desto besser werden die Zusammenhänge zwischen Konzentration und Spektren beschrieben. Jedoch werden auch mehr Störgrößen mit einbezogen. Es bedarf daher einer gewissen Variation, um die optimale Anzahl an Komponenten für das Regressionsmodell zu finden. Die eigentliche Modellbildung findet in Matlab[®] mit dem bereitgestellten *plsregress*-Befehl der *Statistics Toolbox* statt. Eingabeparameter sind die Konzentrationswerte der Kalibrierdaten als x -Werte, sowie die Spektren als y -Werte und die Anzahl an gewünschten Komponenten. Nachdem die Abhängigkeit der Spektren von der Konzentration bestimmt wurde, liefert die Funktion unter anderem die Gewichtswerte (Scores) und die Ladungswerte (Loadings) als Rückgabewerte, aus denen sich bei bekannter Anzahl an Faktoren das Regressionsmodell bilden lässt. Dieses Modell, also der Zusammenhang zwischen Spektren und Konzentration, wird dann auf die Spektren der Validierdaten angewendet und so deren Konzentration bestimmt. Dabei wird die Abweichung zu den Referenzkonzentrationswerten errechnet, was Aufschluss über die Güte des Modells gibt.

Eine Berechnung des Fehlers bei der multivariaten Datenanalyse erfolgt üblicherweise mit dem SEP, also dem Standard Vorhersagefehler [26]. Die Gegenüberstellung von Referenz- und Vorhersagewerten findet oft mittels des in Abbildung 1 gezeigten Clarkes Error Grids statt.

3.4 Untersuchung von Störeinflüssen

Ein elementar wichtiges Kapitel zur Beschreibung des Messaufbaus ist die Untersuchung von Störeinflüssen. Diese lassen sich in zwei Kategorien aufteilen. Hierzu zählen einerseits Störeinflüsse, die einen direkten Einfluss auf das Signal haben und nicht auf eine bestimmte Art wie zum Beispiel durch Normierung rechnerisch ausgeglichen werden können. Hierzu zählen die mechanischen Einflüsse auf den Messaufbau, Probeneigenschaften, Probenmischung sowie Schwankungen in der Faraday-Modulation. Diese Art von Störeinflüssen muss daher so gering wie möglich gehalten werden, um die Auswirkungen auf das Signal zu minimieren. Eine Untersuchung findet in diesem Kapitel statt.

Die zweite Art von Störquellen sind diejenigen, deren Auswirkungen auf das Signal durch ein bestimmtes Verfahren kompensiert werden können, das im Rahmen dieser Arbeit entwickelt und veröffentlicht wurde [1] und gesondert in Abschnitt 4.1 behandelt wird. Betroffen sind Schwankungen der Lichtquellenintensität, der Probenabsorption sowie leichte Streueffekte.

3.4.1 Mechanische Einflüsse

Ein potentieller Störeinfluss auf sämtliche Messungen sind mechanische Verspannungen, die sich in einer Torsion des Aufbaus und somit in einer Veränderung der Polarisationsfilter-Stellung bemerkbar machen. Da sich ein solcher Offset Φ_{Filter} mit der tatsächlichen Drehung Φ_{Probe} durch die Probe überlagert, bewirkt dies einen Messfehler. In erster Linie wird dieser Effekt im statischen Zustand durch Temperaturschwankungen hervorgerufen. Die Temperatur hat auch direkte Auswirkungen auf die Probe, die gesondert in Abschnitt 3.4.2.3 betrachtet werden. In diesem Unterabschnitt wird ausschließlich der Temperatureinfluss auf den Messaufbau behandelt.

Der polarimetrische Teil des Messaufbaus befindet sich, wie in Abbildung 16 gezeigt, auf einer Bodenplatte. Um mechanische Spannungen durch unterschiedliche Temperaturendeckungen zwischen Platte und Käfigsystem zu vermeiden, wurde auf eine starre Verbindung mit der Bodenplatte verzichtet. Eine direkte, temperaturabhängige mechani-

sche Torsion geht von der Mikrometerschraube der einstellbaren Polarisationsfilterhalter (G065088000, Qioptiq Photonics GmbH & Co. KG, Deutschland) aus. Da in Abhängigkeit von den zu messenden Proben eine individuelle Justage der Filter nötig ist (siehe Abschnitt 3.3.1), kann auf ihre Verwendung nicht verzichtet werden. Eine Darstellung dieses Filterhalters mit Illustration der mechanischen Zusammenhänge findet sich in Abbildung 33.

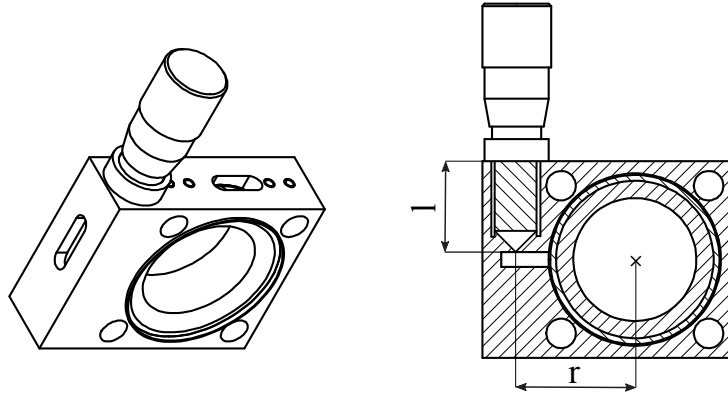


Abbildung 33: Polarisationsfilterhalter mit Hauptmaßen [276].

Durch Drehen der Mikrometerschraube kann deren Länge $l = 20$ mm leicht verändert werden, dass am Radius $r = 24$ mm angreifend das eingespannte Polarisationsfilter entsprechend gedreht wird. Über eine Feder wird eine Rückstellkraft erzeugt, die gewährleistet, dass immer ein mechanischer Kontakt zwischen Mikrometerschraube und drehbarem Teil der Halterung vorhanden ist. Nach Justage der Filter zur Vorbereitung des Messaufbaus wird die Schraube nicht mehr bewegt. Ihre Länge kann sich jedoch trotzdem durch thermische Ausdehnung verändern. Der Chrom-Nickel-Stahl der Mikrometerschraube hat einen Wärmeausdehnungskoeffizienten von $\beta = 1,6 \cdot 10^{-5} \frac{1}{\text{K}}$ [277]. Hieraus lässt sich die Ausdehnung und somit die thermisch bedingte Rotation Φ_{th} für eine Temperaturschwankung von $\Delta T = 1$ K folgendermaßen abschätzen:

$$\Phi_{\text{th}} = \arctan\left(\frac{l \cdot \beta}{r}\right) = \arctan\left(\frac{20 \text{ mm} \cdot 16 \cdot 10^{-6} \frac{1}{\text{K}} \cdot 1 \text{ K}}{24 \text{ mm}}\right) \approx 764 \mu \text{ grad} \quad (35)$$

Dem gegenüber steht eine spezifische Drehung $\alpha = 660,2 \frac{\text{mdeg}\cdot\text{l}}{\text{g}\cdot\text{m}}$ Glucose bei 532 nm nach Gleichung 4. Bei einer verwendeten Pfadlänge von 50 mm bedeutet dies $33,01 \frac{\text{mdeg}\cdot\text{ml}}{\text{g}}$. Bezogen auf die thermisch induzierte mechanische Torsion resultiert ein Fehler von:

$$\frac{\Phi_{\text{th}}}{\Delta T \cdot \alpha} = \frac{764 \mu \text{ grad}}{1 \text{ K} \cdot 22,81 \frac{\text{mdeg}\cdot\text{l}}{\text{g}}} = \pm 3,34 \cdot 10^{-2} \frac{\text{g}}{\text{ml} \cdot \text{K}} = \pm 0,334 \frac{\text{mg}}{\text{dl} \cdot \text{K}} \quad (36)$$

Der sich ergebende Fehler von $\pm 0,334 \frac{\text{mg}}{\text{dl}\cdot\text{K}}$ gilt jedoch nur für eine Wellenlänge von 532 nm und nur für Glucose. Aufgrund der Rotationsdispersionen aus Abbildung 8 auf Seite 24 ergibt sich eine Wellenlängen- und Stoffabhängigkeit. Eine Übersicht über die resultierenden Vorhersagefehler für unterschiedliche Stoffe bei unterschiedlichen Wellenlängen liefert Abbildung 34.

Wellenlängen- und Stoffabhängigkeit führen nicht nur zu einem direkten Vorhersagefehler für reine Lösungen, sondern können bezüglich der Unterscheidung der Moleküle anhand

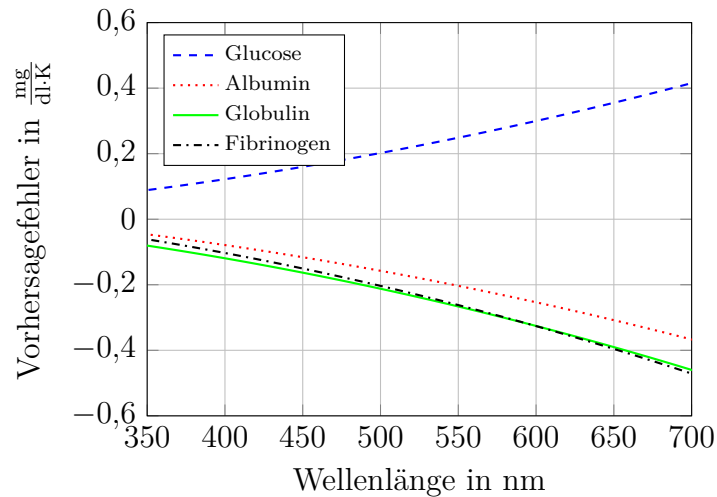


Abbildung 34: Auswirkungen von Temperaturschwankungen auf die Filterhalter.

der Rotationsdispersionen zu zusätzlichen Ungenauigkeiten führen. Zudem kann zusätzliche Torsion des restlichen Aufbaus nicht vollständig ausgeschlossen werden. Die Temperatur ist daher so konstant wie möglich zu halten. Schwankungen innerhalb einer Messreihe sind als kritisch anzusehen, das absolute Temperaturlevel ist, solange es während der Aufnahme der Kalibrier- und Validierdaten gleich gehalten wird, weniger kritisch.

Da die Temperatur vom Steuerungsprogramm aus Abschnitt 3.3.2 mittels eines SHT75 Sensors (Sensirion AG, Deutschland) während der Messungen aufgezeichnet werden kann, lässt sich die Temperaturstabilität einfach überprüfen. Exemplarisch ist die Temperatur während einer Messung für eine Messzeit von circa 20 h in Abbildung 35 für den 13.04.2019 dargestellt.

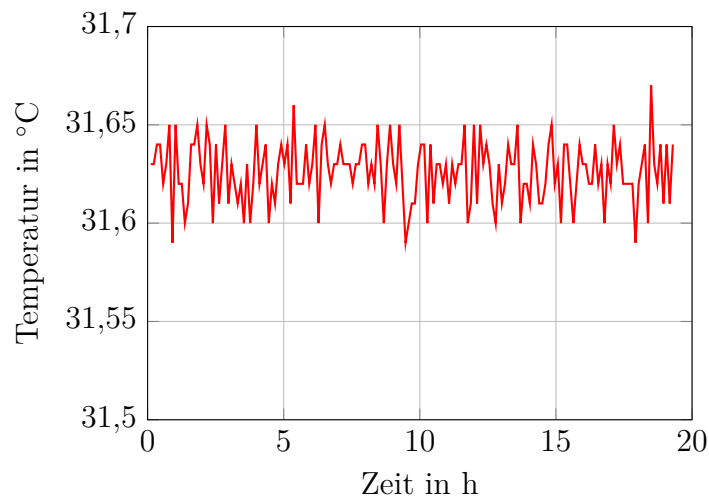


Abbildung 35: Temperaturstabilität des Messaufbaus.

Zwischen der am Temperaturregler aus Abschnitt 3.1.8 eingestellten Temperatur von 32 °C und der am Sensor gemessenen Temperatur gibt es eine leichte Abweichung, welche mit Bauteiltoleranzen erklärt werden kann. Für die Messungen ist die Temperaturstabilität jedoch deutlich wichtiger als die absolute Genauigkeit. Daher ist entscheidend, dass die

Temperatur während des kompletten 20-stündigen Messvorgangs konstant bleibt und eine Standardabweichung von lediglich $\pm 0,0155$ K aufweist. Der in Abbildung 34 aufgezeigte Fehler pro K liegt somit bei deutlich unter $1 \frac{\mu\text{g}}{\text{dl}}$.

3.4.2 Probeneigenschaften

Zunächst werden die direkten Probeneigenschaften betrachtet. Gemeint ist hiermit in erster Linie die spezifische Rotationsdispersion verschiedener optisch aktiver Moleküle sowie der Einfluss der Temperatur und des pH-Werts auf die Stärke der ORD, die teilweise von der Literatur als erheblich angegeben wird [150,191]. Außerdem stellt die Absorption der Bluteiweiße einen weiteren möglichen Störeinfluss auf die Messung dar.

3.4.2.1 Rotationsdispersion optisch aktiver Blutinhaltsstoffe

Die Messung der spezifischen Rotationsdispersion ist ein wichtiger Schritt auch bei der Beurteilung, welche Stoffe bei der späteren Konzentrationsbestimmung hinderlich sein können. Hilfreich sind in diesem Zusammenhang die aus der Literatur bekannten physiologischen Stoffkonzentrationen, aus denen sich die absoluten Drehwinkel bestimmen lassen. Hier finden sich auch Hinweise darauf, welche Stoffe aufgrund ihrer geringen Drehung vernachlässigt werden können [7].

Da im Frequenzanteil $I(\omega)$ in Gleichung 21 nur ein proportionaler jedoch kein direkter Zusammenhang zwischen dem Probendrehwinkel und der gemessenen Intensität besteht, muss ein Weg gefunden werden, den absoluten Drehwinkel zu bestimmen. Die Modulationstiefe Θ_m hat einen unmittelbaren Einfluss auf die Höhe der detektierten Intensität $I(\omega)$. Außerdem setzt sich der scheinbar gemessene Probendrehwinkel Φ aus dem Polarisationsfilter Offset Φ_{Filter} und dem tatsächlichen Probendrehwinkel Φ_{Probe} zusammen, siehe Abschnitt 3.3.1.

Wie bereits in Abschnitt 3.3.3 beschrieben, können durch das Intensitätsverhältnis

$$\frac{I(\omega)}{I(2\omega)} \propto 4 \cdot \frac{\Phi}{\Theta_m} \quad (37)$$

Schwankungen der absoluten Lichtintensität kompensiert werden. Neben den bereits erwähnten Einflüssen bleibt jedoch insbesondere der potentielle Offset des Polarisationsfilters als Störquelle. Dieser kann allerdings bewusst dazu genutzt werden, den fraglichen Zusammenhang zu klären.

Dafür wird die Küvette zunächst mit Wasser gefüllt und die beiden Polarisationsfilter über die Mikrometerschraube der Rotationshalterung des zweiten Filters abgeglichen, sodass sowohl $\Phi_{\text{Filter}} = 0^\circ$ als auch $\Phi_{\text{Probe}} = 0^\circ$ und $I(\omega) = 0$ werden. Anschließend wird über die Rotationshalterung ein Offset von $0,5^\circ$ eingestellt, sodass Φ ausschließlich aus dem Filteroffset besteht und es gilt:

$$\frac{I_{\text{Filter}}(\omega)}{I_{\text{Filter}}(2\omega)} = 4 \cdot \frac{\Phi_{\text{Filter}} + \Phi_{\text{Probe}}}{\Theta_m} = 4 \cdot \frac{0,5^\circ + 0^\circ}{\Theta_m} = 4 \cdot \frac{0,5^\circ}{\Theta_m} \quad (38)$$

Mit diesem Verhältnis ist der Bezug zwischen einem bestimmten Drehwinkel und der zugehörigen Intensität hergestellt. Im nächsten Schritt werden dann die Polarisationsfilter wieder abgeglichen, wodurch gilt: $\Phi = \Phi_{\text{Filter}} + \Phi_{\text{Probe}} = 0^\circ$. Dann wird die zu messende Probe bekannter Konzentration in die Küvette gegeben, wodurch sich Φ ausschließlich aus der Rotationsdispersion der Probe Φ_{Probe} zusammensetzt. Es folgt

$$\frac{I_{\text{Probe}}(\omega)}{I_{\text{Probe}}(2\omega)} = 4 \cdot \frac{\Phi_{\text{Filter}} + \Phi_{\text{Probe}}}{\Theta_m} = 4 \cdot \frac{0^\circ + \Phi_{\text{Probe}}}{\Theta_m} = 4 \cdot \frac{\Phi_{\text{Probe}}}{\Theta_m} \quad (39)$$

Da sowohl Gleichung 38 als auch Gleichung 39 die Modulationstiefe des Faraday-Rotators Θ_m enthalten, kann diese durch Bildung des Verhältnisses kompensiert werden.

$$\frac{\frac{I_{\text{Probe}}(\omega)}{I_{\text{Probe}}(2\omega)}}{\frac{I_{\text{Filter}}(\omega)}{I_{\text{Filter}}(2\omega)}} = \frac{4 \cdot \frac{0^\circ + \Phi_{\text{Probe}}}{\Theta}}{4 \cdot \frac{1^\circ + 0^\circ}{\Theta}} = \frac{\Phi_{\text{Probe}}}{\frac{0,5^\circ}{\Theta}} = \frac{\Phi_{\text{Probe}}}{0,5^\circ} \quad (40)$$

Auf diese Weise lässt sich der Rotationswinkel für jede Wellenlänge bestimmen. Die gemessene Drehung wurde dabei auf die jeweilige Konzentration und die Pfadlänge der Küvette von 50 mm normiert, sodass die spezifische Rotationsdispersion mit der Einheit $\frac{\text{mdeg}\cdot\text{l}}{\text{m}\cdot\text{g}}$ ergibt. In diesem Zusammenhang wurden in einer im Rahmen dieser Dissertation erstellten Masterarbeit die gängigsten Blutinhaltsstoffe gemessen [278]. Hierzu wurden Glucose, Albumin, Laktat und Harnstoff als Pulver in Wasser gelöst und mit Phosphatpuffer zunächst auf einen pH-Wert von 7,4 gebracht. Zusätzlich wurde eine Kochsalz-Infusionslösung sowie Ascorbinsäure mit dem pH-Wert von 5,2 gemessen. Eine Übersicht über die gemessenen Rotationsdispersionen zeigt Abbildung 36.

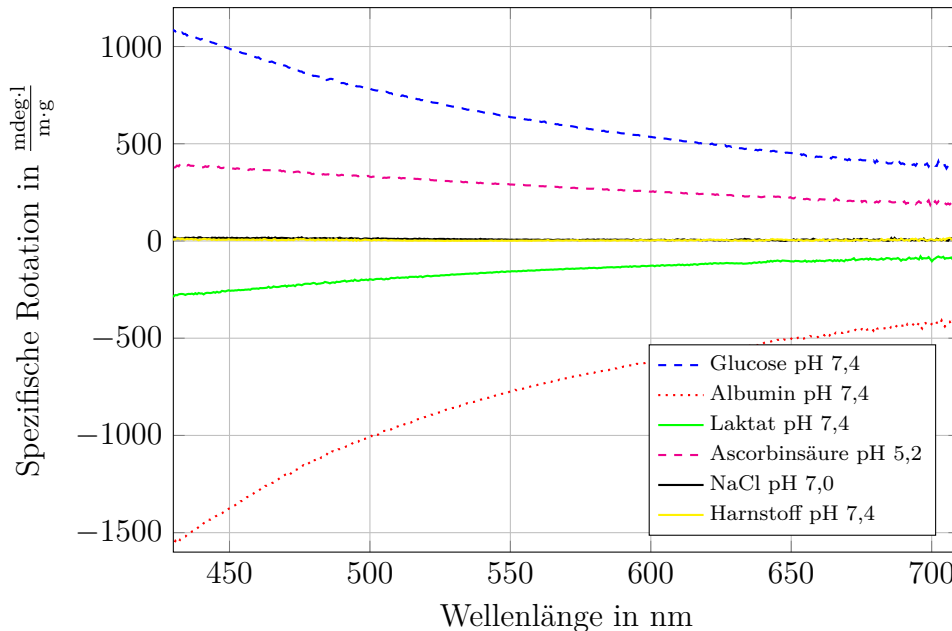


Abbildung 36: Spezifische Rotationsdispersion verschiedener Blutinhaltsstoffe.

Zu erkennen ist, dass Glucose und Ascorbinsäure eine positive Rotationsdispersion aufweisen, also die Polarisationssebene rechts herum im Uhrzeigersinn drehen, wobei Glucose stärker als Ascorbinsäure dreht. Aufgrund seiner äußerst geringen Konzentration im Blutplasma von circa $0,7 - 1,1 \text{ mg/dl}$ [7] (Tabelle 1) trägt Ascorbinsäure jedoch darüber hinaus nur einen sehr geringen Teil zur Gesamtdrehung bei. Von der Glucose geht dank der starken spezifischen Drehung und der hohen Konzentration ein deutlich intensiveres Signal aus, weshalb sich die Polarimetrie zu seiner Bestimmung besonders eignet.

Albumin und Laktat weisen hingegen eine linksseitige Drehung auf, wobei der Einfluss von Laktat hierbei als vernachlässigbar beschrieben wird [7]. Das im Blut enthaltene Albumin stellt jedoch auch wegen seiner großen Konzentrationsvarianz von $4200 \pm 540 \text{ mg/dl}$ einen immensen potentiellen Störfaktor dar [22, 23]. Dieser Effekt wird daher in Abschnitt 4.2.1 intensiv betrachtet.

Natriumionen und Harnstoff hingegen zeigen keine optische Aktivität, was basierend auf

der Literatur, mangels Chiralität ebenfalls erwartet wurde [7]. In Abschnitt 3.4.2.2 und 3.4.2.3 werden der Temperatur- und pH-Wert-Einfluss auf die relevantesten Blutinhaltsstoffe Glucose und Albumin untersucht. Ebenso erfolgt ein quantitativer Vergleich der Rotationsdispersion mit den Literaturwerten. Für Stoffe wie Laktat oder Ascorbinsäure liegen in der Literatur keine zuverlässigen Angaben zur Berechnung mittels der Drude- oder der Moffitt-Yang-Gleichung vor [29, 144], siehe hierzu Abschnitt 2.1.1. Lediglich für eine Wellenlänge war die spezifische Rotation für diese beiden Stoffe verfügbar [7].

3.4.2.2 pH-Einfluss

In der Literatur finden sich bezüglich des pH- und Temperatureinflusses widersprüchliche Angaben. So wird berichtet, dass eine Veränderung des pH-Wertes von 6,8 auf 7,5 etwa eine Verdopplung der spezifischen Rotationsdispersion zur Folge hätte [150, 191], jedoch gleichzeitig der Einfluss oberhalb von 600 nm vernachlässigbar sei. An anderer Stelle wird von vernachlässigbarem Einfluss berichtet [29, 190]. Um Klarheit über den tatsächlichen Einfluss des pH-Wertes auf die Rotationsdispersion von Glucose und Albumin zu schaffen, wurde der pH-Wert dieser Lösungen bei konstanter Temperatur variiert. Eine Bestimmung der Rotationsdispersion erfolgte wie in Abschnitt 3.4.2.1 beschrieben.

Für Blut werden pH-Werte von 7,35 – 7,4 [266] genannt. In interstitieller Flüssigkeit kann der Wert im Bereich von 7,2 – 7,4 liegen [266] und in der Augenflüssigkeit bei 6,5 – 7,6 [266]. Um einen gewissen Schwankungsbereich abzudecken und dennoch in einem realistischem Rahmen zu bleiben, wurde der pH-Wert im Bereich von 6,8 bis 7,6 variiert.

Zu diesem Zweck wurden Pufferlösungen mit den pH-Werten 6,8, 7,2, 7,4 und 7,6 durch Mischung von Kaliumhydrogenphosphat (KH_2PO_4) und Natriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4) hergestellt [279]. Anschließend erfolgte eine Kontrolle mittels pH-Messgerät (InfolabTM 7110, Thermo Fisher Scientific Inc., USA). Mit diesem Puffer wurden dann die Glucose- und Laktat-Lösungen auf den jeweils gewünschten pH-Wert eingestellt und ihre Rotationsdispersion gemessen. Es folgte ein quantitativer und qualitativer Vergleich mit den aus Tabelle 2 bekannten Parametern für die Drude-Gleichung (Gleichung 4) beziehungsweise Abbildung 8. Eine direkte Gegenüberstellung der gemessenen Rotationsdispersionen für verschiedene pH-Werte erfolgt in Abbildung 37 für Glucose und Albumin.

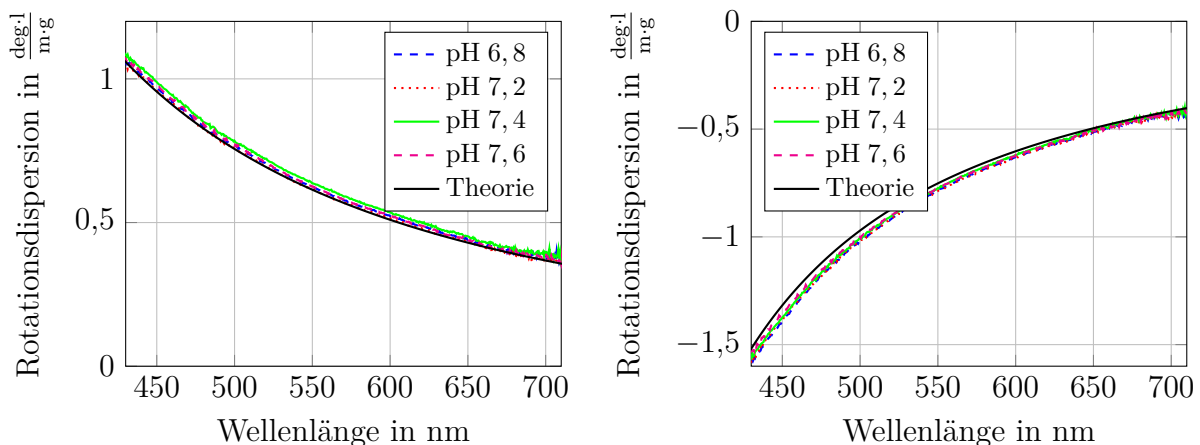


Abbildung 37: Gemessene, spezifische Rotationsdispersion in Abhängigkeit vom pH-Wert, verglichen mit den theoretischen Werten aus Abbildung 36. Links: Glucose, rechts: Albumin

Bei Betrachtung von Abbildung 37 fällt zunächst auf, dass die ermittelten Rotationsdispersionen sowohl qualitativ als auch quantitativ sehr genau mit den theoretischen Werten übereinstimmen. Für Glucose folgt aus der Theorie nach Drude aus Gleichung 4 mit den entsprechenden Literaturwerten aus Tabelle 2 ein Wert von $0,529 \frac{\text{deg}\cdot\text{l}}{\text{m}\cdot\text{g}}$ bei 589 nm, die Messwerte liegen im Bereich von 0,534 bis $\approx 0,554 \frac{\text{deg}\cdot\text{l}}{\text{m}\cdot\text{g}}$. Weiterhin wird deutlich, dass die Messwerte nur gering streuen und dass es offensichtlich kaum einen Einfluss des pH-Wertes auf die Rotationsdispersion gibt.

Diese Beobachtungen gelten auch für Albumin, welches für 589 nm Werte von $\approx -0,649 \frac{\text{deg}\cdot\text{l}}{\text{m}\cdot\text{g}}$ bis $\approx -0,664 \frac{\text{deg}\cdot\text{l}}{\text{m}\cdot\text{g}}$ aufweist, was wiederum dem aus der Drude Gleichung aus der Literatur berechneten Wert von $\approx -0,630 \frac{\text{deg}\cdot\text{l}}{\text{m}\cdot\text{g}}$ entspricht [22] liegt. Auch der qualitative Verlauf bestätigt die theoretischen Werte. Eine systematische Variation der Rotationsdispersion ist hier nicht zu beobachten. Die von Baba et al. gemessene Verdopplung der Rotationsdispersion für eine pH-Wert-Änderung von 6,8 auf 7,5 [150, 191] konnte nicht bestätigt werden. Die dort angegebenen Rotationsdispersionen im Bereich mehrerer Hundert $\frac{\text{deg}\cdot\text{l}}{\text{m}\cdot\text{g}}$ passen weder qualitativ noch quantitativ zu den Werten gemäß Drude oder Moffitt-Yang, siehe Abschnitt 2.1.1. Grund für diese Abweichungen könnte die Einstellung des pH-Wert über tropfenförmige Zugabe von Salzsäure und Natronlauge sein [150, 191], was zu mitunter extremen lokalen pH-Werten führen kann. Im Fall von Albumin können extreme pH-Werte eine entsprechende Denaturierung bewirken [29].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die in diesem Kapitel ermittelten Rotationsdispersionen sowohl qualitativ als auch quantitativ mit den erwarteten theoretischen Werten übereinstimmen. Außerdem bestätigt dies die Aussagen anderer Quellen, nach denen der pH-Einfluss vernachlässigbar ist [29, 190]. Für das verwendete Rinderalbumin wird der Einfluss für den pH-Wert Bereich von 4 – 11 als sehr gering beschrieben [29] und es ist davon auszugehen, dass die Struktur für oben beschriebenen pH-Werte stabil bleibt [280]. Diese Extremwerte sind jedoch weit entfernt von den physiologischen Schwankungen.

3.4.2.3 Temperatureinfluss

Im nächsten Schritt wurde der Temperatureinfluss auf die Rotationsdispersion untersucht. Zu diesem Zweck wurde sowohl die Umgebungstemperatur des Messaufbaus sowie die Proben temperatur auf Werte von 29 °C, 34 °C und 37 °C gebracht. Um zu gewährleisten, dass sich für die Mutarotation der Glucose ein Gleichgewicht eingestellt hat, wurde vor der Aufnahme der Messpunkte jeweils eine Mindestwartezeit von 24 h bei konstanter Temperatur eingehalten, was als ausreichend beschrieben wird [34]. Nach anderen Quellen sollen bereits 5 h hierfür ausreichend sein [7]. Für Albumin wurde keine zusätzliche Wartezeit nach Erreichen der Solltemperatur vorgesehen, da einerseits keine Mutarotation stattfindet und andererseits nach einigen Stunden eine Trübung der Lösung zu beobachten war. Wie schon beim Einfluss des pH-Wertes finden sich in der Literatur widersprüchliche Angaben. Von Baba et al. wird berichtet, dass eine Veränderung der Temperatur von 15 °C auf 26 °C eine Verdopplung der Rotationsdispersion bewirkt, gleichzeitig der Einfluss über 600 nm jedoch vernachlässigbar sei [150]. Andere Quellen berichten von generell vernachlässigbarem Einfluss [190]. Eine Gegenüberstellung der gemessenen Rotationsdispersionen für 29 °C, 34 °C und 37 °C mit der Theorie ist in Abbildung 38 zu finden.

Analog zum pH-Einfluss ist auch hier zu erkennen, dass bei allen drei Temperaturen sowohl für Glucose als auch für Albumin sehr ähnliche Messwerte erreicht werden. Bei Albumin werden für 589 nm Rotationsdispersionen von $-0,615 \frac{\text{deg}\cdot\text{l}}{\text{m}\cdot\text{g}}$ bis $-0,633 \frac{\text{deg}\cdot\text{l}}{\text{m}\cdot\text{g}}$ gemessen, was

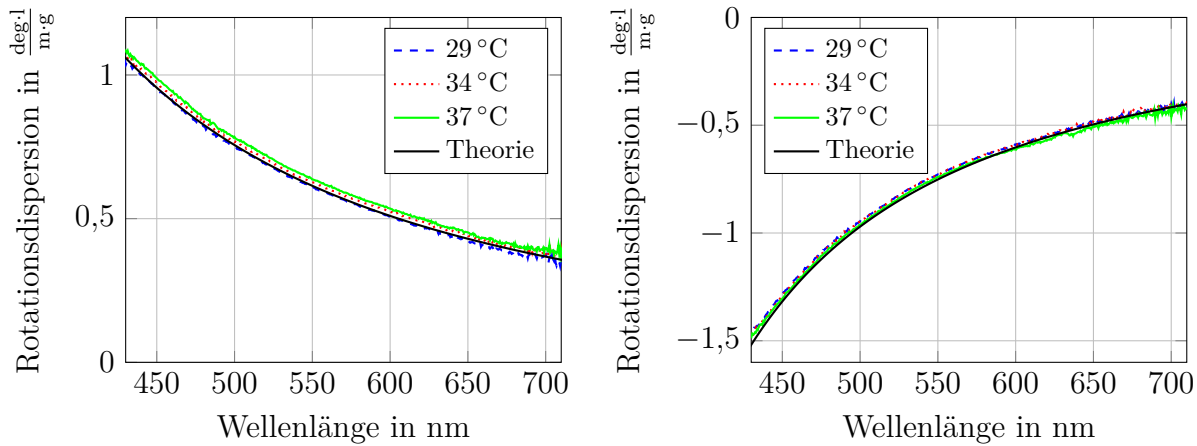


Abbildung 38: Gemessene, spezifische Rotationsdispersion in Abhängigkeit der Temperatur, verglichen mit den theoretischen Werten aus Abbildung 36. links: Glucose, rechts: Albumin.

mit dem Literaturwert von $\approx -0,630 \frac{\text{deg}\cdot\text{l}}{\text{m}\cdot\text{g}}$ übereinstimmt.

Diese Erkenntnis lässt sich auch auf die Messung von Glucose übertragen, zu dessen Rotationsdispersion mehr Literaturquellen und experimentelle Bestimmungen existieren. Für 589 nm wurde in dieser Messreihe eine Schwankungsbreite von $0,528 - 0,554 \frac{\text{deg}\cdot\text{l}}{\text{m}\cdot\text{g}}$ gemessen. Diese Werte stimmen zudem exakt mit dem nach der Drude-Gleichung vorhergesagten theoretischen Wert von $0,529 \frac{\text{deg}\cdot\text{l}}{\text{m}\cdot\text{g}}$ aus Abbildung 36 überein. In diesem Zusammenhang ist zudem zu erwähnen, dass die von Penzkofer et al. bestimmte Rotationsdispersion für 589 nm von $53,2 \frac{\text{deg}\cdot\text{l}}{\text{m}\cdot\text{g}}$ bei $21,5^\circ\text{C}$ [155] trotz einer deutlich anderen Temperatur ebenfalls identisch mit den in diesem Abschnitt ermittelten Werten und dem von ihm angeführten Literaturwert von $52,7 \frac{\text{deg}\cdot\text{l}}{\text{m}\cdot\text{g}}$ [210] bei 20°C ist.

Wie bereits bei den Einflüssen durch den pH-Wert weichen einzig die Messergebnisse von Baba et al. nicht nur von den Ergebnissen dieser Arbeit, sondern auch von denen anderer Arbeiten [155] und den Rotationsdispersionen nach Drude oder Moffitt [22, 23, 29, 210] sowohl in qualitativer als auch quantitativer Form ab. Zudem erscheint die dort ermittelte Temperaturabhängigkeit der Rotationsdispersion in der Größenordnung von $10 \frac{\%}{\text{K}}$ unrealistisch, da eine Schwankung der Proben temperatur von 1 K bei einer Konzentration von 500 mg/dl folglich einen Bestimmungsfehler von 50 mg/dl bewirken würde. In anderen Arbeiten wurde ohne Angabe einer Temperatur oder der Erwähnung einer Temperaturregelung bereits eine Vorhersagegenauigkeit von $\pm 5,2 \text{ mg/dl}$ erreicht [34]. Selbst wenn der gesamte Messfehler aus Schwankungen der spezifischen Rotationsdispersion stammen würde, ließe dies erahnen, welche Temperaturgenauigkeit nötig wäre, wenn die angegebene Temperaturabhängigkeit von $10 \frac{\%}{\text{K}}$ valide wäre. Eine mögliche Ursache für die dort berichteten Schwankungen könnte eine nicht vollständig abgeschlossene Mutarotation sein. Da die Zeit zwischen Probenvorbereitung und Messung dort jedoch nicht erwähnt wird, lässt sich dies nicht nachvollziehen [150].

Zusammenfassend lässt sich über den pH- und Temperatureinfluss sagen, dass die ermittelten Rotationsdispersionen mit denen aus der Drude- und Moffitt-Yang-Gleichung (siehe Abschnitt 2.1.1) und anderen Literaturwerten [210] gut übereinstimmen. Die Messungen zeigen, dass die Rotationsdispersion von Glucose und Albumin kaum abhängig von pH-Wert und Temperatur ist, was andere Quellen bestätigen [29, 155, 190]. Die abwei-

chenden Messergebnisse von Baba et al. [150, 191] müssen aus genannten Gründen jedoch angezweifelt werden, da dort auch trotz starker Schwankungen in den Messwerten von vernachlässigbarem Einfluss berichtet wird.

3.4.2.4 Probenabsorption

Eine weitere Eigenschaft, die einen erheblichen Einfluss auf die Bestimmungsgenauigkeit haben kann, sind Absorptionseffekte der Probe. Zwar ist Absorption von Glucose vorwiegend im NIR und MIR vorzufinden. Jedoch bewirken die Bluteiweiße, insbesondere Albumin, Absorptionseffekte, die einen Einfluss auf das Messsignal haben können. In diesem Kapitel geht es daher um die Eigenschaften der Probe und eine Charakterisierung, um abschätzen zu können, mit welcher Absorption in den späteren Messungen zu rechnen ist. Wie diesem Störeinfluss entgegengewirkt werden kann, wird in Abschnitt 4.1.1.3 und 4.1.2.3 ausführlich beschrieben. Allgemein folgt die Absorption durch einen Stoff dem Gesetz von Lambert-Beer aus Gleichung 1, welches lautet:

$$\frac{I}{I_0} = e^{-\epsilon \cdot c \cdot d} \quad (1)$$

Um den Absorptionskoeffizienten μ zu bestimmen, der aus dem Produkt des molaren Extinktionskoeffizienten ϵ und der Stoffkonzentration c besteht, müssen alle anderen Unbekannten wie die Intensität mit Probe I , die Intensität ohne Probe I_0 , die Stoffkonzentration c sowie die Pfadlänge d der Küvette bekannt sein.

Aus der Literatur geht hervor, dass die Absorption der Proteine hin zum UV ansteigt [193]. Leider findet dies dort statt, wo auch die Rotationsdispersion nach Abbildung 36 den größten Informationsgehalt liefert. Dieser Bereich ist daher von großem Interesse. Da die Polarisationsseigenschaften für die reine Transmissionsmessung keine Rolle spielen, konnten hierfür einige Komponenten des Messaufbaus entfernt werden, um den Spektralbereich entsprechend zu erweitern. Hierzu zählen die Polarisationsfilter, welche nur bis zu einer Wellenlänge von 350 nm verwendbar sind [245]. Außerdem wird für diese Messung auf den Faraday-Rotator verzichtet, der, wie in Abbildung 18 gezeigt, unterhalb von etwa 400 nm bereits deutliche Absorption aufweist. Zusätzlich musste für diesen Versuch noch eine Lochblende eingefügt werden, da aufgrund der fehlenden gekreuzten Polarisationsfiltern die transmittierte Intensität so ansteigen würde, dass es zu einer Sättigung des Spektrometers kommen würde.

Um die Fresnel-Reflexionen an den Küvettenwänden möglichst identisch mit denen der zu messenden Proben zu halten, wurde die Messung der Intensität I_0 mit Wasser in der Küvette durchgeführt. Exemplarisch wurde der Absorptionskoeffizient von Albumin untersucht, das den größten Anteil im Blutplasma hat. Hierzu wurden fünf verschiedene Konzentrationen von 10 g/l, 20 g/l, 30 g/l, 40 g/l und 50 g/l wie in Abschnitt 3.3.1 beschrieben erstellt. Die Konzentrationen wurden dabei in zufälliger Reihenfolge gemessen. Zwischen jeder Messung erfolgte eine erneute Bestimmung der Referenzintensität I_0 . Anschließend wurden die Intensitäten für jede Konzentration ins Verhältnis $\frac{I}{I_0}$ gesetzt, was der Transmission entspricht. Durch die bekannten Konzentrationen sowie die konstante Pfadlänge von 50 mm lässt sich Gleichung 1 nach dem Absorptionskoeffizienten auflösen.

$$\mu = \epsilon \cdot c = -\frac{\ln\left(\frac{I}{I_0}\right)}{d} \quad (41)$$

Idealerweise sollte diese Gleichung für die unterschiedlichen Konzentrationen zu einem

identischen Absorptionskoeffizienten führen. Die Ergebnisse für die reine Transmission der Proben und die Absorptionskoeffizienten sind in Abbildung 39 dargestellt.

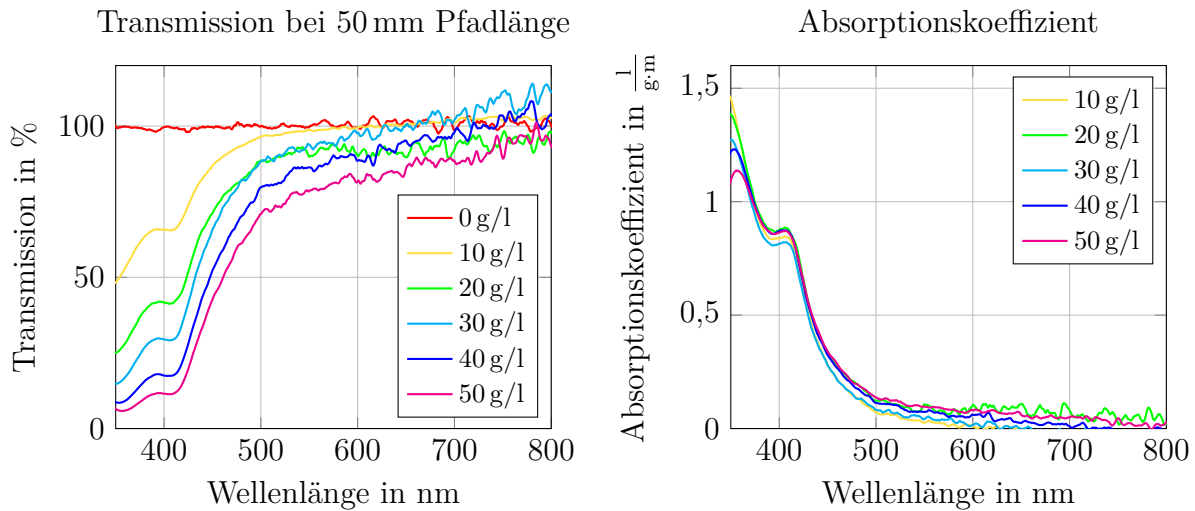


Abbildung 39: links: Albumin-Transmission für Konzentrationen von 0 – 50 g/l, rechts: errechneter Absorptionskoeffizient unter Berücksichtigung von 50 mm Pfadlänge und der jeweiligen Konzentration.

Bei Betrachtung der reinen Transmission bestätigt sich der aus der Literatur gewonnene Eindruck, dass es zum UV-Bereich hin eine zunehmende Absorption gibt. Für eine Wellenlänge von 400 nm ergibt sich für 50 g/l bereits eine Absorption von über 80 %. Auch die Variation in Abhängigkeit von der Albumin-Konzentration ist erheblich. Der Absorptionskoeffizient kann aufgrund der zur Verfügung stehenden Intensität bis etwa 350 nm zuverlässig bestimmt werden. Die ermittelten Werte des spezifischen Absorptionskoeffizienten zeigen für alle Konzentrationen ähnliche Werte und liegen im Bereich von etwa $1 \frac{1}{\text{g}\cdot\text{m}}$.

Da diese Absorption bei Variation der Eiweißkonzentration nicht mit der Glucose korreliert, aber die Restintensität deutlich senkt, ist dies als erheblicher Störfaktor zu betrachten, gegen den geeignete Maßnahmen ergriffen werden müssen. In dieser Arbeit wird dafür das in Abschnitt 3.3.3 vorgestellte Verfahren verwendet, das mit der Verhältnisbildung der Frequenzanteile $I(\omega)$ und $I(2\omega)$ arbeitet. Eine ausführliche Evaluation, in wieweit der Einfluss der Probenabsorption kompensiert werden kann, wird in Abschnitt 4.1.1.3 beziehungsweise 4.1.2.3 durchgeführt [1].

3.4.3 Probenmischung

Essentiellen Einfluss auf die Analysegenauigkeit hat die Präzision bei der Dosierung der Referenzkonzentrationen. Aus diesem Grund wurde das in Abschnitt 3.1.7 beschriebene Spritzenpumpensystem aufgebaut. Da sich der als Standard Error of Prediction (SEP) bezeichnete Bestimmungsfehler aus der Differenz zwischen Referenz- und Vorhersagewerten ergibt, wird versucht den Fehler bei den Referenzkonzentrationen so gering wie möglich zu halten. Der Vorhersagefehler kann dabei maximal so gering sein, wie der Fehler bei den Referenzwerten.

Grundsätzlich setzt sich der Fehler in der Referenzkonzentration aus zwei Anteilen zusammen. Der erste Teil resultiert aus Ungenauigkeiten bei der Erstellung der Stammlösungen

sowie aus mechanischen Toleranzen der Spritzenpumpen bei der Dosierung. Der zweite Teil wird durch potentielle Reste innerhalb der Küvette von vorherigen Proben verursacht.

Dosierungsfehler der Spritzenpumpe

Die Genauigkeit der Dosierung des Pumpenmoduls wurde gravimetrisch bestimmt. Eine schematische Darstellung des dazu verwendeten Messaufbaus findet sich in Abbildung 40.

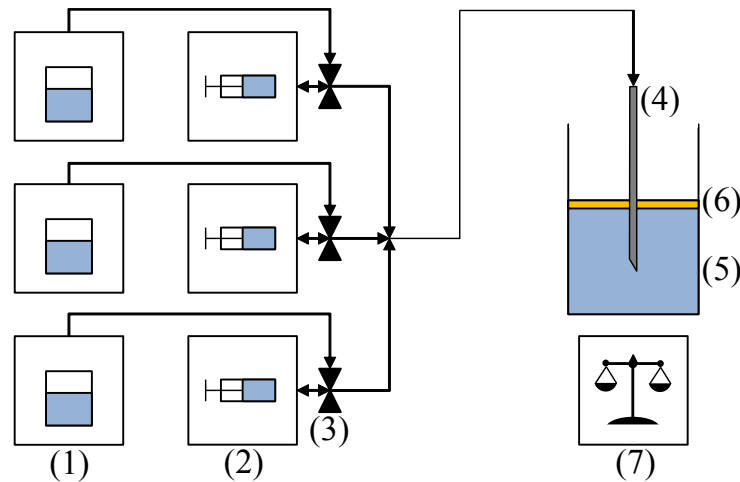


Abbildung 40: Schematische Darstellung des Messaufbaus zu Überprüfung der Dosiergenauigkeit des Spritzenpumpensystems: (1) Stammlösungen (nur destilliertes Wasser), (2) neMESYS Spritzenpumpensystem mit ILS Glasspritzen, (3) Zweiwegeventile, (4) Kanüle, (5) Wasserbehälter, (6) Ölschicht, (7) Präzisionswaage Kern ES 120-4NM

Zur Bestimmung der Dosiergenauigkeit wurden die einzelnen NeMESYS Spritzenpumpenmodule (Cetoni GmbH, Deutschland) (2) wie bei den späteren Messungen zur Konzentrationsbestimmung mit den ILS Glasspritzen bestückt und mit den Zweiwegeventilen (3) sowie den verwendeten Leitungen verbunden. Im Gegensatz zu diesen Messungen werden jedoch alle Spritzen zur besseren Vergleichbarkeit mit Phosphatpuffer (pH 7,4) versehentlich destilliertem Wasser gefüllt. Anstatt in die Küvette wird die Lösung in diesem Versuch mittels einer 0,8 mm Kanüle (4) in ein Glasgefäß (5) gefördert, wobei sich die Spitze der Kanüle unmittelbar unterhalb der Wasseroberfläche befindet. Die Wasseroberfläche ist mit einer dünnen Ölschicht bedeckt, sodass das Verdunsten des Wassers und somit eine potentielle Ungenauigkeit verhindert wurde. Das Gefäß stand während der Messung auf einer Präzisionswaage (Kern ES 120-4NM, Kern & Sohn GmbH, Deutschland), die eine Messunsicherheit von ± 1 mg aufweist.

Um die maximal möglichen Fehler zu bestimmen, wurde das kleinste in den späteren Messungen auftretende Volumen von 1 ml gefördert und insgesamt 20 Mal für jede Spritze wiederholt. Das eingestellte Sollvolumen wurde dann gravimetrisch unter Berücksichtigung der Wasserdichte von $0,997 \frac{\text{g}}{\text{cm}^3}$ bei der Versuchstemperatur von 25°C und dem Auftrieb durch die Kanüle bestimmt. Die so bestimmte Abweichung ist für die drei Spritzenpumpen mit ihren Modulen in Abbildung 41 dargestellt.

Zu erkennen ist, dass sich trotz Berücksichtigung der Temperaturabhängigkeit der Wasserdichte Abweichungen zum Sollvolumen ergeben. Dies ist zum einen eine Schwankung beim Vergleich der Dosierschritte zueinander und zum anderen eine systematische Abweichung, bei der alle Module geringfügig zu wenig Volumen dosieren. Verdeutlicht wird dies auch noch einmal durch Abbildung 42, welche die jeweiligen Abweichungen in einem

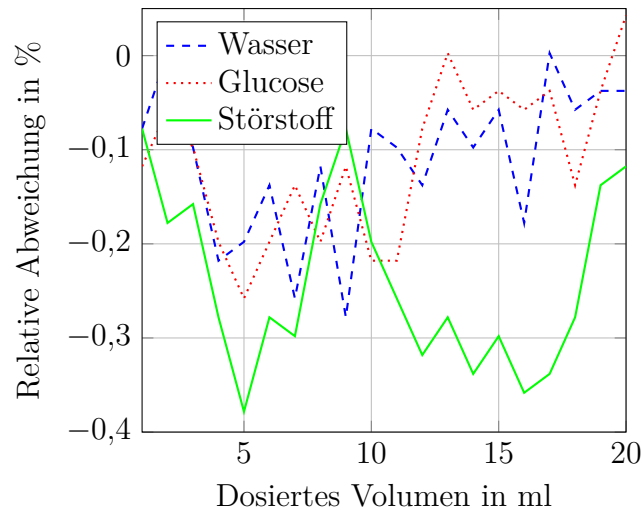


Abbildung 41: Dosiergenauigkeit der jeweiligen Einzelschritte der NeMESYS Spritzenpumpe

Fehlerbalken-Diagramm darstellt.

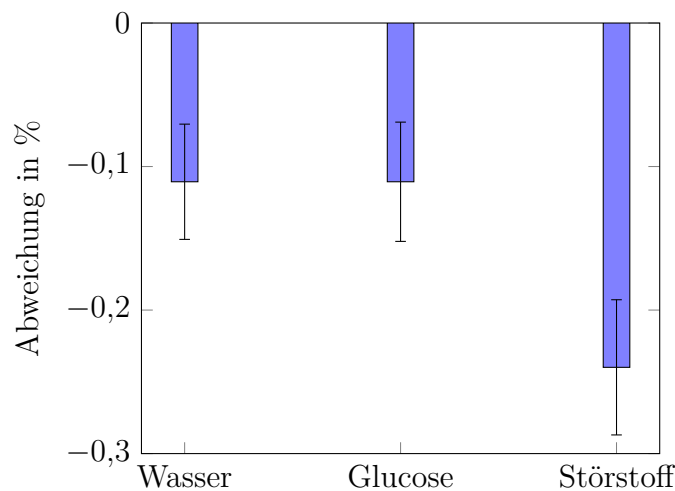


Abbildung 42: Standardabweichungen der Dosiergenauigkeiten der NeMESYS Spritzenpumpen.

Der Durchmesser der Glasspritzen beträgt $23,03 \pm 0,01$ mm (Persönliche Auskunft, ILS), was eine relative Abweichung von $\pm 0,04$ % bedeutet und dem Fehler in der Wiederholbarkeit entspricht. Insgesamt ergeben sich systematische Abweichungen von $-0,11$ % für Wasser und Glucose sowie $-0,24$ % für das Störstoff-Modul bezogen auf ein Fördervolumen von 1 ml, was absolut betrachtet $-1,1 \mu\text{l}$ beziehungsweise $-2,4 \mu\text{l}$ bedeutet. Der Fehler in der Wiederholbarkeit liegt bei $\pm 0,040$ % für Wasser, $\pm 0,041$ % für Glucose und bei $\pm 0,047$ % für den Störstoff.

Ursächlich hierfür können Toleranzen in den einzelnen Komponenten sein. So beträgt die absolute Genauigkeit des Dosierschlittens der Spritzenpumpe $\pm 0,05 - 0,5$ % (Persönliche Auskunft, Cetoni GmbH), was dem systematischen Fehler entspricht.

Potentielle Probenkontamination

Auch wenn die Dosiergenauigkeit der Spritzenpumpen sehr hoch ist, bleibt eine mögliche Probenkontamination in der Küvette als potentielle Störquelle. Dies gilt insbesondere dann, wenn sich Probenreste einer zuvor gemessenen Probe in der Küvette befinden, die dann die nachfolgende Konzentration verfälschen. Dieser Einfluss sollte auf ein Minimum reduziert werden.

Erreicht wird dies durch eine intensive Spülung der Küvette. Hierbei ist jedoch zu beachten, dass ein entsprechendes Volumen der jeweiligen Stammlösungen bereit gestellt werden muss und dass eine Vergrößerung des in die Küvette injizierten Volumens zu einer Verlängerung der Messzeit führt. Da die Abmessungen der Küvette aus Abschnitt 3.1.4 wegen der benötigten Pfadlänge und des Durchmessers nicht beliebig reduziert werden können, muss ein Kompromiss zwischen Probenkontamination und benötigtem Probenvolumen gefunden werden.

Eine Möglichkeit für einen verbesserten Probenaustausch ist ein zusätzlicher Spülvorgang mit destilliertem Wasser nach jeder Messung. Über eine solche Spülung wurde bereits in anderen Arbeiten berichtet [34], weshalb diese Methode auch in dieser Arbeit Anwendung findet.

Diese Methode hat den Vorteil, dass zwei Messproben nicht mehr direkt aufeinander folgen. Selbst für den Fall, dass durch ein unzureichend injiziertes Probenvolumen noch Reste der vorher in der Küvette befindlichen Flüssigkeit vorhanden sind, wäre dies das destillierte Wasser des zusätzlichen Spülvorgangs und nicht mehr die vorherige Probe. Da ein solcher Spülvorgang vor jeder Probe stattfindet, würde sich dieser als Verdünnungsfehler auf alle Proben der Kalibrier- und Validierdatensätze gleich auswirken.

Ein eindeutiger Hinweis auf Probenkontamination wäre gegeben, wenn der Konzentrationsvorhersagefehler in den späteren Messungen mit der Abweichung der Referenzkonzentration vom jeweiligen vorherigen Wert korrelieren würde. Reste zuvor deutlich größerer Konzentrationen würden entsprechend zu hohe Vorhersagewerte bewirken und umgekehrt.

3.4.4 Faraday-Rotator

Wie in Abschnitt 2.2.3, 3.3.3 und 3.4.2.2 beschrieben, hängt das Messsignal auch von der Modulationstiefe Θ_m des Faraday-Rotators ab. Dies gilt sowohl für sämtliche Frequenzanteile als auch für das Intensitätsverhältnis $\frac{I(\omega)}{I(2\omega)}$. Eine Untersuchung der absoluten Modulationstiefe sowie deren Stabilität über die Zeit ist also erforderlich.

Welchen Einfluss Θ_m auf die jeweiligen Frequenzanteile hat, kann am besten anhand der bereits aus Gleichung 21 bekannten zeitlich abhängigen Intensität veranschaulicht werden.

$$I_t \propto E^2 = \left[\underbrace{\left(\frac{\Theta_m^2}{2} + \Phi^2 \right)}_{DC} + \underbrace{2 \cdot \Phi \cdot \Theta_m \cdot \sin(\omega \cdot t)}_{\omega} - \underbrace{\frac{\Theta_m^2}{2} \cdot \cos(2 \cdot \omega \cdot t)}_{2\omega} \right] \cdot E_0^2 \cdot T_P \quad (21)$$

Aus ihr geht hervor, dass $I(\omega)$ proportional zu Θ_m ist, $I(2\omega)$ quadratisch von Θ_m abhängt und sich $I(DC)$ aus einer Summe der quadratischen Drehung Φ^2 durch die Probe und der quadratischen Modulationstiefe $\frac{\Theta_m^2}{2}$ zusammensetzt. Es besteht daher nicht die Möglichkeit, durch Verrechnung einzelner Frequenzanteile ähnlich der Intensitätskompensation aus Abschnitt 3.3.3 und Abschnitt 4.1 den Einfluss der Modulationstiefe zu kompensie-

ren. Dies gilt auch für das Intensitätsverhältnis

$$\frac{I(\omega)}{I(2\omega)} = 4 \cdot \frac{\Phi}{\Theta_m} \quad (42)$$

welches nicht mehr proportional sondern antiproportional zu Θ_m ist. Daher ist es wichtig, diesen Einfluss zu bestimmen.

Absolute Modulationstiefe

Um die absolute Modulationstiefe zu bestimmen, wird das aus Abschnitt 3.4.2 aus Gleichung 38 bekannte Verfahren eingesetzt. Da durch Erzeugung eines bekannten Offsets von $0,5^\circ$ durch den Polarisationsfilterhalter der Zusammenhang zwischen Intensität und Winkel hergestellt ist, kann auf die Modulationstiefe geschlossen werden.

$$\frac{I(\omega)}{I(2\omega)} = 4 \cdot \frac{0,5^\circ}{\Theta_m} \longrightarrow \Theta_m = \frac{4 \cdot 0,5^\circ}{\frac{I(\omega)}{I(2\omega)}} \quad (43)$$

Die so bestimmte spektrale Abhängigkeit der Modulationstiefe ist sowohl für SF59 als auch für SF6 in Abbildung 43 dargestellt. Gleichzeitig kann die Modulationstiefe aus der in Abschnitt 3.1.3.1 bestimmten Verdetkonstante sowie den Spulenparametern aus Abschnitt 3.1.3.2 und dem Modulationsstrom von etwa $2 A_{pp}$ näherungsweise bestimmt werden. Für das Magnetfeld B der vom Strom I durchflossenen Zylinderspule der Länge l und der Windungszahl N gilt in erster Näherung

$$B = \mu_0 \cdot \mu_r \cdot \frac{I \cdot N}{l} = 4 \cdot \pi \cdot 10^{-7} \frac{N}{A^2} \cdot 1 \frac{V \cdot s}{A \cdot m} \cdot \frac{1 A \cdot 475}{0,065 m} = 9,18 \text{ mT} \quad (44)$$

Eingesetzt wurden hier die Spulenparameter aus Tabelle 4. Das Magnetfeld von 9,18 mT kann dann gemäß Gleichung 24 zur Berechnung der Modulationstiefe Θ_m eingesetzt werden. Die theoretisch ermittelten Werte sind den gemessenen in Abbildung 43 gegenüber gestellt.

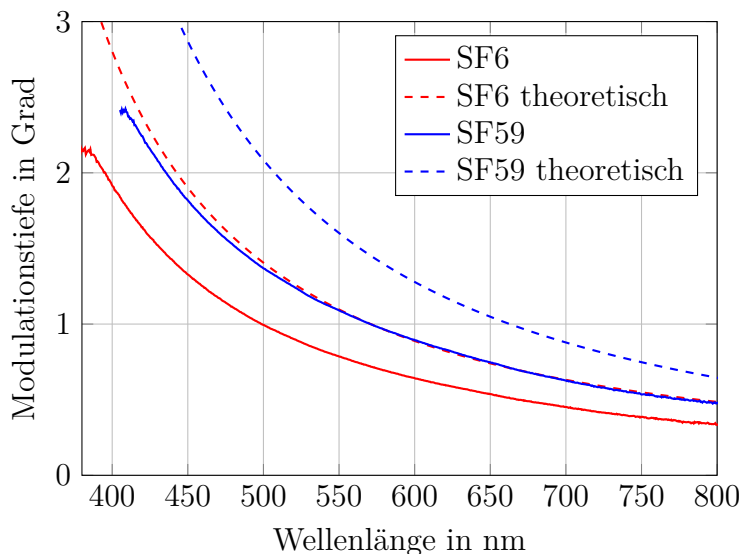


Abbildung 43: Bestimmung der SF6- und SF59-Modulationstiefe des Faraday-Rotators.

Zu erkennen ist, dass die gemessene Modulationstiefe für SF59 erwartungsgemäß über der von SF6 liegt, was bereits in Zusammenhang mit Abbildung 18 ausführlich diskutiert wurde.

Weiterhin ist zu erkennen, dass die gemessenen Werte unterhalb der theoretisch bestimmten liegen. Die Diskrepanz zur theoretischen Berechnung ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass es sich bei Gleichung 44 zur Bestimmung des Magnetfelds nur um eine Näherungsformel handelt, in der die Mehrlagigkeit der Wicklung und das an den Spulenenden inhomogen werdende Magnetfeld nicht berücksichtigt werden.

Außerdem sei an dieser Stelle darauf hingewiesen, dass in der Literatur für die jeweiligen Verdetkonstanten unterschiedliche Angaben vorliegen. So ergeben sich nach Schott für 532 nm Verdetkonstanten von $34,89 \frac{\text{rad}}{\text{T}\cdot\text{m}}$ für SF6 und $51,24 \frac{\text{rad}}{\text{T}\cdot\text{m}}$ für SF59 [255]. Nach Weber ergeben sich hingegen um etwa 15 – 20 % geringere Werte von $30,06 \frac{\text{rad}}{\text{T}\cdot\text{m}}$ beziehungsweise $41,21 \frac{\text{rad}}{\text{T}\cdot\text{m}}$ [252]. Diese würden dichter an den in dieser Arbeit ermittelten Werten liegen. Aufgrund der inkonsistenten Literatur können Abweichungen der Verdetkonstanten somit nicht ausgeschlossen werden und ursächlich für diese Abweichung sein. Da sich die Verdetkonstante während der Messungen jedoch nicht signifikant ändert, ist ihr absoluter Beitrag für die vorliegende Arbeit nicht von Bedeutung.

Stabilität der Modulationstiefe

Da sowohl sämtliche Frequenzanteile aus Gleichung 21 als auch das Verhältnis $\frac{I(\omega)}{I(2\omega)}$ von der Modulationstiefe abhängig sind, ist deren zeitliche Stabilität wichtiger als der absolute Wert. Priorität hat daher, dass Θ_m bei der Aufnahme von Kalibrier- und Validierdaten möglichst konstant gehalten wird.

An dieser Stelle sei angemerkt, dass der Temperatureinfluss auf die Verdet-Konstante optischer Gläser wie SF57 mit circa 10^{-6}K^{-1} [281] wesentlich geringer als auf das üblicherweise eingesetzte TGG [282] ist. Die Temperaturempfindlichkeiten für SF6 und SF59 lassen sich aus dem Datenblatt der Schott GmbH berechnen [255] und liegen etwa im gleichen Bereich. Da auch der Faraday-Rotator und somit das optische Glas den Schwankungen der geregelten Umgebungstemperatur (siehe Abschnitt 3.4.1) von unter $0,1^\circ\text{C}$ liegen, wird der Einfluss auf die Verdet-Konstante als vernachlässigbar angenommen.

Das Magnetfeld im Inneren des Faraday-Rotators hängt nach Abschnitt 3.1.3.2 von der magnetischen Permeabilität μ_0 , der Windungszahl N sowie der Geometrie und dem Strom I ab. Von einer messbaren Schwankung ist jedoch nur beim Modulationsstrom auszugehen. Zwar hat der für das Referenzsignal verwendete Funktionsgenerator (33120A, Hewlett Packard, USA) nach Werksangaben einen Temperaturkoeffizienten von lediglich $\leq 2 \frac{\text{ppm}}{^\circ\text{C}}$, sowie eine Drift von $10 \frac{\text{ppm}}{90 \text{Tagen}}$, jedoch trägt die für die Stromregelung aufgebaute Treiberschaltung einen zusätzlichen Fehler bei. Dieser setzt sich insbesondere aus den Temperaturabhängigkeiten des im Gegenkopplungskreis verwendeten Shuntwiderstands R_{125} mit $20 \frac{\text{ppm}}{^\circ\text{C}}$ und der Verstärkerdrift von IC11A (OPA2192) mit $0,2 \frac{\mu\text{V}}{\text{K}}$ zusammen, die bei $2,5 \text{V}_{\text{pp}}$ entsprechend $0,08 \frac{\text{ppm}}{\text{K}}$ beträgt, siehe Schaltplan in Abbildung 83 im Anhang. Die identischen Temperaturkoeffizienten des Spannungsteilers aus R_{90} und R_{94} kompensieren sich jeweils. Daher wird der Fehler maßgeblich durch den Shuntwiderstand R_{125} bestimmt. Um darüber hinaus einen Eindruck über die real erreichbare Stabilität des Modulationsstroms zu gewinnen, wurde in einem Langzeitversuch die Spannung über dem Shunt-Widerstand R_{125} aus Abbildung 83 nach Verstärkung an Pin $SJ28$ gemessen, aus dem sich durch Kenntnis der Größe des Shuntwiderstands der entsprechende Strom berechnen lässt. Die Messung erfolgte mittels einer Messkarte (NI9205, National Instruments, USA), deren Signale parallel von LabVIEW® 2016 ausgewertet wurden. Die

Ergebnisse für 4 aufeinander folgende Messtage sind in Abbildung 44 normiert auf den Initialwert dargestellt.

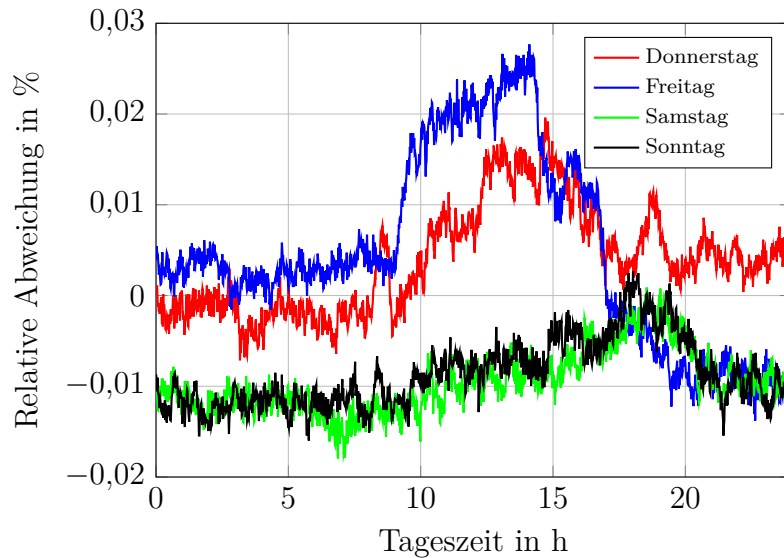


Abbildung 44: Relative Amplitudenstromstabilität des Faraday-Rotators.

Es zeigt sich, dass die relative Abweichung der Amplitude des Modulationsstroms mit 0,03 % äußerst gering ist. Die Maximalwerte werden dabei an Werktagen bei Anwesenheit von Personen im Labor erreicht. Die Standardabweichung liegt dabei unterhalb von $\pm 0,01$ %, was einem Strom von etwa $100 \mu\text{A}$ entspricht. Bezogen auf die größte in den späteren Messungen verwendete Glucose Konzentration von 500 mg/dl bedeutet eine Standardabweichung der Modulationsamplitude von $\pm 0,01$ % einen Fehler von $0,05 \text{ mg/dl}$, was ausreichend gering ist.

Offsetstabilität des Modulationsstroms

Neben der Stabilität der Modulationsamplitude ist es ebenfalls wichtig, dass es durch die elektrische Ansteuerung zu keiner nennenswerten Nullpunktverschiebung beziehungsweise Schwankung derselben kommt. Ein solcher Offset wurde, wie in Abschnitt 3.3.3 beschrieben, in der Literatur bereits verwendet, um die Drehung durch die Probe zu kompensieren und den dafür nötigen Strom zur Konzentrationsbestimmung zu verwenden. Sollte sich ein solcher Offset während der Messungen einstellen oder verändern, würde sich dies in einer scheinbar veränderten Probenkonzentration bemerkbar machen.

Um die Nullpunktstabilität der Ansteuerung zu prüfen, wurden die bereits aufgezeichneten Daten mit demselben LabVIEW® Programm im Hinblick auf den Offset des Stromsignals ausgewertet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 45 dargestellt.

Auf dem Signal lässt sich ein geringer Offsetstrom von knapp unter 1 mA feststellen. Gemessen an der Amplitude von fast $2 A_{pp}$ ist dies jedoch verschwindend gering. Noch geringer ist die Abweichung von etwa $\pm 100 \mu\text{A}$, die einen Fehler in der Konzentrationsbestimmung von etwa $\pm 0,2 \text{ mg/dl}$ bewirkt und trotz höheren Anteils im Vergleich sehr stabil ist. Generell lässt sich somit sagen, dass weder die Modulationsamplitude, noch ein möglicher Offsetstrom oder eine Variation der Verdet-Kontante signifikante Instabilitäten aufweisen. Aus diesen Gründen ist davon auszugehen, dass vom Faraday-Rotator kein nennenswerter Störeinfluss auf die Konzentrationsbestimmung ausgeht.

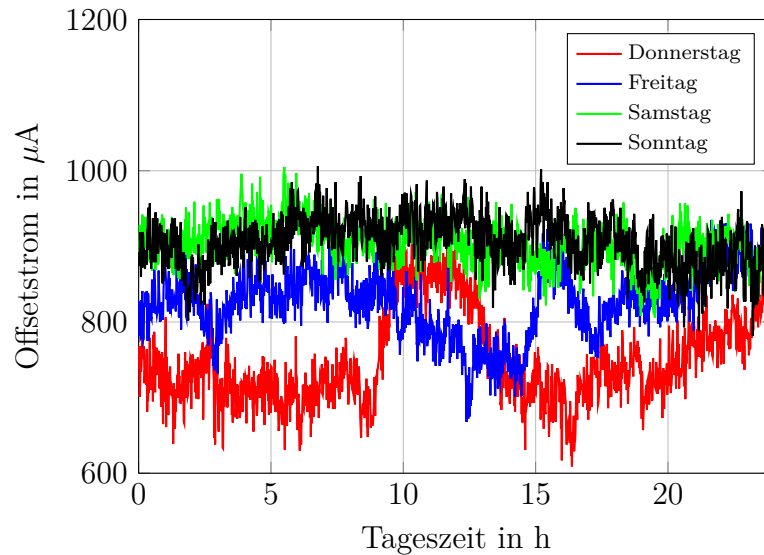


Abbildung 45: Stromstabilität des Faraday-Rotators.

Frequenzstabilität der Modulation

Grundvoraussetzung für eine optimale Messung ist die korrekte Ermittlung der Frequenzanteile $I(DC)$, $I(\omega)$ und $I(2\omega)$. Wie in der Erläuterung des Steuerungsprogramms des Messaufbaus in Abschnitt 3.3.2 beschrieben, werden die zu extrahierenden Frequenzen manuell mit der zuvor eingestellten Modulationsfrequenz am Hewlett Packard 33120A Funktionsgenerator abgeglichen. Sollte es zu einer Abweichung dieser Frequenzen voneinander kommen, würden folglich falsche Frequenzanteile ermittelt werden, bei denen u.U. kein oder nur ein schlechtes Signal vorhanden ist.

Daher ist es essentiell, dass sich die eingestellte Modulationsfrequenz von 7 Hz (siehe Abschnitt 3.1.6) im Laufe der Messung nicht verändert. Eine Schwankung der Modulationsfrequenz geht in der Regel vom Referenzsignal, in diesem Fall vom Funktionsgenerator aus. Die Frequenzstabilität wird vom Hersteller mit $10 \frac{\text{ppm}}{90 \text{ Tage}}$ beziehungsweise $20 \frac{\text{ppm}}{1 \text{ Jahr}}$ angegeben. Bei der verwendeten Modulationsfrequenz von 7 Hz würde dies eine Abweichung von 0,14 mHz in einem Jahr bedeuten, was als vernachlässigbar klein angesehen werden kann.

3.4.5 Spektrometer-Timing

Neben einer potentiellen Schwankung der Modulationsfrequenz kann auch eine unpräzise Abtastung des Intensitätssignals zu einer fehlerhaften Berechnung der Frequenzanteile bei der Fouriertransformation führen. Welche Auswirkungen solche potentiell ungenauen Zeitstempel auf die errechneten Frequenzanteile hätten, wurde bereits in Abschnitt 3.1.5 bei der Auswahl des Spektrometers erläutert. Zwar bietet das Avantes ULS2048 EVO im Gegensatz zu vergleichbaren Konkurrenzprodukten einen besonders schnellen internen Speicher, der es auch ermöglicht, ohne Datenverlust eine große Anzahl von Spektren hintereinander aufzunehmen. Es ist jedoch auch hier nicht ganz auszuschließen, dass es zu gewissen Abweichungen zum Beispiel durch interne Datenverarbeitung kommt. Daher erfolgt eine Untersuchung der zeitlichen Zuordnung der Zeitstempel, um dieser Frage nachzugehen.

Zu diesem Zweck wurden jeweils 1.000 Spektren mit unterschiedlichen Integrationszeiten im Bereich 1,05 – 10 ms aufgenommen. Anschließend wurden die entsprechenden Zeitstempel untersucht und mit den jeweiligen Sollabständen verglichen.

Wird in der Software eine Integrationszeit von zum Beispiel 2 ms eingestellt, sollte idealerweise auch alle 2 ms ein Spektrum abgespeichert werden. Bei Betrachtung der Zeitstempel fällt aber auf, dass es zu leichten Abweichungen kommt. Es zeigt sich, dass gleichmäßig über die gesamte Messzeit verteilt bei 70 % der Werte der Abstand zwischen zwei Messpunkten tatsächlich 2 ms beträgt. Bei den übrigen 30 % werden 2,01 ms verzeichnet, was einer Abweichung von $+10 \mu\text{s}$ entspricht. Die Aufteilung der Werte von 70 : 30 lässt auf eine interne Zeitauflösung von $10 \mu\text{s}$ schließen, wodurch die mittlere Abweichung $+3 \mu\text{s}$ beträgt. Dieses Verhalten lässt sich auch für andere Integrationszeiten im Bereich von 1,05 – 10 ms beobachten. Die scheinbar gemessene Frequenz f_{mess} ergibt sich aus der tatsächlichen Frequenz f_{real} wie folgt:

$$f_{\text{mess}} = f_{\text{real}} \cdot \frac{\text{Int. Zeit} + 3 \mu\text{s}}{\text{Int. Zeit}} = 7 \text{ Hz} \cdot \frac{2000 \mu\text{s} + 3 \mu\text{s}}{2000 \mu\text{s}} = 7,0105 \text{ Hz} \quad (45)$$

Mit den leicht veränderten Zeitstempeln des Spektrometers wird die Modulationsfrequenz von 7 Hz als 7,0105 Hz gemessen. Da sich aus der Messzeit von 2 s aus der Fouriertransformation eine Frequenzauflösung von 0,5 Hz ergibt, ist eine Abweichung von $+0,0105 \text{ Hz}$ als gering anzusehen. Für den Extremfall, dass die Abweichung größer ist, als die Frequenzauflösung kann dies dazu führen, dass Intensitäten bei zum Beispiel 7,5 Hz extrahiert werden, wo nur Rauschen vorzufinden ist.

4 Ergebnisse

Dieses Kapitel dokumentiert die Messergebnisse bezüglich der Konzentrationsbestimmung von Glucose in Anwesenheit möglicher Störfaktoren und zeigt entsprechende Optimierungsmaßnahmen auf.

Zur Erhöhung der Reproduzierbarkeit und der Robustheit des Messaufbaus wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Verfahren entwickelt, mit dem sich der Einfluss schwankender Lichtquellenintensität, Probenabsorption oder leichter Streueffekte kompensieren lässt. Inwieweit dies die Messergebnisse verbessert, wird in Abschnitt 4.1 zunächst für monochromatische Daten und anschließend für breitbandige Messungen q betrachtet.

In Abschnitt 4.2 werden zusätzlich durch breitbandige Messung Wellenlängeninformationen zur Konzentrationsbestimmung herangezogen, um zu zeigen, dass optisch aktive Stoffe in Stoffgemischen anhand ihrer Rotationsdispersion identifiziert werden können.

Die aus Abschnitt 4.1 und 4.2 gewonnenen Erkenntnisse fließen dann in Abschnitt 4.3 in die Glucose-Bestimmung in Blutplasma-Proben ein und ergeben einen Ausblick auf eine mögliche spätere Anwendung.

4.1 Kompensation von Störeinflüssen

Neben den in Abschnitt 3.4 präsentierten und stabilisierten Störeinflüssen stellen auch die Lichtquellenintensität, die Probenabsorption und -streuung einen erheblichen Störeinfluss dar. Wie bereits in Abschnitt 3.3.3 hergeleitet, ist das Verhältnis aus den Frequenzanteilen $I(\omega)$ und $I(2\omega)$ der Theorie nach unabhängig von diesen Einflüssen.

4.1.1 Monochromatische Konzentrationsbestimmung

Um diese Theorie experimentell zu bestätigen, wird in diesem Kapitel zunächst ohne breitbandige Wellenlängeninformation gemessen, damit die direkten Auswirkungen der Intensität auf die Vorhersagegenauigkeit bestimmt werden können. Lichtintensitätsschwankungen werden entsprechend über den LED-Strom simuliert, Probenabsorption durch den Farbstoff Allura Red AC und Streuung über eine Clinoleic[®]-Fettemulsion. Eine Übersicht der einzelnen Messungen befindet sich in Tabelle 7.

Tabelle 7: Überblick über die in Abschnitt 4.1 durchgeführten Messungen.

Ab-schnitt	Glucose in mg/dl	LED-Strom in mA	Allura Red AC in mg/dl	Streukoeffizient in cm^{-1}
4.1.1.1	0; 100; ...; 500	400	0	0
4.1.1.1	0; 100; ...; 500	400	0	0
4.1.1.2	500	360; 364; ...; 440	0	0
4.1.1.2	0; 100; ...; 500	360; 380; ...; 440	0	0
4.1.1.3	500	400	0; 0, 01; ...; 0, 2	0
4.1.1.3	0; 100; ...; 500	400	0; 0, 05; ...; 0, 2	0
4.1.1.4	500	400	0	0, 225; 0, 2275; ...; 0, 275
4.1.1.4	0; 100; ...; 500	400	0	0, 225; 0, 2275; ...; 0, 275

4.1.1.1 Glucose-Bestimmung ohne Störeinflüsse

Um den Einfluss der beschriebenen Störquellen und deren Kompensierbarkeit besser einordnen zu können, wurde das System in diesem Unterabschnitt zunächst ohne Störeinflüsse gemessen. Dazu wurde die Signalabhängigkeit der einzelnen Frequenzanteile von der Glucose-Konzentration betrachtet und eine entsprechende Konzentrationsbestimmung durchgeführt.

An dieser Stelle soll die zeitlich abhängige Detektorintensität I aus Abschnitt 2.2.3 mit den Frequenzanteilen $I(DC)$, $I(\omega)$ und $I(2\omega)$ sowie der Modulationstiefe Θ_m und dem Probendrehwinkel Φ erneut betrachtet werden:

$$I = \left[\underbrace{\left(\frac{\Theta_m^2}{2} + \Phi^2 \right)}_{DC} + \underbrace{2 \cdot \Phi \cdot \Theta_m \cdot \sin(\omega \cdot t)}_{\omega} - \underbrace{\frac{\Theta_m^2}{2} \cdot \cos(2 \cdot \omega \cdot t)}_{2\omega} \right] \cdot I_0 \cdot T_P \quad (21)$$

Wie in Abschnitt 3.3.3 hergeleitet, besitzen alle Frequenzanteile eine lineare Abhängigkeit von der Probenabsorption T , sowie dem von der Lichtquelle emittierten E-Feld E_0 , ist der Frequenzanteil $I(2\omega)$ jedoch unabhängig von der Probendrehung Φ . Es gilt für die Amplitudenbeiträge:

$$\frac{I(\omega)}{I(2\omega)} = \frac{2 \cdot \Phi \cdot \Theta_m}{\frac{\Theta_m^2}{2}} \cdot \frac{I_0 \cdot T_P}{I_0 \cdot T_P} = 4 \cdot \frac{\Phi}{\Theta_m} \quad (46)$$

Hierdurch wird das Verhältnis $\frac{I(\omega)}{I(2\omega)}$ der Theorie nach unabhängig von der Lichtquellenintensität oder der Probenabsorption. Auch eine eventuell auftretende Depolarisation durch Streueffekte würde die Intensität der polarisierten Lichtanteile $I(\omega)$ und $I(2\omega)$ in gleichem Maße abschwächen. An dieser Stelle erfolgt daher eine experimentelle Untersuchung, um herauszufinden, inwiefern sich die theoretischen Betrachtungen bestätigen lassen und welche Auswirkungen dies auf die Konzentrationsbestimmung hat.

Zu diesem Zweck wurde der Messaufbau für die Erfassung einer Einzelwellenlänge modifiziert. Dazu wurde die LDLS durch eine schmalbandige grüne LED (LT W5SM, Osram Light GmbH, Deutschland) mit einer Zentralwellenlänge von 528 nm und einer Halbwertsbreite von 33 nm ersetzt und mit einem Strom von $400 \pm 0,3$ mA betrieben, der sich jedoch variieren lässt. Durch die dadurch mögliche Dimmbarkeit konnte in Abschnitt 4.1.1.2 der Einfluss schwankender Lichtintensität evaluiert werden. Anstelle des Spektrometers wurde auf der Detektorseite eine Photodiode (DA36A, Thorlabs GmbH, Deutschland) verwendet, deren Signal von einer A/D-Wandler-Karte (NI9205, National Instruments GmbH, Deutschland) eingelesen wurde. Da die Photodiode eine wesentlich höhere zeitliche Abtastrate als das in Abschnitt 3.1.5 beschriebene Spektrometer zulässt, wurde die Modulationsfrequenz des Faraday-Rotators auf 1,09 kHz erhöht, welche bereits in verschiedenen anderen Arbeiten vorgeschlagen wurde [46, 50, 147, 148, 152–154, 157], um eine Überlappung mit harmonischen Oberwellen der Netzfrequenz von 50 Hz auszuschließen.

Die Signalverarbeitung erfolgte mit LabVIEW 2016 (National Instruments GmbH, Deutschland). Dazu wurden die Frequenzanteile $I(DC)$, $I(\omega)$ und $I(2\omega)$ per Fourier Transformation im von LabVIEW bereitgestellten Baustein *FFT express VI* berechnet. Nach einer Messzeit von 1 s und 50.000 aufgenommenen Datenpunkten wurden die jeweiligen Frequenzanteile bestimmt. Diese Prozedur wurde für eine Mittelung der Werte 20 Mal wiederholt.

Die Erstellung der Proben erfolgte mit Hilfe des in Abschnitt 3.1.7 und 3.3.1 beschriebenen automatischen Probenmischungssystems. Die entsprechenden Stammlösungen wurden

durch präzises Abwiegen erstellt und nach ausreichender Akklimatisierungszeit mit dem Spritzenpumpensystem vermischt.

Einfluss der Glucose-Konzentration auf die Frequenzanteile $I(\omega)$ und $I(2\omega)$

Zunächst wurden die aus Abschnitt 2.2.3 hergeleiteten und in Gleichung 21 dargestellten Zusammenhänge zwischen Probendrehung Φ und den Frequenzanteilen $I(\omega)$ und $I(2\omega)$ überprüft. Demnach ist $I(2\omega)$ unabhängig von der Drehung durch die Probe, während $I(\omega)$ eine lineare Abhängigkeit aufweist. Um dies zu überprüfen, wurden die Polarisationsfilter abgeglichen und anschließend 41 verschiedene Glucose-Konzentrationen im Bereich von 0 – 500 mg/dl mit einer Schrittweite von 12,5 mg/dl gemessen. Die ermittelten Amplituden der Frequenzanteile $I(\omega)$, $I(2\omega)$ sowie das Verhältnis $\frac{I(\omega)}{I(2\omega)}$ wurden auf den jeweiligen Endwert von 500 mg/dl normiert. Das Ergebnis mit den entsprechenden relativen Abweichungen ist in Abbildung 46 dargestellt.

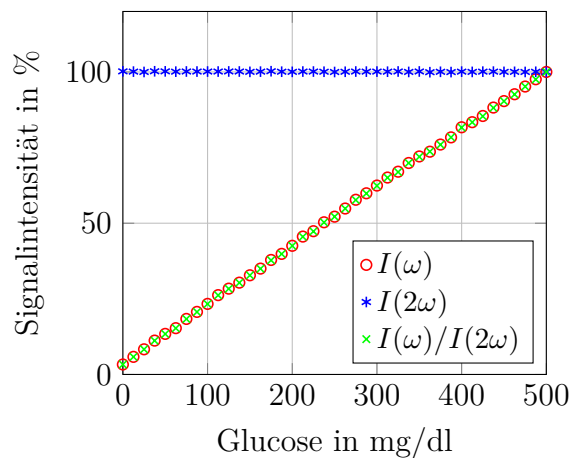


Abbildung 46: Frequenzanteile $I(\omega)$, $I(2\omega)$ und $\frac{I(\omega)}{I(2\omega)}$ in Abhängigkeit von der Glucose-Konzentration normiert auf den Endwert von 500 mg/dl.

Bei Betrachtung der Frequenzanteile wird offensichtlich, dass sich $I(\omega)$ linear mit der Konzentration der Glucose und somit dem Drehwinkel ändert, während $I(2\omega)$ konstant bleibt. Das Intensitätsverhältnis $\frac{I(\omega)}{I(2\omega)}$ weist daher den gleichen relativen Verlauf wie $I(\omega)$ auf, was die Erwartungen aus Abschnitt 2.2.3 und 3.3.3 bestätigt. Daher liegt die Vermutung nahe, dass bei einer Konzentrationsbestimmung ohne zusätzliche Störeinflüsse mit $I(\omega)$ und $\frac{I(\omega)}{I(2\omega)}$ ähnliche Ergebnisse erreicht werden können.

Glucose-Bestimmung ohne Störeinflüsse

Eine Konzentrationsbestimmung erfolgt, indem zunächst ein Kalibrationsmodell aus einem Kalibrierdatensatz erstellt und dann auf einen Validierdatensatz angewendet wird, siehe Abschnitt 3.3.3. Zu diesem Zweck wurden sechs verschiedene Glucose-Konzentrationen von 0, 100, ..., 500 mg/dl jeweils fünf Mal gemessen, wodurch eine Matrixgröße von 30 entsteht. Dieser Vorgang wurde zwei Mal wiederholt. Aufgrund der monochromatischen Daten in diesem Abschnitt erfolgte die Auswertung mittels linearer Regression, bei der der erste Datensatz zur Erstellung des Regressionsmodells verwendet wurde. Als Eingangsdaten wurden die Referenzkonzentrationswerte als x-Werte und die Signale $I(\omega)$ beziehungsweise $\frac{I(\omega)}{I(2\omega)}$ als y-Werte verwendet. Das so erstellte Regressionsmodell wurde anschließend auf den Validierdatensatz angewendet und die vorhergesagte Konzentration

mit den Referenzwerten des Validierdatensatzes verglichen. Die Ergebnisse der Konzentrationsvorhersage sind in Abbildung 47 jeweils für die konventionelle Bestimmung mittels $I(\omega)$ und das kompensierte Signal $\frac{I(\omega)}{I(2\omega)}$ dargestellt. Die gestrichelte Linie steht dabei für die ideale Vorhersage, bei der die Vorhersage der Referenzkonzentration entspricht.

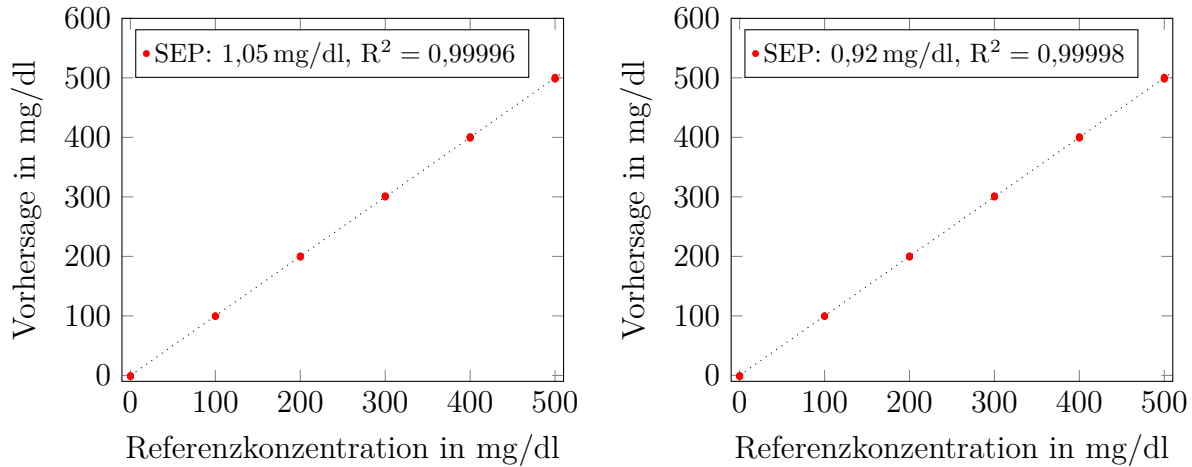


Abbildung 47: Konzentrationsvorhersage für Glucose im Bereich 0 – 500 mg/dl für konstante Umgebungsbedingungen. Links: $I(\omega)$ führt zu einer Genauigkeit von $\pm 1,05$ mg/dl. Rechts: Das kompensierte Signal $\frac{I(\omega)}{I(2\omega)}$ ermöglicht ein SEP von $\pm 0,92$ mg/dl.

Sowohl für $I(\omega)$ als auch für $\frac{I(\omega)}{I(2\omega)}$ werden Vorhersagegenauigkeiten (Standard Error of Prediction (SEP), siehe Gleichung 23) im Bereich von ± 1 mg/dl erreicht. $\frac{I(\omega)}{I(2\omega)}$ liefert mit $\pm 0,92$ mg/dl geringfügig bessere Werte als $I(\omega)$ mit $\pm 1,05$ mg/dl. Aufgrund der in Abbildung 46 dargestellten nahezu identischen relativen Abhängigkeiten war bereits mit einem ähnlichen Ergebnis gerechnet worden.

Weiterhin zeigt eine Vorhersagegenauigkeit von etwa ± 1 mg/dl und ein Regressionskoeffizient von 0,99996 beziehungsweise 0,99998, dass die Bemühungen zur Temperaturstabilisierung und die Optimierung der Reproduzierbarkeit bei der Probenmischung erfolgreich waren. In anderen Arbeiten wurde für ähnliche Aufbauten ein Vorhersagefehler von $\pm 5,4$ mg/dl erreicht [34]. Das ermittelte Ergebnis stellt somit eine gute Basis für die nachfolgenden Untersuchungen zu schwankender Lichtintensität, Probenabsorption und Streuung sowie zur Überlagerung von Rotationsdispersionen in Abschnitt 4.2 dar.

Aus den Ergebnissen kann auch abgelesen werden, ob es zum Beispiel zu Drifteffekten während der Messung oder Kontamination mit zuvor gemessenen Proben kam. Eine Auftragsung der Abweichungen über die jeweiligen Messwertnummern ermöglicht die Identifikation von Driften, wie sie zum Beispiel durch Temperaturschwankungen, Alterung von Komponenten des Messaufbaus oder der Proben verursacht werden können. Sollte es zu Signaldrift gekommen sein, würde dies über die Zeit beziehungsweise Messwertnummer geschehen, was sich wiederum in einer Korrelation der Abweichung mit den Messwertnummern bemerkbar machen würde.

Um einen solchen Effekt zuverlässig zu identifizieren, ist allerdings eine zufällige Reihenfolge der Konzentrationswerte erforderlich um seinerseits eine Korrelation des Fehlers mit der Konzentration auszuschließen. Diese wurde in sämtlichen Messreihen dieser Arbeit eingehalten. In Abbildung 48 werden die Ergebnisse für $I(\omega)$ und $\frac{I(\omega)}{I(2\omega)}$ gegenübergestellt. Eine starke oder eindeutige Korrelation zwischen Bestimmungsfehler und Messwertnum-

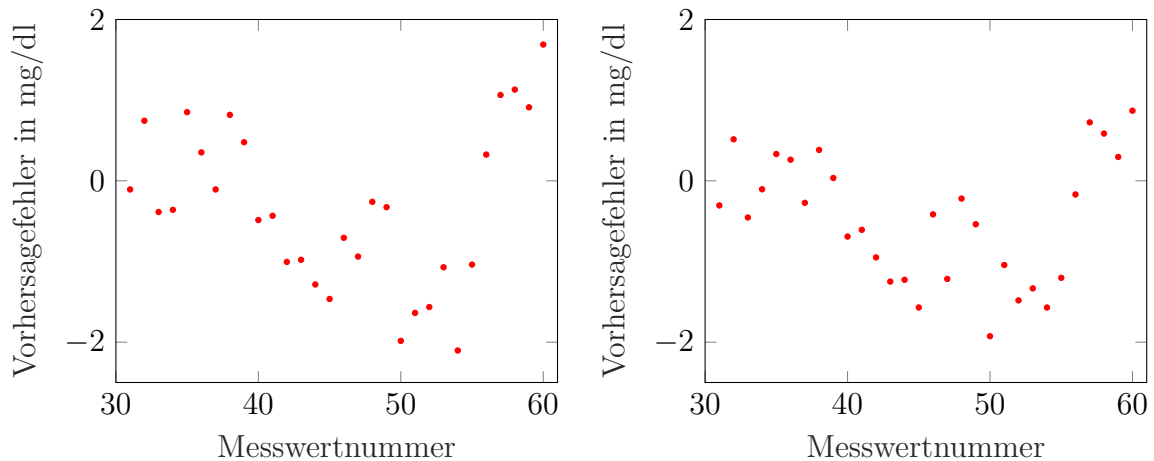


Abbildung 48: Vorhersagefehler in Abhängigkeit von der Messwertnummer. Links: $I(\omega)$, rechts: $\frac{I(\omega)}{I(2\omega)}$.

mer ist nicht festzustellen, was zeigt, dass die in Abschnitt 3.4 beschriebenen Maßnahmen zur Stabilisierung der Messparameter ausreichend sind.

Des Weiteren lässt sich aus den Abweichungen ableiten, ob durch das Spülen der Küvette Rückstände vorheriger Messungen vollständig entfernt werden konnten. In diesem Fall würde bei niedrigen Konzentrationen ein zu hoher Wert vorhergesagt werden, sofern zuvor eine hohe Konzentration gemessen wurde. Entsprechend zu wenig würde bei vorheriger niedriger Konzentration vorhergesagt werden. Um dies zu prüfen, wird die Abweichung über die Differenz zur vorherigen Referenzkonzentration aufgetragen. Diese Ergebnisse sind in Abbildung 49 zu finden.

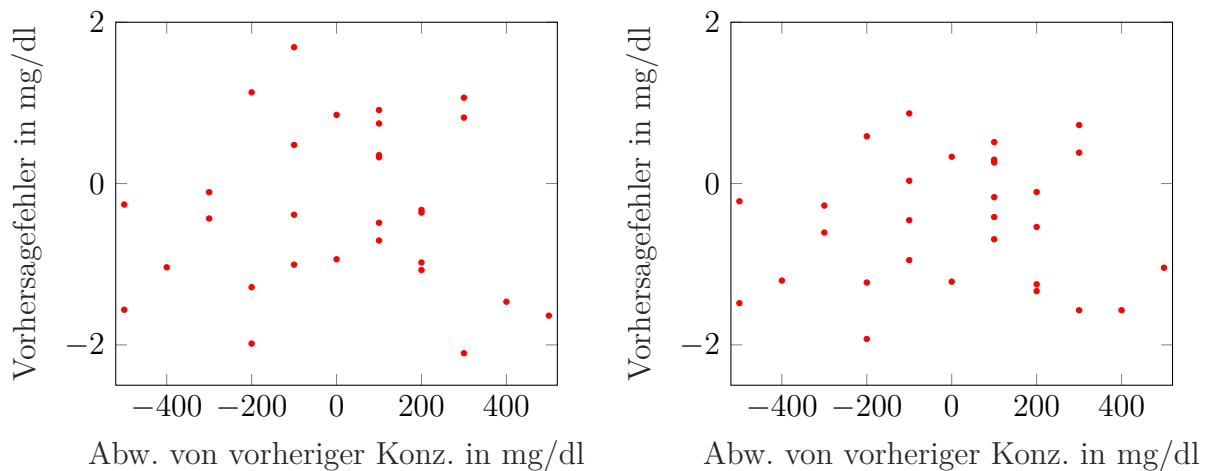


Abbildung 49: Vorhersagefehler in Abhängigkeit der Differenz zu vorherigen Konzentration. Links: $I(\omega)$, rechts: $\frac{I(\omega)}{I(2\omega)}$.

Auch in diesem Fall sind keine eindeutigen Korrelationen zwischen Vorhersagefehler und Differenz zur vorherigen Konzentration erkennbar. Dies bedeutet, dass keine messbaren Reste der vorherigen Proben vorhanden sind und die Spülung der Küvette ausreichend war.

Zusammenfassend lässt sich aus diesen Messungen sagen, dass ohne Störeinflüsse $I(\omega)$ und $\frac{I(\omega)}{I(2\omega)}$ weitgehend identische Ergebnisse liefern. Zudem lässt sich feststellen, dass die Vorhersagegenauigkeit mit circa ± 1 mg/dl etwa um den Faktor fünf besser als bei anderen Arbeitsgruppen ist [34] und dass Drifteffekte und Probenkontamination durch zuvor gemessenen Proben vernachlässigbar klein sind. Im nächsten Schritt soll der Einfluss durch bewusst aufgebrauchte Störungen und damit verbundene Verschlechterung der Messbedingungen untersucht werden.

4.1.1.2 Variation der Lichtquellenintensität

Ein möglicher Einfluss, der zu einer Verschlechterung der Messbedingungen führt, ist eine schwankende Lichtintensität. In der Praxis ist davon auszugehen, dass die Intensität der Lichtquelle, insbesondere über längere Zeit, nicht völlig konstant bleibt, wobei aber auch kurzfristige Schwankungen möglich sind. Hiervon sind sowohl die LDLS als auch die LED betroffen. Hervorgerufen wird dies zum Beispiel durch Alterung oder im Falle einer LED durch Variation der Sperrschichttemperatur. Nach Gleichung 21 hängt der konventionell verwendete Frequenzanteil $I(\omega)$ nicht nur von der Probendrehung Φ , sondern auch von der absoluten Lichtintensität ab. Eine Variation der absoluten Lichtintensität würde sich daher auf die gleiche Weise wie die Drehung durch die Probe auf $I(\omega)$ auswirken, weshalb dieser Einfluss kompensiert werden sollte.

Um zu zeigen, dass das Verhältnis $\frac{I(\omega)}{I(2\omega)}$ hierzu tatsächlich geeignet ist, wurde der Einfluss der Lichtintensität auf die Frequenzanteile $I(\omega)$ und $I(2\omega)$ untersucht. Dazu wurde die Küvette mit einer Glucose-Konzentration von 500 mg/dl befüllt und der LED-Strom um $\pm 10\%$ um den Arbeitspunkt von 400 mA variiert, was der zu erwartenden Schwankungsbreite im praktischen Einsatz entspricht und eine entsprechende Intensitätsschwankung bewirkt.

Der Theorie aus Gleichung 21 und Gleichung 46 nach sollte der Einfluss auf $I(\omega)$ und $I(2\omega)$ gleich und das Verhältnis $\frac{I(\omega)}{I(2\omega)}$ somit unverändert bleiben. Abbildung 50 zeigt die Ergebnisse für eine Variation des LED-Stroms im Bereich von 360 – 440 mA.

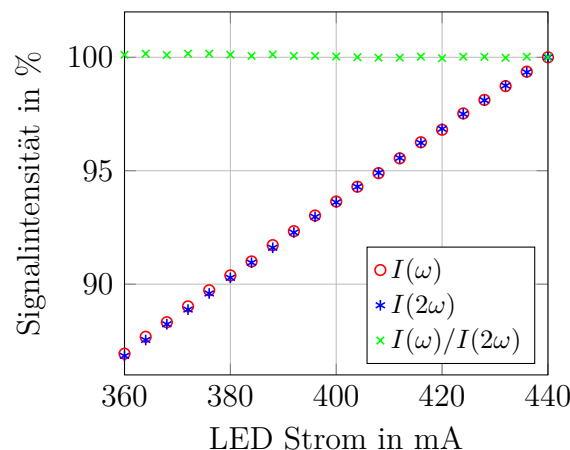


Abbildung 50: Frequenzanteile $I(\omega)$, $I(2\omega)$ und $\frac{I(\omega)}{I(2\omega)}$ in Abhängigkeit des LED-Stroms im Bereich 360 – 440 mA bei einem Glucose-Wert von 500 mg/dl und ohne Absorption, normiert auf den Endwert.

Es ist ersichtlich, dass sich Änderungen des LED-Stroms auf $I(\omega)$ und $I(2\omega)$ wie erwartet auf gleiche Weise auswirken. Folglich bleibt das Intensitätsverhältnis $\frac{I(\omega)}{I(2\omega)}$ konstant und

der Einfluss der Lichtintensitätsschwankungen kann im Vergleich zu $I(\omega)$ um mehr als 99 % reduziert werden. Folglich ist für das Kompensationsverhältnis auch keine erhöhte Unsicherheit festzustellen.

Um im nächsten Schritt die Auswirkung auf die Konzentrationsbestimmung zu evaluieren, wurden wie in Abschnitt 4.1.1.1 zwei Sätze von jeweils 30 Proben mit Glucose-Konzentrationen von 0, 100, ..., 500 mg/dl gemessen. Jeder Glucose-Wert wurde dabei 5 Mal mit einem unterschiedlichen LED-Strom im Bereich 360, 380, ..., 440 mA wiederholt. Anschließend wurde ebenso eine lineare Regression durchgeführt, bei der nacheinander $I(\omega)$ und $\frac{I(\omega)}{I(2\omega)}$ als Eingangsdaten verwendet werden. Die Ergebnisse für beide Fälle sind in Abbildung 51 zu finden.

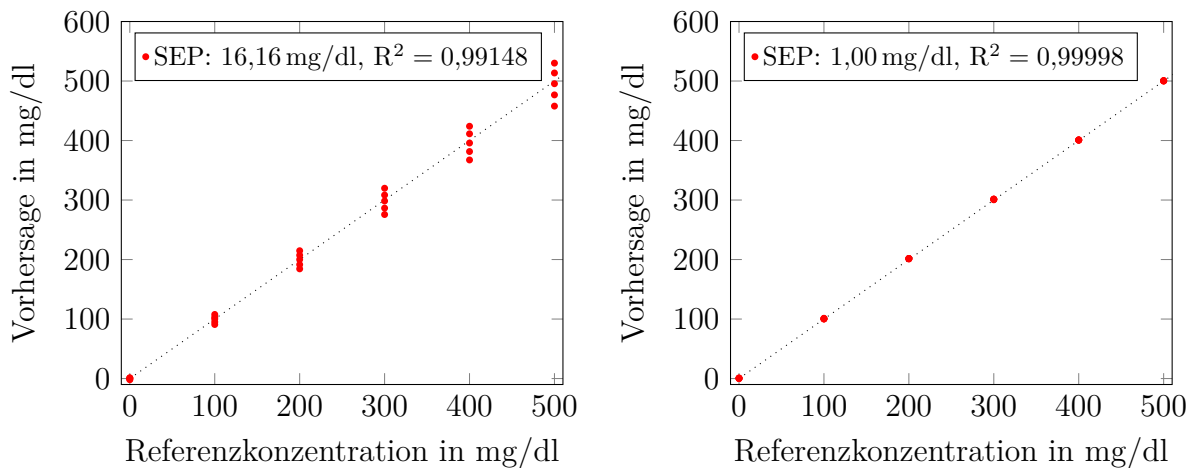


Abbildung 51: Konzentrationsvorhersage für Glucose im Bereich 0 – 500 mg/dl bei Variation der Lichtquellenintensität von 360 – 440 mA. Links: Konventionelles Signal $I(\omega)$, rechts: Kompensiertes Signal $\frac{I(\omega)}{I(2\omega)}$.

Der Glucose-Vorhersagefehler mit dem in anderen Arbeiten verwendeten Frequenzanteil $I(\omega)$ verschlechtert sich im Vergleich zum Fall ohne Störungen aus Abbildung 47 deutlich auf $\pm 16,16$ mg/dl. Außerdem wird nur noch ein Bestimmtheitsmaß von $R^2 = 0,99148$ statt zuvor $R^2 = 0,99996$ erreicht. Im Gegensatz dazu ermöglicht die Verwendung von $\frac{I(\omega)}{I(2\omega)}$ eine Vorhersagegenauigkeit von $\pm 1,00$ mg/dl mit $R^2 = 0,99998$. Diese Werte entsprechen nahezu exakt den Werten aus Abbildung 47 ohne Störung. Dies zeigt, dass die Verwendung des Kompensationsverhältnisses besonders bei sich verschlechternden Umgebungsbedingungen deutliche Vorteile bietet. Diese Messung wurde auch für eine deutlich stärkere Stromschwankung von ± 50 % im Bereich 200 – 600 mA durchgeführt. Hier konnte der Vorhersagefehler von $\pm 82,28$ mg/dl auf $\pm 1,05$ mg/dl reduziert werden. Somit ist das Ergebnis unter Verwendung des Verhältnisses $\frac{I(\omega)}{I(2\omega)}$ selbst bei starker Schwankung der Lichtquellenintensität erheblich besser als bei konventioneller Bestimmung mittels $I(\omega)$ bei anderen Arbeitsgruppen [34].

4.1.1.3 Schwankung der Probenabsorption

Als eine weitere Störquelle sind auftretende Absorptionen der Lichtintensität durch die Probe zu nennen. So kann es speziell im Blutplasma unter anderem durch die enthaltenen Eiweiße zu nicht unerheblichen Absorptionseffekten kommen, siehe Abschnitt 3.4.2.4. Ähnlich wie bei den Schwankungen der Lichtquellenintensität in Abschnitt 4.1.1.2 würde

dies zu einer Reduktion der absoluten Lichtintensität und somit zu einer Verfälschung des $I(\omega)$ -Signals führen.

Es folgt daher eine Untersuchung, inwieweit das Intensitätsverhältnis $\frac{I(\omega)}{I(2\omega)}$ in der Lage ist, auch die Probenabsorption zu kompensieren. Für diese Messungen wurde der rote Farbstoff Allura Red AC (Sigma Aldrich, Deutschland) im Konzentrationsbereich 0–0,2 mg/dl verwendet, dessen maximale Absorptionswellenlänge von 504 nm dicht an der zentralen Emissionswellenlänge von 528 nm der für diesen Test verwendeten grünen LED liegt.

Wie bereits in Abschnitt 4.1.1.2 erfolgt, wurde zunächst der Einfluss auf die Frequenzanteile $I(\omega)$, $I(2\omega)$ sowie $\frac{I(\omega)}{I(2\omega)}$ untersucht. Hierzu wurde die Glucose-Konzentration konstant auf 500 mg/dl sowie der LED-Strom bei 400 mA stabilisiert, während die Allura Red AC Konzentration zwischen 0 mg/dl und 0,2 mg/dl variiert wurde. Zu erwarten ist, dass sich, wie bereits für die Lichtquellenintensität gezeigt, die Auswirkungen der Absorption auf $I(\omega)$ und $I(2\omega)$ identisch bemerkbar machen. Die Resultate sind in Abbildung 52 dargestellt.

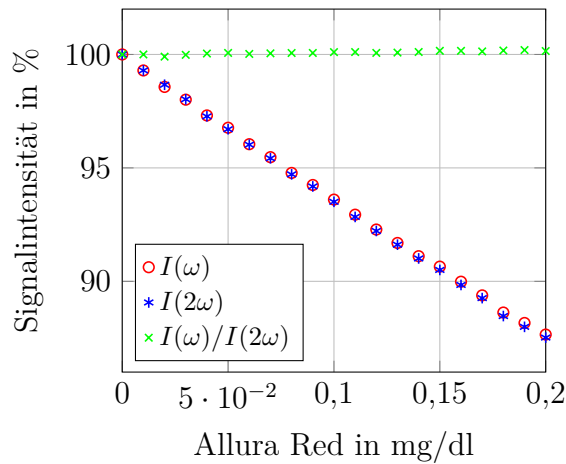


Abbildung 52: Frequenzanteile bei einem LED-Strom von 400 mA und 500 mg/dl Glucose für variierende Allura Red Konzentration von 0 – 0,2 mg/dl.

Es zeigt sich, dass $I(\omega)$ und $I(2\omega)$ mit steigender Allura Red Konzentration tatsächlich auf gleiche Weise verändert werden. Das Intensitätsverhältnis $\frac{I(\omega)}{I(2\omega)}$ bleibt hingegen stabil. Es ist lediglich ein sehr geringer Anstieg zu beobachten, dessen Ursache nicht vollständig geklärt werden konnte. Eine mögliche Ursache könnte eine optische Aktivität des Allura Red AC Farbstoffs sein. Um diese Vermutung zu überprüfen, wurde der Hersteller kontaktiert. Er konnte jedoch ebenfalls keine eindeutigen Informationen hierüber liefern. Dieser Effekt ist aber im Vergleich zur Änderung in den einzelnen Frequenzanteilen vernachlässigbar.

In einem nächsten Schritt erfolgte die Evaluation des Einflusses auf die Bestimmung der Glucose-Konzentration. Zu diesem Zweck wurden wie in Abschnitt 4.1.1.2 zwei identische Sätze aus je 30 Proben zur Kalibrierung respektive Validierung aufgenommen. Jede der sechs verschiedenen Glucose-Konzentrationen im Bereich von 0, 100, ..., 500 mg/dl wurde dabei mit einer von fünf verschiedenen Dosierungen des Allura Red AC im Bereich von 0 – 0,2 mg/dl kombiniert, was in einer Matrixgröße von 30 resultiert. Wie bereits aus Abbildung 52 hervorgegangen, wird erwartet, dass eine Variation der Probenabsorption zu einer deutlichen Verschlechterung der Glucose-Bestimmungsgenauigkeit auf Basis von $I(\omega)$ führt. Die Gegenüberstellung der für $I(\omega)$ und $\frac{I(\omega)}{I(2\omega)}$ erreichten Genauigkeiten erfolgt

in Abbildung 53.

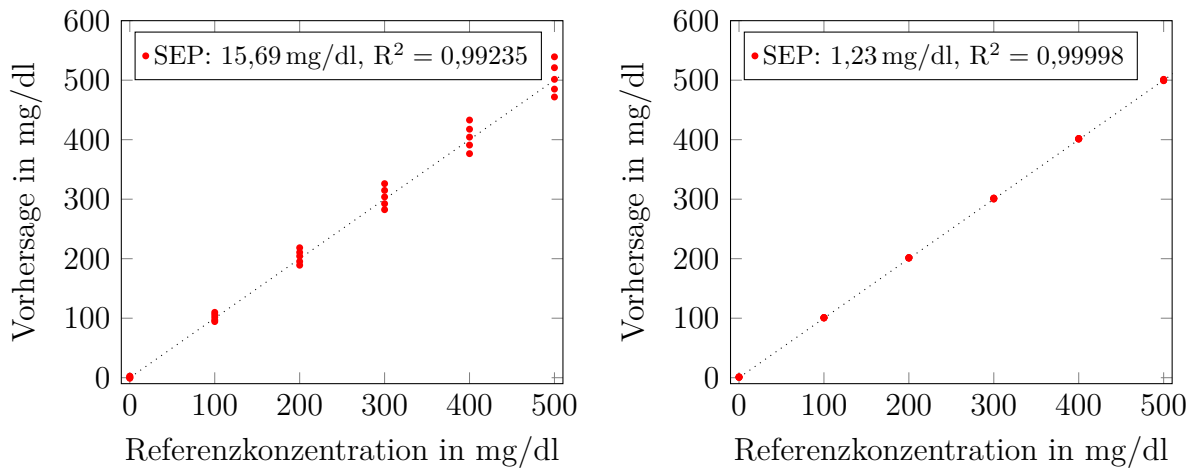


Abbildung 53: Konzentrationsvorhersage für Glucose im Bereich 0 – 500 mg/dl bei Variation der Probenabsorption durch Allura Red AC im Bereich 0 – 0,2 mg/dl. Links: Konventionelles Signal $I(\omega)$, rechts: Kompensiertes Signal $\frac{I(\omega)}{I(2\omega)}$.

Auch hier wird deutlich, dass eine Variation der Probenabsorption die Bestimmungsgenauigkeit mittels konventionellem $I(\omega)$ im Vergleich zum Fall ohne Störung aus Abschnitt 4.1.1.1 deutlich verschlechtert. Es wird eine Standardabweichung von $\pm 15,69$ mg/dl und ein Regressionskoeffizient von $R^2 = 0,99235$ erzielt. Wird für die Konzentrationsbestimmung das Kompensationsverhältnis $\frac{I(\omega)}{I(2\omega)}$ verwendet, verbessert sich die Vorhersagegenauigkeit auf $\pm 1,23$ mg/dl und der Regressionskoeffizient auf 0,99998. Dies entspricht in etwa den Ergebnissen ohne Störung. Um den Einfluss eines stark absorbierenden Mediums zu zeigen, wurde diese Messung auch für eine zehnfache Erhöhung der Allura Red Konzentration von 0 – 2 mg/dl durchgeführt. In diesem Fall konnte die Genauigkeit sogar von $\pm 110,68$ mg/dl auf 1,37 mg/dl verbessert werden. Dies zeigt erneut, dass die Verwendung von $\frac{I(\omega)}{I(2\omega)}$ die Glucosebestimmung deutlich unabhängiger von Einflüssen durch Probenabsorption macht.

4.1.1.4 Einfluss der Streuung

Neben Schwankungen der absoluten Lichtintensität, hervorgerufen durch Lichtquelle oder Probenabsorption, stellen auch Streueffekte einen erheblichen Störeinfluss dar. Durch die senkrecht zueinander angeordneten Polarisationsfilter und die Faraday-Modulation enthalten die Intensitäten der Frequenzanteile $I(\omega)$ und $I(2\omega)$ nur vollständig polarisiertes Licht. Depolarisiertes Licht zum Beispiel durch ein zu geringes Auslöschungsverhältnis oder Streueffekte innerhalb der Wegstrecke des Lichtes lässt den Frequenzanteil $I(DC)$ steigen. Entsprechend fehlt dieses Licht bei $I(\omega)$ und $I(2\omega)$ und würde bei konventioneller Konzentrationsbestimmung unter Verwendung von $I(\omega)$ zu Fehlern führen.

Insbesondere die Streuung innerhalb der Probe stellt eines der größten Probleme in der Polarimetrie dar, da es sich in der Regel um keinen statischen Zustand handelt und sie für jede Probe individuell ist. In der Vergangenheit haben sich daher diverse Arbeitsgruppen mit der Auswertung polarimetrischer Signale aus streuenden Medien beschäftigt, siehe Abschnitt 1.2.4. Diese Arbeiten wurden jedoch mit sehr hohen Glucosekonzentrationen von 16.200 – 180.000 mg/dl [158, 159, 163] durchgeführt. Die jeweiligen

Streukoeffizienten betragen in diesem Zusammenhang $20 - 100 \text{ cm}^{-1}$ [158, 159, 163]. Es wurde gezeigt, dass der Streukoeffizient einen massiven Einfluss auf das Polarimetersignal hat [158, 165, 169, 283]. Eine Skalierung auf den physiologischen Konzentrationsbereich sowie die Untersuchung, inwieweit die Verwendung von $\frac{I(\omega)}{I(2\omega)}$ auch hier helfen kann, steht ebenso noch aus, wie eine Messung der Kompensation bei variierender Streuung in der Glucose-Konzentrationsbestimmung.

In der Vergangenheit wurden verschiedene Stoffe zur Simulation von Streueigenschaften wie Polystyrol Kugeln [159, 163, 165] oder Fettemulsionen wie Intralipid[®] [164] verwendet. Aufgrund ihrer guten Verfügbarkeit und der Einfachheit bietet sich eine Fettemulsion an, die in verschiedenen Zusammensetzungen aus Sojabohnenöl, Olivenöl, Glycerin und weiteren Stoffen verfügbar ist [284]. Zur Erzeugung von Streueffekten wird in diesem Abschnitt 20 %-ige ClinOleic[®] (Baxter GmbH, Deutschland) verwendet und entsprechend verdünnt. Da Fettemulsionen einen vergleichsweise geringen Absorptionskoeffizienten aufweisen [164, 284], kann in diesem Test davon ausgegangen werden, dass vorrangig die Streuung als Störeinfluss gemessen wird.

ClinOleic[®] ist Intralipid[®] sehr ähnlich, welches in anderen Arbeiten zu diesem Zweck bereits verwendet wurde [164], und weist bei der LED-Wellenlänge von 532 nm einen Streukoeffizienten von etwa 1120 cm^{-1} auf [284]. Da der physiologische Glucose-Konzentrationsbereich um etwa den Faktor 100 geringer als der von anderen Arbeitsgruppen untersuchte ist [158, 159, 163], wurde die Stärke der Streuung entsprechend angepasst, um ein ähnliches Verhältnis von Glucosekonzentration zu Streukoeffizient zu schaffen. Zu diesem Zweck wurde für den Streukoeffizienten ein Basiswert von $\mu_s = 0,25 \text{ cm}^{-1}$ angesetzt, was einer ClinOleic[®]-Konzentration von etwa 22,32 mg/dl entspricht.

Zunächst wurde auch hier wieder der Einfluss auf $I(\omega)$, $I(2\omega)$ sowie $\frac{I(\omega)}{I(2\omega)}$ untersucht. Dazu wurde die Glucose-Konzentration bei 500 mg/dl und der LED-Strom konstant bei 400 mA gehalten, während der Streukoeffizient um $\pm 10\%$ im Bereich $0,225 - 0,275 \text{ cm}^{-1}$ variiert wurde. Die Ergebnisse befinden sich in Abbildung 54.

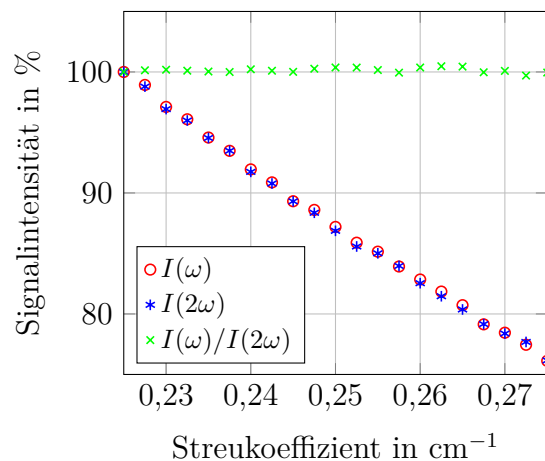


Abbildung 54: Frequenzanteile $I(\omega)$, $I(2\omega)$ und $\frac{I(\omega)}{I(2\omega)}$ in Abhängigkeit des Streukoeffizienten im Bereich $\mu_s = 0,225 - 0,275 \text{ cm}^{-1}$.

Es zeigt sich erneut, dass der Streukoeffizient auf $I(\omega)$ und $I(2\omega)$ einen identischen Einfluss hat. Das Verhältnis $\frac{I(\omega)}{I(2\omega)}$ bleibt wie schon bei den beiden Tests zur Schwankung der absoluten Lichtintensität aus Abschnitt 4.1.1.2 und 4.1.1.3 nahezu unbeeinflusst. Dies ist solange der Fall, bis die Streuung zu einer vollständigen Depolarisation des Signals führt

und bei $I(\omega)$ und $I(2\omega)$ keine messbaren Intensitäten mehr vorhanden sind, aus denen sich ein Verhältnis bilden lässt oder der Fehler im Rauschen zu so großen Fehlern im Verhältnis von $\frac{I(\omega)}{I(2\omega)}$ führt, dass diese den Messwert um ein Vielfaches übersteigen.

Aufgrund dieser Ergebnisse liegt die Vermutung nahe, dass $\frac{I(\omega)}{I(2\omega)}$ auch für die Konzentrationsbestimmung von Glucose einen entscheidenden Vorteil bringen kann. Für diese Untersuchung wurde wie in Abschnitt 4.1.1.2 und 4.1.1.3 für jeden Glucosewert von 0, 100, ..., 500 mg/dl der Streukoeffizienten in fünf Schritten von $0,225 - 0,275 \text{ cm}^{-1}$ variiert.

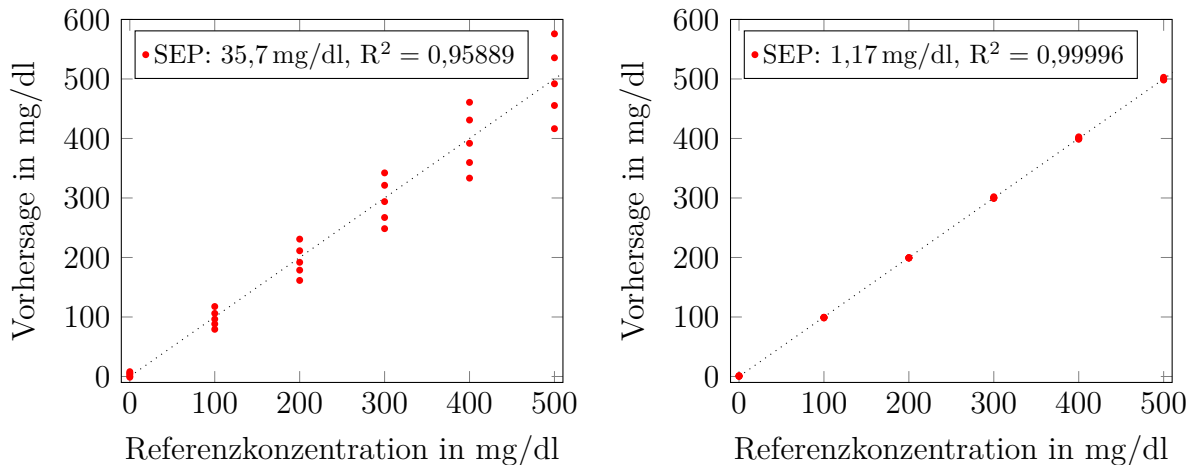


Abbildung 55: Konzentrationsvorhersage für Glucose im Bereich 0 – 500 mg/dl für konstante Umgebungsbedingungen. Links: Die Verwendung des konventionellen Signals $I(\omega)$ führt zu einer Genauigkeit von $\pm 1,05 \text{ mg/dl}$. Rechts: Das kompensierte Signal $\frac{I(\omega)}{I(2\omega)}$ ermöglicht ein SEP von $\pm 0,92 \text{ mg/dl}$.

Es zeigt sich, dass der Streukoeffizient den Vorhersagefehler auf $\pm 35,7 \text{ mg/dl}$ erhöht und sich der Regressionskoeffizient auf $R^2 = 0,95889$ reduziert. Der Fehler kann hingegen durch Verwendung von $\frac{I(\omega)}{I(2\omega)}$ ausgeglichen werden. Für den kompensierten Fall wird dadurch eine Vorhersagegenauigkeit von $\pm 1,17 \text{ mg/dl}$ und $R^2 = 0,99996$ erreicht. Dies entspricht wie bei den anderen Störfällen dem Fehler bei der Vorhersage ohne zusätzliche Störquellen. Abschließend lässt sich für die drei Fälle von schwankender Lichtintensität, variierender Probenabsorption oder sich verändernder Streuung sagen, dass sich die Vorhersagegenauigkeit durch die Verwendung von $\frac{I(\omega)}{I(2\omega)}$ massiv verbessern lässt. Während der Fehler bei konventioneller Bestimmung mittels $I(\omega)$ deutlich ansteigt, bleibt dieser bei Verwendung des Kompensationsverhältnis auf dem Niveau ohne zusätzliche Störquellen. Selbst für den Fall dieser starken, bewusst hervorgerufenen Störungen auf das Signal bleibt der Vorhersagefehler mit $\frac{I(\omega)}{I(2\omega)}$ etwa um den Faktor vier bis fünf unterhalb dem anderer Arbeitsgruppen [34], die ohne zusätzliche Störquellen gearbeitet haben. Dementsprechend kann, unter der Voraussetzung eines vorhandenen Restsignals, unabhängig von schwankender Lichtintensität, Probenabsorption oder Streueffekten gemessen werden. Diese Methode führt zu einer erheblichen Verbesserung der Reproduzierbarkeit und erhöhten Robustheit des Messaufbaus und wird für sämtliche folgenden Messungen angewendet.

4.1.2 Breitbandige Bestimmung der Glucose-Konzentration

Um im nächsten Schritt zu zeigen, dass die Kompensationsmethode auch für breitbandige Messungen einen Vorteil bietet, wurden die Messungen aus Abschnitt 4.1.1 mit dem in 3.1 beschriebenen Messaufbau wiederholt. Dabei wird in diesem Kapitel untersucht, inwieweit die Datenauswertung mittels PLSR in der Lage ist, Rotation und Störeinflüsse spektral zu unterscheiden. In diesem Zusammenhang erfolgte ein Vergleich mit der Zwei-Wellenlängen-Methode bei 532 nm und 635 nm anderer Autoren [46, 50, 152, 157]. Ebenso erfolgte eine Betrachtung des $I(2\omega)$ -Frequenzanteils zur Konzentrationsbestimmung von Albumin mittels Messung der Probenabsorption. Eine Übersicht der Messungen dieses Kapitels gibt Tabelle 8.

Tabelle 8: Überblick über die in Abschnitt 4.1.2 durchgeführten Messungen.

Ab-schnitt	Glucose in mg/dl	LED-Strom in A	Allura Red AC in mg/dl	Streukoeffizient in cm^{-1}
4.1.2.1	0; 100; ...; 500	1	0	0
4.1.2.1	0; 100; ...; 500	1	0	0
4.1.2.2	500	0,9; 0,91; ...; 1,1	0	0
4.1.2.2	0; 100; ...; 500	0,9; 0,94; ...; 1,1	0	0
4.1.2.3	500	1	0; 0,01; ...; 0,2	0
4.1.2.3	0; 100; ...; 500	1	0; 0,05; ...; 0,2	0
4.1.2.4	500	1	0	0,225; 0,2275; ...; 0,275
4.1.2.4	0; 100; ...; 500	1	0	0,225; 0,2375; ...; 0,275

4.1.2.1 Glucose-Bestimmung ohne Störeinflüsse

Zunächst erfolgte eine Charakterisierung der Bestimmungsgenauigkeit ohne Störeinflüsse wie bereits bei dem monochromatischen Ansatz in Abschnitt 4.1.1.1. Im Gegensatz zu der dort verwendeten linearen Regression wurde für die breitbandigen Messdaten jedoch eine multivariate Regression mit dem in Abschnitt 3.3.3 beschriebenen und im Rahmen dieser Arbeit erstellten Matlab[®]-Auswerteskripts verwendet.

In einem ersten Schritt wurde wie in Abbildung 46 der Einfluss der Glucose-Konzentration auf die jeweiligen Frequenzanteile $I(\omega)$, $I(2\omega)$ sowie das Verhältnis $\frac{I(\omega)}{I(2\omega)}$ untersucht. Dazu wurde die Glucose-Konzentration in Abstufungen von 25 mg/dl im Bereich von 0 – 500 mg/dl variiert. Die Frequenzanteile sind normiert auf den höchsten Glucose-Wert für den Wellenlängenbereich von 380 – 680 nm in Abbildung 56 dreidimensional dargestellt.

Deutlich zu erkennen ist, dass sich der Frequenzanteil $I(\omega)$ linear mit der Konzentration der Glucose beziehungsweise der Rotation ändert, während $I(2\omega)$ wie auch schon bei der monochromatischen Messung konstant bleibt. Das Intensitätsverhältnis $\frac{I(\omega)}{I(2\omega)}$ verhält sich relativ gesehen somit identisch zu $I(\omega)$ und ist optisch kaum zu unterscheiden. Dies entspricht den Erwartungen und den in Abschnitt 4.1.1.1 gewonnenen Erkenntnissen.

Um im nächsten Schritt die Auswirkungen auf die Glucose-Bestimmungsgenauigkeit zu

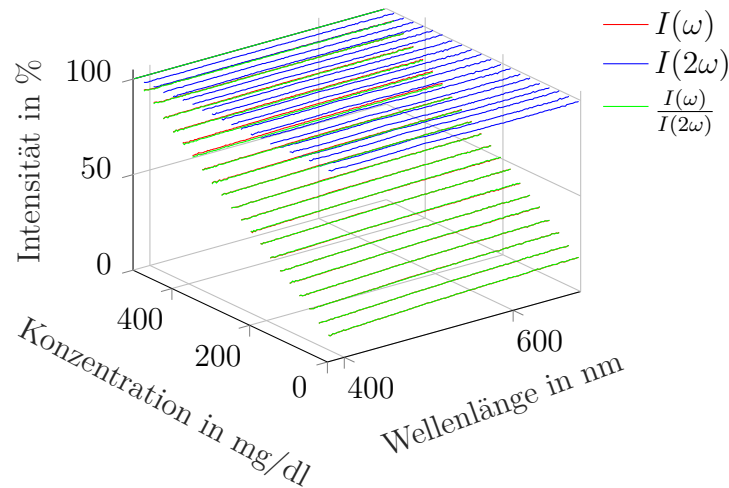


Abbildung 56: Breitbandige Frequenzanteile in Abhängigkeit von der Glucose-Konzentration.

untersuchen, wurden für jede Messung drei identische Datensätze mit je 36 Konzentrationswerten hintereinander aufgenommen. Jeder Datensatz bestand dabei aus sechs verschiedenen Glucose-Dosierungen im Bereich von 0, 100, ..., 500 mg/dl, die jeweils in sechs Konzentrationsstufen mit einem entsprechendem Störstoff versehen wurden, sodass jede Kombination von Glucose mit einem Störstoff zu einer Matrixgröße von 6 x 6 führte, siehe auch Abbildung 30. Der Ablauf bei der Datenauswertung war zwecks besserer Vergleichbarkeit in den folgenden Messungen stets gleich. Mehr Informationen hierzu sind auch in Abschnitt 3.3.2 und 3.3.3 zu finden.

Die ersten beiden Datensätze wurden für die Erstellung des Kalibrationsmodells verwendet, mit dem die Konzentrationswerte des dritten Datensatzes zur Validierung vorhergesagt wurde. Im Matlab[®]-Skript zur Auswertung kann die Art der Eingangsdaten gewählt werden, zum Beispiel, ob $I(\omega)$, $\frac{I(\omega)}{I(2\omega)}$ oder $I(2\omega)$ zur Konzentrationsbestimmung verwendet werden soll.

Ebenfalls einstellbar ist der Wellenlängenbereich. Aufgrund der spektralen Charakteristik der LDLS sowie der Absorption durch den Faraday-Rotator (siehe Abbildung 18) ist der Wellenlängenbereich auf oberhalb von 380 nm begrenzt, da unterhalb dieses Wertes die Signalamplitude zu gering ist. Auf der langwelligen Seite ist der Wellenlängenbereich ebenfalls begrenzt, da einerseits die Lichtquellenintensität abnimmt (siehe Abbildung 17) und andererseits sowohl die Modulationstiefe beziehungsweise die Verdet-Konstante des Faraday-Rotators (vergleiche 3.1.3.1) als auch die Rotationsdispersion der optisch aktiven Stoffe (vergleiche 2.1.1) mit steigender Wellenlänge sinkt. Wie in Gleichung 21 beschrieben, tragen diese Faktoren gemeinsam zur Gesamtintensität der jeweiligen Frequenzanteile bei, sodass es mit steigender Wellenlänge zu einem besonders starken Signalabfall und damit verbundener Reduktion des S/N kommt, der die Verwendung der Rotationspektren nur bis etwa 680 nm möglich macht.

Andererseits war durch die hohe Intensität bei etwa 500 nm der Dynamikbereich limitiert, wodurch das schwache Signal unterhalb von 380 nm und oberhalb von 680 nm nicht durch Nachregelung der Integrationszeit oder andere Maßnahmen gesteigert werden konnte. Deshalb war der Wellenlängenbereich mit dieser Konfiguration für die folgenden Messungen auf 380 – 680 nm begrenzt. Da zur Messung der vollständigen Rotationsdispersion ein

spektral breitbandiger Bereich erforderlich ist, wurde der gesamte zur Verfügung stehende Wellenlängenbereich von 380 – 680 nm für die Regressionsanalyse genutzt.

Eingestellt werden kann auch die Breite der spektralen Mittelung. Da es besonders beim Intensitätsverhältnis $\frac{I(\omega)}{I(2\omega)}$ zu spektralem Rauschen kommen kann, jedoch bei der Rotationsdispersion keine scharfkantigen Änderungen aufgelöst werden müssen, bietet sich eine solche Mittelung an. Für die Breite wurden jeweils fünf Pixel gewählt.

Die Anzahl an Komponenten bestimmt, wie viele spektrale Merkmale im Regressionsmodell verwendet werden, vgl. Abschnitt 2.3.1. Je komplexer der Zusammenhang zwischen Spektren und Probenkonzentration ist, desto mehr Komponenten werden in der Regel benötigt. Liegt die Anzahl der Komponenten über dem der optimalen Vorhersage, so ist mit einem Anstieg des Vorhersagefehlers zu rechnen. Die Ergebnisse sind sowohl für $I(\omega)$ als auch für $\frac{I(\omega)}{I(2\omega)}$ unter Verwendung von fünf Komponenten in Abbildung 57 dargestellt.

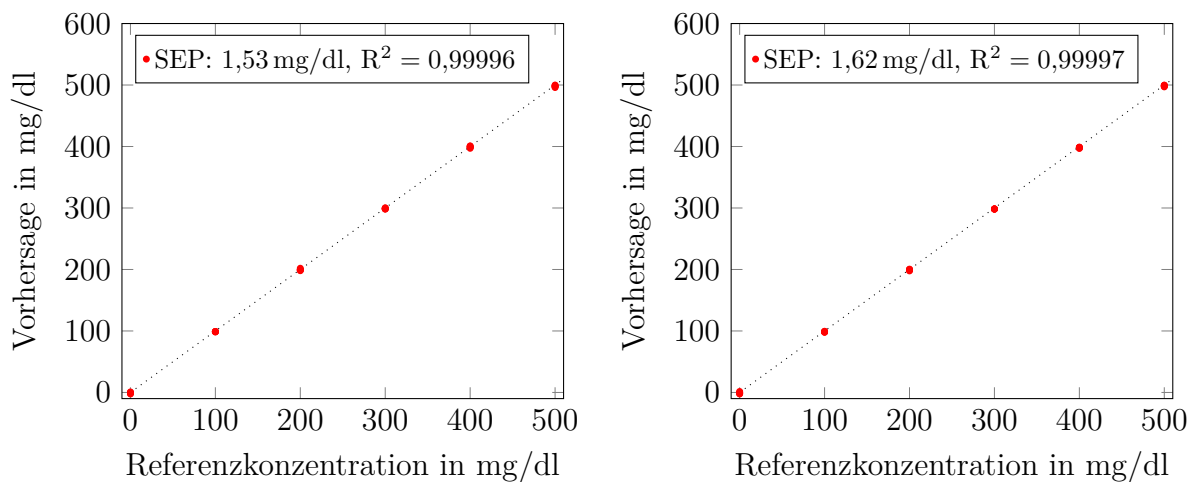


Abbildung 57: Glucose-Vorhersage mittels PLS-Regression und fünf Komponenten. Links: mit $I(\omega)$, rechts: mit $\frac{I(\omega)}{I(2\omega)}$.

Es zeigt sich, dass für $I(\omega)$ und $\frac{I(\omega)}{I(2\omega)}$ mit $\pm 1,53$ mg/dl beziehungsweise $\pm 1,62$ mg/dl sehr ähnliche Werte erreicht werden. Dies deckt sich mit den monochromatischen Ergebnissen aus Abschnitt 4.1.1.1, da es auch hier keine kompensierenden Störeinflüsse gibt und eine lineare Abhängigkeit zwischen Glucose-Konzentration und Signal besteht und nicht zwischen Glucose und Störgröße unterschieden werden muss.

Um die Vorhersagequalität einer spektral breitbandigen PLS-Regression mit der aus der Literatur bekannten Zwei-Wellenlängen-Bestimmung [46, 50, 152, 157] zu vergleichen, besteht die Möglichkeit, aus den spektralen Daten die Intensitätswerte bei bestimmten Wellenlängen zu extrahieren. Der Fehler durch Drift oder ähnliche Störeinflüsse ist dabei identisch, da es sich um dieselbe Messung handelt. Aufgrund ihrer allgemeinen Verwendung in anderen Messaufbauten [46, 50, 152, 157] bieten sich die Laserwellenlängen 532 nm und 635 nm an. Dort wurden mit $\pm 1,75$ mg/dl und $\pm 2,12$ mg/dl für $I(\omega)$ und $\frac{I(\omega)}{I(2\omega)}$ ähnliche Werte erreicht. Die leicht erhöhten Werte im Vergleich zur monochromatischen Bestimmung mittels LED aus Abschnitt 4.1.1.1 lassen sich darauf zurückführen, dass sich die Intensität beim Spektrometer auf sämtliche Pixel verteilt, wodurch ein einzelnes Pixel weniger Lichtintensität und erfasst somit mehr Rauschen.

4.1.2.2 Variation der Lichtquellenintensität

Ein Störeinfluss, der die Bestimmungsgenauigkeit beeinträchtigen kann, sind Schwankungen der Lichtquellenintensität. Dieser Effekt kann zum Beispiel durch Alterung der Leuchtmittel auftreten oder im Falle der LDLS durch ein nicht immer gleichmäßig brennendes Plasma entstehen.

Für diese Untersuchung muss die Lichtquelle definiert gedimmt werden können. Da die LDLS nur an oder aus geschaltet werden kann, und eine gezielte Intensitätsvariation nur manuell über Blenden möglich wäre, wurde für diese Messung auf die weiße Cree XM-L LED aus Abschnitt 3.1.1 zurückgegriffen, was allerdings den nutzbaren Spektralbereich etwas einschränkt. Die Lichtintensität der LED lässt sich durch den LED-Strom entsprechend regeln. Als Ausgangspunkt wurde ein Strom von 1000 mA gewählt, der um $\pm 10\%$ variiert wird. Dies entspricht einem Bereich von 900 – 1100 mA.

Während dieser Variation wurde die Glucose-Konzentration zunächst konstant auf einem Wert von 500 mg/dl gehalten, um den direkten Einfluss auf die Frequenzanteile $I(\omega)$, $I(2\omega)$ und $\frac{I(\omega)}{I(2\omega)}$ zu bestimmen. Die Darstellung der Ergebnisse befindet sich in Abbildung 58.

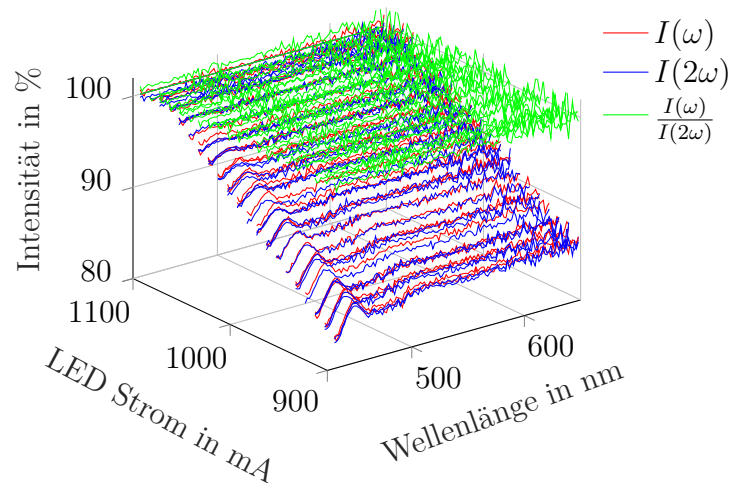


Abbildung 58: Breitbandige Frequenzanteile in Abhängigkeit vom LED-Strom.

Deutlich wird, dass sich $I(\omega)$ und $I(2\omega)$ gleichermaßen mit dem LED-Strom beziehungsweise der Lichtintensität um bis zu 20 % ändern. Neben der absoluten Schwankung ist auch eine relative, spektrale Verschiebung im Blau-Anteil der LED zu beobachten. Dies resultiert aus dem Aufbau einer Weißlicht-LED, ist jedoch für die späteren Messungen nicht relevant, da zum einen die LDLS statt der LED verwendet wird und zum anderen das Verhältnis $\frac{I(\omega)}{I(2\omega)}$ nicht beeinflusst wird. Das im Vergleich zu den Messungen mit der LDLS höhere Rauschen ist mit der geringeren Lichtintensität der LED zu erklären.

Es folgte die Evaluation des Einflusses auf die Glucose-Konzentrationsbestimmung, indem die Konzentrationsmatrix mit verschiedenen LED-Strömen kombiniert wurde. Dabei wurden zur Messung der sechs verschiedenen Glucose-Konzentrationen von 0 – 500 mg/dl jeweils sechs verschiedene LED-Ströme von 900 – 1100 mA verwendet. Auch hier wurden die 6 x 6 Matrizen drei Mal wiederholt und mit identischem Vorgehen aus den ersten beiden Datensätzen auf die Konzentration geschlossen. Lediglich der Wellenlängenbereich musste aufgrund der spektralen Charakteristik der LED auf 425 – 650 nm reduziert werden. Abbildung 59 zeigt die Ergebnisse für $I(\omega)$ und $\frac{I(\omega)}{I(2\omega)}$.

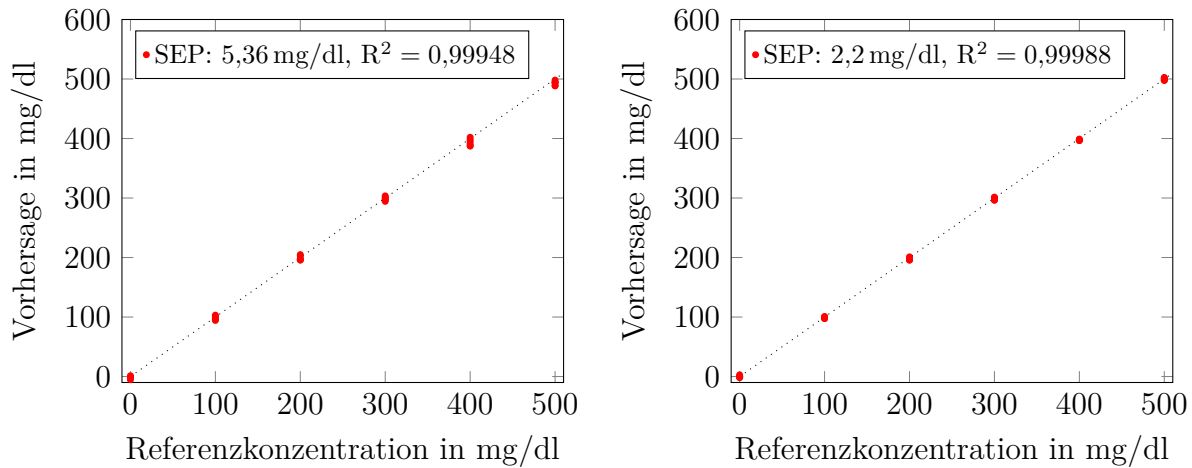


Abbildung 59: Glucose-Vorhersage bei 900 – 1100 mA und 425 – 650 nm. Links: Konventionelles $I(\omega)$ -Signal, rechts: Das kompensierte Signal $\frac{I(\omega)}{I(2\omega)}$.

Besonders von Bedeutung ist, dass für $I(\omega)$ eine Genauigkeit von $\pm 5,36$ mg/dl erreicht wird, was bereits zu einer deutlichen Verbesserung gegenüber der Zwei-Wellenlängen-Bestimmung mit 532 nm- und 635 nm-Daten führt, die aus dem gleichen Datensatz ein SEP von $\pm 21,46$ mg/dl bewirken. Dies zeigt deutlich, dass die PLS-Regression mit der Verwendung breitbandiger Daten in der Lage ist, zwischen der Rotationsdispersion der Glucose (siehe Abschnitt 3.4.2.1 und 2.1.2) und des Spektrums der LDLs (siehe Abbildung 17) zu unterscheiden. Aus diesem Grund wird die PLS-Regression zum Beispiel in der Absorptionsspektroskopie zur Analyse verschiedener Inhaltsstoffe im hochkomplexen Medium Blut eingesetzt. Dort werden Stoffe wie Glucose oder Laktat trotz Überlagerung der jeweiligen Absorptionsspektren anderer Blutinhaltsstoffe zuverlässig identifiziert [97, 101]. Werden die breitbandigen und kompensierten $\frac{I(\omega)}{I(2\omega)}$ -Daten für die PLS-Regression verwendet, findet eine weitere Verbesserung der Vorhersagegenauigkeit auf $\pm 2,2$ mg/dl statt. Die aus diesem Datensatz extrahierten 532 nm- und 635 nm-Daten resultieren in einem ähnlichen SEP von $\pm 2,33$ mg/dl.

Als Fazit aus dieser Messung lässt sich ziehen, dass es mit der Evaluation breitbandiger Daten durch PLS-Regression trotz Einschränkung des Wellenlängenbereichs auf 425 – 650 nm möglich ist, zwischen Glucose-Konzentration beziehungsweise Rotationsdispersion und Schwankung der Lichtquellenintensität zu unterscheiden und so eine Verbesserung der Bestimmungsgenauigkeit herbeizuführen. Die bisher in der Literatur verwendeten Wellenlängen 532 nm und 635 nm reichen hierfür nicht aus. Weiterhin wurde gezeigt, dass die Verwendung des Kompensationsverhältnisses $I(\omega)$ und $\frac{I(\omega)}{I(2\omega)}$ Vorteile bei der Messstabilität bringt, wodurch sich die Kombination beider Verfahren für maximale Genauigkeit anbietet.

4.1.2.3 Schwankung der Probenabsorption

Anders als bei einer breitbandigen Schwankung der Lichtquellenintensität hat eine Absorption durch die Probe gewöhnlicherweise einen von der jeweiligen Wellenlänge abhängigen Einfluss. Um dies genauer zu untersuchen, wurde der Glucoselösung wie in Abschnitt 4.1.1.3 roter Allura Red AC Farbstoff im Konzentrationsbereich 0 – 0,2 mg/dl beigemischt. Da der Einfluss von Intensitätsschwankungen bereits in Abschnitt 4.1.2.2

untersucht wurde, wurden die folgenden Messungen wiederum mit der LDLS bei konstanter Intensität durchgeführt. Neben einer höheren Intensität wurde so auch eine breitere Abdeckung des Wellenlängenbereichs erreicht.

Zu erwarten ist, dass sich die Probenabsorption auch hier gleichermaßen auf $I(\omega)$ und $I(2\omega)$ auswirkt und das Kompensationsverhältnis $\frac{I(\omega)}{I(2\omega)}$ eine deutliche Verbesserung der Signalstabilität bewirkt. Dafür wurde bei einer konstanten Glucose-Konzentration von 500 mg/dl die Allura Red AC Konzentration im Bereich 0–0,2 mg/dl variiert. Eine Übersicht über die auf die absorptionsfreie Probe bezogenen Frequenzanteile ermöglicht Abbildung 60.

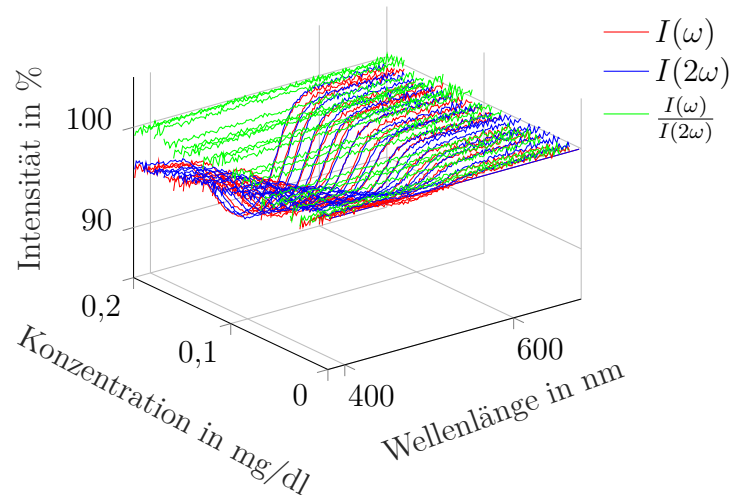


Abbildung 60: Breitbandige Frequenzanteile in Abhängigkeit von der Allura Red AC Konzentration.

Bei 0,2 mg/dl wurde im Absorptionsmaximum bei 520 nm eine Signalabschwächung von etwa 12 % erreicht. Erwartungsgemäß zeigte sich dabei, dass der Einfluss auf $I(\omega)$ und $I(2\omega)$ identisch ist und $\frac{I(\omega)}{I(2\omega)}$ wesentlich stabiler bleibt.

Im nächsten Schritt erfolgte die Untersuchung des Absorptionseinflusses auf die Glucose-Bestimmung, indem die Glucose-Werte von 0, 100, ..., 500 mg/dl mit 0, 0,04, ..., 0,2 mg/dl Allura Red AC in bekannter 6 x 6 Kombination gemischt wurden. Dabei wurden wie bereits zuvor drei Datensätze mit insgesamt 108 Messwerten aufgenommen. Neben einer erwarteten Verbesserung der Vorhersagegenauigkeit durch $\frac{I(\omega)}{I(2\omega)}$ ist auch hier von Interesse, ob es durch die breitbandigen Daten möglich ist, zwischen Glucose und Allura Red AC zu unterscheiden. Abbildung 61 zeigt die Gegenüberstellung der mit PLS-Regression ermittelten Vorhersagegenauigkeiten für $I(\omega)$ und $\frac{I(\omega)}{I(2\omega)}$.

Erwähnenswert ist dabei zunächst der für $I(\omega)$ erreichte Vorhersagefehler von $\pm 3,13$ mg/dl. Werden die Daten bei 532 nm und 635 nm für die Konzentrationsbestimmung verwendet, resultiert dies in einem Fehler von $\pm 2,68$ mg/dl. Im Gegensatz zur schwankenden LED-Intensität sind hier für breitbandige und Zwei-Wellenlängen-Bestimmung ähnliche Ergebnisse zu beobachten. Dies ist darauf zurückzuführen, dass sich die Wellenlänge 532 nm dicht am Absorptionsmaximum des Allura Red AC von 520 nm befindet, die zweite Wellenlänge 635 nm jedoch weit entfernt ist, was eine spektrale Unterscheidung erleichtert. Bei Betrachtung der Ergebnisse für $\frac{I(\omega)}{I(2\omega)}$ fällt auf, dass die damit erreichte Genauigkeit von $\pm 1,67$ mg/dl im Vergleich zu den mit $I(\omega)$ erzielten Ergebnissen noch einmal deutlich

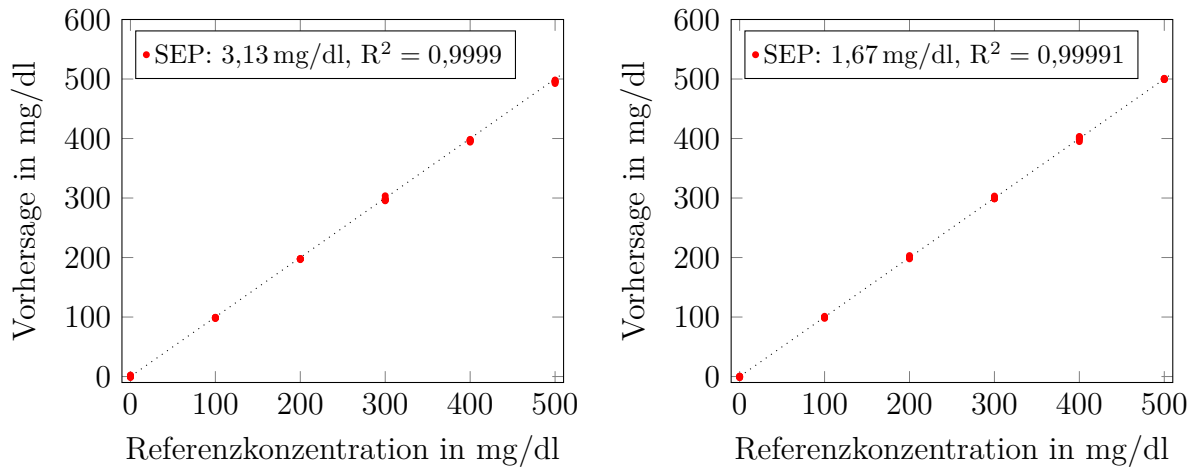


Abbildung 61: Glucose Vorhersage für 380 – 680 nm. Links: Konventionelles Signal $I(\omega)$, rechts: Kompensiertes Signal $\frac{I(\omega)}{I(2\omega)}$.

verbessert wurde. Es bleibt an dieser Stelle für die Absorptionmessungen somit festzuhalten, dass die Verwendung breitbandiger Daten für eine PLS-Regression bereits eine erhebliche Steigerung der Genauigkeit bewirkt, jedoch das Kompensationsverhältnis $\frac{I(\omega)}{I(2\omega)}$ nicht vollständig ersetzt. Die beste Genauigkeit bei variierender Probenabsorption wird mit einer Kombination beider Verfahren erreicht.

Da gezeigt werden konnte, dass die Glucose-Konzentration bei gleichzeitig variierender Probenabsorption präzise gemessen werden kann, liegt die Vermutung nahe, dass aus dem gleichen Datensatz über die Absorption auch auf die Konzentration des Farbstoffs geschlossen werden kann. Um dieser Fragestellung nachzugehen, wurde die Allura Red AC Konzentration als unabhängige Variable betrachtet. Da wie in Abbildung 60 gezeigt, sowohl $I(\omega)$ als auch $I(2\omega)$ gleichermaßen von der Absorption beeinflusst werden, wurde über diese Frequenzanteile versucht, die Allura Red AC Konzentration zu bestimmen. Die Verwendung von $\frac{I(\omega)}{I(2\omega)}$ würde hingegen nicht sinnvoll sein, weil in diesem Fall sämtliche Absorptionseffekte kompensiert werden.

Weil bei Absorptionseffekten ohne Streuung üblicherweise das Lambert-Beer-Gesetz gilt (siehe Gleichung 1), bietet sich eine Logarithmierung des Signals an, um wie für die Messung der Rotation einen linearen Zusammenhang zwischen Konzentration und Signal zu erhalten. Die Bestimmungsgenauigkeiten mittels $\log(I(\omega))$ und $\log(I(2\omega))$ sind in Abbildung 62 dargestellt.

Aus den Abbildungen geht hervor, dass die Allura Red AC Konzentration mit einer Genauigkeit von $\pm 0,0033$ mg/dl beziehungsweise $\pm 0,0020$ mg/dl für $\log(I(\omega))$ respektive $\log(I(2\omega))$ bestimmt werden kann. Bezogen auf die Maximalkonzentration von 0,2 mg/dl entspricht dies einer Abweichung in der Größenordnung von etwa $\pm 1\%$. Eine Bestimmung ist somit mit beiden Frequenzanteilen möglich.

Dennoch bietet der $\log(I(2\omega))$ Anteil eine etwa um den Faktor zwei bessere Genauigkeit. Zu erklären ist dies damit, dass sich bei konstanter Modulationstiefe bei $I(2\omega)$ lediglich Intensitätsschwankungen wie Absorption bemerkbar machen, während es bei $I(\omega)$ zu einer multiplikativen Überlagerung mit der Rotationsdispersion der Probe kommt. Ein ähnliches Verhalten wurde bereits bei der Glucose-Bestimmung mittels $I(\omega)$ beziehungsweise $\frac{I(\omega)}{I(2\omega)}$ beobachtet, bei der eine Bestimmung bei $I(\omega)$ zwar möglich war, die Messergebnisse

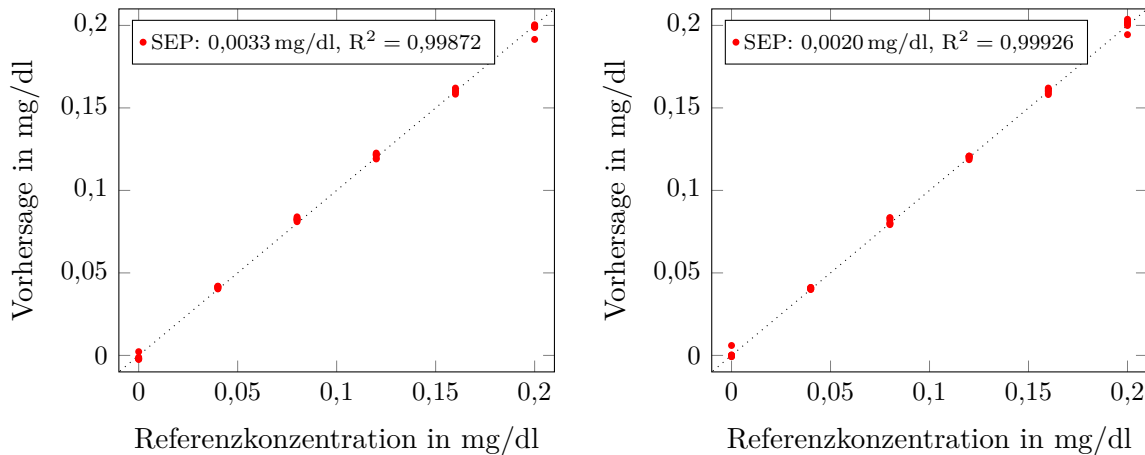


Abbildung 62: Allura Red AC-Vorhersage mittels PLS-Regression, Links: mittels $\log(I(\omega))$ Rechts: über $\log(I(2\omega))$.

jedoch stark durch Intensitätsschwankungen beeinflusst wurden.

Es bleibt daher festzuhalten, dass zur Bestimmung eines Stoffes über seine Rotationsdispersion $\frac{I(\omega)}{I(2\omega)}$ die besten Ergebnisse liefert, da dort exklusiv Rotation ohne Absorptionseffekte gemessen wird. Soll ein Stoff über seine Absorption gemessen werden, bietet sich hingegen der logarithmierte Frequenzanteil $\log(I(2\omega))$ an, da diese dort wiederum ohne Überlagerung der Rotation messbar ist. Damit ist es möglich, zeitgleich Rotation und Absorption über verschiedene Signalfrequenzen getrennt voneinander zu betrachten und für etwaige Konzentrationsbestimmungen zu verwenden. Da, wie in Abbildung 39 gezeigt, Albumin als Hauptblutprotein eine Absorption aufweist, besteht Grund zu der Annahme, dass dieses auch mittels Messung der Absorption bei $I(2\omega)$ bestimmt werden kann. Eine detaillierte Untersuchung hierzu erfolgt in Abschnitt 4.2.1.2.

4.1.2.4 Einfluss von Streueigenschaften

Streueffekte in der Probe stellen einen weiteren möglichen Störeinfluss auf die Glucose-Vorhersage dar. Zu ihrer Untersuchung wurde verdünnte Clinoleic[®]-Lösung verwendet und der dabei auftretende Streukoeffizient von $0,25 \text{ cm}^{-1}$ um $\pm 10\%$ variiert. In Relation zur Glucose-Konzentration entspricht dieser Wert in etwa dem von anderen Arbeitsgruppen [158, 159, 163], die jedoch jeweils höhere Glucose-Konzentrationen und höhere Streukoeffizienten verwendet haben, siehe Abschnitt 4.1.1.4.

Zunächst erfolgt, wie in den Abschnitten zuvor, eine Betrachtung des Einflusses des Streukoeffizienten auf die einzelnen Frequenzanteile. Dazu wurde die Glucose-Konzentration konstant auf einem Wert von 500 mg/dl gehalten, während der Streukoeffizient im Bereich $0,225 - 0,275 \text{ cm}^{-1}$ variiert wurde. Der hohe Offset des Streukoeffizienten von $0,225 \text{ cm}^{-1}$ erfordert zur optimalen Aussteuerung des Spektrometers eine Nachregelung der Integrationszeit von 2 ms auf 10 ms . Erwartet wird, dass der Einfluss auf $I(\omega)$ und $I(2\omega)$ für alle Wellenlängen gleich ist und somit das Verhältnis $\frac{I(\omega)}{I(2\omega)}$ konstant bleibt, wie für den monochromatischen Betrieb bereits in Abbildung 54 gezeigt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 63 dargestellt.

Obwohl es je nach Streuung und Wellenlänge zu Intensitätseinbrüchen von bis zu 50% kommt, bleibt $\frac{I(\omega)}{I(2\omega)}$ sehr stabil. Dennoch nimmt die Streuung zu kurzen Wellenlängen hin zu. Dieser als Mie-Streuung bekannte Effekt wurde bei der Charakterisierung verschie-

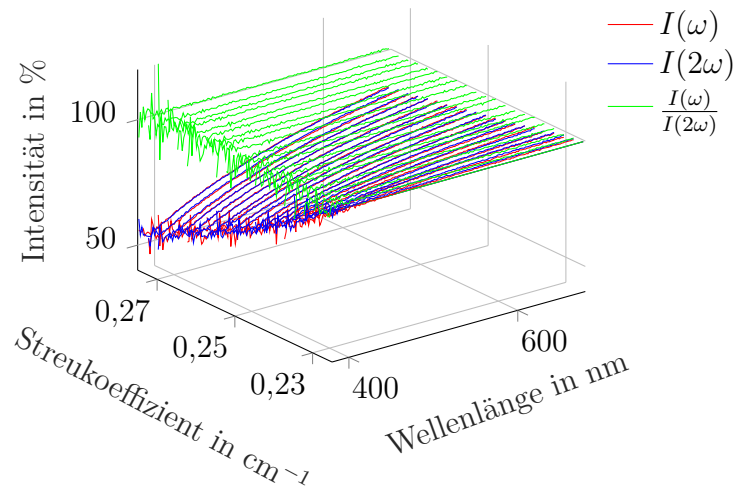


Abbildung 63: Frequenzanteile von 380 – 680 nm in Abhängigkeit vom Streukoeffizienten.

dener Fettemulsionen beobachtet und entspricht den aktuellen Messungen [284]. Da sich diese Streuverluste mit den ebenfalls wellenlängenabhängigen Eigenschaften der Verdichtungskonstanten des Faraday-Rotators Abschnitt 3.1.3.1 und denen der Rotationsdispersionen aus Abschnitt 2.1.1 beziehungsweise Abschnitt 3.4.2.1 überlagern, stellt sich die Frage, ob die PLS-Regression auch hier in der Lage ist, zwischen der Rotationsdispersion der Glucose und der Mie-Streuung der Clinoleic® Lösung zu unterscheiden. Dies kann auch als Indikator dafür gewertet werden, inwieweit eine Unterscheidung der Rotationsdispersionen weiterer optisch aktiver Moleküle möglich ist. Eine detaillierte Untersuchung hierzu erfolgt in Abschnitt 4.2.

Der Einfluss des Streukoeffizienten auf die Konzentrationsbestimmung wurde evaluiert, indem Glucose-Konzentrationen von 0, 100, ..., 500 mg/dl Glucose mit einem Streukoeffizienten von 0,225, 0,2375, ..., 0,275 cm^{-1} in bekannter 6 x 6 Matrixform vermischt wurden. Eine Gegenüberstellung der Ergebnisse unter der Verwendung des Wellenlängenbereichs von 380 – 680 nm ist in Abbildung 64 zu finden.

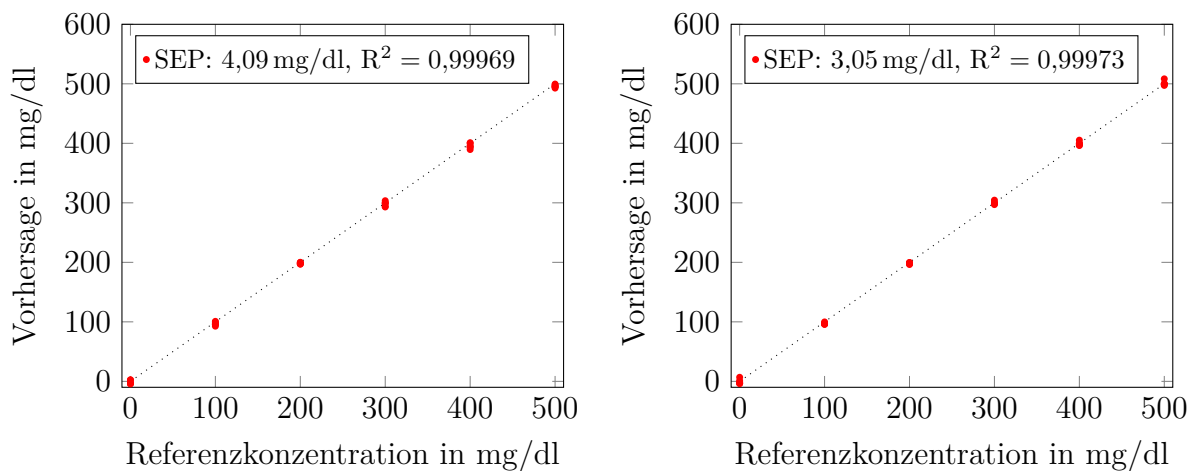


Abbildung 64: Glucose Vorhersage bei 0,225 – 0,275 cm^{-1} mittels PLS-Regression bei 380 – 680 nm und 5 Komponenten. links: mit $I(\omega)$, rechts: mit $\frac{I(\omega)}{I(2\omega)}$.

Mit den breitbandigen Daten wurden Vorhersagegenauigkeiten von $\pm 4,09$ mg/dl und $\pm 3,05$ mg/dl für $I(\omega)$ beziehungsweise $\frac{I(\omega)}{I(2\omega)}$ erreicht. Besonders auffällig dabei sind die Ergebnisse für $I(\omega)$, bei der es zu einer Überlagerung von Rotationsdispersion und Mie-Streuung kommt. Wird die Konzentrationsbestimmung mit 532 nm und 635 nm aus den Intensitätsdaten durchgeführt, liegt der Vorhersagefehler mit 5,71 mg/dl deutlich höher. Die Verwendung breitbandiger Daten bringt auch in diesem Fall bereits einen Vorteil. Daher ist bei späteren Messungen mit spektraler Überlagerung der Rotationsdispersionen von Glucose und Eiweiß mit einem positiven Einfluss zu rechnen.

Dennoch zeigt das Kompensationsverhältnis $\frac{I(\omega)}{I(2\omega)}$ mit $\pm 3,05$ mg/dl ein nochmals besseres Ergebnis, was auf die vollständige Kompensation des Streueinflusses zurückzuführen ist. Mit zwei Wellenlängen beträgt der Fehler $\pm 3,36$ mg/dl, was auch hier die vollständige Kompensation des Einflusses demonstriert. Die Kompensation funktioniert, solange noch Restpolarisation vorhanden ist. Steigt der Streukoeffizient oder die Pfadlänge soweit an, dass das gesamte Signal depolarisiert wird, ist bei $I(\omega)$ und $I(2\omega)$ keine messbare Intensität mehr vorhanden, wodurch auch $\frac{I(\omega)}{I(2\omega)}$ keine polarisationsspezifischen Informationen mehr enthält und eine Konzentrationsbestimmung unmöglich wird.

4.2 Messung von Stoffgemischen optisch aktiver Substanzen

In Abschnitt 3.1 und 4.1.1 konnte gezeigt werden, dass für reine Glucose-Lösungen eine Vorhersage-Genauigkeit von etwa $\pm 1 - 3$ mg/dl erreicht wird. Außerdem wurde demonstriert, dass die Auswirkungen von Lichtintensitätsschwankungen, Probenabsorption oder Streueffekten kompensiert werden können. Dieses gilt sowohl für die Verwendung von monochromatischen 532 nm-Daten als auch für die breitbandige Bestimmung im Wellenlängenbereich 380 – 680 nm in Abschnitt 4.1.2. In diesem Zusammenhang konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die multivariate Datenanalyse bei breitbandigen Daten geeignet ist, zwischen Glucose-Konzentrationsänderungen und Intensitätsschwankungen, Probenabsorption oder variierenden Streukoeffizienten zu unterscheiden.

Als letzter großer Störeinfluss verbleibt die spektrale Überlagerung der Rotationsdispersionen verschiedener optisch aktiver Moleküle, insbesondere die der Bluteiweiße. Die bisherigen Erkenntnisse zur multivariaten Differenzierung zwischen Rotationsdispersion und Störeinflüssen bekräftigen die in der Literatur aufgestellte Hypothese [112, 150], dass ein solches multivariates Kalibrationsmodell in der Lage ist, zwischen optisch aktiven Stoffen zu unterscheiden. In diesem Abschnitt wird daher untersucht, inwieweit sich mittels auf breitbandig gemessene Rotationsdispersion angewendete PLS-Regression zwischen Glucose und anderen relevanten optisch aktiven Substanzen unterscheiden lässt. Außerdem wird betrachtet, in welchem Maße sich dadurch die Glucose-Vorhersagegenauigkeit verbessern lässt. Teile dieses Abschnitts wurden im *Biomedical Optics Express* Journal veröffentlicht [2].

4.2.1 Glucose und Albumin Gemische

Den größten Störeinfluss auf die Rotationsdispersion stellen die Bluteiweiße mit Konzentrationen von etwa 7.000 mg/dl dar. Besonders kritisch ist dies, wenn der Anteil unabhängig von der Glucose-Konzentration variiert, da es zwangsläufig zu einer spektralen Überlagerung der Rotationsdispersionen führt. Um dies zu umgehen, wurde in der Literatur bei polarimetrischen Ansätzen zur Glucose-Bestimmung häufig auf die Augenflüssigkeit von betäubten Kaninchen ausgewichen [7, 46, 49, 178, 179, 181], bei der die Eiweiß-

Konzentration vernachlässigbar ist [7, 150, 285].

Da eine solche Messung, wie in Abschnitt 1.2.4 beschrieben, zahlreiche Nachteile aufweist, stellt die direkte Messung am Blutplasma trotz der spektralen Überlagerung der Rotationsdispersionen durch Bluteiweiße nach wie vor eine mögliche Alternative dar. Über erste Ansätze wurde bereits in der Literatur berichtet, bei denen mit einer synthetischen Blutmatrix aus Glucose und 0 – 100 mg/dl Albumin als Hauptblutprotein gearbeitet wurde [46]. Hier konnte gezeigt werden, dass sich mit einem Zwei-Wellenlängensystem mit 532 nm und 635 nm die Glucose-Vorhersagegenauigkeit von über ± 100 mg/dl auf ± 20 mg/dl steigern ließ.

Prinzipiell wurde damit bereits demonstriert, dass eine spektrale Unterscheidung von Glucose und Albumin anhand ihrer Rotationsdispersion möglich ist. Da in der Literatur jedoch bisher keine polarimetrische Untersuchung mit physiologischen Eiweißkonzentrationen bekannt ist, besteht noch Bedarf, die zu messende und tolerierbare Eiweißkonzentration zu erhöhen und zu evaluieren, wie stark die Glucose-Vorhersage durch die entsprechenden Störlevel beeinträchtigt wird. Aspekte, die in den folgenden Messungen für bessere Ergebnisse sorgen könnten, sind der breitere Wellenlängenbereich dieses Aufbaus von 380 – 680 nm, die Auswertung mittels der in der Absorptionsspektroskopie etablierten PLS-Regression, sowie die erfolgreich angewendete Kompensationsmethode $\frac{I(\omega)}{I(2\omega)}$ aus Abschnitt 4.1.

Wie bei anderen Arbeitsgruppen [46, 147, 148] wird auch bei den Messungen in dieser Arbeit Rinderalbumin verwendet, das sehr ähnliche optische Eigenschaften im Vergleich zu menschlichem Albumin aufweist [29]. Zwar besteht das menschliche Blut aus insgesamt 341 verschiedenen Eiweißen, jedoch verursacht der Albuminanteil alleine einen größeren Störeinfluss als die verbleibenden 340 Proteine zusammen [28]. Für die Erstellung der Matrizen aus Glucose und Albumin ergibt sich draus vorteilhafterweise ein deutlich reduzierter Dosieraufwand, der bei der Berücksichtigung aller Eiweiße im Blutplasma deutlich höher wäre. Außerdem können die jeweiligen Konzentrationsbereiche, die möglichen Kombinationen oder Reihenfolgen beliebig angepasst werden.

Der von anderen Arbeitsgruppen evaluierte Albumin-Bereich von 0 – 100 mg/dl entspricht jedoch nur etwa 10 % der physiologischen Variation der Albumin-Konzentration, die mit 4200 ± 540 mg/dl angegeben wird [22, 23]. Da die absolute Drehung und somit das $\frac{I(\omega)}{I(2\omega)}$ -Signal, wie in Gleichung 10 gezeigt, linear von der Konzentration abhängt, bewirkt ein Offset in der Albuminkonzentration eine Verschiebung der absoluten Drehung, was wiederum durch das Regressionsmodell eliminiert wird. Daher konzentrieren sich die folgenden Messungen auf die physiologische Variation, um den Einfluss schwankender Eiweißkonzentration auf die Glucose-Bestimmbarkeit zu evaluieren. Die Konzentrationsbereiche des Albumins werden dabei in mehreren Schritten von 0 – 250 mg/dl auf 0 – 500 mg/dl und schließlich bis zur physiologischen Variation von 0 – 1000 mg/dl gesteigert.

Hiernach erfolgt eine Auswertung der Glucose- und der Albumin-Bestimmungsgenauigkeit mittels PLS-Regression wie zuvor in Abschnitt 4.1.2. Eine Übersicht über die Messungen zeigt Tabelle 9.

Dabei wurde wie bei den bisherigen Konzentrationsmessungen vorgegangen. Jeweils sechs verschiedene Glucose-Konzentrationen von 0 – 500 mg/dl wurden mit sechs verschiedenen Albumin-Werten des jeweiligen Bereichs so kombiniert, dass die bekannte 6 x 6 Matrix entsteht, die ihrerseits drei Mal wiederholt wurde.

Bei der Durchführung der Messreihe ist darauf zu achten, dass die Position der Polarisationsfilter korrekt eingestellt ist. Wie in Abschnitt 2.2 beschrieben, werden für dem Betrag nach gleiche positive und negative Winkel Φ identische Intensitäten gemessen. Da durch

Tabelle 9: Überblick über die in Abschnitt 4.2.1 durchgeführten Messungen.

Ab-schnitt	Glucose in mg/dl	Albumin in mg/dl	Matrix- größe	Wieder- holungen
4.2.1	0; 100; ...; 500	0; 50; ...; 250	6 x 6	3
4.2.1	0; 100; ...; 500	0; 100; ...; 500	6 x 6	3
4.2.1	0; 100; ...; 500	0; 200; ...; 1000	6 x 6	3

die Extraktion der Frequenzanteile per Fouriertransformation der Phasenbezug zur Faraday Modulation verloren geht, ist es äußerst wichtig, dass es im gesamten Spektralbereich zu keiner Überschreitung des Intensitätsnullpunktes kommt (siehe Abschnitt 3.3.1). Bei reinen Glucose-Lösungen reicht es dazu, die Polarisationsfilter senkrecht zueinander abzugleichen. Da D-Glucose jedoch rechtsdrehend und Albumin linksdrehend ist [29], bedarf es eines geeigneten Offset-Winkels, damit es bei kleinen Glucose- und großen Albumin-Konzentrationen nicht zu einer Überschreitung des Intensitätsnullpunktes kommt.

Ein Nachteil der Messung mit künstlichem Offset besteht jedoch darin, dass dadurch der Dynamikbereich eingeschränkt wird, wodurch sich Intensitätsschwankungen prozentual auswirken. Ein Großteil kann zwar durch die Verwendung des $\frac{I(\omega)}{I(2\omega)}$ -Verhältnisses kompensiert werden, eine geringe Verschlechterung der Signalqualität bleibt jedoch.

4.2.1.1 Glucose-Bestimmung

Nach Durchführung der Messung wurde aus den ersten beiden Datenmatrizen ein Kalibrationsmodell erstellt, welches anschließend zur Validierung auf den dritten Datensatz angewendet wurde. Da in den Datensätzen die jeweiligen Referenzkonzentrationen sowohl von Glucose als auch von Albumin enthalten sind, ist es möglich, separat ein Regressionsmodell für beide Substanzen zu erstellen. Im ersten Teil der Evaluation wurde die Glucose-Bestimmung mit Albumin als Störfaktor betrachtet. Dabei wurde Glucose-Konzentrationen im Bereich 0 – 500 mg/dl zunächst Albuminlösung mit Konzentrationen von 0 – 250 mg/dl zugegeben, die dann in 2 Schritten auf physiologisch relevante Werte von 0 – 1000 mg/dl gesteigert wurden [22].

Signalform

Um einen Eindruck darüber zu vermitteln, welchen Einfluss die Glucose- beziehungsweise Albumin-Konzentration auf das $\frac{I(\omega)}{I(2\omega)}$ -Signal hat, ist diese Abhängigkeit in Abbildung 65 exemplarisch für den höchsten Albumin-Konzentrationsbereich von 0 – 1000 mg/dl für 532 nm und 635 nm beziehungsweise 380 – 680 nm dargestellt. Die Signale in den Konzentrationsbereichen von 0 – 250 mg/dl und 0 – 500 mg/dl sind im Anhang in Abbildung 96 und 98 zu finden.

Wie schon in den vorherigen Messungen aus Abschnitt 4.1.1.1 oder 4.1.2.1 steigt das $\frac{I(\omega)}{I(2\omega)}$ -Signal mit der Glucose-Konzentration an. Da sich die Rotationsdispersionen von Glucose und Albumin überlagern, kommt es für die 6 verschiedenen Albumin-Konzentrationen jedes Glucose Wertes zu 6 unterschiedlichen $\frac{I(\omega)}{I(2\omega)}$ -Werten. Dabei zeigt sich auch, dass das Signal mit steigender Albumin-Konzentration sinkt, was an der spezifischen Orientierung der Polarisationsfilter zueinander und den linksdrehenden Eigenschaften des Albumins

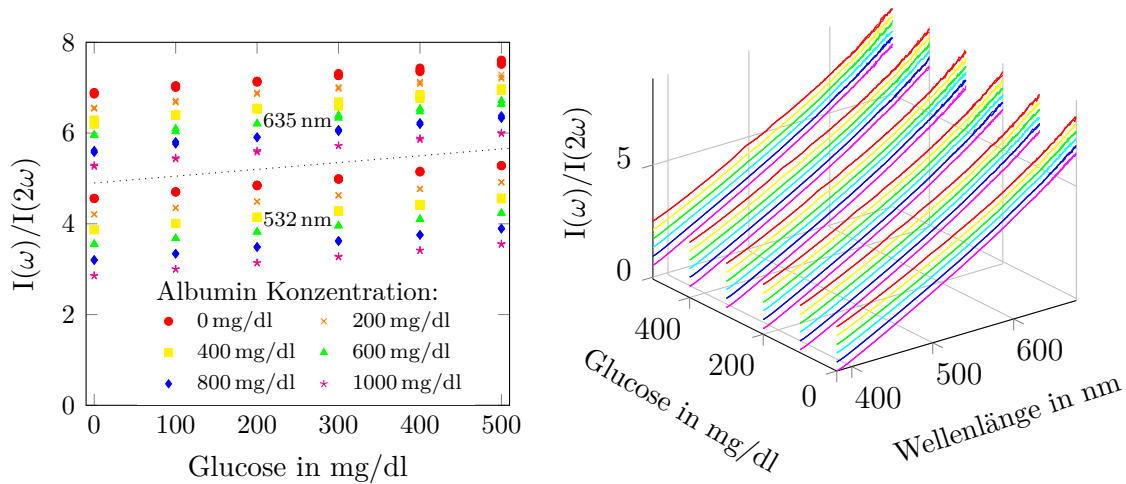


Abbildung 65: $\frac{I(\omega)}{I(2\omega)}$ für 0–500 mg/dl Glucose und 0–1000 mg/dl Albumin. Links: 532 nm und 635 nm, rechts: Breitbandige Daten für 380 – 680 nm.

liegt.

Betrachtet man die aus den Spektrometerdaten bei 532 nm und 635 nm extrahierten Intensitätswerte, so zeigt sich, dass bei den Wellenlängen trotz unterschiedlicher Konzentrationskombinationen teilweise identische Werte auftreten, was an den sich partiell kompensierenden Drehungen durch Glucose und Albumin liegt. So weist das $\frac{I(\omega)}{I(2\omega)}$ -Verhältnis bei 532 nm zum Beispiel für 0 mg/dl Glucose und 0 mg/dl Albumin mit etwa 4,56 den gleichen Wert wie für 500 mg/dl Glucose und 400 mg/dl Albumin auf. Ein ähnliches, jedoch leicht unterschiedliches Bild ergibt sich für 635 nm. Hier wird beispielsweise für $\frac{I(\omega)}{I(2\omega)}$ bei 0 mg/dl Glucose und 0 mg/dl Albumin ein Wert von 6,87 gemessen, während 500 mg/dl Glucose und 400 mg/dl zu 6,95 führen. Beide Werte liegen auf ähnlichem Niveau, lassen sich aber im Vergleich zu den Verhältnissen bei 532 nm unterscheiden. Analog verhält es sich mit den Albumin-Bereichen 0 – 250 mg/dl und 0 – 500 mg/dl im Anhang.

Bei Betrachtung der breitbandigen Daten von 380 – 680 nm fällt ein ähnlicher Verlauf auf, wobei das Signal erneut mit der Glucose-Konzentration ansteigt und bei Zugabe von Albumin sinkt. Der für lange Wellenlängen zunehmend hohe $\frac{I(\omega)}{I(2\omega)}$ -Wert ist in erster Linie damit zu erklären, dass durch die Polarisationsfilteranordnung zur Vermeidung eines Intensitätsnulldurchgangs ein für alle Wellenlängen gleicher Offset für den Winkel Φ eingebracht werden musste. Für $\frac{I(\omega)}{I(2\omega)}$ ergibt sich nach Gleichung 21 das durch den Drehwinkel Φ und die Modulationstiefe Θ definierte Verhältnis von $4 \cdot \frac{\Phi}{\Theta}$. Da die Modulationstiefe nach Abbildung 43 mit steigender Wellenlänge abnimmt, macht sich der nötige Offset der Polarisationsfilter relativ stark bemerkbar. Der Offset sollte daher nur so groß wie nötig, aber so klein wie möglich gewählt werden.

Bei Betrachtung der breitbandigen Darstellung der $\frac{I(\omega)}{I(2\omega)}$ -Signale wird auch deutlich, dass es hier nicht mehr zu einem Umschlagen der Intensität durch Vorzeichenwechsel des Drehwinkels Φ kommt. Dies würde zuerst bei kleinen Glucose- und großen Albuminkonzentrationen im Bereich kurzer Wellenlängen auftreten.

Aufgrund des Offsets ist es in dieser Darstellung schwierig, die spektralen Unterschiede zwischen den Rotationsdispersionen von Glucose und Albumin zu erkennen. Diese wurden jedoch bereits in Abschnitt 3.4.2.1 theoretisch beschrieben und in Abschnitt 3.4.2 ausführlich untersucht.

Glucose-Bestimmung

Im nächsten Schritt wurden die Auswirkungen schwankender Albumin-Konzentrationen auf die Bestimmungsgenauigkeit für Glucose ermittelt. Die Ergebnisse der Konzentrationsbestimmung für das Zwei-Wellenlängen System mit 532 nm und 635 nm sind zunächst in Abbildung 66 sowohl für $I(\omega)$ als auch $\frac{I(\omega)}{I(2\omega)}$ dargestellt.

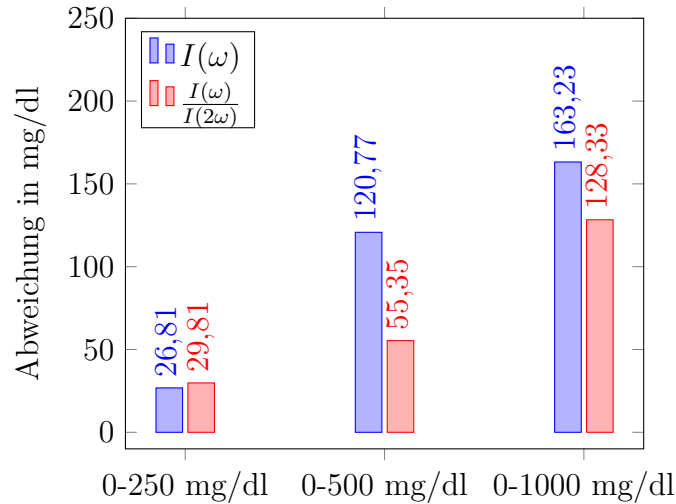


Abbildung 66: Glucose-Bestimmungsgenauigkeit mit 532 nm und 635 nm in Anwesenheit verschiedener Albumin-Konzentrationen.

Bei Verwendung der aus der Literatur bekannten Wellenlängen 532 nm und 635 nm werden mit einer PLS-Regression und zwei Komponenten für unkompensierte $I(\omega)$ -Werte Bestimmungsgenauigkeiten von $\pm 26,81$ mg/dl, $\pm 120,77$ mg/dl beziehungsweise $\pm 163,23$ mg/dl für die drei Störkonzentrationsbereiche des Albumin von 0 – 250 mg/dl, 0 – 500 mg/dl beziehungsweise 0 – 1000 mg/dl erreicht. Dabei steigt der Fehler mit zunehmender Albumin-Konzentration deutlich an. Die an anderer Stelle demonstrierte Verbesserung der Vorhersagegenauigkeit mit zwei Wellenlängen gegenüber einer einzelnen kann auch hier bestätigt werden [46]. So führt 532 nm als einzelne Wellenlänge mit linearer Regression zu einer Abweichung von $\pm 106,52$ mg/dl, $\pm 211,46$ mg/dl beziehungsweise $\pm 422,66$ mg/dl, siehe Tabelle 10.

Wird hingegen das Kompensationsverhältnis $\frac{I(\omega)}{I(2\omega)}$ für 532 nm und 635 nm verwendet, können Intensitätsschwankungen, wie sie zum Beispiel durch Probenabsorption auftreten, kompensiert werden. Dies führt zu einer leichten Verbesserung auf $\pm 29,81$ mg/dl, $\pm 55,35$ mg/dl beziehungsweise $\pm 128,33$ mg/dl. Dennoch ist diese Abweichung deutlich höher als bei den Messungen ohne Störkonzentration aus Abschnitt 4.1.2.

Die Ergebnisse für eine breitbandige Konzentrationsbestimmung für den Wellenlängenbereich 380 – 680 nm sind in Abbildung 67 zu finden.

Bei Verwendung breitbandiger Daten lässt sich demnach eine deutliche Verbesserung der Vorhersagegenauigkeit verzeichnen. Dies gilt bereits für die unkompensierten $I(\omega)$ -Daten. Hier wurden Abweichungen von $\pm 26,00$ mg/dl, $\pm 31,01$ mg/dl beziehungsweise $\pm 81,61$ mg/dl für die Albumin Bereiche 0 – 250 mg/dl, 0 – 500 mg/dl beziehungsweise 0 – 1000 mg/dl bestimmt. Jedoch bleibt auch hier zu berücksichtigen, dass mögliche Intensitätsschwankungen unkompensiert blieben und so das Ergebnis negativ beeinflussen konnten.

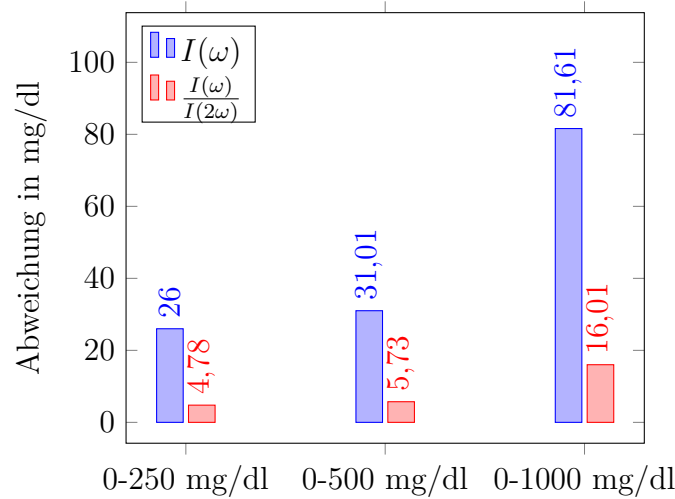


Abbildung 67: Glucose-Bestimmungsgenauigkeit in Anwesenheit von verschiedener Albumin-Konzentrationen mit 380 – 680 nm.

Wird hingegen $\frac{I(\omega)}{I(2\omega)}$ zur Konzentrationsbestimmung herangezogen, zeigt sich abermals eine deutliche Verbesserung. Erreichte Genauigkeiten von $\pm 4,78$ mg/dl, $\pm 5,73$ mg/dl beziehungsweise $\pm 16,01$ mg/dl zeigen einerseits, dass die Verwendung breitbandiger Daten im Gegensatz zu dem in der Literatur präsentierten Zwei-Wellenlängen-Ansatz einen erheblichen Vorteil bringt. Andererseits wird die höchste Bestimmungsgenauigkeit erst durch das Kompensationsverhältnis $\frac{I(\omega)}{I(2\omega)}$ möglich, da hier die von Intensitätsschwankungen befreite Rotationsdispersion gemessen werden kann.

Zur besseren Interpretation der Resultate ist die Konzentrationsvorhersage exemplarisch für die höchste Albumin Variation von 0 – 1000 mg/dl mittels $\frac{I(\omega)}{I(2\omega)}$ für 532 nm und 635 nm beziehungsweise für 380 – 680 nm in Abbildung 68 dargestellt.

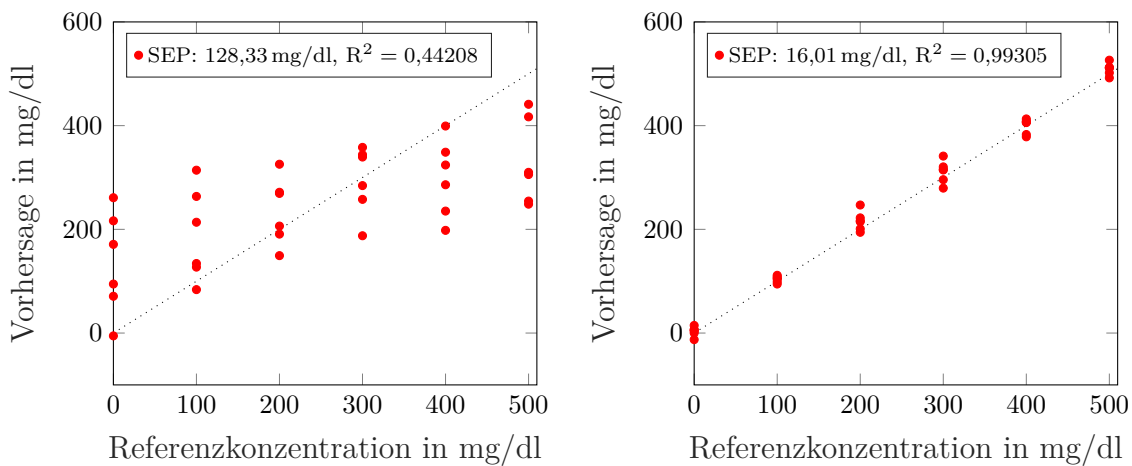


Abbildung 68: Glucose-Vorhersage mit 0 – 1000 mg/dl Albumin mittels $\frac{I(\omega)}{I(2\omega)}$. links: 532 nm und 635 nm, rechts: 380 – 680 nm und 5 PLS-Komponenten.

Beim Vergleich der Konzentrationsvorhersagen durch unterschiedliche Spektraldaten wird noch einmal deutlich, inwieweit die Vorhersagegenauigkeit durch den breitbandigen Wel-

lenlängenbereich von 380 – 680 nm im Vergleich zur Zwei-Wellenlängen-Vorhersage mit 532 nm und 635 nm verbessert wird. Insbesondere ist dabei auf die durch die zusätzlichen spektralen Informationen gesteigerte Korrelation von Vorhersage- und Referenzwerten hinzuweisen, die sich in einem Regressionskoeffizienten von 0,99305 anstatt 0,44208 äußert. Ebenso stellt die Konzentrationsabweichung von $\pm 16,01$ mg/dl im Vergleich zu $\pm 128,33$ mg/dl eine signifikante Verbesserung dar. Abschließend sind die Ergebnisse dieses Abschnitts in Tabelle 10 noch einmal zusammengefasst.

Tabelle 10: Übersicht der SEP-Werte für die Glucose-Bestimmung in Anwesenheit von Albumin.

Albumin in mg/dl	532 nm	532 nm + 635 nm		380 – 680 nm		Matrix- größe	Wieder- holungen
	$\frac{I(\omega)}{I(2\omega)}$	$I(\omega)$	$\frac{I(\omega)}{I(2\omega)}$	$I(\omega)$	$\frac{I(\omega)}{I(2\omega)}$		
0 – 250	$\pm 106,52$	$\pm 26,81$	$\pm 29,81$	$\pm 26,00$	$\pm 4,78$	6 x 6	3
0 – 500	$\pm 211,46$	$\pm 120,77$	$\pm 55,35$	$\pm 31,01$	$\pm 5,73$	6 x 6	3
0 – 1000	$\pm 422,66$	$\pm 163,23$	$\pm 128,33$	$\pm 81,61$	$\pm 16,01$	6 x 6	3

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Vorhersagequalität mit zunehmender Anzahl der für die Konzentrationsbestimmung verwendeten Wellenlängen kontinuierlich verbessert wird. So kann die Literatur bestätigt werden [46], nach der ein Zwei-Wellenlängen-System mit 532 nm und 635 nm die Genauigkeit im Vergleich zu einem monochromatischen Ansatz mit 532 nm zumindest für den Albumin-Konzentrationsbereich von 0 – 100 mg/dl verbessert. Besonders für hohe Albumin-Konzentrationen ergeben sich jedoch auch bei dem Zwei-Wellenlängen Ansatz nicht tolerierbare Abweichungen. Erst unter Verwendung des breitbandigen Wellenlängenbereichs von 380 – 680 nm werden selbst für die höchste Albumin-Konzentration von 0 – 1000 mg/dl Genauigkeiten erreicht, die nach dem Clarke's Error Grid als tolerierbar angesehen werden können. Ebenfalls bestätigt werden konnte die in der Literatur aufgestellte Hypothese, nach der spektral anhand der Rotationsdispersion verschiedene optisch aktive Substanzen differenziert werden können [23, 112, 150]. Weiterhin zeigen die Ergebnisse, dass das im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Kompensationsverhältnis $\frac{I(\omega)}{I(2\omega)}$ [1] sowohl für die Verwendung von zwei Wellenlängen als auch für das breitbandige Spektrum eine deutliche Verbesserung der Ergebnisse mit sich bringt. Möglich wird dies dadurch, dass für die Regression ein normiertes Rotationsdispersionssignal verwendet wird und Intensitätsschwankungen durch Streueffekte oder Probenabsorption weitestgehend kompensiert werden.

4.2.1.2 Eiweiß-Bestimmung

Da die Ergebnisse zeigen, dass sich spektral mittels multivariater Datenanalyse zwischen den Rotationsdispersionen von Glucose und Albumin unterscheiden lässt, liegt die Frage auf der Hand, ob es damit auch möglich ist, aus demselben Datensatz die Albumin-Konzentration vorherzusagen. Aus diesem Wert ließen sich Rückschlüsse auf mögliche Fehlfunktionen der Nieren oder der Leber ableiten.

Zu diesem Zweck wurden dieselben Datensätze aus Abschnitt 4.2.1.1 ebenfalls im Wellenlängenbereich von 380 – 680 nm verwendet, jedoch mit der Albumin-Konzentration als unabhängigem X-Wert bei der Regression und dementsprechend Glucose als Störstoff betrachtet. Bei dieser Art der Betrachtung ist die Störkonzentration der Glucose

mit 0 – 500 mg/dl für jeden Konzentrationsbereich des Albumins gleich. Von besonderem Interesse ist dabei, ob sich das Albumin besser über seine intensitätsstabilisierte Rotationsdispersion mit $\frac{I(\omega)}{I(2\omega)}$ oder über seine Absorption mit $I(2\omega)$ bestimmen lässt. Bei Nutzung der Absorption wird das Signal allerdings aufgrund des Lambert-Beer'schen Zusammenhangs auf $\log(I(2\omega))$ logarithmiert.

Die Ergebnisse für die Konzentrationsbereiche 0 – 250 mg/dl, 0 – 500 mg/dl und 0 – 1000 mg/dl sind in Abbildung 69 und Tabelle 11 zusammengefasst. Eine ausführliche Darstellung der jeweiligen Konzentrationsplots findet sich im Anhang ab Seite 173.

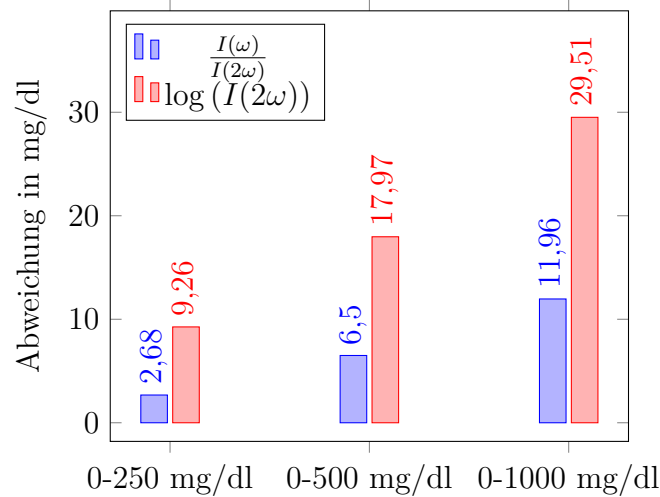


Abbildung 69: Albumin Bestimmungsgenauigkeit in Anwesenheit von 0 – 500 mg/dl Glucose

Die Konzentrationsbestimmung mittels intensitätsstabilisierter Rotationsdispersion führt zu Abweichungen von $\pm 2,68$ mg/dl, $\pm 6,50$ mg/dl und $\pm 11,96$ mg/dl für 0 – 250 mg/dl, 0 – 500 mg/dl beziehungsweise 0 – 1000 mg/dl. Mit dem Anstieg des Konzentrationsbereichs ist somit auch ein Anstieg des Fehlers verbunden, der allerdings jeweils nur etwa 1% der jeweiligen Maximalkonzentration beträgt. Werden hingegen die Zwei-Wellenlängen-Daten mit 532 nm und 635 nm verwendet, betragen die Fehler mit $\pm 22,35$ mg/dl, $\pm 43,76$ mg/dl und $\pm 107,24$ mg/dl für 0 – 250 mg/dl, 0 – 500 mg/dl beziehungsweise 0 – 1000 mg/dl deutlich mehr. Auch diese Messungen bestätigen die Literatur [23, 112, 150], nach der multispektral die Rotationsdispersion des Albumins von der der Glucose unterschieden werden kann.

Wird $\log(I(2\omega))$ zur Albumin-Bestimmung über die Absorption genutzt, führt dies zu einem SEP von $\pm 9,26$ mg/dl, $\pm 18,97$ mg/dl und $\pm 29,51$ mg/dl, was in etwa um den Faktor drei über dem durch die Rotationsdispersion liegt. Ein Grund für diese Tatsache liegt darin, dass das Albumin einerseits nur in einem schmalen Wellenlängenbereich nahe des UV absorbiert, siehe Abschnitt 3.4.2.4. Andererseits bedeutet die Verwendung von $I(2\omega)$ zwangsläufig, dass etwa Intensitätsschwankungen oder Streueffekte nicht mehr kompensiert werden. Um abzuwägen, ob das Albumin mittels Absorptionsmessung auch mit einer Wellenlänge bestimmt werden kann, wird aus den Messdaten mit 405 nm eine typische Laser-Wellenlänge extrahiert, bei der das Albumin eine hohe Absorption aufweist (siehe Abbildung 39). Mit $\pm 115,26$ mg/dl, $\pm 18,92$ mg/dl und $\pm 69,56$ mg/dl werden dabei sehr unterschiedliche und hohe Abweichungen erreicht, die darauf zurückzuführen sind, dass

in diesem Wellenlängenbereich wenig Intensität vorhanden ist und ein einzelnes Detektorpixel anfällig für Schwankungen ist. Außerdem ist es bei $\log(2\omega)$ weder durch spektrale Auflösung noch das Kompensationsverhältnis $\frac{I(\omega)}{I(2\omega)}$ möglich, Intensitätsschwankungen etwa durch Streuung oder Denaturierung der Albumins von konzentrationsbedingter Absorption durch das Albumin zu unterscheiden. Für den monochromatischen Fall sind die Albumin-Bestimmungsgenauigkeiten mittels Absorption dennoch besser als über die Rotationsdispersion. Jedoch bleibt auch festzuhalten, dass aufgrund der hohen Empfindlichkeit bei der Verwendung einer Wellenlänge dieses Verfahren nur bedingt zur Konzentrationsbestimmung von Albumin geeignet ist. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse ist in Tabelle 11 zu finden.

Tabelle 11: Übersicht der SEP-Werte für die Albumin-Bestimmung in Anwesenheit von Glucose.

Albumin in mg/dl	405 nm	532 nm + 635 nm	380 – 680 nm		Matrix- größe	Wieder- holungen
	$\log(I(2\omega))$	$\frac{I(\omega)}{I(2\omega)}$	$\log(I(2\omega))$	$\frac{I(\omega)}{I(2\omega)}$		
0 – 250	$\pm 115,26$	$\pm 22,35$	$\pm 9,26$	$\pm 2,68$	6 x 6	3
0 – 500	$\pm 18,92$	$\pm 43,76$	$\pm 17,97$	$\pm 6,50$	6 x 6	3
0 – 1000	$\pm 69,56$	$\pm 107,24$	$\pm 29,51$	$\pm 11,96$	6 x 6	3

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich die Albuminkonzentration breitbandig simultan zur Glucose sowohl mittels Rotationsdispersion als auch unter Verwendung der Absorptionswerte vorhersagen lässt. Aufgrund der $\frac{I(\omega)}{I(2\omega)}$ -Kompensation und der damit verbundenen Verbesserung der Stabilität funktioniert dies über die Rotationsdispersion jedoch sowohl für Glucose als auch für Albumin besser. Basierend auf monochromatischen Daten ist eine solche Bestimmung über die Rotationsdispersion und Absorption jedoch nur mit Einschränkungen möglich.

4.2.1.3 Kombination von Rotation und Absorption

Aus den bisherigen Erkenntnissen über die Bestimmbarkeit von Glucose in Anwesenheit variierender Albumin-Konzentrationen ging hervor, dass sich diese beiden Stoffe anhand der Rotationsdispersion bei $\frac{I(\omega)}{I(2\omega)}$ lediglich mittels PLS-Regression angewendet auf breitbandige Daten spektral unterscheiden lassen. Monochromatisch kommt es zu einer Überlagerung der Rotationsdispersionen, die eine Unterscheidung unmöglich macht. Es wurde jedoch in Abschnitt 4.2.1.2 auch gezeigt, dass sich zumindest die Albumin-Konzentration auch monochromatisch bei zum Beispiel 405 nm über ihre Absorption mittels $\log(I(2\omega))$ unabhängig von der Rotationsdispersion vorhersagen lässt.

Daher stellt sich die Frage, ob die Information über die Störkonzentration, wenn auch mit einer gewissen Ungenauigkeit (siehe Tabelle 11) behaftet, in den Messdaten aus Abschnitt 4.2.1.1 und 4.2.1.2 für eine Verbesserung der Vorhersage genutzt werden kann. Insbesondere ist dabei interessant, ob sich bei Kenntnis der Albumin-Konzentration deren Beitrag zur Rotationsdispersion korrigieren lässt. Hierzu bietet sich zunächst ein Blick

in Gleichung 47 zur Überlagerung der Rotationsdispersionen an:

$$\underbrace{\Phi_{\text{ges}}}_{\text{bekannt}} = \underbrace{\alpha_{\text{Gluc}} \cdot \underbrace{C_{\text{Gluc}}}_{\text{gesucht}} + \alpha_{\text{Alb}} \cdot \underbrace{C_{\text{Alb}}}_{\text{bestimmt}}}_{\Phi_{\text{Probe}}} + \Phi_{\text{Filter}} \quad (47)$$

Der gemessene Gesamtdrehwinkel resultiert dabei aus dem Polarisationsfilter-Offset Φ_{Filter} und der Drehung durch die Probe Φ_{Probe} . Letztere setzt sich wiederum aus den spezifischen Drehwinkeln α_{Gluc} und α_{Alb} von Glucose und Albumin sowie deren jeweiliger Konzentration C_{Gluc} und C_{Alb} zusammen. Bekannt sind in dieser Gleichung nach Bestimmung mittels $\log(I(2\omega))$ die Albumin-Konzentration C_{Alb} und der Messwert Φ_{ges} .

Da zur Konzentrationsbestimmung eine lineare Regression durchgeführt wird, und der Polarisationsfilter Offset Φ_{Filter} konstant und somit für Kalibrier- und Validierdatensatz gleich ist, spielt dieser bei der Lösung des Gleichungssystems effektiv keine Rolle und kann vernachlässigt werden, wodurch gilt:

$$\underbrace{\Phi_{\text{ges}}}_{\text{bekannt}} = \underbrace{\alpha_{\text{Gluc}} \cdot \underbrace{C_{\text{Gluc}}}_{\text{gesucht}} + \alpha_{\text{Alb}} \cdot \underbrace{C_{\text{Alb}}}_{\text{bestimmt}}}_{\Phi_{\text{Probe}}} + \underbrace{\Phi_{\text{Filter}}}_{\text{irrelevant}} \quad (48)$$

Es bleiben drei Unbekannte, von denen die spezifischen Drehwinkel α_{Gluc} und α_{Alb} entweder rechnerisch oder experimentell bestimmt werden können, um das Gleichungssystem nach der gesuchten Glucose-Konzentration C_{Gluc} auflösen zu können. Es ergibt sich:

$$\underbrace{C_{\text{Gluc}}}_{\text{gesucht}} = \frac{\overbrace{\underbrace{\Phi_{\text{ges}}}_{\text{bekannt}} - \alpha_{\text{Alb}} \cdot \underbrace{C_{\text{Alb}}}_{\text{bestimmt}}}_{\text{Korrektur der Gesamtdrehung}}}{\alpha_{\text{Gluc}}} \quad (49)$$

Bei dieser Gleichung wird bereits deutlich, wie die gemessene Gesamtdrehung Φ_{ges} vom Einfluss der Albumin-Drehung $\alpha_{\text{Alb}} \cdot C_{\text{Alb}}$ bereinigt wird. Zur Bestimmung von C_{Gluc} wird diese Subtraktion noch auf die spezifische Glucose-Drehung α_{Gluc} normiert, sodass zur endgültigen Bestimmung nur noch α_{Gluc} und α_{Alb} fehlen.

Bei den 6 x 6 Konzentrationsmatrizen aus Glucose und Albumin existieren in jeder Matrix immer sechs verschiedene Werte, bei denen die jeweils andere Konzentration 0 mg/dl beträgt. Es bietet sich daher an, diese Werte aus dem Kalibrationsdatensatz zur Bestimmung von α_{Gluc} und α_{Alb} zu verwenden. Mit $C_{\text{Alb}} = 0$ vereinfacht sich Gleichung 48 zu

$$\underbrace{\Phi_{\text{ges}}}_{\text{bekannt}} = \alpha_{\text{Gluc}} \cdot \underbrace{C_{\text{Gluc}}}_{\text{Ref(cal)}} + \underbrace{\alpha_{\text{Alb}} \cdot \underbrace{C_{\text{Alb}}}_{=0}}_0 + \underbrace{\Phi_{\text{Filter}}}_{\text{irrelevant}} \quad (50)$$

wodurch der spezifische Drehwinkel anhand der Regressionsgeraden bestimmt werden kann. Dabei wird der gesamte Dynamikbereich $\Delta\Phi_{\text{ges}}$ des Messsignals und der Referenzkonzentration ΔC_{Gluc} ausgenutzt. Somit ergibt sich

$$\alpha_{\text{Gluc}} = \frac{\Delta\Phi_{\text{ges}}}{\Delta C_{\text{Gluc}}} \quad (51)$$

wodurch α_{Gluc} bekannt ist. Analog wird mit dem spezifischen Drehwinkel des Albumin α_{Alb} verfahren, wobei dann entsprechend $\alpha_{\text{Gluc}} = 0$ ist. Die beiden spezifischen Rotationen

können nun in Gleichung 48 eingesetzt werden.

$$\underbrace{C_{\text{Gluc}}}_{\text{gesucht}} = \frac{\underbrace{\Phi_{\text{ges}}}_{\text{bekannt}} - \underbrace{\alpha_{\text{Alb}}}_{\text{bestimmt}} \cdot \underbrace{C_{\text{Alb}}}_{\text{bestimmt}}}{\underbrace{\alpha_{\text{Gluc}}}_{\text{bestimmt}}} \quad (52)$$

Somit sind bis auf C_{Gluc} alle Unbekannten bestimmt und es kann für den Validierdatensatz nach C_{Gluc} aufgelöst werden. Φ_{ges} ist als Messwert bekannt, C_{Alb} wurde über die Absorption mittels $\log(I(2\omega))$ bestimmt, und α_{Gluc} beziehungsweise α_{Alb} konnten aus der Kalibrationsmatrix oder als theoretisch berechnete Werte ermittelt werden.

Mit Gleichung 52 lässt sich nun untersuchen, inwieweit eine Verbesserung der Bestimmungsgenauigkeit für ein monochromatisches System mit 405 nm möglich ist, wenn eine Korrektur der Rotationsdispersion mittels über die Absorption bestimmte Albumin-Konzentration erfolgt. Dazu wird dieses Verfahren auf die Datensätze aus Abschnitt 4.2.1.1 und 4.2.1.2 angewendet bei der 0 – 500 mg/dl Glucose jeweils mit 0 – 250 mg/dl, 0 – 500 mg/dl beziehungsweise 0 – 1000 mg/dl Albumin vermischt wurde.

Die Albumin-Konzentration wurde dort in Tabelle 11 bei 405 nm bereits über die Absorption mittels $\log(I(2\omega))$ bestimmt. Diese Werte werden für jeden der drei Konzentrationsbereiche in Gleichung 52 eingesetzt. Eine Bestimmung der spezifischen Rotationen für α_{Gluc} und α_{Alb} wurde analog über Gleichung 51 ermittelt.

Eine ausführliche Darstellung des Vergleichs für die 405 nm-Bestimmung ist exemplarisch für die höchste Albumin-Konzentration von 0 – 1000 mg/dl in Abbildung 70 zu finden. Eine übersichtliche Darstellung der drei Konzentrationsbereiche erfolgt in Abbildung 72 und Tabelle 12.

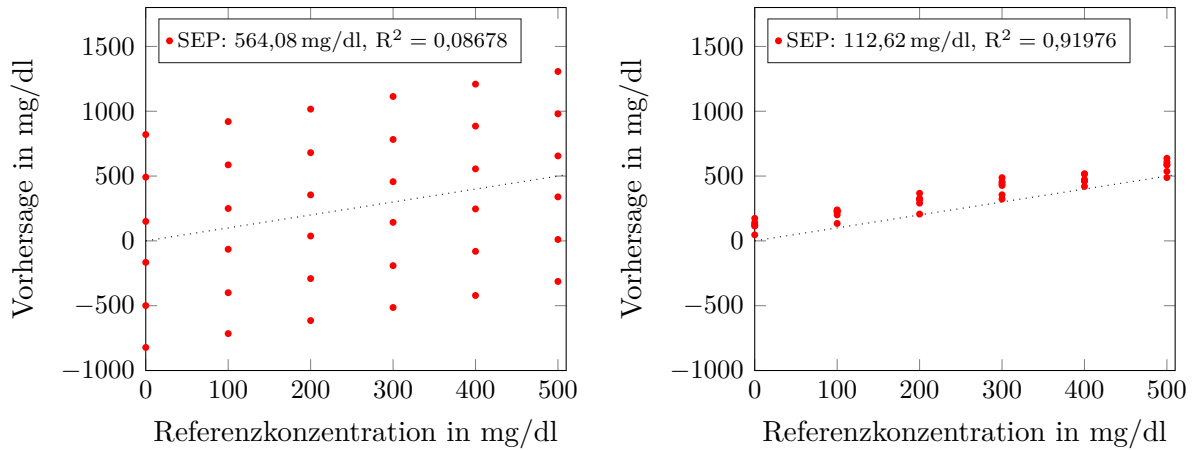


Abbildung 70: Glucose-Vorhersage mit 0 – 1000 mg/dl Albumin und Absorptionsmessung bei 405 nm. links: $\frac{I(\omega)}{I(2\omega)}$ mit linearer Regression, rechts: $\frac{I(\omega)}{I(2\omega)}$ mit Korrektur der Rotationsdispersion über $\log(I(2\omega))$.

Die überlagerten Rotationsdispersionen führen bei monochromatischer Auswertung des $\frac{I(\omega)}{I(2\omega)}$ Signals zu einer erheblichen Abweichung von $\pm 564,08$ mg/dl und einem sehr geringen R^2 von 0,08678. Da monochromatisch nicht zwischen den Rotationsdispersionen von Glucose und Albumin unterschieden werden kann, wurde bereits mit einem ähnlichen Ergebnis gerechnet.

Wird hingegen die Albumin-Konzentration über $\log(I(2\omega))$ durch Absorptionsmessung

bestimmt und die Rotationsdispersion basierend auf dieser Konzentration korrigiert, so verbessert sich die Vorhersage auf $\pm 112,62$ mg/dl. Im Vergleich zur breitbandigen Analyse der Rotationsdispersionen mittels PLSR auf $\pm 16,01$ mg/dl (siehe Abbildung 68) ist dies jedoch deutlich mehr.

Es ist davon auszugehen, dass der Hauptgrund darin liegt, dass es bei der Ermittlung der Albumin-Konzentration über die Absorptionmessungen bereits zu Abweichungen von $\pm 69,56$ mg/dl kommt. Insofern ist es klar, dass auch die daraus bestimmte Glucose-Konzentration fehlerbehaftet ist. Um diesem Sachverhalt nachzugehen, werden für die Albumin-Konzentrationen die Referenzwerte eingesetzt, womit Bestimmungsfehler über die Absorption ausgeschlossen sind. Einzig Fehler in der Anmischung der Proben, bei der Bestimmung der spezifischen Rotationen α_{Gluc} und α_{Alb} sowie bei der Messung der Gesamtdrehung Φ_{ges} bleiben somit bestehen. Die Ergebnisse für die Glucose-Bestimmung zeigt Abbildung 71.

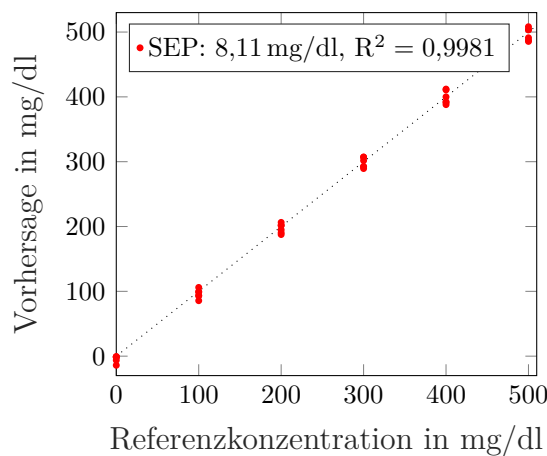


Abbildung 71: Glucose Vorhersage mit 0 – 1000 mg/dl Albumin bei 405 nm korrigiert mit Albumin-Referenzwerten.

Es zeigt sich, dass durch Korrektur der Rotationsdispersion in Gleichung 52 mit den Referenzwerten für die Albumin-Konzentration eine Bestimmungsgenauigkeit von $\pm 8,11$ mg/dl und ein R^2 von 0,9981 erreichbar ist. Dies ist sogar um den Faktor zwei besser als die breitbandige Bestimmung anhand der Rotationsdispersion mit $\frac{I(\omega)}{I(2\omega)}$. Nötig wäre dafür jedoch eine fehlerfreie Bestimmung der Albumin-Konzentration, was in der Praxis nicht möglich ist. Dies zeigt aber auch, dass die Rotationsdispersion trotz spektraler Überlagerung aus Glucose und Albumin und trotz der jeweils hohen Werte offensichtlich sehr präzise gemessen wird. Eine Zusammenstellung der Glucose-Bestimmungsgenauigkeiten für die drei verschiedenen Albumin Bereiche 0 – 250 mg/dl, 0 – 500 mg/dl und 0 – 1000 mg/dl aus Abschnitt 4.2.1.1 und 4.2.1.2 befindet sich in Tabelle 12 und Abbildung 72.

Die für 0 – 1000 mg/dl Albumin gemachten Beobachtungen setzen sich auch für die beiden anderen Konzentrationsbereiche fort. Bei Bestimmung mittels $\frac{I(\omega)}{I(2\omega)}$ ohne Korrektur steigt die Abweichung proportional zur Albumin-Konzentration von $\pm 141,08$ mg/dl über $\pm 279,74$ mg/dl auf $\pm 564,08$ mg/dl an. Wird die Rotationsdispersion durch die über $\log(I(2\omega))$ bestimmte Albumin-Konzentration korrigiert, bleibt der Fehler mit einem Wert von $\pm 112,29$ mg/dl, $\pm 32,34$ mg/dl beziehungsweise $\pm 112,62$ mg/dl moderat, jedoch höchst unterschiedlich. Dabei ist allerdings eine Korrelation zur Bestimmungsgenauigkeit des Albumins über die Absorption aus Tabelle 11 zu erkennen. Dort werden für

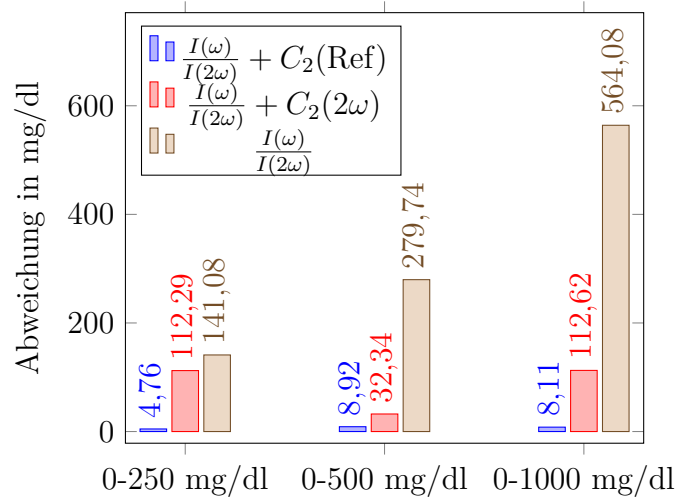


Abbildung 72: Glucose-Bestimmungsgenauigkeit bei 405 nm mit Kombination von Rotation und Absorption.

0 – 500 mg/dl Albumin ebenso die geringsten Abweichungen erreicht, wie für die spätere Glucose-Bestimmung nach Korrektur.

Tabelle 12: Bestimmungsfehler für monochromatische Kombination von Rotation und Absorption in mg/dl.

Albumin in mg/dl	Albumin	Glucose		
	$\log(I(2\omega))$	$\frac{I(\omega)}{I(2\omega)}$	$\frac{I(\omega)}{I(2\omega)} + C_2(2\omega)$	$\frac{I(\omega)}{I(2\omega)} + C_2(\text{Ref})$
0 – 250	$\pm 115,26$	$\pm 141,08$	$\pm 112,29$	$\pm 4,76$
0 – 500	$\pm 18,92$	$\pm 279,74$	$\pm 32,34$	$\pm 8,92$
0 – 1000	$\pm 69,56$	$\pm 564,08$	$\pm 112,62$	$\pm 8,11$

Werden die Albumin-Referenzwerte in Gleichung 49 eingesetzt, führt dies zu den besten Ergebnissen. Damit wird deutlich, dass die Effizienz dieser Methode sehr stark von der Bestimmungsgenauigkeit der Störkonzentration abhängt. Ist deren Abweichung gering, kann auch die Glucose-Konzentration mit einer Wellenlänge sehr präzise bestimmt werden. Da in der Praxis mit einer Wellenlänge nicht zwischen Intensitätsschwankungen durch zum Beispiel Streueffekte und konzentrationsabhängiger Absorption unterschieden werden kann, ist diese Methode nur bedingt zur Verbesserung der Vorhersagegenauigkeit geeignet.

Im Gegensatz zur Messung der Rotationsdispersion bei $\frac{I(\omega)}{I(2\omega)}$ werden bei der Absorption mittels $\log(I(2\omega))$ keine Störeinflüsse wie Schwankungen der Lichtquellenintensität oder Streueffekte kompensiert. Beide Frequenzanteile für sich allein genommen, sowohl $I(\omega)$ als auch $I(2\omega)$ sind anfällig gegenüber Störungen der Strahlungsintensität. Hierin ist einer der Hauptgründe zu sehen, weshalb sich die Albumin-Konzentration über die Absorption nicht optimal vorhersagen lässt, was schließlich auch die Glucose-Bestimmung negativ beeinflusst.

Abschließend lässt sich jedoch sagen, dass es mit dieser Methode möglich ist, die Bestimmungsgenauigkeit für Glucose in Anwesenheit von Albumin für ein monochromatisches System zu verbessern, sofern die Wellenlänge im Absorptionsbereich des Albumin liegt. Aufgrund der Störanfälligkeit des $I(2\omega)$ -Frequenzanteils kommt es jedoch zu Ungenauigkeiten, sodass dieses Verfahren den breitbandigen Aufbau nicht gänzlich ersetzen kann. Auch eine Überlagerung von Einflüssen weiterer Stoffe kann mit dieser Methode als kritisch angesehen werden.

4.2.2 Glucose gemischt mit sonstigen optisch aktiven Stoffen

Neben Albumin existiert noch eine Vielzahl weiterer Stoffe, die potentiell eine Messung beeinträchtigen können. Ein Großteil dieser Stoffe ist jedoch optisch inaktiv, wie zum Beispiel Kalium, Natrium, Chlorid, Magnesium, Kalzium, Harnstoff, Glycin oder H_2O_2 [7]. Da durch die Verwendung von $\frac{I(\omega)}{I(2\omega)}$ Absorptions- und Streueffekte kompensiert werden, kann auch der Einfluss der genannten Stoffe als vernachlässigbar angesehen werden.

Eine größere mögliche Störung geht aus den optisch aktiven Substanzen hervor, die sich mit der Rotationsdispersion von Glucose überlagern. Auch hier werden mit Alanin, Arginin, Cystein, Glutamin, Histidin, Isoleucin, Lysin, Methionin, Phenylalanin, Serine, Threonin, Tyrosin, Valine, Ascorbinsäure, Laktat eine große Menge an Stoffen - hauptsächlich α -Aminosäuren - genannt, die jedoch aufgrund ihrer im Vergleich zu Glucose oder Albumin sehr geringen Konzentration meist zu vernachlässigen sind [7, 286]. Ascorbinsäure und Laktat stechen dabei heraus und werden neben den anderen Bluteiweißen im Folgenden diskutiert.

Laktat

Laktat entsteht als Zwischenprodukt beim Stoffwechsel und ist ein Indikator für seine Leistungsfähigkeit [3–5]. Die Laktatkonzentration wird im Leistungssport daher als wichtige Größe betrachtet. Je nach Quelle werden etwa 4,5 – 17 mg/dl [7, 8] beziehungsweise 0,3 – 18 mg/dl [26] als normal angesehen. Unter starker Belastung kann die Konzentration jedoch auf bis etwa 225 mg/dl ansteigen, doch bereits eine Konzentration von über etwa 40 mg/dl wird in der Intensivmedizin mit Herzinfarkten, Kreislaufversagen oder Trauma in Verbindung gebracht [26].

Auch wenn Laktat je nach Wellenlänge wie in Abschnitt 3.4.2.1 untersucht, eine um etwa den Faktor vier geringere spezifische Drehung als Glucose aufweist, geht hiervon ein potentieller Störeinfluss auf die Rotationsdispersion aus. Um den für die Messung ungünstigsten Fall zu simulieren, wurden die Glucose-Konzentrationen von 0 – 500 mg/dl mit der physiologisch maximal möglichen Laktat-Konzentration von 0 – 250 mg/dl vermischt. In der Messreihe wurde mit der bekannten 6 x 6-Matrix-Kombination aus den vorherigen Kapiteln gearbeitet. Die Rohsignale dieser Daten sind in Abbildung 73 zu sehen.

Wie schon bei den bisherigen Messreihen steigt das $\frac{I(\omega)}{I(2\omega)}$ Signal sowohl für 532 nm und 635 nm als auch bei den breitbandigen Daten an. Durch die Zugabe von Laktat kommt es wie bereits bei den Messungen mit Albumin als Störstoff in Abschnitt 4.2.1.1 ebenso zu einer Überlagerung der Rotationsdispersionen, bei denen das $\frac{I(\omega)}{I(2\omega)}$ Signal aufgrund der linksdrehenden Eigenschaften von Laktat sinkt. Im Gegensatz zu 0 – 250 mg/dl Albumin ist die Störung durch das Laktat jedoch weitaus geringer, was mit der bei 532 nm um etwa den Faktor fünf schwächeren spezifischen Rotationsdispersion zu erklären ist, siehe Abschnitt 3.4.2.1.

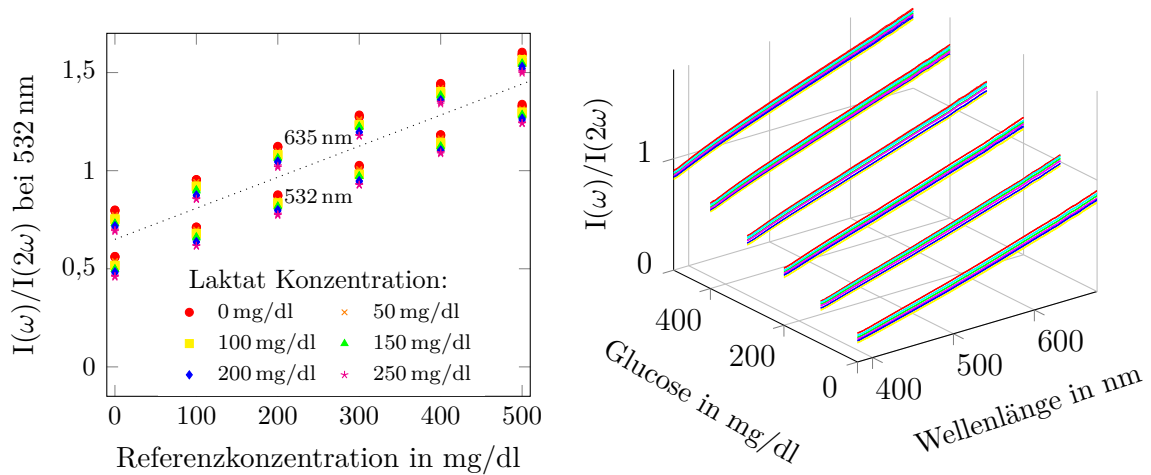


Abbildung 73: $\frac{I(\omega)}{I(2\omega)}$ für Glucose 0 – 500 mg/dl mit 0 – 250 mg/dl Laktat. Links: 532 nm und 635 nm, rechts: Breitbandige Daten für 380 – 680 nm.

Im nächsten Schritt wurden die Auswirkungen auf die Bestimmungsgenauigkeit der Glucose-Konzentration untersucht. In Abbildung 74 werden die Ergebnisse der Auswertung für 532 nm und 635 nm und für breitbandige Daten gegenübergestellt.

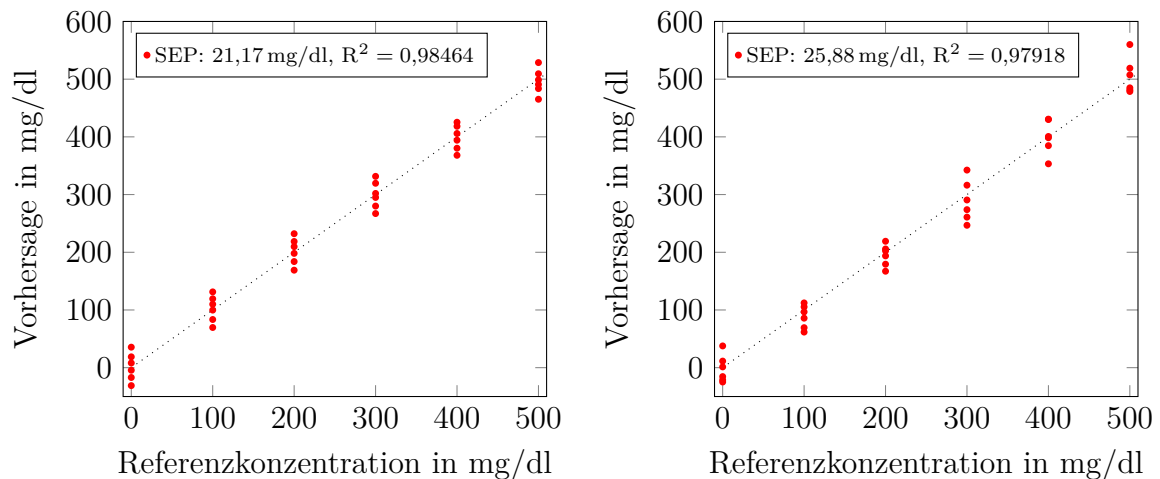


Abbildung 74: Glucose-Vorhersage mit 0 – 250 mg/dl Laktat mittels $\frac{I(\omega)}{I(2\omega)}$. links: 532 nm und 635 nm mit linearer Regression, rechts: 380 – 680 nm mit fünf PLS-Komponenten.

Auffällig ist bei dieser Bestimmung, dass sowohl der Zwei-Wellenlängen- als auch der breitbandige Ansatz mit $\pm 21,17$ mg/dl beziehungsweise $\pm 25,88$ mg/dl ähnliche Ergebnisse liefert. Zur Vollständigkeit wurde auch eine Bestimmung mit monochromatischem Licht von 532 nm durchgeführt, was zu einer Abweichung von $\pm 21,71$ mg/dl führte. In diesem Fall bringt die Evaluation mit PLS-Regression keinen nennenswerten Vorteil im Vergleich zum monochromatischen oder Zwei-Wellenlängen-Ansatz.

Ein Grund hierfür liegt in der Rotationsdispersion des Laktats. Die Zentralwellenlänge λ_0 von Glucose liegt mit 150 nm [22,23] wesentlich dichter an der von Laktat mit 210 nm [202] als an der von Albumin mit 264 nm [22,23]. Daher sind die spektralen Unterschiede der Rotationsdispersionen von Glucose und Laktat geringer als die von Glucose und Albumin.

Dies macht es schwieriger, optisch zwischen Glucose und Laktat zu unterscheiden. Hinzu kommt, dass es durch die geringe spezifische Drehung von Laktat in Kombination mit seiner physiologischen Konzentration nur zu geringen Signalausschlägen kommt, die eine Identifikation seines spektralen Einflusses erschweren.

Allerdings wurde mit der maximal möglichen Laktat-Konzentration auch ein Extremfall untersucht, bei dem sich der Fehler immer noch auf 25 mg/dl begrenzt. Da die physiologischen Laktatwerte um etwa den Faktor 10 geringer liegen, ist auch davon auszugehen, dass sich der Fehler entsprechend reduziert. Dies bestätigt die Annahme der Literatur, nach der der Einfluss der physiologischen Laktat-Konzentration zu vernachlässigen ist [7].

Ascorbinsäure

Eine weitere mögliche Störquelle für die Messung der Rotationsdispersion stellt Ascorbinsäure dar, die als Vitamin C im menschlichen Körper vorkommt. Ihre Rotationsdispersion wurde in Abschnitt 3.4.2.1 gemessen und für 532 nm mit etwa $\alpha_{\text{Ascorbin}} \approx 305 \frac{\text{mdeg} \cdot \text{l}}{\text{m} \cdot \text{g}}$ bestimmt. Die physiologische Konzentration im Plasma wird mit $c_{\text{Ascorbin}} = 0,04 - 0,06 \text{ mmol/l}$ angegeben [7], was etwa $c_{\text{Ascorbin}} = 0,007 - 0,01 \text{ mg/l}$ entspricht. Die daraus resultierende Drehung Φ_{Ascorbin} beträgt somit für den höchsten Ascorbinsäure-Wert

$$\Phi_{\text{Ascorbin}} = \alpha_{\text{Ascorbin}} \cdot c_{\text{Ascorbin}} \cdot d \approx 305 \frac{\text{mdeg} \cdot \text{l}}{\text{m} \cdot \text{g}} \cdot 1 \cdot 10^{-5} \frac{\text{g}}{\text{l}} \cdot 0,05 \text{ m} \approx 1,5 \cdot 10^{-4} \text{ mdeg} \quad (53)$$

Bei einer Küvettenlänge von $d = 0,05 \text{ m}$ gehen von der Ascorbinsäure bei 532 nm Rotationen von lediglich $1,5 \cdot 10^{-4} \text{ mdeg}$ aus, was um mehr als drei Größenordnungen niedriger als die Auswirkungen durch temperaturbedingte Drift des Polarisationsfilter-Halters ist, siehe Abschnitt 3.4.1.

Dies deckt sich auch mit den Literaturangaben, nach denen der Einfluss der Ascorbinsäure auf die Rotationsdispersion im Augenwasser vernachlässigbar ist, obwohl die dort vorherrschende Konzentration sogar um etwa den Faktor 20 größer ist [7]. Daher kann davon ausgegangen werden, dass der Ascorbinsäureanteil im Blutplasma zu vernachlässigen ist.

Weitere Bluteiweiße

Als größter Störeinfluss auf die gemessene Rotation wurde in der bisherigen Untersuchung bereits Albumin identifiziert und seine Auswirkungen auf die Glucose-Bestimmungsgenauigkeit ausführlich evaluiert und diskutiert. Albumin wurde stellvertretend für die im Blut vertretenen Eiweiße verwendet, da es einerseits mehr als die Hälfte der Proteine ausmacht und die verbleibenden 340 Eiweiße in wesentlich geringeren Konzentrationen vorliegen, so dass alle zusammen genommen in ihrer Konzentration geringer sind als das Albumin. Tatsächlich kann jedes vorhandene Protein die Rotationsdispersion individuell überlagern.

Jedes dieser 340 Eiweiße einzeln zu untersuchen, wäre jedoch enorm aufwändig. Da die Anzahl an verfügbaren Spritzenpumpen und der Platz für mögliche Stammlösungen begrenzt ist, wären die Möglichkeiten einer solchen Messung limitiert. Anstatt jedes Bluteiweiß und seinen Einfluss einzeln zu untersuchen, wurden in Abschnitt 4.3 stattdessen Messreihen mit Humanblut durchgeführt.

4.3 Glucose-Bestimmung in humanen Proben

Im Hinblick auf eine zukünftige Anwendung konnte in den Abschnitten 4.1 und 4.2 bereits gezeigt werden, dass Intensitätsschwankungen und Streueffekte noch einen vernachlässigbaren Einfluss auf die Konzentrationsbestimmung haben [1]. Gleichzeitig wurde demonstriert, dass eine Glucose-Bestimmung selbst in Anwesenheit von in physiologischen Grenzen schwankender Albumin-Konzentration als Hauptblutprotein in synthetischen Proben möglich ist und dass zwischen beiden Stoffen anhand ihrer Rotationsdispersion unterschieden werden kann [2]. Um dies unter realen Bedingungen zu bestätigen, wurden Messungen an humanen Proben durchgeführt, deren Ergebnisse im Folgenden beschrieben werden.

4.3.1 Anpassung des Messaufbaus

Eine Bedingung für die zuverlässige Messung der Rotationsdispersion ist das Vorhandensein eines Restsignals in den Frequenzanteilen $I(\omega)$ und $I(2\omega)$, um das bekannte Intensitätsverhältnis $\frac{I(\omega)}{I(2\omega)}$ zu bilden. Die bisherigen Messungen an streuenden und mit Clinoleic[®] versetzten Proben beschränkten sich auf einen Streukoeffizienten von maximal $0,275 \text{ cm}^{-1}$. Dies führte jedoch bereits zu einer deutlichen Reduktion der Restintensitäten. Da Vollblut mit etwa $400 - 900 \text{ cm}^{-1}$ [287] eine um mehr als drei Größenordnungen höhere Streuung aufweist, muss der Streukoeffizient erheblich reduziert werden, um die Rotationsdispersion überhaupt messen zu können. Zu diesem Zweck müssen die Blutproben zunächst zentrifugiert werden, um die Erythrozyten als Hauptursache der Streuung abzutrennen. Zwar weist Blutplasma mit etwa 1 cm^{-1} [288] einen erheblich geringeren Streukoeffizienten als Vollblut auf, jedoch ist auch dieser noch etwa um das Vierfache höher als der bisher in Abschnitt 4.1.1.4 und 4.1.2.4 untersuchte Bereich des Streukoeffizienten. Da Literaturquellen im Spektralbereich unterhalb von 550 nm von Absorptionskoeffizienten zwischen $0,05 \text{ mm}^{-1}$ und $0,35 \text{ mm}^{-1}$ berichten [288], erscheint eine Überprüfung notwendig, in welchem Maße das Intensitätssignal abgeschwächt wird und ob das verbleibende Restsignal für eine zuverlässige Messung der Rotationsdispersion ausreicht beziehungsweise der Messaufbau für die Untersuchung von Blutplasma-Proben gegebenenfalls modifiziert werden muss.

Dafür wurden zunächst Vollblutproben mit einer Mikro 220 Zentrifuge (Hettich GmbH & Co. KG, Deutschland) bei einer Drehzahl von $6000 \frac{1}{\text{min}}$ und einer Dauer von 5 min zentrifugiert und das Blutplasma anschließend aus den Zentrifugenröhrchen mit einer Spritze entnommen. Bei sämtlichen der in dieser Arbeit verwendeten Humanproben handelt es sich um Blutspenden des Instituts für Transfusionsmedizin der Universität zu Lübeck, die aufgrund von zum Beispiel Mindermengen verworfen wurden und somit keinem Patienten mehr zugeführt worden wären. Der Verwendung der Proben im Rahmen des Projektes wurde durch die Ethikkommission der Technischen Hochschule Lübeck sowie der Universität zu Lübeck zugestimmt. Entsprechende Schreiben sind im Anhang als Abbildung 103 und 104 beigefügt.

Nach der Zentrifugation wurden jeweils 25 ml dieser Plasmaproben in die bisher verwendete 50 mm lange Küvette des Polarimeters gegeben und die gemessene Intensität mit der einer gewöhnlichen Wasserprobe verglichen. Dazu wurde der $I(2\omega)$ Frequenzanteil aufgrund seiner Unabhängigkeit von der optischen Drehung gewählt, um lediglich den Einfluss des Streu- und Absorptionskoeffizienten zu erhalten. Die Ergebnisse für zwei unterschiedliche Proben sind in Abbildung 75 dargestellt.

Es wird deutlich, dass es beim $I(2\omega)$ Signal durch das Blutplasma zu einer erheblichen Abschwächung im Vergleich zur Wasserprobe kommt. Im bisher verwendeten Wellenlän-

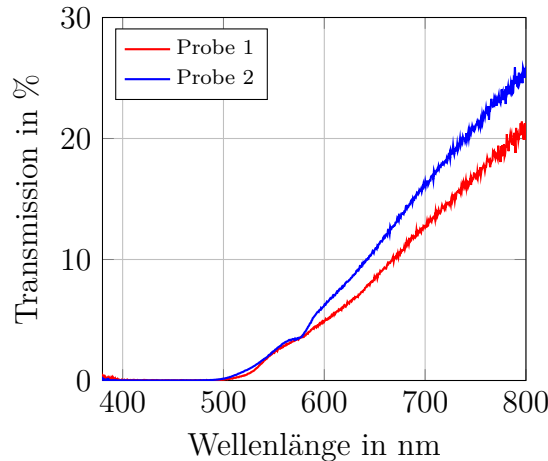


Abbildung 75: Gemessene Transmission zweier Blutplasmaproben bei 50 mm Pfadlänge.

genbereich zwischen 380 – 680 nm kommt es besonders bei kurzen Wellenlängen zu deutlichen Signalverlusten, die unterhalb von etwa 500 nm zu totalem Signalverlust führen. Ursächlich hierfür sind zum einen der zum UV hin ansteigende Streukoeffizient [288] und zum anderen in nicht unerheblicher Weise die Absorption der Blutproteine.

Die Messmethode erlaubt es jedoch nicht, zwischen Absorption und Streuung zu unterscheiden. Dies liegt unter anderem daran, dass nur vollständig polarisiertes Licht im $I(2\omega)$ Frequenzanteil messbar ist. Eine durch Streuung verursachte Depolarisation des Signals macht sich daher ebenso in einer Abschwächung der Signalamplitude bemerkbar, wie eine Absorption [1]. Daher wurden Absorptionskoeffizient μ_a und Streukoeffizient μ_s zum Abschwächungskoeffizienten $\mu_t = \mu_a + \mu_s$ zusammengefasst.

Die bisherigen Erkenntnisse zur spektralen Überlagerung optisch aktiver Substanzen in Abschnitt 4.2 haben zwar gezeigt, dass zwischen diesen anhand ihrer Rotationsdispersion unterschieden werden kann, dass aber auch hierfür ein Restsignal von $I(\omega)$ und $I(2\omega)$ nötig ist. Da zudem insbesondere die kurzen Wellenlängen spektrale Informationen tragen, jedoch unterhalb von 550 nm kaum noch Transmission vorhanden ist, ist eine Vermessung mit unterschiedlichen Glucose-Konzentrationen in dieser Messkonfiguration nicht sinnvoll. Um zu bestimmen, welche Pfadlänge im Bezug auf die Intensitätsverluste noch tolerierbar ist, wurde nach dem modifizierten Gesetz von Lambert-Beer zunächst der aus Absorptions- und Streukoeffizienten zusammengesetzte Abschwächungskoeffizient μ_t bestimmt. Damit stellt sich das Lambert-Beer-Gesetz folgendermaßen dar:

$$\frac{I}{I_0} = e^{-\mu_t \cdot d} = e^{-(\mu_a + \mu_s) \cdot d} \quad (54)$$

Aus dem bei einer Pfadlänge von 50 mm bestimmten Abschwächungskoeffizienten kann dann die Transmission für verschiedene Pfadlängen berechnet werden. Eine Darstellung des spektralen Transmissionsverlaufs für diese Pfadlänge ist in Abbildung 77 zu finden.

Für kurze Wellenlängen ergibt sich ein Abschwächungskoeffizient von etwa $0,2 - 0,3 \text{ mm}^{-1}$, was sich mit den Erkenntnissen anderer Arbeiten ebenso wie die unterschiedlichen Transmissionen für verschiedene Blutplasma Proben deckt [288]. Die Messdaten zeigen, dass bei einem Wert von 10 mm noch eine Resttransmission von etwa 10 – 20 % zu erwarten ist. Dieser Wert erscheint tolerierbar, zumal in Polarimetern anderer Arbeiten ebenfalls

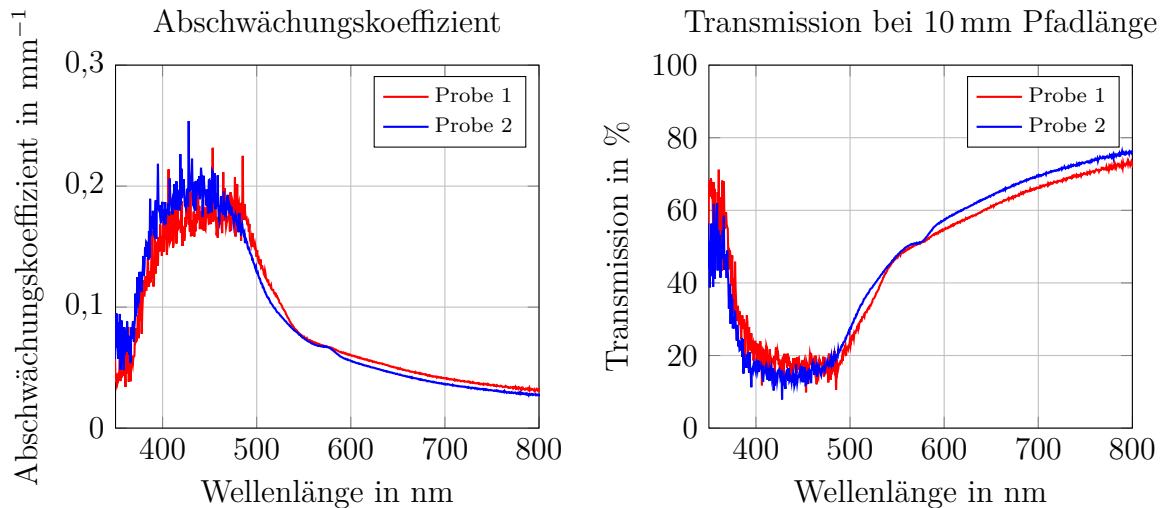


Abbildung 76: Links: gemessener Abschwächungskoeffizient zweier Blutplasmaproben bei 50 mm Pfadlänge, rechts: errechnete Transmission bei 10 mm Pfadlänge.

eine Pfadlänge von 10 mm verwendet wurde [34, 147, 148, 150–152, 156].

Reduktion der Pfadlänge

Um eine ausreichende Transmission zu erzielen, wurde eine neue Küvette mit einer Pfadlänge von 10 mm angefertigt, die vom Aufbau her der bereits in Abschnitt 3.1.4 verwendeten ähnelt. Hierzu wurde ebenfalls ein Durchmesser von 12 mm gewählt und die Enden mit Glasplättchen verschlossen. Zur Evaluation der nun erreichbaren Restintensität wurde eine erneute Transmissionsmessung des rotationsunabhängigen $I(2\omega)$ -Frequenzanteils weiterer Blutplasmaprobe durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 77 dargestellt.

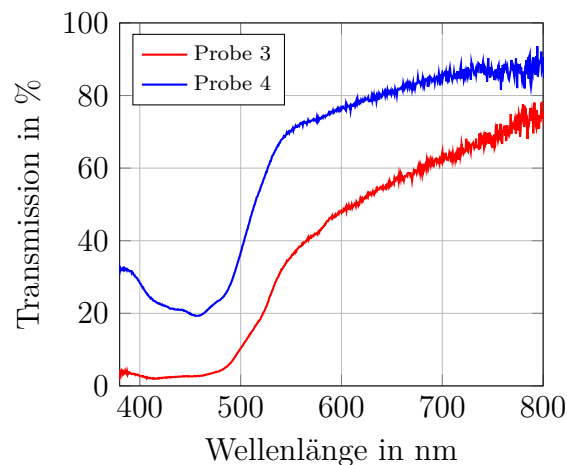


Abbildung 77: gemessene Transmission zweier Blutplasmaproben bei 10 mm Pfadlänge.

Deutlich wird, dass die Transmission im Vergleich zur Messung mit 50 mm aus Abbildung 75 signifikant gesteigert werden konnte. Insbesondere unterhalb von 500 nm konnte nach der Pfadlängenreduktion noch eine messbare Intensität verzeichnet werden, was ein Beibehalten des bisherigen Wellenlängenbereichs von 380–680 nm ermöglicht. Dies bestä-

tigt die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen, bei denen ebenfalls unterschiedliche Transmissionswerte für verschiedene Plasmaproben gemessen wurden [288]. Das Kompensationsverhältnis $\frac{I(\omega)}{I(2\omega)}$ ist auch hier in der Lage, diese Einflüsse zu eliminieren.

Konzentrationsbestimmung mit reduzierter Pfadlänge

Da der messbare probenabhängige Drehwinkel Φ gemäß Gleichung 10 direkt proportional zur Konzentration c und Pfadlänge d ist, bewirkt eine Verringerung der Pfadlänge zwar eine verbesserte Transmission, reduziert aber gleichzeitig auch die Sensitivität im Bezug auf die Rotationsdispersion. Daraus ergibt sich die Frage, ob mit diesem System trotz der geringeren Empfindlichkeit noch eine spektrale Unterscheidung von Glucose und Bluteiweiß anhand der Rotationsdispersion möglich ist. Um dem nachzugehen, wurde die Messung aus Abschnitt 4.2.1.1 wiederholt, in der 0, 100, ..., 500 mg/dl Glucose mit 0, 200, ..., 1000 mg/dl Albumin gemischt wurden, um einen direkten Vergleich der Bestimmungsgenauigkeiten zu ermöglichen. Die Ergebnisse für sind in Abbildung 78 zu sehen.

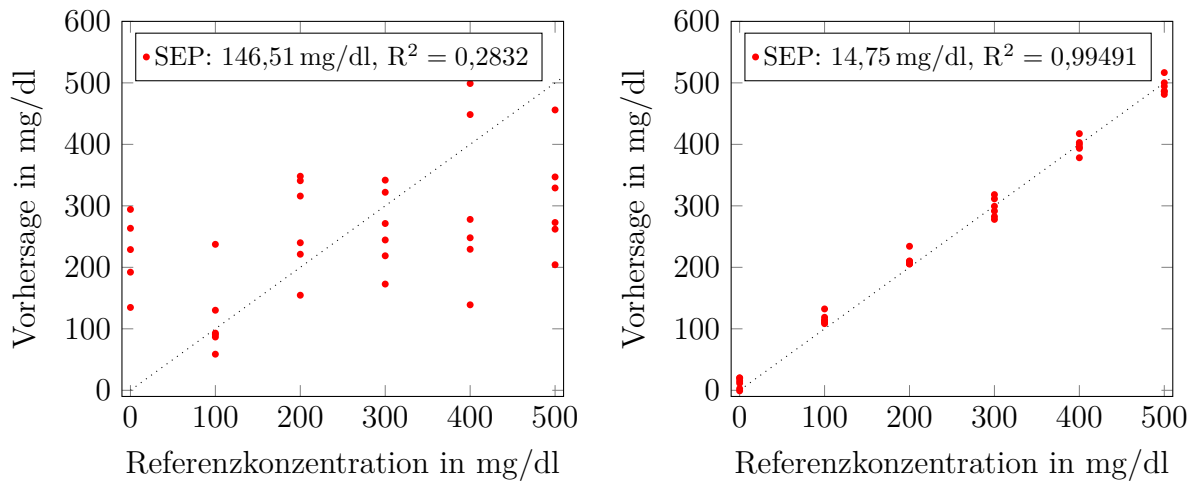


Abbildung 78: Glucose-Vorhersage für 10 mm Pfadlänge und 0 – 1000 mg/dl Albumin, links: mit 532 nm und 635 nm, rechts: mit 380 – 680 nm.

Es zeigt sich, dass die Vorhersagegenauigkeit unter Verwendung der 10 mm Küvette und Messung bei 532 nm und 635 nm zwar leicht auf $\pm 146,51$ mg/dl ansteigt, was aber in etwa den Ergebnissen mit der 50 mm Küvette aus Abbildung 66 mit $\pm 128,33$ mg/dl entspricht. Wird hingegen der Wellenlängenbereich von 380 – 680 nm zur Konzentrationsbestimmung herangezogen, so ergeben sich $\pm 14,75$ mg/dl, was ebenfalls mit den Werten für 50 mm aus Abbildung 67 übereinstimmt. Auch hier bringt die Verwendung des Kompensationsverhältnisses $\frac{I(\omega)}{I(2\omega)}$ einen Vorteil, da sonst bei breitbandiger Messung mit $\pm 33,3$ mg/dl ein um mehr als den Faktor zwei erhöhter Vorhersagefehler in Kauf genommen werden muss. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sowohl mit 50 mm als auch mit 10 mm Pfadlänge nahezu identische Bestimmungsgenauigkeiten erreicht werden. Dies lässt darauf schließen, dass Störeffekte mit einem absoluten Beitrag eine untergeordnete Rolle spielen, da sich diese relativ gesehen bei kleiner werdender Pfadlänge und somit kleinerem Rotationsbeitrag stärker bemerkbar machen würden. Hierzu zählen zum Beispiel mechanische Einflüsse (siehe Abschnitt 3.4.1). Beiträge, die hingegen einen relativen Einfluss auf die Messung der Drehung durch die Probe haben, wie zum Beispiel Lichtintensitätsschwankungen Proben-

absorption (siehe Abschnitt 4.1.2.2), die Probenabsorption (siehe Abschnitt 4.1.2.3), oder Streueffekte (siehe Abschnitt 4.1.2.4) können hingegen zuverlässig durch die vorgestellte Kompensationsmethode $\frac{I(\omega)}{I(2\omega)}$ unterdrückt werden.

4.3.2 Konzentrationsbestimmung in Blutplasma

Basierend auf den bisherigen Ergebnissen zur Glucose-Bestimmung in Anwesenheit von Albumin bei einer reduzierten Pfadlänge von 10 mm wurde untersucht, ob eine Konzentrationsbestimmung in humanem Blutplasma möglich ist.

Für diese Messungen wurden Blutspenden des Instituts für Transfusionsmedizin der Universität zu Lübeck verwendet, die aufgrund von zum Beispiel Mindermengen verworfen wurden. Diese Proben standen nur in unregelmäßigen Abständen zur Verfügung, sodass mit den vorhandenen Proben nur kleinere Messreihen durchgeführt werden konnten. Zudem waren die Proben der Blutspende bereits mit 63 – 70 ml Citrat Phosphat Dextrose (CPD)-Puffer versetzt worden, welcher neben Citratpuffer, Natriumdihydrogenphosphat und Adenin auch 25,5 mg/dl Glucose enthält, welche die im Blut vorhandene Konzentration während der Messreihen verfälscht. Je nach Größe der Blutprobe variiert daher die tatsächliche Glucose-Konzentration. Zudem kann eine Wechselwirkung der Glucose mit den in der Probe enthaltenen Erythrozyten nicht ausgeschlossen werden.

Um dies zu bestätigen, wurde der tatsächliche Glucose-Wert zunächst mit einem Referenzgerät (Accu-Chek, Roche Diabetes Care GmbH, Deutschland) überprüft. Insgesamt wurden drei individuelle Konzentrationsbestimmungen mit Blut von drei unterschiedlichen Spendern durchgeführt. Die bereits im Blut vorhandene Glucose-Konzentration betrug 432 mg/dl, 417 mg/dl beziehungsweise 352 mg/dl, was unter anderem durch die Zugabe des CPD Puffers zu erklären ist.

Zur Vorbereitung der Messungen wurden die Blutproben zentrifugiert und das Blutplasma entsprechend abgetrennt. Da die Menge des erhaltenen Plasmas sowohl von der Größe der Blutspende als auch vom Hämatokrit der Probe abhängt, standen für die Messungen jeweils Volumina von etwa 180 ml zur Verfügung.

Die Proben wurden mit 0, 100, ..., 500 mg/dl Glucose versetzt, um eine Konzentrationsvariation ähnlich Abschnitt 4.1.2 und 4.2 zu erreichen. Da die Zugabe von in Wasser gelöster Glucose zum Blutplasma wie in den bisherigen Kapiteln zu einer Verdünnung der Plasma-Probe führen und somit eine Korrelation von Plasma und Glucose bewirken würde, musste die Probenvorbereitung entsprechend angepasst werden. Um den Anmischungsfehler möglichst gering zu halten, wurden die Blutplasma-Proben in zwei gleichgroße Teile zu je 80 ml aufgeteilt und ein Teil durch Zugabe von 0,8 g pulverförmiger Glucose entsprechend mit 1000 mg/dl dotiert. Hierdurch wurde gewährleistet, dass individuelle Gemische der beiden Teile zwar unterschiedliche Glucose- aber gleiche Plasma-Konzentrationen aufweisen. Die Vermischung der Proben erfolgte mittels einer Eppendorf Pipette 1 – 10 ml (systematische Abweichung 60 μ l, zufällige Abweichung ± 10 μ l). Insgesamt standen für die Messungen jeweils 18 Proben mit je sechs verschiedenen Glucose-Konzentrationen zur Verfügung. Für eine Messreihe beschränkte sich die Anzahl der Proben aufgrund der verfügbaren Plasamenge auf 16.

Zur Auswertung wurden die ersten zwölf Werte beziehungsweise zehn bei der Messreihe mit 16 Proben zur Kalibration verwendet und die letzten sechs zur Validierung, so dass für die Vorhersage der gesamte Konzentrationsbereich abgedeckt werden konnte. Die Vorhersage-Genauigkeiten für die drei Messreihen sind in Abbildung 79 für 532 nm und 635 nm sowie 380 – 640 nm dargestellt. Es zeigt sich, dass auch in den Blutplasma-Proben

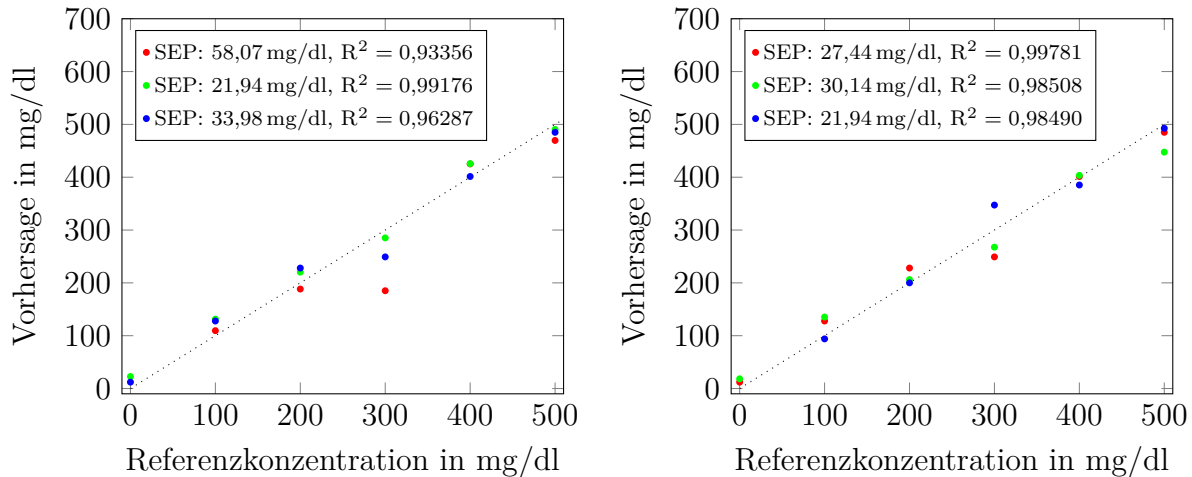


Abbildung 79: Glucose-Vorhersage in Blutplasma für 10 mm Pfadlänge, links: mit 532 nm und 635 nm, rechts 380 – 640 nm.

eine Glucose-Bestimmung möglich ist, obwohl der Eiweißgehalt der Proben mit circa 7.000 mg/dl [7,8] deutlich höher als bei den bisherigen Messungen mit synthetischen Proben aus Abschnitt 4.2 ist. Trotz höherer Absorption und größerem Streukoeffizienten [288] wird bei gleichzeitig reduzierter Pfadlänge für die Messungen mit 532 nm und 635 nm eine Vorhersage-Genauigkeit von $\pm 58,07$ mg/dl, $\pm 21,94$ mg/dl beziehungsweise $\pm 33,98$ mg/dl erreicht. Zur optimalen Bestimmung mittels breitbandiger Daten musste der bei den bisherigen Messungen verwendete Wellenlängenbereich von 380 – 680 nm auf 380 – 640 nm beschränkt werden, da es durch die Probenabsorption zu Intensitätsverlusten kommt und die Rotationsdispersion bei steigenden Wellenlängen weniger Sensitivität liefert, siehe Abbildung 8. Wird der breitbandige Wellenlängenbereich von 380–640 nm für die Vorhersage verwendet, so werden Werte von $\pm 27,33$ mg/dl, $\pm 30,14$ mg/dl, $\pm 21,94$ mg/dl erreicht. Die ähnlichen Ergebnisse für die Vorhersage mit zwei Wellenlängen und die Verwendung des breitbandigen Wellenlängenbereich können darauf zurückgeführt werden, dass der Eiweiß-Hintergrund in den Blutplasma-Proben jeweils gleich war und somit nicht spektral zwischen verschiedenen optisch aktiven Substanzen unterschieden werden musste. Zur detaillierteren Untersuchung sind weitere Messungen erforderlich, wofür jedoch deutlich mehr Proben von verschiedenen Spendern benötigt werden. Hierzu müsste im Rahmen einer größeren Messreihe unterschiedlichen Probanden Blut entnommen werden, was jedoch über die für das aktuelle Projekt von der Ethikkommission der TH Lübeck und der Universität zu Lübeck genehmigten Messungen hinausgeht, siehe Abbildung 103 und 104. Um einen Eindruck von der Qualität der Vorhersage mittels breitbandigem Wellenlängenbereich von 380 – 640 nm zu erhalten, wurden die Ergebnisse aus Abbildung 79 in das Clarke's Error Grid übertragen, siehe Abschnitt 1.2. Dies ermöglicht eine Abwägung, inwiefern eine für den klinischen Gebrauch verlässliche Vorhersage der jeweiligen Konzentrationen möglich ist. Die Ergebnisse sind in Abbildung 80 zu finden.

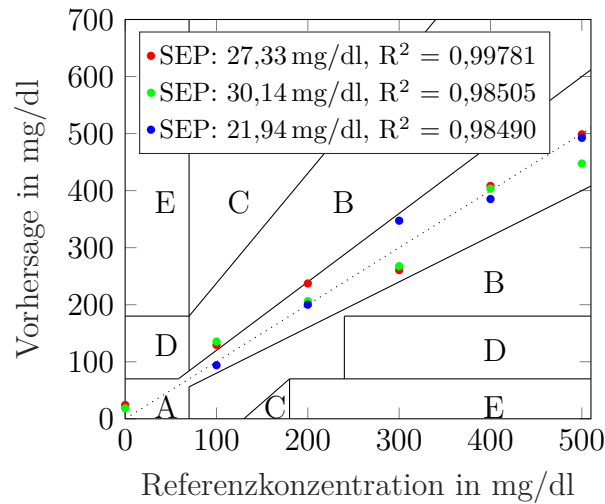


Abbildung 80: Glucose-Vorhersage in dotiertem Blutplasma im Wellenlängenbereich 380–640 nm im Clarke's Error Grid.

Von den 18 Werten des Validierungsdatensatzes liegen 16 im Bereich *A* und zwei in *B*. Da Felder mit fortlaufender alphabetischer Reihenfolge zunehmend kritischere Auswirkungen auf die abgeleitete Diagnostik und damit auf die Gesundheit des Patienten darstellt, ist es wünschenswert, wenn sämtliche Punkte in *A* lägen. Zwei Punkte in der Kategorie *B* können jedoch als tolerierbar angesehen werden, da hier davon auszugehen ist, dass es trotz der erhöhten Messungenauigkeit zu keiner Patientengefährdung kommt. Eine spätere Fehldiagnose bei einem Patienten, die zu einem Punkt im Bereich von *E* führt, könnte hingegen unter Umständen äußerst gravierende, in Extremfällen auch tödliche Konsequenzen haben, da eine Hyperglykämie nicht erkannt, oder bei einer Unterzuckerung unsinnige Maßnahmen zur weiteren Senkung des Blutzuckerspiegels getroffen werden könnten. Die erreichten Ergebnisse liegen jedoch von einem solchen fatalen Szenario weit entfernt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es trotz der hohen Absorption durch die Bluteiweiße und trotz der Streueffekte durch die Probe möglich ist, die Glucose-Konzentration in Blutplasma in klinischer Genauigkeit vorherzusagen. Möglich wird dies einerseits durch die Verwendung des Kompensationsverhältnisses $\frac{I(\omega)}{I(2\omega)}$, mit dem diese Störeinflüsse wie in vorherigen Kapiteln gezeigt auf ein Minimum reduziert werden. Andererseits kann durch die breitbandige Messung und Auswertung mittels PLS-Regression eine Unterscheidung zwischen Glucose und den verbleibenden Störeinflüssen geleistet werden, was die Vorhersagegenauigkeit weiter verbessert.

5 Zusammenfassung, Diskussion und Ausblick

In diesem Kapitel erfolgt eine Zusammenfassung der Arbeit sowie eine Bewertung der Ergebnisse in Bezug auf die Zielsetzung und eine Einordnung in den wissenschaftlichen Kontext anderer Arbeiten sowie den Stand der Wissenschaft. Schließlich folgt ein Ausblick auf weitere mögliche Forschungsarbeiten und die klinische Relevanz der Erkenntnisse.

5.1 Zusammenfassung

Seit vielen Jahren steigt der Bedarf an alternativen Verfahren zur konventionellen enzymatischen Glucose-Bestimmung im menschlichen Körper. Dabei stellen optische Messverfahren einen vielversprechenden Ansatz dar. Über die auf diesem Gebiet, insbesondere in der Absorptionsspektroskopie und der Polarimetrie gemachten Fortschritte wurde in der wissenschaftlichen Literatur bereits berichtet, wobei jedoch jedes dieser Verfahren für sich individuelle Vor- und Nachteile aufweist: In der Absorptionsspektroskopie war es dank der spektralen Auflösung möglich, mittels multivariater Datenanalyse zwischen verschiedenen Inhaltsstoffen zu unterscheiden. Dabei schränken jedoch die vergleichsweise geringe Absorption sowie die physikalisch bedingt niedrige Sensitivität der Messtechnik und der hohe Absorptionshintergrund des Wassers als Hauptbestandteil der Proben die Messbarkeit von Glucose im Blut stark ein. Die Polarimetrie dagegen eignet sich zwar aufgrund ihres hohen Wirkungsquerschnitts, der im sichtbaren Wellenlängenbereich hohen Sensitivität der Messtechnik und des vernachlässigbaren Einflusses der Wasserabsorption besonders zur Bestimmung von Glucose. Jedoch hat die üblicherweise monochromatisch durchgeführte Polarimetrie mit der Überlagerung der Dreheinflüsse von Glucose und Bluteiweißen sowie Depolarisations- und Absorptionseffekten zu kämpfen.

Ziel dieser Dissertation war es daher, beide Verfahren miteinander zu kombinieren und so die jeweiligen Vorteile zu nutzen und die Nachteile zu eliminieren. Hierzu wurde das in Abschnitt 3.1 beschriebene Breitbandpolarimeter entwickelt, um die technisch bedingte hohe Messempfindlichkeit im Bezug auf die Rotationsdispersionen der optisch aktiven Moleküle im sichtbaren Wellenlängenbereich mit der hohen Konzentrationsauflösung für Glucose bei gleichzeitig vernachlässigbarem Störeinfluss durch Wasserabsorptionen zu verbinden. Bei der Entwicklung des Messaufbaus wurden zunächst die einzelnen Bauteile hinsichtlich ihrer Eigenschaften verglichen und die optimale Auswahl getroffen.

Es folgte eine Untersuchung der potentiellen Störeinflüsse, wie Temperatur- und pH-Wert der Probe, Ungenauigkeiten in der Probenanmischung oder Intensitätsschwankungen der Lichtquelle oder Probenabsorption beziehungsweise Streueffekte der Probe. In diesem Zusammenhang wurde gezeigt, dass der Einfluss der absoluten Lichtintensität auf zwei Frequenzanteile des Messsignals identisch ist, jedoch nur einer dieser beiden Anteile von der Probendrehung abhängig ist. Hierauf aufbauend wurde ein Verfahren entwickelt, dass es durch Bildung des Intensitätsverhältnisses ermöglicht, die Einflüsse schwankender Lichtintensität durch Probenabsorption, Streueffekte oder die Lichtquelle selbst zu kompensieren. In diesem Zusammenhang wurde gezeigt, dass die Genauigkeit bei der Bestimmung von Glucose selbst bei stark schwankender Lichtintensität signifikant gesteigert werden konnte und unabhängig von der Störung eine Vorhersagegenauigkeit von etwa ± 1 mg/dl erreicht wurde.

Um die spektrale Überlagerung der Rotationsdispersionen zu untersuchen, wurden Stoffgemische aus Glucose und Albumin als Hauptblutprotein erzeugt, gemessen und mittels PLS-Regression evaluiert. Hierbei wurde gezeigt, dass eine spektrale Unterscheidung von

Glucose und Albumin möglich ist und demonstriert, dass eine Glucose-Bestimmung auch in Anwesenheit von 0 – 1000 mg/dl Albumin möglich ist, was der zehnfachen der bisher untersuchten Konzentration entspricht [7, 46]. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass sich die Vorhersage-Genauigkeit durch Verwendung des breitbandigen Wellenlängenbereichs von 380 – 680 nm im Vergleich zu herkömmlichen Zwei-Wellenlängen-Systemen um etwa den Faktor 10 verbessern lässt.

Um einen Bezug zu menschlichen Proben herzustellen, wurden in einem letzten Schritt humane Blutplasmaproben mit Glucose versetzt und auch hier Konzentrationsbestimmungen durchgeführt. Dabei wurde nachgewiesen, dass auch in solchen Proben eine Bestimmung der Glucose-Konzentration möglich ist.

5.2 Diskussion

Messaufbau

Die Anforderung an die Lichtquelle bestand darin, ein breitbandiges und kontinuierliches Spektrum bereitzustellen, um eine optimale Ausnutzung des Dynamikbereichs des Detektors zu gewährleisten. Mit der LDLS wurde eine neuartige Lichtquelle verwendet, die im Vergleich zu herkömmlichen Xenon-Lampen ein spektral glatteres Spektrum aufweist. Darüber hinaus lässt sich durch ihre hohe Energiedichte und die kleine Emissionsfläche eine gute Kollimation erreichen, was bei Polarisationsmessungen vorteilhaft ist.

Da die mit der Lichtquelle erzielbare Strahldivergenz jedoch nicht an die eines Lasers heranreicht, war ein hierfür unempfindlicheres Filter erforderlich. Durch den Einsatz von Glan-Thompson Filtern wurde neben einem hohen FOV auch eine gute Transmission über einen weiten Wellenlängenbereich ab 350 nm erreicht.

Zu Verbesserung der Signalqualität wurde ein Faraday-Rotator in den Messaufbau integriert, um das optische Signal zu modulieren und so zwischen Messsignal und Störquellen zu unterscheiden (siehe Abschnitt 3.1.3). Für den Faraday-Rotator wurde mit SF6 ein optisches Glas gewählt, was einerseits durch seine hohe Verdet-Konstante eine große Signalamplitude ermöglicht und andererseits eine besonders zum UV-Bereich hin hohe Transmission aufweist, was im Vergleich zu dem in der Literatur oft verwendeten TGG [34, 49, 50, 157, 272] eine deutlich günstigere Absorptionscharakteristik zur Folge hat. Dennoch schränkt das SF6-Glas den Wellenlängenbereich auf oberhalb von 380 nm ein.

Um eine möglichst konstante Modulationstiefe des Faraday-Rotators zu erreichen, wurde für den Betrieb der Spule eine passende Treiberschaltung entworfen. Da in der Literatur keine Angaben über den Fehlerbeitrag der Modulationstiefe des Faraday-Rotators zur Glucose-Bestimmungsgenauigkeit gefunden werden konnten, erfolgte eine eigene Untersuchung. Dabei zeigte sich, dass die Stromamplitude von etwa $2 A_{pp}$ über die Zeitdauer eines Tages einer Schwankung von lediglich etwa $\pm 100 \mu A$ unterliegt, was etwa $\pm 0,01 \%$ entspricht. Bezogen auf eine Probenkonzentration von 500 mg/dl bedeutet dies eine Abweichung von lediglich $\pm 0,05$ mg/dl. Die Schwankung des Offsetstroms kann mit unter 1 mA genauso vernachlässigt werden, wie die Frequenzstabilität des Funktionsgenerators zur Erzeugung des Referenzsignals mit $\pm 10 \frac{ppm}{90 \text{ Tage}}$ oder der Temperatureinfluss auf die Verdet-Konstante, der für optische Gläser wie z.B. SF57 bei $\pm 10^{-6} \frac{1}{K}$ liegt [281]. Zusammenfassend kann davon ausgegangen werden, dass die Modulationstiefe des Faraday-Rotators äußerst stabil und ihre Schwankung als Störeinfluss auf die Bestimmungsgenauigkeit vernachlässigbar ist.

Um die Frequenzanteile des Signals optimal wellenlängenaufgelöst zu erfassen, war eine präzise zeitliche Zuordnung der Spektren des Spektrometers nötig. Ermöglicht wurde dies

durch ein Avantes ULS2048-EVO Spektrometer, mit dem sich die Spektren mit korrektem Zeitstempel und einer Auflösung von $10\ \mu\text{s}$ ohne Datenverluste abspeichern lassen. Nach der Messung eines Zeitintervalls von 2 s beziehungsweise 1000 Spektren wurden diese Signale mit einem eigens auf den Messaufbau angepassten Programm auf den Auswertepc übertragen. Dabei wurden per Fouriertransformation für jede Wellenlänge die aus dem zeitlich modulierten Intensitätssignal entstandenen Frequenzanteile $I(DC)$, $I(\omega)$ und $I(2\omega)$ bestimmt.

Um die Bestimmbarkeit von Glucose in Anwesenheit von bestimmten Störstoffen untersuchen zu können, wurde ein aus drei Präzisions-Spritzenpumpen (NeMESYS, Cetoni GmbH, Deutschland) bestehendes System zur Probenmischung verwendet, das mit drei Glas-spritzen (ILS GmbH, Deutschland) ausgestattet wurde und die jeweiligen Konzentrationsmischungen aus Stammlösungen erstellt. Ein ähnliches System wurde bereits erfolgreich in der Literatur für Langzeitmessungen eingesetzt [34]. Die Evaluation dieses Systems erbrachte eine Genauigkeit von etwa $-0,3\%$ und eine Präzision von circa $0,05\%$. Da eine möglichst hohe Dosiergenauigkeit zwingende Voraussetzung für die Erzeugung präziser Referenzkonzentrationen ist, wurde der gesamte Aufbau in einem geschlossenen Gehäuse untergebracht und temperiert.

Im Zuge der Charakterisierung der Störeinflüsse auf das Messsignal erfolgte zunächst in Abschnitt 3.4.1 eine Abschätzung des Temperatureinflusses auf den Polarisationsfilterhalter und somit eine potentielle Verstimmung der beiden Polarisationsfilter zueinander. Dieser Einfluss stellte sich dank der auf $\pm 0,1\ \text{K}$ geregelten Umgebungstemperatur als äußerst gering dar.

In Abschnitt 3.4.2.2 und 3.4.2.3 folgte dann eine Messung der Rotationsdispersionen von Glucose und Albumin als häufigstem Blutprotein während pH-Wert und Temperatur gezielt verändert wurden. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Rotationsdispersionen sowohl qualitativ als auch quantitativ mit den Literaturwerten [22, 23, 29] übereinstimmen und die Abweichungen im niedrigen einstelligen Prozentbereich liegen. Auch konnte gezeigt werden, dass sich der Einfluss von Temperatur und pH-Wert in vernachlässigbarem Ausmaß halten, was die Angaben der Literatur bestätigt [29, 155, 190].

Kompensation von Intensitätsschwankungen

Trotz Stabilisierung der Umgebungsparameter sind Schwankungen der absoluten Lichtintensität nicht gänzlich auszuschließen. Diese kann durch Variationen in der Lichtquellenintensität selbst, auftretende Probenabsorptionen oder Streueffekte innerhalb der Probe hervorgerufen werden. Aus diesem Grund wurde eine Methode benötigt, um diese Einflüsse zu reduzieren. In anderen Arbeitsgruppen wurde zu diesem Zweck meist ein closed-loop System verwendet, bei dem in den Faraday-Rotator ein Offsetstrom eingebracht wird, der die Drehung durch die Probe gerade kompensiert [34, 46, 50, 147, 149, 152, 153, 153, 249, 261, 273]. Der dazu nötige Strom wurde dann zur Konzentrationsbestimmung verwendet. Da spektral jedoch beim Breitbandpolarimeter alle Wellenlängen separat abgetastet werden müssten, konnte dieses Verfahren nicht verwendet werden.

Bei der Herleitung der zeitlich modulierten Spektrometerintensität konnte jedoch in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Frequenzanteile $I(\omega)$ und $I(2\omega)$ in gleichem Maße von der absoluten Lichtintensität beeinflusst werden, wobei jedoch nur $I(\omega)$ linear von der optischen Aktivität der Probe abhängt, $I(2\omega)$ hingegen unabhängig ist [1]. Daher wurde in dieser Arbeit in Abschnitt 2.2.3 das Intensitätsverhältnis $\frac{I(\omega)}{I(2\omega)}$ zur Kompensation von intensitätsbeeinflussenden Störfaktoren vorgeschlagen, während konventionell in anderen Ansätzen nur mit $I(\omega)$ gearbeitet wird [34, 49, 50, 145, 147–154, 181, 249, 270–272]. Eine

experimentelle Untersuchung des Einflusses schwankender Lichtquellenintensität, auftretender Probenabsorption oder variierender Streuung innerhalb der Probe auf die Frequenzanteile $I(\omega)$ und $I(2\omega)$ erfolgte in Abschnitt 4.1. Zum besseren Verständnis wurde dabei zunächst auf ein monochromatisches System zurückgegriffen, das einzig die absoluten Intensitäten berücksichtigt. Hierbei zeigte sich bereits sehr deutlich, dass der Einfluss der Theorie entsprechend identisch ist und das Verhältnis $\frac{I(\omega)}{I(2\omega)}$ konstant bleibt. Auch konnte die gleiche relative Abhängigkeit von der optischen Aktivität der Probe von $\frac{I(\omega)}{I(2\omega)}$ und $I(\omega)$ beobachtet werden.

Zur Charakterisierung des Systems wurde eine Konzentrationsbestimmung für Glucose zunächst ohne Störstoffe mittels Linearer Regression durchgeführt. Dabei wurden mit $\pm 1,05$ mg/dl für $I(\omega)$ beziehungsweise $\pm 0,92$ mg/dl für $\frac{I(\omega)}{I(2\omega)}$ sehr geringe Abweichungen erreicht. Dies ist etwa um den Faktor fünf präziser als die in der Literatur erreichte Genauigkeit von $\pm 5,4$ mg/dl bei einem ähnlichen Messaufbau und ähnlichem Konzentrationsbereich [34]. Wurde die Lichtintensität um $\pm 10\%$ während der Messung verändert, stieg der Fehler auf $\pm 16,16$ mg/dl für das unkompenzierte $I(\omega)$ -Signal an, während er bei Verwendung bei $\frac{I(\omega)}{I(2\omega)}$ auf ± 1 mg/dl begrenzt blieb. Ein ähnliches Verhalten wurde beobachtet, als die Glucose-Lösungen mit Allura Red AC Farbstoff dotiert wurden. Dort konnte mittels kompensiertem Signal die Vorhersagegenauigkeit von $\pm 15,69$ mg/dl auf $\pm 1,23$ mg/dl verbessert werden. Auch bei Variation des Streukoeffizienten im Bereich von $0,225 - 0,275 \text{ cm}^{-1}$ wurde eine Verbesserung der Abweichung von $\pm 35,7$ mg/dl auf $\pm 1,17$ mg/dl erreicht. Hierbei wurde mit einem ähnlichen Verhältnis von Glucose-Konzentration zu Streukoeffizient wie bei anderen Arbeitsgruppen gearbeitet [158, 159, 163], jedoch mit variierender Streuung. Diese bereits veröffentlichten Ergebnisse zeigen, dass es durch Division der Frequenzanteile $I(\omega)$ und $I(2\omega)$ möglich ist, bei vorhandener Restpolarisation nahezu unabhängig von Intensitätsschwankungen der Lichtquelle, schwankender Probenabsorption oder variierendem Streukoeffizienten zu messen und so die Robustheit und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse erheblich zu verbessern [1]. Für dieses Verfahren werden weder zusätzliche Hardware etwa für einen Referenzpfad noch zusätzliche Messzeit für eventuelle Referenzmessungen benötigt.

Es folgte eine Wiederholung dieser Messreihen mit im Wellenlängenbereich $380 - 680$ nm und anschließender Auswertung mittels PLS-Regression. Bei reinen Glucose-Lösungen ohne zusätzliche Störeinflüsse wurden analog zur monochromatischen Bestimmung $1 - 2$ mg/dl für $I(\omega)$ und $\frac{I(\omega)}{I(2\omega)}$ erreicht. Wurde die Lichtintensität um $\pm 10\%$ variiert, so stieg der Fehler auf $\pm 5,36$ mg/dl für $I(\omega)$ beziehungsweise $\pm 2,18$ mg/dl für $\frac{I(\omega)}{I(2\omega)}$ an. Auffällig dabei ist, dass die PLS-Analyse der breitbandigen Daten auch bei $I(\omega)$ in der Lage ist, zwischen Glucose und Störung zu unterscheiden. Die besten Ergebnisse wurden jedoch für $\frac{I(\omega)}{I(2\omega)}$ erreicht. Ähnliche Resultate zeigen sich auch bei der Störung durch variierende Absorption mit $\pm 3,13$ mg/dl beziehungsweise $\pm 1,67$ mg/dl und für Streueffekte mit $\pm 4,09$ mg/dl beziehungsweise $\pm 3,05$ mg/dl. In diesem Zusammenhang konnte auch gezeigt werden, dass es möglich ist, mit dem von der optischen Aktivität unabhängigen $I(2\omega)$ Anteil die Absorption des Allura Red Farbstoffs zu messen und simultan seine Konzentration vorherzusagen.

Spektrale Überlagerung optisch aktiver Substanzen

Als letzter großer Störeinfluss blieb die spektrale Überlagerung der Rotationsdispersionen von Glucose und den Bluteiweißen zu untersuchen. Da Albumin mehr als die Hälfte der Bluteiweiße ausmacht [7, 28], wurde es zunächst stellvertretend für die Blutproteine verwendet, um die Überlagerung zu demonstrieren. Zur Evaluation der besonders kritischen Schwankung der Albumin Konzentration wurden mit 0 – 250 mg/dl, 0 – 500 mg/dl und 0 – 1000 mg/dl drei Bereiche gewählt, die etwa 25 %, 50 % beziehungsweise 100 % der physiologischen Variation entsprechen [22]. Dabei wurden mit $\pm 4,78$ mg/dl, $\pm 5,73$ mg/dl beziehungsweise $\pm 16,01$ mg/dl Genauigkeiten erreicht, die etwa um den Faktor zehn besser sind als die in der Literatur für ein Zwei-Wellenlängen System mit 532 nm und 635 nm berichteten Ergebnisse und sogar um den Faktor 20 besser als mit einem monochromatischen 532 nm Ansatz. Selbst für den höchsten Konzentrationsbereich mit 0 – 1000 mg/dl wurden bessere Genauigkeiten erreicht als die ± 20 mg/dl, von denen in der Literatur mit einem Zwei-Wellenlängensystem mit 532 nm und 635 nm bei lediglich 0 – 100 mg/dl Albumin berichtet wurde [46].

Bei einer Einordnung der Vorhersagewerte in das Clarke's Error Grid zeigte sich, dass 35 der 36 Werte im Bereich *A* und einer in *B* liegt, was für eine klinische Anwendung als ausreichend genau angesehen werden kann. Es bestätigt dabei auch die These, nach der ein multispektrales System in der Lage sein sollte, zwischen verschiedenen optisch aktiven Substanzen zu unterscheiden [112, 150, 190]. Auch diese Ergebnisse wurden bereits veröffentlicht [2]. Ermöglicht wurde die präzise Vorhersage durch Verwendung des Kompensationsverhältnisses $\frac{I(\omega)}{I(2\omega)}$, das Probenabsorption, Schwankungen der Lichtquellenintensität sowie leichte Streueffekte kompensiert. Ohne die Kompensation wurden mit $I(\omega)$ alleine etwa um den Faktor fünf erhöhte Fehler gemessen.

Gleichzeitig war es aber auch möglich, aus den gleichen Datensätzen die Albumin-Konzentration anhand der Rotationsdispersion mittels $\frac{I(\omega)}{I(2\omega)}$ mit $\pm 2,68$ mg/dl, $\pm 6,5$ mg/dl beziehungsweise $\pm 11,96$ mg/dl für 0 – 250 mg/dl, 0 – 500 mg/dl beziehungsweise 0 – 1000 mg/dl vorherzusagen. Ebenso war eine Bestimmung anhand der Absorption aus $\log(I(2\omega))$ möglich, wenn auch bei etwa um den Faktor drei höheren Abweichungen.

Die Bestimmbarkeit der Albumin-Konzentration anhand der Absorption machte es möglich, für ein monochromatisches System die Albumin-Werte über $\log(I(2\omega))$ vorherzusagen und diese zur Korrektur der überlagerten Rotationsdispersion durch $\frac{I(\omega)}{I(2\omega)}$ zu nutzen. Dabei stellte sich heraus, dass die Vorhersagegenauigkeit bei breitbandiger Auswertung beziehungsweise Verrechnung der Daten deutlich verbessert werden kann, die Effizienz dieser Methode jedoch maßgeblich an der Bestimmungsgenauigkeit des Albumins über die Absorption hängt. Da $I(2\omega)$ allerdings unkompensiert ist, haben zahlreiche Störfaktoren einen großen Einfluss. Insbesondere für den monochromatischen Fall, bei dem spektral nicht zwischen konzentrationsbedingter Absorption und Intensitätsschwankungen unterschieden werden kann, führen die Intensitätsschwankungen dazu, dass keine zuverlässige Absorption mehr gemessen werden kann. Folglich ist dieses Verfahren für monochromatische Konzentrationsbestimmung ungeeignet.

Neben Bluteiweiß wurden auch Gemische aus Glucose und Laktat untersucht, bei denen analog zu den vorangegangenen Messungen die beiden Konzentrationen variiert wurden. Bei einer Variation der Laktat-Konzentration im Bereich 0 – 250 mg/dl wurde mit breitbandiger Evaluation der Messdaten eine Abweichung von $\pm 25,88$ mg/dl erreicht, was jedoch keine Verbesserung zu einem Zwei-Wellenlängen-System darstellt. Dies ist zum einen darauf zurückzuführen, dass es aufgrund der geringen Rotationsdispersion des Laktat zu einem geringen Signalbeitrag kommt und sich zum anderen die Rotationsdispersionen von

Glucose und Laktat aufgrund ihrer Zentralwellenlängen stärker als die von z.B. Glucose und Albumin ähneln [22, 23, 202]. Da der physiologisch relevante Laktat-Bereich jedoch normalerweise etwa um den Faktor zehn unterhalb des hier untersuchten maximal möglichen liegt, kann von einem vernachlässigbaren Einfluss ausgegangen werden, was die Literatur bestätigt [7]. Von anderen Stoffen wie Ascorbinsäure wird ebenfalls davon ausgegangen, dass der Einfluss auf die gemessene Rotationsdispersion vernachlässigbar ist [7].

Glucose-Bestimmung in Blutplasma

In Abschnitt 4.3 wurde schließlich untersucht, inwieweit die bisher gewonnen Erkenntnisse in Bezug auf die Stabilität des Messaufbaus sowie spektrale Unterscheidbarkeit von Glucose und anderen Blutinhaltsstoffen auf humane Proben anwendbar sind. Da die Blutproben wesentlich mehr Inhaltsstoffe als die bisher untersuchten Stoffgemische aufweisen, blieb zunächst die Frage zu klären, ob bei Humanproben aufgrund potentieller Absorption und Streueffekten ein ausreichend hohes Intensitätssignal verbleibt. Dabei haben nicht nur der Absorptionskoeffizient, sondern auch der Streukoeffizient, der mit etwa 1 cm^{-1} [288] angegeben wird, einen maßgeblichen Einfluss auf die Transmission. Zur Untersuchung wurden zunächst Blutproben zentrifugiert und das Blutplasma entnommen. Dies wurde anschließend hinsichtlich seiner Transmission vermessen. Dabei zeigte sich, dass es insbesondere unterhalb von etwa 500 nm zu einem sehr starken Abfall der Signalanteile $I(\omega)$ und $I(2\omega)$ kam, die für eine spätere Konzentrationsbestimmung essentiell sind. Dies deckt sich mit den Angaben aus der Literatur [288]. Hierdurch wäre der effektiv nutzbare Wellenlängenbereich auf oberhalb von 500 nm beschränkt worden. Konzentrationsbestimmungen mit dieser Messkonfiguration erschienen somit nicht sinnvoll.

Da bei den bisherigen Messungen ohne nennenswerte Absorption und Streuung zugunsten der Sensitivität eine Pfadlänge von 50 mm verwendet wurde, stellte sich die Frage, ob durch eine Reduktion der Pfadlänge eine ausreichende Transmission für Blutplasma erreicht werden kann. Hierzu wurde aus der bei 50 mm ermittelten Transmission der aus Absorptionskoeffizient und Streukoeffizient bestehende Abschwächungskoeffizient bestimmt. Aus diesem Wert wurde dann rechnerisch die Transmission für verschiedene Pfadlängen ermittelt, wobei sich ein Wert von 10 mm als geeignet herausstellte und die Küvette entsprechend angepasst wurde. Bei erneuter Messung der Transmission einer Blutprobe mit der reduzierten Pfadlänge konnte dann gezeigt werden, dass der bisher genutzte Wellenlängenbereich von 380 – 680 nm beibehalten werden kann.

Mit der reduzierten Pfadlänge erfolgte dann eine erneute Evaluation der Vorhersagegenauigkeiten mit Glucose und Albumin, analog zu Abschnitt 4.2.1. Dabei zeigte sich, dass breitbandig mit $\pm 14,75 \text{ mg/dl}$ ähnliche Ergebnisse wie mit 50 mm Pfadlänge erreicht werden konnten, was zeigt, dass der Messaufbau auch unter diese Voraussetzungen zuverlässig arbeitet. Ein weiterer Vorteil, den die reduzierte Pfadlänge mit sich bringt, ist die Verringerung des Küvettenvolumens von 5,6 ml auf etwa 1,1 ml, was für eine spätere klinische Anwendung sehr von Vorteil ist.

Mit der optimierten Messkonfiguration wurden im letzten Schritt drei Konzentrationsbestimmungen für Glucose in humanem Blutplasma durchgeführt. Dazu wurden dem Blutplasma verworfener Blutspenden Glucose-Konzentrationen von 0, 100, ..., 500 mg/dl zugesetzt, gemessen und anschließend analog zu den vorangegangenen Messungen evaluiert. Dabei wurden für ein Zwei-Wellenlängen-System Genauigkeiten von $\pm 58,07 \text{ mg/dl}$, $\pm 21,94 \text{ mg/dl}$ bzw. $\pm 33,98 \text{ mg/dl}$ erreicht. Diese Vorhersage ließ sich mit breitbandigen Daten im für die Transmission auf 380 – 640 nm angepassten Wellenlängenbereich leicht auf $\pm 27,44 \text{ mg/dl}$, $\pm 30,14 \text{ mg/dl}$ bzw. $\pm 21,94 \text{ mg/dl}$ verbessern. Bei einer Einordnung

dieser Werte in das Clarke's Error Grid konnte gezeigt werden, dass von den 18 vorhergesagten Konzentrationen 16 im Bereich von A und zwei im Feld b liegen, was hinsichtlich einer klinischen Akzeptanz als hinreichend genau angesehen werden kann.

Damit wurde nachgewiesen, dass mit dem vorgestellten Messaufbau und Kompensationsverhältnis $\frac{I(\omega)}{I(2\omega)}$ auch in Blutplasma zuverlässig die Rotationsdispersion der Probe gemessen werden kann und eine Unterscheidung von Glucose und anderen optisch aktiven Substanzen möglich ist.

5.3 Abschließende Bewertung

Abschließend lässt sich sagen, dass es in dieser Arbeit gelungen ist, ein Faraday-moduliertes Breitbandpolarimeter zu konstruieren, welches in der Lage ist, die überlagerte Rotationsdispersion verschiedener optisch aktiver Substanzen zu messen. Dabei wurde besonderer Wert auf die Optimierung der einzelnen Bauteile gelegt, und Einflussparameter wie z.B. Umgebungstemperatur oder Faraday-Modulation stabilisiert. Durch eine detaillierte Analyse sämtlicher Störquellen wurde deren jeweiliger Beitrag zu eventuellen Ungenauigkeiten bei der Bestimmung der Glucose-Konzentration untersucht.

Durch Anwendung einer Fouriertransformation anstatt des üblicherweise in der Literatur verwendeten Lock-In-Verstärkers war es möglich, sämtliche Frequenzanteile des Signals zu messen. Im Gegensatz zu anderen Ansätzen wurde in dieser Arbeit nicht nur $I(\omega)$ sondern darüber hinaus $I(2\omega)$ gemessen. Mit der Verwendung des Intensitätsverhältnisses $\frac{I(\omega)}{I(2\omega)}$ wurde damit ein neuartiges Kompensationsverfahren vorgestellt, das im Vergleich zu den sonst aus der Literatur bekannten Ansätzen nicht nur für alle Wellenlängen gleichzeitig funktioniert, sondern auch keine zusätzliche Hardware oder Messzeit für Referenzmessungen benötigt [1]. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass bei vorhandener Restpolarisation unabhängig von absoluter Lichtintensität, schwankender Probenabsorption oder variierenden Streueffekten gemessen werden kann. Dies ermöglicht eine erhebliche Verbesserung der Messgenauigkeit und Robustheit des Messaufbaus.

Um die Untersuchung und Reduktion von Störeinflüssen abzuschließen, wurde die Bestimmungsgenauigkeit von Glucose in Anwesenheit verschiedener Albuminkonzentrationen evaluiert. Es konnte gezeigt werden, dass sich das Messergebnis durch die Verwendung breitbandig gemessener Rotationsdispersionen von 380–680 nm und die Auswertung mittels multivariater Datenanalyse etwa um den Faktor zehn gegenüber in der Literatur beschriebenen Systemen mit zwei Wellenlängen verbessern lässt [7, 46]. Die Vorhersage gegenüber der Verwendung einer einzelnen Wellenlänge von 532 nm wird dabei sogar um den Faktor 20 verbessert. Damit wurde die Vermutung aus der Literatur bestätigt, nach der ein solches System anhand der multispektralen Rotationsdispersion in der Lage sein sollte, zwischen verschiedenen optisch aktiven Substanzen zu unterscheiden [112, 150, 190]. Zudem wurde gezeigt, dass sich aus den gleichen Probengemischen auch Rückschlüsse auf die Albumin-Konzentration ziehen lassen. Dies funktioniert sowohl unter Verwendung der Rotationsdispersionen als auch unter Verwendung der Absorption. Die Korrektur der Rotationsdispersion über mittels Absorption bestimmte Albumin-Konzentration bringt in der Praxis jedoch keinen Vorteil, da das Absorptionssignal zu sehr durch äußere Störeinflüsse wie Streuung beeinflusst wird.

Um die Erkenntnisse über den Einfluss verschiedener Parameter und Einflüsse auf die polarimetrische Bestimmung von Glucose auf einen klinischen Hintergrund zu beziehen, wurden in Abschnitt 4.3 Glucose-Konzentrationsbestimmungen in Blutplasma durchgeführt. Hierbei zeigte sich, dass die bisher verwendete Pfadlänge der Küvette von 50 mm

wegen der hohen Absorption des Blutplasmas und des Streukoeffizienten von 1 cm^{-1} [288] die Transmission insbesondere unterhalb von 500 nm stark einschränkt. Da dieser Wellenlängenbereich, wie in Abschnitt 2.1.2 gezeigt, jedoch für die Identifikation der jeweiligen optisch aktiven Substanzen anhand ihrer Rotationsdispersion besonders wichtig ist, wurde die Pfadlänge von 50 mm auf 10 mm reduziert, was zu einem ausreichenden Signal führte. In Abschnitt 4.3.2 wurden dann dem Blutplasma 0 – 500 mg/dl Glucose zugeführt und eine Konzentrationsbestimmung durchgeführt. Dabei konnte gezeigt werden, dass es trotz zahlreicher Störeinflüsse wie hoher Absorption und starker Streuung der Proben sowie der Überlagerung der Rotationsdispersionen der Bluteiweiße mit denen der Glucose möglich ist, die Glucose-Konzentration in Blutplasma zu bestimmen.

5.4 Ausblick

Die Entwicklung des Kompensationsverfahrens $\frac{I(\omega)}{I(2\omega)}$ zur unabhängigen Messung der Rotationsdispersion in streuenden und absorbierenden Medien sowie die spektrale Unterscheidung von Glucose und Bluteiweiß anhand ihrer Rotationsdispersion eröffnet eine Vielzahl an Möglichkeiten zur Glucose-Bestimmung in der Blutanalytik.

Da, wie in Abschnitt 4.3.2 gezeigt, eine Glucose-Bestimmung in Blutplasma prinzipiell möglich ist, wäre der Einsatz in einem Blutanalysegerät in Kliniken nach Abtrennung der Erythrozyten denkbar. Hierzu bedarf es jedoch noch weiterer Untersuchungen, die Gegenstand eines neuen Forschungsprojektes und Fortführung dieser Thematik sein sollen. Insbesondere ist dabei eine klinische Evaluation mit einer entsprechenden Anzahl Blutproben verschiedener Probanden gemeint, die jedoch über den Rahmen der von der Ethik-Kommission der TH Lübeck sowie der Universität zu Lübeck hinausgehen (siehe Abbildung 103 und 104). Für eine entsprechende klinische Anwendung wäre auch eine Miniaturisierung des Messaufbaus denkbar, wobei ein Ersatz der LDLS durch z.B. eine weiße LED auch eine Kostenreduktion der Hardware zur Folge hätte. Ein Vorteil der hier vorgestellten Methode ist, dass auch leichte Streueffekte des Blutplasmas durch das Intensitätsverhältnis $\frac{I(\omega)}{I(2\omega)}$ kompensiert werden.

Eine Messung an Vollblut ist bei der derzeitigen Konfiguration jedoch nicht möglich, da eine Restpolarisation zur Messung der Frequenzanteile $I(\omega)$ und $I(2\omega)$ nötig ist und der Streukoeffizient von Vollblut um mehrere Größenordnungen über dem der hier gemessenen Werte liegt [21]. Da in anderen Arbeiten bei stark streuenden Medien für polarimetrischen Glucose-Bestimmungen eine Messung der Rückstreuung vorgeschlagen wurde [165], könnte die Effizienz eines solchen Ansatzes für Messungen in Vollblut untersucht werden. Hierfür bedarf es jedoch elementarer Modifikationen des Messaufbaus, die Teil einer fortführenden Arbeit sein können.

Ein Aspekt, der für eine Langzeitverwendung bei einmaliger Kalibration besondere Beachtung finden sollte, ist der Offset des Polarisationsfilters. Zur spektralen Unterscheidung verschiedener Rotationsdispersionen ist es unbedingt erforderlich, dass der eingestellte Offset zwischen Kalibrier- und Validierdaten konstant bleibt beziehungsweise reproduzierbar eingestellt werden kann, da dies sonst eine Identifikation der spezifischen Drehungen negativ beeinflusst.

Ein etwas einfacheres Szenario wäre der Einsatz zur Messung der Glucose-Konzentration in anderen Medien wie z.B. Urin. Hier könnte die Glucose durch das Intensitätsverhältnis $\frac{I(\omega)}{I(2\omega)}$ unabhängig von der Färbung des Urins gemessen werden. Gleichzeitig könnten aber auch eventuell vorhandene Eiweiße anhand ihrer Rotationsdispersion oder der Absorption bestimmt werden.

Eine kostengünstigere, monochromatische Version des Aufbaus wie in Abschnitt 4.1.1.2 könnte z.B. in der Dialyse eingesetzt werden, um die Glucose im Dialysat ohne verbleibende Eiweiße kontinuierlich zu überwachen. Das Kompensationsverhältnis $\frac{I(\omega)}{I(2\omega)}$ kann auch hier für zusätzliche Sicherheit sorgen und die Verwendung sehr einfacher Lichtquellen möglich machen.

Die Erkenntnisse dieser Arbeit müssen sich jedoch nicht zwingend nur auf den medizinischen Bereich beschränken. Ebenfalls denkbar wäre ein Einsatz des Messaufbaus in der Lebensmittelindustrie, bei der z.B. die Glucose-Konzentration in Getränken bei gleichzeitiger Absorption überwacht werden muss. Ohne weitere optisch aktive Substanzen wurde in dieser Arbeit bei variierender Absorption bereits eine Vorhersagegenauigkeit von etwa ± 1 mg/dl demonstriert, obwohl die dabei verwendeten Glucose-Konzentrationen wesentlich geringer als z.B. in Getränken waren.

Abschließend lässt sich sagen, dass durch diese Arbeit Klarheit in viele offene Fragestellungen aus der Polarimetrie gebracht werden konnte und dass sich sowohl die breitbandige Messmethode, als auch das hier entwickelte Kompensationsverfahren für die unabhängige Glucose-Bestimmung in absorbierenden und streuenden Proben als vorteilhaft in Bezug auf die Analysegenauigkeit erweisen. Daraus ergibt sich sowohl für bereits existierende Verfahren als auch für neue Anwendungsfelder ein erhebliches Verbesserungspotential.

Literatur

- [1] C. Stark, R. Behroozian, B. Redmer, F. Fiedler, and S. Müller, “Real-time compensation method for robust polarimetric determination of glucose in turbid media,” *Biomedical Optics Express*, vol. 10, no. 1, pp. 308–321, 2019.
- [2] C. Stark, C. A. C. Arrieta, R. Behroozian, B. Redmer, F. Fiedler, and S. Müller, “Broadband polarimetric glucose determination in protein containing media using characteristic optical rotatory dispersion,” *Biomedical Optics Express*, vol. 10, no. 12, pp. 6340–6350, 2019.
- [3] R. White, D. Yeager, and S. Stavrianeas, “Determination of blood lactate concentration: Reliability and validity of lactate oxidase-based method,” *International Journal of Exercise*, vol. 2, pp. 83–93, 2009.
- [4] J. Bakker, M. W. Nijsten, and T. C. Jansen, “Clinical use of lactate monitoring in critically ill patients,” *Annals of Intensive Care*, vol. 3, no. 1, p. 12, 2013.
- [5] B. Soller, F. Zou, M. D. Prince, M. A. Dubick, and J. L. Sondeen, “Comparison of noninvasive pH and blood lactate as predictors of mortality in a swine hemorrhagic shock with restricted volume resuscitation model,” *Shock*, vol. 44, pp. 90–95, aug 2015.
- [6] S. L. Aronoff, K. Berkowitz, B. Shreiner, and L. Want, “Glucose metabolism and regulation: Beyond insulin and glucagon,” *Diabetes Spectrum*, vol. 17, pp. 183–190, jul 2004.
- [7] Brent D. Cameron, *The Application of Polarized Light to Biomedical Diagnostics*. PhD thesis, Texas A&M University, Texas, 2000.
- [8] G. Cote and R. Ansari, “A noninvasive glucose sensor based on polarimetric measurements through the aqueous humor of the eye,” in *Handbook of Optical Sensing of Glucose in Biological Fluids and Tissues* (Valery V. Tuchin, ed.), ch. 15, pp. 457–485, Taylor & Francis, dec 2008.
- [9] A. C. Guyton, *Human Physiology and Mechanisms of Disease*. W.B.Saunders, 1992.
- [10] American Diabetes Asssocation, “Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus,” *Diabetes Care*, vol. 33, pp. S62–S69, dec 2010.
- [11] R. J. McNichols and G. L. Cote, “Optical glucose sensing in biological fluids: an overview,” *Journal of Biomedical Optics*, vol. 5, no. 1, p. 5, 2000.
- [12] S. M. Masud, *Blutglukose - Sensorik*. PhD thesis, Technische Universität München, Fakultät für Medizin und Fakultät für Elektrotechnik und Informationstechnik, 2012.
- [13] “Standards of medical care in diabetes–2012,” *Diabetes Care*, vol. 35, pp. S11–S63, dec 2011.
- [14] International Diabetes Federation, “IDF Diabetes Atlas,” Tech. Rep. 7th edition, International Diabetes Federation, 2003.

- [15] P. M. Lepper, S. Ott, E. Nuesch, M. von Eynatten, C. Schumann, M. W. Pletz, N. M. Mealing, T. Welte, T. T. Bauer, N. Suttorp, P. Juni, R. Bals, and G. Rohde, "Serum glucose levels for predicting death in patients admitted to hospital for community acquired pneumonia: prospective cohort study," *BMJ*, vol. 344, pp. e3397–e3397, may 2012.
- [16] D. M. Chan, "Global Report on Diabetes," tech. rep., World Health Organization, ISBN 978 92 4 156525 7, 2016.
- [17] International Diabetes Federation, "IDF Diabetes Atlas," Tech. Rep. 2nd edition, International Diabetes Federation, 2015.
- [18] J. Bolinder, E. Hagstrom-Toft, U. Ungerstedt, and P. Arner, "Self-monitoring of blood glucose in type i diabetic patients: Comparison with continuous microdialysis measurements of glucose in subcutaneous adipose tissue during ordinary life conditions," *Diabetes Care*, vol. 20, pp. 64–70, jan 1997.
- [19] L. B. Mohammadi, T. Klotzbücher, S. Sigloch, K. Welzel, M. Göddel, T. R. Pieber, and L. Schaupp, "Clinical performance of a low cost near infrared sensor for continuous glucose monitoring applied with subcutaneous microdialysis," *Biomedical Microdevices*, vol. 17, jul 2015.
- [20] C. Lentner, ed., *Geigy Scientific Tables, Vol. 3: Physical Chemistry Composition of Blood, Hematology Somatometric Data*. Ciba-Geigy, 1985.
- [21] A. Roggan, M. Friebel, K. Doörschel, A. Hahn, and G. Müller, "Optical properties of circulating human blood in the wavelength range 400–2500 nm," *Journal of Biomedical Optics*, vol. 4, no. 1, p. 36, 1999.
- [22] M. F. G. Wood, D. Cote, and I. A. Vitkin, "Combined optical intensity and polarization methodology for analyte concentration determination in simulated optically clear and turbid biological media," *Journal of Biomedical Optics*, vol. 13, no. 4, p. 044037, 2008.
- [23] M. F. G. Wood, A. Rohani, R. Ghazalah, I. A. Vitkin, and R. Pawluczyk, "Multivariate analysis methods for spectroscopic blood analysis," in *Biomedical Vibrational Spectroscopy V: Advances in Research and Industry* (A. Mahadevan-Jansen and W. Petrich, eds.), vol. 8219, SPIE, feb 2012.
- [24] Philipp Claar, *Die Entwicklung eines halbwertszeitverlängerten Albumins*. PhD thesis, Philipps-Universität Marburg, 2011.
- [25] C. Petibois, G. Cazorla, A. Cassaigne, and G. Deleris, "Plasma protein contents determined by fourier-transform infrared spectrometry," *Clinical Chemistry*, vol. 47, no. 4, pp. 730–738, 2001.
- [26] D. LaFrance, *Near Infrared Determination of Lactate in Biological Fluids and Tissues*. PhD thesis, McGill University, 2003.
- [27] R. A. Shaw and H. H. Mantsch, *Infrared Spectroscopy In Clinical And Diagnostic Anylsis*, ch. Infrared Spectroscopy in Clinical and Diagnostic Analysis, pp. 1–20. John Wiley & Sons Ltd, Chichester, 2010.

- [28] R. S. Tirumalai, K. C. Chan, D. A. Prieto, H. J. Issaq, T. P. Conrads, and T. D. Veenstra, "Characterization of the low molecular weight human serum proteome," *Molecular & Cellular Proteomics*, vol. 2, pp. 1096–1103, aug 2003.
- [29] B. Jirgensons, "Optical Rotatory Dispersion of Proteins and Other Macromolecules," *Science*, vol. 168, pp. 962–962, may 1969.
- [30] K. Tonyushkina and J. H. Nichols, "Glucose meters: A review of technical challenges to obtaining accurate results," *Journal of Diabetes Science and Technology*, vol. 3, pp. 971–980, jul 2009.
- [31] G. Freckmann, S. Pleus, M. Grady, S. Setford, and B. Levy, "Measures of accuracy for continuous glucose monitoring and blood glucose monitoring devices," *Journal of Diabetes Science and Technology*, vol. 13, pp. 575–583, nov 2018.
- [32] G. Freckmann, A. Baumstark, N. Jendrike, D. Rittmeyer, S. Pleus, and C. Haug, "Accuracy evaluation of four blood glucose monitoring systems in the hands of intended users and trained personnel based on ISO 15197 requirements," *Diabetes Technology & Therapeutics*, vol. 19, pp. 246–254, apr 2017.
- [33] W. L. Clarke, "The original clarke error grid analysis (EGA)," *Diabetes Technology & Therapeutics*, vol. 7, pp. 776–779, oct 2005.
- [34] B. W. Clarke and B. D. Cameron, "The development of an integrated faraday modulator and compensator for continuous polarimetric glucose monitoring," in *Optical Diagnostics and Sensing XIII: Toward Point-of-Care Diagnostics* (G. L. Coté, ed.), vol. 8591, pp. 1–11, SPIE, feb 2013.
- [35] N. S. Oliver, C. Toumazou, A. E. G. Cass, and D. G. Johnston, "Glucose sensors: a review of current and emerging technology," *Diabetic Medicine*, vol. 26, pp. 197–210, mar 2009.
- [36] I. M. Wentholt, J. B. Hoekstra, and J. H. DeVries, "A critical appraisal of the continuous glucose-error grid analysis," *Diabetes Care*, vol. 29, pp. 1805–1811, jul 2006.
- [37] D. C. Klonoff, C. Lias, R. Vigersky, W. Clarke, J. L. Parkes, D. B. Sacks, M. S. Kirkman, B. Kovatchev, L. Aurand, C. Benson, P. Bernhardt, L. Blonde, M. Bretton, B. Buckingham, A. Cariski, S. Colburn, F. Flacke, B. Harrison, C. Herman, R. Hinzmann, D. Johnson-Lyles, S. A. Karinka, L. Landree, T. Lebinger, S. Lee, J. Mastrototaro, T. Peyser, S. Phillips, A. Pinkos, D. Price, S. Scott, K. Serrano, and D. Simmons, "The surveillance error grid," *Journal of Diabetes Science and Technology*, vol. 8, pp. 658–672, jun 2014.
- [38] R. Matri, E. Varlera, R. M. Segura, J. Alegre, J. M. Surinach, and C. Pascual, "Determination of d-lactate by enzymatic methods in biological fluids: a study of interferences," *Clinical Chemistry*, vol. 43, no. 6, pp. 1010–1015, 1997.
- [39] J. D. Newman and A. P. Turner, "Home blood glucose biosensors: a commercial perspective," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 20, pp. 2435–2453, jun 2005.
- [40] K. H. Hazen, M. A. Arnold, and G. W. Small, "Measurement of glucose and other

- analytes in undiluted human serum with near-infrared transmission spectroscopy,” *Analytica Chimica Acta*, vol. 371, pp. 255–267, oct 1998.
- [41] Kevin H. Hazen, Mark A. Arnold, Gary W. Small, “Measurement Of Glucose in Water with First-Overtone Near-Infrared Spectra,” *Applied Spectroscopy*, vol. 52, no. 12, pp. 1597–1605, 1998.
- [42] S. Malin, T. Rutchi, T. B. Blank, S. N. Tennadil, and S. L. Monfre, “Noninvasive prediction of glucose by near-infrared diffuse reflectance spectroscopy,” *Clinical Chemistry*, vol. 45, no. 9, pp. 1651–1659, 1999.
- [43] J. J. Burmeister, M. A. Arnold, and G. W. Small, “Noninvasive blood glucose measurements by near-infrared transmission spectroscopy across human tongues,” *Diabetes Technology & Therapeutics*, vol. 2, pp. 5–16, may 2000.
- [44] M. Rhiel, M. B. Cohen, D. W. Murhammer, and M. A. Arnold, “Nondestructive near-infrared spectroscopic measurement of multiple analytes in undiluted samples of serum-based cell culture media,” *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 77, pp. 73–82, dec 2001.
- [45] K. E. Kramer and G. W. Small, “Robust absorbance computations in the analysis of glucose by near-infrared spectroscopy,” *Vibrational Spectroscopy*, vol. 43, pp. 440–446, mar 2007.
- [46] B. D. Cameron, J. S. Baba, and G. L. Cote, “Optical polarimetry applied to the development of a noninvasive in-vivo glucose monitor,” in *Optical Diagnostics of Biological Fluids V* (A. V. Priezzhev and T. Asakura, eds.), vol. 66, pp. 66–77, SPIE, may 2000.
- [47] B. Dremel, S.-Y. Li, and R. Schmid, “On-line determination of glucose and lactate concentrations in animal cell culture based on fibre optic detection of oxygen in flow-injection analysis,” *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 7, pp. 133–139, jan 1992.
- [48] M. R. Riley, M. Rhiel, X. Zhou, M. A. Arnold, and D. W. Murhammer, “Simultaneous measurement of glucose and glutamine in insect cell culture media by near infrared spectroscopy,” *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 55, pp. 11–15, jul 1997.
- [49] G. Purvinis, B. D. Cameron, and D. M. Altrogge, “Noninvasive polarimetric-based glucose monitoring: An in vivo study,” *Journal of Diabetes Science and Technology*, vol. 5, pp. 380–387, mar 2011.
- [50] C. W. Pirstill, B. H. Malik, V. C. Gresham, and G. L. Coté, “In vivo glucose monitoring using dual-wavelength polarimetry to overcome corneal birefringence in the presence of motion,” *Diabetes Technology & Therapeutics*, vol. 14, pp. 819–827, sep 2012.
- [51] T. S. Bailey, A. Chang, and M. Christiansen, “Clinical accuracy of a continuous glucose monitoring system with an advanced algorithm,” *Journal of Diabetes Science and Technology*, vol. 9, pp. 209–214, nov 2014.
- [52] R. S. Mazze, E. Strock, S. Borgman, D. Wesley, P. Stout, and J. Racchini, “Evalua-

- ting the accuracy, reliability, and clinical applicability of continuous glucose monitoring (CGM): Is CGM ready for real time?," *Diabetes Technology & Therapeutics*, vol. 11, pp. 11–18, jan 2009.
- [53] A. Maran, C. Crepaldi, A. Tiengo, G. Grassi, E. Vitali, G. Pagano, S. Bistoni, G. Calabrese, F. Santeusanio, F. Leonetti, M. Ribauda, U. D. Mario, G. Annuzzi, S. Genovese, G. Riccardi, M. Previti, D. Cucinotta, F. Giorgino, A. Bellomo, R. Giorgino, A. Poscia, and M. Varalli, "Continuous subcutaneous glucose monitoring in diabetic patients: A multicenter analysis," *Diabetes Care*, vol. 25, pp. 347–352, feb 2002.
- [54] H. Thabit, L. Leelarathna, M. E. Wilinska, D. Elleri, J. M. Allen, A. Lubina-Solomon, E. Walkinshaw, M. Stadler, P. Choudhary, J. K. Mader, S. Dellweg, C. Benesch, T. R. Pieber, S. Arnolds, S. R. Heller, S. A. Amiel, D. Dunger, M. L. Evans, and R. Hovorka, "Accuracy of continuous glucose monitoring during three closed-loop home studies under free-living conditions," *Diabetes Technology & Therapeutics*, vol. 17, pp. 801–807, nov 2015.
- [55] R. Esposito, B. D. Ventura, S. D. Nicola, C. Altucci, R. Velotta, D. G. Mita, and M. Lepore, "Glucose sensing by time-resolved fluorescence of sol-gel immobilized glucose oxidase," *Sensors*, vol. 11, pp. 3483–3497, mar 2011.
- [56] L. Ekhlaspour, D. Mondesir, N. Lautsch, C. Balliro, M. Hillard, K. Magyar, L. G. Radocchia, A. Esmaeili, M. Sinha, and S. J. Russell, "Comparative accuracy of 17 point-of-care glucose meters," *Journal of Diabetes Science and Technology*, vol. 11, pp. 558–566, oct 2016.
- [57] B. Kovatchev, S. Anderson, L. Heinemann, and W. Clarke, "Comparison of the numerical and clinical accuracy of four continuous glucose monitors," *Diabetes Care*, vol. 31, pp. 1160–1164, mar 2008.
- [58] J. Kim, M. Kim, M.-S. Lee, K. Kim, S. Ji, Y.-T. Kim, J. Park, K. Na, K.-H. Bae, H. K. Kim, F. Bien, C. Y. Lee, and J.-U. Park, "Wearable smart sensor systems integrated on soft contact lenses for wireless ocular diagnostics," *Nature Communications*, vol. 8, p. 14997, apr 2017.
- [59] H. Yao, A. J. Shum, M. Cowan, I. Lähdesmäki, and B. A. Parviz, "A contact lens with embedded sensor for monitoring tear glucose level," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 26, pp. 3290–3296, mar 2011.
- [60] J. Zhang, W. Hodge, C. Hutnick, and X. Wang, "Noninvasive diagnostic devices for diabetes through measuring tear glucose," *Journal of Diabetes Science and Technology*, vol. 5, pp. 166–172, jan 2011.
- [61] Verily Life Sciences, LLCs, "Stop of Smart Lens Development." <https://blog.verily.com/2018/11/update-on-our-smart-lens-program-with.html>, Zugriff: 27.02.2019.
- [62] M. Montagnana, M. Caputo, D. Giavarina, and G. Lippi, "Overview on self-monitoring of blood glucose," *Clinica Chimica Acta*, vol. 402, pp. 7–13, apr 2009.
- [63] S. B. Bankar, M. V. Bule, R. S. Singhal, and L. Ananthanarayan, "Glucose oxidase — an overview," *Biotechnology Advances*, vol. 27, pp. 489–501, jul 2009.

- [64] R. Katakay and R. M. Zawawi, "Modification of the chiral selectivity of d-glucose oxidase and l-lactate oxidase in a collagen matrix," *Physical Chemistry Chemical Physics*, vol. 12, no. 32, p. 9183, 2010.
- [65] Sandeep Kumar Vashist, "Continuous Glucose Monitoring Systems: A Review," *Diagnostics*, vol. 3, no. 4, pp. 385–412, 2013.
- [66] G. Cappon, G. Acciaroli, M. Vettoretti, A. Faccinetti, and G. Saracino, "Wearable continuous glucose monitoring sensors: A revolution in diabetes treatment," *Electronics*, vol. 6, p. 65, sep 2017.
- [67] D. Rodbard, "Continuous glucose monitoring: A review of successes, challenges, and opportunities," *Diabetes Technology & Therapeutics*, vol. 18, pp. S2–3–S2–13, feb 2016.
- [68] A. Tura, A. Maran, and G. Pacini, "Non-invasive glucose monitoring: Assessment of technologies and devices according to quantitative criteria," *Diabetes Research and Clinical Practice*, vol. 77, pp. 16–40, jul 2007.
- [69] S. K. Vashist, "Non-invasive glucose monitoring technology in diabetes management: A review," *Analytica Chimica Acta*, vol. 750, pp. 16–27, oct 2012.
- [70] H. Choi, J. Naylon, S. Luzio, J. Beutler, J. Birchall, C. Martin, and A. Porch, "Design and in vitro interference test of microwave noninvasive blood glucose monitoring sensor," *IEEE Transactions on Microwave Theory and Techniques*, vol. 63, pp. 3016–3025, oct 2015.
- [71] J. Heikenfeld, A. Jajack, J. Rogers, P. Gutruf, L. Tian, T. Pan, R. Li, M. Khine, J. Kim, J. Wang, and J. Kim, "Wearable sensors: modalities, challenges, and prospects," *Lab on a Chip*, vol. 18, no. 2, pp. 217–248, 2018.
- [72] A. Caduff, E. Hirt, Y. Feldman, Z. Ali, and L. Heinemann, "First human experiments with a novel non-invasive, non-optical continuous glucose monitoring system," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 19, pp. 209–217, nov 2003.
- [73] I. Harman-Boehm, A. Gal, A. M. Raykhman, E. Naidis, and Y. Mayzel, "Noninvasive glucose monitoring: Increasing accuracy by combination of multi-technology and multi-sensors," *Journal of Diabetes Science and Technology*, vol. 4, pp. 583–595, may 2010.
- [74] M. Kim and V. A. Amirfar, "Noninvasive glucose monitors: New technologies on the horizon," *Pharmacy Today*, vol. 22, no. 2, p. 40, 2016.
- [75] H. A. MacKenzie, H. S. Ashton, S. Spiers, Y. Shen, S. S. Freeborn, J. Hannigan, J. Lindberg, and P. Rae, "Advances in photoacoustic noninvasive glucose testing," *Clinical Chemistry*, vol. 45, no. 9, pp. 1587–1595, 1999.
- [76] K. Zirk and H. Poetzschke, "A refractometry-based glucose analysis of body fluids," *Medical Engineering & Physics*, vol. 29, pp. 449–458, may 2007.
- [77] B. Gehr and T. Biester, "Kontinuierliche glukosemessung," *Der Diabetologe*, vol. 14, pp. 417–432, aug 2018.

- [78] A. Ghatak, *Optics, 4 Edition*. Tata Mcgraw Hill, 2008.
- [79] M. Hod, L. G. Jovanovic, G. C. D. Renzo, A. de Leiva, and O. Langer, eds., *Textbook of Diabetes and Pregnancy*. Taylor & Francis, 2018.
- [80] MIT Technology Review, “Business Report: Blood Sugar Crash.” <https://www.technologyreview.com/s/529026/blood-sugar-crash/>, Zugriff: 27.02.2019.
- [81] I. Barman, C.-R. Kong, G. P. Singh, R. R. Dasari, and M. S. Feld, “Accurate spectroscopic calibration for noninvasive glucose monitoring by modeling the physiological glucose dynamics,” *Analytical Chemistry*, vol. 82, pp. 6104–6114, jul 2010.
- [82] M. Goetz, G. Cote, R. Erckens, W. March, and M. Motamedi, “Application of a multivariate technique to raman spectra for quantification of body chemicals,” *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, vol. 42, pp. 728–731, jul 1995.
- [83] N. Spegazzini, I. Barman, N. C. Dingari, R. Pandey, J. S. Soares, Y. Ozaki, and R. R. Dasari, “Spectroscopic approach for dynamic bioanalyte tracking with minimal concentration information,” *Scientific Reports*, vol. 4, pp. 1–7, nov 2014.
- [84] M. Ren and M. A. Arnold, “Comparison of multivariate calibration models for glucose, urea, and lactate from near-infrared and raman spectra,” *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 387, pp. 879–888, jan 2007.
- [85] A. Rogalski, “Infrared detectors: status and trends,” *Progress in Quantum Electronics*, vol. 27, pp. 59–210, jan 2003.
- [86] J. Yadav, A. Rani, V. Singh, and B. M. Murari, “Comparative study of different measurement sites using NIR based non-invasive glucose measurement system,” *Procedia Computer Science*, vol. 70, pp. 469–475, 2015.
- [87] P. D. F. Träger, ed., *Springer Handbook of Lasers and Optics*. Springer-Verlag GmbH, 2012.
- [88] S. Sivakesava, J. Irudayaraj, and D. Ali, “Simultaneous determination of multiple components in lactic acid fermentation using FT-MIR, NIR, and FT-raman spectroscopic techniques,” *Process Biochemistry*, vol. 37, pp. 371–378, dec 2001.
- [89] A. K. Amerov, J. Chen, and M. A. Arnold, “Molar absorptivities of glucose and other biological molecules in aqueous solutions over the first overtone and combination regions of the near-infrared spectrum,” *Applied Spectroscopy*, vol. 58, no. 10, pp. 1195–1204, 2007.
- [90] M. A. Arnold and G. W. Small, “Determination of physiological levels of glucose in an aqueous matrix with digitally filtered fourier transform near-infrared spectra,” *Analytical Chemistry*, vol. 62, pp. 1457–1464, jul 1990.
- [91] M. R. Robinson, R. P. Eaton, D. M. Haaland, G. W. Koepp, E. V. Thomas, B. R. Stallard, and P. L. Robinson, “Noninvasive glucose monitoring in diabetic patients: A preliminary evaluation,” *Clinical Chemistry*, vol. 38, no. 9, pp. 1618–1622, 1992.
- [92] H. Chung, M. A. Arnold, M. Rhiel, and D. W. Murhammer, “Simultaneous measurement of glucose and glutamine in aqueous solutions by near infrared spectroscopy,” *Applied Biochemistry and Biotechnology*, vol. 50, pp. 109–125, feb 1995.

- [93] J. J. Burmeister, H. Chung, and M. A. Arnold, “Phantoms for noninvasive blood glucose sensing with near infrared transmission spectroscopy,” *Photochemistry and Photobiology*, vol. 67, pp. 50–55, jan 1998.
- [94] J. J. Burmeister and M. A. Arnold, “Evaluation of measurement sites for noninvasive blood glucose sensing with near-infrared transmission spectroscopy,” *Clinical Chemistry*, vol. 45, no. 9, pp. 1621–1627, 1999.
- [95] M. J. McShane and G. L. Coté, “Near-infrared spectroscopy for determination of glucose, lactate, and ammonia in cell culture media,” *Applied Spectroscopy*, vol. 52, pp. 1073–1078, aug 1998.
- [96] M. S. Collado, V. E. Mantovani, H. C. Goiciochecea, and A. C. Oliveieri, “Simultaneous spectrophotometric-multivariate calibration determination of several components of ophthalmic solutions: phenylephrine, chloramphenicol, antipyrine, methylparaben and thimerosal,” *Talanta*, vol. 52, pp. 909–920, aug 2000.
- [97] M. A. Arnold, L. Liu, and J. T. Olesberg, “Selectivity assessment of noninvasive glucose measurements based on analysis of multivariate calibration vectors,” *Journal of Diabetes Science and Technology*, vol. 1, pp. 454–462, jul 2007.
- [98] S. Kasemsumran, Y. Du, K. Murayama, M. Huehne, and Y. Ozaki, “Near-infrared spectroscopic determination of human serum albumin, gamma-globulin, and glucose in a control serum solution with searching combination moving window partial least squares,” *Analytica Chimica Acta*, vol. 512, pp. 223–230, jun 2004.
- [99] H. M. Heise, R. Marbach, G. Janatsch, and J. D. Kruse-Jarres, “Multivariate determination of glucose in whole blood by attenuated total reflection infrared spectroscopy,” *Analytical Chemistry*, vol. 61, pp. 2009–2015, sep 1989.
- [100] G. Budínová, J. Salva, and K. Volka, “Application of molecular spectroscopy in the mid-infrared region to the determination of glucose and cholesterol in whole blood and in blood serum,” *Applied Spectroscopy*, vol. 51, pp. 631–635, may 1997.
- [101] A. K. Amerov, J. Chen, G. W. Small, and M. A. Arnold, “Scattering and Absorption Effects in the Determination of Glucose in Whole Blood by Near-Infrared Spectroscopy,” *Analytical Chemistry*, vol. 77, pp. 4587–4594, jul 2005.
- [102] Y. Suzuki, K. Maruo, A. W. Zhang, K. Shimogaki, H. Ogawa, and F. Hirayama, “Preliminary evaluation of optical glucose sensing in red cell concentrations using near-infrared diffuse-reflectance spectroscopy,” *Journal of Biomedical Optics*, vol. 17, no. 1, p. 017004, 2012.
- [103] B. D. Cameron and Y. Li, “Polarization-based diffuse reflectance imaging for noninvasive measurement of glucose,” *Journal of Diabetes Science and Technology*, vol. 1, pp. 873–878, nov 2007.
- [104] A. Sakudo, “Near-infrared spectroscopy for medical applications: Current status and future perspectives,” *Clinica Chimica Acta*, vol. 455, pp. 181–188, apr 2016.
- [105] J. Chen, M. A. Arnold, and G. W. Small, “Comparison of combination and first overtone spectral regions for near-infrared calibration models for glucose and other

- biomolecules in aqueous solutions,” *Analytical Chemistry*, vol. 76, pp. 5405–5413, sep 2004.
- [106] P. S. Jensen and J. Bak, “Near-infrared transmission spectroscopy of aqueous solutions: Influence of optical pathlength on signal-to-noise ratio,” *Applied Spectroscopy*, vol. 56, pp. 1600–1606, dec 2002.
- [107] H. L. Mark and P. R. Griffiths, “Analysis of noise in fourier transform infrared spectra,” *Applied Spectroscopy*, vol. 56, pp. 633–639, may 2002.
- [108] R. Cole, “Optimum optical density in spectrophotometry,” *Journal of the Optical Society of America*, vol. 41, p. 38, jan 1951.
- [109] V. S. Langford, A. J. McKinley, and T. I. Quickenden, “Temperature dependence of the visible-near-infrared absorption spectrum of liquid water,” *The Journal of Physical Chemistry A*, vol. 105, pp. 8916–8921, oct 2001.
- [110] Z. Wang, T. Dean, and B. R. Kowalski, “Additive background correction in multivariate instrument standardization,” *Analytical Chemistry*, vol. 67, pp. 2379–2385, jul 1995.
- [111] K. Maruo and Y. Yamada, “Near-infrared noninvasive blood glucose prediction without using multivariate analyses: introduction of imaginary spectra due to scattering change in the skin,” *Journal of Biomedical Optics*, vol. 20, p. 047003, apr 2015.
- [112] T. W. King, G. L. Cote, R. J. McNichols, and J. Marcel J. Goetz, “Multispectral polarimetric glucose detection using a single pockels cell,” *Optical Engineering*, vol. 33, p. 2746, aug 1994.
- [113] A. Trabelsi, M. Boukadoum, and M. Siaj, “A preliminary investigation into the design of an implantable optical blood glucose sensor,” *American Journal of Biomedical Engineering*, vol. 1, pp. 62–67, aug 2011.
- [114] Matthias Kohl, Matthias Essenpreis, Mark Cope, “The influence of glucose concentration upon the transport of light in tissue-simulating phantoms,” *Physics in Medicine and Biology*, vol. 40, pp. 1267–1287, jul 1995.
- [115] L. B. Mohammadi, S. Sigloch, I. Frese, V. Stein, K. Welzel, F. Schmitz, and T. Klotzbücher, “A minimally invasive chip based near infrared sensor for continuous glucose monitoring,” in *Biophotonics: Photonic Solutions for Better Health Care III* (J. Popp, W. Drexler, V. V. Tuchin, and D. L. Matthews, eds.), vol. 53, pp. 99–104, SPIE, jun 2012.
- [116] L. B. Mohammadi, T. Klotzbücher, S. Sigloch, K. Welzel, M. Göddel, T. R. Pieber, and L. Schaupp, “In vivo evaluation of a chip based near infrared sensor for continuous glucose monitoring,” *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 53, pp. 99–104, mar 2014.
- [117] Y. Jung and J. Hwang, “Near-infrared studies of glucose and sucrose in aqueous solutions: Water displacement effect and red shift in water absorption from water-solute interaction,” *Applied Spectroscopy*, vol. 67, pp. 171–180, feb 2013.

- [118] H. Arimoto, M. Tarumi, and Y. Yamada, “Temperature-insensitive measurement of glucose concentration based on near infrared spectroscopy and partial least squares analysis,” *Optical Review*, vol. 10, pp. 74–76, mar 2003.
- [119] D. Lafrance, L. C. Lands, and D. H. Burns, “In vivo lactate measurement in human tissue by near-infrared diffuse reflectance spectroscopy,” *Vibrational Spectroscopy*, vol. 36, pp. 195–202, dec 2004.
- [120] T. Yano, H. Matsushige, K.-I. Suehara, and Y. Nakano, “Measurement of the concentrations of glucose and lactic acid in peritoneal dialysis solutions using near-infrared spectroscopy,” *Journal of Bioscience and Bioengineering*, vol. 90, pp. 540–544, jan 2000.
- [121] Y.-J. Kim and G. Yoon, “Prediction of glucose in whole blood by near-infrared spectroscopy: Influence of wavelength region, preprocessing, and hemoglobin concentration,” *Journal of Biomedical Optics*, vol. 11, no. 4, p. 041128, 2006.
- [122] C. Petibois, A.-M. Melin, A. Perromat, G. Cazorla, and G. Dél eris, “Glucose and lactate concentration determination on single microsamples by fourier-transform infrared spectroscopy,” *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, vol. 135, pp. 210–215, feb 2000.
- [123] S. Liakat, K. A. Bors, T.-Y. Huang, A. P. M. Michel, E. Zanghi, and C. F. Gmachl, “In vitro measurements of physiological glucose concentrations in biological fluids using mid-infrared light,” *Biomedical Optics Express*, vol. 4, p. 1083, jun 2013.
- [124] S. Liakat, K. A. Bors, L. Xu, C. M. Woods, J. Doyle, and C. F. Gmachl, “Noninvasive in vivo glucose sensing on human subjects using mid-infrared light,” *Biomedical Optics Express*, vol. 5, p. 2397, jun 2014.
- [125] M. Brandstetter, A. Genner, K. Anic, and B. Lendl, “Tunable external cavity quantum cascade laser for the simultaneous determination of glucose and lactate in aqueous phase,” *The Analyst*, vol. 135, no. 12, p. 3260, 2010.
- [126] M. Brandstetter, L. Volgger, A. Genner, C. Jungbauer, and B. Lendl, “Direct determination of glucose, lactate and triglycerides in blood serum by a tunable quantum cascade laser-based mid-IR sensor,” *Applied Physics B*, vol. 110, pp. 233–239, jun 2012.
- [127] S. Yu, D. Li, H. Chong, C. Sun, H. Yu, and K. Xu, “In vitro glucose measurement using tunable mid-infrared laser spectroscopy combined with fiber-optic sensor,” *Biomedical Optics Express*, vol. 5, p. 275, dec 2013.
- [128] J. Lademann, H. Richter, M. Meinke, G. J. Mueller, P. Kapustin, V. I. Masychev, Y. N. Bulkin, K. W. Berndt, and W. Sterry, “In vitro glucose measurements using a two-wavelength CO₂ laser,” in *Optical Diagnostics and Sensing in Biomedicine III* (A. V. Priezzhev and G. L. Cote, eds.), SPIE, jul 2003.
- [129] X. Guo, A. Mandelis, and B. Zinman, “Non-invasive glucose measurements using wavelength modulated differential photothermal radiometry (WM-DPTR),” *International Journal of Thermophysics*, vol. 33, pp. 1814–1821, aug 2012.

- [130] M. Pleitez, H. von Lilienfeld-Toal, and W. Mäntele, “Infrared spectroscopic analysis of human interstitial fluid in vitro and in vivo using FT-IR spectroscopy and pulsed quantum cascade lasers (QCL): Establishing a new approach to non invasive glucose measurement,” *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, vol. 85, pp. 61–65, jan 2012.
- [131] S. Yu, D. Li, H. Chong, C. Sun, H. Yu, and K. Xu, “In vitro glucose measurement using tunable mid-infrared laser spectroscopy combined with fiber-optic sensor,” *Biomedical Optics Express*, vol. 5, p. 275, dec 2013.
- [132] C. Hughes, M. Brown, G. Clemens, A. Henderson, G. Monjardez, N. W. Clarke, and P. Gardner, “Assessing the challenges of fourier transform infrared spectroscopic analysis of blood serum,” *Journal of Biophotonics*, vol. 7, pp. 180–188, jan 2014.
- [133] W. Zhang, R. Liu, W. Zhang, H. Jia, and K. Xu, “Discussion on the validity of NIR spectral data in non-invasive blood glucose sensing,” *Biomedical Optics Express*, vol. 4, p. 789, may 2013.
- [134] K. Yamakoshi and Y. Yamakoshi, “Pulse glucometry: a new approach for noninvasive blood glucose measurement using instantaneous differential near-infrared spectrophotometry,” *Journal of Biomedical Optics*, vol. 11, no. 5, p. 054028, 2006.
- [135] O. Amir, D. Weinstein, S. Zilberman, M. Less, D. Perl-Treves, H. Primack, A. Weinstein, E. Gabis, B. Fikhite, and A. Karasik, “Continuous Noninvasive Glucose Monitoring Technology Based on Occlusion Spectroscopy,” *Journal of Diabetes Science and Technology*, vol. 1, pp. 463–469, jul 2007.
- [136] J. Solanki, P. Sen, J. T. Andrews, and K. K. Thareja, “Cyclic correlation of diffuse reflected signal with glucose concentration and scatterer size,” *Journal of Modern Physics*, vol. 03, no. 01, pp. 64–68, 2012.
- [137] E. Guevara and F. Gonzales, “Joint optical-electrical technique for noninvasive glucose monitoring,” *Revista Mexicana de Fisica*, vol. 56, no. 5, pp. 430–434, 2010.
- [138] K. Wang, G. Chi, R. Lau, and T. Chen, “Multivariate calibration of near infrared spectroscopy in the presence of light scattering effect: A comparative study,” *Analytical Letters*, vol. 44, pp. 824–836, mar 2011.
- [139] S. C. H. Lam, J. W. Y. Chung, K. L. Fan, and T. K. S. Wong, “Non-invasive blood glucose measurement by near infrared spectroscopy: Machine drift, time drift and physiological effect,” *Spectroscopy*, vol. 24, no. 6, pp. 629–639, 2010.
- [140] J. Cumming, “Temperature dependence of light absorption by water,” *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment*, vol. 713, pp. 1–4, jun 2013.
- [141] W. S. Pegau, D. Gray, and J. R. V. Zaneveld, “Absorption and attenuation of visible and near-infrared light in water: dependence on temperature and salinity,” *Applied Optics*, vol. 36, p. 6035, aug 1997.
- [142] A. Nawaz, P. Øhlckers, S. Sælid, M. Jacobsen, and M. N. Akram, “Review: Non-invasive continuous blood glucose measurement techniques,” *Journal of Bioinformatics And Diabetes*, vol. 1, pp. 1–27, jun 2016.

- [143] L.-N. Li, Q.-B. Li, and G.-J. Zhang, "A weak signal extraction method for human blood glucose noninvasive measurement using near infrared spectroscopy," *Journal of Infrared, Millimeter, and Terahertz Waves*, vol. 30, pp. 1191–1204, jul 2009.
- [144] Dieter Jeckel, Gerhard Pfeleiderer, "änderung der optischen rotationsdispersion von lactat-dehydrogenase aus schweineherzmuskel nach zugabe von harnstoff, coenzym und sh-blockierenden reagenzien," *Hoppe-Seylers Zeitschrift für physiologische Chemie*, vol. 350, pp. 903–914, jan 1969.
- [145] T. W. King and G. L. Cote, "Closed loop polarimetric glucose sensing using the pockels effect," in *Proceedings of the Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society*, IEEE, oct 1992.
- [146] G. L. Cote, M. D. Fox, and R. B. Northrop, "Noninvasive optical polarimetric glucose sensing using a true phase measurement technique," *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, vol. 39, pp. 752–756, jul 1992.
- [147] B. D. Cameron and G. L. Cote, "Noninvasive glucose sensing utilizing a digital closed-loop polarimetric approach," *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, vol. 44, no. 12, pp. 1221–1227, 1997.
- [148] B. D. Cameron and G. L. Cote, "Polarimetric detection of glucose in biologically based fluids," in *Optical Diagnostics of Biological Fluids and Advanced Techniques in Analytical Cytology* (A. V. Priezzhev, T. Asakura, and R. C. Leif, eds.), vol. 308, pp. 308–313, SPIE, 1997.
- [149] S. Jang and M. Fox, "Double lock-in concept for MORE glucose detection," in *Proceedings of the IEEE 25th Annual Northeast Bioengineering Conference (Cat. No. 99CH36355)*, IEEE, 1999.
- [150] J. S. Baba, B. D. Cameron, S. Theru, and G. L. Cote, "Effect of temperature, pH, and corneal birefringence on polarimetric glucose monitoring in the eye," *Journal of Biomedical Optics*, vol. 7, no. 3, p. 321, 2002.
- [151] M. Yokota, Y. Sato, I. Yamaguchi, T. Kenmochi, and T. Yoshino, "A compact polarimetric glucose sensor using a high-performance fibre-optic faraday rotator," *Measurement Science and Technology*, vol. 15, pp. 143–147, nov 2003.
- [152] Q. Wan, G. L. Cote, and J. B. Dixon, "Dual-wavelength polarimetry for monitoring glucose in the presence of varying birefringence," *Journal of Biomedical Optics*, vol. 10, no. 2, p. 024029, 2005.
- [153] B. D. Cameron and H. Anumula, "Development of a real-time corneal birefringence compensated glucose sensing polarimeter," *Diabetes Technology & Therapeutics*, vol. 8, pp. 156–164, apr 2006.
- [154] B. H. Malik and G. L. Cote, "Real-time, closed-loop dual-wavelength optical polarimetry for glucose monitoring," *Journal of Biomedical Optics*, vol. 15, no. 1, p. 017002, 2010.
- [155] A. Penzkofer, "Optical rotatory dispersion measurement of d-glucose with fixed polarizer analyzer accessory in conventional spectrophotometer," *Journal of Analytical Sciences, Methods and Instrumentation*, vol. 03, no. 04, pp. 234–239, 2013.

- [156] T. Mitsui, T. Kinugawa, and K. Sakurai, "A new polarimeter for dilute aqueous solutions: The improved null-method compensation for the optical rotatory power by the faraday effect of a sample," *Japanese Journal of Applied Physics*, vol. 38, pp. 2152–2154, apr 1999.
- [157] B. H. Malik, C. W. Pirnstill, and G. L. Coté, "Dual-wavelength polarimetric glucose sensing in the presence of birefringence and motion artifact using anterior chamber of the eye phantoms," *Journal of Biomedical Optics*, vol. 18, p. 017007, jan 2013.
- [158] D. Cote and I. A. Vitkin, "Robust concentration determination of optically active molecules in turbid media with validated three-dimensional polarization sensitive monte carlo calculations," *Optics Express*, vol. 13, no. 1, p. 148, 2005.
- [159] M. F. G. Wood, X. Guo, and I. A. Vitkin, "Polarized light propagation in multiply scattering media exhibiting both linear birefringence and optical activity: Monte carlo model and experimental methodology," *Journal of Biomedical Optics*, vol. 12, no. 1, p. 014029, 2007.
- [160] N. Ghosh, M. F. G. Wood, and I. A. Vitkin, "Mueller matrix decomposition for extraction of individual polarization parameters from complex turbid media exhibiting multiple scattering, optical activity, and linear birefringence," *Journal of Biomedical Optics*, vol. 13, no. 4, p. 044036, 2008.
- [161] N. Ghosh, M. F. G. Wood, and I. A. Vitkin, "Polarimetry in turbid, birefringent, optically active media: A monte carlo study of mueller matrix decomposition in the backscattering geometry," *Journal of Applied Physics*, vol. 105, p. 102023, may 2009.
- [162] N. Ghosh, M. F. G. Wood, S. hong Li, R. D. Weisel, B. C. Wilson, R.-K. Li, and I. A. Vitkin, "Mueller matrix decomposition for polarized light assessment of biological tissues," *Journal of Biophotonics*, vol. 2, pp. 145–156, mar 2009.
- [163] X. Guo, M. F. G. Wood, and I. A. Vitkin, "Angular measurements of light scattered by turbid chiral media using linear stokes polarimeter," *Journal of Biomedical Optics*, vol. 11, no. 4, p. 041105, 2006.
- [164] S. T. Flock, S. L. Jacques, B. C. Wilson, W. M. Star, and M. J. C. van Gemert, "Optical properties of intralipid: A phantom medium for light propagation studies," *Lasers in Surgery and Medicine*, vol. 12, no. 5, pp. 510–519, 1992.
- [165] M. P. Silverman and W. Strange, "Polarimetric detection of cached objects and chiral solutes by light scattering in turbid media," in *Applications of Photonic Technology 4* (R. A. Lessard and G. A. Lampropoulos, eds.), SPIE, dec 2000.
- [166] L. Wang and S. L. Jacques, "Use of a laser beam with an oblique angle of incidence to measure the reduced scattering coefficient of a turbid medium," *Applied Optics*, vol. 34, p. 2362, may 1995.
- [167] L. Wang, S. L. Jacques, and X. Zhao, "Continuous-wave ultrasonic modulation of scattered laser light to image objects in turbid media," *Optics Letters*, vol. 20, p. 629, mar 1995.

- [168] N. Ghosh, A. Pradhan, P. K. Gupta, S. Gupta, V. Jaiswal, and R. P. Singh, “Depolarization of light in a multiply scattering medium: Effect of the refractive index of a scatterer,” *Physical Review E*, vol. 70, dec 2004.
- [169] I. Vitkin, R. Laszlo, and C. Whyman, “Effects of molecular asymmetry of optically active molecules on the polarization properties of multiply scattered light,” *Optics Express*, vol. 10, p. 222, feb 2002.
- [170] N. Ghosh, “Tissue polarimetry: concepts, challenges, applications, and outlook,” *Journal of Biomedical Optics*, vol. 16, p. 110801, nov 2011.
- [171] B. D. Cameron, M. J. Rakovic, M. Mehrübeoglu, G. W. Kattawar, S. Rastegar, L. V. Wang, and G. L. Cote, “Measurement and calculation of the two-dimensional backscattering mueller matrix of a turbid medium: errata,” *Optics Letters*, vol. 23, p. 1630, oct 1998.
- [172] W. K. R. Barnikol and N. Weiler, “Experiments aimed at enabling the development of an implantable glucose sensor based on polarimetry,” *Biomedizinische Technik/Biomedical Engineering*, vol. 40, no. 5, pp. 114–120, 1995.
- [173] S. Pohjola, “IV Normal Glucose content of the Aqueous,” *Acta Ophthalmologica*, vol. 44, pp. 34–43, may 1966.
- [174] W. March, R. Engerman, and B. Rabinovitch, “Optical monitor of glucose,” *Trans Am Soc Artif Intern Organs*, vol. 25, pp. 28–31, 1979.
- [175] B. Rabinovitch, W. F. March, and R. L. Adams, “Noninvasive glucose monitoring of the aqueous humor of the eye: Part i. measurement of very small optical rotations,” *Diabetes Care*, vol. 5, pp. 254–258, may 1982.
- [176] W. F. March, B. Rabinovitch, and R. L. Adams, “Noninvasive glucose monitoring of the aqueous humor of the eye: Part II. animal studies and the scleral lens,” *Diabetes Care*, vol. 5, pp. 259–265, may 1982.
- [177] B. D. Cameron, J. S. Baba, and G. L. Coté, “Measurement of the glucose transport time delay between the blood and aqueous humor of the eye for the eventual development of a noninvasive glucose sensor,” *Diabetes Technology & Therapeutics*, vol. 3, pp. 201–207, jun 2001.
- [178] B. D. Cameron, H. W. Gorde, B. Satheesan, and G. L. Cote, “The use of polarized laser light through the eye for noninvasive glucose monitoring,” *Diabetes Technology & Therapeutics*, vol. 1, pp. 135–143, jun 1999.
- [179] A. J. Webb and B. D. Cameron, “The use of optical polarimetry as a noninvasive in vivo physiological glucose monitor,” in *Optical Diagnostics and Sensing XI: Toward Point-of-Care Diagnostics and Design and Performance Validation of Phantoms Used in Conjunction with Optical Measurement of Tissue III* (R. J. Nordstrom and G. L. Coté, eds.), SPIE, feb 2011.
- [180] A. M. Winkler, G. T. Bonnema, and J. K. Barton, “Optical polarimetry for noninvasive glucose sensing enabled by sagnac interferometry,” *Applied Optics*, vol. 50, p. 2719, jun 2011.

- [181] B. H. Malik, C. W. Pirnstill, and G. L. Cote, “Polarimetric glucose sensing in an artificial eye anterior chamber,” in *Optical Diagnostics and Sensing XII: Toward Point-of-Care Diagnostics and Design and Performance Validation of Phantoms Used in Conjunction with Optical Measurement of Tissue IV* (R. J. Nordstrom and G. L. Cote, eds.), SPIE, feb 2012.
- [182] B. H. Malik and G. L. Coté, “Advancement in polarimetric glucose sensing: simulation and measurement of birefringence properties of cornea,” in *Optical Diagnostics and Sensing XI: Toward Point-of-Care Diagnostics and Design and Performance Validation of Phantoms Used in Conjunction with Optical Measurement of Tissue III* (R. J. Nordstrom and G. L. Coté, eds.), vol. 7906, SPIE, feb 2011.
- [183] H. Anumula, A. A. Nezhuvungal, Y. Li, and B. D. Cameron, “Development of a noninvasive corneal birefringence-compensated glucose-sensing polarimeter,” in *Advanced Biomedical and Clinical Diagnostic Systems* (T. Vo-Dinh, W. S. Grundfest, D. A. Benaron, and G. E. Cohn, eds.), vol. 4958, pp. 4958 – 4958 – 10, SPIE, jul 2003.
- [184] J. B. Dixon, Q. Wan, and G. L. Cote, “Motion compensation for detecting glucose through dual wavelength polarimetric system,” in *Optical Diagnostics and Sensing V* (A. V. Priezzhev and G. L. Cote, eds.), vol. 5702, pp. 5702 – 5702 – 8, SPIE, mar 2005.
- [185] G. L. Cote, H. Gorde, J. Janda, and B. D. Cameron, “Multispectral polarimetric system for glucose monitoring,” in *Biomedical Sensing and Imaging Technologies* (R. A. Lieberman and T. Vo-Dinh, eds.), SPIE, may 1998.
- [186] B. H. Malik and G. L. Cote, “Modeling the corneal birefringence of the eye toward the development of a polarimetric glucose sensor,” *Journal of Biomedical Optics*, vol. 15, no. 3, p. 037012, 2010.
- [187] C. Chou, C.-Y. Han, W.-C. Kuo, Y.-C. Huang, C.-M. Feng, and J.-C. Shyu, “Noninvasive glucose monitoring in vivo with an optical heterodyne polarimeter,” *Applied Optics*, vol. 37, pp. 3553–3557, jun 1998.
- [188] J. T. Sorensen, *A physiologic model of glucose metabolism in man and its use to design and assess improved insulin therapies for diabetes*. PhD thesis, Massachusetts Institute of Technology. Dept. of Chemical Engineering, 1985.
- [189] V. V. Tuchin, L. Wang, and D. A. Zimnyakov, *Optical Polarization in Biomedical Applications*, vol. 2 of 5–16. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2006.
- [190] L. Rovati and X. Guo, “Noninvasive measurements of glucose in the human body using polarimetry and brewster-reflection off of the eye lens,” in *Handbook of Optical Sensing of Glucose in Biological Fluids and Tissues*, pp. 487–526, Taylor & Francis, dec 2008.
- [191] J. S. Baba, A. Meledeo, B. D. Cameron, and G. L. Cote, “Investigation of pH and temperature on optical rotatory dispersion for noninvasive glucose monitoring,” in *Optical Diagnostics and Sensing of Biological Fluids and Glucose and Cholesterol Monitoring* (A. V. Priezzhev and G. L. Cote, eds.), SPIE, jun 2001.

- [192] C. Browne and F. Zerban, *Physical and chemical methods of sugar analysis*. Chapman & Hill, New York, 1948. pp. 263-273.
- [193] F. Morgner, S. Stufler, D. Geißler, I. L. Medintz, W. R. Algar, K. Susumu, M. H. Stewart, J. B. Blanco-Canosa, P. E. Dawson, and N. Hildebrandt, "Terbium to quantum dot FRET bioconjugates for clinical diagnostics: Influence of human plasma on optical and assembly properties," *Sensors*, vol. 11, pp. 9667–9684, oct 2011.
- [194] E. Breitmaier and G. Jung, *Organische Chemie: Grundlagen, Stoffklassen, Reaktionen, Konzepte, Molekülstruktur*. Georg Thieme Verlag, 2005.
- [195] M. Bass, C. DeCusatis, J. M. Enoch, V. Lakshminarayanan, and G. Li, *Handbook of Optics, Third Edition Volume I: Geometrical and Physical Optics, Polarized Light, Components and Instruments(set)*. McGraw-Hill Education, LLC CoreSource, 2009.
- [196] L. Darmstaedters, *Handbuch zur Geschichte der Naturwissenschaften und der Technik*. Springer Berlin Heidelberg, 1908.
- [197] C. S. Hudson and J. K. Dale, "A comparison of the optical rotatory powers of the alpha and beta forms of certain acetylated derivatives of glucose," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 37, pp. 1264–1270, may 1915.
- [198] W. Moffitt, "Optical rotatory dispersion of helical polymers," *The Journal of Chemical Physics*, vol. 25, pp. 467–478, sep 1956.
- [199] W. Moffitt and J. T. Yang, "The optical rotatory dispersion of simple polypeptides," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 42, pp. 596–603, sep 1956.
- [200] W. Hoppe, W. Lohmann, H. Markl, and H. Ziegler, eds., *Biophysik*. Springer-Verlag, 2011.
- [201] D. F. Detar, "The Calculation of Parameters of the Moffitt Equation for Rotatory Dispersion Data," *Biophysical Journal*, vol. 6, pp. 505–512, jul 1966.
- [202] S. Matsuo and Y. Iwakura, "Analysis of Optical Rotatory Dispersion of Poly- and Oligo(L-Lactate) by Two-term DRUDE Equation," *Die Makromolekulare Chemie*, vol. 152, pp. 203–215, feb 1972.
- [203] K. K. Yamaoka, "An analysis of optical rotatory dispersion curves of synthetic polypeptides," *Biopolymers*, vol. 2, pp. 219–229, jun 1964.
- [204] E. Shechter and E. R. Blout, "An analysis of the optical rotatory dispersion of polypeptides and proteins," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 51, pp. 695–702, apr 1964.
- [205] J. T. Yang and P. Doty, "The optical rotatory dispersion of polypeptides and proteins in relation to configuration," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 79, pp. 761–775, feb 1957.
- [206] C. Schellman and J. Schellman, "Optical rotation and protein configuration," *CR Trav. Lab. Carlsberg Ser. Chim* 30, pp. 463–500, 1958.
- [207] S. Bienz, L. Bigler, T. Fox, and H. Meier, *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*. Georg Thieme Verlag, 2016.

- [208] J. M. Sturtevant and T. Y. Tsong, “Investigations of yeast l-lactate dehydrogenase,” *Journal of Biomedical Chemistry*, vol. 243, no. 9, pp. 2359–2366, 1968.
- [209] H. Soetedjo and J. Rätty, “Use of a modified drude's equation to investigate the optical rotation property of sugars,” *Optik*, vol. 125, pp. 7162–7165, dec 2014.
- [210] S. Budavari, *The Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals*. Merck, 13th ed., 1989.
- [211] B. H. Malik and G. L. Cote, “Characterizing dual wavelength polarimetry through the eye for monitoring glucose,” *Biomedical Optics Express*, vol. 1, p. 1247, oct 2010.
- [212] R. Azzam, “The intertwined history of polarimetry and ellipsometry,” *Thin Solid Films*, vol. 519, pp. 2584–2588, feb 2011.
- [213] M. Monteiro, C. Stari, C. Cabeza, and A. C. Martí, “The polarization of light and malus’ law using smartphones,” *The Physics Teacher*, vol. 55, pp. 264–266, may 2017.
- [214] P. Yeh, *Optical Waves in Layered Media*. Wiley-Interscience, 2005.
- [215] E. J. Gillham, “A high-precision photoelectric polarimeter,” *Journal of Scientific Instruments*, vol. 34, pp. 435–439, nov 1957.
- [216] E. J. Gillham, “Photoelectric polarimeter using the faraday effect,” *Nature*, vol. 178, pp. 1412–1413, dec 1956.
- [217] J. Badoz, M. P. Silverman, and J. C. Canit, “A new model of a photoelastic modulator with distributed birefringence,” in *Polarization Considerations for Optical Systems II* (R. A. Chipman, ed.), SPIE, jan 1990.
- [218] H. Jia, G. Xia, B. Wu, T. Jin, and H. Lu, “A novel optical polarimeter based on the signal width measurement of the waveform,” *Optik - International Journal for Light and Electron Optics*, vol. 122, pp. 2107–2109, dec 2011.
- [219] R. C. Jones, “A new calculus for the treatment of optical systems i. description and discussion of the calculus,” *Journal of the Optical Society of America*, vol. 31, p. 488, jul 1941.
- [220] J. A. Kerckhoff, C. D. Bruzewicz, R. Uhl, and P. K. Majumder, “A frequency stabilization method for diode lasers utilizing low-field faraday polarimetry,” *Review of Scientific Instruments*, vol. 76, p. 093108, sep 2005.
- [221] R. C. Jones, “A new calculus for the treatment of optical systems v. a more general formulation, and description of another calculus,” *Journal of the Optical Society of America*, vol. 37, p. 107, feb 1947.
- [222] H. Müller, “Memorandum on the polarization optics of photo-elastic shutter,” *Report No. 2 of OSRD, Project OEM-sr-576*, Nov. 1943.
- [223] J.-R. Chung, J. S. Baba, A. H. DeLaughter, and G. L. Cote, “Development and use of a novel automated mueller matrix polarization imaging system for in-vivo imaging of lesions,” in *Optical Biopsy IV* (R. R. Alfano, ed.), vol. 4613, pp. 111–117, SPIE, may 2002.

- [224] S. Firdous and M. Ikram, "Transmission and scattering matrix of polarization imaging for biological turbid medium," in *Optical Modeling and Performance Predictions II* (M. A. Kahan, ed.), vol. 5867, pp. 686704 1–11, SPIE, aug 2005.
- [225] W. Kessler, *Multivariate Datenanalyse in Der Bio- Und Prozessanalytik*. Wiley VCH Verlag GmbH, 2006.
- [226] I. T. Jolliffe and J. Cadima, "Principal component analysis: a review and recent developments," *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, vol. 374, p. 20150202, mar 2016.
- [227] R. Bro, Å. Rinnan, and N. K. M. Faber, "Standard error of prediction for multilinear PLS," *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, vol. 75, pp. 69–76, jan 2005.
- [228] N. M. Faber, F. H. Schreutelkamp, and H. W. Vedder, "Estimation of prediction uncertainty for a multivariate calibration model," *Spectroscopy Europe*, vol. 16, no. 1, pp. 17–21, 2004.
- [229] B. Hemmateenejad, M. Akhond, and F. Samari, "A comparative study between PCR and PLS in simultaneous spectrophotometric determination of diphenylamine, aniline, and phenol: Effect of wavelength selection," *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, vol. 67, pp. 958–965, jul 2007.
- [230] P. Yaroshchuk, D. L. Death, and S. J. Spencer, "Comparison of principal components regression, partial least squares regression, multi-block partial least squares regression, and serial partial least squares regression algorithms for the analysis of Fe in iron ore using LIBS," *J. Anal. At. Spectrom.*, vol. 27, no. 1, pp. 92–98, 2012.
- [231] D. Landgrebe, C. Haake, T. Höpfner, S. Beutel, B. Hitzmann, T. Scheper, M. Rhiel, and K. F. Reardon, "On-line infrared spectroscopy for bioprocess monitoring," *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 88, pp. 11–22, jul 2010.
- [232] A. Lorber, K. Faber, and B. R. Kowalski, "Net analyte signal calculation in multivariate calibration," *Analytical Chemistry*, vol. 69, pp. 1620–1626, apr 1997.
- [233] B. Nadler and R. R. Coifman, "Partial least squares, beer's law and the net analyte signal: statistical modeling and analysis," *Journal of Chemometrics*, vol. 19, pp. 45–54, jan 2005.
- [234] M. Goodarzi, S. Sharma, H. Ramon, and W. Saeys, "Multivariate calibration of NIR spectroscopic sensors for continuous glucose monitoring," *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, vol. 67, pp. 147–158, apr 2015.
- [235] Thorlabs, "CAD Bauteile des Messaufbaus der Thorlabs Homepage." https://www.thorlabs.com/navigation.cfm?guide_id=2262, Zugriff: 04.05.2018–07.05.2018.
- [236] Avantes BV, "CAD Datei, interne Kommunikation," tech. rep., 17.12.2015.
- [237] W. Pfeiler, *Optik, Strahlung*. Gruyter, Walter de GmbH, 2016.
- [238] H. Niedrig, *Bergmann Schäfer: Optik (Wellen- und Teilchenphysik)*. De Gruyter, 2004.

- [239] Hamamatsu Photonics K.K., “Datenblatt: Hamamatsu Super Quiet Xenon Lamp L2273.” https://www.hamamatsu.com/resources/pdf/etd/Xe-HgXe_TLS1016E.pdf, Zugriff: 28.1.2019.
- [240] Cree Inc., “Datenblatt: Cree XM-L High Power LED.” <http://www.cree.com/led-components/media/documents/XLampXML.pdf>, Zugriff: 17.7.2018.
- [241] Energetiq Technology, Inc., “Datenblatt: Laser Driven Light Source Energetiq EQ-99X.” <https://www.energetiq.com/DataSheets/EQ99X-Data-Sheet.pdf>, Zugriff: 17.7.2018.
- [242] K. A. Roshan L. Aggarwal, *Introduction to Optical Components*. Taylor & Francis Inc, 2018.
- [243] K. Iizuka, *Photonics Volume I*. John Wiley & Sons, 2002.
- [244] G. Wang, J. Lu, D. Cui, Z. Xu, Y. Wu, P. Fu, X. Guan, and C. Chen, “Efficient second harmonic generation in a new nonlinear La₂CaB₁₀O₁₉ crystal,” *Optics Communications*, vol. 209, pp. 481–484, aug 2002.
- [245] Thorlabs, Inc., “Datenblatt: Thorlabs GT10H Polarisationfilter.” https://www.thorlabs.com/newgrouppage9.cfm?objectgroup_id=5707, Zugriff: 29.7.2018.
- [246] D. Yang, J. C. Canit, and E. Gagnebet, “Photoelastic modulator: polarization modulation and phase modulation,” *Journal of Optics*, vol. 26, pp. 151–159, jul 1995.
- [247] T. D. Wolfenden, P. E. G. Baird, J. A. Deeny, and M. Irie, “Use of a Faraday modulator in a laser polarimeter for optical forward-wave level-crossing experiments in atomic vapours,” *Measurement Science and Technology*, vol. 1, pp. 1060–1066, oct 1990.
- [248] P. N. Schatz and A. J. McCaffery, “The faraday effect,” *Quarterly Reviews, Chemical Society*, vol. 23, no. 4, p. 552, 1969.
- [249] S. Jang and M. Fox, “Optical glucose sensor using a single faraday rotator,” in *Proceedings of the IEEE 23rd Northeast Bioengineering Conference*, IEEE, 1997.
- [250] G. Westenberger, H. J. Hoffmann, W. W. Jochs, and G. Przybilla, “Verdet constant and its dispersion in optical glasses,” in *Passive Materials for Optical Elements* (G. W. Wilkerson, ed.), SPIE, nov 1991.
- [251] H. Bach and N. Neuroth, *The Optical Properties of Glass*. Springer Science & Business IEEE Multimedia, 2012.
- [252] M. J. Weber, *Handbook of Optical Materials*. CRC Press Laser & Optical Science & Technology, 2002.
- [253] H. Yoshida, K. Tsubakimoto, Y. Fujimoto, K. Mikami, H. Fujita, N. Miyanaga, H. Nozawa, H. Yagi, T. Yanagitani, Y. Nagata, and H. Kinoshita, “Optical properties and faraday effect of ceramic terbium gallium garnet for a room temperature faraday rotator,” *Optics Express*, vol. 19, p. 15181, jul 2011.

- [254] O. Yabluchanskii, S. G. Kozenhevatkin, T. Nedospasova, and M. Artamonova, "Optical flint glass with enhanced transmission in the ultraviolet region," *Glass and Ceramics*, vol. 53, no. 7–8, pp. 204–206, 1996.
- [255] Schott AG, "Datenblatt: Optische Gläser von Schott." https://www.schott.com/d/advanced_optics/47d79895-2965-472d-83ed-af9e48ac72c0/1.4/schott-optisches-glas-datenblatt-sammlung-german-17012017.pdf, Zugriff: 1.8.2018.
- [256] W. Grevendonk, J. Dauwen, P. V. den Keybus, and B. Vanhuyse, "Dispersion of the verdet constant of water: A band model interpretation," *The Journal of Chemical Physics*, vol. 81, pp. 3746–3747, oct 1984.
- [257] J. C. Whitaker, ed., *The Electronics Handbook*. CRC-Press, 1996.
- [258] U. Tietze, C. Schenk, and E. Gamm, *Electronic Circuits: Handbook for Design and Application*. Springer, 2008.
- [259] R. Behroozian, "Development of a microcontroller-based interface to operate a multi-spectral polarimeter for blood component determination," Master Thesis, Fachhochschule Lübeck, 2016.
- [260] M. Goetz, M. Fox, and R. Northrop, "Microdegree polarimetry using a diode laser for glucose detection," in *[1992] Proceedings of the Eighteenth IEEE Annual Northeast Bioengineering Conference*, IEEE, 1992.
- [261] B. Cameron and B. Clarke, "Integrated magneto-optic modulator/compensator system, methods of making, and methods of using the same," Aug. 23 2016. US Patent 9,423,635.
- [262] K. E. Geckeler and H. Eckstein, eds., *Bioanalytische und biochemische Labormethoden*. Springer Berlin Heidelberg, 1998.
- [263] H. Czichos, *Die Grundlagen Der Ingenieurwissenschaften*. Springer, 31. Auflage ed., 2000.
- [264] STEGO Elektronik GmbH, "Datenblatt: Heizlüfter STEGO Typ HVL 031." https://www.stego.de/fileadmin/Languages/German/HV031_HVL031_DE.pdf, Zugriff: 05.10.2018.
- [265] Newport Spectra Physis GmbH, "CAD Zeichnung des Optischen Tisches." <https://www.newport.com/p/M-VIS3036-IG2-125N>, Zugriff: 29.02.2016.
- [266] D. Bruen, C. Delaney, L. Florea, and D. Diamond, "Glucose sensing for diabetes monitoring: Recent developments," *Sensors*, vol. 17, p. 1866, aug 2017.
- [267] M. A. Masuelli, "Study of bovine serum albumin solubility in aqueous solutions by intrinsic viscosity measurements," *Advances in Physical Chemistry*, vol. 2013, pp. 1–8, 2013.
- [268] K. Takeda, A. Wada, K. Yamamoto, Y. Moriyama, and K. Aoki, "Conformational change of bovine serum albumin by heat treatment," *Journal of Protein Chemistry*, vol. 8, no. 5, pp. 653–659, 1989.

- [269] H. R. Kermis, G. Rao, and T. A. Barbari, “Transport properties of pHEMA membranes for optical glucose affinity sensors,” *Journal of Membrane Science*, vol. 212, pp. 75–86, feb 2003.
- [270] B. H. Malik and G. L. Coté, “Real-time dual wavelength polarimetry for glucose sensing,” in *Optical Diagnostics and Sensing IX* (G. L. Coté, ed.), SPIE, feb 2009.
- [271] C. W. Pirnstill, B. H. Malik, E. Thomas, and G. L. Cote, “Design and characterization of a ferromagnetic, air gapped magneto-optic faraday rotator,” *Optics Letters*, vol. 38, p. 1298, apr 2013.
- [272] C. W. Pirnstill, *Polarized Light Applications towards Biomedical Diagnostics*. PhD thesis, Texas A & M University, 2015.
- [273] S. Liu, E. Li, and Q. Zhou, “Non-invasive detection system design for blood glucose based on optical rotation properties,” in *2010 3rd International Conference on Biomedical Engineering and Informatics*, vol. 4, pp. 1532–1535, IEEE, oct 2010.
- [274] K. J. Jeon, I. D. Hwang, S. Hahn, and G. Yoon, “Comparison between transmittance and reflectance measurements in glucose determination using near infrared spectroscopy,” *Journal of Biomedical Optics*, vol. 11, no. 1, p. 014022, 2006.
- [275] D. Rohleder, G. Kocherscheidt, K. Gerber, W. Kiefer, W. Köhler, J. Möcks, and W. Petrich, “Comparison of mid-infrared and raman spectroscopy in the quantitative analysis of serum,” *Journal of Biomedical Optics*, vol. 10, no. 3, p. 031108, 2005.
- [276] Qioptiq Photonics GmbH & Co. KG, “CAD Zeichnung der G065088000 Drehhalterung.” https://www.qioptiq-shop.com/out/Graphics/de/00004071_0.zip, Zugriff: 29.10.2018.
- [277] H. Naumann, G. Schröder, and M. Löffler-Mang, *Handbuch Bauelemente der Optik*. Hanser Fachbuchverlag, 2014.
- [278] C. A. C. Arrieta, “Polarimetric glucose determination in the presence of impurities,” Master Thesis, Technische Hochschule Lübeck, 2018.
- [279] T. Paulus, *Studien zur Bildung heterocyclischer Backbone-Modifikationen in Proteinen durch technologische Prozesse*. Herbert Utz Verlag, 1998.
- [280] L. R. Barbosa, M. G. Ortore, F. Spinozzi, P. Mariani, S. Bernstorff, and R. Itri, “The importance of protein-protein interactions on the pH-induced conformational changes of bovine serum albumin: A small-angle x-ray scattering study,” *Biophysical Journal*, vol. 98, pp. 147–157, jan 2010.
- [281] P. A. Williams, A. H. Rose, G. W. Day, T. E. Milner, and M. N. Deeter, “Temperature dependence of the verdet constant in several diamagnetic glasses,” *Applied Optics*, vol. 30, p. 1176, apr 1991.
- [282] R. Yasuhara, S. Tokita, J. Kawanaka, T. Kawashima, H. Kan, H. Yagi, H. Nozawa, T. Yanagitani, Y. Fujimoto, H. Yoshida, and M. Nakatsuka, “Cryogenic temperature characteristics of verdet constant on terbium gallium garnet ceramics,” *Optics Express*, vol. 15, no. 18, p. 11255, 2007.

- [283] A. I. Vitkin and E. Hoskinson, "Polarization studies in multiply scattering chiral media," *Optical Engineering*, vol. 39, p. 353, feb 2000.
- [284] R. Michels, F. Foschum, and A. Kienle, "Optical properties of fat emulsions," *Optics Express*, vol. 16, p. 5907, apr 2008.
- [285] J. S. Baba, *The use of polarized light for biomedical Applications*. PhD thesis, Texas A&M University, 2003.
- [286] D. A. Cough, "The composition and optical rotary dispersion of bovine aqueous humor," *Diabetes Care*, vol. 5, pp. 266–270, may 1982.
- [287] M. Meinke, G. Müller, J. Helfmann, and M. Friebel, "Empirical model functions to calculate hematocrit-dependent optical properties of human blood," *Applied Optics*, vol. 46, p. 1742, mar 2007.
- [288] M. Meinke, G. Müller, J. Helfmann, and M. Friebel, "Optical properties of platelets and blood plasma and their influence on the optical behavior of whole blood in the visible to near infrared wavelength range," *Journal of Biomedical Optics*, vol. 12, no. 1, p. 014024, 2007.

6 Anhang

Messaufbau

Polarimeter

Elektrische Ansteuerung aus Abschnitt 3.1.6

Spannungsreglereinheit

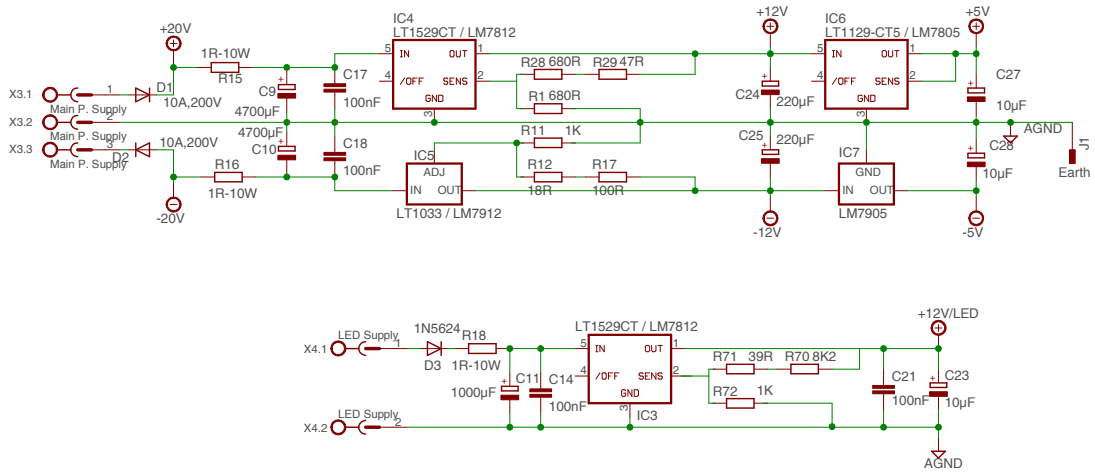


Abbildung 81: Stromversorgung der Steuerungseinheit für LED und Faraday Rotator.

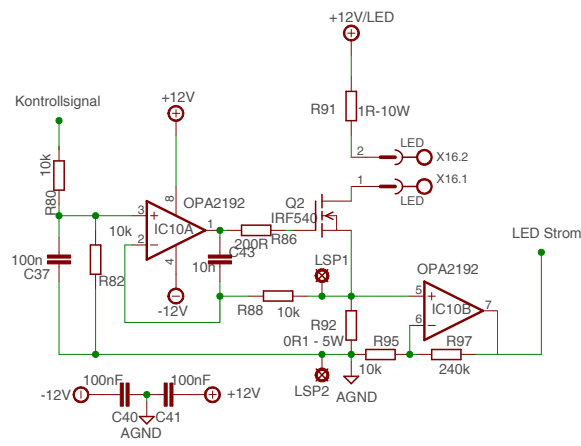


Abbildung 82: Verwendeter Stromtreiber für die LED-Lichtquelle.

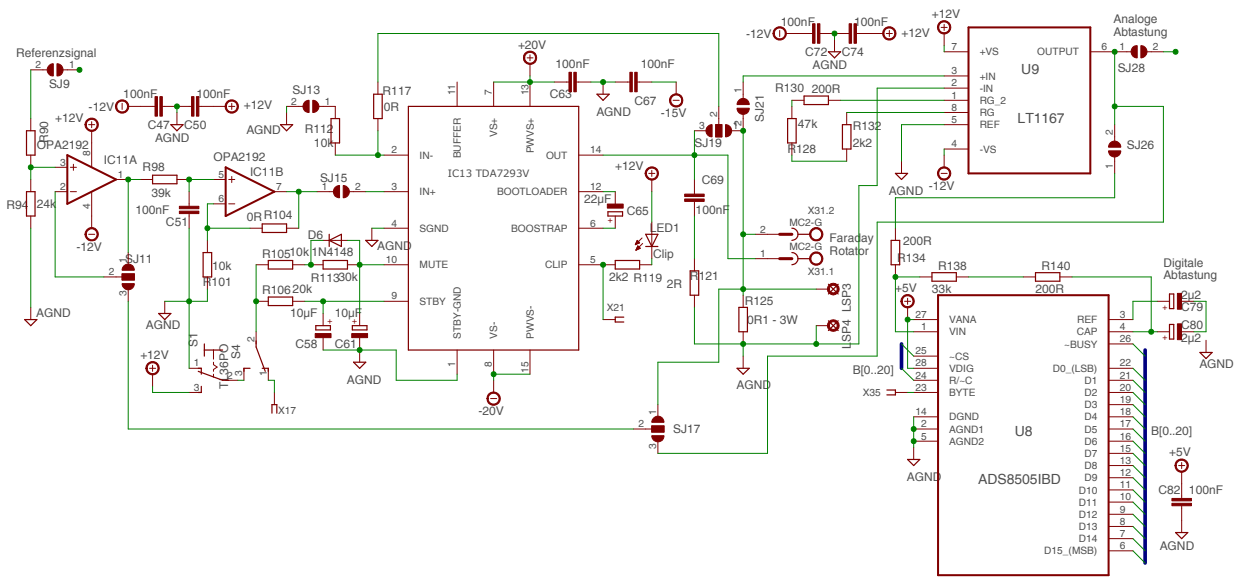


Abbildung 83: Verwendeter Stromtreiber für Faraday-Rotator-Spule.

Mikrocontroller

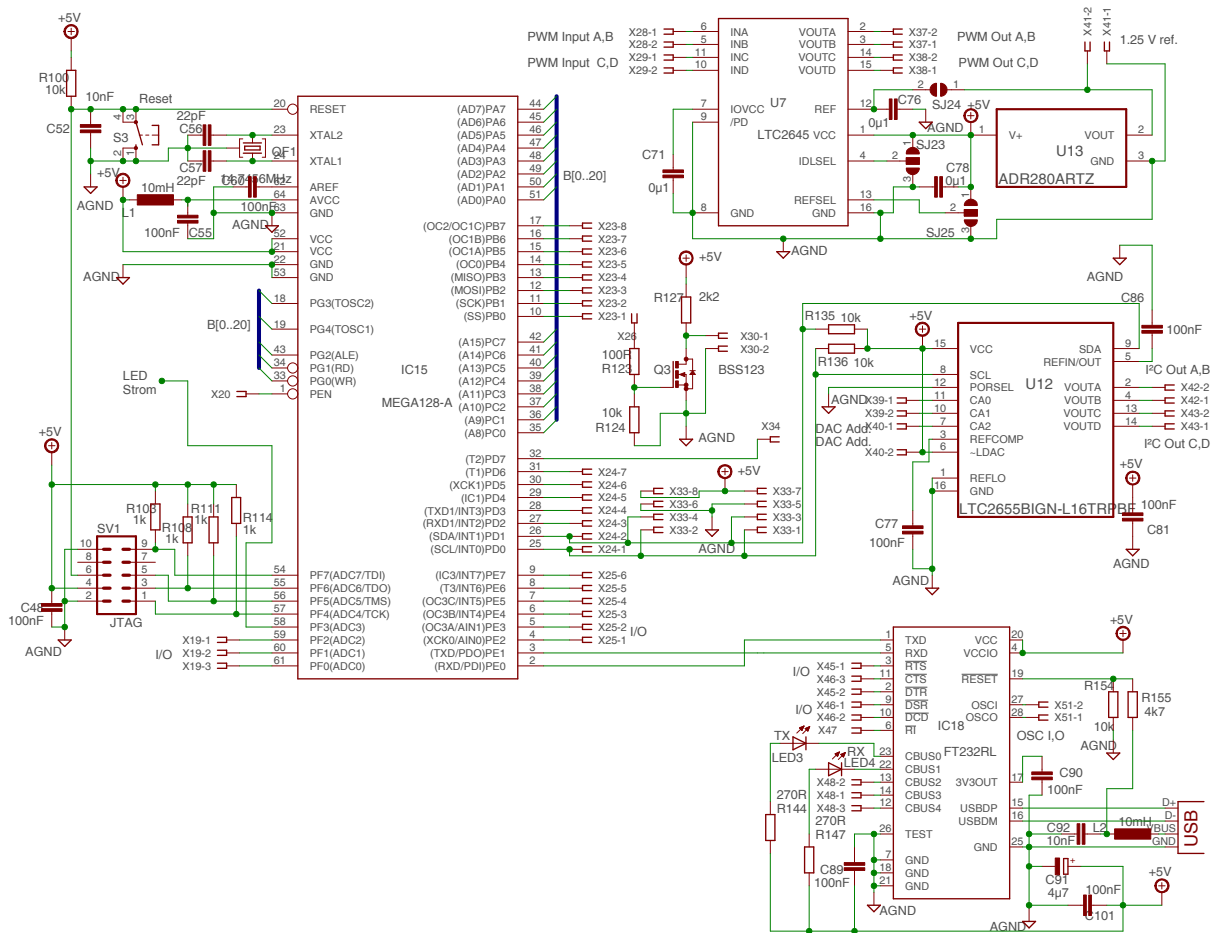


Abbildung 84: Mikrocontroller der Ansteuerungseinheit, der bisher jedoch keine Verwendung fand, da die Datenauswertung, wie in Abschnitt 3.3.3 beschrieben, mit MATLAB erfolgte. Zudem konnten die benötigten Ströme nach Untersuchungen auf ein Maß gebracht werden, welches für sämtliche Messungen als ausreichend angesehen werden kann. Ein Nachregeln des Faraday Offsets zum Abgleich der Messungen ist nicht zielführend, da der Faraday Rotator eine wellenlängenabhängige Drehung hervorruft.

Gleichrichter-Einheit

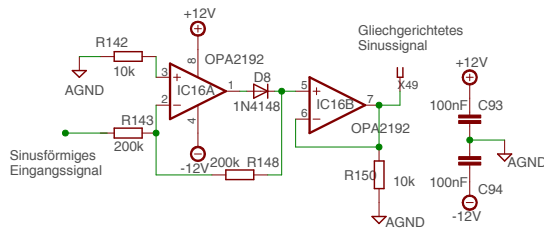


Abbildung 85: Gleichgerichtetes Signal, das aus sinusförmigem Signal ein nadelförmiges Signal macht, welches von Nullpunkt-Detektor in Abbildung 86 gemessen wird.

Nullpunkt-Detektor

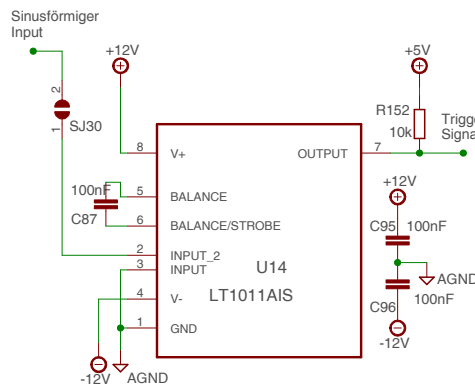


Abbildung 86: Nullpunkt-Detektor zur Erkennung wenn Strom $I = 0 A_{pp}$ beträgt.

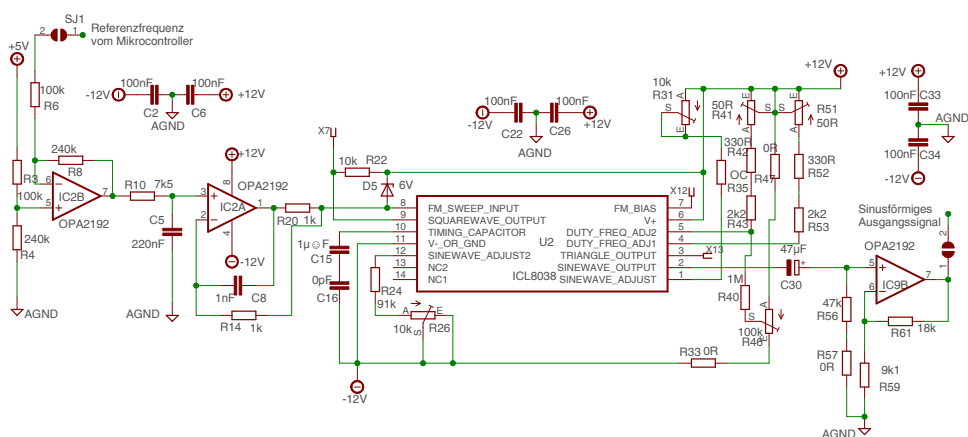


Abbildung 87: Sinusgenerator zur Erzeugung des Modulationssignals für den Faraday Rotator.

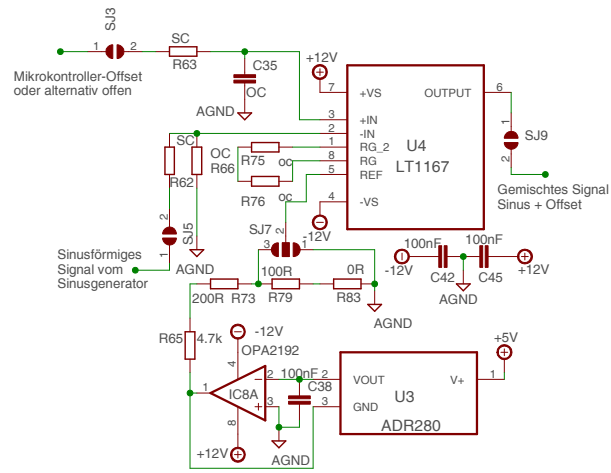


Abbildung 88: Mischer für DC- und Sinussignal.

Gesamter Elektronik-Schaltplan

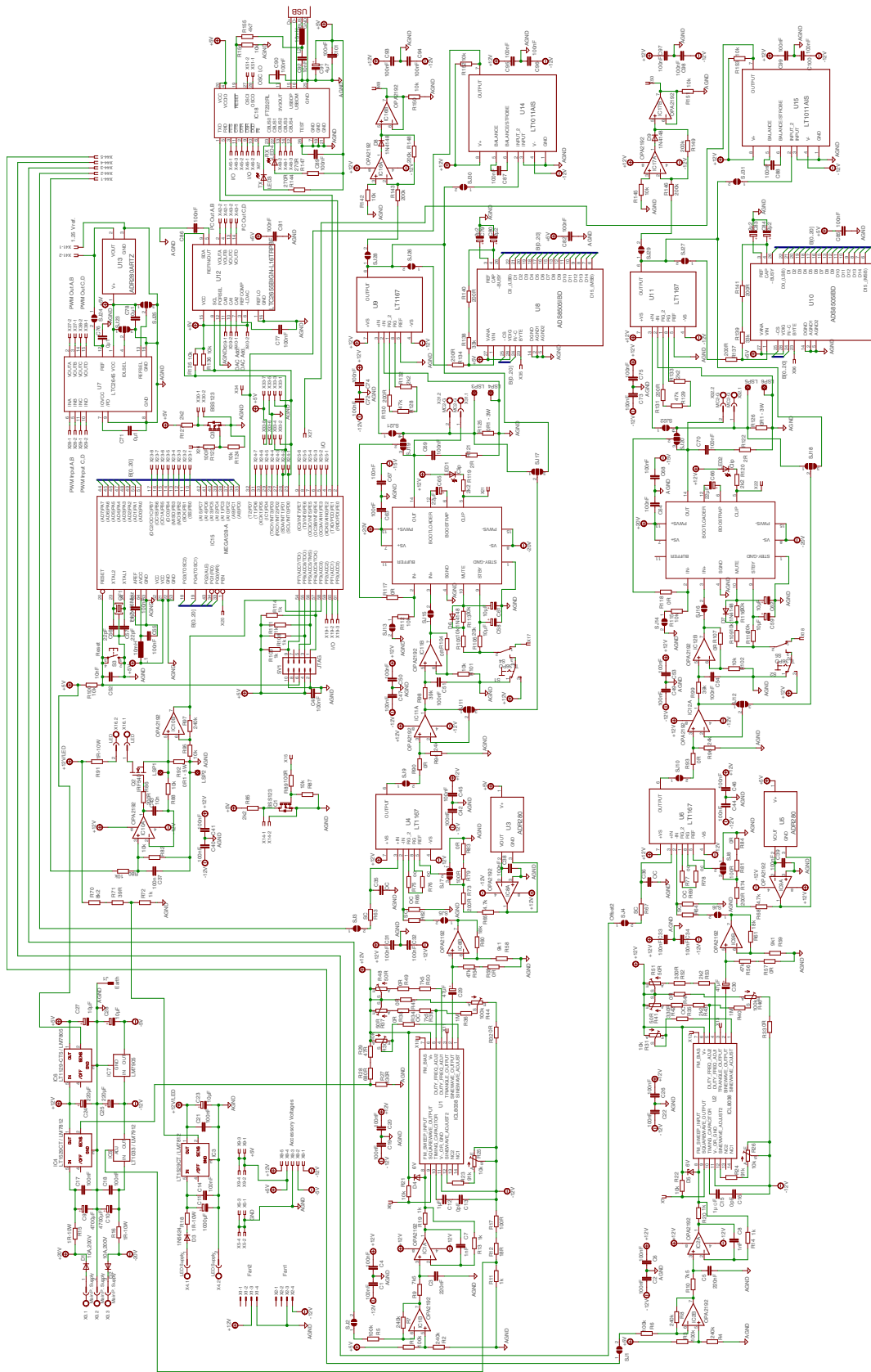


Abbildung 89: Schaltplan der zusammenhängenden Elektronik-Einheit.

Gesamtes Elektronik-Platinenlayout

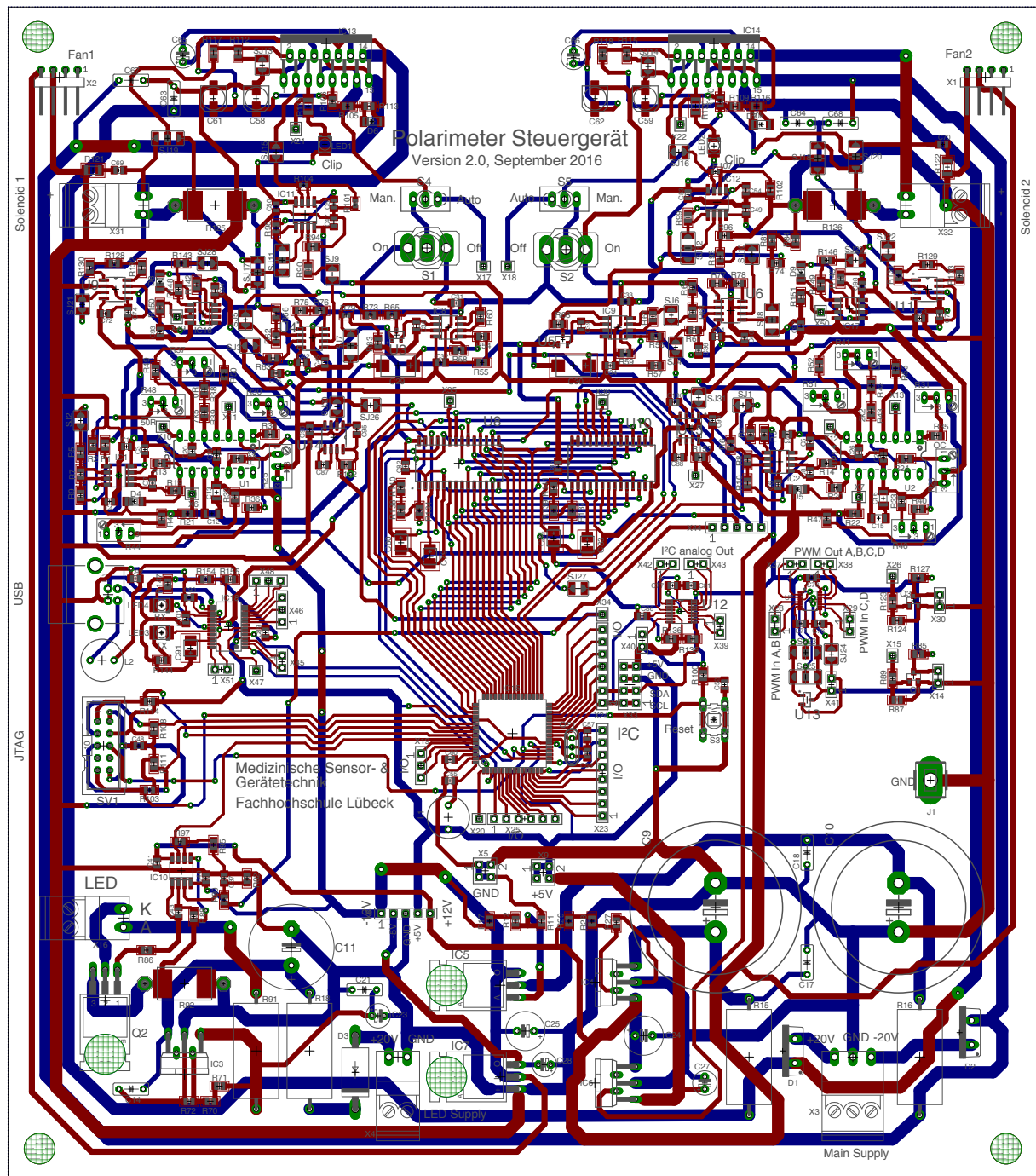


Abbildung 90: Vollständiges Platinen-Layout zur Steuerung der LED-Lichtquelle und des Faraday-Rotators. Die Beschreibung der jeweiligen Einzelkomponenten mit ihrer Funktion erfolgt in Abschnitt 3.1.6.

Steuerungssoftware des Messaufbaus

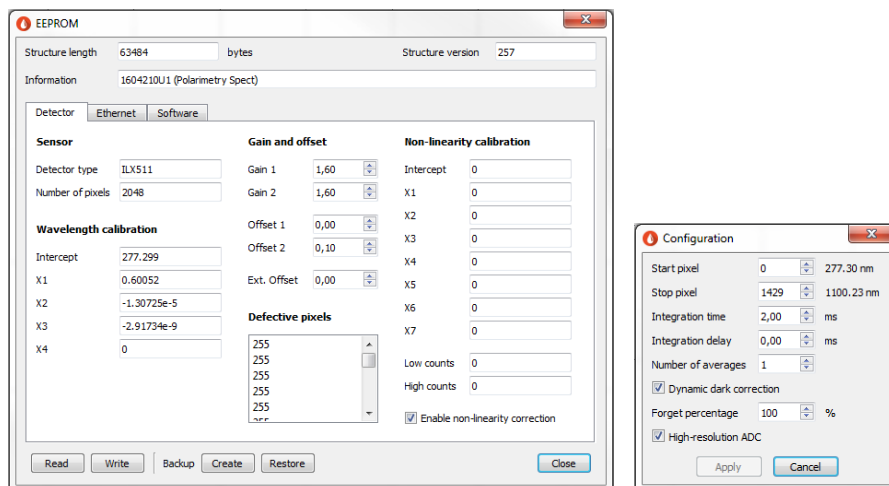


Abbildung 91: Einstellungsmenü der Steuerungssoftware (EEPROM).

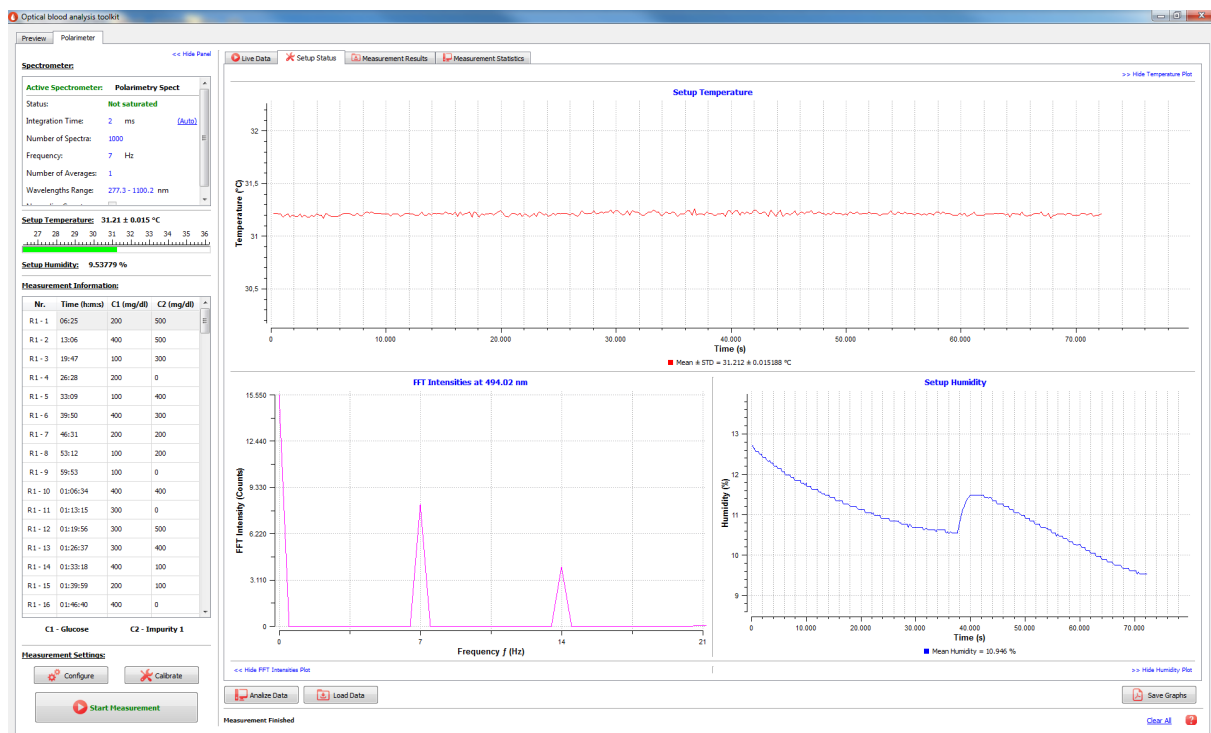


Abbildung 92: Anzeige der Messdaten (Status): Temperatur und Luftfeuchtigkeit.

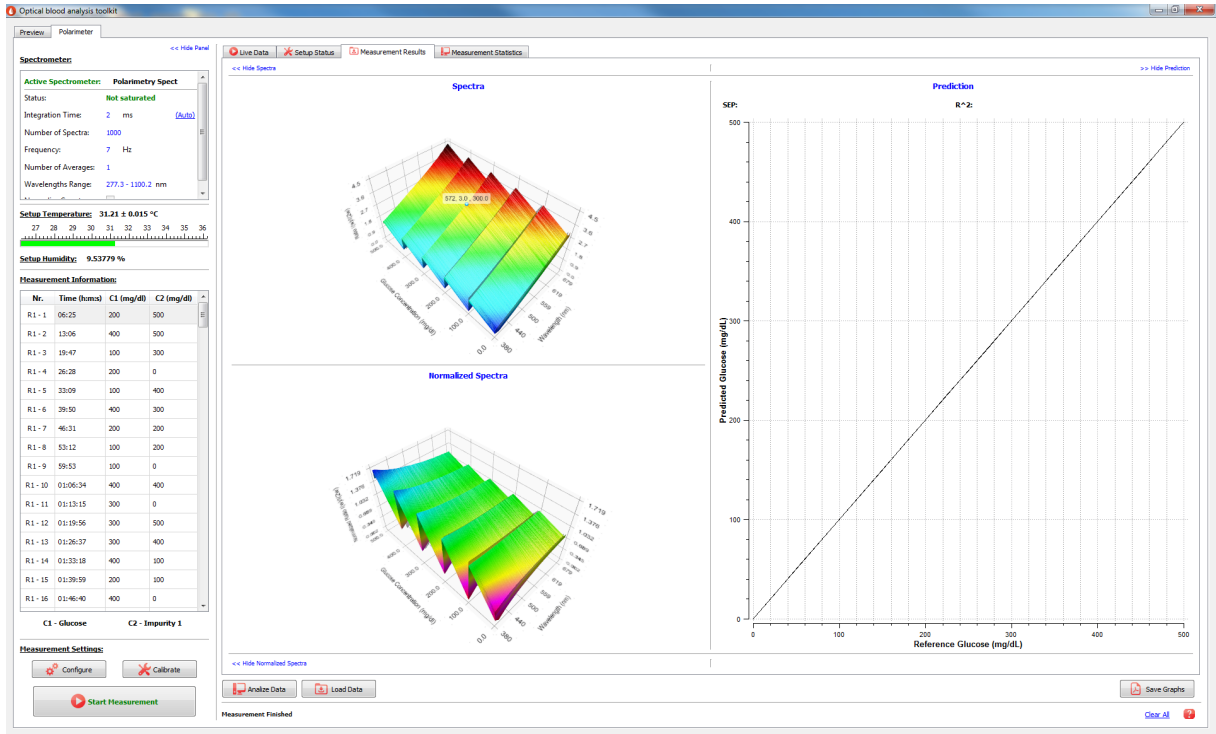


Abbildung 93: Anzeige der Messdaten (Darstellung der Ergebnisse).



Abbildung 94: Anzeige der Messdaten (Konzentrationsvorhersage).

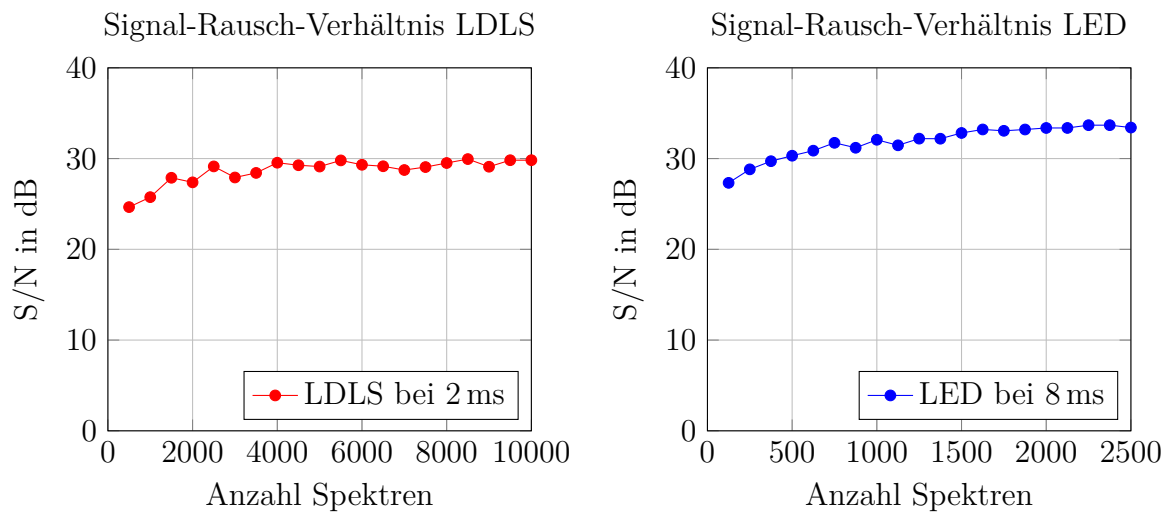
Signal-Rausch-Verhältnis in Abhängigkeit der Spektren-Anzahl

Abbildung 95: Signal-Rausch-Verhältnis in Abhängigkeit der Anzahl aufgenommener Spektren. Links: Bei Verwendung der LDLS und einer Integrationszeit von 2 ms. Rechts: Bei Verwendung der LED und 8 ms Integrationszeit.

Glucose 0-500 mg/dl und 0-250 mg/dl Albumin

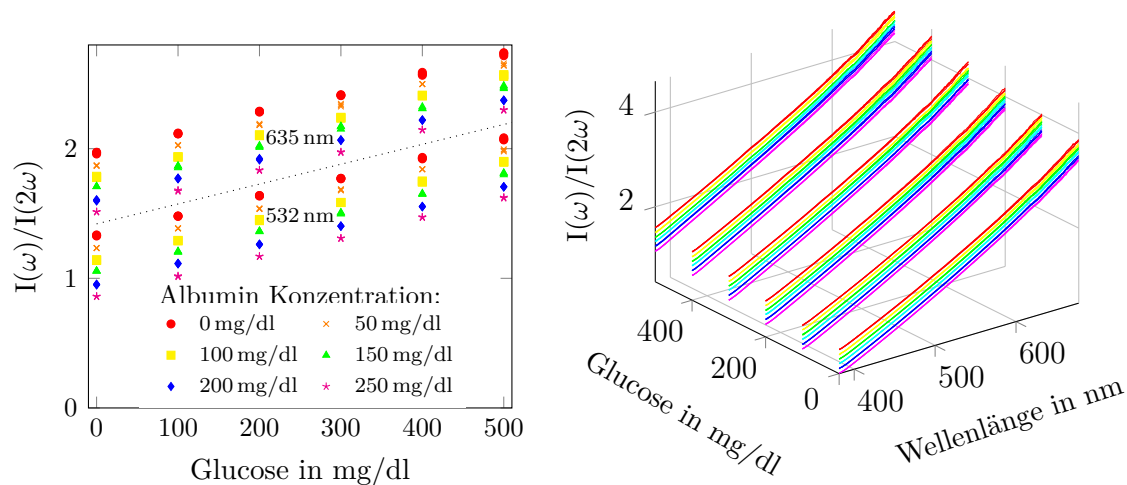


Abbildung 96: $\frac{I(\omega)}{I(2\omega)}$ für 0 – 500 mg/dl Glucose und 0 – 250 mg/dl Albumin. Links: Daten für 532 nm und 635 nm, Rechts: Breitbandige Daten für 380 – 680 nm.

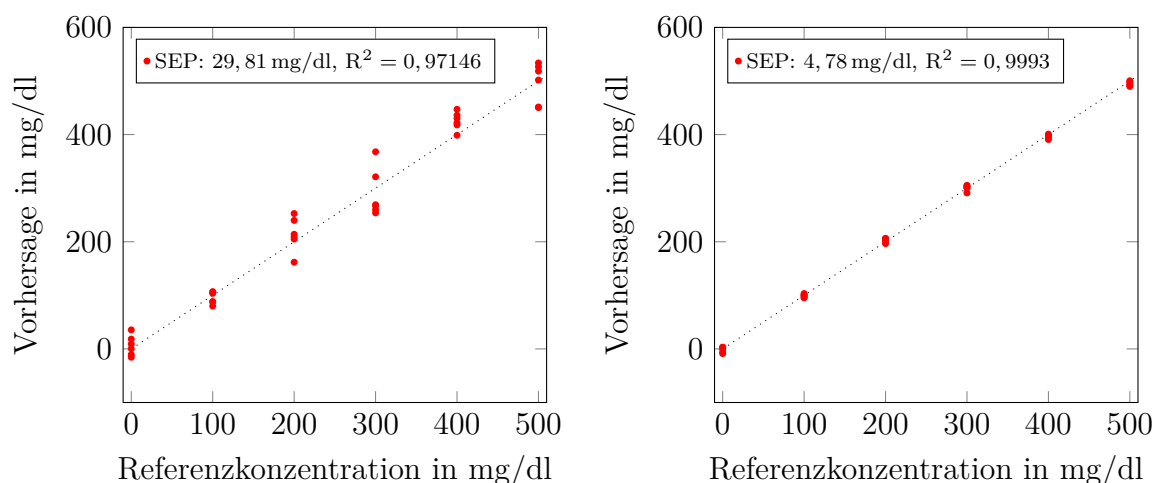


Abbildung 97: Glucose-Vorhersage mit 0 – 250 mg/dl Albumin mittels $\frac{I(\omega)}{I(2\omega)}$. links: 532 nm und 635 nm, rechts: 380 – 680 nm mit 5 PLS-Komponenten.

Glucose 0-500 mg/dl und 0-500 mg/dl Albumin

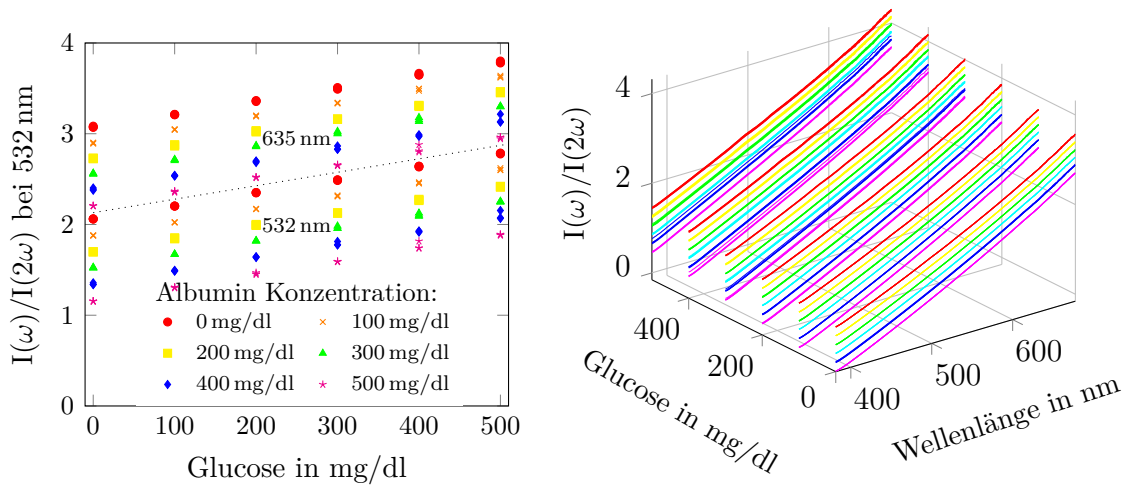


Abbildung 98: $\frac{I(\omega)}{I(2\omega)}$ für Glucose 0 – 500 mg/dl und 0 – 500 mg/dl Albumin. Links: 532 nm und 635 nm, Rechts: Breitbandige Daten für 380 – 680 nm.

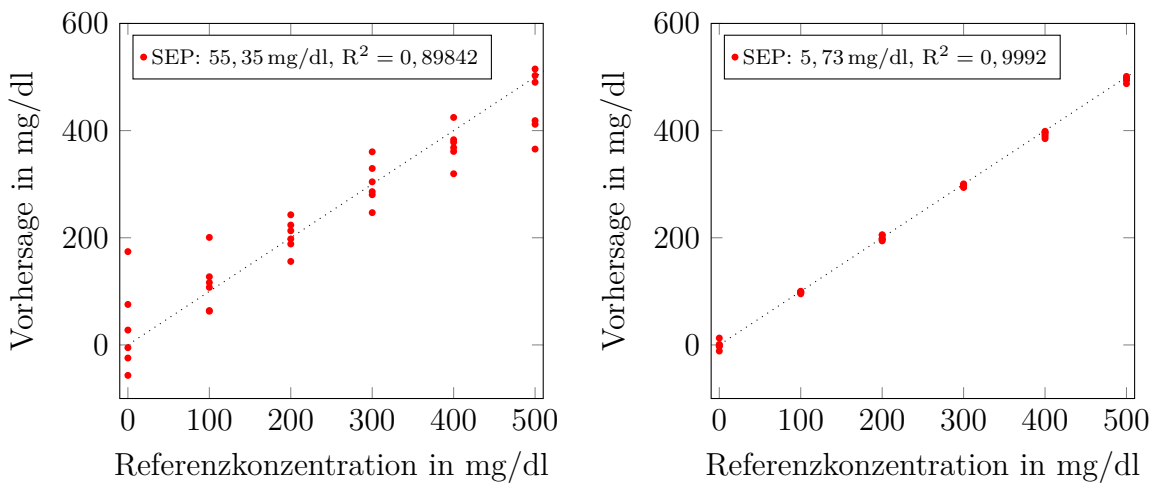


Abbildung 99: Glucose-Vorhersage mit 0 – 500 mg/dl Albumin mittels $\frac{I(\omega)}{I(2\omega)}$. links: 532 nm mit linearer Regression, rechts: 380 – 680 nm mit 5 PLS-Komponenten.

Albumin-Vorhersage in Anwesenheit von 0 – 500 mg/dl Glucose

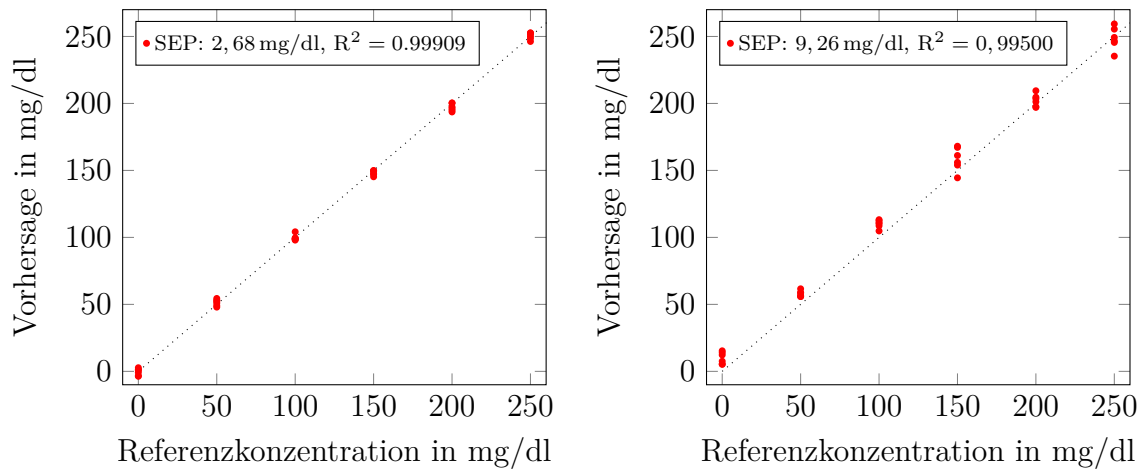


Abbildung 100: Albumin-Vorhersage für 0–250 mg/dl Albumin und 0–500 mg/dl Glucose im Wellenlängenbereich von 380 – 680 nm. links: mittels $\frac{I(\omega)}{I(2\omega)}$, rechts: $I(2\omega)$.

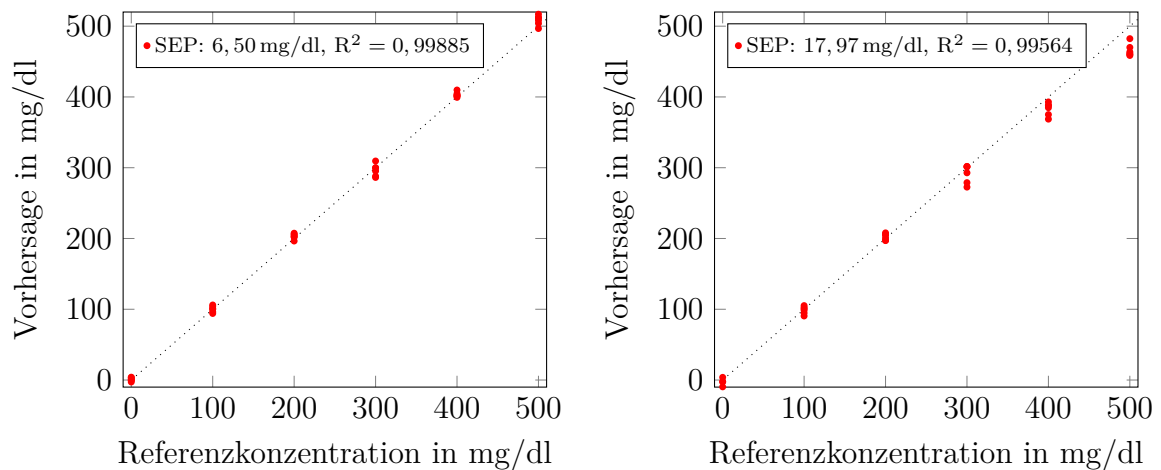


Abbildung 101: Albumin-Vorhersage für 0–500 mg/dl Albumin und 0–500 mg/dl Glucose im Wellenlängenbereich von 380 – 680 nm. links: mittels $\frac{I(\omega)}{I(2\omega)}$, rechts: $I(2\omega)$.

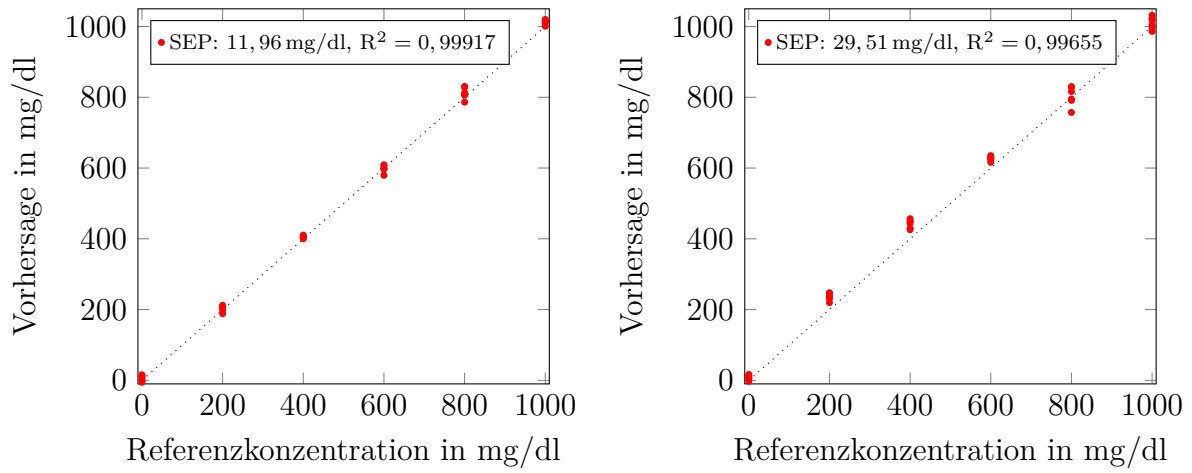


Abbildung 102: Albumin-Vorhersage für 0 – 1000 mg/dl Albumin und 0 – 500 mg/dl Glucose im Wellenlängenbereich von 380 – 680 nm. links: mittels $\frac{I(\omega)}{I(2\omega)}$, rechts: $I(2\omega)$.

Stellungnahme der Ethikkommission der TH Lübeck



**TECHNISCHE
HOCHSCHULE
LÜBECK**

Technische Hochschule Lübeck · Mönkhofer Weg 239 · 23562 Lübeck

Technische Hochschule Lübeck
**Vizepräsident Forschung und
Internationales**
Mönkhofer Weg 239
Dienstgebäude 36
23562 Lübeck

Telefon +49 451 300-5431
Fax +49 451 300-5082
vpfi@th-luebeck.de
www.th-luebeck.de

Mein Zeichen: vo
Datum: 10.12.2019

Hiermit wird bestätigt, dass die unabhängige Ethikkommission der Technischen Hochschule Lübeck, Deutschland, den Antrag für die Entwicklung einer Plattform für die reagenzienfreie optische Multiparameter-Analyse von Blutproben (ProMAB) (Hauptverantwortlich: Prof. Dr. Stefan Müller) überprüft hat und keine ethischen Bedenken gegen die Durchführung des Projekts bestehen.

Mit freundlichen Grüßen

Prof. Dipl.-Ing. Frank Schwartze
Vorsitzender der Ethikkommission der
Technischen Hochschule Lübeck

Seite 1 von 1

Abbildung 103: Stellungnahme der Ethikkommission der Technischen Hochschule Lübeck zur Verwendung verworfener Blutproben.

Stellungnahme der Ethikkommission der Universität zu Lübeck



UNIVERSITÄT ZU LÜBECK

Universität zu Lübeck · Ratzeburger Allee 160 · 23538 Lübeck

Prof. Dr. Stefan Müller
Fachbereich Angewandte Naturwissenschaften
Labor für medizinische Sensor- und Gerätetechnik
Technische Hochschule Lübeck
Mönkhofer Weg 239
23562 Lübeck

Ethik-Kommission

Vorsitzender:
Herr Prof. Dr. med. Alexander Katalinic
Stellv. Vorsitzender:
Herr Prof. Dr. med. Frank Gieseler

Geschäftsstelle: Dr. A. Hüppe
ethikkommission@uni-luebeck.de

Aktenzeichen: 20-028
Datum: 17. Januar 2020

Vorab als E-Mail an felix.fiedler@th-luebeck.de

Anzeige: verkürztes Verfahren

Entwicklung einer Plattform für die reagenzfreie optische Multiparameter-Analyse von Blutproben (ProMAB)

hier: Antragsunterlagen vom 09.01.2020

Sehr geehrter Professor Müller,

die Kommission nimmt das von Ihnen beschriebene Vorhaben, das die Verwendung von Blutspenden aus dem Institut für Transfusionsmedizin des UKSH vorsieht, **zustimmend zur Kenntnis**.

Folgende Dokumente wurden vorgelegt.

- SpenderFragebogen_Markierung.pdf – Allgemeiner Fragebogen für die Spender der Transfusionsmedizin des UKSH
- Antrag_EK_UzL_ProMAB_200109_V01.pdf – Basisformular
- Antrag_EK_UzL_ProMAB_Beschreibung_200108.pdf – Beschreibung des Projekts und der ethischen Fragestellung
- Ethikkommission_ProMAB_Stellungnahme_2019-12_20200107.pdf – Stellungnahme der Ethikkommission der TH-Lübeck
- Antrag_EK_TH_Lübeck_ProMAB_191021.pdf – Antrag an die Ethikkommission der TH Lübeck

Mit freundlichen Grüßen


Prof. Dr. med. Alexander Katalinic
Vorsitzender

Abbildung 104: Stellungnahme der Ethikkommission der Universität zu Lübeck zur Verwendung verworfener Blutproben.

Verwendete Hardware in dieser Arbeit

Tabelle 13: Übersichtstabelle der für den Messaufbau dieser Arbeit verwendeten Hardware

Bauteil	Hersteller	Modellbezeichnung
Lichtquelle	Energetiq Inc., USA	EQ99-X
Polarisationsfilter	Thorlabs GmbH, Deutschland	GT10H
Optisches Glas	Schott GmbH, Deutschland	SF6 und SF59
Spektrometer	Avantes BV, Niederlande	ULS2048-EVO
Spritzenpumpen	Cetoni GmbH, Deutschland	neMESYS 290N
Glasspritzen	ILS GmbH, Deutschland	25 ml H-1/428-PEEK
Optischer Tisch	Newport Spectra-Physics GmbH, Deutschland	VIS Iso-Station
Funktionsgenerator	Hewlett Packard, USA	33120A

Parameter anderer Arbeiten

Tabelle 14: Übersichtstabelle über die Parameter anderer Arbeiten

Autor	Wellenlänge in nm	Pfadlänge in cm	Mod. Freq in kHz	Medium	Temp. in °C
Cote [146]	633	0,9	–	Glucose in H ₂ O	–
King [145]	633	–	12,5	Glucose in H ₂ O	–
King [112]	594 + 633	5	1	Glucose in H ₂ O	25
Jang [249]	630	–	1,2	–	–
Cameron [148]	670	1	1,09	Glu+Alb in H ₂ O	–
Cameron [147]	670	1	1,09	Glucose in H ₂ O	–
Jang [149]	633	–	1,2	Glucose in H ₂ O	–
Cameron [46]	532 + 635	–	1,09	Glu+Alb in H ₂ O	–
Baba [150]	Xenon	1	1,09	Glu,Alb in H ₂ O	15 – 26
Wan [152]	532 + 635	1	1,09	Augenmodell	–
Cameron [153]	635	–	1,09	Auge	–
Malik [154]	635 + 830	–	1,09	–	–
Purvinis [49]	632,8	–	0,976	Auge	–
Clarke [34]	543,5	1	1,073	Glucose in H ₂ O	–
Penzkofer [155]	632,8	–	–	Glucose in H ₂ O	21,5
Mitsui [156]	780	1	6,17	Glucose in H ₂ O	–
Malik [157]	532 + 635	6,5 – 8,5	1,0	Augenmodell	–
Pirnstill [50]	532 + 635	–	1,09	Augenmodell	–

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand während meiner Tätigkeit als wissenschaftlicher Mitarbeiter im Labor für Medizinische Sensor- und Gerätetechnik an der Technischen Hochschule (TH) Lübeck, ehemals Fachhochschule Lübeck.

An dieser Stelle möchte ich all jenen danken, die mich während meiner Promotionsphase unterstützt haben, sei es durch technische Ratschläge, Unterstützung bei den ausführenden Arbeiten oder einfach nur durch ihre mentale Unterstützung. Alle einzeln aufzuzählen ist daher nahezu unmöglich, dennoch ein Versuch.

In erster Linie möchte ich mich bei Prof. Dr.-Ing. Stefan Müller für die Möglichkeit der Projektbearbeitung, die überlassenen Freiheiten und die vielen konstruktiven Ratschläge bedanken, die einen entscheidenden Beitrag zu dieser Arbeit geleistet haben, bedanken. Die angenehme Atmosphäre in der gesamten Arbeitsgruppe hat war ebenso wichtig für den Projekterfolg.

Ein weiterer großer Dank geht an meinen Doktorvater Prof. Dr. rer. nat. Torsten Buzug für die Möglichkeit der Promotion an der Universität zu Lübeck und die entbehrte Zeit, sowie an Prof. Dr. rer. nat. Robert Huber für die Zweitbegutachtung meiner Dissertation und an Prof. Dr.-Ing. Alfred Mertins für die Übernahme des Vorsitzes des Prüfungsausschusses.

Durch Absolvierung des Promotionsprogramms der Graduiertenschule (CDSL) war es mir nicht nur möglich, zahlreiche interessante Weiterbildungen zu besuchen. Bei den regelmäßigen Treffen mit den Betreuern Prof. Dr. rer. nat. Torsten Buzug, Prof. Dr. Philipp Rostalski und Prof. Dr. rer. nat. Bodo Nestler entstanden viele nützliche Ideen, die bei der Umsetzung der Arbeit sehr hilfreich waren.

Nicht zuletzt gilt mein Dank den Mitgliedern der Arbeitsgruppe um Prof. Dr.-Ing. Stephan Klein für die Laborleitung und Dr. rer. nat. Christian Damiani für seine Hinweise und Ratschläge, wie man ein gutes Paper schreibt. Hierdurch habe ich viel gelernt und mit den entsprechender Ausdauer war die Veröffentlichung im *Biomedical Optics Express Journal* letztlich erfolgreich. Bedanken möchte ich mich auch bei meinen Doktoranden-Kollegen Benjamin Redmer, Felix Fiedler und Reza Behroozian, mit denen ich mir das Büro teilen durfte, für die schöne Zeit sowie die gegenseitigen Ratschläge und fachlichen Diskussionen bei Problemstellungen. Ebenfalls geht ein Dank an Tobias Klepsch für die vielen gemeinsamen Mittagessen, da wir uns nicht dem allgemeinen Wettlauf des Labors um den frühesten Zeitpunkt des "Mittagessens" anschlossen, welcher auf natürliche Weise durch die Öffnungszeit der Mensa auf 11.15 h begrenzt wurde. Immer in Erinnerung bleiben wird unser Kollege Jan Krieger, dessen tragischer Tod nach schwerer Krankheit uns alle tief erschüttert hat.

Weiterhin möchte ich mich bei meinen Studenten Sarah Conrad, Melika Ghate, Lena Luers, Cesar Carvajal, Andres Arrieta, Reza Behroozian, Max Hünert, Torben Kruse, Sebastian Rippert und Nils Roedel für die Unterstützung bei konstruktiven Aufgaben und der Durchführung wichtiger Messungen bedanken. Mit euren Praktika, Bachelor- und Masterarbeiten habt ihr zur Fertigstellung meiner Dissertation beigetragen.

Ein weiterer Dank geht an die TH Lübeck für die zur Verfügung Stellung meines Arbeitsplatzes und Werkstatt der TH und Jens Endruschat, der mit seinem Team meine Konstruktionszeichnungen stets präzise und zuverlässig Realität werden ließ.

Zu guter Letzt möchte ich mich noch bei meiner Familie und meinen Freunden bedanken, die an mich geglaubt und durch ihre mentale Unterstützung immer wieder neu motiviert haben und dadurch auch einen nicht unerheblichen Anteil am Erfolg meiner Arbeit hatten.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Christian Stark
geboren am: 21. Juli 1988 in Bad Oldesloe



Schulbildung

1995–1999 Gerhardt-Hauptmann Grundschule, Stockelsdorf
1999–2008 Gymnasium am Mühlenberg, Bad Schwartau
Abschluss: Abitur

Zivildienst

09/2008–05/2009 Jugendherberge Scharbeutz-Uhlenflucht, Klingberg

Studium

09/2009–02/2013 Physikalische Technik, Fachhochschule Lübeck
Abschluss: Bachelor of Science
03/2013–09/2014 Angewandte Physik, Hochschule Rhein Main
Abschluss: Master of Science

Promotion

seit 01/2015 Wissenschaftlicher Mitarbeiter, Technische Hochschule Lübeck

Publikationsliste

- 2015 C. Stark, F. Fiedler and S. Müller, „Evaluation of a multi-wavelength NIR system to determine lactate in human plasma“, *Biomedical Engineering / Biomedizinische Technik*, vol. 60, p. 119
F. Fiedler, C. Stark, S. Müller, „Methods to reduce the light scattering for spectral analysis of blood components“, *Biomedical Engineering / Biomedizinische Technik*, vol. 60, p. 118
F. Fiedler, C. Stark, N. Schmidt and S. Müller, „Development of a cuvette for an optical measurement setup to determine the concentration of blood components“, *Biomedical Engineering / Biomedizinische Technik*, vol. 60, p. 122
- 2016 C. Stark, R. Gänger, F. Fiedler, B. Redmer and S. Müller, „In vitro polarimetric blood component determination in pretreated plasma samples“, *Biomedical Engineering / Biomedizinische Technik*, vol. 61,

p. 44, 2016

C. Stark, R. Gänger, F. Fiedler, B. Redmer and S. Müller, „Spectroscopic lactate determination: An evaluation of prediction accuracy limiting effects“, *Biomedical Engineering / Biomedizinische Technik*, vol. 61, p. 43, 2016

F. Fiedler, R. Gänger, C. Stark, B. Redmer and S. Mueller, „Application of Electrophoresis to Improve Spectral Analysis of Lactate in Blood Plasma“, *Biomedical Engineering / Biomedizinische Technik*, vol. 61, p. 39

F. Fiedler, M. Ripon, C. Stark, B. Redmer and S. Mueller, „Preparation of Human Whole Blood Samples for Spectral Analysis of Solute Blood Components with Magnetophoresis“, *Biomedical Engineering / Biomedizinische Technik*, vol. 61, p. 42

B. Redmer, J. Albrecht, I. Dibbern, C. Stark, F. Fiedler and B. Nestler, „Requirements and design of a fluidic circuit for optical measurements on non-hemolyzed human blood“, *Biomedical Engineering / Biomedizinische Technik*, vol. 61, p. 40

B. Redmer, I. Dibbern, J. Albrecht, C. Stark, F. Fiedler and B. Nestler, „A novel concept for optical concentration determination of hemoglobin derivatives in non-hemolyzed human blood“, *Biomedical Engineering / Biomedizinische Technik*, vol. 61, p. 41

2017

C. Stark, F. Fiedler, B. Redmer, R. Behroozian and S. Müller, „MEMS-FTIR-based reference system for glucose and lactate determination in the NIR wavelength range“, *Biomedical Engineering / Biomedizinische Technik*, vol. 64, p. 148, 2017

C. Stark, R. Behroozian, F. Fiedler, B. Redmer and S. Müller, „Polarimeter compensation methods for drift and scattering effects by using information comprising frequency components“, *Biomedical Engineering / Biomedizinische Technik*, vol. 64, p. 463, 2017

F. Fiedler, A. Schlüter, C. Stark, B. Redmer and S. Mueller, „Concept development and prototyping of a flow cell for blood preparation with acoustophoresis“, *Biomedical Engineering / Biomedizinische Technik*, vol. 62, p. 17

2019

C. Stark, R. Behroozian, B. Redmer, F. Fiedler and S. Müller, „Real-time compensation method for robust polarimetric determination of glucose in turbid media“, *Biomedical Optics Express*, vol. 10, no. 1, p. 308-321, 2019

C. Stark, C. A. C. Arrieta, R. Behroozian, B. Redmer, F. Fiedler and S. Müller, „Broadband polarimetric glucose determination in protein containing media using characteristic optical rotatory dispersion“, *Biomedical Optics Express*, vol. 10, no. 12, p. 6340-6350, 2019

Lübeck, 24. März 2020