

Fortschritte in der Infrarot-Spektroskopie für die in-vivo Blutglucoseanalytik

Vom Fachbereich Chemie
der Universität Duisburg-Essen

zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
genehmigte Dissertation

vorgelegt von
Uwe Damm
aus Lippstadt

Essen 2006

Die vorliegende Arbeit wurde von Mai 2003 bis Juni 2006 am *Institute for Analytical Sciences* unter der Leitung der Herren Prof. Dr. H.W. Siesler und Dr. H.M. Heise durchgeführt.

Referent: Prof. Dr. H.W. Siesler
Korreferent: Prof. Dr. K. Molt

Tag der mündlichen Prüfung: 21.11.2006

Danksagung

Ein ganz besonderes Dankeschön geht an die Herren Prof. Dr. H.W. Siesler und Dr. H.M. Heise; sie hatten immer ein offenes Ohr und waren herausragende Ratgeber bei jedem noch so komplizierten Problem.

Ich danke Herrn Prof. Dr. K. Molt, der trotz der Umstrukturierungsphase an seinem Lehrstuhl Zeit für mich fand und das Zweitgutachten übernahm.

Allen Mitarbeitern des ISAS, vor allem denen, die am CLINICIP-Projekt beteiligt waren, danke ich für die schöne Zeit am Institut: Insbesondere Christian Funke, Thomas Oszinda, Marianne Hillig, Brigitte Stubenrauch, Rüdiger Kuckuk, Venkata Kondepati, Stephan Haiber und Oliver Vogt.

Manfred Bodenlenz und allen Mitarbeiter des ZMF in Graz danke ich für die wundervolle Zeit während der klinischen Studien und insbesondere für die Überlassung des Prototypen zum Nachbau der Mini-Peristaltikpumpe.

Labor Eberhard & Partner führte einen großen Teil der unzähligen Referenzwertbestimmungen durch.

Ich danke meiner Lebensgefährtin Julia Ringeis und meinem Sohn Lukas Knappstein für ihre Geduld und die schönen gemeinsamen Stunden.

Und nicht zuletzt danke ich allen meinen Freunden, im Speziellen der Rollenspielrunde und den *HIFI-Freaks*

Der Mangel an mathematischer Bildung gibt sich durch nichts so auffallend zu erkennen,
wie durch maßlose Schärfe im Zahlenrechnen.

C.F. Gauss

Inhaltsverzeichnis

1	Motivation und Einleitung	10
2	Medizinische Aspekte der Blutglucoseüberwachung	13
3	Grundlagen der IR-Spektroskopie und ihre Anwendung in der Biomedizin	18
3.1	Bisherige Anwendungen der IR-Spektroskopie in der klinischen Chemie .	18
3.1.1	Übersicht	18
3.1.2	IR-spektroskopische Verfahren zur Glucosediagnostik	19
3.2	Schwingungsspektroskopie und Messtechniken	21
3.2.1	Physikalische Grundlagen	21
3.2.2	Messtechniken	22
3.2.3	Kopplung der IR-Spektroskopie mit Mikro-Dialyse	25
4	Modelle und Methoden der Spektrenauswertung	28
4.1	Physikalisches Modell	28
4.2	Statistisches Modell	30
4.2.1	Der PCR-Schätzer	31
4.2.2	Der PLS-Schätzer	32
4.2.3	Kreuzvalidierung	33
4.2.4	Ausreißer	34
4.3	Net Analyte Signal	34
4.4	Spektrale Variablenselektion	36
4.5	Spektrenvorbehandlung	40
4.5.1	Basislinien	40
4.5.2	Signalkorrektur durch orthogonale Projektion	41

5	Glucoseanalytik mit MIR-Spektroskopie und Mikro-Dialyse	44
5.1	Transmission wässriger Proben im mittleren IR	44
5.1.1	Aufbau der Mikro-Transmissions-Durchfluss-Küvette	47
5.1.2	Optisches Filter zur Rauschoptimierung	48
5.1.3	Optimierung der Küvettenschichtdicke	50
5.2	Mehrkomponentenanalytik und Einflussfaktoren	53
5.2.1	Mutarotation	54
5.2.2	Abhängigkeit der Komponentenspektren vom pH-Wert	57
5.2.3	Temperaturabhängigkeit der Komponentenspektren	65
5.2.4	Weitere spektrale Abhängigkeiten und Komponenten	67
5.3	In-vitro Messungen von Dialysaten	71
5.3.1	Dialyse von Blutplasma	72
5.3.2	Kalibrationsergebnisse mit Blutplasma-Dialysaten	76
5.3.3	Kalibrationstransfer für FTIR-Mini-Spektrometer	78
5.3.4	Wiederfindungsrate	81
5.4	Messungen in Kombination mit automatisierter Mikro-Fluidik	87
5.4.1	Software zur Ausführung zeitgesteuerter Messungen	89
5.4.2	Transport flüssiger Proben	91
5.4.3	Analytische Leistungsfähigkeit des Sensorsystems	95
5.5	Klinische Studien	102
5.5.1	Orale Glucose Toleranz Tests	102
5.5.2	Langzeitmessungen über 24 Stunden	109
5.5.3	Studien mit Diabetikern vom Typ 1	111
5.6	Zusammenfassung und Vergleich der Studien	120
6	Zusammenfassung und Ausblick	125
A	Abkürzungen und mathematische Schreibweisen	128
B	WinTest-Skript für kontinuierliche Messungen	130
	Literaturverzeichnis	135

Abbildungsverzeichnis

2.1	Vereinfachte Darstellung des Glucosestoffwechsels.	14
2.2	Methoden der Blutglucosemessung (nach [1]).	16
3.1	Transmission.	22
3.2	Schema der Mikro-Dialyse	26
4.1	Ablaufdiagramm der TABU-Suche.	38
4.2	Vergleich der Stabilität der Resultate von PMMS und TABU-Suche . . .	39
5.1	Schematischer Aufbau des IR200 FTIR-Spektrometers	45
5.2	Schematischer Aufbau des Vector 22 FTIR-Spektrometers	46
5.3	Mikro-Durchfluss-Küvette für Transmissionsmessungen.	46
5.4	Transmission von CaF_2 (Schichtdicke 1 mm) und Langpass-IR-Filter. . . .	48
5.5	Einfluss des Langpass-Filters auf Interferogramm und Einkanalspektrum .	49
5.6	Wasserabsorptionskoeffizient und S/R als Funktion der Schichtdicke . . .	52
5.7	Schichtdickenbestimmung über Fabry-Perot-Interferenzen	52
5.8	Spektrale Zusammensetzung eines EDTA-Blutplasma-Dialysats	54
5.9	Haworth-Projektion von α - und β -D-Glucose.	54
5.10	Mutarotation von Glucose	55
5.11	Vergleich von Mutarotation und Temperaturabhängigkeit	57
5.12	Abhängigkeit der Komponentenspektren vom pH-Wert (1)	58
5.13	Abhängigkeit der Komponentenspektren vom pH-Wert (2)	59
5.14	pH-Wert Abhängigkeit: Glucose und Harnstoff	60
5.15	pH-Wert Abhängigkeit: physiologische Puffersysteme	60
5.16	pH-Wert Abhängigkeit: Lactat und Acetat	60
5.17	Spektrale pH-Wert Bestimmung anhand von Hydrogencarbonat und CO_2	62

5.18	CO_3^{2-} Spektrum	63
5.19	<i>Scatterplots</i> und PWS der Temperaturabhängigkeit	65
5.20	Temperaturabhängigkeit: Bandenverschiebung	66
5.21	Spektren von unterschiedlichen EDTA-Lösungen	68
5.22	Elektrolytabhängige Extinktionsspektren von Hydrogencarbonat	69
5.23	Einfluss verschiedener Apodisationsfunktionen auf das Acetat-Spektrum	71
5.24	In-vitro Aufbau zum dialysieren der EDTA-Blutplasma-Proben.	72
5.25	Glucosereferenzkonzentrationen der EDTA-Blutplasma-Proben	74
5.26	Vergleich der Wiederfindungsrate von Glucose und Harnstoff	75
5.27	PLS-Kreuzvalidierung: Spektren der EDTA-Blutplasma-Dialysate	76
5.28	Quantifizierung mit dem physikalischen Modells für Glucose und Harnstoff	78
5.29	Schräger Strahleinfall in das Interferometer	80
5.30	Extinktionsspektren der Dialysate wässriger Glucoselösungen	83
5.31	Residuen der Wiederfindungsraten-Messung (Blutplasma und Serum)	84
5.32	Wiederfindungsraten-Messung (Glucose)	85
5.33	Wiederfindungsraten-Messung (Harnstoff)	86
5.34	Wiederfindungsraten-Messung (Hydrogencarbonat, Phosphat, Lactat)	86
5.35	Aufbau der Mikro-Fluidik und die Verhältnisse im Schaltventil	88
5.36	Software <i>WinTest</i> zur Ansteuerung der Fluidik.	89
5.37	Flussratenstabilität der verwendeten Spritzenpumpen von TSE Systems	90
5.38	Bestimmung des benötigten Probenvolumens	92
5.39	Dynamik des Probenflusses	93
5.40	Optimierung des Transportvolumens	94
5.41	Langzeitmessung von ELO-MEL- und wässriger Glucoselösung	95
5.42	<i>Treppenstufen</i> -Messung wässriger Glucoselösung	96
5.43	<i>Up-Down</i> -Messung: Extinktionsspektren und Glucosebestimmung	98
5.44	<i>Up-Down</i> -Messung: Konzentrationen der übrigen Komponenten	98
5.45	<i>Langzeit</i> -Messung: Einfluss des atmosphärischen Wassers	99
5.46	”Instabilität” des Interferogramm- <i>Centerbursts</i>	100
5.47	Zusammensetzung eines Dialysat-Extinktionsspektrums	103
5.48	PDMS als Ursache für Ablagerungen auf den CaF_2 Fenstern	104
5.49	Eigenschaftskorrelations- und Mittelwert-Spektren der CM6-Studie	105

5.50	Multivariate Konzentrationsbestimmungen der CM6-Studie	105
5.51	CM6-Studie: Zeitabhängiger Verlauf der Glucosekonzentrationen	106
5.52	CM6-Studie: CEG der ersten beiden Probanden	108
5.53	Ausreißererkenung der Spektren der CM8-Studie	110
5.54	CM8-Studie, Proband 2: CEG und Zeitabhängigkeit	111
5.55	Fotos der Mini-Peristaltikpumpe.	112
5.56	Flussraten der Mini-Peristaltikpumpe.	112
5.57	CM9-Studie, Proband 1: CEG und Zeitabhängigkeit	114
5.58	CM9-Studie, Proband 1: Zusammensetzung eines Dialysat-Spektrums . . .	114
5.59	CM9-Studie, Proband 2: CEG und Zeitabhängigkeit	115
5.60	PLS-Regressionsvektoren mit Glucose und Lactat	116
5.61	CM9, Proband 2: PLS-Kreuzvalidierung mit Dialysat-Referenzwerten . . .	117
5.62	CM9, Proband 2: Konzentrationsbestimmungen des physikalischen Modells	117
5.63	CM9, Proband 2: Zeitlicher Verlauf der Lactat-Konzentration	118
5.64	CM9-Studie, Proband 4: CEG und Zeitabhängigkeit	119
5.65	CEG mit Blutglucosebestimmungen aller Studien	121
5.66	Residuen der spektralen Daten aller klinischen Studien	123

Kapitel 1

Motivation und Einleitung

Diabetes mellitus ist eine der weltweit häufigsten Stoffwechselerkrankungen. Dies ist einer der Gründe, dass die Glucosekonzentration in Körperflüssigkeiten einer der am meisten bestimmten Parameter in der klinischen Chemie ist. Vielseitige Entwicklungen ermöglichen heutzutage eine zuverlässige Glucosekonzentrationsbestimmung in Blut und hiervon abgeleiteten Flüssigkeiten wie Blutplasma und Serum, aber auch in anderen Körperflüssigkeiten wie beispielsweise Urin. In den letzten Jahren haben sich insbesondere unterschiedliche enzymatische Methoden etablieren können. Bei Laborgeräten und Biosensoren wird häufig die Glucoseoxidase als Katalysator für eine Reaktion eingesetzt, bei der die Glucose zu Gluconsäure umgesetzt wird. Amperometrische oder photometrische Verfahren ermöglichen die quantitative Analyse über die Reaktionsprodukte. Daneben wurden auch spektroskopische Verfahren entwickelt, die eine reagenzfreie Bestimmung der Glucose in komplizierten Körperflüssigkeiten erlauben. Schwingungsspektroskopische Methoden wie die Infrarot (IR)-Spektroskopie sind äußerst vielseitig, da sich entsprechende Geräte auch für eine im Labor oder beim Patienten stattfindende Analytik (engl.: *Point of Care*) miniaturisieren lassen.

Zur Motivation der in dieser Arbeit entwickelten analytisch-chemischen Methoden soll der Hintergrund zu den Störungen des Kohlenhydratstoffwechsels beim Menschen ausführlicher beleuchtet werden. Bei gesunden Menschen wird die Blutglucosekonzentration von hormonellen Regulationsmechanismen in einem relativ engen physiologischen Schwankungsbereich gehalten (ca. 70 bis 110 *mg/dL*). Der Kohlehydratstoffwechsel wird hauptsächlich durch die beiden Hormone Insulin und Glucagon beeinflusst. Das Insulin, das in den β -Zellen der Langerhans'schen Zellen der Bauchspeicheldrüse synthetisiert wird, hat eine blutzuckersenkende Wirkung. Diese besteht darin, dass zum einen der Einstrom von Glucose in bestimmte Zellen gesteigert und zum anderen der Glycogenaufbau in der Leber vorangetrieben wird (Verringerung der Gluconeogenese). Der Gegenspieler des Insulins, das in den α -Zellen der Langerhans'schen Inselzellen gebildete Glucagon, hat eine blutzuckersteigernde Wirkung (Steigerung der Glycogenolyse).

Abweichungen vom normalen Blutglucosekonzentrationsbereich, so genannte Hyper- und Hypoglykämien, treten bei verschiedenen Formen des Diabetes mellitus auf. Als Ur-

sache für Hyperglykämien sind teilweiser oder vollständiger Insulinmangel zu nennen, der im nüchternen Zustand oder nach Glucosebelastung bei Patienten ersichtlich wird. Hypoglykämien können nach vermehrtem peripheren Verbrauch von Glucose z.B. nach körperlicher Überanstrengung oder bei reduzierter Nahrungsaufnahme erfolgen. Bei Diabetikern vom Typ 1 führt eine Autoimmunerkrankung zur vollständigen Zerstörung der β -Zellen mit der Folge eines chronischen Insulinmangels. Beim Diabetes mellitus vom Typ 2 zeigt sich eine im Alter zunehmende Resistenz der Zellen gegen das körpereigene Insulin. Diese beiden Krankheiten führen zu erhöhten Blutglucosekonzentrationen, die medikamentös z.B. durch die Gabe geeigneter Insulindosen gesenkt werden müssen, um erhebliche, spätere Gesundheitsschäden zu vermeiden. Ähnliche Symptome sind bei Patienten auf Intensivstationen zu beobachten. Schwere Stoffwechselstörungen führen zu fehlerhaften Reaktionen des hormonellen Systems ebenfalls mit dem Ergebnis von Hyper- und Hypoglykämien.

Die gegenwärtige Praxis der Glucosemessungen reicht von selten - beim Arztbesuch - bis hin zu mehrfach pro Stunde gemessenen Werten bei Patienten auf der Intensivstation. Bei insulinpflichtigen Diabetikern ist eine bis zu sechsmal tägliche Selbstkontrolle mit Hilfe von Teststreifengeräten üblich, um eine verbesserte, jedoch nicht optimale Regulation der Blutglucosekonzentration zu erreichen. Eine eindrucksvolle Studie von Intensivmedizinern in Leuven (Belgien) zeigte, dass die Mortalitätsrate von Patienten auf Intensivstationen bei Einsatz einer intensivierten Insulintherapie erheblich gesenkt werden kann [2]. Eine adäquate Blutglucoseeinstellung ist jedoch mit erheblichem Personalaufwand verbunden. Somit ermöglicht eine Automatisierung kontinuierlicher Glucosemessungen in Verbindung mit der Steuerung einer Insulinpumpe eine deutliche Verbesserung der bisherigen Praxis; hierzu sind regelmäßige Messungen im 10- bis 15-minütigen Rhythmus notwendig.

Zur kontinuierlichen Überwachung der Blutglucose existieren verschiedene Strategien: zum einen werden mit wenig Erfolg direkt implantierbare Biosensoren eingesetzt, zum anderen kombiniert man Biosensoren mit Mikro-Dialysetsonden, mit denen eine ex-vivo Messung der Glucose möglich ist. Ein Vorteil hierbei ist, dass das erhaltene Dialysat weniger komplex zusammengesetzt ist als die entsprechende interstitielle Flüssigkeit im Körper, die sich im die Zellen umgebenden Zellzwischenraum (Interstitium) befindet. Durch die Dialyse unter Verwendung einer semipermeablen Membran lassen sich hochmolekulare Stoffe wie Proteine abtrennen. Dies ist auch für elektrochemisch-enzymatische Biosensoren vorteilhaft, da eine mögliche Sensorvergiftung vermieden bzw. verringert werden kann.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein bettseitiges Sensorsystem auf der Grundlage eines programmierbaren Mini-IR-Spektrometers in Kombination mit einer automatisierten Mikro-Fluidik entwickelt, das eine quasi-kontinuierliche Messung der Glucose mit einem zeitlichen Abstand von 10 Minuten ermöglicht. Eine besondere Herausforderung bestand darin, dass dabei nur geringe Probenvolumina zur Verfügung stehen, da bei der Mikro-Dialyse Flussraten für das Perfusat von ca. $1 \mu\text{L}/\text{min}$ zu realisieren sind.

Ein bedeutender Vorteil der IR-spektroskopischen physikalischen Messmethode ist, dass neben der Glucose noch weitere niedermolekulare Substanzen wie Hydrogencarbonat,

Phosphat, CO_2 , Lactat und Harnstoff quantifiziert werden können, die zusätzliche Informationen über etwaige Stoffwechsellagen liefern. Zum einen lässt sich hiermit auf lebensbedrohliche Komplikationen hinweisen und zum anderen wird Intensivmedizinern ein neuartiges Analysegerät an die Hand gegeben, mit dem zusätzliches Wissen über die physiologischen Rahmenbedingungen bei Intensivstationspatienten online bereitgestellt werden kann.

Eine besondere Problematik der Messtechnik mit Mikro-Dialysekathetern wurde im Laufe der Studien ebenfalls angegangen: Die Wiederfindungsrate bei der Mikro-Dialyse für niedermolekulare Substanzen hängt unter anderem von der Implantationsdauer und der Flussrate der Perfusionslösung ab [3]. Die Verwendung einer geeigneten Marker-substanz im Perfusat ermöglicht die kontinuierliche Bestimmung der Wiederfindungsrate, womit zuverlässige Werte für die interstitielle Glucosekonzentration ermittelt werden können. Hierzu wurden umfangreiche Untersuchungen angestellt, die eine weitere Verbesserung für das Patientenmonitoring erwarten lassen. Ein weiterer Gesichtspunkt war die Automatisierbarkeit des Systems: Die Zuverlässigkeit der kontinuierlichen Messungen wurde durch die Vermeidung von Signaldriften und die Reduzierung des Kalibrierungsaufwands bedeutend gesteigert. Kritische Betriebsbedingungen wie das Auftreten von Mikro-Luftblasen im Dialysat, die andere Biosensoren stark beeinträchtigen können, konnten durch die Optimierung der Fluidik bewältigt werden.

Die vorliegende Arbeit führt zunächst in die medizinischen Grundlagen des Blutglucosestoffwechsels ein. In Kap. 3 wird ein Überblick über Anwendungen der IR-Spektroskopie zur quantitativen Analyse in der klinischen Chemie gegeben. Darauf folgt in Kap. 4 eine Übersicht der mathematischen Werkzeuge zur quantitativen Spektrenauswertung. In Kap. 5 werden Transmissionsmessungen wässriger Proben vorgestellt, woran sich die Ergebnisse der in-vitro Analysen von Blutplasma-Dialysaten anschließen. Durch die Entwicklung einer automatisierten Fluidik konnten verschiedene Experimente im Labor zur Überprüfung der Zuverlässigkeit des Mess-Systems bei Langzeitmessungen durchgeführt werden, um anschließend die Leistungsfähigkeit des Aufbaus bei klinischen Studien unter Beweis zu stellen.

Insgesamt steht mit den zusammengeführten Bauelementen des bettseitigen Messgeräts ein Instrument zur Verfügung, das auch für andere Fragestellungen außerhalb klinisch-chemischer Anwendungen wie beispielsweise beim Monitoring von Bioreaktoren mit Fermentationsprozessen oder bei der Überwachung von Zellkulturen vielseitig eingesetzt werden kann. Die mathematischen Auswertestrategien sind auf minimalen Kalibrierungsaufwand getrimmt worden und lassen sich für anderweitige Anwendungen ebenfalls nutzen.

Kapitel 2

Medizinische Aspekte der Blutglucoseüberwachung

Glucose ist einer der wichtigsten Energieträger des menschlichen Metabolismus. Eine Entgleisung des Glucosestoffwechsels ist mit ernstzunehmenden Komplikationen verbunden. So genannte Hypoglykämien können - wie weiter unten ausgeführt - durch eine Unterversorgung des Gehirns mit Glucose zu lebensbedrohlichen Situationen führen. Demgegenüber verursachen erhöhte Blutglucosekonzentrationen nicht-enzymatische Glykierungen von Proteinen, was die Ursache vieler zellulärer Dysfunktionen ist. Aldehyde - also auch die offenkettige Glucoseform - bilden spontan mit Verbindungen, die Aminogruppen enthalten, so genannte Schiff-Basen. Durch Umlagerungen entstehen daraus Glykierungsendprodukte (AGE, engl.: *Advanced Glycation Endproducts*), die mit physiologischen und pathologischen Vorgängen in Verbindung gebracht werden; insbesondere treten diese Stoffe bei Alterungsprozessen entsprechend auf [4]. Daher ist die Blutglucosekonzentration ein wichtiger Parameter in der medizinischen Diagnostik.

Die Zahl der an Diabetes erkrankten Menschen mit beträchtlichen Störungen des Kohlenhydratstoffwechsels nimmt in der Bevölkerung kontinuierlich zu [5]. Die Mediziner unterscheiden im Wesentlichen zwei unterschiedliche Arten des Diabetes mellitus. Diabetes vom Typ 1 geht mit einer Insuffizienz der Bauchspeicheldrüse einher, verursacht durch eine Autoimmunreaktion des Körpers, die die β -Zellen in der Bauchspeicheldrüse zerstört. Die Krankheit wird zum einen durch genetische Faktoren und zum anderen durch Umwelteinflüsse ausgelöst. Der Anteil der Diabetiker vom Typ 1 an der Bevölkerung bleibt konstant. Eine Insulinresistenz, die beim Typ 2 bzw. Altersdiabetes vorliegt, wird überwiegend durch Bewegungsmangel und falsche Ernährung ausgelöst; eine genetische Veranlagung erhöht das Risiko einer Erkrankung. Der Anteil an Diabetikern vom Typ 2 speziell in der Population der Industriestaaten wächst kontinuierlich an. Die Mediziner erwarten bis zum Jahr 2010 einen Anstieg auf 32.9 Mio. Diabetes-Kranke in der europäischen Bevölkerung [5].

Als Folge eines unbehandelten Diabetes mellitus werden von den Körperzellen Fette an Stelle der Glucose zur Energieversorgung verstoffwechselt. Die Lactat- und Ketonkörper-

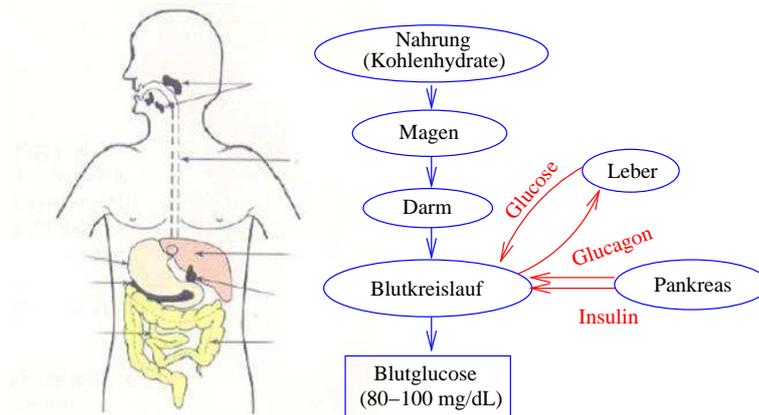


Abb. 2.1: Vereinfachte Darstellung des Glucosestoffwechsels.

Konzentrationen im Blut steigen an, was zur Ketoazidose und damit zur Übersäuerung des Bluts führen kann. Die durch Glykierung von Proteinen verursachten Spätfolgen, die mit kostspieligen Krankheiten verbunden sind, können nicht immer durch geeignete medizinische Versorgung der Kranken reduziert werden.

Einige wichtige Organe, die den Glucosestoffwechsel des Menschen beeinflussen, veranschaulicht Abb. 2.1. Bei der Nahrungsaufnahme durch den Magendarmtrakt steigt die Blutglucosekonzentration. Die Homöostase wird von den im Pankreas produzierten Hormonen Insulin und Glucagon gesteuert. In der Leber eines gesunden Menschen sind ca. 150 g Glucose als Glycogen gespeichert [6]. Das Glucagon veranlasst eine Ausschüttung dieser Reserven und damit ein Ansteigen der Blutglucosekonzentration. Das Insulin ist das Schlüsselmolekül, das den Transport der Glucose vom Blut in die Zellen bewirkt, woraus die senkende Wirkung auf die Blutglucosekonzentration resultiert.

Schon zu Beginn des letzten Jahrhunderts war bekannt, dass Hormone von der Bauchspeicheldrüse produziert werden. Frederick Grant Banting isolierte im Jahr 1921 erstmalig Insulin aus der Bauchspeicheldrüse eines Hundes. Nach einigen Tierversuchen und Selbstexperimenten wurde es erfolgreich einem im Koma liegenden Diabetiker injiziert. In den folgenden Jahren wurde Insulin industriell aus den Bauchspeicheldrüsen von Rindern und Schweinen extrahiert. Heutzutage gibt es gentechnisch modifizierte Varianten, die sich durch die Geschwindigkeit ihrer Wirkung unterscheiden.

Bei Diabetikern vom Typ 1 sind im Rahmen der intensivierten Insulintherapie etwa fünf tägliche Insulininjektionen erforderlich, um eine fast vollständige Normalisierung der Blutglucosewerte zu erreichen. Eine Überdosierung des Insulins führt zu einem Absinken der Blutglucosekonzentration unter den physiologischen Grenzwert, der so genannten Hypoglykämie. Bei dieser lebensbedrohlichen Stoffwechselentgleisung wird das Gehirn nicht mehr ausreichend mit Glucose versorgt, was zur Bewusstlosigkeit und schließlich zum Tod des Patienten führen kann. Insbesondere bei gentechnisch modifizierten, schnell wirkenden Insulinanaloga ist eine häufige Kontrolle der Blutglucosekonzentrationen zur Abschätzung der jeweiligen Dosis wichtig.

Neben dem Krankheitsbild des Diabetes mellitus werden Stoffwechsellentgleisungen bei Patienten auf Intensivstationen durch die stark geschwächten Körperfunktionen verursacht; dies führt ebenfalls zu erhöhten Blutglucosewerten. Üblicherweise wird dann mit mäßigen Insulingaben die Blutglucosekonzentration auf einem annehmbaren Niveau gehalten. Bis vor einigen Jahren galt die Annahme, dass eine grobe Einstellung der Blutglucosekonzentration unter 200 mg/dL genügt, um akute Komplikationen zu vermeiden. Spätschäden durch im Vergleich zum normalen physiologischen Rahmen erhöhte Glucosewerte wurden wegen der kurzen Aufenthaltsdauer auf der Intensivstation als vernachlässigbar eingestuft.

Diese einfache Blutglucoseregulierung ist jedoch mit Komplikationen der Patienten verbunden, wie aktuelle klinische Studien von Intensivmedizinern in Leuven (Belgien) zeigen [2,7,8]. Die Mortalitätsrate bei Intensivpatienten konnte durch Anwendung der intensivierten Insulintherapie um über 40% gesenkt werden. Dabei wird die Blutglucosekonzentration durch vermehrte Gaben von Insulin an die Normwerte angepasst. Da hiermit immer das Risiko einer Hypoglykämie einhergeht, muss diese Therapieform mit häufigen Blutglucosemessungen kombiniert werden. Diese Ergebnisse unterstützten sicherlich die Bewilligung des EU-Projekts CLINICIP (engl.: *Closed Loop INSulin Infusion for Critical Ill Patients*¹) in dessen Rahmen diese Arbeit durchgeführt wurde. In diesem Projekt arbeiten insgesamt 13 europäische Partner an der Entwicklung eines Systems, das letztendlich vollautomatisch die Blutglucosewerte bei Intensivpatienten im Rahmen der physiologisch sinnvollen Grenzen zwischen 80 und 110 mg/dL stabilisieren soll. Ziel dabei ist, eine Insulinpumpe mit einem adaptiven Algorithmus zu steuern, wobei ein kontinuierlich messender Blutglucosesensor die benötigte Messgröße in diesem Regelkreislauf liefert.

Verschiedene Möglichkeiten zur Bestimmung der Glucosekonzentration am Patienten sind in Abb. 2.2 dargestellt. Übliche Praxis der Diabetiker-Selbstkontrolle ist die Messung der Blutglucose mit Teststreifengeräten. Diese benötigen dazu eine Blutprobe, die durch das Einstechen einer Lanzette in den Finger gewonnen wird. Ein Tropfen Blut mit einem Volumen zwischen 0.3 und $3 \mu\text{L}$ wird auf einen Teststreifen aufgetragen; dieser Biosensor enthält in den meisten Fällen Glucoseoxidase (GOD) als Enzym. Die Konzentration des bei der enzymgesteuerten Reaktion entstehenden Wasserstoffperoxyds wird seit einigen Jahren amperometrisch gemessen, worüber nach Kalibrierung die Glucosekonzentration ermittelt werden kann. Bei früheren Teststreifensystemen wurde die Konzentration von den bei der chemischen Reaktion gebildeten Farbstoffen reflexionspektroskopisch bestimmt. In der klinischen Praxis wird dem Patienten eine Blutprobe abgenommen und in einem Analyseautomaten nach einer enzymatischen Reaktion z.B. photometrisch bestimmt. Der personelle Aufwand ist dabei sehr hoch; daher werden Blutglucosemessungen nicht häufig - maximal einige Male pro Tag - durchgeführt.

Eine Verbesserung der Versorgung des Patienten besteht darin, einen Biosensor zu entwickeln, der die Blutglucosekonzentrationen direkt am Patienten ermittelt und kontinuierlich anzeigt, bzw. an den steuernden Prozessrechner einer Insulinpumpe überträgt. Da

¹www.clinicip.org

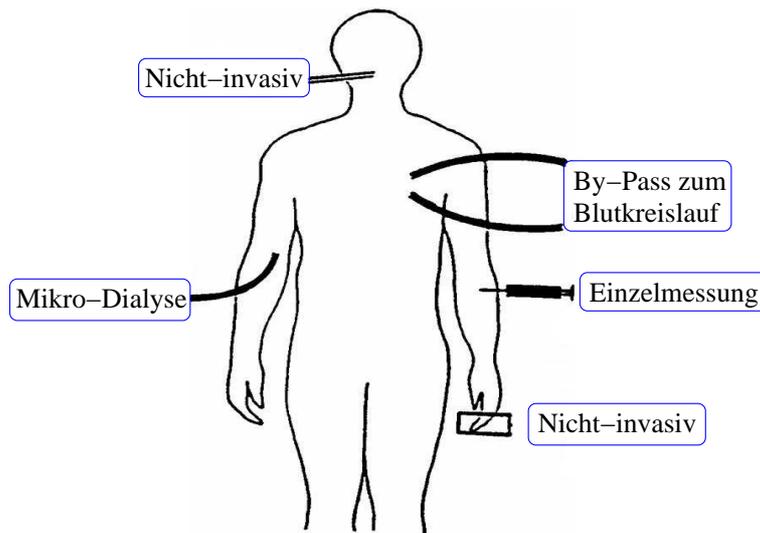


Abb. 2.2: Methoden der Blutglucosemessung (nach [1]).

es schwierig ist, dem Patienten kontinuierlich Blut abzunehmen, ist die Mikro-Dialyse der interstitiellen Körperflüssigkeit eine gering-invasive Alternative zum Gewinnen von Körperflüssigkeit, die anschließend analysiert werden kann [9]. Höherkonzentrierte Bestandteile wie Proteine verbleiben dabei im Organismus und stören die Messung nicht. In der Vergangenheit wurden einige Studien durchgeführt, die zeigen, dass die Glucosekonzentration im Interstitium mit der im Blut korreliert [10–13]. Eine Analyse des Dialysats ermöglicht also eine Bestimmung der Blutglucosekonzentration, dem goldenen Standard der Mediziner zur Einschätzung von Entgleisungen des Glucosestoffwechsels. Die nicht-invasive Blutglucosemessung wird ebenfalls seit vielen Jahren erforscht [14, 15]. Die Genauigkeit genügt jedoch bisher nicht den Anforderungen, die ein *Closed-Loop* System an den Glucosesensor stellt. Kommerzielle Geräte auf der Basis enzymatischer Sensoren zur kontinuierlichen Bestimmung der Blutglucosekonzentration existieren bereits. Zum Beispiel nutzt das Glucoday-System (A. Menarini Diagnostics, Florenz, Italien) die Mikro-Dialyse [16]. Die Gerätezuverlässigkeit und Genauigkeit der Blutglucosebestimmungen in Verbindung mit häufigen Nachkalibrierungen genügt jedoch nicht für die Entwicklung eines künstlichen Pankreas-Systems. Beim CGMS Gold[®] (Medtronic, MiniMed, Northridge, CA), wird der enzymatische Sensor direkt in das subkutane Fettgewebe gestochen [17–20]. Ein solches Gerät wurde bereits experimentell in einem *Closed-Loop* System zur Kontrolle der Blutglucosekonzentration von Intensivpatienten eingesetzt [21]. Die Lebensdauer des Sensors ist jedoch auf 72 Stunden beschränkt.

Im CLINICIP-Projekt werden neben dem in dieser Arbeit vorgestellten noch zwei weitere Konzepte bei der Entwicklung eines Sensors zur Glucoseanalyse in Dialysaten untersucht. Im Rahmen des vorangegangenen europäischen ADICOL-Projekts wurde ein enzymatisch funktionierender Sensor entwickelt, bei dem die Glucosekonzentration amperometrisch ermittelt wird [22]. Dieser Ansatz wird im Rahmen des CLINICIP-Projekts weiterentwickelt. Signaldriften durch eine chemische Veränderung des Sensors sind eines

der wichtigsten zu bewältigenden Probleme bei diesem Verfahren [23]. Ein anderes Konzept ist der ebenfalls auf GOD basierende fluoreszenzspektroskopische Ansatz. Die von der enzymatischen Reaktion verbrauchte Sauerstoffmenge wird durch eine Fluoreszenzmessung bestimmt, wobei der Sauerstoff als die Fluoreszenz abschwächendes Medium wirkt (engl.: *Quenching*). Die anregende und die emittierte Wellenlänge liegen im sichtbaren Spektrum, was die Verwendung einfach zu handhabender und preiswerter optischer Glasfasern ermöglicht [24, 25]. Die bestehenden Defizite dieser Sensorsysteme motivierten auch die Entwicklung eines Systems auf Basis der IR-Spektroskopie, die mit dieser Arbeit erreicht wurde.

Kapitel 3

Grundlagen der IR-Spektroskopie und ihre Anwendung in der Biomedizin

3.1 Bisherige Anwendungen der IR-Spektroskopie in der klinischen Chemie

3.1.1 Übersicht

Die Entwicklung der IR-Spektrometer und effizienter Messtechniken ermöglichte in den letzten Dekaden eine ganze Reihe von Anwendungen der IR-Spektroskopie in der klinischen Chemie und für die medizinische Diagnostik. Als erste Anwendung wurde diese physikalische Methode bereits in den 70er Jahren des letzten Jahrhunderts zur Harnsteinanalyse eingesetzt [26,27]. Sie liefert wichtige Informationen über die Zusammensetzung von Harnsteinen und die zu Grunde liegenden Stoffwechselproblematiken.

Quantitative IR-spektroskopische Messungen an Körperflüssigkeiten wie Urin [28], Speichel [29], Gelenkflüssigkeit [30, 31], Blutplasma [32] oder Dialysaten [33] wurden in den letzten Dekaden durchgeführt. Die multivariate Auswertung der Spektren ermöglicht eine Mehrkomponentenanalyse mit Unsicherheiten der erzielten Konzentrationsbestimmungen, die in der Größenordnung der in der klinischen Praxis verwendeten Referenzmethoden liegen. Die Konzentrationen wichtiger Substanzen wie Glucose, Cholesterin, Triglyceride, Harnstoff, Protein, Phosphat u.a. können so zuverlässig und reagenzfrei bestimmt werden [34].

Die Aufklärung der Struktur und Wechselwirkung von Proteinen, Lipiden, Kohlenhydraten und Nukleinsäuren [35] und die Bestimmung der quantitativen Zusammensetzung bei der Untersuchung von Gewebeproben wurden zum Nachweis unterschiedlicher Krankheiten vorgeschlagen. Dies ermöglicht die Erkennung von Arthritis, multipler Sklerose, Alzheimer und verschiedener Krebsarten. Eine Klassifizierung von Gewebeproben hinsichtlich letzterer Krankheiten mittels IR-Spektroskopie wurde in den letzten Jahren erfolgreich erforscht [36, 37]. Ein großer Schwerpunkt liegt in einer Pathologie mittels IR-

Spektroskopie, mit der eine Klassifizierung der Gewebearten erfolgen kann, ohne dass Färbetechniken der Gewebeschnitte - wie sonst in der Histologie üblich - erforderlich sind. Mittels der IR-Mikroskopie können kleinste Gewebeproben analysiert werden [38], wobei ortsaufgelöste Messungen sogar die Analyse einzelner Zellen ermöglichen.

Ein anderer Einsatzbereich ist die nicht-invasive Diagnostik, bei der vielfach die Nah-Infrarot-Spektroskopie (NIR) zum Einsatz kommt. Mit den größeren Eindringtiefen der Photonen dieses Wellenlängenbereiches gegenüber dem mittleren IR in verschiedene Gewebearten werden entsprechende substanzspezifische Informationen des Gewebes erhalten. Ein Schwerpunkt sind hier nicht-invasive Blutglucosemessungen mittels Hautspektroskopie, deren Zuverlässigkeit und Genauigkeit jedoch noch beträchtlich zu verbessern ist [15, 39, 40]. Weiterentwicklungen kann zum Beispiel die pulsabhängige, zeitaufgelöste IR-Spektroskopie liefern, die zur Eliminierung von Gewebebeeinflüssen herangezogen wird [41, 42]. Eine andere Option besteht in Temperatur modulierten Messungen [43]. Dieses schmerzfreie Verfahren wäre von großem Vorteil für die Patienten, da häufigere Messungen und damit eine verbesserte Versorgung realisierbar wären.

Eine möglichst frühzeitige Diagnose des Diabetes mellitus ist für eine Behandlung erstrebenswert. Bei üblichen Verfahren zur Diabetes-Früherkennung [44] ist dazu eine Blutabnahme in Kombination mit einer klinisch-chemischen Analyse nötig, die wenig Zustimmung in der Bevölkerung findet. Nicht-invasive IR-spektroskopische Verfahren erhielten eine größere Akzeptanz und könnten damit - durch eine frühzeitige Diagnose - die Zahl der Spätfolgen dieser Krankheit deutlich reduzieren [45].

Erfolgreich werden spektroskopische Methoden beispielsweise zur Oximetrie (Bestimmung der Sauerstoffsättigung des Hämoglobins) in verschiedenen Körpergeweben bereits eingesetzt. Das Blutvolumen und der Blutfluss lassen sich hiermit ebenfalls messen. Eine spezielle Anwendung ist das funktionelle Imaging von Gehirnaktivitäten, das mit entsprechenden Mess-Systemen im kurzwelligen NIR realisiert wurde [46]. Einfache auf Diodenlasern beruhende Systeme mit optimierter Wellenlängenauswahl wurden auch zur Brustkrebsdiagnostik vorgeschlagen [47].

Die Methoden der IR-Spektroskopie zum Verfolgen biochemischer Prozesse sind deutlich preiswerter als die bisher verwendeten Verfahren wie Positron-Emissions-Tomographie (PET), Computer unterstützte Tomographie (CAT, engl.: *Computer Aided Tomography*) oder die magnetische Resonanz-Bildgebung (MRI, engl.: *Magnetic Resonance Imaging*). Für den Einsatz in der medizinischen Analytik werden zuverlässige, einfach zu bedienende und kostengünstige Geräte benötigt. Daher ist zu erwarten, dass in der nächsten Zeit wegen der genannten Vorteile der IR-spektroskopischen Methoden auch diese in der Routineanalytik Verwendung finden werden.

3.1.2 IR-spektroskopische Verfahren zur Glucosedagnostik

Die bisher genannten Einsatzmöglichkeiten der IR-Spektroskopie zeigen die Vielseitigkeit der Methode. Im Speziellen ist sie wie bereits erwähnt auch für die Glucoseanalytik in Körperflüssigkeiten geeignet. In den vergangenen Jahren wurde gezeigt, dass

mit Hilfe der IR-Spektrometrie Glucose mit physiologischen Konzentrationen in biologischen Proben bestimmt werden kann. Bereits 1989 wurden mit Hilfe der ATR-Messtechnik Blutplasma- bzw. Vollblut-Proben einer Krankenhauspatientenpopulation von über 100 Personen untersucht [32, 48]. Nach weiteren Verbesserungen im spektralen Signal/Rausch-Verhältnis und der Probenhandhabung wurde eine weitere Studie mit einer zum Teil aus Diabetikern bestehenden Patientengruppe durchgeführt. Die quantitative multivariate Datenanalyse mit einer PLS-Kalibrierung ergab Unsicherheiten in der Bestimmung der Glucosekonzentrationen des Blutplasmas von unter 10 mg/dL [49]. Seitdem sind dazu eine Vielzahl von weiteren Veröffentlichungen erschienen, z.B. [50–54].

Bei der Verwendung getrockneter Proben können Volumina im Submikroliter-Bereich analysiert werden [55]. Diese Methode vermeidet die Problematik der starken IR-Absorption des Wassers im mittleren IR. Forschungen am ISAS, an deren Auswertung ich beteiligt war, zeigen, dass Flüssigkeitsvolumina von 10 nL und geringer - eingetrocknet spektroskopiert - zur Quantifizierung der Glucosekonzentration genügen, um beachtenswerte Ergebnisse zu erzielen [56, 57].

Trotz der guten Ergebnisse dieser Veröffentlichungen zeigen sich Schwierigkeiten, die mit der Komplexität von Körperflüssigkeiten - wie z.B. Blut - verbunden sind. Zum einen erschwert die komplizierte Zusammensetzung der Körperflüssigkeiten die quantitative Auswertung der Spektren, zum anderen führen die im Blut enthaltenen Proteine zu einer Beschichtung der verwendeten Messzellenmaterialien, die nach jeder Messung aufwändig gereinigt werden müssen [49, 58]. Diese Probleme lassen sich durch den Einsatz der Dialyse vermeiden, Dabei wird ein Mikro-Dialysekatheter als *Body-Interface* subkutan in die Haut eingesetzt, um die von großen Molekülen bereinigten Körperflüssigkeiten ex-vivo messen zu können.

IR-spektroskopische Untersuchungen an Dialysaten wurden u.a. bereits in [33] und [59] durchgeführt. Neben Glucose konnten auch Harnstoff- und Phosphat-Konzentrationen mit großer Genauigkeit bestimmt werden. Ein wesentlicher Nachteil speziell bei den Untersuchungen der letztgenannten Veröffentlichung sind die verwendeten großen Probenvolumina im Milliliter-Bereich. Verbesserungen speziell im Hinblick auf kleine Probenvolumina und kontinuierliche Messungen wurden in dieser Arbeit erforscht und die ersten Ansätze bereits veröffentlicht [60–62]. Außerdem wurde die Zusammensetzung der Dialysate im Hinblick auf die im mittleren IR absorbierenden Bestandteile vollständig geklärt. Ebenfalls publiziert wurde die Anwendung des Systems zur Quantifizierung von Harnstoff in Dialysaten [63]. Mit einer Messung der Wiederfindungsrate, die bei der Mikro-Dialyse von verschiedenen Parametern abhängig ist, wird eine verbesserte Bestimmung der Blutglucosekonzentrationen ermöglicht. Damit wird der Einsatz des entwickelten Systems als Sensor für eine künstliche Bauchspeicheldrüse planbar.

Im Folgenden wird die IR-Spektroskopie näher erläutert. Dabei wird speziell auf die in dieser Arbeit verwendeten Verfahren und ihre Optimierung im Hinblick auf zuverlässige, kontinuierliche Messungen der Blutglucosekonzentration eingegangen.

3.2 Schwingungsspektroskopie und Messtechniken

3.2.1 Physikalische Grundlagen

Moleküle können über Molekülschwingungen, die eine Veränderung des Dipolmoments hervorrufen, mit elektromagnetischer Strahlung bestimmter Wellenlänge wechselwirken. Hiermit verbunden sind die Phänomene der Absorption und Emission beim Durchgang elektromagnetischer Strahlung durch Materie. Für die meisten Anwendungen in der Schwingungs- bzw. IR-Spektroskopie wird die Absorption genutzt; sie wird als Funktion der Wellenlänge - bzw. der dazu reziproken Wellenzahl ($\bar{\nu} = 1/\lambda$) gemessen. Der Messbereich der Molekülschwingungsfrequenzen erstreckt sich von der Mikrowellenstrahlung bis hin zum sichtbaren Licht. Er wird in drei Bereiche unterteilt, das ferne IR von 10 bis 400 cm^{-1} in dem u.a. Torsions- und Gerüstschwingungen von Molekülen liegen, das mittlere IR von 400 bis 4000 cm^{-1} mit den dominierenden fundamentalen Schwingungsbanden und das nahe IR von 4000 bis 12800 cm^{-1} , das spezielle Oberton- und Kombinationschwingungsbanden der Moleküle enthält.

Die IR-Spektroskopie ist eine der wichtigsten Methoden der instrumentellen Analytik. Die Absorptionsbanden im mittleren IR sind charakteristisch für spezifische Molekülgruppen wie z.B. CH_3 oder COOH und können für die qualitative Analyse und Strukturaufklärung genutzt werden. Speziell der so genannte Fingerprint-Bereich zwischen den Absorptionsbanden des Wassers bei 700 und 1600 cm^{-1} ermöglicht vielfach eine eindeutige Zuordnung der analysierten Probe. Eine umfangreiche Übersicht spektraler Banden im mittleren IR enthält [64], wobei die Korrelation der Substrukturen mit den entsprechenden Bandenlagen vorgestellt wird. Zu den theoretischen Grundlagen der Schwingungsspektren siehe z.B. [65]. Computerbasierte Spektrenbibliotheken¹ ermöglichen eine automatische Analyse, die den erfahrenen Spektroskopiker bei der Identifizierung unbekannter Substanzen unterstützt.

Mit der heutigen Leistungsfähigkeit der Spektrometer werden anspruchsvolle quantitative Messungen bis in den Spuren-Bereich durchgeführt [66–68]. Nach dem Lambert-Beerschen Gesetz ist die Extinktion einer Substanz proportional zu ihrer Konzentration; dies vereinfacht die quantitative Analyse mit Hilfe der Spektrometrie. Existiert eine so genannte *analytische Bande*, die frei von Überlagerungen der Banden anderer Substanzen in der Probe ist, kann aus der zugehörigen Extinktion direkt auf die Konzentration geschlossen werden. Das ist jedoch nur bei einfachen Proben mit wenigen Komponenten der Fall. Bei komplizierteren Proben, wie z.B. Blutplasma oder Dialysaten, genügt eine univariate Analyse in der Regel nicht, weil sich die Banden der verschiedenen Komponenten überlagern. Um eindeutige Ergebnisse bei großer Selektivität zu erzielen, müssen Spektren über breite spektrale Bereiche mit geeigneten multivariaten chemometrischen Methoden ausgewertet werden, womit auch bei komplizierten Proben eine zuverlässige Analyse möglich wird.

¹z.B. KnowItAll von Bio-Rad-Sadtler.

Eine Übersicht der mathematischen Methoden zeigen beispielsweise die Monographien [69, 70] oder in etwas anwendungsbezogener Weise das Buch von M. Otto [71]. Aktuelle Beiträge finden sich auch auf der Chemometrie-Webseite von J. Trygg (www.chemometrics.se) oder in Zeitschriften wie z.B. *Journal of Chemometrics* und *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*. In Kap. 4 wird ausführlich auf die in dieser Arbeit verwendeten multivariaten Methoden eingegangen. Der rechnerische Aufwand bei der multivariaten Regression zur quantitativen Analyse stellt heutzutage keine Hürde mehr dar. Preiswerte Personal Computer liefern soviel Rechenleistung, dass sich eine Optimierung der Algorithmen nur noch in wenigen Spezialfällen lohnt.

Die Extinktionskoeffizienten des Wassers sind im NIR deutlich kleiner als im mittleren IR, so dass Schichtdicken im Millimeter-Bereich messbar sind [72]. Trotz der im Vergleich zu den fundamentalen Schwingungsbanden weniger spezifischen Oberton- und Kombinationsbanden, findet die NIR Spektroskopie ihre Anwendung in der instrumentellen Analytik [73]. Aufgrund der - im Sinne des Signal/Rausch-Verhältnisses (S/R) - optimalen experimentellen Schichtdicken, die dort mit 1 bis 10 mm um zwei Größenordnungen über denen des mittleren IR liegen, ist der experimentelle Aufwand deutlich geringer. Im NIR verwendbare Quarzglas-Küvetten absorbieren im mittleren IR, so dass dort teure wasserkompatible Materialien wie z.B. CaF_2 oder ZnSe nötig sind. Preiswertere im mittleren IR durchlässige Küvettenfenster wie z.B. aus NaCl sind wasserlöslich und daher bei der Messung wässriger Proben nicht verwendbar.

3.2.2 Messtechniken

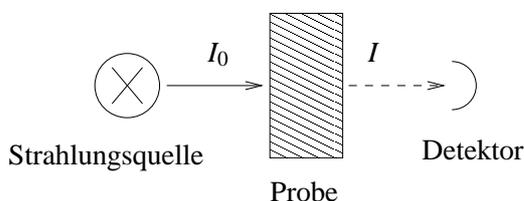


Abb. 3.1: Transmission.

Bei Transmissionsmessungen wird die Abschwächung von Strahlung beim Durchgang durch eine Probe gemessen. Die Transmission ist definiert als das Verhältnis der Strahlungsintensitäten mit und ohne Probe. Die Extinktion ist der negative dekadische Logarithmus der Transmission $A = -\log_{10} I/I_0$. Zur wellenzahlabhängigen Messung der Extinktion kommen unterschiedliche Methoden zum

Einsatz. Um breitere spektrale Messbereiche wie z.B. den gesamten Fingerprint-Bereich abzudecken, werden thermische Strahlungsquellen verwendet, die sich wie ein Schwarzer Strahler verhalten und über einen breiten spektralen Bereich emittieren. Das Intensitätsmaximum ist von der Temperatur der Strahlungsquelle abhängig: im mittleren IR werden Globare bei etwa 1000°C ($\bar{\nu}_{max} = 2500 \text{ cm}^{-1}$) und im NIR Halogenlampen bei etwa 3000°C ($\bar{\nu}_{max} = 6400 \text{ cm}^{-1}$) eingesetzt.

Für die wellenzahlabhängige Messung eines breiten spektralen Bereiches ist ein dispersives Element erforderlich. Früher wurden dazu im sichtbaren und infraroten Spektralbereich Prismen verwendet. Im IR wurden dann Gittermonochromatoren üblich, bei denen ein schmaler spektraler Bereich über einen Spalt ausgewählt wird. Die Spaltbreite legt dabei die spektrale Auflösung der Messung fest: je größer die Spaltbreite, desto größer

ist auch die Strahlungsintensität am Detektor, doch umso geringer ist die resultierende Auflösung.

Im Spektralbereich des mittleren IR sind beispielsweise Michelson-Zweistrahl-Interferometer besser geeignet, die das Herz der Fourier-Transform (FT)-Spektrometer sind. Der Strahl einer breitbandigen Strahlungsquelle wird mit einem Strahlteiler aufgespalten und nach Reflexion an zwei Spiegeln wieder vereinigt. Eine der beiden Weglängen hinter dem Strahlteiler wird durch Parallelverschiebung des entsprechenden Spiegels moduliert. Die durch das Zusammenführen der beiden Strahlen am Strahlteiler entstehende Interferenz, liefert eine von der Weglängendifferenz abhängige Intensität, die abzüglich eines konstanten Amplitudenbeitrags im Idealfall der Cosinus-Transformierten der spektralen Verteilung entspricht. Das von einem Detektor als Funktion der Wegdifferenz aufgezeichnete Interferogramm entspricht damit der Fourier-Transformierten der Strahlungsleistung. Durch inverse Fourier-Transformation wird daraus das Spektrum berechnet.

Bei handelsüblichen FT-Spektrometern kann das Interferogramm über eine Weglängendifferenz von wenigen Millimetern gemessen werden, wobei die außerhalb dieses Bereiches liegende Information nicht zur Verfügung steht. Mathematisch entspricht das einer Multiplikation des Interferogramms mit einer Rechteckfunktion. Die Fourier-Transformation eines Produkts entspricht einer Faltung der Fourier-transformierten Multiplikatoren. Das Abschneiden des Interferogramms führt also zu einer Faltung des Intensitätsspektrums mit der $\text{sinc}(x) = \sin(x)/x$ Funktion. Um die daraus entstehenden Seitenmodulationen der spektralen Banden zu unterdrücken, wird das Interferogramm in der Praxis mit einer speziellen Apodisationsfunktion gewichtet, was immer mit einer Verschlechterung der Auflösung einhergeht. In der Praxis wird die Seitenmodulation also auf Kosten der Auflösung unterdrückt [68, 74].

Neben optischen Elementen im Interferometer gibt es im Spektrometer elektronische dispersive Einflüsse, die zu einer wellenzahlabhängigen Phasenverschiebung des Signals führen, mit der Konsequenz eines nicht mehr zur Maximumposition symmetrischen Interferogramms. Dessen Fourier-Transformierte enthält damit auch komplexe Anteile, die mit Hilfe einer Phasenkorrektur beseitigt werden müssen, um die Spektren zu erhalten. Die nahe liegende Lösung, die Absolutwerte der komplexen Intensitäten zu verwenden, führt zu folgenden Resultaten: Die Basislinie verschiebt sich, zum einen wegen der durch das Rauschen bedingten negativen Intensitäten und zum anderen wegen der Seitenbanden der Apodisationsfunktion. Üblicherweise wird daher die mathematisch aufwändigere Mertz-Phasenkorrektur verwendet [75, 76]. Dabei wird die Phasenverschiebung als $\phi(\bar{\nu}) = \arctan(\text{Im}(\bar{\nu})/\text{Re}(\bar{\nu}))$ aus dem Real- und Imaginärteil eines Spektrums, das über ein kurzes zweiseitiges Interferogramm erhalten wird, berechnet und dann durch Rotation im komplexen Raum in entgegengesetzter Richtung eliminiert.

FT-Spektrometer sind den dispersiven in einigen Punkten überlegen. Der Lichtleitwert eines optischen Systems ist eine Konstante und berechnet sich als Produkt aus Querschnittsfläche des Strahls im Fokus und dem Raumöffnungswinkel. Im Gegensatz zu dispersiven Spektrometern ist, um eine geringe Auflösung zu erzielen, kein Spalt erforderlich, sondern es können relativ große kreisförmige Aperturen verwendet werden. Daraus resultiert ein größerer Lichtleitwert, der den so genannten *Throughput*- oder *Jacquinot*-

Vorteil ausmacht. Die zeitgleiche Messung des gesamten Spektralbereiches erhöht das S/R-Verhältnis um die Wurzel aus der Zahl der spektralen Elemente, was als Multiplex- bzw. *Fellgett*-Vorteil bezeichnet wird.

Eine beachtliche Präzision in der Wellenzahlachse wird durch die Verwendung eines Lasers (engl.: *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*) zum Abtasten des Interferogramms erreicht. Diese Strahlungsquelle zeichnet sich durch eine schmalbandige Emission und eine Langzeitstabilität in der Wellenzahl aus. Das Laser-Signal durchstrahlt das Interferometer parallel zum Strahl der Strahlungsquelle. Mittels eines Schmitt-Triggers wird aus dem cosinusförmigen Intensitätsverlauf am Detektor bei jedem Nulldurchgang ein Steuersignal generiert, das eine Messung des Analog-Digital-Wandlers auslöst. Die Positionsbestimmung des beweglichen Spiegels im Interferometer wird damit reproduzierbar und damit die daraus resultierende Wellenzahlachse genau festgelegt. Hierdurch wird auch die Coaddition von einzelnen Interferogrammen ermöglicht.

Zur Messung der Intensitäten hinter dem Interferometer kommen Photo- und thermische bzw. pyroelektrische Detektoren zum Einsatz. Deren Detektivität $D^*[cm \sqrt{(Hz)}/W]$ limitiert das erreichbare S/R-Verhältnis des Systems. Um den Einfluss des im infraroten Spektralbereich dominierenden Detektorrauschens zu minimieren, werden mit flüssigem Stickstoff gekühlte Halbleiter Detektoren verwendet (z.B. MCT, engl.: *Mercury Cadmium Telluride*, $D^* \approx 10^{10} cm \sqrt{(Hz)}/W$). Um ein bis zwei Größenordnungen schlechter - dafür jedoch bei Raumtemperatur verwendbar - sind die pyroelektrischen Detektoren (z.B. DTGS, deuteriertes Triglycinsulfat, $D^* \approx 5 \times 10^8 cm \sqrt{(Hz)}/W$). Vigo (Warschau, Polen)² bietet Halbleiter-Photodetektoren in Kombination mit einer Peltier-Kühlung an, deren Detektivität bei $D^* \approx 2 \times 10^9 cm \sqrt{(Hz)}/W$ liegt.

Langsame Spektrometerdriften, z.B. durch Raumtemperaturschwankungen, werden durch direkt hintereinander gemessene Proben- und Referenzmessungen eliminiert. Ein gutes S/R-Verhältnis ergibt sich bei optimaler Ausnutzung des linearen Detektionsbereiches der Detektoren. Eine geeignete elektronische Verstärkung transformiert das gemessene Signal auf den Dynamikbereich des Analog-Digital-Wandlers. Das so optimierte S/R-Verhältnis gilt für Proben- und Referenzmessung gleichermaßen; die hierbei gemessenen Intensitäten sollten also im Idealfall übereinstimmen [77]. Daher wird bei wässrigen Proben optimalerweise eine mit Wasser gefüllte Küvette zur Referenzmessung verwendet.

Im mittleren IR absorbiert Wasser in weiten Bereichen sehr stark, so dass nur kleine Schichtdicken um $30 \mu m$ hinreichend große Intensitäten am Detektor zulassen. Geringe transmissionsäquivalente Schichtdicken in der Größenordnung der Wellenlänge sind mit Hilfe der abgeschwächten Totalreflexion (ATR) realisierbar. Mehrfachreflexionen ermöglichen dabei eine optimierte Probenschichtdicke. Ein Kristall mit hohem Brechungsindex - z.B. ZnSe - wird in Kontakt mit der Probe gebracht. Der unter dem Winkel der Totalreflexion an der Innenfläche des Kristalls totalreflektierte Strahl dringt zu einem kleinen Teil in die Probe ein (so genanntes evaneszentes Feld). Bei Absorption durch die Probe wird dieser Anteil abgeschwächt, messbar als Dämpfung in der gemessenen Strahlintensität. Die Eindringtiefe des evaneszenten Feldes ist gering und entspricht et-

²www.vigo.com.pl

wa der Wellenlänge der elektromagnetischen Welle. Die Schichtdicke d_p und damit die Extinktion bei ATR-Messungen ist wellenlängenabhängig [67]:

$$d_p = \frac{\lambda_1}{2\pi \sqrt{\sin^2 \phi_1 - \frac{n_2^2}{n_1^2}}} \quad (3.1)$$

λ_1 ist die Wellenlänge im optisch dichteren Medium. n_1 und n_2 bezeichnen den Brechungsindex im Kristall und in der Probe. Der Einfallswinkel ϕ_1 ist größer als der Winkel der Totalreflexion. Die optische Justage bei ATR Messungen ist aufwändiger als bei Transmissionsmessungen, da der Strahl entweder mit im mittleren IR einsetzbaren Lichtleitern auf den Kristall gelenkt oder durch geeignete Optik auf den Kristall fokussiert werden muss (Micro-Circle-Zelle [78]). Wegen der Verluste, u.a. durch die Fresnelreflexionen an den Oberflächen des Kristalls, müssen unter Raumtemperatur gekühlte Detektoren verwendet werden, um ein hinreichend hohes spektrales S/R-Verhältnis zu erzielen.

Demgegenüber sind Transmissionsmessungen einfacher. Die Messung kleinster Proben volumina im Submikroliter-Bereich ist mit Mikro-Transmissions-Küvetten realisierbar. Gegenüber Wasser beständige Küvettenfenster aus CaF_2 sind auch im Fingerprint-Bereich des mittleren IR durchlässig. Mit dem einfachen optischen Transmissionsaufbau liefern pyroelektrische Detektoren bereits bei Raumtemperaturbetrieb ein gutes S/R-Verhältnis.

Spektrometrische Messungen mit schmalbandigen Strahlungsquellen wie Leuchtdioden (LED, engl.: *Light Emitting Diode*), die jedoch noch nicht im mittleren IR verfügbar sind, oder Lasern sind ebenfalls möglich. Diese zeichnen sich durch große spektrale Intensitäten aus, ermöglichen jedoch aufgrund geringer Abstimmbarkeit nur die Untersuchung schmaler spektraler Bereiche. Bei Existenz einer analytischen Bande sind genaue Messungen möglich. Die Analyse kompliziert zusammengesetzter Proben kann durch Kombination mehrerer derartiger Strahlungsquellen realisiert werden. Quantenkaskaden-Laser emittieren im mittleren IR und wurden bereits zur Glucosebestimmung in wässrigen Medien [79, 80] oder in Serum [81] eingesetzt. Experimente zur nicht-invasiven Quantifizierung von Glucose über photoakustische Spektroskopie der Haut wurden ebenfalls vorgeschlagen [82]. Ebenfalls möglich ist die Verwendung von CO_2 -Lasern, die im spektralen Bereich um 1000 cm^{-1} emittieren [83].

3.2.3 Kopplung der IR-Spektroskopie mit Mikro-Dialyse

Die Mikro-Dialyse wird sowohl in der Forschung, als auch im klinischen Einsatz verwendet, um gering-invasiv und kontinuierlich Körperflüssigkeiten vom Patienten zu gewinnen. Abb. 3.2 zeigt den schematischen Aufbau eines Dialysekatheters, der beispielsweise in das subkutane Fettgewebe der Haut des Patienten eingesetzt wird [3, 84]. Der Katheter enthält eine semipermeable Membran, die durch eine Kapillare mit einer Pumpe und einem Auffanggefäß oder einem Biosensor verbunden ist. Ein Perfusat - mit geeigneter Zusammensetzung und ähnlicher Osmolalität wie die der interstitiellen Flüssigkeit - wird mit geringen Flussraten um $1 \mu\text{L}/\text{min}$ an der Membran entlang gepumpt. Dabei findet

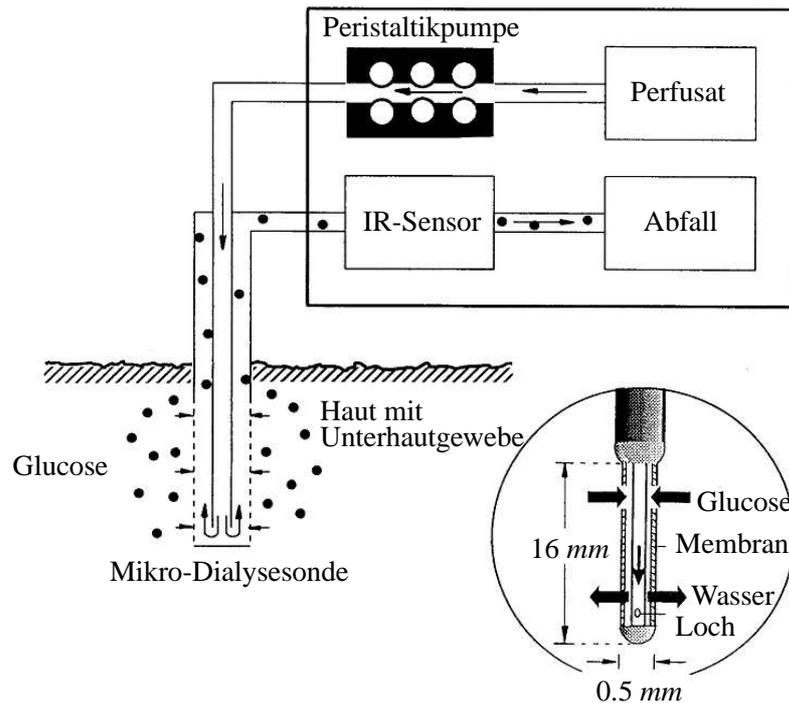


Abb. 3.2: Schema der Mikro-Dialyse [33].

aufgrund von Konzentrationsgradienten ein Austausch von Molekülen mit einer Größe unterhalb des so genannten *Cut-Offs* der Membran (etwa 20 *kDa* bei dem hier verwendeten CMA60 Dialysekatheter von CMA Microdialysis, Stockholm, Schweden) zwischen Interstitium und Perfusat statt. Andere Bestandteile der interstitiellen Flüssigkeit, wie Proteine, verbleiben im Organismus. Die Konzentrationen im so erhaltenen Dialysat korrelieren mit denen in der interstitiellen Flüssigkeit, womit eine kontinuierliche Messung möglich wird.

Die gewählte Kombination von Mikro-Dialyse und *ex-vivo* Bestimmung der Glucose hat den Nachteil, dass die Wiederfindungsraten von der Implantationsdauer der Mikro-Dialysesonde und dem Perfusatfluss abhängig sind. Die Wiederfindungsrate, das Verhältnis zwischen den Molekülkonzentrationen im Dialysat und der interstitiellen Flüssigkeit, sinkt mit wachsender Flussrate. Wiederfindungsraten von beinahe 100% sind nur mit sehr geringen Flussraten unter 1 $\mu\text{L}/\text{min}$ realisierbar [3]. Da es sich um einen Diffusionsprozess handelt, der dem Fickschen Gesetz gehorcht, ist die Diffusionsrate proportional zum Gradienten der Konzentration [85]. Außer von der Durchflussrate ist die Wiederfindungsrate von der Lage der Membran im subkutanen Fettgewebe, der Versorgung des Gewebes von den Blutgefäßen, dem Glucosestoffwechsel der umgebenden Zellen und den Diffusionskoeffizienten der Moleküle abhängig [86].

Bei Verwendung eines geeigneten Markers, der ebenfalls dem Diffusionsprozess unterworfen ist, kann die Wiederfindungsrate aus dessen Konzentration im Dialysat ermittelt werden [3]. Die in den verwendeten Perfusaten vorliegende Osmolalität entspricht dem Wert der interstitiellen Flüssigkeit. Damit ist die Diffusion durch die Dialyse-

sonde richtungsunabhängig, wenn gleiche Flussraten im Zu- und Abfluss des Mikro-Dialysekatheters vorgegeben sind. Zusätzlich muss ein solcher Marker eine konstante Konzentration im Interstitium und im Perfusat aufweisen, um die Wiederfindungsrate zuverlässig bestimmen zu können. Als Marker im Perfusat kommen z.B. Harnstoff oder Acetat in Frage, aus deren Abreicherung eine Wiederfindungsrate ermittelt werden kann. Eine andere Methode basiert auf der Verwendung von elektrolytfreiem Perfusat [87]. Hierbei wird angenommen, dass die Konzentration von Elektrolyten im Interstitium nahezu konstant ist. Mit einer Leitfähigkeitsmessung oder der Flammenphotometrie [88] kann dann die Konzentration der Elektrolyten im Dialysat nachgewiesen und damit die Wiederfindungsrate berechnet werden. Dieser Ansatz wird im Zusammenhang mit den enzymatischen Glucosesensoren angewendet, die von den Sensorpartnern im CLINICIP-Projekt entwickelt werden. Mit der über längere Zeiträume betrachteten nicht konstanten Wiederfindungsrate lässt sich von der Glucosekonzentration im Dialysat auf die im Interstitium schließen. Hiermit wird eine bessere Ermittlung der interstitiellen Konzentrationen möglich, als wenn nur die Dialysekonzentrationen herangezogen werden. Diese werden üblicherweise mittels einer Ein-Punkt Kalibrierung unter Berücksichtigung des Ergebnisses einer gleichzeitigen Vollblut-Messung skaliert. Somit wird eine verbesserte Korrelation der Konzentrationsbestimmungen zu den Blutwerten auch über lange Zeiträume erreicht, die für den Einsatz auf Intensivstationen notwendig ist [89].

Kapitel 4

Modelle und Methoden der Spektrenauswertung

Für die qualitative Spektroskopie werden die Intensitäten bei den Wellenzahlen der Bandenmaxima und deren Verhältnisse untersucht. Bei der quantitativen Analyse wird ausgenutzt, dass die Extinktionen nach dem Lambert-Beerschen Gesetz [90] proportional zu den Konzentrationen sind. Das S/R-Verhältnis spielt hier eine wichtige Rolle. Das Extinktionsrauschen muss minimiert werden, um geringe Konzentrationen genau quantifizieren zu können. Außerdem werden breite spektrale Bereiche für eine selektive quantitative Auswertung verwendet.

Die multivariate Datenanalyse unterscheidet im Wesentlichen zwei Konzepte, die Konzentrationsbestimmungen für neu gemessene Spektren liefern: das so genannte physikalische und das statistische Modell. Beim physikalischen, auch klassisch genannten Modell wird das zu untersuchende Spektrum als Summe der Spektren aller bekannten in der Probe enthaltenen Komponenten dargestellt. Die Skalierungsfaktoren der üblicherweise konzentrationsnormierten Komponentenspektren entsprechen dann den Konzentrationen der einzelnen Komponenten. Beim statistischen bzw. inversen Modell wird aus einem bestehenden Satz von Spektren mit zugehörigen Referenzkonzentrationen ein Regressionsvektor ermittelt, der Konzentrationsbestimmungen mit den zukünftig gemessenen Spektren über das Skalarprodukt ermöglicht.

4.1 Physikalisches Modell

Laut dem Lambert-Beerschen Gesetz ist die Extinktion einer Substanz proportional zu ihrer Konzentration und Schichtdicke. Extinktionen verhalten sich additiv, für Stoffgemische gilt dann:

$$a(\bar{\nu}) = \epsilon_1(\bar{\nu}) d c_1 + \epsilon_2(\bar{\nu}) d c_2 + \dots + \epsilon_k(\bar{\nu}) d c_k \quad (4.1)$$

Dabei ist a die gemessene Extinktion, ϵ_i sind die molaren Extinktionen der Komponenten und deren Konzentrationen c_i . Die Schichtdicke wird mit der molaren Extinktion zur

Extinktion pro Konzentrationseinheit zusammengefasst: $k_i(\bar{\nu}) = \epsilon_i(\bar{\nu}) d$. Schreibt man die bei n diskreten Wellenzahlen abgetasteten Komponentenspektren als Spaltenvektoren einer Matrix, lautet das physikalische Modell in mathematischer Schreibweise:

$$\mathbf{a}_{n \times 1} = \mathbf{K}_{n \times k} \mathbf{c}_{k \times 1} + \mathbf{e}_{n \times 1} \quad (4.2)$$

Das Extinktionsspektrum \mathbf{a} ist hier die abhängige Variable. Die Konzentrationen \mathbf{c} der k Komponenten sind die Parameter. Der Vektor \mathbf{e} berücksichtigt spektrale Unsicherheiten des Modells und der Messung. Die Annahme, dass sich das Gesamtspektrum als Summe der Komponentenspektren darstellt, ist nur in erster Näherung gültig. Fehlerquellen sind z.B. nichtlineare Einflussparameter wie pH-Wert und Temperatur. Matrixeffekte beeinflussen die Form, Position und Amplitude der Extinktionsbanden. Speziell bei wässrigen Proben sind Wasserstoffbrückenbindungen und Hydrathüllen von der Probenzusammensetzung und Temperatur abhängig. Bei schwachen Säuren oder Basen verschiebt der pH-Wert das Dissoziationsgleichgewicht und damit die spektralen Anteile der korrespondierenden Säure-Base-Paare.

Das Gleichungssystem (4.2) lässt sich mittels der Pseudoinversen \mathbf{K}^+ zu den Konzentrationen \mathbf{c} auflösen. Bei vollem Spaltenrang gilt:

$$\mathbf{K}^+ = (\mathbf{K}^T \mathbf{K})^{-1} \mathbf{K}^T \quad \Rightarrow \quad \mathbf{c}_{LS} = \mathbf{K}^+ \mathbf{a} = (\mathbf{K}^T \mathbf{K})^{-1} \mathbf{K}^T \mathbf{a} \quad (4.3)$$

Die Anwendung der Pseudoinversen garantiert, wie folgende Rechnung zeigt, die Minimierung der Summe der Fehlerquadrate (SSE, engl.: *Sum of Squared Errors*)

$$\text{SSE}(\mathbf{c}_{LS}) = (\mathbf{a} - \mathbf{K} \mathbf{c}_{LS})^T (\mathbf{a} - \mathbf{K} \mathbf{c}_{LS}) \quad (4.4)$$

Variation von \mathbf{c} mit $\mathbf{c} = \mathbf{c}_{LS} + \Delta \mathbf{c}$ und Einsetzen in Gl. (4.4) ergibt:

$$\text{SSE}(\mathbf{c}_{LS} + \Delta \mathbf{c}) = \text{SSE}(\mathbf{c}_{LS}) + \Delta \mathbf{c}^T \mathbf{K}^T \mathbf{K} \Delta \mathbf{c} \quad (4.5)$$

Bei vollem Spaltenrang ist $\mathbf{K}^T \mathbf{K}$ stets positiv definit (siehe Kap. 3 in [91]) und die Behauptung damit bewiesen.

Dieses auch mit Classical Least Squares (CLS) bezeichnete Verfahren kann bei Proben mittlerer Komplexität, wie bei den in dieser Arbeit untersuchten Dialysaten, eingesetzt werden. Die Betrachtung des spektralen Residuums, das nach dem skalierten Abzug aller ermittelten Komponenten verbleibt, gibt Auskunft über Unzulänglichkeiten des Modells. Residuen mit Banden, die einen dispersiven Charakter haben, deuten auf Wellenzahlverschiebungen hin; dies entspricht der ersten Ableitung der spektralen Bande nach der Wellenzahl. Eigenschaften, die der zweiten Ableitung gleichen, sind auf Änderungen der Bandenbreite zurückzuführen [92]. Residuen mit Bandenform deuten auf weitere Bestandteile der Probe oder ein verschobenes Dissoziationsgleichgewicht hin. Dieser Einfluss kann experimentell ermittelt und dem aus den bekannten spektralen Komponenten bestehenden physikalischen Modell hinzugefügt werden.

4.2 Statistisches Modell

Beim statistischen Modell sind Parameter und Variable im Vergleich zum physikalischen Modell vertauscht. Aus einem Satz von m Kalibrationsspektren als Zeilenvektoren - $\mathbf{A}_{m \times n}$ - mit zugehörigen Referenzwerten $\mathbf{c}_{m \times 1}$ wird der Schätzer $\mathbf{b}_{n \times 1}$ ermittelt, mit dessen Hilfe aus einem unbekanntem Spektrum die Konzentration bestimmt werden kann.

$$\mathbf{c} = \mathbf{A}\mathbf{b} + \mathbf{e} \quad (4.6)$$

Die Abweichungen vom vorliegenden Konzentrationswert \mathbf{e} werden hier der Referenzmethode, also den Konzentrationen zugeordnet. Anders als beim physikalischen Modell enthält \mathbf{c} nicht die Konzentrationen aller Komponenten, sondern nur die einer einzigen für m verschiedene Messungen. Um ein Kalibrationsmodell mit Hilfe einer statistischen Kalibration aufstellen zu können, wird ein Satz von Spektren mit zugehörigen Referenzkonzentrationen benötigt. Um ein stabiles Kalibrationsmodell zu erhalten, muss der von den Kalibrationsspektren aufgespannte Raum die Schwankungen der unbekanntem Komponenten der Probe erfassen, da weitere nicht-orthogonale Anteile in neu gemessenen Spektren die Konzentrationsbestimmungen stören. Die Ähnlichkeit der Spektren kann mit Hilfe der Mahalanobis-Distanz zum Mittelwert der Kalibrationsspektren getestet werden [93].

Spektrometer liefern bei Messungen von Proben in kondensierter Phase Spektren mit einem Datenpunktabstand, der geringer ist als die Bandenbreite der untersuchten Komponente. Durch die Anwendung des so genannten Zerofills, bei dem das Interferogramm mit Nullen verlängert wird, um die virtuelle spektrale Auflösung zu verbessern, kommen noch weitere Datenpunkte hinzu, so werden für jede Bande mehrere untereinander korrelierte Messwerte gewonnen. Außerdem können Komponentenspektren häufig mehrere Banden im betrachteten Intervall aufweisen. Die Ähnlichkeit der Probenspektren führt zur so genannten Kollinearität der Zeilenvektoren der Spektrenmatrix. Der von den Spektren aufgespannte Raum, hat einen Rang $rk(\mathbf{A}) < n$, der kleiner ist als die Zahl der untersuchten Spektralelemente. Eine Lösung von (4.6) mit Hilfe der vollrangigen Pseudoinversen:

$$\mathbf{b} = \mathbf{A}^+ \mathbf{c} \quad (4.7)$$

wird numerisch instabil. Eine geeignete Auswertung ist daher nur mit Verfahren möglich, die den Rang der Matrix des linearen Gleichungssystems, also die Dimension des spektralen Raums, vor der Matrix-Invertierung erniedrigen. Dies gelingt entweder durch eine Faktorisierung der Spektrenmatrix mit orthogonalen Matrizen und anschließender Auswahl von Basisvektoren oder durch eine Reduktion der Anzahl der spektralen Variablen. Beim ersten Verfahren sind so genannte nicht erwartungstreue Schätzer gegeben, die eine reduzierte Varianz auf Kosten geringer systematischer Fehler erlangen [94].

Die Eigenschaften der in dieser Arbeit verwendeten Verfahren werden im Folgenden zusammengefasst; eine gute Darstellung dazu findet sich in [95]. Zunächst möchte ich dabei auf die Methoden eingehen, die einen großen spektralen Bereich nutzen: zum einen

die Matrix-Invertierung mit Hilfe einer Hauptkomponentenanalyse (PCA, engl.: *Principal Component Analysis*), die die so genannte Hauptkomponentenregression (PCR, engl.: *Principal Component Regression*) ermöglicht und zum anderen die PLS (engl.: *Partial Least Squares*). Später folgen Verfahren, die die Dimension durch Auswahl geeigneter spektraler Variablen reduzieren; diese liefern häufig stabilere Ergebnisse und reduzieren den experimentellen Aufwand durch eine Reduktion der Zahl der spektralen Messpunkte.

4.2.1 Der PCR-Schätzer

Die Hauptkomponentenanalyse der spektralen Daten einer Population von Kalibrationspektren liefert orthogonalisierte Matrizen. Dies entspricht einer Hauptachsentransformation der Spektrenmatrix, alternativ spricht man auch von einer Singulärwertzerlegung der Spektrenmatrix \mathbf{A} : [69, 70, 95].

$$\mathbf{A}_{m \times n} = \mathbf{U}_{m \times m} \mathbf{S}_{m \times n} \mathbf{V}_{n \times n}^T \quad \mathbf{U}, \mathbf{V} : \text{orthonormal} \quad \text{und} \quad \mathbf{S} : \text{diagonal} \quad (4.8)$$

Die Spaltenvektoren des Matrizen-Produkts \mathbf{US} sind die Koeffizienten, auch *Scores* genannt, in dem von den Spaltenvektoren von \mathbf{V} (*Loadings*) aufgespannten Raum, die die Basisvektoren des neuen Koordinatensystems darstellen. Die quadrierten Diagonalelemente der Matrix \mathbf{S} sind die Eigenwerte s_i^2 der Kovarianzmatrix; sie entsprechen den Varianzen in den entsprechenden Richtungen des neuen Koordinatensystems und werden üblicherweise nach abfallender Größe sortiert. Die größte Varianz der spektralen Daten wird durch den ersten Hauptvektor erklärt, die größte Varianz im dazu orthogonalen Unterraum durch den zweiten Hauptvektor usw.

Bei der Anwendung der PCR wird eine Reduzierung der Matrix vor der Invertierung z.B. durch Verwendung der ersten r Hauptkomponenten vorgenommen. Diese enthalten den analytisch wichtigen Anteil der in den spektralen Daten vorhandenen Information, wobei auch eine Separierung von Rauschteilen ermöglicht wird, die mit höheren Faktoren in Verbindung zu bringen sind. Wegen der Orthonormalität von \mathbf{U} und \mathbf{V} mit:

$$\mathbf{U}^T \mathbf{U} = \mathbf{V}^T \mathbf{V} = \mathbf{I} \quad \Rightarrow \quad \mathbf{U}^T = \mathbf{U}^{-1} \quad \text{und} \quad \mathbf{V}^T = \mathbf{V}^{-1} \quad (4.9)$$

gilt für die im Rang reduziert invertierte Matrix das entsprechende Matrizen-Produkt:

$$\mathbf{b}_{r,PCR} = \left(\mathbf{A}^T \mathbf{A} \right)_{r,PCR}^{-1} \mathbf{A}^T \mathbf{c} = \mathbf{V}_{n \times r} \mathbf{S}_{r \times r}^{-1} \mathbf{U}_{r \times m}^T \times \mathbf{c}_{m \times 1} \quad (4.10)$$

Eine Korrelation der ersten und damit signifikantesten Hauptkomponenten mit den Konzentrationswerten der zu analysierenden Komponente ist nicht immer gegeben. Bei Messungen wässriger Glucoselösungen ist die Extinktion des Analyten häufig kleiner, als der Einfluss durch die Extinktion des Wassers. Speziell im nahen IR schwankt diese aufgrund von Temperaturdriften sehr stark. Die größten Varianzen werden also nicht von der untersuchten Komponente verursacht; deren Einfluss wird von den höherwertigen Hauptkomponenten beschrieben. Daher wird auch als Variante eine Auswahl der für die Konzentrationsbestimmung signifikanten Hauptkomponenten herangezogen. Wird der Rang, der

äquivalent zur Anzahl der berücksichtigten Basisvektoren ist, bei der Matrix-Invertierung zu klein gewählt, gehen für das Kalibrationsmodell benötigte Informationen möglicherweise verloren.

Neben der Matrizen-Invertierung kann eine Hauptkomponentenanalyse dazu verwendet werden, den Einfluss eines externen Parameters auf die Extinktionsspektren einer Substanz zu untersuchen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Extinktionsspektren einiger Substanzen z.B. bei unterschiedlichem pH-Wert gemessen. Die Hauptkomponenten zeigen in diesem Fall den durch eine Änderung des Dissoziationsgleichgewichts hervorgerufenen Einfluss der pH-Wert Änderung auf. Über die Größe der Singulärwerte lässt sich die Dimensionalität des Systems und damit die Anzahl der beteiligten Analytkomponenten gegenüber den Einflüssen, die dem Rauschen zugeordnet werden können, abschätzen. Dies wird in dieser Arbeit z.B. zum Analysieren der pH-Wert Abhängigkeit und zur Untersuchung des Temperatureinflusses von Extinktionsspektren (siehe Kap. 5.2) angewendet.

4.2.2 Der PLS-Schätzer

Bei der PLS-Regression wird die Korrelation zwischen Spektren und Referenzkonzentrationen bei der Berechnung eines neuen orthogonalen Basisvektorensatzes berücksichtigt. Dazu wird die Faktorisierung der Spektrenmatrix mit der Lanczos Bidiagonalisierung berechnet [96].

$$\mathbf{A} = \mathbf{P}\mathbf{B}\mathbf{W}^T \quad \text{mit} \quad \mathbf{w}_1 = \frac{\mathbf{A}^T \mathbf{c}}{\|\mathbf{A}^T \mathbf{c}\|} \quad (4.11)$$

Der erste Hauptvektor \mathbf{w}_1 ist das durch die Kovarianz von \mathbf{A} und \mathbf{c} gegebene und entspricht einem normierten Eigenschaftskorrelationspektrum [32] (PWS, engl.: *Property Weighting Spectrum*); damit wird die Faktorisierung eindeutig. Eine Invertierung von im Rang reduzierten Matrizen liefert dann folgende Lösung des linearen Gleichungssystems (4.6):

$$\mathbf{b}_{r,PLS} = (\mathbf{A}^T \mathbf{A})_{r,PLS}^{-1} \mathbf{A}^T \mathbf{c} = \mathbf{W}_{n \times r} (\mathbf{B}_{rxr}^T \mathbf{B}_{rxr})^{-1} \mathbf{W}_{rxn}^T \mathbf{A}^T \mathbf{c} \quad (4.12)$$

Die Varianz der Referenzkonzentrationen der Probenpopulation sollte einen möglichst großen Wertebereich abdecken, dessen Mittelwert nah bei den vorherzusagenden Konzentrationen liegt. Ansonsten kann die so genannte *slope-deficiency* [97, 98] Abweichungen in der Quantifizierung verursachen. Die Steigung der Ausgleichsgeraden zwischen den Referenz- und IR-spektrometrisch bestimmten Konzentrationen ist immer kleiner als die der optimalen Winkelhalbierenden:

$$m = \frac{\Delta c^2}{\sigma_c^2 + \Delta c^2} \quad (4.13)$$

Je kleiner die Varianz Δc^2 der Konzentrationen im Verhältnis zur Varianz der Messfehler σ_c^2 wird, desto flacher wird die Ausgleichsgerade. Damit wächst die Abweichung der

IR-spektrometrischen Bestimmung mit dem Abstand zum Mittelwert der Kalibrationspopulation. Die Unsicherheit in der Konzentration wird also größer, je weiter man sich vom Mittelwert entfernt und desto kleiner die Varianz Δc^2 der Referenzkonzentrationen des Kalibrationsmodells wird.

In der Literatur finden sich Ansätze, die Vorteile des klassischen und des statistischen Modells zu kombinieren [97, 99]. Die größere Selektivität des physikalischen Modells vermeidet dabei Unsicherheiten durch Zufallskorrelationen und die Statistik bei der PLS-Modellierung reduziert Ungenauigkeiten des physikalischen Modells, die z.B. durch experimentelle Fehler bei den Messungen der Komponentenspektren oder auch unerkannte Matrixeffekte verursacht werden.

4.2.3 Kreuzvalidierung

Um die Güte der Konzentrationsbestimmungen eines Kalibrationsmodells abschätzen zu können, wird ein Verfahren benötigt, das dies mit möglichst geringem messtechnischen Aufwand bewerkstelligt. Dazu werden in der Literatur z.B. die *Bootstrap* oder *Jackknife* Methode genannt [100]. Am häufigsten wird in der Praxis jedoch die Kreuzvalidierung (engl.: *Cross-Validation*) angewendet [101, 102]. Dabei wird eine Untermenge von m_1 Datensätzen aus der Gesamtpopulation entfernt. Aus den $m - m_1$ übrigen Datensätzen wird ein Kalibrationsmodell erstellt und damit die Konzentrationen der m_1 Spektren vorhergesagt. Der SEP¹-Wert (engl.: *Standard Error of Prediction*) ist ein Maß für die Ungenauigkeit eines Modells.

$$\text{SEP} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^m (c_{\text{pred},i} - c_{\text{ref},i})^2}{m}} \quad (4.14)$$

$c_{\text{pred},i}$ sind die vorhergesagten Konzentrationen und $c_{\text{ref},i}$ die Referenzwerte. In dieser Arbeit wird der SEP-Wert sowohl bei kreuzvalidierten Konzentrationsbestimmungen mittels der PLS-Kalibrierung als auch bei Quantifizierungen mit Hilfe des physikalischen Modells verwendet. Bei letzterem wird das Modell jedoch nicht aus den Messdaten, sondern über die Bereitstellung von Referenzspektren berechnet. Um den Messaufwand gering zu halten, wird das Verfahren blockweise für alle Datensätze durchgeführt. Die Auswahl von m_1 wird je nach Anwendung unterschiedlich gewählt. Um eine möglichst gute Aussage über das Verhalten der Gesamtpopulation - speziell bei kleinen Datensätzen - zu erhalten kann $m_1 = 1$ genutzt werden (leave-1-out). Um die Stabilität zu überprüfen, werden größere Blöcke (leave-n-out) ausgelassen. Mit dem Ziel den Einfluss systematischer Strukturen in den Datensätzen zu vermeiden, wird die Reihenfolge der Datensätze zufällig vertauscht (leave-n-rnd-out). Bei blockweise strukturierten Daten (z.B. mehrere Spektren für dieselbe Probe) werden jeweils m_1 Blöcke aus der Population entfernt (leave-n-samples-out). Ebenfalls in dieser Arbeit wurden die Daten einer mehrtägigen Studie tageweise (leave-day-out) kombiniert.

¹In der Literatur wird an Stelle der Abkürzung SEP häufig PRESS^{1/2} (engl.: *Predicted Error Sum of Squares*) oder RMSEP (engl.: *Root Mean Squared Error of Prediction*) verwendet.

Die Kreuzvalidierung wird u.a. zur Parameteroptimierung bei der Modellbildung verwendet. Mit dem Minimum des SEP-Wertes als Funktion von der Anzahl verwendeter Basisvektoren wird bei der PCR- oder PLS-Invertierung die Dimension des optimalen Kalibrationsmodells festgelegt. Bei der Wellenzahlauswahl ist der SEP-Wert ebenfalls ein geeignetes Auswahlkriterium, obwohl bei dem bei Auswahl von wenigen spektralen Variablen vielfach überbestimmten Gleichungssystem die Standardabweichung der Regression dem SEP-Wert sehr nahe kommt.

4.2.4 Ausreißer

In [95] werden Verfahren zur Bewertung von Ausreißern vorgestellt. Die Hebelwerte sind die Diagonalelemente $h_m(r)$ der Matrix: $\mathbf{A} \left(\mathbf{A}^T \mathbf{A} \right)_{r, PLS|PCR}^{-1} \mathbf{A}^T$, m ist die Nummer des zugehörigen Datenpaares aus Spektrum und zugehörigem Referenzwert und r ist die Anzahl der verwendeten Basisvektoren bei der Invertierung. Damit lassen sich die studentisierten Residuen: $t_m(r) = (e_m) / (\sigma \sqrt{1 - h_m(r)})$ mit dem Fehler e_m und dessen Standardabweichung σ^2 berechnen. Die Cook-Distanz ist: $D_m(r) = (t_m^2(r) h_m(r)) / (r (1 - h_m(r)))$. Mit dem t-Test lassen sich Datenpaare ermitteln, deren Unsicherheit zu groß ist. Die Cook-Distanz bezieht zusätzlich die Wirkung dieses Datenpaares auf das Kalibrationsmodell mit ein. Mit einem so genannten F-Test wird entschieden, ob gleichzeitig eine große Unsicherheit in der Konzentrationsbestimmung und ein starker Einfluss auf das Kalibrationsmodell vorliegen und es sich damit um einen Ausreißer handelt. Ist die Cook-Distanz klein und der t-Test ergibt eine große Abweichung der Referenzkonzentrationen zum mit dem Modell geschätzten Wert, handelt es sich vermutlich um einen Ausreißer.

4.3 Net Analyte Signal

Im Zusammenhang mit den klassischen und statistischen Kalibrierungen wurden Betrachtungen angestellt, welche spektralen substanzrelevanten Informationen optimalerweise für die Quantifizierung von Komponenten über das Probenspektrum herangezogen werden können. Bei der CLS wird davon ausgegangen, dass die spektralen Beiträge aller zum Probenspektrum beitragenden Komponenten bekannt sind. Unter dieser Voraussetzung definierte Lorber das so genannte *Net Analyte Signal* (NAS) [103, 104]. Dieses entsteht durch orthogonale Projektion eines Komponentenspektrums auf den durch die übrige Population aufgespannten spektralen Raum [105].

$$\mathbf{net}_i = (\mathbf{I} - \mathbf{K}_{-i} \mathbf{K}_{-i}^+) \mathbf{k}_i \quad (4.15)$$

Die Spalten von \mathbf{K}_{-i} enthalten sämtliche Spektren der Population mit Ausnahme der i -ten Komponente \mathbf{k}_i . Die NAS entsprechen bis auf einen Skalierungsfaktor den Zeilenvektoren der Pseudoinversen [98].

$$\mathbf{B} = (\mathbf{K}^T \mathbf{K})^{-1} \mathbf{K}^T, \quad \mathbf{net}_i = \frac{\mathbf{b}_i}{\|\mathbf{b}_i\|^2} \quad (4.16)$$

Eine geometrische Motivation für diese Aussage ist, dass wegen $\mathbf{BK} = \mathbf{I}$ die Zeilenvektoren der Pseudoinversen \mathbf{b}_i orthogonal zu den Spaltenvektoren der Komponentenmatrix \mathbf{k}_j sind; außer für $i = j$. Die Projektion auf das NAS ergibt eine Konzentrationsbestimmung, die wegen der Orthogonalität zur übrigen spektralen Population unabhängig von Konzentrationsänderungen der anderen Komponenten ist.

Mit Hilfe des NAS lassen sich einige Gütefaktoren der Auswertung einer spektralen Messung einer Vielkomponentenmischung bestimmen. Dazu gehören die Sensitivität, die Selektivität und die Genauigkeit. Diese werden hier nur aufgeführt; eine genauere Analyse und deren Herleitung findet sich in [103].

Sensitivität Die Sensitivität $s = \|\mathbf{net}_i\|/c_i^0$ ist ein Maß für die spektrale Messgröße in Abhängigkeit von der Konzentration des Analyten. Sie wird mit der Konzentration des Komponentenspektrums c_i^0 auf die Einheitskonzentration normiert.

Selektivität Die Selektivität $\zeta = \|\mathbf{net}_i\|/\|\mathbf{k}_i\|$ ist ein Maß für die Unabhängigkeit der Messung des untersuchten Analyten von den übrigen Komponenten der Probe. Der Zahlenwert liegt zwischen 0 und 1. Eine Selektivität von 0 ist gleichbedeutend mit einer verschwindenden Länge des NAS-Vektors. Der Vektor des Analytspektrums hat keinerlei zur restlichen Population orthogonale Anteile. Die Konzentrationsbestimmung des Analyten ist vollständig unselektiv, unter diesen Bedingungen kann die zu bestimmende Komponente nicht eindeutig angegeben werden. Eine Selektivität von 1 bedeutet, dass sich die vektorielle Länge des Analytspektrums mit der orthogonalen Projektion nicht ändert. NAS und Analytspektrum stimmen überein. Die Konzentrationsbestimmung ist vollkommen selektiv, sämtliche übrigen Komponenten haben keinerlei Einfluss darauf.

Genauigkeit Die relative Genauigkeit ist ein Maß für die Unsicherheit der Konzentrationsbestimmung. Sie setzt sich zusammen aus der Präzision der spektralen Messung und des Kalibrationsmodells:

$$\frac{\Delta c}{c_i} = \left(\frac{\|\mathbf{a}\|}{\|\mathbf{net}_i\|} + \kappa_a \right) \frac{\epsilon_a}{\|\mathbf{a}\|} \quad (4.17)$$

mit

$$\kappa_a = \frac{\|\mathbf{net}_i\| \|\mathbf{a}\|}{\mathbf{a}^T \mathbf{net}_i} \quad \text{und} \quad \epsilon_a = \sqrt{\frac{\mathbf{a}^T (\mathbf{I} - \mathbf{K}\mathbf{K}^+) \mathbf{a}}{n - k}} \quad (4.18)$$

\mathbf{a} bezeichnet das bei n diskreten Wellenzahlen abgetastete Extinktionsspektrum und k ist die Anzahl der Komponenten. Im Grenzfall verschwindenden Rauschens ist das NAS bis auf einen Skalierungsfaktor identisch mit dem aus der PLS-Modellierung resultierenden Regressionsvektor [106]. Dort wird auch bewiesen, dass sich die beiden Resultate bei einer unendlich großen Population mit vorhandenem Rauschen unterscheiden. Der PLS-Regressionsvektor enthält dann Anteile in der spektralen Richtung der übrigen Komponenten der Probe mit der Größe der Varianz σ^2 des Rauschens. Vorbehandlungen der Spektren mit Hilfe des NAS führen ähnlich der orthogonalen Signalkorrektur (OSC, engl.:

Orthogonal Signal Correction) zu einer Reduzierung der benötigten Basisvektoren bei Anwendung der Matrix-Invertierung zur Schätzung des Regressionsvektors [107]. [108] und [109] beschäftigen sich ebenfalls mit dem Thema, dort werden Alternativen zur ursprünglich von Lorber genannten Berechnung des NAS vorgeschlagen.

4.4 Spektrale Variablenselektion

Die bisher beschriebenen Verfahren nutzen einen breiten spektralen Bereich für eine Berechnung des Kalibrationsmodells. Die Problematik der Kollinearität wird dabei durch eine Reduzierung der Anzahl der verwendeten Basisvektoren bei der Invertierung der spektralen Matrix berücksichtigt. Es hat sich jedoch herausgestellt, dass auch eine Reduzierung der Zahl der spektralen Variablen zu deutlichen Verbesserungen der Kalibrationsmodelle führt.

Eine optimale Wellenzahlauswahl muss dabei mindestens zwei Bedingungen erfüllen: zum einen sollte sie zu geringen Unsicherheiten in der Konzentrationsbestimmung führen, zum anderen bei bestimmten Umgebungseinflüssen auf die Probenspektren weiterhin stabile Resultate liefern. Die Fehler lassen sich mit Hilfe der Kreuzvalidierung abschätzen. In der Literatur finden sich eine Reihe von Methoden zur Wellenzahlauswahl, von denen einige hier vorgestellt werden. Sämtliche Kombinationsmöglichkeiten durchzuspielen, auch **Brute-Force**² genannt, ist bei vieldimensionalen spektralen Daten nicht möglich. Die $2^n - 1$ Kombinationsmöglichkeiten durchzuprobieren, ist mathematisch extrem aufwändig und selbst bei einer geringen Anzahl von spektralen Variablen bei einem schmalen Wellenzahlbereich kaum durchführbar. Diese Methode liefert theoretisch die besten möglichen Konzentrationsbestimmungen, ist jedoch sehr anfällig gegenüber Zufallskorrelationen, die zu instabilen Kalibrationsmodellen führen und daran erkennbar sind, dass der SEP-Wert bei wachsender Blockgröße der Kreuzvalidierung zunimmt. Um Zufallskorrelationen auszuschließen, ist daher auch eine qualitative Bewertung der Spektren und der ermittelten Wellenzahlauswahl durch einen erfahrenen Spektroskopiker wichtig [97].

In der Literatur finden sich einige weniger rechenintensive Verfahren, die nun vorgestellt werden. Das so genannte **Stepwise-up** Verfahren beginnt mit der Wellenzahlvariablen, die am besten mit den Referenzwerten korreliert und nimmt dann nacheinander die Wellenzahlvariablen hinzu, mit Hilfe derer der beste SEP-Wert erzielt werden kann. Das Minimum der als Funktion der Anzahl der spektralen Variablen aufgetragenen Werte wird als Ergebnis verwendet. Diese Methode ist empfindlich gegenüber Verschiebungen der Basislinie und liefert nur mäßige Ergebnisse, da immer nur einzelne Parameter zum Modell hinzugefügt werden. Besser ist das so genannte **Stepwise-up&down** Verfahren [110], bei dem in jedem Schritt geprüft wird, ob eine Hinzunahme oder Beseitigung eines Parameters das Modell verbessert. Dies wird solange wiederholt, bis ein - häufig lokales - Minimum gefunden wurde. **Stepwise-down** beginnt mit einer vollständigen Liste der Wellenzahlvariablen und entfernt Schritt für Schritt jeweils diejenige Wellenzahl, deren

²Hier ganz richtig mit 'unvernünftige Gewalt' zu übersetzen, in der Informatik übliches Verfahren, das die Lösung eines Problems durch die Anwendung aller Kombinationsmöglichkeiten ermittelt.

Herausnahme aus dem Modell zum kleinsten Fehler in der Konzentrationsbestimmung führt.

Beim **Moving-Window** Verfahren [111–113] werden nicht einzelne Wellenzahlvariablen, sondern Wellenzahlbereiche untersucht. Die obere und untere Grenze eines oder mehrerer Intervalle werden solange verschoben, bis ein Minimum im SEP-Wert gefunden ist.

Ebenfalls zum Einsatz kommen genetische Algorithmen (GA, engl.: *Genetic Algorithm*), siehe z.B. [114]. Dabei enthalten so genannte Chromosome (die Variablenauswahl) eine Liste mit Genen (die Variablen). Unterschiedliche Chromosome werden kombiniert und an Hand eines Güteparameters entschieden, ob sie weiter verwendet oder verworfen werden. Speziell bei spektralen Daten mit einer großen Zahl von Variablen führen die GA in [114] zu verbesserten Ergebnissen. Dies geht häufig mit Zufallskorrelationen einher. Genetische Algorithmen wurden in dieser Arbeit nicht näher untersucht.

Sehr gute Ergebnisse liefert die von Hageman et al. für die Wellenzahlauswahl vorgeschlagene Anwendung der **TABU-Suche** [115]. Die genutzte deterministische globale Optimierung basiert auf Konzepten der künstlichen Intelligenz. Der Raum zur Wellenzahlauswahl wird systematisch durchsucht, wobei bereits analysierte Bereiche im Auge behalten werden. Das Resultat hängt eindeutig von einem zufällig ausgewählten Startvektor ab. Vergleiche mit *Simulated Annealing* (engl.: SA) und genetischen Algorithmen zeigen ähnliche Resultate. Existieren lokale Minima des Güteparameters, liefert die TABU-Suche die besseren Ergebnisse [115].

Eine modifizierte Variante der TABU-Suche wurde im Rahmen dieser Arbeit in *Matlab* (The Mathworks Inc., South Natick, MA, USA) programmiert und bei der Quantifizierung der Sonnenblumenöl-Konzentration in damit verunreinigten Olivenöl-Proben verwendet [116]. Abb. 4.1 zeigt das Ablaufdiagramm der Prozedur und Tab. 4.1 ein Beispiel. Eine zufällige Auswahl von Wellenzahlvariablen wird als Startvektor s festgelegt (Spalte 1): im Beispiel die 1. und 4. Wellenzahl. In einer Schleife über alle Wellenzahlen wird nacheinander jede einzelne Auswahl umgekehrt und falls diese noch nicht in der TABU-Liste vorhanden ist, gespeichert (Spalte 2 bis 6). Anschließend werden für alle gespeicherten Auswahlmöglichkeiten die zugehörigen SEP-Werte (leave-10-out) berechnet. Die Auswahl mit dem kleinsten SEP-Wert wird als neuer Startvektor ausgewählt und an die TABU-Liste angehängt (Spalte 3 und 7). Falls dies zu einer Verringerung des SEP-Wertes führt, wird der neue Vektor in s_{opt} gespeichert; danach wird wieder von vorne begonnen. Wurde nach einer gewissen Schleifenanzahl (MAXITER) keine weitere Verbesserung erreicht, wird die Auswahl mit dem kleinsten SEP-Wert als Resultat verwendet (Spalte 15).

Eine sehr anschauliche Methode, die die PLS-Eigenschaften für breite Spektralbereiche nutzt [117, 118], wird in dieser Arbeit **PMMS** (engl.: *Pairwise-Min-Max-Selection*) genannt. Die lokalen Minima und Maxima des Regressionsvektors der PLS-Kalibration werden nach ihrer Größe sortiert, zu Paaren kombiniert und diese sukzessive zur Wellenzahlauswahl hinzugefügt. Die erzielten SEP-Werte sind häufig kleiner als bei Verwendung der gesamten spektralen Daten und verhalten sich bei wachsender Blockgröße der

```

1) BOOLEAN s=Randomisierte Auswahl von Wellenzahlen
2) INTEGER iter=0
3) for i=1:Wellenzahlen
    s_test=s
    s_test(i)=s_test(i) XOR 1      % Auswahlumkehr
    speicher s_test if NOT in TABU_Liste
end % for i=1:Wellenzahlen
4) s=s_test(kleinster SEP-Wert)
5) if SEP(s)<SEP_opt
    s_opt=s
    iter=0
else
    iter++
end
s wird an TABU_Liste angehängt
6) while iter<MAXITER goto 3

```

Abb. 4.1: Ablaufdiagramm der TABU-Suche.

Spalte	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
\bar{v}	s	opt					s	min					s		Result
\bar{v}_1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	...	1
\bar{v}_2	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	MAX-	1
\bar{v}_3	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	ITER	0
\bar{v}_4	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1		1
\bar{v}_5	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	...	0
SEP	2.1	1.9	1.8	2.0	1.9	2.1	1.8	2.2	2.1	2.3	2.4	2.3	2.2		1.8
TABU	x	x						x					x		

Tab. 4.1: Beispielhafte TABU-Auswahl (mit willkürlichen Zahlenwerten).

Kreuzvalidierung stabiler als die Ergebnisse der TABU-Suche. Die Auswahl hängt mit dem Regressionsvektor von der Anzahl der Basisvektoren, die bei der PLS-Modellierung verwendet werden, ab. Das Verfahren ist wenig rechenintensiv, so dass die in Frage kommenden Ränge - je nach Komplexität der Probe und Wellenzahlintervallgröße sind bis zu 20 sinnvoll - durchgerechnet werden können. Diese Vorgehensweise wurde für das Beispiel der FT-Raman Spektren der durch Sonnenblumenöl verfälschten Olivenöl-Proben programmiert und mit Erfolg eingesetzt. Für den Regressionsvektor, der mit 11 PLS-Basisvektoren berechnet wurde, wurden 38 Wellenzahlpaare also 76 Wellenzahlvariablen ausgewählt [116].

In Abb. 4.2 wird der SEP-Wert der Bestimmung der Sonnenblumenöl-Konzentrationen als Funktion der bei der leave-n-out Kreuzvalidierung verwendeten Blockgröße, zum einen für die Wellenzahlauswahl mit PMMS und zum anderen mit der TABU-Suche ge-

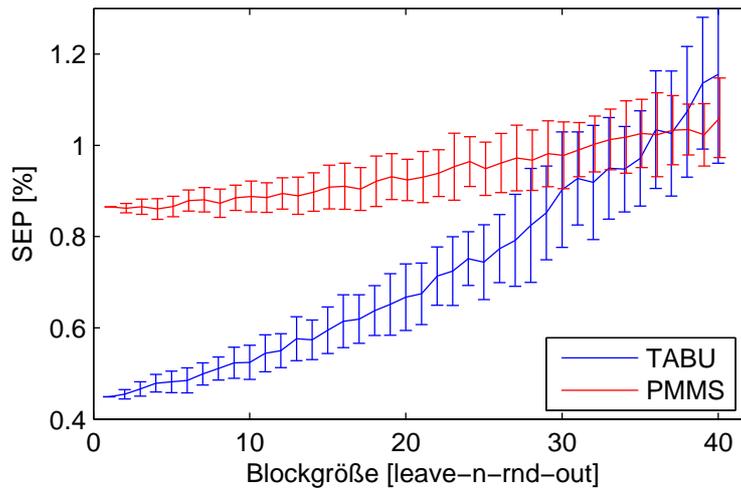


Abb. 4.2: Vergleich der Stabilität der Resultate von PMMS und TABU-Suche in Abhängigkeit von der Blockgröße der zur Kreuzvalidierung herangezogenen Proben. SEP-Werte der Sonnenblumenöl-Konzentration in Olivenöl-Proben mittels Variablenauswahl bei FT-Raman Spektren (Probenpopulation: 92 Spektren, je 23 mit den Konzentrationen 0, 2, 5 und 10%, zusätzliche Informationen zur Variablenanzahl sind im Text angegeben).

zeigt, bei der von der Software 109 Wellenzahlen ausgewählt wurden. Die Berechnung wurde für unterschiedliche zufällige Anordnungen der Reihenfolge der Datensätze berechnet, die Fehlerbalken in der Abbildung zeigen die Standardabweichung der mit 40 unterschiedlichen Randomisierungen berechneten SEP-Werte. Die mit der PMMS Variablenauswahl erstellten Kalibrationsmodelle sind verglichen mit denen aus der TABU-Suche deutlich stabiler, die Zufallskorrelationen sind also durch die Zuhilfenahme der PLS-Eigenschaften bei der Wellenzahlauswahl deutlich reduziert.

Eine **Varianzanalyse** des Regressionsvektors [119] bei der Kreuzvalidierung ergibt unterschiedliche Standardabweichungen der einzelnen Parameter. Bei Verwendung von leave-1-out werden n unterschiedliche Regressionsvektoren berechnet. Die Wellenzahlvariablen werden mit Hilfe eines Signifikanztests (t-Test) der einzelnen Parameter ausgewählt.

In Tab. 4.2 sind die hier genannten Verfahren der Wellenzahlauswahl noch einmal zusammengefasst, mit einer von mir vorgenommenen Einschätzung ihrer Eigenschaften bezüglich SEP-Wert, Stabilität und mathematischem Aufwand. Letzterer ist der Grund für die Suche nach einem geeigneten Parameter, der effizienter als der SEP-Wert berechnet werden kann. Siehe hierzu z.B. auch den Übersichtsartikel von Forina et al. [120] und [121].

Verfahren	SEP	Stabilität	math. Aufwand
Brute-Force	+++	0	+++
TABU-Suche	++	0	++
genetic algorithm	++	0	++
Stepwise-increase	0	+	+
Stepwise-up&down	+	+	++
Stepwise-down	0	+	+
Moving-Window	+	+	+
Varianz	+	++	+
PMMS	++	++	0

Tab. 4.2: Qualitative Bewertung der Verfahren zur Wellenzahlwahl ('0' entspricht klein, '+++ ' groß).

4.5 Spektrenvorbehandlung

4.5.1 Basislinien

Einflüsse wie z.B. Temperaturschwankungen oder Interferometerinstabilitäten verändern die optischen Verhältnisse in einem FTIR-Spektrometer unabhängig von der Konzentration der zu untersuchenden Komponente. In [122] werden die aus Temperaturdriften resultierenden Einflüsse auf die Basislinie zusammengefasst. Eine Verschiebung bzgl. der Ordinatenachse entsteht bei einer Versetzung der Strahlungsquelle bzw. des Detektors relativ zum übrigen optischen System. Dieser Einfluss ist unabhängig von der Wellenzahl und damit über das gesamte Spektrum konstant. Temperaturschwankungen der Strahlungsquelle - also des Schwarzen Strahlers - ergeben linear mit der Wellenzahl wachsende bzw. fallende Basislinien, die aus dem Verhältnis der Schwarzkörperstrahlung bei verschiedenen Temperaturen berechnet werden können. Verkippungen der Interferometerspiegel bzw. des Strahlteilers liefern Basislinien, die von geradzahligem Potenzen der Wellenzahl abhängen:

$$a(\bar{\nu}) \propto c_1 \bar{\nu}^2 + c_2 \bar{\nu}^4 + c_3 \bar{\nu}^6 + \dots \quad (4.19)$$

Bereiche im Spektrum, in denen keine Absorptionen auftreten, können genutzt werden, um eine Basislinie zu ermitteln. Diese wird dann vom Spektrum subtrahiert, um die genannten Störungen zu eliminieren. Bei kurzem temporalen Abstand zwischen Referenz- und Probenmessung sind die Basislinien-Effekte gering; hier genügt eine einfache Verschiebung bzgl. der Ordinatenachse zur Anpassung der Spektren.

Instabilitäten des Interferometers führen zu einer Verschiebung des Interferogramms. Insbesondere in Bereichen mit großem Amplitudenhub führt dies zu einer - das Einkanalpektrum nichtlinear beeinflussenden - Schwankung im Interferogramm. Diese ist im Bereich des *Centerbursts* am größten und führt damit zu einer Verschiebung der Basislinie des Einkanalpektrums und damit zu entsprechenden nichtlinearen Verschiebungen der Basislinie des Extinktionsspektrums. Untersuchungen der Basislinien, die

über Einkanalspektren einer mit Wasser gefüllten Küvette berechnet wurden, zeigt Kap. 5.1.2. Basislinien-Schwankungen werden dort mit und ohne Verwendung eines optischen Langpass-Filters im Strahlengang des Spektrometers verglichen. Bei der breiten Intensitätsverteilung ohne optisches Filter sind die Interferogramme sehr schmal. Geringe Unsicherheiten in der Skala der optischen Weglänge führen bereits zu großen Schwankungen im Mittenmaximum des Interferogramms, damit zu starken Fluktuationen in den Amplituden der Einkanalspektren und letztendlich zu nichtlinearen Basislinien-Effekten im Extinktionsspektrum.

Ähnliche Erscheinungen werden durch Detektor-Nichtlinearitäten hervorgerufen [123]; diese speziell bei Flüssigstickstoff gekühlten MCT Detektoren auftretenden Störungen konnten durch den Wechsel von konstant-Strom- zu konstant-Spannungs-gesteuerter Schaltung deutlich verringert werden [124]. Bei dem u.a. in dieser Arbeit verwendeten FTIR-Spektrometer Vector 22 (Bruker Optics, Ettlingen) werden die Nichtlinearitäten von der verwendeten Spektrometersoftware *OPUS* durch eine Nichtlinearitätskorrektur minimiert. DTGS-Detektoren verhalten sich demgegenüber in einem großen dynamischen Bereich linear.

Das physikalische Kalibrationsmodell lässt sich um die Basislinien-Einflüsse erweitern [125]. Ein aus Einsen bestehender Vektor berücksichtigt dabei konstante, ein zum Wellenzahlvektor proportionaler Vektor lineare und ein quadratisch von der Wellenzahl abhängender Vektor quadratische Einflüsse.

$$k_{B1}(\bar{\nu}) = 1, \quad k_{B2}(\bar{\nu}) = \bar{\nu}, \quad k_{B3}(\bar{\nu}) = \bar{\nu}^2 \quad (4.20)$$

Alternativ kann ein Satz aus orthogonalen Legendre-Polynomen verwendet werden, um polynomiale Einflüsse beliebiger Ordnung aufzunehmen. Ein Spektrum mit der Form der nichtlinearen Schwankungen kann ebenfalls in das physikalische Modell eingebunden werden. Solange die Basislinien-Schwankungen orthogonal zu den übrigen Komponentenspektren des physikalischen Modells sind, ist dies einer Basislinien-Korrektur vor Anwendung des physikalischen Modells vorzuziehen.

4.5.2 Signalkorrektur durch orthogonale Projektion

Speziell bei kleinen Anteilen des Komponentenspektrums zum Probenspektrum tragen die ersten Hauptkomponenten, die die größten Varianzanteile der Spektrenpopulation erklären, nicht oder nur schwach zur Modellierung der Konzentrationsbestimmungen bei. Wold et al. [126] machten den Vorschlag, vor der Kalibration die größtmöglichen Varianzanteile, die unkorreliert zu den Referenzkonzentrationen sind, mittels der OSC zu eliminieren. Eine OSC-Komponente besteht aus dem *Score*-Vektor \mathbf{t}_{OSC} , dem *Loading*-Vektor \mathbf{p}_{OSC} und der weiteren OSC-Vektorkomponente \mathbf{w}_{OSC} . Für die Auswertung wird nun die korrigierte Spektrenmatrix $\mathbf{A}_{RES} = \mathbf{A} - \mathbf{t}_{OSC} \mathbf{p}_{OSC}^T$ mit $\mathbf{t}_{OSC} = \mathbf{A} \mathbf{w}_{OSC}$ und $\|\mathbf{w}_{OSC}\| = 1$ verwendet. Dies kann mehrfach durchgeführt und damit mehrere OSC-Komponenten entfernt werden. Die verschiedenen Verfahren unterscheiden sich in der Wahl des Vektors \mathbf{w}_{OSC} , wodurch unterschiedliche *Scores* \mathbf{t}_{OSC} und *Loadings* \mathbf{p}_{OSC} resultieren. Das optimale OSC-Filter muss folgende Bedingungen erfüllen:

- Der *Score*-Vektor \mathbf{t}_{OSC} muss orthogonal zu den Konzentrationen liegen: $\mathbf{t}_{OSC} \perp \mathbf{c}$.
- \mathbf{w}_{OSC} muss möglichst große Varianzen der spektralen Daten erklären.
- Die Methode muss auf zukünftige Messdaten anwendbar sein.

Es wurden verschiedene Verfahren entwickelt [127–130], um geeignete OSC-Komponenten zu ermitteln. Die von Wold et al. geforderten Eigenschaften schienen zunächst nicht vereinbar, denn die Lösungen waren entweder nicht orthogonal zum Konzentrationsvektor oder enthielten nicht die größte Varianz der zur Konzentration orthogonalen Messdaten. Die Orthogonalität zur Konzentration kann durch Antiprojektion zum Konzentrationsvektor bewerkstelligt werden, birgt jedoch, wenn die Anzahl der Spektren bzw. Referenzwerte größer als die Anzahl der spektralen Datenpunkte ist, das Risiko, dass die Lösung nicht im ursprünglichen spektralen Raum liegt. Die daraus resultierenden, nicht von den spektralen Daten erklärten Anteile führen dann zu einer Überkompensation (engl.: *Overfitting*). Westerhuis et al. veröffentlichten 2001 die direkte orthogonale Signal Korrektur (DOSC, engl.: *Direct Orthogonal Signal Correction*) [131]. Diese erfüllt die von Wold et al. genannten Eigenschaften vollständig. Ein wichtiger Unterschied ist die direkte Art, mit der die OSC-Komponenten berechnet werden; hier sind keine Regressionsverfahren nötig. Das Resultat zeichnet sich durch die strikte Einhaltung der Orthogonalität zum Konzentrationsvektor aus. Bei dieser Methode stellten die Autoren jedoch fest, dass sich die Vorhersagen mittels der PLS-Kalibration nach Anwendung der DOSC verschlechterte. Eine Überkompensation, hervorgerufen durch die strikte Einhaltung der Orthogonalität bzgl. des Konzentrationsvektors, kann jedoch mit einer Abschwächung des Verfahrens durch eine Reduzierung der Anzahl der Basisvektoren bei der Invertierung der Spektrenmatrix zur Berechnung von \mathbf{t}_{OSC} vermieden werden. Dann erniedrigt die Anwendung der DOSC den optimalen Rang der PLS-Modellierung und erhöht die Stabilität des Kalibrationsmodells.

Übersichten zu den verwendeten OSC-Algorithmen finden sich in [131] und [132]. Die in [126, 127, 129, 130] genannten Verfahren linearisieren Anteile, die quadratisch von den Referenzkonzentrationen abhängen. Die Methode nach [128] entfernt diese, was bei dem Lambert-Beerschen Gesetz unterworfenen - Absorptionmessungen ohne Bedeutung ist. Die Reduzierung des optimalen Ranges der PLS-Modellierung hängt ebenfalls vom verwendeten Verfahren ab. Bei einigen resultiert letztendlich eine Dimension von 1 bzw. 2, z.B. [127], andere vermindern den optimalen Rang mit jeder OSC-Komponente um 1, z.B. [128, 129]. Die Angaben von [131] und [132] widersprechen sich in der Aussage bezüglich der Reduzierung bei der Methode nach Wold. Bei Svensson et al. [132] wird die Anzahl der Basisvektoren der optimalen Regressionsinversen auf ein Minimum reduziert, bei Westerhuis et al. [131] zeigt sich eine Reduzierung des optimalen Ranges bei der PLS-Modellierung um 1 je entfernter OSC-Komponente.

Eine reale Verbesserung der Ergebnisse der Kalibrationsmodelle auf der Grundlage der Roh-Daten wurde mit Hilfe der verschiedenen OSC-Verfahren nicht erreicht. Als Vorteil der OSC wird häufig die bessere Interpretierbarkeit des Regressionsvektors - hervorgerufen durch die Reduzierung der Komplexität - genannt. Dies konnte bei Anwendung

auf Dialysat-Spektren nicht bestätigt werden; die Regressionsvektoren ohne Spektrenvorbehandlung waren dem Extinktionsspektrum der Glucose ähnlicher. Bei komplizierteren Systemen als den hier untersuchten Dialysaten ist möglicherweise eine Verbesserung zu erzielen; dies wurde jedoch in dieser Arbeit nicht weiter untersucht.

Kapitel 5

Glucoseanalytik mit MIR-Spektroskopie und Mikro-Dialyse

5.1 Transmission wässriger Proben im mittleren IR

Im Rahmen des CLINICIP-Projekts soll ein portables, in einer Klinik einsetzbares System entwickelt werden, das automatisierte, kontinuierliche Messungen der Blutglucosekonzentration erlaubt. Ein wichtiger Punkt dabei ist die Programmierbarkeit der zugehörigen Komponenten. Abb. 5.1 zeigt den schematischen Aufbau des für die spektralen Messungen im klinischen Umfeld angeschafften IR200 FTIR-Kleinspektrometers (Nicolet, Thermo Electron GmbH, Dreieich). Dieses besitzt einen DTGS Raumtemperaturdetektor, der ohne umständliche Flüssigstickstoff-Kühlung verwendet werden kann. Die zugehörige Spektrometersoftware kann von einem externen Programm mit Hilfe der *Windows*-Schnittstelle DDE (engl.: dynamic data exchange) gesteuert werden, was eine Automatisierung der Messungen ermöglicht. Parameter wie z.B. Auflösung und Messzeit lassen sich dabei einstellen.

Für die in-vitro Messungen stand außerdem ein Vector 22 FTIR-Spektrometer (Bruker Optics, Ettlingen) zur Verfügung. Abb. 5.2 zeigt den schematischen Aufbau. Das Gerät war für unsere Messungen mit einem Flüssigstickstoff-gekühlten MCT Detektor ausgestattet und ermöglichte so Messungen mit hohem S/R-Verhältnis.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die in Abb. 5.3 (S. 46) gezeigte Mikro-Durchfluss-Küvette (im Folgenden Küvette genannt) für Transmissionsmessungen entwickelt. Auf folgende Eigenschaften wurde dabei besonderer Wert gelegt:

- großer Lichtleitwert, um bei Verwendung von Raumtemperaturdetektoren noch ein entsprechend hohes S/R-Verhältnis zu erhalten
- geeignete Schichtdicke für die Messung wässriger Proben im mittleren IR
- möglichst geringe Fresnelreflexionen und daraus resultierende Interferenzen

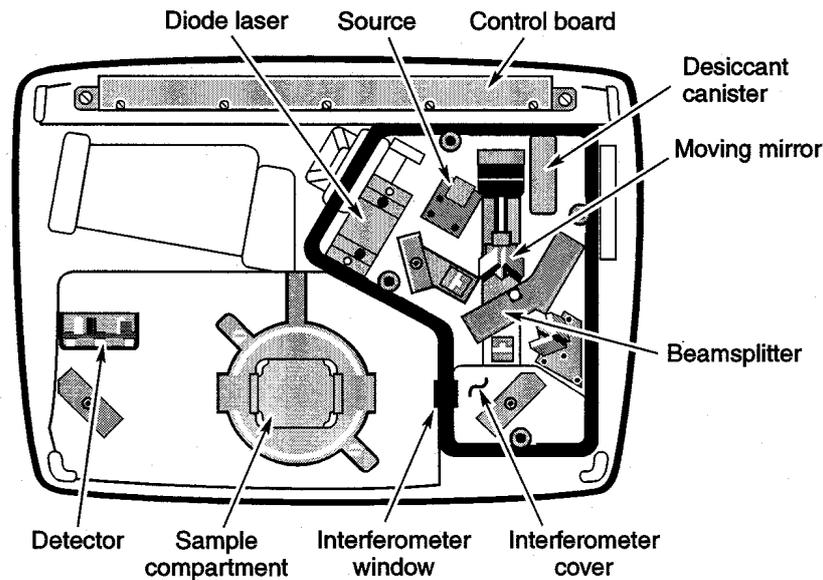


Abb. 5.1: Schematischer Aufbau des IR200 FTIR-Spektrometers (IR200-Handbuch).

- beständig gegenüber wässrigen Lösungen für pH-Werte im Bereich von pH=4 bis pH=10
- internes Volumen im sub- μL Bereich
- Anschlussmöglichkeiten mit geringem Totvolumen für Kapillaren
- regelbare Thermostatisierung

Spektrale Messungen an verdünnten wässrigen Proben wie den Dialysaten erfordern ein hinreichend hohes S/R-Verhältnis, um die zu untersuchenden Bestandteile präzise in ihrer Konzentration quantifizieren zu können. Für eine möglichst große Intensität am Detektor wurde der innere Durchmesser der Küvette von etwa 4 mm am Fokus des Strahls im Probenraum ausgerichtet. Außerdem erfordern Transmissionsmessungen wässriger Proben wegen der großen Absorption des Wassers im mittleren IR kleine Schichtdicken um 30 μm . Als wasserfeste, pH-Wert beständige und im mittleren IR transmittierende Fenstermaterialien kommen im Wesentlichen ZnSe und CaF₂ in Frage. Diese führen wegen der Fresnelreflexionen an den Küvettenfenstern zu Interferenzerscheinungen und damit zu sinusförmigen Schwankungen in den Spektren, deren Amplitude von der Differenz des Brechungsindex des verwendeten Fenstermaterials und dem des Wassers abhängt. Die Verwendung von CaF₂ als Fenstermaterial minimiert die Interferenzen aufgrund seines dem Wasser sehr ähnlichen Brechungsindex ($n \approx 1.3$). Dieser unterscheidet sich auch deutlich weniger von dem der Luft, als der von ZnSe. wodurch die Fresnelreflexionen am Grenzübergang Luft \rightarrow Küvette nur $R \approx 2 * \left(\frac{n-1}{n+1}\right)^2 \approx 3.5\%$ der Strahlung betragen. Die

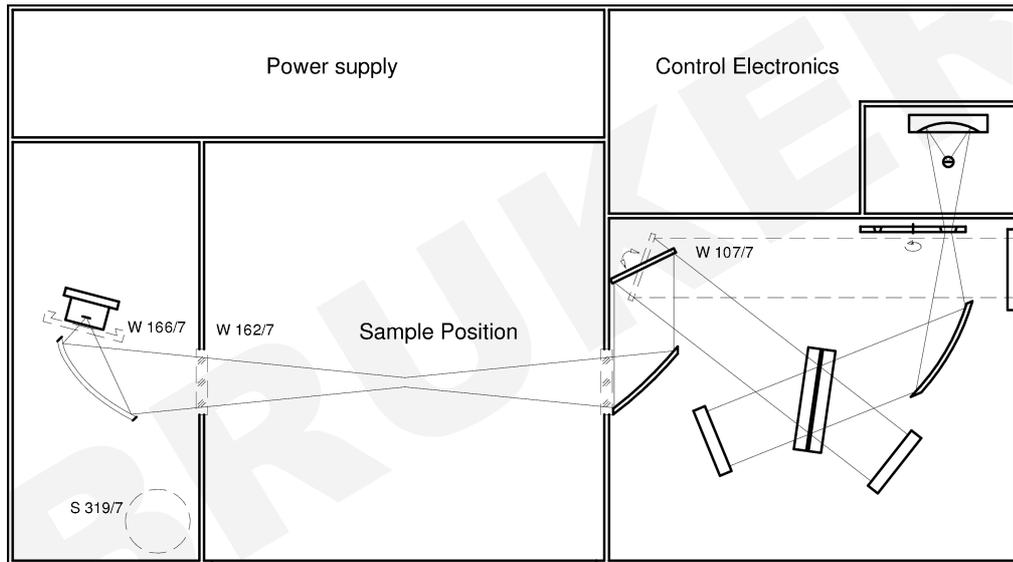


Abb. 5.2: Schematischer Aufbau des Vector 22 FTIR-Spektrometers (Service-Manual von Bruker Optics).

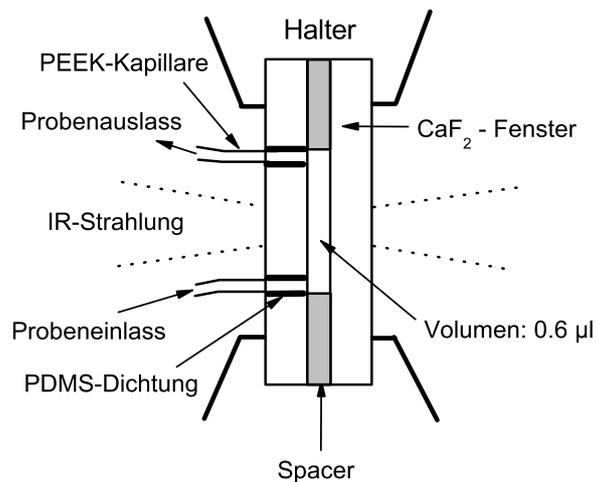
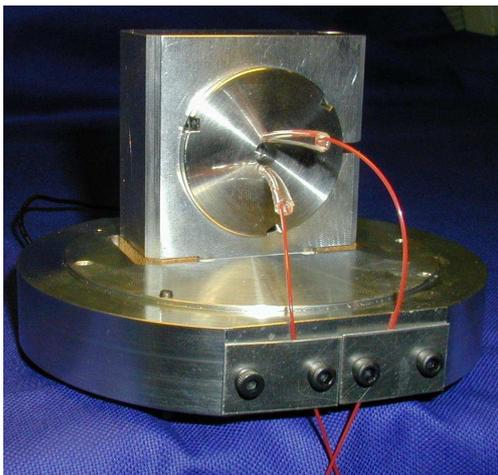


Abb. 5.3: Mikro-Durchfluss-Küvette für Transmissionsmessungen.

linke Hälfte von Abb. 5.4 (S. 48) zeigt das Transmissionsspektrum eines der verwendeten CaF₂ Küvettenfenster. Die Transmission fällt zwischen 1000 und 800 cm^{-1} steil ab. Bei der verwendeten Fensterstärke von 1 mm beträgt der Transmissionsgrad bei 1000 cm^{-1} noch 70% und bei zwei Fenstern also etwa 50%. Bei der Messung wässriger Proben kommt die starke Librationsbande des Wassers bei 700 cm^{-1} hinzu; damit sind Messungen mit geeignetem S/R-Verhältnis bis etwa 1000 cm^{-1} möglich.

Für die Mikro-Dialyse wurden Flussraten des Perfusats um 1 $\mu L/min$ gewählt, um geeignete Wiederfindungsraten zu gewährleisten. Für die Messungen der Dialysate stehen also nur wenige Mikroliter der Probe je Messung zur Verfügung. Das Innenvolumen der Küvette ist hier unproblematisch, es beträgt bei der gewünschten Schichtdicke von 30 μm

und dem durch den Abstandshalter (engl.: *Spacer*) festgelegten Loch-Durchmesser von 5 mm etwa 0.6 μL . Kritisch ist der Probentransport durch die Kapillaren. Um ein kleines Probenvolumen bei gegebener Flussrate in kurzer Zeit über große Distanzen transportieren zu können, sind kleine Innendurchmesser nötig. Nach dem Hagen-Poiseuilleschen Gesetz ist der Gegendruck in einer Kapillare mit rundem Querschnitt bei konstanter Flussrate umgekehrt proportional zur vierten Potenz des Kapillarendurchmessers. Kapillaren mit einem Innendurchmesser von 125 μm erwiesen sich experimentell als geeigneter Kompromiss zwischen beim Probentransport erzeugten Gegendruck und dem Innenvolumen, da sie ein Volumen von etwa 12 μL pro Meter aufweisen.

Die Temperaturabhängigkeit des Wasserextinktionsspektrums ist im mittleren IR deutlich kleiner als im nahen IR. Trotzdem ist eine Thermostatisierung der Küvette für genaue Messungen wichtig. Diese wird üblicherweise durch eine Heizung über die Raumtemperatur erzielt, die von einem Proportional/ Integral (PI)-Regler mit einem PT100-Temperatursensor als Regelgröße angesteuert wird. Die Löslichkeit von Gasen in wässrigen Medien steigt mit sinkender Temperatur. Um sich bildende Luftblasen in der Küvette bei Temperaturen über der Raumtemperatur zu vermeiden, ist eine Kühlung der Küvette einer Erwärmung vorzuziehen; daher wurden im Rahmen dieser Arbeit die ursprünglich verwendeten Heizwiderstände in der Küvettenhalterung gegen ein Peltier-Element ausgetauscht und der elektronische Regler durch eine Invertierung des Steuerstroms entsprechend angepasst. Dieser steigt nun bei einer positiven Abweichung von der Solltemperatur und aktiviert damit die Peltier-Kühlung.

5.1.1 Aufbau der Mikro-Transmissions-Durchfluss-Küvette

In Zusammenarbeit mit der mechanischen Werkstatt des ISAS wurde die in Abb. 5.3 gezeigte Küvette konstruiert und gebaut. Das Probenvolumen wird von den beiden CaF_2 -Fenstern mit einem dazwischen liegenden Spacer umschlossen, der aus einer etwa 30 μm dünnen Folie (LDPE, engl.: *Low-Density Polyethylen*) ausgeschnitten¹ wurde. In den beiden Bohrungen ($d = 1.5 \text{ mm}$) des einen Fensters sind zwei kegelförmig in Polydimethylsiloxan² gegossene Kapillaren eingeklemmt. Zwei individuell geformte PDMS-Dichtungsscheiben schützen die Fenster vor Unebenheiten in der metallischen Halterung.

Der Aufbau wird von zwei aneinander geschraubten Edelstahlblöcken gehalten. Eine Bohrung darin enthält den PT100-Temperatursensor, der das Signal für die Temperaturstabilisierung liefert. Zwischen der Küvette und einer Gegenkühlplatte befindet sich das Peltier-Element, das von dem am ISAS entwickelten PI-Regler angesteuert wird. Dieser liefert einen maximalen Stromfluss von 1.5 A, was eine Kühlung der Küvette um maximal 15°C unter Raumtemperatur ermöglicht.

¹Verpackung von Papiertaschentüchern einer bekannten Marke.

²Polydimethylsiloxan (PDMS) wird am ISAS in Mikro-Fluidik-Bauteilen von Lab-on-the-chip Systemen eingesetzt und entsteht nach der Vermischung von Trimethylchlorsilan und Dimethyldichlorsilan unter Ausgasen von *HCl*. PDMS passt sich feinsten Strukturen an und härtet als Abbild von diesen aus.

Die Probe benötigt nach der Befüllung der Küvette eine gewisse Zeit, um deren Temperatur anzunehmen. Um die Zeitkonstante für diesen Angleich abzuschätzen, wurde folgende Messung durchgeführt: Die Küvette wurde bei einer Temperatur von 17.6°C mit einer Flussrate von $40\ \mu\text{L}/\text{min}$ eine Minute lang mit Wasser (Raumtemperatur) befüllt und schon während des Pumpvorgangs wurden im 20-sekündigen Rhythmus Einkanal-spektren aufgezeichnet. Außer einer geringen Verschiebung der Basislinien waren in den Spektren keinerlei Anzeichen einer Temperaturveränderung zu erkennen. Die Zeitkonstante der Anpassung der Proben- an die Küvettentemperatur ist also klein gegenüber der Messzeit, so dass dieser Einfluss bei den Messungen vernachlässigt werden kann. Auch wurde eine Schichtdickenerhöhung bedingt durch den größeren Druck während des Pumpvorgangs nicht festgestellt.

5.1.2 Optisches Filter zur Rauschoptimierung

Eine Schwierigkeit der FTIR-Technik ist der große benötigte Dynamikbereich für die Messelektronik. Sowohl der Detektor als auch die elektronische Verstärkerschaltung inklusive des Analog-Digital-Wandlers müssen hierfür ausgelegt sein. Die Strahlintensität ist - bei einer breitbandigen Strahlungsquelle - in den Seitenästen des Interferogramms deutlich kleiner als im Mittenmaximum (engl.: *Centerburst*). Je schmalbandiger die Strahlungsquelle wird - im Grenzfall bei monochromatischer Laser-Strahlung - desto kleiner wird das Verhältnis zwischen der Signalstärke im *Centerburst* und der in den Seitenästen. Der gewünschte Messbereich im Fingerprint-Bereich des mittleren IR liegt zwischen 1000 und $1580\ \text{cm}^{-1}$. Außerdem wird eine Messung der Wasserbande bei $1643\ \text{cm}^{-1}$ für die Luftblasendetektion genutzt. Spektrale Daten oberhalb von $1800\ \text{cm}^{-1}$ sind für die Messungen der Dialysate somit im normalen Rahmen nicht erforderlich. Daher wurde ein Langpass-Filter (L.O.T.-Oriel, Darmstadt) mit einem *Cut-Off* von $1830\ \text{cm}^{-1}$ angeschafft und im Proben-Strahlengang eingebaut, um die Bandbreite und somit den benötigten Dynamikbereich zu senken und um das S/R-Verhältnis in den Spektren zu verbessern. Die rechte Hälfte der Abb. 5.4 zeigt das Transmissionsspektrum des verwendeten Filters. Die Transmission im Wellenzahlbereich von 950 bis $1750\ \text{cm}^{-1}$ liegt über 80% .

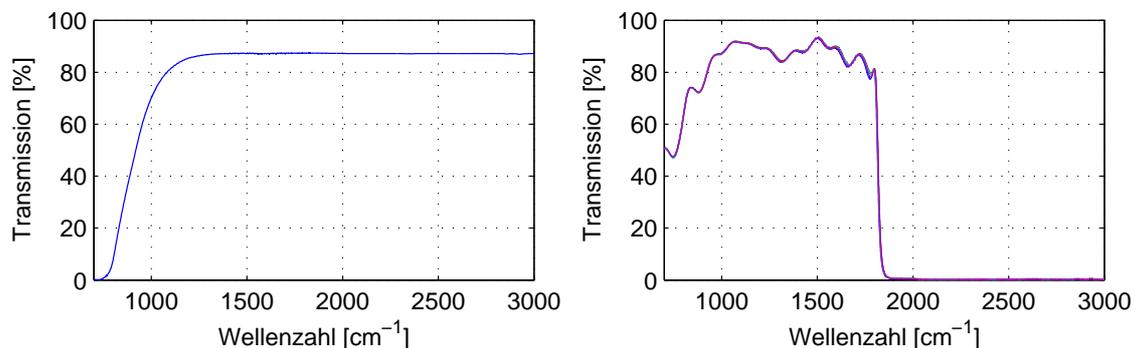


Abb. 5.4: Transmission von CaF_2 (Schichtdicke $1\ \text{mm}$) und Langpass-IR-Filter.

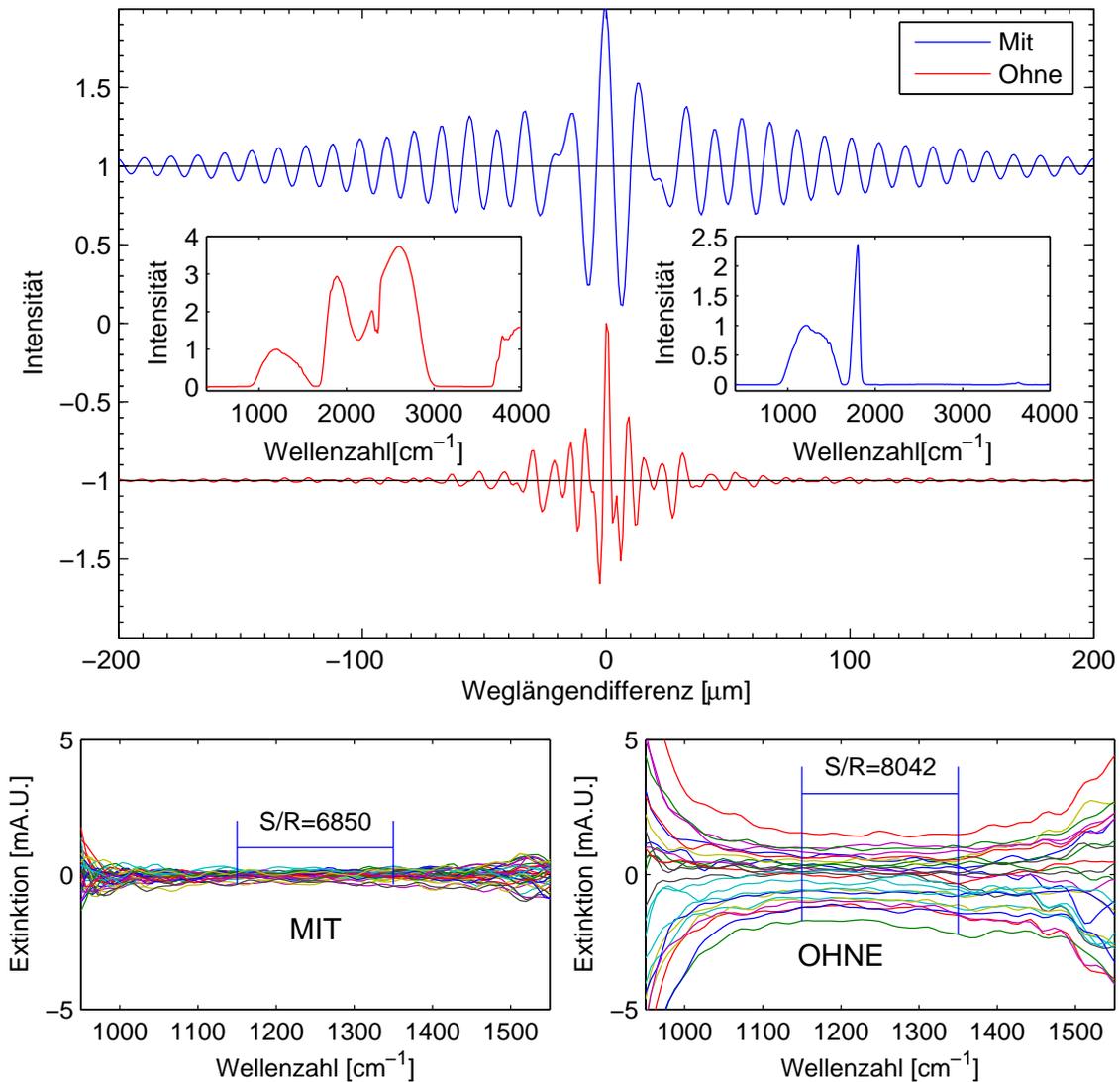


Abb. 5.5: Ausschnitte von Interferogrammen mit wassergefüllter Küvette mit und ohne Langpass-Filter, zusammen mit den zugehörigen Einkanalspektren und Basislinien-Driften der beiden Varianten (Interferogramme amplitudennormiert und verschoben).

In der oberen Hälfte der Abb. 5.5 sind zwei jeweils mit und ohne optisches Filter gemessene Interferogramme im Bereich des *Centerbursts* abgebildet, die mit dem IR200 Spektrometer aufgezeichnet wurden. Das Verhältnis der Amplituden in den Seitenarmen zur Amplitude im *Centerburst* steigt bei Verwendung des optischen Filters um etwa eine Größenordnung; die Breite des *Centerbursts* verdoppelt sich. Die beiden kleinen Abbildungen zeigen die zugehörigen Einkanalspektren. Oberhalb des *Cut-Offs* bei 1830 cm^{-1} transmittiert das optische Filter nicht mehr, die geringe bei 3600 cm^{-1} ersichtliche Struktur ist ein Satellit der bandenähnlichen Intensität bei 1800 cm^{-1} und resultiert aus einer Teilreflexion des Strahls an der Küvette und einem dadurch bedingten erneuten Durchgang durch das Interferometer [133].

Das spektrale Rauschen und Kurzzeitdriften eines Spektrometers werden durch eine direkt aufeinander folgende Messung zweier Einkanalspektren ermittelt. Das daraus berechnete Transmissionsspektrum wird auch 100%-Linie genannt. Die Logarithmierung liefert die Transformation in die Extinktionsdomäne, wodurch Basislinien zur Verfügung stehen. Die untere Hälfte der Abb. 5.5 vergleicht zwei Messreihen von Basislinien einer elektrolythaltigen wässrigen Lösung (Ringer-Lösung, siehe unten) mit und ohne optisches Filter. Zwei Einkanalspektren wurden in sechsminütigem Abstand nach wiederholter Befüllung der Küvette mit einer Messzeit von jeweils zwei Minuten und einer Auflösung von 16 cm^{-1} aufgenommen. Die Schwankungen ohne eine Verwendung des optischen Filters ähneln in ihrer Form dem Wasserextinktionsspektrum. Schwankungen im *Centerburst* des Interferogramms führen durch die Fourier-Transformation zu Verschiebungen bzgl. der Ordinatenachse des Einkanalspektrums. Speziell im Bereich starker Absorptionen, also bei geringen Intensitäten im Einkanalspektrum, resultieren diese in großen relativen Fehlern. Die logarithmische - also nichtlineare - Transformation der 100%-Linien in Extinktionseinheiten führt dann zu einer dem Wasserextinktionsspektrum ähnlichen Basislinien-Form.

Das S/R-Verhältnis einer 100%-Linie berechnet sich als Mittelwert der Abstandsquadrate vom Mittelwert des Transmissionsspektrums (RMS, engl.: *Root Mean Squared*). Für die 100%-Linien der beiden Serien wurde das S/R-Verhältnis im Wellenzahlbereich von 1150 bis 1350 cm^{-1} berechnet; die nichtlinearen Basislinien-Schwankungen stören in diesem Bereich nur wenig. Der Mittelwert des S/R-Verhältnis liegt ohne optisches Filter bei etwa 8000 und damit um 20% besser als bei Verwendung des Filters (6900). Trotzdem wurde der optische Filter weiterhin eingesetzt, weil die stabileren Basislinien die spektrale Gesamtvarianz und damit die Komplexität einer Auswertung mittels des klassischen physikalischen Modells deutlich reduziert.

Um die Basislinien-Schwankungen der ohne optisches Filter durchgeführten Messreihen korrigieren zu können, wurde das mit der Extinktion bei 1650 cm^{-1} gewichtete Mittelwert-Spektrum aus einer großen Anzahl von Basislinien berechnet. Dieses wurde bei den CLS-Kalibrierungen als eine zusätzliche Komponente des physikalischen Modells verwendet. Bei PLS-Auswertungen wurde dieses Korrekturspektrum mit der Extinktion bei 950 cm^{-1} gewichtet und vor der PLS-Kalibrierung von den Spektren subtrahiert. Die Basislinien-Driften konnten damit beinahe vollständig eliminiert werden. Die mit optischem Filter gemessenen Spektren benötigen keinerlei Basislinien-Korrektur zur weiteren Verwendung; ein einfacher Basislinien-Versatz genügt hier zur Kompensation. Dazu wird der Extinktionswert bei 1180 cm^{-1} verwendet, da die bekannten Komponenten der Dialysate bei dieser Wellenzahl nur schwach oder gar nicht absorbieren.

5.1.3 Optimierung der Küvettschichtdicke

Für Transmissionsmessungen an gelösten Analyten existiert eine optimale Schichtdicke, die sich durch ein maximales S/R-Verhältnis auszeichnet. Das Signal - also die Extinktion - steigt linear und das Extinktionsrauschen exponentiell mit der Schichtdicke an. Bei

sehr kleinen Schichtdicken ist die Extinktion des Analyten zu schwach, bei sehr großen Schichtdicken ist das Rauschen zu groß.

Bei der Ableitung der optimalen Schichtdicke d_{opt} für Transmissionsmessungen wird hier der Rechnung aus [77] gefolgt, mit der Annahme vergleichbarer Extinktion in Probe und Referenz, was bei verdünnten wässrigen Proben mit wässriger Referenz gegeben ist. Die Signalstärke wächst linear mit der Schichtdicke: $A = a d = -\log_{10} I/I_0$. Der Absorptionskoeffizient $a = \epsilon c$ wird als Produkt aus der molaren Extinktion ϵ und der Konzentration c berechnet. Die wichtigsten Rauschquellen bei der FTIR-Spektroskopie werden als additives und photonisches Rauschen bezeichnet. Ersteres wird u.a. durch die Elektronik des Verstärkers verursacht. Ein Quantisierungsrauschen kann durch geeignete Einstellung des elektrischen Verstärkungsfaktors oder die Verwendung eines Analog-Digital-Wandlers mit großem dynamischen Bereich vermieden werden. Das additive Rauschen ist proportional zur Detektorfläche, aber unabhängig von der Strahlungsintensität. Das photonische Rauschen resultiert aus der Quantelung der Strahlung in Photonen und wächst daher mit der Quadratwurzel der Strahlungsintensität. Nach dem Gesetz der Fehlerfortpflanzung gilt für die absolute Rauschamplitude der Extinktion σ_A :

$$\sigma_A^2 = \sigma_I^2 \left(\frac{\partial A}{\partial I} \right)^2 + \sigma_{I_0}^2 \left(\frac{\partial A}{\partial I_0} \right)^2 \quad (5.1)$$

Die Intensitäten für Referenz- und Probenmessung sind hier beinahe gleich ($I \approx I_0$):

$$\Rightarrow \sigma_A = \frac{\sqrt{2}}{\ln 10} \frac{\sigma_I}{I} \quad (5.2)$$

Die Intensität fällt exponentiell mit der Schichtdicke $I = I_{src} 10^{-a_w d}$, mit I_{src} als der Intensität der Strahlung ohne Probe und Küvette. Die Größe $a_w [cm^{-1}]$ ist der Extinktionskoeffizient des wässrigen Mediums. Intensitätsschwankungen werden bei der FT-Spektroskopie im mittleren IR üblicherweise vom konstanten additiven Detektorrauschen $\sigma_I = n_D^{add}$ dominiert.

$$S/R^{add} = \frac{A}{\sigma_A^{add}} = \frac{a d I_{src} \ln 10}{n_D^{add} \sqrt{2}} 10^{-a d} \quad (5.3)$$

Das Maximum ergibt sich für:

$$\frac{dS/R^{add}}{dd} (d = d_{opt}^{add}) = 0 \quad \Rightarrow d_{opt}^{add} = \frac{1}{a \ln 10} \quad (5.4)$$

Beim Photonengeräuschen steigt die Rauschamplitude mit der Wurzel der Intensität: $n_D^{phot} = n \sqrt{I} = n 10^{-a d/2}$

$$S/R^{phot} = \frac{A}{\sigma_A^{phot}} = \frac{a d I_{src} \ln 10}{n \sqrt{2}} 10^{-\frac{a d}{2}} \quad \Rightarrow d_{opt}^{phot} = \frac{2}{a \ln 10} \quad (5.5)$$

Die optimale Schichtdicke verdoppelt sich im Vergleich zum additiven Rauschen.

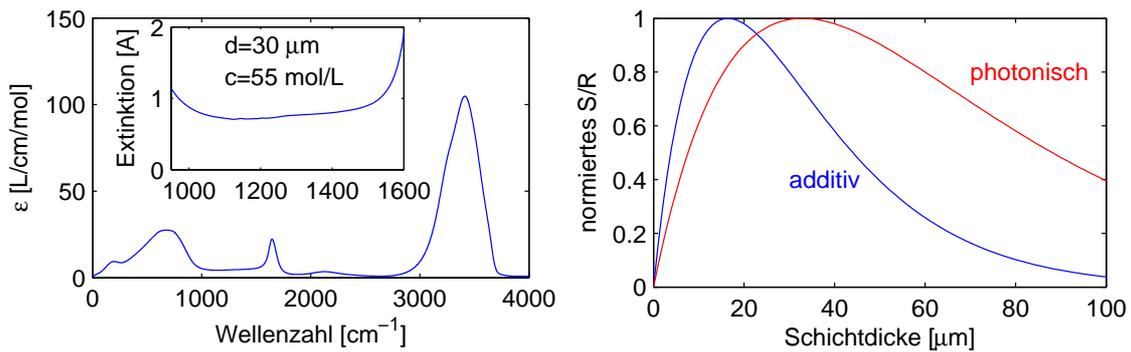


Abb. 5.6: Von der Wellenzahl abhängiger molarer Extinktionskoeffizient von Wasser (entnommen aus [72]) und normiertes S/R-Verhältnis als Funktion der Schichtdicke, simuliert für den Absorptionskoeffizienten $a = 264 \text{ cm}^{-1}$ bei 1034 cm^{-1} .

Die linke Hälfte der Abb. 5.6 zeigt den molaren Absorptionskoeffizienten von Wasser. Für das Maximum der Glucoseabsorption im mittleren IR bei 1034 cm^{-1} ist der Absorptionskoeffizient des Wassers $a = c \epsilon = 55 \text{ M} \times 4.8 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1} = 264 \text{ cm}^{-1}$. Die rechte Hälfte der Abbildung zeigt das theoretische S/R-Verhältnis als Funktion der Schichtdicke für additives (photonisches) Rauschen; der optimale Wert liegt bei $\approx 16 \text{ (33)} \mu\text{m}$ und ist wegen der großen Breite der Maxima relativ unkritisch; insbesondere bei großen Schichtdicken nimmt das S/R-Verhältnis nur langsam ab. Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Messungen wurde aus praktischen Gründen eine Schichtdicke von $30 \mu\text{m}$ gewählt, um einen geringen Gegendruck der Fluidik zu gewährleisten.

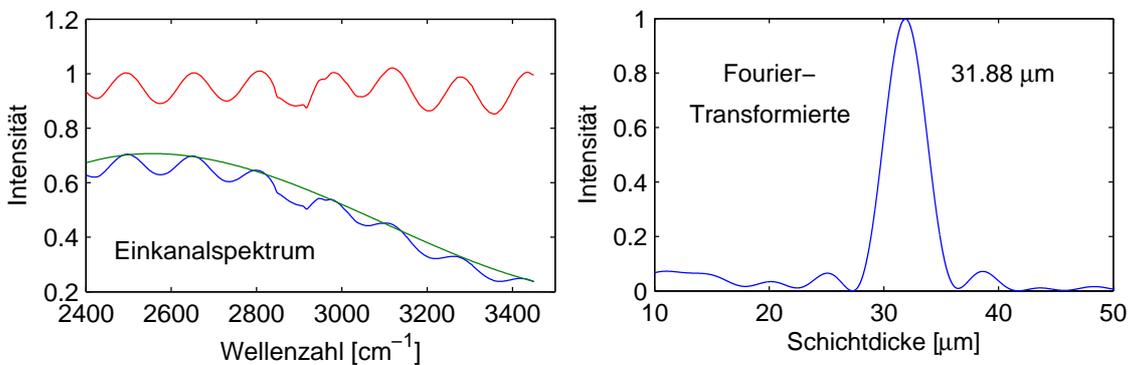


Abb. 5.7: Schichtdickenbestimmung über Fabry-Perot-Interferenzen innerhalb einer leeren CaF_2 -Küvette (siehe Text).

Die Schichtdicke kann durch die Messung einer Kalibrationslösung mit bekannter Konzentration ermittelt werden oder auch durch die Messung eines Transmissionsspektrums der mit Luft gefüllten Küvette mit einer Referenzmessung des leeren Probenraums. Alternativ dazu kann ein interferenzfreies Einkanalspektrum als Referenz simuliert werden. Die durch die Fresnelreflexionen innerhalb der Küvette verursachten Interferenzen führen zu Seitenbändern im Interferogramm, bzw. zu einer Überlagerung des Einkanalspektrums mit einer Sinus-Schwingung [134]. Die linke Hälfte der Abb. 5.7 zeigt einen Ausschnitt

eines Einkanalspektrums einer mit Luft gefüllten Küvette. Ein Polynom vierten Grades wurde an die Maxima der Sinus-modulierten Funktion angepasst und als Referenz-Einkanalspektrum verwendet. Die rechte Hälfte der Abb. 5.7 zeigt die aus dem Transmissionspektrum gebildete Fourier-Transformierte, um Abbrucheffekte zu vermeiden, wurde dieses zuvor mittenzentriert. Die Position des Maximums ist die gesuchte Schichtdicke der Küvette. Um den Datenpunktabstand bei der Fourier-Transformierten zu vergrößern, wurden Nullen an die spektrale Funktion angehängt (Zerofill). Ein Zerofill-Faktor von 1024 bedeutet, dass die virtuelle Auflösung in der Fourier-Transformierten auf das 1024-fache vergrößert wird. Dies ergibt hier einen Datenpunktabstand von $0.005 \mu\text{m}$, so dass das Ergebnis mit hinreichender Genauigkeit abgelesen werden kann. Die Bestimmung der Schichtdicke von mit sieben unterschiedlichen Spacern ausgestatteten Küvetten ergab eine Streubreite für die Küvettschichtdicke von $31.4 \pm 0.4 \mu\text{m}$. Zwei von diesen Küvetten wurden nach einem Tag wiederholt vermessen, die Schichtdicke verringerte sich in dieser Zeit um 0.1 bzw. $0.24 \mu\text{m}$. Der Grund dafür ist vermutlich das Nachgeben und Glätten des relativ weichen Spacer-Materials (LDPE).

5.2 Mehrkomponentenanalytik und Einflussfaktoren

Spektrale Komponenten der Dialysate

Abb. 5.8 zeigt die beispielhafte Zusammensetzung eines EDTA-Blutplasma-Dialysats. Die Extinktion zwischen 950 und 1180 cm^{-1} wird hauptsächlich von Glucose verursacht. Die größte Bande des Hydrogencarbonats liegt im mittleren IR zwischen 1200 und 1400 cm^{-1} ; die größten spektralen Banden der übrigen Komponenten sind bei 990 und 1080 cm^{-1} (Phosphat), 1160 , 1470 cm^{-1} (Harnstoff), 1000 bis 1150 , 1250 bis 1500 cm^{-1} und 1580 cm^{-1} (Lactat) und bei 1100 cm^{-1} (Sulfat) zu finden. Das zur Gerinnungshemmung hinzugegebene EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure, engl.: *Ethylendiaminetetraacetic acid*) absorbiert mit Banden bei 1115 , 1580 und zwischen 1200 und 1500 cm^{-1} . Die angegebenen Konzentrationen sind das Ergebnis einer Anpassung mit Hilfe des physikalischen Modells. Zusätzlich zu den dargestellten Bestandteilen bestand dies aus einem mit der ATR-Messtechnik gemessenen CO_3^{2-} - (siehe Abb. 5.18, S. 63) und einem konstanten Basislinien-Spektrum.

Mit dem Ziel der Optimierung des physikalischen Kalibrationsmodells wurden die Spektren der in den Dialysaten enthaltenen Komponenten genauer untersucht. Erhebliche spektrale Varianzen werden von der Temperatur und dem pH-Wert der Lösungen verursacht. Wässrige Lösungen von Glucose, Harnstoff, Hydrogencarbonat, Phosphat, Lactat und Acetat wurden bei unterschiedlichen pH-Werten angesetzt und deren Extinktionsspektren bei Raumtemperatur gemessen. In einer weiteren Messreihe wurden die Lösungen mit einem pH-Wert von 7.0 bei unterschiedlichen Küvettemperaturen vermessen. Die Elektrolytkonzentration hat ebenfalls einen geringen Einfluss auf die spektralen Eigenschaften der gelösten Reinstoffe. Speziell die mit den Metallionen Komplexe bildende Komponente EDTA wurde diesbezüglich untersucht. Außerdem wurde die Auswirkung der Io-

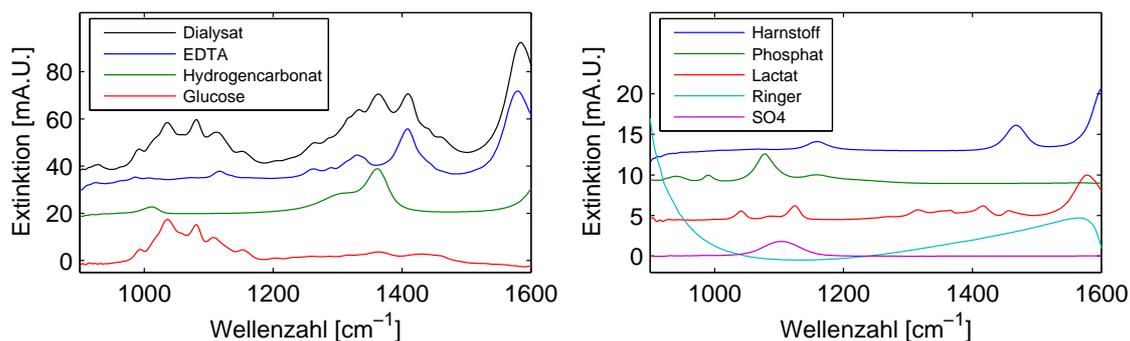


Abb. 5.8: IR-Spektrums eines EDTA-Blutplasma-Dialysats und dessen Zusammensetzung mit folgenden Konzentrationen: Hydrogencarbonat (112 mg/dL), Glucose (252 mg/dL), Harnstoff (47 mg/dL), Phosphat (13 mg/dL), Lactat (31 mg/dL), Sulfat (4.8 mg/dL).

nenstärke auf die Hydrogencarbonat-Spektren analysiert. Bei der Fourier-Transformation der Interferogramme hängt die spektrale Auflösung und damit die Bandenbreite naturgemäß von der Apodisationsfunktion ab; dieser Einfluss auf die quantitative Auswertung der Spektren wird am Beispiel eines Spektrums von Acetat-haltiger Lösung (ELO-MEL isoton von Fresenius, Graz, Österreich)³ näher erläutert.

5.2.1 Mutarotation

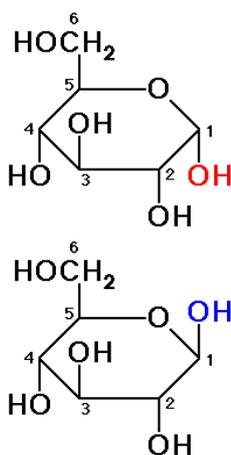


Abb. 5.9: Haworth-Projektion von α - und β -D-Glucose.

Sukzessive spektrale Messungen frisch angesetzter Glucoselösungen ergaben nach Subtraktion des zuerst gemessenen Spektrums charakteristische Banden im Residuum-Spektrum. Diese können auf die Mutarotation der Glucose zurückgeführt werden [135]. Abb. 5.9 zeigt zwei unterschiedliche Isomere der Glucose. Die α -Struktur liegt üblicherweise kristallin aus der wässrigen Phase ausgefällt vor. In wässriger Lösung wandelt sich ständig ein Teil der zyklischen Glucosemoleküle in die lineare Aldehydform um, woraus sich anschließend sowohl α - als auch β -D-Glucose Ringe bilden. Dieser Prozess der Umwandlung wird Mutarotation genannt. Die Reaktionsgeschwindigkeit ist proportional zum Verhältnis der Konzentrationen, hat also einen exponentiell mit der Zeit fallenden Verlauf. Im dynamischen Gleichgewicht liegen bei Raumtemperatur

ein Drittel der Glucose in der α - und zwei Drittel in der β -Form vor [23]. Da die beiden anomeren Formen eine unterschiedliche Drehung der Polarisationssebene linear polarisierter Strahlung im sichtbaren Spektralbereich verursachen, kann dieser Vorgang auch über Polarimetrie verfolgt werden.

³Zusammensetzung: $\text{NaCH}_3\text{COO} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$: 612.4 mg/dL, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 36.8 mg/dL, KCl : 37.3 mg/dL, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$: 30.5 mg/dL, NaCl : 555.2 mg/dL.

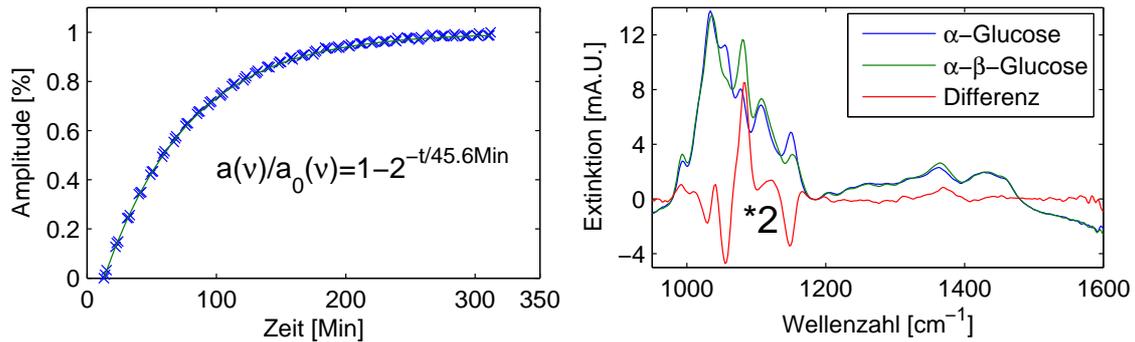


Abb. 5.10: Zeitabhängigkeit der Mutarotation von Glucose in wässriger Lösung bei Raumtemperatur. Extinktionsspektren zu Beginn, nach Auflösen der α -D-Glucose in Wasser und am Ende der Messreihe, sowie deren mit Faktor 2 skaliertes Differenzspektrum.

Die Halbwertszeit der Mutarotation wurde bei Raumtemperatur (20°C) und einem pH-Wert der Probe von pH=7 experimentell ermittelt. Dazu wurden Messungen mit dem Flüssigstickstoff-gekühlten MCT-Detektor im Vector 22 FTIR-Spektrometer durchgeführt. Eine zu Beginn der Messung frisch angesetzte Glucoselösung mit einer Konzentration von 200 mg/dL α -D-Glucose wurde abwechselnd mit entionisiertem Wasser (Serapur) mittels einer Peristaltikpumpe (Minipuls 2, Gilson, Bad Camberg) in die Küvette gepumpt. Ein elektrisches Schaltventil (Knauer, Berlin) wechselte alle 4.5 Minuten zwischen den beiden Proben. Mit einer Messzeit von einer Minute und einer spektralen Auflösung von 4 cm⁻¹ wurden jeweils drei Einkanalspektren aufgezeichnet. Die Differenz zur Extinktionsmessung der frischen Lösung - hier liegt die Glucose noch im α -Zustand vor - zeigt die durch die Mutarotation hervorgerufene Veränderung der Extinktionsspektren. Der mittels einer Ausgleichsrechnung berechnete Skalierungsfaktor für die Amplituden des Differenzspektrums relaxiert exponentiell gegen einen Grenzwert, bei dem sich die Lösung im Gleichgewicht befindet. Eine exponentielle Regression der Amplitudenrelaxation: $a(\bar{\nu}) = a_0(\bar{\nu})(1 - 2^{-t/T_{1/2}})$ ergibt eine Halbwertszeit von $T_{1/2} = 45.6 \text{ min}$. Das Spektrum $a(\bar{\nu})$ ist die Differenz zum bei Beginn gemessenen Spektrum der α -D-Glucose. $a_0(\bar{\nu})$ die Differenz zwischen den Spektren der Lösung im dynamischen Gleichgewichtszustand und der Lösung zu Beginn der Messung. Abb. 5.10 zeigt die Amplituden der Differenzspektren normiert auf die letzte Messung gemeinsam mit dem Ergebnis der exponentiellen Regressionsrechnung. Ebenfalls zu sehen sind die Extinktionsspektren zu Beginn und Ende der Messung und deren durch die Mutarotation verursachte Differenz. Bei Messungen und quantitativen Auswertungen von nicht im Gleichgewicht befindlichen Glucoselösungen wurde das letztgenannte Spektrum mit in das physikalische Modell integriert. Das dynamische Gleichgewicht bei Berücksichtigung des hier bei den Experimenten realisierbaren Residuums ist bei Raumtemperatur nach etwa 6 Stunden erreicht. Abweichungen vom 1:2 Verhältnis der α - zur β -D-Glucose wurden im Rahmen dieser

Arbeit weder bei Dialysaten biologischer Proben, noch bei Proben mit unterschiedlichen pH-Werten beobachtet.

Das Besetzungszahlverhältnis V der beiden Glucoseisomere kann im thermodynamischen Gleichgewicht mit der Maxwell-Boltzmann-Verteilung berechnet werden:

$$V(T) = \frac{N_\alpha}{N_\beta} = e^{-\frac{\Delta E}{k_B T}} \quad (5.6)$$

$N_{\alpha/\beta}$ ist die Anzahl der Glucoseanomere im jeweiligen Zustand, ΔE die Differenz der beiden beteiligten Energieniveaus, k_B die Boltzmann-Konstante und T die Temperatur. Die Änderung des Besetzungszahlverhältnisses als Funktion der relativen Temperaturänderung T_R/T berechnet sich zu:

$$V(T_R) = [V(T)]^{T/T_R} \quad (5.7)$$

Unter der Voraussetzung, dass die Gesamtzahl der Glucosemoleküle N_{ges} , die in der α - und β -Form vorliegen, konstant ist, gilt:

$$N_\alpha = \frac{V(T)}{1 + V(T)} N_{ges} \quad N_\beta = \frac{1}{1 + V(T)} N_{ges} \quad (5.8)$$

Das Glucoseextinktionsspektrum im physikalischen Kalibrationsmodell wurde von einer wässrigen Glucoselösung bei pH=7 gemessen, die vor dem Einspritzen in die Küvette Raumtemperatur ($T_R \approx 293K$) aufwies. Das Extinktionsspektrum setzt sich wie folgt zusammen:

$$\mathbf{a}_{gluc}(T_R) = \mathbf{a}_\alpha + \mathbf{a}_{muta} = \frac{1}{3} \mathbf{a}_\alpha + \frac{2}{3} \mathbf{a}_\beta \quad (5.9)$$

\mathbf{a}_{gluc} ist das Extinktionsspektrum der sich im thermodynamischen Gleichgewicht befindlichen Lösung, $\mathbf{a}_{\alpha/\beta}$ sind die konzentrationsnormierten Anteile der α - bzw. β -D-Glucose und \mathbf{a}_{muta} ist die Differenz zwischen dem Gleichgewichtsspektrum und dem zu Beginn der Messreihe gemessenen Spektrum \mathbf{a}_α .

Eine Zwischenrechnung ergibt für die Temperaturabhängigkeit des Glucoseextinktionsspektrums:

$$\mathbf{a}_{gluc}(T) = \mathbf{a}_{gluc}(T_R) + \frac{1 - 2V(T)}{2 + 2V(T)} \mathbf{a}_{muta} \quad (5.10)$$

Die Körpertemperatur eines Menschen liegt etwa bei $T_K \approx 310 K$. Dies ergibt einen zusätzlichen Anteil im Glucosespektrum von $\approx -0.01 \mathbf{a}_{muta}$. Das macht bei einer Glucosekonzentration von 200 mg/dL in der größten Bande des Mutarotations-Differenzspektrums bei 1082 cm^{-1} einen Unterschied in der Extinktion von etwa 0.04 mA.U. , was bei Messungen mit dem IR200 unterhalb des Rauschniveaus ist. Abb. 5.11 zeigt das um den Faktor 10 reduzierte Mutarotations-Differenzspektrum im Vergleich zur Differenz zweier temperaturabhängig bei 16 und 23 °C gemessenen Glucosespektren. Deren Konzentration wurde von 100 auf 200 mg/dL und die Temperaturdifferenz linear auf $17 K$ skaliert. Die Halbwertsbreite der spektralen Banden nimmt mit wachsender Temperatur wegen der Stoßverbreiterung zu [136], außerdem verursacht eine Modifikation der Hydrathülle, die die Glucosemoleküle umgibt, eine Bandenverschiebung, womit die Signaturen des Differenzspektrums erklärbar sind. Diese ähneln zum

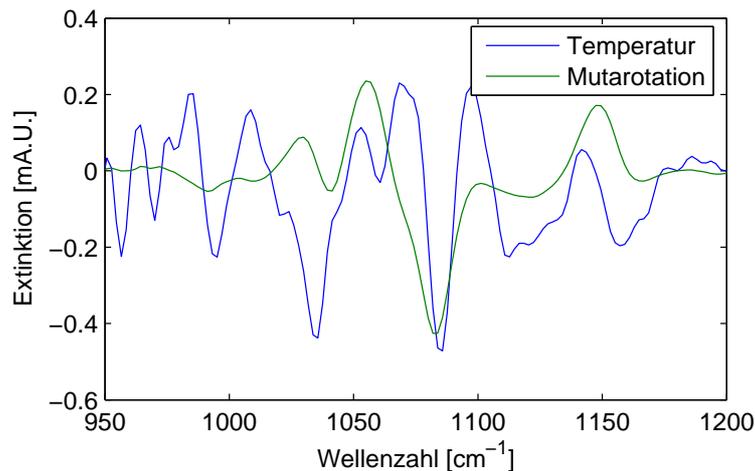


Abb. 5.11: Vergleich zwischen der Differenz zweier bei unterschiedlicher Temperatur gemessenen Glucoseextinktionsspektren (auf $\Delta T = 17^\circ\text{C}$ skaliert) und dem Mutarotations-Differenzspektrum (skaliert mit 0.1).

Teil der ersten (Bandenverschiebung) und der zweiten (Bandenverbreiterung) Ableitung einer Gauss-Kurve. Die zugehörigen Eigenschaften des Differenzspektrums sind in ihrer Position auf der Wellenzahlachse der Mutarotation ähnlich, zeigen jedoch deutlich abweichende Amplituden. Diese sind etwa um einen Faktor 10 größer als nach Gl. (5.10) berechnet. Außerdem ist die Halbwertszeit der Mutarotation zu groß, als dass sich bei der kurzen Verweildauer der Probe in der temperierten Küvette ein Gleichgewicht hätte einstellen können. Die Temperaturabhängigkeit der Glucoseabsorption lässt sich also durch die Mutarotations-Vorgänge nicht erklären.

5.2.2 Abhängigkeit der Komponentenspektren vom pH-Wert

Im Mittel liegen die pH-Werte von Körperflüssigkeiten wie z.B. Blut bei $\text{pH}=7.4$, dessen Wert durch verschiedene Puffersysteme konstant gehalten wird. Jedoch treten auch hier Abweichungen vom Normalwert auf. Verschiebungen im pH-Wert führen auch zu Veränderungen im Dissoziationsgleichgewicht schwacher Säuren. Die Spektren von Lösungen bekannter Reinstoff-Komponenten der Dialysate wurden für pH-Werte von $\text{pH}=5$ bis $\text{pH}=10$ gemessen. Niedrige pH-Werte der Proben wurden durch Zugabe von Salzsäure (1 M), hohe pH-Werte durch Zugabe von Natronlauge realisiert. In dieser stark basischen Lösung lösten sich messbare Mengen von CO_2 aus der Luft, da das Dissoziationsgleichgewicht $\text{H}_2\text{O} + \text{CO}_2 \rightleftharpoons \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$ erheblich in Richtung HCO_3^- verschoben ist. Die durch diese Verunreinigung verursachte Hydrogencarbonat-Bande zeigt sich in den Spektren und wurde außer beim Hydrogencarbonat durch skalierte Subtraktion eliminiert. Beim Harnstoff-Spektrum der $\text{pH}=10$ Lösung verbleibt ein Residuum der Bande der unter diesen Bedingungen vorliegenden CO_3^{2-} -Komponente.

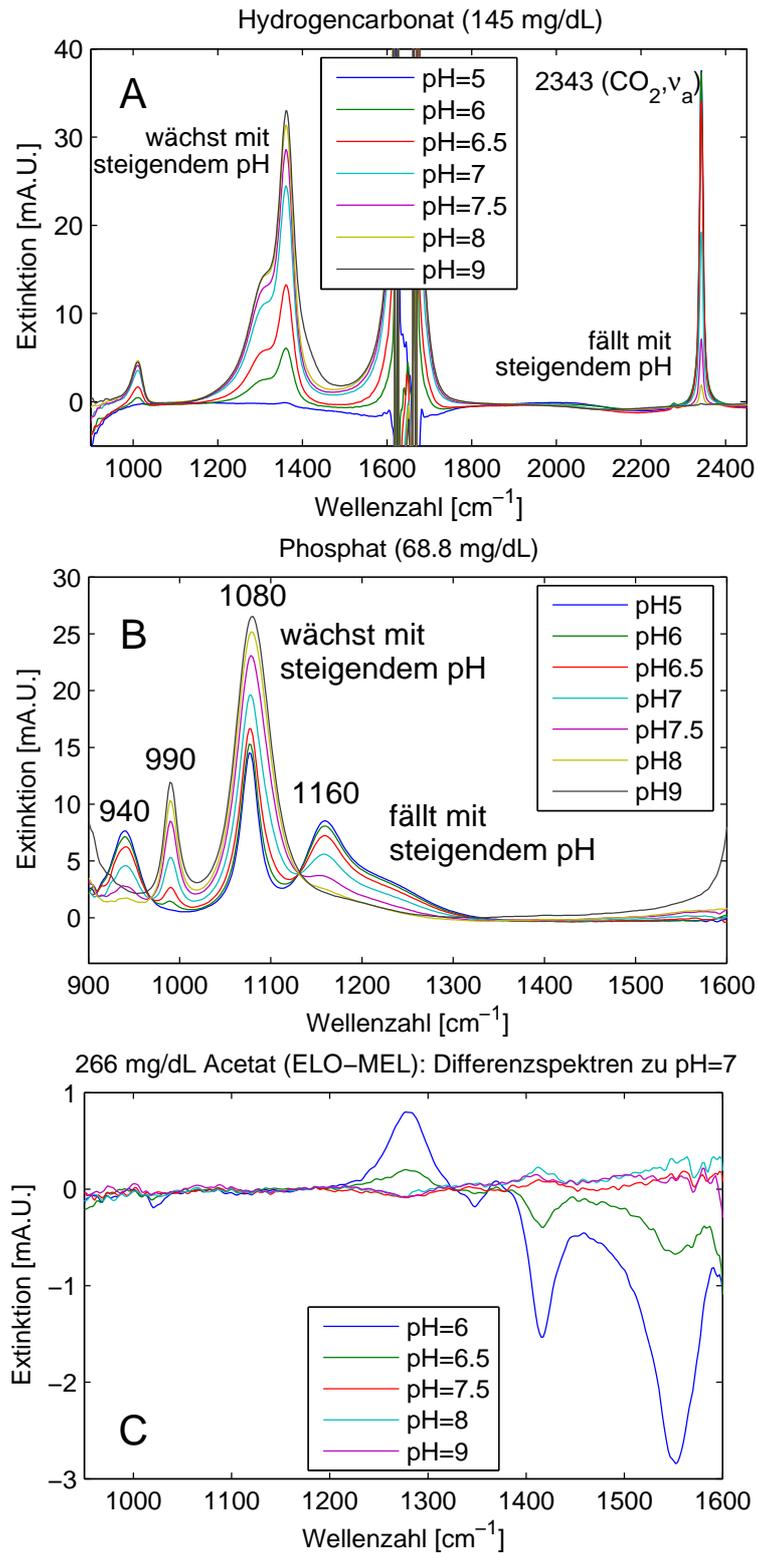


Abb. 5.12: Abhängigkeit der Dialysat-Komponenten und ihrer Spektren vom pH-Wert.

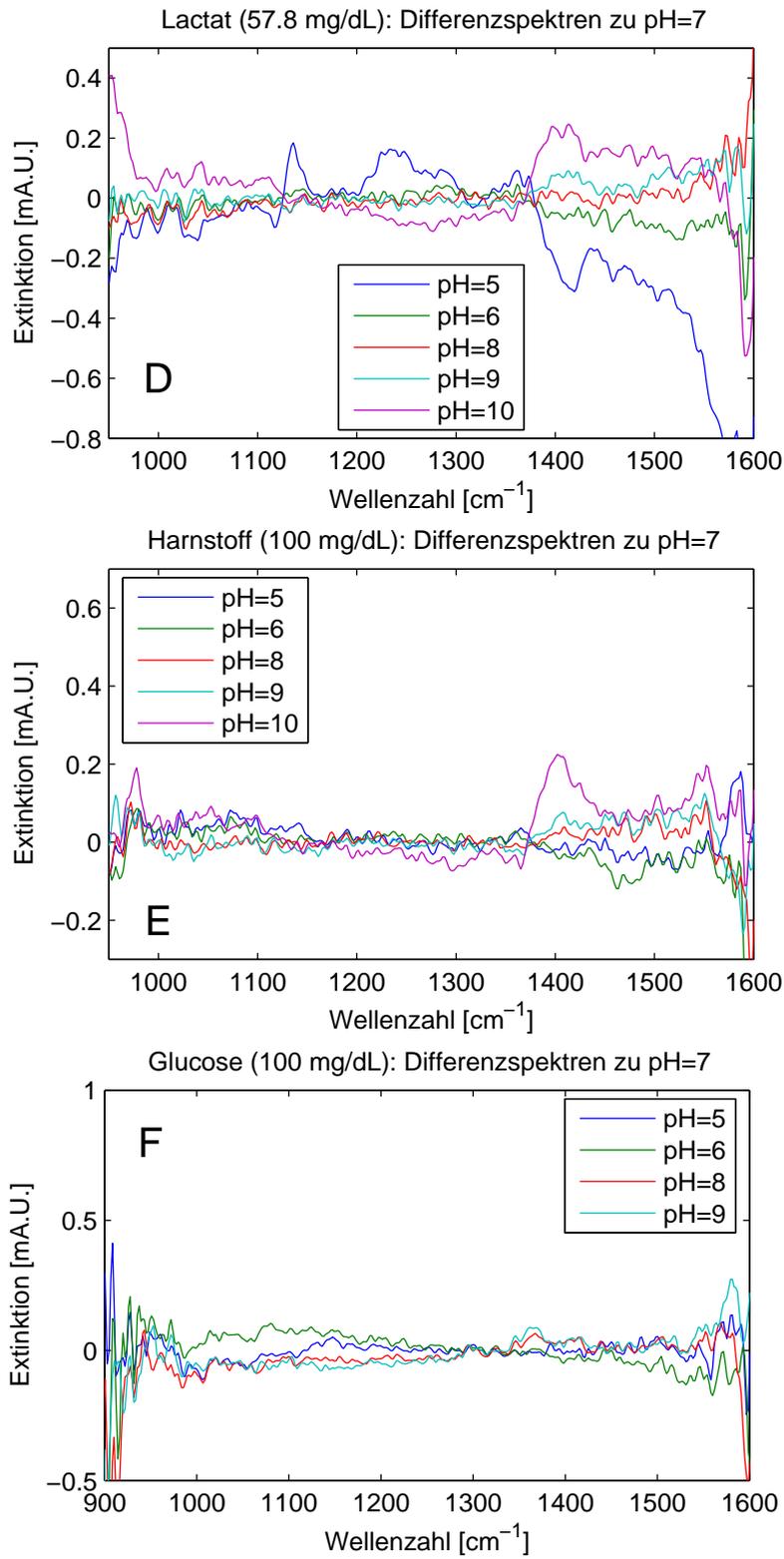


Abb. 5.13: Abhängigkeit der Dialysat-Komponenten und ihrer Spektren vom pH-Wert.

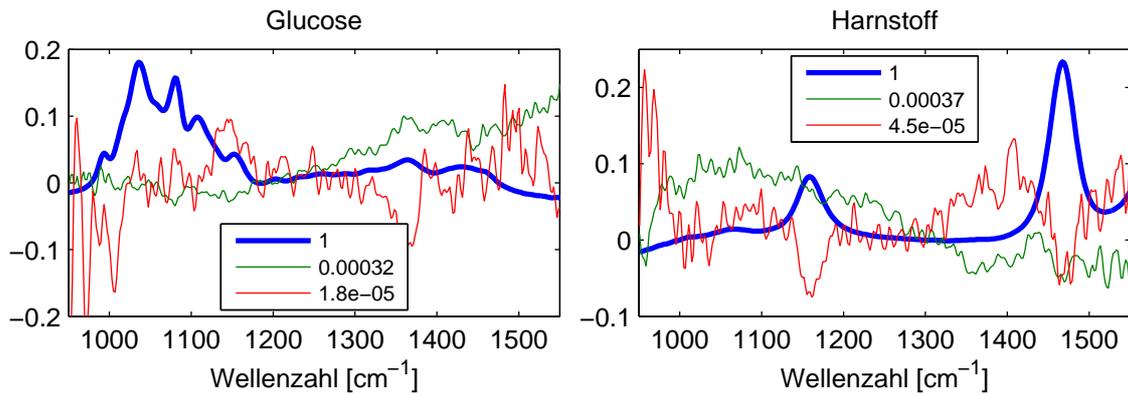


Abb. 5.14: PCA-Hauptkomponenten der vom pH-Wert abhängig gemessenen Glucose- und Harnstoff-Spektren. Die zugehörigen Varianzen sind in der Legende angegeben.

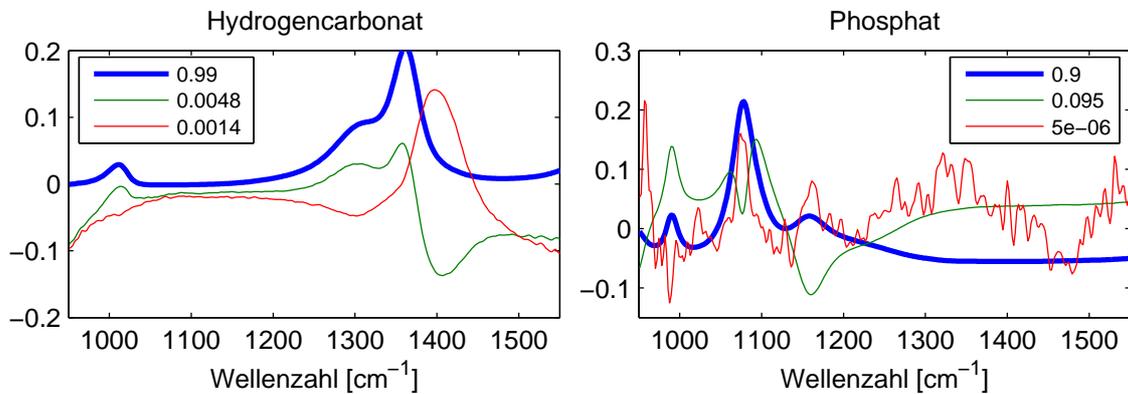


Abb. 5.15: PCA-Hauptkomponenten der bei unterschiedlichem pH-Wert gemessenen Spektren von physiologischen Puffersystemen.

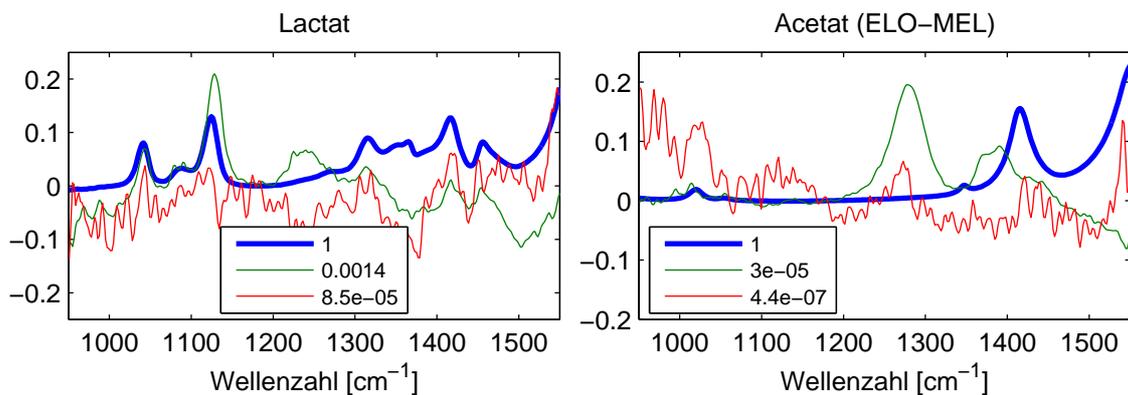


Abb. 5.16: PCA-Hauptkomponenten aus vom pH-Wert abhängig gemessenen Lactat- und Acetat-Spektren.

Abb. 5.12 und 5.13 zeigen die Spektren der vom pH-Wert abhängigen Lösungen der untersuchten Substanzen. Deren Konzentrationen beziehen sich auf die entsprechenden Anionen und sind in [mg/dL] angegeben. Um den Einfluss des pH-Wertes besser erkennen zu können, wurde für Glucose, Harnstoff, Lactat und Acetat das Spektrum der jeweils beim pH-Wert 7.0 gemessenen Lösung abgezogen. Abb. 5.14 bis 5.16 enthalten die mittels PCA berechneten ersten Hauptkomponenten der spektralen Daten. Die erste Hauptkomponente entspricht dem Mittelwert-Spektrum der jeweiligen Population, die zweite - im Falle der schwachen Säuren - dem pH-Wert bedingten Einfluss auf das Dissoziationsgleichgewicht.

Die Spektren und ihre pH-Abhängigkeit werden nun für die untersuchten Komponenten diskutiert. Die Hauptkomponenten können bei Anwendung des physikalischen Kalibrationsmodells eingesetzt werden, um die Kalibration zu verbessern. Dieses Vorgehen minimiert häufig das Residuum-Spektrum, führt aber wegen des komplizierteren Modells nicht immer zu verbesserten Resultaten.

Glucose und Harnstoff: Glucose und Harnstoff verändern sich in wässrigen Lösungen nicht in Abhängigkeit vom pH-Wert. Die 2. und 3. Hauptkomponente der PCA enthalten hauptsächlich Rauschanteile, die auch durch den Abstand der Varianzanteile zu dem Betrag der ersten Komponente erklärbar sind. Das Mutarotations-Gleichgewicht ist nicht vom pH-Wert beeinflusst. Es ist lediglich bekannt, dass durch Abweichungen vom neutralen Zustand die Gleichgewichtseinstellung beschleunigt werden kann. Der Einfluss der Mutarotation auf die Spektren bei biologischen Proben spielt also keine Rolle.

Acetat: Das Dissoziationsgleichgewicht des Acetats:



ändert sich mit der H^+ -Konzentration. Für $T = 25^\circ C$ beträgt der pK_{s0} -Wert 4.75 [137]. Das Gleichgewicht verschiebt sich mit steigendem pH-Wert von Essigsäure in Richtung CH_3COO^- . Der Anteil der mesomer stabilisierten Sauerstoffatome in der Carboxyl-Gruppe nimmt zu und damit der Anteil der zugehörigen Streckschwingungen mit Banden bei 1416 und 1553 cm^{-1} . Gleichzeitig sinkt die Extinktion der Bande bei 1280 cm^{-1} , die der Schwingung der einfachen C – O Bindung zugeordnet wurde. Die Extinktionsänderung der Bande bei 1280 cm^{-1} ist in der zweiten Hauptkomponente zu sehen (siehe Abb. 5.16).

Hydrogencarbonat: Im Gegensatz zum Acetat dissoziiert Dihydrogencarbonat (Trivialname: Kohlensäure) mehrstufig



H_2CO_3 ist nicht stabil und zerfällt beinahe vollständig ($pK_{s0}(20^\circ C) = 1.41 \Rightarrow 96\%$)⁴.

⁴Die hier verwendeten logarithmierten Dissoziationskonstanten des Carbonats pK_{s0} , pK_{s1} und pK_{s2} stammen aus [138].

Aus dem Verhältnis der Konzentrationen von CO_2 und HCO_3^- kann auf den pH-Wert der Lösung geschlossen werden. Das Massengleichgewicht, das durch den pK_s -Wert charakterisiert ist, liefert:

$$pK_{s1}(20^\circ C) = 6.38 = -\log_{10} \frac{[HCO_3^-][H^+]}{[H_2CO_3]} \quad (5.13)$$

Nach einfacher Umformung ergibt sich die Henderson-Hasselbalch-Gleichung [139]:

$$pH = pK_{s1} + \log_{10} \frac{[HCO_3^-]}{[H_2CO_3]} = const + \log_{10} \frac{a_{HCO_3^-}}{a_{CO_2}} \quad (5.14)$$

Das Verhältnis der Konzentrationen ist proportional zum Verhältnis der gemessenen Extinktionen $a_{HCO_3^-}$ und a_{CO_2} ; der zu kalibrierende Skalierungsfaktor ergibt logarithmiert einen additiven Beitrag. Dieser wurde mit der logarithmierten Dissoziationskonstanten pK_{s1} , den molaren Extinktionskoeffizienten von CO_2 und HCO_3^- und dem als konstant angenommenen Dissoziationsgrad von $CO_2 + H_2O \rightleftharpoons H_2CO_3$ in der Konstanten $const$ zusammengefasst, die durch eine Regressionsrechnung berechnet werden kann. Somit lässt sich mittels IR-spektroskopischer Messung auch der pH-Wert solcher Lösungen ermitteln.

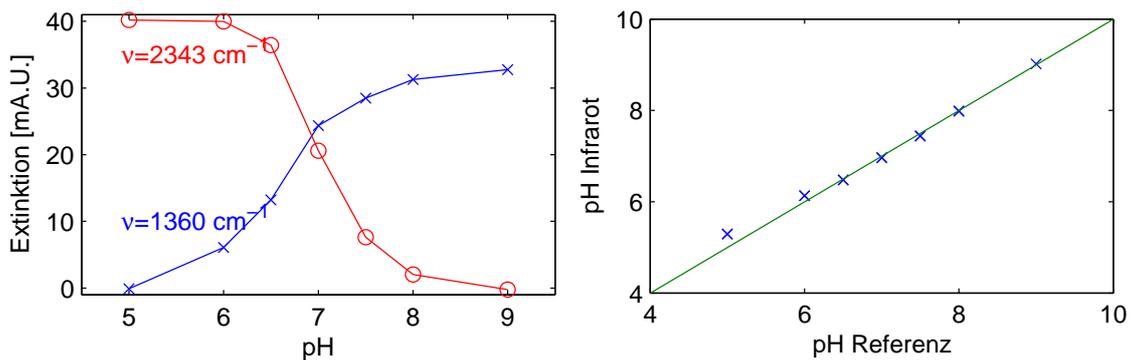


Abb. 5.17: Extinktionsamplituden der Hydrogencarbonat- und CO_2 -Bande und die hierüber nach einer Anpassung des Ordinatenabschnitts berechneten pH-Werte.

Die linke Hälfte der Abb. 5.17 zeigt die Amplitude des Maximums der zum CO_2 und zum Hydrogencarbonat gehörenden Extinktionsbanden als Funktion vom pH-Wert. Die unsymmetrische Streckschwingung des CO_2 absorbiert in wässrigen Medien bei 2343 cm^{-1} [140]. Das Absorptionsmaximum der intensivsten Hydrogencarbonat-Bande liegt im mittleren IR bei 1360 cm^{-1} . Die rechte Hälfte der Abb. 5.17 zeigt die Bestimmung der pH-Werte mit Hilfe der Henderson-Hasselbalch-Gleichung (5.14). Bei kleinen pH-Werten sinkt die Konzentration des Hydrogencarbonats soweit, dass nur noch eine ungenaue pH-Wert Bestimmung möglich ist. Entsprechendes gilt für große pH-Werte und die CO_2 Messung. Die additive Konstante $const$ wurde daher im Sinne einer optimalen Übereinstimmung nur im physiologisch wichtigen Bereich von pH=6 bis pH=8 angepasst und als Mittelwert von $pH - \log_{10} a_{HCO_3^-}/a_{CO_2}$ berechnet. Die Unsicherheit für die pH-Wert Bestimmung zwischen pH=6 und pH=8 beträgt 0.06 Einheiten. Eine Basislinien-Korrektur

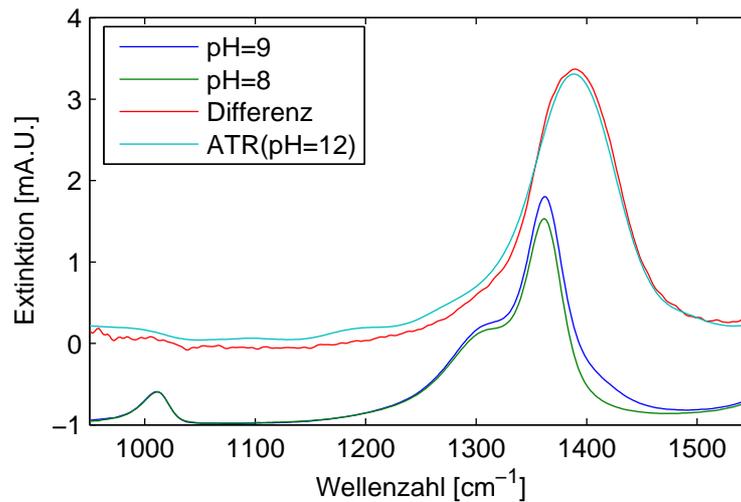


Abb. 5.18: In Transmission gemessene Spektren wässriger Hydrogencarbonatlösung bei pH=8 und pH=9 zusammen mit dem zugehörigen Differenzspektrum und einem mittels ATR-Messtechnik aufgenommenen Spektrum einer Carbonat-Lösung bei einem pH-Wert von pH=11.5 (Spektren amplitudennormiert und verschoben).

oder die Verwendung der Fläche unter den Absorptionsbanden für die pH-Wert Bestimmungen wurde versucht, ergab jedoch keinerlei Verbesserung der Bestimmung der pH-Werte.

Bei Erhöhung des pH-Wertes dissoziiert HCO_3^- weiter zu $\text{CO}_3^{2-} + \text{H}^+$. Die zugehörige logarithmierte Dissoziationskonstante ist $pK_{s2}(20^\circ\text{C}) = 10.38$, so dass erst bei großen pH-Werten über 8 spektral messbare Konzentrationen von CO_3^{2-} vorliegen. Bei pH=8 ist das Gleichgewicht in Richtung HCO_3^- verschoben. Das Spektrum dieser Komponente wurde skaliert von dem bei pH=9 aufgenommenen Spektrum subtrahiert. Abb. 5.18 zeigt die zugehörigen Extinktionsspektren im Vergleich. Ebenfalls abgebildet ist das mittels der ATR-Messtechnik gemessene Extinktionsspektrum einer wässrigen Natriumcarbonat-Lösung bei pH=11.5. Für die ATR-Messungen wurde eine Diamantsonde - mit zwei bei 45° stattfindenden Reflexionen - verwendet. Bei diesem pH-Wert ist das Dissoziationsgleichgewicht nahezu vollständig in Richtung CO_3^{2-} verschoben. Das Differenz- und das ATR-Spektrum sind beinahe identisch und zeigen die gleiche Absorptionsbande bei 1390 cm^{-1} . Die pK_s -Werte des Carbonats sind u.a. abhängig von der Ionenkonzentration [141]. Dies kann die Quantifizierung der pH-Werte stören und führt zu Residuen bei der Auswertung der Spektren von Carbonat-haltigen Lösungen mit dem physikalischen Modell. Um diese Veränderungen im Dissoziationsgleichgewicht zu berücksichtigen, wurde das Differenzspektrum dem CLS-Modell hinzugefügt.

Die Löslichkeit von CO_2 in wässriger Lösung hängt vom Partialdruck P_{CO_2} an der Grenzfläche zwischen Flüssigkeit und Gas ab. Nach dem Henryschen Gesetz gilt der Zusammenhang [138]:

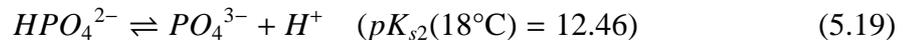
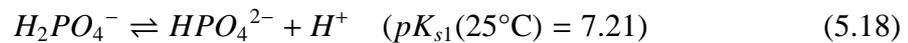
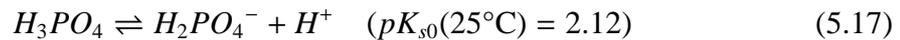
$$[\text{CO}_2] = K_{\text{CO}_2} P_{\text{CO}_2}, \quad K_{\text{CO}_2}(T = 298\text{K}) = 33.5 \times 10^{-3} \frac{\text{M}}{\text{bar}} \quad (5.15)$$

$[CO_2]$ ist die molare Konzentration des im dynamischen Gleichgewicht gelösten CO_2 und K_{CO_2} die Henry-Konstante. Bei einem Partialdruck von $P_{CO_2} \approx 340 \times 10^{-6} \text{ bar}$ in der Raumluft ist die Lösung bereits bei 0.01 mM gesättigt. Der Partialdruck P_{CO_2} , bei dem die Lösung mit CO_2 gesättigt ist, berechnet sich als Funktion des pH-Wertes und der Konzentration des vollständig dissoziierenden $NaHCO_3$ unter Verwendung der Henderson-Hasselbalch-Gleichung (5.14) zu:

$$P_{CO_2}(pH) = \frac{[NaHCO_3]}{K_{CO_2} \times 10^{-pK_{s0}} \times 10^{pH-pK_{s1}}} \quad (5.16)$$

Bei $[NaHCO_3] = 100 \text{ mg/dL} \approx 12 \text{ mM}$ ist der benötigte Partialdruck für ein dynamisches Gleichgewicht bei $pH=7$ bereits 2.2 bar . Die Proben wurden nach dem Ansetzen in gasdichten 100 mL Messkolben aufbewahrt, dennoch konnte das Ausgasen des CO_2 speziell bei kleinem pH-Wert vermutlich nicht vermieden werden. Dies ist jedoch unerheblich für das Verhältnis der Konzentrationen von CO_2 und HCO_3^- und hat damit keinen Einfluss auf die Bestimmung des pH-Wertes.

Phosphat: Den größten Einfluss hat der pH-Wert auf die Gleichgewichtseinstellung der verschiedenen Phosphat-Ionen, die eine wichtige Pufferkomponente in physiologischen Flüssigkeiten bilden. Die Phosphor-Säure dissoziiert dreistufig⁵:



Im gemessenen pH-Wert Bereich liegen im Wesentlichen $H_2PO_4^-$ und HPO_4^{2-} vor. Daher sind spektrale Veränderungen bereits mit den beiden ersten Hauptkomponenten der Serie von pH-Wert abhängig aufgenommenen Spektren modellierbar. Die Extinktion bei 990 und 1080 cm^{-1} steigt mit dem pH-Wert an, diese Banden gehören also zum HPO_4^{2-} . Gleichzeitig nehmen die Banden des $H_2PO_4^-$ bei 937 und 1161 cm^{-1} ab (siehe S. 58, Abb. 5.12 B).

Lactat: Der pH-Wert physiologischer Flüssigkeiten wird durch verschiedene Parameter beeinflusst. Liegt der pH-Wert im Blut unterhalb von 7.35 spricht man von einer Azidose. Ein Grund hierfür kann das als Stoffwechselzwischenprodukt beim Abbau von Kohlenhydraten im Übermaß gebildete Lactat (Lactat-Azidose) sein. Eine solche Übersäuerung durch Anhäufung von Lactat führt in ausgeprägten Fällen zu Schock und Versagen der Nierenfunktion. Milchsäure dissoziiert mit $pK_{s0}(^\circ\text{C}) = 3.86$ [139] zu Lactat:



Wegen des niedrigen pK_s -Wertes liegt bei physiologischen pH-Werten in wässrigen Lösungen nahezu ausschließlich Lactat vor.

⁵Die logarithmierten Dissoziationskonstanten der Phosphor-Säure stammen aus [137].

Eine Bestimmung der Komponentenspektren mit den Konzentrationsanteilen ist mittels MCR (Multivariate Curve Resolution) möglich [142]. Linearkombinationen der Hauptkomponentenspektren, die positive und negative Anteile aufweisen, führen dann zu Komponentenspektren, mit nur positiven Extinktionen.

5.2.3 Temperaturabhängigkeit der Komponentenspektren

Die Extinktionskoeffizienten von Wasser sind auch im mittleren IR temperaturabhängig [143]. Die Temperaturabhängigkeit der Dialysat-Komponenten ist wegen der starken Verdünnung deutlich geringer in den Spektren ausgeprägt. Um das physikalische Modell diesbezüglich zu optimieren, wurde die Temperaturabhängigkeit der Spektren der untersuchten Komponenten im für unsere Messungen relevanten Bereich von etwa 24 bis 15°C gemessen. Mit zwei Spritzen in beiden verwendeten Spritzenpumpen wurde die Küvette durch einen Y-Adapter abwechselnd mit entionisiertem Wasser und der Probe befüllt und jeweils ein Einkanalspektrum aufgezeichnet. Die erste Probe wurde ohne aktive Kühlung der Küvette gemessen. Die Temperatur im Probenraum des Spektrometers

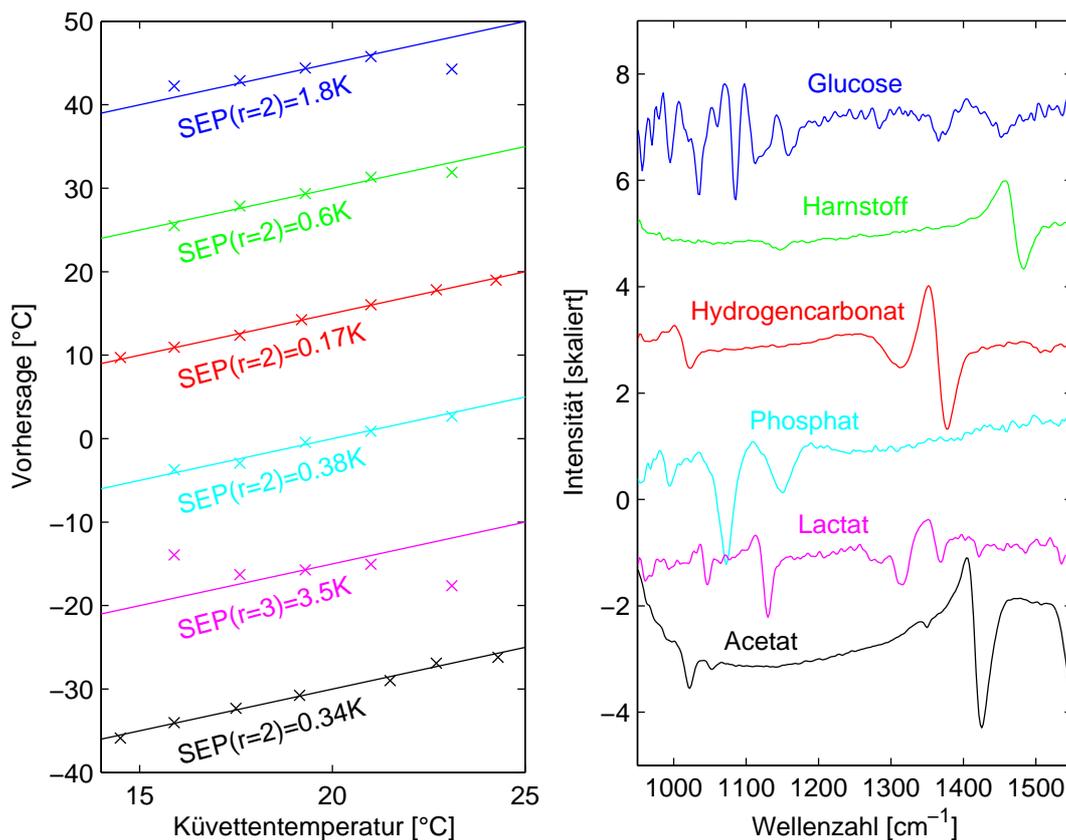


Abb. 5.19: Scatterplots und Eigenschaftskorrelationsspektren, die über die Temperaturen und die zugehörigen spektralen Daten berechnet wurden (jeweils in der Ordinatenachse verschoben, die Geraden zeigen die Identität).

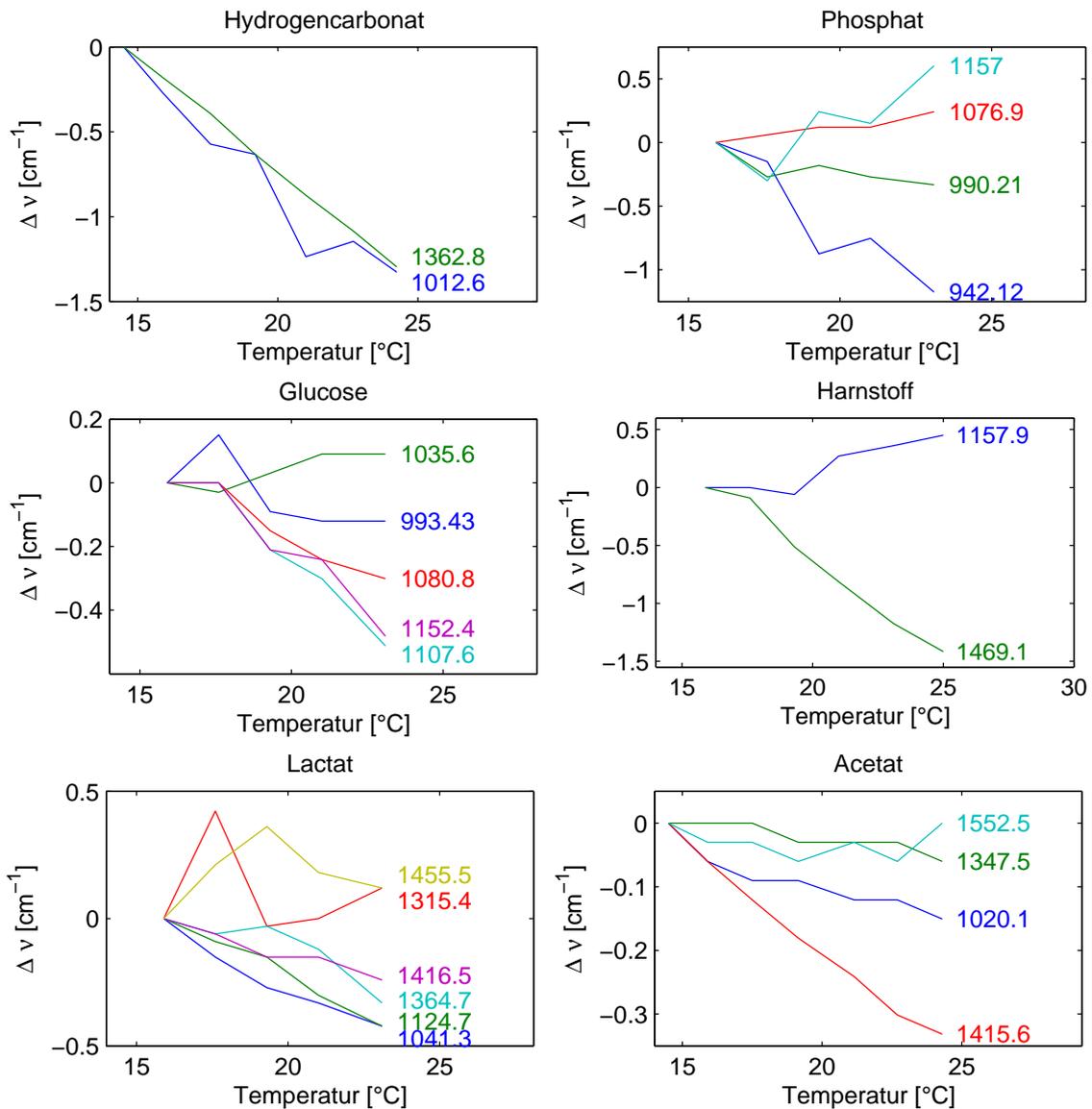


Abb. 5.20: Temperaturabhängigkeit: Verschiebung der spektralen Banden einiger Dialysat-Komponenten.

ist durch die Abwärme der Elektronik gegenüber der Raumtemperatur leicht erhöht (etwa 24°C). Vor jeder Messung wurde die Temperatur der Küvettenhalterung mit Hilfe der Peltier-Regelung um etwa 1.5°C erniedrigt und die Gleichgewichtseinstellung der Peltier-Kühlung abgewartet.

Die Dichte einer wässrigen Lösung sinkt oberhalb von 4°C mit steigender Temperatur. Um die hieraus resultierende Konzentrationsänderung in der Küvette als Ursache für Änderungen der spektralen Eigenschaften auszuschließen, wurden die Spektren vor der weiteren Auswertung mit der reziproken Dichte skaliert, deren Zahlenwerte aus [144] entnommen wurden. Weitere Einflüsse der Temperatur auf die spektralen Banden sind im untersuchten Temperaturbereich nahezu linear. Um dies zu veranschaulichen, wurde

eine PLS-Regression mit den Temperaturen als Referenzwerten durchgeführt. Abb. 5.19 zeigt die mittels der leave-1-out Kreuzvalidierung berechneten Temperaturen zusammen mit den zugehörigen Eigenschaftskorrelationsspektren für die einzelnen Komponenten. Das zugehörige Eigenschaftskorrelationsspektrum des Acetats wurde als Komponente des physikalischen Modells zur Spektrenauswertung verwendet, wenn die Proben relativ große Anteile an Acetat enthielten, wie z.B. bei den Wiederfindungsraten-Messungen in Kap. 5.3.4 oder bei den Dialysaten, die in den klinischen Studien mit ELO-MEL-Lösung als Perfusat gewonnen wurden (Kap. 5.5). Speziell bei Hinzunahme des Eigenschaftskorrelationsspektrums des Acetats verringerte dieses Verfahren die Amplituden der spektralen Residuen erheblich.

Ein dispersionsartiger Verlauf der Eigenschaftskorrelationsspektren zeigt eine temperaturabhängige Wellenzahlverschiebung. Um diese im Detail zu untersuchen, wurden die Extinktionsspektren mit einem Zerofill-Faktor von 128 transformiert und die Positionen der Bandenmaxima als Funktion der Temperatur bestimmt. Die Verschiebung bzgl. der Maxima bei der niedrigsten gemessenen Temperatur ist in Abb. 5.20 dargestellt. Die angegebenen Wellenzahlen in der Grafik sind die Positionen der Banden bei der niedrigsten gemessenen Temperatur. Die Verschiebung der spektralen Banden hat unterschiedliche Ursachen: Die Schwingungsfrequenz ist abhängig von den schwingenden Massen und deren Bindungsstärke. Eine vermehrte Brownsche Molekularbewegung mit steigender Temperatur führt zu einer Dämpfung der Schwingungen. Die Zusammensetzung der Wasser-Cluster ist ebenfalls temperaturabhängig, daraus resultiert eine Änderung der Hydrathülle der im Wasser gelösten Moleküle, was eine Verschiebung der Elektronenverteilung hervorrufen kann. Eine größere Elektronendichte zwischen den Molekül-Atomen ist mit einer stärkeren Bindung und damit einer höheren Schwingungsfrequenz verbunden und umgekehrt. Ein Wechsel der Hydrathülle führt auch zu veränderten schwingenden Massen der äußeren Molekülgruppen; eine größere Masse bedeutet dabei eine kleinere Anregungsfrequenz.

5.2.4 Weitere spektrale Abhängigkeiten und Komponenten

Einfluss der Ionenstärke

Die spektralen Eigenschaften von EDTA ändern sich durch Komplexbildung mit bestimmten Kationen je nach Konzentration und Zusammensetzung der Elektrolyte in der Probe beträchtlich. Dies betrifft zum einen die Lage und zum anderen die Amplitudenverhältnisse der Absorptionsbanden. Abb. 5.21 zeigt verschiedene Varianten des Extinktionsspektrums des in den uns vorliegenden Blutplasma-Proben enthaltenen EDTAs. Dieses wurde einmal in destilliertem Wasser und einmal in Ringer⁶-Lösung angesetzt und dann gegen eine mit Wasser bzw. Ringer-Lösung gefüllte Küvette spektroskopiert. Der Einfluss der Komplexbildung auf die spektralen Eigenschaften ist unabhängig von den Extinktionsunterschieden zwischen Ringer-Lösung und Wasser; dort verursachen die Elektrolyte

⁶Fresenius: Bestehend aus Calciumchlorid-2H₂O (0.33 g/L), Kaliumchlorid (0.30 g/L) und Natriumchlorid (8.6 g/L) in einer wässrigen Lösung mit Natronlauge und Salzsäure (pH=5 bis pH=7).

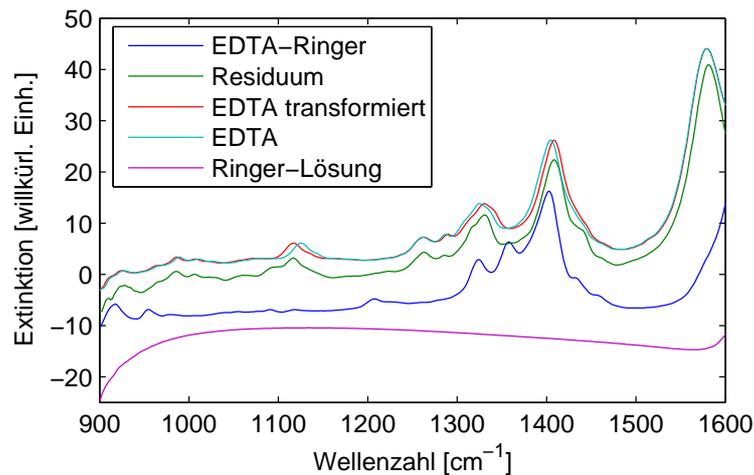


Abb. 5.21: Spektren von unterschiedlichen EDTA-Lösungen und das Wellenzahl-korrigierte Spektrum von EDTA in destilliertem Wasser, die gegen die mit Wasser bzw. Ringer-Lösung gefüllte Küvette gemessen wurden (siehe Text). Zum Vergleich ist hier noch einmal das Spektrum der gegen Wasser gemessenen Ringer-Lösung abgebildet.

nur eine Veränderung der Wasserbanden, eigene Absorptionsbanden im mittleren IR existieren jedoch nicht.

Das Residuum, das nach skaliertem Subtraktion aller bekannten Komponentenspektren vom Mittelwert-Spektrum der Dialysate verbleibt, ist dem Spektrum des in destilliertem Wasser gelösten EDTAs am ähnlichsten; dessen Wellenzahlachse wurde an Hand der Positionen der Bandenmaxima an das Residuum angepasst und das daraus erhaltene Spektrum für das physikalische Modell verwendet. Die Güte des physikalischen Modells konnte damit erheblich verbessert werden. Zum einen eliminierte die Verwendung des transformierten EDTA-Spektrums eine systematische Verschiebung von etwa 10 mg/dL in den Konzentrationsbestimmungen des Harnstoffs und zum anderen verringerte sie die Unsicherheiten der Glucosebestimmung von $\text{SEP}_{\text{CLS,gluc}} = 5.5 \text{ mg/dL}$ auf 4.8 mg/dL und des Harnstoffs von $\text{SEP}_{\text{CLS,harn}} = 3.2 \text{ mg/dL}$ auf 2.1 mg/dL . Ein Versuch, das oben genannte, nach skaliertem Subtraktion verbleibende Residuum-Spektrum direkt als Komponente des physikalischen Modells zu verwenden, lieferte geringfügig schlechtere Resultate als das mit dem teilweise in der Wellenzahlachse manipulierte EDTA-Spektrum.

Eine Alternative zu dieser Optimierung des physikalischen Modells stellt das so genannte *Hard-modeling* [145] dar, hier werden die Spektren der einzelnen Komponenten als Summe aus Voigt-Profilen der spektralen Banden modelliert. Dazu werden deren Lagen, Halbwertsbreiten und Amplitudenverhältnisse verwendet, um die Spektren der einzelnen Komponenten zu simulieren. In einer anderen Arbeit [146] wird vorgeschlagen, eine Hauptkomponentenanalyse der Residuen, die nicht modellierte spektrale Bestandteile aufweisen, durchzuführen und das physikalische Modell um die ersten Hauptvektoren zu erweitern.

Der Einfluss der Elektrolyte auf das Extinktionsspektrum von Hydrogencarbonat-Lösungen wurde ebenfalls untersucht. Dazu wurden wässrige Lösungen von Natriumhy-

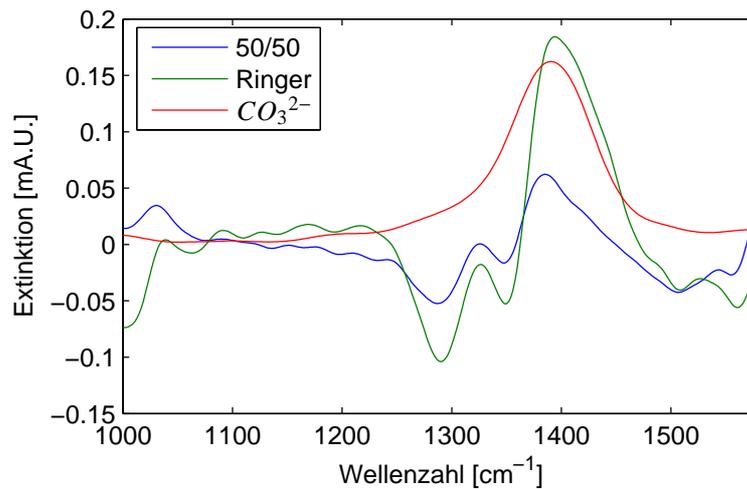


Abb. 5.22: Differenzspektren von Hydrogencarbonat-Lösungen mit unterschiedlichen Elektrolytkonzentrationen (pH=7) mit den Spektren des in reinem Wasser gelösten Salzes als Subtrahend und das mittels der ATR-Messtechnik aufgenommene Spektrum einer wässrigen Carbonat-Lösung bei einem pH-Wert von pH=11.5, bei dem - bedingt durch das Dissoziationsgleichgewicht - beinahe ausschließlich CO_3^{2-} vorliegt.

drogencarbonat bei einem pH-Wert von pH=7 in Wasser, Ringer-Lösung und einer mit Wasser um 50% verdünnten Ringer-Lösung angesetzt (200 mg/dL). Die Spektren der 3 Proben wurden gegen ein Referenz-Einkanalspektrum von Wasser aufgezeichnet. Auf die Extinktionsspektren der elektrolythaltigen Lösungen wurde das physikalische Modell bestehend aus einem Spektrum der Ringer-Lösung, der in Wasser angesetzten Natriumhydrogencarbonat-Lösung und einer konstanten Basislinie angewandt. Die logarithmierten Dissoziationskonstanten nehmen nach [141] mit zunehmender Ionenkonzentration ab, d.h. das Gleichgewicht ist in der elektrolythaltigen Lösung in Richtung des CO_3^{2-} verlagert. Abb. 5.22 zeigt die nach skaliertem Subtraktion der Komponenten des Modells verbleibenden Residuen-Spektren und zum Vergleich noch einmal das mittels der ATR-Messtechnik aufgenommene Spektrum einer wässrigen Natriumcarbonat-Lösung bei einem pH-Wert von pH=11.5. Die zur Herstellung der Dialysate eingesetzten Perfusate (Ringer- und ELO-MEL-Lösung) - und damit auch die Dialysate - sind elektrolythaltig, daher wurde das CO_3^{2-} -Spektrum bei der Auswertung mit Hilfe des physikalischen Modells einbezogen, um die Verschiebung des Dissoziationsgleichgewichts zu berücksichtigen.

Sulfat

Ein weiterer Bestandteil der untersuchten Körperflüssigkeiten ist Sulfat (SO_4^{2-}). Die Konzentration im Blutplasma ist etwa $0.5 \text{ mM} \approx 5 \text{ mg/dL}$ [147]. Die Absorptionsbande von Sulfat bei 1103 cm^{-1} liegt im Zentrum des Absorptionsspektrums von Glucose. Die Verwendung im physikalischen Modell hat damit einen direkten Einfluss auf die Bestimmungen der Glucosekonzentrationen. Abb. 5.8 (S. 54) enthält unter anderem das skalierte,

bei einem pH-Wert von 7.0 und Raumtemperatur gemessene Extinktionsspektrum einer wässrigen Lösung, die mit $100 \text{ mg/dL Na}_2\text{SO}_4$ in destilliertem Wasser angesetzt wurde. Temperatur und pH-Wert Abhängigkeiten wurden für diese Komponente nicht untersucht.

Einfluss der Apodisationsfunktion

Die bei der FT-Spektroskopie gemessenen Interferogramme haben wegen der beschränkten Weglängendifferenz des beweglichen Interferometerspiegels nur eine endliche Länge. Die Seitenarme sind abgeschnitten, was mathematisch einer Multiplikation mit einer Rechteckfunktion entspricht. Eine Multiplikation mit einer Funktion im Fourier-Raum entspricht einer Faltung mit der Fourier-Transformierten der Funktion im Realraum. Die Fourier-Transformierte einer Rechteckfunktion ist die $\text{sinc}(x) = \sin(x)/x$ Funktion; diese hat einen Peak mit großen benachbarten Überschwängern. Die Halbwertsbreite der auch instrumentelle Linienfunktion genannten Funktion ist umgekehrt proportional zur Breite der Rechteckfunktion. D.h. die Auflösung der Spektren sinkt mit einer Verringerung der maximalen optischen Weglängendifferenz $\Delta x_{\text{max}} = 2\Delta l_{\text{max}}$ zwischen beiden Interferometerarmen. Nach [74] gilt für die Auflösung $\delta\bar{\nu} = 1/\Delta x_{\text{max}}$.

Um die Überschwinger zu reduzieren, wurden so genannte Apodisationsfunktionen vorgeschlagen, mit denen das Interferogramm vor Anwendung der Fourier-Transformation gewichtet wird. Die Halbwertsbreite der Fourier-Transformierten einer Apodisationsfunktion sollte möglichst schmal sein, und die Überschwinger müssen kleine Amplituden besitzen, um eine optimale spektrale Auflösung und nicht durch Seitenbandmodulationen beeinträchtigte Absorptionsbanden zu gewährleisten. In Tab. 5.1 sind die relativen Breiten einiger Fourier-transformierter Apodisationsfunktionen angegeben [74, 148]. Die gemessene Halbwertsbreite von Absorptionsbanden ergibt sich über eine Faltung der "wahren" Transmissionsspektren mit der instrumentellen Linienfunktion. In der Literatur wurden verschiedene Verfahren zur Entfaltung vorgestellt, jedoch ist dies ohne Bedeutung, wenn alle auszuwertenden Spektren unter gleichen Bedingungen aufgenommen und berechnet wurden. Ein wichtiger Aspekt ist, dass bei Spektrenauswertungen mit größeren Extinktionen nichtlineare Abhängigkeiten gegenüber Konzentrationsänderungen auftreten können,

Name	rel. Auflösung	rel. Überschwinger
Boxcar	0.61	0.35
Dreieck	0.89	0.047
4-Punkt	0.77	0.18
Happ-Genzel	0.91	0.014
Blackman-Harris-3-Term	1.15	0.0006
Blackman-Harris-4-Term	1.33	0.00005
Norton-Beer-schwach	0.73	0.101
Norton-Beer-mittel	0.85	0.028
Norton-Beer-stark	0.95	0.019

Tab. 5.1: Relative Auflösung einiger Apodisationsfunktionen.

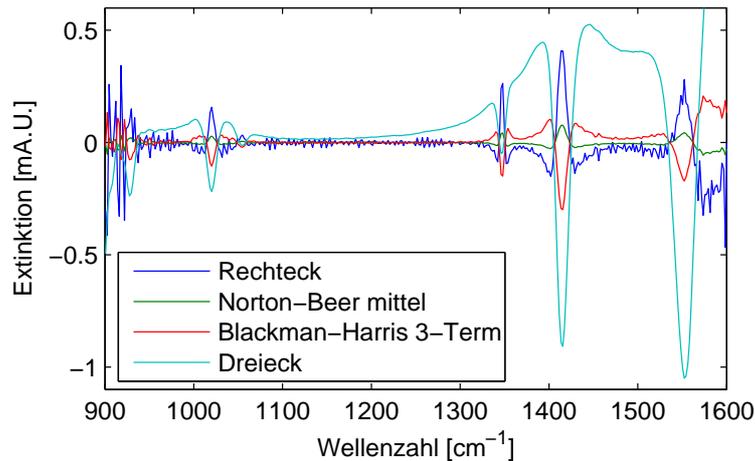


Abb. 5.23: Einfluss verschiedener Apodisationsfunktionen auf das Acetat-Spektrum. Differenzspektren zum mit Happ-Genzel-Apodisation erhaltenen Spektrum einer wässrigen Acetat-Lösung (266 mg/dL), das mit einer Auflösung von 4 cm^{-1} gemessen wurde.

die jedoch hier bei den eher geringen Extinktionen keine Rolle spielen [149]. Der Einfluss verschiedener Apodisationsfunktionen auf die Form der Absorptionsbanden wird in Abb. 5.23 am Beispiel eines Acetat-Spektrums dargestellt. Dieses wurde mit verschiedenen Apodisationsfunktionen berechnet und die mit Happ-Genzel-Apodisation berechnete Variante von den übrigen Spektren abgezogen. Bei den hier vorgestellten Spektren wurde die Happ-Genzel Apodisation bevorzugt eingesetzt. Neben den Bandenformen ist ebenfalls das spektrale Rauschen von der Apodisation abhängig. Dieses ist bei Anwendung der Boxcar-Apodisationsfunktion um einen Faktor $\sqrt{3}$ größer als z.B. bei der Verwendung der Dreiecksfunktion, weil die Seitenarme mit geringer Signalintensität stärker gewichtet werden [150].

5.3 In-vitro Messungen von Dialysaten

Die Mikro-Dialyse wird verwendet, um kontinuierlich Körperflüssigkeiten zu gewinnen, die frei von Proteinen und Blutzellen sind. Dialysate von biologischen Proben, wie z.B. Blutplasma, Serum oder Blut, haben eine relativ einfache Zusammensetzung, hinsichtlich dessen, was IR-spektroskopisch unter den Randbedingungen unserer Experimente bestimmbar ist. Diese Zusammensetzung soll im Folgenden detailliert geklärt werden. Dazu wurden EDTA-Blutplasma-Proben aus einer früheren Messkampagne [49], die seit 1994 im Gefrierschrank bei -30°C aufbewahrt wurden, dialysiert und die Dialysate spektroskopiert. Die wichtigsten im mittleren IR absorbierenden Bestandteile der Dialysate konnten durch skalierte Subtraktion von Komponentenspektren identifiziert werden. Von den Dialysaten und einem Teil der Proben wurden im klinisch-chemischen Labor die Glucose- und Harnstoff-Konzentrationen ermittelt. Die spektralen Daten mit den zugehörigen Referenzwerten wurden mit unterschiedlichen multivariaten Verfahren untersucht, um daraus

ein geeignetes Kalibrationsmodell zu berechnen, das Konzentrationsbestimmungen von zukünftig gemessenen Dialysaten ermöglicht.

Zur Vermeidung der Koagulation der Plasma-Proteine, die u.a. durch Calciumionen ausgelöst wird, wurde den Blutproben EDTA hinzugegeben. Dieses bildet Komplexe mit den Calciumionen im Plasma. Die EDTA-Moleküle sind kleiner als der *Cut-Off* der Dialysemembran, so dass sie bei der Analyse der Dialysate berücksichtigt werden sollten. EDTA absorbiert im mittleren IR mit verschiedenen Schwingungsbanden und musste bei der Auswertung der Dialysat-Spektren entsprechend einbezogen werden.

5.3.1 Dialyse von Blutplasma

Mit dem in Abb. 5.24 gezeigten Aufbau wurden etwa 100 EDTA-Blutplasma-Proben dialysiert. Die CMA60 Dialysekatheter wurden bei Raumtemperatur in jeweils 1.1 mL Blutplasma getaucht. Bei ständiger Durchmischung der Probe mit einem Magnetrührer wurde das Perfusat mit einer Flussrate von 1 $\mu\text{L}/\text{min}$ durch den Dialysekatheter gepumpt. Dazu wurden zwei Spritzenpumpen (TSE Systems GmbH, Bad Homburg) verwendet, einmal das Modell 540100, ausgestattet mit zwei luftdichten Spritzen mit einem Volumen von 5 mL mit Luerlockanschluss (Hamilton), und das Modell 540060 mit einer Spritze desselben Typs.

Die als Perfusat verwendete Ringer-Lösung hat eine den Plasmen ähnliche Osmolarität (309 *mosmol/L*), um eine richtungsunabhängige Diffusion durch die Membran zu gewährleisten. Um ein hinreichendes Probenvolumen zu erzielen, wurde jeweils 12 bis 14 Stunden lang dialysiert. Die Dialysate wurden bis zur Referenz- und Spektrenmessung im Gefrierschrank aufbewahrt.

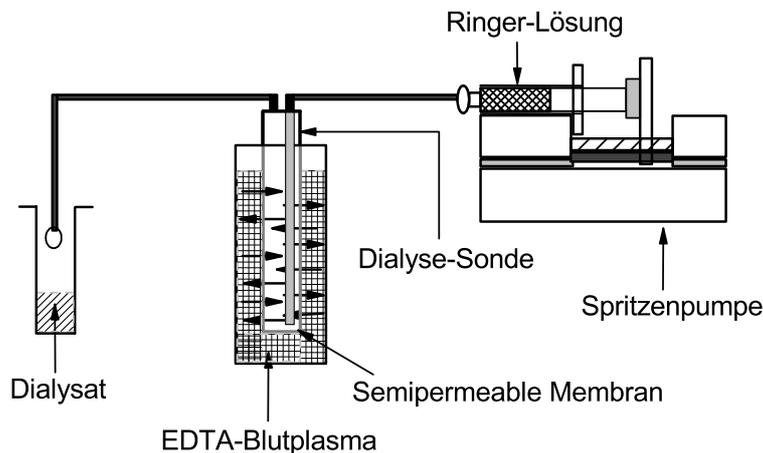


Abb. 5.24: In-vitro Aufbau zum dialysieren der EDTA-Blutplasma-Proben.

Name	Anzahl	Mittelwert	σ
Plasma-Glucose [49]	126	208	91
Plasma-Harnstoff [49]	126	36.8	10.0
Plasma-Glucose Neu	67	222	94
Dialysat-Glucose	115	168	75
Dialysat-Harnstoff	76	28.3	6.4

Tab. 5.2: Populationen der Referenzmessungen (Konzentrationsangaben in $[mg/dL]$); ohne Literaturangaben: in dieser Arbeit durchgeführte Bestimmungen.

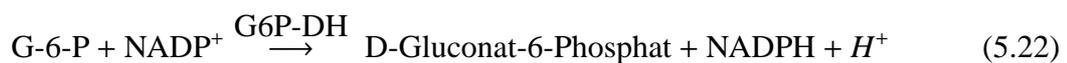
Referenzanalytik

Ein klinisch-chemisches Labor (Labor Eberhard & Partner, Dortmund) wurde mit der Analyse zur Bestimmung der Glucose- und Harnstoff-Konzentrationen von Plasmen und Dialysaten beauftragt. Dabei wurden nicht alle Proben untersucht, da die verfügbaren Probenvolumina zum Teil nicht ausreichten. Für Dreifachbestimmungen waren jeweils $250 \mu L$ Probe nötig. Ergebnisse der Blutplasma-Analysen aus [49] lagen ebenfalls vor und wurden zu einem Vergleich herangezogen. Tab. 5.2 zeigt den Umfang der Messreihen mit dem Mittelwert und der Standardabweichung der gemessenen Konzentrationen.

Zur Bestimmung der Glucosekonzentrationen verwendete das Labor die in der medizinischen Analytik übliche Hexokinase-Referenzmethode⁷ [23]. Die Glucose wird bei Anwesenheit des Enzyms Hexokinase (HK) durch Adenosin-Triphosphat (ATP) zu D-Glucose-6-Phosphat (G-6-P) phosphoryliert:



In einem zweiten Schritt wird G-6-P bei Anwesenheit des Enzyms Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6P-DH) von Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat (NADP^+) zu D-Gluconat-6-Phosphat oxydiert:



Die Menge des reduzierten Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat (NADPH) ist äquivalent zur Glucosekonzentration, die photometrisch durch eine Extinktionsmessung der NADPH-Bande bei 340 nm bestimmt wird.

Der Harnstoff-Gehalt wird unter Verwendung von Urease ermittelt⁸. Mit Hilfe dieses Enzyms wird der Harnstoff in Ammoniak und Carbonat aufgespalten.



⁷Packungsbeilage zum D-Glucose/UV-Test (Boehringer Mannheim/R-Biopharm, Nr. 0 716 251)

⁸siehe z.B. URL: http://www.olympus-diagnostics.com/medical/3112_marketinginformation.cfm?file=UREA6134-0.pdf&folder=uploadfiles4

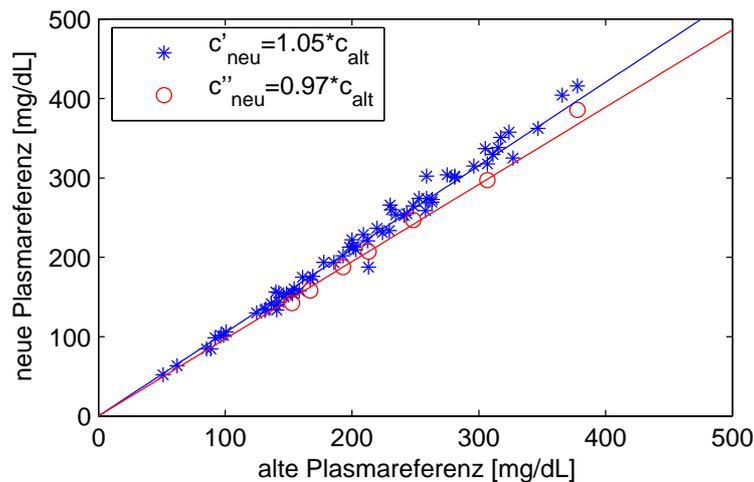
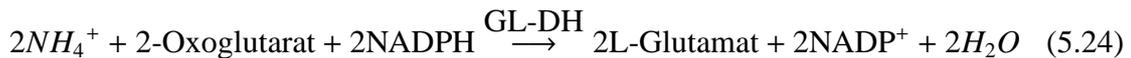


Abb. 5.25: Glucosereferenzkonzentrationen der EDTA-Blutplasma-Proben von 1997, 2005 und 2006 (Regressionsgeraden mit angepasster Steigung).

In Anwesenheit des Enzyms Glutamat-Dehydrogenase (GL-DH) wird NADPH und NH_4^+ von 2-Oxoglutarat zu $NADP^+$ oxydiert.



Im Gegensatz zur Glucosekonzentrationsbestimmung wird hier die Konzentrationsabnahme des NADPH photometrisch ermittelt. Die relative Standardabweichung der Dreifachbestimmung lag je nach Konzentration zwischen 1 und 3% [63].

Abb. 5.25 zeigt den Vergleich von Blutplasma-Glucose-Referenzmessungen, die 1997 und 2005 durchgeführt wurden. Die neu gemessenen Konzentrationen sind im Durchschnitt um 5% größer. Eine erneute Messung einiger ausgewählter Proben Anfang 2006 zeigte im Gegensatz hierzu um 3% niedrigere Werte als die Daten von 1997. Diese systematischen Abweichungen sind wahrscheinlich auf eine fehlerhafte Kalibrierung der Analyseautomaten des klinisch-chemischen Labors zurückzuführen. Sie sind deutlich größer als die relative Standardabweichung der Dreifachbestimmung, welche 1% betrug. Die Glucosekonzentrationen der Blutplasma-Proben sind trotz der langen Lagerung bei -30°C im Rahmen der Messgenauigkeit konstant.

Die Dialysate wurden im so genannten Push-Betrieb erzeugt, d.h. das Perfusat wurde unter - wenn auch kleinem Druck - durch den Dialysekatheter gepumpt. Im Vergleich dazu sind im so genannten Push/Pull-Betrieb, der durch die Verwendung von zwei Schläuchen in der Peristaltikpumpe - je einer vor und einer hinter dem Dialysekatheter - realisiert wird, deutlich höhere Wiederfindungsraten zu erwarten. Diese sind hier bei einer verwendeten Flussrate von $1 \mu\text{L}/\text{min}$ mit 60 bis 80% kleiner als in [3] angegeben. Das gesammelte Volumen des Dialysats war auch geringer, als von der Flussrate zu erwarten; die Diffusion des Perfusats in Richtung des Blutplasmas war somit größer als in Richtung Dialysat. Zum einen wurden dadurch im Laufe des Dialyseprozesses die Proben verdünnt und zum anderen die Diffusionsraten gesenkt.

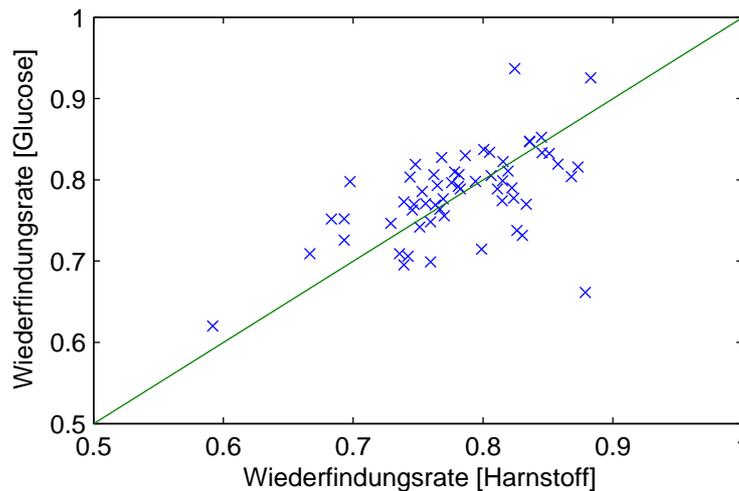


Abb. 5.26: Vergleich der Wiederfindungsrate von Glucose und Harnstoff bei der Dialyse von EDTA-Blutplasma-Proben (berechnet über die Quotienten der Konzentrationen im Dialysat gegen die im Plasma).

Die Wiederfindungsraten der Glucose konnten direkt aus dem Verhältnis der Konzentrationen im Dialysat und im Blutplasma errechnet werden. Für die Harnstoff-Konzentrationen im Blutplasma liegen nur die Referenzwerte aus dem Jahre 1997 vor; sie wurden verwendet, um die Wiederfindungsrate für den Harnstoff abzuschätzen. Abb. 5.26 zeigt das Verhältnis der Wiederfindungsraten von Glucose und Harnstoff. Die Voraussetzungen der Diffusion für Glucose und Harnstoff sind bei diesem Experiment identisch, Unterschiede liegen nur in den Diffusionskoeffizienten der beiden Analyten. Nach den in der Literatur [151] gefundenen Diffusionskoeffizienten für Glucose und Harnstoff in wässrigen Lösungen sollte die Glucose deutlich langsamer diffundieren als der Harnstoff; dies wird hier nicht bestätigt. Die Streuung der Werte ist für eine genaue Analyse zu groß. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass in der Laboranalytik ein systematischer Kalibrationsfehler vorliegt.

Die Spektren der 126 Dialysate wurden mit dem Vector 22 FTIR-Spektrometer aufgenommen. Dieses war mit einem Flüssigstickstoff-gekühlten MCT Detektor ausgestattet. Die Detektivität liegt mit etwa $10^9 \text{ W}/\sqrt{\text{cmHz}}$ eine Größenordnung über der des im IR200 Kleinspektrometer verwendeten DTGS Detektors. Die Auflösung betrug 4 cm^{-1} bei einer Messzeit von zwei Minuten pro Einkanalspektrum. Die Messungen wurden ohne Temperierung der Küvette durchgeführt. Die Temperatur im Probenraum des Vector 22 FTIR-Spektrometer liegt etwa bei 24°C . Effekte durch die Nichtlinearität des Detektors wurden mit der in *OPUS* (Spektrometersoftware von Bruker Optics zum Vector 22 FTIR-Spektrometer) zur Verfügung stehenden Nichtlinearitätskorrektur minimiert. Vor der Mertz-Phasenkorrektur wurden die Interferogramme mit einer Blackman-Harris-Apodisationsfunktion gewichtet und anschließend mit einem Zerofill-Faktor von zwei Fourier-transformiert.

Vor jeder Probenmessung wurden zwei Hintergrundspektren mit der in der Küvette als Referenz verwendeten Ringer-Lösung aufgezeichnet, um Basislinien von Extinktionspektren zu erhalten. Dazu wurde die Küvette jeweils mit etwa $150 \mu\text{L}$ Ringer-Lösung gespült, um ein vollständiges Entfernen der Probe zu gewährleisten.

Die Absorptionsbanden einer wässrigen Lösung verändern sich in Abhängigkeit von der Konzentration der Elektrolyte, wie bereits oben aufgeführt wurde (siehe auch das Spektrum der Ringer-Lösung in Abb. 5.21, S. 68). Die Elektrolytkonzentration ist in der Ringer-Lösung ähnlich wie in den Dialysaten. Daraus resultiert insgesamt eine nahezu linear verlaufende Basislinie der Dialysat-Spektren. Für jede Probe wurden ebenfalls zwei Einkanalpektren gemessen, eines nach Befüllen der Küvette mit $60 \mu\text{L}$ und ein Weiteres nach erneutem Einspritzen von $40 \mu\text{L}$ Dialysat aus einer $100 \mu\text{L}$ Spritze. Die vollständige Befüllung der Küvette wurde durch Vergleich der beiden erhaltenen Spektren überprüft. Die Abweichung ist in der Größenordnung des aus den Basislinien berechneten Rauschens.

5.3.2 Kalibrationsergebnisse mit Blutplasma-Dialysaten

Im Anschluss an die Betrachtung der Matrixeffekte in wässrigen Lösungen wurden die multivariaten Verfahren des physikalischen und statistischen Modells zur quantitativen Spektrenauswertung angewandt. Mit Hilfe der PLS-Matrix-Invertierung wurde das lineare Gleichungssystem, bestehend aus den Spektren und den zugehörigen Konzentrations-Referenzwerten, gelöst. Zur Ermittlung der Güte der Kalibrationsmodelle wurde der SEP-Wert bei Verwendung der leave-1-sample-out Kreuzvalidierung berechnet und als Funktion der Anzahl der Basisvektoren für die PLS-Kalibrierung dargestellt. Abb. 5.27 zeigt die Ergebnisse für Glucose und Harnstoff zusammen mit den zugehörigen *Scatterplots*. Dieser bezeichnet ein Diagramm, in dem die spektrometrisch bestimmten Messwerte ge-

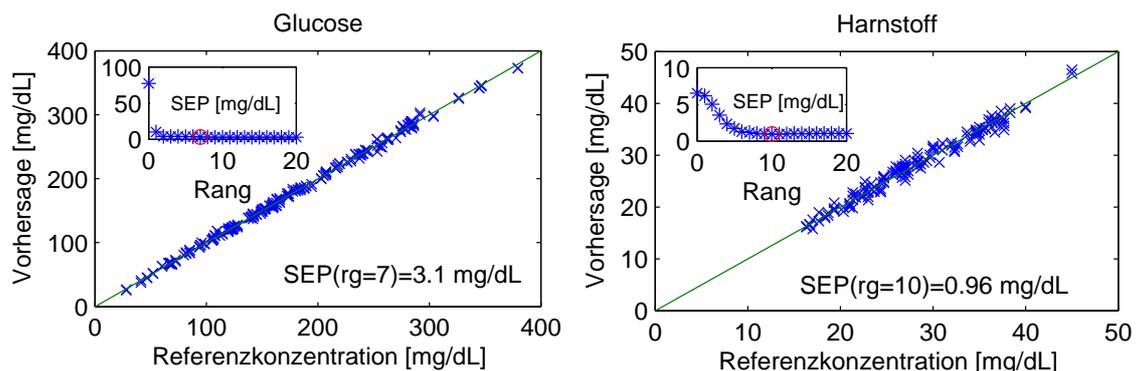


Abb. 5.27: PLS-Kreuzvalidierung mit den Spektren der EDTA-Blutplasma-Dialysate. Mit dem optimalen PLS-Kalibrationsmodell erhaltene *Scatterplots* der Glucose- und Harnstoff-Konzentrationsbestimmungen. Im Einschub ist die Abhängigkeit des SEP-Wertes von der Anzahl der PLS-Vektoren, die bei der Invertierung der rangreduzierten Spektrenmatrix verwendet werden, gezeigt.

$\Delta\nu$	Rang	SEP [mg/dL]	Rang	SEP [mg/dL]
	Glucose		Harnstoff	
4	2	3.9(4.0)	6	1.3(1.3)
	7	2.9(3.3)	10	0.96(0.97)
16	2	4.0(4.1)	6	1.4(1.4)
	10	3.1(3.3)	10	1.0(1.0)

Tab. 5.3: PLS-Kalibrierung der Dialysat-Spektren für Glucose (112 Proben) und Harnstoff (75 Proben); SEP-Werte für leave-1-sample-out (leave-10-samples-out). Die Ergebnisse zur Glucose wurden bereits in [62] veröffentlicht.

gen die Referenzkonzentrationen aufgetragen werden; Vollständige Übereinstimmungen liefern die Identitätsfunktion.

Zur Berechnung der Glucosekonzentrationen wurde der Wellenzahlbereich von 950 bis 1180 cm^{-1} verwendet. Die Absorptionsbanden-Struktur der Glucose ist hier sehr spezifisch und die Verwendung von zwei PLS-Vektoren zur optimalen PLS-Kalibrierung ergibt bereits einen SEP-Wert von 4 mg/dL , also etwa 5% der Standardabweichung der Probenpopulation von 78 mg/dL , wie in der Abbildung beim Rang 0 zu sehen ist. Für die Kalibrationsmodellberechnungen des Harnstoffs wurden die beiden Wellenzahlbereiche von 1120 bis 1220 cm^{-1} und 1420 bis 1520 cm^{-1} herangezogen. Innerhalb des physiologischen Konzentrationsintervalls sind die Absorptionsbanden des Harnstoffs bei 1160 und 1460 cm^{-1} verglichen mit den Glucosebanden verhältnismäßig klein. Aus den Beiträgen verschiedener Komponenten resultiert ein komplizierteres mathematisches Modell, und eine größere Anzahl von Basisvektoren wird bei der optimalen PLS-Kalibrierung benötigt. Bei Verwendung von 10 Basisvektoren zur Invertierung der rangreduzierten Spektrenmatrix wurde ein SEP-Wert von 1 mg/dL erzielt, der kleiner ist als der bei der Berechnung der Glucosekonzentrationen. Die Streuungen in der Glucosebestimmung ähneln der Streuung der Referenzkonzentrationen des EDTA-Blutplasmas beim Vergleich der Messungen von 1997 und 2005 (siehe Abb. 5.25, S. 74); diese werden also zu einem großen Teil durch Unsicherheiten in der Referenzanalytik verursacht. Tab. 5.3 zeigt einige Resultate der PLS-Kalibrierung für Glucose und Harnstoff in einem Überblick. Die Auswertung wurde für die spektralen Auflösungen 4 und 16 cm^{-1} berechnet. Die Kreuzvalidierung mit leave-1-sample-out und leave-10-samples-out zeigt die große Stabilität der Ergebnisse, die sowohl bei Glucose als auch bei Harnstoff erreicht wurde. Die Ergebnisse sind beinahe unabhängig von der spektralen Auflösung, wobei 16 cm^{-1} für die Analyse von Dialysaten biologischer Proben genügen.

Neben der PLS-Kalibrierung wurde das physikalische Kalibrationsmodell verwendet, um mit den in Kap. 5.2 vorgestellten Komponentenspektren Konzentrationen zu bestimmen. Die Daten wurden im Wellenzahlbereich von 1000 bis 1500 cm^{-1} angepasst. Das spektrale Rauschen außerhalb dieses Bereiches nimmt durch die starke Absorption des Wassers bei 700 cm^{-1} und 1640 cm^{-1} und durch die Absorption der CaF_2 -Fenster unterhalb von 950 cm^{-1} zu. Größere spektrale Bereiche sind damit für eine zuverlässige Auswertung nicht geeignet. Das physikalische Modell bestand aus den bei pH=7 gemessenen

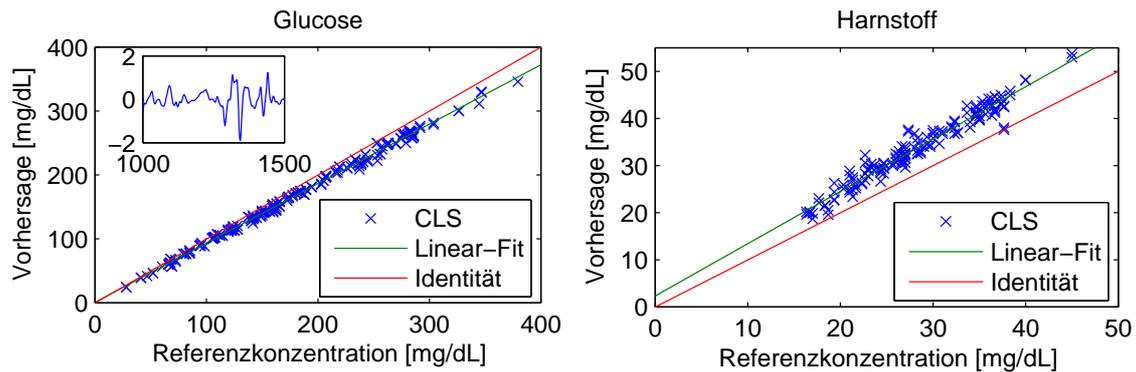


Abb. 5.28: Konzentrationsbestimmungen und Mittelwert der Residuen-Spektren [mA.U.] bei Anwendung des physikalischen Kalibrationsmodells für Glucose und Harnstoff.

Komponentenspektren der wässrigen Lösungen von Glucose, Harnstoff, Hydrogencarbonat, Lactat, Acetat und Sulfat. Für Phosphat wurde das bei $\text{pH}=7.5$ gemessene Spektrum aufgrund des Einflusses der Ionenstärke in den Dialysaten verwendet. Zusätzlich wurde das Spektrum der Ringer-Lösung, das mit geringen Verschiebungen der Absorptionsbanden modifizierte EDTA-Spektrum, ein konstanter Basislinien-Versatz und das CO_3^{2-} -Spektrum eingebunden. Abb. 5.28 zeigt die für Glucose und Harnstoff berechneten Bestimmungen im Vergleich mit den Referenzwerten. Zur Berechnung der Unsicherheiten ($\text{SEP}_{\text{CLS,gluc}} = 4.6 \text{ mg/dL}$, $\text{SEP}_{\text{CLS,harn}} = 1.5 \text{ mg/dL}$) wurden die Konzentrationswerte mit einem Skalierungsfaktor angepasst, da die Referenzwerte der Glucosekonzentration im Durchschnitt um etwa 9% größer als die IR-spektrometrische bestimmten Konzentrationen waren. Dies bestätigt die systematische Abweichung der Konzentrationsbestimmungen des klinisch-chemischen Labors von der realen Konzentration, die bereits beim Vergleich der Blutplasma-Glucosekonzentrationen von Bestimmungen in den Jahren 1997 und 2005 auftrat (siehe Abb. 5.25, S. 74). Bei den Konzentrationsbestimmungen des Harnstoffs tritt ebenfalls eine systematische Abweichung von den Referenzwerten auf; die vom Labor gemessenen Referenzwerte sind um etwa 10% kleiner als die IR-spektrometrisch bestimmten Konzentrationen.

5.3.3 Kalibrationstransfer für FTIR-Mini-Spektrometer

Messungen im klinischen Umfeld stellen einige Anforderungen an den Messaufbau zur online Messung von Dialysaten, die über Mikro-Dialyse bereitgestellt werden. Zum einen ist das relativ große Vector 22 FTIR-Spektrometer schwierig zu transportieren, zum anderen steht nicht immer flüssiger Stickstoff zum Kühlen des bisher verwendeten Photodetektors zur Verfügung. Für dieses Spektrometer stand auch ein bei Raumtemperatur einsetzbarer DTGS-Detektor zur Verfügung, bei dem das erzielbare S/R-Verhältnis jedoch nur geringfügig besser war, als bei dem deutlich kleineren und leichteren IR200 Spektrometer. Dieses ist aufgrund seiner Größe wesentlich besser für Messungen im klinischen Einsatz geeignet. Die damit durchgeführten spektralen Messungen erfordern jedoch eine

Anpassung an die mit dem Vector 22 Spektrometer aufgenommenen Referenzspektren bzgl. der Wellenzahlachse, um zuverlässige Konzentrationsbestimmungen zu erzielen.

Die gleichen Küvetten wurden sowohl im Vector 22 als auch im IR200 FTIR-Spektrometer eingesetzt. Die Schichtdicken, die linear in die Konzentrationsbestimmungen einfließen, bleiben also unverändert, sie müssen jedoch nach jedem Küvettenwechsel wegen der leicht variierenden Dicke der Spacer neu bestimmt werden.

Eine Thermostatisierung der Küvette war nicht bei sämtlichen Messungen verfügbar. Bei einer Spektrenauswertung mit Hilfe des physikalischen Modells können Temperaturunterschiede bei den spektralen Messungen durch Verwendung des Eigenschaftskorrelationspektrums der temperaturabhängig gemessenen Komponentenspektren berücksichtigt werden. Dies reduziert die Amplitude der Residuen-Spektren, die Konzentrationsbestimmungen werden jedoch erfahrungsgemäß aufgrund eines aufwändigeren Kalibrationsmodells geringfügig schlechter.

Spektrale Auflösung

Ein weiterer Einflussparameter der IR-spektroskopischen Messung ist die spektrale Auflösung. Sie sollte so gewählt werden, dass sie eine hinreichend große Selektivität gewährleistet. Eine weitere Verbesserung liefert keine zusätzlichen Informationen, verschlechtert jedoch das S/R-Verhältnis. Die spektrale Auflösung kann nachträglich - d.h. für bereits gemessene Interferogramm-Daten - verringert werden, indem diese gekürzt und die Umwandlung in die Einkanalspektren erneut durchgeführt wird. Damit können die Messdaten an Spektren angepasst werden, die direkt mit einer geringeren Auflösung aufgenommen wurden. Die Spektrometersoftware *OPUS* stellt entsprechende Makros zur Verfügung, welche von Visual-Basic (VB) Skripten aus verwendet werden können. Im Rahmen dieser Arbeit wurde dazu ein VB-Skript programmiert, das für eine Liste von Spektrendateien die Umwandlung der Interferogramme in die Einkanalspektren durchführt. Dabei lassen sich die Apodisationsfunktion, die spektrale Auflösung und der Zerofill-Faktor für die Fourier-Transformation einstellen.

Die spektralen Banden in wässrigen Proben sind verhältnismäßig breit, erfahrungsgemäß genügt eine spektrale Auflösung von 16 cm^{-1} für eine quantitative Analyse von Blutplasmen [58], welche in ihrer Zusammensetzung komplizierter als die von Dialysaten sind. Das spektrale Rauschen spielt bei Verwendung des MCT-Detektors im Vector 22 FTIR-Spektrometer, verglichen mit anderen Fehlergrößen durch Selektivität und Referenzanalytik, nur eine untergeordnete Rolle, daher wurden alle Spektren auf dem Vector 22 mit der relativ hohen Auflösung von 4 cm^{-1} gemessen; eine nachträgliche Reduzierung der Auflösung ist somit einfach.

Das IR200 Spektrometer ist wie bereits erwähnt mit einem bei Raumtemperatur betriebenen DTGS Detektor ausgestattet. Das spektrale Rauschen der mit einer wassergefüllten Küvette aufgenommenen 100%-Linien - bei Vorgabe gleicher Bedingungen wie Detektoren, Messzeiten, Auflösung und Apodisation - liegt etwa eine Größenordnung über dem der mit dem Vector 22 FTIR-Spektrometer gemessenen Spektren. Es wurden sämtliche

Spektren auf diesem Gerät mit 16 cm^{-1} Auflösung aufgenommen. Die an den CLS-Kalibrationsmodellen beteiligten Spektren wurden mit Hilfe des oben genannten VB-Skripts zu dieser Auflösung reduziert. Die wirkliche Auflösung des IR200 unterscheidet sich durch einen Programmierfehler von der Angabe in der Software. Ursprünglich wurde das Spektrometer mit einem HeNe-Laser mit einer Wellenlänge von 633 nm (15768 cm^{-1}) vermarktet; dieser wurde durch einen Diodenlaser mit einer Wellenlänge von 849 nm (11782 cm^{-1}) ersetzt. Diese Änderung wird bei der Berechnung der Auflösung nicht berücksichtigt. Die Auflösung beträgt also in Wirklichkeit 21.4 cm^{-1} .

Die Spektrometersoftware *EZOmic* des IR200 verwendet die Happ-Genzel-Apodisationsfunktion. Bei der Konvertierung der mit dem Vector 22 FTIR-Spektrometer gemessenen Interferogramme wurde die Blackman-Harris-3-Term Funktion verwendet. Wegen der daraus resultierenden schlechteren spektralen Auflösung (siehe Kap. 5.2.4) wurde der Software-Fehler erst spät erkannt, da sich die Einflüsse nahezu gegenseitig aufheben. Sämtliche Spektren des Kalibrationsmodells waren bereits mit der Blackman-Harris-3-Term Apodisation konvertiert worden, eine erneute Konvertierung mit angepasster Auflösung und Happ-Genzel-Apodisation wurde daher nicht durchgeführt. Die Aufforderung an die Firma Thermo Electron, diesen Fehler zu beseitigen, wurde bisher nicht erfüllt.

Wellenzahlachsenkalibrierung

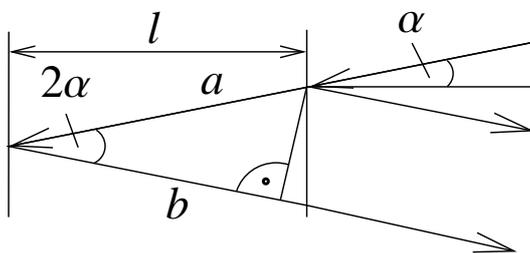


Abb. 5.29: Schräger Strahleinfall in das Interferometer, veranschaulicht für die Positionen des beweglichen Spiegels im Umkehrpunkt (nach [152]).

durch die endliche Apertur bedingter schräger Strahleneinfall in das Interferometer [74]. Die Weglängendifferenz der beiden Strahlanteile bei schrägem Strahleinfall ist (siehe Abb. 5.29):

$$a + b = \frac{l}{\cos \alpha} + \frac{l}{\cos \alpha} \cos (2\alpha) = 2l \cos \alpha \quad (5.25)$$

Die Größe $2l$ ist die optische Weglängendifferenz bei parallel zur optischen Achse verlaufenden Strahlen, was für den Referenzlaser angenommen wird, da dieser - verglichen mit der Weißlichtstrahlung - besser kollimiert ist. Die mit Hilfe des Referenzlasers gemessene Weglängendifferenz ist also größer als die effektiv durch die Spiegelverschiebung hervorgerufene. Daraus resultiert eine Verschiebung der Absorptionsbanden zu niedrige-

FTIR-Spektrometer sind für ihre Präzision und Genauigkeit in der Messung der Wellenzahlachse bekannt. Ein Vergleich mit einer Polystyrenfolie, die schmale Banden bei bekannten Wellenzahlen aufweist, ergab eine relative Abweichung in der Wellenzahlskala des IR200 zum Vector 22 von etwa 0.14% zu größeren Wellenzahlen hin. Eine Ursache für eine abweichende Skalierung der Wellenzahlachse ist ein

ren Wellenzahlen. Ein schräger Strahleinfall resultiert unter anderem aus dem endlichen Durchmesser der Aperturblende und der Ausdehnung der Strahlquelle [152]. Nach den experimentellen Ergebnissen in [153] beträgt dieser Einfluss etwa 0.005% der Wellenzahlskala und ist damit deutlich kleiner als die hier gemessene Verschiebung.

Abweichungen in der Laser-Wellenzahl gehen linear in die Abweichungen der Wellenzahlachse ein. Die Wellenzahl des Diodenlasers, der im IR200 zur Positionsbestimmung des Interferometerspiegels verwendet wird, kann an Hand atmosphärischer Wasserbanden recht genau bestimmt werden. Die Abweichung wird bei den Auswertungen durch Skalierung der Wellenzahlachse der mit dem IR200 gemessenen Spektren korrigiert.

5.3.4 Wiederfindungsrate

Die Wiederfindungsrate bei der Dialyse ist definiert als Quotient aus der Konzentration im Dialysat und der in der interstitiellen Flüssigkeit. Diese hängt bei der Mikro-Dialyse von der Flussrate und der Implantierung der Sonde ab. Eine genaue Bestimmung der interstitiellen Konzentrationen ist nur bei bekannter Wiederfindungsrate möglich. In dieser Arbeit wurde eine Methode entwickelt, die zusammen mit der IR-Spektroskopie die simultane Bestimmung der Wiederfindungsrate durch den Einsatz eines in der klinischen Praxis üblichen Acetat enthaltenden Perfusats erlaubt. Die Acetat-Konzentration in der ELO-MEL-Lösung von $45 \text{ mM} \cong 2.7 \text{ g/L}$ ist deutlich größer als die im Blut ($c = 53 \text{ mg/L}$ [147]). Acetat diffundiert durch dieselbe Dialysemembran in das Interstitium wie die Glucose in das Perfusat - allerdings in entgegengesetzter Richtung. Aus der Konzentration des Acetats im Dialysat lässt sich dessen Abreicherung gegenüber der eingesetzten Perfusatlösung berechnen und damit auf die Austauschprozesse quer zur Dialysemembran rückschließen. Acetat hat im Fingerprint-Bereich des mittleren IR starke Absorptionsbanden, die zu einer genauen Quantifizierung herangezogen werden können (siehe auch Abb. 5.30, S. 83).

Zusammenhang zwischen Wiederfindungs- und Diffusionsrate

Die Wiederfindungsrate R über eine Dialysemembran ist nach [154]:

$$R = 1 - e^{-\frac{P S_{eff}}{\phi}} \quad (5.26)$$

Die effektive Membranfläche S_{eff} ist nur von der Membrangeometrie abhängig. Die Permeabilität P ist, wenn die betrachteten Moleküle klein gegenüber den Öffnungen der Membran sind, proportional zum Diffusionskoeffizienten D [155]. Auflösen der Gl. (5.26) nach der Flussrate des Perfusats ϕ und Gleichsetzen der Ergebnisse zum einen für Acetat und zum anderen für ein weiteres Molekül ergibt die Abhängigkeit der zugehörigen Wiederfindungsraten vom Verhältnis V der Diffusionskoeffizienten der betrachteten Substanzen:

$$R = 1 - (1 - R_{Acet})^{1/V} \quad V = \frac{D_{Acet}}{D} \quad (5.27)$$

Probe	Glucose	Harnstoff	Hydrogen-carbonat	Phosphat	Lactat
Glucose	100	-	-	-	-
Harnstoff	-	100	-	-	-
Hydrogencarbonat	-	-	72.6	-	-
Phosphat	-	-	-	68.8	-
Lactat	-	-	-	-	57.7
Mixtur	120.2	30.0	146	4.41	13.5
Serumpool	80				
aufgestocktes Serum	296				
Blutplasmapool	195.5	37.3			
aufgestocktes Plasma	267.5	37.3			

Tab. 5.4: Konzentrationen der einzelnen Reinstoffe in den dialysierten Proben. (Angaben in [mg/dL]).

Um den Zusammenhang zu der Abreicherung des Acetats und der Wiederfindungsrate der in den Dialysaten erwarteten Komponenten zu testen, wurden in einer Messreihe unterschiedliche Proben bei verschiedenen Flussraten mit ELO-MEL-Lösung als Perfusat dialysiert. Tab. 5.4 listet die untersuchten Proben und deren Zusammensetzung auf. Es wurden wässrige Lösungen mit Glucose, Harnstoff, Hydrogencarbonat, Phosphat, Lactat und eine Mehrkomponentenmischung (Mixtur) der fünf Reinstoffe jeweils bei einem pH-Wert $\text{pH}=7$ angesetzt. Insgesamt 30 der EDTA-Blutplasma-Proben (siehe Kap. 5.3) wurden gepoolt und ein Teil der so gewonnenen Probe mit Glucose aufgestockt. Die angegebene Konzentration für Glucose und Harnstoff ist die mit den Volumina gewichtete Summe der 1997 ermittelten Referenzkonzentrationen. Im Falle der aufgestockten Probe wurde die Glucosekonzentration für 20 mL Blutplasma mit 14.4 mg Glucose erhöht. Vier Blutseren-Proben wurden gepoolt und 15 mL der Probe mit 32.4 mg Glucose aufgestockt. Die Konzentrationsangabe des Poolserums wurde ebenso als gewichtete Summe der bekannten Referenzkonzentrationen der jeweiligen Blutseren berechnet.

Mittels einer Peristaltikpumpe (Minipuls 2, Gilson), die mit einer 80 cm langen Tygon[®]-Kapillare (Bartelt, Graz, Österreich, Außendurchmesser 2.03 mm, Innendurchmesser 0.19 mm) ausgestattet war, wurde das Perfusat befördert. Die Dialysesonde (CMA60) wurde bei diesen Experimenten vollständig in die Proben mit einem jeweiligen Volumen von 11 mL getaucht. Die Zeiten der Dialysat-Probennahme wurden gestoppt und die Dialysate gewogen, um daraus die durchschnittlichen Flussraten bei der Dialyse zu bestimmen. Zum Start und nach jedem Flussratenwechsel wurde ein Teil der vorgelegten Probe entnommen und zur späteren Spektrennahme im Gefrierschrank aufbewahrt. Für jede Flussrate wurde das produzierte Dialysat gesammelt und ebenfalls eingefroren.

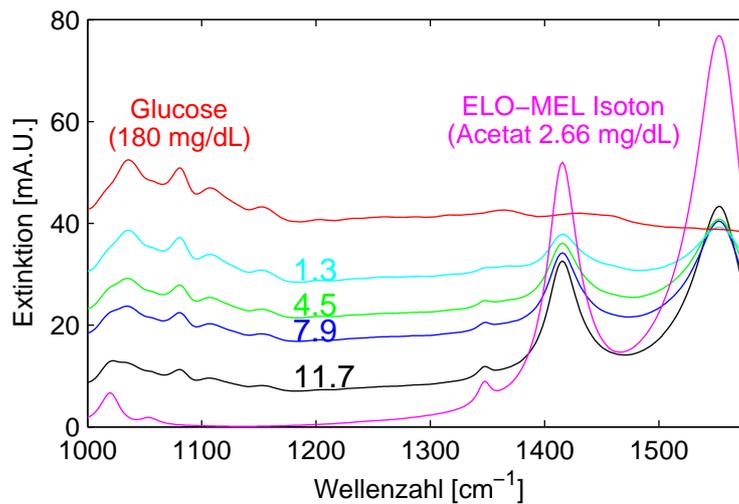


Abb. 5.30: Extinktionsspektren der mit ELO-MEL-Lösung als Perfusat gewonnenen Dialysate wässriger Glucoselösungen zusammen mit den Komponentenspektren von Glucose und ELO-MEL-Lösung. Die Zahlenangaben sind die zugehörigen mit der Peristaltikpumpe realisierten Flussraten in $[\mu\text{L}/\text{min}]$.

Spektrenaufnahme

Mit unserer Mikro-IR-Küvette wurden die Extinktionsspektren der Dialysate und der wässrigen Proben im Probenraum des Vector 22 FTIR-Spektrometers gemessen. Dazu wurde dasselbe Messprotokoll wie bei den Blutplasma-Dialysaten (siehe Kap. 5.3.1) genutzt, bei dem je Probe zwei Extinktionsspektren gemessen wurden. Eine Thermostatisierung der Küvette stand bei diesen Experimenten nicht zur Verfügung, so dass die Messungen bei der Probenraumtemperatur von etwa $24\text{ }^{\circ}\text{C}$ durchgeführt wurden.

Abb. 5.30 zeigt beispielhaft einige Spektren der Dialysate einer Glucoselösung zusammen mit den Spektren der vorgelegten Glucoselösung und des ELO-MEL-Perfusats. Mit wachsender Flussrate sinkt die Wiederfindungsrate, d.h. die Glucosekonzentration im Dialysat nimmt ab. Gleichzeitig sinkt die Abreicherungsrate des Acetats, d.h. die Konzentration im Dialysat nimmt zu, was deutlich an den Absorptionsbanden bei 1416 und 1552 cm^{-1} zu erkennen ist.

Konzentrationsbestimmungen

Mit Hilfe einer CLS-Kalibrierung wurden aus den spektralen Daten aller Messreihen die Konzentrationen der einzelnen Analyten ermittelt. Das physikalische Modell setzte sich wie folgt zusammen: Spektrum der ELO-MEL-Lösung, Komponentenspektren der untersuchten Reinstoff-Lösungen (Raumtemperatur, $\text{pH}=7$), Spektrum mit konstantem Basislinien-Versatz, und gegen destilliertes Wasser gemessenes Spektrum der Ringer-Lösung. Bei Hydrogencarbonat enthaltenden Proben wurde das Modell um das CO_3^{2-} Spektrum erweitert, um dessen Anteil im Probenspektrum mit anzupassen. Das Eigen-

schaftskorrelationsspektrum der Temperaturabhängigkeit von Acetat wurde nicht verwendet, weil die Spektren des physikalischen Modells ebenfalls bei Raumtemperatur gemessen worden waren. Die Residuen-Spektren nach Anpassung an die Spektren der wässrigen Lösungen sind hier nicht explizit abgebildet. Die Amplitude der stärksten Banden in den Residuen betrug bei den Spektren von Einkomponentenlösungen etwa 0.1 mA.U. und bei denen der wässrigen Mischung etwa 0.3 mA.U.

Die proteinhaltigen Körperflüssigkeiten wurden mit der entwickelten Küvette nicht gemessen. Referenzkonzentrationen von Glucose und Harnstoff zu den EDTA-Blutplasma- und Serum-Proben wurden vom klinisch-chemischen Labor bestimmt. Das gesammelte Volumen der Dialysate reichte nicht für die Referenzanalytik aus; spektrale Daten lagen jedoch vor, mittels derer Konzentrationsbestimmungen mit dem physikalischen Modell berechnet werden konnten. Dazu wurden dieselben Komponentenspektren wie bei der Auswertung der Spektren wässriger Proben eingesetzt und mit dem Sulfat-Spektrum ergänzt. Außerdem wurde das Phosphat-Spektrum bei $\text{pH}=7.5$ verwendet. Bei der Auswertung der EDTA-Blutplasma-Dialysate wurde zusätzlich das in der Wellenzahlachse bandenspezifisch modifizierte EDTA Spektrum hinzugefügt. Die Residuen der EDTA-Blutplasma- und Serum-Dialysate sind in Abb. 5.31 dargestellt. Die etwa 2 mA.U. großen Banden bei den EDTA-Blutplasma-Messungen zwischen 1280 und 1480 cm^{-1} sind auf die spektralen Eigenschaften des EDTAs zurückzuführen. Die Komplexe variieren stark mit der Zusammensetzung und Temperatur der Probe, so dass der Einfluss von Bandenverschiebungen nur schwer durch das physikalische Modell zu erfassen ist. Eine genaue Bestimmung der Harnstoff-Konzentrationen wurde daher nicht erreicht, Harnstoff hat spektrale Banden bei 1160 , 1460 und um 1630 cm^{-1} [63], welche durch Querempfindlichkeiten zum EDTA zu einer Verschiebung von ca 10 bis 20 % der Wiederfindungsrate gegenüber der theoretischen Kurve führten. Die etwa 0.5 mA.U. großen Banden bei den Serum-Messungen zwischen 1300 und 1450 cm^{-1} stammen vermutlich von einer geringfügigen Veränderung des Hydrogencarbonat-Spektrums. Diese wurde auch bei den Auswertungen der Dialysate der reinen Hydrogencarbonat-Lösung beobachtet, dort jedoch mit einer deutlich (etwa Faktor 5) geringeren Amplitude.

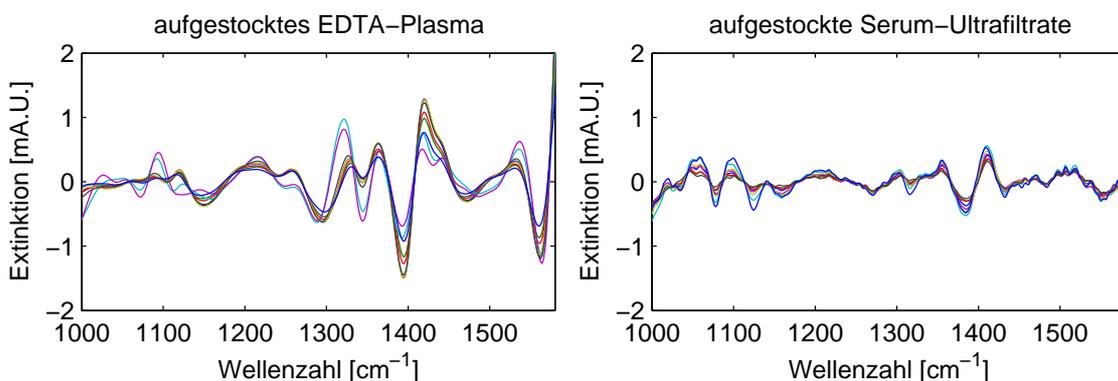


Abb. 5.31: Residuen-Spektren der EDTA-Blutplasma- und Serum-Dialysate.

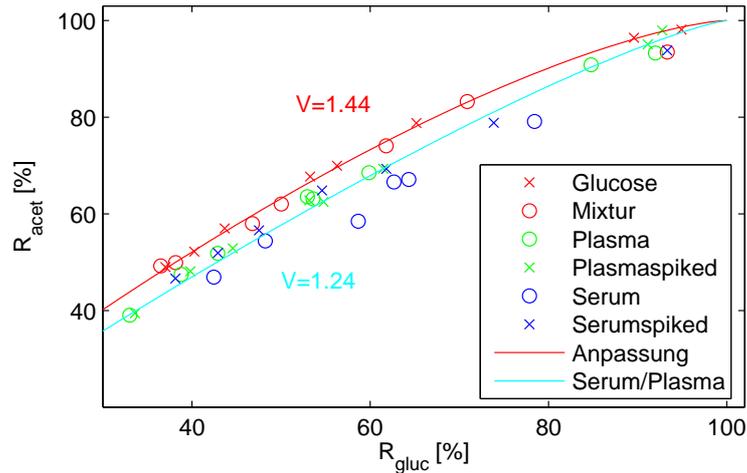


Abb. 5.32: Wiederfindungsraten der Glucose für die unterschiedlichen Mess-Serien.

Die Konzentrationen der Bestandteile in den Proben änderten sich durch den Vorgang der Dialyse; die Acetat-Konzentration reicherte sich in der Probe an und alle übrigen Konzentrationen ab, was bei der Berechnung der Wiederfindungsrate aus dem Verhältnis der Konzentrationen zwischen Dialysat und Probe berücksichtigt wurde. Mit dem Ziel, die Genauigkeit der Wiederfindungsraten-Bestimmung zu erhöhen, wurden die berechneten Konzentrationen in der Probe gegen das gepumpte Perfusatvolumen (Zeit mal Flussrate) aufgetragen und linear regressiert. Für die Auswertung wurde der Mittelwert der Konzentrationen zum Beginn und am Ende eines Dialysevorgangs genutzt. Im Falle der wässrigen Proben wurde aus diesen Konzentrationsbestimmungen und denen für die Dialysate die Wiederfindungsrate R der einzelnen Komponenten und die Abreicherungsrate des Acetats R_{Acet} errechnet (*dia* benennt das Dialysat, *smp* die Probe und *perf* das Perfusat):

$$R = \frac{c_{dia}}{c_{smp}} \quad R_{Acet} = \frac{c_{perf,Acet} - c_{dia,Acet}}{c_{perf,Acet} - c_{smp,Acet}} \quad (5.28)$$

Abb. 5.32 zeigt die ermittelten Wiederfindungsraten der einzelnen Messungen für Glucose zusammen mit dem Ergebnis einer Regressionsrechnung. Das Verhältnis der Diffusionskoeffizienten in Gl. (5.27) wurde mit Hilfe eines Anpassungsprogramms für nichtlineare Funktionen (*gnuplot*) angepasst. In der Grafik sind die theoretischen Kurven sowohl für die wässrigen Lösungen als auch für die Plasma- und Serum-Serien dargestellt. Eine ähnliche Darstellung für die Resultate der Harnstoff-Untersuchungen zeigt Abb. 5.33. Die Resultate der EDTA-Blutplasma-Dialysate wurden hier wegen der oben genannten Probleme der spektralen Querempfindlichkeiten zum EDTA ausgelassen. Die Auswertung der Mixtur und der Einkomponentenlösungen von Phosphat, Hydrogencarbonat und Lactat sind in Abb. 5.34 dargestellt. Im Rahmen der Messgenauigkeit stimmt das Verhältnis der Diffusionskoeffizienten überein, experimentelle Werte liegen für diese Stoffe nicht in entsprechenden Tabellenwerken vor. Die Regressionsparameter der Messreihen sind in Tab. 5.5 zusammengefasst. Experimentelle Werte der Diffusionskoeffizienten von Glucose und Harnstoff in wässriger Lösung wurden in [151] angegeben. Eine Extrapolation auf

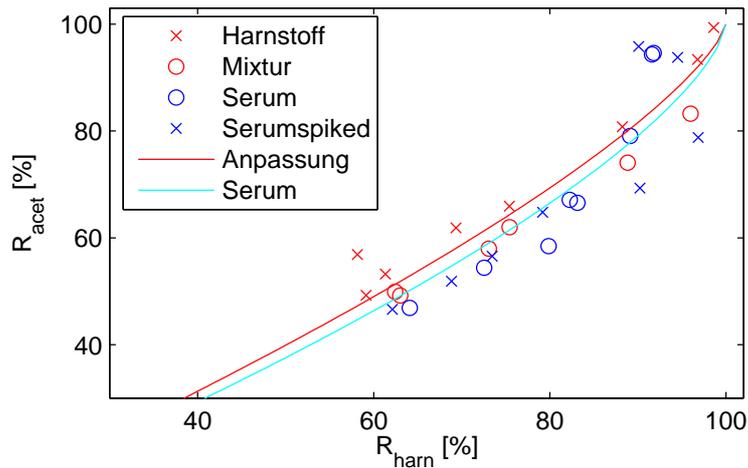


Abb. 5.33: Wiederfindungsraten des Harnstoffs für die unterschiedlichen Mess-Serien.

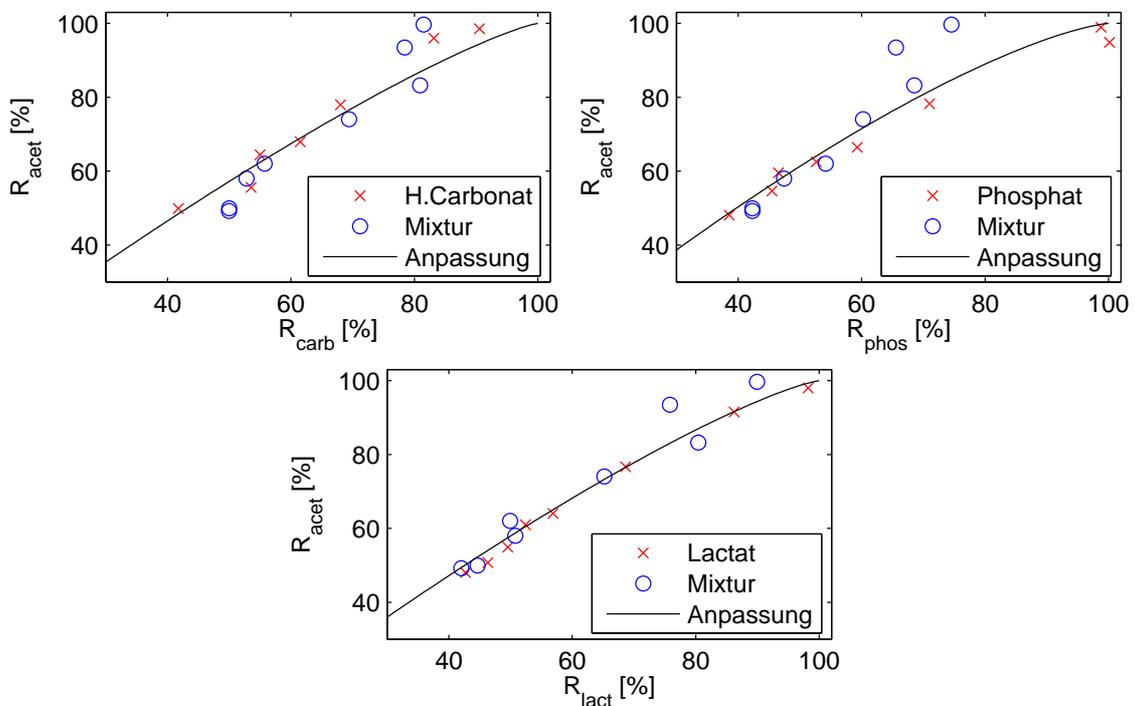


Abb. 5.34: Wiederfindungsraten für Hydrogencarbonat, Phosphat und Lactat bei der Verwendung der Mixtur und der Einkomponentenlösungen.

unsere experimentellen Bedingungen (Temperatur und Konzentration) ergibt nach Quotientenbildung die Vergleichswerte in der Tabelle.

Das berechnete Verhältnis der Diffusionskoeffizienten der Glucose und des Acetats ist bei den EDTA-Blutplasma- und Serum-Proben kleiner als bei den wässrigen Proben. Dies resultiert möglicherweise aus der höheren Viskosität, bedingt durch die erhebliche Konzentration der Proteine im Prozentbereich. Diese ist in der interstitiellen Flüssigkeit eines Menschen ähnlich zur Konzentration im Plasma; daher könnte dies auch bei der

Probe	Glucose	Harnstoff	Hydrogen-carbonat	Phosphat	Lactat
Glucose	1.46	-	-	-	-
Harnstoff	-	0.81	-	-	-
Hydrogencarbonat	-	-	1.26	-	-
Phosphat	-	-	-	1.31	-
Lactat	-	-	-	-	1.20
Mixtur	1.42	0.60	1.19	1.48	1.30
Serum	1.17	0.69			
aufgestocktes Serum	1.27	0.67			
Blutplasma	1.21				
aufgestocktes Plasma	1.26				
Landolt/Boernstein	1.59	0.82			

Tab. 5.5: Verhältnisse V der Diffusionskoeffizienten für Experimente mit wässrigen Lösungen, so wie Seren und Plasmen Letzte Zeile: Werte berechnet aus experimentellen Diffusionskoeffizienten in wässriger Lösung [151].

Berechnung der Wiederfindungsraten bei Online-Messungen an Probanden berücksichtigt werden.

5.4 Messungen in Kombination mit automatisierter Mikro-Fluidik

Im vorangegangenen Kapitel wurde gezeigt, dass Transmissionsmessungen im mittleren IR dazu geeignet sind, die untersuchten Analyten - im Speziellen Glucose, Harnstoff und Acetat - im Dialysat zu quantifizieren. Nun wird ein Aufbau vorgestellt, mit dem durch automatisiertes Befüllen der Küvette mit einer Probe kontinuierliche Messungen an Dialysaten durchgeführt werden können. Dazu werden hier zunächst die Anforderungen an ein solches System diskutiert.

Der Einfluss von Langzeitdriften des FTIR-Spektrometers wird durch aufeinander folgende Messungen von Probe und Referenz vermieden. So ermöglicht die FTIR-Spektroskopie langzeitstabile Resultate, die einen entscheidenden Vorteil gegenüber den elektrochemisch-enzymatischen Sensoren bedeuten, bei denen das Mess-System durch chemische Veränderung des Sensors driftet und nachkalibriert werden muss. Als physikalische Methode ist die FTIR-Spektrometrie daher bei Kenntnis der Küvettschichtdicke und Vorliegen eines Kalibrationsspektrensatzes nicht nur reagenzien-, sondern quasi auch kalibrationsfrei.

Die Diffusion durch die Mikro-Dialysemembran wird stark von den osmotischen und hydrostatischen Druckverhältnissen in der Flüssigkeit beeinflusst. Ein Überdruck im Perfusat wirkt der Diffusion in Richtung Perfusat entgegen; außerdem ergibt sich neben der

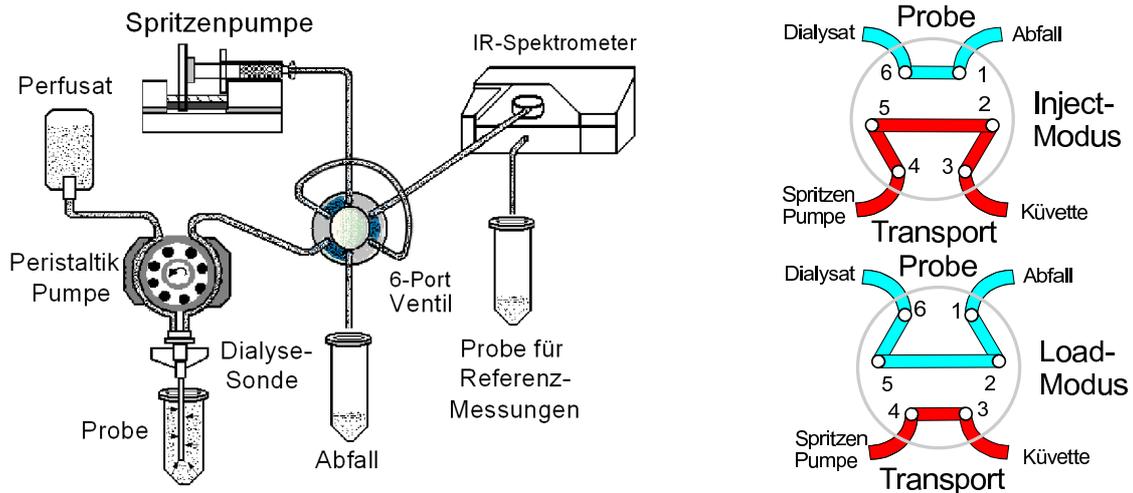
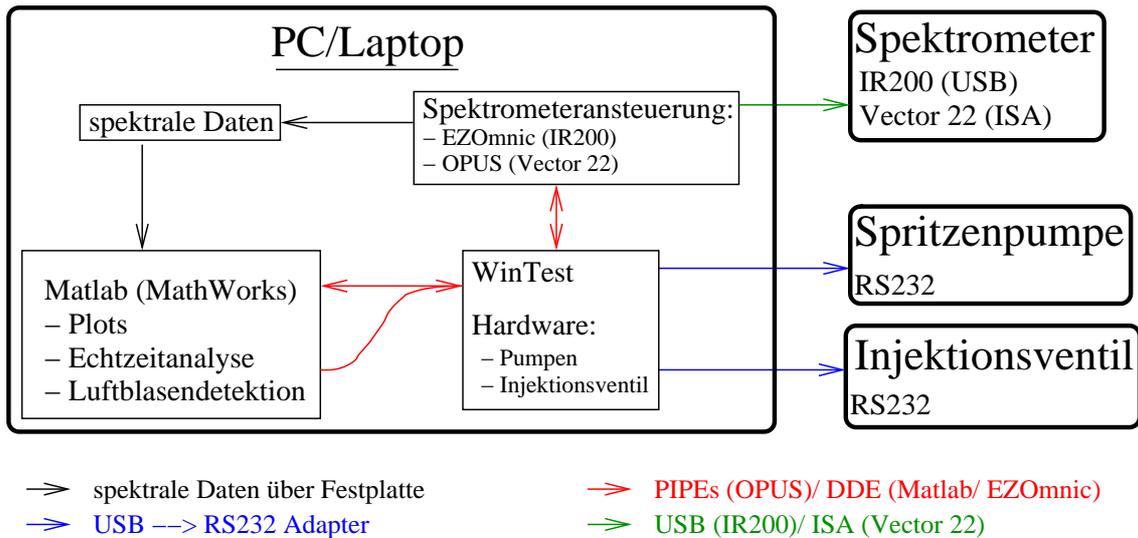


Abb. 5.35: Aufbau der Mikro-Fluidik und die Verhältnisse im Schaltventil im Detail. Die Probenschleife befindet sich zwischen den Anschlüssen 2 und 5.

Diffusion ein effektiver Fluss des Perfusats in das Interstitium, wodurch das Probenvolumen des Dialysats reduziert und damit die Wiederfindungsraten-Bestimmung gestört wird. Daher ist die Verwendung des so genannten Push/Pull-Modus bei der Anwendung der Mikro-Dialyse von Vorteil. Hierbei wird das Perfusat mit identischen Flussraten zum Dialysekatheter und das Dialysat von dort weg gepumpt; dies wird durch die Verwendung zweier Kapillare mit identischem Innendurchmesser in einer Peristaltikpumpe realisiert. Die kleinen inneren Abmessungen der Küvette verursachen bereits bei geringen Flussraten einen Gegendruck, der einen direkten Anschluss der Dialysesonde an die Küvette nicht zulässt.

Der Aufbau in Abb. 5.35 zeigt die Verwendung eines 3-Wege Schaltventils (Knauer, Berlin) mit 6 Ein- und Ausgängen (Ports) für die kontinuierliche Messung. An den sechs Anschlüssen lassen sich handelsübliche 1/16 bzw. 1/32 Zoll Kapillaren anschließen; diese sind paarweise über drei interne Kanäle miteinander verbunden. Das Ventil lässt sich elektronisch zwischen zwei Zuständen umschalten, im so genannten "Load-Modus" sind die Anschlüsse 1/2, 3/4 und 5/6 miteinander verbunden. Das Umschalten in den so genannten "Inject-Modus" dreht die Kanäle um 60 Grad unter den Anschlüssen, so dass nun die Verbindung zwischen den Anschlüssen 2/3, 4/5 und 6/1 liegt. Wie im rechten Teil der Abbildung zu sehen, separiert das Ventil die Fluidik in zwei getrennte Zweige, den der Probe und den zum Transport derselben zur Küvette. Im "Load-Modus" befindet sich die Probenschleife im Probenfluss und wird mit Dialysat befüllt. Im "Inject-Modus" befindet sie sich im Transportfluss und der Inhalt kann mit Hilfe der Spritzenpumpe zur Küvette transportiert werden. Die Probe wird nur im "Load-Modus" gesammelt, im "Inject-Modus" hingegen geht sie verloren. Das System wurde daher für einen schnellen Transport der Probe zur Küvette optimiert, um zügig zurück zum "Load-Modus" schalten zu können. Die Trennung zwischen den beiden Fluidik-Zweigen vermeidet einen Überdruck im Perfusat und ermöglicht so den Proben transport mit hoher Flussrate.

Abb. 5.36: Software *WinTest* zur Ansteuerung der Fluidik.

5.4.1 Software zur Ausführung zeitgesteuerter Messungen

Die zum Aufbau der quasi-kontinuierlichen Glucosemessung gehörenden Geräte wie Spektrometer, Pumpen und Schaltventil werden mit einer von mir am ISAS programmierten *Windows XP* Applikation *WinTest* gesteuert, deren Struktur in Abb. 5.36 gezeigt wird. *WinTest* wurde unter Verwendung des *lcc-compilers*⁹ in der Programmiersprache 'C' programmiert und läuft auf dem Laptop, der das gesamte System steuert.

Die Ansteuerung der Spektrometer (IR200 und Vector 22) erfolgt durch Kommunikation mit der jeweils zum Spektrometer gehörigen Software. Beim Vector 22 ist dies *OPUS*; es bietet eine Schnittstelle zu externen Programmen über *Windows*-Pipes an. Die zum IR200 gehörende Software *EZOmnics* ermöglicht eine Steuerung mit Hilfe der *Windows*-Schnittstelle DDE. Eigenschaften zur Spektrenaufnahme, wie Auflösung, Anzahl coadrierter Interferogramme u.a. werden sowohl bei *OPUS* als auch bei *EZOmnics* über eine Experiment-Datei festgelegt. Die spektralen Daten werden nach den Messungen auf der Festplatte des Rechners abgelegt. Von dort können sie mit *Matlab*-Skripten weiterverarbeitet werden, die ebenfalls über die DDE-Schnittstelle gestartet werden. Diese Software erkennt Störungen durch Luftblasen sowie auch Ausreißer und wertet die Daten mit entsprechenden Kalibrationsmodellen aus; die Ergebnisse werden direkt auf dem Bildschirm dargestellt.

Da der Probentransport innerhalb der Fluidik von großer Wichtigkeit ist, wurden zwei verschiedene Spritzenpumpen von TSE Systems mit einem FLG1430 Flusssensor (Sensirion, Zürich, Schweiz) hinsichtlich der Konstanz ihrer Flussraten charakterisiert. Abb. 5.37 zeigt einen zehnmütigen Ausschnitt der Messungen. Die Pulsationsperiode entspricht

⁹light C-Compiler, <http://www.cs.virginia.edu/~lcc-win32>, frei zur unkommerziellen Nutzung (Copyright Jacob Navia).

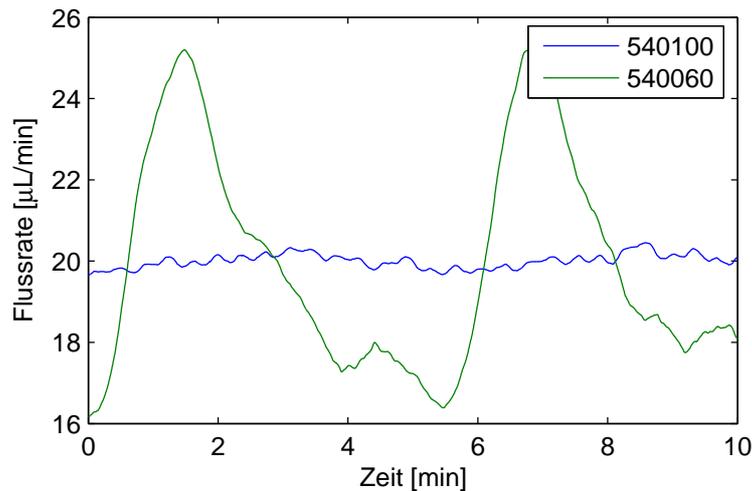


Abb. 5.37: Flussratenstabilität der verwendeten Spritzenpumpen von TSE Systems mit einer Pumprate von $20 \mu\text{L}/\text{min}$ bei Verwendung von 5 mL Hamilton-Spritzen.

einer vollständigen Umdrehung der den Spritzenkolben antreibenden Spindel. Verglichen mit dem Modell 540060 sind die Schwankungen in der Flussrate beim Modell 540100 um mehr als eine Größenordnung kleiner und damit die Transportvolumina deutlich reproduzierbarer. Die ursprüngliche Steuerelektronik dieser Spritzenpumpe bot keine Möglichkeit einer Ansteuerung durch einen Computer. Sie wurde daher gegen eine selbst entwickelte Schrittmotorsteuerung, die auf einem ATMELE 90LS4433 Mikro-Kontroller in Kombination mit einem Schrittmotortreiber der Firma ELMOS (100.13, ELMOS Semiconductor AG, Dortmund) basiert, ausgetauscht. Diese Hardware bietet die Anschlussmöglichkeit an eine RS232-Schnittstelle. Im Schaltventil war eine solche Schnittstelle bereits vorhanden; damit konnten die Geräte mit einem USB/RS232 Adapter vom Laptop aus gesteuert werden.

Der Zeitablauf der Messungen wird von einem so genannten *WinTest*-Skript festgelegt. Dieses versteht neben Befehlen zur Steuerung der Hardware auch einige strukturelle Konstrukte, wie z.B. Variablen, bedingte Verzweigungen und Unterprogrammaufrufe und ist damit vergleichbar mit einer Programmiersprache wie Basic. Schleifenartige Vorgänge werden mit veränderlichen Variablen und bedingten Sprungbefehlen realisiert. Bedingte Unterprogrammaufrufe ermöglichen die Reaktion auf Störungen wie z.B. das Auftreten von Luftblasen durch Reaktion auf den Rückgabewert des aufgerufenen *Matlab*-Skripts. Die Struktur der *WinTest*-Skripte wurde einfach gehalten. In jeder Zeile steht entweder ein Kommentar oder eine Zeit [ms] gefolgt von einem zugehörigen Befehl, dem sich optionale Parameter anschließen können. Im folgenden kurzen Beispiel wird in einer einfachen Schleife viermal eine Meldung auf dem Bildschirm ausgegeben, auf die der Nutzer reagieren muss.

```
# Beispiel
# Setzen der Variable 'var' auf den Wert 4
0 var=4
# Interaktion mit dem Nutzer
1000 messagebox "Bitte OK drücken"
# var=var-1
1999 var-=1
# verzweigt, solange das Ergebnis ungleich 0 ist
2000 gotoifresult 1000
# Ende des Ablaufs
2001 done
```

5.4.2 Transport flüssiger Proben

Einige häufig verwendete *WinTest*-Skripte werden hier erläutert. Ein beispielhafter Quelltext befindet sich im Anhang B. Das Skript *kontinuierlich.txt* wurde verwendet, um Messungen im zehnmütigen Rhythmus durchzuführen. Jeweils 8:41 Minuten ist das Ventil im "Load-Modus", d.h. bei einer Pumprate der Probe von $1 \mu\text{L}/\text{min}$ wird die Probenschleife mit $8.7 \mu\text{L}$ befüllt. Zu Beginn der Messung wird ein zweiminütiges Referenzspektrum der mit Ringer-Lösung gefüllten Küvette aufgezeichnet und nach Umschalten des Schaltventils in den "Inject-Modus" befördert die Spritzenpumpe die Probe zur Küvette. Die Flussrate wird langsam auf $40 \mu\text{L}/\text{min}$ beschleunigt, um Durchmischungen der Probe mit der Transportflüssigkeit zu reduzieren. Schon vor der spektroskopischen Probenmessung schaltet das Ventil zurück in den "Load-Modus", um mit dem Sammeln der nächsten Probe fortzufahren. Die Probenmessung wird einmal wiederholt und die Probe anschließend mit der fördernden Spritzenpumpe aus der Küvette entfernt; nach einer zweiten Referenzmessung startet das Skript von vorne. Nach jeder Einkanalmessung werden die spektralen Daten an *Matlab*-Skripte übergeben. Dort werden die aus Probe- und Referenzspektrum berechneten Extinktionen mit dem Kalibrationsmodell ausgewertet. Die vorhergesagten Konzentrationen und die aktuellen spektralen Daten werden auf dem Bildschirm des Laptops angezeigt. Das *Matlab*-Skript vergleicht die Intensität der Einkanalspektren der mit wässrigen Proben gefüllten Küvette bei 1643 cm^{-1} mit einem vorgegebenen Schwellenwert; wird dieser überschritten, ist das ein Anzeichen für Luftblasen in der Küvette. Die Methode ist sehr empfindlich, sie reagiert bereits, wenn die Luftblase etwa ein Promille der durchstrahlten Fläche einnimmt. Wird eine Luftblase detektiert, ruft das Skript ein Unterprogramm zum Entfernen derselben auf. Dort wird abwechselnd mit der Spritzenpumpe gepumpt und ein Einkanalspektrum aufgezeichnet. Sobald die Küvette als luftblasenfrei erkannt wird, kehrt das Skript zum Hauptprogramm zurück. Ist die Spritze der Spritzenpumpe geleert, erfolgt ebenfalls ein Unterprogrammaufruf indem eine so genannte *MessageBox* auf dem Bildschirm abgebildet wird. Sobald die Spritze wieder befüllt wird, kann das Programm durch Bestätigung mit der Maustaste fortgesetzt oder abgebrochen werden.

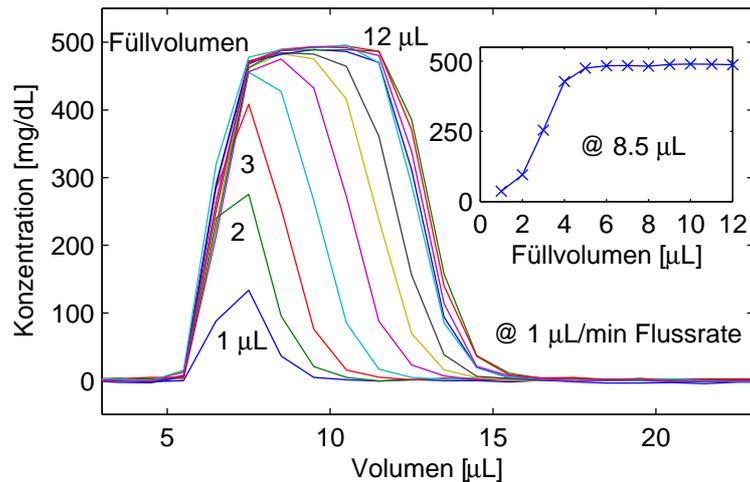


Abb. 5.38: Messungen der Konzentrationsprofile zur Bestimmung des benötigten Probenvolumens zur Befüllung der $4 \mu\text{L}$ Probenschleife (wässrige Glucoselösung mit 500 mg/dL).

Befüllung der Probenschleife

Für die Probenschleife wurde ein Innenvolumen von $4 \mu\text{L}$ gewählt. Zusammen mit dem Totvolumen des Schaltventils von $2 \mu\text{L}$ ergibt dies ein Gesamtvolumen von $6 \mu\text{L}$. Um eine gleichmäßige Befüllung zu gewährleisten, muss die Probenschleife mit einem hinreichend großen Probenvolumen befüllt werden. Die minimal benötigte Zeit, um die Probenschleife bei einer verwendeten Flussrate von $1 \mu\text{L}/\text{min}$ vollständig zu befüllen, wurde experimentell ermittelt. Abb. 5.38 zeigt 12 Messreihen, bei denen der Inhalt der Probenschleife mit einer Flussrate von $1 \mu\text{L}/\text{min}$ durch die Küvette gepumpt wurde. Dabei wurde in jeder Minute ein Einkanalspektrum aufgezeichnet. Die Probenschleife wurde mit Hilfe der zweiten Spritzenpumpe (TSE 540060) mit variierendem Probenvolumen zwischen $1 \mu\text{L}$ und $12 \mu\text{L}$ befüllt. Das kleine Diagramm in der Abbildung zeigt die maximal in der Küvette gemessene Konzentration aufgetragen gegen die Füllrate. Eine vollständige und konstante Befüllung wurde bereits mit einem Probenvolumen von $6 \mu\text{L}$ erreicht.

Dynamik des Flusses

Der Fluss der Probe in den Kapillaren unterliegt einer gewissen Trägheit. Die Kapillaren dehnen sich aus, sobald die Spritzenpumpe einen Überdruck aufbaut. Nach dem Abschalten der Pumpe setzt sich der Fluss noch eine gewisse kurze Zeit fort, bis der Überdruck wieder abgebaut ist. Eine genaue und reproduzierbare Messung ist nur beim Maximum der Probenkonzentration möglich, wobei dieses bei der großen Flussrate eine Breite von etwa $1 \mu\text{L}$ hat. Der Fluss sollte zwischen dem Pumpvorgang und dem Start der spektralen Messung hinreichend weit abgefallen sein, damit sich die Konzentration in der Küvette durch ein Nachlaufen im Rahmen der Messgenauigkeit nicht mehr verändert.

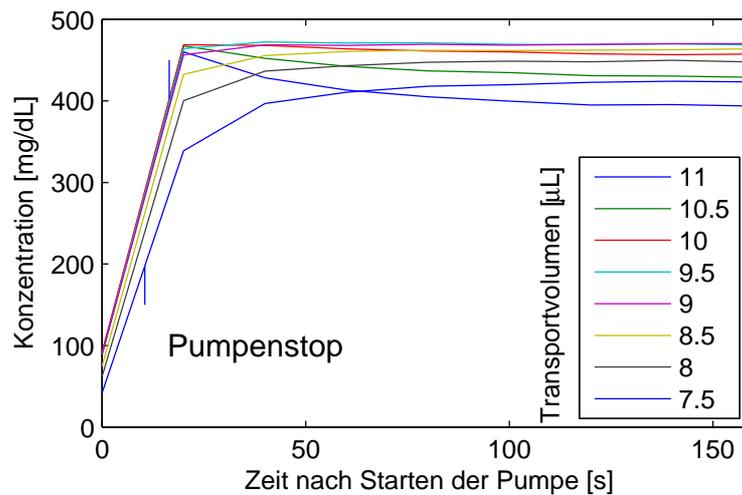


Abb. 5.39: Zeitabhängiges Verhalten des Probenflusses unter den Bedingungen der Fluidik-Programmierung bei Messungen wässriger Glucoselösung (500 mg/dL), die mit unterschiedlichem Transportvolumen in die Küvette gepumpt wurden. Die spektralen Messungen erfolgten für jeweils 20 s .

Abb. 5.39 zeigt die Dynamik der Fluidik über die in der Küvette gemessenen Konzentrationen. Nach dem Befüllen wurde der Inhalt der Probenschleife mit der Spritzenpumpe mit einer Flussrate von $40 \mu\text{L}/\text{min}$ befördert. Direkt nach dem Start der Pumpe wurde in Intervallen von jeweils 20 s ein Einkanalsspektrum aufgezeichnet. Nach dem Pumpenhalt bewegt sich das Probenvolumen in der Küvette wie erwartet weiter. Dieser Vorgang wurde mit acht verschiedenen Transportvolumina durchgeführt. Bei zu kleinem Transportvolumen, erreicht das Konzentrationsmaximum die Küvette nicht. Ein zu großes Transportvolumen führt zu einem Überfüllen, das Konzentrationsmaximum fließt an der Küvette vorbei und die Konzentration sinkt wieder. Bei einem optimalen Transportvolumen zwischen 9.5 und $10 \mu\text{L}$ erreicht das Maximum die Küvette innerhalb einer Minute.

Transportvolumen

Im Skript "kontinuierlich.txt" ist das Transportvolumen, das den Inhalt der Probenschleife zur Küvette befördert, festgelegt. Das optimale Volumen hängt von der Kapillarenlänge vom Schaltventil zur Küvette ab und muss zunächst durch geeignete Messungen ermittelt werden. Dazu wurde ein *WinTest*-Skript programmiert, das das Transportvolumen bei jedem Schleifendurchlauf variiert, d.h. alle 10 Minuten wird eine Messung mit einem veränderten Transportvolumen durchgeführt. Dieses wird von einem Start bis zu einem Zielwert variiert und dann anschließend von vorne begonnen. Abb. 5.40 zeigt eine sechsfache Wiederholung einer derartigen Mess-Serie, die die aktuelle Konzentration bei der Messung von wässriger Glucoselösung in der Küvette zeigt, wie sie bei großer Flussgeschwindigkeit die Küvette erreicht. Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse mit dem vorgestellten Fluidik-Aufbau zeigt eine relative Standardabweichung der Konzentrationsbestimmung im Konzentrationsmaximum von etwa 1% . Diese setzt sich aus den

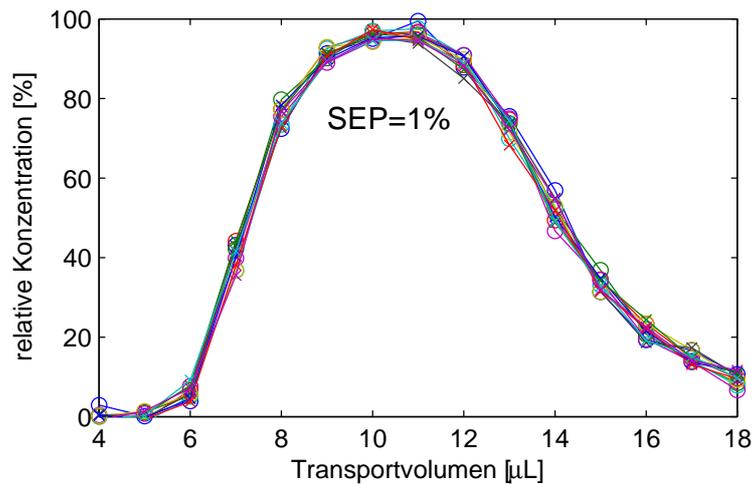


Abb. 5.40: Optimierung des Transportvolumens und Reproduzierbarkeit der Fluidik bei Vorgabe der gewählten Spritzenpumpenprogrammierung: Messungen mit wässriger Glucoselösung (180 mg/dL) bei jeweils 2 min Messdauer. Angabe der relativen Konzentration zur komplett mit der gleichen Glucoselösung befüllten Küvette.

Unsicherheiten der Fluidik und der spektralen Messung mit der zugehörigen Auswertung zusammen.

Diffusionseffekte beim Proben-transport vermischen die Probe mit der Transportflüssigkeit, wodurch die Extinktion am Konzentrationsmaximum nur etwa 90 bis 95 % im Vergleich zu einer Messung mit einer direkt in die Küvette injizierten Probe beträgt. Der genaue Wert der Verdünnung hängt von der Qualität der fluidischen Anschlüsse zwischen den Kapillaren ab, die eine gewisse experimentelle Erfahrung erfordert. Bei kleinen Flussraten von $1 \mu\text{L}/\text{min}$ hat die Konzentration ein breites Plateau auf einem Niveau von 100%. Eine Vermischung durch thermische Diffusion scheidet aus, da sich diese bei kleinen Flussraten erhöht. Für Strömungen durch runde Kapillaren wird in [156] die so genannte Reynoldszahl definiert:

$$Re = 2R \langle v \rangle \rho / \eta \quad (5.29)$$

mit R [m] dem Radius der Kapillaren, $\langle v \rangle$ [m/s] der mittleren Flussgeschwindigkeit, ρ [kg/m^3] der Dichte der Flüssigkeit und η [Pa s] der dynamischen Viskosität. Die Reynoldszahl beträgt bei unseren Experimenten etwa 1, laut [156] ist eine turbulente Strömung erst bei Werten von $Re > 2000$ zu erwarten und scheidet damit als Ursache für die Durchmischung von Probe und Transportflüssigkeit ebenfalls aus. Die Ursache liegt vermutlich in den Anschlüssen der Kapillaren untereinander, am Schaltventil und an der Küvette. Hier liegen keine einfachen runden Querschnitte mehr vor und eine fluidische Durchmischung der Probe mit der Transportflüssigkeit kann stattfinden.

5.4.3 Analytische Leistungsfähigkeit des Sensorsystems

Die Langzeitstabilität und ein geringer Kalibrationsaufwand sind wichtige Anforderungen an das zu entwickelnde Sensorsystem. Abb. 5.41 zeigt eine Langzeitmessung mit optimiertem Transportvolumen. Zunächst wurde ca. 9 Stunden lang die Acetat-Konzentration in ELO-MEL-Lösung gemessen und dann etwa 8 Stunden die der Glucose in wässriger Lösung. Die Mittelwerte und deren Standardabweichungen der Konzentrationsbestimmung nach Anpassen entsprechender Referenzspektren sind für die zwei Analyten für beide Zeitbereiche angegeben. Für das physikalische Modell wurden die Extinktionsspektren von ELO-MEL-Lösung, Glucose und Ringer-Lösung und ein konstanter Basislinien-Versatz verwendet. Die Standardabweichungen für die Glucosekonzentrationsbestimmung bei der Messung von ELO-MEL-Lösung und umgekehrt entsprechen den spektroskopischen Unsicherheiten der Bestimmungen, da der durch Schwankungen in der Fluidik verursachte Fehler dort verschwindet. Diese sind $\sigma_{spec,Glucose} = 0.9\%$ (1.6 mg/dL) für Glucose und $\sigma_{spec,ELO-MEL} = 0.4\%$ für das Acetat in der ELO-MEL-Lösung. Bei einer von Null verschiedenen Konzentration setzen sich die Varianzen der Analytkonzentrationsbestimmungen aus den spektralen und fluidischen Unsicherheitsanteilen zusammen $\sigma^2 = \sigma_{Fluidik}^2 + \sigma_{spec}^2$. Der durch die Fluidik verursachte relative Fehler liegt bei $\sqrt{0.005^2 - 0.004^2} = 0.3\%$ bis $\sqrt{0.01^2 - 0.009^2} = 0.4\%$.

Die gemessene relative Konzentration der ELO-MEL-Lösung liegt im Mittel um 3 % über dem Messwert der Glucosekonzentration. Ein möglicher Grund hierfür sind die Adsorptionsprozesse der gelösten Bestandteile an den Kapillarwänden. Die in der ELO-MEL-Lösung enthaltenen Elektrolyte bilden dabei evt. eine abschirmende Schicht, die die Adsorptions- und Reibungseffekte beim Acetat und damit die Diffusionsverbreiterung verringert. Dies könnte durch Experimente, bei denen in Ringer-Lösung angesetzte Glu-

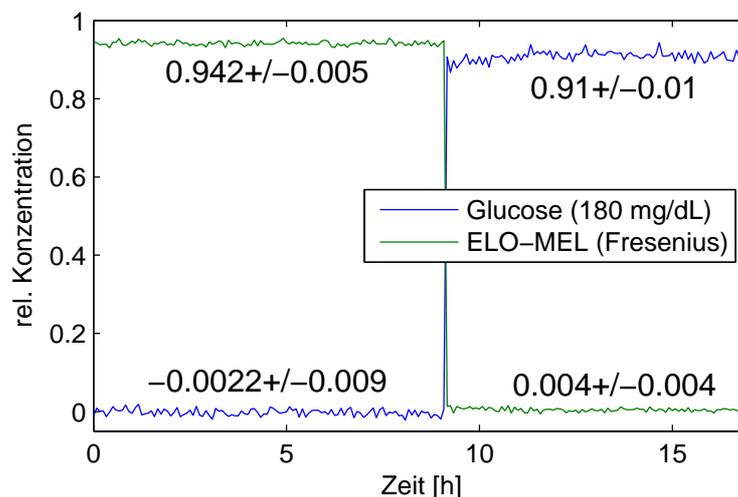


Abb. 5.41: Langzeitmessung mit optimiertem Transportvolumen: Konzentrationsbestimmungen von Acetat im ELO-MEL-Perfusat und Glucose in wässriger Lösung zur Bestimmung der Unsicherheiten des Mess-Systems.

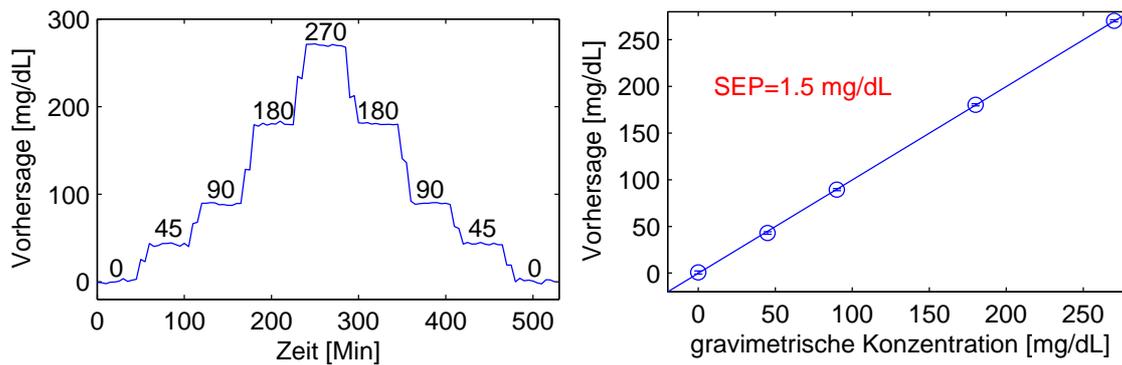


Abb. 5.42: Messung von wässriger Glucoselösung mit treppenstufenförmigem Konzentrationsprofil zum Überprüfen der Präzision und Genauigkeit der kontinuierlichen Messungen.

cose gemessen wird, genauer untersucht werden; diese wurden jedoch hier nicht durchgeführt.

Mit dem in Kap. 5.4.2 vorgestellten Protokoll wurden Proben mit treppenstufenartig variiertem Konzentrationsprofil wässriger Glucoselösungen gemessen. Die Probe wurde von einer Minipuls 2 Peristaltikpumpe mit einer Flussrate von $1 \mu\text{L}/\text{min}$ in die Probenschleife des Schaltventils gepumpt. Die Zeitpunkte des Probenwechsels wurden so gewählt, dass der Konzentrationswechsel die Probenschleife jeweils in der Mitte des 8:41 Minuten währenden Befüllens erreichte. Die linke Hälfte der Abb. 5.42 zeigt die zeitabhängigen Konzentrationsbestimmungen; zwischen den Stufen entsprechen sie etwa dem Mittelwert der Konzentrationen vor und nach dem Wechsel der Probe. Die erhaltenen Konzentrationswerte wurden um den durch die Fluidik verursachten Faktor $1/0.935$ skaliert. Das Plateau der jeweiligen Stufen wurde immer direkt in der auf den Wechsel folgenden Messung erreicht, was eine schnelle Reaktion des Systems auf Veränderungen in der Glucosekonzentration zeigt. Die Konzentrationsbestimmungen liegen beim Anstieg um etwa 1% unter denen beim Abfall der Treppe. In der rechten Hälfte der Abb. 5.42 sind die IR-spektrometrisch quantifizierten gegen die gravimetrisch bestimmten Konzentrationen der Proben aufgetragen. Die Ergebnisse bestätigen die hervorragende Linearität des spektroskopischen Verfahrens und zeigen eine Reaktionszeit auf Konzentrationsänderungen, die unterhalb der Zeitauflösung von 10 min der quasi-kontinuierlichen Messungen liegt.

Die vorangehenden Untersuchungen wurden mit einfachen wässrigen Lösungen durchgeführt. Eine Abschätzung des spektralen Rauschens und der durch die Fluidik verursachten Unsicherheiten zeigt, dass die Methode geeignet ist, Glucosekonzentrationen im gewünschten physiologischen Konzentrationsbereich mit hoher Genauigkeit zu messen. Die Messungen der Blutplasma-Dialysate zeigten bereits die Selektivität für die Glucosekonzentrationsbestimmung gegenüber den übrigen, in den Dialysaten enthaltenen Komponenten. Im Folgenden werden einige Langzeitmessungen mit dem entwickelten Aufbau an biologischen Proben dargelegt, die dessen praktische Anwendbarkeit weiter beweisen können.

Im Rahmen des CLINICIP-Projekts wurden drei Messprotokolle vereinbart, die von den Sensorpartnern in-vitro durchgeführt werden sollten, um die entwickelten Sensorsysteme miteinander vergleichen zu können, wobei der erste Punkt bereits dargelegt wurde.

- *Treppenstufen*-Messungen: Die Messung einer Reihe von wässrigen Glucoselösungen mit auf und absteigenden Konzentrationen von 0, 45, 90, 180 und 270 mg/dL
- *Up-Down*-Messungen: Eine Langzeitmessung von mit Glucose aufgestockten Blutserum-Ultrafiltraten mit abwechselnd gewählter großer und kleiner Glucosekonzentration (90 und 270 mg/dL)
- *Langzeit*-Experiment: Eine Langzeitmessung von mit Glucose aufgestockten Blutserum-Ultrafiltraten über 72 Stunden mit frischen Proben bei wechselnden Glucosekonzentrationen in Abständen von 24 Stunden (90, 180 und 270 mg/dL).

Für die *Up-Down*- und *Langzeit*-Messungen an biologischen Proben wurden uns von den klinischen Partnern am Zentrum für medizinische Forschung (ZMF, Medizinische Universität Graz - MUG, Österreich) Ultrafiltrate von Blutserum zur Verfügung gestellt. Die Bioflüssigkeiten wurden *frisch* verwendet, um Effekte durch mikrobielle Aktivitäten auszuschließen. Sie wurden durch Filter mit einem *Cut-Off* von 20 kDa zentrifugiert und haben eine vergleichbare Zusammensetzung wie die der Dialysate. Die Herstellung von Ultrafiltraten gelingt deutlich schneller als die der letztgenannten Proben (ein Blutplasmavolumen von 50 mL benötigt etwa 30 min zum Zentrifugieren). Die Ultrafiltrate mit einer Glucosekonzentration von 94 mg/dL wurden mit kristalliner α -D(+)-Glucose auf 184 und 284 mg/dL aufgestockt. Nach einigen Stunden war erfahrungsgemäß das dynamische Gleichgewicht der Glucose-Mutarotation erreicht, danach wurden die Proben bis zu den Messungen bei -24°C aufbewahrt.

Die *Up-Down*-Messung mit den Ultrafiltraten wurde wie die *Treppenstufen*-Messung (siehe Kap. 5.4.3) durchgeführt, allerdings mit zeitlich verschobenem Probenwechsel, so dass der Konzentrationssprung die Probenschleife genau zwischen zwei Messungen erreichte. Alle 60 Minuten wurde zwischen den beiden verwendeten Proben (94 und 284 mg/dL) gewechselt, wobei jedes Ultrafiltrat über insgesamt 4 Stunden gemessen wurde.

Die quantitative CLS-Auswertung wurde auf die Extinktionsspektren angewandt, wobei der Wellenzahlbereich von 1000 bis 1580 cm^{-1} genutzt wurde. Das physikalische Modell setzte sich aus Extinktionsspektren der folgenden Komponenten zusammen: Glucose, Harnstoff, Hydrogencarbonat, Phosphat, Lactat, Acetat, Sulfat, Glycerin, Ringer-Lösung, konstanter Basislinien-Versatz und CO_3^{2-} . Die Proben enthielten Acetat, da sie von den klinischen Partnern mit ELO-MEL-Lösung verdünnt wurden, um das Probenvolumen zu vergrößern. Ebenfalls an die Probenspektren angepasst wurde die Temperaturabhängigkeit der Acetat-Banden über das Eigenschaftskorrelationsspektrum und das Extinktionsspektrum atmosphärischen Wassers (siehe unten).

Das in der Probe enthaltene Glycerin stammt aus den Ultrafiltern; eine Kontamination konnte trotz Spülung derselben mit Wasser nicht ganz vermieden werden. Das Glyce-

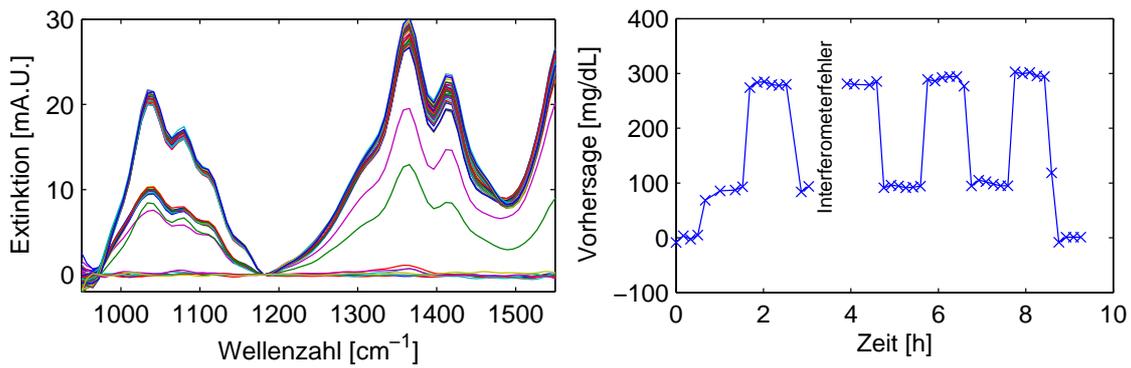


Abb. 5.43: Basislinien-korrigierte Extinktionsspektren und Glucosekonzentrationsbestimmungen bei den *Up-Down*-Messungen.

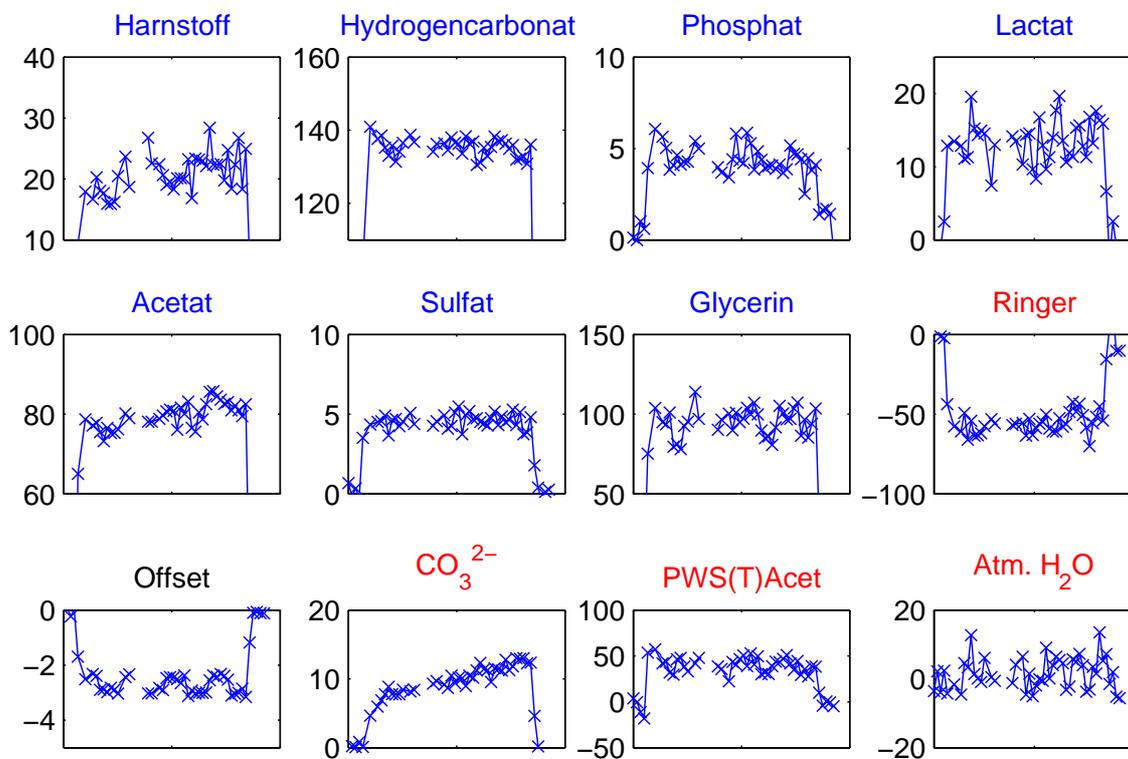


Abb. 5.44: Konzentrationsbestimmungen für Modell-Komponenten bei der zehnstündigen *Up-Down*-Messung (Einheiten in [mg/dL]/blau, [%]/rot, [mA.U.]/schwarz).

rin hat starke spektrale Banden im Bereich zwischen 950 und 1170 cm^{-1} , dies führt in Kombination mit der Sulfat-Bande bei 1103 cm^{-1} zu einer großen Querempfindlichkeit gegenüber der Glucosebestimmung. Um diese genauer zu untersuchen, wurde das Sulfat-Extinktionsspektrum mit unterschiedlichen Skalierungsfaktoren von den Extinktionsspektren der Probe abgezogen. Die Faktoren wurden im Rahmen der zu erwartenden physiologischen Sulfat-Konzentration von 2.9 bis 6.7 mg/dL (0.3 bis 0.7 mM) variiert (siehe Kap. 5.2.4). Anschließend wurde das Sulfat-Spektrum aus dem physikalischen

Modell entfernt und die CLS-Kalibration erneut durchgeführt. Je größer der Skalierungsfaktor gewählt wurde, desto kleiner war die IR-spektrometrisch bestimmte Glucosekonzentration; im genannten Bereich des Skalierungsfaktors sinkt sie etwa um 5 mg/dL .

Abb. 5.43 zeigt die Glucosekonzentrationsbestimmung und die Extinktionsspektren der Messreihe. Letztere unterscheiden sich im Wesentlichen in der Extinktion der Glucose zwischen 950 und 1180 cm^{-1} . Die Hydrogencarbonat- und Acetat-Banden zwischen 1200 und 1550 cm^{-1} sind im Rahmen der Messgenauigkeit konstant. Die unterschiedlichen Glucosekonzentrationen wurden durch Aufstocken mit Glucose angesetzt, so dass die Konzentrationen der übrigen Komponenten sich nur äußerst geringfügig änderten. Die diesbezüglichen Konzentrationsbestimmungen des physikalischen Modells sind in Abb. 5.44 dargestellt. Der Gehalt an Harnstoff, Lactat, Acetat nimmt über den Messzeitraum leicht zu, was jedoch statistisch nicht signifikant ist. Gründe dafür sind möglicherweise eine Anreicherung der Bestandteile durch ein Verdunsten des Wassers in der Probe oder eine Veränderung der Verdünnung durch den Probentransport der Fluidik. Die deutliche Konzentrationszunahme des CO_3^{2-} geht mit einer Konzentrationsabnahme des Hydrogencarbonats einher. Dies wird durch ein Ausgasen von CO_2 und einer damit einhergehenden Erhöhung des pH-Wertes verursacht, was das Dissoziationsgleichgewicht des Carbonats verschiebt.

Ein *Langzeit*-Experiment über nahezu 100 Stunden wurde ebenfalls durchgeführt. Die rechte Hälfte der Abb. 5.45 zeigt die zugehörigen Glucosekonzentrationsbestimmungen. Die Messreihe wurde von einigen Unterbrechungen gestört. Kurzfristige Ausfälle des Spektrometers wurden auf Instabilitäten der gemessenen Interferogramme zurückgeführt. Durch die Verwendung des optischen Langpass-Filters ist der *Centerburst* der Interferogramme breiter, als von der Software erwartet. Wenn der *Centerburst* genau zwischen zwei Abtastpunkten liegt (rote und hellblaue Kurve in Abb. 5.46), genügt eine geringe Verschiebung des Interferogramms für einen Wechsel der quantisierten *Centerburst*-Position. Deren Lage wird von der Spektrometersoftware vor der Mittelwert-Bildung der Interferogramme mit Hilfe einer Korrelationsfunktion getestet. Schwankt diese, werden

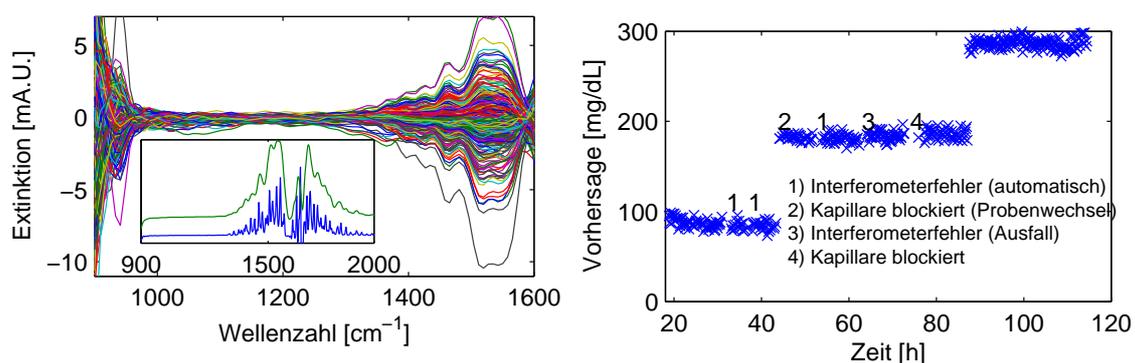


Abb. 5.45: Basislinien der *Langzeit*-Messung zusammen mit der Extinktion von atmosphärischem Wasser bei 4 und 16 cm^{-1} Auflösung (unterschiedlich skaliert, Wellenzahlachse von 900 bis 2000 cm^{-1} gezeigt) und die über das IR-Mess-System erhaltenen Glucosekonzentrationswerte der *Langzeit*-Messung.

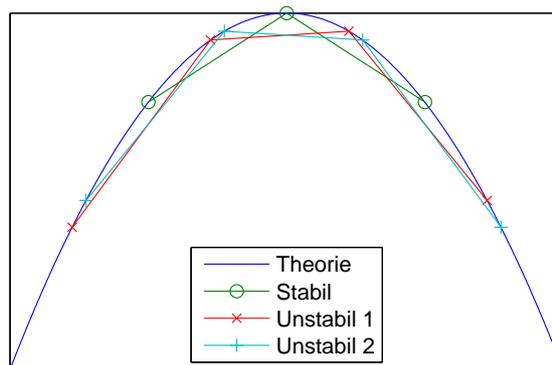


Abb. 5.46: "Instabilität" des Interferogramm-*Centerbursts* bei unterschiedlicher Abtastung.

die zugehörigen Interferogramme verworfen und die Messung solange fortgesetzt, bis die in der Experiment-Datei vorgegebene Anzahl an Interferogrammen erfolgreich für die Mittelung gemessen wurde. Durch das vorgegebene Zeitprotokoll in den WinTest-Skripten wird die Messung abgebrochen, wenn diese nicht in der vorgegebenen Zeit beendet wird. Das elektronische Detektorsignal des IR200 läßt sich optional um einen "Faktor 1" bzw. "4" verstärken. Ein Umschalten dieses Faktors ändert das Tiefpassverhalten und verschiebt das Interferogramm gerade um den halben Abstand zwischen zwei Abtastpunkten. Hiermit kann also zwischen dem stabilen und instabilen Verhalten gewechselt werden. Inzwischen wurde in den WinTest-Skripten eine entsprechende Abfrage realisiert, die den elektronischen Verstärkungsfaktor wechselt, sobald die Differenz der beiden größten Intensitätswerte im Interferogramm einen Schwellwert unterschreitet. Der Einfluss des Verstärkungsfaktors auf das S/R-Verhältnis ist nur gering. Messungen zeigen einen Unterschied von weniger als 10 %.

Ein weiteres Problem bei der *Langzeit*-Messung war ein Verstopfen der verwendeten Tygon[®]-Kapillaren durch kleine Schwebeteilchen in den Ultrafiltraten. Diese entstehen sobald die biologischen Proben der Laborluft ausgesetzt werden. Bei den klinischen Messungen von Dialysaten hinter einem Dialysekatheter ist dies nicht zu erwarten, da die Proben nach der Dialyse durch die Tygon[®]-Kapillare gepumpt und direkt ohne längere Lagerung gemessen werden. Die linke Hälfte der Abb. 5.45 zeigt die gesamte Population der Basislinien der *Langzeit*-Messung, die durch Quotientenbildung von zwei hintereinander aufgenommenen Hintergrundspektren und anschließender Logarithmierung berechnet wurden. Bedingt durch verhältnismäßig große Schwankungen in der Luftfeuchtigkeit, enthalten diese Extinktionsspektren Banden des atmosphärischen Wassers zwischen 1450 und 1600 cm^{-1} . Dessen Spektrum ist im eingefügten Diagramm der linken Abbildung mit einer spektralen Auflösung von 4 und 16 cm^{-1} zu sehen. Ein solches in der Auflösung angepasstes Spektrum wurde bei den Auswertungen von Messungen, die bei großen Schwankungen der Raumluftfeuchtigkeit durchgeführt wurden, in das physikalische Modell integriert. Die rechte Abbildung zeigt die Konzentrationsbestimmungen der Glucose für die drei verwendeten Ultrafiltrate.

Serum	<i>Up-Down</i>	<i>Langzeit</i>
Ultrafiltrate [mg/dL]	IR-Bestimmung [mg/dL]	IR-Bestimmung [mg/dL]
94	94 ± 5	87 ± 6
184	–	183 ± 5
284	289 ± 8	286 ± 5

Tab. 5.6: Konzentrationsbestimmung der biologischen Proben.

In Tab. 5.6 sind die Ergebnisse der beiden Messreihen zusammengefasst. Angegeben sind die gravimetrisch aufgestockten Glucosekonzentrationen der Ultrafiltrate, die Mittelwerte der IR-spektrometrisch unter Verwendung des physikalischen Kalibrationsmodells bestimmten Konzentrationen und deren Standardabweichungen. Die Ergebnisse stimmen gut mit den Referenzkonzentrationen überein. Zusammen mit einem Skalierungsfaktor, der die durch die Fluidik bedingte Diffusion des Konzentrationsmaximums berücksichtigt, sind genaue quantitative Analysen von Ultrafiltraten möglich. Die Messungen zeigen die hervorragende Langzeitstabilität des entwickelten Systems. Gründe für Ausfälle wurden erkannt und bei weiteren Messungen vermieden.

5.5 Klinische Studien

Der in den vorangehenden Kapiteln beschriebene Aufbau zur kontinuierlichen Analyse von Dialysaten wurde im Rahmen des CLINICIP-Projekts in vier voneinander unabhängigen klinischen Studien eingesetzt. Diese wurden im ZMF an der MUG in Österreich durchgeführt. Tab. 5.7 gibt einen Überblick zu den Studien. Das Mess-System wurde an insgesamt neun Probanden, von denen vier an Diabetes mellitus vom Typ 1 erkrankt waren (CM9), getestet. Die Daten von zwei Probanden konnten wegen technischer Schwierigkeiten nicht ausgewertet werden (siehe unten). Die laut Ethikkommission erforderlichen Einverständniserklärungen der Probanden lagen vor. Der Mikro-Dialysekatheter wurde von einem an der MUG beschäftigten Arzt eingesetzt und das Perfusat mit einer Peristaltikpumpe bei einer Flussrate von ca. $1 \mu\text{L}$ befördert. Nach einer Einlaufzeit von etwa 30 Minuten erreichte das Dialysat den Auslass der Tygon[®]-Kapillaren; danach wurden diese an den Eingang des Schaltventils angeschlossen und die Messungen begonnen.

Name	Datum	Umfang [h]	n_{specs}	Referenzwerte
CM6	03'2005	5.5	23	$Dial_{gluc}$, BG
		6	20	$Dial_{gluc}$, BG
		6.5	27	$Dial_{gluc}$, BG
CM8	09'2005	24	89	BG
CM9	02'2006	26.5	83	BG
		28	120	$Dial_{gluc,lact}$, BG
CM9	06'2006	24	134	BG

Tab. 5.7: Übersicht über die klinischen Studien.

5.5.1 Orale Glucose Toleranz Tests

In der ersten Studie (CM6) wurden die Dialysate von drei unterschiedlichen Probanden an drei aufeinander folgenden Tagen für jeweils etwa sechs Stunden spektroskopiert. In dieser Studie war der Zeitabstand zwischen den Dialysat-Messungen 15 min an Stelle von 10 min Minuten pro Messzyklus; davon wurden 13 Minuten zum Befüllen der Probenschleife verwendet. Das optische Filter war noch nicht im Strahlengang des Spektrometers vorhanden, und die Temperierung der Küvette als Heizung und nicht als Kühlung realisiert; die Messungen wurden bei einer Küvettentemperatur von 30°C durchgeführt. Eine Bestimmung der Wiederfindungsrate bei der Dialyse war ebenfalls noch nicht implementiert, wobei als Perfusat Ringer-Lösung zum Einsatz kam.

Die mit der Transportflüssigkeit verdünnten Dialysate wurden hinter der Küvette gesammelt und deren Glucosekonzentrationen im klinisch-chemischen Labor des ZMF ermittelt. Der dortige Analyseautomat (Roche Cobas Mira Analyser) ist für kleine Glucosekonzentrationen optimiert und damit für die Dialysate mit den zusätzlich durch die Transportflüssigkeit verdünnten Konzentrationen geeignet. Der Verdünnungsfaktor berechnet sich als Verhältnis aus Probenschleifenvolumen zur Menge des zum Hin- und Weg-Transport

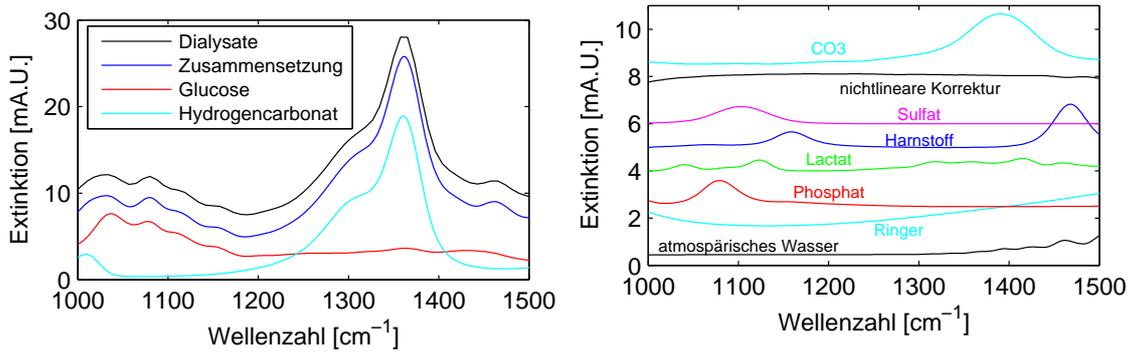


Abb. 5.47: Zusammensetzung eines Dialysat-Extinktionsspektrums des zweiten Probanden der CM6-Studie. Die mit dem physikalischen Modell ermittelten Konzentrationen betragen für Glucose (83 mg/dL), Harnstoff (31 mg/dL), Hydrogencarbonat (103 mg/dL), Phosphat (3.6 mg/dL), Lactat (11 mg/dL) und Sulfat (2.0 mg/dL). Der nicht abgebildete Basislinien-Versatz betrug 0.8 mA.U.

benötigten Transportvolumens. Dasselbe Messprotokoll wie in der in-vivo Studie wurde in-vitro mit gravimetrisch angesetzter Glucoselösung durchgeführt. Die verdünnte Probe wurde hinter der Küvette gesammelt. Die Konzentration beider Proben wurde spektroskopisch ermittelt, das Verhältnis ergab einen Verdünnungsfaktor von 3.52. Die Referenzwerte der Dialysat-Proben wurden bei den Auswertungen um diesen Faktor korrigiert.

Während der Studien wurden regelmäßig die Blutglucosekonzentrationen der Probanden gemessen. Dazu wurde arterialisiertes Blut über einen venösen Katheter im Unterarm, der sich in einer so genannten Hotbox¹⁰ befand, abgenommen und die Glucosekonzentration vor Ort mit einem Beckman-Analyseautomaten bestimmt. Die Blutproben wurden viertel- bzw. halbstündlich entnommen und die Konzentration als Mittelwert einer zweifachen Bestimmung berechnet. Um ein zeitliches Blutglucoseprofil mit großer Variationsbreite zu erzielen, erhielten die Probanden während der Studie eine Zuckerlösung, die aus 100 g Zucker aufgelöst in 500 mL Wasser bestand¹¹.

Die mittels des physikalischen Modells berechnete Zusammensetzung des Dialysat-Spektrums des zweiten Probanden mit der größten aufgetretenen Glucosekonzentration ist in Abb. 5.47 zu sehen. Zur Spektrenanpassung wurde der Wellenzahlbereich von 1000 bis 1500 cm^{-1} verwendet. Die stärkste Bande bei 1360 cm^{-1} stammt vom Hydrogencarbonat, das auch bei 1008 cm^{-1} im Bereich der Glucoseabsorptionsbanden zwischen 950 und 1180 cm^{-1} absorbiert. Ebenfalls mit dem bloßen Auge zu erkennen ist die Bande des Harnstoffs bei 1460 cm^{-1} . Neben erhöhten Glucosekonzentrationen sind beim zweiten Probanden auch die Harnstoff-Konzentrationen überdurchschnittlich hoch gewesen.

Messungen von proteinhaltigen Proben wie Blutplasma führen zur Beschichtung des verwendeten Fenstermaterials in der Küvette [58]. Proteine sind in den gemessenen Dia-

¹⁰Durch eine Temperierung auf etwa 45°C öffnen sich die arterio-venösen Anastomosen, die Durchblutung wird damit verstärkt und die arterio-venöse Differenz der Blutglucosekonzentration gesenkt.

¹¹Beim so genannten oralen Glucose-Toleranz-Test (OGTT) trinkt der Patient eine Glucoselösung (75 g/500 mL), um die Funktion der Glucosestoffwechselregulierung zu testen [157].

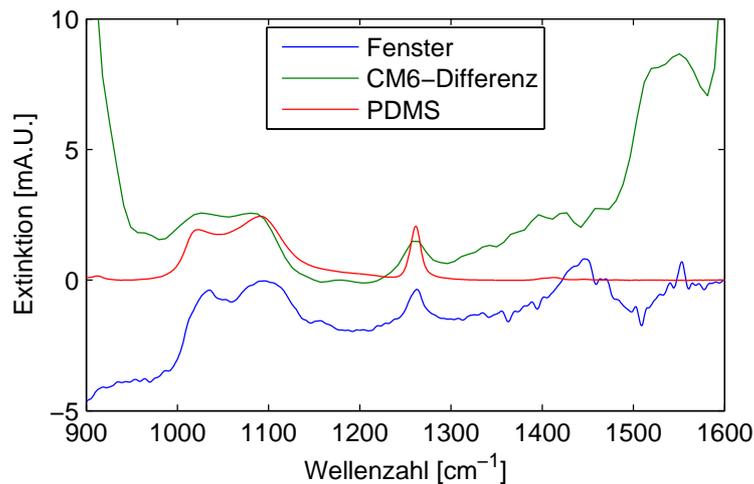


Abb. 5.48: PDMS als Ursache für die Ablagerungen auf den CaF_2 -Fenstern während der CM6-Studie (Spektren skaliert und in der Ordinate verschoben).

lysaten nicht vorhanden, trotzdem war eine geringfügige Veränderung der Transmissions-eigenschaften der Küvette zu beobachten. Abb. 5.48 zeigt u.a. das aus dem ersten und letzten Referenz-Einkanalspektrum der CM6-Studie berechnete Extinktionsspektrum zwischen Beginn und Ende der Messkampagne. Ein Vergleich mit dem Extinktionsspektrum von PDMS zeigt eine Übereinstimmung der Extinktionsbanden bei 1260 cm^{-1} und zwischen 1000 und 1150 cm^{-1} . PDMS löst sich in Spuren-Konzentrationen aus dem Dichtungsmaterial der Küvette und lagert sich auf den CaF_2 -Fenstern ab. Die Banden zwischen 1500 und 1600 cm^{-1} zeigen auch Änderungen in der Konzentration des atmosphärischen Wassers, die durch Schwankungen in der Luftfeuchtigkeit in der Klinik bedingt waren. Ebenfalls gezeigt ist das Extinktionsspektrum eines bei den in-vitro Messungen verwendeten CaF_2 -Fensters; das Referenz-Einkanalspektrum wurde mit einem sauberen CaF_2 -Fenster gemessen. Die dünnen PDMS-Filme auf den Küvettenfenstern absorbieren nur sehr schwach - etwa eine Milliextinktionseinheit bei einem Messzeitraum von 24 Stunden. Die bei einem Abstand von 7.5 min zwischen Referenz- zu Proben-Einkanalspektrum zu erwartenden Einflüsse sind um mehr als zwei Größenordnungen kleiner und damit im spektralen Rauschen nicht auszumachen.

Wegen der diffusionsbedingten Konzentrationsverminderung durch die Fluidik (siehe Kap. 5.4.2) müssen die Extinktionsspektren vor der Verwendung skaliert werden. Dies wurde bei diesen Messungen durch die Skalierung der Spektren mit einem Faktor $1/0.86$ berücksichtigt. Dieser Faktor wurde in-vitro durch die Messung einer wässrigen Glucoselösung mit $c = 500\text{ mg/dL}$ bestimmt. Die gemessene Konzentration mit optimierter Fluidik betrug 429 mg/dL .

Das Eigenschaftskorrelationspektrum der Glucose, das über die Spektrenpopulation der CM6-Studie und die zugehörigen Dialysat-Referenzkonzentrationen berechnet wurde (siehe Abb. 5.49), zeigt eine deutliche Übereinstimmung mit dem Spektrum wässriger Glucoselösung. Die Bande bei 1360 cm^{-1} ist durch eine Zufallskorrelation mit der Hydrogencarbonat-Konzentration erklärbar. Die ebenfalls abgebildeten Mittelwert-

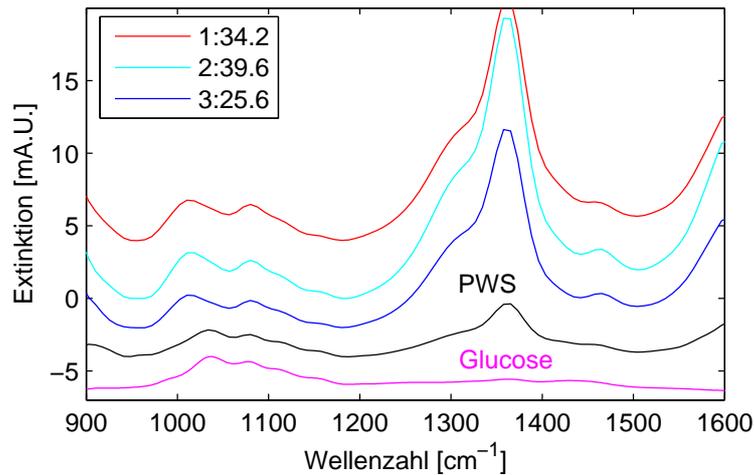


Abb. 5.49: Eigenschaftskorrelationsspektrum (PWS) und Mittelwert-Spektren der drei Probanden-Experimente mit in der Legende zu findenden Dialysat-Glucosereferenzkonzentrationen in $[mg/dL]$ bei der CM6-Studie. Im Vergleich dazu ist das Extinktionsspektrum von Glucose gezeigt.

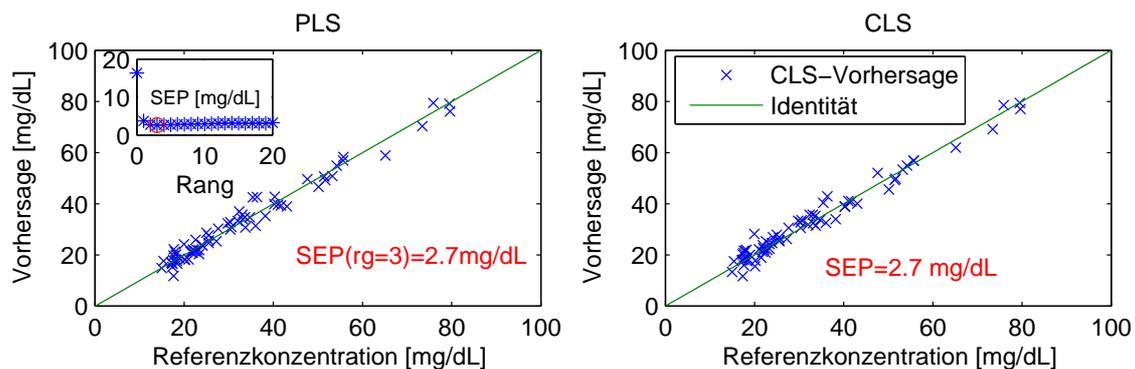


Abb. 5.50: Multivariate Konzentrationsbestimmungen der CM6-Studie im Vergleich zur Glucose-Referenzkonzentration der Dialysat-Proben berechnet mit PLS-Kalibrierung und mittels CLS-Auswertung.

Spektren der drei Probanden sind sehr ähnlich. Eine etwas größere Harnstoff-Bande bei 1460 cm^{-1} und Hydrogencarbonat-Bande bei 1360 cm^{-1} sind beim zweiten Probanden zu erkennen. Die PLS-Kalibrierungsmodelle wurden mit spektralen Daten zwischen 950 und 1180 cm^{-1} erstellt, da hier die relevanten Banden der Glucose liegen. Damit war eine Konzentrationsbestimmung bei Verwendung der leave-1-out Kreuzvalidierung bereits bei niedrigen Rängen möglich (linke Hälfte der Abb. 5.50). Das Heranziehen der mit der nichtlinearen Basislinien-Korrektur (siehe Kap. 5.1.2) behandelten Spektren ergab einen optimalen SEP-Wert von 2.7 mg/dL bei Verwendung von 3 Basisvektoren zur rangreduzierten Spektrenmatrix-Invertierung. Hieraus resultierte der linke *Scatterplot* mit den IR-spektrometrisch bestimmten Konzentrationen, die gegen die Dialysat-Referenzkonzentrationen aufgetragen wurden.

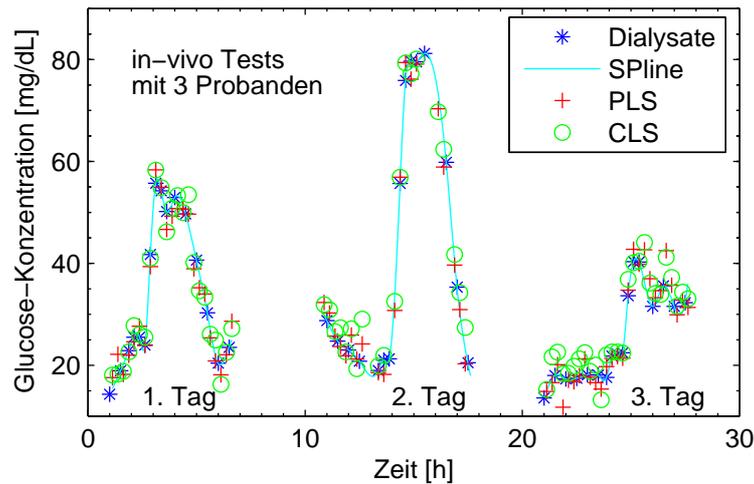


Abb. 5.51: CM6-Studie: Zeitabhängiger Verlauf der Glucosekonzentrationen bei den drei untersuchten Probanden mit Referenzwerten und Ergebnissen der PLS- und CLS-Kalibrierung.

Im rechten Teil der Abb. 5.50 ist die Konzentrationsbestimmung auf der Grundlage der CLS-Kalibrierung gezeigt. Dabei wurde der Wellenzahlbereich von 1000 bis 1500 cm^{-1} für die Auswertung herangezogen. Das physikalische Modell wurde aus den Spektren der wässrigen Lösungen von Glucose, Harnstoff, Hydrogencarbonat, Phosphat, Lactat und Sulfat zusammengesetzt. Bei Phosphat und Hydrogencarbonat wurden die bei einem pH-Wert von 7.5 bei den übrigen Komponenten die bei pH=7 gemessenen Spektren verwendet. Außerdem enthielt das CLS-Modell ein Spektrum der Ringer-Lösung, einen anzu-passenden Basislinien-Versatz, das CO_3^{2-} -Spektrum und das Spektrum, das den Einfluss der Fluktuationen im Maximum des Interferogramms berücksichtigt (siehe Kap. 5.1.2); die Schwankungen in der Luftfeuchtigkeit wurden durch den Einsatz eines Spektrums von atmosphärischem Wasser berücksichtigt. Die Residuenspektren sind zusammen mit den bei den übrigen Studien berechneten Residuen am Ende des Kapitels in Abb. 5.66 (S. 123) abgebildet.

In Abb. 5.51 ist der zeitliche Verlauf der Dialysat-Glucosekonzentrationen und ihrer multivariaten Quantifizierung dargestellt. Die Glucosekonzentrationen können sowohl mit dem statistischen als auch mit dem physikalischen Modell zuverlässig geschätzt werden. Der Anstieg der Glucosekonzentrationen nach Einnahme der Zuckerlösung durch die Probanden ist gut zu sehen. Die Bestimmung mit Hilfe des physikalischen Modells kommt ohne weitere Skalierung der Ergebnisse aus, sämtliche Einflussparameter, wie z.B. die Küvettendicke und die diffusionsbedingte Verdünnung der Probe wurden unabhängig von den Dialysat-Messungen bestimmt und durch geeignete Faktoren eliminiert.

Die in Kap. 4.4 vorgestellten Verfahren zur Auswahl geeigneter spektraler Variablen wurden auf die Daten der CM6-Studie angewandt. Hierzu wurden die unbearbeiteten Extinktionsspektren, die Basislinien-korrigierten Spektren (siehe Kap. 5.1.2) und die logarithmierten Einkanalprobenspektren, d.h. ohne Verwendung der Referenzmessungen, herangezogen. Für die Ergebnisse wurde die Kreuzvalidierung mit verschiedenen Block-

größen durchgeführt: leave-1-out, leave-10-out und leave-day-out. Bei der leave-10-out Validierung wurde der Mittelwert der Ergebnisse aus unterschiedlichen Randomisierungen der Spektrenreihenfolge gebildet. In Tab. 5.8 sind die Ergebnisse zusammengefasst. Die Zahlenangaben in den Klammern hinter den SEP-Werten sind die Ränge des zur optimalen Kreuzvalidierung verwendeten PLS-Modells. Bei Verwendung der TABU-Suche und PMMS ist dort zusätzlich die Anzahl der ausgewählten Variablen angegeben. Bei der Verwendung von PMMS ist der Zahlenwert vor dem SEP-Wert die Anzahl der Basisvektoren, die zur Ermittlung des Regressionsvektors zur Wellenzahlwahl genutzt wurde.

Daten	leaveout	gesamter Spektralbereich	PMMS		TABU
			Rang	SEP (n_{sel})	SEP (n_{sel})
Roh-Daten	1	2.75 (6)	3	2.50 (4)	2.40 (5)
	10	2.8 (6)	3	2.46 (4)	2.4 (5)
	day	3.3 (3)	3	2.54 (4)	2.8 (5)
Basislinien korrigiert	1	2.65 (3)	4	2.43 (2)	2.40 (2)
	10	2.7 (3)	4	2.47 (4)	2.4 (2)
	day	2.95 (2)	5	2.38 (2)	2.5 (2)
Einkanal logarithmiert	1	2.93 (9)	6	2.9 (10)	2.8 (10)
	10	3.0 (9)	6	3.2 (8)	2.85 (10)
	day	8.3 (10)	6	3.6 (10)	5.3 (10)

Tab. 5.8: Variablenselektion mit PMMS und TABU im Vergleich zur Auswertung der Daten des gesamten Spektralintervalls von 950 bis 1180 cm^{-1} mit den Roh-Daten, Basislinien-korrigierten Daten und Einkanalspektren. SEP-Werte in $[mg/dL]$, bei PMMS ist der Rang zur Berechnung des PLS-Regressionsvektors angegeben, der zur Wellenzahlwahl führt. Die Zahlenangaben in Klammern sind der Rang bei Verwendung des gesamten Spektralbereiches, bzw. die jeweilige Anzahl n_{sel} der ausgewählten Variablen bei PMMS- und TABU-Suche.

Die besten Ergebnisse liefern die Basislinien-korrigierten Spektren, der optimale Rang der entsprechenden Modelle ist je nach Kreuzvalidierungsverfahren um 1 bis 3 niedriger als bei den beiden anderen Auswertungen und die Ergebnisse sind unabhängig vom Verfahren der Variablenselektion am stabilsten. Die höheren SEP-Werte, die mit den logarithmierten Einkanalspektren erzielt wurden, resultieren aus der Langzeitdrift der Spektrometeroptik. Die SEP-Werte für leave-1-out und leave-10-out unterscheiden sich nur wenig, da das Modell genügend Daten für eine robuste Berechnung des Kalibriermodells zur Verfügung hat, um diese Driften in den Einkanalspektren zu erkennen. Die mit leave-day-out kreuzvalidierten Werte sind jedoch deutlich schlechter.

Die zuverlässigste Quantifizierung der Glucosekonzentrationen wurde mit PMMS erzielt, die leave-day-out Resultate bleiben dort selbst bei Verwendung der Einkanalspektren stabil. Wird deren gesamter spektraler Bereich verwendet, sind zwar gute Ergebnisse möglich, diese verschlechtern sich jedoch deutlich mit der Blockgröße der Kreuzvalidierung. Die Ergebnisse der TABU-Suche liefern für kleine Blockgrößen - wie erwartet - die besten Ergebnisse, sind aber bei leave-day-out nicht so gut wie die mit PMMS erzielten Resultate.

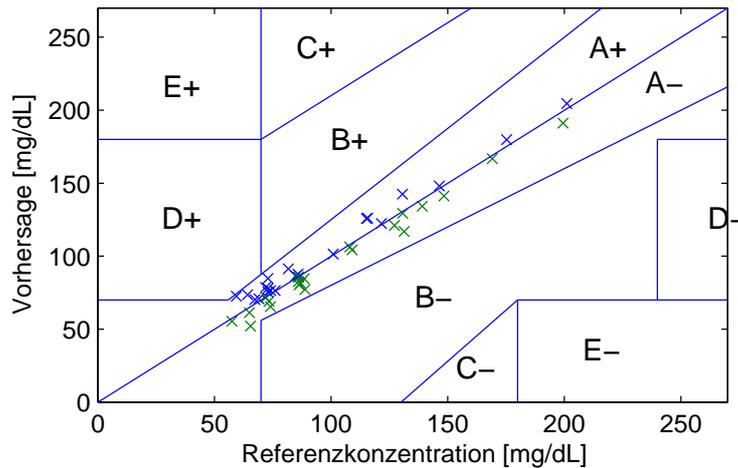


Abb. 5.52: CM6-Studie: CEG-Diagramm der Messergebnisse für die ersten beiden Probanden; Referenzwerte sind die mit Spline interpolierten Blutglucosekonzentrationen.

In der Medizin wird üblicherweise eine Darstellung im so genannten CEG-Diagramm (engl.: *Clarke-Error-Grid* [158]) verwendet, um Blutglucosemessgeräte bzgl. ihrer analytischen Leistungsfähigkeit einzuschätzen. Die mit dem Sensor bestimmten Konzentrationen werden gegen die Referenzkonzentrationen aufgetragen. Die Grafik wird in mehrere mit den Buchstaben A bis E bezeichnete Bereiche unterteilt. Diese wichten die Messfehler hinsichtlich ihrer medizinischen Relevanz. Sämtliche im Bereich A liegenden Messungen gelten als unkritisch in Bezug auf die Gesundheit eines Patienten. Blutglucosekonzentrationen unterhalb von 70 mg/dL gelten als Hypoglykämie und werden in der Regel durch eine Referenzmessung überprüft, Abweichungen kleiner als 20% gelten als tolerierbar. Im Bereich B liegen sämtliche Referenzkonzentrationen oberhalb von 70 mg/dL , eine Hypoglykämie ist daher auszuschließen. Konzentrationsbestimmungen in den Bereichen C, D und E zeigen erhebliche Abweichungen von den Referenzkonzentrationen; ohne erneute Glucosekonzentrationsbestimmung durch eine Referenzmethode führen Messwerte in diesen Bereichen zu erheblichen Stoffwechsellentgleisungen eines Patienten. Zu große Konzentrationen veranlassen das klinische Personal - oder bei der Blutzuckerselbstkontrolle mit Teststreifengeräten den Patienten selbst - zur Injektion von Insulin, was zu einer lebensbedrohlichen Hypoglykämie führen kann. Zu niedrige Konzentrationen verführen zu einer Einnahme von Kohlenhydraten und verursachen damit eine unerkannte Hyperglykämie.

Die Bestimmung der Wiederfindungsraten wurde erst in der zweiten Studie eingeführt; daher sind hier keine durchgängigen Konzentrationsbestimmungen der Blutglucose möglich. Ein Vergleich der Dialysat- mit den Blutglucosekonzentrationen zeigt jedoch, dass die Wiederfindungsraten bei den ersten beiden Probanden nahezu übereinstimmen. Eine PLS-Kalibrierung wurde mit den Roh-Spektren und den Blutglucose-Referenzkonzentrationen durchgeführt. Abb. 5.52 zeigt das CEG-Diagramm mit den Ergebnissen der leave-1-out Kreuzvalidierung. Die Unsicherheit bzgl. der Blutglucosekonzentrationen bei der optimalen Anzahl von Basisvektoren von 6 zur PLS-Matrix-Invertierung beträgt $\text{SEP} = 6.7 \text{ mg/dL}$.

5.5.2 Langzeitmessungen über 24 Stunden

Mit der Erfahrung der ersten Studie und einigen Verbesserungen des experimentellen Aufbaus wurde eine zweite Studie im September 2005 durchgeführt. Es sollte an zwei Probanden über jeweils 24 Stunden gemessen werden. An Stelle von Ringer- wurde ELO-MEL-Lösung als Perfusat verwendet, um die Mikro-Dialyse-Wiederfindungsraten bestimmen zu können. Die heizende Küvettentemperierung wurde gegen eine Peltier-Kühlung getauscht und die spektralen Messungen bei einer Küvettentemperatur von 19.6°C durchgeführt. Das Auftreten von Luftblasen konnte damit deutlich reduziert, aber nicht vollständig vermieden werden. Der Einbau des optischen Filters reduzierte die Basislinien-Driften auf ein Minimum, die durch die daraus resultierende Verbreiterung der Interferogramme hervorgerufenen Spektrometerabstürze wurden hier noch nicht automatisch, sondern manuell korrigiert.

Die erste Probandin bei dieser Studie musste verhältnismäßig häufig die Toilette aufsuchen, was jedes Mal erforderte, die Verbindung zwischen Schaltventil, Peristaltikpumpe und Dialysekatheter zu unterbrechen. Die zeitliche Korrelation zwischen Konzentrations- und Messwerten war dadurch stark gestört, so dass zu wenige Referenzwerte vorlagen, um sie für eine Auswertung zu verwenden. Diese Schwierigkeiten wurden beim zweiten Probanden vermieden, indem die Minipuls 3 Peristaltikpumpe durch eine tragbare Mini-Peristaltikpumpe ersetzt wurde¹². Bei Verwendung dieser Pumpe konnte der Proband das Bett verlassen, ohne den Perfusat- und Dialysat-Fluss zu unterbrechen. Die in den Pausen des Dialysat-Flusses gemessenen spektralen Daten wurden eliminiert, jedoch blieb die zeitliche Korrelation der Spektren zu den Blutglucose-Referenzkonzentrationen erhalten.

Das Verhalten der Fluidik hängt stark vom Gegendruck des Schaltventils, der Kapillaren und der Küvette ab. Während der CM8-Studie kam es zu einer partiellen Verstopfung, die die Fluidik störte. Das Problem wurde erst nach einer Messzeit von etwa 20 Stunden erkannt und dann durch Auswechseln der Küvette gelöst. Einige der spektralen Daten mussten daher als Ausreißer entfernt werden. Die verstopfte Fluidik führte zu einem erhöhten Druck im System, was die Küvettendicke und damit die Wasserextinktion vergrößerte, welches an den übermäßigen Basislinien-Schwankungen der Extinktionsspektren erkennbar war. Außerdem verschob sich der Zeitpunkt maximaler Konzentration in der Küvette durch die erniedrigte Flussrate; dadurch war bei der ersten Probenmessung das Konzentrationsmaximum noch nicht erreicht. In diesem Fall konnten nur die Daten der zweiten Probenmessung ausgewertet werden. Um die spektralen Ausreißer zu ermitteln, wurden Extinktionsspektren aller vier Kombinationsmöglichkeiten der jeweils zwei Proben- und Referenz-Einkanalspektren berechnet. Abb. 5.53 zeigt den Mittelwert und das Maximum der Extinktion bei 1360 cm^{-1} , dem Maximum der Hydrogencarbonat-Bande. Zur Auswertung wurde wahlweise das Mittelwert-Spektrum der beiden Messungen oder das Spektrum mit maximaler Hydrogencarbonat-Extinktion gewählt, mit dem Ziel einen möglichst stetigen Verlauf der Hydrogencarbonat-Konzentrationsbestimmung zu erzielen; sprunghafte Änderungen sind im Dialysat eines Menschen nicht zu erwarten.

¹²Diese batteriebetriebene Pumpe wurde von Manfred Bodenlenz im Rahmen seiner Arbeit am ZMF in Graz entwickelt (Joanneum Research, Graz, Österreich).

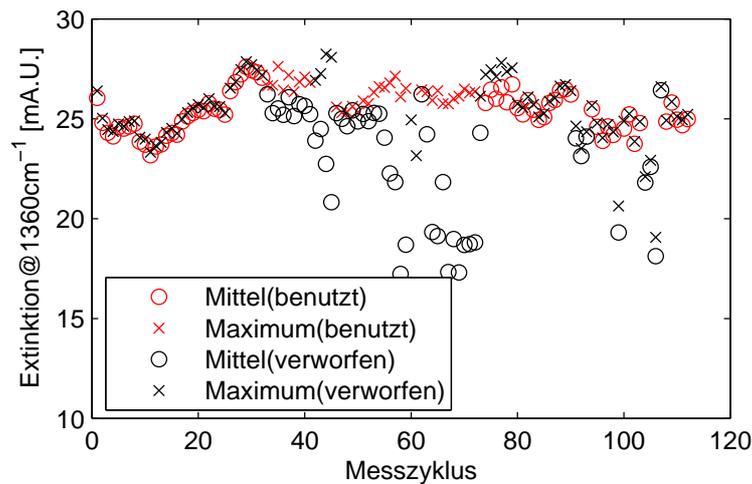


Abb. 5.53: Ausreißerererkennung der Spektren der CM8-Studie (siehe Text).

Messzyklen mit erheblicher Abweichung vom stetigen Verlauf wurden verworfen. Hiermit kann ein zusätzlicher Funktionstest vorgenommen werden, um die Zuverlässigkeit der Spektrenmessungen weiter zu erhöhen.

Auf die verbleibenden Extinktionsspektren wurde das physikalische Kalibrationsmodell angewandt. Dieses bestand aus den Spektren von Glucose, Hydrogencarbonat, Phosphat, Lactat, Sulfat ELO-MEL-Lösung, Harnstoff, Ringer-Lösung, CO_3^{2-} und einem konstanten Basislinien-Versatz. Außerdem wurde die Temperaturabhängigkeit der Acetat-Banden durch Hinzunahme des Eigenschaftskorrelationsspektrums berücksichtigt und ebenso die Schwankungen der Raumluftfeuchtigkeit durch ein Spektrum atmosphärischen Wasserdampfes. Wegen der durch die Fluidik bedingten Diffusionsprozesse ist die Konzentration in der Küvette kleiner als im kontinuierlich gewonnenen Dialysat. Im Anschluss an die Studie wurde an Stelle des Dialysats wässrige Glucoselösung mit $c = 180 \text{ mg/dL}$ gemessen. Daraus ergab sich ein Skalierungsfaktor von $1/0.90$; um diesen Faktor wurden die Spektren vor der Auswertung korrigiert. Abb. 5.54 zeigt die Glucosekonzentrationen geteilt durch die ebenfalls abgebildeten Wiederfindungsraten. Diese wurden mit dem nicht-linearen Modell aus Gl. (5.27) berechnet. Für das Verhältnis der Diffusionskonstanten wurde dabei der Mittelwert der Wiederfindungsraten-Messungen der EDTA-Blutplasma- und Serum-Proben verwendet (siehe Kap. 5.3.4). Dieser ergab sich zu $V = 1.23$. Der Blutglucoseverlauf des Probanden wird gut wiedergegeben, sämtliche Anstiege und Abfälle sind in den IR-spektrometrisch quantifizierten Konzentrationen zu erkennen. Dies wird vom CEG-Diagramm in der oberen Hälfte der Abbildung bestätigt; bis auf zwei Datenpunkte in der B-Zone liegen sämtliche Ergebnisse im Bereich A. Interessant sind die veränderlichen Wiederfindungsraten, deren Verwendung eine verbesserte Korrelation der mit dem IR-Sensor erhaltenen Glucosekonzentrationswerten zu den Blutwerten ergibt. Dies ist ein wesentlicher Vorteil gegenüber einparametrischen Biosensoren, die keine Wiederfindungsraten-Anpassung der Messwerte ermöglichen.

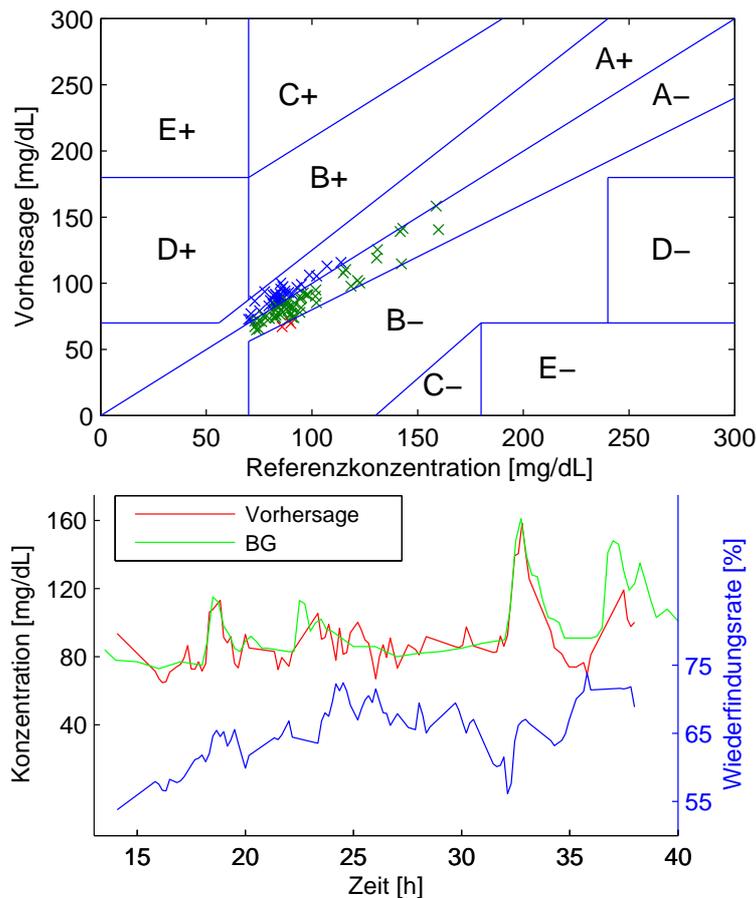


Abb. 5.54: CM8-Studie, Proband 2: CEG-Diagramm und Zeitabhängigkeit der mit den Wiederfindungsraten korrigierten Messergebnisse der Blutglucosekonzentrationen mit Hilfe des physikalischen Modells.

5.5.3 Studien mit Diabetikern vom Typ 1

Eine dritte Messkampagne - der erste Teil der CM9-Studie - wurde im Februar 2006 durchgeführt. Aufgrund der Erfahrungen in der CM8-Studie wurde die Mini-Peristaltikpumpe in der Mechanikwerkstatt des ISAS nachgebaut und bei der Studie verwendet. Abb. 5.55 zeigt Fotos von der Pumpe. Vier Zylinder sind quadratisch angeordnet in einem Block angebracht, der auf die Achse eines Getriebes mit zugehörigem Motor¹³ geschraubt ist. Der Motor dreht den Block, wodurch die Zylinder nacheinander die Tygon[®]-Kapillaren zusammenquetschen und damit die Flüssigkeit befördern. Die Flussrate hinter dem Schaltventil in Abb. 5.56 wurde mit dem Flusssensor (FLG 1430 von Sensirion) während einer in-vitro Messung hinter dem Schaltventil aufgenommen.

Eine Umdrehungsrate von etwa 1.5 Umdrehungen pro Minute entspricht bei dem gegebenen Innendurchmesser der Kapillaren von 0.19 mm einer Flussrate von etwa 1 $\mu\text{L}/\text{min}$.

¹³Faulhaber, Schönaich (www.faulhaber.de): Motor 1516E, Stirnradgetriebe Serie 15/5, Übersetzungsverhältnis 5752:1.

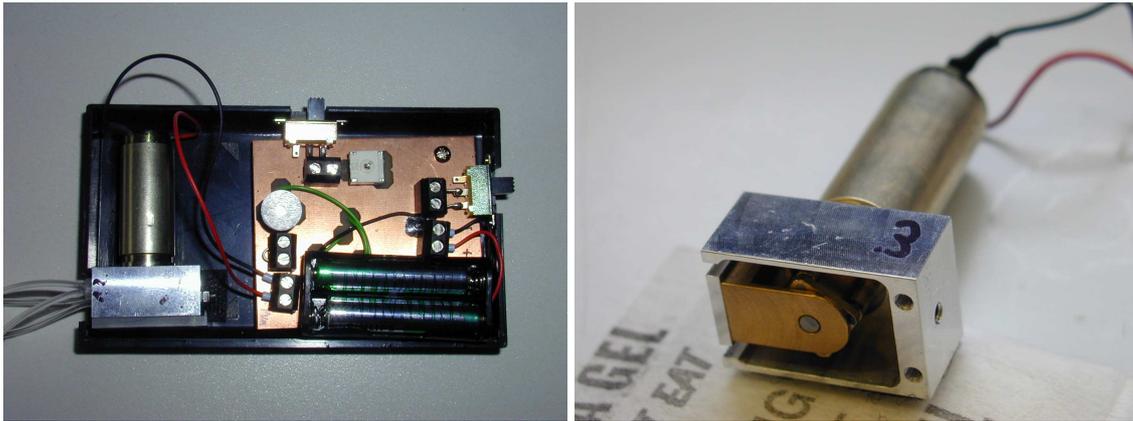


Abb. 5.55: Fotos der Mini-Peristaltikpumpe.

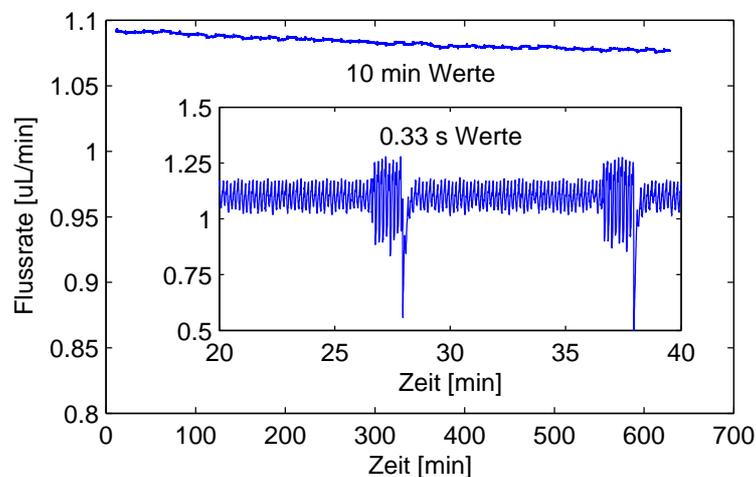


Abb. 5.56: Flussraten der Mini-Peristaltikpumpe.

Diese oszilliert mit einer Frequenz von 0.1 Hz , alle 10 s quetscht ein anderer Zylinder die Tygon[®]-Kapillaren. Die Amplituden dieser Fluktuationen schwanken im zehnmütigen Rhythmus. Sie werden kleiner, wenn sich der Gegendruck durch das Hinzuschalten der Probenschleife im Load-Modus des Schaltventils erhöht. Der Langzeitmittelwert mit einer Zeitkonstanten von 10 Minuten zeigt eine sehr konstante Flussrate, so dass die vollständige Befüllung der Probenschleife immer gewährleistet ist. Leichte Driften werden durch eine Dehnung der Tygon[®]-Kapillaren verursacht, durch die sich der Innendurchmesser und damit dann das Transportvolumen ändert.

Wichtig im Push/Pull-Betrieb der Peristaltikpumpe ist, dass die Flussrate in Richtung Dialysekatheter mit der Flussrate zum Schaltventil übereinstimmt. Ansonsten kommt es zu einem Über- oder Unterdruck im Katheter; bei letzterem werden Luftblasen an den Anschlüssen der Kapillaren und im Dialysekatheter eingesaugt und zur Küvette befördert. Die Tygon[®]-Kapillaren werden vom Hersteller auf Rollen in 30 m -Einheiten geliefert. Der Innendurchmesser hängt vom Abschnitt auf einer Rolle und von der gelieferten Char-

ge ab. Die Experimente im Labor zeigten Flussratenvariationen von 0.9 bis 1.6 $\mu\text{L}/\text{min}$, bei identischer Rotationsgeschwindigkeit der Pumpe, aber unterschiedlichen verwendeten Schläuchen. Daher wurden bei den bisherigen Studien die in der Peristaltikpumpe verwendeten Kapillaren vom technischen Personal des ZMF so ausgewählt, dass sie immer direkt nacheinander von einer Rolle abgeschnitten wurden, um die Unterschiede im Innendurchmesser zu minimieren.

Beim ersten Probanden der CM9-Studie entstanden trotz der Küvettentemperierung auf 17.6°C kontinuierlich Luftblasen in den Tygon[®]-Kapillaren. Diese führten zu häufigen Ausfällen der Messung. Nach der Studie wurde die Flussrate der beiden verwendeten Tygon[®]-Kapillaren gravimetrisch nachgemessen, die Flussraten waren 1.13 $\mu\text{L}/\text{min}$ in Richtung Dialysekatheter und 1.32 $\mu\text{L}/\text{min}$ in Richtung Schaltventil. Der daraus resultierende Unterdruck im Dialysekatheter führte zu den - die Messung störenden - Luftblasen. Eine Nachfrage beim zuständigen Personal der Klinik ergab, dass die Anleitung zur Auswahl der Schläuche bei der Vorbereitung zu dieser Studie nicht eingehalten wurde. Daraus resultierten die Diskrepanzen in den Innendurchmessern und damit in der Flussrate, die als Ursache für das verstärkte Auftreten der Luftblasen erkannt wurden.

Das Auftreten von Luftblasen ist immer mit einem Messausfall von einigen Minuten verbunden, in denen die Software (WinTest) durch pulsierendes Pumpen mit der Spritzenpumpe automatisch die Luftblasen entfernt. Dies geschieht durch rhythmisches Pumpen mit der Spritzenpumpe durch die Küvette, dabei wird die dahinter gesammelte Probe mit einer unbekannt Menge von Ringer-Lösung verdünnt und kann nicht mehr für Referenzmessungen verwendet werden. Beim ersten Probanden liegen aus diesem Grund nur die Blutglucose-Referenzwerte des Beckman-Analyseautomaten vor. Abb. 5.57 zeigt die wie bei der CM8-Studie mit dem physikalischen Modell ermittelten Wiederfindungsraten und die damit korrigierten Glucosekonzentrationen. Der diffusionsbedingte Korrekturfaktor betrug hier 1/0.93. Die IR-spektrometrisch bestimmten Konzentrationen stimmen wie bei der CM8-Studie gut mit den Referenzkonzentrationen überein, wie auch im CEG-Diagramm zu sehen ist. Auch hier sind nur zwei der insgesamt 83 Messwerte in der Zone B, alle übrigen im Bereich A. Die mit dem physikalischen Modell ermittelte spektrale Zusammensetzung wird beispielhaft für das Spektrum mit der größten Glucosekonzentration in Abb. 5.58 dargestellt.

Dieselbe Auswertung wurde mit den Daten des zweiten Probanden durchgeführt. Wie auch beim ersten Probanden wurden die Blutglucosekonzentrationen mit Hilfe des physikalischen Kalibrationsmodells vorhergesagt, wobei Abb. 5.59 die zugehörigen Resultate zeigt. Die IR-spektrometrisch bestimmten Konzentrationen sind in den ersten Stunden nach der Implantierung des Dialysekatheters deutlich zu klein, was vermutlich an der Stoffwechselreaktion des verletzten Hautgewebes auf die implantierte Mikro-Dialysesonde liegt. Zu ähnlichen Ergebnissen kommen auch andere Autoren, siehe [86]. Die zugehörigen Daten wurden im CEG-Diagramm als Ausreißer entfernt. Die übrigen Werte liegen ausschließlich in der Zone A.

Zusätzlich zu den Blutglucosekonzentrationen liegen im Gegensatz zum ersten Probanden auch Referenzkonzentrationen von Lactat und Glucose der hinter der Küvette gesam-

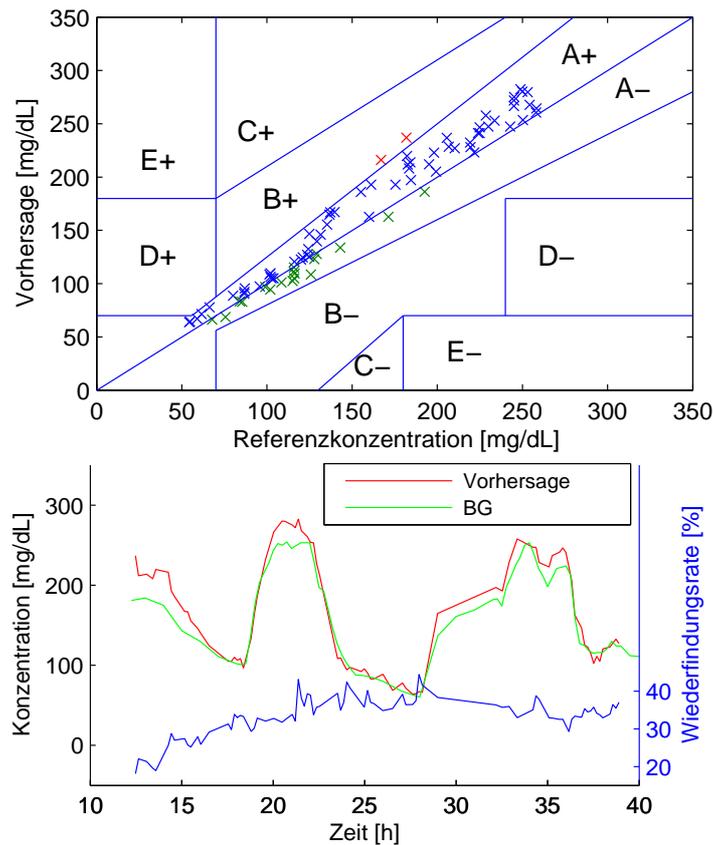


Abb. 5.57: CM9-Studie, Proband 1: CEG-Diagramm und Zeitabhängigkeit der mit den Wiederfindungsraten korrigierten Messergebnisse der Blutglucosekonzentrationen mit Hilfe des physikalischen Modells.

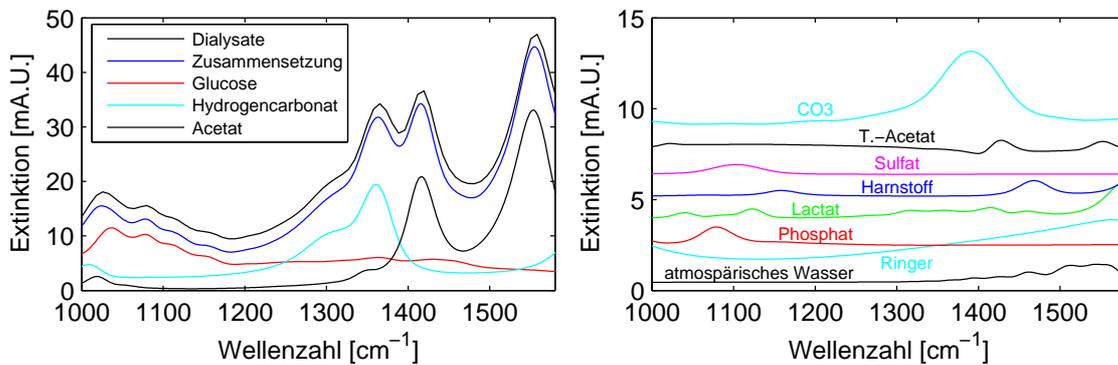


Abb. 5.58: CM9-Studie, Proband 1: Zusammensetzung des Dialysat-Extinktionsspektrums mit den größten Glucosekonzentrationen. Die mit dem physikalischen Modell ermittelten Konzentrationen betragen für Glucose (114 mg/dL), Harnstoff (14 mg/dL), Hydrogencarbonat (95 mg/dL), Phosphat (3.3 mg/dL), Lactat (12 mg/dL), Acetat (122 mg/dL) und Sulfat (1.5 mg/dL). Der nicht abgebildete Basislinien-Versatz betrug 0.6 mA.U.

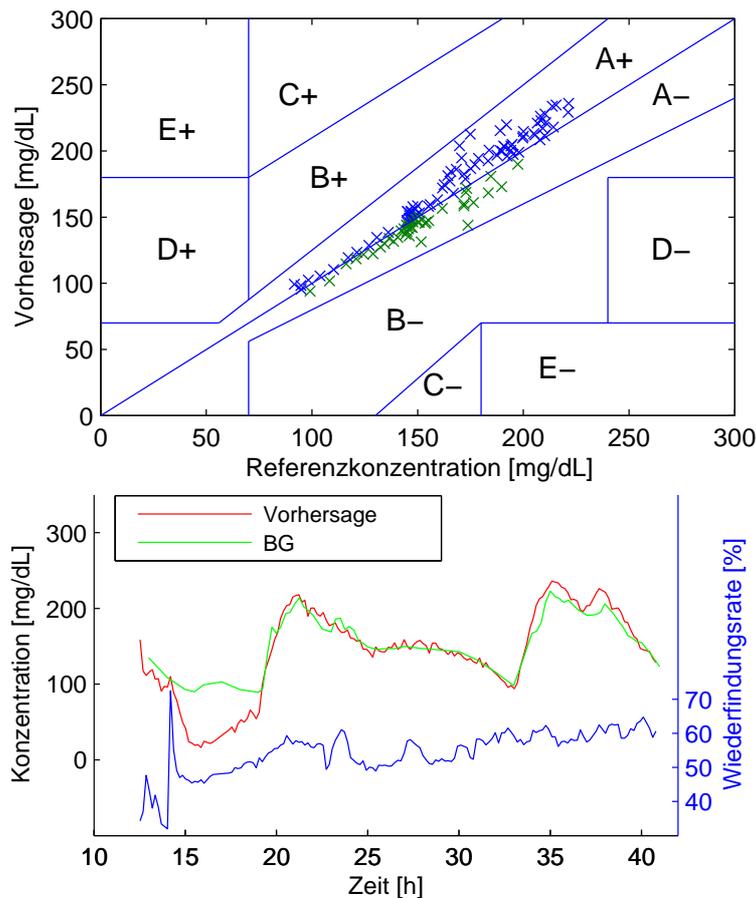


Abb. 5.59: CM9-Studie, Proband 2: CEG-Diagramm und Zeitabhängigkeit der mit den Wiederfindungsraten korrigierten Messergebnisse der Blutglucosekonzentrationen mit Hilfe des physikalischen Modells.

melten verdünnten Dialysat-Proben vor. Um diese Konzentrationen mit den Ergebnissen des physikalischen Modells vergleichen zu können, musste der Verdünnungsfaktor experimentell ermittelt werden. Dazu wurde im Anschluss an die Studie wässrige Glucoselösung ($c = 180 \text{ mg/dL}$) mit unverändertem Aufbau gemessen. Die dabei gesammelten Proben wurden zusammen mit den Dialysaten vom klinisch-chemischen Labor des ZMF analysiert. Aus den Referenzkonzentrationen der verdünnten wässrigen Glucoselösung wurde der Verdünnungsfaktor zu 3.84 ± 0.06 berechnet und die Referenzwerte damit skaliert.

Zur Konzentrationsbestimmung der Glucose verwendet das Labor die enzymatische Hexokinase-Referenzmethode (siehe Kap. 5.3.1). Zur Bestimmung von Lactat wird eine enzymatische Reaktionskaskade mit anschließender photometrischer Detektion verwendet. Lactat wird in einem ersten Schritt mit Sauerstoff über die Lactat-Oxidase zu Pyruvat und Wasserstoffperoxyd umgesetzt. Im zweiten Schritt wird das so entstandene Wasserstoffperoxyd mit einem Wasserstoffdonor und 4-Aminoantipyrin über die Peroxidase zu einem Chromophor und Wasser umgesetzt. Dieser Farbstoff wird photometrisch

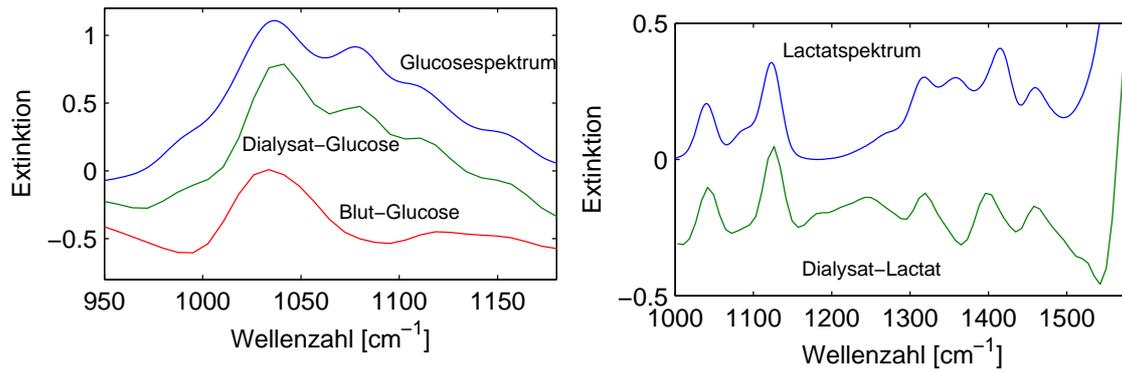


Abb. 5.60: Skalierte PLS-Regressionsvektoren mit Dialysat- bzw. Blutglucose-Referenzkonzentrationen (jeweils Rang=2) und Dialysat-Referenzkonzentrationen von Lactat (Rang=4).

bei 550 nm vermessen. Dessen gebildete Menge ist dem Lactat-Gehalt in der Probe direkt proportional.

Abb. 5.60 zeigt die mittels PLS-Kalibrierung aus den spektralen Daten und den Referenzkonzentrationen errechneten Regressionsvektoren und die Extinktionsspektren der Reinstoffe in wässriger Lösung. Bei Glucose ist zusätzlich der Regressionsvektor bei Verwendung der Blutglucose-Referenzwerte abgebildet. Die Banden des Glucosespektrums stimmen deutlich mit dem aus den Dialysat-Referenzwerten ermittelten Regressionsvektor überein. Bei Verwendung der Blutglucose-Referenzwerte liegt die Übereinstimmung nur in der Bande bei 1034 cm^{-1} , was die Probleme nicht-konstanter Wiederfindungsraten aufzeigt.

Trotz der niedrigen Lactat-Konzentrationen ist auch bei dem relativ schlechten S/R-Verhältnis der Messungen mit dem IR200 eine deutliche Übereinstimmung zwischen Lactat-Spektrum und Regressionsvektor zu beobachten. Die absoluten Unsicherheiten bei Verwendung der Kreuzvalidierung sind kleiner als bei Verwendung der Glucose-Referenzwerte. Abb. 5.61 zeigt die *Scatterplots* und den SEP-Wert als Funktion der Anzahl der PLS-Faktoren. Das optimale PLS-Modell wurde für die Ränge 3 (7) für Glucose (Lactat) für einen spektralen Bereich von $950\text{ bis }1180\text{ cm}^{-1}$ ($1000\text{ bis }1580\text{ cm}^{-1}$) erhalten. Der bei der Bestimmung des Lactats für geringste SEP-Werte benötigte Rang ist deutlich größer als im Falle der Glucose. Mehrfach durchgeführte Kreuzvalidierungen mit einer Blockgröße von leave-10-rnd-out lieferten ähnlich gute Werte ($\text{SEP}=2.3 \pm 0.1$), die sich jedoch deutlich zu einem $\text{SEP}=2.7\text{ mg/dL}$ verschlechtern, wenn die ursprüngliche Reihenfolge der Spektren beibehalten wird (leave-10-out). Dieselbe Rechnung wurde für Glucose durchgeführt, auch hier sind die SEP-Werte für leave-10-rnd-out ähnlich wie beim leave-1-out ($\text{SEP}=9.1 \pm 0.1\text{ mg/dL}$), und beim leave-10-out mit unveränderter Reihenfolge der Spektren ergab sich ein SEP-Wert von 12.4 mg/dL .

Die Quantifizierungen der Lactat- und Glucosekonzentrationen im Dialysat wurden auch mit dem physikalischen Modell berechnet. Die Ergebnisse sind in Abb. 5.62 dargestellt. Der SEP-Wert für die Glucosekonzentrationsbestimmung ist mit 10.5 mg/dL nur

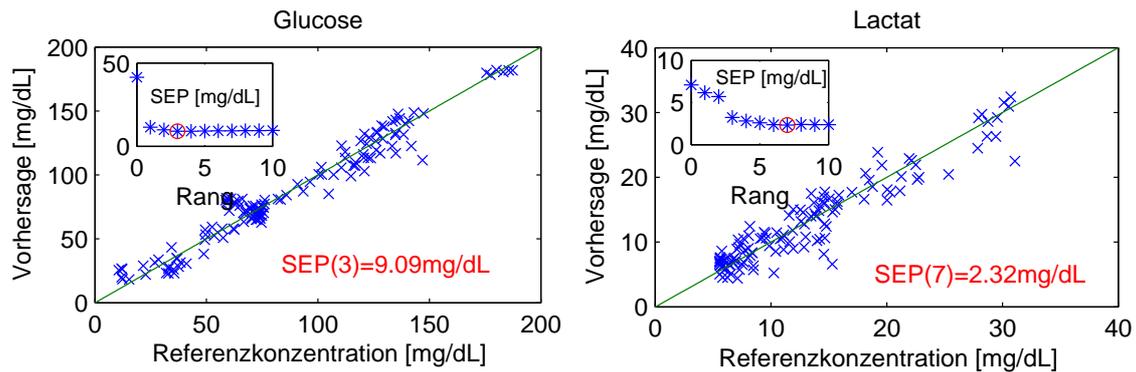


Abb. 5.61: CM9, Proband 2: PLS-Kreuzvalidierung mit den Glucose- und Lactat-Referenzwerten der Dialysat-Proben. Mit dem optimalen PLS-Kalibrationsmodell erhaltene *Scatterplots* der Glucose- und Harnstoff-Konzentrationsbestimmungen sowie im Einsetz die Abhängigkeit des SEP-Wertes von der Anzahl der Basisvektoren, die bei der Invertierung der Spektrenmatrix verwendet wurden.

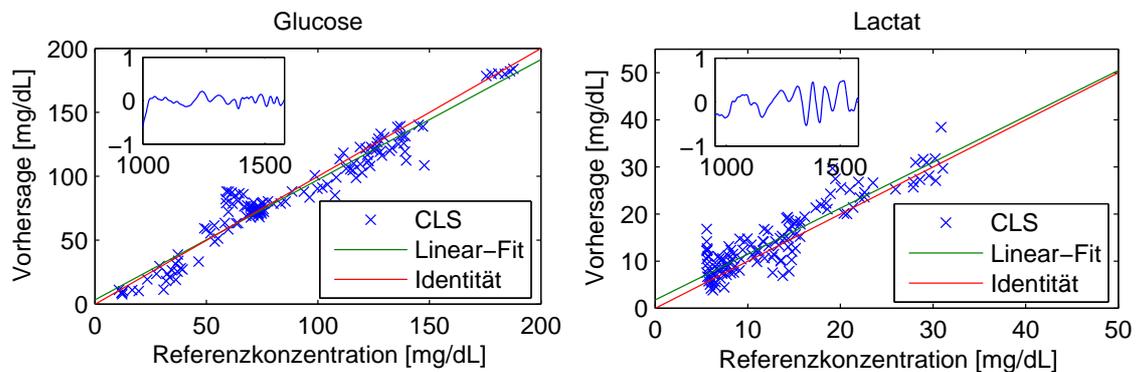


Abb. 5.62: CM9, Proband 2: Konzentrationsbestimmungen und Mittelwert der Residuen-Spektren [m.A.U.] bei Anwendung des physikalischen Kalibrationsmodells für Glucose und Lactat.

geringfügig schlechter als bei Anwendung der PLS-Kalibrierung. Die absoluten Fehler ähneln denen, die bei der Bestimmung der Blutglucosekonzentration erhalten wurden. Die relativen Fehler der Quantifizierung der Blutglucosekonzentration sind wegen der Skalierung durch die Wiederfindungsraten-Korrektur kleiner. Ein Grund dafür ist das Sammeln der Probe hinter der Transmissionsküvette: Zum einen gestaltet sich die Handhabung der geringen Probenmengen als schwierig, zum anderen schwankt das Volumen mit dem die Probenschleife befüllt wird u.a. mit der Flussrate der Peristaltikpumpe. Das Konzentrationsmaximum in der Küvette wird schon erreicht, wenn die Probenschleife nicht vollständig befüllt wird. Dann ist jedoch das Verhältnis zwischen Probenvolumen in der Probenschleife und Transportvolumen nicht mehr konstant. Die spektrometrisch ermittelte Konzentration ist dann genauer als das Ergebnis der Referenzanalytik.

Die Konzentrationsbestimmungen des Lactats bei Anwendung der CLS-Kalibrierung waren gegenüber der Identitätslinie um etwa 15 mg/dL verschoben. dies wird von

Querempfindlichkeiten im physikalischen Modell verursacht. Der SEP-Wert der um den Versatz korrigierten Werte beträgt 3.3 mg/dL . Eine Erweiterung des Wellenzahlbereiches auf 950 bis 1580 cm^{-1} und das gleichzeitige Herausnehmen des Spektrums atmosphärischen Wassers aus dem Modell reduzierte die Verschiebung der Lactat-Konzentrationsbestimmungen auf 1.4 mg/dL , führt jedoch zu einem geringfügig größeren SEP-Wert von 3.8 mg/dL . Ein Grund für die konstante Verschiebung der IR-spektrometrischen Konzentrationsbestimmung ist die starke Absorptionsbande des Lactats bei 1580 cm^{-1} , die sich mit Banden des atmosphärischen Wassers in diesem Bereich überschneidet. Außerdem hat das im Modell verwendete Spektrum der Ringer-Lösung spektrale Anteile unter 1000 und um 1570 cm^{-1} , die möglicherweise die Abhängigkeit der Verschiebung der Lactat-Konzentrationen bei einer Erweiterung des Wellenzahlbereiches verursachen.

Die Konzentrationsbestimmungen von Lactat sind interessant für die Anwendung des IR-Sensors in der klinischen Praxis. Erhöhte Lactat-Konzentrationen im Interstitium zeigen Stoffwechsellstörungen eines Patienten und sind neben der Glucosekonzentration wichtige Indikatoren, die dem medizinischen Personal damit zur Verfügung stehen. Die Verschiebung der Lactat-Konzentrationsbestimmungen je nach Anpassung der Parameter des physikalischen Modells müssen jedoch vor einer Anwendung genauer untersucht werden. Abb. 5.63 zeigt den zeitlichen Verlauf der Lactat-Konzentration und die Konzentrationsbestimmungen der PLS- und CLS-Kalibrierungen. Die physiologischen Konzentrationen des Lactats im Blut eines Erwachsenen liegen etwa bei 10 mg/dL , die hohen Konzentrationen existieren in den hier gemessenen Dialysaten nur zu Beginn der Messung nach Einsetzen des Mikro-Dialysekatheters, was nach [86] durch die physiologischen Prozesse nach direkter Wundenbildung verursacht wird.

Im Juni 2006 wurde der zweite Teil der CM9-Studie durchgeführt, wobei auch hier an zwei Probanden mit Diabetes vom Typ 1 gemessen wurde. Die Daten des ersten Pro-

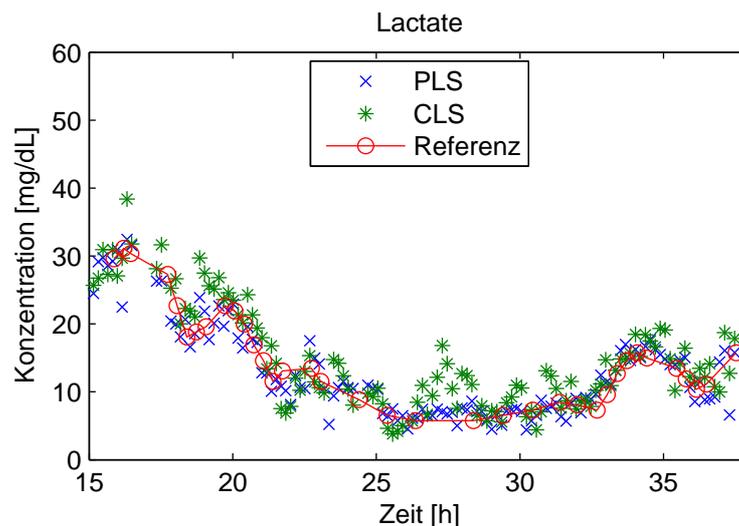


Abb. 5.63: CM9, Proband 2: Zeitlicher Verlauf der Lactat-Konzentration in den Dialysaten.

banden waren wegen massiver Probleme mit dem fluidischen Aufbau nicht zu verwerten. Nach kurzen Erfolgen kam es immer wieder zu einem Ausfall des Probentransportsystems. Ursache war ein defektes Fitting zwischen dem Schaltventil und der Küvette. Dieses Problem wurde erst während der Messungen am zweiten Probanden erkannt und erfolgreich gelöst. Daher wurde die Bestimmung der diffusionsbedingten Verdünnung erst nach den Messungen am Probanden durchgeführt, was einen Faktor von $1/0.89$ ergab. Die Küvettentemperatur wurde bei dieser Studie wegen der relativ hohen Raumtemperatur von etwa 25°C nur auf 20°C eingestellt; bei einer stärkeren Kühlung besteht die Gefahr einer Kondensation der Luftfeuchtigkeit auf den Küvettenfenstern. Die Daten wurden wie bei den bisherigen Studien ausgewertet und deren Ergebnisse in Abb. 5.64 dargestellt. Bei Verwendung eines Diffusionskoeffizienten-Verhältnisses von $V = 1.23$ und des gemessenen Verdünnungsfaktors liegen sämtliche Datenpunkte in der Zone A des CEG-Diagramms; die Blutglucosekonzentrationen des Probanden werden hervorragend übereinstimmend mit den IR-Sensordaten wiedergegeben.

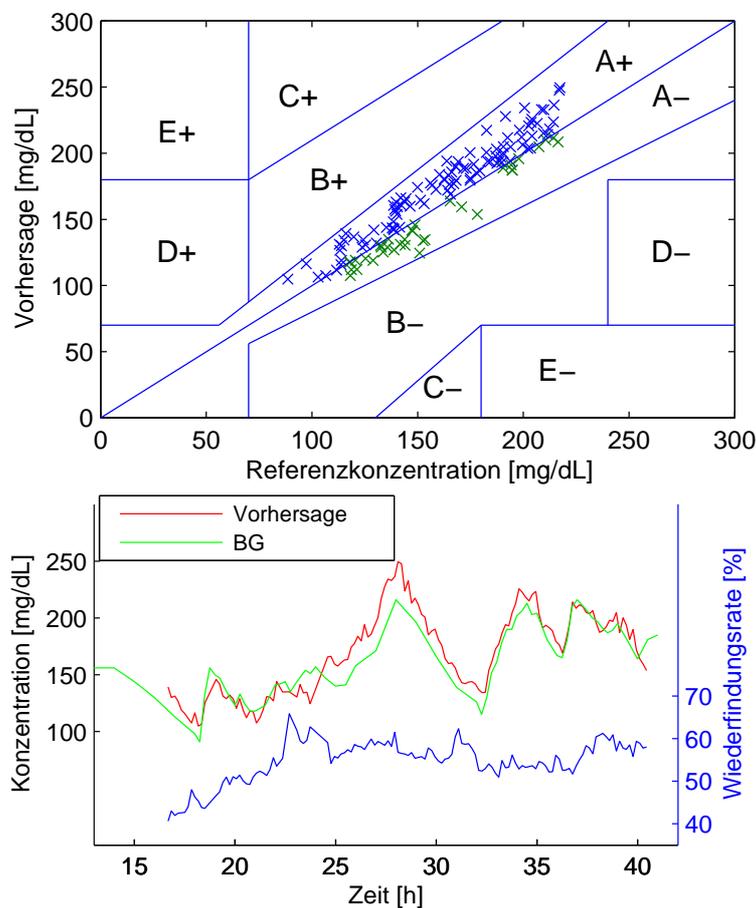


Abb. 5.64: CM9-Studie, Proband 4: CEG-Diagramm und Zeitabhängigkeit der mit den Wiederfindungsraten korrigierten Messergebnisse der Blutglucosekonzentrationen mit Hilfe des physikalischen Modells.

5.6 Zusammenfassung und Vergleich der Studien

Bei den letzten drei der insgesamt vier Studien wurde eine gleichzeitige Wiederfindungsraten-Bestimmung verwendet, um von den Dialysatkonzentrationen auf verbesserte Blutglucosekonzentrationsschätzungen zu schließen. In Tab. 5.9 sind die Abweichungen dieser Bestimmungen von den venösen Blutglucosekonzentrationswerten für die vier Probanden aufgeführt. Hierfür wurden die mit der klinisch-chemischen Referenzmethode erhaltenen Blutglucosekonzentrationen, die im allgemeinen nur viertel- bzw. halbstündlich vorlagen, genutzt. Für die letztgenannten Daten musste eine Interpolation durch Spline-Funktionen vorgenommen werden, um an die Zeiten der spektralen Datenaufnahme anzuknüpfen. Dabei wurde auch der zeitliche Versatz, der zwischen der Probennahme im Mikro-Dialysekatheter und der Messung in der Küvette lag, berücksichtigt.

Die IR-spektrometrischen Blutglucosekonzentrations-Vorhersagen wurden auf zwei unterschiedliche Arten berechnet. Zunächst wurden diese ohne eine Nachkalibrierung berechnet. Dabei wurde das aus den Wiederfindungsraten-Messungen ermittelte Verhältnis der Diffusionskoeffizienten für die nichtlineare Korrektur aus Gl. (5.27) verwendet. Der durch den Probentransport verursachte, diffusionsbedingte Verdünnungsfaktor wurde jeweils durch eine in-vitro Messung mit einer wässrigen Glucose-Kalibrationslösung bestimmt. Dieser Verdünnungsfaktor korrigiert ebenfalls Schwankungen in der Schichtdicke der Küvette. Die Steigung der an die Daten im CEG-Diagramm angepassten Geraden stimmt bei den vier Datensätzen nicht exakt mit der Identitätsgeraden überein. Die Daten können *a posteriori* über eine Variation des diffusionsbedingten Verdünnungsfaktors angepasst werden. Dieser wurde jeweils so optimiert, dass die Daten auf der Identitätsgeraden liegen. Die sich daraus ergebenden SEP-Werte sind ebenfalls in der letzten Spalte der Tabelle enthalten.

Beim ersten Probanden der CM9-Studie lag durch die Unterschiede in den Perfusat-Flussraten im Zu- und Ablauf des Mikro-Dialysekatheters ein Unterdruck vor. Dieser

Proband	Std. Abw. (N) BG [mg/dL]	CEG- n_A (f_{exp})	CEG- n_A (f_{opt})	SEP (f_{exp}) [mg/dL]	SEP (f_{opt}) [mg/dL]
CM8.2	18.9 (89)	87	88	9.8 (0.90)	9.2 (0.875)
CM9.1	60.2 (83)	81	83	18.0 (0.93)	10.8 (0.955)
CM9.2	30.9 (120)	120	120	10.7 (0.93)	9.8 (0.945)
CM9.3	32.6 (134)	134	133	15.0 (0.89)	11.6 (0.92)

Tab. 5.9: Zusammenfassung der IR-spektrometrischen Ergebnisse aller Studien mit Wiederfindungsraten-Messung im Vergleich zu den venösen Blutglucosekonzentrationen (zu den Details siehe Text). Angegeben sind die Standardabweichung der Blutglucose-Referenzkonzentrationen, Anzahl der Messwerte (N), die Verteilung derselben auf die Zone A des CEG-Diagramms (übrige Werte in Zone B) und die SEP-Werte ohne Nachkalibrierung mit in-vitro gemessenem diffusionsbedingtem Verdünnungsfaktor (f_{exp}) bzw. mit über eine lineare Regression optimiertem Faktora (f_{opt}).

verstärkte die Diffusion in Richtung Dialysat und schwächte die Diffusion des Acetats aus dem Perfusat in das Interstitium des Hautgewebes. Dies führte zu einer größeren Wiederfindungsrate für die Glucose und einer kleineren für das Acetat. Daraus resultierte ein niedrigerer Wert für das Verhältnis der Diffusionskoeffizienten ($V = \frac{D_{Acet}}{D}$) und daraus der relativ große angepasste Wert von $f_{opt} = 0.955$. Die optimierten Faktoren für die Anpassung der diffusionsbedingten Verdünnung der Probe weichen auch bei den anderen Messungen um etwa 2.5% von den gemessenen Werten ab. Diese Schwankungen sind größer als die von den durch die Fluidik verursachten Fehlern zu erwarten sind. Es können jedoch Langzeitdriften auftreten, die z.B. durch Temperaturänderungen in der Klinik verursacht werden. Beim zweiten Probanden des zweiten Teils der CM9-Studie wurden die Fehler der Fluidik erst mitten in der Studie durch den Austausch des defekten Fittings korrigiert. In diesem provisorischen Aufbau sank der Wert für den Verdünnungsfaktor langsam ab. Dies ist daran zu erkennen, dass die IR-spektrometrisch bestimmten Konzentrationen zunächst deutlich über den Blutglucosekonzentrationen lagen und sich zum Ende der Messung langsam dem wahren Wert annäherte. Der nach der Studie gemessene Verdünnungsfaktor von 0.89 ist damit wahrscheinlich zu niedrig geschätzt worden.

Ebenfalls in der Tabelle angegeben ist die Verteilung der Konzentrationsbestimmungen auf die einzelnen Zonen des CEG-Diagramms. Selbst ohne Nachkalibrierung der Messungen lagen nur 4 der insgesamt 426 Datenpunkte in der Zone B des CEG-Diagramms; alle übrigen in der Zone A. Abb. 5.65 zeigt den zugehörigen CEG als Zusammenfassung der Ergebnisse aller Studien. Dies konnte durch Anpassung des Verdünnungsfaktors nur wenig verbessert werden. Die Unsicherheiten liegen um 10 mg/dL . Der Wert für den ersten Probanden der CM9-Studie fällt hier - ohne Nachkalibrierung - ein wenig heraus. Ursache war der durch die Flussratendifferenz bedingte Unterdruck im Dialysekatheter und die damit fehlerbehaftete Wiederfindungsraten-Korrektur. Über das Verhältnis der Glucosekonzentration in der interstitiellen Flüssigkeit und im Blut wurde und wird in der Literatur weiterhin kontrovers diskutiert, z.B. [13, 159–165]. Glucosekonzentrationen

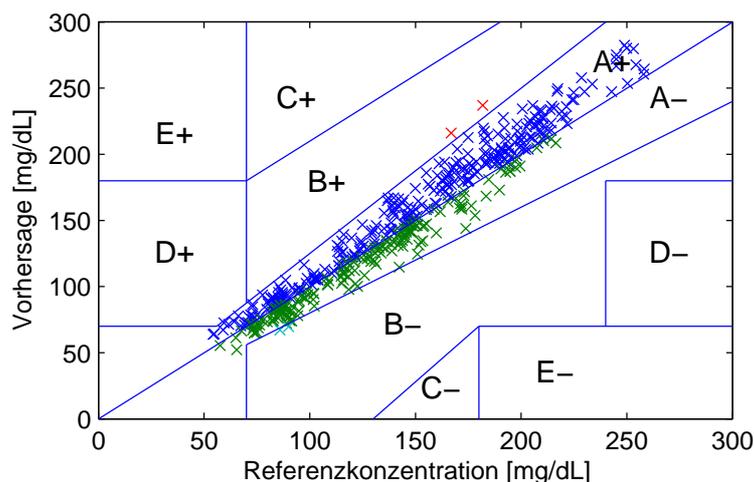


Abb. 5.65: CEG-Diagramm mit allen Blutglucosebestimmungen der vier Studien (Sechs Probanden, davon zwei Gesunde nach OGTT und drei Diabetiker vom Typ 1).

im Interstitium weichen je nach Messmethode und Proband um bis zu 20 % nach oben und unten von den Blutglucosekonzentrationen ab. Die Bestimmungen mit dem hier vorgestellten Aufbau zeigen ein Verhältnis, dass beinahe bei 100 % liegt; diese Ergebnisse sollten mit weiteren Studien überprüft werden.

Bei den mir bekannten Wiederfindungsraten-Bestimmungen anderer Sensorsysteme, die zur Untersuchung von Dialysaten verwendet werden, wird ein elektrolytfreies Perfusat verwendet. Dabei wird die Natriumionen-Konzentration im Interstitium als konstant angenommen und deren Konzentration im Dialysat durch eine Leitfähigkeitsmessung bestimmt. Aus diesen Messwerten wird über eine Skalierung direkt auf die Wiederfindungsrate der Glucose geschlossen und keine nichtlineare Anpassung vorgenommen. Der Diffusionskoeffizient der Natriumionen unterscheidet sich deutlich von dem der Glucose, so dass bei diesen Systemen eine Verbesserung in der Auswertung durch Verwendung einer nichtlinearen Anpassung erreicht werden kann. Wenn sich die Wiederfindungsrate nur wenig ändert, ist das Verhältnis zwischen der Wiederfindungsrate der Glucose und des Acetats bzw. hier der Na-Ionen im Rahmen der Messgenauigkeit linear. Eine Änderung von V führt nur zu einer Skalierung der Daten um einen - beinahe - von der Wiederfindungsrate unabhängigen Faktor. Da die elektrochemisch-enzymatischen Sensoren während der Messung ohnehin nachkalibriert werden müssen, spielt diese Korrektur also nur eine untergeordnete Rolle. Der Einfluss des durch die Unterschiede der Diffusionskoeffizienten hervorgerufenen, nichtlinearen Zusammenhangs gewinnt jedoch mit wachsender Varianz der Wiederfindungsrate an Bedeutung.

Bei der CLS-Kalibrierung aller Studien mit Wiederfindungsraten-Bestimmung wurde dieselbe Zusammensetzung des physikalischen Modells gewählt. Wie bereits oben dargelegt, bestand dieses aus den Spektren von Glucose, Hydrogencarbonat, Phosphat, Lactat, Sulfat ELO-MEL-Lösung, Harnstoff, Ringer-Lösung, CO_3^{2-} und einem konstanten Basislinien-Versatz. Bei Phosphat und Hydrogencarbonat wurde ein pH-Wert von pH=7.5 gewählt (Gründe hierfür liegen in den unterschiedlichen Ionenstärken der untersuchten Bioflüssigkeiten), bei allen übrigen pH=7. Außerdem wurde die Temperaturabhängigkeit der Acetat-Banden durch Hinzunahme des Eigenschaftskorrelationsspektrums und die Schwankungen der Raumluftfeuchtigkeit durch das Spektrum atmosphärischen Wassers berücksichtigt.

In der ohne Wiederfindungsraten-Messung durchgeführten CM6-Studie wurde das Acetat und dessen Temperaturabhängigkeit aus dem physikalischen Modell entfernt, um den daraus resultierenden Versatz von 5 mg/dL in den Glucosekonzentrationsbestimmungen zu eliminieren. In dieser Studie wurden die Spektren noch ohne optisches Filter aufgezeichnet. Um die Schwankungen der Basislinien zu berücksichtigen, wurde eine nichtlineare Basislinie zum Modell hinzugefügt. In den nach Abzug der verwendeten Komponentenspektren verbleibenden Residuen-Spektren sind einige systematische Bandenstrukturen zu erkennen, wie der Vergleich in Abb. 5.66 zeigt. Außerhalb des angepassten Bereiches von 1000 bis 1580 cm^{-1} (bzw. 1500 cm^{-1} bei den Daten der CM6-Studie) wachsen diese aufgrund der Einflüsse durch die Wasserextinktion stark an. Die verbleibende Struktur zwischen 1000 und 1150 cm^{-1} ist vermutlich auf Änderungen im Dissoziationsgleichgewicht des Phosphats zurückzuführen.

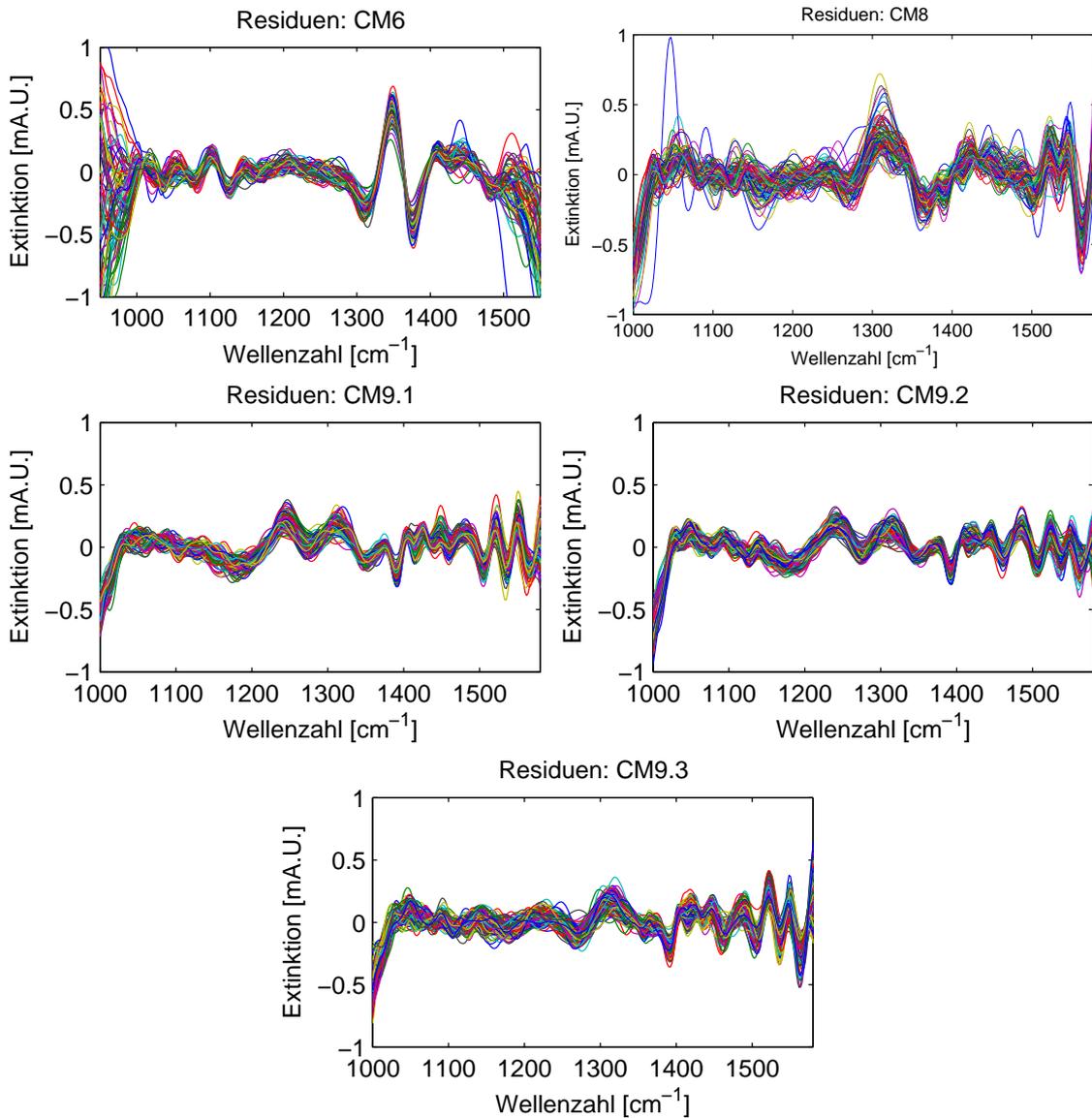


Abb. 5.66: Residuen der spektralen Daten aller klinischen Studien nach Anwendung des physikalischen Modells (CLS-Auswertung).

Die Messungen der CM6-Studie wurden mit einer verhältnismäßig hohen Küvetten-temperatur von 30°C gemessen; entsprechend groß sind die Residuen, die durch die Temperaturabhängigkeit der Absorptionsbanden hervorgerufen werden. Eine Hinzunahme des Eigenschaftskorrelationspektrum der temperaturabhängig gemessenen Glucose-spektren führt jedoch zu einer Verschiebung der Konzentrationsbestimmungen von etwa +7 mg/dL. Daher wurde diese Komponente wieder entfernt. Die residuale Bande bei 1350 cm^{-1} resultiert aus der Temperaturabhängigkeit der Absorptionbande des Hydrogencarbonats; die Anwendung des zugehörigen Eigenschaftskorrelationspektrums als Komponente des physikalischen Modells führt neben geringeren Residuen auch zu signifikant größeren Unsicherheiten in der Konzentrationsbestimmung und wurde daher

unterlassen. Insgesamt sind die Amplituden der Residuen nur wenig größer als die maximale Rauschamplitude der 100%-Linien. Die wichtigsten spektralen Anteile konnten im Rahmen dieser Arbeit mit dem hier vorgeschlagenen und erfolgreich eingesetzten physikalischen Modell erklärt werden.

Ausfälle bei kontinuierlichen Messungen wurden häufig durch die Verstopfung der Fluidik-Kapillaren und Verbindungsstücke hervorgerufen. Die Anschlüsse der einzelnen Komponenten untereinander müssen noch weiter optimiert werden. Insbesondere verschleißten die Fittings zum Verbinden zweier Kapillaren bei häufiger Verwendung. Die Verzögerungszeit zwischen Probennahme am Probanden und der IR-spektroskopischen Messung ist bisher noch zu groß. Die Länge der Tygon[®]-Kapillaren vom Mikro-Dialysekatheter bis zur Probenschleife des Schaltventils beträgt etwa einen Meter (30 *min* bei einer Flussrate von $1\mu\text{L}/\text{min}$). Um die PEEK-Kapillaren vor und am Ventil zu befüllen, werden weitere 10 *min* benötigt. Bis zur IR-spektroskopischen Messung vergehen zusätzliche 5 *min*. Damit beträgt die Verzögerungszeit insgesamt etwa 45 *min*. Dies ist für eine Steuerung der Blutglucosekonzentration des Patienten nicht annehmbar. Machbar ist ein Fluidik-Aufbau mit Klemmventilen, die sich direkt am Probanden befinden und damit eine zeitnahe Messung ermöglichen, indem das Dialysat mit hoher Flussrate vom Probanden zur Küvette gepumpt wird. Damit wird zum einen das teure Mehrwege-Schaltventil (ca. € 1500) überflüssig und die Zeitverzögerung kann deutlich gesenkt werden. Erste in-vitro Experimente eines Diplomanden am ISAS zeigten die Realisierbarkeit eines solchen Aufbaus, der jedoch zunächst noch weiter optimiert werden muss, bevor er bei in-vivo Messungen an Probanden getestet werden kann. Dies ist für eine der folgenden Studien im CLINICIP-Projekt geplant.

Kapitel 6

Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein IR-spektroskopisches Sensorsystem zur quasi-kontinuierlichen Blutglucosemessung in Kombination mit subkutan gelegten Mikro-Dialysekathetern entwickelt. Die IR-Spektroskopie ermöglicht eine reagenzien- und nahezu kalibrationsfreie Messung, mit deren Hilfe außer der Glucose noch weitere Analyten in den untersuchten Dialysaten wie Harnstoff, Lactat, Hydrogencarbonat oder Phosphat quantifiziert werden können. Die Spektren im Fingerprint-Bereich des mittleren IR sind sehr spezifisch für die einzelnen Komponenten und ermöglichen bei geeignetem apparativem Aufwand Glucosekonzentrationsbestimmungen, die der medizinisch geforderten Genauigkeit entsprechen. Die verwendete Fluidik hilft, mit wiederholten Referenzspektrenmessungen Drifterscheinungen zu vermeiden, und führt zu einer beachtlichen Langzeitstabilität des Sensors. Eine in-vivo Nachkalibrierung des Systems ist damit nicht erforderlich.

Für geeignete hohe Wiederfindungsraten bei der Mikro-Dialyse sind Flussraten von unter $1 \mu\text{L}/\text{min}$ nötig. Bei den quasi-kontinuierlichen Messungen im zehnmütigen Rhythmus stehen pro Zyklus somit weniger als $10 \mu\text{L}$ Probe zur Verfügung. Es wurde eine Mikro-Transmissions-Durchfluss-Küvette mit geeigneter Fluidik entwickelt, um mit diesen geringen Probenmengen zuverlässige Messungen durchführen zu können.

Bei der verwendeten Mikro-Dialyse-Messtechnik können üblicherweise auftretende kleinste Luftblasen den Ausfall des Sensors bedeuten. Das hier vorgestellte Mess-System ermöglicht die Detektion solcher Störungen. Die Betriebsbereitschaft kann durch die automatisierte Steuerung der Fluidik umgehend wieder hergestellt werden. So wurde ein vollautomatisches System für Langzeitmessungen entwickelt, das neben der Blutglucoseanalytik auch für andere Einsatzbereiche wie z.B. die Überwachung von Bioreaktoren und die chemische Prozessanalytik verwendet werden kann. Die Wiederfindungsrate ist ein wichtiger zu bestimmender Parameter, der durch die Verwendung eines Acetat-haltigen Perfusats als geeignetem Marker ermittelt wird. Der Einfluss der Diffusionskoeffizienten bei der Modellierung der Transportprozesse quer zur Dialysemembran wurde systematisch untersucht und ein geeignetes mathematisches Modell entwickelt, um den nichtlinearen Zusammenhang bei den jeweiligen An- bzw. Abreicherungen der Komponenten

zu berücksichtigen. Wie die in-vivo Experimente zeigten kann dies auch als Anregung für die Entwickler anderer Sensorsysteme verstanden werden, bei denen bisher nur eine konstante Wiederfindungsraten-Korrektur durchgeführt wird.

Eine vollständige Analyse der Bestandteile von Dialysaten der interstitiellen Flüssigkeit war in der Literatur bisher nicht zu finden. Eine umfangreiche Messreihe mit Blutplasma-Dialysaten wurde in einer Pilotstudie durchgeführt. Die wesentlichen Komponenten der Dialysate konnten identifiziert werden und ermöglichten sowohl die Erstellung von statistischen Kalibrationsmodellen als auch eines geeigneten physikalischen Kalibrationsmodells zur Quantifizierung von Glucose, Harnstoff, Lactat u.a. in den Dialysaten. Matrixeffekte wie Temperatur und pH-Wert Abhängigkeit und ihr Einfluss auf das Kalibrationsmodell wurden systematisch untersucht und die Stabilität des Kalibrationsmodells damit verbessert. Die Anwendbarkeit des entwickelten Modells wurde außerdem an Spektren einiger weiterer Proben verifiziert: Dialysate von Blutseren, Dialysate der interstitiellen Flüssigkeit unterschiedlicher Probanden und Ultrafiltrate von Blutplasma.

Die quantitative Bestimmung von Harnstoff und Lactat liefert den Medizinern ein Instrument, mit dessen Hilfe Stoffwechsellentgleisungen erkennbar werden. Interessant ist auch die Bestimmung der Konzentration von CO_2 und damit indirekt des pH-Wertes. Somit ist das entwickelte Gerät nicht nur in der Lage, in Kombination mit einer Insulinpumpe und einem geeigneten Algorithmus die Blutglucosekonzentration des Patienten zu regulieren, sondern auch, bei weiteren, zum Teil lebensbedrohlichen physiologischen Grenzzuständen Alarm zu geben.

Eine Erweiterung des Systems besteht darin, das Potential der Methode auch für die Bestimmung der Parameter pCO_2 und pH im Gewebe zu nutzen, wofür zur Zeit andere Sensoren bzw. analytische Methoden benötigt werden. Dazu müssten jedoch gasdichte Kapillaren verwendet werden, um genaue Messungen des gelösten CO_2 zu gewährleisten. Bei dessen im Dialysat vorliegenden Konzentrationen ist der Partialdruck so hoch, dass das Gas möglicherweise durch die PEEK-Kapillaren diffundiert und damit nicht in der Transmissionsküvette gemessen werden kann.

Ein wichtiger Punkt ist die zukünftige Untersuchung von Querempfindlichkeiten des Kalibrationsmodells speziell in Bezug auf Arzneimittel, die in der Intensivstation Verwendung finden. Wenn deren Konzentrationen in die Größenordnung der anderen Dialysat-Analyten kommen, sind Einflüsse auf die Konzentrationsbestimmungen der IR-spektrometrischen Kalibrationsmodelle nicht auszuschließen. Eine Analyse der Residuen-Spektren, die nach Anwendung des physikalischen Modells verbleiben, kann dazu verwendet werden, das klinische Personal auf eine mögliche Funktionsstörung hinzuweisen. Damit sind auch Fehler des Spektrometers erkennbar und die Gefahr einer fehlerbehafteten Konzentrationsbestimmung wird verringert.

Das System hat verschiedene Redundanzen eingebaut, um eine intelligente Fehlerdiagnostik zu gewährleisten: Zum einen ist dies die zweifache spektrale Messung bei jedem Messzyklus, womit Fehler in der Fluidik erkennbar werden und zum anderen die automatische Erkennung und Beseitigung von Luftblasen. Die Online-Auswertung der spektralen

Daten ermöglicht ferner, auf unerwartete Residuen der CLS-Auswertung entsprechend zu reagieren.

Als Fazit kann festgehalten werden, dass sich die kontinuierliche Messung von Glucose bei Patienten auf Intensivstationen mittels FTIR-Transmissionsmesstechnik als erfolgreich und verlässlich in vielen Studien innerhalb des CLINICIP-Projekts bereits bewährt hat. Zur zukünftigen Umsetzung eines kommerziell erhältlichen Prototypen müsste die Miniaturisierung des Messaufbaus weiter voranschreiten, da die zur Zeit verwendeten Fluidik-Bauteile zu teuer und komplex für dieses Ziel sind. Des Weiteren erfordert der momentane Aufbau noch die Anwesenheit eines Fachmanns, da auftretende Fehler wie beispielsweise Verstopfungen der Transmissionsküvette von Ärzten oder Krankenschwestern ohne genauere Einführung in die Funktion des Mess-Systems nicht erkannt und behoben werden können.

Dennoch zeigen diese Entwicklungen und Untersuchungen, dass IR-spektrometrische Mess-Systeme auch für die zuverlässige kontinuierliche Bestimmung von niedrig konzentrierten Substraten und Metaboliten in den Dialysaten von Körperflüssigkeiten erfolgreich einsetzbar sind. Die Vielseitigkeit der hier entwickelten Messtechnik hebt sich von den in der medizinischen Diagnostik vielfach verwendeten elektrochemischen, enzymatischen Biosensoren ab, die in den überwiegenden Fällen nur für einen Analyten geeignet sind. Hierdurch kann der Konkurrenzkampf trotz der höheren Anschaffungskosten für die spektrometrischen Messtechniken zugunsten der Photonik entschieden werden.

Anhang A

Abkürzungen und mathematische Schreibweisen

ADICOL	Dem CLINICIP vorangegangenes EU-Projekt
ADP	Adenosindiphosphat
AG	Aktiengesellschaft
ATP	Adenosin-Triphosphat
ATR	Abgeschwächte Totalreflexion
CAT	Computer unterstützte Tomographie (engl.: <i>Computer Aided Tomography</i>)
CEG	Darstellung zur Abschätzung der analytischen Leistungsfähigkeit von Blutglucosemessgeräten (engl.: <i>Clarke-Error-Grid</i>)
CM6,8,9	Bezeichnungen für die Studien im Rahmen des CLINICIP-Projekts
CMA60	Mikro-Dialysekatheter von Cameda
CLINICIP	EU-Projekt: Closed Loop INSulin Infusion for Critically Ill Patients
DDE	Übertragungsprotokoll unter Windows (engl.: <i>Dynamic Data Exchange</i>)
DOSC	Ein Verfahren zur Orthogonalisierung spektraler Daten (engl.: <i>Direct Orthogonal Signal Correction</i>)
DTGS	Material für IR-Detektoren (Deuteriertes Triglycinsulfat)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (engl.: Ethylendiaminetetraacetic acid)
EU	Europäische Union
FT	Fourier-Transform
GA	Genetische Algorithmen (engl.: <i>Genetic Algorithms</i>)
GOD	Glucoseoxidase (Enzym)
HK	Hexokinase (Enzym)
IR	Infrarot
ISAS	Institute for Analytical Sciences
LASER	Monochromatische Quelle elektromagnetischer Strahlung (engl.: <i>Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation</i>)
LDPE	Spacermaterial (engl.: <i>Low-Density Polyethylen</i>)
LED	Light Emitting Diode

m.A.U.	Milli-Absorptionseinheiten (engl.: <i>milli-absorbance units</i>)
MCT	Material für IR-Detektoren (engl.: <i>Mercurium Cadmium Telluride</i>)
MRI	Auf Kernspinresonanz beruhendes, bildgebendes Verfahren (engl.: <i>Magnetic Resonance Imaging</i>)
MUG	Medizinische Universität Graz (Österreich)
NAS	engl.: <i>Net Analyte Signal</i>
NIR	nahes Infrarot
OGTT	Oraler Glucose Toleranz Test
OSC	Orthogonalisierung spektraler Daten (engl.: <i>Orthogonal Signal Correction</i>)
PCA	Hauptkomponentenanalyse (engl.: <i>Principal Component Analysis</i>)
PCR	Hauptkomponentenregression (engl.: <i>Principal Component Regression</i>)
PDMS	Polydimethylsiloxan (wird in der Mikro-Fluidik zum Abgießen feinsten Strukturen verwendet)
PET	Positron-Emissions-Tomographie
PLS	Verfahren zur statistischen Kalibrationsmodell-Erstellung (engl.: <i>Partial Least Squares</i>)
PMMS	Verfahren zur spektralen Variablenauswahl (engl.: <i>Pairwise-Min-Max-Selection</i>)
PRESS	Güteparameter der Kreuzvalidierung (engl.: <i>Predicted Error Sum of Squares</i>)
PWS	Eigenschaftskorrelationspektrum (engl.: <i>Property Weighting Spectrum</i>)
RMS	Wurzel aus dem Mittelwert der Abstandsquadrate (engl.: <i>Root Mean Squared</i>)
SA	engl.: <i>Simulated annealing</i>
SEP	Güteparameter der Kreuzvalidierung oder CLS-Quantifizierung (engl.: <i>Standard Error of Prediction</i>)
SSE	Summe der Fehlerquadrate (engl.: <i>Sum of Squared Errors</i>)
VB	Programmiersprache unter Windows (Visual Basic)
ZMF	Zentrum für Medizinische Forschung an der MUG

Matrizen werden fett und groß geschrieben, zur besseren Verständlichkeit sind stellenweise durch "x" getrennte Indizes angegeben ($\mathbf{A}_{n \times k}$), Vektoren fett und klein ($\mathbf{e}_{k \times 1}$) und skalare Größen dünn und klein (*const*). \mathbf{A}^T ist die transponierte Matrix, \mathbf{A}^+ die Moore Penrose Inverse und $(\mathbf{A}^T \mathbf{A})_{r, PLS/PCR}^{-1}$ die rangreduzierte PLS- oder PCR-Inverse. Die n -dimensionale Einheitsmatrix wird als \mathbf{I}_n bezeichnet. $\mathbf{P}_A = \mathbf{A} \mathbf{A}^+$ ist der orthogonale Projektor bzgl. des Spaltenraums von \mathbf{A} , $\mathbf{O}_A = \mathbf{I} - \mathbf{P}_A$ der hierzu orthogonale Antiprojektor. $\|\mathbf{v}\|$ bezeichnet die euklidische Norm eines Vektors.

Die nichtlinearen Regressionsrechnungen wurden mit Hilfe von *gnuplot* (www.gnuplot.info) durchgeführt. Diese setzt den Algorithmus nach Levenberg-Marquardt ein und kann beliebig viele linear unabhängige Parameter einer frei programmierbaren Funktion anpassen.

Anhang B

WinTest-Skript für kontinuierliche Messungen

```
#
# Dateinamen des Logfiles festlegen
0 logfilename=d:\wintestlogs\22022006graz_cm9_patient10
# Elektrische Verstärkung des A/D im IR200
0 ir200amp=1
#
# Füllvolumen der Spritze in der Spritzenpumpe setzen
1 syringe_setgesvol 4000
#
# 25 uL pro Zyklus [10 min], Transportvolumen ist 9 uL
4 plugposition=9
4 emptyvolume=16
#
#
# IR200-Experiment laden: Auflösung=16cm, nscans=240
# --> etwa 1:50 min pro Spektrum
# elektrische Verstärkung je nach Centerburst auswählen
# Abhängig von der Variablen 'ir200amp' wird die
# Experiment-Datei geladen
5 ir200amp==1
5 gotoifresult 7
6 ir200exp D:\ir200\experiment\wn16s240einkanal_amp4.exp
# Dummy für eine Verzweigung
6 test=0
6 test==0
6 gotoifresult 8
7 ir200exp D:\ir200\experiment\wn16s240einkanal_amp1.exp
# Dummy als Sprungziel
```

```
8 test=0
#
# Logdatei: '$d' wird durch das aktuelle Datum ersetzt
21000 logmessage ##### ($d) Start Measurement
#
# Mail schicken: "Alles noch in Ordnung"
21000 matlabscript email('damm@ansci.de','wintest','meas($d)')
#
# Erste Referenz als Einkanalspektrum messen.
# Die letzte Zahl im Dateinamen wird automatisch inkrementiert
21000 ir200smp D:\Measurements\22022006a0
#
# LEDs setzen: gerade kein Vial-Wechsel
130000 syringe_greenoff
130000 syringe_redon
#
# Spektrum speichern
136000 ir200flush
# Auf Luftblasen testen und bei Bedarf beseitigen
137000 matlabscript setup_ref(1,'$filename')
137002 gosubifresult 1000000
#
# Logdatei: '$f' wird durch aktuellen Dateinamen ersetzt
137003 logmessage ##### ref1=$f ($d)
#
# Schalten des HPLC-Ventils
137003 valveInject
#
# Beschleunigter Transport der Probe zur Küvette
138000 syringe_stop
138000 syringe_setvolume plugposition
138000 syringe_setspeed 1
138000 syringe_start
144000 syringe_setspeed 2
147000 syringe_setspeed 4
149000 syringe_setspeed 6
151000 syringe_setspeed 8
154000 syringe_setspeed 12
156000 syringe_setspeed 16
160000 syringe_setspeed 24
163000 syringe_setspeed 32
169000 syringe_setspeed 40
#
# Probenschleife erneut befüllen
```

```
218000 valveLoad
#
# Bei Bedarf Meldung ausgeben, dass die Spritze leer ist
218000 gosubifresult 2000000
#
# Erste Proben als Einkanalspektrum messen
218001 ir200smp D:\Measurements\22022006a0
333000 ir200flush
#
# Konzentration berechnen und
# bei Bedarf Luftblasen beseitigen
334000 matlabscrip setup_smp(1,'$filename')
334000 gosubifresult 1000000
#
334000 logmessage ##### smp1=$f ($d)
#
# Zweite Probe als Einkanalspektrum messen
334000 ir200smp D:\Measurements\22022006a0
449000 ir200flush
#
# Auf Luftblasen testen und bei Bedarf beseitigen
450000 matlabscrip setup_smp(2,'$filename')
450000 gosubifresult 1000000
#
450000 logmessage ##### smp2=$f ($d)
#
# Befüllung der Küvette mit Referenzprobe
450001 syringe_stop
450001 syringe_setvolume emptyvolume
450001 syringe_setspeed 50
450001 syringe_start
#
# Bei Bedarf Meldung ausgeben, dass die Spritze leer ist
450002 gosubifresult 2000000
#
# Zweite Referenz als Einkanalspektrum messen
480002 ir200smp D:\Measurements\22022006a0
#
# Vialwechsel, LEDs umsetzen und Melodie abspielen
590000 syringe_greenon
590000 syringe_redoff
595000 matlabscrip tada
#
595000 ir200flush
```

```
#
# Zweite Konzentrationsbestimmung und
# bei Bedarf Luftblasen beseitigen
596000 matlabscript setup_ref(2,'$filename')
596000 gosubifresult 1000000
#
596000 logmessage ##### ref2=$f ($d)
#
# Centerburst des Interferogramms testen und
# bei Bedarf die elektronische Verstärkung umschalten
596001 ir200convifg
597000 matlabscript checkifg('$filename')
598001 gosubifresult 5000000
#
# Hauptschleife (1000000*10 min) (Sprung zu '4')
600000 goto 1000000,4
# nach 19 Jahren beenden:-)
600001 syringe_stop
600002 done
#
#
#
# rhythmisches Pumpen zum Entfernen der Luftblase
# kurze Messung zum Luftblasen-Testen
1000000 ir200exp D:\ir200\experiment\wn16s40einkanal_amp1.exp
#
1000010 logmessage ##### remove airbubbles now ($d)
1000010 syringe_stop
1000010 syringe_setvolume 50
1000010 syringe_setspeed 150
1000010 syringe_start
#
# Spritze leer?
1000010 gosubifresult 2000000
#
# Kontinuierliches Testen auf Luftblasen
1020000 ir200smp D:\Measurements\airbubbles0
1038000 ir200flush
1039000 matlabscript check_airbubble('$filename')
# Solange pumpen, bis die Luftblase beseitigt ist
1039999 gotoifresult 1000010
#
#
1040001 ir200exp D:\ir200\experiment\wn16s240einkanal_amp1.exp
```

```
1060002 return
#
#
# Bei entleerter Spritze zum Wiederauffüllen auffordern
2000000 logmessage ##### syringepump is empty ($d)
2000000 matlabscrip email('damm@ansci.de','wintest','pump empty')
2000001 message "refill syringes > 4500uL THAN PRESS OK"
#
# Spritzenpumpenstempel bis zum Spritzenkolben bewegen
2000002 syringe_setgesvol 4500
2000002 syringe_stop
2000002 syringe_setvolume 150
2000002 syringe_setspeed 150
2000002 syringe_start
2060000 return
#
#
#
# change ir200amp from 1 to 4 and vice versa
5000000 ir200amp==1
5000001 gotoifresult 5001000
5000002 ir200amp=1
5000002 return
5001000 ir200amp=4
5001000 return
#
#
```

Literaturverzeichnis

- [1] H.M. HEISE: *Infrarot-Spektroskopie und ihre potentiellen Möglichkeiten in der klinischen Chemie*. Lab. Med., **15**: 470–476, 1991.
- [2] G. VAN DEN BERGHE, P. WOUTERS, F. WEEKERS, C. VERWAEST, F. BRUYNINCKX, M. SCHETZ, D. VLASSELAERS, P. FERDINANDE, P. LAUWERS und R. BOUILLON: *Intensive insulin therapy in critically ill patients*. N. Engl. J. Med., **345**(19): 1359–1367, 2001.
- [3] J. KEHR: *A survey on quantitative microdialysis: Theoretical models and practical implications*. J. Neuroscience Methods, **48**: 251–261, 1993.
- [4] G. LÖFFLER: *Biochemie und Pathobiochemie*. Springer, 7. Auflage, 2003.
- [5] P. ZIMMET, K.G.M.M. ALBERTI und J. SHAW: *Global and societal implications of the diabetes epidemic*. Nature, **414**: 782–787, 2001.
- [6] H. KELLER: *Klinisch-chemische Labordiagnostik für die Praxis: Analyse, Befund, Interpretation*. Georg Thieme, 2. Auflage, 1991.
- [7] G. VAN DEN BERGHE, A. WILMER, G. HERMANS, W. MEERSSEMAN, P.J. WOUTERS, I. MILANTS, E. VAN WIJNGAERDEN, H. BOBBAERS und R. BOUILLON: *Intensive insulin therapy in the medical ICU*. N. Engl. J. Med., **354**(5): 449–461, 2006.
- [8] G. VAN DEN BERGHE, P.J. WOUTERS, K. KETELOOT und D.E. HILLEMAN: *Analysis of healthcare resource utilization with intensive insulin therapy in critically ill patients*. Crit. Care Med., **34**(3): 612–616, 2006.
- [9] L. HEINEMANN: *Continuous glucose monitoring by means of the microdialysis technique: Underlying fundamental aspects*. Diabetes Technol. Ther., **5**(4): 545–561, 2003.
- [10] P.J. STOUT, N. PELED, B.J. ERICKSON, M.E. HILGERS, J.R. RACCHINI und T.B. HOEGH: *Comparison of glucose levels in dermal interstitial fluid and finger capillary blood*. Diabetes Technol. Ther., **3**(1): 81–90, 2001.
- [11] S.N. THENNADIL, J.L. RENNERT, B.J. WENZEL, K.H. HAZEN, T.L. RUCHTI und M.B. BLOCK: *Comparison of glucose concentration in interstitial fluid, and capillary and*

- venous blood during rapid changes in blood glucose levels. *Diabetes Technol. Ther.*, **3**(3): 357–365, 2001.
- [12] K. REBRIN, G.M. STEIL, W.P. VAN ANTWERP und J.J. MASTROTOTARO: *Subcutaneous glucose predicts plasma glucose independent of insulin: Implications for continuous monitoring*. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **277**(3):E561–E571, 1999.
- [13] K. REBRIN und G. STEIL: *Can interstitial glucose assessment replace blood glucose measurements?* *Diabetes Technol. Ther.*, **2**(3): 461–472, 2000.
- [14] H.M. HEISE: *Glucose, in vivo assay of*. In: R.A. MEYERS (Herausgeber): *Encyclopedia of analytical chemistry*, Band I, Seiten 56–83. John Wiley & Sons, Chichester, 2000.
- [15] O.S. KHALIL: *Non-invasive glucose measurement technologies: An update from 1999 to the dawn of the new millennium*. *Diabetes Technol. Ther.*, **6**(5): 660–697, 2004.
- [16] T.M. VRIESENDORP, J.H. DEVRIES, F. HOLLEMAN, M. DZOLJIC und J.B.L. HOEKSTRA: *The use of two continuous glucose sensors during and after surgery*. *Diabetes Technol. Ther.*, **7**(2): 315–322, 2005.
- [17] M.J. TANSEY, R.W. BECK, B.A. BUCKINGHAM, N. MAURAS, R. FIALLO-SCHARER, D. XING, C. KILLMAN, W.V. TAMBORLANE, K.J. RUEDY und THE DIABETES RESEARCH IN CHILDREN NETWORK (DIRECNET) STUDY GROUP: *Accuracy of the modified continuous glucose monitoring system (CGMS[®]) sensor in an outpatient setting: Results from a diabetes research in children network (DirecNet) study*. *Diabetes Technol. Ther.*, **7**(1): 109–114, 2005.
- [18] S.M. JONES, J.L. QUARRY, M. CALDWELL-McMILLAN, D.T. MAUGER und R.A. GABBAY: *Optimal insulin pump dosing and postprandial glycemia following a pizza meal using the continuous glucose monitoring system*. *Diabetes Technol. Ther.*, **7**(2): 233–240, 2005.
- [19] R. JAMALI, M. BACHRACH-LINDSTRÖM und S. MOHSENI: *Continuous glucose monitoring system signals the occurrence of marked postprandial hyperglycemia in the elderly*. *Diabetes Technol. Ther.*, **7**(3): 509–515, 2005.
- [20] A. KERSSSEN, H.W. DE VALK und G.H.A. VISSER: *The continuous glucose monitoring system during pregnancy of women with type 1 diabetes mellitus: Accuracy assessment*. *Diabetes Technol. Ther.*, **6**(5): 645–651, 2004.
- [21] F. CHEE, T. FERNANDO und P.V. HEERDEN: *Closed-loop control of blood glucose levels in critically ill patients*. *Anaesth. Intensive Care*, **30**: 295–307, 2002.
- [22] R. HOVORKA, L.J. CHASSIN, M.E. WILINSKA, V. CANONICO, J.A. AKWI, M.O. FEDERICI, M. MASSI-BENEDETTI, I. HUTZLI, C. ZAUGG, H. KAUFMANN, M. BOTH, T. VERING, H.C. SCHALLER, L. SCHAUPP, M. BODENLENZ und T.R. PIEBER: *Closing the Loop: The Adicol Experience*. *Diabetes Technol. Ther.*, **6**(3): 307–318, 2004.

- [23] H.M. HEISE und P.U. ABEL: *Clinical analysis: Glucose*. In: P.J. WORSFOLD, A. TOWNSHEND und C.F. POOLE (Herausgeber): *Encyclopedia of Analytical Sciences*, Band **10**, Seiten 152–166. Elsevier Science, Amsterdam, 2. Auflage, 2004.
- [24] E.A. MOSCHOU, B.V. SHARMA, S.K. DEO und S. DAUNERT: *Fluorescence glucose detection: Advances toward the ideal in vivo biosensor*. *J. Fluoresc.*, **14**(5): 535–547, 2004.
- [25] A. PASIC, H. KOEHLER, I. KLIMANT und L. SCHAUPP: *Miniaturized fiber-optic hybrid sensor for continuous glucose monitoring in subcutaneous tissue*. *Sens. Actuators, B*, in press, 2006.
- [26] A. HESSE, G. SCHRUMPF und I. SCHILLING: *Quantitative Bestimmung von Harnstein-komponenten durch Anwendung der Infrarot-Spektroskopie*. *Zschr. Urol.*, **67**: 367–375, 1974.
- [27] L. ESTEPA und M. DAUDON: *Contribution of Fourier transform infrared spectroscopy to the identification of urinary stones and kidney crystal deposits*. *Biospectroscopy*, **3**: 347–369, 1997.
- [28] H.M. HEISE, G. VOIGT, P. LAMPEN, L. KÜPPER, S. RUDLOFF und G. WERNER: *Multivariate calibration for the determination of analytes in urine using mid-infrared attenuated total reflection spectroscopy*. *Appl. Spectrosc.*, **55**(4): 434–443, 2001.
- [29] C.P. SCHULTZ, M.K. AHMED, C. DAWES und H.H. MANTSCH: *Thiocyanate levels in human saliva: Quantification by Fourier transform infrared spectroscopy*. *Anal. Biochem.*, **240**: 7–12, 1996.
- [30] H.H. EYSEL, M. JACKSON, A. NIKULIN, R.L. SOMORJAI, G.T.D. THOMSON und H.H. MANTSCH: *A novel diagnostic test for arthritis: Multivariate analysis of infrared spectra of synovial fluid*. *Biospectroscopy*, **3**(2): 161–167, 1997.
- [31] J.M.G. CANVIN, S. BERNATSKY, C.A. HITCHON, M. JACKSON, M.G. SOWA, J.R. MANSFIELD, H.H. EYSEL, H.H. MANTSCH und H.S. EL-GABALAWY: *Infrared spectroscopy: Shedding light on synovitis in patients with rheumatoid arthritis*. *Rheumatology*, **42**: 76–82, 2003.
- [32] H.M. HEISE, R. MARBACH, G. JANATSCH und J.D. KRUSE-JARRES: *Multivariate determination of glucose in whole blood by attenuated total reflection infrared spectroscopy*. *Anal. Chem.*, **61**(18): 2009–2015, 1989.
- [33] H.M. HEISE, A. BITTNER, T. KOSCHINSKY und F.A. GRIES: *Ex-vivo determination of blood glucose by microdialysis in combination with infrared attenuated total reflection spectroscopy*. *Fresenius J. Anal. Chem.*, **359**: 83–87, 1997.
- [34] H.M. HEISE: *Infrared and Raman spectroscopy of biological materials*. In: H.U. GREMLICH und B. YAN (Herausgeber): *Clinical applications of Near- and mid-infrared spectroscopy*, Seiten 259–322. Marcel Dekker, Inc., 2001.

- [35] M. JACKSON und H.H. MANTSCH: *FTIR spectroscopy in the clinical sciences*. In: R.J.H. CLARK und R.E. HESTER (Herausgeber): *Biomedical applications of Spectroscopy*, Band 25, Seiten 185–215. John Wiley & Sons Ltd., 1996.
- [36] U. BINDIG und G. MÜLLER: *Fibre-optic laser-assisted infrared tumour diagnostics (FLAIR)*. *J. Phys. D: Appl. Phys.*, **38**: 2716–2731, 2005.
- [37] R.K. DUKOR: *Vibrational spectroscopy in the detection of cancer*. In: J.M. CHALMERS und P.R. GRIFFITHS (Herausgeber): *Handbook of vibrational spectroscopy*, Band 5, Seiten 3335–3375. John Wiley & Sons, 2002.
- [38] M. DIEM, M. ROMEO, S. BOYDSTON-WHITE, M. MILJKOVIC und C. MATTHÄUS: *A decade of vibrational micro-spectroscopy of human cells and tissue (1994–2004)*. *Analyst*, **129**: 880–885, 2004.
- [39] R. MARBACH: *Meßverfahren zur IR-spektroskopischen Blutglucosebestimmung*. Doktorarbeit, Universität Dortmund, 1992.
- [40] R. MARBACH, T. KOSCHINSKY, F.A. GRIES und H.M. HEISE: *Noninvasive blood glucose assay by near-infrared diffuse reflectance spectroscopy of the human inner lip*. *Appl. Spectrosc.*, **47**(7): 875–881, 1993.
- [41] W. NAHM und H. GEHRING: *Non-invasive in vivo measurement of blood spectrum by time-resolved near-infrared spectroscopy*. *Sens. Actuators, B*, **29**: 174–179, 1995.
- [42] H.M. HEISE, A. BITTNER und R. MARBACH: *Clinical chemistry and near infrared spectroscopy: Technology for non-invasive glucose monitoring*. *J. Near Infrared Spectrosc.*, **6**: 349–359, 1998.
- [43] S.J. YEH, C.F. HANNA und O.S. KHALIL: *Monitoring blood glucose changes in cutaneous tissue by temperature-modulated localized reflectance measurements*. *Clin. Chem.*, **49**(6): 924–934, 2003.
- [44] AMERICAN DIABETES ASSOCIATION: *Standards of medical care for patients with diabetes mellitus*. *Diabetes Care*, **25**(1): S33–S49, 2002.
- [45] H.M. HEISE, S. HAIBER, M. LICHT, D.F. IHRIG, C. MOLL und M. STÜCKER: *Recent progress in non-invasive diabetes screening by diffuse reflectance near-infrared skin spectroscopy*. *Proc. SPIE*, **6093**: 250–258, 2006.
- [46] G. TAGA, K. ASAKAWA, A. MAKI, Y. KONISHI und H. KOIZUMI: *Brain imaging in awake infants by near-infrared optical topography*. *PNAS*, **100**(19): 10722–10727, 2003.
- [47] A. ZYBIN, V. LIGER, R. SOUCHON, H.M. HEISE und K. NIEMAX: *Examination of the oxygenation state of hemoglobin in a phantom and in-vivo tissue applying absorption balancing with two and three laser wavelength*. *Appl. Phys. B*, **83**(1): 141–148, 2006.

- [48] G. JANATSCH, J.D. KRUSE-JARRES, R. MARBACH und H.M. HEISE: *Multivariate calibration for assays in clinical chemistry using attenuated total reflection infrared spectra of human blood plasma*. *Anal. Chem.*, **61**: 2016–2023, 1989.
- [49] H.M. HEISE, R. MARBACH, TH. KOSCHINSKY und F.A. GRIES: *Multicomponent assay for blood substrates in human plasma by mid-infrared spectroscopy and its evaluation for clinical analysis*. *Appl. Spectrosc.*, **48**(1): 85–95, 1994.
- [50] K.H. HAZEN, M.A. ARNOLD und G.W. SMALL: *Measurement of glucose and other analytes in undiluted human serum with near-infrared transmission spectroscopy*. *Anal. Chim. Acta*, **371**: 255–267, 1998.
- [51] R.J. McNICHOLS und G.L. COTÉ: *Optical glucose sensing in biological fluids: An overview*. *J. Biomed. Opt.*, **5**(1): 5–16, 2000.
- [52] Y.C. SHEN, A.G. DAVIES, E.H. LINFIELD, T.S. ELSEY, P.F. TADAY und D.D. ARNONE: *The use of Fourier-transform infrared spectroscopy for the quantitative determination of glucose concentration in whole blood*. *Phys. Med. Biol.*, **48**: 2023–2032, 2003.
- [53] D. ROHLEDER, G. KOCHERSCHIEDT, K. GERBER, W. KIEFER, W. KÖHLER, J. MÖCKS und W. PETRICH: *Comparison of mid-infrared and Raman spectroscopy in the quantitative analysis of serum*. *J. Biomed. Opt.*, **10**(3): 1–10, 2005.
- [54] R.A. SHAW und H.H. MANTSCH: *Infrared spectroscopy in clinical and diagnostic analysis*. In: R.A. MEYERS (Herausgeber): *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, Seiten 83–102. John Wiley & Sons, 2000.
- [55] A. BITTNER und H.M. HEISE: *Dry film preparation from whole blood, plasma and serum for quantitative infrared diffuse reflectance spectroscopy*. In: J.A. DE HASSETH (Herausgeber): *Fourier Transform Spectroscopy: 11th international conference*, Band **430**, Seiten 278–281. American Institute of Physics: Woodbury, NY, 1998.
- [56] E. DIESEL, S. WILLMANN, P. KAMPHAUS, R. KURTE, U. DAMM und H.M. HEISE: *Glucose quantification in dried-down nanoliter samples using mid-infrared attenuated total reflection spectroscopy*. *Appl. Spectrosc.*, **58**(4): 442–450, 2004.
- [57] E. DIESEL, P. KAMPHAUS, K. GROTHE, R. KURTE, U. DAMM und H.M. HEISE: *Nanoliter serum sample analysis by mid-infrared spectroscopy for minimally invasive blood-glucose monitoring*. *Appl. Spectrosc.*, **59**(4): 442–451, 2005.
- [58] H.M. HEISE und A. BITTNER: *Investigation of experimental errors in the quantitative analysis of glucose in human blood plasma by ATR-IR spectroscopy*. *J. Mol. Struct.*, **348**: 21–24, 1995.
- [59] P.S. JENSEN, J. BAK, S. LADEFOGED und S. ANDERSSON-ENGELS: *Determination of urea, glucose, and phosphate in dialysate with Fourier transform infrared spectroscopy*. *Spectrochim. Acta A*, **60**: 899–905, 2004.

- [60] O. VOGT, U. DAMM und H.M. HEISE: *Towards reagent-free continuous blood glucose monitoring for the critical care environment using micro-dialysis and infrared spectrometry*. Proc. Biomed. Eng., **458**: 305–308, 2005.
- [61] H.M. HEISE, U. DAMM und V.R. KONDEPATI: *Reliable long-term continuous blood glucose monitoring for patients in critical care using micro-dialysis and infrared spectrometry*. Proc. SPIE, **6093**: 21–29, 2006.
- [62] H.M. HEISE, U. DAMM, O. VOGT und V. KONDEPATI: *Towards reagent-free blood glucose monitoring using micro-dialysis and infrared transmission spectrometry*. Vib. Spectrosc., in press, 2006.
- [63] V.R. KONDEPATI, U. DAMM und H.M. HEISE: *Infrared transmission spectrometry for the determination of urea in microliter sample volumes of blood plasma dialysates*. Appl. Spectrosc., **60**(8): in press, 2006.
- [64] G. SOCRATES: *Infrared and Raman characteristic group frequencies: Tables and charts*. John Wiley & Sons, 3. Auflage, 2004.
- [65] N.B. COLTHUP, L.H. DALY und S.E. WIBERLEY: *Introduction to infrared and Raman spectroscopy*. Academic Press, Boston, 3. Auflage, 1990.
- [66] J.M. CHALMERS und P.R. GRIFFITHS: *Handbook of vibrational spectroscopy*. John Wiley & Sons, 2002.
- [67] B. SCHRADER: *Infrared and Raman spectroscopy: Methods and applications*. VCH-Wiley, Weinheim, 1995.
- [68] H. GÜNZLER und H.M. HEISE: *IR-Spektroskopie*. VCH-Wiley, Weinheim, 3. Auflage, 1996.
- [69] T. NÆS, T. ISAKSSON, T. FEARN und T. DAVIES: *A userfriendly guide to multivariate calibration and classification*. NIR Publications, 2004.
- [70] H. MARTENS und T. NÆS: *Multivariate Calibration*. John Wiley & Sons, Chichester, 1989.
- [71] M. OTTO: *Chemometrie, Statistik und Computereinsatz in der Analytik*. VCH-Wiley, Weinheim, 1998.
- [72] J.E. BERTIE und Z. LAN: *Infrared intensities of liquids XX: The intensity of the OH stretching band of liquid water revised, and the best current values of the optical constants of H₂O(l) at 25°C between 15,000 and 1 cm⁻¹*. Appl. Spectrosc., **50**(8): 1047–1057, 1996.
- [73] H.W. SIESLER, Y. OZAKI, S. KAWATA und H.M. HEISE: *Near-infrared spectroscopy: Principles, instruments, applications*. VCH-Wiley, Weinheim, 2002.

- [74] P.R. GRIFFITHS und J.A. DE HASETH: *Fourier transform infrared spectrometry*, Band **83**. John Wiley & Sons, New York, 1986.
- [75] D.B. CHASE: *Phase correction in FT-IR*. Appl. Spectrosc., **36**(3): 240–244, 1982.
- [76] L. MERTZ: *Transformation in optics*. John Wiley & Sons, 1965.
- [77] P.S. JENSEN und J. BAK: *Near-infrared transmission spectroscopy of aqueous solutions: Influence of optical pathlength on signal-to-noise ratio*. Appl. Spectrosc., **56**(12): 1600–1606, 2002.
- [78] R.P. SPERLINE, S. MURALIDHARAN und H. FREISER: *New quantitative technique for attenuated total reflection (ATR) spectrophotometry: Calibration of the "CIRCLE" ATR device in the infrared*. Appl. Spectrosc., **40**(7): 1019–1022, 1986.
- [79] M. KÖLHED, M. HABERKORN, V. PUSTOGOV, B. MIZAİKOFF, J. FRANK, B. KARLBERG und B. LENDL: *Assessment of quantum cascade lasers as mid infrared light sources for measurement of aqueous samples*. Vib. Spectrosc., **29**: 283–289, 2002.
- [80] A. LAMBRECHT, T. BEYER, K. HEBESTREIT, R. MISCHLER und W. PETRICH: *Continuous glucose monitoring by means of fiber-based, mid-infrared laser spectroscopy*. Appl. Spectrosc., **60**(7): 729–736, 2006.
- [81] W.B. MARTIN, S. MIROW und R. VENUGOPALAN: *Middle infrared, quantum cascade laser optoelectronic absorption system for monitoring glucose in serum*. Appl. Spectrosc., **59**(7): 881–884, 2005.
- [82] H. VON LILIENFELD-TOAL, M. WEIDENMÜLLER, A. XHELAIJ und W. MÄNTELE: *A novel approach to non-invasive glucose measurement by mid-infrared spectroscopy: The combination of quantum cascade lasers (QCL) and photoacoustic detection*. Vib. Spectrosc., **38**(1–2): 209–215, 2005.
- [83] J. LADEMANN, H. RICHTER, M. MEINKE, G. MÜLLER, P. KAPUSTIN, V. MASYSHEV, J. BULKIN, K.W. BERNDT und W. STERRY: *In-vitro glucose measurements using a two wavelength CO₂ laser*. Proc. SPIE, **4965**: 95–103, 2003.
- [84] T. KOSCHINSKY, K. JUNGHEIM und L. HEINEMANN: *Glucose sensors and the alternate site testing-like phenomenon: Relationship between rapid blood glucose changes and glucose sensor signals*. Diabetes Technol. Ther., **5**(5): 829–842, 2003.
- [85] P.W. ATKINS: *Physikalische Chemie*. VCH-Wiley, Weinheim, 2. Auflage, 1990.
- [86] N. WISNIEWSKI, N. RAJAMAND, U. ADAMSSON, P.E. LINS, W.M. REICHERT, B. KLITZMAN und U. UNGERSTEDT: *Analyte flux through chronically implanted subcutaneous polyamide membranes differs in humans and rats*. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab., **282**: E1316–E1323, 2002.

- [87] L. SCHAUPP, M. ELLMERER, G.A. BRUNNER, A. WUTTE, G. SENDLHOFER, Z. TRAJANOSKI, F. SKRABAL, T.R. PIEBER und P. WACH: *Direct access to interstitial fluid in adipose tissue in humans by use of open-flow microperfusion*. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab., **276**(2): E401–E408, 1999.
- [88] D.A. SKOOG und J.J. LEARY: *Instrumentelle Analytik*. Springer, 1996.
- [89] M. ELLMERER, M. HALUZIK, J. BLAHA, J. KREMEN, S. SVACINA, W. TOLLER, J. MADER, L. SCHAUPP, J. PLANK und T.R. PIEBER: *Clinical evaluation of alternative-site glucose measurements in patients after major cardiac surgery*. Diabetes Care, **29**(6): 1275–1281, 2006.
- [90] W. SCHMIDT: *Optische Spektroskopie*. VCH-Wiley, Weinheim, 1994.
- [91] G. STRANG: *Linear algebra and its applications*. Academic Press, 1976.
- [92] H.M. HEISE: *Scaled absorbance difference spectroscopy for the analysis of solutions - What residuals can be expected?* Fresenius J. Anal. Chem., **350**: 505–513, 1994.
- [93] R. DE MAESSCHALCK, D. JOUAN-RIMBAUD und D.L. MASSART: *Tutorial: The mahalanobis distance*. Chemometr. Intell. Lab., **50**: 1–18, 2000.
- [94] K. FABER und B.R. KOWALSKI: *Propagation of measurement errors for the validation of predictions obtained by principal component regression and partial least squares*. J. Chemometrics, **11**: 181–238, 1997.
- [95] R. MARBACH und H.M. HEISE: *Calibration modeling by partial least-squares and principal component regression and its optimization using an improved leverage correction for prediction testing*. Chemometr. Intell. Lab., **9**: 45–63, 1990.
- [96] G.H. GOLUB und C.F. VAN LOAN: *Matrix computations*. Johns Hopkins University Press, 1983.
- [97] R. MARBACH: *On Wiener filtering and the physics behind statistical modeling*. J. Biomed. Opt., **7**(1): 130–147, Jan. 2002.
- [98] C.D. BROWN: *Discordance between net analyte signal theory and practical multivariate calibration*. Anal. Chem., **76**(15): 4364–4373, 2004.
- [99] R. MARBACH: *A new method for multivariate calibration*. J. Near Infrared Spectrosc., **13**: 241–254, 2005.
- [100] B. EFRON und G. GONG: *A leisurely look at the bootstrap, the jackknife, and cross-validation*. The American statistician, **37**(1): 36–48, 1983.
- [101] M. STONE: *Cross-validatory choice and assessment of statistical predictions*. J. R. Stat. Soc. B, **36**: 111–147, 1974.

- [102] D.W. OSTEN: *Selection of optimal regression models via cross-validation*. J. Chemometrics, **2**: 39–48, 1988.
- [103] A. LORBER: *Error propagation and figures of merit for quantification by solving matrix equations*. Anal. Chem., **58**: 1167–1172, 1986.
- [104] A. LORBER, K. FABER und B.R. KOWALSKI: *Net analyte signal calculation in multivariate calibration*. Anal. Chem., **69**: 1620–1626, 1997.
- [105] ÅKE BJÖRCK: *Numerical methods for least squares problems*. SIAM, 1996.
- [106] B. NADLER und R.R. COIFMAN: *Partial least squares, Beer's law and the net analyte signal: Statistical modeling and analysis*. J. Chemometrics, **19**: 45–54, 2005.
- [107] H.C. GOICOECHEA und A.C. OLIVIERI: *A comparison of orthogonal signal correction and net analyte preprocessing methods. Theoretical and experimental study*. Chemometr. Intell. Lab., **56**: 73–81, 2001.
- [108] J. FERRÉ, S.D. BROWN und F.X. RIUS: *Improved calculation of the net analyte signal in inverse multivariate calibration*. J. Chemometrics, **15**: 537–553, 2001.
- [109] J. FERRÉ und K. FABER: *Net analyte signal calculation for multivariate calibration*. Chemometr. Intell. Lab., **69**: 123–136, 2003.
- [110] N. BENOUDJIT, E. COOLS, M. MEURENS und M. VERLEYSSEN: *Chemometric calibration of infrared spectrometers: Selection and validation of variables by non-linear models*. Chemometr. Intell. Lab., **70**: 47–53, 2004.
- [111] S. ENGELEN und M. HUBERT: *Fast model selection for robust calibration methods*. Anal. Chim. Acta, **544**: 219–228, 2005.
- [112] Y.P. DU, Y.Z. LIANG, J.H. JIANG, R.J. BERRY und Y. OZAKI: *Spectral regions selection to improve prediction ability of PLS models by changeable size moving window partial least squares and searching combination moving window partial least squares*. Anal. Chim. Acta, **501**: 183–191, 2004.
- [113] J.H. JIANG, R.J. BERRY, H.W. SIESLER und Y. OZAKI: *Wavelength interval selection in multicomponent spectral analysis by moving window partial least-squares regression with applications to mid-infrared and near-infrared spectroscopic data*. Anal. Chem., **74**(14): 3555–3565, 2002.
- [114] Q. DING und G.W. SMALL: *Genetic algorithm-based wavelength selection for the near-infrared determination of glucose in biological matrixes: Initialization strategies and effects of spectral resolution*. Anal. Chem., **70**: 4472–4479, 1998.
- [115] J.A. HAGEMAN, M. STREPPPEL, R. WEHRENS und L.M.C. BUYDENS: *Wavelength selection with tabu search*. J. Chemometrics, **17**: 427–437, 2003.

- [116] H.M. HEISE, U. DAMM, P. LAMPEN, A.N. DAVIES und P.S. McINTYRE: *Spectral variable selection for partial least-squares calibration applied to authentication and quantification of extra virgin olive oils using Fourier transform Raman spectroscopy*. Appl. Spectrosc., **59**(10): 1286–1294, 2005.
- [117] H.M. HEISE und A. BITTNER: *Rapid and reliable spectral variable selection for statistical calibrations based on PLS-regression vector choices*. Fresenius J. Anal. Chem., **359**: 93–99, 1997.
- [118] H.M. HEISE und A. BITTNER: *Multivariate calibration for near-infrared spectroscopic assays of blood substrates in human plasma based on variable selection using PLS-regression vector choices*. Fresenius J. Anal. Chem., **362**: 141–147, 1998.
- [119] F. WESTAD und H. MARTENS: *Variable selection in near infrared spectroscopy based on significance testing in partial least squares regression*. J. Near Infrared Spectrosc., **8**: 117–124, 2000.
- [120] M. FORINA, S. LANTERI, M.C.C. OLIVEROS und C.P. MILLAN: *Selection of useful predictors in multivariate calibration*. Anal. Bioanal. Chem., **380**: 397–418, 2004.
- [121] B. LI, J. MORRIS und E.B. MARTIN: *Model selection for partial least squares regression*. Chemometr. Intell. Lab., **64**: 79–89, 2002.
- [122] I.K. SALOMAA und J.K. KAUPPINEN: *Origin of and compensation for the baseline errors in Fourier transform spectra*. Appl. Spectrosc., **52**(4): 579–585, 1998.
- [123] D.B. CHASE: *Nonlinear detector response in FT-IR*. Appl. Spectrosc., **38**(4): 491–494, 1984.
- [124] R.O. CARTER, N.E. LINDSAY und D. BEDUHN: *A solution to baseline uncertainty due to MCT detector nonlinearity in FT-IR*. Appl. Spectrosc., **44**(7): 1147–1151, 1990.
- [125] D.M. HAALAND und D.K. MELGAARD: *New prediction-augmented classical least-squares (PACLS) methods: Application to unmodeled interferences*. Appl. Spectrosc., **54**(9): 1303–1312, 2000.
- [126] S. WOLD, H. ANTTI, F. LINDGREN und J. ÖHMAN: *Orthogonal signal correction of near-infrared spectra*. Chemometr. Intell. Lab., **44**: 175–185, 1998.
- [127] J. SJÖBLM, O. SVENSSON, M. JOSEFSON und H. KULLBERG S. WOLD: *An evaluation of orthogonal signal correction applied to calibration transfer of near infrared spectra*. Chemometr. Intell. Lab., **44**: 229–244, 1998.
- [128] C.A. ANDERSSON: *Direct orthogonalization*. Chemometr. Intell. Lab., **47**: 51–63, 1999.
- [129] T. FEARN: *On orthogonal signal correction*. Chemometr. Intell. Lab., **50**: 47–52, 2000.

- [130] J. TRYGG und S. WOLD: *Orthogonal projections to latent structures (O-PLS)*. J. Chemometrics, **16**: 119–128, 2002.
- [131] J.A. WESTERHUIS, S. DE JONG und A.K. SMILDE: *Direct orthogonal signal correction*. Chemometr. Intell. Lab., **56**: 13–25, 2001.
- [132] O. SVENSSON, T. KOURTI und J.F. MACGREGOR: *An investigation of orthogonal signal correction algorithms and their characteristics*. J. Chemometrics, **16**: 176–188, 2002.
- [133] J.R. BIRCH und F.J.J. CLARKE: *Fifty categories of ordinate error in Fourier transform spectroscopy*. Spectroscopy Europe, **7**(4): 16–22, 1995.
- [134] H.M. HEISE: *Comparison of different algorithms for the interferometric determination of thickness in the μm -range by IR-spectroscopy*. Fresenius J. Anal. Chem., **346**: 604–607, 1993.
- [135] D.M. BACK und P.L. POLAVARAPU: *Fourier-transform infrared spectroscopy of sugars, structural changes in aqueous solutions*. Carbohydr. Res., **121**: 308–311, 1983.
- [136] W. DEMTRÖDER: *Laserspektroskopie*. Springer, 3. Auflage, 1993.
- [137] F.W. KÜSTER und A. THIEL: *Rechentafeln für die chemische Analytik*. Walther de Gruyter, 104. Auflage, 1994.
- [138] L. SIGG und W. STUMM: *Aquatische Chemie: Eine Einführung in die Chemie wässriger Lösungen und natürlicher Gewässer*. VDF, 3. Auflage, 1994.
- [139] D. NELSON und M. COX: *Lehninger Biochemie*. Springer, 3. Auflage, 2001.
- [140] C.P. SCHULTZ, H.H. EYSEL, H.H. MANTSCH und M. JACKSON: *Carbon dioxide in tissues, cells, and biological fluids detected by FTIR spectroscopy*. J. Phys. Chem., **100**: 6845–6848, 1996.
- [141] R.L. JUNGAS: *Best literature values for the pK of carbonic and phosphoric acid under physiological conditions*. Anal. Biochem., **349**: 1–15, 2006.
- [142] J.R. SCHOONOVER, R. MARX und S.L. ZHANG: *Multivariate curve resolution in the analysis of vibrational spectroscopy data files*. Appl. Spectrosc., **57**(5): 154–170, 2003.
- [143] P.S. JENSEN, J. BAK und S. ANDERSSON-ENGELS: *Influence of temperature on water and aqueous glucose absorption spectra in the Near- and mid-infrared regions at physiologically relevant temperatures*. Appl. Spectrosc., **57**(1): 28–36, 2003.
- [144] WEAST, R.C.: *Handbook of chemistry and physics*. CRC Press, 55. Auflage, 1974.

- [145] F. ALSMEYER, H.J. KOSS und W. MARQUARDT: *Indirect spectral hard modeling for the analysis of reactive and interacting mixtures*. Appl. Spectrosc., **58**(8): 975–985, 2004.
- [146] D.M. HAALAND und D.K. MELGAARD: *New augmented classical least squares methods for improved quantitative spectral analysis*. Vib. Spectrosc., **29**: 171–175, 2002.
- [147] *Hämatologie und Humangenetik*. In: C. LENTNER (Herausgeber): *Wissenschaftliche Tabellen Geigy*. CIBA GEIGY AG, Basel, 8. Auflage, 1979.
- [148] J. GRONHOLZ und W. HERRES: *Understanding FT-IR data processing*. I & C Reprint 1(84), 3(85), 1985.
- [149] C. ZHU und P.R. GRIFFITHS: *Extending the range of Beer's law in FT-IR-spectrometry. Part I: Theoretical study of Norton-Beer apodization functions*. Appl. Spectrosc., **52**(11): 1403–1408, 1998.
- [150] T. HIRSCHFELD: *Quantitative FT-IR: A detailed look at the problems involved*. In: J.R. FERRARO und L.J. BASILE (Herausgeber): *Fourier transform infrared spectroscopy, applications to chemical systems*, Band **2**, Seiten 193–242. Academic Press, New York, 1979.
- [151] ANDRUSSOW: *Zahlenwerte und Funktionen aus Physik, Chemie, Astronomie, Geophysik, Technik: Diffusion in Flüssigkeiten*, Band **II./5a**. Landolt Börnstein, 6. Auflage, 1969.
- [152] R.J. BELL: *Introductory Fourier transform spectroscopy*. Academic Press, New York and London, 1972.
- [153] H.P. YOZGATLI: *Unsicherheitsbilanzen in der quantitativen FT-IR-Spektroskopie*. Doktorarbeit, Humboldt Universität zu Berlin, 2002.
- [154] A.J.M. SCHOONEN und K.J.C. WIENTJES: *Glucose transport in adipose tissue*. Sens. Actuators, B, **105**: 60–64, 2005.
- [155] J.D. ZAHN, D. TREBOTICH und D. LIEPMANN: *Microdialysis microneedles for continuous medical monitoring*. Biomed. Microdev., **7**(1): 59–69, 2005.
- [156] J.L. BURGUERA: *Flow injection atomic spectroscopy*. Marcel Dekker, 1989.
- [157] J.R. GAVIN ET AL: *Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus*. Diabetes Care, **26**(1): S5–S20, 2003.
- [158] W.L. CLARKE, D. COX, L.A. GONDER-FREDERICK, W. CARTER und S.L. POHL: *Evaluating clinical accuracy of systems for self-monitoring of blood glucose*. Diabetes Care, **10**: 622–628, 1987.

- [159] J.N. ROE und B.R. SMOLLER: *Bloodless glucose measurements*. Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst., **15**(3): 199–241, 1998.
- [160] F. STERNBERG, C. MEYERHOFF, F.J. MENNEL, F. BISCHOF und E.F. PFEIFFER: *Subcutaneous glucose concentration in humans. Real estimation and continuous monitoring*. Diabetes Care, **18**(9): 1266–1269, 1995.
- [161] N.J. CAPLIN, P. O’LEARY, M. BULSARA, E.A. DAVIS und T.W. JONES: *Subcutaneous glucose sensor values closely parallel blood glucose during insulin-induced hypoglycaemia*. Diabetic Medicine, **20**(3): 238–241, 2003.
- [162] P.J. STOUT, J.R. RACCHINI und M.E. HILGERS: *A novel approach to mitigating the physiological lag between blood and interstitial fluid glucose measurements*. Diabetes Technol. Ther., **6**(5): 635–644, 2004.
- [163] C. MEYERHOFF, F. BISCHOF, F. STERNBERG, H. ZIER und E.F. PFEIFFER: *On line continuous monitoring of subcutaneous tissue glucose in men by combining portable glucosensor with microdialysis*. Diabetologia, **35**(11): 1087–1092, 1992.
- [164] C. MEYERHOFF, F.J. MENNEL, F. BISCHOF, F. STERNBERG und E.F. PFEIFFER: *Combination of microdialysis and glucose sensor for continuous on line measurement of the subcutaneous glucose concentration: Theory and practical application*. Horm. Metab. Res., **26**(11): 538–543, 1994.
- [165] H.W. VESPER, P.M. WANG, E. ARCHIBOLD, M.R. PRAUSNITZ und G.L. MYERS: *Assessment of trueness of a glucose monitor using interstitial fluid and whole blood as specimen matrix*. Diabetes Technol. Ther., **8**(1): 76–80, 2006.

Lebenslauf

Name: Uwe Damm
Geboren: 03.06.1971 in Lippstadt

Schulische Laufbahn

06/1977 – 06/1981 Grundschule Rüthen
07/1981 – 06/1991 Städtisches Gymnasium Rüthen
07/1991 – 09/1992 Zivildienst beim Bund Deutscher Pfadfinder, Dortmund

Studium

10/1992 – 09/2002 Studium der Physik, Universität Dortmund
10/2001 – 09/2002 Diplomarbeit: 'Optische Frequenzverdopplung und magnetooptische Spektroskopie'
05/2003 – Heute Wissenschaftlicher Mitarbeiter am ISAS in Dortmund
Dissertation: 'Fortschritte in der Infrarotspektroskopie für die in-vivo Blutglucoseanalytik'