

**Spektroskopische Untersuchungen**  
**an Kammerwasser:**  
*in vitro* und *in vivo*

**Dissertation**

zur Erlangung des  
Naturwissenschaftlichen Doktorgrades  
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

**Petra Meuer**

aus

Bremen

Würzburg 2002

Eingereicht am: .....  
bei der Fakultät für Chemie und Pharmazie

1. Gutachter: .....  
2. Gutachter: .....  
der Dissertation

1. Prüfer: .....  
2. Prüfer: .....  
der mündlichen Prüfung

Tag der mündlichen Prüfung: .....

Doktorurkunde ausgehändigt am: .....





# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Das Auge als spektroskopische Zelle</b>	<b>5</b>
2.1	Die Hornhaut . . . . .	5
2.2	Die Vorderkammer . . . . .	6
2.3	Das Kammerwasser . . . . .	10
2.4	Strahlengänge durch die Vorderkammer . . . . .	13
2.4.1	Die Purkinje-Sanson-Bilder . . . . .	15
2.5	Strahlenbelastung . . . . .	16
2.6	Klinische Studien am Kammerwasser . . . . .	17
<b>3</b>	<b>UV-spektroskopische Untersuchungen</b>	<b>21</b>
3.1	Spektroskopische Grundlagen . . . . .	21
3.2	Experimenteller Aufbau . . . . .	22
3.3	<i>In-vitro</i> -Messungen . . . . .	24
3.4	<i>In-vivo</i> -Detektion von Fluorescein . . . . .	29
<b>4</b>	<b>NIR-spektroskopische Untersuchungen</b>	<b>33</b>
4.1	Motivation: Diabetes mellitus . . . . .	33
4.2	Methoden der Blutglucose-Bestimmung . . . . .	36
4.2.1	Invasive und minimal-invasive Sensoren . . . . .	40
4.2.2	Nicht-invasive Sensoren . . . . .	42
4.2.3	NIR-Spektroskopie . . . . .	45
4.3	Experimenteller Aufbau . . . . .	48
4.3.1	Aufbau des FT-Spektrometers . . . . .	48
4.3.2	Dispersiver Aufbau . . . . .	51

4.3.3	Externe Messungen . . . . .	53
4.3.4	<i>In-vivo</i> -Aufbau . . . . .	56
4.4	Chemikalien und Referenz-Analytik . . . . .	57
4.5	NIR-Spektren . . . . .	62
4.5.1	Wasser . . . . .	62
4.5.2	Glucose . . . . .	65
4.5.3	Milchsäure, Ascorbinsäure und Harnstoff . . . . .	69
4.6	Statistische Auswertung . . . . .	73
4.6.1	Das Lambert-Beer'sche Gesetz . . . . .	74
4.6.2	Multivariate Kalibrierung . . . . .	76
4.6.3	Daten-Vorbehandlung . . . . .	83
4.6.4	Wellenzahl-Selektion . . . . .	85
4.6.5	Programme . . . . .	87
4.6.6	$2^3$ -Faktorenversuchsplan . . . . .	89
4.7	<i>In-vivo</i> -Glucose-Bestimmung . . . . .	91
4.7.1	FT-NIR-Messungen . . . . .	92
4.7.2	Dispersive NIR-Messungen . . . . .	95
4.7.3	Monitorstrahlengang . . . . .	98
4.8	<i>In-vitro</i> -Glucose-Bestimmung . . . . .	100
4.8.1	Externe Messungen . . . . .	100
4.8.2	Dispersive NIR-Messungen . . . . .	110
4.9	<i>In-vitro</i> -FT-NIR-Messungen . . . . .	113
4.9.1	Vorbehandlungen . . . . .	122
4.9.2	Wellenzahl-Selektion . . . . .	127
4.9.3	Reproduzierbarkeit der Ergebnisse . . . . .	130
4.9.4	Stabilität des FT-Spektrometers (Vector22/N-C) . . . . .	134
4.9.5	Einfluss der Querempfindlichkeiten . . . . .	149
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>155</b>
<b>6</b>	<b>Summary</b>	<b>163</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>169</b>

<b>A</b>	<b>Messparameter für das Vector22/N-C (Bruker)</b>	<b>183</b>
<b>B</b>	<b>Proben-Bezeichnungen der Glucose-Lösungen</b>	<b>185</b>
B.1	Proben für das FT-Spektrometer MB 160 . . . . .	185
B.2	Proben für das InfraPrime und InfraProver . . . . .	186
B.3	Proben für das V 570 . . . . .	187
B.4	Proben für die dispersiven NIR-Messungen . . . . .	188
B.5	Proben für die FT-NIR-Messungen . . . . .	188
B.6	Proben für die Bestimmung der Reproduzierbarkeit . . . . .	190



# Abkürzungsverzeichnis

## Medizinische Begriffe

ADA	<i>American Diabetic Association</i>
DCCT	<i>Diabetes Control and Complications Trial</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
IDDM	<i>Insulin Dependent Diabetes Mellitus</i> (Insulin abhängiger Diabetes mellitus)
NIDDM	<i>Non Insulin Dependent Diabetes Mellitus</i> (Nicht Insulin abhängiger Diabetes mellitus)
O. G-T.	oraler Glucose-Toleranztest
BP	Blutplasma
KW	Kammerwasser
VK	Vorderkammer
dpt	Dioptrien

## Methoden und Geräte

IR	Infrarot
NIR	Nahes Infrarot
MIR	Mittleres Infrarot
ATR	<i>Attenuated Total Reflection</i>
FT	Fourier Transformation
AOTF	<i>Acousto-optical-tunable-filter</i> (Akusto-optisches durchstimmbares Filter)

### Substanzen

ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
ADP	Adenosin-5'-Diphosphat
NADP <sup>+</sup>	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
NADPH	Dihydro-Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat

### Chemometrik

MLR	<i>Multiple Linear Regression</i> (multiple lineare Regression)
PCR	<i>Principal Component Regression</i> (Hauptkomponentenregression)
PLS	<i>Partial Least Square Regression</i>
TS	<i>Tabu-Search</i>
REM	<i>Reverse Elimination Method</i>
CV	<i>Crossvalidation</i> (Kreuzvalidierung)
LOO-CV	<i>leave-one-out-Kreuzvalidierung</i>
LMO-CV	<i>leave-multiple-out-Kreuzvalidierung</i>
MDL	<i>Minimum Description Length</i>
SEP	<i>Square Error of Prediction</i> (quadratischer Vorhersagefehler)
MSEP	<i>Mean Square Error of Prediction</i> (mittlerer quadratischer Vorhersagefehler)
RMSEP	<i>Root Mean Square Error of Prediction</i> (mittlerer Vorhersagefehler)
SSE	<i>Sum of Square Errors</i> (Summe der Fehlerquadrate)
MSC	<i>Multiplicative Scatter Correction</i> (multiplikative Streulicht-Korrektur)
SNV	<i>Standard Normal Deviate</i>

# 1 Einleitung

Für die heutige Medizin sind genaue Analysemethoden von unschätzbarem Wert. Besonders der Bereich der nicht-invasiven Diagnostik nimmt einen immer größeren Stellenwert ein. Die Vorteile der nicht-invasiven Methoden liegen dabei auf der Hand, sie sind schmerzfrei und schnell, da sie nicht auf die Entnahme einer Körperflüssigkeit angewiesen sind. Von besonderem Interesse ist der Nachweis bzw. das Monitoring von körperfremden sowie von körpereigenen Stoffen.

Zu den körpereigenen Stoffen gehören z.B. Glucose, Lactat und die Sauerstoffsättigung des Blutes, also alle Bestandteile des Blutes, die routinemäßig bestimmt werden. Einen besonderen Stellenwert hat die Glucose. Allein in Deutschland leben etwa 5 bis 8 Millionen Diabetiker, die ihre Blutglucosewerte ständig überprüfen müssen. [1] Bisher ist eine Bestimmung des Blutglucosewertes mit Selbstmessgeräten nur invasiv über die Entnahme von Blut aus der Fingerbeere möglich. Dies ist ein schmerzhafter Prozess, der aufgrund seiner Häufigkeit im Laufe der Jahre zu Sensibilitätsstörungen führen kann. Daher ist es für diese Patienten-Gruppe von besonderem Interesse, dass eine nicht-invasive Methode gefunden wird. Diese Methode sollte natürlich eine schmerzfreie Bestimmung ermöglichen, aber auch schnell und kontaktlos sein. Idealerweise sollte sogar eine kontinuierliche Messung möglich sein.

Es gibt viele Ansätze für eine nicht-invasive Glucose-Bestimmung. Die meisten beruhen auf den Methoden der optischen Spektroskopie. [2–10] Die optische Spektroskopie und speziell die Schwingungs-Spektroskopie zeichnen sich durch kurze Messzeiten aus und die verwendete Strahlung liegt in Bereichen, die eine zerstörungsfreie Messung ohne Schädigung des untersuchten Gewebes ermöglichen. Untersuchungen zur nicht-invasiven Glucose-Bestimmung wurden bereits mit verschiedenen optischen Methoden durchgeführt. Dazu zählen Absorptions- und Transmissions-Messungen im nahen [11–21] und mittleren Infrarot [8, 22–24] genauso wie photoakustische Messungen [6, 25, 26], die Anwendung der Raman-Spektroskopie [3, 8, 27–35], po-

larimetrische Messungen [3, 8, 36–40] und die Messung der Lichtstreuung [41–43].

Nicht-invasive Messungen können nur an exponierten Stellen am Körper durchgeführt werden, die Informationen über die gesuchte Substanz enthalten und leicht zugänglich sind. Eine solche Stelle bzw. eher Fläche stellt die menschliche Haut dar. Die Haut besteht zu einem großen Prozentsatz aus interstitieller Flüssigkeit. Unter physiologischen Bedingungen findet ein schneller, ungehinderter Glucose-Austausch zwischen Blutplasma und interstitieller Flüssigkeit statt, was eine hohe Korrelation der Konzentrationsänderungen in den beiden Medien bedingt. [9, 44] Akkurate Messungen an der Haut werden allerdings dadurch limitiert, dass die Haut sehr komplex aufgebaut ist und sich beständig an die äußeren Gegebenheiten anpasst. [2, 5, 45]

Neben der Haut zeigt auch das menschliche Auge sehr vielversprechende Charakteristika für nicht-invasive Studien. [46–48] Die Vorderkammer des Auges enthält eine klare, wässrige Flüssigkeit, das Kammerwasser. Das Kammerwasser ist eine Art Ultrafiltrat des Blutes. Alle Substanzen, die die Blut–Kammerwasser-Schranke überwinden können, sind daher im Kammerwasser bestimmbar. Die Vorderkammer wird nach außen von der Hornhaut begrenzt, welche u. a. für Strahlung im NIR- und UV/VIS-Bereich durchlässig ist. Die Vorderkammer bildet daher mit der Hornhaut als optischem Fenster eine ideale *In-vivo*-Küvette für spektroskopische *In-vivo*-Messungen. Das Potential der NIR-spektroskopischen Glucose-Bestimmung konnte bereits an den bisherigen Arbeiten gezeigt werden und bietet sich aus diesem Grund für die nicht-invasive Bestimmung im Auge an.

Neben der Analyse körpereigener Stoffe ist auch die Bestimmung von körperfremden Stoffen von Interesse. Zu den körperfremden Substanzen können ganz allgemein alle Medikamente und Drogen gezählt werden, die dem Körper von außen zugeführt werden. Die Anwendung nicht-invasiver Methoden wäre vor allem im Bereich des Drogenscreenings, der Bestimmung der Pharmakokinetik gewisser Medikamente und für die kontinuierliche Patienten-Überwachung interessant. Fast alle synthetischen Stoffe die dem Körper zugeführt werden, können im Blut qualitativ und quantitativ bestimmt werden, wobei die Blutabnahme ein invasiver Eingriff ist. Eine Alternative stellen Urin-Untersuchungen dar. Diese Untersuchungen unterliegen einer zeitlichen Verzögerung, da der gesuchte Stoff erst metabolisiert und umgesetzt werden muss. Auch sind nicht alle Stoffe aus dem Blut im Urin nachweisbar.

Nicht-invasive Messungen, vor allem wenn sie neben schmerzfrei auch schnell,

---

einfach und am besten quantitativ genau sind, würden in diesen Bereichen eine wünschenswerte Entwicklung bedeuten. Einige nicht-invasive Tests gibt es bereits. Der bekannteste ist wahrscheinlich der Alkohol-Schnelltest, der neben der qualitativen Bestimmung auch eine erste Aussage über die vorliegende Quantität erlaubt. Ein sehr neuer Wischtest ermöglicht den Nachweis von Partydrogen, wie Opiate, Kokain, Amphetamine und Cannabis im Schweiß bzw. Speichel. Die eingesetzten Methoden erlauben den spezifischen Nachweis bestimmter Stoffe durch die Verwendung optimierter Testsubstanzen bzw. Teststreifen.

Ein anderer Ansatz ist die spektroskopische Bestimmung dieser Stoffe. Viele der eingesetzten Medikamente und Drogen zeigen aufgrund ihrer chemischen Struktur charakteristische UV/VIS-Absorptions-Spektren, die nicht nur einen qualitativen Nachweis, sondern über die Intensität der Signale auch eine quantitative Bestimmung erlauben. Daher soll in dieser Arbeit eine Methode zur nicht-invasiven Bestimmung verschiedener Stoffe mittels der UV/VIS-Absorptions-Spektroskopie gefunden werden.

Es bietet sich daher an, die körperfremden Stoffe aufgrund ihrer chemischen Struktur UV/VIS-spektroskopisch und die körpereigenen Stoffe, vor allem Glucose, NIR-spektroskopisch zu untersuchen. In dieser Arbeit sollen die Voraussetzungen geschaffen werden, um nicht-invasive Messungen des Kammerwassers mit Hilfe der UV/VIS- und NIR-Spektroskopie zu ermöglichen. Dazu zählt vor allem die Geräte-technische Umsetzung und Entwicklung einer geeigneten Auswertungsstrategie. Parallel dazu sollen in Zusammenarbeit mit der Universitätsaugenklinik Würzburg aktuelle Studien über die Zusammensetzung des Kammerwassers in Bezug auf Blutplasma und der zeitliche Rahmen der Migration der Stoffe vom Blut in das Kammerwasser durchgeführt werden.



## 2 Das Auge als spektroskopische Zelle

Nicht-invasive *In-vivo*-Messungen können nur an exponierten Stellen am menschlichen Körper durchgeführt werden. Diese Stellen müssen zum einen leicht zugänglich sein und zum anderen Glucose in messbaren Konzentrationen enthalten. Das menschliche Auge zeigt sehr vielversprechende Charakteristika für solche Studien. Das folgende Kapitel gibt einen Überblick über die Voraussetzungen, die das Auge als spektroskopische Zelle mitbringt. Dazu werden Anatomie, Geometrie und Physiologie des Auges erläutert sowie verschiedene Ansätze für nicht-invasive Messungen am Auge vorgestellt.

### 2.1 Die Hornhaut

Das menschliche Auge ist sehr komplex. Einen Überblick bietet der schematische Querschnitt in Abb. 2.1.

Vereinfacht besteht das Auge aus der Hornhaut, der Linse, dem Glaskörper, der Netzhaut und dem Sehnerv. Zwischen der Linse und der Hornhaut befindet sich die Vorderkammer. Diese kann für spektroskopische Messungen als *In-vivo*-Zelle genutzt werden, allerdings nur solange die Transparenz der Hornhaut für die verwendete Strahlung gegeben ist.

Die Hornhaut (Cornea) bildet den äußeren Abschluss des Auges und ist dreischichtig aufgebaut. [50, 51] Die Cornea ist im Zentrum 0,5–0,6 mm dick, nach außen hin verdickt sie sich bis auf 1 mm. Das Hornhautendothel ist für die präzise Steuerung des physiologischen Quellzustands der Hornhaut verantwortlich. Jede Störung der Endothelzellfunktion bzw. jede Störung der regelmäßigen Anordnung der Kollagenfibrillen führt zu einer Eintrübung der Hornhaut und damit zur Änderung aller optischen Eigenschaften der Hornhaut.

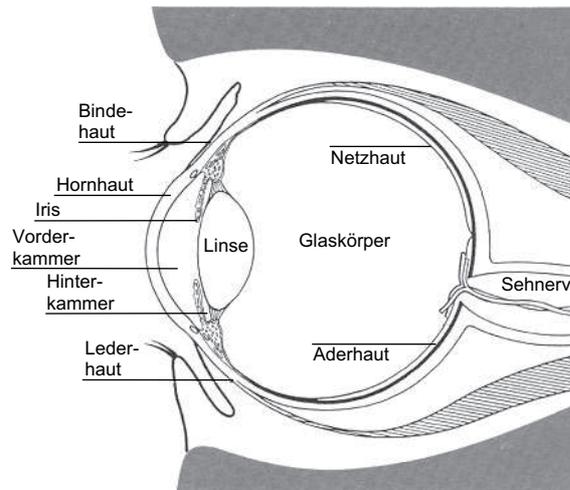


Abb. 2.1: Querschnitt durch das menschliche Auge. [49]

Neben ihrer Stabilität ist ihre Transparenz für sichtbares Licht die wichtigste Eigenschaft der Hornhaut. Sie ist für sichtbares Licht ab einer Wellenlänge von 300 nm transparent. Im langwelligen Bereich wird die Transmission durch die Wasser-Banden begrenzt. In Abb. 2.2 sind Transmissionskurven von isolierter Hornhaut dargestellt. [52] Die obere Linie (—) zeigt die Kurve für eine Messung in totaler Reflexion, die beiden unteren die Kurven für Messungen in Transmission. Der Vergleich der Transmissionskurve der Hornhaut eines 53-jährigen (-.-) mit der eines 4,5-jährigen (- -) zeigt, dass die Transmission und damit die Transparenz der Hornhaut mit zunehmendem Alter abnimmt, besonders im kurzwelligen Bereich.

Die Kollagenfasern in der Hornhaut sind sehr regelmäßig angeordnet. Sie bilden ein Gitter von Streuzentren, welches nur in Strahlrichtung konstruktive Interferenz der gestreuten Wellen zulässt und dadurch einerseits der Hornhaut ihre Transparenz verleiht aber andererseits auch zu deren doppelbrechenden Eigenschaften führt. [53] Zudem wird polarisiertes Licht abhängig von der Dicke der durchstrahlten Hornhaut in seiner Polarisationsrichtung gedreht.

## 2.2 Die Vorderkammer

Die Vorderkammer des Auges ist ein von Hornhaut, Kammerwinkel, Regenbogenhaut (Iris) und Linse begrenzter, flüssigkeitsgefüllter Raum. Das enthaltene Kam-

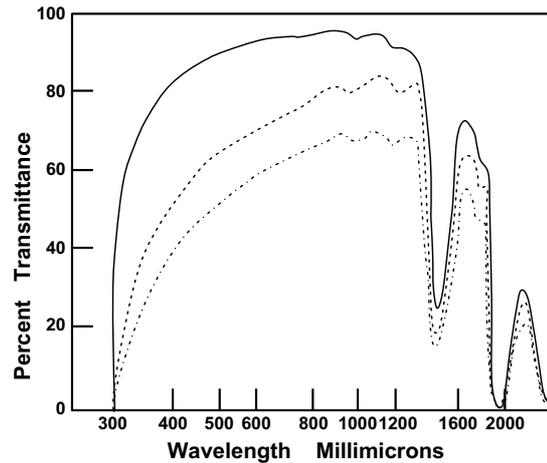


Abb. 2.2: Transmissionskurve der menschlichen Hornhaut, gemessen an einer Spenderhornhaut — gesamte Transmission; - - direkte Transmission (4,5-jähriger); ··· direkte Transmission (53-jähriger). (nach Boettner [52])

merwasser zirkuliert von der Hinterkammer in die Vorderkammer. Die Hinterkammer wird vorne von der Iris, seitlich vom Ziliarkörper und hinten von der Linse begrenzt. Das Kammerwasser ist eine für nah-ultraviolettes bis nah-infrarotes Licht klare Flüssigkeit, wie die Transmissionskurve [52] in Abb. 2.3 zeigt.

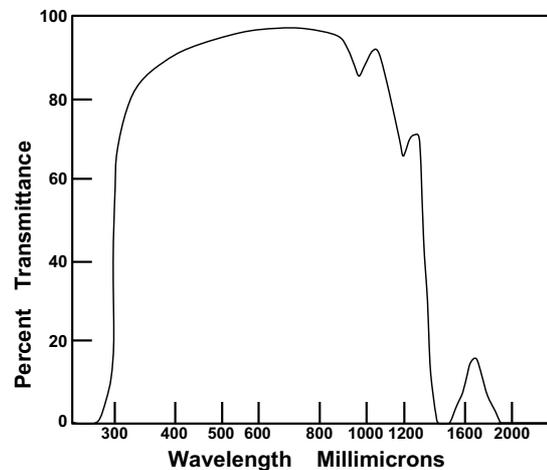


Abb. 2.3: Transmissionskurve des Kammerwassers nach [52].

Der zentrale Hornhaut-Krümmungsradius beträgt im normalsichtigen (emmetrophen) Auge ca. 8,0 mm, die Vorderkammertiefe ca. 3,1 mm (s. Abb. 2.4) und der Horn-

hautdurchmesser ca. 11 mm. Das durchschnittliche Vorderkammervolumen wird mit 0,25 ml, das der Hinterkammer mit 0,06 ml angegeben. [54,55] Diese Angaben gelten strenggenommen nur für junge Menschen, da sich das Vorderkammervolumen mit zunehmendem Alter auf Grund der dicker werdenden Linse reduziert.

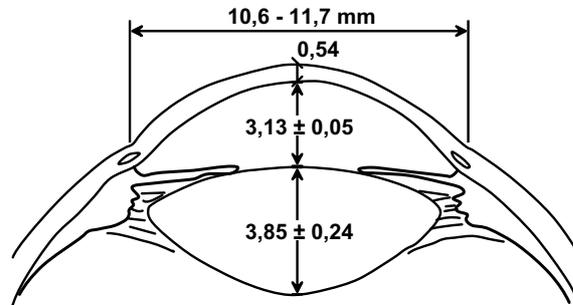


Abb. 2.4: Abmessungen der Vorderkammer. [56, 57]

Die Vorderkammertiefe lässt sich heute mit üblichen Ultraschallverfahren mit einer axialen Auflösung von  $\pm 0,187$  mm ermitteln. Die mittlere Vorderkammertiefe wurde so mit  $3,13 \pm 0,50$  mm [57,58] bestimmt (s. Abb. 2.4). Die Vorderkammertiefe wird durch einen vorliegenden Sehfehler beeinflusst. Hyperope (weitsichtig) Augen zeigen eher flachere, myope (kurzsichtig) Augen eine eher tiefere Vorderkammer. Die mittlere Vorderkammertiefe liegt für hyperope Augen bei 2,69 mm und für myope Augen bei 3,14 mm. [59]

Neben diesen anatomischen Gegebenheiten wird die Vorderkammergeometrie auch durch den Akkommodationszustand des Auges bestimmt. Die Akkommodation bezeichnet die Fähigkeit des Auges zur Scharfeinstellung bzw. -abbildung von beobachteten Gegenständen auf der Netzhautenebene in Relation zur jeweiligen Beobachtungsentfernung. Diese Fähigkeit beruht auf der Umwandlungsfähigkeit der elastischen Linse von der Kugelform (hohe Brechkraft, Naheinstellung) zur Ellipsenform (geringe Brechkraft, Ferneinstellung), die eine Änderung der Vorderkammertiefe nach sich zieht.

Die Änderungen der Vorderkammertiefe wurden bereits 1909 von Gullstrand [60] erfasst. Dieser entwickelte aus den zum damaligen Zeitpunkt bekannten Ergebnisse der optischen und geometrischen Eigenschaften des Auges ein schematisches Auge. Die Gullstrandschen Werte für das schematische Auge im akkomodierten und

desakkomodierten Zustand sind in Tab. 2.1 zusammengestellt.

Tab. 2.1: Die Gullstrandschen Werte für das 'schematische Auge'. [60]

	max. desakkomodiert	max. akkomodiert
<b>Brechungsindices</b> ( $n_D^{36}$ )		
Hornhaut	1,376	1,376
Kammerwasser und Glaskörper	1,336	1,336
Linse (am Rand)	1,386	1,386
Linse (in der Mitte)	1,41	
<b>Dimensionen</b> [mm]		
Hornhautdicke	0,5	0,5
Vorderkammertiefe	3,1	2,7
<b>Krümmungsradien</b> [mm]		
Vordere Hornhautfläche	7,7	7,7
Hintere Hornhautfläche	6,8	6,8
Vordere Linsenfläche	10,0	5,33
Hintere Linsenfläche	-6	-5,33

Heutzutage ermöglicht es die hochauflösende Ultraschallbiomikroskopie, die Vorderkammertiefe genau zu vermessen. Dabei wurde gezeigt, dass sich die Vorderkammertiefe bei einer Akkommodation von 8 dpt um 0,24 mm verringert. [61] Dieser Effekt muss bei Messungen in der Vorderkammer berücksichtigt werden. Während der Messungen muss das Auge im gleichen Akkommodationszustand verbleiben.

Ein weiterer wichtiger Aspekt ist die Temperaturkonstanz der Probe, da die NIR-Absorption wässriger Systeme stark temperaturabhängig ist. Die Vorderkammer wird innen durch die gefäßreiche Iris und außen durch die gefäßlose Hornhaut begrenzt, die zusätzlich durch den Tränenfilm gekühlt wird. Dadurch entsteht ein Temperaturgradient innerhalb der Vorderkammer. Dieser Temperaturgradient wird teilweise durch die Kammerwasserzirkulation (s. Abb. 2.5) und den Lidschluss kompensiert. Im Kaninchenauge beträgt er 0,5–1,0°C. [62] Auch die Außentemperatur hat Einfluss auf die VK-Temperatur, ebenso wie Entzündungen. [63, 64] Junge

Menschen (10 Jahre) haben an der Oberfläche der Hornhaut eine Temperatur von  $34,0^{\circ}\text{C}$ , die mit steigendem Alter abnimmt (80 Jahre,  $32,5^{\circ}\text{C}$ ). [65] Unter normalen Bedingungen ist die VK recht gut temperaturreguliert. Erst extreme Temperaturgradienten zwischen Körpertemperatur und Außentemperatur von etwa  $40^{\circ}\text{C}$  bewirken einen Temperaturabfall von  $0,6^{\circ}\text{C}/\text{min}$  in der VK. [63, 64] Bei einer Messung bei Raumtemperatur unter der Bedingung, dass der Patient die Augen zwischen den Messungen geschlossen hält, sollte sich die Temperaturschwankung auf weniger als  $0,1^{\circ}\text{C}$  minimieren.

Neben den geometrischen und anatomischen Gegebenheiten des Auges ist es für eine potentielle Messung wichtig, die chemische Zusammensetzung der Probe, hier des Kammerwassers, zu kennen.

## 2.3 Das Kammerwasser

Die Vorderkammer des Auges ist mit einer klaren, farblosen, wässrigen Lösung gefüllt, dem Kammerwasser (KW). Das Kammerwasser erfüllt verschiedene Aufgaben: Es transportiert Sauerstoff und Nährstoffe zur Augenlinse, transportiert die Stoffwechselabfälle der Linse ab, reguliert den Augeninnendruck und dient damit dem Erhalt der Form des Auges. Gebildet wird das Kammerwasser im Ziliarepithel und zirkuliert dann aus der Hinterkammer durch die Vorderkammer, um dann im Trabekelwerk des Kammerwinkels resorbiert zu werden (s. Abb. 2.5). [51]

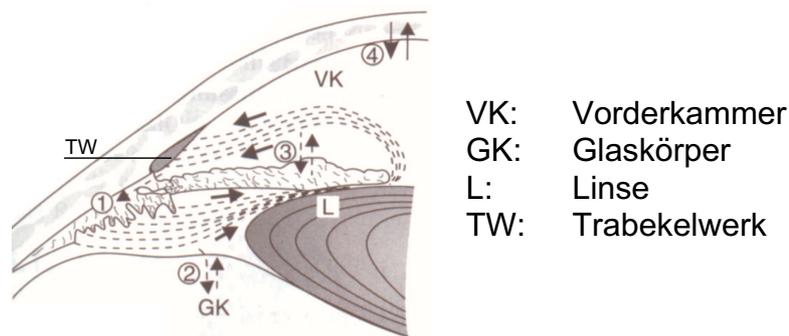


Abb. 2.5: Zirkulation des Kammerwassers durch Hinter- und Vorderkammer: Hauptabfluss über das Trabekelwerk, Nebenwege verlaufen (1) uveoskleral, (2) über den Glaskörper, (3) die Iris und (4) die Hornhaut. [51]

Die Kammerwasserproduktion beginnt mit einer Ultrafiltration des Blutplasmas in den Extrazellulärräumen des Ziliarkörpers. Das Ziliarepithel erhöht dabei die Konzentration einzelner Komponenten des Kammerwassers durch aktive Sekretion. So sind für Natrium, Kalium, Ascorbinsäure, Bicarbonat und einige Aminosäuren aktive Transportvorgänge nachgewiesen. [54,66] Die übrigen Komponenten, wie zum Beispiel Glucose, folgen dem osmotischen Gefälle. Auf dem Weg zum Trabekelwerk nimmt der Glucosespiegel von der Hinterkammer zur Vorderkammer des Auges um 6 % ab. [67] Dies kann durch die Glucosemetabolisierung der angrenzenden Gewebe (Linse und Hornhaut) und durch Diffusion in den Glaskörper erklärt werden. [68]

Das Kammerwasser wird beständig erneuert. Bei Diabetikern geschieht dies mit einer Rate von  $1,26 \pm 0,39$  bis  $1,55 \pm 0,32 \mu\text{l}/\text{min}$  und bei Nicht-Diabetikern mit  $2,18 \pm 0,40 \mu\text{l}/\text{min}$ . [37] Das Gesamtvolumen des Kammerwasser beträgt ca.  $250 \mu\text{l}$ . Daher werden pro Minute etwa 1 % des Vorder- und 3 % des Hinterkammerwassers umgesetzt. Das gesamte Kammerwasser wird in etwa 1,5 bis 3 Stunden komplett ausgetauscht.

Um nicht-invasive Messungen am Auge durchführen zu können, muss die Glucosekonzentration des Kammerwassers im Vergleich zum Blut bekannt sein. Pohjola [69] bestimmte die Kammerwasser-Konzentration mit 70 % der des Blutes. Zwei aktuelle Studien werden im Kap. 2.6 vorgestellt. Veränderungen des Blutglucosespiegels lassen sich erst mit einer gewissen Verzögerung im Kammerwasser nachweisen. Die zeitliche Differenz liegt bei etwa 20 bis 30 min. [70, 71]

Das Kammerwasser enthält verschiedene organische und anorganische Bestandteile. Da das Kammerwasser nur durch einen invasiven Eingriff gewonnen werden kann, gibt es nur wenige Studien am Menschen im Vergleich zu einer Vielzahl von Studien an Tieren. In Tab. 2.2 sind die Konzentrationen der Inhaltsstoffe des Kammerwassers im Vergleich zu denen des Blutplasmas angegeben.

Von besonderem Interesse neben Glucose sind für nicht-invasive Messungen Lactat, Ascorbat und Harnstoff. Diese Stoffe können Querempfindlichkeiten bei den Messungen hervorrufen, da sie in ähnlichen spektralen Bereichen absorbieren. Außerdem liegen sie in relativ hohen Konzentrationen im Kammerwasser vor.

Lactat gehört zu den Endprodukten des Glucosestoffwechsels und wird nicht weiter metabolisiert. Das Lactat im Kammerwasser stammt aus dem glycolytischen Abbau im Ziliarkörper und in der Retina. Es diffundiert aus dem Ziliarkörper in

Tab. 2.2: Konzentrationen von organischen und anorganischen Bestandteilen des Kammerwassers (nach Sears [66]).

Substanz	Einheit	Vorderkammer	Blutplasma	Spezies	Jahr der Messung
H <sup>+</sup>	pH	7,49		Affe	1979 [72]
Sauerstoff	mmHg	53		Mensch	1959 [73]
Hydrogencarbonat	$\mu\text{mol} / \text{ml}$	20,2	27,5	Mensch	1965 [74]
Chlorid	$\mu\text{mol} / \text{ml}$	124,8–131	107–124	Mensch	1956 [75], 1965 [74], 1979 [72]
Phosphat	$\mu\text{mol} / \text{ml}$	0,62	1,11	Mensch	1933 [76]
Calcium	$\mu\text{mol} / \text{ml}$	2,5	4,9	Affe	1970 [77]
Magnesium	$\mu\text{mol} / \text{ml}$	0,8–1,2	0,7–1,2	Affe	1970 [77], 1979 [72]
Kalium	$\mu\text{mol} / \text{ml}$	3,6–3,9	4,0–4,2	Affe	1970 [77], 1979 [72]
Natrium	$\mu\text{mol} / \text{ml}$	152	148	Affe	1979 [72]
Ascorbat	$\mu\text{mol} / \text{ml}$	1,06	0,04	Mensch	1965 [74]
Citrat	$\mu\text{mol} / \text{ml}$	0,12		Mensch	1937 [78]
Creatinin	$\mu\text{mol} / \text{ml}$	0,04	0,03	Affe	1979 [72]
Glucose	$\mu\text{mol} / \text{ml}$	2,8	5,9	Mensch	1965 [74]
Hyaluronat	$\mu\text{g} / \text{dl}$	1,1		Mensch	1981 [79]
Lactat	$\mu\text{mol} / \text{ml}$	4,5	1,9	Mensch	1965 [74]
Protein	mg / dl	13,5–23,7		Mensch	1982 [80]
Harnstoff	$\mu\text{mol} / \text{ml}$	6,1	7,3	Affe	1979 [72]

die Hinterkammer. Dort entspricht die Lactat-Konzentration nahezu der im Plasma. Allerdings transportiert das Kammerwasser auf dem Weg in die Vorderkammer die Stoffwechselprodukte der Linse, der Iris, der Hornhaut und des Glaskörpers ab. Dazu gehört auch Lactat, das sich dadurch im Kammerwasser anreichert. [81] In der Vorderkammer findet sich eine gegenüber dem Plasma um den Faktor 2,4 erhöhte Lactat-Konzentration.

Die Ascorbat-Konzentration im Kammerwasser ist gegenüber der im Blutplasma stark erhöht (Faktor 26,5). Der Grund dafür ist bislang nicht bekannt. Es könnte als Antioxidanz wirken oder auch einen Teil der UV-Strahlung absorbieren. [82] Diese Hypothese wird gestützt durch die Tatsache, dass die Ascorbat-Konzentration im Kammerwasser tagaktiver Tiere etwa dem 35-fachen von nachtaktiven Tieren entspricht. [83]

Die Harnstoff-Konzentration im Kammerwasser entspricht fast der im Plasma. Harnstoff hat keine spezielle Funktion im Kammerwasser. Es ist im Blut vorhanden und kann die Blut-Kammerwasser-Schranke überwinden.

## 2.4 Strahlengänge durch die Vorderkammer

Für spektroskopische Untersuchungen des Kammerwassers direkt in der Vorderkammer muss Licht in die Vorderkammer eingestrahlt werden, mit dem Kammerwasser wechselwirken und zur Analyse wieder aus der Vorderkammer ausgekoppelt werden. Außerdem sollte dieser Strahlengang eine reproduzierbare, konstante Schichtdicke aufweisen. In Abb. 2.6 sind drei denkbare Strahlengänge für die spektroskopische Kammerwasser-Untersuchung dargestellt.

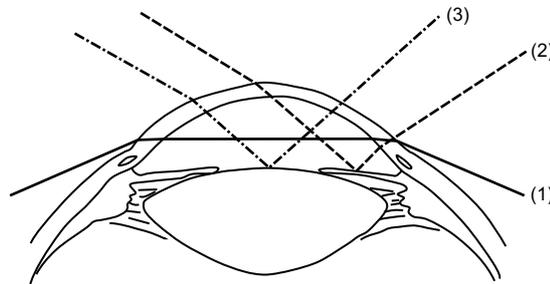


Abb. 2.6: Mögliche Strahlengänge durch die Vorderkammer: (1) transversale Durchleuchtung der VK, (2) Reflexion an der Iris, (3) Reflexion an der Linsenvorderfläche.

**Transversale Durchleuchtung :** Betrachtet man das isolierte, extrahierte Auge, so erscheint dieser Strahlengang (1) in Abb. 2.6 durchaus ausführbar. Aus geometrisch-optischen und anatomischen Gründen ist dieser Strahlengang für kontaktlose Messungen nicht realisierbar, da das Auge nicht isoliert vorliegt, sondern

im Schädel verankert ist. Der ein- oder ausgekoppelte Strahl würde somit zunächst auf die Nase treffen und müsste dort erst umgelenkt werden.

Wird dieser Strahlengang mittels eines Raytracing Programmes (Optics Lab) und den Gullstrandschen Daten für die Hornhaut (Tab. 2.1) simuliert, so zeigt sich, dass er erst bei einem Hornhautdurchmesser von 20 mm realisierbar ist. Der tatsächliche Durchmesser ist 12 mm. Ohne Kontaktglas könnte der ins Auge einfallende Strahl nicht wieder ausgekoppelt werden. Die Strahlenrekonstruktionen des transversalen Strahlengangs für ein reales Auge mit einem Hornhautdurchmesser von 12 mm und für ein theoretisches Auge mit einem Hornhautdurchmesser von 20 mm sind in Abb. 2.7 dargestellt.

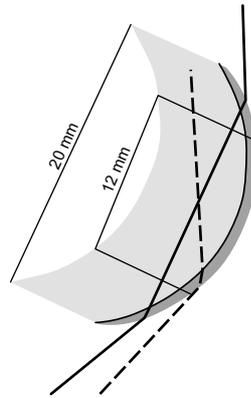


Abb. 2.7: Strahlenrekonstruktion des transversalen Strahlengangs mit einem Hornhautdurchmesser von 12 mm (- -) und 20 mm (—).

Realisierbar ist dieser Strahlengang nur mittels eines Kontaktglases oder einer Kontaktlinse [84]. In der Literatur wird dieser Strahlengang auch für nicht-invasive Messungen vorgeschlagen. [38] Diese Ansätze werden im Kap. 4.2 näher erläutert.

**Reflexion an der Iris:** Ein Strahlengang mit einer punktförmigen Reflexion auf der Iris (Abb. 2.6(2)) kann nicht mit einer ausreichenden Genauigkeit reproduziert werden: Bei Untersuchungen an der Spaltlampe konnte gezeigt werden, dass das Reflexionsvermögen der Iris variiert und zwar nicht nur intraindividuell, sondern auch in Abhängigkeit des Messortes auf der Irisoberfläche und durch die Gabe bestimmter Medikamente. Für Messungen mit einem gebündelten Lichtstrahl ist die Iris ungeeignet. Vorstellbar wäre allerdings die Verwendung einer speziellen Lochblende, mit

der die gesamte Iris ausgeleuchtet werden könnte.

**Reflexion an der Linse:** Hier wird Licht schräg zur optischen Achse eingestrahlt und an der Linsenvorderfläche reflektiert (Abb. 2.6(3)). Das Licht durchläuft die Vorderkammer zweimal. Dieser Strahlengang ist optisch gut definiert und ermöglicht eine kontaktlose Messung. Ein wesentlicher Nachteil ist der geringe Reflexionsgrad der Linsenvorderfläche von 0,034 %. Eine absolute Konstanz der Weglänge ist aufgrund der individuell unterschiedlich tiefen Vorderkammer auch hier nicht gegeben. Für emmetrope Augen liegt die durchleuchtete Strecke bei 7,3 mm, für myope bei 8,3 mm und für hyperope bei 6,4 mm. Allerdings kann der Strahlengang intraindividuell reproduziert werden unter Ausnutzung des dritten Purkinje-Sanson-Bildes. Dies ist der Strahlengang, der für nicht-invasive Untersuchungen am Auge in dieser Arbeit verwendet werden soll.

### 2.4.1 Die Purkinje-Sanson-Bilder

Ein Strahlengang durch die Vorderkammer mit konstanter Länge kann nur gewährleistet sein, wenn das Licht in einem reproduzierbaren Punkt im Auge reflektiert wird. Dazu können die vier sogenannten Purkinje-Sanson-Bilder verwendet werden, speziell das dritte. Purkinje und Sanson entdeckten im 19. Jahrhundert unabhängig voneinander, dass die Strahlung von einer vor dem Auge aufgebauten Lichtquelle insgesamt viermal an den Grenzflächen der Hornhaut und der Linse reflektiert wird. [85] Diese vier Reflexionen können gleichzeitig beobachtet werden, wenn das Licht unter einem bestimmten Winkel ins Auge fällt. Je ein Bild wird von der Vorder- bzw. Rückseite der Hornhaut und der Vorder- und Rückseite der Linse erzeugt (s. Abb. 2.8).

Unter Annahme eines senkrechten Strahlungseinfalls ist es möglich, die Reflexionsgrade  $\rho$  für die vier Bilder mit Hilfe der Fresnelschen-Formel unter Verwendung der Brechungsindices aus Tab. 2.1 zu berechnen. [86] Die Außenseite der Hornhaut (Luft / Hornhaut) zeigt einen Reflexionsgrad von 0,025, die Innenseite (Hornhaut / Kammerwasser) einen von 0,00022, die Vorder- (Kammerwasser / Linse) und Rückseite (Linse / Glaskörper) der Linse einen von 0,00034. Setzt man den Reflexionsgrad der ersten stärksten Reflexion gleich 100 % und die anderen dazu in Relation,

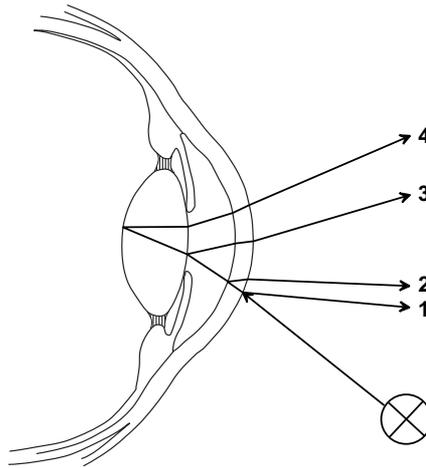


Abb. 2.8: Lage der vier Reflexbilder nach Purkinje-Sanson.

so ergeben sich Werte von 0,87 % für die zweite Reflexion und 1,35 % für die dritte Reflexion.

In der Ophthalmologie werden die Purkinje-Sanson-Bilder zur Untersuchung von durchsichtigen Strukturen des vorderen Augenabschnitts, wie das Hornhautepithel und Zellauflagerungen auf der Oberfläche okularer Linsen, mit dem Spaltlampenmikroskop verwendet. [87, 88] Diese Anwendung legt den Gedanken nahe, dass diese Bilder auch genutzt werden können, um einen Strahlengang reproduzierbarer Länge durch die Vorderkammer zu finden. Allerdings muss die Akkommodation berücksichtigt werden, da diese Einfluss auf die Vorderkammertiefe und auch den Krümmungsradius der Hornhaut hat.

## 2.5 Strahlenbelastung

Eine wichtige Randbedingung für spektroskopische Messungen am Auge ist, dass die Hornhaut für die verwendeten Wellenlängen transparent ist und dass keine Schädigung des Auges durch zu hohe Lichtintensität verursacht wird. Je nach Wellenlänge wird das Licht von der Hornhaut, der Linse oder der Netzhaut absorbiert. Licht unterhalb von 300 nm bzw. oberhalb von 2000 nm wird hauptsächlich von der Cornea absorbiert, Licht aus dem UV-Bereich (295–400 nm) von der Linse und sichtbares und NIR-Licht (400–1400 nm) von der Netzhaut. Dabei kann eine zu lange Expositi-

on bzw. eine Bestrahlung mit zu hoher Intensität auch thermische oder photochemische Schäden hervorrufen, die bis zum Verlust des Sehvermögens reichen können. [89] Photochemische Schäden beruhen auf photoinduzierten chemischen Reaktionen und treten im Bereich energiereicher, kurzwelliger Strahlung auf. Thermische Schäden entstehen durch eine lokale Aufheizung des Gewebes und hängen daher u. a. vom Absorptionskoeffizienten des Gewebes und der Strahlungsintensität ab.

Bei Untersuchungen mit UV-Licht sollte ein Kantenfilter mit ausreichender Steilheit verwendet werden, der Licht mit Wellenlängen  $< 380$  nm abblockt. Licht von einer Wellenlänge von ca. 360 nm kann zu bräunlichen Verfärbungen des Linsenkerns führen. [90]

Bei der Verwendung von NIR-Licht (800–2000 nm,  $4000$ – $12500$   $\text{cm}^{-1}$ ) können photochemische Schäden eigentlich ausgeschlossen werden. Wird jedoch ein FT-Spektrometer verwendet, so sollte darauf geachtet werden, dass die Strahlung des zur Längenmessung verwendeten He:Ne-Lasers nicht ins Auge eindringen kann.

Um die maximal zulässige Gesamtleistung abschätzen zu können, wird eine ophthalmologische Spaltlampe als Vergleich herangezogen. Untersuchungen an Spaltlampen zeigten, dass unter normalen Bedingungen keine thermisch bedingte Gefährdung des Auges zu erwarten ist. Dies schließt auch Augen-Untersuchungen von mehreren Minuten ein. [90] Ein Richtwert für die maximale Gesamtleistung (Strahlungsfluss) kann der für Spaltlampen typische Wert von  $\Phi = 0,5$  W angenommen werden. [39]

## 2.6 Klinische Studien am Kammerwasser

Für *In-vivo*-Messungen ist es wichtig, die Zusammenhänge zwischen den Konzentrationen der Analyte im Kammerwasser und im Blut-Plasma zu kennen, denn während einer Messung kann dem Probanden kein Kammerwasser entnommen werden. Die Einstellung bzw. Kalibrierung kann nur mit aus dem Blut ermittelten Werten erfolgen. Diese Zusammenhänge wurden u. a. von Kirby und Wiener [91, 92] und Pohjola [69] untersucht.

Parallel zu den spektroskopischen Arbeiten wurden an der Universitätsaugenklinik Würzburg zwei klinische Studien durchgeführt. Die erste beschäftigte sich mit dem Zusammenhang zwischen der Glucosekonzentration im Kammerwasser und der im

Kapillarblut, [93, 94] die zweite mit Glucose und Lactat [95]. Lactat ist eine der Substanzen, die möglicherweise Querempfindlichkeiten verursachen können.

Die Studien wurden an älteren Patienten mit und ohne Diabetes mellitus durchgeführt, die vor einer Katarakt oder Pars plana Vitrektomie standen. Die zu untersuchenden Augen durften nicht voroperiert oder entzündet sein.

Im Rahmen der Operation wurde dem Patienten etwa 0,1 ml Kammerwasser entnommen und durch physiologische Kochsalzlösung ersetzt. Das Kammerwasser wurde gekühlt und umgehend zur Analyse ins klinische Labor gebracht. Parallel zur Entnahme des Kammerwassers wurden aus dem Ohrläppchen 30, 20 und 10 Minuten vor Kammerwasserentnahme sowie unmittelbar vor Operationsbeginn je 50  $\mu$ l kapilläres Blut für die Vergleichsanalyse entnommen.

Da sich die Konzentrationswerte der Messungen vor Beginn der Operation nicht signifikant ändern, werden die Mittelwerte zur Auswertung herangezogen. Eine grafische Gegenüberstellung der Glucosekonzentrationen im Plasma und im Kammerwasser aller Patienten (Abb. 2.9) zeigt, dass die Konzentrationen im KW etwa 30 mg/dl geringer sind als die im BP.

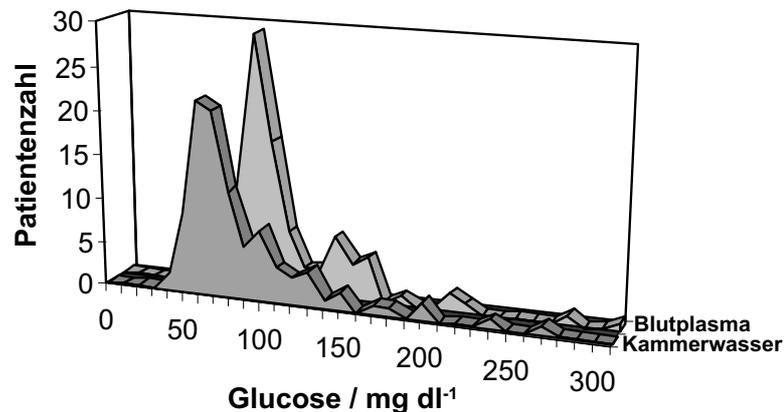


Abb. 2.9: Glucose-Verteilung im Kammerwasser und Blutplasma von 100 Patienten. [93, 94]

Bezogen auf die gesamte Gruppe zeigt sich, dass die Glucosekonzentrationen im KW und im BP miteinander in einem konstanten Verhältnis stehen.

In einer zweiten Studie [95] wurde das KW neben Glucose auch auf Lactat hin untersucht. Die ermittelten mittleren Glucosekonzentrationen sind  $3,02 \pm 1,30$  mmol/l im KW und  $5,97 \pm 1,60$  mmol/l im BP. Beide Studien zeigen, dass die Glucosekon-

zentrationen im KW und im BP korrelieren und im KW niedriger als im BP sind.

Die Lactatkonzentration ist im KW ( $4,92 \pm 1,44$  mmol/l) stark erhöht im Vergleich zum BP ( $1,12 \pm 0,37$  mmol/l), was durch frühere Untersuchungen bestätigt wird. [74, 96]

Die klinischen Studien belegen, dass Glucose und Lactat im Kammerwasser in messbaren Konzentrationen vorliegen. Zusammen mit den anatomischen Voraussetzungen des Auge unterstützen diese Daten das Potential der Vorderkammer als spektroskopische Zelle. Im Folgenden werden verschiedene spektroskopische Methoden vorgestellt und untersucht, die Messungen in der Vorderkammer erlauben.



## 3 UV-spektroskopische Untersuchungen

Die Hornhaut ist unter anderem für Licht im UV-Bereich zum Teil durchlässig. In diesem spektralen Bereich absorbieren viele der als Medikamente oder Drogen verwendeten chemischen Substanzen. In diesem Kapitel wird das Potential verschiedener Drogen und Medikamente für eine Detektion im UV/VIS-Bereich getestet und gezeigt, dass nicht-invasive, *In-vivo*-Messungen am Auge in diesem spektralen Bereich prinzipiell möglich sind.

### 3.1 Spektroskopische Grundlagen

Der spektrale Bereich zwischen 100 und 380 nm wird als Ultraviolett (UV) bezeichnet, der zwischen 380 und 780 nm als sichtbarer Bereich (VIS). Strahlung aus diesem Bereich regt die Valenzelektronen der Moleküle an, es finden elektronische Übergänge statt. [97–100] Gleichzeitig regt Strahlungsenergie Schwingungen und Rotationen an.

Die angeregten Elektronen sind  $n$ -,  $\sigma$ - und  $\pi$ -Elektronen, wie sie typischerweise in organischen Verbindungen vorkommen. Moleküle mit Doppelbindungen, insbesondere mit konjugierten Doppelbindungen, sind starke Absorber. Desweiteren absorbieren im UV die  $d$ - und  $f$ -Elektronen von Metallionen und Elektronen in *Charge-Transfer*-Übergängen. Die elektronischen Übergänge finden dabei zwischen einem bindenden Orbital oder dem Orbital eines einsamen Elektronenpaares und einem unbesetzten nicht-bindenden oder anti-bindenden Orbital statt, wobei die Lage der entstehenden Bande im Spektrum ein Maß für die Separation der Energieniveaus der beteiligten Orbitale ist. Die Energieaufspaltung hängt von der elektronischen Struktur und der chemischen Umgebung des zu untersuchenden Systems ab. Die größte Differenz tritt auf, wenn  $\sigma$ -Bindungen angeregt werden. Solche Banden werden zwischen 120 und 200 nm detektiert. Oberhalb von 200 nm werden Elektronen

in  $p$ -,  $d$ - und  $\pi$ -Orbitalen angeregt. Die gleichzeitige Anregung von Schwingungen und Rotationen führt dabei zu einer Verbreiterung der Banden. [97, 98, 100]

Die UV-Spektroskopie ist eine weitverbreitete Technik, die in vielen Bereichen für qualitative und quantitative Bestimmungen verwendet wird. Dazu zählen einfache photometrische Schnelltests ebenso wie komplexe enzymatische Essays, die Bestimmung von Reaktionsraten, die Umweltanalytik und die quantitative Bestimmung in der Chemie, der Physik, der Pharmazie und der klinischen Chemie. [98, 101–107] Die quantitativen Bestimmungen beruhen wie auch in der NIR-Absorptions-Spektroskopie auf der Anwendbarkeit des Lambert-Beer'schen Gesetzes, welches in Kap. 4.6.1 vorgestellt wird.

Im Bereich der klinischen Chemie haben sich vor allem quantitative enzymatische Tests durchgesetzt, wie z. B. die Glucose-Bestimmung mit der Hexokinase-Methode oder die Lactat-Bestimmung als Lactatdehydrogenase.

Neben diesen reinen Laboruntersuchungen an Körperflüssigkeiten wird in der Medizin verstärkt nach verlässlichen, einfachen, schnellen und vor allem nicht-invasiven Methoden gesucht. Mögliche Anwendungen solcher Methoden wären z. B. Alkoholkontrollen, aber auch der Nachweis eines Drogenmissbrauchs oder die schmerzfreie Kontrolle bei einer Langzeitmedikation. Spektroskopische Methoden bieten sich hier an, da diese je nach vorliegender Substanz und verwendeter Methode eine eindeutige Identifizierung und Quantifizierung der gesuchten Substanz erlauben. Desweiteren sind spektroskopische Messungen rasch durchzuführen und können mit dem entsprechenden Gerät direkt vor Ort vorgenommen werden.

Viele der gebräuchlichen Medikamente und Drogen sind komplexe organische Moleküle, die konjugierte Doppelbindungssysteme besitzen und daher besonders geeignet sind für eine Detektion im UV/VIS-Bereich. Im Folgenden wird ein Aufbau für nicht-invasive Messungen am menschlichen Auge vorgestellt und verschiedene Ophthalmika auf ihre Verwendbarkeit in der nicht-invasiven UV/VIS-Bestimmung getestet.

## 3.2 Experimenteller Aufbau

Die Absorptions-Messungen der Medikamente und Reinsubstanzen werden in Quarz-Rechteckküvetten mit einer Schichtdicke von 0,2 cm an einem Standard-Gerät

(Lambda19, Perkin Elmer) zwischen 190 und 900 nm durchgeführt. Die Scan Geschwindigkeit beträgt 240 nm/min bei einer Spaltbreite von 1  $\mu\text{m}$ . Vor jeder Messung wird ein Autozero durchgeführt.

Für *In-vivo*-Messungen wird das in Kap. 4.3.4 beschriebene *In-vivo*-Setup mit einem Spektrometer bestehend aus einem kompakten Flat-Field-Spektrographen (CP140-104, Jobin Yvon) und einer UV sensitiven CCD-Kamera (*Charge Coupled Device*) gekoppelt. Das Spektrometer ist in Abb. 3.1 gezeigt.

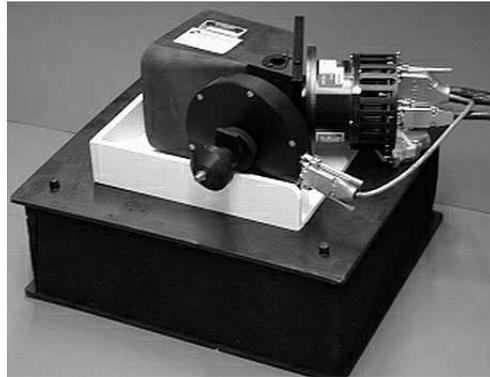


Abb. 3.1: Abbildung des UV/VIS-Spektrometers.

Das auf der menschlichen Augenlinse, im dritten Purkinje-Bild (s. Abb. 2.8), reflektierte Licht wird auf eine Glasfaser fokussiert. Das andere Ende der Glasfaser wird am Spektrometer angebracht. Das ankommende Licht wird von zwei plan-konvexen Linsen auf den Eingangsspalt des Spektrometers fokussiert. Die erste Linse befindet sich vor dem Shutter, die zweite ist direkt vor dem Festspalt (Höhe: 4 mm, Breite 0,05 mm) angebracht. Die zweite Linse kann über ein Gewinde justiert werden.

Der Spektrograph ist ein sehr kompaktes Gerät (HBL: 110 x 120 x 150 mm) mit einem fixierten, holografischen Gitter (Strichzahl: 285 mm, Blaze: 350 nm), das für den spektralen Bereich von 250–850 nm optimiert ist. Die Fokusslänge ist  $f = 140$  mm und das Öffnungsverhältnis  $f/2$ .

Als Detektor fungiert eine zweistufige, Peltier-gekühlte CCD-Kamera mit einem *back-illuminated* Hamamatsu-Chip. Der Chip hat eine Größe von 1024 x 60 Pixel (aktive Fläche: 24,57 x 1,39 mm<sup>2</sup>) bei einer Pixelgröße von 24 x 24  $\mu\text{m}^2$  und umfasst einen spektralen Bereich von 200–1100 nm.

Das Spektrometer kann über das Programm SpectraMax Lite (Plattform: GRAMS/32<sup>TM</sup>) und ein IEEE Interface angesteuert werden.

### 3.3 *In-vitro*-Messungen

Zunächst werden UV-Absorptionsspektren gängiger ophthalmologischer Medikamente in wässriger Lösung vermessen. Diese Messungen werden als Küvetten-Messungen am Lambda19 durchgeführt. Die chemischen Strukturformeln der zur Auswahl stehenden Medikamente und Ophthalmika sind in Abb. 3.2 angegeben.

Brimonidintartrat ist ein  $\beta$ -Blocker, der zur Absenkung des Augeninnendrucks bei grünem Star mit offenem Kammerwinkel (Weitwinkelglaukom) und erhöhtem Augeninnendruck (okuläre Hypertension) verwendet wird. Angewendet wird es in Form von Augentropfen (Alphagan, Pharm-Allergan).

Cefotiam ist ein Cephalosporin-Antibiotikum und wird u. a. unter dem Namen Spizef (Grünenthal) vertrieben. Spizef liegt als Pulver vor, es wird in sterilem Wasser gelöst und intravenös angewandt.

Cocain ist das Hauptalkaloid des Coca-Strauches und gehört zusammen mit ihrer freien Base (Crack) zu den am häufigsten konsumierten illegalen Drogen [108]. In der Ophthalmologie wird Cocain vor allem als Oberflächen-Anästhetikum eingesetzt.

Der Wirkstoff der Injektionslösung Dexahexal (Hexal) ist Dexamethason-phosphat. Dexamethason ist ein Glucokortikosteroid (Nebennierenrindenhormon), das zur Behandlung von Entzündungsreaktionen am äußeren Auge eingesetzt wird. Es ist eines der stärksten lokal eingesetzten Kortikosteroide, seine Wirkungen sind antientzündlich, antiallergisch und immunsuppressiv.

Diclofenac ist ein nichtsteroidales Antiphlogistikum, ein Entzündungshemmer. Da Diclofenac in der Apotheke des Klinikums der Universität Würzburg für einige Rezepturen eingesetzt wird, kann es als Reinstoff bezogen und vermessen werden.

Das Medikament Trusopt (Chibret), das als Augentropfen verabreicht wird, enthält den Wirkstoff Dorzolamidhydrochlorid und dient zur Senkung des Augeninnendrucks (Glaukom). Es ist ein Carboanhydrasehemmer.

Fluorescein ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der als Infusionslösung für die Angiographie verwendet wird. Reines Fluorescein kann als Pulver (Caelo) bezogen werden.

Floxal (Dr. Gerhard Mann GmbH) mit dem Hauptinhaltsstoff Ofloxacin ist ein

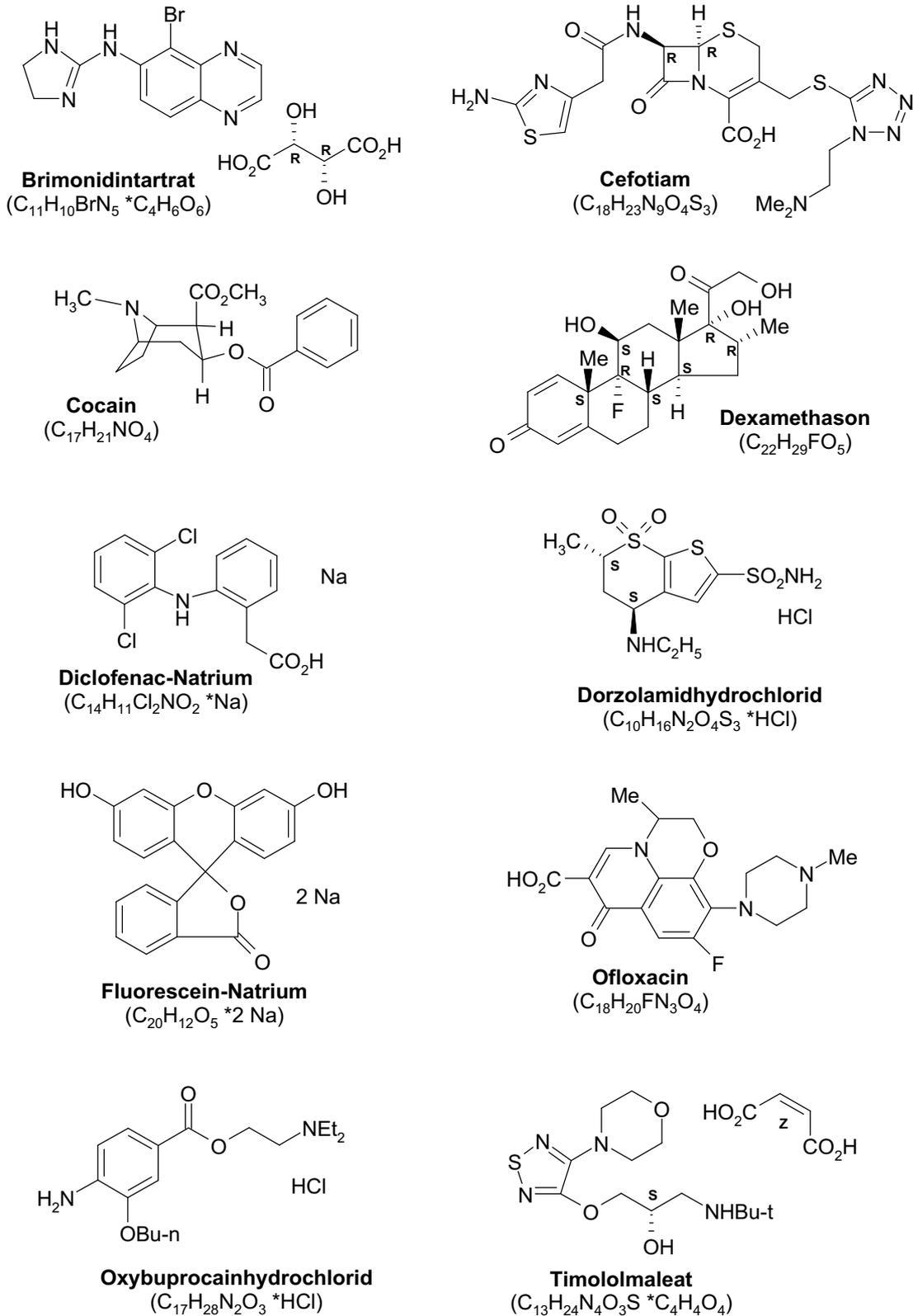


Abb. 3.2: Strukturformeln der Wirkstoffe der verwendeten Ophthalmika und Medikamente.

Gyrasehemmer und Chemotherapeutikum, das bei Infektionen des vorderen Augenabschnitts durch Ofloxacin-empfindliche Erreger als Augentropfen angewendet wird.

Das Oberflächen-Anästhetikum Oxybuprocainhydrochlorid ist der wirksame Bestandteil in Novesine-Augentropfen (CIBA Vision).

Die Augentropfen Timoptol (Chibret) enthalten Timololmaleat, einen  $\beta$ -Blocker, und senken den Augeninnendruck.

Die untersuchten Moleküle sind relativ komplex und enthalten fast alle neben Doppelbindungen auch andere funktionelle Gruppen, die UV-Absorptionsbanden zeigen, wie z. B. Stickstoff- und Sauerstoffatome. Eine genaue Zuordnung der Banden zu den elektronischen Übergängen wird hier daher nicht gegeben, vor allem auch, da meist die Medikamente selbst, also Gemische, vermessen wurden und nicht die Reinsubstanzen.

Für die Aufnahme der UV-Absorptionsmessungen werden die Medikamente und Verbindungen in destilliertem Wasser gelöst bzw. mit destilliertem Wasser verdünnt. Die Spektren sind in den Abb. 3.3 dargestellt. Die meisten der hier untersuchten Medikamente zeigen ein sehr einfaches UV-Absorptions-Spektrum mit einem einzigen Absorptionsmaximum. Dies liegt für Spizef (Cefotiam) bei 260 nm, für Dexhexal (Dexamethason-phosphat) bei 245 nm und für Diclofenac bei 275 nm. Bei 250 nm liegt die Bande von Trusopt (Dorzolamidhydrochlorid) und bei 292 nm die von Timoptol (Timololmaleat).

Brimonidintartrat, der Wirkstoff von Alphagan, enthält sowohl konjugierte Doppelbindungen als auch Stickstoffatome mit freien Elektronenpaaren. Das Spektrum von Alphagan weist zwei Maxima auf. Das stärkere liegt bei 247 nm, das schwächere bei 320 nm.

Auch Cocain weist mehrere Banden auf, eine starke bei 233 nm und zwei sehr schwache, die als Dublett bei 278 nm zu erkennen sind.

Im Spektrum von Novesine (Oxybuprocainhydrochlorid) sind drei Banden zu erkennen. Die beiden starken Banden liegen bei 308 nm mit einer Schulter bei 282 nm und bei 232 nm.

Im Vergleich zu den bisher diskutierten Spektren sind die Spektren von Floxal (Ofloxacin) und Fluorescein relativ komplex. Die stärkste Bande im Floxal-Spektrum ist bei 288 nm, eine weitere schwächer bei 330 nm zu erkennen. Desweiteren sind ein schwaches Dublett bei 256 und 248 nm und eine Bande bei 227 nm zu erkennen.

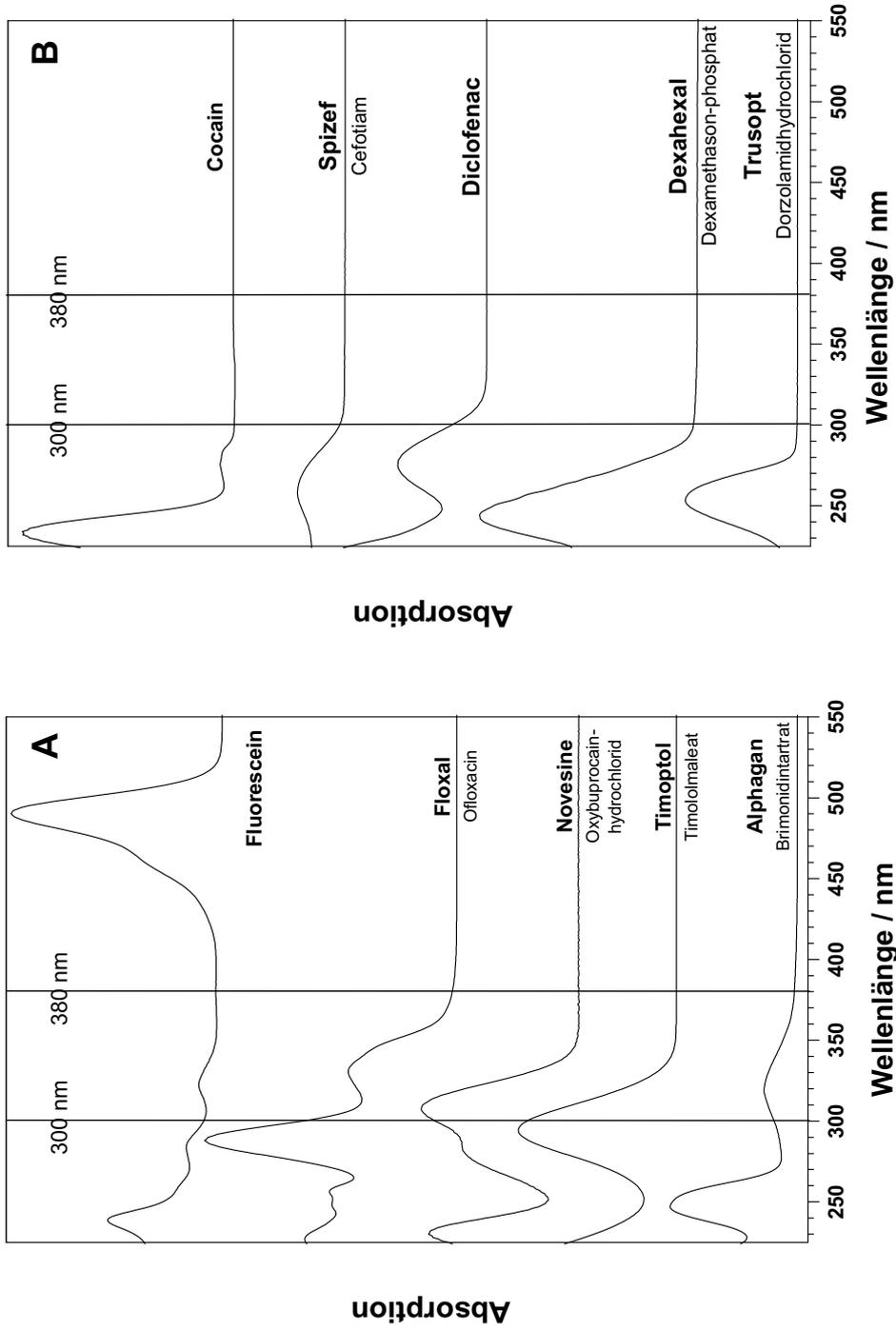


Abb. 3.3: UV-Absorptionsspektren verschiedener Medikamente. Zusätzlich sind die Transmissionsgrenze der menschlichen Hornhaut bei 300 nm und die Abbruchkante des Kantenfilters bei 380 nm eingezeichnet.

Das Absorptionsmaximum von Fluorescein ist eine relativ scharfe Bande bei 491 nm mit einer Schulter bei 460 nm. Weitere schwache Banden liegen bei 323, 284 und 238 nm.

Entscheidend für eine Detektion im Auge ist, dass die Stoffe in einem zugänglichen spektralen Bereich absorbieren, also in einem Bereich, in dem die Hornhaut durchlässig ist. Die Transmissionskurve der menschlichen Hornhaut wurde bereits in Abb. 2.2 dargestellt. Die untere Transmissions-Grenze der Cornea liegt bei ca. 300 nm. Somit können nur Substanzen vermessen werden, deren Absorptionsmaximum oberhalb dieser Grenze liegt. In Tab. 3.1 sind noch einmal die verwendeten Medikamente, ihr Wirkstoff, dessen Konzentration in der Formulierung und die ermittelten Absorptionsmaxima zusammengefasst.

Tab. 3.1: Zusammenstellung der Wirkstoffe, Markennamen, Konzentrationen der Wirkstoffe in der Formulierung und UV-Absorptionsmaxima verschiedener Medikamente.

<b>Wirkstoff</b>	<b>Markenname</b>	<b>Konzentration</b> [*]	<b>Absorptions- maximum</b> $\lambda_{max}$ [nm]
Brimonidintartrat	Alphagan	2,0	320, 247
Cefotiam	Spizef	2,0 g/2,76 g Trockensubstanz	260
Cocain		5%ige Augentropfen	278, 233
Dexamethason-phosphat	Dexahexal	4,0	245
Diclofenac-Natrium		Pulver, rein	275
Dorzolamidhydrochlorid	Trusopt	22,3	250
Fluorescein-Natrium		Pulver, rein	491, 460, 323, 284, 238
Ofloxacin	Floxal	3,0	330, 288, 256, 248, 227
Oxybuprocainhydrochlorid	Novesine	4,0	308, 282, 232
Timololmaleat	Timoptol	6,83	292

\*Konzentrationen in mg/1 ml Lösung soweit nicht anders angegeben.

Die Substanzen, deren Absorptions-Spektren in Abb. 3.3 A dargestellt sind, zeigen alle Absorptionsmaxima oberhalb von 300 nm und kommen daher für *In-vivo*-Messungen in Frage. Allerdings sollte neben dieser rein optischen definierten Grenze zusätzlich ein Sicherheitsabstand eingehalten werden, um eine Schädigung des Auges durch UV-Strahlung [90] zu vermeiden (s. a. Kap. 2.5). Aus diesem Grund wird bei *In-vivo*-Messungen ein Kantenfilter in den Strahlengang gebracht, der Wellenlängen < 380 nm blockiert. Betrachtet man erneut die Absorptions-Spektren der vermessenen Medikamente, so wird nur Fluorescein diesen Bedingungen gerecht.

### 3.4 *In-vivo*-Detektion von Fluorescein

Für die *In-vivo*-Detektion von Fluorescein wird der in Kap. 4.3.4 beschriebene *In-vivo*-Aufbau mit dem kompakten UV-Spektrometer kombiniert. Der Aufbau wird so justiert, dass das linke Auge (l. A.) der Versuchsperson gemessen werden kann. Vor der eigentlichen Applikation von Fluorescein werden Spektren des unbehandelten Auges aufgenommen. Die Aufnahmezeit pro Spektrum liegt bei 0,075 s. Dann wird ein Tropfen Fluorescein-Lösung in das linke Auge getropft. Von diesem Zeitpunkt an werden 60 min lang im Abstand von jeweils fünf Minuten mindestens drei Spektren mit 0,075 s Aufnahmezeit aufgenommen, wobei zehn Minuten nach Fluorescein-Gabe drei Tropfen Tränenersatzflüssigkeit (Artelac, Mann) appliziert werden, wodurch noch auf der Hornhaut verbliebenes Fluorescein abgespült wird.

Der Strahlengang durchläuft sowohl die Hornhaut als auch das Kammerwasser, daher sind vor allem spektrale Informationen von beiden Komponenten im Spektrum enthalten. Um spektrale Einflüsse des Auges und vor allem des reinen Kammerwassers zu unterdrücken, werden jeweils drei Spektren eines Zeitpunktes gemittelt und einer individuellen Basislinienkorrektur (Subtraktion eines Offsets) unterworfen. Anschließend werden Differenz-Spektren zwischen den Mittelwertspektren an verschiedenen Zeitpunkten und dem Mittelwertspektrum des unbehandelten Auges ( $t = 0$  min) gebildet.

Diese Differenz-Spektren sind in Abb. 3.4 dargestellt, zur besseren Übersicht sind nur Spektren zwischen einer und 26 Minuten nach Fluorescein-Gabe dargestellt.

Die bei ca. 500 nm zu erkennende Bande wird Fluorescein zugeordnet. Die Intensität der Bande verändert sich mit der Zeit. Direkt nach Fluorescein-Gabe ist das

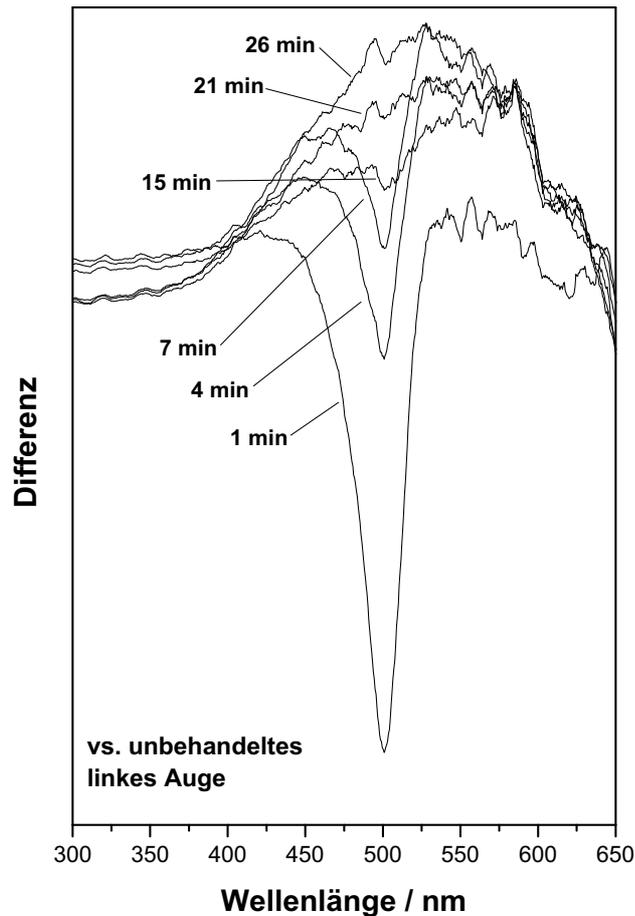


Abb. 3.4: *In-vivo*-Differenz-Spektren eines linken Auges nach Fluorescein-Gabe. Referenz ist das unbehandelte Auge.

Signal am stärksten und nimmt dann stark ab. Die Abnahme liegt wahrscheinlich einerseits daran, dass Fluorescein durch die Hornhaut ins Kammerwasser gelangt, andererseits an der Tränenflüssigkeit, die die Substanz wegschwemmt. Zehn Minuten nach Fluorescein-Gabe werden künstliche Tränen appliziert. Von diesem Zeitpunkt an ist kein Fluorescein-Signal mehr detektierbar.

Die nicht-invasive, *In-vivo*-UV/VIS-Absorptions-Spektroskopie ist eine Methode, mit der geeignete Stoffe direkt in der Vorderkammer detektiert werden können. Mit dem vorgestellten Aufbau kann Fluorescein auf der Hornhaut detektiert werden. Ein eindeutiger Beweis für die *In-vivo*-Detektion im Kammerwasser existiert jedoch noch nicht. Dies kann unter Umständen daran liegen, dass die durch die Hornhaut ins Kammerwasser eingedrungene Fluorescein-Konzentration unterhalb der Nach-

weisgrenze liegt. Dafür spricht die Tatsache, dass für Angiographien Fluorescein nicht als Augentropfen verwendet wird, sondern intravenös gegeben wird.

Neben Fluorescein sollten sich auch andere Substanzen nachweisen bzw. sogar quantitativ bestimmen lassen. Die Absorptionsmaxima dieser Substanzen müssen innerhalb der durch die Hornhaut und die Sicherheitsbedingungen vorgegebenen spektralen Bereiche liegen. Desweiteren sollten sie bereits auf andere Weise im Kammerwasser detektiert worden sein, so dass Angaben über ihre Konzentrationen vorliegen. Diese Bedingung ist vor allem für quantitative Bestimmungen essentiell.



## 4 NIR-spektroskopische Untersuchungen

Für den Diabetiker ist eine regelmäßige Kontrolle der Blutglucosewerte, bis zu sieben mal am Tag, unerlässlich. Diese Kontrollen werden meist zu Hause vom Patienten selbst durchgeführt. Hierzu können verschiedene Selbstkontrollgeräte verwendet werden, die normalerweise den Glucose-Gehalt anhand eines Blutstropfens aus der Fingerbeere ermitteln, also mittels eines invasiven Verfahrens. Neben diesen invasiven Methoden gibt es zahlreiche Ansätze für kontinuierlich arbeitende Glucose-Sensoren, minimal und sogar nicht-invasive Messmethoden. Das folgende Kapitel soll einen Überblick über den Diabetes mellitus und die verschiedenen Methoden der Glucosebestimmung und ihre Realisierungsmöglichkeiten geben.

Für die nicht-invasive Glucose-Bestimmung im Auge eignet sich besonders die Nah-Infrarot-Spektroskopie. Im Folgenden wird ein Einblick in die NIR-Spektroskopie gegeben und die verwendeten Geräte im einzelnen, ebenso wie ein flexibler *In-vitro*- und ein flexibler *In-vivo*-Aufbau vorgestellt.

### 4.1 Motivation: Diabetes mellitus

Diabetes mellitus, auch Zuckerkrankheit genannt, ist die häufigste Stoffwechselerkrankung. Allein in Deutschland gibt es etwa acht Millionen Diabetiker, weltweit sind es ca. 5 % der Bevölkerung der Industrienationen und diese Zahl steigt beständig an. Eine erfolgreiche Behandlung des Diabetes mellitus benötigt Kenntnis über die momentanen Blutglucosewerte, um es dem Diabetiker zu ermöglichen, diese durch Diät, orale Medikation oder Insulininjektionen zu kompensieren. Ohne Kenntnis der Blutglucosewerte ist eine korrekte Behandlung nicht möglich und schwerwiegende Komplikationen und Spätfolgen, die die inneren Organe, den Kreislauf und die Augen betreffen, können auftreten. [6]

Diabetes mellitus dient als Sammelbegriff für verschiedene Formen von Glucose-Stoffwechsel-Störungen, denen der relative oder absolute Mangel an Insulin gemeinsam ist. Allgemein wird der Diabetes mellitus in zwei Typen eingeteilt, Typ I und Typ II. [109]

**Typ I:** Der Typ I Diabetes m., IDDM (*insulin-dependent-diabetes mellitus*) oder auch juvenile Diabetes genannt, ist die genetisch prädisponierte Form mit allmählicher Erschöpfung der körpereigenen Insulinsekretion bis zum absoluten Insulinmangel. Er wird durch die Zerstörung der Insulin produzierenden Inselzellen in der Bauchspeicheldrüse ausgelöst.

Therapeutische Ansätze umfassen neben der Insulinsubstitution eine strikte Diät und Bewegung.

**Typ II:** Typ II Diabetes, auch NIDDM für *non-insulin-dependent diabetes mellitus*, tritt meist erst im höheren Alter auf und wird auch als Altersdiabetes bezeichnet. Aufgrund des häufigen familiären Auftretens ist dieser Typ wahrscheinlich genetisch bedingt. Hier liegt ein relativer Insulinmangel vor mit eingeschränkter, erhaltener oder z. T. sogar erhöhter Insulinproduktion.

Normalgewichtige sind in der Minderheit (Typ IIa), die meisten Patienten sind übergewichtig (Typ IIb). Daraus resultiert als erster Therapieschritt eine Gewichtsreduktion u. U. gefolgt von einer strikten Diät und eventuell einer oralen Antidiabetika- oder auch Insulingabe.

Der mit dem Diabetes mellitus einhergehende Insulinmangel bewirkt:

- Herabsetzung der Glucoseaufnahme im Körper,
- Minderung der Glucoseoxidation,
- Drosselung der Glycogenbildung in Leber und extrahepatischen Organen,
- Steigerung der Zuckerabgabe aus der Leber,
- Verminderung der Lipogenese und Steigerung der Cholesterinproduktion,
- Verminderung der Peptid- und Proteinsynthese,

- Herabsetzung der Brenztraubensäure-Verwertung und der Verwertung des 'aktiven' Acetats,
- Herabsetzung der Bildung von energiereichen Verbindungen.

Neben diesen direkt mit der Störung des Glucose-Stoffwechsels zusammenhängenden Symptomen leiden viele Diabetiker an den Spätfolgen ihrer Erkrankung. Dazu zählen neben der diabetischen Retinopathie, die eine der häufigsten Erblindungsursachen ist, die Hyperglykämie und auch vaskuläre Schäden bzw. Nervenschäden, sowie Nierenleiden (diabetische Nephropathie) und Sensibilitätsstörungen z. B. der Füße (diabetische Neuropathie).

Um diese Spätfolgen zu minimieren, wurde bereits in den 1980ern das Konzept der intensivierten Insulintherapie entwickelt. Dieses Schema ist flexibler und ermöglicht den Patienten ein Leben ohne die rigiden Ernährungsvorschriften der herkömmlichen Therapie. In umfangreichen Studien, den *Diabetes Control and Complications Trials* (DCCT), konnte die Überlegenheit einer intensivierten gegenüber einer konventionellen Insulintherapie nachgewiesen werden. [110, 111]

Die konventionelle Behandlung des insulinpflichtigen Diabetikers bestand in einer zwei- oder dreimaligen Insulingabe, wobei die Dosierung von den mittleren Blutzuckerwerten abhängig war. Die aus diesen Insulingaben resultierenden Blutzuckerschwankungen wurden durch eine strenge Diät verbunden mit einer genau abgestimmten körperlichen Belastung kompensiert. Man zwang damit dem Diabetiker Ess- und Lebensgewohnheiten auf, die nicht dem modernen Lebensstil entsprechen.

In den letzten Jahren lernte man, dass mit einer sogenannten intensivierten Insulintherapie, d. h. 5–7 Injektionen am Tage, normale Lebensgewohnheiten in höherem Maße beibehalten werden können. Um jedoch nach dem aktuellen Bedarf Insulingaben verabreichen zu können, sind entsprechend häufige Glucosekontrollen nötig. Eine Computersimulation, die auf den Ergebnissen der DCCT basierte, errechnete für den sich nach den neuen Richtlinien behandelnden Diabetiker eine um 5 Jahre verlängerte Lebenszeit, eine um 8 Jahre verlängerte Sehfähigkeit, ein Gewinn von 6 Jahren ohne Nierenschaden und von 6 Jahren ohne Amputationen. [111]

Physiologisch betrachtet findet im Körper eine kontinuierliche Kontrolle der glykämischen Änderungen statt. Glucose wird vom Blut über die interstitielle Flüssigkeit zu den Inselzellen in der Bauchspeicheldrüse transferiert und führt zu

einer imminnten Antwort der Inselzellen. Nicht nur das Erkennen der Änderung sondern auch die metabolische Reaktion darauf erfolgt sehr schnell, wobei nicht nur der absolute Glucosewert eine Rolle spielt, sondern auch die Änderungsrate. Der Körper verwendet also eine Art Trend-Information zusammen mit dem absoluten Glucosewert. [9]

## 4.2 Methoden der Blutglucose-Bestimmung

Inzwischen gibt es zahlreiche Ansätze für die Blutglucose-Bestimmung. In der Praxis findet jedoch hauptsächlich die punktuelle Bestimmung aus dem Blut Anwendung. Dies kann durch den Hausarzt geschehen, oder aber mit Selbstkontrollgeräten durch den Diabetiker selbst. Gerade die Selbstkontrollgeräte ermöglichen die geforderten mehrmals täglichen Kontrollen. Dieses sind alles invasive Methoden, da für jede Messung eine Blutprobe gewonnen werden muss. Die Blutabnahme geschieht meist durch einen Einstich in den Finger, was nicht nur akut schmerzhaft ist, sondern auch den Tastsinn der Finger langfristig erheblich stören kann.

Für Messungen mit den angesprochenen Selbstkontrollgeräten werden speziell präparierte Teststreifen verwendet. Die Teststreifen enthalten alle notwendigen Reagenzien für eine Glucose-Oxidase- oder Glucose-Hexokinase-Reaktion. Der aus dem Finger gewonnene Tropfen Blut wird auf den Streifen aufgebracht und reagiert dort. Die Reaktion wird photometrisch oder elektrochemisch analysiert. [112]

Das Glucometer Elite (Bayer) arbeitet z. B. mit einem Glucose-Oxidase Assay und einer elektrochemischen Reaktionskontrolle. [113] Die ablaufende Redox-Reaktion ist in Abb. 4.1 dargestellt. Im ersten Schritt wird Glucose enzymatisch in Gluconolacton umgewandelt und das Enzym, die Glucoseoxidase, reduziert. Im zweiten Schritt wird das Enzym von Hexacyanoferrat(III) wieder oxidiert. Das entstandene Hexacyanoferrat(II) wird dann elektrochemisch oxidiert und der benötigte Strom kann gemessen werden.

Die andere häufig verwendete Reaktion ist der Glucose-Hexokinase Assay, der in Abb. 4.2 dargestellt ist.

Glucose wird im ersten Schritt durch das Enzym Hexokinase und Adenosin-5'-Triphosphat (ATP) zu Glucose-6-phosphat phosphoryliert. Glucose-6-phosphat wird dann im folgenden Schritt in Gegenwart des Enzyms Glucose-6-

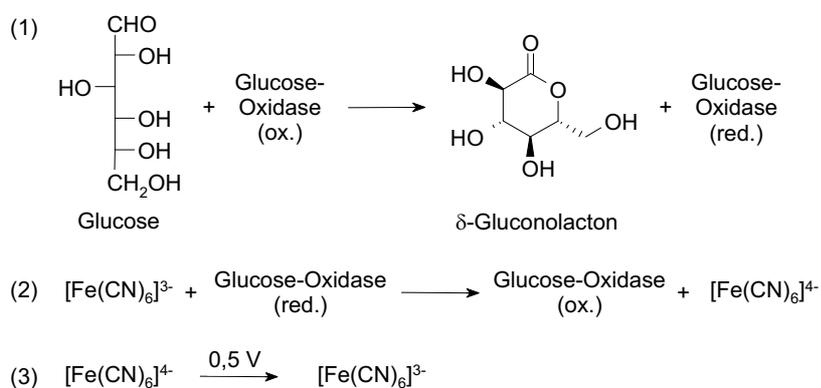


Abb. 4.1: Glucose-Oxidase Reaktion mit elektrochemischer Reaktionskontrolle (ox.: oxidiert; red.: reduziert).

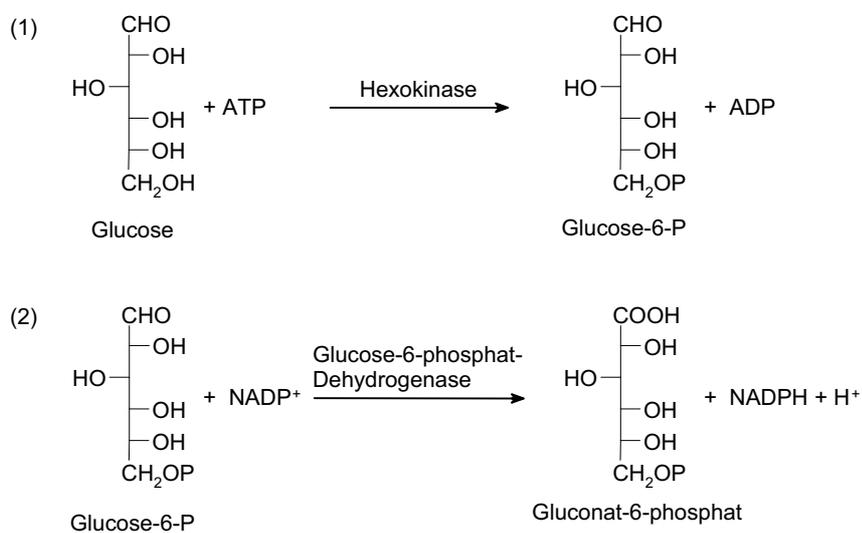


Abb. 4.2: Reaktionsgleichungen der Glucose-Hexokinase-Reaktion.

phosphat-Dehydrogenase und Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat (NADP<sup>+</sup>) zu Gluconat-6-phosphat oxidiert. Dabei wird NADP<sup>+</sup> zu NADPH (Dihydro-Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat) reduziert, wobei die gebildete Menge NADPH äquivalent zur eingesetzten Glucose-Menge ist. Bestimmt wird die NADPH Absorption bei 340 nm.

Die Selbstmessgeräte wurden in den vergangenen Jahren stark verbessert und korrelieren gut mit den Laborwerten. [112] Die neueren Geräte arbeiten mit sehr geringen Blutvolumina und zeigen durch Signaltöne an, wann die Messung beendet ist bzw. eine Messung fehlerhaft ist. Auch die Teststreifen wurden optimiert. Neben solchen, auf die das Blut aufgetropft werden muss, existieren andere, bei denen das Blut unter Ausnutzung des Kapillareffekts aufgesogen wird. Dadurch werden Messfehler minimiert, die durch unzureichende Probenmengen entstehen. Weitere Fehlerquellen sind z. B. Änderungen im Hämatokrit-Wert und Temperaturschwankungen. [114]

Um die Präzision und Genauigkeit der Geräte festzulegen, hat u. a. die *American Diabetes Association* (ADA) Richtlinien aufgestellt. 1987 forderte die ADA eine maximale Abweichung vom im Labor bestimmten Referenzwert von  $\leq 15\%$  und als Ziel für neue Geräte eine Genauigkeit von  $\leq 10\%$  für Glucose-Konzentrationen zwischen 30–400 mg/dl (1,7–2,2 mmol/l). [112] Diese Ziele wurden jedoch angesichts der Tatsache, dass häufige, genaue Bestimmungen die Komplikationen und Spätschäden reduzieren, nach unten revidiert. 1996 wurde das Ziel mit einer Genauigkeit von  $\leq 5\%$  festgelegt. [112] Dieses Ziel wurde jedoch bisher noch von keinem Selbstmessgerät erreicht.

Die Selbstmessgeräte ausreichend genaue Werte liefern, allerdings sind nur invasive Messungen möglich. Die Entwicklung neuer Geräte und Methoden, die genauso verlässlich aber weniger schmerzhaft sind, würde die Mitarbeit (engl. *compliance*) der Patienten verbessern.

Die gegenwärtige Forschung [2–9] beschäftigt sich daher neben der bereits angesprochenen Verbesserung der Selbstkontrollgeräte vor allem mit der Entwicklung minimal und nicht-invasiver Geräte und Methoden. Ein weiterer Schwerpunkt liegt auf der Entwicklung implantierbarer Sensoren, die z. B. eine Insulinpumpe steuern könnten.

Da die medizinischen Risiken bei intravasalen Sensoren vor allem über längere Zeiträume hoch sind, werden die Sensoren daher meist extravaskulär eingesetzt bzw.

extrakorporal eingesetzt. Es findet also im Gegensatz zur traditionellen Glucose-Bestimmung keine direkte Messung der Blutglucosewerte statt. Stattdessen werden die Glucosekonzentrationen in anderen Bereichen des Gewebes bestimmt, wie z. B. der Haut oder im Kammerwasser (KW).

Die menschliche Haut besteht zu ca. 45 % aus interstitieller Flüssigkeit und zu ca. 5 % aus Blutbahnen. [44] Änderungen der Glucosekonzentration werden somit nur zu einem geringen Teil durch Änderungen der Blutglucose-Konzentrationen hervorgerufen. Unter physiologischen Bedingungen findet ein schneller, ungehinderter Glucose-Austausch zwischen Blutplasma (BP) und interstitieller Flüssigkeit statt. Dies bedingt eine hohe Korrelation der Konzentrationsänderungen in den beiden Medien. [9, 44]

Die Konzentrationsänderungen in der interstitiellen Flüssigkeit sind im Vergleich zum Plasma allerdings verzögert. Diese Verzögerung muss beachtet werden, da eine Missinterpretation der Daten für den Patienten schwerwiegende Folgen haben kann. Außerdem zeigen sich bei Diabetikern Veränderungen in der Struktur der Kapillarwände, die u. U. die Diffusionsbarriere erhöhen und so eine zusätzliche Verzögerung hervorrufen könnten. Desweiteren sind die inter- und intraindividuellen Einflüsse auf die zeitliche Differenz noch nicht ausreichend geklärt. [9]

Neben der zeitlichen Differenz, die bei der Auswertung berücksichtigt werden kann, bleibt die Frage offen, ob die Glucosewerte im Gewebe mit denen im Blut identisch sind. Bisherige *steady-state* Studien ergaben für die Abweichung Werte zwischen 50 und 100 %. [44] Die Ursache für diese Schwankungsbreite mag in der Wahl des Messortes liegen, da die Glucosewerte in der interstitiellen Flüssigkeit und auch im Blut in Abhängigkeit der Körperregion, in der sie gemessen werden, variieren. Desweiteren hängen interstitielle Glucosewerte stärker als intravasale Werte von metabolischen Änderungen in den Muskelzellen, Fettzellen und anderen Gewebezellen ab.

Die körpereigene Reaktion auf Änderungen der Glucosewerte geschieht fast sofort. Glucosesensoren sollten daher in der Lage sein, Änderungen schnell zu registrieren und auszugeben. Ideal wäre eine kontinuierliche Messung, bei der auch Trends verfolgbar sind. Ein vollständiges Blutzuckertagesprofil, wie es ein kontinuierlicher Glucosesensor aufzeichnen könnte, gäbe den Patienten die Möglichkeit, ihre Insulin-Therapie optimal einzustellen, außerdem könnten hyper- und hypo-

glykämische Zustände frühzeitig erkannt und behandelt werden, oder sogar eine Insulinpumpe individuell gesteuert werden. Desweiteren wären solche Geräte für die Insulin-Einstellung bei Therapiebeginn notwendig. Eine Bedingung für alle Geräte ist die einfache Bedienung und die Möglichkeit zum schnellen und sicheren Ablesen. Weitere Anforderungen an Glucosesensoren sind die Stabilität des Signals nach der Messung und die Langzeitstabilität des Sensors.

Im Folgenden werden verschiedene Ansätze für die Realisierung solcher Sensoren aufgezeigt. Neben den nicht-invasiven Sensoren werden auch invasive und minimal-invasive Systeme kurz vorgestellt.

### 4.2.1 Invasive und minimal-invasive Sensoren

Die Abgrenzung zwischen invasiven und minimal-invasiven Sensoren ist fließend, da inzwischen einige der vollständig implantierten also invasiven Sensoren so verändert wurden, dass sie als minimal-invasiv eingestuft werden. Minimal invasive Methoden messen die Glucosekonzentration in der interstitiellen Flüssigkeit der Haut oder der Subcutis. Die Sensoren werden entweder in das Gewebe eingebracht oder mit interstitieller Flüssigkeit in Kontakt gebracht, die aus dem Körper extrahiert wird. Dadurch kann spezifisch in absoluter Konzentration Glucose gemessen werden. [4,9]

Die Gewinnung der interstitiellen Flüssigkeit erfolgt auf verschiedene Weise. Neben Glucose-Elektroden [7] und Mikrodialyse [9] werden transdermale Methoden [7,115,116] getestet, wobei die Biokompatibilität der implantierbaren Sensoren entscheidenden Einfluss auf die Funktionsfähigkeit und Langzeitstabilität der Sensoren hat.

Künstliche Glucose-Rezeptoren als Alternative zu den herkömmlichen Enzymen könnten die *in vivo* auftretenden Interferenzen mindern und daher stabiler für langfristige Implantate sein. Ein Ansatz sind künstliche Antikörper (*plastic antibodies*), ein weiterer modifizierte fluoreszierende Moleküle. [7]

**Glucose-Elektroden:** Glucose-Elektroden sind meist nadelförmige Elektroden, die aus einer dünnen Nadel oder einem flexiblen Draht mit einem Detektorelement an oder nahe der Spitze bestehen. [7] Diese werden im subkutanen Gewebe implantiert. Durch den an der Spitze angelegten Strom wird das Glucose-spezifische Enzym, die Glucoseoxidase, immobilisiert und die Glucose-Konzentration über die Änderung

des Stromflusses gemessen, der durch die enzymkatalysierte Wasserstoffperoxid-Produktion entsteht.

**Mikrodialyse:** Die Mikrodialyse imitiert die Funktion von Kapillaren. Eine semi-permeable Dialylenadel wird in das subcutane Gewebe eingebracht und die Faser mit isotonischer Lösung gespült. Die aufgefangene Lösung ist dann ein Dialysat der interstitiellen Flüssigkeit. Diese Lösung enthält Glucose, die auf Grund des Konzentrationsgradienten aus der interstitiellen Flüssigkeit durch die Dialyse Membran in das Dialysat diffundiert. Die Analyse erfolgt kontinuierlich außerhalb des Körpers. [7, 9] Der Vorteil der Methode liegt darin, dass Fremdkörper-Reaktionen, wie sie ein implantierbarer Sensor verursachen kann, ausgeschlossen werden können. Dies erlaubt eine kontinuierliche Messung ohne eine starke Signal-Drift. Ein Nachteil ist die zeitliche Differenz von 5 bis 45 min zwischen der Glucosekonzentration in der interstitiellen Flüssigkeit und im Blut. Mehrere Sensoren dieser Art wurden bereits entwickelt. [9] Sie erlaubten die kontinuierliche Glucosemessung über mehrere Tage. Nach diesem Zeitraum muss die Faser ausgetauscht werden, da sie sich zusetzt und das umliegende Gewebe auf die Faser reagiert.

**Transdermale Methoden:** Eine Methode, interstitielle Flüssigkeit zu gewinnen, ohne die Haut zu penetrieren, ist die inverse Iontophorese [7, 115] Hierbei wird eine schwache Spannung an die Haut angelegt und dadurch werden Ionen durch die Haut hindurch transportiert. Der Glucosegehalt des Extraktes liegt bei etwa 1/1000 des Blutes. Die Analyse erfolgt z. B. mittels der Glucose-Oxidase-Reaktion (s. Abb 4.1) außerhalb des Körpers. Die von der *Food and Drug Administration* (FDA) anerkannte Glucowatch ist nach diesem Prinzip aufgebaut. Nach einer dreistündigen Aufwärmphase kann das Gerät zwölf Stunden lang bis zu drei punktuelle Messungen pro Stunde aufzeichnen. [115]

Eine weitere Methode zur Gewinnung ausreichender Mengen interstitieller Flüssigkeit stellt die Verwendung von niederfrequentem Ultraschall dar. [116] Es kommt zur Verstärkung der Permeabilität der Haut und die interstitielle Flüssigkeit kann z. B. mit Unterdruck extrahiert werden. Die Analyse erfolgt in beiden Fällen extrakorporär.

### 4.2.2 Nicht-invasive Sensoren

Die meisten nicht-invasiven Ansätze konzentrieren sich auf optische Glucosesensoren. [2–10] Licht wird durch die intakte Hautoberfläche eingestrahlt und die reflektierten, transmittierten oder gestreuten Signale gemessen. Dieses entspricht einer indirekten Glucosemessung in intrazellulären, interstitiellen bzw. intravaskulären Bereichen. Am häufigsten wird die NIR-Spektroskopie für diese Messungen herangezogen. NIR-Licht vermag in Abhängigkeit der Wellenlänge 1–100 mm weit in die Haut einzudringen, bzw. sie zu durchdringen. [45] Gerade für Transmissionspektren bietet sich der Bereich des sogenannten therapeutischen Fensters zwischen 16700 und 7700  $\text{cm}^{-1}$  (600–1300 nm) an. Der Bereich unterhalb dieser Wellenzahlen wird von zwei Wasser-Banden dominiert, die allerdings zwei weitere Fenster zwischen 5500 und 6500  $\text{cm}^{-1}$  und 4000–5000  $\text{cm}^{-1}$  begrenzen. [10, 117] Die Bereiche unterhalb von 7700  $\text{cm}^{-1}$  können z. B. durch spezielle Messungen der diffusen Reflexion zugänglich gemacht werden. Je nach Messort und den dort vorliegenden physiologischen Bedingungen werden verschiedene spektroskopische Techniken eingesetzt.

**Lichtstreuung:** Viele Strukturen in der Haut, z. B. die Zellmembranen, Zellorganellen und Kollagenfasern, absorbieren nicht nur NIR-Licht, es wird auch an ihnen gestreut. Die Streuung ist dabei der bevorzugte Prozess. In turbulenten Suspensionen hängt die Lichtstreuung vom Verhältnis der Brechungsindices zwischen suspendierten Partikeln und Lösung ab. Eine Erhöhung der Glucose-Konzentration bewirkt eine proportionale Erhöhung des Brechungsindex der Lösung, hier Blut und interstitielle Flüssigkeit. [39, 41, 42] Dies zieht eine Änderung der Streueigenschaften der suspendierten Partikel nach sich, der Streukoeffizient wird kleiner.

Die Anwendbarkeit dieses Phänomens für nicht-invasive Untersuchungen wurde an Typ-I-Diabetikern mit Hilfe der Glucose-Clamp-Technik gezeigt. [43] Die durch die Glucose-Clamp-Technik hervorgerufenen schnellen Änderungen zwischen eu- und hyperglykämischen Werten resultierten in einem Abfall der Lichtstreuung um ca. 1 % je 5.5 mmol/l Konzentrationsänderung. Dies konnte auch bei späteren Untersuchungen an Typ-II-Diabetikern mit Glucosetoleranztests verfolgt werden.

Dieser Ansatz beruht nicht auf der spezifischen Messung von Glucose. Der Glucosewert wird indirekt über Glucose-induzierte Änderungen des Brechungsindex ermittelt. Daher besteht die Möglichkeit, dass auch andere Blutanalyte und physiolo-

gische Faktoren, wie z. B. Veränderungen in der Wasser–Plasma-Verteilung zwischen intravasalen und interstitiellen Gebieten oder Temperaturänderungen, die Messung beeinflussen können.

**Polarimetrie** Die polarimetrische Quantifizierung von Glucose beruht auf der Grundlage der optischen Rotation. Glucose als chirales Molekül ist in der Lage, die Polarisationssebene linear-polarisierten Lichts zu drehen. Es konnte gezeigt werden, dass die optische Rotation von Glucose in physiologischen Konzentrationen bei Weglängen von etwa 1 cm in der Größenordnung von  $0,005^\circ$  liegt. [3, 8, 37–39] Da die Haut ein stark streuendes Medium ist wurde bereits 1979 von March et al. die Vorderkammer als Messort vorgeschlagen und zwar der transversale Strahlengang. [36] Nach *In-vitro*-Versuchen an Kaninchenaugen [36] und intakten Rinderaugen [39] wurden auch erste *In-vivo*-Messungen [40] durchgeführt.

**Raman-Spektroskopie** Auch die Raman-Spektroskopie wird als potentielle Methode zur nicht-invasiven Glucosebestimmung untersucht. Bisherige Studien wurden an komplexen, wässrigen Glucoselösungen [27, 30, 31], Blutplasma, [31, 32] Kammerwasserproben [28, 29] und Kammerwassermodellen von Kaninchen [33, 34] und an einem Modell der menschlichen Vorderkammer [35] durchgeführt. Als möglicher Messort wird das menschliche Auge vorgeschlagen, [3, 8] allerdings sind *In-vivo*-Messungen am Auge bisher nicht bekannt, vor allem da sie durch die strengen Grenzwerte der Laserbelastung erschwert werden.

**Photoakustische Spektroskopie:** Der photoakustische Prozess beinhaltet die Umwandlung optischer Energie in akustische Energie über einen mehrstufigen Umwandlungsprozess. Das eingestrahelte Licht führt zu einer lokalen Erwärmung der Probe, diese wiederum zu einer gewissen Ausdehnung der Region, die mit dem Licht wechselwirkt. Durch die Ausdehnung wird eine Druckwelle erzeugt, die vom Ort der Entstehung nach außen propagiert und mit einem piezoelektrischen Detektor gemessen werden kann. Wird nun Licht aus dem nahen Infrarot zur Anregung verwendet, kann auch diese Methode zur nicht-invasiven Bestimmung der Blutglucosewerte herangezogen werden. Bisher wurden Messungen am Finger [6] und an der Haut [25, 26] durchgeführt bzw. vorgeschlagen.

**MIR-Spektroskopie:** MIR-Spektren von wässrigen Lösungen zeigen hohe spektrale Hintergrundsignale, daher können quantitativ verwertbare Spektren wässriger Lösungen nur mit Schichtdicken von wenigen hundert Mikrometern aufgenommen werden. Die geringen Schichtdicken limitieren die MIR-Spektroskopie für *In-vivo*-Messungen stark. Trotzdem wurde auch dieser Bereich für die quantitative Glucose-Bestimmung herangezogen. So wurde z. B. mit Glucose versetztes Vollblut oder die Effektivität verschiedener Kalibrier-Verfahren für gepufferte Lösungen mit Glucose und verschiedenen interferierenden Substanzen untersucht. [8] Es wurde auch die Verwendung von ATR-Spektroskopie (*Attenuated Total Reflection*) vorgeschlagen und an Vollblut gezeigt. [8,22] Shichiri et al. [23] zeigten, dass Messungen mit einem Chalkogenid-ATR-Kristall an der Lippenschleimhaut möglich sind. Auch Heise et al. [24] führten entsprechende Messungen an der Lippenschleimhaut durch.

**NIR-Absorptions-Messungen:** NIR-Spektroskopie in diffuser Reflexion ermöglicht die Vermessung kompakter Proben und hat den Vorteil, dass die von der Probe reflektierten Signale detektiert und ausgewertet werden. Daher eignet sich diese Konfiguration besonders gut für nicht-invasive Messansätze.

Robinson et al. [11] führten Messungen an der Fingerbeere zwischen 600 und 1300 nm durch. Die absoluten mittleren Vorhersagefehler der PLS- bzw. PCR-Regressionen lagen dabei zwischen 1,1 und 2,1 mmol/l (19,8–37,8 mg/dl). Auch die Gruppe um Heise verwendet die diffuse Reflexion, allerdings im Bereich zwischen 1111 und 1835 nm. [12,13] Sie führten mit einer optimierten Reflexionseinheit *In-vivo*-Experimente an der Lippenschleimhaut durch. [12] Ein zweitägiger Glucose-Toleranztest an einer Person führte zum besten Ergebnis mit einem Standardvorhersagefehler (SEP) von 2,4 mmol/l (43 mg/dl).

Weitere Studien wurden von der Gruppe um Danzer mit einer Faseroptik zwischen 800 und 1350 nm am Mittelfinger durchgeführt. [14,15,18] Die Auswertung erfolgte mit PLS-Regression und neuronalen Netzen. Eine Kreuzvalidierung über 31 Glucose Profile lieferte dabei einen mittleren Vorhersagefehler von 2,0 mmol/l (36 mg/dl). [18] Malin et al. führten *In-vivo*-Messungen zwischen 1050 und 2450 nm am Unterarm durch. [19] Die besten Ergebnisse lagen dabei bei einem mittleren Vorhersagefehler von  $MSEP = 1,03$  mmol/l (19,0 mg/dl).

**NIR-Transmissions-Messungen:** Im Gegensatz zu Messungen in diffuser Reflexion können *In-vivo*-Transmissionsspektren nur an wenigen Stellen am Körper durchgeführt werden. Diese Stellen müssen durchlässig für das verwendete Licht sein und möglichst dünn, damit eine hohe Signalausbeute gewährleistet werden kann. Verschiedene Stellen wurden von Burmeister und Arnold [16, 17, 20, 21] getestet. Sie haben Transmissionsspektren im Bereich 1429–2000 nm an der Unterlippe, der Oberlippe, dem Nasenseptum, der Wange, der Schwimmhaut zwischen zwei Fingern und der Zunge aufgenommen. Der Vorhersagefehler (SEP) lag für alle Personen bei  $> 3,0$  mmol/l (54 mg/dl). [20, 21] Neben diesen relativ dünnen Hautschichten wurde auch die Vorderkammer (VK) des menschlichen Auges als möglicher Messort untersucht. [39, 46–48]

Alle hier angesprochenen Studien zeigten auch Grenzen auf, die sich auf die Zuverlässigkeit der Methode auswirken. Diese Einschränkungen sind u. a. die Sensitivität, Probleme bei der Probennahme, die zeitlichen Differenzen, Kalibrier-Fehler, Temperaturschwankungen, die Langzeitstabilität und Geräterauschen. Zusätzlich limitiert wird die akkurate nicht-invasive Vorhersage von Blutglucose durch die Dynamik der bisher verwendeten Proben, der Haut und das Gewebe des Probanden. [2, 5, 45] Es treten chemische, strukturelle und physiologische Variationen auf, die dramatische, oft nicht-lineare Änderungen der optischen Charakteristika der Gewebeprobe nach sich ziehen können. Desweiteren erschweren die komplexen, sich ändernden Hintergrund-Signale anderer Substanzen im Blut, wie z. B. Körperfett und Proteine, die Messung. Viele experimentelle Ansätze nutzen die NIR-Spektroskopie. Die menschliche Vorderkammer bzw. die Hornhaut ist für Licht im NIR-Bereich durchlässig, dadurch bietet sich auch hier die Verwendung der NIR-Spektroskopie für die nicht-invasive Glucose-Bestimmung an. Die Grundlagen der NIR-Spektroskopie werden im Folgenden näher erläutert.

### 4.2.3 NIR-Spektroskopie

Das nahe Infrarot (NIR) umfasst den spektralen Bereich von  $12800$  bis  $4000$   $\text{cm}^{-1}$  (780–2500 nm). Im NIR-Bereich sind Obertöne und Kombinationsschwingungen aktiv, im Gegensatz zum mittleren Infrarot (MIR). Dort liegen zusätzlich die Grundschwingungen der Moleküle. Die Obertöne treten als Folge der Anharmonizität der

Schwingungspotentiale auf, die bei großen Schwingungsamplituden bemerkbar sind, also vor allem bei Bindungen zu leichten Atomen wie Wasserstoff. Auf Grund der Anharmonizität der Moden wird die strikte Auswahlregel für die Änderung der Schwingungsquantenzahl  $\Delta\nu = \pm 1$  abgeschwächt und auch Übergänge mit  $\Delta\nu = \pm 2, \pm 3 \dots$  sind erlaubt. Die Übergangswahrscheinlichkeit nimmt jedoch ab. Durch die mit steigender Schwingungsquantenzahl abnehmenden Differenzen der Energieniveaus des anharmonischen Oszillators ist die Wellenlänge der Oberschwingung immer etwas größer als  $\lambda_1/2, \lambda_1/3, \lambda_1/4 \dots$ . Im kurzwelligen NIR-Bereich liegen außerdem Absorptionsbanden, die von elektronischen Übergängen der schwersten Atome (seltene Erden, Transurane) resultieren. Diese Elemente besitzen in ihren äußeren Elektronenhüllen  $f$ -Elektronen mit so geringen Bindungsenergien, dass elektronische Übergänge im NIR sichtbar sind. [118]

Kombinationsbanden treten auf, wenn ein Lichtquant in einem mehratomigen Molekül gleichzeitig zwei oder mehr Schwingungen anregt, deren Gesamtenergie exakt der des Lichtquants entspricht. Dabei dominieren einfache Kombinationen aus zwei Grundschwingungen. Ein weiteres im MIR und NIR auftretendes Phänomen sind Bandenverdopplungen auf Grund von Fermi-Resonanz. Deren Ursache liegt in der Kopplung von Ober- oder Kombinationsschwingungen mit einer Grundschwingung gleicher Energie. [119]

Eine vollständige quantitative Spektreninterpretation ist nur für zweiatomige oder hochsymmetrische mehratomige Moleküle möglich, da komplexe Moleküle mehrere tausend Schwingungszustände besitzen. Zwei Ursachen lassen NIR-Absorptionspektren dennoch einfacher erscheinen als vergleichbare Spektren im MIR. Einerseits ist eine Entkopplung der Valenzschwingung bei höheren Wellenzahlen zu beobachten, dadurch schwingen die einzelnen Bindungen unabhängig voneinander, also analog zu zweiatomigen Molekülen (*local mode* Schwingungen) [120], andererseits sind durch die Abnahme der Übergangswahrscheinlichkeit um etwa eine Zehnerpotenz pro Stufe der Oberschwingung im NIR-Spektrum nur wenige Banden mit ausreichender Intensität zu finden. Im Spektrum dominieren daher Obertöne und Kombinationsbanden der Valenzschwingungen von C-H, N-H und O-H. [121]

Charakteristisch für NIR-Absorptionspektren sind breite, überlappende Banden, die für die Strukturaufklärung mehratomiger Moleküle weniger geeignet sind als MIR-Spektren. Eine Ausnahme bilden Untersuchungen zu Wasserstoffbrücken-

bindungen, speziell zur Struktur flüssigen Wassers. [122] Banden-Verschiebungen auf Grund einer Änderung der chemischen Umgebung machen sich im NIR wesentlich stärker bemerkbar als im MIR, da diese Änderungen sich mit jeder Stufe der Oberschwingung stärker auswirken.

Vor allem NIR-Absorptions-Spektren von Systemen mit Wasserstoffbrücken zeigen eine starke Abhängigkeit von der Struktur, Polarität und Temperatur des Lösungsmittels sowie von anderen gelösten Stoffen. Die auftretenden Banden-Verschiebungen können zur quantitativen Bestimmung von Substanzen genutzt werden, die selbst keine NIR-Banden zeigen. Auf diesem Weg konnten bereits die Konzentrationen bestimmter Salze, z. B. in Lebensmitteln, bestimmt werden. [123]

Das Haupteinsatzgebiet der NIR-Spektroskopie liegt heute in der quantitativen Analyse, vor allem in Kombination mit modernen chemometrischen Methoden. Die schwachen Intensitäten der NIR-Absorptionen lassen im Vergleich zum MIR- oder UV/VIS-Bereich lange Weglängen zu und die Proben können ohne große Vorbereitung vermessen werden. [124]

Es gibt zahlreiche Anwendungsbeispiele der NIR-Spektroskopie bzw. der NIR-Spektroskopie in Verbindung mit Chemometrik in der Literatur. Exemplarisch seien hier einige neuere Übersichtsartikel [121, 122, 125–131] angegeben. Die Anwendungen reichen z. B. von der reinen Grundlagenforschung über die Ermittlung des Feuchtigkeits-, Protein- und Ölgehalts verschiedener Getreidesorten, die Untersuchung von rohen und verarbeiteten Lebensmitteln sowie von Fasern und Polymeren, der quantitativen Bestimmung von Färbemitteln in der Textilindustrie bis hin zur *On-line*- und *In-line*-Kontrolle chemischer und pharmazeutischer Prozesse. Gerade im pharmazeutischen Bereich findet diese Technik ein breites Einsatzgebiet, da sowohl die verwendeten Chemikalien, der Herstellungsprozess und auch das fertige Produkt nicht nur analysiert, sondern auch validiert werden müssen. Die NIR-Spektroskopie ist eine anerkannte Validierungsmethode. Auch die Biomedizin und Klinische Chemie sind interessante Gebiete. Hier werden die Grundlagen zur quantitativen Bestimmung von Blut-, Gewebe- und Urinuntersuchung gelegt. Einige dieser Verfahren werden nicht-invasiv durchgeführt. Gerade nicht-invasive Messungen erfordern flexible, an die Probe und Aufgabenstellung angepasste Spektrometer und Aufbauten.

## 4.3 Experimenteller Aufbau

Die NIR-Messungen werden an verschiedenen Geräten durchgeführt, die hier kurz vorgestellt werden. Desweiteren wird die *In-vivo*-Adaption eines dispersiven und eines FT-NIR-Spektrometers beschrieben.

### 4.3.1 Aufbau des FT-Spektrometers

Abb. 4.3 A zeigt den schematischen Aufbau eines Fourier-Transform (FT) Spektrometers (Vector22/N-C, Bruker), der Strahlengang für die Messung im Probenraum ist eingezeichnet. Abb. 4.3 B zeigt eine Detail-Photographie des Probenraums.

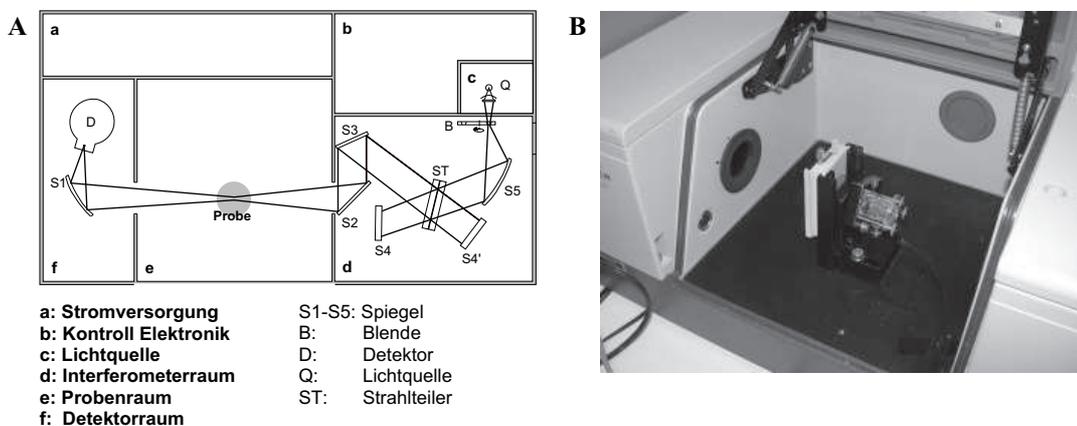


Abb. 4.3: **A:** Schematischer Aufbau des FT-Spektrometers (Vector22/N-C, Bruker). [132]  
**B:** Blick in den Probenraum des Spektrometers.

Das Licht der internen Wolfram-Lampe (Q) durchläuft zuerst das aus zwei Spiegeln und einem Quarz-Strahlteiler bestehende Michelson-Interferometer (**d**) und anschließend die Probe, bevor es auf den Detektor (D) fokussiert wird. In diesem Gerät können drei verschiedene Detektoren verwendet werden: ein Peltier-gekühlter InGaAs-Detektor ( $12800\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$ ) und ein luftgekühlter InGaAs-Detektor ( $10000\text{--}6000\text{ cm}^{-1}$ ). Der luftgekühlte InGaAs Detektor ist sehr sensitiv und wird normalerweise in Raman-Spektrometern verwendet. Zur besseren Unterscheidung wird er von nun an als Raman-Detektor bezeichnet. In Abb. 4.4 sind die Empfindlichkeitskurven der drei Detektoren gezeigt. Die Lichtquelle wird mit  $12,2 \pm 0,1\text{ V}$  und  $2,92 \pm 0,1\text{ A}$  betrieben, dies entspricht einer Energie von  $11,2\text{ W}$  und laut Her-

stellerangaben einer Temperatur der Glühwendel von 3000 K. Das Spektrum der Lichtquelle entspricht einem schwarzen Strahler mit einer Temperatur von 3000 K und zeigt im NIR-Bereich keine nennenswerten Schwankungen. [133]

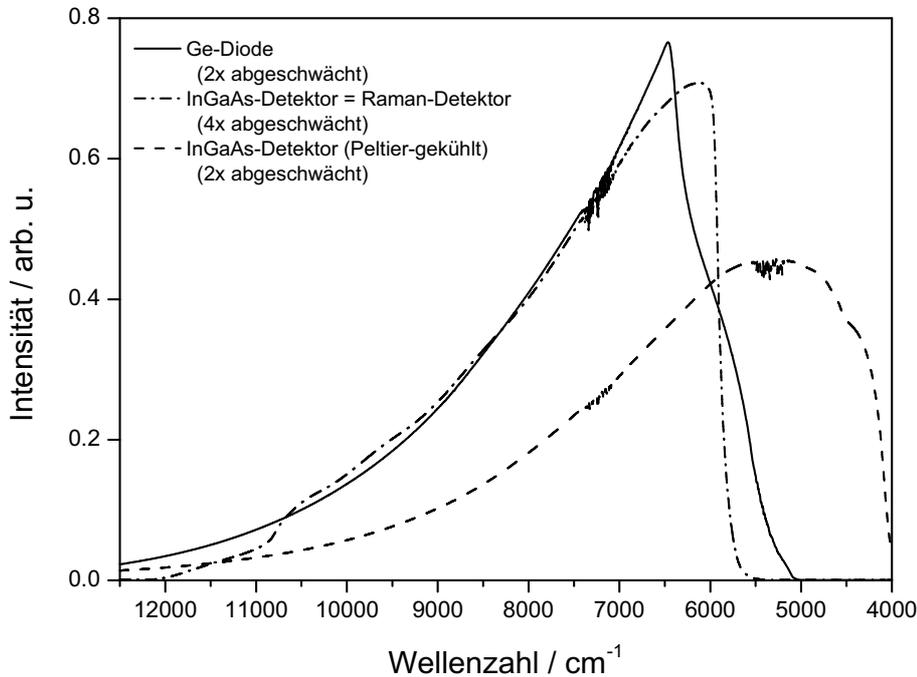


Abb. 4.4: Empfindlichkeitskurven der drei Detektoren des Vector22/N-C.

Die Empfindlichkeitskurven der Detektoren wurden erstellt, indem Leerkanal-Messungen mit den verschiedenen Detektoren durchgeführt wurden. Für die Ge-Diode und den gekühlten InGaAs-Detektor wurden zwei Lochplatten im Strahlengang als Abschwächer verwendet, für den Raman-Detektor sogar vier Abschwächer. Die weiteren Messungen wurden mit den beiden InGaAs-Detektoren durchgeführt, da diese die höhere Sensitivität zeigen und gerade *In-vivo*-Messungen können nur mit extrem sensitiven Detektoren durchgeführt werden. Die *In-vivo*-Messungen werden ohne Abschwächer durchgeführt. Für die *In-vitro*-Studien wird ein variabler Abschwächer eingesetzt, der so eingestellt wird, dass maximal 26500 count/s vom Detektor registriert werden. Der abrupte Einbruch des Raman-Detektors bei 10000 cm<sup>-1</sup> entsteht durch ein vor dem Detektorelement angebrachtes Filter, das das Detektormaterial vor einer Lichtsättigung schützt.

Das Spektrometer ist ein Einstrahlgerät. Um Referenzspektren ( $I_0$ ) aufnehmen

zu können, wird ein drehbarer Probenhalter verwendet. Auf der einen Seite ist die Probe befestigt, die andere Seite ist offen.

Das verwendete Messprogramm ist OPUS (Bruker). Die Daten werden direkt mit QUANT-2, einem Chemometrik-Programmpaket von OPUS, weiterbehandelt oder für die Bearbeitung mit anderen Programmen in ASCII-Daten umgewandelt. Eine komplette Liste der für die Messungen am Vector22/N-C verwendeten Parameter ist im Anhang A zu finden.

### ***In-vivo*-Adaption**

Für die *In-vivo*-Messungen musste das Spektrometer mit einem Glasfaseranschluss versehen werden. Eine schematische Darstellung des Strahlengangs ist in Abb. 4.5 zu sehen. Das Licht von der Glasfaser wird von einem Parabolspiegel (S7) gesammelt und anschließend über zwei plane Spiegel (S5+S6) in das Interferometer gelenkt. Diese beiden Spiegel ersetzen dabei den *Beamlift* (S5, Abb. 4.3). Zusätzlich wird die interne Lichtquelle über das Messprogramm abgeschaltet.

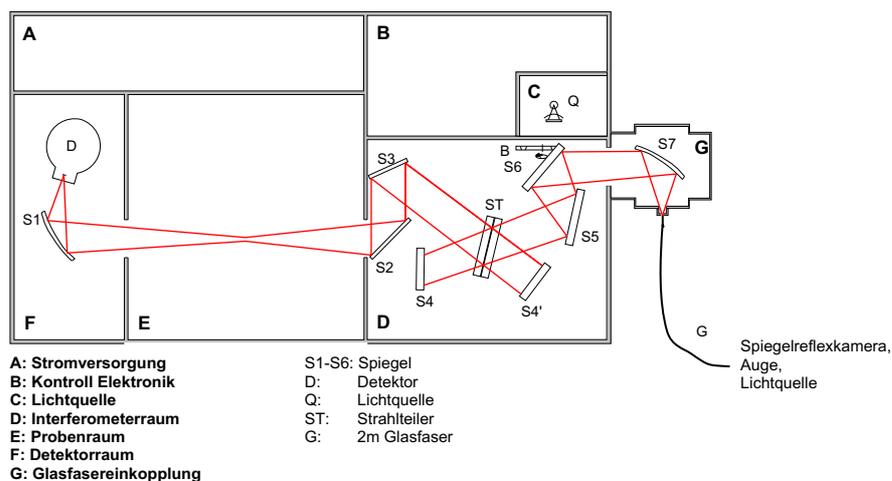


Abb. 4.5: Schematische Darstellung des FT-Spektrometers (Vector22/N-C, Bruker) angepasst für *In-vivo*-Messungen.

Neben diesen Änderungen am Spektrometer wird zusätzlich eine Ein- und Auskoppeleinheit zur Messung am Auge benötigt. Diese wird in Kap. 4.3.4 vorgestellt.

### 4.3.2 Dispersiver Aufbau

Neben dem FT-Spektrometer wird auch ein dispersives Spektrometer mit einem Diodenarray als Detektor eingesetzt (s. Abb. 4.6). Das Gerät besteht aus einem Flat-Field-Spektrographen (Abb. 4.6 B, CP140-1821, Jobin Yvon) und einem InGaAs-Diodenarray-Detektorsystem (IKS-Optoelektronik).

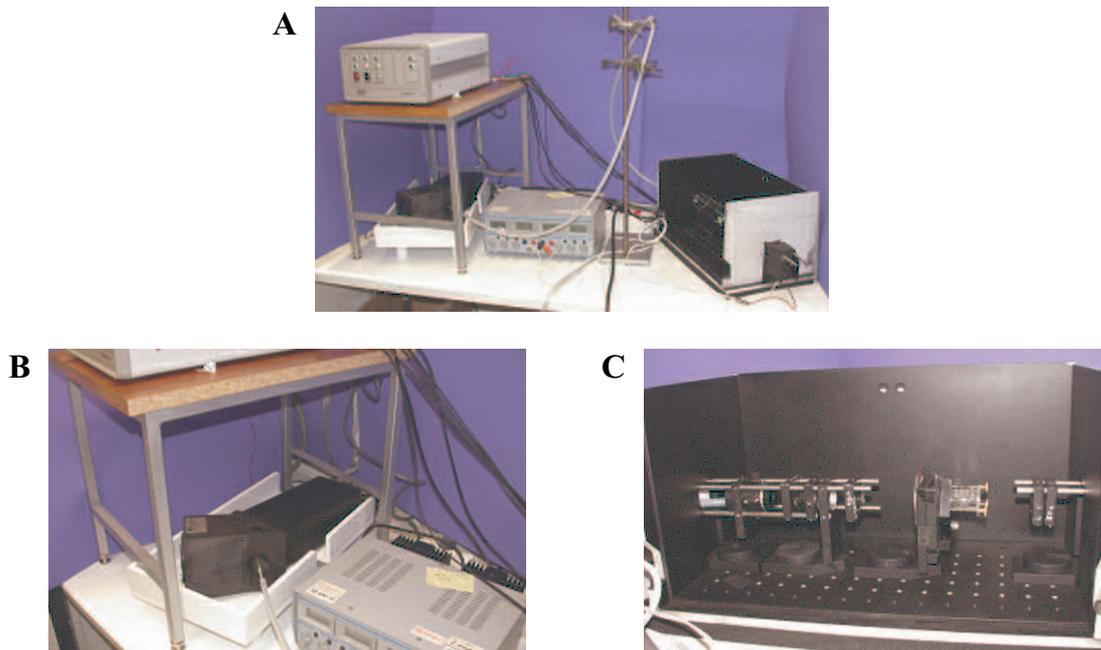


Abb. 4.6: **A:** Messaufbau für *In-vitro*-Messungen mit einem dispersiven Spektrometer. **B:** Das Spektrometer. **C:** Die Probenkammer.

Der Spektrograph ist ein sehr kompaktes Gerät (HBL:  $110 \times 120 \times 150$  mm) mit einem fixierten Gitter, das für den spektralen Bereich von 700–1700 nm optimiert ist.

Das verwendete Diodenarray besteht aus 512 Dioden (Elementabstand  $50 \mu\text{m}$ , Elementhöhe 1 mm), umfasst einen spektralen Bereich von 0,8–1,7  $\mu\text{m}$  und wird thermoelektrisch gekühlt (3-stufig), die Wärmeabfuhr erfolgt über eine Wasserkühlung. Die Ausleserate liegt bei  $10^7$  Elemente/s, zwei Pixel sind fehlerhaft (Nr. 256 und 107). Je nach Ausrichtung von Spektrometer und Array zueinander liegt die Mitte des Spektrums bei 1300 nm bzw. 1700 nm.

Zur Einkopplung der Glasfaser wird ein angepasster Adapter verwendet, der das Ende der Faser direkt vor dem Festspalt platziert. Dadurch wird die spektrale

Auflösung erhöht im Vergleich zu einer Messung, die nur mit einem Faseradapter ohne Festspalt durchgeführt wird (s. Abb. 4.7). Die beiden Spektren sind auf die Bande bei  $9899\text{ cm}^{-1}$  normiert. Das Spektrometer kann über das Programm Xlab (IKS Optoelektronik) und ein IEEE-488 Interface angesteuert werden.

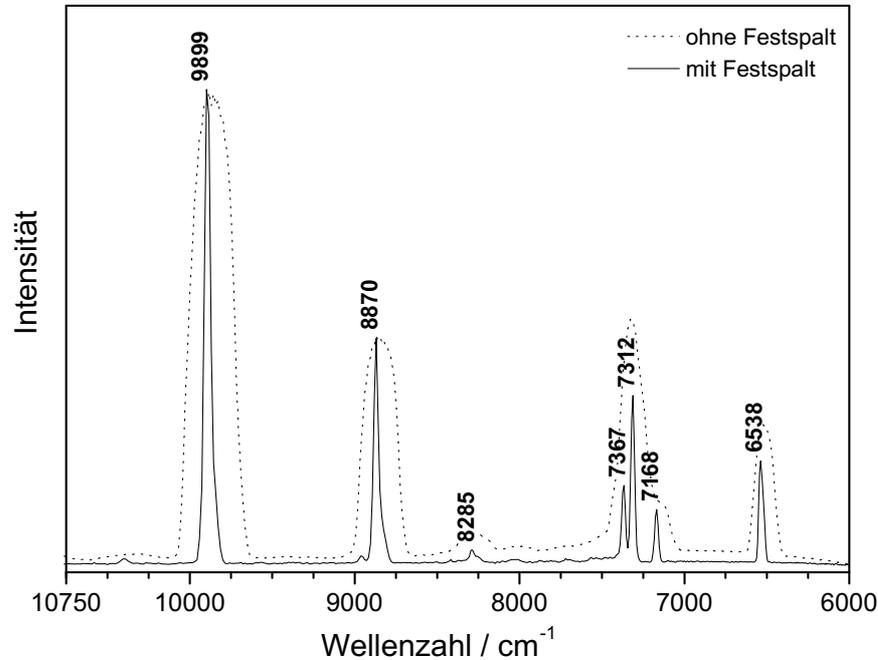


Abb. 4.7: Vergleich der Spektren einer Hg-Lampe ( $\lambda = 254\text{ nm}$ ) mit und ohne Festspalt zwischen Glasfaser und dispersivem Spektrometer ( $t = 10\text{ ms}$ ).

Für Küvetten-Messungen mit diesem Gerät wurde eine Probenkammer gebaut, deren Optik der des *In-vivo*-Aufbaus entspricht, um vergleichbare Messbedingungen zu haben. Die geöffnete Probenkammer ist in Abb. 4.6 A und als Nahaufnahme in Abb. 4.6 C zu sehen. Der Boden ist einer Lochplatte, wie sie bei Lasertischen üblich ist, nachempfunden. Sowohl der Deckel als auch die Seitenteile können entfernt werden, um Zugriff auf die Probe zu erhalten bzw. die Optik zu justieren. Ein schematischer Aufbau ist in Abb. 4.8 zu sehen.

Das Licht einer Wolframlampe (12 V, 30 W, Osram) wird auf die Probe und anschließend auf die Glasfaser fokussiert. Die Lichtquelle wird mit einem CPU-Lüfter gekühlt, um die Aufheizung des Probenraums zu minimieren. Die Glasfaser ist so befestigt, dass sie in zwei Achsen justiert werden kann. Das dispersive NIR-

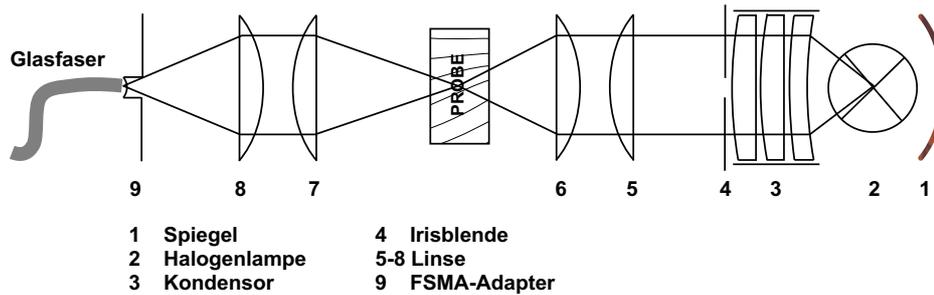


Abb. 4.8: Schematische Darstellung der Optik in der Probenkammer.

Spektrometer ist extrem sensitiv. Um eine Detektorsättigung zu vermeiden, muss die Intensität des einfallenden Lichts reguliert werden. Dies kann durch das Einbringen von Lochplatten in den Strahlengang geschehen. Die verwendeten Linsen sind Quarzlinsen (Suprasil, Schott), da dieses Material sowohl im NIR als auch im UV durchlässig ist und die Probenkammer so auch mit dem UV-Spektrometer (s. Kap. 3.2) kombiniert werden kann.

### 4.3.3 Externe Messungen

Um den Einfluss des Geräts auf die Ergebnisse der *In-vitro*-Messungen zu untersuchen, wurden zusätzliche Testmessungen an externen Geräten durchgeführt. Dabei wurden Glucose/Wasser-Mischungen an den in Tab. 4.1 aufgeführten Geräten mit folgenden Parametern vermessen.

Da sich das AOTF-Spektrometer (InfraPrime, Bran+Luebbe) grundlegend von den bisher vorgestellten unterscheidet, wird dessen Funktionsweise genauer erläutert.

#### AOTF-Spektrometer

Abb. 4.9 zeigt den schematischen Strahlengang eines AOTF-Spektrometers (InfraPrime, Bran+Luebbe).

Die Technik der AOTF-Filter (Acousto-Optic-Tunable-Filter) beruht auf der Tatsache, dass sich die Wellenlänge einer Schallwelle in einer Substanz ändert, wenn sich die Frequenz des Schalls ändert. Die Schallwelle formt eine Serie von Regionen mit hoher und niedriger Dichte, an denen sich das Licht bricht (s. Abb.4.10). Es bildet sich ein durch die Frequenz modulierbares Gitter aus. [121, 135]

Tab. 4.1: Zusammenstellung der für externe Messungen verwendeten NIR-Spektrometer und der Parameter.

Firma Gerät	Bran+Luebbe		JASCO V-570	
	MB 160	InfraPrime		InfraProver
<b>Prinzip</b>	FT-Spektrometer	AOTF (2-Strahl)	Polarisations- Interferometer	dispersiv (2-Strahl)
<b>Lichtquelle</b>	IR-Quarz-Halogen	Wolfram-Halogen	Halogen	Halogen
<b>Detektor</b>	InAs	InGaAs	Pbs	Pbs
<b>Spektraler Bereich</b>	3800–14000 $\text{cm}^{-1}$ 700–2600 nm	5900–11000 $\text{cm}^{-1}$ 900–1700 nm	4000–10000 $\text{cm}^{-1}$ 1000–2500 nm	4000–30300 $\text{cm}^{-1}$ 330–2500 nm
<b>Auflösung</b>	16 $\text{cm}^{-1}$ 0,4 nm	3,5 $\text{cm}^{-1}$ 2 nm	12 $\text{cm}^{-1}$ 0,6 nm	14 $\text{cm}^{-1}$ 0,5 nm
<b>Anzahl an scans</b>	64	1	5	1
<b>Küvette</b>	Glasröhrchen für GC	Durchfluss	Durchfluss	Rechteck
<b>Schichtdicke</b>	5 mm	1 / 10 mm	1 mm	5 mm
<b>Temperatur</b>	37°C, temperiert	RT	RT	ca. 37°C
<b>Anzahl an Proben</b>	63	21 / 36	36	60
<b>Glucose [mg/dl]</b>	10–300, 500, 700, 800, 900	10–300, 500	10–300, 500	10–300, 500, 700, 750, 850
<b>Chemometrik- Software</b>	PLSPPlus/1Q	Sesame 3.1	Sesame 3.1	Spectra Manager
<b>Algorithmen</b>	PLS	MLR, PLS, PCR	MLR, PLS, PCR	PLS

GC: Gaschromatographie, AOTF: Acousto-Optic-Tunable-Filter.

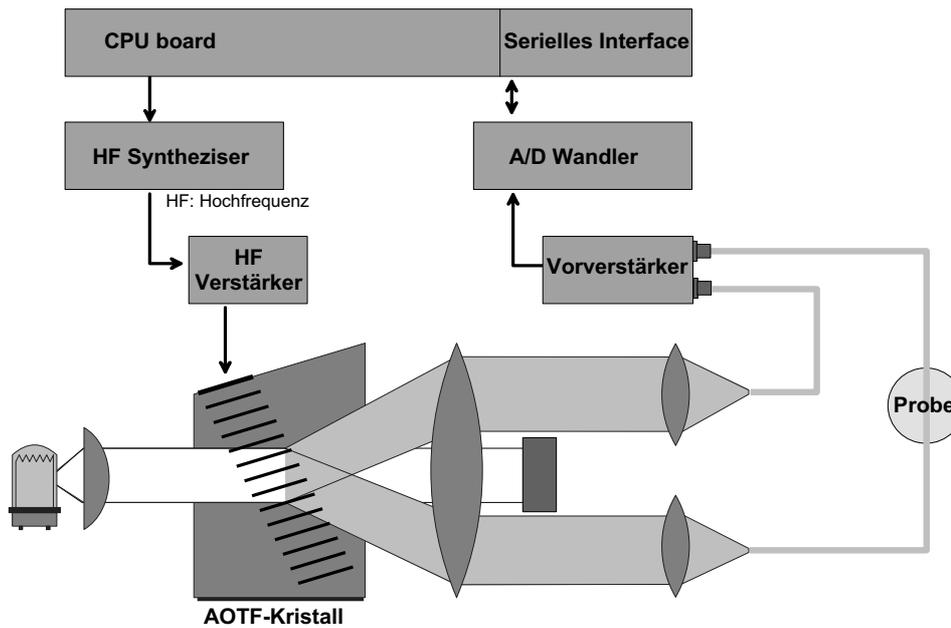


Abb. 4.9: Schematischer Strahlengang eines AOTF-Spektrometers (InfraPrime, Bran+Luebbe). [134]

In einem Spektrometer wird der Effekt folgendermaßen umgesetzt: Ein Piezoelektrisches Element wird an ein im NIR durchlässiges Material, dem AOTF-Kristall, angebracht. Im Kristall wird durch das Anlegen einer Wechselspannung (AC-Signal) eine Schallwelle erzeugt. Die Tonhöhe  $d$  des Schalls im Kristall ist durch das Verhältnis der Fortpflanzungsgeschwindigkeit  $v$  und der Frequenz  $f$  des AC-Signals gegeben. Eine Änderung der Frequenz führt zu einer Änderung des Abstands der Gitterstriche und damit zu einer Änderung der Wellenlänge des daran gebrochenen Lichts. Wird z. B.  $\text{TeO}_2$  als Kristall eingesetzt, so liegen die Werte für dieses Material bei:  $d = 8,2 \mu\text{m}$ ,  $v = 616 \text{ms}^{-1}$  und  $f = 75 \text{MHz}$ . Die eingesetzte Schallwelle ist eine Ultraschallwelle und damit für den Menschen nicht hörbar. [135]

An dem im Kristall generierten Gitter bricht sich das einfallende Licht. Es entsteht ein ordentlicher und ein außerordentlicher Strahl, die beide exakt dieselbe Wellenlänge aber verschiedene Polarisations-Richtungen haben. Im Fall des InfraPrime wird der eine Strahl auf die Probe gelenkt und der zweite für die Referenz verwendet. Als Detektoren dienen zwei InGaAs-Detektoren. Es ist ein echtes 2-Strahl-Gerät. [134] Die Wellenlänge der resultierenden Lichtstrahlen wird durch Frequenzänderung der Schallwelle moduliert. Der AOTF-Effekt ist ein tempera-

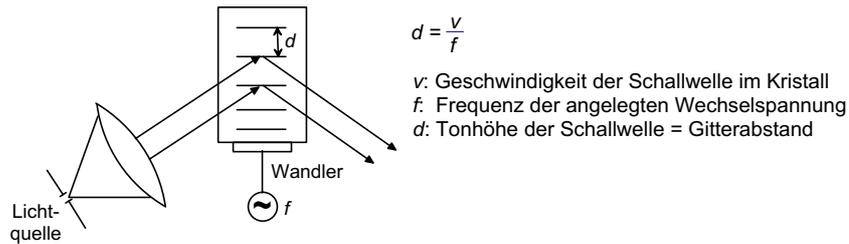


Abb. 4.10: Diffraction an einem akusto-optischen Gitter. [135]

turkritischer Effekt. Daher wird die Temperatur im Spektrometer mit mehreren Temperaturfühlern gemessen.

#### 4.3.4 *In-vivo*-Aufbau

Als *In-vivo*-Aufbau wird die Ein- und Auskopplung des Lichts am Auge bezeichnet. [46–48] Er ist so konzipiert, dass sowohl das FT-Spektrometer (Kap. 4.3.1) als auch das dispersive NIR- bzw. UV-Spektrometer (Kap. 4.3.2 bzw. 3.2) über eine Glasfaser angeschlossen werden kann. Verwendung findet eine Quarzfaser mit einem Durchmesser von 1 mm und eine Länge von 2 m (Optran WF 1000/1100 N, CeramOptec). Die Faser ist für Messungen im NIR ausgelegt, kann aufgrund ihrer optischen Eigenschaften aber auch im UV/VIS eingesetzt werden (s. Abb. 4.11).

Abb. 4.12 zeigt schematisch die Ein- und Auskoppleinheit vor dem Auge. In Abb. 4.13 sind Photographien des Aufbaus, auch am Probanden, zu sehen. Die Lichtquelle ist eine luftgekühlte Wolfram-Lampe (12 V / 30 W, Modell 64261, Osram), die stromstabilisiert mit einer Stromstärke von 2,5 A betrieben wird. Das Lampengehäuse, das auch den Spiegel und den Kollimator enthält, wird durch einen CPU-Lüfter gekühlt. Zusätzlich ist das Gehäuse mit Kühlrippen bestückt. Das Licht wird dann mit zwei Plan-Convex-Linsen auf das Auge fokussiert. Der Focusdurchmesser ist mit einer Irisblende einstellbar. Das an der Augenlinse reflektierte Licht wird wieder von zwei Plan-Convex-Linsen auf die Glasfaser fokussiert. Die zweite Irisblende dient dazu, z. B. von der Hornhaut reflektiertes Licht abzublocken. Die Glasfaser ist in der Fokusebene einer Spiegelreflexkamera (OM-1, Olympus) befestigt. Dies erlaubt dem Experimentator eine visuelle Kontrolle der Fokusposition auf der Augen-Linse, solange der Spiegel der Kamera hochgeklappt ist, und spektrosko-

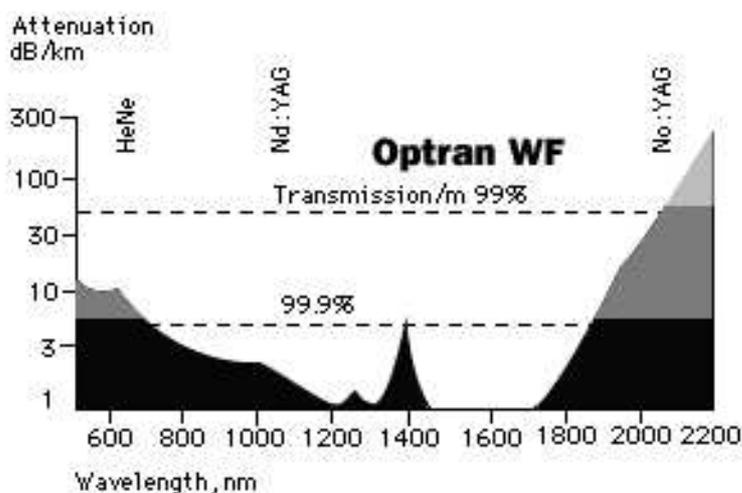


Abb. 4.11: Optische Eigenschaften der verwendeten Glasfaser (Optran WF 1000/1100 N, CeramOptec). Aufgetragen ist die Dämpfung (*attenuation*) gegen die Wellenlänge. [136]

pische Messungen, sobald die Kamera ausgelöst wird. Das Ende der Glasfaser führt zu einem Spektrometer, mit dem das transmittierte Licht detektiert wird.

Je nach Einsatzgebiet werden vor dem Auge noch Filter eingesetzt. Für UV-Messungen wird ein Kantenfilter (KG 1, Schott) verwendet, der Licht unterhalb von 380 nm abschneidet. Für NIR-Messungen wird ein Kantenfilter (RG 655 1.0, Schott) benutzt, der nur Licht oberhalb von 655 nm ( $15250 \text{ cm}^{-1}$ ) durchlässt. Zusätzlich wird bei Messungen mit dem FT-Spektrometer direkt vor der Glasfaser ein weiteres Filter (RG 850 1.0, Schott) angebracht, das Streulicht des He:Ne-Laser im Interferometer unterdrückt.

## 4.4 Chemikalien und Referenz-Analytik

### *In-vitro*-Messungen

Für die *In-vitro*-Messungen werden D-(+)-Glucose (wasserfrei für biochemische Zwecke), L-(+)-Ascorbinsäure (reinst), D,L-Milchsäure (reinst) und Harnstoff (reinst) verwendet. Die chemischen Strukturen der verwendeten Chemikalien sind in Abb. 4.14 angegeben. Glucose liegt in wässriger Lösung in mehreren Formen vor.

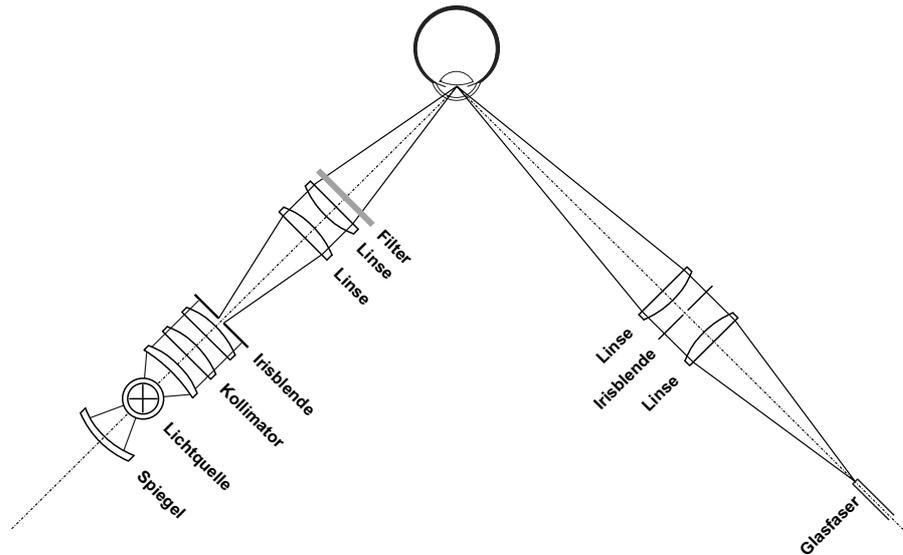


Abb. 4.12: Schematische Darstellung des Strahlengangs der Ein/Auskopplung vor dem Auge.

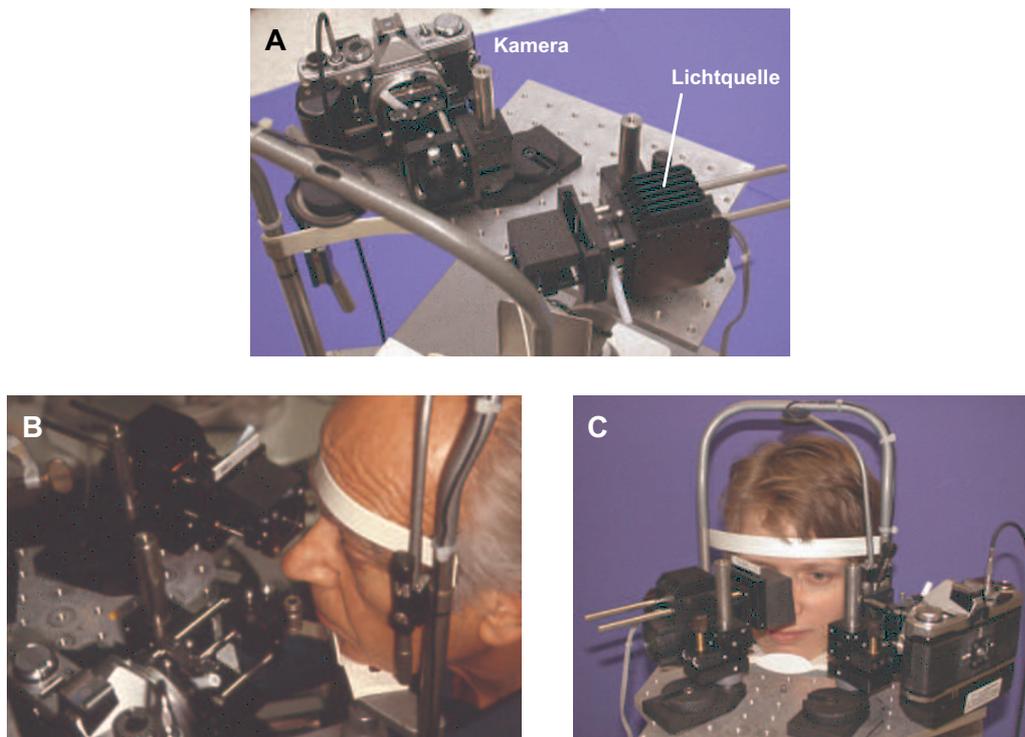


Abb. 4.13: Photographien des *In-vivo*-Aufbaus (A) und von B. Schrader (B) und P. Meuer (C) während einer Messung. Bild B zeigt eine Seiten- und Bild C eine Frontal-aufnahme des Aufbaus.

Die Mutarotation der Glucose ist ebenfalls in Abb. 4.14 dargestellt zusammen mit den im Gleichgewicht vorliegenden prozentualen Anteilen.

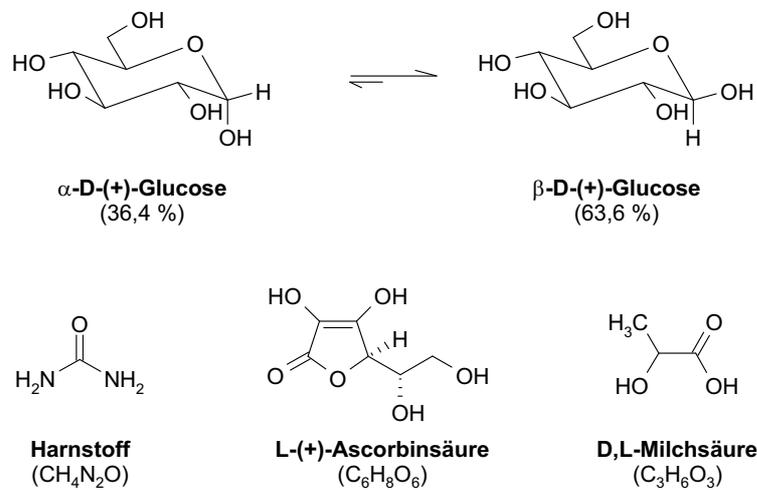


Abb. 4.14: Mutarotation von Glucose in Wasser und Strukturformeln der vermessenen Substanzen.

Die Proben für die NIR-Spektroskopie werden am Tag der Messung frisch angesetzt. Die Chemikalien werden für jede Probe getrennt eingewogen und mit ultrareinem Wasser aufgefüllt. Durch die getrennte Einwaage jeder Probe entstehen voneinander unabhängige Proben. Proben, die aus einer Stammlösung als Verdünnungsreihe hergestellt werden, sind voneinander abhängig. Diese Unabhängigkeit der Proben ist für die statistische Auswertung von entscheidender Bedeutung. Das Reinstwasser wird im Allgemeinen mit 0,05 % Natriumazid ( $\text{NaN}_3$ ) versetzt, um die Proben zu konservieren.

Die Konzentrationen der Glucoselösungen werden parallel im Klinischen Labor der Neurologischen Klinik Würzburg bestimmt. Die Bestimmung erfolgt nach der Hexokinase-Methode an einem Hitachi 911 (Roche). Das Gerät weist eine tagesunabhängige Genauigkeit von  $\leq 0.5\%$  auf. Diese Daten werden später zur Auswertung herangezogen.

Bis zur Messung werden die Proben zunächst bei ca  $35^\circ\text{C}$  vortemperiert. Dies vermindert eine störende Bläschenbildung in der Küvette.

Die *In-vitro*-Messungen werden mit Thermoküvetten (Hellma) mit 1 bzw. 5 mm Durchmesser durchgeführt. In Abb. 4.15 zeigt eine Thermoküvette im drehbaren

Halter. Die Küvetten haben rund um die Probe herum einen Wassertank, der mit einem herkömmlichen Thermostaten in der Regel auf  $37^{\circ}\text{C} \pm 0,1^{\circ}\text{C}$  temperiert werden. Vor der eigentlichen Messung werden die befüllten Küvetten zusätzlich 5–10 min im Strahlengang temperiert, nach dieser Zeit hat sich eine Temperaturkonstanz eingestellt. Direkt vor der Messung wird die Probe noch auf Bläschen untersucht und die Bläschen gegebenenfalls entfernt. Als Hintergrundspektrum dient ein Luft- bzw. Leerkanalspektrum, das direkt vor der eigentlichen Messung und für jede Messung neu aufgenommen wird.

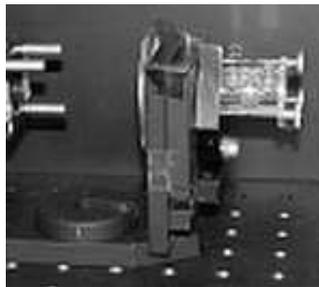


Abb. 4.15: Der drehbare Küvettenhalter mit einer Thermoküvette (ohne Wasser-schläuche).

Zur Temperaturkontrolle werden mehrere Sensoren (Dallas DS1820) eingesetzt, die, soweit nicht anders angegeben, sowohl die Raumtemperatur als auch die Temperaturen im Probenraum und im Wasserablauf der Küvette aufzeichnen. Die Sensoren werden über ein Interface an den Parallel-Anschluss eines Computers angeschlossen und über ein DOS-Programm (Hygrotec) ausgelesen. Das Programm erlaubt eine individuelle Einstellung des Messzeitintervalls.

Bei mehreren Messzyklen von Glucoselösungen wurde der pH-Wert der einzelnen Proben bestimmt. Dabei hat sich gezeigt, dass sich der pH-Wert nicht signifikant ändert und auch in diesem Fall keinen Einfluss auf die chemometrische Auswertung hat. Bei weiteren Messungen wurde der pH-Wert daher nicht bestimmt.

#### ***In-vivo*-Messungen**

Um eine Änderung der Blutglucose-Konzentrationen hervorzurufen, unterzieht sich der Proband einem standardisierten Glucose-Toleranz-Test. Bei einem Glucose-Toleranz-Test wird dem nüchternen Probanden eine definierte Menge Glucose oral

zugeführt. Die Formulator Dextro O.G-T. (Roche) entspricht 75 g Glucose, welche in schwarzem Johannisbeersaft gelöst sind. Die in der Formulator enthaltenen Kohlehydrate (Mono- und Oligosaccharide) werden im Verdauungstrakt in Glucose gespalten, welche dann vom Körper aufgenommen wird und einen Anstieg des Blutzuckerspiegels hervorruft. Der Anstieg und Abfall des Blutzuckerspiegels wird dann über zwei bis drei Stunden verfolgt. Ein typischer Verlauf der Blutzuckerwerte während eines oralen Glucose-Toleranz-Tests ist in Abb. 4.16 dargestellt.

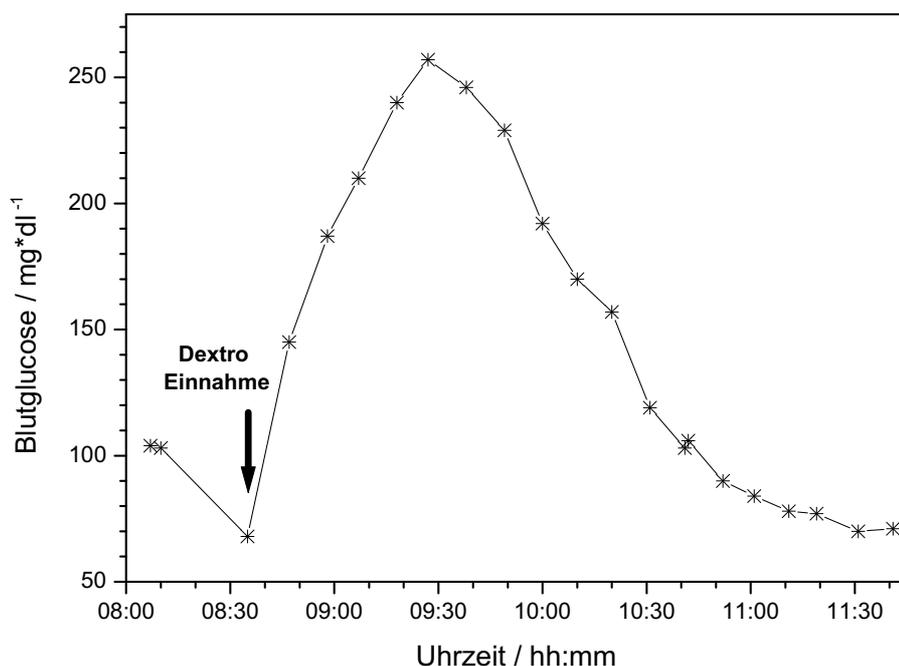


Abb. 4.16: Typischer Verlauf der Blutzuckerwerte während eines oralen Glucose-Toleranz-Tests.

Für die *In-vivo*-Messungen trinkt der nüchterne Proband 300 ml Dextro O.G-T. innerhalb von 5 min. Im Anschluss werden über mindestens drei Stunden alle 10 min *In-vivo*-Spektren der Augenvorderkammer aufgezeichnet. Parallel werden alle 10 min die Blutzuckerwerte bestimmt. Dies geschieht mit einem Selbstmessgerät (AccuTrend, Roche).

## 4.5 NIR-Spektren

NIR-Absorptions-Spektren weisen meist breite, sich überlappende Banden auf. Bei einer quantitativen Auswertung werden daher im Allgemeinen statistische Methoden verwendet. Deren Anwendung wird durch die Kenntnis der Bandenlagen erleichtert. Aus diesem Grund werden im Folgenden die NIR-Absorptions-Spektren von Wasser, Glucose, Ascorbinsäure, Milchsäure und Harnstoff dargestellt und diskutiert.

### 4.5.1 Wasser

Wasser ist der Hauptbestandteil menschlichen Kammerwassers und wird als Lösungsmittel für die *In-vitro*-Proben verwendet. Das NIR-Absorptions-Spektrum von Wasser mit einer Schichtdicke von 5 bzw. 1 mm ist in Abb. 4.17 dargestellt.

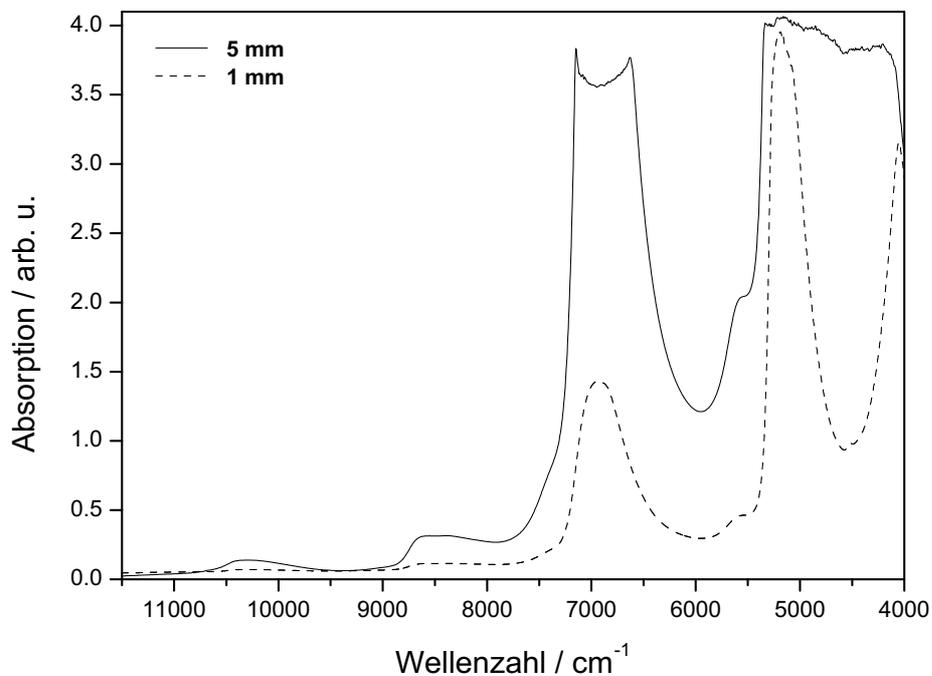


Abb. 4.17: NIR-Absorptions-Spektrum von Wasser mit einer Schichtdicke von 5 mm (—) und 1 mm (- -) (Vector22/N-C, 64 scans, Auflösung 8 cm<sup>-1</sup>, 37°C).

Die Banden werden den Kombinationsmoden und Obertönen der drei OH-Fundamentalschwingungen des Wassers zugeordnet. Die Bande bei 5235 cm<sup>-1</sup> ist die Kombination aus der Deformations- und asymmetrischen Streckschwingung

$(\delta + \nu_{AS})$ . Bei  $6900 \text{ cm}^{-1}$  erscheint die Kombination der beiden Streckschwingungen  $(\nu_S + \nu_{AS})$  und bei  $10613 \text{ cm}^{-1}$  die Kombination des 1. Obertons der symmetrischen und der asymmetrischen Streckschwingung  $(2\nu_S + \nu_{AS})$ . [122]

In Bezug auf die Schichtdicke sieht man, dass die Intensität der Wasser-Bande mit kleiner werdender Schichtdicke abnimmt. Für die NIR-Spektroskopie bedeutet es, dass man entweder die Schichtdicke oder die zu untersuchende spektrale Region auswählen kann. Für diese Arbeit ist die Schichtdicke durch die Vorderkammertiefe des Auges gegeben, die ca. 5 mm beträgt. Bei dieser Schichtdicke sind die Bereiche unterhalb von  $5500 \text{ cm}^{-1}$  und zwischen  $6400\text{--}7200 \text{ cm}^{-1}$  spektroskopisch nicht zugänglich, da die Wasser-Banden in diesen Bereichen zu intensiv sind und andere Signale verdecken.

Die NIR-Absorptions-Spektroskopie wird insbesondere für wässrige Proben verwendet, da Wasser hier sehr viel schwächere Banden zeigt als im MIR. Neben den drei sehr breiten Banden gibt es im NIR-Bereich weitere schwächere Wasser-Banden [122, 137, 138], deren Lage und Zuordnung in Tab. 4.2 zusammengefasst sind.

Tab. 4.2: Bandenlagen und Zuordnung der OH-Schwingungen des Wassers (nach Ozaki [122]).

Schwingung				Schwingung			
$\nu_S$	$\delta$	$\nu_{AS}$	$[\text{cm}^{-1}]$	$\nu_S$	$\delta$	$\nu_{AS}$	$[\text{cm}^{-1}]$
0	1	0	1595	1	0	1	7250
1	0	0	3657	0	0	2	7445
0	0	1	3756	2	1	0	8762
0	2	0	3151	1	1	1	8807
0	3	0	4667	0	1	2	9000
1	1	0	5235	3	0	0	10600
0	1	1	5332	2	0	1	10613
1	2	0	6775	1	0	2	10869
0	2	1	6874	0	0	3	11032
2	0	0	7201				

Die breite  $\nu_S + \nu_{AS}$ -Wasser-Bande bei  $6900\text{ cm}^{-1}$  besteht z. B. aus mehreren Banden ( $6775, 6874, 7201, 7250$  und  $7445\text{ cm}^{-1}$ ), die erst in der zweiten Ableitung von Messungen bei  $5^\circ\text{C}$  aufgelöst werden können. [139]

Zusätzlich zur Abhängigkeit von der Schichtdicke zeigen NIR-Absorptions-Spektren von Wasser eine starke Temperatur-Abhängigkeit. In Abb. 4.18 A sind NIR-Absorptions-Spektren von Wasser bei Temperaturen zwischen  $31$  und  $40^\circ\text{C}$  dargestellt.

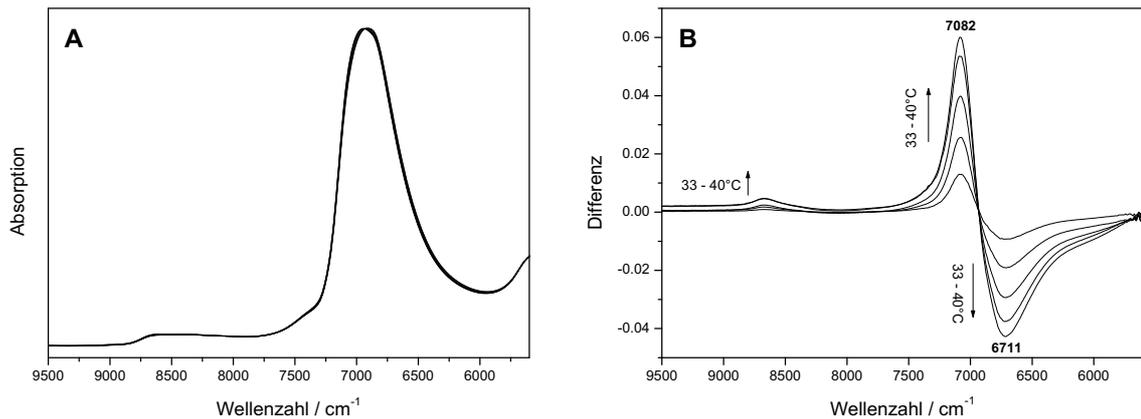


Abb. 4.18: **A:** NIR-Absorptions-Spektrum von Wasser bei Temperaturen zwischen  $31$  und  $40^\circ\text{C}$  (Mittelwert aus drei Spektren, Vector22/N-C,  $d = 1\text{ mm}$ , 100 scans,  $8\text{ cm}^{-1}$ , Raman-Detektor). **B:** Differenz-Spektren von Wasser, als Referenz dient das  $31^\circ\text{C}$ -Spektrum.

Mit der Temperaturänderung ändern sich auch die Bandenlage der prominenten  $\nu_A + \nu_{AS}$ -Bande bei  $6900\text{ cm}^{-1}$ . Abb. 4.18 B zeigt die zugehörigen Differenz-Spektren, die gebildet werden, indem das  $31^\circ\text{C}$ -Spektrum von den anderen subtrahiert wird. Die Bande bei  $7082\text{ cm}^{-1}$  wird mit Erhöhung der Temperatur stärker, während die Bande bei  $6711\text{ cm}^{-1}$  schwächer wird. Dies korreliert mit den Ergebnissen von Maeda et al. [139], die NIR-Absorptions-Spektren von Wasser zwischen  $5$  und  $85^\circ\text{C}$  bei einer Schichtdicke von  $1\text{ mm}$  aufgenommen haben. In diesem Fall reicht die Verschiebung der  $\nu_A + \nu_{AS}$ -Bande von  $7050$  bis  $6844\text{ cm}^{-1}$ .

Die Abhängigkeit der Wasser-Spektren von Temperatur, Elektrolytzugabe und pH-Wert haben ihren Ursprung in der Änderung der komplexen Wasser-Struktur und sind auf das Gleichgewicht zwischen freien und verbrückten OH-Gruppen zurückzuführen. [137] Dieses Phänomen ermöglicht u. a. NIR-spektroskopische

Untersuchungen der Wasser-Struktur und Studien an Eis [122] genauso wie die Vorhersage von Temperatur, pH-Wert oder Schichtdicke.

Neben der Temperatur werden NIR-Absorptions-Spektren von Wasser auch durch die Zugaben von Ionen wie z. B. Natriumchlorid beeinflusst. [140, 141] Die Elektrolytzugabe verursacht eine Veränderung der Bandenformen und der Basislinie. Eine NaCl-Zugabe zu Glucose/Wasser-Lösungen mit Glucose-Konzentrationen im physiologischen Bereich bewirkt nur geringfügige spektrale Änderungen [141] bzw. eine geringe Verschlechterung der Vorhersage der Glucose-Konzentrationen. [39]

Auch Änderungen des pH-Werts verursachen spektrale Änderungen. Es ist sogar möglich, die Titration von Essigsäure bzw. Phosphorsäure gegen Natronlauge spektroskopisch zu verfolgen. [142] Die pH-Abhängigkeit der Spektren ist für die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen nicht relevant, da Glucose keine nennenswerte Änderung des pH-Werts hervorruft. Bei verschiedenen Messzyklen wurde für jede frisch angesetzte Probe der pH-Wert bestimmt, dieser ändert sich für eine Messreihe um maximal 0,06 Einheiten. Ein Einfluss auf die statistische Auswertung konnte nicht festgestellt werden.

Es zeigt sich, dass sich die pH-Werte der Proben nicht signifikant ändern. Auch die pH-Werte des verwendeten Reinst-Wassers zeigen über mehrere Wochen keine signifikanten Änderungen. Daher wurde der pH-Wert bei den weiteren Messungen reiner Glucose/Wasser-Mischungen nicht mehr bestimmt.

### 4.5.2 Glucose

Die NIR-Absorptions-Spektren wässriger 1–10%ige-Glucoselösungen (s. Abb. 4.19 A) unterscheiden sich auf den ersten Blick kaum vom Spektrum reinen Wassers mit gleicher Schichtdicke (s. Abb. 4.17). Lediglich an den mit Pfeilen angezeichneten Bereichen zeigen sich kleine spektrale Veränderungen, die durch die unterschiedlichen Glucose-Konzentrationen hervorgerufen werden. Eine Erhöhung der Glucose-Konzentration bewirkt eine Verstärkung der Bande bei  $6900\text{ cm}^{-1}$  und dem Bereich um  $4630\text{ cm}^{-1}$  bzw. eine Intensität-Verminderung im Bereich um  $6230\text{ cm}^{-1}$ . Die spektralen Veränderungen liegen im Bereich der Wasser-Banden bzw. in den Flanken der Wasser-Banden. Dies wirft die Frage auf, ob die spektralen Veränderungen durch echte Glucose-Banden bzw. durch eine Änderung der Wasser-Struktur, wie

sie auch durch Zugabe von Elektrolyten [140] hervorgerufen wird, verursacht wird.

Das Wasser-Spektrum dominiert die Spektren wässriger Glucoselösungen. Stärkere Unterschiede und Banden treten erst zu Tage, wenn das Wasser-Spektrum vom Spektrum der Glucoselösungen subtrahiert wird. Diese Differenz-Spektren gegen Wasser sind für 1–10%ige Glucoselösungen in Abb. 4.19 B für den vermessenen Spektralbereich von  $4000\text{--}11500\text{ cm}^{-1}$  und als Ausschnitts-Vergrößerungen in Abb. 4.19 a–c für die Spektralbereiche von  $4000\text{--}6000\text{ cm}^{-1}$ ,  $5500\text{--}8000\text{ cm}^{-1}$  und  $8000\text{--}11000\text{ cm}^{-1}$  dargestellt. Die Glucose-Differenz-Spektren weisen besonders im Bereich  $4000\text{--}8000\text{ cm}^{-1}$  eine Vielzahl von positiven und negativen Banden auf. Die Bandenlagen und wahrscheinliche Zuordnung der Differenzbanden sind in Tab. 4.3 zusammengefasst.

Das negative Dublett bei  $6900$  und  $7090\text{ cm}^{-1}$  wird von Berentsen et al. [143] durch Änderungen der Wasser-Struktur aufgrund der steigenden Glucose-Konzentration erklärt. Änderungen in der Wasser-Struktur sollten daher auch die Ursache für weitere negative Banden bei  $4170$ ,  $4350$ ,  $5015$ ,  $5290$ ,  $8695$  und  $10435\text{ cm}^{-1}$  sein, wobei die Banden bei  $4170$  und  $4350\text{ cm}^{-1}$  keiner  $\text{H}_2\text{O}$ -Mode zugeordnet werden können. Die Banden bei  $5015$  und  $5290\text{ cm}^{-1}$  entsprechen den Flanken der  $\delta + \nu_{AS}$ -Wasser-Bande bei  $5235\text{ cm}^{-1}$  und das negative Dublett bei  $6870$  und  $7090\text{ cm}^{-1}$  der  $2\delta + \nu_{AS}$ -Mode des Wassers bei  $6874\text{ cm}^{-1}$ . Im Bereich oberhalb von  $8000\text{ cm}^{-1}$  liegen mehrere Wasser-Banden. Das Wasser-Spektrum zeigt bei  $8762\text{ cm}^{-1}$  die  $2\nu_S + \delta$ -Bande und bei  $8807\text{ cm}^{-1}$  die  $\nu_S + \delta + \nu_{AS}$ -Bande. [122] Diese beiden Banden bilden wahrscheinlich den Ursprung der negativen Bande bei  $8965\text{ cm}^{-1}$  im Glucose-Differenz-Spektrum. Die schwache Bande im Glucose-Differenz-Spektrum bei  $10435\text{ cm}^{-1}$  findet ihre Entsprechung in den  $3\nu_S$ - und  $2\nu_S + \nu_{AS}$ -Banden im Wasser-Spektrum bei  $10600$  bzw.  $10613\text{ cm}^{-1}$ .

Die positiven Banden im Differenz-Spektrum enthalten Glucose-spezifische Informationen. Da das Glucose-Molekül (s. Abb. 4.14) ausschließlich aus Kohlenstoff, Wasserstoff und Sauerstoff besteht, finden sich im NIR-Spektrum Banden von OH-, CH-, CCH- und OCH-Schwingungen, wobei die Obertöne der OH-Glucose-Schwingungen mit denen des Wassers korrelieren. Khalil [5] hat mögliche NIR-Banden von Glucose ausgehend von den bekannten Fundamentalschwingungen berechnet. Die Fundamentalschwingungen sind die CH-Streckschwingungen bei  $2947\text{ cm}^{-1}$  und  $2961\text{ cm}^{-1}$  und die OH-Streckschwingung bei  $3550\text{ cm}^{-1}$ . [144–147]

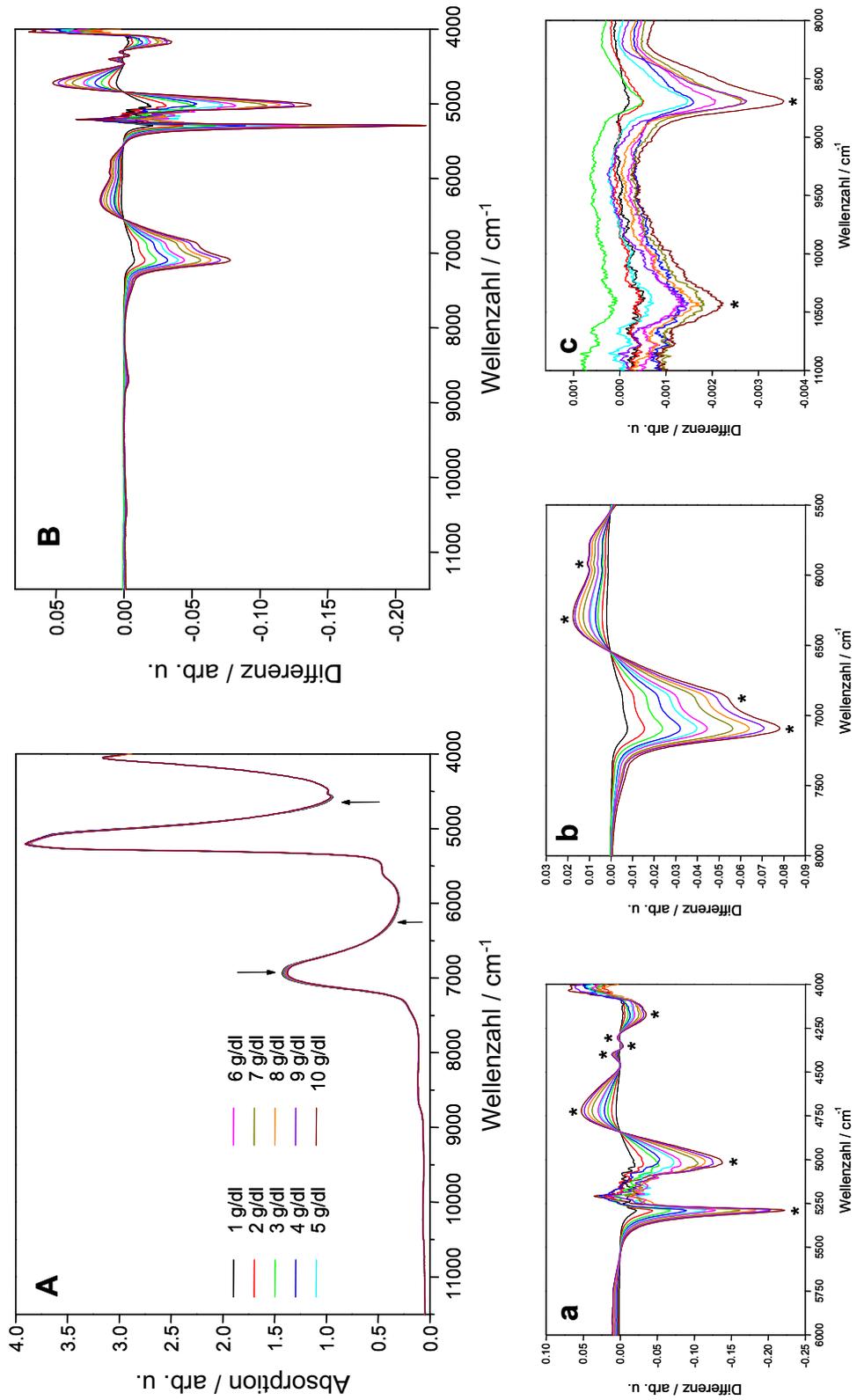


Abb. 4.19: NIR-Spektren 1–10 % wässriger Glucoselösungen (Mittelwert aus 5 Spektren, Vector22/N-C,  $d = 1 \text{ mm}$ , 64 scans,  $8 \text{ cm}^{-1}$ , InGaAs-Detektor). **A**: Absorptions-Spektren, **B**: Differenz-Spektren gegen Wasser, **a–c**: Ausschnitts-Vergrößerungen von **B**. Die Farbkodierung der Spektren ist in **A** angegeben.

Tab. 4.3: Bandenlagen und mögliche Zuordnung der Glucose-Banden im NIR-Differenz-Spektrum mit Wasser als Referenz (alle Angaben in  $\text{cm}^{-1}$ ).

Experimentell		Literatur	Zuordnung
positiv	negativ		
	4170		
4305		4299	$\nu(\text{CH})+\delta(\text{CCH},\text{OCH})^\dagger$
	4350		
4397		4422	$\nu(\text{CH})+\delta(\text{CCH},\text{OCH})^\dagger$
4718			
	5015	5235	$\delta(\text{OH})+\nu_{AS}(\text{OH})^\ddagger$
	5290	5235	$\delta(\text{OH})+\nu_{AS}(\text{OH})^\ddagger$
5782 (S)			
5913 (S)		5924	$2\nu(\text{CH})^\dagger$
6299		6510	$\nu(\text{OH})+\nu(\text{CH})^\dagger$
	6870	6874	$2\delta(\text{OH})+\nu_{AS}(\text{OH})^\ddagger$
	7090	6874	$2\delta(\text{OH})+\nu_{AS}(\text{OH})^\ddagger$
		7102	$2\nu(\text{OH})^\dagger$
		8762,	$2\nu_S(\text{OH})+\delta(\text{OH}),$
	8695	8807	$\nu_S(\text{OH})+\delta(\text{OH})+\nu_{AS}(\text{OH})^\ddagger$
		8881	$3\nu(\text{CH})^\dagger$
		10600,	$3\nu_S(\text{OH}),$
	10435	10613	$2\nu_S(\text{OH})+\nu_{AS}(\text{OH})^\ddagger$
		10650	$3\nu(\text{OH})^\dagger$

<sup>†</sup> Glucose-Banden nach [5]; <sup>‡</sup> Wasser-Banden nach [122]; (S) Schulter

Im NIR-Differenz-Spektrum liegen bei  $4305\text{ cm}^{-1}$  und  $4397\text{ cm}^{-1}$  die Kombinationsbanden der CH-Streckschwingung und der CCH, OCH-Deformationsschwingung. Eine weitere Bande liegt bei  $4718\text{ cm}^{-1}$ , die nicht eindeutig zugeordnet werden kann. Den ersten Oberton der CH-Streckschwingung erkennt man als Schulter bei  $5913\text{ cm}^{-1}$  und bei  $6299\text{ cm}^{-1}$  liegt die Kombinationsbande der OH- und CH-Streckschwingungen.

Sowohl die Temperatur als auch der pH-Wert beeinflussen hauptsächlich das prominente Wasser-Spektrum. Die Auswirkungen von pH-Wert- und Temperatur-Änderungen wurden bereits im vorangegangenen Kap. 4.5.1 beschrieben.

Für eine quantitative Auswertung von Glucose-Spektren kommen vor allem Bereiche in Frage, die Glucose spezifische Informationen enthalten. Unter Verwendung kleiner Schichtdicken eignet sich vor allem der Bereich zwischen  $4000$  und  $5000\text{ cm}^{-1}$ , da hier die Absorption von Wasser gering ist. Eine Schichtdicke von  $5\text{ mm}$  simuliert die Schichtdicke der Vorderkammer bei Reflektion an der Linse. Mit dieser Schichtdicke sind nur Messungen oberhalb von  $5500\text{ cm}^{-1}$  möglich. Unter Berücksichtigung der Glucose-Banden in NIR-Absorptions-Spektren können die Bereiche zwischen etwa  $5500\text{--}6500\text{ cm}^{-1}$  und  $7200\text{--}11500\text{ cm}^{-1}$  zur Auswertung herangezogen werden. Die Begrenzung auf  $11500\text{ cm}^{-1}$  hängt mit den Grenzen der Empfindlichkeit des Detektors zusammen.

### 4.5.3 Milchsäure, Ascorbinsäure und Harnstoff

Das Kammerwasser ist eine komplexe wässrige Lösung, die neben Glucose weitere Stoffe enthält, die ein NIR-Spektrum zeigen. Diese Stoffe können das NIR-Spektrum der reinen Glucose verändern und dadurch die Auswertung beeinflussen. Sie werden auch als Querempfindlichkeiten verursachende Stoffe bezeichnet. Zu diesen Stoffen zählen Lactat mit einer Kammerwasser-Konzentration von  $4,5\text{ }\mu\text{mol/ml}$ , Ascorbat mit  $1,06\text{ }\mu\text{mol/ml}$  und Harnstoff mit  $6,1\text{ }\mu\text{mol/ml}$ . Abb. 4.20 zeigt die NIR-Absorptions-Spektren 10%iger wässriger Lösungen der drei Substanzen im Vergleich zu Wasser.

Die Spektren von Ascorbinsäure, Harnstoff und Milchsäure werden vom Wasser-Spektrum dominiert, die Abweichungen im Bereich zwischen  $5500$  und  $6300\text{ cm}^{-1}$  werden hauptsächlich durch die hohen Substanz-Konzentrationen hervorgerufen. Einzig das Milchsäure-Absorptions-Spektrum weicht in diesem Bereich von dem des Wassers ab und man kann zwei Banden erkennen. Die Spektren sind mit einer Schichtdicke von  $5\text{ mm}$  aufgenommen worden, daher zeigt sich sowohl im Bereich unterhalb von  $5400\text{ cm}^{-1}$  als auch im Bereich der dominanten Wasser-Bande zwischen  $6500$  und  $7200\text{ cm}^{-1}$  Totalabsorption.

Genauere Unterschiede zwischen dem Wasser-Spektrum und denen der einzelnen

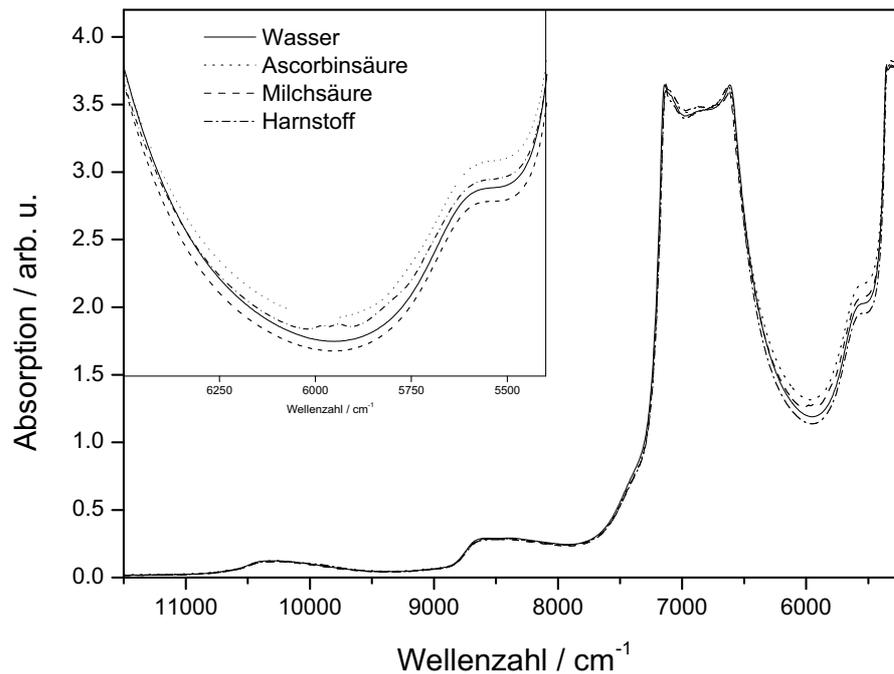


Abb. 4.20: NIR-Absorptions-Spektren von 10%igen wässrigen Lösungen von Wasser, Ascorbinsäure, Harnstoff und Milchsäure (Mittelwert aus fünf Spektren, Vector22/N-C,  $d = 5$  mm, 100 scans,  $8 \text{ cm}^{-1}$ , InGaAs-Detektor).

Substanzen können erst nach Subtraktion des Wasser-Spektrums festgestellt werden. In Abb. 4.21 ist das Differenz-Spektrum von Ascorbinsäure dargestellt.

Wie bereits bei der Diskussion der Glucose-Spektren im vorangegangenen Kap. 4.5.2 finden sich im Differenz-Spektrum negative Banden, die vor allem durch Änderungen der Wasser-Struktur aufgrund der steigenden Analyt-Konzentration entstehen. Diese negativen Banden liegen bei  $6578$ ,  $7163$ ,  $8130$ ,  $8714$  und  $10450 \text{ cm}^{-1}$  und entsprechen weitestgehend den im Differenz-Spektrum von Glucose zugeordneten Bandenlagen.

Positive Banden im Differenz-Spektrum enthalten die für die untersuchte Substanz spezifischen Informationen. Ascorbinsäure zeigt drei Banden bei  $5504$ ,  $5759$  und  $5870 \text{ cm}^{-1}$ , die in den Bereich des ersten Obertons der CH-Streckschwingung fallen. [148–150] Vergleichbare Banden-Positionen und -Formen wurden von Blanco et al. [151] ermittelt, die den Ascorbinsäure Gehalt in pharmazeutischen Formulierungen

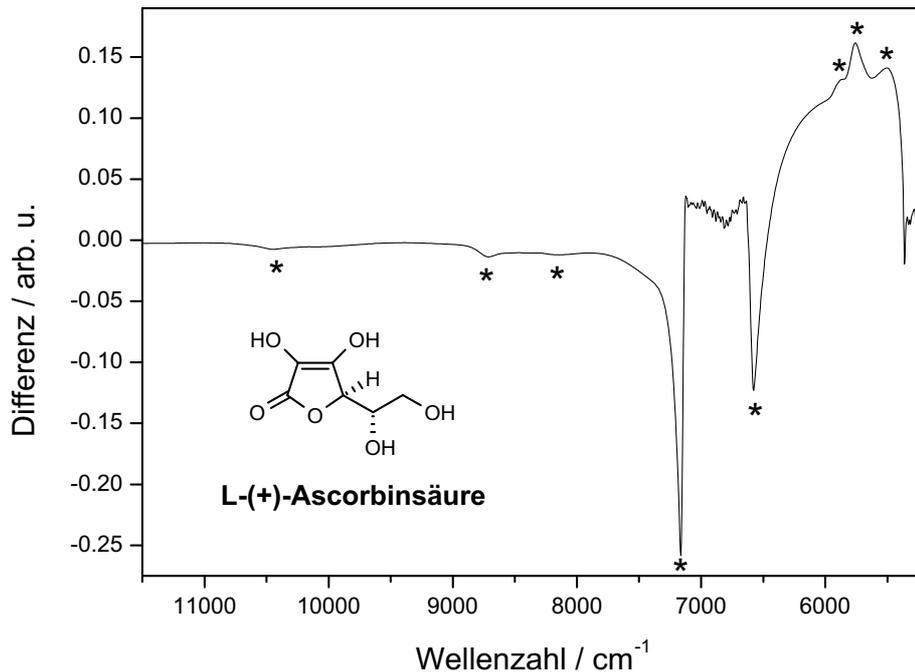


Abb. 4.21: Differenz-Spektrum von Ascorbinsäure gegen Wasser. (Mittelwert aus fünf Spektren, Vector22/N-C,  $d = 5$  mm, OPUS, 100 scans,  $8 \text{ cm}^{-1}$ , InGaAs-Detektor).

untersuchten.

Im Gegensatz zu Ascorbinsäure ist Harnstoff ein sehr einfaches Molekül, das im NIR nur NH-Schwingungen aufweist. Der erste Oberton der NH-Streckschwingung zeigt sich im Differenz-Spektrum (s. Abb. 4.22) als scharfe Bande bei  $6585 \text{ cm}^{-1}$  und der zweite Oberton um  $9900 \text{ cm}^{-1}$ . Beide Banden weisen eine gute Übereinstimmung mit der Literatur auf. [104, 148–150] Durch Änderungen in der Wasser-Struktur hervorgerufene negative Banden liegen bei  $6430$ ,  $7163$ ,  $8124$ ,  $8695$  und  $10450 \text{ cm}^{-1}$ . Weitere signifikante Banden treten im Harnstoff-Differenz-Spektrum nicht auf.

Neben Ascorbinsäure und Harnstoff gehört auch Milchsäure zu den potentiell Querempfindlichkeiten verursachenden Substanzen. Das Differenz-Spektrum von Milchsäure gegen Wasser ist in Abb. 4.23 abgebildet. Auch Milchsäure beeinflusst die Wasser-Struktur, wie die negativen Banden bei  $5266$ ,  $6577$ ,  $7163$ ,  $8706$  und  $10400 \text{ cm}^{-1}$  zeigen.

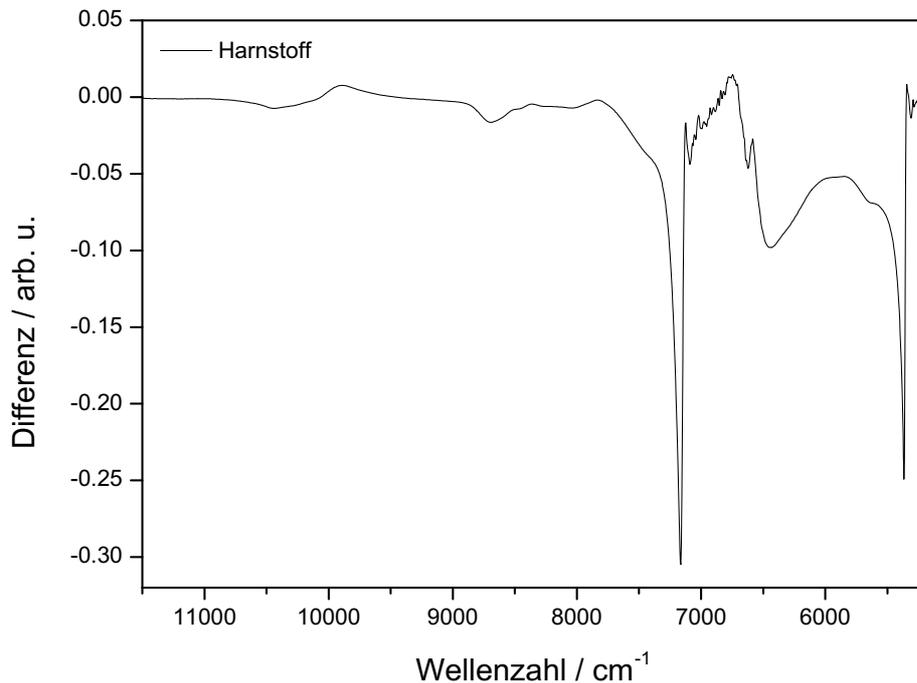


Abb. 4.22: Differenz-Spektrum von Harnstoff gegen Wasser. (Mittelwert aus fünf Spektren, Vector22/N-C,  $d = 5$  mm, 100 scans,  $8 \text{ cm}^{-1}$ , InGaAs-Detektor).

Die Milchsäure spezifischen Banden liegen wie auch bei Ascorbinsäure hauptsächlich zwischen den beiden prominenten Wasser-Banden zwischen  $5400$  und  $6300 \text{ cm}^{-1}$  im Bereich des ersten Obertons der CH-Streckschwingungen [148–150]. Eine breite Bande liegt bei  $5508 \text{ cm}^{-1}$ . Die Banden bei  $5713$ ,  $5805$ ,  $5940$  und  $5980 \text{ cm}^{-1}$  bilden ein Multiplett. Sinnaeve et al. [152] beobachteten in diesem Bereich drei Banden. Zusätzlich ist eine Bande bei  $8506 \text{ cm}^{-1}$  erkennbar, die wahrscheinlich dem zweiten Oberton der CH-Streckschwingung zugeordnet werden kann.

Die spezifischen Banden aller drei Substanzen zwischen  $5400$  und  $11500 \text{ cm}^{-1}$  sind in Tab. 4.4 im Vergleich zu den Glucose-Banden zusammengefasst. Die drei Glucose-Banden um  $4300 \text{ cm}^{-1}$  sind nicht aufgeführt, da diese aufgrund der vorgegebenen Schichtdicke von  $5 \text{ mm}$  innerhalb des Bereiches der Totalabsorption liegen.

Alle untersuchten Substanzen mit Ausnahme von Harnstoff zeigen Banden im Bereich des ersten Obertons der CH-Streckschwingungen zwischen  $5500$  und  $6600 \text{ cm}^{-1}$ . Bei einer quantitativen spektroskopischen Glucose-Bestimmung aus dem Kammer-

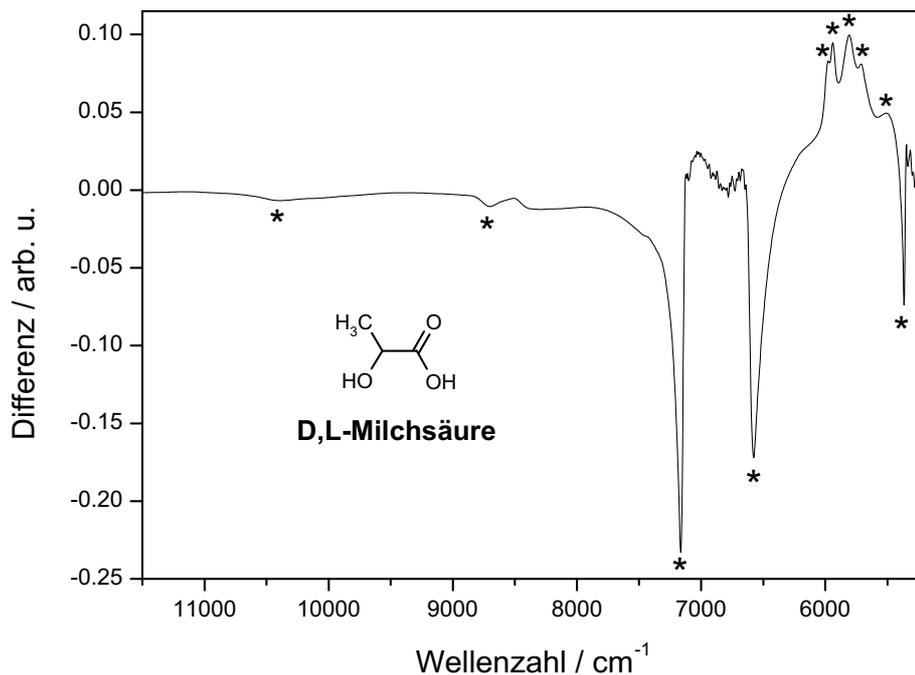


Abb. 4.23: Differenz-Spektrum von Milchsäure gegen Wasser. (Mittelwert aus fünf Spektren, Vector22/N-C,  $d = 5$  mm, 100 scans,  $8 \text{ cm}^{-1}$ , InGaAs-Detektor).

wasser könnten Milchsäure, Ascorbinsäure und Harnstoff daher störend wirken oder die Ergebnisse verfälschen. Der Einfluss der genannten Substanzen auf die quantitative Glucose-Bestimmung wird in Kap. 4.9.5 näher untersucht.

## 4.6 Statistische Auswertung

Multivariate Methoden finden Anwendung, da die NIR-Spektren sehr breite überlappende Banden aufweisen und aufgrund des großen spektralen Bereichs geradezu eine Datenflut liefern. In der Chemie werden derartige statistische Verfahren mit dem Sammelbegriff Chemometrik bezeichnet. Grundlage aller Kalibrier-Verfahren spektroskopischer Daten ist das Lambert-Beer'sche Gesetz. Dies wird im folgenden Kapitel vorgestellt zusammen mit den Grundlagen der multivariaten Kalibrierung und den verwendeten Programmen. Im Anschluss wird die Theorie des sogenannten 2<sup>3</sup>-Faktorenversuchsplanes erläutert.

Tab. 4.4: Lage der Glucose-, Ascorbinsäure, Harnstoff- und Milchsäurebanden im NIR-Differenz-Spektrum mit Wasser als Referenz zwischen 5400 und 11500  $\text{cm}^{-1}$  (alle Angaben in  $\text{cm}^{-1}$ ).

Glucose	Ascorbinsäure	Harnstoff	Milchsäure
	5504		5508
	5559		
5782			5713
			5805
	5870		
5913			5940
			5980
6299		6585	
			8506
		10450	

#### 4.6.1 Das Lambert-Beer'sche Gesetz

Ein Spektrum wird als Intensität gegen die Wellenzahl aufgenommen. Für eine quantitative Auswertung ist es entscheidend, dass die gesuchte Größe, hier die Konzentration, in einer festen Beziehung zu den spektralen Daten steht. In der Spektroskopie beschreibt das Lambert-Beer'sche Gesetz den linearen Zusammenhang zwischen Konzentration, Schichtdicke und Extinktion: [153]

$$E = \epsilon \cdot c \cdot d. \quad (4.1)$$

Die Extinktion  $E$  ist gegeben durch das Produkt des Extinktionskoeffizienten  $\epsilon$ , der Konzentration des Analyten  $c$  und der vermessenen Schichtdicke  $d$ . Der Extinktionskoeffizient  $\epsilon$  ist eine von der Wellenlänge abhängige Stoffkonstante. Die Extinktion (im engl. *absorbance*) bezeichnet den negativ dekadischen Logarithmus der Transmission  $T$

$$E = -\log \frac{I}{I_0} = -\log T, \quad (4.2)$$

mit der Intensität des einfallenden Lichts  $I_0$  und der Intensität des Lichts nach der Probe  $I$ . Die Absorption  $A$  ist gegeben durch

$$A = 1 - \frac{I}{I_0} = 1 - T. \quad (4.3)$$

Das Lambert-Beer'sche Gesetz gilt nicht universell, sondern unterliegt verschiedenen Annahmen: Das einfallende Licht ist monochromatisch, die absorbierenden Moleküle wechselwirken nicht miteinander, die einfallenden Strahlen verlaufen parallel zueinander, das absorbierende Material ist homogen und streut die einfallende Strahlung nicht, die Leistung des einfallenden Lichts ist zu niedrig, um Sättigungseffekte hervorzurufen, und die Transmission ist linear, d. h. dass die Messung nicht durch Streulicht gestört wird. Diese Annahmen können nicht immer eingehalten werden und dadurch treten Abweichungen vom Lambert-Beer'schen Gesetz auf.

Wechselwirkungen zwischen den Molekülen können z. B. bei hohen Konzentrationen auftreten, daher werden meist sehr kleine Konzentrationen eingesetzt bzw. höher konzentrierte Lösungen verdünnt. Desweiteren sollten die Proben so präpariert werden, dass keine unerwünschten Reaktionen auftreten, die die Konzentrationen beeinflussen.

Streulicht der Probe verändert die beobachteten Extinktionswerte. Die wahre Extinktion der Probe bei einer bestimmten Wellenlänge wird durch auftretendes Streulicht der Intensität  $I_S$  wie folgt beeinflusst:

$$E_{obs} = -\log \frac{I + I_S}{I_0 + I_S}. \quad (4.4)$$

Die beobachtete Extinktion  $E_{obs}$  ist somit kleiner als die wahre Extinktion. Bei dispersiven Spektrometern liegt der Anteil des durch das Spektrometer verursachten Streulichts für den Großteil des Spektrums bei ca. 0,1%. Bei Wellenlängen oberhalb von 8000 nm nimmt der Streulichtanteil zu. [153] Als Faustregel gilt, dass die Extinktion sich bis zu einem Wert von eins linear zur Konzentration verhält und mit zunehmender Extinktion eine steigende negative Abweichung zeigt. Bei FT-IR-Spektrometern sollte Streulicht aufgrund der getrennten Modulation jeder Wellenlänge bei einer anderen Frequenz zu keinen Abweichungen des Lambert-Beer'schen Gesetzes führen.

### 4.6.2 Multivariate Kalibrierung

In der Spektroskopie werden die Spektren als Intensität in Bezug auf eine sehr große Zahl von Wellenzahlen aufgenommen, in der Chemometrik allgemein Variablen genannt. Um mit Hilfe der Informationen aus diesen Variablen z. B. die Konzentration der vermessenen Probe feststellen zu können, reichen univariate Verfahren nicht mehr aus, da die relevanten Informationen nicht in einer einzigen Variable zu finden sind, sondern in größeren sich teilweise überlappenden spektralen Bereichen. Die Grundlagen der Chemometrik und der hier beschriebenen Algorithmen sind in verschiedenen Monographien ausführlich beschrieben. [154–158] Aus diesem Grund soll hier nur ein kurzer Überblick über die verwendeten Methoden gegeben und die relevanten Gleichungen erläutert werden. Für eine genauere Erklärung sei auf die Literatur verwiesen.

Eine Kalibrierung beinhaltet das Aufstellen eines mathematischen Modells (Regression) mit dem Ziel, eine Variable ( $y$ ) aus messbaren Ersatzvariablen ( $X$ ) vorherzusagen. Die Bedingung für eine Kalibrierung ist, dass  $y$  eine Funktion von  $X$  ist. Das allgemeine Model lautet

$$\mathbf{y} = f(\mathbf{X}), \quad (4.5)$$

bzw.

$$\mathbf{y} = \mathbf{X} \cdot \boldsymbol{\beta}. \quad (4.6)$$

$\mathbf{y}$  ist dabei die abhängige Variable bzw. die Messgröße oder das Signal und  $X$  die unabhängige oder erklärende Variable auch Zustandsgröße genannt. Das lineare Modell ist unter der Annahme gültig, dass das Lambert-Beer'sche Gesetz erfüllt ist.

Die hier verwendete Nomenklatur entspricht der in [155]. Die aus den Daten geschätzten Werte werden mit einem 'hat' gekennzeichnet.  $\hat{\boldsymbol{\beta}}$  bezeichnet z. B. den besten geschätzten Regressionskoeffizientenvektor. Im Folgenden werden Matrizen in fetten Großbuchstaben ( $\mathbf{A}$ ) und Vektoren in fetten Kleinbuchstaben ( $\mathbf{a}$ ) angegeben. Skalare werden klein und kursiv geschrieben ( $a$ ).

In der Spektroskopie handelt es sich meist um die Vorhersage physikalisch-chemischer Eigenschaften ( $y$ ) des vermessenen Stoffes aus den spektralen Daten ( $X$ ), dies wird als inverse Regression bezeichnet. Vorhersagbare physikalisch-chemische

Eigenschaften sind z. B. die Konzentration aber auch der pH-Wert, die Temperatur, die Korngröße oder der Wassergehalt der Probe. Zur Vereinfachung wird im Folgenden immer die Konzentration als gesuchte Größe verwendet.

Für die Kalibrierung können verschiedene Regressions-Algorithmen angewendet werden. Der einfachste ist der der univariaten Kalibrierung, wie er in der UV-Spektroskopie verwendet wird. Es wird nur bei einer einzigen Wellenlänge kalibriert und die spektrale Intensität ( $X$ ) ist direkt proportional zur Konzentration der untersuchten Substanz ( $y$ ). Der Koeffizient  $\beta$  kann durch Auftragung der spektralen Intensität gegen die Konzentration verschiedener Standards als Steigung der Geraden bestimmt und für spätere Messungen verwendet werden.

Befindet sich die gesuchte Information nicht in der Intensität bei einer einzigen Wellenlänge bzw. Wellenzahl, so reicht eine univariate Kalibrierung nicht mehr aus. In der Gleichung 4.6 wird die Matrix  $\mathbf{X}$  um weitere Variablen ergänzt. Die Matrix  $\mathbf{X}$  besteht aus  $n$  Zeilen und  $p$  Spalten,  $\mathbf{y}$  aus  $n$  Zeilen und  $\boldsymbol{\beta}$  aus  $p$  Zeilen. Die Zeilen stellen die Objekte bzw. Spektren dar und die Spalten die Zahl der Variablen, also die Zahl der zur Kalibrierung verwendeten Wellenzahlen.

Wie bereits erwähnt, gibt es sehr viele verschiedene Arten der Regression. Im Folgenden wird auf die multiple lineare Regression (MLR), die Hauptkomponentenregression (PCR) und die *Partial Least Squares* Regression (PLS) genauer eingegangen. Diese Techniken unterscheiden sich vor allem in der Berechnung des Regressions-Koeffizienten.

## MLR

Die Modell-Gleichung für die multiple lineare Regression lautet

$$\mathbf{y} = \mathbf{X} \cdot \boldsymbol{\beta} + \boldsymbol{\epsilon}. \quad (4.7)$$

Die Gleichung der linearen Kalibrierung enthält einen unvermeidbaren Fehler  $\boldsymbol{\epsilon}$ . Da der wahre Regressionskoeffizientenvektor  $\boldsymbol{\beta}$  in den experimentellen Wissenschaften immer unbekannt ist, muss ein Schätzwert  $\hat{\boldsymbol{\beta}}$  aus den Daten ermittelt werden. Zwischen dem tatsächlichen Wert der Variable  $\mathbf{y}$  und dem aus  $\mathbf{X}$  und  $\hat{\boldsymbol{\beta}}$  vorhergesagten Wert der Variable  $\hat{\mathbf{y}}$ ,

$$\hat{\mathbf{y}} = \mathbf{X} \cdot \hat{\boldsymbol{\beta}}, \quad (4.8)$$

besteht eine Differenz von  $\mathbf{y} - \hat{\mathbf{y}}$ . Aus dieser Differenz kann die Summe der Fehlerquadrate (SSE: *Sum of Square Errors*) als

$$SSE = \|\mathbf{y} - \hat{\mathbf{y}}\|^2 = \sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2 \quad (4.9)$$

bestimmt werden. Eine optimale Schätzung von  $\hat{\boldsymbol{\beta}}$  wird daher durch die Minimierung der entstehenden Fehlerquadratsumme erreicht. Die allgemeine Lösung lautet

$$\hat{\boldsymbol{\beta}} = (\mathbf{X}^T \mathbf{X})^{-1} \mathbf{X}^T \mathbf{y}. \quad (4.10)$$

Die MLR erreicht ihre Grenzen wenn  $p > n$  ist bzw. wenn eine ausgeprägte Korrelation zwischen den verschiedenen Variablen  $x$  herrscht, wie es z. B. bei chemischen Systemen mit überlagerten Peaks der Fall ist. Unter solchen Voraussetzungen treten Multikollinearitäts-Probleme auf, die dazu führen, dass der Fehler des Regressionskoeffizientenvektors sehr groß wird. Durch Verwendung einer PLS- oder PCR-Regression kann dies vermieden werden.

### PCR und PLS

Im Gegensatz zur MLR werden bei der PCR und PLS die spektrale Intensität bei jeder Wellenlänge nicht direkt in die Modelle eingebunden. Stattdessen werden die Informationen aus allen relevanten Wellenlängen in eine Untergruppe von künstlichen Variablen komprimiert, den sogenannten latenten Variablen oder Regressionsfaktoren. Mittels dieser latenten Variablen werden im Anschluss die unabhängigen Variablen bestimmt. Die PCR- und PLS-Regressionen werden somit in Schritten ausgeführt. Im ersten Schritt werden die Daten reduziert und eine sogenannte Score-Matrix erstellt, die durch die Projektion der spektralen Original-Matrix auf einen Subraum entsteht, der durch die latenten Variablen definiert wird. Die resultierenden Scores sind orthogonal zueinander. Dadurch wird die in der unbehandelten Daten-Matrix vorliegende Kollinearität in der Score-Matrix aufgehoben. Der Hauptunterschied zwischen der PCR- und PLS-Regression liegt dabei in der Art und Weise, wie die spektrale Original-Matrix zerlegt wird.

Die Singulärwert-Zerlegung sieht für die MLR wie folgt aus:

$$\mathbf{X} = \mathbf{U} \cdot \mathbf{S} \cdot \mathbf{V}^T. \quad (4.11)$$

Die Matrix  $\mathbf{X}$  wird in mehrere Matrizen  $\mathbf{U}$ ,  $\mathbf{S}$  und die transponierte Matrix  $\mathbf{V}^T$  zerlegt. Die Matrix  $\mathbf{X}$  hat dabei die Größe  $n \times p$ .  $n$  gibt die Zahl der Objekte bzw. Spektren an und  $p$  die Zahl der Variablen bzw. der verwendeten Wellenzahlen.  $\mathbf{U}$  wird auch als *Score* bezeichnet und besteht aus  $n$  Zeilen und  $r$  Spalten, wobei  $r$  als Rang der Matrix oder Anzahl der verwendeten Hauptkomponenten bezeichnet wird. Entsprechend ist  $\mathbf{S}$  eine Diagonal-Matrix der Dimension  $r \times r$ , welche die Varianz jedes Faktors beschreibt.  $\mathbf{V}^T$  hat die Dimension  $r \times p$  und wird auch als Eigenvektor oder *Loading* bezeichnet.

Aus Gleichung 4.11 ergibt sich für die Schätzung des Regressions-Koeffizienten  $\hat{\boldsymbol{\beta}}$  in der MLR

$$\hat{\boldsymbol{\beta}} = \mathbf{V} \cdot \mathbf{S}^{-1} \cdot \mathbf{U}^T \cdot \mathbf{y}. \quad (4.12)$$

Für eine PCR wird die Original-Matrix in Hauptkomponenten, auch Faktoren genannt, zerlegt, welche nur die Varianz in der spektralen Matrix berücksichtigen. Die Hauptkomponenten werden, nach ihrer Fähigkeit, die Information der spektralen Matrix zu erklären, sortiert. Die erste Hauptkomponente gibt die größte Varianz und die letzte Hauptkomponente die geringste Varianz wieder. Allerdings kann es sein, dass einige der Hauptkomponenten, die die Haupt-Varianz in der spektralen Matrix erklären, in keiner Relation zu den gesuchten physikalisch-chemischen Eigenschaften der Probe stehen.

Dieses Problem wird in der PLS-Regression durch die Zerlegung der Matrix unter Berücksichtigung der Kovarianz zwischen der spektralen Matrix und der gesuchten physikalisch-chemischen Eigenschaften umgangen. Die resultierenden PLS-Faktoren werden nach ihrer Fähigkeit sortiert, die Information in der spektralen Matrix zu erklären, welche mit der unabhängigen Variable korreliert ist. Für die PLS gilt, dass die Matrixzerlegung mit Hilfe von  $\mathbf{y}$  gesteuert wird. Die PLS-Faktoren werden derart verändert, dass sie für die Vorhersage von  $\mathbf{y}$  optimiert werden. Die PCR-Methode hingegen verfolgt die Strategie, die wesentlichen Strukturen von  $\mathbf{X}$  mit möglichst wenigen Hauptkomponenten (Kolonnen der Matrizen  $\mathbf{U}$  und  $\mathbf{V}$ ) zu erklären. Die An-

zahl der Faktoren bzw. der Hauptkomponenten werden auch als Tuning-Parameter bezeichnet. Sie beschreibt, wieviel Information aus der Spektrenmatrix extrahiert wird.

Der zweite Schritt in der PCR- und auch PLS-Regression ist die Bildung eines MLR-Modells, bei dem die unabhängigen Variablen die jeweiligen Scores darstellen. Dieses Modell kann für die PCR wie folgt beschrieben werden

$$\hat{\boldsymbol{\beta}} = \mathbf{V}_{[r]} \cdot \mathbf{S}_{[r]}^{-1} \cdot \mathbf{U}_{[r]}^T \cdot \mathbf{y}. \quad (4.13)$$

Gleichung 4.12 entspricht fast der Gleichung 4.13, allerdings wird hier die Rechnung nach dem optimalen Faktor  $r$  abgebrochen. Für die PLS ergibt sich eine ähnliche Gleichung, die z. B. in [159] zu finden ist.

Die Anzahl der verwendeten Faktoren  $r$  ist ein wichtiger Parameter für das Kalibrier-Modell. Die ersten Faktoren erklären den größten Teil der Varianz in der spektralen Matrix. Die verbleibenden Faktoren repräsentieren das spektrale Rauschen. Durch die Wahl der optimalen Anzahl an Faktoren wird dafür gesorgt, dass die wichtigen Informationen für die Vorhersage verwendet werden während das Rauschen entfernt wird. Im Allgemeinen werden bei einer PLS-Regression weniger Faktoren benötigt als Hauptkomponenten bei einer PCR, die Fähigkeit zur Vorhersage sind dabei häufig vergleichbar.

Die Wahl der optimalen Zahl an Faktoren geschieht häufig durch eine sogenannte Kreuzvalidierung. Dazu werden die vorhandenen Daten, hier Spektren, in mehreren Teil-Datensätze aufgeteilt. Der Trainings-Datensatz enthält die Spektren für die Konstruktion und Validierung des Kalibrier-Modells. Der Test-Datensatz besteht im idealen Fall aus Daten, die unabhängig vom Trainings-Datensatz sind, und wird genutzt, um das validierte Modell auf seine Vorhersagefähigkeit zu untersuchen.

Im Fall einer *leave-one-out Cross Validation* (LOO-CV) bzw. LOO-Kreuzvalidierung wird nacheinander jeweils ein Spektrum aus dem Trainings-Datensatz entfernt, der Rest als Konstruktions-Datensatz definiert, ein Kalibrier-Modell erstellt und anhand des ausgelassenen Spektrums validiert. Diese Abfolge wird für jedes Spektrum durchlaufen und im Anschluss ein mittlerer quadratischer Vorhersagefehler  $\text{MSEP}_{CV}$  und das Bestimmtheitsmaß  $R_{CV}^2$  bestimmt, diese sind in Gleichung 4.14 und Gleichung 4.15 angeben. Zur Ermittlung der idealen Anzahl an Faktoren wird die Kreuzvalidierung für eine bestimmte Zahl an Faktoren

durchgeführt, um so denjenigen mit dem geringsten Fehler und dem höchsten Wert für das Bestimmtheitsmaß zu ermitteln. Das Modell mit dieser Zahl von Faktoren sollte dann die besten Vorhersage-Ergebnisse liefern.

Neben der LOO-CV gibt es auch eine *leave-multiple-out*-Kreuzvalidierung (LMO-CV) welche nach dem gleichen Prinzip funktioniert, nur dass in diesem Fall nicht nur ein Spektrum aus dem Trainings-Datensatz entfernt wird, sondern eine definierte Anzahl von Spektren.

**Gütekennzahlen einer multivariaten Kalibrierung:** Der Trainings-Datensatz besteht aus  $n$  Objekten (Spektren). Der Konstruktions- und der Validier-Datensatz sind unabhängige Untergruppen des Trainings-Datensatzes. Sie werden durch Aufteilung des Trainings-Datensatzes in einen Validier-Datensatz mit  $d$  Objekten und einen Konstruktions-Datensatz mit  $n - d$  Objekten gebildet.

Der Trainings-Datensatz besteht aus der Matrix  $(\mathbf{y}, \mathbf{X})$  mit der Größe  $n \times (1+p)$ .  $\mathbf{y}$  bezeichnet dabei erneut die abhängige Variable und  $\mathbf{X}$  ist die Matrix der unabhängigen Variablen.  $\mathbf{s}$  wird als Teilmenge von  $1, \dots, n$  mit der Größe  $d$  definiert und eine weitere Teilmenge  $(-\mathbf{s})$  als Schnittmenge zwischen  $1, \dots, n$  und  $\mathbf{s}$ . Der Trainings-Datensatz  $(\mathbf{y}, \mathbf{X})$  wird für die Kreuzvalidierung (CV) in zwei Untergruppen geteilt, einen Konstruktions-Datensatz  $(\mathbf{y}_{-\mathbf{s}}, \mathbf{X}_{-\mathbf{s}})$  der Größe  $(n - d) \times (1 + p)$  und einen Validier-Datensatz  $(\mathbf{y}_{\mathbf{s}}, \mathbf{X}_{\mathbf{s}})$  der Größe  $d \times (1 + p)$ .  $\Omega$  soll eine Kollektion von  $B$  Teilmengen aus  $1, \dots, n$  sein mit einer Größe  $d < n$ , z.B. eine Kollektion von  $B$  verschiedenen Vektoren  $\mathbf{s}$ .

Nun wird der  $MSEP_{CV-d}(r)$  (*Mean Square Error of Prediction*) definiert als

$$MSEP_{CV-d}(r) = \frac{1}{B} \sum_{\mathbf{s} \in \Omega} \frac{1}{d} \|\mathbf{y}_{\mathbf{s}} - \mathbf{X}_{\mathbf{s},r} \cdot \hat{\boldsymbol{\beta}}_{r,-\mathbf{s}}\|^2, \quad (4.14)$$

mit  $\mathbf{X}_{\mathbf{s}}$  als die  $d \times p$  Submatrix bei der die Reihen durch die Teilmenge  $\mathbf{s}$  indiziert werden.  $\hat{\boldsymbol{\beta}}_{r,-\mathbf{s}}$  ist der Schätzwert der Regressions-Koeffizienten unter Verwendung von  $r$  latenten Variablen basierend auf den Konstruktions-Daten  $(\mathbf{y}_{-\mathbf{s}}, \mathbf{X}_{-\mathbf{s}})$ . Die senkrechten Doppelstriche bezeichnen die euklidische Norm, die definiert ist als  $\|\mathbf{a}\| = \|\mathbf{a}\| = \sqrt{\sum a_i^2}$ .  $d$  bezeichnet die Anzahl ausgelassener Objekte und  $B$  die Anzahl der Unterteilungen in Konstruktions- und Validier-Datensatz.  $d$  und  $B$  sind für die LOO-CV festgelegt mit  $d = 1$  und  $\Omega$  enthält  $n = B$  Untergruppen und die

$i$ te Untergruppe ( $i = 1, \dots, n$ ) enthält die  $i$ te Zahl. Bei Verwendung der LMO-CV müssen die Werte  $d$  und  $B$  durch den Anwender gegeben werden.

Zwei wichtige Größen, die aus dem  $MSEP_{CV-d}(r)$  abgeleitet werden können, sind der kreuzvalidierte *Root Mean Square Error of Prediction*  $RMSEP_{CV-d}(r)$  die Quadratwurzel des  $MSEP_{CV-d}(r)$  und das Bestimmtheitsmaß  $R^2_{CV-d}(r)$ , das gegeben ist als

$$R^2_{CV-d}(r) = 1 - \frac{n \cdot MSEP_{CV-d}(r)}{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}, \quad (4.15)$$

mit  $y$  als Mittelwert der abhängigen Variablen des Trainings-Datensatzes, also der Mittelwert der Konzentrations-Werte.

Weitere wichtige Werte für die Charakterisierung des Datenanpassung and die Modellfunktion sind der *Root Mean Square Error of Calibration*  $RMSEC(r)$  und das Bestimmtheitsmaß  $R^2(r)$ , die wie folgt definiert sind

$$RMSEC(r) = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \mathbf{x}_i^T \hat{\boldsymbol{\beta}}_r)^2}{n - df}} \quad (4.16)$$

$$= \sqrt{\frac{\|(\mathbf{y} - \mathbf{X}\hat{\boldsymbol{\beta}}_r)\|^2}{n - df}} \quad (4.17)$$

und

$$R^2(r) = 1 - \frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \mathbf{x}_i^T \hat{\boldsymbol{\beta}}_r)^2}{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2} \quad (4.18)$$

$$= 1 - \frac{\|(\mathbf{y} - \mathbf{X}\hat{\boldsymbol{\beta}}_r)\|^2}{S_{yy}} \quad (4.19)$$

mit  $df$  als Anzahl der Freiheitsgrade. Als grobe Näherung für die tatsächlichen Freiheitsgrade wird die Anzahl der Hauptkomponenten oder die Anzahl der PLS-Faktoren verwendet. Man beachte, dass in dieser Definition von  $df$  die Zahl der tatsächlichen Freiheitsgrade leicht unterschätzt werden kann.

Wenn genügend Daten vorhanden sind, so dass man einen unabhängigen Test-Datensatz bilden kann, so werden der *Root Mean Square Error of Prediction*  $RMSEP_{Test}(r)$  und das Bestimmtheitsmaß für den Test-Datensatz  $R^2_{Test}(r)$  wie folgt berechnet:

$$RMSEP_{Test}(r) = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n_{Test}} (y_i^{Test} - (\mathbf{x}_i^{Test})^T \hat{\boldsymbol{\beta}}_r)^2}{n_{Test}}} \quad (4.20)$$

$$= \sqrt{\frac{\|\mathbf{y}^{Test} - \mathbf{X}^{Test} \hat{\boldsymbol{\beta}}_r\|^2}{n_{Test}}} \quad (4.21)$$

und

$$R_{Test}^2(r) = 1 - \frac{\sum_{i=1}^{n_{Test}} (y_i^{Test} - (\mathbf{x}_i^{Test})^T \hat{\boldsymbol{\beta}}_r)^2}{\sum_{i=1}^{n_{Test}} (y_i^{Test} - \bar{y})^2} \quad (4.22)$$

$$= 1 - \frac{\|\mathbf{y}^{Test} - \mathbf{X}_\alpha^{Test} \hat{\boldsymbol{\beta}}_r\|^2}{S_{yy}}, \quad (4.23)$$

mit  $n_{Test}$  als Zahl der Objekte im Test-Datensatz,  $y_i^{Test}$  als Antwort des  $i$ ten Test-Objektes und  $\bar{y}$  als Mittelwert der Antwort des Training-Datensatzes.

### PLS-1 und PLS-2

Es gibt zwei verschiedenen PLS-Algorithmen, PLS-1 und PLS-2, die sich geringfügig voneinander unterscheiden. Diese geringen Unterschiede können aber einen Einfluss auf die Kalibrierung haben. PLS-1 ist ein Spezialfall von PLS-2, bei dem nur eine Variable angepasst wird. Die Konzentrationen anderer Substanzen werden bei der Berechnung nicht berücksichtigt, auch wenn sie bekannt sind. PLS-2 wird angewendet, wenn mehrere physikalisch-chemische Variablen gleichzeitig in ein Modell eingebunden werden sollen. Der PLS-2 Algorithmus ist der allgemeinere, allerdings ist der PLS-1 Algorithmus schneller und für die Vorhersage einer einzelnen Substanz besser geeignet. PLS-2 gibt normalerweise bessere Ergebnisse bei der Klassifikation als bei der Vorhersage der Konzentration von Einzelsubstanzen.

### 4.6.3 Daten-Vorbehandlung

Ein Kalibrier-Modell wird aus einer sehr großen Zahl von Spektren erstellt, die systematische oder auch zufällige Variationen aufweisen können. Zur Reduktion dieser Variationen werden die Spektren oft einer Daten-Vorbehandlung unterzogen. Als

Vorbehandlung wird jede mathematische Manipulation von Daten vor der eigentlichen Analyse bezeichnet. Zu beachten ist, dass eine Vorbehandlung die spektralen Informationen verändert und dadurch das Kalibrier-Ergebnis positiv, aber auch negativ beeinflussen kann.

Häufig verwendete Vorbehandlungen sind die Normierung der Daten, das Glätten, die Basislinien-Korrektur, die *Multiplicative Scatter Correction* (MSC), die *Standard Normal Deviate* (SNV) und die Bildung der 1. und 2. Ableitung. Die verschiedenen Methoden werden im Folgenden kurz erläutert.

**Normieren:** Das Normieren wird angewendet, um systematische, durch Unterschiede in der Gesamtmenge der Probe entstehende Fehler, zu minimieren. Dazu werden die Daten durch eine Konstante dividiert. Dies kann z. B. mit der Min-Max-Normierung oder einer Vektornormierung erfolgen. Allerdings kann durch die Normierung ein Verlust an spektraler Information entstehen, indem wichtige Bereiche verfälscht oder sogar völlig eliminiert werden.

**Glätten:** Durch das Glätten wird willkürlich auftretendes Rauschen reduziert, mit dem Ziel, das Signal/Rausch-Verhältnis zu verbessern. Dies geschieht unter der Annahme, dass das Rauschen im Vergleich zum Signal bei höherer Frequenz auftritt. Im Allgemeinen wird zum Glätten ein spektrales Fenster mit einer gewissen Breite bestimmt. Innerhalb dieses Fensters wird aus allen Punkten der neue Wert für die Mitte des Fensters ermittelt. Ein übliches Verfahren ist das nach Salvitzky-Golay. Dieses entspricht einem gleitenden polynominalen Glätten. Innerhalb jedes gewählten Fensters wird ein Polynom kleiner Ordnung angenähert und so der neue geglättete Wert bestimmt.

**Basislinien-Korrektur:** Niederfrequentes Rauschen, das in keiner Beziehung zu dem untersuchten chemischen System steht, äußert sich als Verschiebung der Basislinie des Spektrums. Die Ursachen dafür kann z. B. der Einfall von Streulicht auf den Detektor sein. Basislinien-Verschiebungen sollten korrigiert werden, da sie sonst möglicherweise die statistische Auswertung dominieren und so das Ergebnis verfälschen. Dazu können verschieden Techniken verwendet werden, bei denen entweder eine Konstante, eine Gerade oder ein Polynom von dem Spektrum subtrahiert

wird. Diese Techniken erfordern es, dass zunächst Datenpunkte ermittelt werden, die ausschließlich Basislinien-Informationen enthalten.

***Multiplicative Scatter Correction (MSC)***: Die Streulicht-Korrektur stellt eine weitere Möglichkeit zur Basislinien-Korrektur dar und beruht auf der Annahme, dass störendes Streulicht eine andere Wellenlängen-Abhängigkeit aufweist als die Lichtabsorption der Probe. Die Streuung wird für jedes Spektrum relativ zu einem Referenz-Spektrum bestimmt. Jedes Spektrum wird dann korrigiert, so dass alle Spektren denselben Anteil an Streulicht aufweisen. Besonders effektiv ist die MSC bei Spektren, die in diffuser Reflektion aufgenommen wurden.

**Ableitung**: Die Bildung der 1. oder 2. Ableitung der Spektren mit einem Salvitzy-Golay-Filter ist ebenfalls eine Methode zur Basislinien-Korrektur, die dann Anwendung findet, wenn keine diskreten Punkte die ausschließlich Basislinien-Informationen enthalten, identifiziert werden können.

***Standard Normal Deviate (SNV)***: Die SNV ist eng verwandt mit der MSC. Die Daten werden zur Vorbehandlung zeilenweise autoskaliert.

#### 4.6.4 Wellenzahl-Selektion

In einer PLS-Regression werden meist viele Variablen verwendet, die nicht alle für die Modell-Bildung bzw. die Vorhersage-Genauigkeit des Modells entscheidend sind. Um ein möglichst kleines Modell mit einer hohen Vorhersage-Genauigkeit zu erstellen, ist es daher sinnvoll, diese irrelevanten Variablen zu identifizieren und zu entfernen.

Für die Variablen-Reduktion gibt es verschiedene Möglichkeiten. Häufig können bereits verschiedene Vorbehandlungen wie z. B. Ableitungen oder die MSC (*multiple scatter correction*) die Variablen reduzieren, da durch die Vorbehandlung u. U. die relevanten spektralen Bereiche hervorgehoben werden. In jedem Chemometrik-Programm können die spektralen Bereiche vom Benutzer selbst definiert werden. Wenn definierte Banden im Spektrum vorliegen, ist diese Vorgehensweise gerechtfertigt. Im Falle der breiten, stark überlappenden NIR-Banden wird diese benutzerdefinierte Auswahl sehr subjektiv. Objektiver ist die Verwendung von Algorithmen, die nach Bereichen suchen, welche für die Modell-Bildung entscheidend sind. Dazu

zählt z. B. die Wellenzahl-Selektion. Durch eine Wellenzahl-Selektion können die verwendeten spektralen Bereiche bis auf einzelne Wellenzahlen reduziert werden. Dabei wird von der Annahme ausgegangen, dass bereits ein korrektes Modell besteht, das allerdings noch redundante Variablen enthält. Im Fall von Spektren sind dies zur Berechnung herangezogene spektrale Bereiche ohne Informationen über die gesuchte Substanz.

Die verwendete Variablen-Selektions-Prozedur besteht daher aus einem Algorithmus zur Modellierung der Daten (hier PLS oder PCR), einem Such-Algorithmus zum Auffinden der korrekten Variablen und einer Zielfunktion, über die die Qualität der bestimmten und der latenten Variablen während der Suche festgestellt werden kann.

Die Qualität des gesuchten Regressions-Modells wurde bisher (s. Kap. 4.6.2) über eine *leave-one-out*-Kreuzvalidierung (LOO-CV) bestimmt. Allerdings hat sich gezeigt, dass die LOO-CV leicht zu einem *Overfitting* des Modells führen kann. [160] Eine Verbesserung stellt die *leave-multiple-out*-Kreuzvalidierung (LMO-CV) dar. [160] Entscheidend für die Güte einer LMO-CV ist, dass über eine große Zahl von verschiedenen Aufteilungen des Trainings-Datensatzes gemittelt wird. Gerade bei großen Datensätzen, wie sie Spektren aufgrund der hohen Anzahl an Wellenzahlen darstellen, kann diese Methode daher nur mit großem Rechenaufwand durchgeführt werden.

K. Baumann et al. [161, 162] verwenden als Such-Algorithmus die *Reverse Elimination Method Tabu Search* (REM-TS). Bei jeder Iteration wird eine Variable zur PLS/PCR-Regression hinzugefügt oder eliminiert. In jeder Iteration wird die vollständige Nachbarschaft der aktuellen Lösung durchsucht, indem jede Variable systematisch einbezogen und ausgelassen wird. Diejenige Nachbarschafts-Lösung, welche die größte Verbesserung zur vorangegangenen Iteration darstellt, wird als Startwert für die nächste Iteration herangezogen. Falls es keine beste Nachbarschafts-Lösung gibt, wird die Lösung mit der geringsten Verschlechterung als beste angenommen. Ein Schwanken zwischen zwei oder mehr Lösungen wird vermieden, indem dynamisch generierte Einschränkungen den Suchverlauf steuern. Mit Hilfe der Tabu-Liste, die Nachbarschafts-Lösungen enthält, die nicht besucht werden dürfen, wird verhindert, dass bereits besuchte Lösungen nochmals verwendet werden. Ein solches Verfahren, bei dem das erneute Besuchen einer bereits evaluierten Lösung verboten ist, nennt man eine strikte Tabu-Suche.

Als Zielfunktion wird der kreuzvalidierte mittlere quadratische Vorhersagefehler

( $\text{MSEP}_{CV-d}(r)$ ) herangezogen, der entweder über eine LOO-CV oder eine LMO-CV berechnet werden kann.

Zur Optimierung wird die REM-TS mit dem Ziel berechnet, ein optimales Variablen-Set  $\hat{\alpha}$  mit einer korrespondierenden optimalen Zahl an latenten Variablen  $r$  zu finden, das den  $\text{MSEP}_{CV-d}(r)$  minimiert.

Die Anwendung dieser Sequenz für die Wellenzahl-Selektion wird in Kap. 4.9.2 am Beispiel einer Glucose-Messreihe vorgestellt. Dazu wird eine von Dr. K. Baumann, Institut für Pharmazie, Universität Würzburg, in Matlab implementierte Routine verwendet.

### 4.6.5 Programme

Die Algorithmen der multivariaten Kalibrierung sind bereits in verschiedenen Programmen bzw. Programmpaketen implementiert. Dazu zählen auch einige der Mess- und Steuerprogramme für die Spektroskopie. Für die Auswertung der NIR-Spektren wurden in dieser Arbeit drei verschiedene Programme verwendet. Dies ist das Paket QUANT-2 im Messprogramm OPUS (Bruker), ein Programm zur Spektren-Darstellung und Auswertung und Matlab (The MathWorks) ein Matrix orientiertes Mathematik-Programm. QUANT-2 ist ein kommerzielles Programm, das nun kurz vorgestellt wird.

**QUANT-2:** Das Programmpaket QUANT-2 verwendet ausschließlich den PLS-1 Algorithmus zur Erstellung des Kalibrier-Modells. [163] Die Modell-Bildung kann an mehreren Substanzen gleichzeitig berechnet werden und es können mehrere spektrale Bereiche ausgewählt werden. Zur Vorbehandlung der Spektren kann zwischen keiner Vorbehandlung, der Eliminierung einer Konstanten, der Subtraktion einer Geraden, der Vektornormierung, der Min-Max-Normierung, der MSC, einem internen Standard und der 1. und 2. Ableitung entschieden werden. Die Spektren können dem Trainings-Datensatz oder dem Test-Datensatz zugeordnet werden, so dass sowohl eine Kreuzvalidierung als auch eine Test-Set-Validierung durchgeführt werden kann. Als Test-Set-Validierung wird eine spezielle Form der Kreuzvalidierung bezeichnet, bei der der Datensatz nur einmal in einen Konstruktions- und einen Validier-Datensatz geteilt wird. Die Modell-Bildung erfolgt ausschließlich

mit dem Konstruktions-Datensatz, die Validierung ausschließlich mit dem Validier-Datensatz.

Aus dem Ergebnis der Kreuzvalidierung wird mittels einer empirischen Funktion der *Minimum Description Length* (MDL) die optimale Zahl an PLS-Faktoren bestimmt. Die MDL ist definiert als

$$MDL = n \ln \frac{SSE}{n} + r \ln n. \quad (4.24)$$

$n$  bezeichnet die Anzahl an Proben,  $r$  den Rang und SSE ist die Summe der Fehlerquadrate (*sum of squared error*). Die SSE gibt den Wert der Summe der *Residuen*quadrate der Kalibrierung an. Je größer die *Residuen*quadrate sind, desto schlechter erklärt das Modell die Varianz des Datensatzes. Als *Residuum* wird die Differenz zwischen dem experimentellen Konzentrationswert  $y$  und dem vorhergesagten Wert  $\hat{y}$  bezeichnet.

$$SSE = \sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2. \quad (4.25)$$

Neben der visuellen Ausreißer-Erkennung, bei der Spektren mit starken Basislinien-Verschiebungen bzw. Fehlmessungen aus den Datensätzen entfernt werden, sucht das Programm anhand der Mahanalobis-Distanz nach Ausreißern. Die Mahanalobis-Distanz ist ein Maß für die Ähnlichkeit zwischen einem Spektrum und dem Satz von Kalibrier-Spektren. Je ähnlicher das Sepktrum den Kalibrier-Spektren ist, desto kleiner ist die Mahanalobis-Distanz. Verunreinigte Proben oder solche, bei denen Temperatureffekte eine Verzerrung der Peaksymmetrie verursacht haben, zeichnen sich durch erhöhte Mahanalobis-Distanzen aus. Während der PLS-Regression werden für alle Kalibrier-Spektren die Mahanalobis-Distanzen berechnet und daraus ein maximal zulässiger Wert bestimmt. Alle Proben, die diesen Wert überschreiten, können nicht mehr sicher bestimmt werden und gelten als Ausreißer. Ausreißer sollten nicht willkürlich aus dem Modell entfernt werden, da dieses dadurch leicht übermodelliert werden kann. Es sollten daher nur Spektren als Ausreißer gekennzeichnet werden, die starke spektrale Abweichungen von den Vergleichs-Spektren aufweisen.

Die Ergebnisse der PLS-Regression können in verschiedenen Grafiken visualisiert werden. Als Vergleichswerte zwischen verschiedenen Modellen können der Vorher-

sagefehler  $RMSEP_{CV}$  (*Root Mean Square Error of Cross Validation*), das Bestimmtheitsmaß  $R^2$  und der PLS-Rang verwendet werden. Das Bestimmtheitsmaß gibt an, wieviel der Varianz der Konzentrationsdaten durch das Modell erklärt wird. Je höher  $R^2$ , desto besser ist die Korrelation zwischen der Varianz in den Konzentrations- und Spektraldaten. Dieser Parameter wird sowohl durch ungeeignete Modellparameter als auch durch Fehler in den Referenzdaten (unzureichende Genauigkeit oder Ausreißer) beeinflusst.

**Matlab:** Matlab ist ein Matrix-orientiertes Mathematik-Programm, das die Verwendung eigener Subroutinen für die Kalibrierung erlaubt. Die für die Auswertung verwendeten Routinen wurden von Dr. K. Baumann, Institut für Pharmazie, Universität Würzburg entwickelt und programmiert. Die Auswertung erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. K. Baumann.

#### 4.6.6 $2^3$ -Faktorenversuchsplan

Ein Faktorenversuchsplan (engl. *factorial design*) erlaubt es, den Einfluss verschiedener Variablen auf eine Zielgröße zu bestimmen. Im Auge liegen neben Glucose noch weitere Stoffe vor, die im NIR-Bereich absorbieren. In der statistischen Auswertung werden ausschließlich die spektralen Daten betrachtet. Daher können alle Substanzen, die die Banden-Form, -Intensität oder -Lage beeinflussen, auch Einfluss auf das Ergebnis nehmen. Solche Substanzen werden als Querempfindlichkeiten verursachende Substanzen bezeichnet. Substanzen im Kammerwasser, die wahrscheinlich die Auswertung beeinflussen könnten, sind Milchsäure, Ascorbinsäure und Harnstoff. Es ist daher von Interesse, den Einfluss dieser Substanzen auf die quantitative Glucose-Bestimmung zu kennen.

Der Einfluss dieser drei Faktoren auf eine Zielgröße, hier Glucose, kann am einfachsten mittels eines statistischen Versuchsplanes untersucht werden. Der hierzu verwendete Plan folgt einem  $2^3$ -Faktorenversuchsplan. [164] Ganz allgemein dient ein faktorieller Versuchsplan zur Prüfung mehrerer Faktoren auf eine oder mehrere Zielgrößen. Jeder Versuch wird dabei mit unterschiedlichen Faktorstufenkombinationen durchgeführt. Im einfachsten Fall werden alle möglichen Kombinationen eingesetzt. Die Bezeichnung der Pläne setzt sich aus der Zahl der Faktoren und der Zahl der untersuchten Stufen zusammen. Hier werden drei Faktoren/Substanzen in

jeweils zwei Stufen/Konzentrationen untersucht, es handelt sich damit um einen  $2^3$ -Faktorenversuchsplan. Ein Faktorenversuchsplan wird aufgestellt, indem die Versuche in einer standardisierten Anordnung zusammengestellt werden. Die Faktoren werden mit großen Buchstaben A, B, C bezeichnet. Jeder Versuch/Faktorstufe erhält eine laufende Nummer und zusätzlich ein Symbol. (1) bezeichnet dabei den Versuch, bei dem alle Faktoren auf der niedrigsten Stufe sind. Der Versuch, bei dem nur der Faktor A auf dem hohen Niveau ist, erhält das Symbol a, usw.. Die Standardanordnung ist in Tab. 4.5 dargestellt.

Tab. 4.5: Standardanordnung für einen  $2^3$ -Faktorenversuchsplan (nach [164]).

Lfd. Nr.	Standard- Bezeichnung	Faktor		
		A	B	C
1	(1)	-	-	-
2	a	+	-	-
3	b	-	+	-
4	ab	+	+	-
5	c	-	-	+
6	ac	+	-	+
7	bc	-	+	+
8	abc	+	+	+

+ hohe Stufe, - niedrige Stufe

Aus der Standardanordnung ergibt sich der vollständige  $2^3$ -Faktorenversuchsplan, wie er in in Abb. 4.24 A dargestellt ist. Abb. 4.24 B zeigt die graphische Darstellung der Faktorstufenkombinationen.

Für einen  $2^3$ -Faktorenversuchsplan ergeben sich damit acht mögliche Faktorstufenkombinationen bzw. Freiheitsgrade. Von denen einer durch die Bestimmung des Mittelwerts aus allen Versuchen festgelegt ist. Die restlichen  $(2^3 - 1)$ -Freiheitsgrade ermöglichen die Bestimmung der Hauptwirkungen sowie Zwei- und Dreifach-Wechselwirkungen. Diese Wirkungen lassen sich aus den Ergebnissen der einzelnen Versuche wie folgt berechnen:

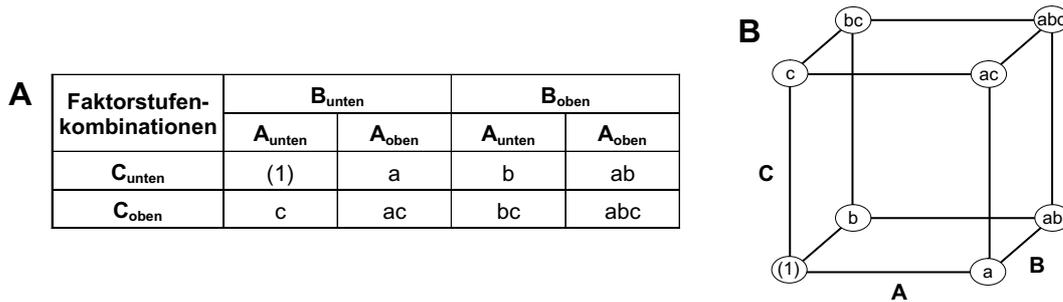


Abb. 4.24: **A**: Vollständiger Versuchsplan, **B**: Graphische Darstellung der Faktorstufenkombinationen (nach [164]).

$$A = 0,25 \cdot \{(a - (1)) + (ab - b) + (ac - c) + (abc - bc)\}, \quad (4.26)$$

$$B = 0,25 \cdot \{(b - (1)) + (ab - a) + (bc - c) + (abc - ac)\}, \quad (4.27)$$

$$C = 0,25 \cdot \{(c - (1)) + (ac - a) + (bc - b) + (abc - ab)\}, \quad (4.28)$$

$$AB = 0,25 \cdot \{((1) + ab + c + abc) - (a + b + ac + bc)\}, \quad (4.29)$$

$$AC = 0,25 \cdot \{((1) + b + ac + abc) - (a + ab + c + bc)\}, \quad (4.30)$$

$$BC = 0,25 \cdot \{((1) + a + bc + abc) - (b + ab + c + ac)\}, \quad (4.31)$$

$$ABC = 0,25 \cdot \{(a + b + c + abc) - ((1) + ab + ac + bc)\}. \quad (4.32)$$

Mit Hilfe der berechneten Wechselwirkungen lassen sich die Einflüsse der drei Faktoren auf die Zielgröße bestimmen. Soll der Einfluss von mehr als drei Faktoren bestimmt werden, so kann der Faktorenversuchsplan erweitert werden. Man spricht allgemein von  $2^n$ -Faktorenversuchsplänen.

## 4.7 In-vivo-Glucose-Bestimmung

Die an einem Probanden durchgeführte *In-vivo*-Glucose-Bestimmung erfolgt über Messungen am Auge. Zur Variation der Blutglucosewerte unterzieht sich der Proband einem Glucose-Toleranztest, der über ca. 2–3 Stunden hinweg einen Anstieg der Blutglucosewerte hervorruft, gefolgt von einem Abfall auf das Anfangsniveau. Die Blutglucosewerte werden als Referenz-Konzentrationen mit einem gebräuchlichen Glucometer alle 10 min während des Glucose-Toleranztests bestimmt. Die zugehörigen

gen Spektren der Augenvorderkammer werden in einem abgedunkeltem Raum mit dem in Kap. 4.3.4 vorgestellten Aufbau aufgenommen. Wenn möglich werden alle 10 min sukzessiv mindestens drei Einkanalspektren aufgenommen. Um eine gleichbleibende Qualität der Spektren zu gewährleisten, muss der Proband den Kopf sehr ruhig halten und Augenbewegungen und Lidschlüsse (Zwinkern) während Aufnahme der Spektren versuchen zu vermeiden. Als Hilfestellung dient eine Kopfstütze, wie sie typischerweise in der Ophthalmologie Einsatz findet (s. a. Abb. 4.13). Die Spektren-Aufnahme kann mit zwei verschiedenen Spektrometern durchgeführt werden, einem dispersiven und einem FT-NIR-Spektrometer. Im Folgenden werden die Ergebnisse für beide Spektrometer vorgestellt.

### 4.7.1 FT-NIR-Messungen

Das verwendete FT-NIR-Spektrometer ist ein kommerzielles Gerät (Vector22/N-C, Bruker), das speziell für die *In-vivo*-Messungen adaptiert wurde (s. Kap. 4.3.1). Ein typisches Einkanal-Spektrum einer menschlichen Vorderkammer ist in Abb. 4.25 dargestellt.

Der Kurvenverlauf zeigt zwei spektrale Fenster, ein sehr kleines um  $6000\text{ cm}^{-1}$  und eines zwischen  $7200$  und etwa  $12000\text{ cm}^{-1}$ . Der Einbruch bei  $10500\text{ cm}^{-1}$  wird durch das auf den Raman-Detektor aufgebrachte Filter verursacht, das eine Sättigung des Detektors verhindern soll. Desweiteren ist ein Einbruch der Intensität bei  $8500\text{ cm}^{-1}$  zu sehen, der einer Wasser-Bande entspricht. Die Gesamtintensität des Einkanal-Spektrums ist sehr gering. Verglichen mit der Detektorkurve (Abb. 4.4) beträgt die Intensität etwa ein Tausendstel.

Die niedrige Gesamtintensität resultiert aus der geringen Reflektivität der Vorderfläche der Linse. Für die *In-vivo*-Messungen bedeutet es, dass die Messparameter sehr genau abgestimmt und eingehalten werden müssen, um verwertbare Spektren zu erhalten. Aus den Einkanalspektren werden Absorptions-Spektren berechnet mit einem Spektrum des Auges vor dem Glucose-Toleranztest als Hintergrund. Natürlich ist zu diesem Zeitpunkt der Blutglucose-Wert nicht Null, allerdings ist er bei einem nüchternen Probanden auf einem niedrigen Niveau. Für die multivariate Kalibrierung ist dies nicht von Bedeutung. Den Spektren wird eine Glucose-Konzentration in Relation zum Grundwert zugeordnet.

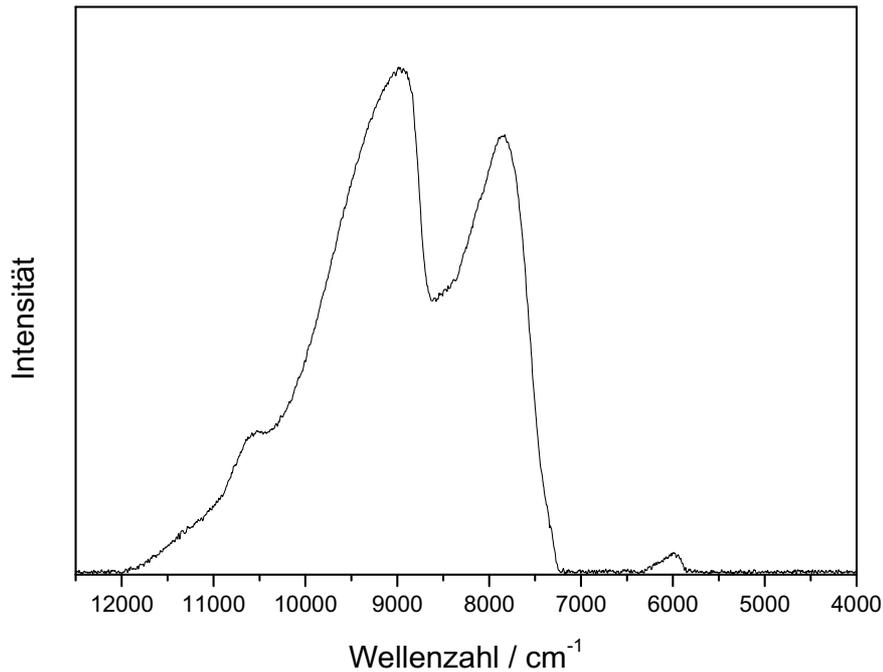


Abb. 4.25: Typisches *In-vivo*-Einkanalspektrum der menschlichen Vorderkammer (Vector22/N-C, *In-vivo*-Setup, Fokus-Größe 1,8 mm, 32 scans,  $8\text{ cm}^{-1}$ , Raman-Detektor).

Die Auswertung der Spektren erfolgt durch eine *leave-one-out*-Kreuzvalidierung mit dem Programmpaket QUANT-2 (OPUS, Bruker). Die aktuelle Glucose-Konzentration im Auge kann nicht direkt bestimmt werden. Es ist bekannt, dass eine Variation des Blutglucosewertes mit einer Latenzzeit von etwa 20 min eine Änderung der Glucose-Konzentration in der Vorderkammer bewirkt. Diese Latenzzeit wird bei der Zuordnung der gewonnenen Blutglucosewerte zu den Spektren mit in Betracht gezogen.

Mit diesen Annahmen erhält man für einen Messzyklus während eines Glucose-Toleranztests aus 42 Spektren das in Abb. 4.26 dargestellte Ergebnis für eine Kreuzvalidierung ohne Vorbehandlung der Spektren in zwei spektralen Bereichen, 5766 bis  $6545\text{ cm}^{-1}$  und 7259 bis  $10503\text{ cm}^{-1}$ .

Die Korrelation der experimentellen gegen die vorhergesagten Konzentrationswerte ist hier nicht optimal. Die Werte streuen stark über den gesamten Konzentrationsbereich. Dies zeigt sich auch im berechneten Vorhersagefehler der Kreuzvalidierung

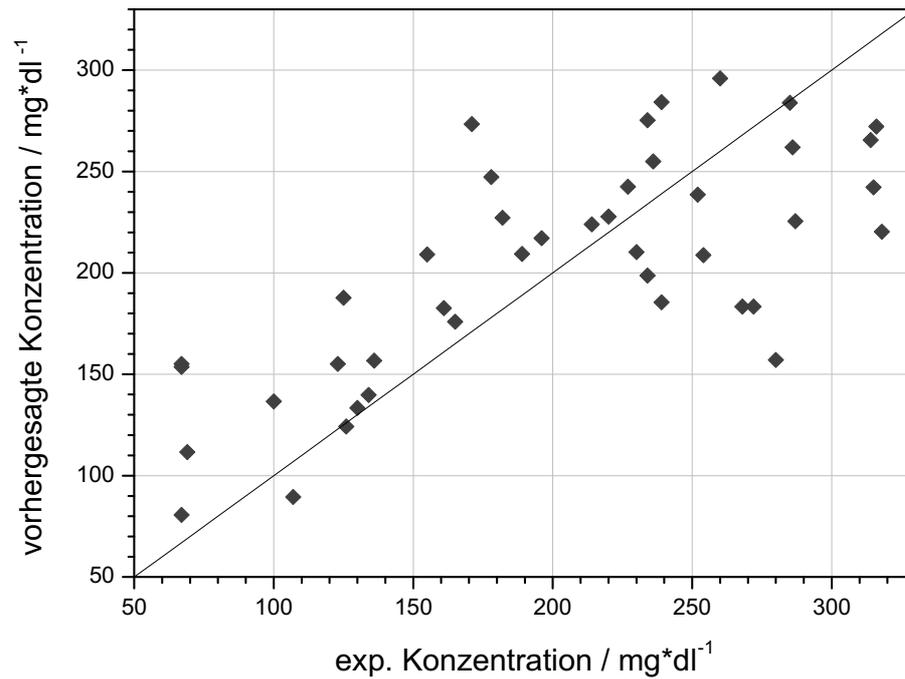


Abb. 4.26: Kreuzvalidierung von 42 *In-vivo*-Spektren (QUANT-2, ohne Vorbehandlung, 5766–6545  $\text{cm}^{-1}$  und 7259–10503  $\text{cm}^{-1}$ ).

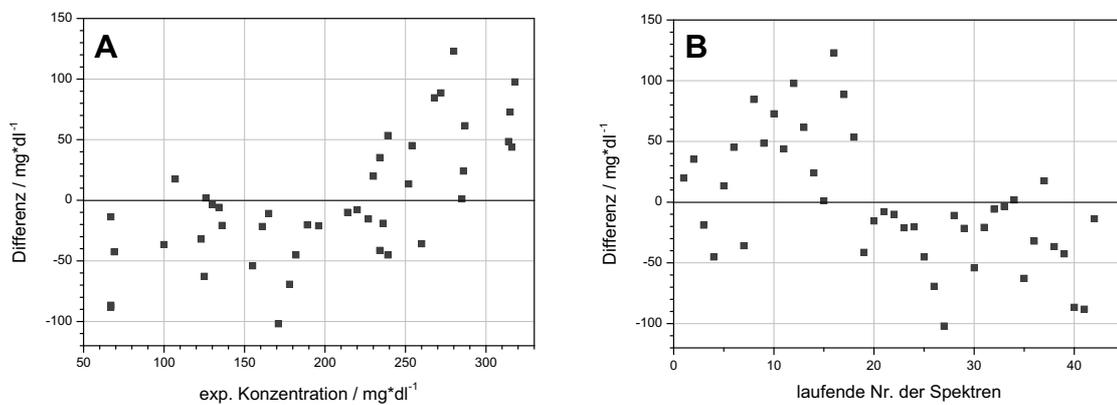


Abb. 4.27: *Residuen* der Kreuzvalidierung von 42 *In-vivo*-Spektren (QUANT-2, ohne Vorbehandlung, 5766–6545  $\text{cm}^{-1}$  und 7259–10503  $\text{cm}^{-1}$ ). Differenz der experimentellen und der vorhergesagten Konzentration gegen die exp. Konzentration (**A**) und gegen die laufende Nr. der Spektren (**B**).

$RMSEP_{CV} = 51,7 \text{ mg/dl}$  bei einem Bestimmtheitsmaß von  $R^2 = 52,36 \%$  und einem PLS-Rang von 3.

Die *Residuen*, also die Darstellung der Differenz der experimentellen und der vorhergesagten Konzentration gegen die Konzentration bzw. gegen die laufende Nr. der Spektren sind in Abb. 4.27 gezeigt.

Hieraus lässt sich erkennen, dass die Vorhersage für hohe Konzentrationen etwas schlechter ist als für niedrige. Außerdem erkennt man einen Zusammenhang mit der laufenden Nr. der Spektren. Am Anfang des Messzyklus werden zu niedrige Konzentrationen vorhergesagt, am Ende eher zu hohe.

### 4.7.2 Dispersive NIR-Messungen

Neben dem FT-NIR-Spektrometer stand auch ein dispersives NIR-Spektrometer für *In-vivo*-Messungen zur Verfügung. Der entsprechende Aufbau wurde bereits in Kap. 4.3.2 vorgestellt. Auch für diese Messung unterzieht sich der Proband einem Glucose-Toleranz-Test. Die Spektren der Vorderkammer werden mit einer Messzeit von nur 800 ms pro Spektrum aufgenommen (FT-NIR: 20 s). Dadurch sollten zufällige Augenbewegungen die Messungen weniger beeinflussen. Die Spektren werden als Einkanal-Spektren zwischen 930 und 1670 nm ( $10750\text{--}6000 \text{ cm}^{-1}$ ) aufgenommen. Aus diesen Einkanal-Spektren werden mit einem Vorderkammer-Spektrum als Hintergrund, das vor der Glucose-Einnahme aufgenommen wurde, Absorptions-Spektren gebildet. Der Proband ist zum Zeitpunkt der Aufnahme des Hintergrund-Spektrums nüchtern, d. h. der Blutglucosewert ist daher niedrig aber messbar. Den Absorptions-Spektren wird für die Kalibrierung ein Blutglucosewert relativ zu dem des Hintergrund-Spektrums zugeordnet.

Eine Änderung des Blutglucosewertes führt erst mit einer Latenzzeit von ca. 20 min zu einer Änderung der Glucose-Konzentration in der Vorderkammer. Diese Latenzzeit wird bei der Zuordnung der Blutglucosewerte zu den Kalibrier-Spektren berücksichtigt.

Abb. 4.28 zeigt ein typisches *In-vivo*-Einkanal-Spektrum, das mit dem dispersiven Aufbau aufgenommen wurde. Unterhalb von  $7200 \text{ cm}^{-1}$  ist die Intensität gleich Null, in diesem Bereich liegt eine Wasser-Bande.

Für die Kreuzvalidierung werden 114 *In-vivo*-Spektren, die während eines

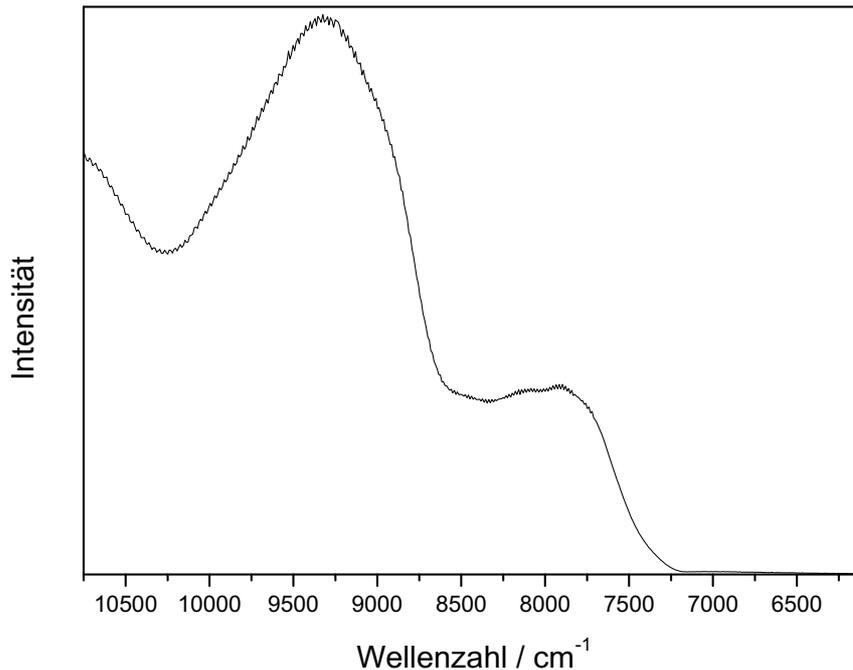


Abb. 4.28: Typisches *In-vivo*-Einkanalspektrum der menschlichen Vorderkammer (disp. Aufbau, *In-vivo*-Setup, Fokus-Größe 2 mm, 800 ms).

Glucose-Toleranz-Tests aufgenommen wurden, herangezogen. Nach Eliminierung der Ausreißer verbleiben 90 Kalibrier-Spektren für die LOO-Kreuzvalidierung. Abb. 4.29 zeigt die Korrelation der vorhergesagten gegen die experimentelle Konzentration für die LOO-Kreuzvalidierung. Die Kreuzvalidierung wird in dem spektralen Bereich zwischen  $7141,1$  und  $10509,9\text{ cm}^{-1}$  mit dem Programm-Paket QUANT-2 (OPUS, Bruker) berechnet.

Das Diagramm zeigt, dass die Konzentrationen hier besser korreliert sind, als es bei den Messungen mit dem FT-Spektrometer der Fall ist. Der Vorhersagefehler ist mit  $\text{RMSEP}_{CV} = 27,6\text{ mg/dl}$  zwar sehr viel besser als bei der FT-Messung, allerdings zeigen die Werte immer noch eine starke Streuung auf. Dies zeigt sich auch im Bestimmtheitsmaß mit  $R^2 = 70,68\%$  bei einem optimalen PLS-Rang von 15.

Einen besseren Vergleich der Streuung in Abhängigkeit der Konzentration zeigt die Abb. 4.30. Hier sind die *Residuen* in Abhängigkeit der experimentellen Konzentration (**A**) bzw. der Reihenfolge der Aufnahme (**B**) dargestellt. In beiden Diagrammen sind die Datenpunkte relativ gleichmäßig verteilt. Dies lässt darauf schließen, dass

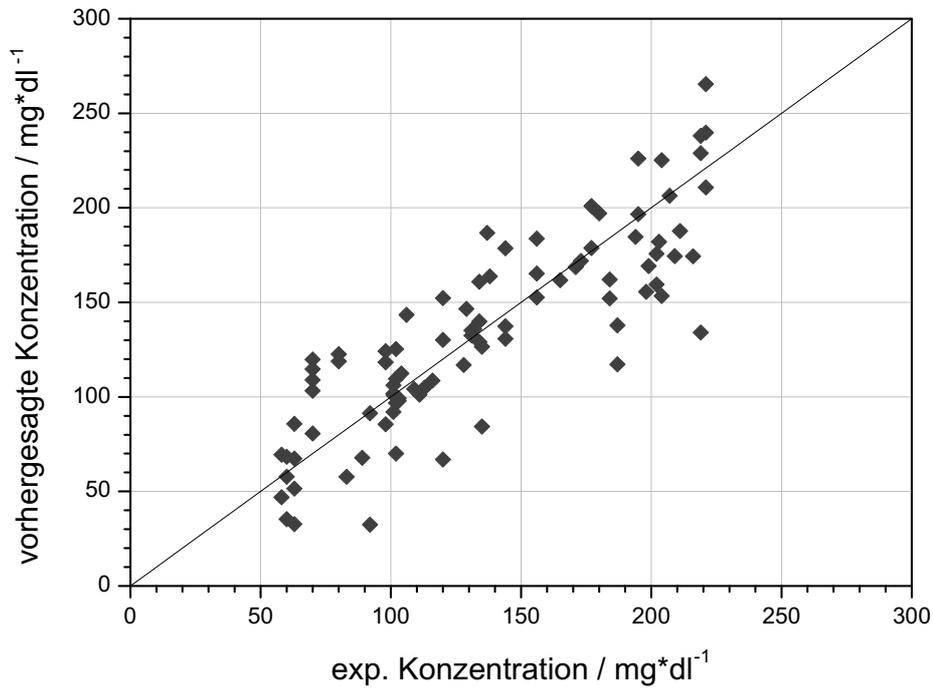


Abb. 4.29: Kreuzvalidierung von 90 *In-vivo*-Spektren (QUANT-2, ohne Vorbehandlung, 7141,1–10509,9 cm<sup>-1</sup>).

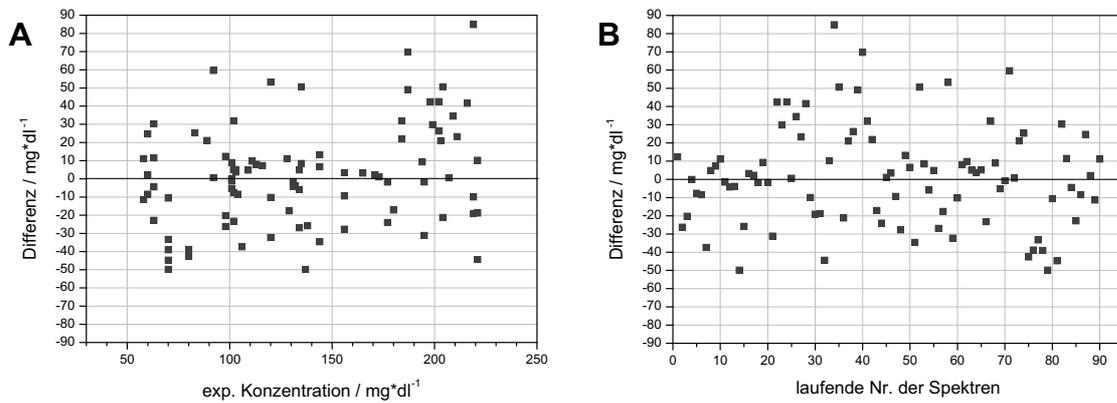


Abb. 4.30: Auftragung der *Residuen* der Kreuzvalidierung von 90 *In-vivo*-Spektren gegen die exp. Konzentration (**A**) und gegen die laufende Nr. der Spektren (**B**).

die Ergebnisse der Validierung für alle Konzentrations-Bereiche ähnlich sind und auch keine offensichtliche Abhängigkeit von der Reihenfolge der Messung besteht, also keinen Trend wie in Abb. 4.27 zeigen.

Die beiden vorgestellten Resultate lassen keine endgültige Aussage über die Möglichkeit der nicht-invasiven Glucose-Bestimmung am Auge zu. Allerdings sieht man, dass diese Methoden über ein gewisses Vorhersage-Potential verfügen. Die *in vivo* ermittelten Ergebnisse müssen jedoch zunächst optimiert werden, bevor die Vorhersage unbekannter Proben damit möglich sein wird. Medizinisch gefordert ist ein Vorhersagefehler für unbekannte Proben von  $RMSEP = 10 \text{ mg/dl}$ . Der Vorhersagefehler der Validierung ist normalerweise etwas besser und sollte daher unter  $RMSEP < 10 \text{ mg/dl}$  liegen. Die vorgestellten Ergebnisse zeigen deren Abhängigkeit von mehreren Faktoren. Dazu zählen neben der Messdauer und dem damit verbundenem Zeitraum, in dem das Auge geöffnet bleiben muss, auch das Gerät selbst. Eine systematische Untersuchung der Geräte-Parameter und eine Optimierung der Parameter für die Auswertung sind *in vivo* nicht zu realisieren. Daher werden im Folgenden *In-vitro*-Messungen zur Ermittlung der optimalen Parameter herangezogen.

### 4.7.3 Monitorstrahlengang

Der für die *In-vivo*-Spektroskopie verwendete Strahlengang erfordert immer einen Experimentator, der die Apparatur einstellt bzw. scharf stellt. Allerdings wird das in das Auge eingestrahelte Licht nicht nur auf der Linse sondern auch auf der Vorder- und Rückseite der Hornhaut reflektiert. Diese Reflektionen sind sehr viel stärker als die der Linse, wie es bereits in Kap. 2 beschrieben wurde. Das legt die Idee nahe, diese Reflektionen zur Scharfstellung der Apparatur zu verwenden. [48] Dazu muss der in Kap. 4.3.4 beschriebene Aufbau erweitert werden. Eine entsprechende Skizze des Aufbaus ist in Abb. 4.31 gezeigt.

Das Licht von der Lichtquelle L wird ins Auge fokussiert und in allen vier Purkinje-Punkten reflektiert. Das an der Vorder- und Rückseite der Hornhaut reflektierte Licht wird auf einen Monitor M gelenkt und das an der Vorderfläche der Linse reflektierte Licht auf den Detektor D.

Als erste Lösung des Problems der automatischen Scharfstellung der Apparatur wird einfach eine grüne Leuchtdiode an der angegebenen Position angebracht, die

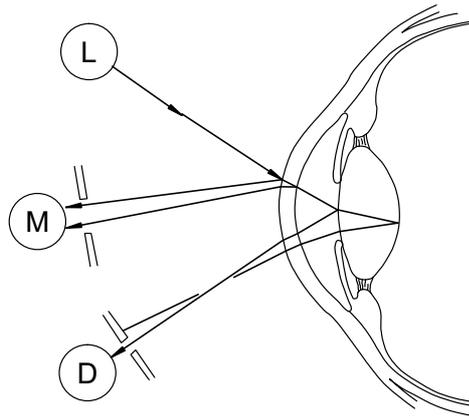


Abb. 4.31: Skizze des *In-vivo*-Aufbaus mit Monitorstrahlengang. L: Lichtquelle, M: Detektor des Monitorstrahlengangs, D: Detektor.

der Proband fixieren kann. Die Farbe der Leuchtdiode wird so gewählt, dass sie gut erkennbar und sich von dem eher roten zur NIR-Messung verwendeten Licht abhebt. Erste Tests zeigen, dass es dem Probanden dadurch leichter fällt, unbeabsichtigte Augenbewegungen zu vermeiden. Allerdings ist es nur ein erster Schritt in Richtung einer automatisierten Scharfstellung der Apparatur.

Eine Weiterentwicklung besteht im Austausch der Diode gegen einen kleinen Detektor. Der Detektor besteht aus einer BaK4-Plankonvexlinse (10 mm  $\varnothing$ ,  $f = 15$  mm), die das Licht auf eine Phototransistor (BPX 25) fokussiert. Die Anzeige erfolgt als Änderung der Stromstärke. Zu diesem Zweck wird das Detektorsignal mit einer Darlington-Schaltung gewandelt.

Es konnte während einer *In-vivo*-Messung gezeigt werden, dass die Stromstärke mit der Fixation zu korrelieren scheint. Dies wird durch den Experimentator visuell festgestellt. Die gemessenen Ströme sind klein, ca.  $200 \mu\text{A}$ , und werden bisher nur als Hilfestellung für den Experimentator verwendet.

Diese Vorversuche zeigen, dass die Reflektion an der Hornhaut mit der Scharfeinstellung der Apparatur zu korrelieren scheint und dass es u. U. möglich ist, die Scharfeinstellung auf diese Weise zu automatisieren. Für eine Automatisierung muss der durch den Detektor des Monitorstrahlengangs festgestellte Maximal-Wert für jeden Probanden individuell festgestellt werden. Zusätzlich sollte die Software für die Spektren-Aufnahme mit dem Monitorstrahlengang gekoppelt werden, so dass eine Programm-gesteuerte Spektren-Aufnahme anhand der ermittelten Werte möglich

ist.

## 4.8 *In-vitro*-Glucose-Bestimmung

Da eine systematische Untersuchung der Geräte-Parameter und eine Optimierung der Parameter für die Auswertung *in vivo* nicht zu realisieren sind, werden im Folgenden *In-vitro*-Messungen zur Ermittlung der optimalen Parameter herangezogen. Dazu werden Messungen an unterschiedlichen Geräten durchgeführt und auch verschiedene Parameter für die Auswertung getestet.

### 4.8.1 Externe Messungen

Die *In-vivo*-Glucose-Messungen wurden an zwei verschiedenen Geräten durchgeführt, einem FT-Spektrometer und einem dispersiven Gerät. Dies hatte unterschiedliche Ergebnisse in der Glucose-Bestimmung zur Folge und führte zu der Annahme, dass auch das verwendete Gerät einen Einfluss auf die Qualität der Messung haben könnte. Aus diesem Grund wurden Testmessungen an verschiedenen, kommerziell erhältlichen Geräten durchgeführt. Da diese Geräte zur Spektren-Aufnahme und auch zur Auswertung unterschiedliche Programme verwenden, kann ein Vergleich der Ergebnisse ausschließlich anhand der Vorhersagefehler gemacht werden. Die verwendeten Geräte-Parameter sind in Tab. 4.1 angegeben.

**FT-Spektrometer MB 160 (ABB):** Zu den bereits in Kap. 4.3.3 vorgestellten Geräten gehört das FT-Spektrometer MB 160 (ABB). An diesem Gerät werden wässrige Glucoselösungen mit Konzentrationen zwischen 10 und 300 mg/dl in Schritten von 10 mg/dl sowie 500, 700, 800 und 900 mg/dl untersucht. Die genauen Konzentrationen und Probenbezeichnungen sind in Anhang B.1 aufgeführt. Die Proben werden in Glasröhrchen für die GC-Analyse mit einem Durchmesser von 5 mm gefüllt, auf 37°C temperiert und bei dieser Temperatur vermessen. Die Spektren werden mit 64 scans bei einer Auflösung von 16 cm<sup>-1</sup> zwischen 3800–14000 cm<sup>-1</sup> aufgenommen. Die Auswertung erfolgt mit dem Programm-Paket PLSPlus/IQ (ABB).

In Abb. 4.32 sind die NIR-Absorptions-Spektren für Glucose-Konzentrationen von 10, 100, 500 und 1000 mg/dl dargestellt (Proben 1, 10, 31 und 33).

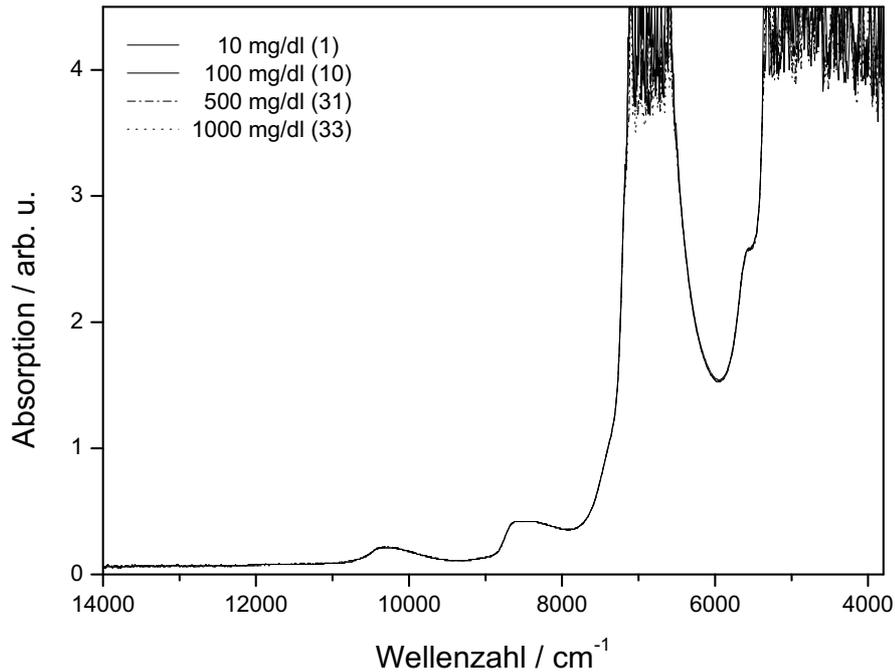


Abb. 4.32: NIR-Absorptions-Spektren wässriger Glucoselösungen (MB 160,  $d = 5$  mm,  $16 \text{ cm}^{-1}$ ).

Die Spektren entsprechen den Glucose-Spektren, die mit dem Vector22/N-C (Bruker) mit einer Schichtdicke von 5 mm aufgenommen werden (s. Abb. 4.40). Es lassen sich nur marginale Unterschiede aufgrund der verschiedenen Konzentrationen feststellen. Unterhalb von  $5300 \text{ cm}^{-1}$  und zwischen  $6500\text{--}7100 \text{ cm}^{-1}$  beobachtet man Totalabsorption.

Die Auswertung erfolgt mit dem in Grams (Thermo Galactic) implementierten Programmpaket PLSPlus/IQ (ABB) nach dem PLS-1 Algorithmus. Nach einer ersten visuellen Kontrolle der Spektren wird das Spektrum der Probe Nr. 9 als Ausreißer identifiziert und aus dem Datensatz genommen. Die PLS-1-Regression wird über zwei spektrale Bereiche ( $5755\text{--}6295 \text{ cm}^{-1}$ ,  $7267\text{--}11124 \text{ cm}^{-1}$ ) mit 62 Spektren als *leave-one-out*-Kreuzvalidierung berechnet.

Es werden zwei Regressionen durchgeführt, eine mit den Spektren ohne Vorbehandlung und eine mit der ersten Ableitung der Spektren. Die Ergebnisse beider Regressionen sind in Abb. 4.33 als vorhergesagte Konzentration gegen die tatsächliche Konzentration dargestellt.

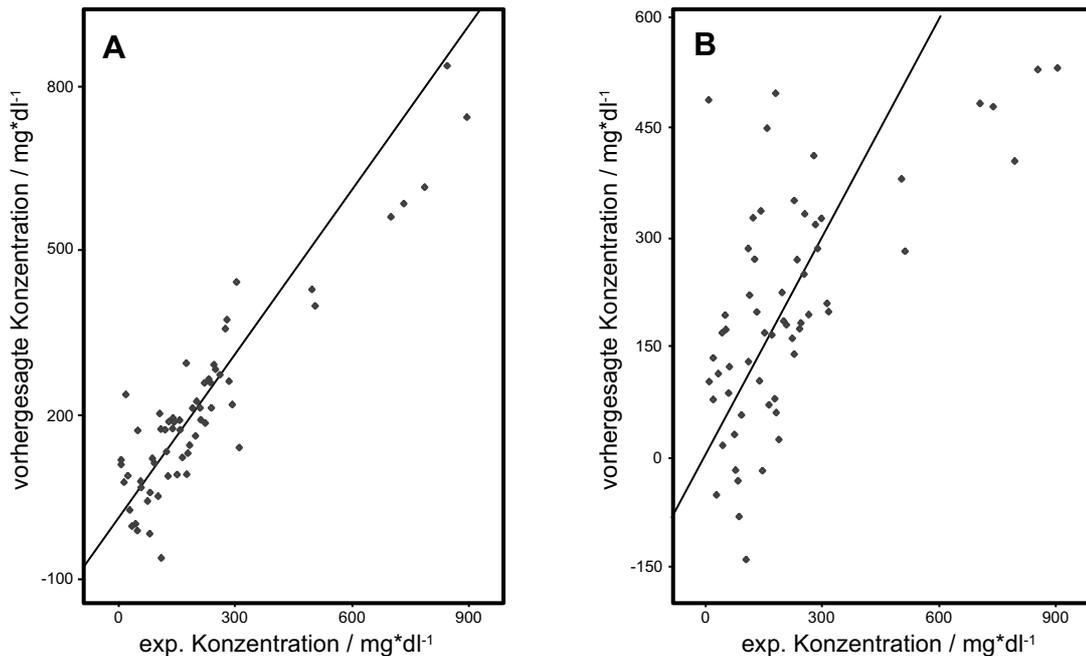


Abb. 4.33: Ergebnisse der PLS-1 Regression (62 Spektren, MB 160,  $d = 5$  mm,  $16$  cm<sup>-1</sup>).  
**A:** Ohne Vorbehandlung, **B:** erste Ableitung.

Beide Regressionen zeigen keinen eindeutigen Zusammenhang zwischen den vorhergesagten und den experimentellen Konzentrations-Werten. Die beste Regression ohne Vorbehandlung der Spektren ist die mit einem Fehler von  $RMSEP_{CV} = 79,45$  und einem Bestimmtheitsmaß  $R^2 = 84,92\%$  bei einem PLS-Rang von 6. Werden die ersten Ableitungen der spektralen Daten verwendet, so ergibt sich ein Fehler von  $RMSEP_{CV} = 156,33$  bei einem Bestimmtheitsmaß von  $R^2 = 41,84\%$ , und einem Rang von 4.

Die Verwendung der ersten Ableitung führt zu einem sehr viel schlechteren Ergebnis. Aber auch die Validierung ohne Vorbehandlung zeigt keine ausreichende Genauigkeit für eine korrekte Glucose-Vorhersage im physiologischen Konzentrations-Bereich.

Wird für die Berechnung anstelle von PLSPlus/IQ das Programm QUANT-2 (OPUS, Bruker) mit den selben Parametern verwendet, so verschlechtert sich das Ergebnis weiter. Ohne Vorbehandlung ergibt sich bei einem PLS-Rang von 4 ein Fehler von  $RMSEP_{CV} = 196$  mg/dl bei einem Bestimmtheitsmaß von  $R^2 = 7,22\%$ . Bei Verwendung der ersten Ableitung wird der erste PLS-Rang als optimaler Rang

ausgegeben mit einem Fehler von  $RM\ SECV = 187\ \text{mg/dl}$  und einem Bestimmtheitsmaß von  $R^2 = 15,01\ \%$ . Im Vergleich mit der Auswertung der mit dem Vector22/N-C aufgenommenen Daten stellen diese Ergebnisse keine Verbesserung dar.

**InfraPrime und InfraProver (Bran+Luebbe):** Neben dem direkten Vergleich zweier FT-Spektrometer werden auch andere Spektrometertypen getestet. Dazu gehören zwei Geräte der Firma Bran+Luebbe, das InfraPrime, ein 2-Strahl-AOTF-Spektrometer, und das InfraProver, ein Polarisations-Interferometer. Die Funktionsweise des AOTF-Spektrometers wurde in Kap. 4.3.3 erläutert.

Die Proben für diese Testmessung wurden analog zu den bereits für die am MB 160 beschriebenen Testmessungen vorbereitet. Die genauen Konzentrations-Angaben und die Bezeichnungen der tatsächlich vermessenen Proben sind im Anhang B.2 zusammengestellt. Die Spektren wurden in 1 bzw. 10 mm Durchflussküvetten bei Raumtemperatur aufgenommen. Am InfraPrime wurde zwischen 900 und 1700 nm ( $11000\text{--}5900\ \text{cm}^{-1}$ ) in 2 nm Schritten gemessen, am Infraprover zwischen 10000 und  $4000\ \text{cm}^{-1}$  (1000–2500 nm) mit einer Schrittweite von  $12\ \text{cm}^{-1}$ . Die Küvette wurde für jede Messung neu gefüllt und es wurden drei Spektren pro Probe aufgenommen. In Abb. 4.34 sind typische Spektren für die Messung an den beiden Geräten dargestellt.

Die mit der 1 mm Küvette aufgenommenen Spektren (**A**) entsprechen wiederum den bereits zuvor diskutierten Glucose-Spektren (s. Kap. 4.5.2). Das mit einer Schichtdicke von 10 mm aufgezeichnete Spektrum (**B**) zeigt aufgrund der höheren Schichtdicke bereits oberhalb von etwa 1400 nm ( $7143\ \text{cm}^{-1}$ ) Totalabsorption, im Vergleich dazu existiert bei einer Schichtdicke von 5 mm noch ein spektrales Fenster zwischen den beiden Wasser-Banden ( $5750\text{--}6300\ \text{cm}^{-1}$ ). Die 1 mm Spektren am InfraProver (**C**) wurden in einem größeren spektralen Bereich (1000–2500 nm) aufgenommen. Auch sie zeigen den typischen, bereits in Kap. 4.5.2 diskutierten Verlauf.

Die Auswertung der Spektren erfolgte mit dem Programm Sesame 3.1 (Bran+Luebbe). Für die Modellbildung wurden neben PLS-Algorithmen der der multiplen linearen Regression (MLR) verwendet. Um einen Anhaltspunkt zur Beurteilung der Güte des mathematischen Modells zu erhalten, wurde der Vorhersagefehler (RMSEP) berechnet. Neben dem Vorhersagefehler wurde auch der *Multiple Correlation Coefficient* (MCC) und die geschätzte Standardabweichung (SEE:

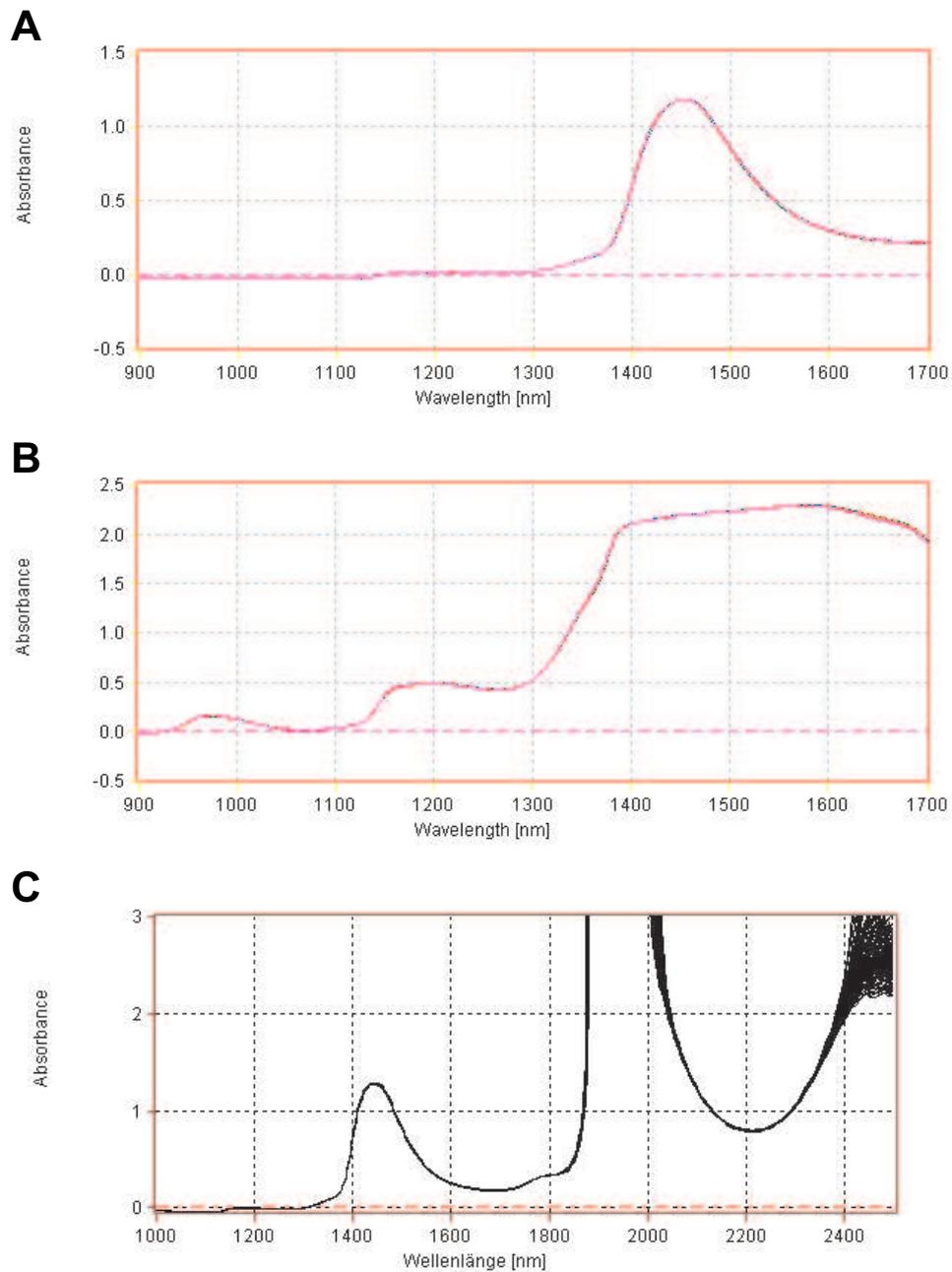


Abb. 4.34: Glucose-Absorptions-Spektren des AOTF-Spektrometers (InfraPrime) **A:** mit der 1 mm Küvette und **B:** mit der 10 mm Küvette. **C:** Spektren des Polarisations-Interferometers (InfraProver) mit der 1 mm Küvette.

*Standard Error of Estimation*) berechnet. Die mathematischen Definitionen dieser Begriffe sind in den Gleichungen 4.33–4.35 angegeben:

$$MCC = \sqrt{1 - \frac{SEE^2(n - k - 1)}{SD_{\text{Bereich}}(n - 1)}}, \quad (4.33)$$

$$SEE = \sqrt{\frac{\sum(y_{\text{pred}} - y_{\text{ref}})^2}{n - k - 1}}, \quad (4.34)$$

$$RMSEP = \sqrt{\frac{\sum(y_{\text{pred}} - y_{\text{ref}})^2}{n}}. \quad (4.35)$$

$SD$  bezeichnet die Standardabweichung,  $n$  die Anzahl der Kalibrier-Proben und  $k$  die Anzahl der Wellenlängen.

Die Spektren wurden in mehrere Blöcke unterteilt, so dass unterschiedliche Spektren zur Kalibrierung und zur Vorhersage verwendet wurden. Die RMSEP-, MCC- und SEE-Werte sind für die verschiedenen Regressionen in Tab. 4.6 zusammengefasst.

Tab. 4.6: Auswertung der Kalibrierungen für das InfraPrime und das InfraProver (Bran+Luebbe).

Gerät	Schichtdicke	Statistik	MCC	SEE	RMSEP
InfraPrime	1 mm	MLR	0,998	4,0	9,5
		PLSR	0,997	4,3	9,5
InfraPrime	10 mm	MLR	0,996	10,4	20,2
		PLSR	0,998	6,9	9,4
InfraProver	1 mm	MLR	0,986	15,1	40
		PLSR	0,993	12,2	42

Das beste Ergebnis wird mit den 1 mm-Spektren des InfraPrime erzielt. Der Vorhersagefehler (RMSEP) für unbekannte Test-Spektren liegt sowohl für die MLR- als auch für die PLS-Regression unter 10 mg/dl bei einer geschätzten Standardabweichung von 4,0 bzw. 4,3 mg/dl. Die Regressionen mit den Spektren mit 10 mm Schichtdicke bzw. mit dem InfraProver weisen mit Vorhersagefehlern bis zu RMSEP = 42 mg/dl erheblich schlechtere Werte auf.

Da Messungen mit einer Schichtdicke von 5 mm an diesen Geräten nicht durchgeführt werden konnten, ist kein direkter Vergleich mit den Ergebnissen am Vector22/N-C möglich. Die Testmessungen am InfraPrime und InfraProver zeigen, dass es prinzipiell möglich ist, Glucose in wässriger Lösung im physiologischen Konzentrations-Bereich zu messen. Aufgrund der geringen Konzentrationen ist jedoch mit einem starken Matrixeinfluss des Lösungsmittels, hier Wasser, zu rechnen. Bei allen Kalibrierungen ist daher darauf zu achten, dass tatsächlich Glucose modelliert wird und nicht die Wechselwirkungen von Glucose mit der Wassermatrix.

**V-570 (JASCO):** Auch ein dispersives Spektrometer wurde getestet, das V-570 (JASCO), ein Zwei-Strahl-Spektrometer. Die Spektren wurden in Küvetten mit einer Schichtdicke von 5 mm zwischen 2500 und 750  $\text{cm}^{-1}$  (4000–13300  $\text{cm}^{-1}$ ) bzw. 2000 bis 750 nm (5000–13300  $\text{cm}^{-1}$ ) mit einer Scan-Geschwindigkeit von 400 nm/min aufgenommen. Daraus resultierte eine Aufnahmezeit von etwa 5 min pro Spektrum. Die Temperatur der Proben betrug 37°C. Als Referenz diente ein Leerkanal-Spektrum, das direkt vor der Probe vermessen wurde. Jede Probe wurde einmal vermessen. Die an diesem Gerät vermessenen Proben sind im Anhang B.3 aufgeführt.

Abb. 4.35 zeigt einige mit diesem Gerät aufgenommene NIR-Absorptions-Spektren wässriger Glucoselösungen. Die Spektren zeigen den typischen Verlauf, wie auch in Abb. 4.32 und 4.40.

Für die PLS-Modellbildung wurde das Programm Spectra Manager (JASCO) verwendet. Die beiden Spektren-Serien A und B wurden getrennt voneinander ausgewertet. Die Proben der Serie A wurden einzeln eingewogen, die der Serie B als Verdünnungsreihe hergestellt.

Abb. 4.36 zeigt die Korrelation der vorhergesagten Konzentrationen gegen die experimentell bestimmten Konzentrationen für drei PLS-Modelle mit unterschiedlichen Parametern.

Zunächst wird eine PLS-Regression mit den Spektren der Proben A0–A28 ohne Vorbehandlung der Daten in zwei spektralen Bereichen (1548–1850 nm und 750–1390 nm) berechnet (Abb. 4.36 A). Das Bestimmtheitsmaß dieser Berechnung ist  $R^2 = 95,98\%$  und der Vorhersagefehler liegt bei  $\text{RMSEP} = 23,44 \text{ mg/dl}$ . Die Korrelation ist im unteren und mittleren Konzentrations-Bereich besser als im Bereich hoher Konzentrationen. Aus diesem Grund werden Proben mit Konzentrationen

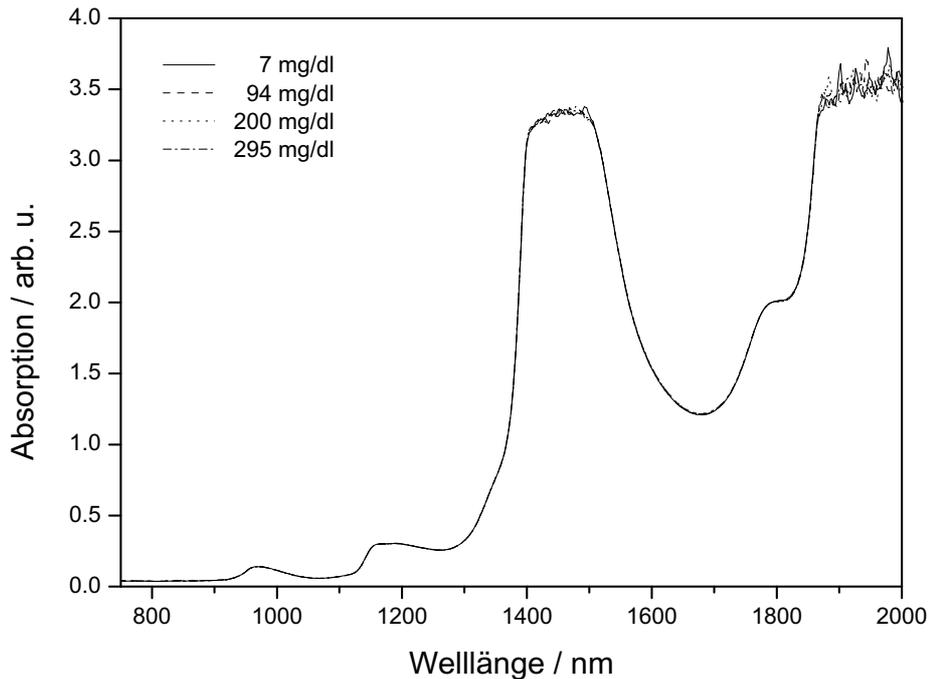


Abb. 4.35: Glucose-Absorptions-Spektren des V-570 (JASCO) mit einer Schichtdicke von 5 mm bei 37°C.

über 250 mg/dl als Ausreißer gekennzeichnet und aus dem Datensatz entfernt. Diese Konzentrationen haben auch physiologisch kaum noch eine Bedeutung. Zusätzlich werden die Spektren geglättet. Dadurch verbessert sich das Ergebnis der Kreuzvalidierung. Der Vorhersagefehler verringert sich auf 16,09 mg/dl und das Bestimmtheitsmaß steigt auf  $R^2 = 98,18\%$  an (Abb. 4.36 B). Da gleichzeitig Ausreißer entfernt und die Spektren geglättet wurden, ist es nicht feststellbar, welche Aktion das Vorhersage-Ergebnis hauptsächlich beeinflusst hat.

Auch die verwendeten spektralen Bereiche beeinflussen das Ergebnis der Kreuzvalidierung. Aus diesem Grund wird für die letzte Kreuzvalidierung nur einer der beiden Bereiche herangezogen (750–1864 nm). Das Ergebnis der Kreuzvalidierung ist in Abb. 4.36 C gezeigt. Die Korrelation der vorhergesagten zu den experimentellen Konzentrationen ist etwas besser als bei Verwendung beider spektraler Bereiche (Abb. 4.36 A). Dies äußert sich auch im Bestimmtheitsmaß, das hier  $R^2 = 97,15\%$  beträgt und dem Vorhersagefehler von  $RMSEP = 19.89$  mg/dl.

Für die Proben der Serie B ergibt sich ein ganz anderes Bild. Die PLS-Regression wird in zwei spektralen Bereichen (1548–1850 nm und 750–1390 nm) mit 24 geglättete-

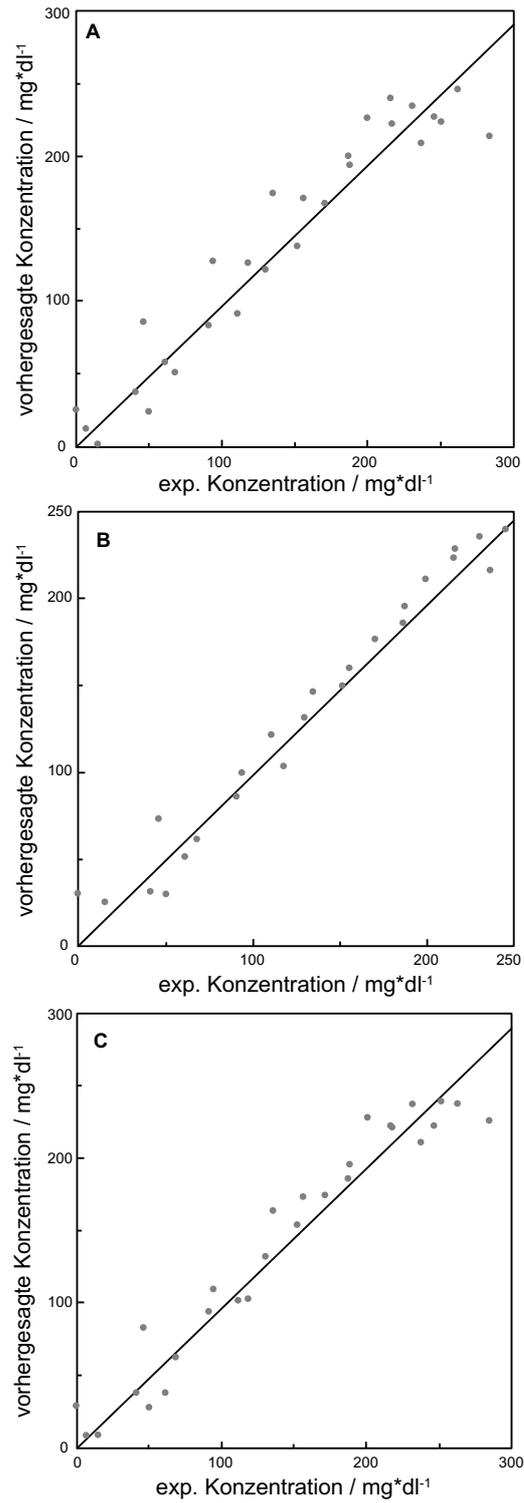


Abb. 4.36: Kreuzvalidierung zwischen 1548–1850 nm und 750–1390 nm **A**: ohne Vorbehandlung (Spektren A0–A28), **B**: glätten (Spektren A0–A24). **C**: Kreuzvalidierung ohne Vorbehandlung zwischen 750–1864 nm (Spektren A0–A28).

ten Spektren mit Konzentrationen von 7 bis 277 mg/dl durchgeführt. Die Kreuzvalidierung der Konzentrationen ist in Abb. 4.37 gezeigt. Im Gegensatz zur A-Serie kann hier keine gute Korrelation zwischen vorhergesagten zu den experimentellen Konzentrationen beobachtet werden. Dies schlägt sich auch im Bestimmtheitsmaß von  $R^2 = 64,89\%$  und dem Vorhersagefehler von  $RMSEP = 62,56$  mg/dl nieder.

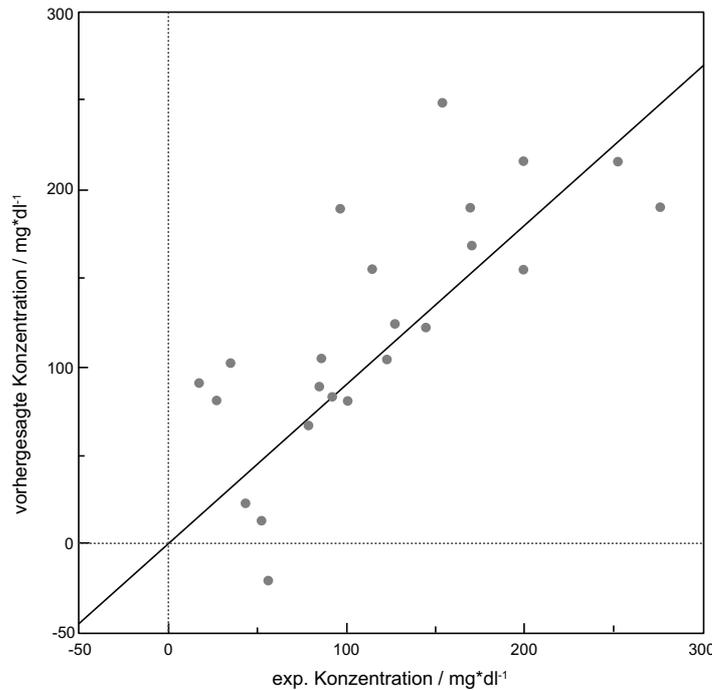


Abb. 4.37: Kreuzvalidierung zwischen 1548–1850 nm und 750–1390 nm mit den geglätteten Spektren der Serie B zwischen 7 und 277 mg/dl.

Die Proben der Serie B wurden als Verdünnungsreihe hergestellt, sie sind also abhängig voneinander. Allerdings sollten von einander abhängige Proben eine bessere Kreuzvalidierung ergeben als von einander unabhängige Proben.

Ein weiterer Unterschied zwischen den beiden Versuchsreihen ist die Reihenfolge der Spektren-Aufnahme. Serie A wurde mit steigender Konzentration vermessen, Serie B dagegen randomisiert, also in einer zufälligen Reihenfolge. Es wäre daher möglich, dass bei Serie A nicht die Glucose, sondern eine Gerätefunktion modelliert wurde. Andererseits entsprechen die mit Serie A gewonnenen Ergebnisse den mit dem Vector22/N-C erhaltenen. Dies legt die Vermutung nahe, dass nicht eine Gerätefunktion modelliert wurde, sondern die Küvette zwischen den einzelnen Mes-

sungen nicht sorgfältig genug gereinigt wurde, so dass die Konzentrationen verfälscht wurden. Da diese Messungen als Test-Messungen bei den jeweiligen Firmen durchgeführt wurden, konnten sie leider nicht wiederholt werden.

Zusammenfassend ergeben die Messungen an den verschiedenen Geräten, dass eine Glucose-Bestimmung im physiologischen Konzentrationsbereich möglich ist. Die Verwendung verschiedener Geräte führt zu einer unterschiedlichen Güte der Glucose-Vorhersage. Die Unterschiede treten jedoch erst bei der statistischen Auswertung hervor. Spektrale Unterschiede sind direkt nicht zu erkennen. Verbesserungen in der Glucose-Vorhersage hängen also stärker von der Art der zur Auswertung herangezogenen Algorithmen und Programme ab als vom verwendeten Spektrometer.

### 4.8.2 Dispersive NIR-Messungen

Der in Kap. 4.3.2 vorgestellte dispersive Aufbau hat bereits bei den ersten *In-vivo*-Messungen sein Potential für die Glucose-Bestimmung gezeigt. In diesem Kapitel sollen nun *In-vitro*-Messungen an diesem Gerät vorgestellt werden. Dazu wird anstelle des *In-vivo*-Aufbaus der ebenfalls in Kap. 4.3.2 vorgestellte lineare Aufbau verwendet.

Es werden Spektren von wässrigen Glucoselösungen mit Konzentrationen zwischen 20 und 350 mg/dl in 10 mg/dl Schritten aufgenommen. Die Daten umfassen einen spektralen Bereich von 6000 bis 10750  $\text{cm}^{-1}$ . Für jedes Spektrum wurden 125 scans mit 8 ms Messzeit akkumuliert, so dass sich eine gesamte Messdauer von 1 s pro Spektrum ergibt. Die Spektren werden als Einkanal-Spektren aufgenommen. Vor der Aufnahme eines Proben-Spektrums wird ein Einkanal-Spektrum ohne Probe als Hintergrund-Spektrum aufgenommen. Aus diesen beiden Spektren wird anschließend ein Absorptions-Spektrum berechnet.

Alle Proben wurden in einer Suprasil Thermo-Küvette (Hellma) mit einer festen Länge von 5 mm aufgenommen. Dies entspricht ca. der doppelten mittleren Weglänge durch die menschliche Vorderkammer. Die Küvette besitzt einen Wasser-gekühlten Mantel, der mit einem Thermostaten verbunden ist. Die Temperatur der Zelle wurde auf 37,0°C ( $\pm 0.1^\circ\text{C}$ ) eingestellt. Neben der Temperatur der Lösung wurde diese vor jeder Messung auch auf Luftblasen untersucht, welche entfernt wurden.

Abb. 4.38 zeigt einige typische 5-mm-Glucose-Spektren, die mit dem dispersiven

Aufbau aufgenommen wurden. Bei  $6900$ ,  $8500$  und  $10200\text{ cm}^{-1}$  sind Banden zu erkennen, welche Wasser zugeordnet werden können.

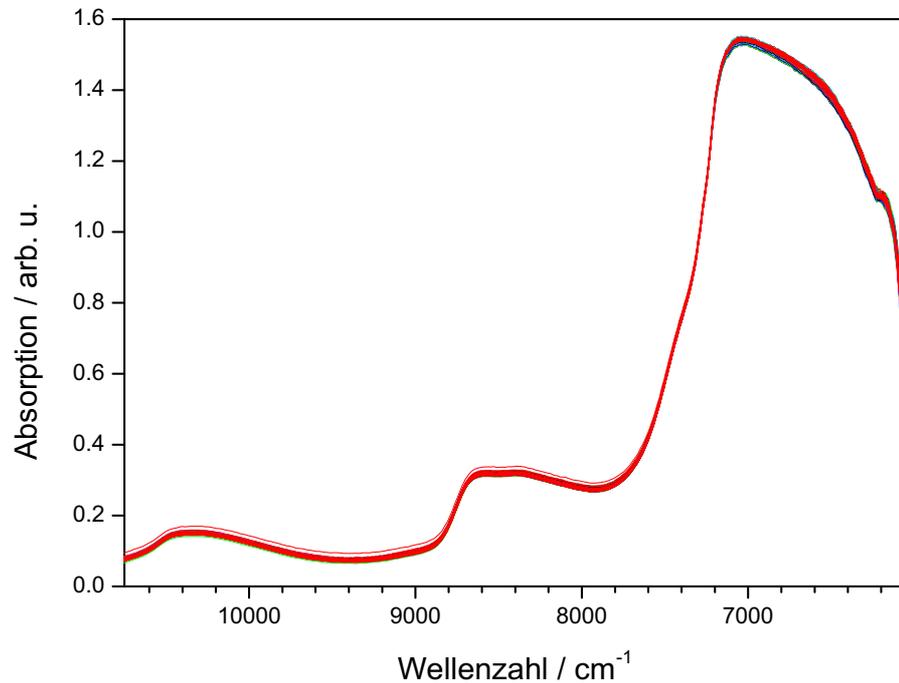


Abb. 4.38: NIR-Absorptions-Spektren von wässrigen Glucoselösungen (dispersiver Aufbau,  $d = 5\text{ mm}$ ,  $8\text{ ms}$ ,  $125$  Akkumulationen).

Für die Kalibrierung wird wie bereits bei den *In-vivo*-Messungen (s. Kap. 4.7.2) der spektrale Bereich von  $7141$  bis  $10510\text{ cm}^{-1}$  herangezogen. Es werden  $34$  Proben mit Glucose-Konzentrationen zwischen  $20$  und  $350\text{ mg/dl}$  an einem Tag in willkürlicher Reihenfolge vermessen. Die Konzentrationen und Namen der einzelnen Proben sind im Anhang B.4 angegeben. Die Auswertung der Daten erfolgt mit dem Programm-Paket QUANT-2 (OPUS, Bruker). Von den  $99$  gemessenen Spektren werden  $25$  als Ausreißer erkannt und aus dem Trainings-Datensatz entfernt. Die restlichen  $74$  Spektren werden einer LOO-Kreuzvalidierung unterworfen.

Das Ergebnis der LOO-Kreuzvalidierung ist als Korrelation der vorhergesagten und experimentellen Konzentration in Abb. 4.39 gezeigt. Das Diagramm weist eine starke Streuung der Werte auf, was sich auch im Vorhersagefehler  $\text{RMSE}_{CV} = 44,6\text{ mg/dl}$  widerspiegelt. Das Bestimmtheitsmaß für dieses Modell liegt bei  $R^2 = 77,42\%$  bei einem optimalen PLS-Rang von  $7$ . Trotz der starken Streuung

kann eine Korrelation der Konzentrationen erkannt werden. Dies äußert sich darin, dass sich die Datenpunkte um die Winkelhalbierende herum anordnen.

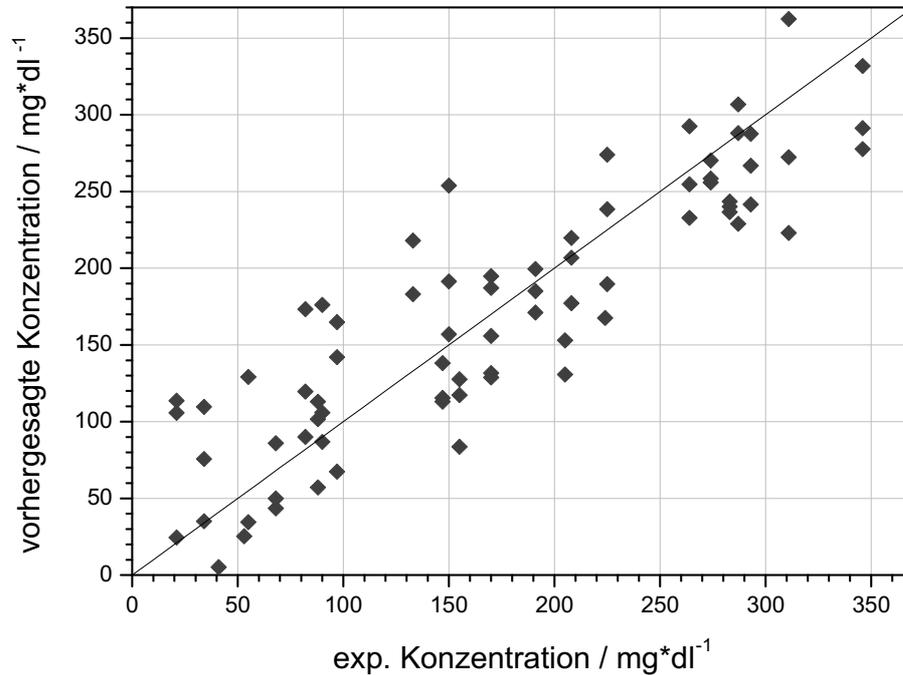


Abb. 4.39: Ergebnis der LOO-Kreuzvalidierung für 74 Spektren mit Glucose-Konzentrationen von  $c = 20\text{--}350$  mg/dl (PLS-1, keine Vorbehandlung, Wellenzahlbereiche:  $7141,1$  bis  $10509,9$   $\text{cm}^{-1}$ ).

Dieses schlechte *In-vitro*-Ergebnis überrascht, vor allem in Hinblick auf das gute Ergebnis für die *In-vivo*-Messungen mit diesem Gerät. Es kommen verschiedene Ursachen für das *In-vitro*-Ergebnis in Frage. Diese liegen wahrscheinlich im Geräte-technischen Bereich, wobei auch die Auswertung einen Einfluss haben kann. Kritische Punkte sind die Temperatur-Stabilisierung des gesamten Gerätes und die verwendete Glasfaser. Der Aufbau setzt sich aus mehreren Komponenten zusammen: Spektrometer, Glasfaser und Probenkammer. Daher besteht die Möglichkeit, dass z.B. die Apparatur nicht optimal justiert ist oder auch dass Temperatur-Unterschiede zwischen den Komponenten vorherrschen. Eine weitere Fehlerquelle liegt in der Beweglichkeit der Faser. Diese ist zwar fixiert, allerdings nicht auf voller Länge. Positiv zu vermerken sind die extrem kurzen Messzeiten mit diesem Gerät, die besonders für *In-vivo*-Messungen wichtig sind. Die bisherigen *In-vivo*- und *In-*

*vitro*-Untersuchungen haben zwar gezeigt, dass eine Glucose-Bestimmung prinzipiell möglich ist, allerdings wurden auch einige Schwachstellen der Methode erkannt. Daher soll nun eine systematische Untersuchung der Mess- und Geräte-Parameter an einem kommerziellen FT-NIR-Spektrometer durchgeführt werden.

## 4.9 *In-vitro*-FT-NIR-Messungen

Das zur Verfügung stehende FT-NIR-Spektrometer (Vector22/N-C, Bruker) ist ein kompaktes, kommerziell erhältliches Gerät. Aus diesem Grunde ist es für eine systematische Untersuchung der Parameter für die Glucose-Bestimmung besonders geeignet, da der systematische, durch das Gerät verursachte Fehler gering sein sollte. Im Folgenden werden die an diesem Gerät erhaltenen Ergebnisse vorgestellt und verschiedene Optimierungs-Strategien aufgezeigt. Desweiteren wird die Temperaturstabilität des Gerätes und der Einfluss der Querempfindlichkeiten untersucht.

Im Vorfeld der *In-vivo*-Glucose-Bestimmung am Auge ist es wichtig, die Parameter für die Kalibrierung zu ermitteln und zu zeigen, dass Glucose-Konzentrationen an dem verwendeten Gerät mit einer ausreichenden Genauigkeit vorhergesagt werden können. Da eine Kalibrierung nicht direkt von einem Gerät auf ein anderes übertragen werden kann, müssen diese Parameter für jedes Gerät neu bestimmt werden. Dazu werden FT-NIR-Absorptions-Spektren von Glucoselösungen aufgenommen und entsprechend ausgewertet.

Die Aufnahme der Spektren erfolgte mit dem Vector22/N-C (Bruker). Die Daten umspannen dabei einen spektralen Bereich von 12500 bis 4000  $\text{cm}^{-1}$  mit einer spektralen Auflösung von 8  $\text{cm}^{-1}$ . Die Interferogramme wurde im Modus *double-sided forward-backward* aufgenommen. Die Proben werden analog zu den Proben für die dispersiven *In-vitro*-Messungen vorbereitet.

Jedes Spektrum wurde mit 100 scans pro Probe mit einer Gesamt-Scan-Zeit von 60s aufgenommen. Jede Probe wurde dreimal vermessen und vor jeder Messung wurde ein neuer Hintergrund, hier ein Leerkanal-Spektrum, aufgenommen. Spektren, eine starke Abweichung von der Mehrheit der Spektren aufwiesen, wurden verworfen.

Die Wahl des Detektors fiel auf den Peltier-gekühlten InGaAs-Detektor. Dieser Detektor weist nicht ganz die Empfindlichkeit des Raman-Detektors auf (s. Abb. 4.4), aber er ermöglicht Messungen auch unterhalb von 6000  $\text{cm}^{-1}$ , ein Be-

reich, in dem verschiedene Glucose-Banden liegen (s. Kap. 4.5.2).

Abb. 4.40 zeigt einige typische 5 mm-Glucose-Spektren. Die Totalabsorption um  $6900\text{ cm}^{-1}$  resultiert von einer Wasser-Bande. Unterhalb von  $5300\text{ cm}^{-1}$  findet aufgrund der hohen Schichtdicke ebenfalls Totalabsorption statt. Für die multivariate Kalibrierung werden diese Bereiche nicht verwendet, sondern nur die beiden Bereiche  $5377,2$  bis  $6542\text{ cm}^{-1}$  und  $7171$  bis  $11001\text{ cm}^{-1}$ . Diese Bereiche wurden so gewählt, dass die maximale Absorption unterhalb von 3 arb. u. liegt und alle spektralen Merkmale enthalten sind.

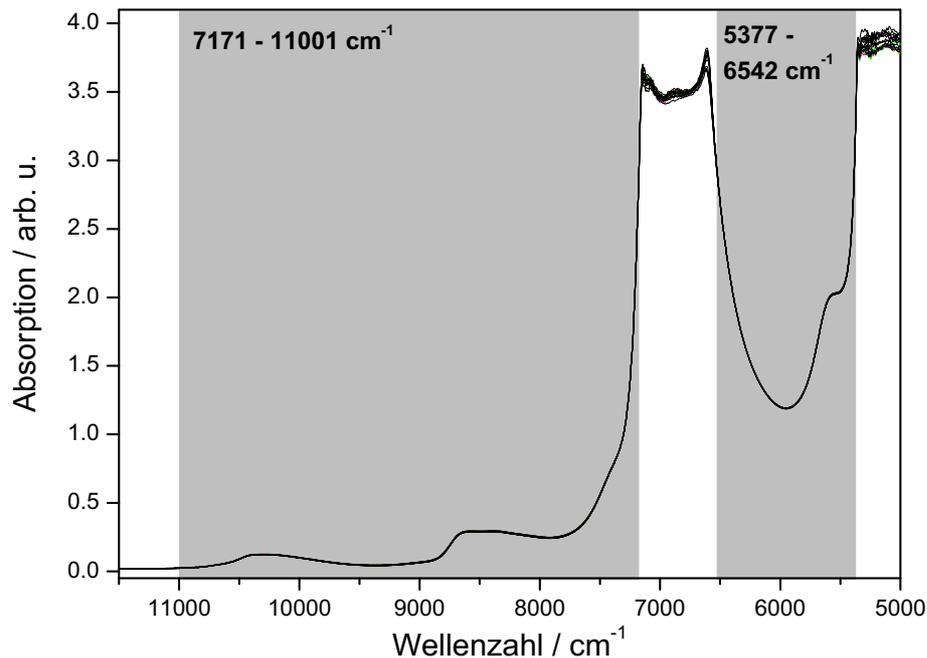


Abb. 4.40: NIR-Absorptions-Spektren von wässrigen Glucoselösungen (Vector22/N-C,  $d = 5\text{ mm}$ , 100 scans,  $8\text{ cm}^{-1}$ , InGaAs-Detektor). Die gekennzeichneten Bereiche werden für die Kalibrierung verwendet.

Für die Kalibrierung wurden zwei Proben-Sätze mit je 35 Proben vermessen. Die Proben-Konzentrationen variierten dabei von 10 bis 350 mg/dl in Schritten von 10 mg/dl. Für eine genaue Aufschlüsselung der Proben-Konzentrationen wird auf den Anhang B.5 verwiesen. Jeder Proben-Satz wurde in einer zufälligen Konzentrations-Folge innerhalb von zwei Tagen vermessen. Die beiden Sätze wurden mit einem Abstand von drei Wochen vermessen.

Die resultierenden 214 Absorptions-Spektren wurden chemometrisch mit dem

Programm-Paket QUANT-2 (OPUS, Bruker) als Test-Set-Validierung und LOO-Kreuzvalidierung analysiert und die Ergebnisse auf ihre medizinische Relevanz hin untersucht. Der Test auf medizinische Relevanz erfolgt, indem die Konzentrations-Korrelations-Diagramme in ein Clarke- bzw. *BD-Error-Grid* [165] eingetragen werden.

Für die Test-Set-Validierung werden die Spektren in einen Trainings-Datensatz, bestehend aus einem Konstruktions- und einem Validier-Datensatz, und einen Test-Datensatz aufgeteilt. Mehrfach-Messungen einer Probe wurden demselben Datensatz zugeordnet. Der Konstruktions-, Validier- und Test-Datensatz besteht zunächst aus jeweils 69 Spektren. Von den 214 Spektren wurden 17 aufgrund starker Basislinien-Verschiebungen als Ausreißer gekennzeichnet und aus den Daten-Sätzen entfernt (s. Anhang B.5).

Der resultierende Konstruktions-Datensatz besteht somit aus 64 Spektren, der Validier-Datensatz aus 67 und das Test-Set aus 66 Spektren. Die PLS-Regression wird als Test-Set-Validierung ohne Vorbehandlung der Daten in den beiden angegebenen spektralen Bereichen durchgeführt.

Das Ergebnis der Test-Set-Validierung ist in Abb. 4.41 als Konzentrations-Korrelation zwischen den experimentellen und den vorhergesagten Konzentrationen dargestellt. Der mittlere Vorhersagefehler liegt bei  $RMSEP_{CV} = 15,7 \text{ mg/dl}$  bei einem Bestimmtheitsmaß von  $R^2 = 97,38 \%$  und einem optimalen PLS-Rang von 11.

Sowohl der niedrige Fehler als auch die gute Korrelation zwischen den experimentellen und vorhergesagten Konzentrations-Werten zeugen von der Güte dieses Modells. Die Korrelation der Konzentrationen ist umso besser, je näher die einzelnen Messungen für eine Konzentration beieinander liegen und je besser sie mit den experimentellen Konzentrationen übereinstimmen also je näher sie an der Winkelhalbierenden liegen. Ideal wäre es, wenn alle Datenpunkte direkt auf der Winkelhalbierenden liegen würden.

Die Übereinstimmung, zwischen experimentellen und vorhergesagten Werten, kann anhand der *Residuen* gezeigt werden. Als *Residuum* wird die Differenz zwischen dem experimentellen und dem vorhergesagten Wert bezeichnet. Die *Residuen* werden in zwei Diagrammen dargestellt, einmal als Funktion der experimentellen Konzentration und einmal als Funktion der Reihenfolge in der die Spektren aufgenommen wurden. Dadurch kann sowohl gezeigt werden, ob der Fehler in allen

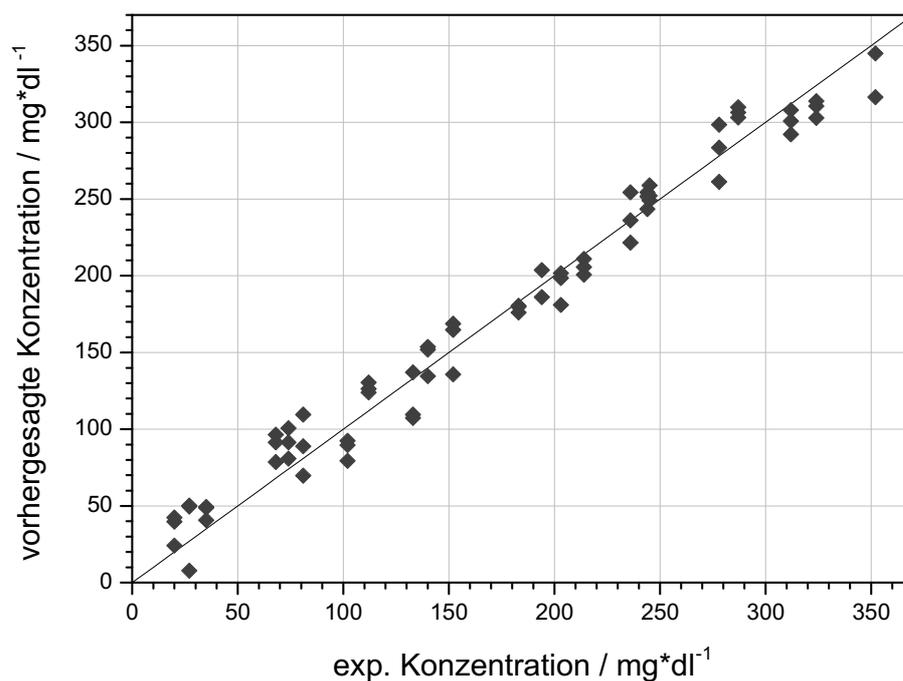


Abb. 4.41: Ergebnis der Test-Set-Validierung für 64 Konstruktions- und 67 Validierungs-Spektren mit Glucose-Konzentrationen  $c = 10\text{--}350\text{ mg/dl}$  (PLS-1, keine Vorbehandlung, Wellenzahl-Bereiche:  $5377\text{--}6542\text{ cm}^{-1}$  und  $7171\text{--}11001\text{ cm}^{-1}$ ).

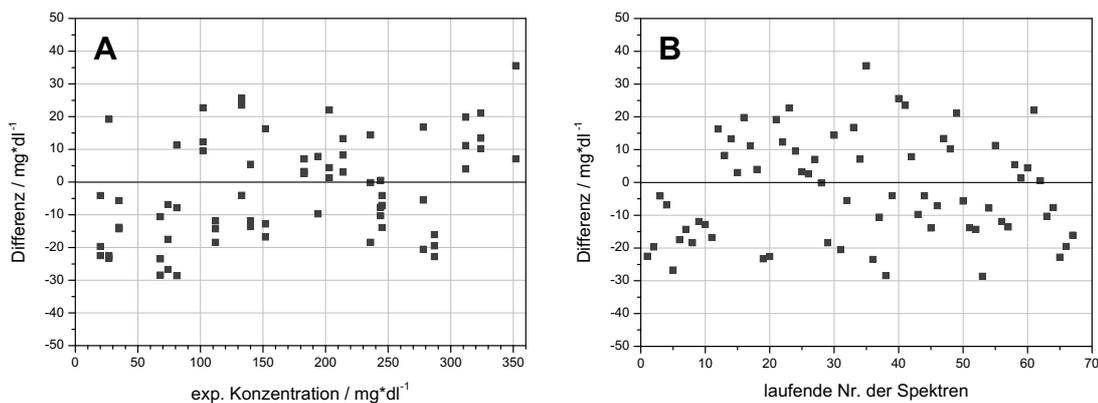


Abb. 4.42: *Residuen* der Test-Set-Validierung: **A** als Funktion der Konzentration, **B**: als Funktion der laufenden Nr. der Spektren (QUANT-2, ohne Vorbehandlung,  $5377\text{--}6542\text{ cm}^{-1}$  und  $7171\text{--}11001\text{ cm}^{-1}$ ).

Konzentrations-Bereichen ähnlich ist, bzw. ob gewisse Bereiche eine bessere Übereinstimmung zeigen, oder ob eine mögliche Geräte-Abhängigkeit vorliegt.

Für die in Abb. 4.41 gezeigte Kalibrierung sind in Abb. 4.42 die *Residuen* aufgetragen. Es zeigt sich, dass die *Residuen* gleichmäßig verteilt sind. Die Vorhersage erfolgt daher für alle Konzentrations-Bereiche mit einem ähnlichem Fehler und die Darstellung gegen die laufende Nr. zeigt, das wahrscheinlich keine Gerätefunktion modelliert worden ist.

Allerdings ist dies nur die Validierung. Wichtiger ist die Fähigkeit des Modells, Proben bzw. Spektren mit unbekanntem Konzentrationen vorherzusagen. In diesem Fall werden dazu die 66 Spektren des Test-Satzes verwendet. Diese Spektren wurden nicht für die Kalibrierung verwendet.

In Abb. 4.43 ist die Vorhersage-Fähigkeit des aufgestellten Kalibrierungs-Modells als Konzentrations-Korrelations-Plot dargestellt. Es ist sofort erkennbar, dass die Abweichung vom Optimum größer ist als für die interne Validierung. Dies gilt auch für den mittleren Fehler den  $RMSEP_{Test} = 17,44 \text{ mg/dl}$ , der analog zum  $RMSEP_{CV}$  ermittelt wird. Ein Blick auf die *Residuen* in Abb. 4.44 zeigt, dass die meisten Werte zu niedrig vorhergesagt werden und deren *Residuen* positiv sind.

Die Tendenz der Vorhersage von zu niedrigen Glucose-Konzentrations-Werten wirft die Frage nach den medizinischen Konsequenzen auf. Eine Möglichkeit, um den Zusammenhang zwischen der Vorhersage und der medizinischen Wirkung darzustellen, ist es, das Ergebnis in ein Clarke oder BD *Error Grid* Diagramm zu plotten. Diese Art der Darstellung ermöglicht eine schnelle Bewertung der medizinischen Wirkung des Modells. Dazu wird ein Streudiagramm erstellt, das in fünf Zonen eingeteilt ist. [166,167] Die fünf Zonen A bis E stellen Bereiche dar, in denen die Glucose-Vorhersage eine bestimmte medizinischer Handlung bedingt. Punkte, die in Zone A fallen, führen zu einer richtigen medizinischen Behandlung, in Zone B zu einer leicht abweichenden Behandlung, die allerdings das klinische Ergebnis gar nicht oder nur wenig ändern. Zone C und D führen zu abweichenden medizinischen Handlungen, die wahrscheinlich das klinische Ergebnis verändern (C) bzw. ein medizinisches Risiko verursachen (D). Datenpunkte in Zone E führen zu falschen Diagnosen mit gefährlichen Konsequenzen. Für eine klinisch korrekte Studie sollten daher alle Datenpunkte in der Zone A liegen. Diese Zonen des Clarke *Error Grids* wurden empirisch durch eine kleine Gruppe von Medizinern ermittelt. Einen etwas

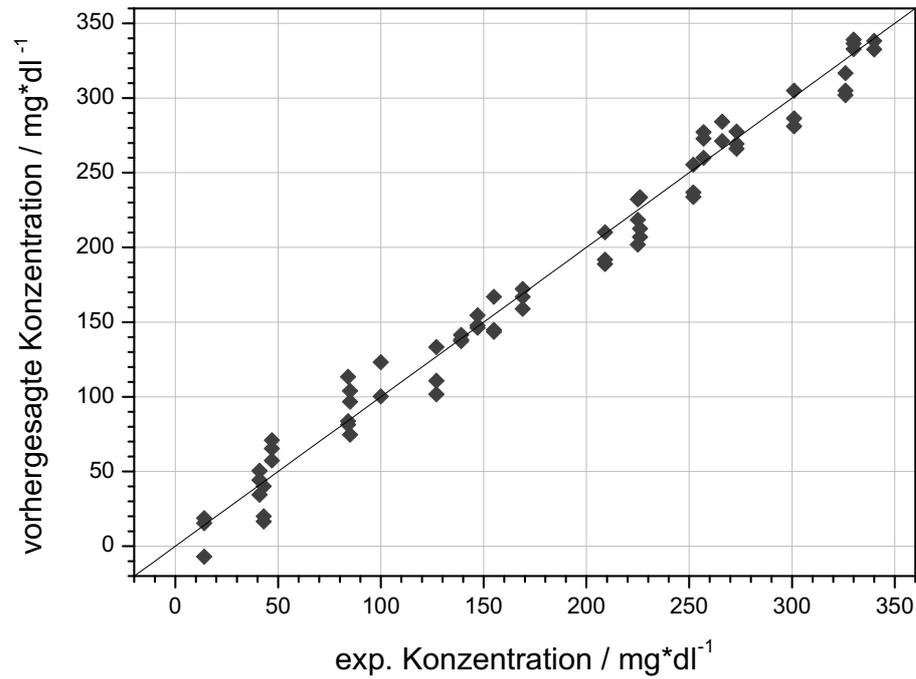


Abb. 4.43: Vorhersage von 66 unabhängigen Spektren des Test-Datensatzes mit dem Modell der Test-Set-Validierung.

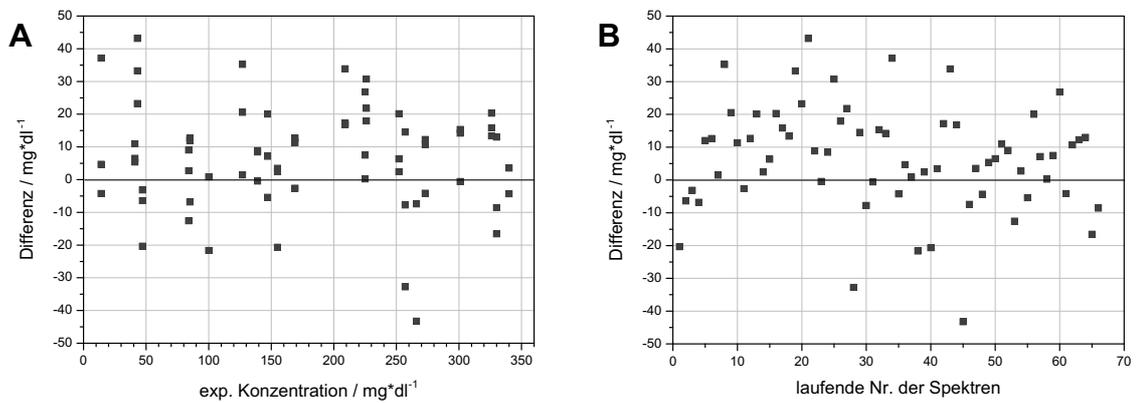


Abb. 4.44: *Residuen* der Vorhersage von dem Modell unbekannter Daten: **A** als Funktion der Konzentration, **B**: als Funktion der laufenden Nr. der Spektren.

umfassenderen Ansatz für ein *Error Grid* wurde von Parkes et al. [167] verfolgt. Sie stellten das sogenannte BD *Error Grid* auf, das aufgrund einer empirischen Studie von 100 Endokrinologen aufgestellt wurde. Dieses *Error Grid* zeigt aufgrund der größeren Statistik eine etwas zuverlässigere Korrelation zwischen den vorhergesagten Glucose-Konzentrationen und der medizinischen Reaktion. Die Risiko-Zonen sind ähnlich definiert wie die des Clarke *Error Grid*.

In Abb. 4.45 A ist ein Clarke *Error-Grid*-Diagramm mit den Ergebnissen der Test-Datensatz-Vorhersage gezeigt. Das Diagramm verifiziert die gute Korrelation der Werte. 61 der 66 Werte liegen in Zone A und nur vier in Zone B und einer in Zone D. Im Vergleich dazu zeigt Abb. 4.45 B das entsprechende BD *Error Grid*. Auch hier fällt der Großteil der Punkte in die Zone A, genauer 63 von 66 Punkten. Die drei übrigen finden sich in Zone B. Beide Diagramme bestätigen die guten Vorhersagequalität des aufgestellten Modells. Die Diagramme wurden mit dem Makro BD ERROR GRID.XLS [165] erstellt.

Trotz der Tendenz des Modells, die Konzentrationen unbekannter Proben zu niedrig vorherzusagen, zeigt das Modell eine ausreichende Genauigkeit, die zu keinen medizinischen Konsequenzen führen würde.

Anstelle einer Test-Set-Validierung kann auch eine LOO-Kreuzvalidierung durchgeführt werden. Die Aufteilung der Spektren wird für das kreuzvalidierte Modell beibehalten, nur wird der Trainings-Datensatz nicht aufgeteilt, sondern komplett für die LOO-Kreuzvalidierung verwendet. Die Kreuzvalidierung wird mit dem Programm-Paket QUANT (OPUS, Bruker) berechnet.

In Abb. 4.46 ist die Korrelation zwischen den experimentellen und vorhergesagten Glucose-Konzentrationen für die LOO-CV dargestellt und zeigt eine gute Korrelation der Werte. Die zur Berechnung herangezogenen spektralen Bereiche sind wieder 5377 bis 6542  $\text{cm}^{-1}$  und 7171 bis 11001  $\text{cm}^{-1}$ . Der optimale PLS-Rang wie auch bei der Test-Set-Validierung 11, der Vorhersagefehler ist mit  $\text{RMSEP}_{CV} = 14,4 \text{ mg/dl}$  etwas geringer und das Bestimmtheitsmaß mit  $R^2 = 97,87\%$  etwas höher.

Abb. 4.47 zeigt die *Residuen* als Funktion der experimentellen Konzentration bzw. der laufenden Nummer der Spektren. Diese Diagramme ähneln denen für die Test-Set-Validierung und zeigen keine auffälligen Tendenzen. Da hier fast die doppelte Anzahl an Spektren zur Modell-Bildung herangezogen wurde, ist es möglich, dass die leichte Verbesserung der Werte dadurch zu erklären ist. Die beiden Modelle stellen

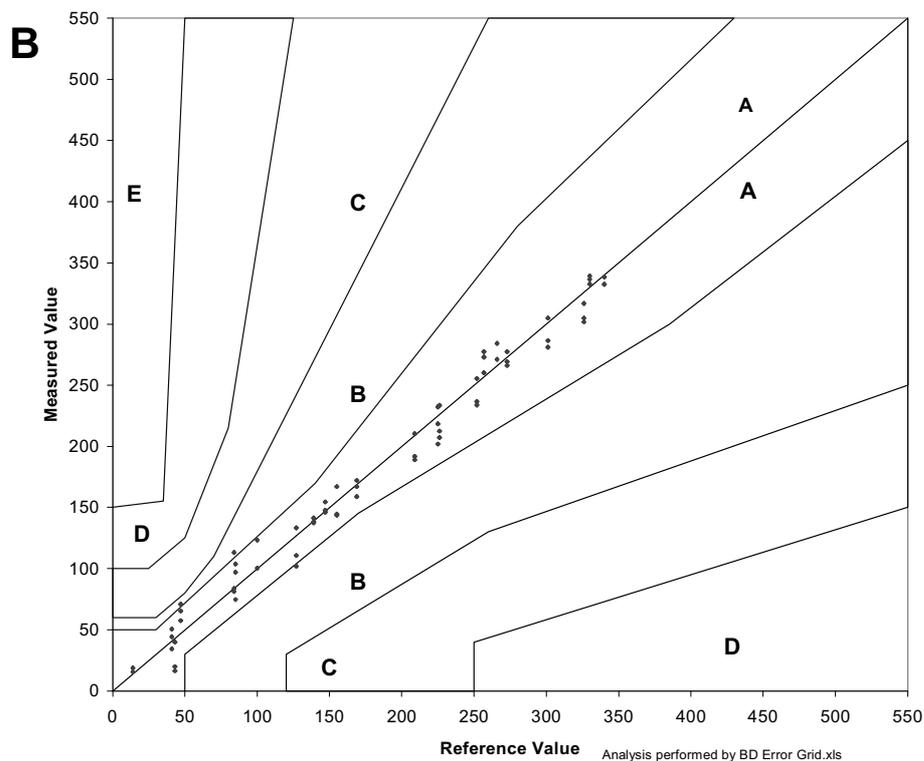
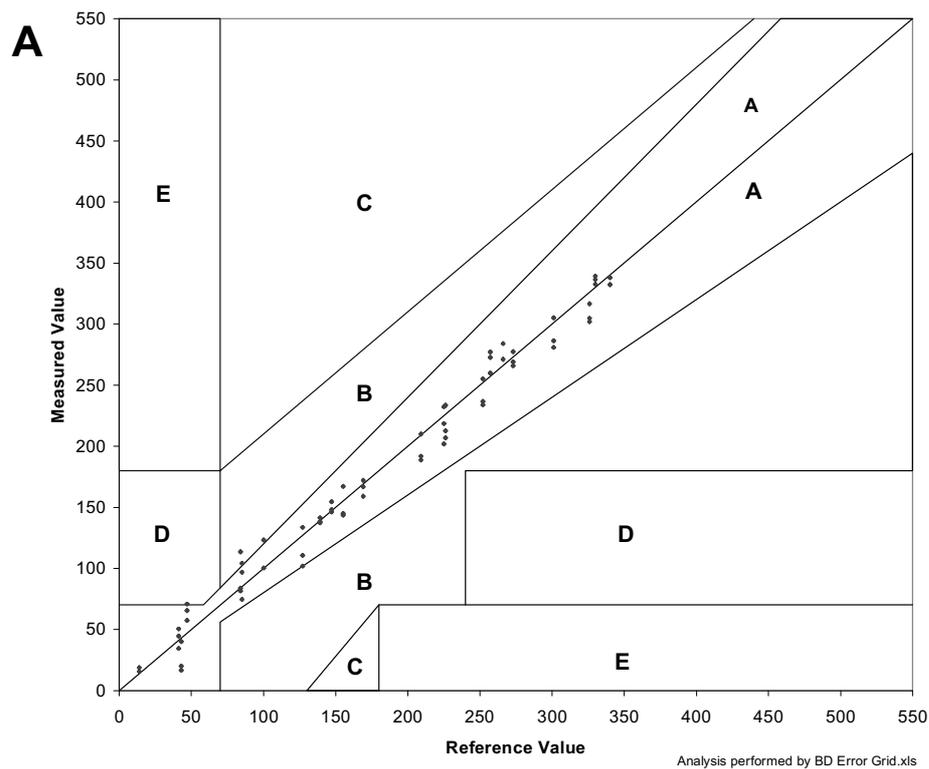


Abb. 4.45: Vorhersage von 66 unabhängigen Spektren des Test-Datensatzes mit dem Modell der Test-Set-Validierung. **A:** Clarke *Error Grid*, **B:** BD *Error Grid*.

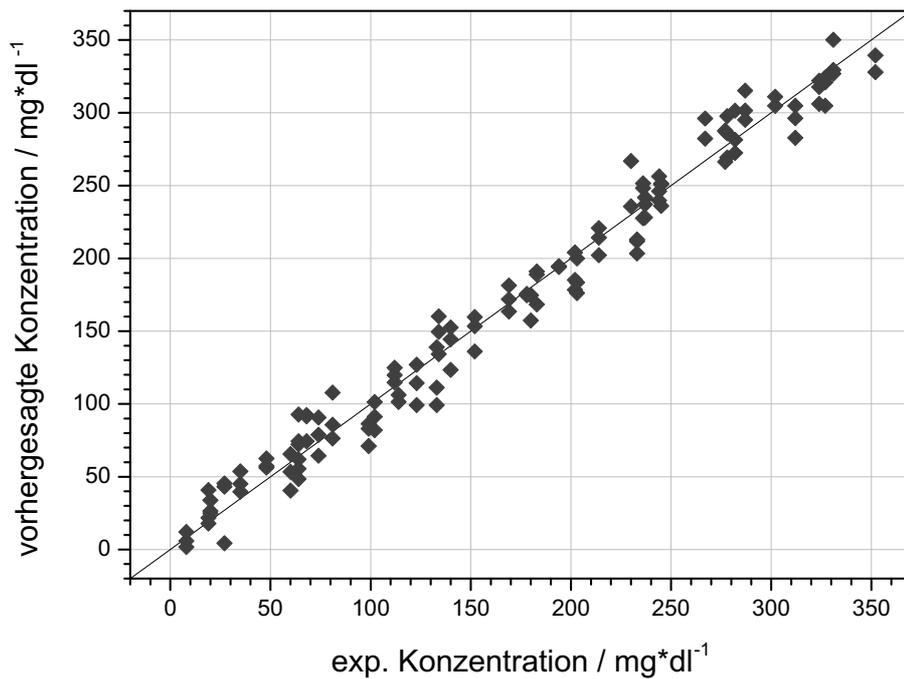


Abb. 4.46: Ergebnis der LOO-Kreuzvalidierung für 131 Spektren mit Glucose-Konzentrationen  $c = 10\text{--}350\text{ mg/dl}$  (PLS-1, keine Vorbehandlung, Wellenzahl-Bereiche:  $5377\text{--}6542\text{ cm}^{-1}$  und  $7171\text{--}11001\text{ cm}^{-1}$ ).

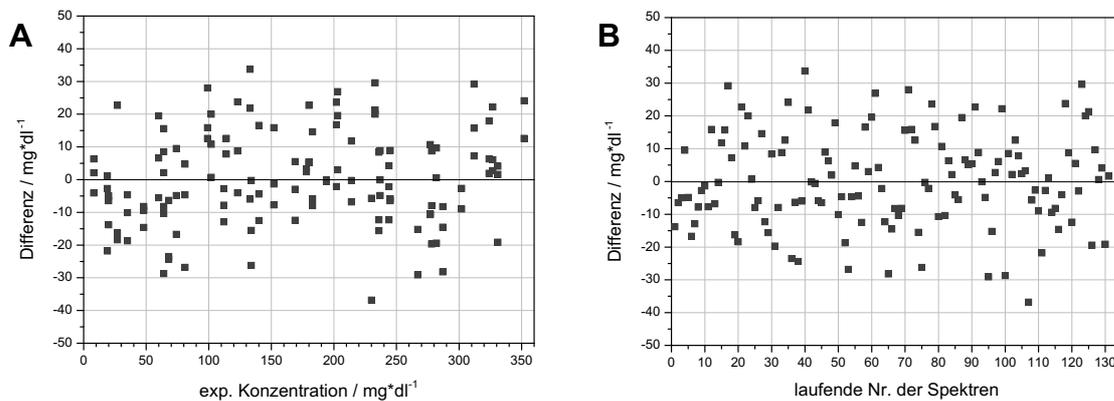


Abb. 4.47: *Residuen* der LOO-Kreuzvalidierung: **A** als Funktion der Konzentration, **B**: als Funktion der laufenden Nr. der Spektren (QUANT-2, ohne Vorbehandlung,  $55377\text{--}6542\text{ cm}^{-1}$  und  $7171\text{--}11001\text{ cm}^{-1}$ ).

sich hier als fast gleichwertig dar.

Entscheidend ist daher die Fähigkeit der Modelle unbekannte Proben vorherzusagen. Dazu wurde der Test-Datensatz mit 66 Spektren herangezogen. Das LOO-kreuzvalidierte Modell erreicht bei der Vorhersage dieser Spektren einen Vorhersagefehler von  $\text{RMSEP}_{\text{Test}} = 15,41 \text{ mg/dl}$  und zeigt damit eine bessere Leistung als das Test-Set-Modell ( $\text{RMSEP}_{\text{Test}} = 17,44 \text{ mg/dl}$ ). Die zugehörige Konzentrations-Korrelation ist in Abb. 4.48 gezeigt. Sie zeigt eine Korrelation der vorhergesagten mit den experimentellen Konzentrationen.

Die *Residuen* (s. Abb. 4.49) zeigen wie auch bei der Test-Set-Validierung die Tendenz des kreuzvalidierten Modells, unbekannte Konzentrationen zu niedrig vorherzusagen. Dies zeigt sich in beiden Darstellungen.

Auch die Darstellung als *Error Grid* Diagramm bestätigt die Leistung des Modells. Sowohl ein Clarke- als auch ein *BD-Error-Grid*-Diagramm sind in Abb. 4.50 gezeigt, beide sind mit dem Makro *BD ERROR GRID.XLS* [165] erstellt worden.

Beide *Error-Grid*-Diagramme für die vorhergesagten Werte der Kreuzvalidierung zeigen dieselbe Verteilung der Datenpunkte. Bei beiden Diagrammen liegt nur ein Datenpunkt in Zone B, alle anderen in Zone A. Der Vorhersagefehler für unbekannte Proben ist für die LOO-Kreuzvalidierung etwas schlechter als für die Test-Set-Validierung, allerdings zeigt das LOO-CV-Modell eine höhere Genauigkeit bei der Korrelation mit der medizinischen Reaktion auf das Ergebnis.

Daraus kann gefolgert werden, dass auch die medizinische Reaktion auf die vorhergesagten Werte zu berücksichtigen ist. Die geforderte Genauigkeit von 10 mg/dl konnte mit diesen Modellen für *In-vitro*-Messungen noch nicht erreicht werden. Daher werden nun zwei Strategien zur Verbesserung der Ergebnisse verfolgt. Einerseits wird versucht, die Auswertung durch die Verwendung verschiedener Vorbehandlungen und einer Wellenzahl-Selektion zu optimieren, andererseits wird das Gerät selbst auf seine Temperaturabhängigkeit untersucht. Die Auswertung wird in Zusammenarbeit mit Dr. K. Baumann (Institut für Pharmazie, Universität Würzburg) optimiert.

### 4.9.1 Vorbehandlungen

Zunächst soll die Verwendung verschiedener Vorbehandlungen auf die Ergebnisse der Kalibrierung untersucht und wenn möglich bereits für die Auswertung relevan-

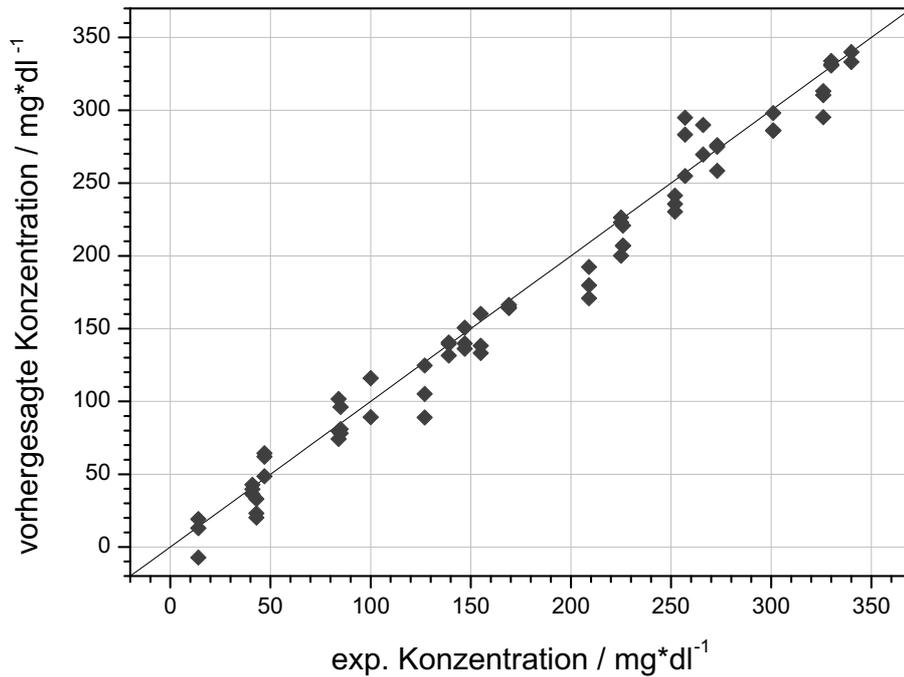


Abb. 4.48: Vorhersage von 66 unabhängigen Spektren des Test-Datensatzes mit dem Modell der Kreuzvalidierung.

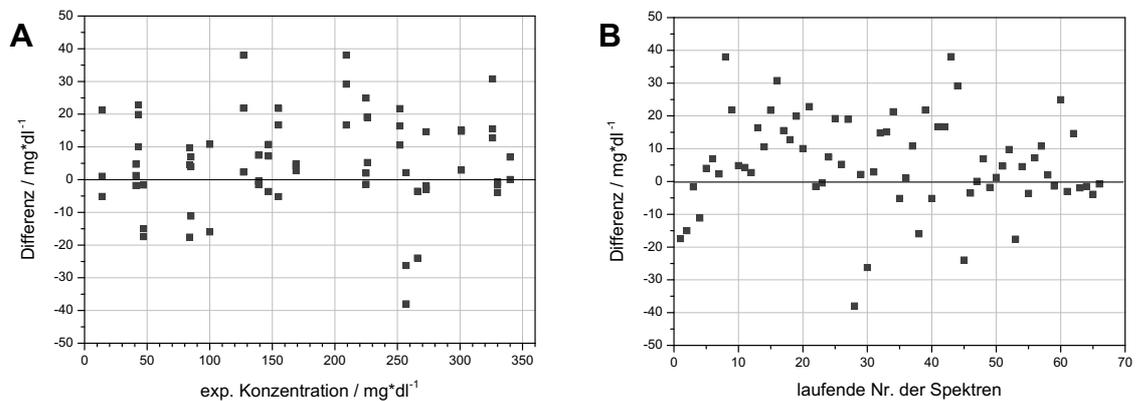


Abb. 4.49: *Residuen* der Vorhersage von dem Modell unbekannter Daten: **A** als Funktion der Konzentration, **B**: als Funktion der laufenden Nr. der Spektren.

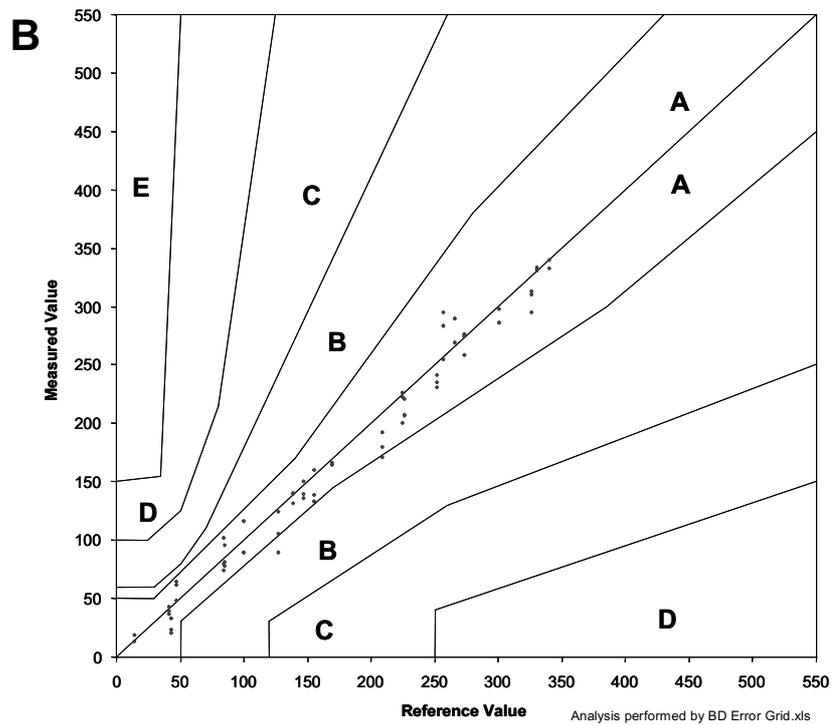
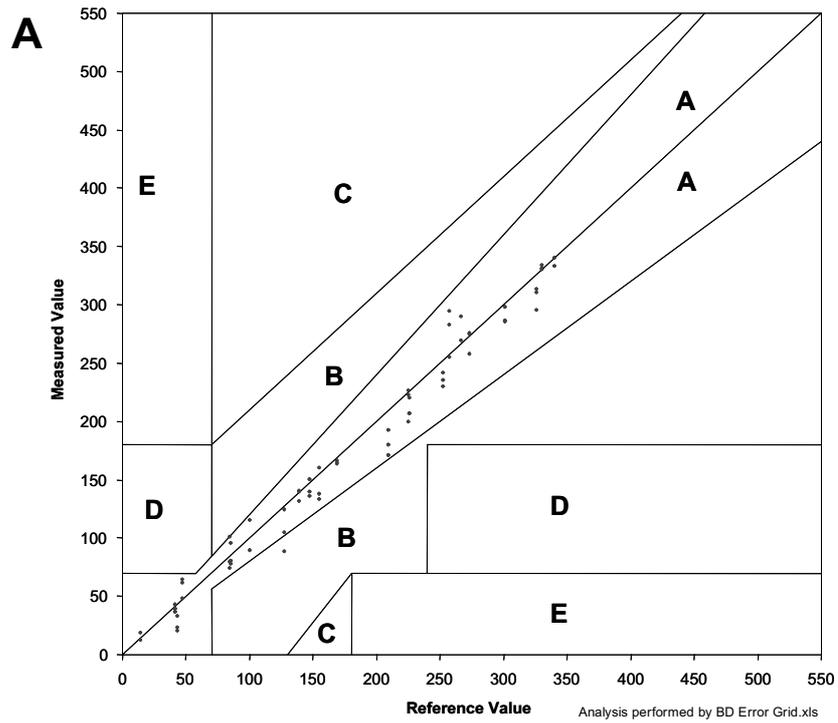


Abb. 4.50: Vorhersage von 66 unabhängigen Spektren des Test-Datensatzes mit dem Modell der Kreuzvalidierung. **A:** Clarke *Error Grid*, **B:** BD *Error Grid*.

te Bereiche identifiziert werden. Im Folgenden werden die 105 Spektren des ersten Proben-Satzes (s. Anhang B.5), die auch für die *In-vitro*-FT-NIR-Auswertung verwendet wurden, verschiedenen Vorbehandlungen unterworfen und der Einfluss der Vorbehandlungen auf das Ergebnis gezeigt.

Typische NIR-Glucose-Spektren mit einer Schichtdicke von 5 mm wurden bereits in Abb. 4.40 dargestellt. Für die Anwendung der Vorbehandlungen wird zunächst die Wasser-Bande um  $6900\text{ cm}^{-1}$  aus den Spektren herausgeschnitten ( $6538\text{--}7171\text{ cm}^{-1}$ ). Werden diese Rohdaten dann kolonnenweise zentriert, so spaltet sich die Spektren-Schar in zwei Blöcke auf (Abb. 4.51 A). Diese zwei Blöcke korrespondieren mit den zwei Tagen, an denen die Messungen durchgeführt wurden. Es zeigt sich also eine tatsächliche Tages-Abhängigkeit der Spektren.

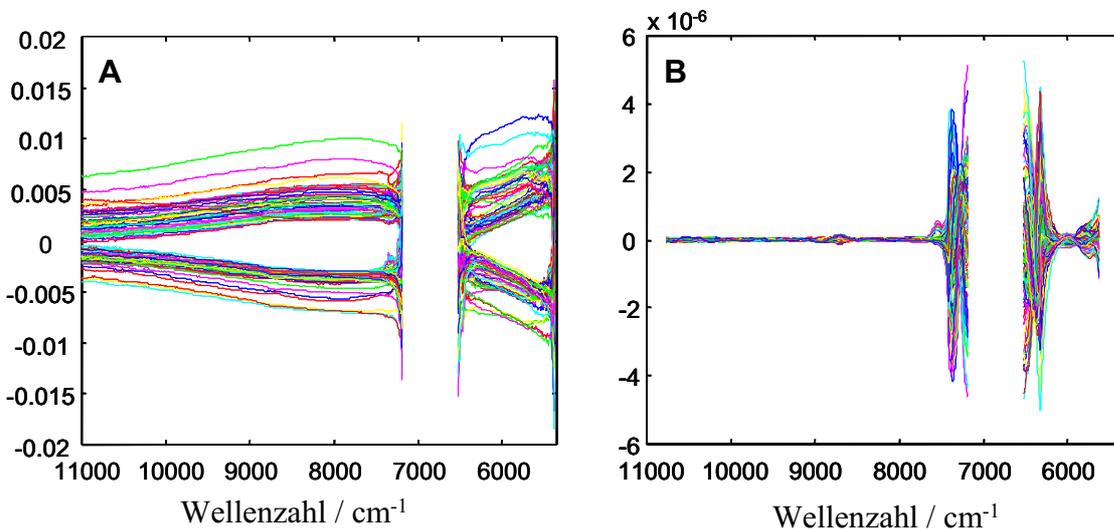


Abb. 4.51: **A**: Kolonnenweise zentrierte Rohdaten. **B**: 2. Ableitung (quadratisch, 61 Pkt.). Die Wasser-Bande um  $6900\text{ cm}^{-1}$  wurde herausgeschnitten (105 Spektren, Vector22/N-C,  $d = 5\text{ mm}$ ,  $100\text{ scans}$ ,  $8\text{ cm}^{-1}$ , InGaAs-Detektor).

Wird die 2. Ableitung (quadr., 61 Pkt.) der zentrierten Daten gebildet, so verschwinden die Basislinien-Verschiebungen. Spektrale Variationen weisen die Spektren nur noch in definierten Bereichen auf. Dazu zählt der Wellenzahl-Bereich unterhalb von  $6500\text{ cm}^{-1}$ , in dem bereits Glucose-Banden identifiziert werden konnten (s. Kap. 4.5.2). Weitere spektrale Variationen liegen um  $7200\text{ cm}^{-1}$  und  $8900\text{ cm}^{-1}$ , die beide Flanken der Wasser-Banden entsprechen. Es wäre daher möglich, dass hier

Modifikationen der Wasser-Matrix für die Hervorhebung dieser Wellenzahl-Bereiche verantwortlich sind.

Die Auswirkungen auf den Vorhersagefehler von unabhängigen Test-Spektren ist in einem Blockdiagramm in Abb. 4.52 dargestellt. Als Vorbehandlungen wurden keine Vorbehandlung, MSC, SNV und die 2. Ableitung verwendet. Die 105 Spektren wurden dafür in einen Training-Datensatz mit 69 Spektren und einen Test-Datensatz mit 36 Spektren aufgeteilt. Zwei Spektren wurden als Ausreißer identifiziert, so dass insgesamt 103 Spektren ausgewertet wurden. Die Modell-Bildung erfolgte mit einer *leave-12-out*-Kreuzvalidierung als PLS-Regression.

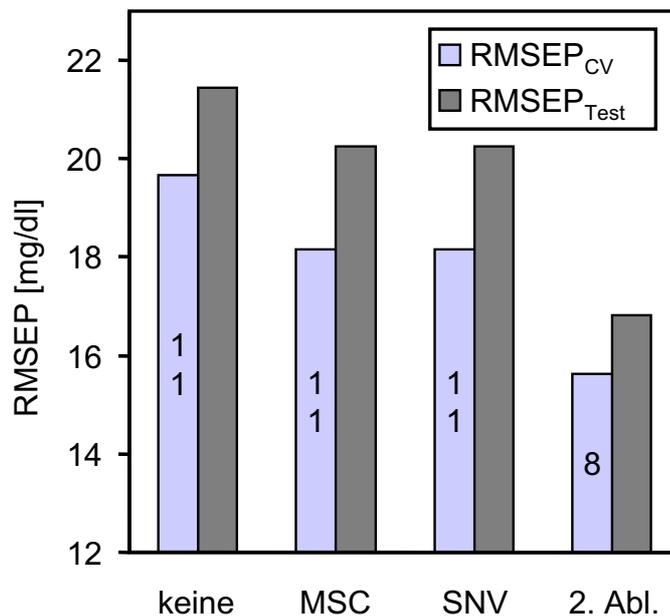


Abb. 4.52: Vergleich der Vorhersagefehler für eine LMO-Kreuzvalidierung von 103 Spektren mit verschiedenen Vorbehandlungen der Spektren. Angegeben sind der  $RMSEP_{CV}$ , der  $RMSEP_{Test}$  und der verwendete PLS-Rang.

Die Art der Vorbehandlung hat sowohl Einfluss auf den  $RMSEP_{CV}$  und damit auf den  $RMSEP_{Test}$  als auch auf den PLS-Rang. Den höchsten Fehler ergibt die Auswertung der Rohdaten ( $RMSEP_{CV} = 19,7$  mg/dl,  $RMSEP_{Test} = 21,5$  mg/dl, Rang 11). Die MSC und SNV zeigen eine etwas bessere Leistung, wobei die beiden Methoden vergleichbare Ergebnisse hervorbringen mit einem  $RMSEP_{CV} = 18,2$  mg/dl und  $RMSEP_{Test} = 20,2$  mg/dl bei Rang 11 für die MSC bzw. SNV. Das beste Ergebnis zeigt die 2. Ableitung. Die Vorhersagefehler wie auch der verwendete

Rang werden hier stark reduziert. Dies führt zu einem  $RMSEP_{CV} = 15,6$  mg/dl,  $RMSEP_{Test} = 16,8$  mg/dl bei Rang 8. Die Reduzierung des PLS-Ranges weist darauf hin, dass diese Art der Vorbehandlung die durch die zwei Messtage bedingte Drift der Spektren vermindert hat und daher weniger PLS-Faktoren für die Modellbildung ausreichen.

Die 2. Ableitung ermöglicht somit die Auswahl Glucose-relevanter Bereiche und führt zu einem optimierten Ergebnis. Hier wurde die 2. Ableitung nicht für die gesamte spektrale Matrix berechnet, sondern nur in dem bereits reduzierten Wellenzahl-Bereich. Das hat zur Folge, dass die 2. Ableitung der linken Flanke der Wasser-Bande von der rechten beeinflusst wird und umgekehrt. Bei der Berechnung mit der kompletten Matrix wären die Flanken vom Rauschen im Peakmaximum bestimmt gewesen. Die Verwendung der kompletten Matrix führt zu wesentlich schlechteren Ergebnissen ( $RMSEP_{CV} = 37$  mg/dl,  $RMSEP_{Test} = 33$  mg/dl).

Eine Berechnung der 2. Ableitung unter Auslassung des Bereiches der Wasser-Bande kann z. B. mit einem *Initial Point Filter* [168, 169] oder lokalen Polynomen [170] durchgeführt werden und sollte ebenfalls zu einer Reduzierung des spektralen Rauschens und damit des Vorhersagefehlers führen. Diese Methoden zeigen ein gewisses Optimierungspotential für künftige Arbeiten auf.

### 4.9.2 Wellenzahl-Selektion

Eine Möglichkeit, die für die Kalibrierung verwendeten Variablen zu reduzieren, ist die in Kap. 4.6.4 vorgestellte Methode der Wellenzahl-Selektion. Dazu werden die gleichen Spektren wie im vorangegangenen Kap. 4.9.1. Die Wellenzahl-Selektion wird basierend auf allen 103 Spektren des ersten Proben-Satzes (s. Anhang B.5) mit einer *leave-75-out*-Kreuzvalidierung und Hauptkomponenten-Regression (PCR) vorgenommen. Für die LMO-Kreuzvalidierung der 103 Spektren ergibt sich ein Bestimmtheitsmaß von  $R_{CV}^2 = 98,4\%$  und ein Vorhersagefehler von  $RMSEP_{CV} = 12,4$  mg/dl. Damit weist die LMO-Kreuzvalidierung bessere Ergebnisse auf als die vorangegangene LOO-Kreuzvalidierung ( $RMSEP_{CV} = 14,4$  mg/dl) bzw. Test-Set-Validierung ( $RMSEP_{TS} = 15,7$  mg/dl). Das Ergebnis der Wellenzahl-Selektion ist grafisch in Abb. 4.53 dargestellt.

Die vertikalen Linien bezeichnen die selektierten Wellenzahlen. Diese Wellenzahlen

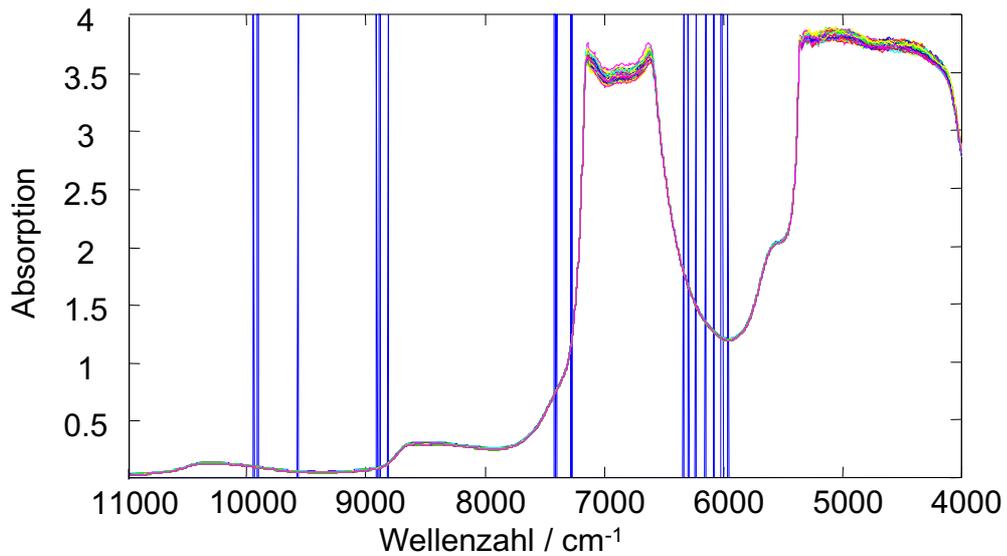


Abb. 4.53: Ergebnis der Wellenzahl-Selektion für 103 Spektren. Die vertikalen Linien bezeichnen die selektierten Wellenzahlen.

sollten besonders relevant für die Glucose-Vorhersage sein. Die selektierten Wellenzahlen liegen um 6000, 7400, 8900, 9600 und 9900  $\text{cm}^{-1}$ . Im Bereich um 6000  $\text{cm}^{-1}$  konnten Glucose-Banden identifiziert werden (s. Kap. 4.5.2), ebenso um 8900  $\text{cm}^{-1}$ . Die selektierten Bereiche oberhalb von 9000  $\text{cm}^{-1}$  konnten bisher nicht Glucose zugeordnet werden. Allerdings liegen die selektierten Wellenzahlen in den Flanken der Wasser-Banden. Es wäre daher möglich, dass hier Modifikationen der Wasser-Matrix für die Hervorhebung dieser Wellenzahlen verantwortlich sind.

Werden nur die selektierten Wellenlängen zur Modellbildung herangezogen, so verbessert sich der Vorhersagefehler für eine unabhängige Testdaten-Vorhersage mit 68 Spektren im Trainings-Datensatz und 35 im Test-Datensatz. Der Vorhersagefehler beträgt nun  $\text{RMSEP}_{\text{Test}} = 10,3 \text{ mg/dl}$  bei einem Bestimmtheitsmaß von  $R^2_{\text{Test}} = 98,9\%$ . Der medizinisch geforderte Fehler von 10 mg/dl wird nahezu erreicht.

Die Selektion basiert jedoch auf allen 103 Spektren, d. h. auf dem gesamten Datensatz, womit die Selektion nicht unabhängig von den Testdaten ist. Lediglich in der anschließenden Testdaten-Vorhersage wurde der Datensatz in Trainings- und Testdaten geteilt.

Eine akkurate Wellenzahl-Selektion sollte hingegen nur mittels der Spektren des Trainings-Satzes durchgeführt werden, was hier nicht gemacht wurde. Die einge-

schlagene Strategie zeigt jedoch, dass die Spektren die Information enthalten, die für die medizinisch geforderte Präzision nötig ist. Allerdings gelang es bislang noch nicht, diese Selektion vollautomatisch nur mit dem kleineren Trainings-Datensatz zu erhalten. Verbesserungen in den statistischen Zielfunktionen, die die Variablen-Selektion steuern, sind hierzu nötig.

Abb. 4.54 zeigt die bisher beste Auswahl für den kleinen Datensatz. Allerdings wurde das Modell nicht vollautomatisch gefunden, sondern benötigte eine nachträgliche manuelle Inspektion der Daten. Dadurch wurden selektierte Wellenzahlen in Bereichen mit Totalabsorption eliminiert.

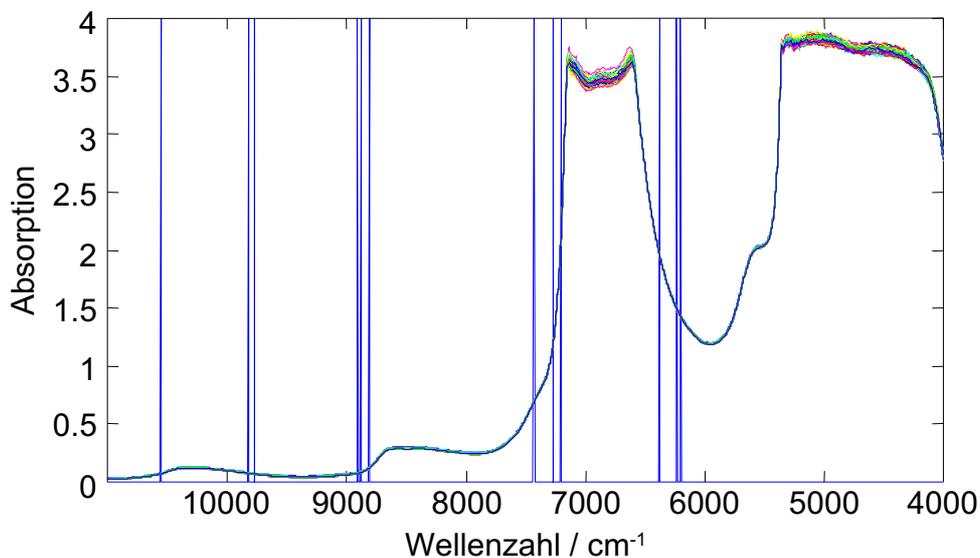


Abb. 4.54: Ergebnis der Wellenzahl-Selektion für 68 Spektren. Die vertikalen Linien bezeichnen die selektierten Wellenzahlen.

Die selektierten Wellenzahlen liegen um 6100, 7200, 8900, 9800 und 10600  $\text{cm}^{-1}$ . Im Bereich um 10600  $\text{cm}^{-1}$  konnten bereits Glucose-Banden identifiziert werden (s. Kap. 4.5.2), die anderen Bereiche stimmen mit den zuvor bestimmten überein. Die Wellenzahl-Selektion basiert auf 68 Spektren und wurde mit einer *leave-45-out*-Kreuzvalidierung und PCR-Regression ermittelt. Das Ergebnis der *leave-45-out*-Kreuzvalidierung für 68 Trainings-Spektren liegt bei einem Vorhersagefehler von  $\text{RMSEP}_{CV} = 15,6 \text{ mg/dl}$  und einem Bestimmtheitsmaß von  $R_{CV}^2 = 97,7\%$  und stellen eine Verbesserung im Vergleich zu den aus den Rohdaten ermittelten Ergebnis dar (s. Kap. 4.9.1).

Werden nun die selektierten Wellenzahlen zur Testdaten-Vorhersage der 35 vom Trainings-Datensatz unabhängigen Spektren verwendet, so resultiert dies in einem Vorhersage-Fehler von  $RMSEP_{Test} = 13,6 \text{ mg/dl}$  und einem Bestimmtheitsmaß von  $R^2_{Test} = 98,1 \%$ .

Aus diesen Ergebnissen kann gefolgert werden, dass die Daten zumindest das Potential für einen RMSEP von 10 bis 12 mg/dl haben. Allerdings besteht noch ein Optimierungs-Potential, das die genaue Auswahl der einzelnen Wellenzahlen betrifft. Bevorzugte Bereiche für die Vorhersage der Glucose-Konzentration lassen sich hingegen bei beiden Abbildungen klar ablesen.

### 4.9.3 Reproduzierbarkeit der Ergebnisse

Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse hängt nicht nur von den Geräte-Parametern ab, auch der Anwender kann die Reproduzierbarkeit beeinflussen. Aus diesem Grund wird die Reproduzierbarkeit der Messungen in Abhängigkeit des Operators untersucht. Dazu werden von zwei Personen (A und B) jeweils drei Messreihen mit einer Schichtdicke von 5 mm an drei nicht aufeinander folgenden Tagen aufgenommen und ausgewertet. Jede Messreihe besteht aus 15 wässrigen Glucoselösungen mit Konzentrationen zwischen 20 und 300 mg/dl in 20 mg/dl-Schritten und einer Wasser-Probe. Jede der Lösungen ist mit 0,05 %  $\text{NaN}_3$  zur Konservierung versetzt und wird mit Reinst-Wasser aufgefüllt. Die Lösungen werden sowohl vor als auch während der Messung auf  $37,0^\circ\text{C}$  temperiert und mit zunehmender Konzentration am NIR-FT-Spektrometer Vector22/N-C vermessen. Jede Probe wird dreimal in Folge vermessen (Parameter: Vector22/N-C, 100 scans,  $d = 5 \text{ mm}$ ,  $8 \text{ cm}^{-1}$ ). Augenscheinlich fehlerhafte Messungen werden wiederholt, so dass pro Probe drei charakteristische Spektren gemessen werden. Die Konzentrationen der verwendeten Glucoselösungen sind im Anhang B.6 angegeben.

Zur Auswertung der Spektren wird das Programmpaket QUANT-2 (OPUS, Bruker) verwendet. Als Vergleichswerte dienen der Vorhersagefehler  $RMSEP_{CV}$ , das Bestimmtheitsmaß  $R^2$  und der durch das Programm vorgeschlagene, optimale PLS-Rang. Dazu werden *leave-one-out*-Kreuzvalidierungen in zwei spektralen Bereichen von 5377 bis  $6542 \text{ cm}^{-1}$  und 7171 bis  $11001 \text{ cm}^{-1}$  durchgeführt. Für die Validierung werden je drei Spektren pro Probe verwendet. Die Spektren der Proben Nr. 500g

ebenso wie die Spektren 453n\_02, 462g\_02, 470g\_03 und 535g\_01 werden als Ausreißer identifiziert und nicht zur Berechnung herangezogen.

Werden die Spektren aller sechs Messtage mit Ausnahme der Ausreißer ohne Vorbehandlung für die PLS-Regression verwendet, so ergibt sich für die Kreuzvalidierung das in Abb. 4.55 dargestellte Verhältnis zwischen vorhergesagten und realen Konzentrationen.

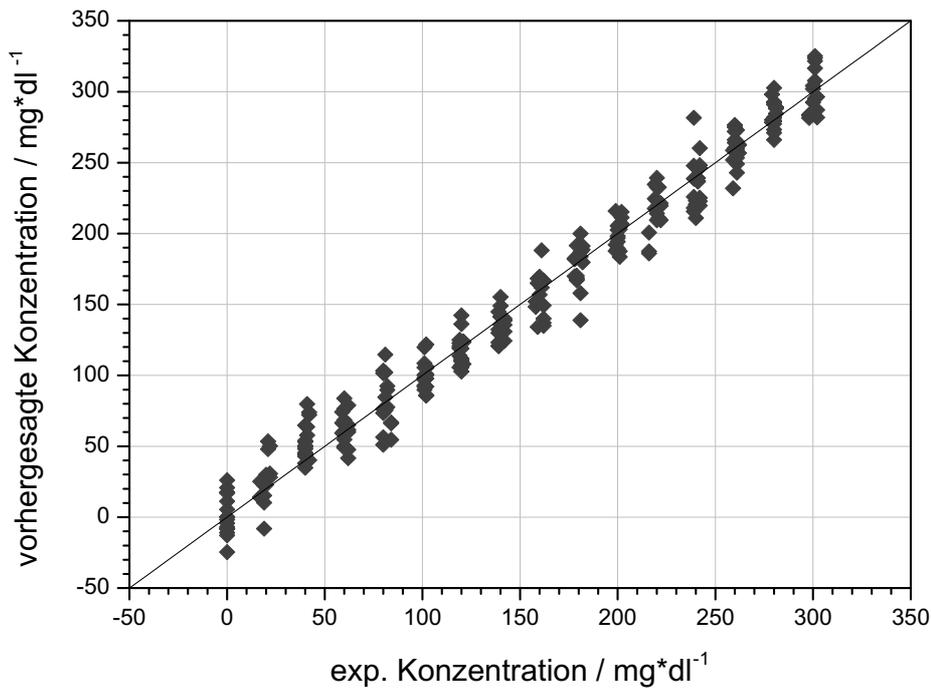


Abb. 4.55: Ergebnis der LOO-Kreuzvalidierung für 282 Glucose-Spektren mit  $c = 0$ – $300$  mg/dl (PLS-1, keine Vorbehandlung, Wellenzahlbereiche:  $5377$ – $6542$   $\text{cm}^{-1}$  und  $7171$ – $11001$   $\text{cm}^{-1}$ ).

Die vorhergesagten stimmen mit den experimentellen Konzentrations-Werten relativ gut überein. Dies zeigt sich auch im mittleren Vorhersagefehler von  $\text{RMSEP}_{CV} = 13,7$  mg/dl und dem Bestimmtheitsmaß von  $R^2 = 97,74\%$  bei einem optimalen PLS-Rang von 10.

Um eine mögliche Abhängigkeit vom Operator ausschließen zu können, wird jeder Tag getrennt ausgewertet. Die Ergebnisse der *leave-one-out*-Kreuzvalidierungen ohne Vorbehandlung der Spektren für die verschiedenen Tage sind in Abb. 4.56 als vorhergesagte gegen die tatsächliche Glucose-Konzentration aufgetragen.

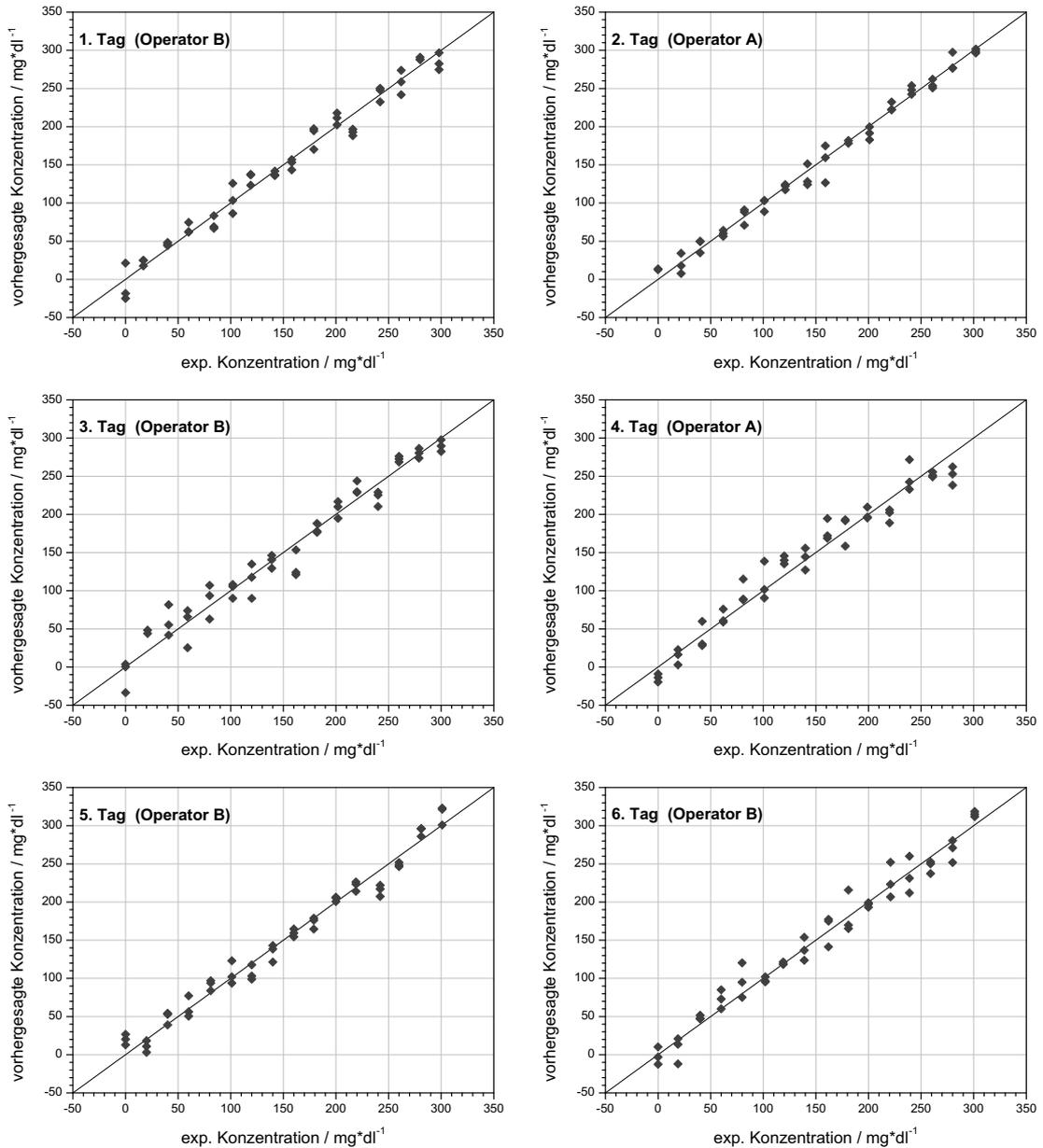


Abb. 4.56: Ergebnisse der LOO-Kreuzvalidierung für 48 (1. Tag), 46 (2. Tag), 47 (3. Tag), 48 (4. Tag), 48 (5. Tag) und 48 (6. Tag) Glucose-Spektren mit  $c = 0\text{--}300\text{ mg/dl}$  (PLS-1, keine Vorbehandlung, Wellenzahlbereiche:  $5377\text{--}6542\text{ cm}^{-1}$  und  $7171\text{--}11001\text{ cm}^{-1}$ ).

Die Übereinstimmung zwischen vorhergesagten und experimentellen Glucose-Konzentrationen ist an allen sechs Tagen relativ gut. Zum besseren Vergleich der einzelnen Regressionen sind in Tab. 4.7 die zugehörigen mittleren Vorhersagefehler, die Bestimmtheitsmaße und die verwendeten PLS-Ränge sowie der Operator des Spektrometers für die verschiedenen Tage zusammengefasst.

Tab. 4.7: Mittlerer Vorhersagefehler ( $\text{RMSEP}_{CV}$ ), Bestimmtheitsmaß ( $R^2$ ) und verwendeter PLS-Rang für die *leave-one-out*-Kreuzvalidierung sowie der Operator der Messung an sechs Tagen.

	$R^2$ [%]	$\text{RMSEP}_{CV}$ [mg/dl]	PLS-Rang	Operator
1. Tag	97,85	13,5	8	B
2. Tag	98,81	10,0	12	A
3. Tag	96,17	17,8	5	B
4. Tag	95,74	17,8	5	A
5. Tag	97,82	13,6	4	B
6. Tag	97,14	15,6	8	A

Die mittleren Vorhersagefehler liegen meist zwischen 13,5 und 17,8 mg/dl bei einem Bestimmtheitsmaß von 95,74 bis 97,85 % und einem PLS-Rang zwischen 4 und 8. Der 2. Tag sticht mit einem Vorhersagefehler von 10,0 mg/dl und einem Bestimmtheitsmaß von 98,81 % hervor. Allerdings ermittelt das Programm hier einen optimalen PLS-Rang von 12. Dies bedeutet, dass für die Regression der Daten des 2. Tages mehr Rauschanteile zur Vorhersage herangezogen werden als für die anderen Tage.

Die Vorhersagen liegen somit alle in einem ähnlichen Bereich und lassen keinen direkten Rückschluss auf den Operator zu. Das untersuchte System zeigt keine Abhängigkeit vom Operator, wie es gerade in Bezug auf eine weitergehende Geräteentwicklung wünschenswert wäre.

#### 4.9.4 Stabilität des FT-Spektrometers (Vector22/N-C)

Der Vergleich der externen Messungen mit den *In-vitro*-Messungen am Vector22/N-C zeigt, dass sich die Ergebnisse bei allen Geräten nahezu entsprechen. Die Ergebnisse mit dem AOTF-Spektrometer sind allerdings etwas besser als der Durchschnitt. Neben dem Spektrometertyp fällt vor allem die bessere Temperaturstabilisierung dieses Gerätes ins Auge. Ein AOTF-Kristall benötigt konstante Temperaturen, daher sind im Gerät mehrere Sensoren zur Temperaturüberwachung angebracht.

Vor diesem Hintergrund zusammen mit der Tatsache, dass NIR-Absorptionspektren per se sehr temperaturempfindlich sind, stellt sich die Frage nach der Stabilität des verwendeten FT-Spektrometers (Vector22/N-C) und der Reproduzierbarkeit der Messdaten.

Hierzu wurden zunächst Temperatursensoren (Dallas 1820) an verschiedenen Stellen im Spektrometer plziert und die Temperatur über einen längeren Zeitraum aufgezeichnet. Zusätzlich wurde die Raumtemperatur gemessen. Die Temperatursensoren sind über ein Interface mit der parallelen Schnittstelle eines Computers verbunden und werden mittels eines DOS-Programmes (Hygrotec) angesteuert. Diese Messungen fanden in einem Raum in der Universitätsaugenklinik in Würzburg statt, der ausschließlich über eine Hausklimaanlage klimatisiert ist und nur über zwei permanent verschlossene Oberlichter verfügt.

In Abb. 4.57 sind die verschiedenen Temperaturprofile über einen Zeitraum von 72 Stunden dargestellt. Neben der Raumtemperatur werden die Temperaturen in den verschiedenen Kammern des Spektrometers (s. Abb. 4.3) gemessen, in der Detektorkammer, der Probenkammer und nahe der Lichtquelle.

Der Messzeitraum beginnt um Mitternacht. Das Messintervall beträgt eine Minute. Das Temperaturprofil der Klimaanlage (Raumtemperatur) findet sich bei den anderen Messungen wieder. Die maximale Temperaturdifferenz ist am zweiten Messstag am größten. Die Raumtemperatur zeigt einen maximalen Unterschied von  $1,4^{\circ}\text{C}$  ( $24,3\text{--}25,7^{\circ}\text{C}$ ). Die verschiedenen Kammern des Spektrometers zeigen zwar dasselbe Profil wie die Raumtemperatur, die maximalen Temperaturänderungen sind jedoch geringer. So ändert sich die Temperatur in der Detektorkammer um  $1,1^{\circ}\text{C}$  ( $29,5\text{--}30,6^{\circ}\text{C}$ ), in der Probenkammer um  $1^{\circ}\text{C}$  ( $31,0\text{--}32,0^{\circ}\text{C}$ ) und in der Kammer mit der Lichtquelle um  $0,9^{\circ}\text{C}$  ( $43,7\text{--}44,5^{\circ}\text{C}$ ). Allgemein lässt sich feststellen, dass die Tem-

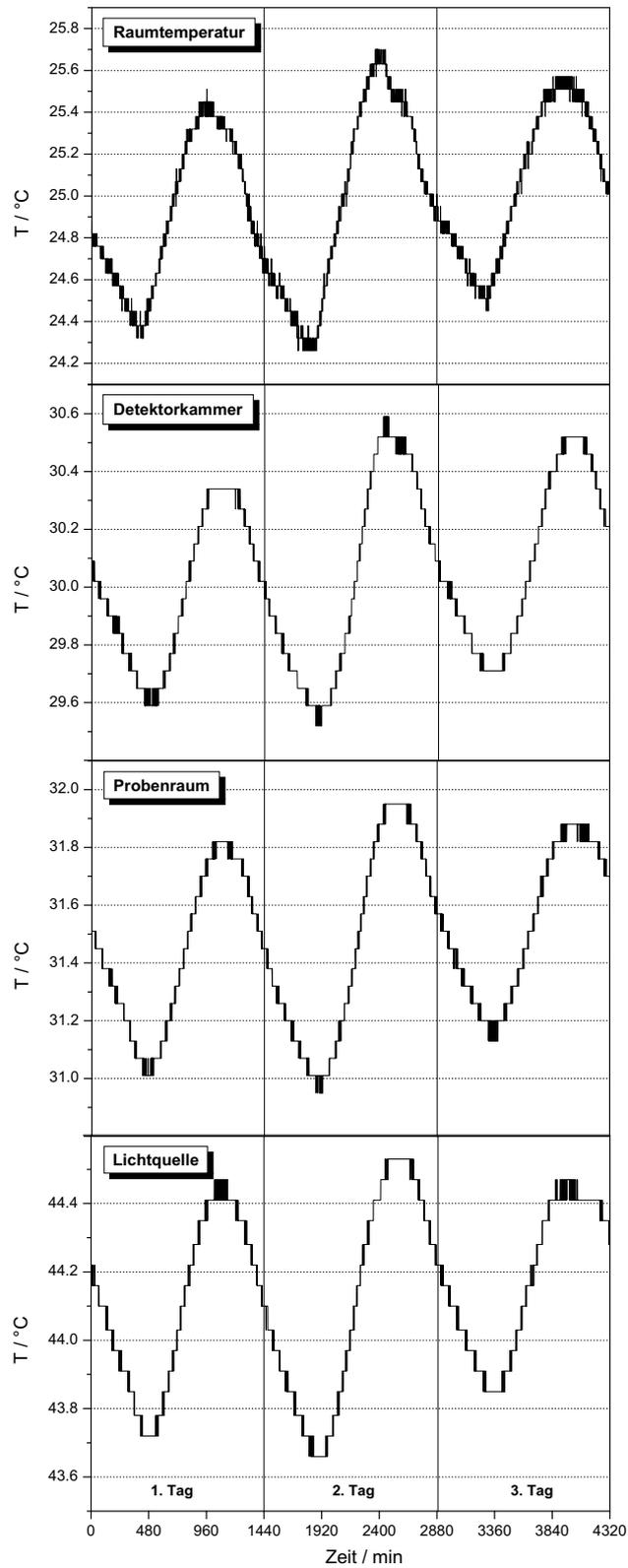


Abb. 4.57: 72-stündige Temperaturprofile in der Detektorkammer, der Probenkammer und in der Nähe der Lichtquelle im Vergleich zur Raumtemperatur.

peraturen in den einzelnen Spektrometerkammern höher sind als die Raumtemperatur. Die erhöhten Temperaturen in der Proben- und der Detektorraum entstehen wahrscheinlich auf Grund der Aufheizung durch den Lichtstrahl und die Abwärme der elektronischen Komponenten des Gerätes, die in einer angrenzenden Kammer untergebracht sind.

Die NIR-Spektroskopie reagiert sehr sensibel auf Temperaturschwankungen. Da allerdings bei den Küvettenpektren vor der Aufnahme eines Spektrums jeweils ein Referenzspektrum aufgenommen wird, sind vor allem Temperaturänderungen während eines Zeitraums von 5–10 Minuten entscheidend. Die Spektren werden meist mit einer Messzeit von ca. einer Minute aufgenommen.

Um mögliche Temperatureinflüsse auf die Spektren zu verfolgen, wird alle zehn Minuten ein Leerkanalspektrum aufgenommen. Die über 24 Stunden aufgenommenen Leerkanalspektren sind in Abb. 4.58 A dargestellt. Die Messungen werden parallel zum Temperaturprofil des zweiten Tages in Abb. 4.57 aufgenommen. Die Leerkanalspektren scheinen zunächst keine Abhängigkeit von der Temperatur zu zeigen. Die Spektren zeigen lediglich das bekannte Detektorprofil, ohne von dem in Abb. 4.57 prominenten Temperaturprofil überlagert zu werden.

Die Temperaturabhängigkeit wird sichtbar, sobald die Spektren abhängig von einander betrachtet werden. Dazu werden Differenz-Spektren gebildet mit dem ersten Spektrum des Tages als Referenz. In der zweidimensionalen Darstellung (Abb. 4.58 B) erkennt man, dass die Differenz-Spektren sowohl negative als auch positive Abweichungen zum Referenzspektrum aufweisen. In der dreidimensionalen Darstellung in Abb. 4.58 C, in der auch die zeitliche Abfolge der Spektren dargestellt ist, erkennt man, dass gerade Bereiche der Wasser-Banden (hier Luftfeuchtigkeit) um 5400 und 7200  $\text{cm}^{-1}$  stark von der Temperatur beeinflusst werden. Die spektralen Intensitäten verhalten sich gegenläufig zum Temperaturprofil. Die Temperatur des Referenzspektrums entspricht etwa den mittleren Temperaturen in den verschiedenen Kammern des Spektrometers. Mit abnehmenden Temperaturen wird ein Anstieg der Differenz der spektralen Intensitäten beobachtet und mit sinkender Temperatur ein Abfall. Die Erklärung für dieses gegenläufige Verhalten von Temperatur und Intensität liegt in der Temperaturabhängigkeit der Wasser-Banden begründet, die bereits in Kap. 4.5.1 diskutiert wurde. Dort wurde an Differenz-Spektren von Wasser mit 1 mm Schichtdicke gezeigt, dass die Intensität der Bande bei 7082  $\text{cm}^{-1}$  mit Erhöhung der

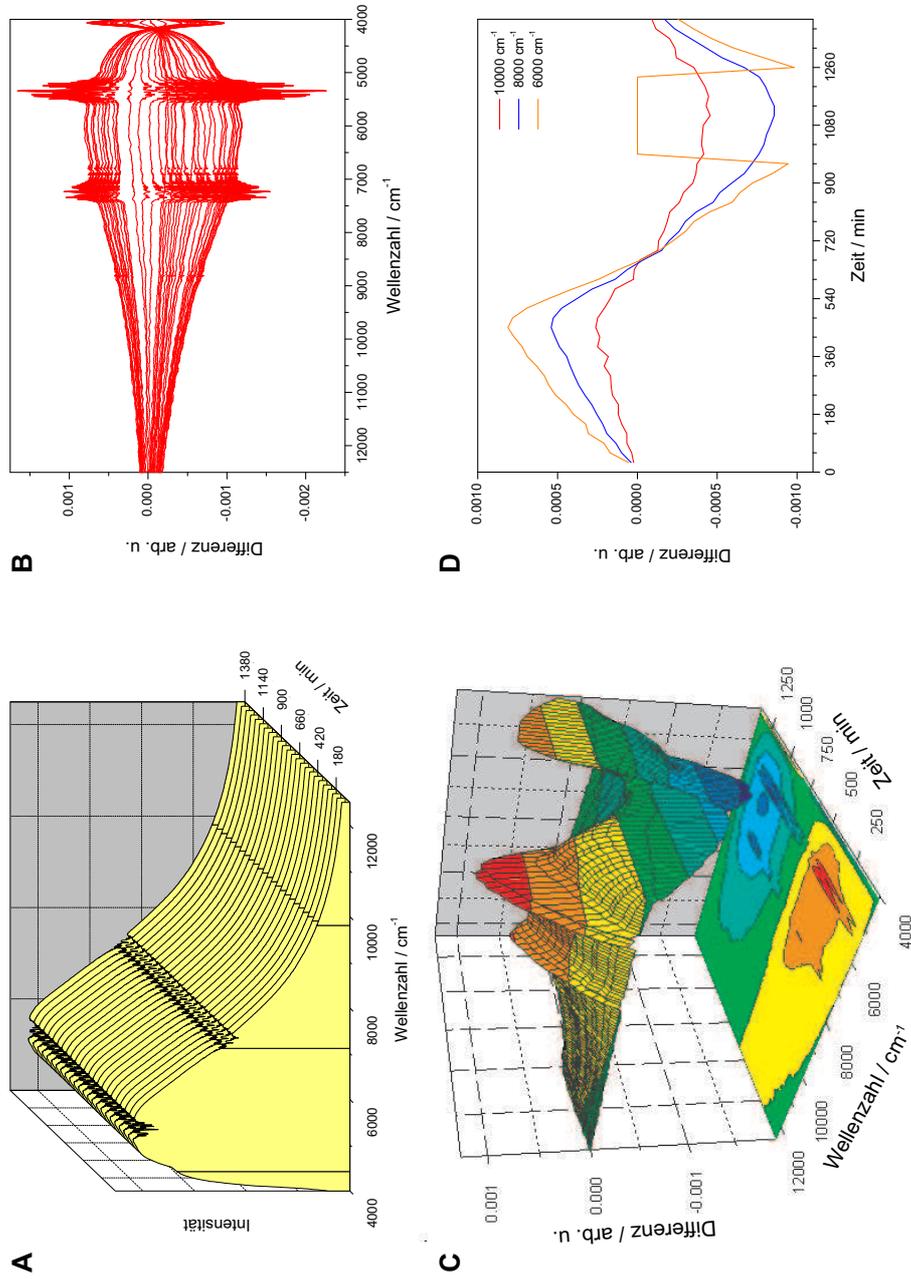


Abb. 4.58: **A:** Über 24 Stunden aufgenommene Leerkanalspektren. **B:** Differenz-Spektren der in A dargestellten Leerkanalspektren mit dem ersten Spektrum als Referenz. **C:** Dreidimensionale Darstellung der Differenz-Spektren. **D:** Schnitte durch C bei 6000, 8000 und 10000  $\text{cm}^{-1}$

Temperatur stärker wird, während die Bande bei  $6711\text{ cm}^{-1}$  schwächer wird. Bei 5 mm Schichtdicke können die beiden Banden nicht mehr sauber aufgelöst werden und der Temperatureffekt der  $7082\text{ cm}^{-1}$  Bande scheint zu dominieren.

Der Temperatureinfluss auf die Spektren hängt auch von der Wellenzahl ab. Abb. 4.58 D zeigt Schnitte durch die dreidimensionale Darstellung C bei drei verschiedenen Wellenzahlen ( $\lambda = 6000, 8000$  und  $10000\text{ cm}^{-1}$ ). Es zeigt sich, dass die Temperatur mit steigender Wellenzahl weniger Einfluss auf die Spektren hat. Das Plateau entsteht, da in diesem Bereich die Spektren und das Referenzspektrum dieselbe spektrale Intensität aufweisen.

Während einer realistischen Messung wird die Probenkammer zum Probenwechsel und zur Kontrolle der Probe auf Luftblasen geöffnet und geschlossen. Dabei könnte es zu kurzzeitigen Temperaturänderungen in der Probenkammer kommen, die bei kontinuierlichen Leerkanalmessungen mit geschlossenem Gerät nicht auftreten. Daher wurde die Temperatur in der Probenkammer während realistischer Messungen aufgezeichnet und in Abb. 4.59 A dargestellt. Das Temperaturprofil korreliert auch hier wieder mit dem der Raumtemperatur, die im Inset dargestellt ist. Der Temperaturverlauf in der Probenkammer weist Minima auf, die 1 bis  $1,5^\circ\text{C}$  niedriger sind als die Grundlinie. Diese Minima korrelieren mit dem Öffnen der Probenkammer zwecks Probenwechsel bzw. Kontrolle der Probe.

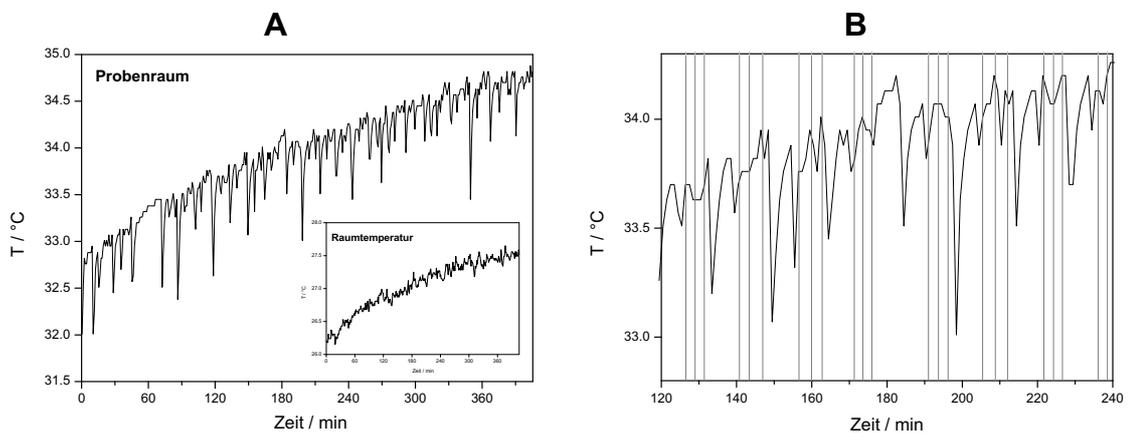


Abb. 4.59: **A:** Temperaturverlauf in der Probenkammer während realistischer Messungen, der Inset zeigt die Raumtemperatur im selben Zeitraum. **B:** Ausschnitt aus A, die vertikalen Linien bezeichnen die genauen Messzeitpunkte.

Temperaturunterschiede von wenigen Graden können bereits einen Einfluss auf die NIR-Absorptions-Spektren wässriger Systeme haben. Allerdings ist die Temperatur zum Zeitpunkt der Spektrenaufnahme entscheidend. Dieser Zeitpunkt wird vom Programm (hier OPUS) automatisch zusammen mit den spektralen Daten und Geräteparametern gespeichert und kann aus den Messdaten extrahiert werden. Abb. 4.59 B zeigt einen Ausschnitt des Temperaturprofils der Probenkammer und die vertikalen Linien bezeichnen die genauen Messzeitpunkte. Die Anordnung von drei Messungen kurz hintereinander und dann einer Pause von ca. zehn Minuten entsteht, da jede Probe dreimal vermessen und dann gegen eine neue ausgetauscht wird, die zunächst zehn Minuten temperiert wird.

Die Messzeitpunkte fallen nicht mit den extremen Minima zusammen, allerdings zeigen sich weitere kleinere Minima zwischen den drei Messungen einer Probe. Hier wird die Probenkammer geöffnet und die Küvette in bzw. aus dem Lichtstrahl geschwenkt, um ein Proben- bzw. Referenzspektrum aufzunehmen. Referenz und Probe werden mit einem zeitlichen Abstand von ca. einer Minute aufgenommen und fallen daher in dieser Darstellung zusammen.

Um die Spektren möglichst ohne Temperaturunterschiede zwischen Referenz- und Probenspektrum bzw. zwischen den Proben aufzunehmen, muss darauf geachtet werden, dass eine ausreichend lange Wartezeit zwischen dem Öffnen der Probenkammer und der Aufnahme der Spektren liegt, damit sich die Temperatur wieder regulieren kann. Andererseits sollte die Zeit zwischen Aufnahme der Referenz- und Probenspektren gering sein.

Die Temperaturstudie mit diesen einfachen Mitteln zeigt, dass die Zeitintervalle zwischen Öffnen der Probenkammer und den Messzeitpunkten in etwa den Anforderungen entsprechen. Ein ganz anderes Problem stellt die Klimaanlage dar. Da diese jedoch nicht separat für das Labor kontrolliert werden kann, stellt sich die Frage, wie die Temperaturschwankungen durch die Klimaanlage die Messungen beeinflussen. Dazu ist eine Studie unter kontrollierten Außenbedingungen notwendig.

Für eine derartige Studie wird das Gerät in eine Klimakammer gestellt und unter kontrollierten Temperaturbedingungen auf seine Langzeitstabilität untersucht. Zusätzlich wurden Temperaturrampen gefahren, um den Einfluss verschiedener Temperaturen und Temperaturänderungen zu untersuchen. Diese Messungen wurden in Zusammenarbeit mit T. Mahl und R. Rawer aus der Arbeitsgruppe von Prof. Stork

im Institut für Technik der Informationsverarbeitung an der Universität Karlsruhe durchgeführt. [171]

Das Photo in Abb. 4.60 zeigt das Labor in Karlsruhe und die Klimakammer, in der das Gerät untersucht wurde. Als Maß dienten bei diesen Untersuchungen Einkanalspektren, die ohne Probe aufgenommen wurden, sogenannte Leerkanalspektren.



Abb. 4.60: Photographie des Labors mit der Klimakammer in der Universität Karlsruhe.

#### Das Vector22/N-C im Langzeittest

Zur Abschätzung der Langzeitstabilität verschiedener Komponenten des Gerätes wird dieses in die Klimakammer, in der konstante Bedingungen bezüglich Temperatur und äußerer Beleuchtung herrschen, gestellt und eingeschaltet. Nach etwa zwei Stunden ist das Gerät temperiert und betriebsbereit.

Es werden eine Vielzahl kurzer Leerkanalmessungen über mehrere Stunden aufgenommen und anschließend deren Intensitäten bezogen auf eine Wellenlänge (hier 1800 nm) normiert auf den Mittelwert gegen die Zeit dargestellt (s. Abb. 4.61).

Nach einer Einbrennzeit der Lichtquelle von ca. zwei Stunden verhält sich die Intensität über alle Wellenlängen nahezu identisch. Für die dargestellte Wellenlänge von 1800 nm ergibt sich über einen Zeitraum von sechs Stunden eine Standardabweichung von 0,28 % bei einer maximalen Variation von 0,49 %. Wird der Zeitraum auf eine Stunde reduziert, so verbessern sich diese Werte auf 0,22 % für die Standardabweichung bei einer maximalen Variation von 0,45 %. Diese Werte beziehen sich explizit auf eine Wellenlänge von 1800 nm, in anderen spektralen Bereichen weichen die Werte ab.

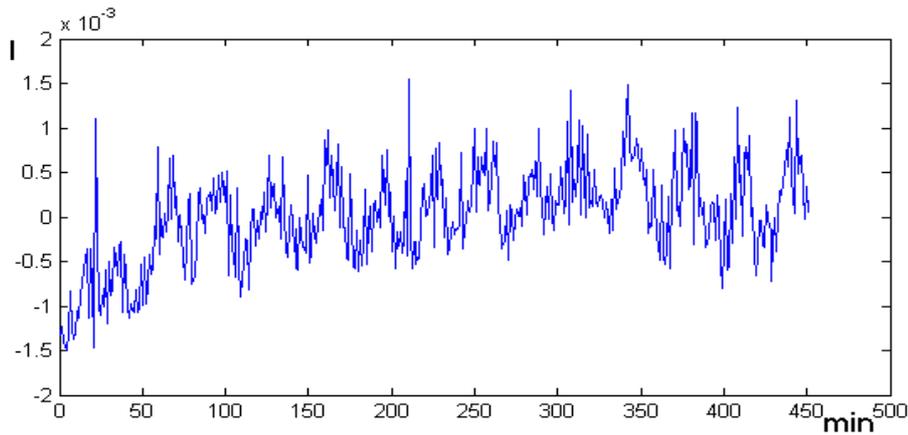


Abb. 4.61: Intensitätsverteilung der Leerkanalspektren bei 1800 nm unter konstanten äußeren Bedingungen normiert auf den Mittelwert. [171]

Um den Einfluss der Gerätefunktion und teilweise auch äußerer Parameter auf die Spektren zu minimieren, werden in der NIR-Spektroskopie meist Absorptions- oder Transmissionsspektren aufgenommen, die das Verhältnis zwischen dem Einkanalspektrum der Probe und dem des Lösungsmittels bzw. des Leerkanalspektrums darstellen. Das verwendete FT-Spektrometer ist ein Einkanal-Gerät. Referenz- und Probenspektren können daher nicht zeitgleich aufgenommen werden, sondern nur nacheinander. Dies gilt umso mehr für *In-vivo*-Messungen (s. Kap. 4.7). Je zeitnäher die Aufnahme der beiden Spektren erfolgt, desto weniger Abweichungen treten auf. Vergleicht man zwei Leerkanalspektren, so verschlechtert sich die Standardabweichung und maximale Variation in Abhängigkeit der Zeit stark. Dieser Zusammenhang ist in Tab. 4.8 dargestellt.

Die Signale in Abb. 4.61 scheinen periodisch zu schwanken. Dies verdeutlicht sich noch, wenn die Signale aus Abb. 4.61 mittels eines Tiefpasses elektronisch gefiltert werden. In Abb. 4.62 sind die gefilterten Signale dem Temperaturverlauf in der Detektorkammer denen des Interferometerraumes und des klimatisierten Raumes gegenübergestellt (Schemazeichnung des Geräts s. Abb. 4.3). Dadurch wird die Korrelation zwischen der Raumtemperatur und dem Intensitätsverlauf der Spektren deutlich hervorgehoben.

Die Raumtemperatur wird durch eine Klimaanlage geregelt, deren Periodendauer von etwa 30 Minuten in den beiden Graphen gut zu erkennen ist. Der Zeitversatz

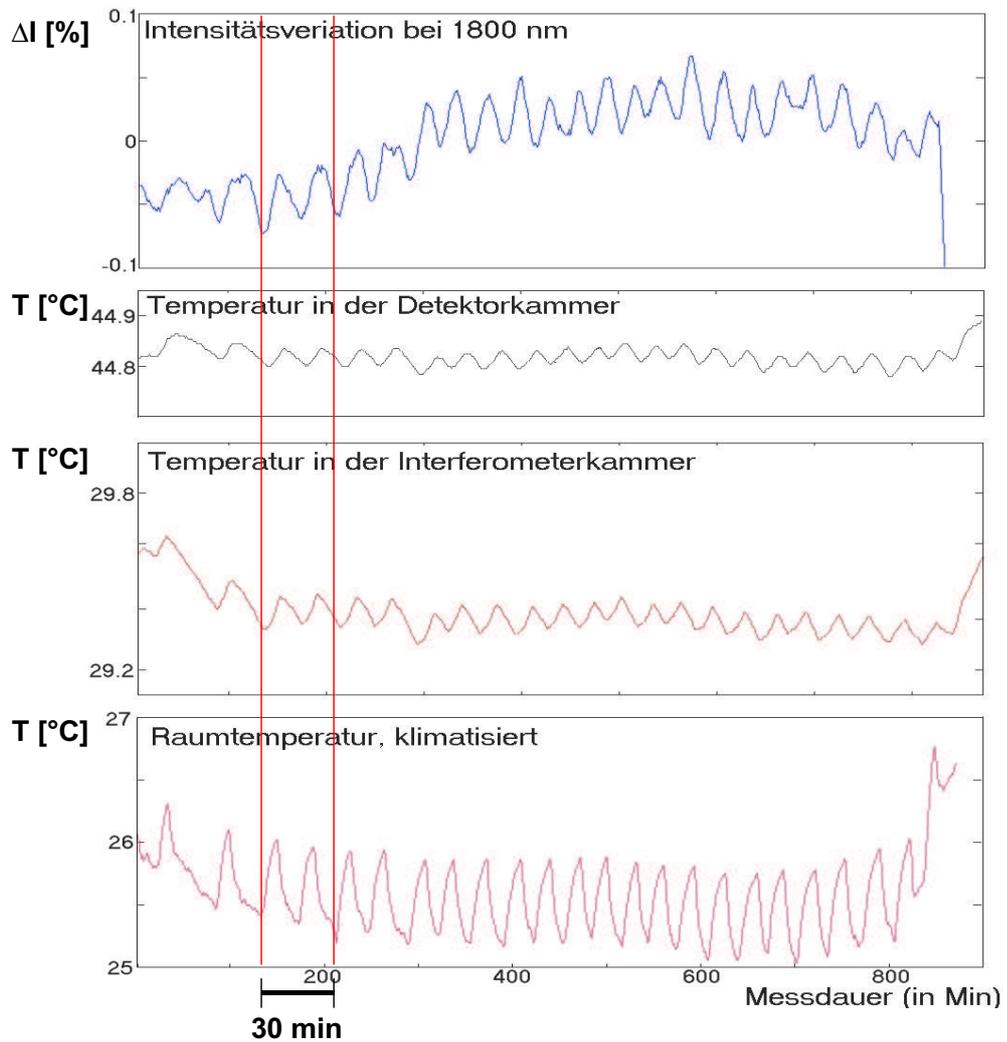


Abb. 4.62: Korrelation zwischen den Tiefpass-gefilterten Intensitäten der Einkanalspektren bei 1800 nm in Abhängigkeit der Zeit und dem Verlauf der Temperatur im Detektorraum, Interferometeraum und der Raumtemperatur im selben Zeitintervall. [171]

Tab. 4.8: Rauschanteil der Intensität zweier Leerkanalmessungen in Abhängigkeit des zeitlichen Abstands. [171]

$\Delta t$	max. Variation	Standardabweichung
[s]	[%]	[%]
10	0,18	0,04
60	0,26	0,12
120	0,28	0,15
600	0,36	0,19
3600	0,41	0,25

von 5–10 min zwischen den Maxima der Temperatur und der Intensität entsteht, da das Spektrometer vom Außenraum durch das Gehäuse abgetrennt und isoliert ist. Die Schwankungen in der Raumtemperatur beeinflussen das Spektrometer erst mit einer gewissen Verzögerung. Eine Änderung der Raumtemperatur um  $1^\circ\text{C}$  bewirkt eine Variation der spektralen Intensität von 0,02 %. Dieser Einfluss ist sehr gering. Die Glucosemessungen finden jedoch in Konzentrationsbereichen statt, die sehr nah an der Nachweisgrenze des Gerätes liegen. Daher könnte auch bereits diese geringe Variation einen Einfluss auf das Ergebnis haben und sollte mit in die Auswertung einbezogen werden.

Das Gerät selbst besteht aus verschiedenen Komponenten, die in unterschiedlichem Maße von der Temperatur abhängig sein könnten. Im folgenden wird die Temperaturabhängigkeit der verschiedenen Komponenten untersucht und soweit möglich quantifiziert. Dazu wurde die Temperatur in der Klimakammer über einen Zeitraum von insgesamt 16 Stunden langsam erhöht und sowohl die Intensität von Einkanalspektren mit kurzer Messdauer als auch die Temperatur in der Probenkammer, dem Interferometerraum und dem Detektorraum aufgezeichnet. Nach einer Adaptionsphase von drei Stunden wird die Temperatur in  $1^\circ\text{C}$ -Schritten erhöht und nach Erreichen der Temperatur für 30 min gehalten. In Abb. 4.63 sind die typischen Temperaturprofile bei geschlossenem Spektrometer für die verschiedenen Abtastpunkte gezeigt.

Die dargestellten Temperaturprofile weisen einen konstanten Temperatur-Offset

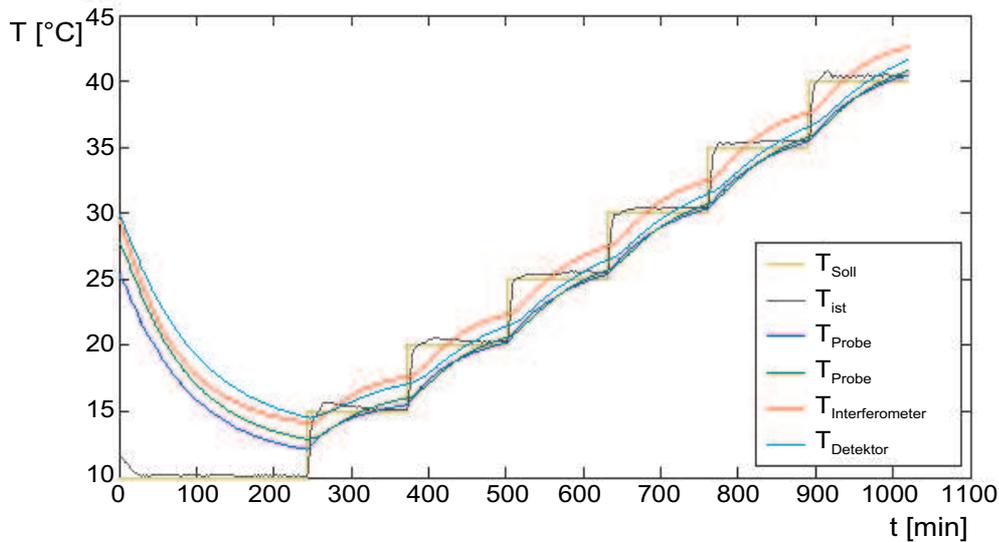


Abb. 4.63: Typisches Temperaturprofil während einer Messreihe für die verschiedenen Spektrometer-Komponenten bei Temperaturen zwischen 10 und 40°C bei geschlossenem Spektrometer.  $T_{soll}$  und  $T_{ist}$  bezeichnen die Regelwerte der Klimakammer. [171]

für jede Komponente des Spektrometers auf, daher soll im Folgenden der Temperatureinfluss auf die einzelnen Module untersucht werden.

Die Ergebnisse dieser Experimente sind in Abb. 4.64 zusammengefasst. Die Plots zeigen die Relation zwischen Wellenzahl und der Temperatur an. Der Farbverlauf gibt dabei die Änderung der spektralen Intensität in Relation zu einem Einkanalpektrum bei  $T = 20^\circ\text{C}$  wieder.

Abb. 4.64 A gibt die Verhältnisse für das Gesamtgerät wieder. Besonders signifikant ist der Bereich zwischen 24 und 32°C und 8000 und 12500  $\text{cm}^{-1}$ . Leider entsprechen diese Temperaturen den normalerweise im Sommer in Würzburg vorherrschenden Raumtemperaturen, die durch die Hausklimaanlage nur bedingt reguliert werden. Der spektrale Bereich zwischen 8000–11000  $\text{cm}^{-1}$  wird zur quantitativen Auswertung der Spektren herangezogen, da um 7000  $\text{cm}^{-1}$  eine sehr starke Wasser-Bande das Spektrum der wässrigen Glucoselösungen verdeckt und unterhalb von 6500  $\text{cm}^{-1}$  bei einer Schichtdicke von typischerweise 5 mm das Signal gesättigt ist.

Da dieser signifikante Bereich für die Auswertung von Bedeutung ist und die Temperaturen durchaus erreicht werden, soll im Folgenden geklärt werden, welche

Komponenten des Spektrometers diesen starken Temperatureinfluss auf die Spektren hervorrufen.

**Halogenlampe:** Der Einfluss der Halogenlampe wird mit Hilfe einer externen Halogenlampe bestimmt, die der internen Lichtquelle des Gerätes entspricht. Das Licht dieser Lichtquelle wird mittels einer bikonvexen Linse und zweier Blenden auf die Glasfaser fokussiert, welche auch für *In-vivo*-Messungen verwendet wird und seitlich am Spektrometer angebracht ist. Der Strahlengang im Gerät entspricht somit dem in Abb. 4.5 dargestellten Strahlengang. Die Lichtquelle wird mit  $12,2 \pm 0,1$  V und  $2,92 \pm 0,1$  A betrieben, dies entspricht einer Energie von 11,2 W und laut Herstellerangaben einer Temperatur der Glühwendel von 3000 K. Um nur den Einfluss der Lichtquelle zu messen, wird diese in die Klimakammer gestellt und über die Glasfaser mit dem Spektrometer verbunden, das sich außerhalb der Kammer befindet. Die maximale Intensitätsänderung lag bei Messungen über 13 Stunden bei  $\Delta I = 1,2\%$  mit einer Standardabweichung von  $\sigma = 0,14\%$ . Da diese Änderungen in keinem Zusammenhang mit den Temperaturänderungen in der Klimakammer stehen, folgt daraus, dass die Lichtquelle stabil läuft und vor allem bei kleineren Zeitabständen nur gering variiert (Abb. 4.64 C).

**Probenkammer:** Die Probenkammer zeigt ebenfalls keinen erfassbaren Temperatureinfluss (hier nicht dargestellt). Messungen mit geöffneter und geschlossener Probenkammer ergaben identische Temperaturprofile mit dem einzigen Unterschied, dass der Temperatenausgleich bei geöffnetem Gerät schneller stattfindet.

**Detektor:** Da der InGaAs-Detektor Peltier-gekühlt ist und relativ große Kühlrippen hat, kann die Temperatur des Detektors nicht direkt gemessen werden. Messungen in der Detektorkammer und direkt an den Kühlrippen zeigen keinen Unterschied bei geöffnetem bzw. geschlossenem Detektorraum. Gezieltes Erwärmen und Abkühlen des Detektors zeigt, dass die Peltier-Kühlung Temperaturschwankungen effektiv ausgleicht.

**Interferometer:** Die Interferometerkammer enthält das Interferometer mit seiner Ein- und Auskopplung. Bis auf die Einkoppelspiegel für den Detektor sind alle

optischen Komponenten des Gerätes in dieser Kammer untergebracht. Wie man in Abb. 4.64 A sieht, haben Temperaturänderungen einen starken Einfluss auf dieses Modul. Besonders signifikant sind die Bereiche um 24°C und 32°C und 8000 bis 12500 cm<sup>-1</sup>. Dies entspricht nahezu der Temperaturabhängigkeit, die im Gesamtgerät beobachtet wurde (Abb. 4.64 A). Die Temperaturabhängigkeit in diesen Bereichen kann durch den Temperatursausgleich des Spektrometers nicht mehr kompensiert werden. Der Bereich von 15 bis 35°C entspricht in etwa den Temperaturschwankungen in einem nicht-klimatisierten Raum. In diesem Bereich liegt die maximale Variation der Intensität bei  $\Delta I = 16\%$  bei einer Standardabweichung von  $\sigma = 2,5\%$ .

**Glasfaser:** Nachdem die verschiedenen Spektrometer-Komponenten untersucht wurden, soll nun auch noch die für die *In-vivo*-Messungen verwendete Glasfaser untersucht werden. Die Glasfaser zeigt zwar keinen Temperatureinfluss (s. Abb. 4.64 D), reagiert allerdings sehr sensibel auf Bewegung. Die Variation der spektralen Intensität ( $\Delta I = 0,8\%$ ,  $\sigma = 0,09\%$ ) wird gemessen, indem die Glasfaser durch die Klimakammer geführt wird. Das Spektrometer wie auch die oben beschriebene externe Lichtquelle stehen außerhalb der Kammer. Die Intensitätsvariation ist nicht mit der Temperatur korreliert. Der Einfluss von Bewegung auf die Glasfaser ist in Abb. 4.65 dargestellt. Die ersten 50 Messungen werden mit einer fixierten Glasfaser durchgeführt, bei den zweiten 50 Messungen wird die Glasfaser leicht bewegt.

Durch Bewegung der Glasfaser erhöht sich die Variation der Intensität drastisch von  $\Delta I_{ruhig} = 0,01\%$  mit  $\sigma_{ruhig} = 0,01\%$  auf  $\Delta I_{bewegt} = 24\%$  mit  $\sigma_{bewegt} = 1,25\%$ . Es ist daher wichtig, die Glasfaser gut zu fixieren, um die Bewegung der Faser während einer Messung zu vermeiden.

#### Ausgleich der Temperaturabhängigkeit

Besonders das Interferometer wird stark von Temperaturänderungen beeinflusst. Das Gerät kann im praktischen Einsatz nicht in einer Klimakammer betrieben werden und auch normale Klimaanlage sind Temperaturschwankungen unterworfen. Daher soll versucht werden, den Temperatureinfluss auf den Interferometerraum rechnerisch zu unterdrücken. Der Verlauf der spektralen Intensität mit der Temperatur ist bekannt, allerdings ist die Temperaturabhängigkeit nicht über alle Wellenzahlen

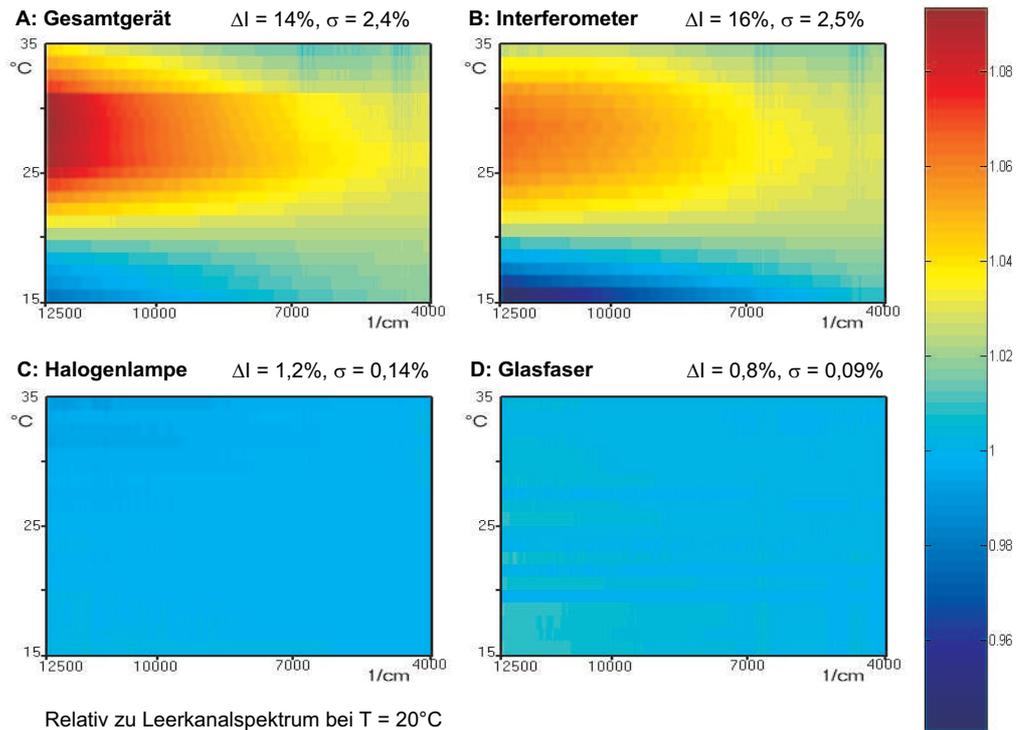


Abb. 4.64: Relation zwischen Wellenlänge und Temperatur für **A**: das Gesamtgerät, **B**: den Interferometerraum, **C**: die Halogenlampe und **D**: die Glasfaser. Der Farbverlauf stellt die Änderung der spektralen Intensität in Relation zu einem Einkanalspektrum bei  $T = 20^\circ\text{C}$  dar. [172]

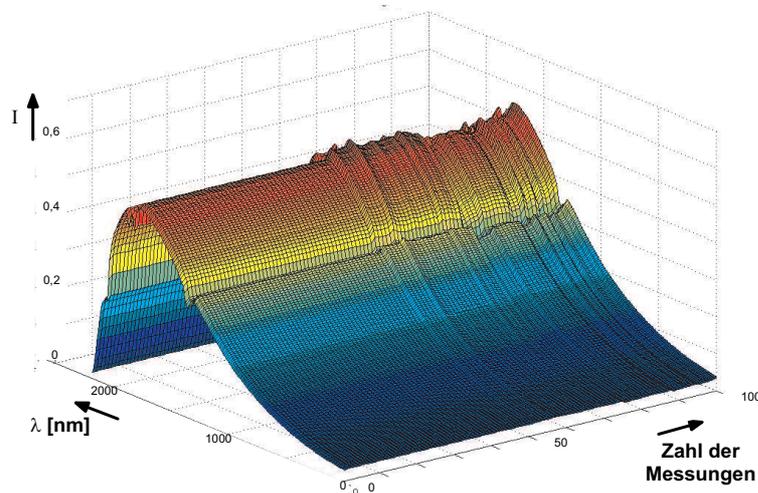


Abb. 4.65: Abhängigkeit der Bewegung der Glasfaser auf die spektrale Intensität des Leerkanalspektrums (Messung 1–50 Glasfaser in Ruhe, Messung 51–100 Glasfaser bewegt). [171]

gleich. Eine Kompensation muss daher für alle Wellenzahlen getrennt durchgeführt werden. Um eine ausreichende Genauigkeit zu erhalten, sollte, wie Simulationen ergeben haben, mindestens ein Polynom 5. Ordnung verwendet werden. [171] Als Bezugstemperatur wird die des Interferometermoduls verwendet.

In Abb. 4.66 ist der Intensitätsverlauf für das Interferometer aufgetragen. Die linke Grafik zeigt den gemessenen Verlauf, die rechte den Verlauf nach Anwendung eines Polynoms 5. Ordnung. Durch die Approximation kann der maximale Fehler von  $\Delta I = 16\%$  mit  $\sigma = 2,5\%$  auf  $\Delta I = 0,14\%$  mit  $\sigma = 0,01\%$  reduziert werden.

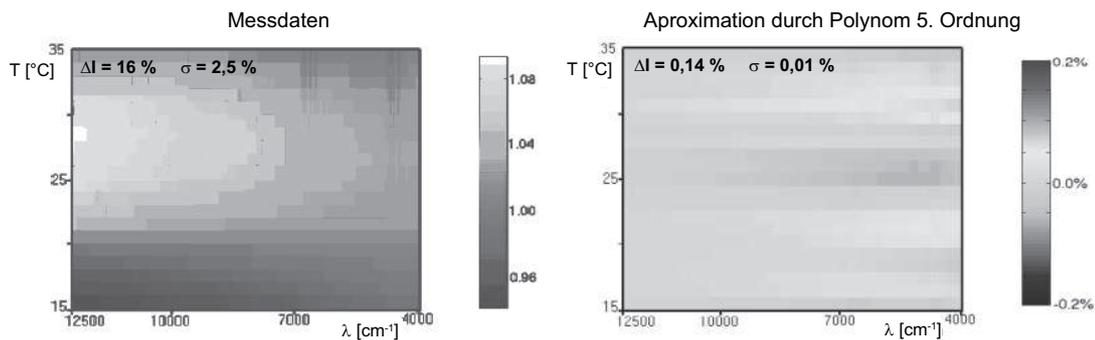


Abb. 4.66: Gegenüberstellung des temperaturabhängigen Intensitätsverlaufs für das Interferometer ohne und mit Approximation durch ein Polynom 5. Ordnung. Aufgetragen ist die Temperatur gegen die Wellenzahl, die Graustufen stellen die Änderung der spektralen Intensität normiert auf  $T = 22^\circ\text{C}$  dar. [171]

Bisher konnte die Approximation nur an wenigen Messungen getestet werden. Eine Erprobung an einem realen Datensatz steht daher noch aus.

#### Auswirkungen auf weitere Messungen

Bei den Untersuchungen an der Universität Karlsruhe konnten verschiedene Aspekte gezeigt und quantifiziert werden, die bei weiteren Messungen beachtet werden sollten:

- Der Einfluss der Klimaanlage der Augenklinik sollte bei der Auswertung berücksichtigt werden.
- Das Gerät sollte mindestens zwei Stunden vor der Messung eingeschaltet werden, bzw. nur während längerer Messpausen ausgeschaltet werden.

- Proben- und Referenzspektrum sollten mit möglichst geringem zeitlichem Abstand aufgenommen werden.
- Aufgrund des starken Temperatureinflusses des Interferometerraums sollte hier ein zusätzlicher Temperaturfühler angebracht werden und diese Temperatur in die Auswertung eingebunden werden.
- Die Spektren werden stark von der Bewegung der Glasfaser beeinflusst, daher sollte diese bei Messungen fixiert sein.

Zwei dieser Punkte wurden bei allen hier vorgestellten Messungen bereits beachtet. Das Gerät war bis auf wenige Ausnahmen permanent eingeschaltet bzw. wurde bereits einen Tag vor der Messung eingeschaltet. Die Referenzspektren wurden für die *In-vitro*-Messungen immer direkt vor der Aufnahme des Proben-Spektrums gemessen.

#### 4.9.5 Einfluss der Querempfindlichkeiten

Das menschliche Kammerwasser enthält neben Glucose andere im NIR absorbierende Substanzen wie Milchsäure, Ascorbinsäure und Harnstoff. Die NIR-Spektren dieser Substanzen wurden in Kap. 4.5.3 dargestellt und diskutiert. Die Frage nach dem Einfluss dieser Substanzen auf eine quantitative Glucose-Bestimmung soll nun geklärt werden.

Der Einfluss von drei Faktoren, hier die drei Substanzen, auf eine Zielgröße, Glucose, kann am einfachsten mittels eines  $2^3$ -Faktorenversuchsplans [164] (engl. *factorial design*) untersucht werden. Diese Art von Faktorenversuchsplan wurde in Kap. 4.6.6 vorgestellt und enthält acht mögliche Faktorstufenkombinationen. Angewendet auf das hier vorgestellte Problem würden die drei Substanzen jeweils in einer hohen und niedrigen Konzentration eingesetzt, die den im Auge vorliegenden physiologischen Bereich abdecken sollten.

Um die Wechselwirkungen der verschiedenen Faktoren zu berechnen, wird für jede Versuchsstufe ein vergleichbarer Wert als Ergebnis benötigt. In diesem Fall ist das Ergebnis jedoch jeweils ein Spektrum. Die Spektren sind aufgrund der unterschiedlichen Zusammensetzung der vermessenen Lösungen nicht direkt vergleichbar. Aus diesem Grund wird für jeden der acht durch den Faktorenversuchsplan

vorgegebenen Kombinationen zusätzlich die Glucose-Konzentration variiert und ein PLS-Model erstellt. Die  $RMSEP_{CV}$ -,  $R^2$ -Werte oder der verwendete PLS-Rang des erstellten Modells können dann als Ergebnis-Wert der Kombination zur Berechnung der Wechselwirkungen herangezogen werden. In Tab. 4.9 ist der abgewandelte  $2^3$ -Faktorenversuchsplan für die Untersuchung der Einflüsse von Milchsäure, Ascorbinsäure und Harnstoff auf die quantitative Glucosebestimmung dargestellt. Die verwendeten Glucose-Konzentrationen (50–300 mg/dl) sind nur für die erste Kombination ausführlich aufgeführt.

Tab. 4.9: Abgewandelter  $2^3$ -Faktorenversuchsplan für die Untersuchung der Einflüsse von Milchsäure (L), Ascorbinsäure (A) und Harnstoff (U) auf die quantitative Glucosebestimmung.

Ifd. Nr.	Standard- Bezeichnung	Glucose [mg/dl]	Faktoren			Wechselwirkung			
			L	A	U	LA	LU	AU	LAU
1	(1)	50	-	-	-	+	+	+	-
		100	-	-	-	+	+	+	-
		150	-	-	-	+	+	+	-
		200	-	-	-	+	+	+	-
		250	-	-	-	+	+	+	-
		300	-	-	-	+	+	+	-
2	a	50–300	+	-	-	-	-	+	+
3	b	50–300	-	+	-	-	+	-	+
4	ab	50–300	+	+	-	+	-	-	-
5	c	50–300	-	-	+	+	-	-	+
6	ac	50–300	+	-	+	-	+	-	-
7	bc	50–300	-	+	+	-	-	+	-
8	abc	50–300	+	+	+	+	+	+	+

- niedrige Konzentration, + hohe Konzentration

Milchsäure, Ascorbinsäure und Harnstoff werden in folgenden Konzentrationen eingesetzt, die den im Auge vorliegenden Konzentrationsbereich abdecken:

- Milchsäure: 34,7 mg/dl und 49,9 mg/dl,
- Ascorbinsäure: 15 mg/dl und 25 mg/dl,

- Harnstoff: 35 mg/dl und 45 mg/dl.

Durch die Verwendung von sechs Glucose-Konzentrationen pro Faktorstufenkombination entstehen 48 zu vermessende Lösungen. Diese Zahl an Proben kann nicht mehr an einem Tag vermessen werden. Aus diesem Grund wird der Versuchsplan geblockt. Die Blockbildung erfolgt anhand der Dreifachwechselwirkung, so dass alle Proben mit einer negativen Dreifachwechselwirkung an einem Tag und alle mit einer positiven Dreifachwechselwirkung am folgenden Tag vermessen werden.

Die vier Substanzen werden in einem PBS-Puffer (pH 7,50, PAA Laboratories) vermessen. Zur Darstellung der Proben werden Stammlösungen mit Konzentrationen von 10 g/l für Glucose, 2,5 g/l für Ascorbinsäure und 5 g/l für Harnstoff hergestellt. Milchsäure liegt als 90%ige Lösung vor. Die Stammlösungen und der PBS-Puffer werden am Morgen des Messtages frisch hergestellt. Die Stammlösungen werden in 100 ml Messkolben pipettiert, mit PBS-Puffer-Lösung aufgefüllt und auf ca. 37°C vortemperiert. Die Spektren-Aufnahme erfolgt am FT-NIR-Spektrometer (Vector22/N-C, Bruker) in Thermoküvetten mit einer Schichtdicke von 5 mm bei einer Temperatur von 37°C. Die Temperatur der Lösung wird vor der Messung in der Küvette überprüft. Die Messung der Proben an einem Tag erfolgt nach dem Zufallsprinzip und jede Probe wird in Folge dreimal vermessen. Die Leerkanal-Referenzmessung wird direkt vor Aufnahme jedes Spektrums wiederholt.

In Abb. 4.67 sind einige typische Spektren der Vierfach-Mischungen gezeigt.

Die Spektren unterscheiden sich rein optisch nicht von denen reinen Wassers. Daher wird eine PLS-1-Regression mit dem Programmpaket QUANT-2 (OPUS, Bruker) durchgeführt. Dazu werden alle 18 Spektren einer Faktorkombination verwendet. Die Regression wird ohne Vorbehandlung der Spektren zwischen 5377–6542  $\text{cm}^{-1}$  und 7171–11001  $\text{cm}^{-1}$  als *leave-one-out* Kreuzvalidierung durchgeführt. Die Ergebnisse der Kreuzvalidierung für die verschiedenen Faktorkombinationen sind in Tab. 4.10 als  $\text{RMSEP}_{CV}$ -,  $R^2$ -Werte und verwendeter Rang angegeben.

Der Vorhersagefehler liegt für die meisten Faktorstufenkombinationen zwischen 80 und 90 mg/dl. Ausnahmen bilden die Kombination **a** mit 96,37 mg/dl, die Kombination **b** mit nur 77,11 mg/dl und **c** mit 79,07 mg/dl. Proben mit diesen Kombinationen enthalten neben Glucose nur eine der zu untersuchenden Substanzen. Diese Ergebnisse werden auch in den Bestimmtheitsmaßen und den PLS-Rängen wiedergegeben.

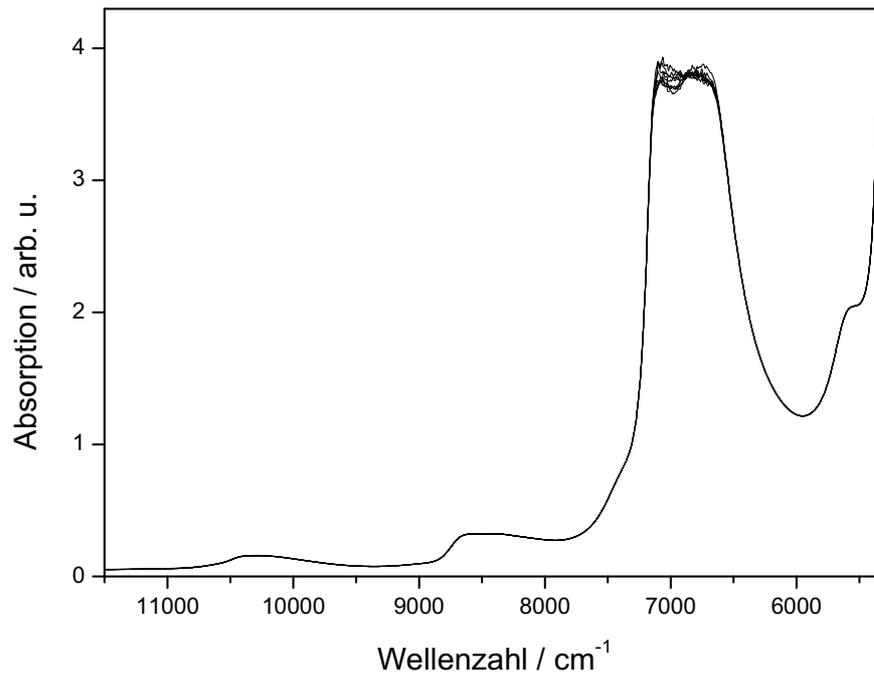


Abb. 4.67: FT-NIR-Absorptions-Spektren von wässrigen Gemischen aus Glucose, Milchsäure, Ascorbinsäure und Harnstoff bei pH 7,5 und  $T = 37^{\circ}\text{C}$  (Vector22/N-C,  $d = 5\text{ mm}$ , 100 scans,  $8\text{ cm}^{-1}$ , InGaAs-Detektor).

Tab. 4.10: Ergebnisse der leave-one-out Kreuzvalidierung (PLS-1) der acht Faktorstufenkombinationen.

lfd. Nr.	Standard-Bezeichnung	RMSEP <sub>CV</sub> [mg/dl]	R <sup>2</sup> [%]	Rang
1	(1)	88,41	29,1	4
2	a	96,37	16,3	7
3	b	77,11	40,9	7
4	ab	85,29	32,8	6
5	c	79,07	39,1	2
6	ac	84,74	33,4	3
7	bc	86,64	31,2	4
8	abc	82,57	35,6	2

Die Bestimmtheitsmaßen liegen hier zwischen 29 und 35 %, für Kombination **a** hingegen bei 16,3 %, für **b** bei 40,9 % und für **c** bei 39,1 %. Um diese Ergebnisse zu erreichen, werden PLS-Ränge zwischen 2 und 4, für die drei Ausnahmen zwischen 6 und 7 verwendet. Das beste Ergebnis der Kreuzvalidierung zeigt Kombination **a**.

Anhand der  $R^2$ -Werte bzw. der Ränge wird nun der Einfluss der drei Substanzen auf die Glucose-Bestimmung und die Wechselwirkungen berechnet. Unter Verwendung des Bestimmtheitsmaßes ( $R^2$ ) ergibt sich ein Wert von 2,22 für den Einfluss der Milchsäure (L), von -2,12 für die Ascorbinsäure (A) und von -1,77 für Harnstoff (U). Die Zweifachwechselwirkungen haben einen Wert von -1,19 für die Kombination LA, von -1,82 für LU und 3,47 für AU. Die Dreifachwechselwirkung hat einen Wert von -1,25. Da echte Dreifachwechselwirkungen sehr selten sind, wird der Wert der Dreifachwechselwirkung in der Regel mit dem Rauschanteil gleichgesetzt und kann zum Testen der Signifikanz der übrigen Effekte verwendet werden. Unter dieser Annahme zeigt sich, dass keiner der berechneten Koeffizienten eine besondere Signifikanz aufzeigt.

Dieses Ergebnis bestätigt auch die anhand der aus den PLS-Rängen berechneten Regressionskoeffizienten. Allerdings scheint das Vorhandensein von Harnstoff eine Reduzierung des PLS-Ranges zu verursachen. Es ergeben sich Werte von 0,13 für Milchsäure, 0,38 für Ascorbinsäure und -1,63 für Harnstoff sowie die Zweifachwechselwirkungen mit -0,88 für LA, -0,38 für LU und -0,13 für AU. Die Dreifachwechselwirkung hat einen Wert von 0,13.

In Bezug auf die Fragestellung, ob Harnstoff, Milchsäure und Ascorbinsäure die quantitative Glucose-Bestimmung beeinflussen, ergibt sich, dass die Substanzen in Konzentrationen, wie sie im Auge vorliegen, keinen Einfluss auf die Glucose-Bestimmung haben.



## 5 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, die Möglichkeiten zur Verwendung des Auges bzw. der Augenvorderkammer als spektroskopische Zelle für nicht-invasive *In-vivo*-Messungen zu untersuchen. Dabei stand vor allem die Geräte-technische Umsetzung und die Entwicklung geeigneter Auswertestrategien im Vordergrund.

Das menschliche Auge, speziell die Vorderkammer, ist für nicht-invasive Messungen besonders geeignet, da es aufgrund seiner exponierten Lage im Körper leicht zugänglich ist. Das in der Vorderkammer enthaltene Kammerwasser ist eine Art Ultrafiltrat des Blutes. Daher können dort die Stoffe nachgewiesen werden, die in der Lage sind, die Blut-Kammerwasser-Schranke zu überwinden. Von den verschiedenen denkbaren Strahlengängen ist der günstigste der, der Licht im 3. Purkinje-Bild (also auf der Linse) fokussiert und reflektiert. Bei einem Lichteinfall und -ausfall unter einem 45°-Winkel durchläuft das austretende Licht die Vorderkammer zweimal und legt dabei einen Weg von ca. 6,3 mm zurück. Für eine solche Anordnung kann aufgrund der Charakteristika der Hornhaut ultraviolette, sichtbare oder nahinfrarote Strahlung verwendet werden. Dies lässt die Untersuchung verschiedener Substanzen zu.

In der UV/VIS-Spektroskopie werden elektronische Übergänge beobachtet. Charakteristische UV/VIS-Spektren zeigen daher komplexe organische Moleküle mit konjugierten Doppelbindungssystemen. Zu diesen Substanzen zählen viele in der Ophthalmologie eingesetzte Medikamente und auch Drogen. Zunächst wurden die UV/VIS-Spektren verschiedener Ophthalmika und Drogen aufgenommen, um für die *In-vivo*-Bestimmung geeignete Substanzen zu finden. Das Absorptions-Maximum dieser Substanzen muss oberhalb von 380 nm liegen. Die Hornhaut ist schon ab 300 nm transparent, allerdings sollte ein zusätzlicher Sicherheitsabstand eingehalten werden, um Schädigungen auszuschließen. Diese Bedingung erfüllt von den untersuchten Substanzen nur Fluorescein. Dieser Stoff wird in der Angiographie einge-

setzt.

Für die *In-vivo*-UV/VIS-Messungen wurde ein kompaktes UV-Spektrometer über eine Glasfaser an ein *In-vivo*-Setup gekoppelt. Das *In-vivo*-Setup besteht aus einer Lichtquelle, einem Linsensystem zur Fokussierung auf das 3. Purkinje-Bild und einem weiteren Linsensystem zur Fokussierung des im Auge reflektierten Lichts auf die Glasfaser. Zusätzlich wird vor dem Auge ein Kantenfilter eingesetzt, welches Licht unterhalb von 380 nm abblockt. Die Glasfaser ist in der Bildebene einer Spiegelreflexkamera montiert. Die Kamera ermöglicht es dem Operator, bei heruntergeklapptem Spiegel die Fokus-Position im Auge zu justieren und bei hochgeklappten Spiegel Spektren aufzunehmen.

Mit diesem Aufbau wurden nicht-invasive *In-vivo*-Spektren von Fluorescein aufgenommen. Das Fluorescein wurde als Augentropfen appliziert und die Reste nach 10 min durch Auftropfen von Tränenersatzflüssigkeit entfernt. UV/VIS-Spektren wurden direkt nach der Applikation und in gewissen zeitlichen Abständen aufgenommen. Innerhalb der ersten Minuten konnten Spektren gemessen werden, welche das charakteristische Absorptionsmaximum von Fluorescein zeigten. Die Intensität des Maximums nahm beständig ab. Nach Gabe der Tränenersatzflüssigkeit konnte kein Fluorescein mehr detektiert werden.

Fluorescein scheint sich bei der Applikation als Augentropfen, hauptsächlich auf der Hornhaut zu befinden und nur zu einem geringen Teil in die Vorderkammer einzudringen. Das auf der Hornhaut befindliche Fluorescein wird dabei durch Tränenflüssigkeit und später durch die Applikation der Tränenersatzflüssigkeit abgespült.

Diese Messungen zeigen, dass es möglich ist, nicht-invasive *In-vivo*-UV/VIS-Absorptions-Spektren aufzunehmen. Am Beispiel von Fluorescein wurde gezeigt, dass die Abnahme der Substanz mit der Zeit verfolgt werden konnte. Für weitergehende Studien sollten daher zunächst die Identifikation von Substanzen mit geeigneten spektralen Eigenschaften im Vordergrund stehen.

Das zweite spektrale Fenster der Hornhaut liegt im NIR-Bereich. In diesem Bereich ist eine nicht-invasive Glucose-Bestimmung möglich, wie bereits verschiedene Studien an anderen Körperstellen gezeigt haben. Die Glucose-Konzentration im Auge ist ca. 30 mg/dl niedriger als die im Blutplasma, was durch eine zu dieser Arbeit parallel durchgeführte Studie an der Universitätsaugenklinik Würzburg festgestellt wurde. Eine Änderung im Blutglucose-Wert ist außerdem erst mit einer Latenzzeit

---

von ca. 20 min im Auge detektierbar.

Am Auge wurden *In-vivo*-Messungen sowohl mit einem kommerziellen FT-NIR-Spektrometer als auch mit einem kompakten dispersiven NIR-Spektrometer mit Diodenarray-Detektor aufgenommen. Das dispersive Spektrometer besaß bereits einen Glasfasereingang, so dass es problemlos mit dem *In-vivo*-Setup kombiniert werden konnte. Für die Kombination mit dem *In-vivo*-Setup wurde das FT-NIR-Spektrometer mit einem weiteren Eingang mit Glasfaseradapter und einer austauschbaren optischen Einheit zur Einkopplung des Lichts in das Interferometer versehen.

Um Schwankungen der Glucose-Konzentrationen zu simulieren, führte der Proband einen oralen Glucose-Toleranz-Test durch. Die Blutglucose-Konzentrationen wurden parallel zu den spektroskopischen Messungen bestimmt und als Referenzwert für die Auswertung verwendet, dabei wird eine Latenzzeit von 20 min angenommen. Die Auswertung erfolgte aufgrund der großen Datenmenge mittels Verfahren der multivariaten Kalibrierung.

Die *leave-one-out*-Kreuzvalidierung der Rohdaten des FT-NIR-Spektrometers zeigte zwar eine Korrelation der Referenzwerte mit den vorhergesagten Werten, allerdings keine optimale Korrelation. Die Vorhersage wurde mit steigender Glucose-Konzentration schlechter.

Die mit dem dispersiven NIR-Spektrometer aufgenommenen *In-vivo*-Spektren zeigten eine bessere Korrelation auf, was zum Teil an der sehr viel kürzeren Messzeit liegen könnte. Die Spektren wurden ohne Vorbehandlung verwendet. Der Vorhersagefehler ( $RMSEP_{CV}$ ) lag unter 30 mg/dl, allerdings zeigten die Werte immer noch eine starke Streuung, was sich auch in dem hohen PLS-Rang ausdrückt.

Vorversuche zum Einsatz eines Monitorstrahlengangs, der die Reflexionen von der Hornhaut detektiert, zeigte bei FT-NIR-Messungen eine Verbesserung der Fixation des Probanden und erlauben dem Probanden in gewissem Maße eine Selbsteinstellung der Apparatur. Eine Einbindung in die Messprogramme steht noch aus.

Die vorgestellten *In-vivo*-Resultate zeigen das Potential der Methode, aber lassen keine endgültige Aussage über die Möglichkeit der nicht-invasiven Glucose-Bestimmung am Auge zu. Die vorgestellten Ergebnisse zeigen deren Abhängigkeit von mehreren Faktoren. Dazu zählen neben der Messdauer und dem damit verbundenem Zeitraum, in dem das Auge geöffnet bleiben muss, auch das Gerät selbst.

Da eine systematische Untersuchung der Geräte-Parameter und eine Optimierung der Parameter für die Auswertung *in vivo* nicht zu realisieren ist, wurden *In-vitro*-Messungen an verschiedenen Geräten durchgeführt.

Die *In-vitro*-Testmessungen an unterschiedlichen kommerziellen Geräten und dem dispersiven NIR-Spektrometer zeigten alle, dass die *In-vitro*-Bestimmung von Glucose-Konzentrationen im physiologischen Konzentrationsbereich (10–350 mg/dl) möglich ist. Für die Messungen mit dem dispersiven NIR-Spektrometer wurde eine Probenkammer konstruiert, die eine lineare Version des *In-vivo*-Setups enthält, um eine möglichst hohe Übereinstimmung zwischen dem *In-vivo*- und *In-vitro*-Aufbau zu erhalten. Die Testmessungen wurden an sehr unterschiedlichen Geräten durchgeführt, einem FT-Spektrometer (ABB), einem AOTF-Spektrometer (Bran+Luebbe), einem Polarisations-Interferometer (Bran+Luebbe) und einem dispersiven Zwei-Strahl-Spektrometer (JASCO). Die einzelnen Ergebnisse unterschieden sich jedoch voneinander, wobei die Unterschiede erst bei der statistischen Auswertung hervortraten. Wichtig ist es, dass Glucose-Informationen und nicht eine Gerätefunktion bzw. die Wasser-Matrix modelliert werden.

Aus diesem Grund wurden *In-vitro*-Spektren mit einer Schichtdicke von 5 mm bei einer Proben-Temperatur von  $37^{\circ}\text{C} \pm 0,1^{\circ}\text{C}$  systematisch mit verschiedenen Parametern ausgewertet. Diese Untersuchungen wurden mit dem FT-NIR-Spektrometer durchgeführt. Das Gerät sollte aufgrund der kompakten Bauweise eine stabilere Justage aufweisen, als die Kombination aus dispersivem NIR-Spektrometer, Probenkammer und Glasfaserverbindung.

Sowohl die Test-Set-Validierung ( $n_{Konstr.} : n_{Val.} = 64:67$ ) als auch die *leave-one-out*-Kreuzvalidierung ( $n = 131$ ) von *In-vitro*-FT-NIR-Spektren ohne Vorbehandlung zeigten eine gute Korrelation zwischen den Referenz- und den vorhergesagten Werten. Beide Modelle waren in der Lage, unabhängige Test-Spektren ( $n_{Test} = 66$ ) mit einem Vorhersagefehler von  $\text{RMSEP}_{Test,TS} = 17,44$  mg/dl bzw.  $\text{RMSEP}_{Test,CV} = 15,41$  mg/dl vorherzusagen. Die Qualität der Vorhersage zeigte sich auch in der Darstellung der Ergebnisse als *Error Grid* Diagramme. Für beide Modelle lagen sowohl im Clarke als auch im BD *Error Grid* Diagramm fast alle Datenpunkte im Bereich A und nur vereinzelte im Bereich B. Datenpunkte in Zone A führen zu einer medizinisch korrekten Behandlung, die in Zone B zu nur leichten Abweichungen in der medizinischen Behandlung ohne Beeinträchtigung. Beide Mo-

---

delle zeigen somit, dass sie in der Lage sind, eine medizinisch korrekte Vorhersage zu liefern.

Der medizinisch geforderte Vorhersagefehler von unter 10 mg/dl wurde nicht erreicht. Zur Verbesserung der *In-vitro*-Ergebnisse wurden verschiedene Optimierungsstrategien verfolgt, zum einen eine Variablen-Reduktion durch Wellenzahl-Selektion, zum anderen die Verwendung verschiedener Vorbehandlungen. Diese Arbeiten wurden in Zusammenarbeit mit Dr. K. Baumann, Institut für Pharmazie, Universität Würzburg durchgeführt.

Die Wellenzahl-Selektion wurde basierend auf einer LMO-Kreuzvalidierung und Hauptkomponenten-Regression (PCR) vorgenommen. Dabei wurden die Bereiche um 6000, 7400, 8900, 9600 und 9900  $\text{cm}^{-1}$  als besonders relevant hervorgehoben. Im Bereich um 6000  $\text{cm}^{-1}$  konnten anhand von Differenz-Spektren und der Literatur Glucose-Banden identifiziert werden, die anderen Bereiche liegen alle in den Flanken der Wasser-Banden. Da Glucose auch OH-Banden zeigt, die allerdings vollständig von den Banden der Wasser-Matrix überlagert werden, deutet die Wahl dieser Bereiche darauf hin, dass die gelöste Glucose die Wasser-Matrix verändert. Werden nur die selektierten Wellenlängen zur Modellbildung herangezogen, so betrug der Vorhersagefehler für eine Vorhersage von Testdaten, die auch für die Kalibrierung verwendet wurden,  $\text{RMSEP}_{\text{Test}} = 10,3 \text{ mg/dl}$  ( $n : n_{\text{Test}} = 68:35$ ) bzw.  $\text{RMSEP}_{\text{Test}} = 13,6 \text{ mg/dl}$  ( $n_{\text{Test}} = 35$ ) für die Vorhersage unabhängiger Testspektren mit einem LMO-kreuzvalidierten Modell aus 68 Spektren. Die Wellenzahl-Selektion zeigte, dass die *In-vitro*-Messungen ein Potential für einen RMSEP von 10 bis 12 mg/dl haben, allerdings ist sie sehr Rechenzeit-intensiv.

Aus diesem Grund wurden die Auswirkungen verschiedener Arten der Vorbehandlung der Spektren auf die Auswertung untersucht. Es zeigte sich, dass die Spektren nach einer kolonnenweisen Zentrierung eine Abhängigkeit vom Messtag aufweisen. Diese Abhängigkeit verschwindet bei der 2. Ableitung der Spektren. Ein Vergleich der Auswertung von Spektren ohne Vorbehandlung mit vorbehandelten Spektren ergab, dass die Verwendung der MSC (*Multiplicative Scatter Correction*) oder SNV (*Standard Normal Deviate*) keine Verbesserung darstellen. Sowohl die Wellenzahl-Selektion als auch die Verwendung der 2. Ableitung als Vorbehandlung konnten den Vorhersagefehler  $\text{RMSEP}_{\text{CV}}$  und  $\text{RMSEP}_{\text{Test}}$  der *In-vitro*-FT-NIR-Messung um 4,1 mg/dl bzw. 5,7 mg/dl verbessern.

Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse hängt allerdings nicht nur von den Geräteparametern ab sondern auch vom Anwender. Daher wurden *In-vitro*-FT-NIR-Spektren von zwei Operatoren an verschiedenen Tagen aufgenommen. Die LOO-kreuzvalidierten Vorhersagefehler für die einzelnen Tage sind alle ähnlich und lassen keinen direkten Rückschluss auf den Operator zu. Das untersuchte System zeigt daher keine Abhängigkeit vom Operator, wie es gerade in Bezug auf eine weitergehende Geräteentwicklung wünschenswert wäre.

Als eine weitere mögliche Fehlerquelle wurde während der Messung an den kommerziellen Geräten die Temperatur ermittelt. NIR-Absorptions-Spektren von Wasser zeigen prinzipiell eine starke Temperaturabhängigkeit. Die *In-vitro*-Proben wurden allerdings während der Messung temperiert. Es stellte sich daher die Frage nach der Temperatur-Stabilität des verwendeten FT-NIR-Spektrometers. Zunächst zeichnen einfache Sensoren die Temperaturen an verschiedenen Stellen im Spektrometer und die Raumtemperatur auf. Dabei wurde festgestellt, dass sich die Temperaturschwankungen der Klimaanlage des Labors auch auf die Temperaturen im Spektrometer auswirken und somit die spektralen Schwankungen hervorrufen.

Temperatur-Messungen unter realen Bedingungen, also während der Aufnahme von *In-vitro*-Spektren, zeigten, dass sich die Temperatur beim Öffnen der Probenkammer zwar ändert, sich zum Zeitpunkt der Spektrenaufnahme aber wieder angepasst hat. Ein ganz anderes Problem stellt die Klimaanlage dar, die jedoch nicht separat für das Labor kontrolliert werden kann. Für eine Studie unter kontrollierten Temperaturbedingungen wird das Gerät in einer Klimakammer installiert und auf seine Langzeitstabilität untersucht. Zusätzlich wurden Temperaturrampen gefahren, um den Einfluss verschiedener Temperaturen und Temperaturänderungen zu untersuchen. Diese Messungen wurden in Zusammenarbeit mit T. Mahl und R. Rawer aus der Arbeitsgruppe von Prof. Stork im Institut für Technik der Informationsverarbeitung an der Universität Karlsruhe durchgeführt.

Die Temperatur-Studien zeigten, dass das Gerät für verschiedene Temperatur- und Wellenzahl-Bereiche unterschiedlich empfindlich ist. Um die Ursache für diese Temperatureinflüsse zu finden, wurden die einzelnen Spektrometer-Komponenten getrennt untersucht. Dabei zeigte sich, dass weder die Halogenlampe noch der Probenraum oder der Detektor einen Einfluss haben. Ähnliche Temperaturprofile wie das Gesamtgerät wies jedoch die Interferometerkammer auf. In diesem Modul be-

---

findet sich neben dem Interferometer auch fast die gesamte Optik des Gerätes und hat somit entscheidende Auswirkung auf die Qualität der Spektren.

Zur Minderung des Temperatur-Effekts wurde der Intensitätsverlauf des Interferometers versuchsweise mit einem Polynom 5. Ordnung korrigiert. Bei den Testdaten führte diese Korrektur zu einer signifikanten Reduzierung der Temperaturschwankungen.

Zusätzlich zum Gerät wurde auch die für *In-vivo*-Messungen eingesetzte Glasfaser untersucht. Diese Untersuchungen zeigten, dass die Glasfaser nicht von der Temperatur beeinflusst wird, allerdings sie ist sehr empfindlich gegenüber Bewegung und sollte daher bei den Messungen entsprechend fixiert werden.

Neben Glucose enthält das Kammerwasser weitere Substanzen. Einige dieser Substanzen könnten aufgrund ihrer NIR-Spektren die quantitative Glucose-Bestimmung beeinflussen. Der Einfluss der wichtigsten Komponenten, Lactat, Ascorbat und Harnstoff, wurde anhand eines  $2^3$ -Faktorenversuchsplanes untersucht. Dazu wurden die Komponenten in ihren physiologisch vorliegenden Konzentrationen eingesetzt. Die Auswertung des Faktorenversuchsplans zeigt, dass keine Abhängigkeit zwischen der Glucose-Bestimmung und den drei Substanzen vorliegt.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die spektroskopische Untersuchung von Kammerwasser-Substanzen möglich ist. Durch den Einsatz der UV/VIS-Spektroskopie konnte Fluorescein *in vivo* bestimmt werden. Die Anwendung der NIR-Spektroskopie eignet sich vor allem zur Bestimmung von Glucose im Kammerwasser. Die Güte der Glucose-Bestimmung ist von verschiedenen Faktoren abhängig, wie z. B. dem verwendeten Gerät, den Parameter der Auswertung und der Temperatur. Für weitergehende Studien sollten daher die in dieser Arbeit aufgedeckten Probleme und Strategien beachtet werden.



## 6 Summary

The aim of this work was to determine the possibilities of using the human eye or more precisely the anterior chamber as spectroscopic cell for non-invasive *in vivo* measurements. The focus lay on the technical realization and the development of a suitable analysis strategy.

The human eye, especially the anterior chamber, is well suited for non-invasive measurements. Due to its exposed position in the body it can be easily reached by spectroscopic means. The aqueous humor filling the anterior chamber is a kind of ultrafiltrate of the blood. Therefore, all substances which are able to cross the blood/aqueous humor-barrier can be identified therein. For non-invasive measurements several pathways through the eye are possible. The most promising is the one using the reflection in the third Purkinje spot (on the lens). Light falling into the eye under an angle of  $45^\circ$  is reflected at the lens. When leaving the eye again the light has passed the anterior chamber twice, so the pathway has a length of about 6.3 mm corresponding to the double mean depth of the anterior chamber. Due to the optical properties of the cornea only light in the ultraviolet (UV), visible (VIS) or near infrared (NIR) region can be used for spectroscopic investigations.

UV/VIS spectra arise through electronic transitions. Mostly complex organic molecules with conjugated double bond systems show characteristic UV/VIS absorption spectra. Many ophthalmic drugs and illicit drugs belong to this species. First of all UV/VIS absorption spectra of different ophthalmic drugs were measured in order to find suitable ones for an *in vivo* determination. Suitable substances have to exhibit an absorption maximum above 380 nm. The cornea itself is transparent from 300 nm on, but an additional safety region should be kept in order to prevent any damage of the eye. From the tested substances only fluorescein meets this prerequisite. Fluorescein is normally used for angiographic examinations.

*In vivo* UV/VIS studies were carried out with a compact spectrometer coupled

with the *in vivo* setup via a glassfiber. The *in vivo* setup consists of a light source, an optical system for focussing on the third Purkinje spot plus another optical system which focusses the light into the glassfiber. In front of the eye a filter is mounted to suppress light below 380 nm. The glassfiber is mounted in the image plane of a reflex camera. With the camera the observer is able to place the focus onto the third Purkinje spot while the mirror of the camera is up. When the mirror is down one is able to measure the spectra.

*In vivo* spectra of fluorescein were taken with the described setup. The fluorescein was applied as eye drops and any residues were removed by the application of artificial tears 10 min after the fluorescein application. UV/VIS spectra were taken directly after the fluorescein application and from then on in certain time intervals. Spectra recorded during the first minutes showed the characteristic fluorescein signal. The intensity of this peak decreased with time and could not be detected anymore after application of the artificial tears.

When applied as eye drops fluorescein seems to stay mainly on the cornea and only a minimal concentration is transferred into the anterior chamber. Fluorescein on the cornea is first flushed away by natural tears and later on by application of artificial tears.

The measurements show that it is in principle possible to measure non-invasive *in vivo* absorption spectra in the UV/VIS. It is also possible to follow the decrease of fluorescein with time. A main issue for further studies should be the search for suitable substances.

The second spectral window of the cornea lies in the NIR region. In this region a non-invasive glucose determination is possible, as was already shown in several studies on different body sites. The glucose concentration in the eye is about 30 mg/dl lower than that of blood plasma. This was determined by a parallel study at the Universitätsaugenklinik Würzburg. Changes in the glucose concentration of the blood can be determined in the eye after about 20 min.

*In vivo* studies at the eye were carried out with a commercial available FT-NIR spectrometer and a compact dispersive spectrometer with a diodearray detector. The dispersive spectrometer was already equipped with a fiber connector and could easily be connected with the *in vivo* setup described above. The FT-NIR spectrometer, on the other hand, needed an additional port for the glassfiber together with an

---

exchangeable optical unit to direct the light into the interferometer.

The proband underwent an oral glucose tolerance test to simulate blood glucose variations. The blood glucose concentration was determined parallel to the spectroscopic measurements and served as reference value, a latency time of 20 min was taken into account.

The leave-one-out crossvalidation of the raw FT-NIR data showed a correlation between the reference and the predicted values, but the correlation is not ideal. The prediction is better for low concentration.

The dispersive *in vivo* spectra showed a better correlation, which might be due to the much shorter measurement times. All the *in vivo* spectra were used without any preprocessing. The prediction error ( $RMSEP_{CV}$ ) was below 30 mg/dl, but the values still scatter heavily expressed in a high PLS factor.

Preliminary FT-NIR tests for the employment of a monitor path detecting the reflections from the cornea showed an improvement in the fixation of the proband and allow the proband to correct the apparatus to certain degree himself. An integration into the measurement program has still to be done.

The presented *in vivo* results show the potential of this method but do not allow a final proposition about the possibility of a non-invasive glucose determination at the human eye. The results are still depending on several factors. These include the instrument itself as well as the measurement time being the time period the proband has to keep his eyes open. A systematic analysis of the instrument parameters and an optimization of the evaluation parameters cannot be realized *in vivo*. Therefore measurements on different instruments were carried out.

The *in vitro* test measurements on various commercial instruments and the dispersive NIR spectrometer all showed that an *in vitro* determination of glucose in the physiological concentration range (10–350 mg/dl) is in principal possible. For measurements with the dispersive setup a sample chamber containing a linear version of the *in vivo* setup was constructed to get a high compatibility between the *in vivo* and *in vitro* setup. The test were performed on a FT spectrometer (ABB), an AOTF spectrometer (Bran+Luebbe), a polarization interferometer (Bran+Luebbe) and a dispersive dual-beam instrument (JASCO). The results on the different instruments differed from each other. Major differences were observed in the data analysis. It is important that glucose information is modelled and not an instrument function or

only the water matrix itself.

Therefore *in vitro* spectra were measured with a thickness of 5 mm at a sample temperature of  $37^{\circ}\text{C} \pm 0,1^{\circ}\text{C}$  and analyzed systematically with different parameters. These studies were carried out with the FT-NIR spectrometer as it should have a more stable optical configuration due to its compact build, than the combination of the dispersive NIR spectrometer with the sample chamber and the glassfiber.

The test-set validation ( $n_{Konstr.} : n_{Val.} = 64:67$ ) as well as the leave-one-out crossvalidation ( $n = 131$ ) of the *in vitro* FT-NIR spectra showed a good correlation between the reference and the predicted values. Both models were able to predict independent test spectra ( $n_{Test} = 66$ ) with a prediction error of  $\text{RMSEP}_{Test,TS} = 17,44 \text{ mg/dl}$  or  $\text{RMSEP}_{Test,CV} = 15,41 \text{ mg/dl}$ , respectively. The prediction quality is also expressed in the error grid diagrams. For both models nearly all data points fell in zone A and only a few in zone B of the Clarke or BD error grid diagram, respectively. Data points falling in Zone A lead to a medical correct treatment, those in Zone B lead to a slight diversion from the correct treatment without any adverse effects. Therefore, both models have the ability to make a medical correct prediction.

The medically demanded prediction error of less than 10 mg/dl could not be reached. For optimization of the *in vitro* results several strategies were followed, on one hand a variable reduction through the use of different preprocessing tools and on the other hand by wavenumber selection. These studies were carried out in collaboration with Dr. K. Baumann, Institut für Pharmazie, Universität Würzburg.

The influence of different preprocessing techniques was analyzed. Spectra measured on two different days could be separated after being collumwise mean centered. These day to day differences diminish when the second deviation of the spectra is calculated. A comparison between the evaluation of spectra without and with preprocessing showed that the application of the multiplicative scatter correction or standard normal deviate do not lead to an improvement compared to the raw data result. Only the application of the second deviation as preprocessing tool lead to an improvement of the prediction error  $\text{RMSEP}_{CV}$  and  $\text{RMSEP}_{Test}$  of 4,1 mg/dl and 5,7 mg/dl, respectively.

The wavenumber selection was calculated on the basis of a LMO-crossvalidation in combination with a principal component regression. The regions around 6000, 7400,

---

8900, 9600 und 9900  $\text{cm}^{-1}$  were classified as containing glucose relevant information. The region around 6000  $\text{cm}^{-1}$  was already marked in literature for containing glucose related bands. The other regions correspond with the rising edges of the water bands. Glucose itself exhibits OH bands but these are superimposed by the OH bands of water leading to the conclusion that dissolved glucose influences the water matrix significantly. A model built only with the selected wavenumbers leads to a crossvalidated prediction error for the prediction of test spectra of  $\text{RMSEP}_{Test} = 10,3 \text{ mg/dl}$  ( $n : n_{Test} = 68:35$ ) or  $\text{RMSEP}_{Test} = 13,6 \text{ mg/dl}$  ( $n_{Test} = 35$ ), respectively, whereas the first prediction was done with dependent and the second with independent data. The prediction of dependent data always results in lower prediction errors. The wavenumber selection shows potential for prediction errors between 10 and 12 mg/dl. A drawback is that wavenumber selections are very time consuming.

The reproducibility of the results is not only connected with the instrument parameters but also with the operator. *In vitro* FT-NIR spectra were measured by two operators at three different days each. The leave-one-out-crossvalidated prediction errors for the different days resemble each other and allow no direct correlation with the operator, as it is desirable for further instrument development.

The temperature was determined as another possible error source during the test measurement on the commercial instruments. NIR absorption bands of water are generally very sensitive towards temperature. The *in vitro* samples were generally temperature stabilized during the measurement. First of all simple sensors were installed throughout the instrument and in the laboratory. It was determined that temperature variations due to the laboratory's air conditioning could also be detected in the instrument and therefore, influence the spectra.

Temperature studies during the measurement of the spectra showed variations whenever the sample chamber was opened, but these variations were adjusted before the actual collection of the spectrum. That still leaves the air conditioning which cannot be controlled separately for the laboratory. A study under controlled temperature conditions was carried out in collaboration with T. Mahl and R. Rawer from the workgroup of Prof. Stork, Institut für Technik der Informationsverarbeitung, Universität Karlsruhe. The instrument was placed inside a climate chamber and its longterm stability investigated.

These temperature studies revealed that the instrument has different tempera-

ture sensibilities for different temperature and wavenumber regions. To determine the cause of these variations the spectrometer components were analyzed separately. Neither the halogen lamp, the sample chamber nor the detector showed such temperature variations as the instrument itself. A similar temperature profile as for the whole instrument was found for the interferometer chamber. This chamber contains nearly all the optics of the instrument and variations therein should have a direct influence on the spectra.

The intensity distribution of the interferometer was experimentally modelled by a 5<sup>th</sup> order polynomial leading to a considerable reduction in variation. So far this correction was only carried out on a few test data.

Additionally, the glassfiber used for the *in vivo* measurement was analyzed. The studies came to the result that the glassfiber is not influenced by temperature but is influenced by motion. For any measurement the fiber should be appropriately fixed.

The human aqueous humor contains not only glucose but also many other substances. Some of these substance can influence the quantitative glucose determination by influencing the NIR spectra. The influence of three more important substances namely lactate, ascorbate and urea was studied with a 2<sup>3</sup>-factor analysis. The components were used in their physiological concentrations. The 2<sup>3</sup>-factor analysis showed no influence of the investigated substances on the glucose determination.

Concluding this work showed that spectroscopic investigations of substances in the aqueous humor are possible. Fluorescein was determined *in vivo* by use of UV/VIS spectroscopy. NIR spectroscopy is a suited technique for the non-invasive glucose determination in the anterior chamber. The quality of the glucose determination depends on several factors, e. g. the instrument, the analysis parameters and the temperature. Any further studies on this field should take these factors into account.

# Literaturverzeichnis

- [1] (20.11.2002). [Http://www.diabetikertag2002.de](http://www.diabetikertag2002.de).
- [2] M. A. Arnold, *Curr. Opinion Biochem.* **7**, 46–49 (1996).
- [3] G. Côté, *J. Clin. Eng.* **22**, 253–259 (1997).
- [4] D. C. Klonoff, *Diabetes Care* **20**, 433–437 (1997).
- [5] O. S. Khalil, *Clin. Chem.* **45**, 165–177 (1999).
- [6] H. A. MacKenzie, H. S. Ashton, S. Spiers, Y. S. S. Freeborn, J. Hannigan, J. Lindberg, P. Rae, *Clin. Chem.* **45**, 1587–1595 (1999).
- [7] J. Pickup, L. McCartney, O. Rollinski, D. Birch, *Brit. Med. J.* **319**, 1–4 (1999).
- [8] R. J. McNichols, G. L. Côté, *J. Biomed. Opt.* **5**, 5–16 (2000).
- [9] T. Koschinsky, L. Heinemann, *Diabetes Metab. Res. Rev.* **17**, 113–123 (2001).
- [10] H. M. Heise, in *Handbook of Vibrational Spectroscopy* (Hrgs.: J. M. Chalmers, P. R. Griffiths), Wiley, Chichester, Bd. 5, S. 3280–3293 (2002).
- [11] M. R. Robinson, R. P. Eaton, D. M. Haaland, G. W. Koeppe, E. V. Thomas, B. R. Stallard, P. L. Robinson, *Clin. Chem.* **38**, 1618–22 (1992).
- [12] R. Marbach, T. Koshinsky, F. A. Gries, H. M. Heise, *Appl. Spectrosc.* **47**, 874–881 (1993).
- [13] H. M. Heise, R. Marbach, T. Koschinsky, F. A. Gries, *Artif. Organs.* **18**, 439–47 (1994).
- [14] C. Fischbacher, K. U. Jagemann, K. Danzer, U. A. Müller, L. Papenkordt, J. Schuler, *Fresenius J. Anal. Chem.* **359**, 78–82 (1997).
- [15] U. A. Müller, B. Mertes, C. Fischbacher, K. U. Jageman, K. Danzer, *Int. J. Artif. Organs* **20**, 285–290 (1997).

- [16] J. J. Burmeister, H. Chung, M. A. Arnold, *Photochem. Photobiol.* **67**, 50–5 (1998).
- [17] J. J. Burmeister, M. A. Arnold, *LEOS Newslett.* **12**, 6–9 (1998).
- [18] K. Danzer, C. Fischbacher, K. U. Jagemann, K. J. Reichelt, *LEOS Newslett.* **12**, 9–11 (1998).
- [19] S. F. Malin, T. L. Ruchti, T. B. Blank, S. N. Thennadil, S. L. Monfre, *Clin. Chem.* **45**, 1651–1658 (1999).
- [20] J. J. Burmeister, M. A. Arnold, *Clin. Chem.* **45**, 1621–1627 (1999).
- [21] J. J. Burmeister, M. A. Arnold, G. W. Small, *Diabetes Technol. Ther.* **2**, 5–16 (2000).
- [22] H. M. Heise, A. Bittner, *J. Mol. Struct.* **348**, 21–24 (1995).
- [23] M. Shichiri, T. Uemura, K. Nishida, *LEOS Newslett.* **12**, 14–16 (1998).
- [24] H. M. Heise, R. Marbach, *Cell. Mol. Biol.* **44**, 899–912 (1998).
- [25] R. Nießner, G. Spanner, Photoakustischer Sensor, Deutsches Patent DE 4400674 C2 (26.10.1995).
- [26] R. Nießner, G. Spanner, Verfahren und Vorrichtung zur Messung der Konzentration eines in einer Probe enthaltenen Analyten, Deutsches Patent DE 4446390 C1 (04.07.1996).
- [27] S. Y. Wang, C. E. Hasty, P. A. Watson, J. P. Wickstedt, R. D. Stith, W. F. March, *Appl. Opt.* **32**, 925–929 (1993).
- [28] J. P. Wickstedt, R. J. Erckens, M. Motamedi, W. F. March, *SPIE* **2135**, 264–274 (1994).
- [29] J. P. Wickstedt, R. J. Erckens, M. Motamedi, W. F. March, *Appl. Spectrosc.* **49**, 987–993 (1995).
- [30] J. Goetz, M. J., G. L. Coté, R. Erckens, W. March, M. Motamedi, *IEEE Transactions on Biomedical Engineering* **42**, 728–31 (1995).
- [31] A. J. Berger, I. Itzkan, M. S. Feld, *Spectrochim. Acta* **A53**, 287 (1997).
- [32] T.-W. Koo, A. J. Berger, I. Itzkan, G. Horowitz, M. S. Feld, *LEOS Newslett.* **12**, 18–19 (1998).

- [33] J. Lambert, M. Storrie-Lombardi, M. Borchert, *LEOS Newslett.* **12**, 19–22 (1998).
- [34] M. S. Borchert, M. C. Storrie-Lombardi, J. J. Lambert, *Diabetes Tech. Ther.* **1**, 145–151 (1999).
- [35] J. L. Lambert, J. M. Morookian, S. J. Sirk, M. S. Borchert, *J. Raman Spectrosc.* **33**, 524–529 (2002).
- [36] W. March, R. Engerman, B. Rabinovitch, *Trans. - Am. Soc. Artif. Int. Organs* **25**, 28–31 (1979).
- [37] D. A. Gough, *Diabetes Care* **5**, 226–273 (1982).
- [38] B. Rabinovitch, W. F. March, R. L. Adams, *Diabetes Care* **39**, 752–756 (1982).
- [39] J.-U. Menzebach, Dissertation, Universität Essen (1996).
- [40] B. D. Cameron, H. W. Gorde, B. Satheesan, G. L. Coté, *Diabetes Tech. Ther.* **1**, 135–143 (1999).
- [41] T. J. Farrell, M. S. Patterson, B. Wilson, *Medical Physics* **19**, 879–888 (1992).
- [42] M. Kohl, M. Essenpreis, M. Cope, *Phys. Med. Biol.* **40**, 1267–1287 (1995).
- [43] L. Heinemann, G. Schmelzeisen-Redeker, *Diabetologia* **41**, 848–854 (1998).
- [44] J. N. Roe, B. R. Smoller, *Crit. Rev. Ther. Drug Carr. Syst.* **15**, 199–241 (1998).
- [45] R. W. Waynant, V. M. Chenault, *LEOS Newslett.* **12**, 3–6 (1998).
- [46] J. Backhaus, D. Böcker, B. Schrader, W. Schrader, H.-U. Menzebach, E. Schmidt, Verfahren zur in-vivo Bestimmung einer optischen Eigenschaft des Kammerwassers des Auges, (09.12.1993) Europäisches Patent EP 0 603 658 B1, erteilt am 24.02.1999.
- [47] J. Backhaus, D. Bocker, B. Schrader, W. Schrader, H.-U. Menzebach, E. Schmidt, Device for the in vivo Determination of an Optical Property of the Aqueous Humour of the Eye, US Patent Nr. 5,535,743 (16.07.1996).

- [48] W. Schrader, B. Schrader, Verfahren und Vorrichtung zur Automatischen Messung der Konzentration von Komponenten des Augen-Vorderkammerwassers sowie Verwendung derselben, Deutsche Patentanmeldung 19830541 A1 (08.07.1998), Offenlegung am 13.01.2000.
- [49] (01.05.2002). [Http://www.uni-regensburg.de/Fakultaeten/Medizin/Augenheilkunde/auge1.html](http://www.uni-regensburg.de/Fakultaeten/Medizin/Augenheilkunde/auge1.html).
- [50] R. A. Farrell, in *Principles and Practice of Ophthalmology* (Hrsg.: D. M. Albert, F. A. Jakobiec, N. L. Robinson), W. B. Saunders, Philadelphia, S. 64 – 80 (1994).
- [51] L. Hansen, *Augenheilkunde systematisch*, Uni-Med Verlag AG, Bremen (1997).
- [52] E. A. Boettner, J. R. Wolter, *Invest. Ophthalmol.* **1**, 776–783 (1962).
- [53] D. M. Maurice, *J. Physiol.-London* **136**, 263–286 (1957).
- [54] H. Davson, *Physiology of the Eye*, Churchill Livingstone, Edinburgh (1980).
- [55] R. Moses, *Adler's Physiology of the Eye*, Mosby Company, St. Luis (1987).
- [56] J. W. Rohen, *Funktionelle Anatomie des Nervensystems*, Schattauer, Stuttgart (1978).
- [57] W. Haigis, in *9. Kongr. d. Dt. Ges. f. Intraokularlinsen Implant.*, Kiel 1995, Springer, Berlin, Kiel (1996).
- [58] C. F. S. F. Pavlin, *Ultrasound-Biomicroscopy of the Eye*, Springer, Berlin (1995).
- [59] W. Haigis, Private Mitteilung (2002).
- [60] A. Gullstrand, in *Handbuch der physiologischen Optik von H. von Helmholtz* (Hrsg.: W. Nagel), Leopold Voss, Hamburg (1909).
- [61] L. F. Garner, M. K. H. Yap, *Ophthalmic Physiol. Opt.* **17**, 12–17 (1997).
- [62] J. Schelenz, H. Kilp, H. Paulmann, *Fortschr. Ophthalmol.* **80**, 155–158 (1983).
- [63] P. Rysa, J. Sarvaranta, *Acta Ophthalmol.* **52**, 810–816 (1974).
- [64] P. Rysa, J. Sarvaranta, *Acta Ophthalmol. Suppl.* **123**, 234–239 (1974).

- [65] J. Alio, M. Padron, *Ophthalmic Res.* **14**, 153–159 (1982).
- [66] M. L. Sears, in *Principles and Practice of Ophthalmology* (Hrgs.: D. M. Albert, F. A. Jakobiec, N. L. Robinson), W. B. Saunders, Philadelphia, S. 182 – 205 (1994).
- [67] M. Hayashi, M. E. Yablonski, C. Boxtrud, N. Fong, C. Berger, L. J. Jovanovic, *Brit. J. Ophthalmol.* **73**, 621–623 (1989).
- [68] J. DiMattio, *Exp. Eye Res.* **55**, 337–344 (1992).
- [69] S. Pohjola, *Acta Ophthalmol. Suppl.* **88**, S1–80 (1966).
- [70] C. Chou, C. Y. Han, W. C. Kuo, Y. C. Huang, C. M. Feng, J. C. Shyu, *Appl. Opt.* **37**, 3553–3557 (1998).
- [71] J. DiMattio, J. A. Zadunaisky, *Exp. Eye Res.* **32**, 517–532 (1981).
- [72] D. E. Gaasterland, J. E. Pederson, H. M. Maclellan, V. N. Reddy, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **18**, 1139–1150 (1979).
- [73] O. Kleinfeld, H. C. Neumann, *Klin. Monatsbl. Augenheilk.* **135**, 224–226 (1959).
- [74] E. d. Berardinis, O. Tieri, A. Polzella, N. Iuglio, *Exp. Eye Res.* **4**, 179–186 (1965).
- [75] H. Remky, *Graef. Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* **157**, 506–521 (1956).
- [76] A. M. Walker, *J. Biol. Chem.* **101**, 269–287 (1933).
- [77] L. Bito, *Exp. Eye Res.* **10**, 102–116 (1970).
- [78] H. Grönvall, *Acta Ophthalmol. Suppl* **14**, S279 (1937).
- [79] U. B. G. Laurent, *Exp. Eye Res.* **33**, 147–155 (1981).
- [80] J. P. Dernouchamps, *Doc. Ophthalmol.* **53**, 193–248 (1982).
- [81] M. V. Riley, *Invest. Ophthalmol.* **11**, 600–607 (1972).
- [82] A. Ringvold, *Acta Ophthalmol.* **58**, 69–82 (1980).
- [83] T. K. Koskela, G. R. Reiss, R. F. Brubaker, R. D. Ellefson, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **30**, 2265–2267 (1989).

- [84] J. Miller, D. G. Uttamchandani, *Proc. SPIE-Int. Soc. Opt. Eng. Optical Fibers and Sensors for Medical Applications* **4253**, 118–124 (2001).
- [85] H. v. Helmholtz, *Handbuch der physiologische Optik*, Bd. 1, Verlag von Leopold Voss, Leipzig (1867).
- [86] F. Pedrotti, L. Pedrotti, W. Bausch, H. Schmidt, *Optik: Eine Einführung*, Prentice Hall, München (1996).
- [87] A. Vogt, *Klin. Monatsbl. Augenheilkd.* **63**, 233–234 (1919).
- [88] M. Wenzel, M. Reim, M. Heinze, A. Bocking, *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* **226**, 449–454 (1988).
- [89] J. Mellerio, in *Principles and Practice of Ophthalmology* (Hrgs.: D. M. Albert, F. A. Jakobiec, N. L. Robinson), W. B. Saunders, Philadelphia, S. 1326–1345 (1994).
- [90] H. Stiller, B. Rassow, *Klin. Monatsbl. Augenheilk.* **199**, 62–66 (1991).
- [91] D. B. Kirby, R. v. E. Wiener, *Trans. Am. Acad. Ophthalmol. Otolaryngol.* **37**, 142–212 (1932).
- [92] D. B. Kirby, R. v. E. Wiener, *Arch. Ophthalmol.* **10**, 28–36 (1933).
- [93] W. F. Schrader, R. S. Grajewski, P. Meuer, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **41**, S77 (2000).
- [94] R. Grajewski, P. Meuer, W. F. Schrader, *Ophthalmologe Suppl.* **97**, S22 (2000).
- [95] W. F. Schrader, B. Stehberger, P. Meuer, *ARVO - abstract* (2002).
- [96] A. Bruun Laursen, S. E. Lorentzen, *Acta Ophthalmol.* **53**, 553–62 (1975).
- [97] D. H. Williams, I. Flemming, *Strukturaufklärung in der organischen Chemie*, Thieme, Stuttgart, 6 Aufl. (1991).
- [98] G. Gauglitz, in *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, VCH, Weinheim, Bd. B5, S. 383–429 (1994).
- [99] C. W. Brown, *Applied Spectroscopy Reviews* **35**, 151–173 (2000).
- [100] M. Otto, *Analytische Chemie*, Wiley-VCH, Weinheim, 2 Aufl. (2000).
- [101] L. G. Hargis, J. A. Howell, R. E. Sutton, *Anal. Chem.* **68**, 169–183 (1996).

- [102] J. A. Howell, in *Handbook of Instrumental Techniques for Analytical Chemistry* (Hrsg.: F. A. Settle), Prentice Hall, London, S. 481–506 (1997).
- [103] J. Böcker, *Spektroskopie*, Vogel Verlag, Würzburg (1997).
- [104] J. Workman, in *Applied Spectroscopy: A Compact Reference for Practitioners* (Hrsg.: J. Workman, A. W. Springsteen), Academic Press, London, S. 29–48 (1998).
- [105] J. A. Howell, R. E. Sutton, *Analytical Chemistry* **70**, 107R–118R (1998).
- [106] E. W. Ciurczak, *Pharmaceutical Technology* **23**, 36–42 (1999).
- [107] H. Rein, *Deutsche Apotheker Zeitung* **141**, 53–64 (2001).
- [108] W. Steglich, B. Fugmann, S. Lang-Fugmann (Hrsg.:), *Römpp Lexikon: Naturstoffe*, Thieme, Stuttgart (1997).
- [109] W. Pschyrembel, *Klinisches Wörterbuch*, de Gruyter, Berlin, 257. Aufl. (1994).
- [110] The Diabetes Control and Complications Trial Research Group, *N. Engl. J. Med.* **329**, 977–86 (1993).
- [111] The Diabetes Control and Complications Trial Research Group, *J. Pediat.* **125**, 177–88 (1994).
- [112] D. B. Sacks, D. E. Bruns, D. E. Goldstein, N. K. Maclaren, J. M. McDonald, M. Parrot, *Clin. Chem.* **48**, 436–472 (2002).
- [113] B. Harrison, R. Markes, P. Bradley, I. A. Ismail, *Clin. Biochem.* **29**, 521–7 (1996).
- [114] K. L. Li, H. S. Huang, J. D. Lin, B. Y. Huang, M. J. Huang, P. W. Wang, *Lab. Med.* **25**, 585–591 (1994).
- [115] M. J. Tierney, Y. Jayalakshmi, N. A. Parris, M. P. Reidy, C. Uhegbu, P. Vijayakumar, *Clin. Chem.* **45**, 1681–1683 (1999).
- [116] J. Kost, S. Mitragotri, R. A. Gabbay, M. Pishko, R. Langer, *Nature Med.* **6**, 347–350 (2000).
- [117] M. A. Arnold, in *Handbook of Clinical Automation, Robotics, and Optimization* (Hrsg.: G. J. K. Walsh, J.), John Wiley & Sons, Inc., New York, S. 631–647 (1996).

- [118] H. Mark, in *Handbook of Vibrational Spectroscopy* (Hrgs.: J. M. Chalmers, P. R. Griffiths), Wiley, Chichester, Bd. 3, S. 2258–2275 (2002).
- [119] H. W. Siesler, Y. Ozaki, S. Kawata, H. M. Heise, *Near-Infrared Spectroscopy: Principles, Instruments, Applications*, Wiley, Weinheim (2002).
- [120] I. Murray, I. A. Cowe, *Making Light Work: Advances in Near Infrared Spectroscopy*, VCH, Weinheim (1992).
- [121] H. Mark, in *Near-Infrared Applications in Biotechnology* (Hrgs.: R. Raghavachari), Practical Spectroscopy, Marcel Dekker, New York, S. 293–322 (2001).
- [122] Y. Ozaki, in *Near-Infrared Spectroscopy: Principles, Instruments, Applications* (Hrgs.: H. W. Siesler, Y. Ozaki, S. Kawata, H. M. Heise), Wiley, Weinheim, S. 179–211 (2002).
- [123] A. Grant, A. M. C. Davies, T. Bilverstone, *Analyst* **114**, 819–822 (1989).
- [124] H. W. Siesler, in *Near-Infrared Spectroscopy: Principles, Instruments, Applications* (Hrgs.: H. W. Siesler, Y. Ozaki, S. Kawata, H. M. Heise), Wiley, Weinheim, S. 1–10 (2002).
- [125] E. W. Ciurczak, in *Near-Infrared Applications in Biotechnology* (Hrgs.: R. Raghavachari), Practical Spectroscopy, Marcel Dekker, New York, S. 323–346 (2001).
- [126] E. W. Ciurczak, J. K. Drennen, in *Near-Infrared Applications in Biotechnology* (Hrgs.: R. Raghavachari), Practical Spectroscopy, Marcel Dekker, New York, S. 347–364 (2001).
- [127] Y. Ozaki, K. Murayama, in *Infrared and Raman spectroscopy of biological materials* (Hrgs.: H.-U. Gremlich, B. Yan), Marcel Dekker, New York, S. 515–566 (2001).
- [128] H. W. Siesler, in *Near-Infrared Spectroscopy: Principles, Instruments, Applications* (Hrgs.: H. W. Siesler, Y. Ozaki, S. Kawata, H. M. Heise), Wiley, Weinheim, S. 213–245 (2002).
- [129] H. W. Siesler, in *Near-Infrared Spectroscopy: Principles, Instruments, Applications* (Hrgs.: H. W. Siesler, Y. Ozaki, S. Kawata, H. M. Heise), Wiley, Weinheim, S. 247–268 (2002).

- [130] S. Kawano, in *Near-Infrared Spectroscopy: Principles, Instruments, Applications* (Hrgs.: H. W. Siesler, Y. Ozaki, S. Kawata, H. M. Heise), Wiley, Weinheim, S. 269–287 (2002).
- [131] H. M. Heise, in *Near-Infrared Spectroscopy: Principles, Instruments, Applications* (Hrgs.: H. W. Siesler, Y. Ozaki, S. Kawata, H. M. Heise), Wiley, Weinheim, S. 289–333 (2002).
- [132] Das Vector22/N-C: Benutzerhandbuch, Techn. Ber., BRUKER Analytik GmbH (1998).
- [133] B. Schrader, *Infrared and Raman Spectroscopy*, VCH, Weinheim (1995).
- [134] Near Infrared Analysis: 2.1.1 NIR Process Analysis, Techn. Ber., Bran+Luebbe GmbH (2001).
- [135] S. Kawata, in *Near-Infrared Spectroscopy: Principles, Instruments, Applications* (Hrgs.: H. W. Siesler, Y. Ozaki, S. Kawata, H. M. Heise), Wiley, Weinheim, S. 42–73 (2002).
- [136] CeramOptec (15.07.2002).  
[Http://www.ceramoptec.de/frameindustrialfiber.htm](http://www.ceramoptec.de/frameindustrialfiber.htm).
- [137] K. Buijs, G. R. Choppin, *J. Chem. Phys.* **39**, 2035–41 (1963).
- [138] G. R. Choppin, J. R. Downey, *J. Chem. Phys.* **56**, 5899–904 (1972).
- [139] H. Maeda, Y. Ozaki, M. Tanaka, N. Hayashi, T. Kojima, *J. Near Infrared Spectrosc.* **3**, 191–201 (1995).
- [140] V. J. Frost, K. Molt, *J. Mol. Struct.* **410-411**, 573–579 (1997).
- [141] I. Reeves, James B., *J. AOAC Int.* **77**, 814–20 (1994).
- [142] K. Molt, A. Niemoller, Y. J. Cho, *J. Mol. Struct.* **410-411**, 565–572 (1997).
- [143] S. Berentsen, T. Stolz, K. Molt, *J. Mol. Struct.* **410-411**, 581–585 (1997).
- [144] P. D. Vasko, J. Blackwell, J. L. Koenig, *Carbohydrate Research* **19**, 297–310 (1971).
- [145] P. D. Vasko, J. Blackwell, J. L. Koenig, *Carbohydrate Research* **23**, 407–416 (1972).

- [146] J. J. Cael, J. L. Koenig, J. Blackwell, *Carbohydrate Research* **32**, 79–91 (1974).
- [147] M. J. D. Low, R. T. Yang, *Spectroc. Acta Pt. A-Molec. Biomolec. Spectr.* **A 29**, 1761–1772 (1973).
- [148] O. H. Wheeler, *Chemical Reviews* **59**, 629–666 (1959).
- [149] R. F. Goddu, D. A. Delker, *Anal. Chem.* **32**, 140–141 (1960).
- [150] L. Bokobza, in *Near-Infrared Spectroscopy: Principles, Instruments, Applications* (Hrsgs.: H. W. Siesler, Y. Ozaki, S. Kawata, H. M. Heise), Wiley, Weinheim, S. 11–41 (2002).
- [151] M. Blanco, J. Coello, H. Iturriaga, S. MasPOCH, C. de la Pezuela, *Talanta* **40**, 1671–6 (1993).
- [152] G. Sinnaeve, P. Dardenne, R. Agneessens, R. Biston, *J. Near Infrared Spectrosc.* **2**, 79–84 (1994).
- [153] P. R. Griffiths, in *Handbook of Vibrational Spectroscopy* (Hrsgs.: J. M. Chalmers, P. R. Griffiths), Wiley, Chichester, Bd. 3, S. 2225–2234 (2002).
- [154] H. Martens, T. Næs, *Multivariate Calibration*, John Wiley & Sons, Chichester (1993).
- [155] R. Henrion, G. Henrion, *Multivariate Datenanalyse: Methodik und Anwendung in der Chemie und verwandten Gebieten*, Springer, Heidelberg (1994).
- [156] K. R. Beebe, R. J. Pell, M. B. Seasholtz, *Chemometrics: A Practical Guide*, Wiley, New York (1998).
- [157] K. Danzer, H. Hobert, C. Fischbacher, K.-U. Jagemann, *Chemometrik: Grundlagen und Einführung*, Springer, Heidelberg (2001).
- [158] H. Martens, M. Martens, *Introduction to multivariate data analysis for understanding quality*, J. Wiley & Sons, Chichester (2001).
- [159] S. d. Jong, *Chemom. Intell. Lab. Sys.* **18**, 251–263 (1993).
- [160] J. Shao, *J. Am. Statist. Assoc.* **88**, 486–494 (1993).
- [161] K. Baumann, H. Albert, M. v. Korff, *J. Chemometrics* **16**, 339–350 (2002).

- [162] K. Baumann, H. Albert, M. v. Korff, *J. Chemometrics* **16**, 351–360 (2002b).
- [163] Multivariate Kalibration: Ein praktischer Leitfaden zur Methodenentwicklung in der quantitativen Analytik, Techn. Ber., BRUKER Analytik GmbH (1998).
- [164] H. Petersen, *Grundlagen der statistischen Versuchsplanung*, ecomed, Landsberg/Lech (1991).
- [165] The BD Consumer Health Care Error Grid. Ftp.BDCHC.com.
- [166] W. L. Clarke, D. Cox, L. A. Gonder Frederick, W. Carter, S. L. Pohl, *Diabetes Care* **10**, 622–8 (1987).
- [167] J. L. Parkes, S. L. Slatin, S. Pardo, B. H. Ginsberg, *Diabetes Care* **23**, 1143–8 (2000).
- [168] P. D. Wentzell, T. P. Doherty, S. R. Crouch, *Analytical Chemistry* **59**, 367–71 (1987).
- [169] S. E. Bialkowski, *Analytical Chemistry* **61**, 1308–10 (1989).
- [170] J. Fan, I. Gijbels, *Local Polynomial Modelling and its Applications*, Chapman & Hall, London (1996).
- [171] T. Mahl, Diplomarbeit, Universität Karlsruhe (2002).
- [172] R. Rawer, T. Mahl, W. Stork, Private Mitteilung (2001).



# Anhang

---

# A Messparameter für das Vector22/N-C (Bruker)

Liste der für Messungen am Vector22/N-C verwendeten Parameter. Die sich ändern, kursiv gedruckten Parameter sind, soweit relevant, in den entsprechenden Kapiteln angegeben.

Parameter	Werte
<b>Acquisition Parameters</b>	
Acquisition Mode	Double Sided, Forward-Backward
Correlation Test Mode	Around Peak High
Delay Before Measurement	0
Stabilization Delay	0
Wanted High Frequency Limit	12000,000000
Wanted Low Frequency Limit	4000,000000
Sample Scans	100
Result Spectrum	Absorbance
<i>Resolution</i>	<i>8,000000</i>
<i>To do list</i>	
<b>FT - Parameters</b>	
Apodization Function	Blackman-Harris-3-Term
End Frequency Limit for File	4000,000000
Strat Frequency Limit for File	12500,000000
Phase Resolution	64,000000
Phase Correction Mode	Power Spectrum
Stored Phase Mode	No
Zero Filling Factor	2

Parameter	Werte
<b>Instrument Parameters</b>	
High Folding Limit	15799,830000
Low Folding Limit	0,000000
Laser Wavenumber	15799,830000
<i>Absolute Peak Pos. in Laser*2</i>	<i>63593</i>
Sample Spacing Divisor	1
<i>Actual Signal Gain</i>	<i>2</i>
Switch Gain Position	1689
<i>Scan time (sec)</i>	<i>59,770470</i>
<i>Peak Amplitude</i>	<i>2795</i>
<i>Peak Location</i>	<i>3555</i>
<i>Number of Good FW Scans</i>	<i>50</i>
<i>Number of Bad FW Scans</i>	<i>0</i>
<i>Backward Peak Amplitude</i>	<i>-1317</i>
<i>Backward Peak Location</i>	<i>3551</i>
<i>Number of Good BW Scans</i>	<i>50</i>
<i>Number of Bad BW Scans</i>	<i>0</i>
Instrument Type	Vector22/N-C
<i>Number of Sample Scans</i>	<i>100</i>
<i>Number of Background Scans</i>	<i>100</i>
<i>Running Sample Number</i>	<i>5018</i>
<b>Optic Parameters</b>	
Aperture Setting	open
Measurement Channel	Front
<i>Detector Setting</i>	<i>InGaAs</i>
Low Pass Filter	1; 16 KHz
Preamplifier Gain	0
<i>Source Setting</i>	<i>Tungsten (NIR)</i>
Scanner Velocity	6; 10 KHz
<i>Signal Gain, Sample</i>	<i>2</i>
<i>Signal Gain Background</i>	<i>1</i>
External Synchronisation	OFF

## B Proben-Bezeichnungen der Glucose-Lösungen

Alle Proben wurden mit 0,05 %  $\text{NaN}_3$  versetzt und mit Reinstwasser aufgefüllt und, soweit nicht anders angegeben, einzeln eingewogen. Die Bestimmung der Glucose-Konzentration wurde im Labor der Neurologischen Klinik, Universität Würzburg, nach der Hexokinase-Methode durchgeführt. Alle Konzentrations-Angaben sind in mg/dl. Die File-Namen der Spektren (Probe\_x.\*) bestehen aus der Bezeichnung der Probe und einem Zähler  $x$  für die Zahl der wiederholten Messungen. Angegeben sind hier nur die Proben-Bezeichnungen.

### B.1 Proben für das FT-Spektrometer MB 160

Probe	Einwaage [mg/dl]	Analyse [mg/dl]	Probe	Einwaage [mg/dl]	Analyse [mg/dl]
0	0	—	17	170,1	175
1	9,6	10	18	179,6	185
2	20,4	21	19	189,6	193
3	30,5	31	20	200,0	201
4	40,4	42	21	210,0	214
5	50,2	51	22	220,0	221
6	60,2	61	23	230,0	228
7	70,3	72	24	240,2	236
8	80,3	83	25	250,3	252
9	89,9	94	26	260,4	243
10	100,1	103	27	270,0	265
11	109,5	112	28	280,2	287
12	120,0	124	29	289,4	296
13	130,4	129	30	300,1	310
14	140,0	143	31	500,1	513
15	149,9	151	32	750,4	740
16	160,0	165	33	1000,0	905

**Verdünnungsreihe:**

Probe	Analyse [mg/dl]	Probe	Analyse [mg/dl]	Probe	Analyse [mg/dl]
34	504	44	142	54	242
35	9	45	177	55	315
36	17	46	214	56	854
37	52	47	283	57	27
38	58	48	793	58	91
39	102	49	41	59	109
40	155	50	75	60	137
41	205	51	82	61	180
42	254	52	121	62	226
43	706	53	162	63	277

Eingewogene Proben: 34 (5000,3 mg / 1000 ml), 43 (3500,0 mg / 500 ml),  
48 (8000,1 mg / 1000 ml) und 56 (4500,1 mg / 500 ml).

## B.2 Proben für das InfraPrime und InfraProver

Probe	Analyse [mg/dl]	Probe	Analyse [mg/dl]	Probe	Analyse [mg/dl]
1	8	13	130	25	248
2	19	14	139	26	264
3	27	15	140 <sup>†</sup>	27	266
4	37	16	160	28	279
5	49	17	158 <sup>†</sup>	29	289
6	59	18	178	30	302
7	64	19	188	31	302 <sup>†</sup>
8	80	20	193	32	320
9	85	21	209	33	309 <sup>†</sup>
10	103	22	218	34	333
11	111	23	230	35	340
12	121	24	236		

<sup>†</sup> Ausreißer.

## B.3 Proben für das V 570

Probe	Einwaage [mg/dl]	Analyse [mg/dl]	Probe	Einwaage [mg/dl]	Analyse [mg/dl]
A0	0	—	A16	160,3	156
A1	10,0	7	A17	170,4	171
A2	19,8	15	A18	180,1	187
A3	29,8	25	A19	189,9	188
A4	39,8	41	A20	200,1	200
A5	49,8	50	A21	210,0	217 <sup>†</sup>
A6	59,7	61	A22	218,9	216
A7	70,2	68	A23	230,3	231
A8	79,9	46 <sup>†</sup>	A24	240,3	237
A9	90,3	91	A25	250,8	246
A10	99,8	94	A26	260,1	262
A11	110,0	111	A27	270,0	251
A12	120,3	118	A28	280,2	284
A13	129,0	130	A29	289,3	295
A14	140,1	135	A30	300,1	270
A15	150,4	152			

<sup>†</sup> Ausreißer.

### Verdünnungsreihe:

Probe	Analyse [mg/dl]	Probe	Analyse [mg/dl]	Probe	Analyse [mg/dl]
B1	515	B11	145	B21	170
B2	708	B12	171	B22	86
B3	7	B13	60	B23	325
B4	17	B14	277	B24	27
B5	52	B15	761	B25	92
B6	43	B16	849	B26	79
B7	101	B17	35	B27	128
B8	123	B18	56	B28	155
B9	200	B19	85	B29	200
B10	253	B20	115	B30	97

Eingewogene Proben: B1 (2500,7 mg / 500 ml), B2 (1750,2 mg / 250 ml), B15 (2000,5 mg / 250 ml) und B16 (2250,4 mg / 250 ml).

## B.4 Proben für die dispersiven NIR-Messungen

Probe	Einwaage [mg/dl]	Analyse [mg/dl]	Probe	Einwaage [mg/dl]	Analyse [mg/dl]
d599g	40	41	d616g	350	346
d600g	110	97	d617g	310	311
d601g	120	97 <sup>†</sup>	d618g	90	88
d602g	160	155	d619g	80	82
d603g	60	53	d620g	290	293
d604g	240	224	d621g	280	287
d605g	220	141 <sup>†</sup>	d622g	210	208
d606g	100	90	d623g	230	225
d607g	140	147	d624g	250	214 <sup>†</sup>
d608g	150	150	d625g	330	256 <sup>†</sup>
d609g	300	283	d626g	30	34
d610g	20	21	d627g	190	191
d611g	200	205	d628g	340	213 <sup>†</sup>
d612g	50	55	d629g	170	170
d613g	270	274	d630g	70	68
d614g	130	133	d631g	320	300 <sup>†</sup>
d615g	260	264	d632g	180	170

<sup>†</sup>Ausreißer.

## B.5 Proben für die FT-NIR-Messungen

### 1. Proben-Satz:

Probe	Einwaage [mg/dl]	Analyse [mg/dl]		Probe	Einwaage [mg/dl]	Analyse [mg/dl]	
311g	20	20	V	330g	29	27	V
312g	48	47	T	331g	44	43	T
313g	67	64	K	332g	63	60	K
314g	76	74	V	333g	103	102	V
315g	87	85	T	334g	151	139	T
316g	106	99	K	335g	184	180	K
317g	119	112	V	336g	189	183	V
318g	129	127	T	337g	200	158	
319g	141	134	K	338g	232	226	T

Fortsetzung nächste Seite

Fortsetzung

Probe	Einwaage [mg/dl]	Analyse [mg/dl]		Probe	Einwaage [mg/dl]	Analyse [mg/dl]	
320g	156	152	V	339g	240	237	K
321g	175	169	T	340g	249	236	V
322g	207	202	K	341g	269	257	T
323g	222	214	V	342g	280	267	K
324g	255	252	T	343g	288	278	V
325g	305	277	K	344g	310	301	T
326g	324	312	V	345g	338	327	K
327g	332	326	T	346g	351	352	V
329g	10	8	K				

K: Konstruktions-, V: Validier-, T: Test-Datensatz.

Ausreißer: 311g\_002, 329g\_001, 337g\_001, 337g\_002, 337g\_003, 342g\_002, 346g\_002.

## 2. Proben-Satz:

Probe	Einwaage [mg/dl]	Analyse [mg/dl]		Probe	Einwaage [mg/dl]	Analyse [mg/dl]	
348g	14	14	T	367g	37	41	T
349g	64	64	K	368g	48	48	V
350g	70	68	V	369g	83	81	V
351g	102	100	T	370g	86	84	T
352g	112	114	K	371g	122	123	V
353g	133	133	V	372g	140	140	V
354g	159	155	T	373g	146	147	T
355g	182	178	K	374g	172	169	V
356g	199	194	V	375g	195	203	V
357g	210	209	T	376g	223	225	T
358g	230	230	K	377g	230	233	V
359g	257	245	V	378g	242	244	V
360g	289	266	T	379g	272	273	T
361g	308	302	K	380g	283	282	V
362g	330	324	V	381g	300	287	V
363g	349	340	T	382g	324	330	T
365g	19	19	K	383g	339	331	V
366g	34	35	V				

K: Konstruktions-, V: Validier-, T: Test-Datensatz.

Ausreißer: 351g\_001, 352g\_002, 355g\_002, 356g\_003, 358g\_002, 360g\_002, 360g\_003, 361g\_001, 363g\_001.

## B.6 Proben für die Bestimmung der Reproduzierbarkeit

Tag 1 (Operator B):

Probe	Einwaage [mg/dl]	Probe	Einwaage [mg/dl]
437n	0	445g	158
438g	17	446g	179
439g	40	447g	201
440g	60	448g	216
441g	84	449g	242
442g	102	450g	262
443g	119	451g	280
444g	142	452g	298

Tag 2 (Operator A):

Probe	Einwaage [mg/dl]	Probe	Einwaage [mg/dl]
453n	0	461g	159
454g	22	462g	181
455g	40	463g	201
456g	62	464g	222
457g	82	465g	241
458g	101	466g	261
459g	121	467g	280
460g	142	468g	302

Tag 3 (Operator B):

Probe	Einwaage [mg/dl]	Probe	Einwaage [mg/dl]
469n	0	477g	162
470g	21	478g	182
471g	41	479g	202
472g	59	480g	220
473g	80	481g	240
474g	102	482g	260
475g	120	483g	279
476g	139	484g	300

Tag 4 (Operator A):

Probe	Einwaage [mg/dl]	Probe	Einwaage [mg/dl]
485n	0	493g	161
486g	19	494g	178
487g	42	495g	199
488g	62	496g	220
489g	81	497g	239
490g	101	498g	261
491g	120	499g	280
492g	140	500g	298

Tag 5 (Operator B):

Probe	Einwaage [mg/dl]	Probe	Einwaage [mg/dl]
505n	0	513g	160
506g	20	514g	179
507g	40	515g	200
508g	60	516g	219
509g	81	517g	242
510g	101	518g	260
511g	120	519g	281
512g	140	520g	301

Tag 6 (Operator A):

Probe	Einwaage [mg/dl]	Probe	Einwaage [mg/dl]
521n	0	529g	162
522g	19	530g	181
523g	40	531g	200
524g	60	532g	221
525g	80	533g	239
526g	102	534g	259
527g	119	535g	280
528g	139	536g	301



## *Danksagung*

Auch diese Arbeit verdankt ihre Entstehung der Unterstützung vieler Personen, daher möchte ich zum Abschluss all denen danken, die mir während meiner Dissertation mit Rat und Tat zur Seite standen.

Prof. Dr. W. Kiefer möchte ich für die Aufnahme in den Arbeitskreis und den großen Freiraum bei der Durchführung meiner Arbeit danken. Die Teilnahme an verschiedenen internationalen Tagungen waren für mich nicht nur in wissenschaftlicher Hinsicht wertvolle Erfahrungen.

PD Dr. W. Schrader danke ich für die Möglichkeit, einen Teil dieser Arbeit an der Universitätsaugenklinik, Würzburg durchzuführen. Prof. Dr. B. Schrader stand mir bei Fragen zu den verschiedenen Geräten stets hilfreich zur Seite und hat mir mit seiner Einführung in die nicht-invasive NIR-Spektroskopie sehr geholfen, dafür möchte ich mich herzlich bedanken.

Für die stete Gesprächsbereitschaft und die zahlreichen konstruktiven Vorschläge möchte ich Prof. Dr. J. Popp (inzwischen Universität Jena) danken.

Das gute Klima, das Petra Rösch, Ralph Geßner und Marion Strehle im Zimmer verbreiteten, hat viel zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Bei Petra Rösch möchte ich mich vor allem für die Korrektur meiner ersten Version und die vielen aufbauenden Worte bedanken.

Die Beseitigung einer Vielzahl der Rechtschreibfehler geht auf unsere Sekretärin Frau Müller zurück. Ich hätte wahrscheinlich nie auch nur einen Bruchteil der Komma- und Schreibfehler entdeckt.

Die Feinmechanik- und Elektronikwerkstatt waren immer sehr bemüht, meine Ideen umzusetzen und oft genug auch gleich zu verbessern.

Dem gesamten AKK sei für die gute Stimmung nicht nur an der Uni, sondern auch bei verschiedenen Tagungen gedankt.

Dr. R. Grajewski und Dr. B. Stehberger (Universitätsaugenklinik) danke ich für die medizinische Unterstützung bei den Messungen und dem Labor der neurologischen Klinik für die Analyse meiner unzähligen Glucose-Proben. B. Haka hat diese Arbeit auf ihre medizinische Richtigkeit durchgesehen und mich damit vor allzu schlimmen medizinischen Fehlern bewahrt.

Dr. Knut Baumann (Institut für Pharmazie) hat mir in mehreren Gesprächen die

Chemometrik verständlich gemacht. Ihm möchte ich für die Unterstützung bei der Auswertung, den Interpretationshilfen und seine Diskussionsbereitschaft danken.

R. Rawer und T. Mahl (Universität Karlsruhe) halfen wesentlich bei der Suche nach der Temperatur-Drift.

Die Firmen Bran+Luebbe, ABB und JASCO unterstützen diese Arbeit, indem ich dort Testmessungen durchführen konnte. Der Firma Bruker gilt mein Dank für die schnelle, unkomplizierte Unterstützung bei Geräte-technischen Fragen und der Implementierung des *in-vivo*-Aufbaus in das FT-Spektrometer.

Abschließend möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, die mir stets hilfreich zur Seite stand, und natürlich bei Jan, der mich immer wieder ermutigt hat, weiter zu machen.

# *Lebenslauf*

## **Persönliche Daten**

Name: Petra Meuer  
Geburtsdatum: 20.07.1972  
Geburtsort: Bremen  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Familienstand: ledig

## **Schulbildung**

07/1978 – 06/1980 Grundschule Am Pürschweg, Bremen  
07/1980 – 06/1982 Grundschule Am Dreienkamp, Schwanewede  
07/1982 – 06/1991 Orientierungsstufe und Gymnasialzweig der Waldschule,  
Schwanewede  
05/1991 **Abitur**

## **Studium**

ab WS 1991/92 Studium der Chemie an der Bayerischen Julius-Maximilians-  
Universität, Würzburg  
10/1993 Vordiplom  
11/1996 **Diplomprüfung**  
01/1997 – 01/1998 **Diplomarbeit**, *Hochaufgelöste Fouriertransform Infrarot  
Spektroskopie an Oxetan*

## **Promotion**

seit 04/1998 **Promotionsarbeit**, bei Prof. Dr. W. Kiefer,  
*Spektroskopische Untersuchungen an Kammerwasser:  
in vitro und in vivo*

## **Berufliche Tätigkeiten**

11/1997 – 02/2002 Studentische Hilfskraft und  
Nebenberufliche wissenschaftliche Mitarbeiterin

Würzburg, den

