

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlich-Mathematischen
Gesamtfakultät
der Ruprecht-Karls-Universität
Heidelberg

vorgelegt von
Dipl.-Phys. Christian Vrančić
aus Magdeburg

Tag der mündlichen Prüfung: 23. Mai 2012

Kontinuierliche, reagensfreie Glucosebestimmung

Gutachter: Prof. Dr. Wolfgang Petrich
Prof. Dr. Matthias Weidemüller

Kontinuierliche, reagensfreie Glucosebestimmung

Die häufige Überwachung der Glucosekonzentration kann sowohl akute Risiken als auch Langzeitkomplikationen für Patienten mit Diabetes mellitus, einer Störung des Glucosemetabolismus, verringern. Der in dieser Arbeit vorgestellte Ansatz einer minimal-invasiven, kontinuierlichen Glucosebestimmung nutzt die Spektroskopie molekularer Schwingungen und macht dabei von der hohen Sensitivität und Selektivität der reagensfreien, fasergebundenen Transmissionsspektroskopie im mittleren infraroten Spektralbereich Gebrauch. Quantenchemische Simulationen konnten unter Verwendung von effektiven Fragmentpotentialen den Einfluss des Solvationsprozesses auf die Schwingungsspektren von Glucose beschreiben und für den Fall von 80 gemittelten Einzelspektren mit jeweils 18 umgebenden Wassermolekülen eine sehr gute Korrelation mit experimentellen Daten ($R = 0,941$) erzielen. In Laborversuchen wurde bei Messreihen an wässrigen Testlösungen auf der Basis eines Quantenkaskadenlasers bei einer Emissionswellenlänge von $9,69 \mu\text{m}$ und eines speziell entworfenen faseroptischen Sensors eine rauschäquivalente Vorhersagegenauigkeit von $0,6 \text{ mg/dL}$ bei einer Integrationszeit von 4 s erreicht. Durch diese Ergebnisse konnte erstmals und sehr deutlich die *in-vitro*-Machbarkeit im Kern des Ansatzes belegt werden. Die Experimente wurden flankiert von Untersuchungen zu potenziellen Störsubstanzen und Maßnahmen zur Erhöhung der Biokompatibilität des Fasersensors. Die *in-vivo*-Tauglichkeit eines subkutan implantierten Sensors konnte schließlich in ersten Versuchsreihen demonstriert werden.

Continuous, reagent-free monitoring of glucose

The frequent control of glucose concentration can reduce short-term risks and long-term complications for patients with diabetes mellitus, a disorder of glucose metabolism. The approach of minimally invasive, continuous glucose monitoring presented in this work employs the spectroscopy of molecular vibrations and makes use of the high sensitivity and selectivity of reagent-free, fiber-based transmission spectroscopy in the mid-infrared spectral region. Quantum chemical simulations described the impact of the solvation process onto the vibrational spectrum of glucose using effective fragment potentials. For an averaging over 80 single spectra with 18 surrounding water molecules each, a very good correlation with experimental data ($R = 0.941$) was established. In-vitro measurements with aqueous solutions utilized a quantum cascade laser at an emission wavelength of $9.69 \mu\text{m}$ and a specially designed fiber optical sensor to achieve a noise-equivalent concentration as low as 0.6 mg/dL with an integration time of 4 s . For the first time, the results could clearly show the in-vitro feasibility of the approach. The experiments were accompanied by investigations regarding potentially interfering substances and means to improve the biocompatibility of the fiber sensor. The in-vivo suitability of a subcutaneously implanted sensor could finally be demonstrated in first measurements.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Diabetes mellitus	1
1.2. Kontinuierliche Glucoseüberwachung	3
2. Quantenchemische Simulationen	7
2.1. Theoretische Grundlagen	7
2.2. Methoden	10
2.2.1. Hartree-Fock-Methode	10
2.2.2. Dichtefunktionaltheorie	12
2.2.3. Effektive Fragmentpotenziale	14
2.2.4. Berechnung von Vibrationsspektren	14
2.3. Durchführung	15
2.4. Ergebnisse	18
3. Methoden und Materialien	27
3.1. Spektroskopie molekularer Schwingungen	27
3.2. Experimenteller Aufbau	29
3.2.1. Quantenkaskadenlaser	29
3.2.2. Pyroelektrische Detektoren	31
3.2.3. Lock-in-Verstärker	33
3.2.4. Fluidik-Messsystem	34
3.3. Fasergebundener optischer Sensor	36
3.3.1. Optimierung der Messkavität	37
3.3.2. Sensorfertigung	42
3.3.3. Membranisolierung	43
3.3.4. Dip-Coating-Verfahren	46
3.3.5. Zytotoxizität	46
3.4. Datenanalyse	49
3.4.1. Allan-Formalismus	49
4. Experimenteller Teil	53
4.1. Charakterisierung der Quantenkaskadenlaser	53
4.2. Glucosesensitivität	56
4.3. Chemische Interferenzen	62
4.4. Signalfilterung	65
4.4.1. Lock-in-Einstellungen	65
4.4.2. Fourierfilterung	68

4.5. Externe Störquellen	70
4.5.1. Referenzierung durch zweite Strahlungsquelle	71
4.5.2. Einfluss von Temperaturschwankungen	77
4.6. In-vivo-Erprobung	79
5. Diskussion	91
A. Anhang	105

1. Einleitung

1.1. Diabetes mellitus

Der Begriff Diabetes mellitus beschreibt eine Störung des Kohlenhydrat-, Fett- und Proteinmetabolismus, die auf eine eingeschränkte Insulinproduktion und/oder Wirkung des Insulins zurückzuführen ist [1]. Das Hormon Insulin regelt die Aufnahme des speziellen Kohlenhydrats Glucose („Blutzucker“) seitens der Körperzellen sowie die Glucoseanlagerung in Form von Glykogen im Leber- und Muskelgewebe. Darüber hinaus fördert es den Zuckereinstrom in die Zellen und hemmt gleichzeitig den Fettabbau zur Energiegewinnung (Lipolyse). Die Krankheit geht einher mit chronisch überhöhten Glucosekonzentrationen und neben genetischen Faktoren können eine mangelhafte Ernährung, Übergewicht und Bewegungsmangel als mögliche Ursachen genannt werden.

Im Allgemeinen wird zwischen verschiedenen Formen der Krankheit unterschieden [2]:

- **Typ-1-Diabetes mellitus:** Hierbei handelt es sich um eine Autoimmunkrankheit, die in jedem Alter auftreten kann. In dieser Ausprägung sind die insulinproduzierenden Zellen der Bauchspeicheldrüse vollständig funktionsuntüchtig (absoluter Insulinmangel) und die Therapie für betroffene Personen beinhaltet stets eine externe Insulinzugabe.
- **Typ-2-Diabetes mellitus:** Eine verminderte Wirkung des Insulins, die sog. Insulinresistenz, liegt hier zugrunde. Anfangs kann dem im Organismus durch eine erhöhte Ausschüttung von Insulin durch die Bauchspeicheldrüse entgegenwirkt werden. Schließlich jedoch führt die Form ebenfalls zu einem Insulinmangel. Trat der Typ früher in der Regel hauptsächlich bei älteren Menschen auf, weisen in jüngsten Studien auch immer mehr Kinder und Jugendliche den beschriebenen Krankheitsverlauf auf.
- **Gestationsdiabetes:** Diese Glucosetoleranzstörung tritt während der Schwangerschaft auf und verschwindet in den meisten Fällen nach der Entbindung wieder [3].
- **Weitere spezifische Diabeteserkrankungen:** Die weiteren Ausprägungen der Krankheit gehen sowohl auf genetische Defekte, Erkrankungen der Bauchspeicheldrüse oder der Insulinsekretion zurück als auch auf äußere Einwirkungen, wie bspw. durch Chemikalien, Medikamente oder Infektionen.

In jüngster Zeit gibt es zudem Bestrebungen, die vorgestellte Einteilung aus medizinisch-therapeutischer Sicht zu ändern im Sinne von insulinpflichtigen und nicht-insulinpflichtigen Diabetes-Patienten.

Die „International Diabetes Federation“ (IDF) schätzte die Zahl der Menschen, die im Jahr 2011 von Diabetes betroffen waren auf 366 Millionen [4]. Weiterhin wurde ein Anstieg der Zahl um 51 % auf etwa 552 Millionen bis zum Jahr 2030 prognostiziert. Die Krankheit forderte laut IDF im Jahr 2011 4,6 Millionen Todesopfer, fast 90 % davon in Ländern mit einem mittleren bis niedrigen Durchschnittseinkommen, denen zukünftig ein überdurchschnittliches Bevölkerungswachstum und daraus folgernd auch eine große Zunahme an Diabeteserkrankungen vorausgesagt wird. Beunruhigend ist auch die immer größer werdende Zahl von Kindern (0–14 Jahre), die mit Typ-1-Diabetes diagnostiziert werden. Im Jahr 2011 handelte es sich dabei um 78 000 neue Fälle [4].

Doch nicht nur medizinisch handelt es sich bei der Krankheit um eine große Herausforderung. Diabetes verursacht zur Zeit weltweit wirtschaftliche Kosten pro Jahr in Höhe von 465 Milliarden US-\$ [4], was etwa dem Brutto sozialprodukt von Schweden entspricht.

Die Diagnose der Krankheit orientiert sich, nach den Maßstäben der Weltgesundheitsbehörde WHO, am Auftreten eines der folgenden drei Kriterien für die Glukosekonzentration c_{Glu} [1] bzw. nach der „American Diabetes Association“ zusätzlich am Glykohämoglobinwert (HbA_{1c}) in venösem Blutplasma [5]:

- im nüchternen Zustand $\rightarrow c_{\text{Glu}} \geq 126 \text{ mg/dL}$ (7,0 mmol/L)
- zwei Stunden nach Aufnahme von 75 g Glucose $\rightarrow c_{\text{Glu}} \geq 200 \text{ mg/dL}$ (11,2 mmol/L)
- Symptome einer Hyperglykämie \rightarrow zufällige Werte von $c_{\text{Glu}} \geq 200 \text{ mg/dL}$
- $\text{HbA}_{1c} \geq 6,5 \%$

Einher mit der Erkrankung des Glucosestoffwechsels („Zuckerkrankheit“) kann es bei Patienten mit (Typ-1-)Diabetes zu besonders hohen (Hyperglykämie) oder niedrigen (Hypoglykämie) Werten der Blutzuckerkonzentration kommen. Aus dem Krankheitsbild können ernsthafte Folgeerkrankungen entstehen, sowohl akute wie beispielsweise das Diabetische Koma, als auch langfristige, wobei Erkrankungen der Netzhaut (Diabetische Retinopathie), des peripheren Nervensystems (Neuropathie) sowie Niereninsuffizienz (Nephropathie) zu den am häufigsten vorkommenden zählen. Eine weitere mögliche schwere Langzeitkomplikation ist das sog. Diabetische Fußsyndrom, das in den USA für etwa 84 % aller Diabetes-bezogenen Amputationen im unteren Beinbereich verantwortlich ist [6]. In Deutschland geht eine Zahl von etwa 60 000 bzw. 70 % aller Amputationen auf diese Komplikation zurück [7].

Aus den genannten Zahlen wird die medizinische und wirtschaftliche Brisanz der Krankheit ebenso klar wie der Nutzen, den eine verbesserte Therapie von Diabetes-Patienten mit sich bringen würde. Während die Vorteile einer häufigen Kontrol-

le bei Typ-1-Diabetes-Patienten offensichtlich sind, zeigt sich die Lage bei Typ-2-Diabetes-Patienten differenzierter. Zahlreiche Studien berichteten von Vorteilen für nicht-insulinpflichtige Patienten, deren regelmäßige Kontrollen des Blutzuckerspiegels zu verbesserten Therapieabstimmungen und zu einer Reduktion von Folgeerkrankungen führten [8, 9, 10, 11]. Jedoch warnen wiederum andere Studien davor, blind auf das Werkzeug der Selbstkontrolle zu vertrauen und führen einen teilweise zu geringen medizinischen Nutzen für den zusätzlichen finanziellen Aufwand als Argument an [12, 13, 14].

Eine Selbstkontrolle der Blutzuckerkonzentration stellt jedoch unzweifelhaft für viele Diabetes-Patienten ein unverzichtbares Mittel zur Optimierung der Therapie dar. Bei aktuell für die Selbstkontrolle üblichen punktuellen Messungen werden bis zu sieben Mal am Tag ca. 1 μL Kapillarblut durch die Verwendung von Stechhilfen aus den Fingerkuppen gewonnen und mittels chemischer Reaktionen auf Teststreifen in Produkte umgewandelt, die meist photometrisch oder elektrochemisch in eine Glucosekonzentration übersetzt werden können [15]. Neben eines Bestrebens zur Integration aller Arbeitsschritte des Anwenders in eine einzige Aktion in Form eines Knopfdrucks (one-step systems) [16] wurden in den letzten Jahrzehnten die zur Analytbestimmung benötigten Blutmengen stark verringert und sind in der Forschung bei Werten von weit weniger als 1 μL angekommen [17]. Doch all den Ansätzen ist gemein, dass sie weiterhin auf punktuellen Messerhebungen basieren, deren Unzulänglichkeiten durch kontinuierliche Messmethoden ausgeglichen werden könnten.

1.2. Kontinuierliche Glucoseüberwachung

Man kann die möglichen Vorteile einer kontinuierlichen Überwachung der Glucosekonzentration beispielhaft an Abbildung 1.1 erläutern, die schematisch den Verlauf der Glucosekonzentration über drei Tage zusammen mit einzelnen punktuellen Messungen zeigt.

Hierbei ist ersichtlich, dass durch vereinzelte Messpunkte über die Wachzeit der Patienten und keinerlei Messpunkte während der Schlafphase wichtige Ausbrüche in hyper- und hypoglykämische Bereiche verpasst werden können. Gerade in diesen könnte ein kontinuierlich messendes System, beispielsweise durch Warnsignale oder turnusmäßige Therapieanpassungsvorschläge, den Patienten zu geeigneten Gegenmaßnahmen veranlassen und dadurch sowohl akuten Komplikationen als auch langfristigen Schädigungen effektiver vorbeugen.

Die heutzutage kommerziell erhältlichen Biosensoren zur kontinuierlichen Überwachung der Glucosekonzentration basieren auf einer enzymatischen Umsetzung von Glucose. Im Fall des Enzyms Glucoseoxidase beispielsweise entsteht hier neben Glucosäure auch Wasserstoffperoxid (H_2O_2), das über eine katalytische Oxidation an einer Anode in Form eines Elektronenflusses, der von der umgebenden Glucosekonzentration abhängt, detektiert werden kann. Die ersten Arbeiten zu einer möglichen *in-vivo*-Anwendung der Technologie wurden vor etwa 30 Jahren veröffentlicht [19, 20, 21, 22]. Obwohl solche Arten von Sensoren grundsätzlich auch in

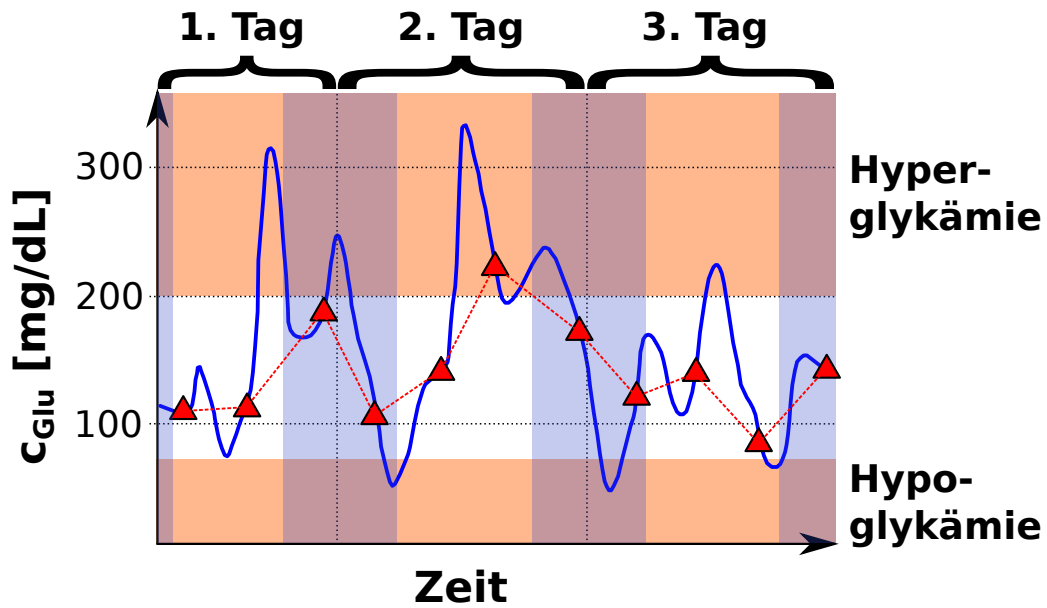


Abbildung 1.1.: Schematische Gegenüberstellung von punktueller Kontrolle (rote Dreiecke) mit 3–4 Messdaten pro Tag und kontinuierlicher Überwachung (blaue Kurve) der Glucosekonzentration c_{Glu} (nach [18]).

blutiger Umgebung funktionieren würden, wurde aufgrund einer Reihe von Überlegungen (Kontaminationen durch Proteine oder Gerinnungsfaktoren, Abhängigkeit von Flussrate des Blutes, etc.) dazu übergegangen, die Glucosekonzentration subkutan in der interstitiellen Flüssigkeit (ISF) zu bestimmen [23, 24]. Studien haben gezeigt [25, 26, 27], dass deren Glucosekonzentration mit einem patientenspezifischen Zeitversatz von etwa 5–10 Minuten mit der Konzentration im Blut korreliert.

Bei der Anwendung der Technologie *in vivo* sind jedoch eine Reihe von intrinsischen Konfliktpunkten zu beachten. Obwohl Verweildauern der Sensoren von 3–7 Tagen angestrebt werden [28], ist die Langzeitstabilität problematisch, was in einer nachlassenden Funktionsfähigkeit der Enzyme begründet liegt. Des Weiteren ist die Biokompatibilität Gegenstand zahlreicher Forschungen (siehe z. B. [29]), da ein Einbringen von Enzymen im Organismus zu Abwehrreaktionen führen kann, die den Glucosetransport zum Messort vermehrt stark behindern können. Ein grundsätzlich verbrauchender Charakter des Detektionsprinzips führt weiterhin streng genommen auch nicht zur Messung der aktuellen Glucosekonzentration, sondern des Gleichgewichts zwischen dem lokalen Verbrauch der Glucose und dem diffusiven Nachtransport des Moleküls. Auch ist die Korrelation zwischen gemessenem Strom und Glucosekonzentration nicht notwendigerweise linear, was die Charakterisierung der Sensoren zusätzlich erschwert. Alle angeführten Argumente führen dazu, dass häufige Rekalibrierungen des Sensors mittels herkömmlicher, punktuell messender, handgehaltener Systeme nötig sind, was den Nutzen von kontinuierlich messenden Systemen einschränkt.

Die Messgenauigkeit bleibt schließlich außerdem hinter denen von handgehaltenen Systemen zurück. Deshalb ist bis zum heutigen Zeitpunkt keines der kommerziell erhältlichen Systeme seitens der US-amerikanischen Lebensmittelüberwachungs- und Arzneimittelzulassungsbehörde FDA („Food and Drug Administration“) für alleinige therapierelevante Entscheidungen zugelassen.

Daher wäre grundsätzlich ein Ansatz wünschenswert, der die soeben aufgeführten Probleme von Grund auf vermeiden könnte. Optische Methoden würden sich hierbei durch ihre observierende Art als mögliche Alternativen zur Detektion von Glucose eignen. In der Vergangenheit wurde eine Vielzahl von ihnen zur reagensfreien Überwachung von Glucose vorgeschlagen, wie z. B. Polarimetrie, Fluoreszenzspektroskopie oder Refraktometrie [30, 31, 32].

Die Untersuchung von molekularen Schwingungen von Glucose mittels Infrarot- und Ramanspektroskopie [33, 34, 35] stellte sich als sensitive und spezifische Methode, sowohl *in vitro* [36, 37, 38, 39, 40, 41] als auch *ex vivo* [42, 43], heraus. Die Schwingungsspektroskopie zeichnet dabei ihre hohe Sensitivität und Selektivität im Spektralbereich des mittleren Infrarot (MIR) bei Wellenlängen um 10 μm aus. In dieser sog. *Fingerprint*-Region überlappen starke Vibrationsbanden von Glucose mit dem breiten Absorptionsspektrum von Wasser [44]. Ein kompakter Aufbau scheint durch die Verfügbarkeit von Quantenkaskadenlasern (QCLs) als intensive MIR-Lichtquellen möglich [45, 46, 47, 48, 49, 50]. Über die Verwendung von Transmissionsspektroskopie mittels eines IR-Elements wurde ebenfalls berichtet [51, 52]. Lambrecht *et al.* veröffentlichten schließlich Ergebnisse über eine QCL-basierte Glucosebestimmung mittels fasergebundener evaneszenter Feldspektroskopie im mittleren Infrarot [53]. Darüber hinaus wurden in der Publikation erste vielversprechende Ansätze unter Nutzung von fasergebundenen Transmissionsmessungen angesprochen, die den Ausgangspunkt für die vorliegende Dissertation bildeten.

Das Hauptproblem der Methode besteht allerdings grundlegend in der äußerst starken Wasserabsorption im mittleren infraroten Spektralbereich, der die Eindringtiefe der Strahlung üblicher Quellen auf etwa 100 μm beschränkt. Für Laboranwendungen der Spektroskopie von wässrigen Lösungen sind deshalb spezielle Küvetten erhältlich, deren optische Weglänge wenige Mikrometer beträgt. Der Befüll- und Reinigungsvorgang von solchen Messkammern gestaltet sich aufgrund der hohen benötigten Druckdifferenzen jedoch schwierig. Eine Umgehung des Problems ist die Reduzierung des Wassergehalts durch Eintrocknen der wässrigen Proben. Während *in vitro* mit der Methode durchaus eine gute Glucosesensitivität erreicht werden konnte [36], stellt sie für *in-vivo*-Anwendungen leider keine Alternative dar. Eine weitere Möglichkeit zur Erhöhung des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses bei gegebener Weglänge in wässriger Lösung ist die Erhöhung der spektralen Energiedichte der Strahlungsquelle, wie sie z. B. Synchrotrons oder eben auch QCLs aufweisen.

Der Ansatz, der der vorliegenden Dissertation zugrunde liegt, setzt auf die Entwicklung eines optischen Fasersensors, in den direkt eine miniaturisierte Messküvette mit einer sehr kleinen Weglänge eingebracht werden soll, um Transmissionsmessungen

im mittleren Infrarot durchführen zu können. Als Strahlungsquellen kommen QCLs zum Einsatz, um das Potenzial eines reagensfreien, fasergebundenen und minimal-invasiven Glucosesensors zu bestimmen, welcher nach einer Erprobung *in vitro* später subkutan implantiert werden könnte, um dort in der ISF die Glucosekonzentrationen zu bestimmen. Das Fehlen von chemischen Reagenzien sollte zu einer verbesserten Biokompatibilität und damit einer verlängerten Verweildauer im menschlichen Organismus führen.

Die Arbeit gliedert sich dabei folgendermaßen: In Kapitel 2 wird quantenchemisch der Lösungsprozess von Glucose untersucht im Hinblick auf die Auswirkungen, die die umgebende Hydrathülle auf die Vibrationsspektren des Moleküls hat. Anschließend folgt in Kapitel 3 die Darstellung der allgemein experimentell verwendeten Methoden und Materialien, gefolgt von der Präsentation der einzelnen, aufeinander aufbauenden Experimente in Kapitel 4 - von der Charakterisierung der Fasersensoren *in vitro* hin zu einer Anwendung *in vivo*. Die Arbeit endet schließlich in Kapitel 5 mit einer Diskussion der Ergebnisse und deren Einordnung bezüglich der Realisierbarkeit eines minimal-invasiven Fasersensors auf Basis der Transmissionsspektroskopie im mittleren Infrarot.

2. Quantenchemische Simulationen

Die quantenchemische Untersuchung biochemischer Substanzen kann im Zusammenspiel mit experimentellen Methoden eine ganzheitliche, belegbare Beschreibung wichtiger Moleküleigenschaften liefern. Für den Einsatz der Mittelinfrarotspektroskopie zur kontinuierlichen Überwachung von Glucose ist die Analyse des Vibrationsverhaltens von Glucose von besonderem Interesse. Der Fokus der vorliegenden Berechnungen leitet sich von experimentellen Beobachtungen ab, die erwartungsgemäß einen starken Einfluss der Matrix feststellen, in welche der Analyt eingebettet ist. Dabei kann es sich, wie in einer Vielzahl von biochemischen Prozessen, um wasserähnliche Flüssigkeiten handeln oder bspw. um in der Infrarotspektroskopie gängige feste Proben wie Kaliumbromid-Presslinge.

Das Ziel der hier vorgestellten quantenchemischen Simulationen ist die Bewertung der Anwendbarkeit eines hybriden Solvationsmodells auf die Berechnung von Vibrationspektren am Beispiel von Glucose. Ausgehend von isolierten Glucosemolekülen wurde im Vergleich mit experimentellen Daten in den hier ausgeführten Betrachtungen schrittweise die Komplexität der Hydrathülle und die Zahl der zugrundeliegenden Einzelspektren erhöht, um den Einfluss der Solvation in Wasser möglichst genau abzubilden. Der Vorteil des präsentierten Simulationskonzepts liegt dabei in der Erweiterbarkeit auf beliebige weitere Analyten sowie alternative Solvationsmedien. Dieses theoretische Konstrukt könnte somit für experimentelle Fragestellungen in der Infrarotspektroskopie ein wichtiges Fundament bilden. Die Erkenntnisse der theoretischen Studien fanden bereits Einzug in einer Veröffentlichung, an der sich im Folgenden orientiert wird [54].

2.1. Theoretische Grundlagen

In wässriger Lösung existiert der Einfachzucker Glucose (Summenformel $C_6H_{12}O_6$) fast ausschließlich in einer zyklischen Form als Pyranose. Er kommt hier in zwei anomeren Varianten vor, abhängig von der C1–O1-Bindung, die sowohl axial (α) als auch äquatorial (β) zum sechselementigen Ring orientiert sein kann. Experimentell ergibt sich bei Raumtemperatur ein Verhältnis der Konzentrationen von α - zu β -Form in wässriger Lösung von 36:64 [55].

Eine weitere Isomerie des Moleküls tritt abhängig vom O6–C6–C5–O5-Torsionswinkel auf, dem sog. ω -Winkel, mit drei stabilen Rotameren für $\omega = \pm 60^\circ$ und 180° (gauche-trans [G+], gauche-gauche [G–] und trans-gauche [T]). Beispielhaft sind in Abbildung 2.1 ein isoliertes α -G- bzw. β -G+ D-Glucopyranosemolekül abgebildet. Im Folgenden wird diese Pyranoseform durchgängig mit Glucose bezeichnet. Während

die Bevölkerung des T-Rotamers in wässriger Lösung vernachlässigbar klein ist, weisen die beiden anderen Rotamere in Lösung eine fast identische Besetzung auf, was sowohl experimentell [56, 57] als auch durch Berechnungen [58, 59] belegt werden konnte.

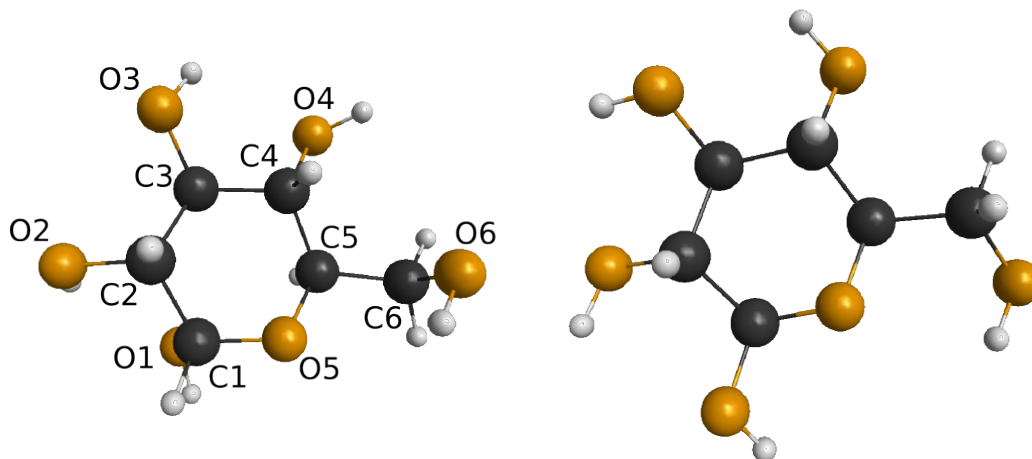


Abbildung 2.1.: Isoliertes α -G- (*links*) bzw. β -G+ (*rechts*) D-Glucopyranosemolekül samt konventioneller Nummerierung der Kohlenstoff-(C) und Sauerstoffatome (O).

Simulationsstudien zur Untersuchung des Hydrationsprozesses von Glucose fokussierten sich oft auf Änderungen der Konformationen, die durch den Solvationsprozess induziert wurden. Da die Anzahl der Atome im zu untersuchenden System für eine genaue Vorhersage dabei sehr groß werden kann, stellt die Wahl der verwendeten Theorie bzw. der genauen Methode immer einen Kompromiss zwischen der Genauigkeit der Berechnungen und der zugrundeliegenden Komplexität dar. Eine Alternative ist die Reduzierung des Problems, bspw. indem nur wenige Solvationsmoleküle in die Simulation miteinbezogen werden und so Wassermoleküle nur an bestimmten prägnanten Stellen des Glucosemoleküls betrachtet werden, z. B. unter Maximierung der Anzahl von ausgebildeten Wasserstoffbrücken zwischen Analyt und Lösungsmittel [60]. Weiterhin besteht die Möglichkeit, das Lösungsmittel mittels Modellen eines kontinuierlichen Mediums zu beschreiben, wie z.B. dem Onsager [61] oder polarisierbaren Kontinuumsmodell (engl. *polarizable continuum model*, kurz PCM) [62].

Bei der Beschreibung von Solvationsprozessen unterscheidet man hauptsächlich zwischen impliziten bzw. kontinuierlichen und expliziten Modellen. Dabei behandeln erstere das Lösungsmittel als kontinuierliches Medium, im Gegensatz zur expliziten, individuellen Beschreibung der Lösungsmittelmoleküle. Während die gemittelten Materialeigenschaften des Mediums durch implizite Modelle relativ gut wieder-

gegeben werden, fehlt ihnen die Beschreibung von gerichteten elektronischen Wechselwirkungen auf molekularem Niveau zwischen gelösten Stoff und Lösungsmittel. Implizite Modelle sind deshalb unter Umständen nicht geeignet, um das tatsächliche detaillierte Verhalten eines Systems abzubilden, was für eine Analyse des Vibrationsverhaltens wichtig sein kann [63]. Sie sind dafür allerdings vergleichsweise sparsam in der benötigten Rechenleistung.

Explizite Modelle warten im Gegensatz dazu mit einer weitaus präziseren Beschreibung von kurzreichweitigen Wechselwirkungen wie bspw. der Ausbildung von Wasserstoffbrücken auf. Um den benötigten Rechenaufwand in Grenzen zu halten, wird sich jedoch oft auf die Betrachtung von wenigen Einzelmolekülen des Lösungsmittels beschränkt, z.B. nur der ersten ausgebildeten Hydrathülle. Auch finden periodische Randbedingungen Verwendung um die Komplexität des Problems zu reduzieren. Für die korrekte Wiedergabe von makroskopischen Effekten wie der Polarisierung des gelösten Analytmoleküls ist jedoch ggf. eine große Anzahl an Hydratmolekülen notwendig.

Zur Nutzung der Vorteile beider Methoden wurden sog. Hybridmodelle vorgeschlagen, die das Lösungsmittel dabei ganz oder teilweise explizit behandeln und zur Beschreibung der langreichweitigen Effekte auch implizite Modelle beinhalten können. Als Beispiel dient das in dieser Arbeit verwendete Modell der effektiven Fragmentpotenziale (engl. *effective fragment potentials*, kurz EFPs) [64, 65], welches in Abschnitt 2.2.3 ausführlich vorgestellt wird.

In der Literatur finden sich zum speziellen Fall der Glucose einige Vorarbeiten unter Verwendung von expliziten und impliziten Solvationsmodellen. Simulationsstudien des Hydrationsprozesses von Glucose wurden durchgeführt auf Basis von Kraftfeldmethoden, *ab-initio*-Berechnungen und Dichtefunktionaltheorie (DFT) [60, 66, 67]. Die Konformation von Glucose wurde dabei mittels Kraftfeldmethoden *in vacuo* [68, 69] als auch dynamisch in Lösung [70] studiert. DFT lieferte gute Resultate, z. B. bezüglich Molekulardynamik [71, 58, 72, 73, 74] oder in der konformativen Analyse von Glucose [75]. Weitere DFT Studien zielten auf die Geometrie von Glucose in einer Umgebung bestehend aus fünf Wassermolekülen ab [76]. Spektrale Untersuchungen wurden bspw. bei der Berechnung von ^1H und ^{13}C -NMR Spektren von Glucose durchgeführt [77]. Weiterhin wurden IR Spektren von Glucose mittels *vibrational self-consistent field* (VSCF) Methoden berechnet [78] sowie mittels DFT, sowohl für isolierte Moleküle [79] als auch mit einer geringen Anzahl umgebender Wassermoleküle [60]. Leider finden sich in den Studien nur sehr selten Vergleiche mit experimentellen Beobachtungen. Im Folgenden steht daher nach einer theoretischen Einführung in die Thematik die erstmalige Applikation der EFP-Methode auf den Fall der Glucose im Vordergrund. Die hieraus abgeleiteten theoretischen Schwingungsspektren der Glucose in wässriger Lösung werden dabei im direkten Vergleich mit experimentellen Ergebnissen bewertet. Eine Einführung in die Theorie der Infrarotspektroskopie kann in Abschnitt 3.1 gefunden werden.

2.2. Methoden

2.2.1. Hartree-Fock-Methode

Der Ausgangspunkt quantenchemischer Betrachtungen von Molekülsystemen bildet die Schrödingergleichung, die in ihrer zeitunabhängigen Form folgende Gestalt annimmt:

$$\hat{H}\Psi = E\Psi. \quad (2.1)$$

Der Hamiltonoperator \hat{H} setzt sich dabei aus den kinetischen und potenziellen Energien der Kerne und Elektronen zusammen,¹

$$\hat{H} = - \underbrace{\sum_I \frac{1}{2m_I} \nabla_I^2}_{\hat{T}_n} - \underbrace{\sum_i \frac{1}{2m_e} \nabla_i^2}_{\hat{T}_e} - \underbrace{\sum_{i,I} \frac{Z_I}{r_{i,I}}}_{\hat{V}_{ne}} + \underbrace{\sum_{i<j} \frac{1}{r_{ij}}}_{\hat{V}_{ee}} + \underbrace{\sum_{I<J} \frac{Z_I Z_J}{R_{IJ}}}_{\hat{V}_{nn}}, \quad (2.2)$$

wobei m_I und m_e die Massen der Kerne und Elektronen, Z die Kernladungen, $r_{i,I}$ die relativen Abstände zwischen Kernen und Elektronen, r_{ij} zwischen Elektronen sowie R_{IJ} zwischen Kernen bezeichnen. Die Indizes bestehend aus Kleinbuchstaben beziehen sich dabei auf die Elektronen, die Großbuchstaben auf die Kerne. Die kinetischen Energien werden fortan mit \hat{T}_n für die Kerne bzw. \hat{T}_e für die Elektronen bezeichnet, analog für die potenziellen Energien.

Da die Masse der Kerne viel größer als die der Elektronen ist, bewegen sich die Kerne deutlich langsamer. Folglich ist es eine plausible Näherung, die Kernpositionen bei Betrachtung der Elektronenbewegungen als fix anzusehen (Born-Oppenheimer-Näherung). Die Konsequenz daraus ist, dass $\hat{T}_n = 0$ und $\hat{V}_{nn} = \text{const.}$, womit sich der Hamiltonian zu folgendem rein elektronischen Problem vereinfacht:

$$\hat{H} \approx \hat{H}_{elec} = \hat{T}_e + \hat{V}_{ne} + \hat{V}_{ee}. \quad (2.3)$$

Die Eigenfunktionen Φ_{elec} , die sich aus dem resultierenden Eigenwertproblem ergeben, hängen explizit von den elektronischen Koordinaten r_i ab, jedoch nur parametrisch von den Kernkoordinaten, d. h. nur von den Positionen der Kerne und nicht von deren Impuls. Gleiches gilt für die Elektron-Energieeigenwerte E_{elec} .

Für die Berechnung der totalen Energieeigenwerte E_{total} bei fixen Kernkoordinaten muss noch die konstante Kern-Kern-Wechselwirkung addiert werden:

$$E_{total} = E_{elec} + E_{nucl} = E_{elec} + \sum_{I<J} \frac{Z_I Z_J}{r_{IJ}}. \quad (2.4)$$

Anschaulich bedeutet das, dass für eine bestimmte fixierte Kernkonfiguration zunächst das elektronische Problem gelöst werden muss, um daraus ein Potenzial für die Kernbewegung zu erhalten. Aufgrund der relativ schnellen Elektronenbewegung

¹Für die theoretischen Grundlagen dieses Kapitels wurde das Gauß'sche natürliche Einheitensystem gewählt, um so die Formeln übersichtlicher zu halten.

können die Koordinaten der Elektronen für die Lösung der Kernbewegung über die Φ_{elec} gemittelt werden, um hieraus ein mittleres Feld zu erhalten. Als nächster Schritt lässt sich analog das separierte Eigenwertproblem für die Kerne aufstellen, um dann anschließend die Translationen, Rotationen und Vibrationen der Kerne abzuleiten. Die Gesamtwellenfunktion Ψ faktorisiert demnach in die elektronischen und Kernwellenfunktionen Φ_{elec} und Φ_{nucl} . Im Folgenden wird sich zunächst jedoch auf die Lösung des elektronischen Problems beschränkt.

Die Energie E eines Systems lässt sich allgemein durch

$$E = \langle \Psi | \hat{H} | \Psi \rangle = \int \Psi^* \hat{H} \Psi d\vec{r} \quad (2.5)$$

berechnen. Das Variationsprinzip sagt dabei aus, dass jede erhaltene Energie aus gegebenen, genäherten Testwellenfunktionen nur eine obere Schranke der wahren Energie darstellt. Das Prinzip wird u. a. vom später eingeführten Hartree-Fock (HF) Formalismus genutzt, um die Testwellenfunktionen so lange zu variieren, bis der Erwartungswert von \hat{H} minimal ist. Das liefert eine Näherung für die Wellenfunktion und für die Energie des Grundzustands.

Im nächsten Schritt wird die Wellenfunktion durch das Produkt von N Wellenfunktionen $\chi_i(\vec{x}) = \phi_i(\vec{r})\sigma(s)$ genähert, die sich zusammensetzen aus den räumlichen Orbitalen ϕ_i und einer Spinfunktion $\sigma(s)$, welche die Zustände *Spin up* und *down* annehmen kann. Die neu eingeführte Korrdinate \vec{x} enthält sowohl die räumlichen als auch die Spinkoordinanten s , $\vec{x} = (\vec{r}, s)$.

In der Hartree-Fock-Näherung müssen die orthogonalen Wellenfunktionen χ_i gefunden werden, die die Gesamtenergie für die Formulierung von Ψ_0 minimieren. Dazu drückt man die Gesamtwellenfunktion in Form einer Slaterdeterminante aus:

$$\Psi_0 \approx \Psi_{HF} = \frac{1}{\sqrt{N!}} \begin{vmatrix} \chi_1(\vec{x}_1) & \chi_2(\vec{x}_1) & \dots & \chi_N(\vec{x}_1) \\ \chi_1(\vec{x}_2) & \chi_2(\vec{x}_2) & \dots & \chi_N(\vec{x}_2) \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ \chi_1(\vec{x}_N) & \chi_2(\vec{x}_N) & \dots & \chi_N(\vec{x}_N) \end{vmatrix}. \quad (2.6)$$

Die Formulierung erfüllt die Antisymmetrieforderung für Fermionen, deren Wellenfunktionen sich antisymmetrisch unter Austausch der Koordinaten \vec{x} verhalten:

$$\chi(\vec{x}_1, \dots, \vec{x}_i, \dots, \vec{x}_j, \dots, \vec{x}_N) = -\chi(\vec{x}_1, \dots, \vec{x}_j, \dots, \vec{x}_i, \dots, \vec{x}_N). \quad (2.7)$$

Der Erwartungswert des Hamiltonians lässt sich nun aufteilen in Ein- und Zwei-Elektronenanteile und man definiert den sog. Fock-Operator \hat{f} ,

$$\hat{f} = -\frac{1}{2}\nabla_i^2 - \sum_I \frac{Z_I}{r_{iI}} + V_{HF,i}. \quad (2.8)$$

$V_{HF,i}$ ist dabei das Hartree-Fock-Potenzial, welches das mittlere Abstoßungspotenzial beschreibt, dass das *ite* Elektron durch die $(N - 1)$ restlichen erfährt. Es ist definiert als

$$V_{HF,i} = \sum_j (\hat{J}_j(\vec{x}_i) - \hat{K}_j(\vec{x}_i)), \quad (2.9)$$

mit dem Coulomboperator \hat{J} , der die Wechselwirkung mit den restlichen Ladungsverteilungen für das Elektron beinhaltet, welche durch die Wellenfunktion χ_j beschrieben wird, und dem Austauschoperator \hat{K} , der kein klassisches Pendant hat. Details über die Herleitung der beiden Operatoren können der Literatur entnommen werden [80, 81].

Mittels dieser Werkzeuge lassen sich schließlich die Hartree-Fock-Gleichungen aufstellen,

$$\hat{f}\chi_i = \epsilon_i\chi_i, \quad i = 1, 2, \dots, N, \quad (2.10)$$

die iterativ gelöst werden, indem man nach einer ersten Annahme der Wellenfunktionen das mittlere Feld berechnet, welches jedes Elektron wahrnimmt. Hieraus lässt sich dann durch Lösen der Eigenwertgleichung ein neuer Satz Wellenfunktionen berechnen. Das Verfahren wird solange wiederholt, bis sich das mittlere Feld nicht mehr ändert. Die Energieeigenwerte ϵ_i sind nach Koopmans Theorem etwa gleich der negativen Ionisierungsenergie für das am höchsten besetzte Orbital [82].

Die Freiheit in der Variation liegt in der Wahl der Orbitale. Häufig werden jene durch orthogonale Basisfunktionen $\tilde{\chi}_\mu$ ausgedrückt, die um den jeweiligen Atomkern zentriert sind,

$$\chi_i = \sum_{\mu=1}^K c_{\mu i} \tilde{\chi}_\mu, \quad (2.11)$$

wobei nach den Expansionskoeffizienten $c_{\mu i}$ variiert und optimiert wird. Das einfachste Beispiel eines solchen Basisfunktionsatzes sind Slater-type Orbitale (STO), die exponentiell mit dem Abstand zum Kern abfallen.

2.2.2. Dichtefunktionaltheorie

Die Grundlage der Dichtefunktionaltheorie (DFT) bilden zwei grundlegende Theoreme von Hohenberg und Kohn [83]. Das erste sagt aus, dass die elektronische Grundzustandsenergie ein eindeutiges und vollständiges Funktional der Elektronendichte ρ ist. Diese kann mittels der Elektronenwellenfunktion Ψ ausgedrückt werden:

$$\rho(\vec{r}) = N \sum_{s_1} \cdots \sum_{s_N} \int \cdots \int |\Psi(\vec{x}_1, s_1, \dots, \vec{x}_N, s_N)|^2 d\vec{x}_2 \cdots d\vec{x}_N, \quad (2.12)$$

wobei die Integration über alle bis auf eine Raumkoordinate durchgeführt wird und darüber hinaus über alle Spinzustände s_1 bis s_N summiert wird. Der Ausdruck gibt also die Wahrscheinlichkeit an, eines der N Elektronen im Volumenelement $d\vec{r}$ zu finden. Der Vorteil des Ansatzes wird deutlich im Vergleich mit dem vorgestellten Wellenfunktionsformalismus. Anstatt ein N -Elektronensystem mit $3N$ Koordinaten

zu beschreiben ($4N$ unter Einbeziehung des Spins), erlaubt es $\rho(\vec{r})$, sich auf 3 Koordinaten zu beschränken, unabhängig von der Anzahl der Elektronen.

Das Funktional der Gesamtenergie lässt sich somit ausdrücken durch einen exakt bekannten Teil der Coulomb-Wechselwirkungen zwischen Kernen und Elektronen $E_{ne}[\rho]$ und einem unbekanntem Teil, der die kinetische Energie $T[\rho]$ und die Elektron-Elektron-Wechselwirkung $E_{ee}[\rho]$ beinhaltet:

$$E[\rho] = E_{ne}[\rho] + T[\rho] + E_{ee}[\rho]. \quad (2.13)$$

Kohn und Sham schlugen vor, die kinetische Energie des betrachteten Systems durch nicht-wechselwirkende Elektronen zu vereinfachen, ohne dabei die Elektronendichte in diesem fiktiven Modell zu verändern und die resultierende Differenz zur exakten Lösung in ein verbleibendes Austausch-Korrelationsfunktional abzubilden [84]. Dadurch nähert sich die kinetische Energie dann dem in der HF-Theorie bekannten Ausdruck und die Elektronendichte lässt sich durch die Wellenfunktionen Φ_i des nicht-wechselwirkenden Systems beschreiben, welche die Dichte des originalen Vielteilchensystems nachbilden:

$$\rho_S(\vec{r}) = \sum_{i=1}^N \sum_s |\Phi_i(\vec{r}, s)|^2 = \rho(\vec{r}). \quad (2.14)$$

Aus der Elektron-Elektron-Wechselwirkung wird zunächst der bekannte Coulombanteil $J[\rho]$ ausgegliedert, woraus sich für die Gesamtenergie folgendes ergibt:

$$E[\rho] = E_{ne}[\rho] + T_S[\rho] + J[\rho] + E_{XC}[\rho], \quad (2.15)$$

mit dem einzigen unbekanntem Teil $E_{XC}[\rho]$, der alle Vielteilchenwechselwirkungen beinhaltet.

Das zweite Theorem von Hohenberg und Kohn besagt, dass die Elektronendichte, welche die Gesamtenergie minimiert, die einzig wahre Elektronendichte zur vollständigen Lösung der Schrödingergleichung darstellt. Ähnlich der Vorgehensweise in den HF-Methoden mittels des Variationsprinzips werden nun durch Lösung eines Eigenwertproblems, den sog. Kohn-Sham-Gleichungen, beginnend mit Ausgangselektronendichten, kanonische Wellenfunktionen bestimmt, die wiederum über Gleichung 2.14 mit einer Elektronendichte verknüpft sind. So lässt sich in einem iterativen Prozess die Elektronendichte aufstellen, die eine minimale Grundzustandsenergie zur Folge hat, unter Verwendung von unabhängigen Ein-Elektron-Funktionen.

Das Hauptproblem an dem Prozess ist die Definition von $E_{XC}[\rho]$, wobei jedoch anzumerken ist, dass DFT mit einem exakten $E_{XC}[\rho]$ auch eine exakte Gesamtenergie des Systems liefern würde. Gängige Näherungen für $E_{XC}[\rho]$ sind u. a. die des homogenen Elektronengases (engl. *local density approximation*, kurz LDA), bei der $n(\vec{r}) = \text{const.}$ gilt, oder Methoden, bei denen $E_{XC}[\rho]$ nicht nur von der Elektronendichte, sondern auch von deren Ableitungen, abhängt. Ein bekannter Vertreter solch einer Methode ist die verallgemeinerte Gradientennäherung (engl. *generalized gradient approximation*, kurz GGA). Ein weiteres beliebtes Vorgehen ist die Verwendung

von sog. Hybridfunktionalen. Bei dieser auch Hyper-GGA genannten Methode werden exakte Austauschfunktionale aus der HF-Theorie sowohl mit gemischten DFT Austausch- und Korrelationsfunktionalen, wie z. B. den soeben vorgestellten, als auch empirisch abgeleiteten Funktionalen kombiniert.

2.2.3. Effektive Fragmentpotenziale

Die EFP-Methode wurde ursprünglich für die Beschreibung der Ausbildung von Wasserclustern (EFP1) und für die quantenmechanische Behandlung von gelösten Substanzen eingeführt. Das Lösungsmittel wurde anfangs durch eine Formulierung beschrieben, die auf Hartree-Fock-Theorie aufbaute (EFP1/HF), was später zu EFPs erweitert wurde, die auf DFT basierten (EFP1/DFT) [85]. Schließlich wurde eine allgemeine Formulierung der EFP-Methode (EFP2) für die Behandlung von beliebigen Lösungsmitteln eingeführt [64].

In der Theorie von EFPs wird der Gesamthamiltonian H_{total} in einen QM Teil H_{QM} und ein Potenzial V aufgeteilt, welches einzig aus Ein-Elektron-Integralen besteht:

$$H_{total} = H_{QM} + V. \quad (2.16)$$

Das Fragmentpotenzial V setzt sich dabei aus folgenden drei Beiträgen zusammen:

$$V = V_{coul} + V_{ind} + V_{rem}. \quad (2.17)$$

V_{coul} beinhaltet die Coulomb-Wechselwirkungen zwischen Solvationsmolekülen untereinander und zwischen Solvations- und gelösten Molekülen. Unter V_{ind} werden die Induktions- bzw. Polarisationsanteile der elektrostatischen Wechselwirkung zusammengefasst, welche die Wechselwirkung des induzierten Dipolmoments eines Fragments, das beliebig gewählt werden kann, z. B. als Wassermolekül, mit dem permanenten Dipolmoment eines anderen beschreibt. Der verbleibende Teil V_{rem} fasst schließlich alle weiteren Wechselwirkungen wie quantenmechanische Austauschwechselwirkung (engl. *exchange repulsion*), Ladungsaustausch und kurzreichweitige Korrelationsbeiträge zusammen. Das Fragmentpotenzial kann über separate QM-Berechnungen ermittelt und systematisch verbessert werden. Genaue Definitionen der einzelnen Beiträge sowie weitere Details zur Entwicklung von EFPs sind den Referenzen zu entnehmen [85, 65, 86].

In dieser Studie beinhaltet der QM Teil ein Glucosemolekül mit einer theoretischen Formulierung, die im Detail in Abschnitt 2.3 beschrieben ist. Die umgebenden Wassermoleküle werden durch Fragmentpotenziale ausgedrückt.

2.2.4. Berechnung von Vibrationsspektren

Die Berechnung von Vibrationsspektren beruht auf einer geeigneten Koordinatentransformation ausgehend von einer Taylorentwicklung der potenziellen Energie [87]. Bei der Betrachtung von N Atomen können alle kartesischen Koordinaten in einem

Vektor $\vec{r} = (r_1, r_2, \dots, r_{3N})$ zusammengefasst werden. Definiert man nun mit \vec{r}_0 die Gleichgewichtslage aller Atome und führt mit $\vec{x} = \vec{r} - \vec{r}_0$ neue Koordinaten ein, so kann die potenzielle Energie wie folgt bis zur zweiten Ordnung entwickelt werden:

$$E \approx E_0 + \frac{1}{2} \sum_{i=1}^{3N} \sum_{j=1}^{3N} \left[\frac{\partial^2 E}{\partial x_i \partial x_j} \right]_{x=0} x_i x_j.$$

Der Summand, der die erste Ableitung beinhaltet, verschwindet, da um die Gleichgewichtslage entwickelt wird. Durch das zweite Newtonsche Gesetz ist einerseits die Änderung der Bewegung mit einer wirkenden Kraft verknüpft, $F_i = m_i(\partial^2 x_i / \partial t^2)$, wobei m_i für die Masse des i ten Atoms steht. Andererseits sind Kraft und Energie durch $F_i = -\partial E / \partial x_i$ miteinander verbunden und die Bewegungsgleichungen können somit in Matrixform ausgedrückt werden durch

$$\frac{d^2 \vec{x}}{dt^2} = -\hat{A} \vec{x}.$$

Hierbei ist die sog. massengewichtete Hesse-Matrix \hat{A} definiert als

$$A_{ij} = \frac{1}{m_i} \left[\frac{\partial^2 E}{\partial x_i \partial x_j} \right]_{x=0}$$

und sie beinhaltet die zweiten Ableitungen der potenziellen Energie nach dem Ort bei einer Größe von $3N \times 3N$. Die Hesse-Matrix wird näherungsweise durch die Verwendung von Finite-Differenzen-Methoden berechnet. Als letzten Schritt gilt es, das Eigenwertproblem $\hat{A} \vec{q} = \lambda \vec{q}$ zu lösen. Die Diagonalisierung von \hat{A} liefert dann die Eigenwerte λ_i samt Eigenvektoren \vec{q}_i , welche die Normalmoden der Vibrationen darstellen und den dazugehörigen Koordinatenraum aufspannen. Die Frequenzen ν_i der Vibrationsschwingungen lassen sich schließlich durch $\nu_i = \sqrt{\lambda_i} / 2\pi$ aus den Eigenwerten ableiten.

2.3. Durchführung

Die Startgeometrien für G- und G+ Rotamere von α - und β -D-Glucose in Abwesenheit einer Hydrathülle wurden aus kristallografischen Daten gewonnen [88, 89]. Zur Findung von Anfangsbedingungen aus Glucosemolekül und Hydrathülle wurden randomisierte Geometrie Konfigurationen unter Zuhilfenahme der Software Packmol (Version 1.1) [90] ermittelt. Anschließend wurde eine Optimierung starrer Körper mit der Molekularmodellierungssoftware TINKER (Version 5.1) [91] durchgeführt, bei der die internen Koordinaten von Glucose- und Wassermolekülen unverändert belassen wurden. In dem Optimierungsschritt wurde ein erweitertes OPLS (engl. *optimized potentials for liquid simulations*) All-Atom-Kräftefeld für Kohlenhydrate [92] verwendet, das jedes Atom explizit abbildet. So wurden insgesamt 10 000 zufällig generierte Geometrien für jede Kombination aus einem der vier untersuchten Glucosekonformere mit einer bestimmten Anzahl an umgebenden Wassermolekülen

energetisch analysiert. Die fünf Konfigurationen mit der geringsten Energie wurden dann für die weiteren DFT Berechnungen ausgewählt, was in 20 Geometrien pro Konformer- N Wassermoleküle-Komplex resultierte. Die Zahl N der umgebenden, expliziten Wassermoleküle wurde in zwölf Schritten variiert ($N = 2, 4, 8, 12, 18, 24, 32, 40, 52, 100, 151$ und 229). Aus Gründen, die später in den Resultaten erläutert werden, wurde eine weitere Untersuchung für den Fall von $N = 18$ Wassermolekülen durchgeführt: in dieser vertieften Analyse wurden die Konformerkonfigurationen mit den 20 tiefsten Energien ausgewählt, was in dem Fall zu einer Gesamtzahl von 80 Spektren führte. Für die Berechnungen mit isolierten Glucosemolekülen ohne umgebende Wassermoleküle wurden die Kraftfeldoptimierungen ausgelassen und direkt die DFT Optimierung angewandt.

Die starr optimierten Glucose-Wasserkonfigurationen wurden im folgenden Schritt weiter optimiert, unter Verwendung von DFT mit dem sog. B3LYP (Becke three-term correlation [93, 94] & Lee-Yang-Parr exchange [95]) Hybridfunktional. Nach einer ersten Geometrieoptimierung mit dem 6-31+G(d) Basissatz nutzte der endgültige Optimierungsschritt den 6-311++G(d,p) Basissatz. Dabei handelt es sich um Basissätze, die aus Linearkombinationen von Gaußfunktionen bestehen, um die inneren und Valenzschalen der Atome zu modellieren. Zusätzlich dazu werden sowohl diffuse Funktionen verwendet, die die Reichweite der Beschreibung durch Gaußfunktionen erhöhen als auch Polarisationsfunktionen zur besseren Beschreibung von schweren Elementen [81]. Die IR-Spektren wurden anschließend in doppelt harmonischer Näherung berechnet, bei der sowohl die Polarisierbarkeit als auch das permanente Dipolmoment in einer Taylor-Entwicklung um die Ruhelage bis zur ersten Ordnung genähert wurden. Diese Vereinfachung, die zusammen mit weiteren Näherungen, wie der unvollständigen Behandlung der Elektronenkorrelation, in die QM-Berechnungen eingeflossen ist, begründet die Notwendigkeit, die Wellenzahl nach der Berechnung der Spektren zu skalieren, was ausgiebig in der Literatur studiert wurde [96, 97]. Generell wurden alle Spektren abschließend mit einer Gaussfunktion gefaltet, die eine Halbwertsbreite von 10 cm^{-1} aufwies.

Der Prozess der Optimierung und Berechnung der IR-Spektren wurde danach mit identischen Startbedingungen wiederholt, ergänzt um ein implizites Solvationsmodell (PCM) für Konfigurationen mit 2, 4, 8, 12 und 18 Wassermolekülen.

In den DFT-basierten Optimierungsschritten und den Berechnungen der Spektren wurden alle expliziten Wassermoleküle mit Hilfe von EFPs beschrieben und besaßen somit feste interne Koordinaten. Die Berechnungsschritte wurden mittels GAMESS (US) [98, 99], einem elektronischen Strukturcode, durchgeführt. Eine grafische Übersicht der einzelnen Schritte zur Generierung der IR-Spektren ist in Abbildung 2.2 zu finden.

Die experimentellen IR-Vergleichsspektren wurden mit einem FT-IR Spektrometer (TENSOR 27, Bruker Optik GmbH, Ettlingen) aufgezeichnet, welches mit einem DLaTGS-Detektor ausgestattet war. Die Einheit wurde mit einer CaF_2 Transmissionszelle kombiniert (AquaSpec, Bruker Optik GmbH), die eine optische Weglänge von etwa $7 \mu\text{m}$ aufwies. Die wässrige Lösung wurde hergestellt, indem deionisiertes

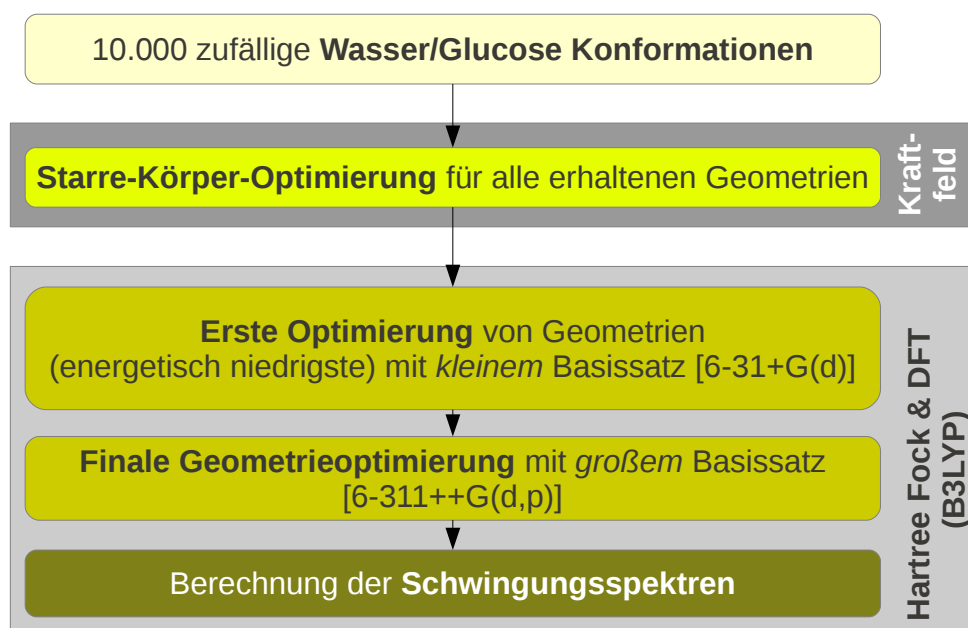


Abbildung 2.2.: Grafische Übersicht der einzelnen Arbeitsschritte zur Berechnung der Schwingungsspektren.

Wasser mit Glucose (Merck KGaA, Darmstadt) versetzt wurde, um eine Glucosekonzentration von 500 mg/dL zu erreichen. Alle Spektren wurden im Wellenzahlbereich von 985–1200 cm^{-1} aufgezeichnet und über 100 Scans mit einer Auflösung von 4 cm^{-1} gemittelt. Eine Blackmann-Harris 3-Term-Apodisierung [100] wurde ebenso genutzt wie ein Zero-Filling-Faktor von 2.

Für den quantitativen Vergleich zwischen theoretischen Ergebnissen (sowohl untereinander als auch mit den experimentellen Spektren) wurden folgende Maßzahlen genutzt:

Der Pearsonsche Korrelationskoeffizient R zwischen zwei Spektren $\tilde{S}(\nu)$ und $\hat{S}(\nu)$ kann wie folgt berechnet werden:

$$R = \frac{\sum \tilde{S}_i \hat{S}_i - \frac{1}{n} (\sum \tilde{S}_i) (\sum \hat{S}_i)}{\sqrt{\left\{ \sum \tilde{S}_i^2 - \frac{1}{n} (\sum \tilde{S}_i)^2 \right\} \left\{ \sum \hat{S}_i^2 - \frac{1}{n} (\sum \hat{S}_i)^2 \right\}}},$$

wobei stets über alle Wellenzahlintervalle von $i = 1$ bis $i = n$ summiert wird, mit $n = 107$ als Gesamtzahl der experimentell erhaltenen Intervalle.

Die mittlere quadratische Abweichung (engl. *root mean square deviation*, kurz RMSD) zwischen einem Referenzspektrum $S^{ref}(\nu)$ und einem weiteren Spektrum

$\tilde{S}(\nu)$ bestehend aus jeweils n Datenpunkten ist definiert als

$$RMSD(S^{ref}, \tilde{S}) = \sqrt{\frac{\sum (S_i^{ref} - \tilde{S}_i)^2}{n}},$$

wobei S_i für den i ten Datenpunkt des Spektrums steht.

Die normierte mittlere quadratische Abweichung (NRMSD) kann daraus abgeleitet werden:

$$NRMSD(S^{ref}, \tilde{S}) = \frac{RMSD(S^{ref}, \tilde{S})}{s_{max} - s_{min}},$$

dabei handelt es sich bei s_{max} und s_{min} um die maximalen bzw. minimalen Werte im Referenzspektrum.

2.4. Ergebnisse

In der Abbildung 2.3 ist exemplarisch eine optimierte Geometrie eines β -D-Glucosemoleküls umgeben von 52 EFP1 Wassermolekülen veranschaulicht.

Abbildung 2.4 zeigt die Entwicklung der IR-Spektren für die Variation von N EFP1 Wassermolekülen ($N = 1 \dots 229$) ohne die Einbindung des kontinuierlichen Solvationsmodells PCM. Das Spektrum für $N = 0$ beinhaltet 4 Einzelspektren (1 pro Konformer). Alle restlichen gemittelten Spektren bestehen aus jeweils 20 Einzelspektren, die sich wiederum aus je 5 Spektren pro Konformer zusammensetzen. Die Spektren in der Abbildung sind für eine übersichtlichere Darstellung mit einem Offset von 1 willkürlicher Einheit (engl. *arbitrary units*, kurz a. u.) versehen. Die Wellenzahlen wurden dabei nicht skaliert. Betrachtete man die durchschnittlichen Standardabweichungen der totalen Energie für jede Konformergruppe mit einer bestimmten Anzahl an Wassermolekülen, so ergab sich über alle Abweichungen gemittelt ein Wert von 5,2 kcal/mol, welcher eine Aussage darüber trifft, wie nah die optimierten Geometrien energetisch beieinander lagen.

Man kann erkennen, dass die stärksten Schwingungen des isolierten Glucosemoleküls bei 1050 cm^{-1} , 1076 cm^{-1} und 1108 cm^{-1} lagen. Dies änderte sich grundlegend mit der Hinzugabe von Wassermolekülen im Optimierungsprozess, wenn sowohl eine Verschiebung der Resonanzfrequenzen als auch eine Abnahme der durchschnittlichen Intensitätsmaxima beobachtet werden konnte. Der Trend setzte sich mit zunehmender Anzahl von Wassermolekülen fort bis schließlich starke Maxima für $N = 229$ Wassermoleküle in Abbildung 2.4 nicht mehr eindeutig auszumachen waren. Eine Ausnahme bildete der Fall von $N = 151$ umgebenden Wassermolekülen, bei dem sich starke Schwingungsbanden um 1052 cm^{-1} befanden.

Wie bereits zuvor erwähnt, wurde im Allgemeinen jede Konformerkonfiguration insgesamt fünffach berechnet. Die Korrelation von Spektren innerhalb einer konformativen Gruppe mit derselben Anzahl an umgebenden Wassermolekülen konnte dadurch abgeschätzt werden, indem der Pearsonsche Korrelationskoeffizient R für jedes einzelne Spektrum zu den restlichen vier bestimmt wurde. Die Ergebnisse konnten

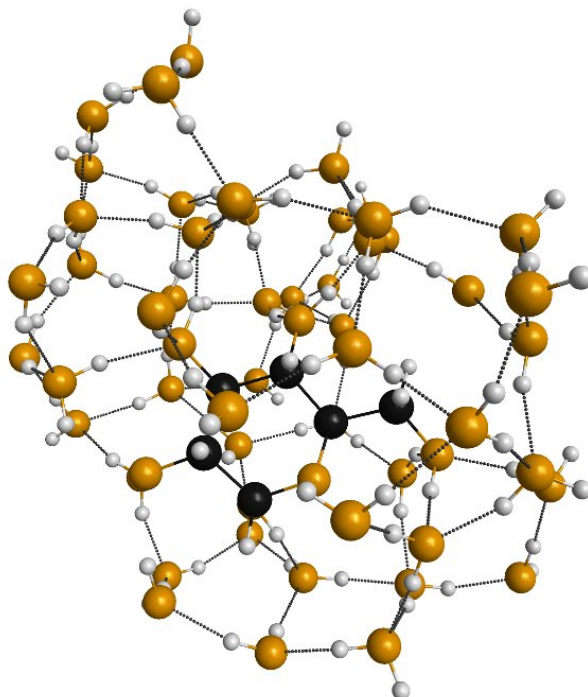


Abbildung 2.3.: Grafische Darstellung einer optimierten Glucosegeometrie zusammen mit 52 EFP1 Wassermolekülen (angefertigt mit der GAMESS Visualisierungssoftware MacMolPlt [101], C: schwarz, O: gold, H: grau) [102].

anschließend über alle vier Konformere gemittelt werden. Der mittlere Korrelationskoeffizient wies Werte zwischen 0,187 und 0,455 auf, ohne erkennbare systematische Abhängigkeit von der Anzahl der Wassermoleküle.

Um ein quantitatives Kriterium für eine tiefergehende Analyse zu erhalten, wurde im Folgenden die Anzahl an ausgebildeten Wasserstoffbrücken zwischen Glucose und dem Lösungsmittel betrachtet. Für das Zustandekommen solch einer Verbindung $O_D\text{-H}\cdots O_A$, wobei O_D und O_A das Donator- bzw. Akzeptorsauerstoffatom bezeichnen, wurde analog zu den Ausführungen in Ref. [71] postuliert, dass für die Abstände $d(O_D\text{-H}) \leq 1.5 \text{ \AA}$ und $d(\text{H}\cdots O_A) \leq 2.4 \text{ \AA}$ sowie für den Winkel $\angle(O_D\text{H}O_A) > 120^\circ$ gelte. Die Anzahl der Wasserstoffbrücken als Funktion der in der Simulation verwendeten Anzahl der Wasserstoffmoleküle ist in Abbildung 2.5 zu sehen.

Während die Anzahl an Wasserstoffbrücken für wenige umgebende Wassermoleküle mit deren Zahl zunimmt, tritt ab etwa 18 Wassermolekülen eine Sättigung auf. Dieses Verhalten ist bei allen betrachteten Konformeren zu finden.

In einer weitergehenden Analyse wurde nun die Zahl der gemittelten Einzelspektren M für eine feste Anzahl von Wassermolekülen ($N = 18$) von 8 bis 80 variiert.

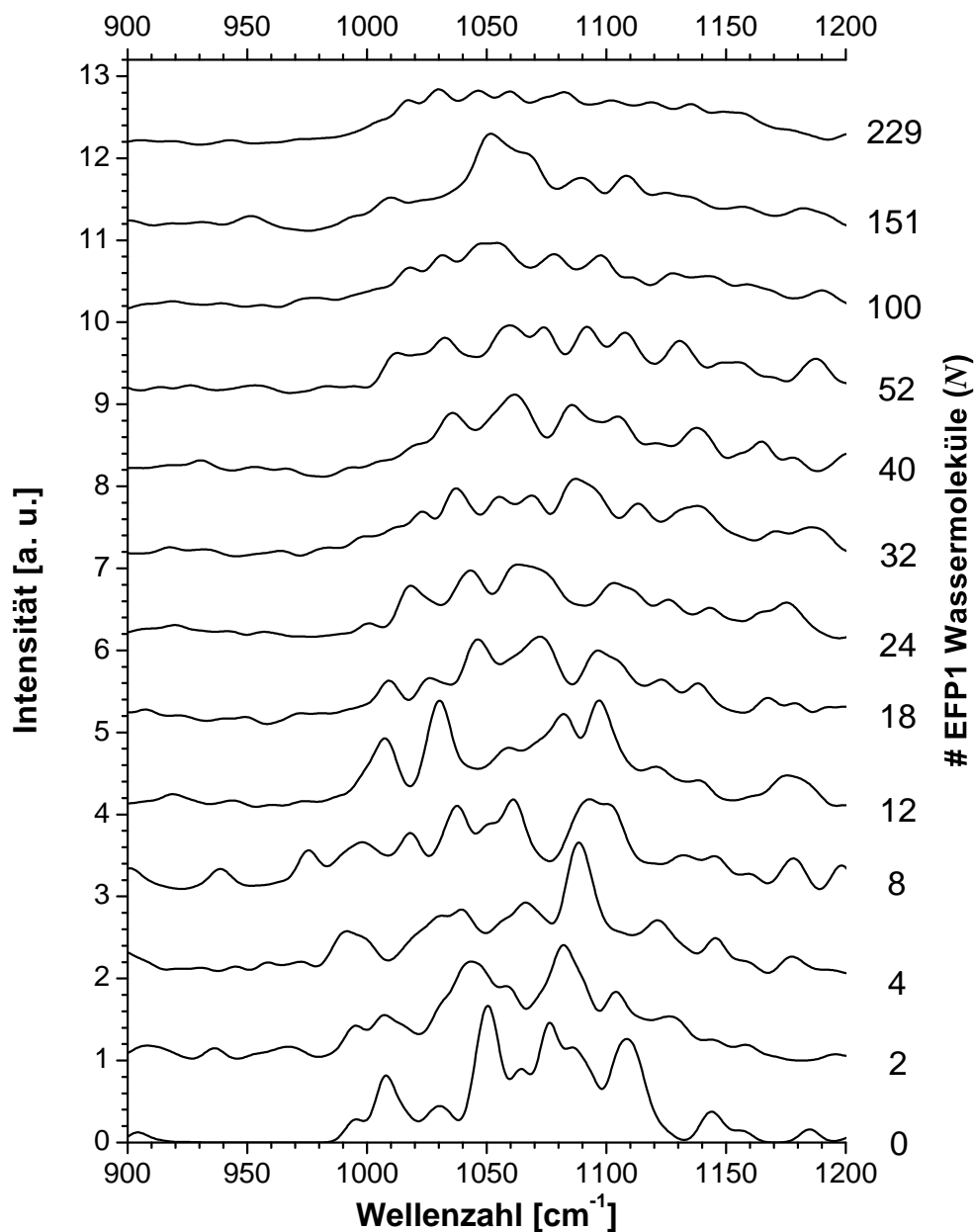


Abbildung 2.4.: Berechnete gemittelte MIR-Spektren von Konfigurationen, die 1 Glucose und N EFP1 Wassermoleküle ($N = 1 \dots 229$) enthielten ohne Einbindung des PCM. Zum Zwecke der besseren Übersichtlichkeit ist jedes Spektrum mit einem Intensitätsoffset von 1 a. u. versehen [102].

Abbildung 2.6 zeigt die resultierenden Gesamtspektren als Funktion der Anzahl von eingeschlossenen Einzelspektren. Die Reihenfolge der Auswahl von Spektren wurde

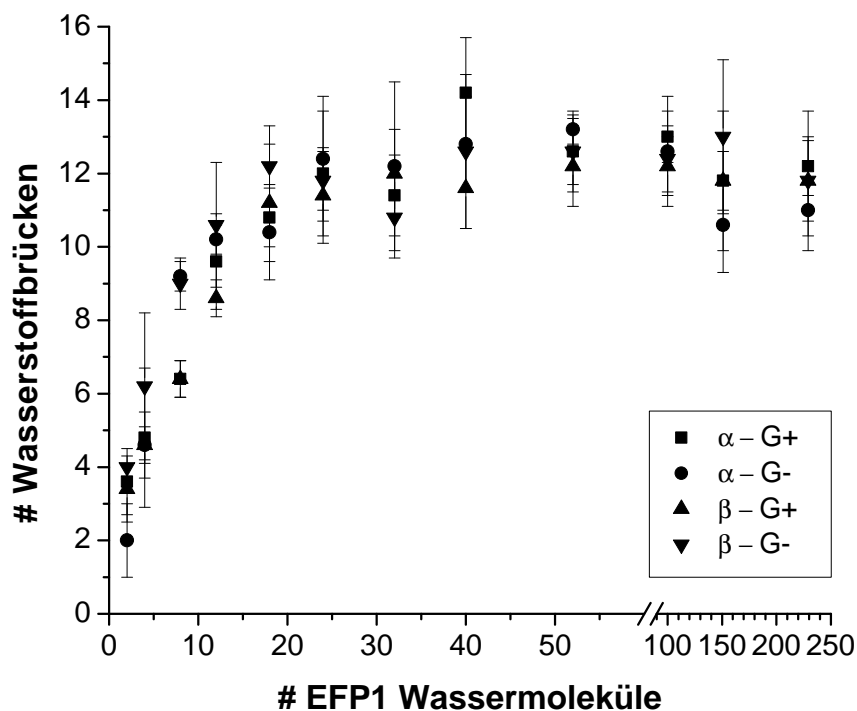


Abbildung 2.5.: Anzahl der Wasserstoffbrücken nach Abschluss der Geometrieoptimierungen für alle 4 analysierten Glucosekonformere (jeweils 5 Spektren beinhaltend) als Funktion der Anzahl an EFP1 Wassermolekülen [102].

randomisiert unter der Bedingung, dass jeder zusätzliche Schritt ein Spektrum pro Konformer beinhalten musste.

Wiederum ist eine deutlich sichtbare Glättung sowie ein Aufweiten der Intensitätsmaxima erkennbar für eine zunehmende Zahl an eingeschlossenen Einzelspektren. Die Hauptmaxima für $M = 8$ Einzelspektren bei 1049 cm^{-1} , 1066 cm^{-1} , 1091 cm^{-1} und 1116 cm^{-1} verschieben sich zu 1045 cm^{-1} , 1057 cm^{-1} , 1072 cm^{-1} und 1093 cm^{-1} für eine Mittelung über $M = 80$ Einzelspektren. Die Korrelation untereinander blieb sehr niedrig mit einem Korrelationskoeffizienten $R = 0,248 \pm 0,224$ für die maximale Anzahl von 80 Einzelspektren.

Ein Vergleich mit experimentell erhobenen Daten wurde aufgestellt, indem der Pearsonsche Korrelationskoeffizient R aller möglichen Untergruppen bestehend aus 4 Spektren (1 pro Konformer) aus dem Satz von 20 Einzelspektren pro Wasserkonfiguration ermittelt wurde. Eine Skalierung der Wellenzahl diente dabei als einziger Fitparameter, wie bereits in Abschnitt 2.3 beschrieben. Die Resultate können in

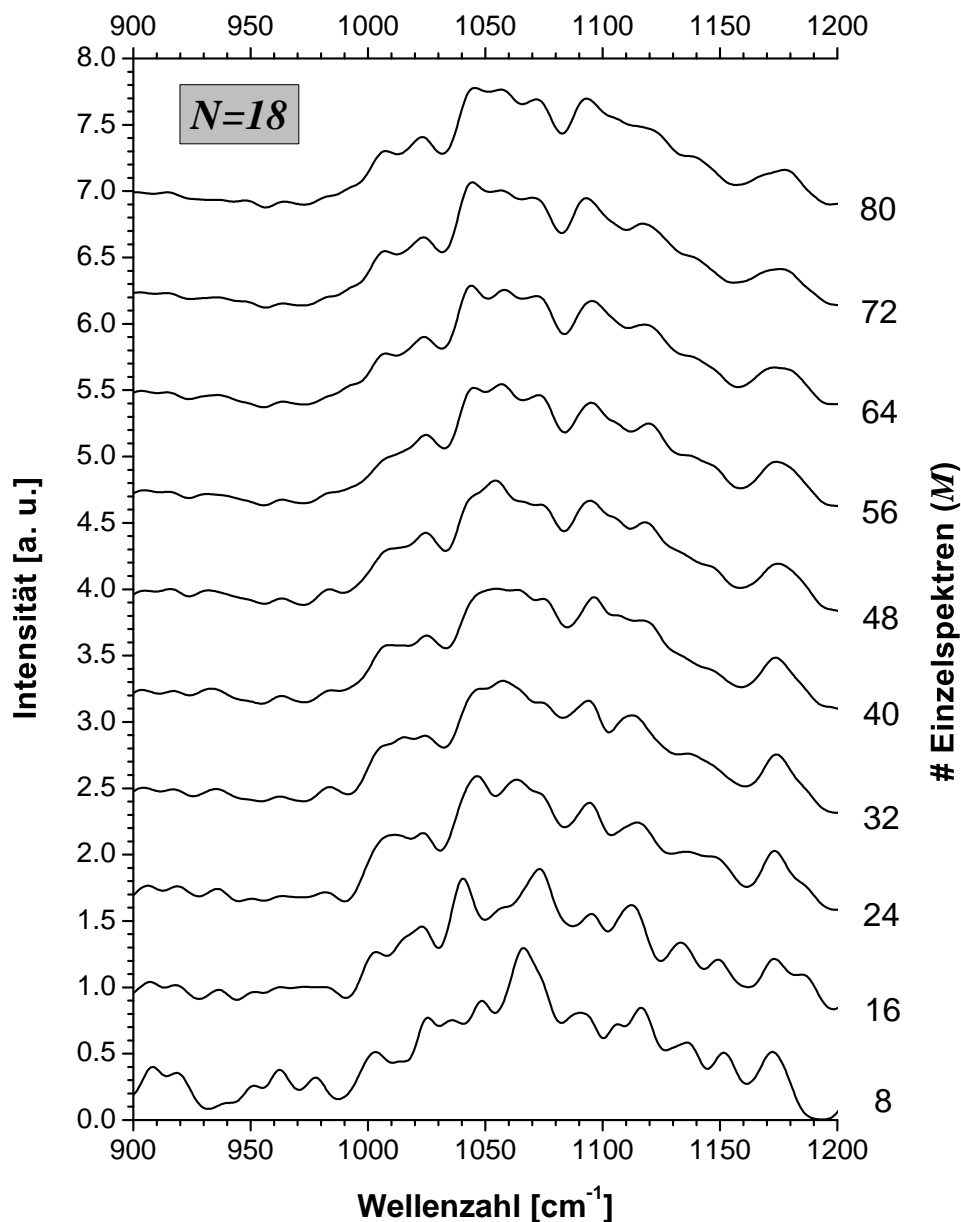


Abbildung 2.6.: Berechnete gemittelte MIR-Spektren von Konfigurationen mit 1 Glucose- und 18 EFP1 Wassermolekülen als Funktion der Anzahl M an Einzelspektren im Mittelungsprozess ($M = 8 \dots 80$) ohne Einbindung des PCM. Zum Zwecke der besseren Übersichtlichkeit ist jedes Spektrum mit einem Intensitätsoffset von 0,75 a. u. versehen [102].

Abbildung 2.7 gefunden werden, die ebenso die Ergebnisse der Simulationen unter Einschluss des PCM beinhaltet. Ein Vergleich der Auswertung, bei der die Koef-

fizienten bestimmt wurden, indem die Spektren zufällig ausgewählt wurden (jedes jedoch nur einmal), zeigte keinen signifikanten Unterschied.

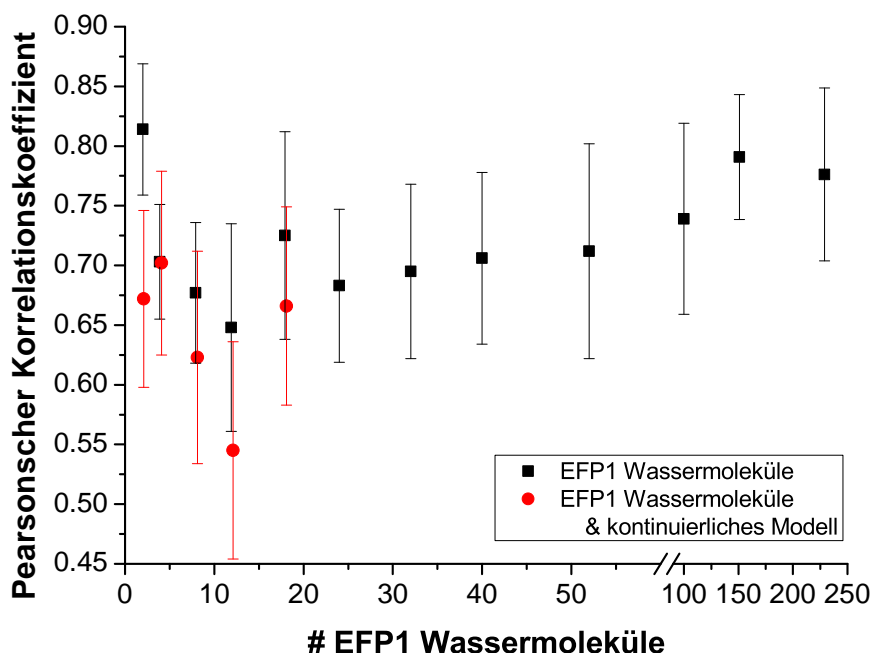


Abbildung 2.7.: Pearson'scher Korrelationskoeffizient simulierter MIR-Spektren verglichen mit experimentellen Ergebnissen als Funktion der Anzahl umgebender Wassermoleküle. Die Resultate sind jeweils mit und ohne die Einbindung eines zusätzlichen kontinuierlichen Solvationsmodells (PCM) dargestellt [102].

Die Daten deuten eindeutig darauf hin, dass die Korrelation mit dem Experiment nicht systematisch von der Anzahl der involvierten Wassermoleküle abhängt. Die relativ großen Fehler der jeweiligen Koeffizienten lassen sich auf die geringe Korrelation innerhalb einer konformativen Gruppe zurückführen. Weiterhin ist ein Einfluss des zusätzlich im Optimierungsprozess verwendeten kontinuierlichen Solvationsmodells nicht erkennbar. Einzig die große Abweichung des Datenpunkts für $N = 2$ Wassermoleküle ohne Verwendung des PCM, könnte darauf hindeuten, dass sich in diesem Fall zwei Moleküle nicht zu einer geeigneten Beschreibung des Lösungsmittels eignen.

Die erweiterten Simulationen mit $N = 18$ Wassermolekülen und einer erhöhten Anzahl an durchgeführten Wiederholungen wurden leicht abweichend ausgewertet, um den Einfluss des Vergleichs von einer größeren Anzahl an Spektren anstatt Sätzen zu je vier Spektren zu untersuchen. Abbildung 2.8 zeigt den gemittelten Pearson'schen Korrelationskoeffizient R als Funktion der Anzahl der im Mittelungsprozess eingeschlossenen Einzelspektren.

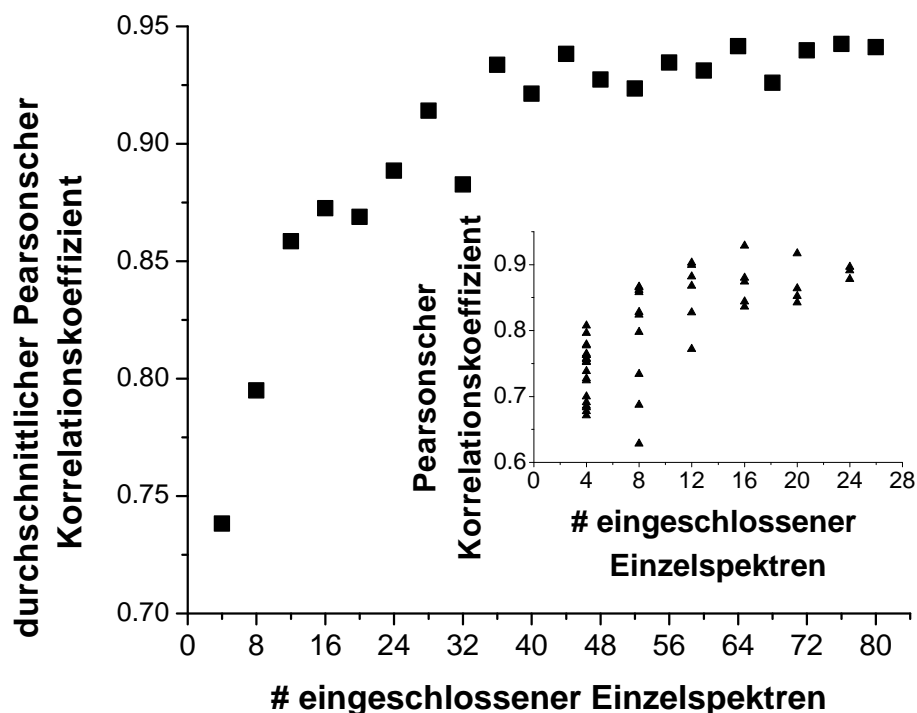


Abbildung 2.8.: Gemittelter Pearsonscher Korrelationskoeffizient als Funktion der Anzahl an eingeschlossenen Einzelspektren. Das Inset zeigt den Pearsonschen Korrelationskoeffizient von Untergruppen aller 80 Einzelspektren für eine Mittelung über $M = 4, \dots, 24$ Spektren [102].

Für weniger als 40 eingeschlossene Spektren wurde der Gesamtsatz von 80 Einzelspektren in Untersätze der Größe M eingeteilt, für welches jeweils R berechnet wurde, um anschließend gemittelt zu werden. Im Inset von Abbildung 2.8 können die einzeln ermittelten Koeffizienten der Untersätze gefunden werden.

Eine Zunahme des durchschnittlichen Pearsonschen Korrelationskoeffizienten kann eindeutig erkannt werden, bis dieser für $M \geq 40$ in ein Plateau bei $R \approx 0.94$ übergeht.

Der Vergleich zwischen den experimentell erhobenen Spektren und den gemittelten, simulierten Spektren für $N = 18$ Wassermoleküle, basierend auf dem größtmöglichen Satz an Einzelspektren ($M = 80$), ist in Abbildung 2.9 veranschaulicht.

Sowohl die Skalierung der Wellenzahl als auch ein Offset in der Intensität dienten hierbei als freie Fitparameter, um den NRMSD zwischen Experiment und Simulation zu minimieren. Es ist jedoch anzumerken, dass beide Kriterien, Pearsonscher Korrelationskoeffizient und NRMSD, zu den gleichen Skalierungsfaktoren die Wellenzahl betreffend führten, mit einem Wert von 0,987 für die veranschaulichten Daten in Abbildung 2.9. Ein Korrelationsfaktor von 0,941 bzw. ein NRMSD von 9,5% zeugen

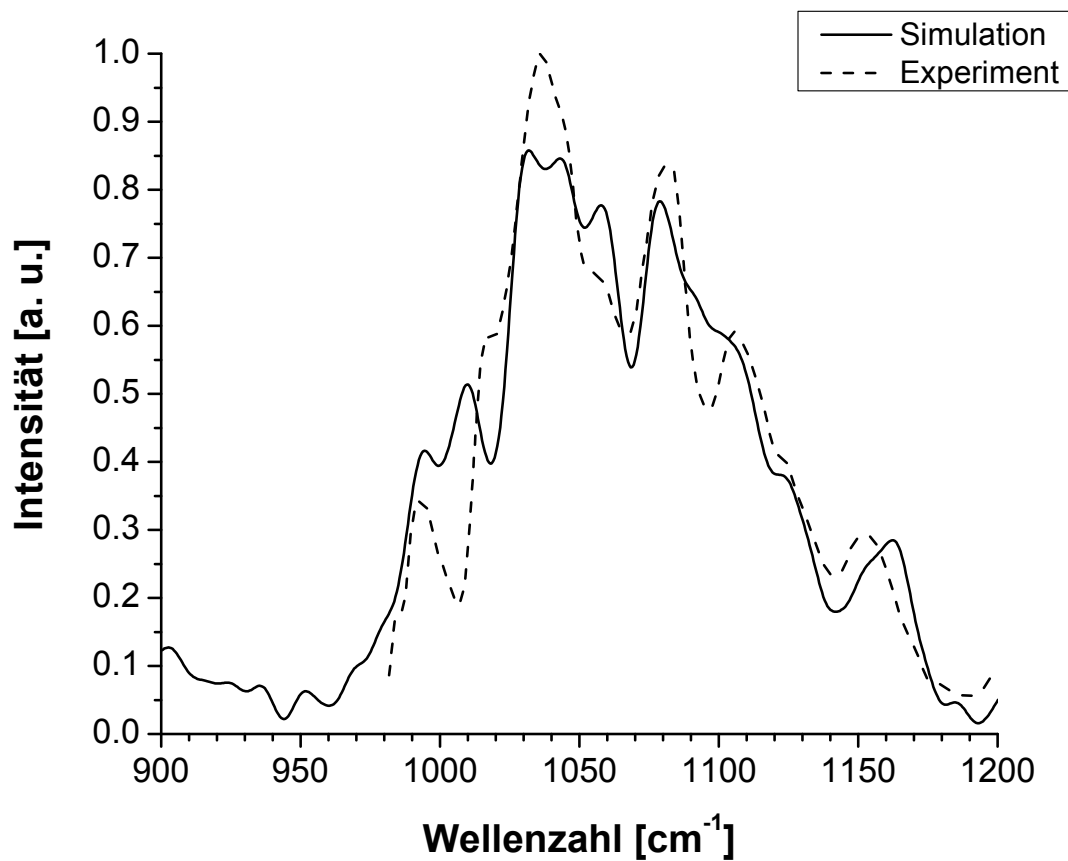


Abbildung 2.9.: Vergleich zwischen einem experimentell erfassten MIR-Spektrum von wässriger Glucoselösung in einer Durchflussküvette und einem simulierten Spektrum eines Glucosemoleküls umgeben von $N = 18$ EFP1 Wassermolekülen, bestehend aus $M = 80$ Einzelspektren [102].

von einer sehr guten Übereinstimmung zwischen Experiment und Simulation.

3. Methoden und Materialien

In diesem Kapitel werden die technischen Grundlagen und Methoden näher erläutert, die zum Verständnis der durchgeführten Experimente von Bedeutung sind. Nach einer Übersicht in Abschnitt 3.1 über die Grundlagen der Infrarotspektroskopie folgen in Abschnitt 3.2 Einzelheiten über die experimentell verwendeten Komponenten wie Strahlungsquelle, Detektionssystem und *in-vitro*-Messaufbau. Abschnitt 3.3 berichtet über Details zur Sensorfertigung, was auch mögliche Erweiterungen des Sensors wie eine Polymerbeschichtung oder die Einbettung in ein Membransystem sowie die Untersuchung einer möglichen Zytotoxizität der eingesetzten Sensorbauteile beinhaltet. Im abschließenden Abschnitt 3.4 wird dann ein Formalismus eingeführt, der eine Bewertung der Sensoren in Hinblick darauf gibt, wie die Vorhersagegenauigkeit mit der Integrationszeit verknüpft ist und wie die Langzeitstabilität des Messsystems bewertet werden kann.

3.1. Spektroskopie molekularer Schwingungen

Die physikalische Grundlage für die Spektroskopie molekularer Schwingungen liegt im molekularen Dipolmoment $\vec{\mu}$ begründet, das sich aus dem permanenten Dipolmoment $\vec{\mu}_0$ und einem induzierten Dipolmoment $\vec{\mu}_{\text{ind}} = \alpha \vec{E}_{\text{lokal}}$ zusammensetzt, welches die Antwort der Polarisierbarkeit α eines Moleküls auf ein äußeres, lokales elektrisches Feld \vec{E}_{lokal} darstellt:

$$\vec{\mu} = \vec{\mu}_0 + \alpha \vec{E}_{\text{lokal}}. \quad (3.1)$$

Bei obiger Formulierung handelt es sich um eine Näherung, da α normalerweise von der Raumrichtung abhängt und somit ein Tensor ist. Im Folgenden wird außerdem zum Zwecke der Lesbarkeit auf die Vektorschreibweise verzichtet. Zur Vereinfachung sei hier weiterhin ein zweiatomiges Molekül angenommen, dessen Kerne sich im Abstand R voneinander befinden.

Entwickelt man nun sowohl μ_0 als auch α um die Gleichgewichtslage R_0 bis zur ersten Ordnung, gelangt man zu folgenden beiden Ausdrücken, bei denen $R - R_0$ die Auslenkung aus der Gleichgewichtslage beschreibt:

$$\begin{aligned} \mu_0(R) &= \mu_0(R_0) + \left. \frac{\partial \mu_0}{\partial R} \right|_{R=R_0} (R - R_0) + \dots \\ \alpha(R) &= \alpha(R_0) + \left. \frac{\partial \alpha}{\partial R} \right|_{R=R_0} (R - R_0) + \dots \end{aligned} \quad (3.2)$$

Die Auslenkung kann nun in harmonischer Näherung mit der Kreisfrequenz ω_v be-

schrieben werden durch

$$(R - R_0)(t) = A \cos(\omega_v t). \quad (3.3)$$

Die lokale elektrische Feldstärke E_{lokal} wird durch ein zeitlich sinusartiges Feld mit der Kreisfrequenz ω genähert:

$$E_{\text{lokal}}(t) = E_0 \cos(\omega t). \quad (3.4)$$

Somit ergibt sich für das Dipolmoment:

$$\begin{aligned} \mu(t) = \mu_0(R_0) + \frac{\partial \mu_0}{\partial R} \Big|_{R=R_0} A \cos(\omega_v t) + \alpha(R_0) E_0 \cos(\omega t) \\ + \frac{\partial \alpha}{\partial R} \Big|_{R=R_0} A \cos(\omega_v t) E_0 \cos(\omega t). \end{aligned} \quad (3.5)$$

Die Nutzung der trigonometrischen Beziehung $2 \cos x \cos y = \cos(x + y) + \cos(x - y)$ führt schließlich zu:

$$\begin{aligned} \mu(t) = \underbrace{\mu_0(R_0)}_{\text{perm. Dipolmoment}} + \underbrace{\frac{\partial \mu_0}{\partial R} \Big|_{R=R_0} A \cos(\omega_v t)}_{\text{IR-Spektroskopie}} + \underbrace{\alpha(R_0) E_0 \cos(\omega t)}_{\text{Rayleigh-Streuung}} \\ + \underbrace{\frac{AE_0}{2} \frac{\partial \alpha}{\partial R} \Big|_{R=R_0} \left[\underbrace{\cos(\omega - \omega_v)t}_{\text{Stokes}} + \underbrace{\cos(\omega + \omega_v)t}_{\text{Anti-Stokes}} \right]}_{\text{Raman-Spektroskopie}}. \end{aligned} \quad (3.6)$$

An den einzelnen Summanden der Gleichung kann man sehr übersichtlich voneinander getrennt die Komponenten erkennen, die zum gesamten Dipolmoment beitragen. Das zeitlich unveränderliche permanente Dipolmoment hängt einzig von R_0 ab und spielt spektroskopisch keine direkte Rolle. Der zweite Term hingegen, der die Veränderung des molekularen Dipolmoments mit der periodischen Auslenkung ($\partial \mu_0 / \partial R \neq 0$) bei der Schwingungsfrequenz ω_v beschreibt, ist derjenige, auf dem die IR-Spektroskopie basiert. So kommt es im QM-Bild zu einer resonanten Absorption für den Fall, dass die Frequenz der einkommenden Strahlung derjenigen der molekularen Schwingung entspricht ($\omega = \omega_v$). Anschließend folgen die Terme, welche die Streuung des eingestrahnten elektrischen Feldes am Molekül beschreiben, sowohl für den elastischen Fall ohne Netto-Energiebeitrag (Rayleigh-Streuung) als auch für die inelastische Streuung. Letztere stellt den zugrundeliegenden physikalischen Effekt der Raman-Spektroskopie dar, bei dem durch die Änderung der Polarisierbarkeit mit Auslenkung aus der Ruheposition ($\partial \alpha / \partial R \neq 0$) Rotations- und Vibrationsenergie durch das Molekül aufgenommen (Stokes) oder abgegeben (Anti-Stokes) wird.

Eine direkte Folge der aufgestellten Betrachtungen ist also, dass homonukleare Moleküle mittels Raman-Spektroskopie beobachtbar sind, während sie für die IR-Spektroskopie aufgrund des konstanten permanenten Dipolmoments direkt nicht de-

tektierbar sind.

Somit stehen zur Untersuchung von molekularen Schwingungen mit der IR- und Raman-Spektroskopie zwei komplementäre physikalische Techniken zur Verfügung [103]. Das Ausschlussprinzip der beiden Methoden, welches besagt, dass eine IR-aktive Schwingung nicht gleichzeitig auch Raman-aktiv sein kann, gilt für Moleküle, die ein Inversionszentrum aufweisen, wie etwa dem linearen, dreiatomigen CO₂-Molekül, versagt aber sowohl bei komplexeren Biomolekülen wie Glucose oder bei geometrisch simpleren Molekülen ohne Inversionszentrum wie z. B. H₂O. Jedoch liefern die Informationen beider Anwendungen auch für Moleküle ohne Ausschlussprinzip wichtige zusätzliche Erkenntnisse, da schwache Übergänge im IR-Spektrum durchaus starke Signale im Raman-Spektrum aufweisen können.

Die MIR-Spektroskopie mit typischen Anregungsenergien um 0,1 eV nutzt Wellenlängen um 10 μm in der sog. *Fingerprint*-Region, um Grundschnwingungen der Moleküle zu beobachten. Die thermische Besetzung der höheren Schwingungsniveaus ($v > 0$) im Verhältnis zum Grundzustand ($v = 0$) folgt der Maxwell-Boltzmann-Verteilung:

$$N(v > 0)/N(v = 0) = \exp(-v(h\nu)/k_B T), \quad (3.7)$$

wobei k_B die Boltzmannkonstante, ν die Frequenzdifferenz benachbarter Schwingungsniveaus und T die Temperatur angeben. Als Vorteile speziell für die MIR-Spektroskopie stellen sich neben der hohen Sensitivität und Selektivität u. a. die Harmlosigkeit für biologische Proben und die große Anzahl an spektralen Bibliotheken dar, jedoch steht die Methode bei der Untersuchung von wässrigen Proben immer vor dem Problem einer äußerst hohen Wasserabsorption.

3.2. Experimenteller Aufbau

3.2.1. Quantenkaskadenlaser

Anfang der 90er Jahre wurde eine neue Art von Halbleiterlasern vorgestellt [104], deren Wirkungsweise sich dabei grundlegend von den verfügbaren Modellen unterschied, die auf Rekombination von Elektron-Loch-Paaren zwischen Leitungs- und Valenzband beruhten. Im Gegensatz zu diesen Interbandübergängen operieren Quantenkaskadenlaser (QCLs) auf diskreten elektronischen Zuständen innerhalb des Leitungsbandes in dem die Rekombination stattfindet (Intersub- bzw. Intrabandübergang). Die Quantisierung innerhalb eines Bandes wird realisiert durch die alternierende Abfolge von Injektions- und aktiven Regionen, die jeweils aus mehreren, wenigen Nanometern dicken Lagen bestehen. So wird in den aktiven Regionen analog zum Quantentopf eine Energiediskretisierung erreicht, die über die Breite und Form des Potenzialtopfs variiert werden kann.

Abbildung 3.1 zeigt schematisch den Aufbau der Regionen und die Abfolge des Elektronentransports. Durch das Anlegen eines elektrischen Feldes werden Elektronen in Minibändern der Injektorregionen per Tunnelung durch die Potenzialbarriere vom Grundzustand $|g\rangle$ des Minibands in den angeregten Zustand $|3\rangle$ der aktiven

Region transportiert, wo sie unter Aussendung von Strahlung in den Zustand $|2\rangle$ übergehen. Ein Tunneln in die folgende Injektorregion ist nicht möglich, da hier eine energetisch verbotene Zone anschließt. Die Potenzialdifferenz zwischen den Zuständen $|2\rangle$ und $|1\rangle$ ist so konzipiert, dass Zustand $|2\rangle$ mittels Energieübertrag an optische Phononen rasch entvölkert wird und Elektronen so über $|1\rangle$ wieder in das Miniband der folgenden Injektorregion übergehen können. Durch die vergleichsweise kurze Lebensdauer im Zustand $|2\rangle$ wird also die für die Lasertätigkeit benötigte Besetzungsinversion erzeugt. Im Miniband relaxieren die Elektronen schließlich wiederum schnell in den Grundzustand $|g\rangle$, der den Ausgangspunkt der Betrachtungen bildete. Eine namensgebende Besonderheit der Technologie ist die Tatsache, dass ein Elektron nicht nur an der (i. d. R. induzierten) Emission eines Strahlungsquants beteiligt ist, sondern kaskadierend mehrere Quantentöpfe und damit Emissionszyklen durchläuft [105, 106].

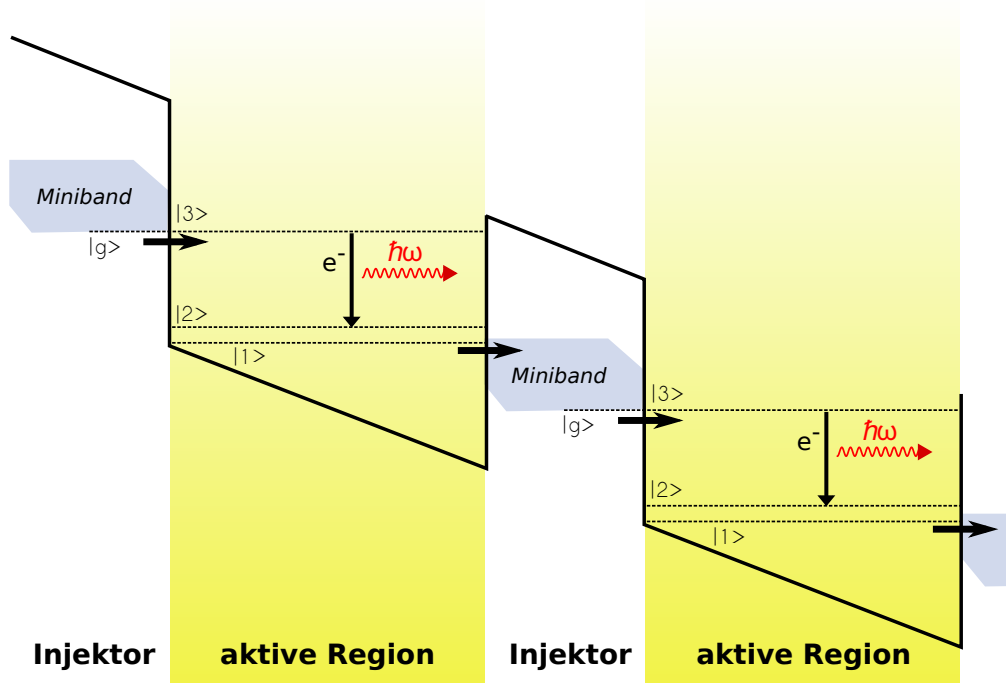


Abbildung 3.1.: Vereinfachtes Energieschema von QCLs bei dem Elektronen in Minibändern der Injektorregionen in aktive Regionen transportiert werden. Unter Strahlungsaussendung findet an dieser Stelle die Rekombination von Elektron-Loch-Paaren im Leitungsband statt.

Technisch werden in der Fertigung von QCLs typische Schichtdicken der Halbleiterverbindungen von etwa $10 - 50 \text{ \AA}$ realisiert durch Anwendung von epitaxialen Beschichtungsverfahren wie der chemischen oder physikalischen Gasphasenabscheidung (engl. *chemical/physical vapour deposition*, kurz CVD/PVD), bei der mehrere

hundert solcher dünnen Schichten alternierend aufgebracht werden.

Während die emittierte Wellenlänge bei Interbandübergängen durch die für die eingesetzte Halbleiterverbindung charakteristische Bandlücke gegeben ist, bieten die Heterostrukturen von QCLs den großen Vorteil des Wellenlängendesigns im Produktionsprozess in einem breiten Spektralbereich vom mittleren bis ins ferne Infrarot, je nach Anordnung und Zusammensetzung der dünnen Materialschichten. So kann die Strahlungsquelle über große Wellenlängenbereiche auf die spektroskopische Anwendung angepasst werden [49], was weder für herkömmliche Halbleiterlaser noch Gaslaser im mittleren Infrarot wie dem CO₂-Laser der Fall ist.

Ein weiterer Vorteil von QCLs liegt in der leichten Handhabung, die biologische oder medizinische Anwendungen oftmals voraussetzen. Neben einer kompakten Größe ist vor allem der Betrieb bei Zimmertemperatur und damit der Verzicht auf eine aufwendige Kühlung (z. B. durch flüssigen Stickstoff) wie bei Bleisalzlasern unverzichtbar für den Einsatz in integrierten und möglicherweise portablen Systemen.

Man unterscheidet weiterhin zwischen drei Arten von QCLs, abhängig von der Art des verwendeten Resonators. Fabry-Pérot-QCLs besitzen Verspiegelungen an den Endflächen des Halbleiter-Gainmediums und formen damit ein Fabry-Pérot-Resonator, der jedoch häufig multimodig abstrahlt. *Distributed feedback* QCLs nutzen darüber hinaus dielektrische Spiegel (engl. *distributed Bragg reflector*), die durch geschicktes Design dünner Reflektionsschichten eine konstruktive Interferenzüberlagerung für eine bestimmte Wellenlänge erzielen, um so einen Einzelmodenbetrieb zu ermöglichen [107, 108]. *External cavity* QCLs verwenden schließlich normalerweise ein Beugungsgitter als Wellenlängen selektierendes Element in einem externen Resonator. Über den Verkipfungswinkel des Gitters wird so die Wellenlänge des zurück reflektierten Strahls festgelegt [109, 110].

3.2.2. Pyroelektrische Detektoren

Bei pyroelektrischen Detektoren handelt es sich um Systeme zur Erfassung von infraroter Strahlung. Sie basieren auf dem pyroelektrischen Effekt von meist auch zugleich ferroelektrischen Materialien, die auf eine Schwankung der Temperatur mit einer spontanen Änderung der Polarisierung reagieren, da die Positionen von Atomen innerhalb der Kristallstruktur leicht aus der Gleichgewichtslage gebracht werden. Dies hat eine Variation der Oberflächenladung und damit des elektrochemischen Potentials zur Folge, welches elektronisch als Spannung abgegriffen und detektiert werden kann. Der Effekt ist nicht mit dem thermoelektrischen zu verwechseln, bei dem ein permanentes Potenzial dadurch erzeugt wird, indem verschiedene Teile des Materials unterschiedlichen Temperaturen ausgesetzt werden. Daher sind pyroelektrische Detektoren nur zur Erfassung von Änderungen der Strahlintensität geeignet, was z. B. durch eine elektrische Pulsung der Strahlungsquelle erreicht werden kann.

Die Vorteile von pyroelektrischen Detektoren liegen einerseits in der hohen Sensitivität über einen großen Spektral- und Temperaturbereich, abhängig von den verwendeten Kristallmaterialien. Andererseits ist die niedrige Leistungsaufnahme, schnelle Reaktionszeit auf die Signaländerungen und nicht zuletzt der günstige Anschaffungs-

preis hervorzuheben.

Der pyroelektrische Strom I , der aufgrund der einfallenden Strahlungsleistung W_0 produziert wird, nennt sich Stromempfindlichkeit R_I und ist definiert als

$$R_I = \frac{I}{W_0} = \frac{\eta p A \omega}{G(1 + \omega^2 \tau_T^2)^{1/2}}, \quad (3.8)$$

wobei p den pyroelektrischen Koeffizienten, η die Detektorabsorptivität, A die Querschnittsfläche des Detektors, ω die Modulationsfrequenz der Strahlungsquelle, G die Wärmeleitfähigkeit zur Umwelt und τ_T die thermale Zeitkonstante für umweltbedingte Wärmeverluste bezeichnet. Multipliziert man die Größe mit der Impedanz des elektrischen Verstärkerkreises, erhält man die Spannungsempfindlichkeit R_V :

$$R_V = \frac{V_P}{W_0} = \frac{R_T \eta p A \omega}{G(1 + \omega^2 \tau_T^2)^{1/2} (1 + \omega^2 \tau_E^2)^{1/2}}, \quad (3.9)$$

wobei R_T den Gesamtwiderstand von Detektor und Schaltung angibt und τ_E die elektrische Zeitkonstante, die Verluste im RC-Kreis beinhaltet. Somit ergibt sich die optimale Empfindlichkeit bei einer Frequenz, die zwischen den reziproken Zeitkonstanten liegt.

Einer hohen Empfindlichkeit steht ggf. auch ein hohes Eigenrauschen der Detektoreinheit gegenüber, weshalb auch dieses mit in die Betrachtungen gezogen werden muss. Man unterscheidet hauptsächlich zwischen drei detektorspezifischen Rauschquellen: dem thermischen, dielektrischen und Verstärkerrauschen. Bei Frequenzen über 20 Hz dominiert dabei üblicherweise das dielektrische Rauschen. Das Signal-zu-Rausch-Verhältnis ist durch das Maß der rauschäquivalenten Leistung (engl. *noise-equivalent power*, kurz NEP) gegeben:

$$\text{NEP} = \frac{V_N}{(\Delta f)^{1/2} R_V}. \quad (3.10)$$

V_N gibt dabei den quadratischen Mittelwert des Spannungsrauschens am Detektorausgang und Δf die Bandbreite des Detektors an.

Da sowohl thermisches als auch dielektrisches Rauschen proportional zu $A^{1/2}$ sind, definiert man als Kenngröße schließlich die spezifische Detektivität D^* :

$$D^* = \frac{A^{1/2}}{\text{NEP}}. \quad (3.11)$$

Zur detaillierteren physikalischen und technischen Beschreibung des pyroelektrischen Effekts und seines Nutzens in der Detektionstechnik sei auf die einschlägige Fachliteratur verwiesen [111, 112, 113, 114].

3.2.3. Lock-in-Verstärker

Betrachtet man das Fourierspektrum des Rauschens, so nimmt die dazugehörige Amplitude häufig (z.B. bei dem sog. $1/f$ -Rauschen) mit der Frequenz ab. Daher ist es sinnvoll, anstatt konstante Signale solche zu messen, die zusätzlich durch höhere Frequenzen moduliert wurden.

Lock-in-Verstärker sind Messinstrumente, die eine Kreuzkorrelation zwischen einem detektierten und einem Referenzsignal mit einer festen Frequenz herstellen. Auf diese Weise kann der Einfluss der niederfrequenten Rauschquellen effektiv reduziert werden. Die Funktionsweise ist vereinfacht in Abbildung 3.2 veranschaulicht.

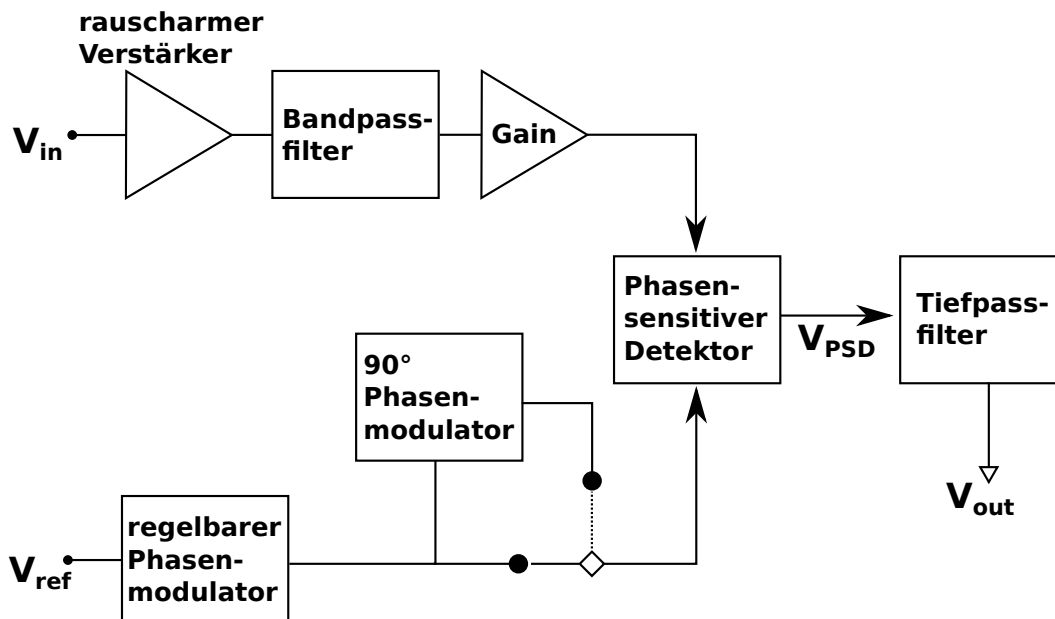


Abbildung 3.2.: Blockdiagramm zur Funktionsweise von Lock-in-Verstärkern.

Das zu detektierende Signal kann beispielsweise durch elektrische Modulation oder - bei optischen Messverfahren - durch Verwendung von Chopperrädern periodisch moduliert werden. Das Eingangssignal des Lock-in-Verstärkers V_{in} ist dann, wie das Referenzsignal V_{ref} , frequenzmoduliert, weist aber für jede Fourierkomponente einen Phasenversatz Θ bzw. Φ auf und kann (im einfachen Fall einer sinusförmigen Modulation) durch $V_{in} = V_{sig} \sin(\omega_r t + \Theta)$ ausgedrückt werden, wobei V_{sig} die Signalamplitude und ω_r die Kreisfrequenz des sinusförmigen Eingangssignals beschreiben. Das Referenzsignal wiederum durchläuft zunächst einen Phasenmodulator und es ergibt sich $V_{ref} \sin(\omega_l t + \Phi)$ mit ω_l als Kreisfrequenz des Referenzsignals.

Bei dem phasensensitiven Detektor (engl. *phase-sensitive detector*, kurz PSD) handelt es sich vereinfacht um ein elektronisches Bauteil, welches die Eingangssignale multipliziert. In diesem Fall wird das gefilterte und verstärkte Eingangssignal mit

dem Lock-in-Referenzkanal multipliziert, was zu folgender Größe V_{PSD} führt:

$$\begin{aligned} V_{PSD} &= V_{sig} V_{ref} \sin(\omega_r t + \Theta) \sin(\omega_l t + \Phi) \\ &= \frac{1}{2} V_{sig} V_{ref} \{ \cos([\omega_r - \omega_l]t + \Theta - \Phi) \\ &\quad - \cos([\omega_r + \omega_l]t + \Theta + \Phi) \}. \end{aligned} \quad (3.12)$$

Das Signal kann anschließend durch einen Tiefpassfilter um seinen AC-Anteil bereinigt und die Phasendifferenz durch Justage des Phasenmodulators ausgeglichen werden, sodass im Fall für $\omega_l \approx \omega_r$ folgender Ausdruck übrig bleibt:

$$V_{out}(\omega_l \approx \omega_r) = \frac{1}{2} V_{sig} V_{ref} \cos(\Theta - \Phi), \quad (3.13)$$

der einzig von der relativen Phasenbeziehung $(\Theta - \Phi)$ abhängt und somit ein zur ursprünglichen Signalamplitude proportionales DC-Signal liefert.

Die Verwendung eines zusätzlichen Referenzkanals mit 90° Phasenversatz dient der Stabilität des Ausgangssignals, da auf solche Weise kleinste Abweichungen von ω_r und ω_l ausgeglichen werden können, die einen relativen Phasenunterschied hervorrufen und damit in einer Änderung des Ausgangssignals resultieren können. Diese ist exakt gegenläufig zu derjenigen bei der Referenzierung mit einem um 90° versetzten, zweiten Referenzsignal. Eine quadratische Addition beider Kanäle liefert so einen stabilen Ausgabewert, der nun unabhängig von den erläuterten Schwankungen ist.

Die Einstellmöglichkeiten am Verstärker erlauben u. a. die Regelung einer Zeitkonstanten, über die das Eingangssignal vor der Filterung integriert werden kann. Dabei hat eine erhöhte Zeitkonstante eine Verringerung der Breite des Tiefpassfilters zur Folge. Weiterhin kann die Dämpfung des Filters variiert werden, welche die Steigung des Tiefpassfilters im Frequenzraum oberhalb der Grenzfrequenz anpasst [115, 116, 117, 118].

3.2.4. Fluidik-Messsystem

Zur Automatisierung der *in-vitro*-Erprobung wurde ein Fluidik-Messstand entworfen, um Sensoren wässrige Proben verlässlich und reproduzierbar zuzuführen. Die Flussregulierung übernahm eine Peristaltikpumpe (LabDos; Pumpantrieb: HiTec Zang GmbH, Herzogenrath; Pumpkopf: Watson-Marlow GmbH, Rommerskirchen) in Zusammenspiel mit einem zwölfmal Ventilregler (Smartline Valve Drive S12, Knauer GmbH, Berlin). Die so transportierten Proben wurden dann entweder einer temperierbaren, massiven Messkammer oder einer Vorrichtung zur automatischen Pipettierung von Sensoren zugeführt [119].

Eine schematische Zeichnung der Fluidikmesskammer ist in Abbildung 3.3 zu sehen. Der äußere Körper besteht aus Aluminium, welches eine vergleichsweise gute Wärmeleitfähigkeit besitzt. Der innere Teil wurde aus Gründen der Korrosionsbeständigkeit aus Edelstahl gefertigt, um möglichen Veränderungen durch die Proben-

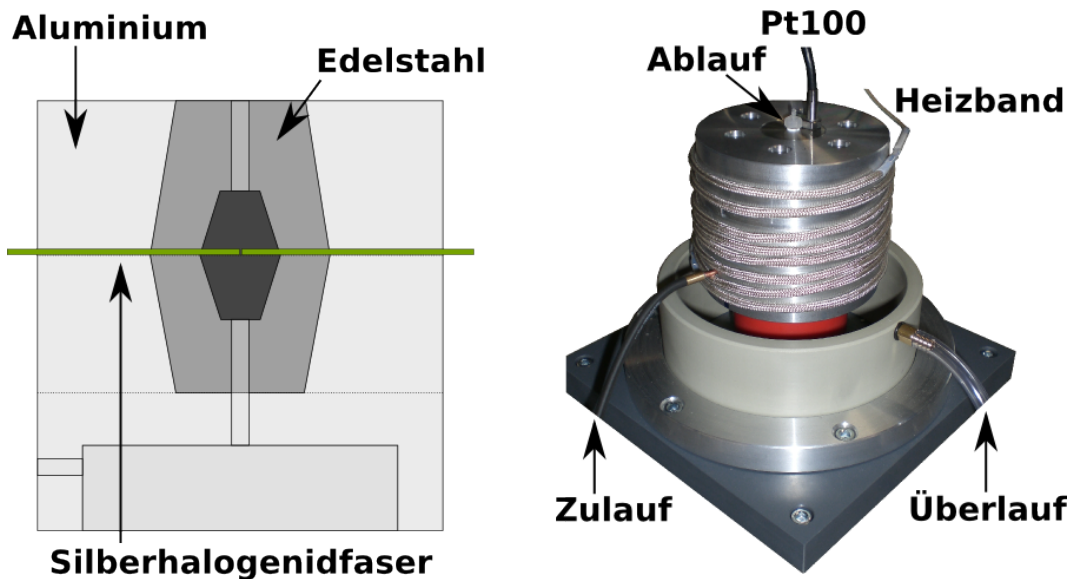


Abbildung 3.3.: Schematische Darstellung der Fluidik-Messkammer mit Positionierung des Fasersensors (*links*) und dazu entsprechende Fotografie des Aufbaus (*rechts*) (nach [119]).

flüssigkeiten vorzubeugen. In diesen austauschbaren Teil wurden auch die Sensoren eingeklebt, die *in vitro* getestet wurden. Der Zulauf besteht aus einem spiralförmigen Kupferrohr, das in den Boden der Messkammer eingesetzt wurde und dem Vorwärmen der Lösung dient.

Der Hohlraum im Inneren der Messkammer besitzt ein Volumen von 2,55 mL und ist doppelt-konisch geformt, um Verwirbelungen zu vermeiden. In den Edelstahlkörper kann ein Pt100 Temperaturfühler eingesetzt werden. Der detaillierte Entwurf und eine ausführliche Charakterisierung der Messkammer ist, wie der Prozess des Einklebens der Fasersensoren, in Referenz [119] zu finden.

Für die schnelle Bewertung von Sensoren wurde alternativ zur Fluidikmesskammer eine Vorrichtung zur automatischen Flüssigkeitszufuhr hergestellt, welche eine leichtere Handhabung aufweisen und ein luftdichtes Einsetzen der Sensoren in ein abgeschlossenes System vermeiden sollte, um etwaigen Sensorbeschädigungen vorzubeugen. Abbildung 3.4 zeigt eine technische Zeichnung der Sensorarretierung. Für die Untersuchung eines als Messküvette dienenden Spalts (s. Abschnitt 3.3) zwischen zwei auf einem Titanhalter eingeklebten Fasern konnte mit dem vereinfachten Aufbau direkt vom Pumpsystem in einem justierbaren Abstand auf den in der Führungsnut eingespannten Sensor getropft werden. Auch wenn bei dem System aufgrund von schlechterer Schwingungsisolierung und geringerem Flüssigkeitsreservoir um die Messkavität mit Abstrichen in der Messgenauigkeit zu rechnen war, konnten

Sensoren so schnell und beschädigungsfrei bewertet werden, was bei Fortschritten in der Sensorfertigung ein immer größer werdendes Anliegen darstellte.

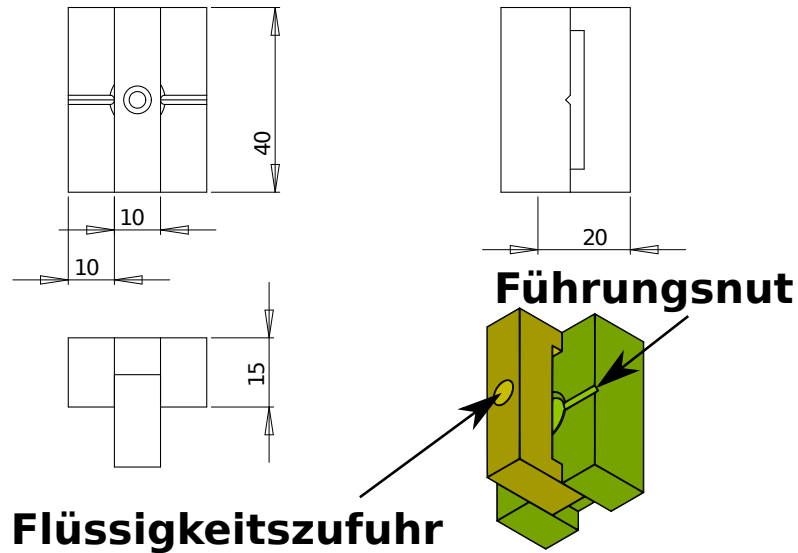


Abbildung 3.4.: Technische Zeichnung der Sensorarretierung zur vereinfachten Sensorcharakterisierung. Fasersensoren des Typs B werden hier mit dem Titanhalter in der Führungsnut festgeklemmt (s. auch Abschnitt 3.3.2). Alle Zahlenwerte sind in Millimeter angegeben.

3.3. Fasergebundener optischer Sensor

Aus der Idee eines fasergebundenen Sensors auf Basis der MIR-Transmissionsspektroskopie, in den direkt eine miniaturisierte Messküvette eingebracht werden soll, ergeben sich eine Reihe von Folgerungen. Zunächst ist die Befüllung der Messküvette durch das Gesetz von Hagen-Poiseuille limitiert, welches aussagt, dass eine Halbierung des Küvettenradius zu einem 16-fach erhöhten Strömungswiderstand führt. Im Zusammenhang mit wünschenswerten Weglängen der Küvette von unter $100\ \mu\text{m}$ wird klar, dass ein Austausch der Probenflüssigkeit aus dem Messvolumen nicht per Konvektion geschehen kann. Vielmehr ist man auf den Flüssigkeitstransport per Diffusion angewiesen, der somit das aktive Pumpen ersetzen soll, das bei herkömmlichen IR-Transmissionzellen zum Einsatz kommt und auf sehr große Druckdifferenzen angewiesen ist.

Aus diesen Überlegungen ergibt sich die Frage nach einer Optimierung der Messküvettengeometrie, die in Abschnitt 3.3.1 behandelt wird, gefolgt von Einzelheiten zur tatsächlichen Sensorfertigung in Abschnitt 3.3.2. Weiterhin gilt es zu klären, inwiefern weitere Analyten und Störsubstanzen mit relativ großen Molekulargewichten

durch die Abscheidung an einer umgebenden Membran vor dem Eindringen in die Messkavität gehindert werden können, ohne die Diffusionszeiten von Glucose zu stark einzuschränken (Abschnitt 3.3.3). Schließlich befassen sich die Abschnitte 3.3.4 und 3.3.5 mit der Zytotoxizität aller zur Faserfertigung im MIR verwendeten Materialien und Möglichkeiten zur Beschichtung der nicht biokompatiblen Fasern unter Wahrung akzeptabler MIR-Transmissionseigenschaften.

3.3.1. Optimierung der Messkavität

Im Folgenden wird die optimale Schichtdicke zur Maximierung der Glucosesensitivität der Sensoren hergeleitet, wie in der bereits erschienen Publikation [119] von uns gezeigt wurde. Abbildung 3.5 zeigt qualitativ das Zustandekommen eines solchen Maximums der Signaldifferenz am Beispiel frei gewählter Absorptionskoeffizienten.

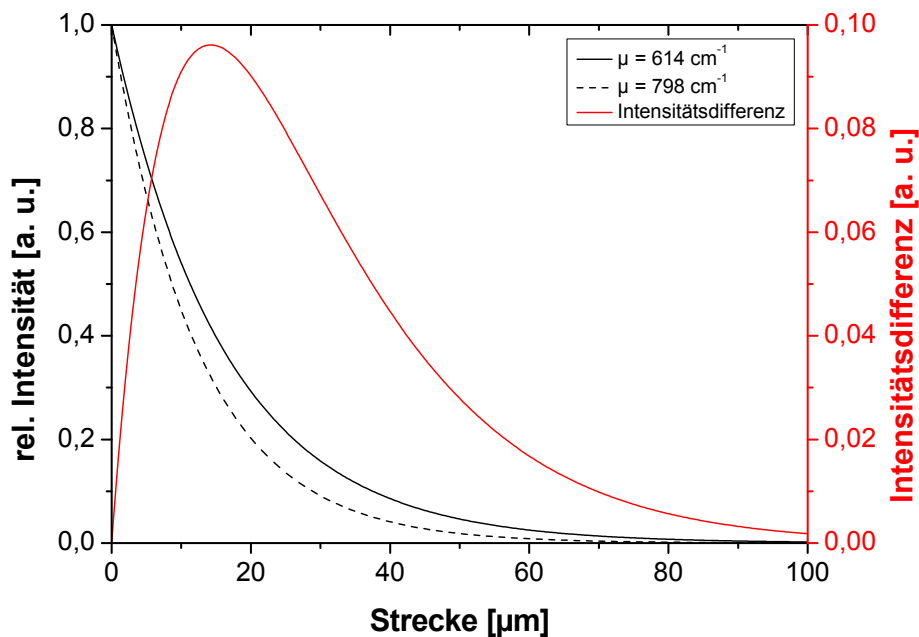


Abbildung 3.5.: Verlauf von Gleichung 3.16 der relativen Intensität nach Durchlaufen einer Strecke mit $\mu_w = 0,0614 \mu\text{m}^{-1}$ und $\mu_2 = 1,3\mu_w = 0,798 \mu\text{m}^{-1}$.

Bei einem Durchgang durch Materie erfährt eine elektromagnetische Welle mit einer anfänglichen Intensität I_0 nach einer Strecke x eine Schwächung gemäß Lambert-Beer:

$$I(x) = I_0 e^{-\epsilon c x} = I_0 e^{-\mu x}, \quad (3.14)$$

wobei $\epsilon(\lambda)$ den Extinktionskoeffizienten und c die Konzentration des absorbierenden Materials darstellen, die zum wellenlängenabhängigen Absorptionskoeffizienten $\mu(\lambda) = \epsilon(\lambda)c$ zusammengefasst werden können.

Durchläuft solch eine Welle nun eine Kavität mit einer wässrigen Lösung, die N Analyten enthält, ist bei einer Transmissionsmessung die Signaldifferenz von reinem Wasser zur wässrigen Lösung samt Analyten eine der zu optimierenden Größen beim Entwurf der miniaturisierten Messkavität.

Nach dem Durchgang durch die Kavität ergibt sich die Intensität zu

$$I_s(x) = I_0 e^{-(\mu_w + \sum_i \mu_i)x}, \quad (3.15)$$

wobei μ_w den Absorptionskoeffizient von Wasser und μ_i ($i = 1 \dots N$) die Absorptionskoeffizienten der gelösten Analyten angibt.

Möchte man nun die Signaldifferenz zu einer mit reinem Wasser gefüllten Kavität (mit der dazugehörigen Intensität $I_w(x)$) betrachten, wie dies in den hier beschriebenen Messungen der Fall ist, muss das Maximum von

$$h(x) := I_w(x) - I_s(x) = I_0 \left(e^{-\mu_w x} - e^{-(\mu_w + \sum_i \mu_i)x} \right) \quad (3.16)$$

bestimmt werden.

Durch Ableitung von Gleichung 3.16 ergibt sich das Maximum bei einem Wert

$$x_m = \frac{\ln(\mu_w + \sum_i \mu_i) - \ln \mu_w}{\sum_i \mu_i}. \quad (3.17)$$

Der Ausdruck lässt sich mit $\ln(a+b) = \ln a + \ln(1+b/a)$ vereinfachen zu

$$x_m = \frac{\ln(1 + (\sum_i \mu_i / \mu_w))}{\sum_i \mu_i}. \quad (3.18)$$

Benutzt man nun noch die Reihenentwicklung

$$\ln(1+x) = x - \frac{x^2}{2} + \frac{x^3}{3} \pm \dots \quad \text{für } -1 < x < 1, \quad (3.19)$$

folgt schließlich

$$x_m = \frac{1}{\sum_i \mu_i} \left(\frac{\sum_i \mu_i}{\mu_w} - \frac{1}{2} \left(\frac{\sum_i \mu_i}{\mu_w} \right)^2 + \frac{1}{3} \left(\frac{\sum_i \mu_i}{\mu_w} \right)^3 \pm \dots \right). \quad (3.20)$$

Weiter ist trivial zu zeigen, dass die zweite Ableitung $\frac{\partial^2 h(x)}{\partial x^2}$ an der Stelle x_m negativ ist.

Ist der Absorptionskoeffizient von Wasser nun viel größer als die Summe der Absorptionskoeffizienten der Analyten ($\mu_w \gg \sum_i \mu_i$), so ergibt sich schließlich unter

Vernachlässigung von Termen höherer Ordnung

$$x_m \xrightarrow{\mu_w \gg \sum_i \mu_i} \frac{1}{\mu_w}. \quad (3.21)$$

Das bedeutet also, dass bei einer Maximierung der Signaldifferenz durch die Hinzugabe von Analyten im Falle einer Dominanz des Wassers einzig der Absorptionskoeffizient von Wasser die optimale Weglänge zur Bestimmung der Analyten festlegt.

Setzt man weiter $\mu_w = 604 \text{ cm}^{-1}$ bei einer für die Glucosevorhersage relevanten Wellenzahl von $\tilde{\nu} = 1030 \text{ cm}^{-1}$ [120], so ergibt sich eine optimale Wegstrecke von

$$x_m = 16,6 \text{ } \mu\text{m}. \quad (3.22)$$

Interessant ist auch zu betrachten, wie sich das Optimum mit dem Verhältnis $\frac{\sum_i \mu_i}{\mu_w}$ verschiebt. In Abbildung 3.6 ist zu sehen, dass sich selbst bei einem Verhältnis von 1/10 die Spaltbreite mit $15,8 \text{ } \mu\text{m}$ noch nahe an obiger Näherung bewegt.

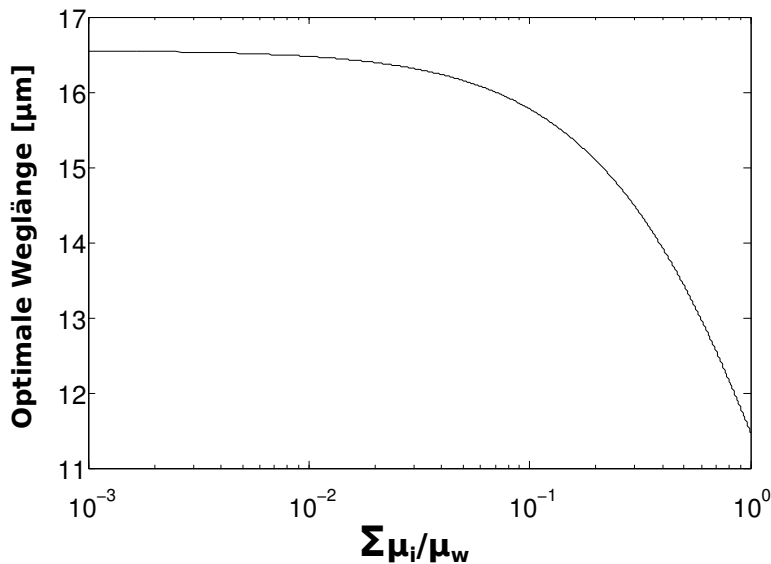


Abbildung 3.6.: Optimale Weglänge einer Messung zur Bestimmung einer Analytkonzentration in wässriger Lösung in Transmission als Funktion des Verhältnisses der Absorptionskoeffizienten von Wasser μ_w und der Summe der Absorptionskoeffizienten aller gelösten Analyten $\sum \mu_i$ bei einer Wellenzahl von 1030 cm^{-1} [119].

Die vorgestellten Betrachtungen zum Optimum lassen allerdings die Beeinflussung durch mögliche Rauschquellen des Systems bisher unbeachtet. So berichteten

Brandstetter *et al.* bei Experimenten zur Bestimmung von Glucosekonzentrationen in wässrigen Lösungen mittels EC-QCLs über eine Abhängigkeit der optimalen Weglänge von der zur Verfügung stehenden optischen Ausgangsleistung der Strahlungsquelle [121].

Venyaminov *et al.* schlagen zur Bestimmung der optimalen Weglänge und des damit verknüpften Signal-zu-Rausch-Verhältnisses folgendes vor [122]:

Das Signal S eines gelösten Stoffes kann über die Absorbanz

$$A(\lambda) = \epsilon_s(\lambda)c_s l \quad (3.23)$$

bei einer gegebenen Wellenlänge λ definiert werden, die vom molaren Extinktionskoeffizienten ϵ_s , der Konzentration c_s des Stoffes und der Weglänge l abhängt. Das Rauschen $N(\lambda)$ ist direkt proportional zum Detektorrauschen $N_{det}(\lambda)$ und invers proportional zur Wassertransmittanz und damit gegeben durch

$$N(\lambda) = N_{det}(\lambda) \times 10^{\epsilon_{H_2O}(\lambda)c_{H_2O}l}. \quad (3.24)$$

Daraus lässt sich für das Signal-zu-Rausch-Verhältnis $\frac{S}{N}(\lambda)$ ableiten:

$$\frac{S}{N}(\lambda) = \frac{\epsilon_s(\lambda)c_s l}{N_{det} \times 10^{\epsilon_{H_2O}(\lambda)c_{H_2O}l}}, \quad (3.25)$$

welches dann unter der Bedingung $d(S/N)/dl = 0$ ausgewertet werden muss, um Extrema der Beziehung aufzufinden. Die optimale Weglänge $l_{opt}(\lambda)$ ergibt sich dann für eine molare Konzentration c_{H_2O} von Wasser von 55,34 M zu

$$l_{opt}(\lambda) = \frac{7,85 \times 10^{-3}}{\epsilon_{H_2O}(\lambda)}. \quad (3.26)$$

Diese Größe ist wie in der rauschfreien Betrachtung hängt nur von molekularen Eigenschaften des Lösungsmittels ab. Das maximale Signal-zu-Rausch-Verhältnis ist somit durch

$$\left(\frac{S}{N}\right)_{max}(\lambda) = \frac{2,89 \times 10^{-3} \times \epsilon_s(\lambda)c_s}{\epsilon_{H_2O}(\lambda)N_{det}(\lambda)} \quad (3.27)$$

gegeben und damit bei fester Wellenlänge nur von der Konzentration des Analyten abhängig, alle weiteren Größen sind konstant.

Experimente, welche die aufgeführten Rechnungen begleiteten, konnten einen Extinktionskoeffizienten von Wasser von $\epsilon_{H_2O}(1035 \text{ cm}^{-1}) \approx 4,9 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ermitteln, was zu einer optimalen Weglänge von etwa 16 μm führt, in guter Übereinstimmung mit der eigenen Abschätzung ohne Rauschbeitrag.

Raytracing-Simulationen

Zur Validierung obiger Berechnungen wurden optische Simulationen mittels nicht-sequentieller Raytracing-Software (ZEMAX-EE, ZEMAX Development Corp., Belle-

vue, WA, USA) durchgeführt, um eine optimale Form der Kavität zu bestimmen und die Toleranz in der Fertigung abzuschätzen [119]. Verschiedene Querschnittsgeometrien wurden dazu mit dem Ziel eines maximalen Differenzsignals zwischen Wasser mit und ohne Zusatz von Glucose verglichen. Eine laterale Kavitätsbreite von $300\ \mu\text{m}$ wurde als Kompromiss zwischen geometrischer Stabilität und optimierter Absorptionseffizienz gewählt, wobei die Weglänge in Schritten von $5\ \mu\text{m}$ von $10\ \mu\text{m}$ bis $100\ \mu\text{m}$ variiert wurde. Die Simulationen wurden mit 3 000 000 Einzelstrahlen durchgeführt und für jede Weglänge elf mal wiederholt.

Der Einfluss von Glucose wurde simuliert, indem der Absorptionskoeffizient von wässriger Glucoselösung auf 101,5% des Wertes von reinem Wasser gesetzt wurde. In Abbildung 3.7 ist exemplarisch der Vergleich von Kavitäten mit rechteckiger und elliptischer Querschnittsfläche in der Transmissionsdifferenz zwischen Wasser und wässriger Glucoselösung als Funktion der Weglänge veranschaulicht.

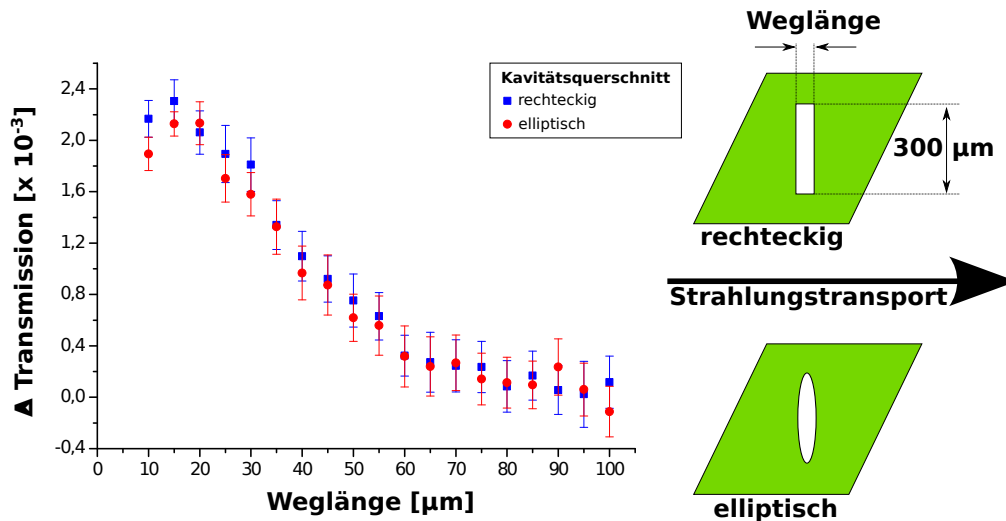


Abbildung 3.7.: Differenz der Transmission in Abhängigkeit der Weglänge durch die Kavität für Wasser und wässrige Glucoselösungen, deren Absorptionskoeffizient auf 101,5% des Koeffizienten für Wasser gesetzt wurde. Untersucht wurden rechteckige und elliptische Querschnittsflächen der Kavität (nach [119]).

Man kann eindeutig erkennen, dass die Geometrie der Querschnittsfläche für diese beiden extremen Fälle keine große Rolle spielt. Das Maximum der Differenz der Transmission bestätigt die zuvor ausgeführten Rechnungen einer optimalen Weglänge zur Maximierung der Signaldifferenz mit einem Wert von ungefähr $15\ \mu\text{m}$.

3.3.2. Sensorfertigung

Das Design des Fasersensors stellte einen wichtigen Bestandteil der Entwicklung dar, da hohe Anforderungen für die Fertigungszeit, Reproduzierbarkeit und Kosten galten. Daher werden im Folgenden zwei Arten von Fasersensoren vorgestellt, die in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden und an deren Beispiel der Schritt von einer *in-vitro*-Erprobung hin zu einer Anwendung *in vivo* veranschaulicht werden kann.

Das Ausgangsmaterial bildeten aufgrund ihrer schwachen Absorption im mittleren Infrarot stets Silberhalogenidfasern (AgBr/AgCl) in einer Core-Cladding-Struktur mit einem äußeren Durchmesser von 500 μm . Der Faserkern besaß einen Durchmesser von 450 μm (A.R.T. Photonics GmbH, Berlin) bzw. 400 μm (CeramOptec GmbH, Bonn). Die Brechungsindizes von Kern und Cladding betragen $n_{\text{Kern}} = 2,16$ bzw. $n_{\text{Clad}} = 2,14$. Mithilfe der Fasern sollte dann eine miniaturisierte Messkavität geschaffen werden, die sich in wässriger Umgebung diffusiv füllt und so Transmissionsmessungen von wässrigen Lösungen zulässt.

Für den Sensortyp A, der in Abbildung 3.8 schematisch gezeigt ist, wurde in eine Frontfacette einer Faser etwa 30 μm tief mit einem 300 μm breiten Blatt gesägt, während das Gegenstück möglichst glatt abgefräst wurde.

Anschließend wurden die Facetten beider Fasern in Kontakt zueinander gebracht, indem sie in einem Hohlzylinder aus Polyetheretherketon (PEEK) mit einem inneren Durchmesser von 500 μm durch einen Zwei-Komponenten-Klebstoff (plus endfest 300, UHU GmbH & Co. KG, Bühl) fixiert wurden. Die PEEK-Hülle beinhaltete außerdem eine Bohrung mit einem Durchmesser von 500 μm , um die diffusive Befüllung der Kavität zu gewährleisten.

Bei der Entwicklung von Fasersensoren des Typs B wurde ein Hauptaugenmerk darauf gelegt, in kürzerer Zeit eine größere Anzahl an Sensoren fertigen zu können, da sich der Fertigungsprozess der Sensoren des Typs A als zu fehleranfällig herausgestellt hatte. Deshalb wurde ein Weg gesucht, alle Schritte der Fertigung möglichst selbst bzw. in der Institutswerkstatt des Kirchhoff-Instituts für Physik ausführen zu können und den Zusammenbau des Sensors besser steuern zu können.

Silberhalogenidfasern mit einem Durchmesser von 500 μm wurden in einem ersten Schritt in einer Fräsmaschine mit einem Diamantwerkzeug bearbeitet, um planare Endflächen zu erhalten. Anschließend wurden zwei Fasern auf einem Titanhalter mit einem biokompatiblen Klebstoff (Locite 4061, Henkel AG & Co. KGaA, Düsseldorf) fixiert, wie in Abbildung 3.9 zu sehen ist. Der Halter wies eine Querschnittsbreite von 1,5 mm sowie eine Fugenbreite von 500 μm auf und wurde in Längen von 4 cm und 8 cm produziert.

Eine zytotoxische Unbedenklichkeit des Halters aus einer speziellen Titanlegierung (6AL4V, THG Titan-Halbzeug GmbH, Mönchengladbach), dessen äußere Form gefräst wurde, konnte in XTT-Tests (s. Abschnitt 3.3.5) bestätigt werden. Durch den Verzicht auf eine umgebende Hülle konnten mögliche Todvolumina stark reduziert werden, die als Flüssigkeitsreservoir zu betrachten wären. Das könnte zu einem Nachfluss von Probenflüssigkeiten führen, deren Zusammensetzung nicht mit der mo-

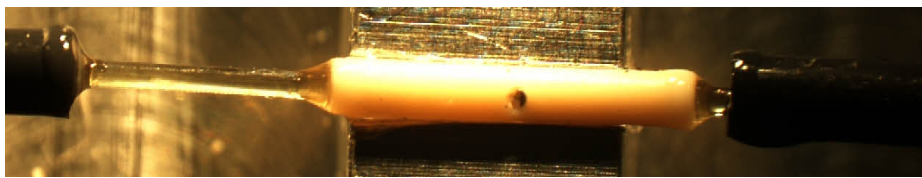
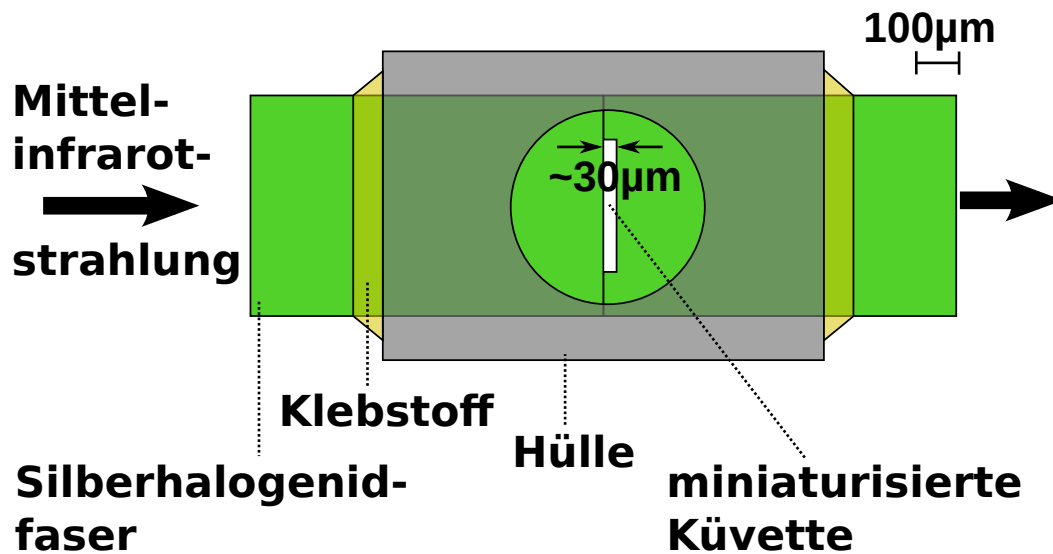


Abbildung 3.8.: Schematische Darstellung des Fasersensors Typ A (*oben*) und Mikroskopieaufnahme des zusammengesetzten Sensors (*unten*) (nach [119]).

mentanen Umgebung übereinstimmt, sodass ein systematischer Messfehler die Folge wäre. Weiterhin konnte die Schranke der diffusiven Befüllung der Messkavität vom äußeren Radius der PEEK-Hülle bei etwa 0,75 mm auf den Faserradius von 0,25 mm reduziert werden, was einen schnelleren Flüssigkeitsaustausch ermöglichen sollte.

3.3.3. Membranisolierung

Die Arbeiten zur Optimierung des Sensordesigns wurden begleitet von Untersuchungen zur Kopplung des Sensors mit semipermeablen Membranen [123], die für kleine ungeladene Moleküle wie Glucose durchlässig sein und große biochemische Moleküle wie z. B. Proteine an der Diffusion in die Messkavität hindern sollen. Das Molekulargewicht für Glucose liegt bei 180 Da, während Albumin als Vertreter der Proteine ein Gewicht von 69 kDa hat. Das sollte es ermöglichen, eine Membran zu finden, deren Filtrationseigenschaften den Anforderungen entsprechen.

Unter Diffusion versteht man einen Stofftransport, dessen treibende Kraft ein Kon-

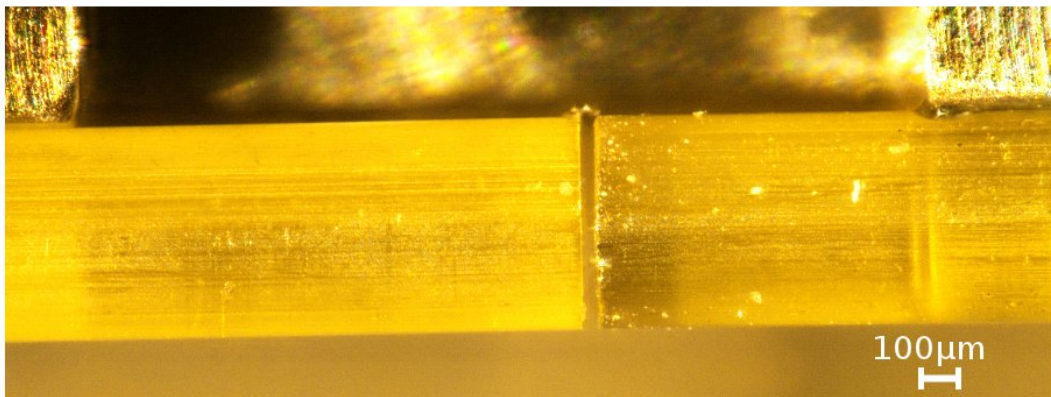
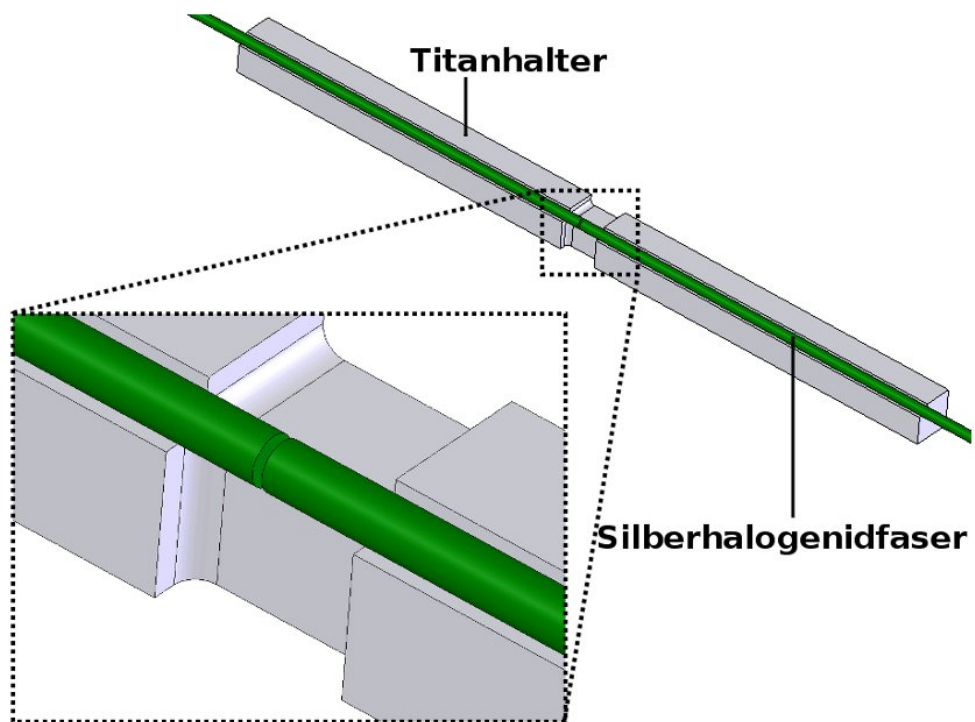


Abbildung 3.9.: Schematische Darstellung (*oben*) und mikroskopische Aufnahme (*unten*) des Fasersensors Typ B, der aus zwei Silberhalogenidfasern besteht, die auf einem Titanhalter mittels eines biokompatiblen Klebstoffes positioniert wurden (nach [54]).

zentrationsunterschied bildet und der danach strebt, dieses Ungleichgewicht auszugleichen. Stationäre Zustände mit einem Konzentrationsgradienten, der nicht von der Zeit abhängt, können durch folgende Relation in einer Dimension beschrieben

werden [124]:

$$J_x = -D \frac{\partial c}{\partial x}, \quad (3.28)$$

die auch als das erste Ficksche Gesetz bekannt ist und die Teilchenflussdichte J_x mit dem Diffusionskoeffizienten D und dem Konzentrationsgradienten $\partial c/\partial x$ in Beziehung setzt. Aus ihr ist ersichtlich, dass der Fluss entgegen dem Konzentrationsgradienten wirkt, also von Orten hoher zu denen mit einer niedrigen Konzentration. Der allgemeinere zeitabhängige Fall wird durch das zweite Ficksche Gesetz beschrieben:

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D \frac{\partial^2 c}{\partial x^2}. \quad (3.29)$$

Eine mögliche Lösung der Differentialgleichung mit den Randbedingungen $c = 0$ (für $t = 0$) und $c = c_0$ (für $t \rightarrow \infty$) bildet folgende Funktion:

$$c(x,t) = c_0 \left[1 - \operatorname{erf} \left(\frac{x}{2\sqrt{Dt}} \right) \right], \quad (3.30)$$

welche Nutzen von der Gaußschen Fehlerfunktion erf macht, die definiert ist als

$$\operatorname{erf} \left(\frac{x}{2\sqrt{Dt}} \right) = \frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_0^{\frac{x}{2\sqrt{Dt}}} e^{-y^2} dy. \quad (3.31)$$

Dieser Lösungsansatz gilt für einen Konzentrationsausgleich in freier Lösung. In den begleitenden Arbeiten wurde er genutzt, um die Diffusion von Glucose in einer Membran mit der anschließenden Diffusion in freier Lösung in die Messkavität zu koppeln [123]. Hierbei wurde die Membran als ein dünner Film betrachtet, der sich chemisch nicht von der Umgebung unterscheidet. In der Realität sind weitere Effekte in die Betrachtungen mit einzuschließen, wie z. B. ein osmotischer Gradient, der sich bei semipermeablen Membranen ausbilden kann.

In der durchgeführten Studie [123] wurde ein Fasersensor des Typs A zwischen zwei Flachmembranen positioniert und die Diffusionszeiten von Glucose und Albumin bestimmt. Die Dicke der verwendeten Membranen lag im Bereich von 30–230 μm , die Cut-Off-Werte reichten von 200 Da als Untergrenze für kleinporige Membranen bis zu Porengrößen von 1,2 μm für großporige Membranen. Zu beachten ist dabei, dass die Grenzen nicht als scharf zu betrachten sind, d. h. eine Membran mit einem bestimmten Cut-Off-Wert lässt immer noch schwerere Moleküle hindurch, jedoch unter zunehmender Erhöhung der dafür benötigten Diffusionszeit. Die Ergebnisse der Studie lauteten, dass Membranen, die ein Eindringen von Albumin verlässlich verhindern könnten, leider auch die Diffusionszeiten der Glucose so stark erhöhen, dass eine kontinuierliche Detektion des Analyten nicht mehr gegeben wäre. Auf der anderen Seite erwiesen sich Membranen mit akzeptablen Eindringzeiten für Glucose als zu durchlässig für Albumin. Daher wurde im weiteren Verlauf auf den produktiven Einsatz von Membranen verzichtet.

Die ausführlichen Ergebnisse, ebenso wie Details zum diffusiven Befüllen der Mess-

kavität, sind in Referenz [123] zu finden.

3.3.4. Dip-Coating-Verfahren

Die Wahl des Beschichtungsmaterials fiel auf Polyethylen (PE), da es sich in mehreren Arbeiten zum Überzug von IR-Komponenten [125] und Silberhalogenidfasern im Speziellen [126, 127] als praktikables und für den betrachteten Spektralbereich als optisch geeignetes Material erwies. Das Polymer besitzt eine hohe chemische sowie thermische Widerstandsfähigkeit, Festigkeit, Flexibilität und toxische Unbedenklichkeit. Als Lösungsmittel wurde Toluol gewählt, das ab etwa 50 °C low density Polyethylen (LDPE) löst, welches im Gegensatz zu high density Polyethylen (HDPE) eine geringere Dichte und schwächere intermolekulare Wechselwirkungen aufweist. Der Umgang mit Toluol bedarf einiger Sicherheitsvorkehrungen, da das Lösungsmittel u. a. gesundheitsschädliche Dämpfe und mit Luft explosive Gemische bilden kann. Außerdem handelt es sich hierbei um einen guten Isolator, der zu starken elektrostatischen Aufladungen führen kann. Daher fanden die Faserbeschichtungen unter einem Abzug statt und alle elektrisch leitenden Teile der im Folgenden vorgestellten Apparatur wurden geerdet. Darüber hinaus wurde das Lösungsmittelvolumen von einem stetigen Argonstrom überspült, um eine substanzielle Mischung des gasförmigen Lösungsmittels mit der umgebenden Atmosphäre zu verhindern.

Die Apparatur zur Beschichtung von Silberhalogenidfasern ist in Abbildung 3.10 zu sehen [18]. In einem Edelstahlbecher wurde das Toluol von einem Magnetrührer (HS20-2, Torrey Pines Scientific, Inc., Carlsbad, CA, USA) unter ständigem Rühren auf etwa 80 °C erwärmt. Die Tauchbewegungen wurden von einem Gleichstrommotor (SD3039, Transmotec Europe, München) ausgeführt, dessen Rotationsgeschwindigkeit über die angelegte Spannung geregelt werden konnte. Die Steuerung des Motors und die Einstellung der Tauchvorgänge erfolgte mithilfe eines frei programmierbaren Mikrocontrollers (ATMega32, Atmel Corp., San Jose, USA). Der eigentliche Faserhalter wurde aus Teflon gefertigt, um die Resistivität gegenüber Toluoldämpfen zu erhöhen. Einzelheiten über das Coatingsystem sowie dessen ausführliche Charakterisierung sind den Referenzen zu entnehmen [18].

Silberhalogenidfasern mit einem Durchmesser von 500 µm wurden für die Zytotoxizitätstests mit einer PE-Schicht von etwa 30 µm überzogen, um anschließend zytotoxisch untersucht zu werden. Nach der Beschichtung mit LDPE wurden die Fasern in einem Klimaschrank für etwa 10 Minuten einer Temperatur von 120 °C ausgesetzt, um die Homogenität der Polymerschichten zusätzlich zu erhöhen.

3.3.5. Zytotoxizität

Die Optimierung des Sensordesigns wurde von Arbeiten am Zentrum für Medizinische Forschung der Universität Heidelberg begleitet, die sich mit der Biokompatibilität der verwendeten Materialien befassten. Diese wurden dabei mittels eines XTT-Tests auf ihre Zytotoxizität untersucht, was im Folgenden kurz beschrieben werden soll.

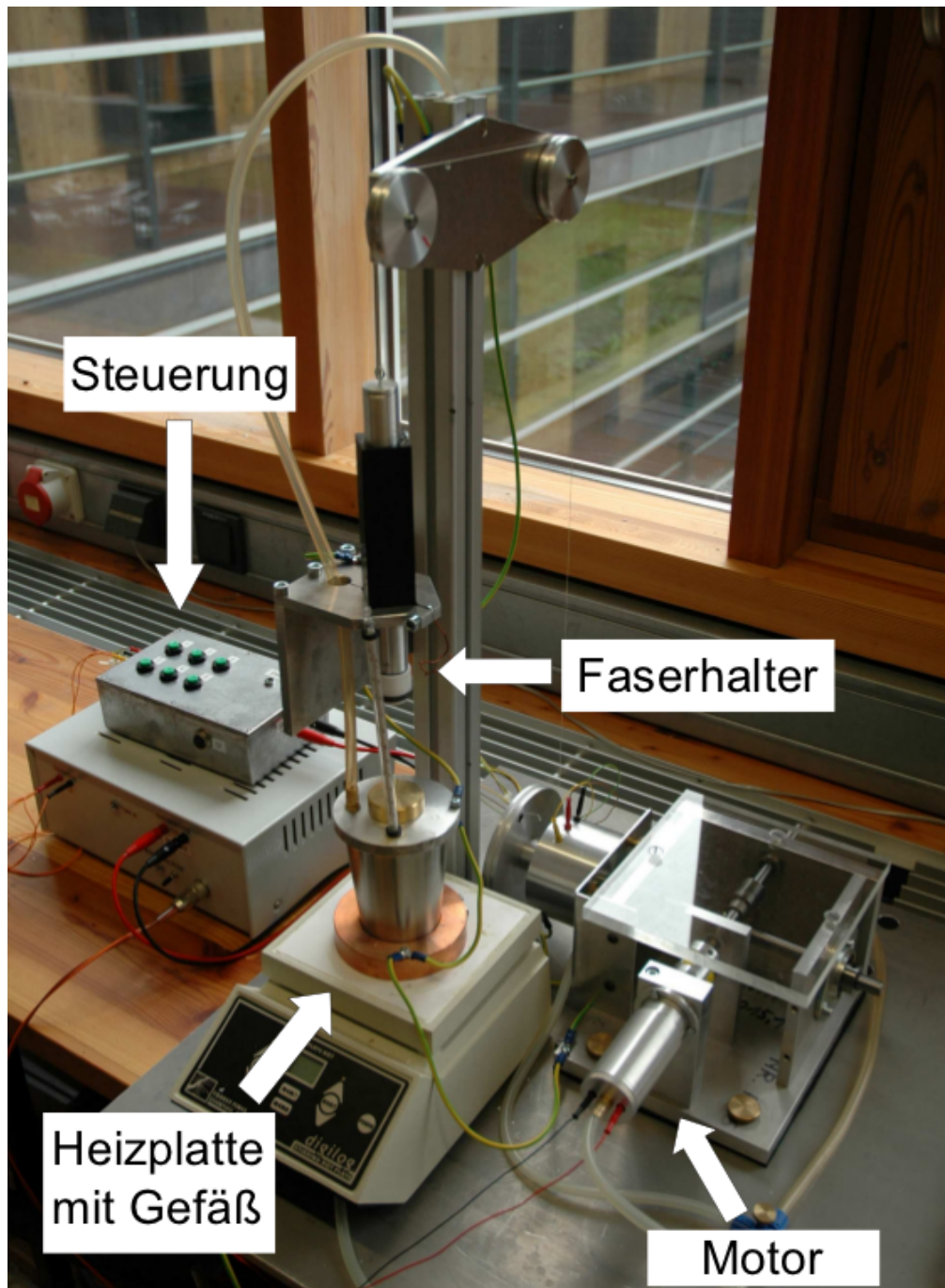


Abbildung 3.10.: Foto des Dipcoating-Aufbaus bestehend aus elektronischer Steuerung, Motor, regelbarer Heizplatte und einem Faserhalter [18].

Das zu untersuchende Material wurde in einem ersten Schritt bei einem Oberflächen-Flüssigkeitsverhältnis von 6 cm²/mL in einem Zellkulturmedium aus RPMI 1640 mit 10 % FCS und PenStrep (alle Life Technologies, Grand Island, NY, USA) für 24 Stunden bei 37 °C eluiert. Anschließend wurden Prüfsubstanzen aus verdünnten Eluaten (100 %, 70 %, 30 %, 10 % und 3 %) sowie eine Positivkontrolle bestehend aus 1000 µg/mL SDS (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München) in RPMI 1640 mit 10 % FCS und PenStrep hergestellt. Parallel zu der Probenpräparation wurden Mausfibroblasten der Linie 929 (CCL-1, American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA) herangezogen und zu einer Zahl von etwa 10 000 pro Well auf eine 96er-Well-Platte platziert. Einer Anwachsphase von weiteren 24 Stunden ging die Zugabe von jeweils 100 µL der Probe- und Kontrollsubstanzen zu den Zellen voraus. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden im Brutschrank wurden 50 µL Färbelösung des Tetrazolium-Salzes XTT (Natrium 3'-[1-(phenylaminocarbonyl)-3,4-tetrazolium]-bis(4-methoxy-6-nitro) benzolsulfonsäure) pro Well hinzugegeben. Die Lösung bestand aus der XTT Färbereagens und einer Elektronen-Kupplungsreagens im Verhältnis 1 : 100 (Cell Proliferation Kit II, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim). Die Proben wurden zur Einfärbung etwa weitere 1,5 Stunden im Brutschrank inkubiert, bis die am stärksten gefärbten Proben auf der Trägerplatte eine optische Dichte (OD) von etwa 1 erreicht hatten. Für jede Prüfsubstanz wurde darüber hinaus auch ein Well ohne Zellen als sog. chemischer Blank pipettiert.

Die Quantifizierung der Zytotoxizität erfolgte photometrisch auf Basis eines Farbumschlags, den metabolisch aktive Zellen durch die Reduktion von XTT in den orangefarbenen und wasserlöslichen Farbstoff Formazan hervorriefen. Die resultierende Farbintensität korrelierte mit der Zahl der vitalen Zellen, welche mittels Fluoreszenzspektroskopie mithilfe eines Infinite 200 Multimode Microplate Readers (Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz) ausgewertet wurde. Dabei wurden bei Wellenlängen von 450 nm und 690 nm sowohl stark als auch schwach absorbierende spektrale Bereiche von Formazan ausgewertet. XTT wartete im Gegensatz dazu mit einer starken Absorption für den Wellenlängenbereich < 420 nm auf.

Die Auswertung betrachtete die relative Absorbanz A^* einer Prüfsubstanz unter folgender Referenzierung:

$$A^* = 100 \times \frac{A_{\text{Prüf}} - A_{\text{Blank}}}{A_{\text{Medium}} - A_{\text{Blank}}}. \quad (3.32)$$

Dabei bezeichnet A_{Blank} die Absorbanz in den Wells des chemischen Blanks und A_{Medium} in der Lösungsmittelkontrolle des reinen Mediums.

Davon leitet sich der XTT_{50} Wert ab, der angibt, bei welcher Eluatskonzentration A^* um 50 % reduziert ist. Laut Definition wird das Material bei XTT_{50} Werten von mehr als 70 % als nicht toxisch, bei Werten zwischen 50 % und 70 % als leicht toxisch und bei Werten kleiner als 50 % als toxisch bewertet.

In Tabelle 3.1 ist eine Auflistung der Materialien zu finden, die als potenzieller Lichtleiter untersucht wurden. Die bestätigte Zytotoxizität von Silberhalogenidfasern konnte durch eine geeignete Polymerbeschichtung mittels des in Abschnitt 3.3.4 be-

Tabelle 3.1.: Übersicht von möglichen in der Sensorfertigung verwendbaren Materialien zum Transport der Strahlung im mittleren Infrarot. Kosten und Transmissionseigenschaften werden dreistufig durch (+, 0, -) bewertet.

Material	Verfügbarkeit als Faser	Kosten	MIR Transmission	Zytotoxizität
Siliziumdioxid-Hohlfaser	Ja	0	+	zytotoxisch
Chalcogenidfaser	Ja	0	+	zytotoxisch
Silberhalogenidfaser	Ja	0	+	zytotoxisch
→ MPC beschichtet	Ja	0	+	zytotoxisch
→ LDPE beschichtet	Ja	0	+	nicht zytotoxisch
Silizium	Nein	+	-	nicht zytotoxisch
ZnS	Nein	0	+	nicht zytotoxisch
ZnSe	Nein	0	+	nicht zytotoxisch
Diamant	Nein	-	+	nicht zytotoxisch

schriebenen Verfahrens beseitigt werden. Alternative Sensormaterialien wie Silizium, Zinkselenid (ZnSe) oder Zinksulfid (ZnS) erwiesen sich als toxikologisch unbedenklich, wurden aber aufgrund der fehlenden Verfügbarkeit in Faserform und einer damit bedingten aufwendigen Fertigung nicht experimentell erprobt. Weitere Fasermaterialien stellten sich ebenfalls als zytotoxisch heraus und wiesen gegenüber Silberhalogenidfasern keine Vorteile auf. Einzig ein retroreflektierendes Sensorkonzept unter Verwendung von polierten Diamantstäben als Sensorkopf konnte in ersten Experimenten *in vitro* seine generelle Tauglichkeit beweisen [18], wurde jedoch zugunsten der Konzentration der Arbeiten auf beschichtete Silberhalogenidfasern bisher nicht weiter verfolgt.

3.4. Datenanalyse

3.4.1. Allan-Formalismus

Der Formalismus der Allan-Varianz kann genutzt werden, um Störquellen eines Systems wie hochfrequentes Rauschen oder relativ langsame Systemdrifts als Funktion eines Zeitintervalls τ zu charakterisieren. Die Größe fand ursprünglich Anwendung in der Hochfrequenztechnik zur Beschreibung der Frequenzstabilität von Systemen wie bspw. Uhren, Oszillatoren oder Verstärkern [128] und wurde in Vorarbeiten auf die zugrundeliegenden Fragestellung angepasst [53]. Demnach ergibt sich die Allan-Varianz $\sigma_{Allan}^2(\tau)$ zu

$$\sigma_{Allan}^2(\tau) = \frac{1}{2(M-1)} \sum_{s=1}^{M-1} (U_{s+1}^*(\tau) - U_s^*(\tau))^2, \quad (3.33)$$

wobei hier die quadrierten Abweichungen der gemittelten Signale $U^*(\tau)$ über $(M-1)$ aufeinanderfolgende Zeitintervalle der Länge τ aufsummiert werden. Der Formalis-

mus wurde stets auf Langzeitmessungen unter stabilen Laborbedingungen angewandt, um daraus Rückschlüsse auf die Signalstabilität zu erhalten sowie das Zeitintervall τ^* zu bestimmen, unter dem eine maximale Analytsensitivität erreicht wird.

Aus der Größe $\sigma_{Allan}(\tau)$ lässt sich in Zusammenspiel mit der Glucosesensitivität $\partial U/\partial c$, die man aus Kalibrationsmessreihen erhalten hat, die Glucosekonzentration bestimmen, die einem Signal-zu-Rausch-Verhältnis von 2 entspricht (rauschäquivalente Konzentration oder rauschlimierte Vorhersagegenauigkeit, engl. *noise-equivalent concentration*, NEC):

$$\text{NEC}(\tau) = \frac{2\sigma_{Allan}(\tau)}{\partial U/\partial c}. \quad (3.34)$$

Eine anschauliche Demonstration der Analyse unter Nutzung des Formalismus ist im Folgenden an künstlich generierten Beispieldaten gegeben, die in Abbildung 3.11 veranschaulicht sind. Alle Kurven enthalten dabei ein zufälliges Rauschen mit einer maximalen Amplitude von 0,1 mV. Der roten und blauen Kurve ist zusätzlich ein linearer Drift unterlegt mit einer Steigung von ± 10 nV/s. Darüber hinaus weist die blaue Kurve eine periodische Störung mit einer Frequenz von 0,79 mHz und einer Amplitude von 0,1 mV auf, um etwaige externe periodische Störquellen zu simulieren.

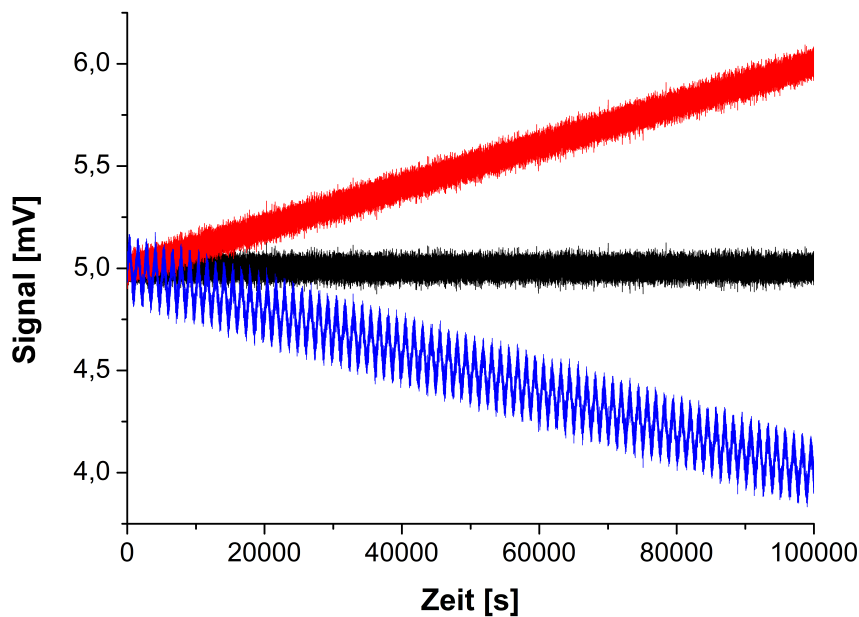


Abbildung 3.11.: Beispieldaten mit zufälligem Rauschen (*schwarze Kurve*), zusätzlichem Drift (*rote Kurve*) und zusätzlicher periodischer Störung (*blaue Kurve*).

Das Resultat der Allan-Analyse ist in Abbildung 3.12 zu sehen. Für die schwarze Kurve geht eine Erhöhung der Integrationszeit mit einer kontinuierlichen Abnahme der Allan-Standardabweichung einher, da in diesem Fall über ein immer größeres Intervall über das Rauschen integriert und der Fehler so immer weiter reduziert wird.

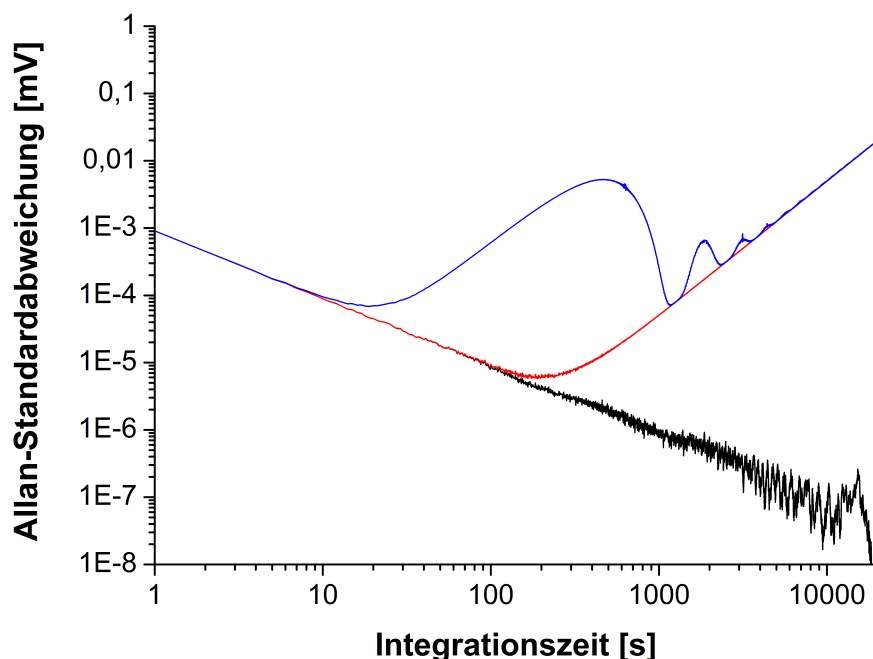


Abbildung 3.12.: Auswertung der künstlich erzeugten Beispieldaten aus Abbildung 3.11 mit dem Allan-Formalismus zur Visualisierung des Effekts von Langzeitdrifts und periodischen Störungen auf die Allan-Varianz.

Schließt man zusätzlich ein Systemdrift wie in der roten Kurve mit ein, so kann man erkennen, wie für große Integrationszeiten die Allan-Standardabweichung wieder zunimmt. Das führt zu einem Kompromiss zwischen einem möglichst großen Zeitintervall zur Unterdrückung des Rauschanteils und dem Bestreben die Integrationszeiten klein zu halten, um den Einfluss des Systemdrifts nicht allzu groß werden zu lassen. Die beiden Störanteile für die Grenzfälle kleiner und sehr großer Integrationszeiten treffen in einem Minimum aufeinander, der optimalen Integrationszeit. Zu erwähnen ist darüber hinaus, dass die Allan-Varianz für große Zeiten auch Auskunft darüber gibt, wie genau die Reproduzierbarkeit bzw. Vergleichbarkeit der Messdatenerhebung ist. Ersichtlich ist weiterhin die Folge von periodischen Störungen wie in der blauen Kurve, die in der Allan-Analyse zu einem lokalen Maximum der Varianz in der Umgebung der der halben Schwingungsdauer bei etwa 470 s führt. Durch

die Überlagerung mit dem linearen Drift der künstlichen Beispieldaten kommt es zu einer Verschiebung des lokalen Maximums, welches man theoretisch bei 635 s erwarten würde. Außerdem sind weitere lokale Maxima bei $3/2$, $5/2$, $7/2$, usw. der Schwingungsdauer erkennbar.

In diesem Sinne bietet die Allan-Varianz ein sehr gutes Mittel, die Grenzen des simplen Ansatzes „längere Messzeit führt zu einer höheren Genauigkeit“ zu quantifizieren, was gerade für kontinuierliche Langzeitmessungen äußerst relevant ist.

In realen Messsystemen muss folglich neben einer Minimierung des Rauschens zur Erhöhung der Vorhersagegenauigkeiten für kurze Zeiten auch die Betrachtung von Systemdrifts und weiteren periodischen Störquellen in Betracht gezogen werden, um eine adäquate Langzeitstabilität zu gewährleisten.

4. Experimenteller Teil

Im folgenden Kapitel werden aufeinander aufbauend die einzelnen experimentellen Blöcke vorgestellt, die von der Charakterisierung des Messaufbaus über die Optimierung des Fasersensors bis hin zu einem Einsatz *in vivo* reichen. Die einzelnen Unterkapitel sind stets so aufgebaut, dass nach einigen über Kapitel 3 hinausgehenden Informationen zum Experiment die Ergebnisse nahtlos präsentiert werden. Nach einem Einstieg zur Charakterisierung der Strahlungsquellen in Abschnitt 4.1 folgen Einzelheiten zur Untersuchung der Fasersensoren, bei der u. a. auf die Glucosesensitivität eingegangen und die Machbarkeit der quantitativen Glucosebestimmung gezeigt wird (Abschnitt 4.2). Anschließend wird ein Augenmerk auf die möglicherweise störenden Einflüsse anderer Substanzen gelegt, die in nicht zu vernachlässigenden Konzentrationen in der ISF vorkommen (Abschnitt 4.3). Als nächstes schließen sich weitere *in-vitro*-Experimente an mit Untersuchungen zu Möglichkeiten der Signalfilterung und des Potenzials zur Referenzierung mittels einer zusätzlichen Strahlungsquelle (Abschnitte 4.4 und 4.5). Die gewonnen Erkenntnisse werden dann zusammengeführt in einem *in-vivo*-Einsatz der Fasersensoren (Abschnitt 4.6).

4.1. Charakterisierung der Quantenkaskadenlaser

In diesem Abschnitt werden die Charakteristiken der beiden verwendeten QCLs und deren Integration in den Messaufbau näher erläutert. Die wesentlichen Bestandteile zum Betrieb der Strahlungsquellen sowie die elektronische Ansteuerung und Kühlung sind in Abbildung 4.1 zu sehen.

Die Kühlung der Strahlungsquelle wurde zum einen über einen Regelkreis, bestehend aus einem Peltierelement in Zusammenspiel mit einer externen Temperaturregelung (LFI-3551, Wavelength Electronics, Bozeman, MT, USA) und einem internen Pt100 Temperatursensor (OMEGA Engineering Inc., Stamford, CT, USA), realisiert. Zum anderen wurde der Kreislauf durch einen Umlaufkühler im Wasserbetrieb (WKL 2309, LAUDA, Lauda-Königshofen) unterstützt, der zum Transport der Abwärme des Peltierelements eingesetzt und bei einer Temperatur von $(15 \pm 1)^\circ\text{C}$ betrieben wurde.

Die elektronische Ansteuerung wurde grundsätzlich von einem TTL-Pulsgenerator (TPG 128, Alpes Lasers, Neuchâtel, Schweiz) umgesetzt, der in den vorgestellten Experimenten Pulse mit einer zeitlichen Ausdehnung im Nanosekundenbereich an die Strahlungsquellen sendete. Diesem hochfrequenten Signal zur Steuerung der QCLs wurde von einem Lock-in-Verstärker (SR830, Stanford Research Systems, Inc., Sunnyvale, CA, USA) zusätzlich ein relativ langsames TTL-Gatesignal überlagert. Die

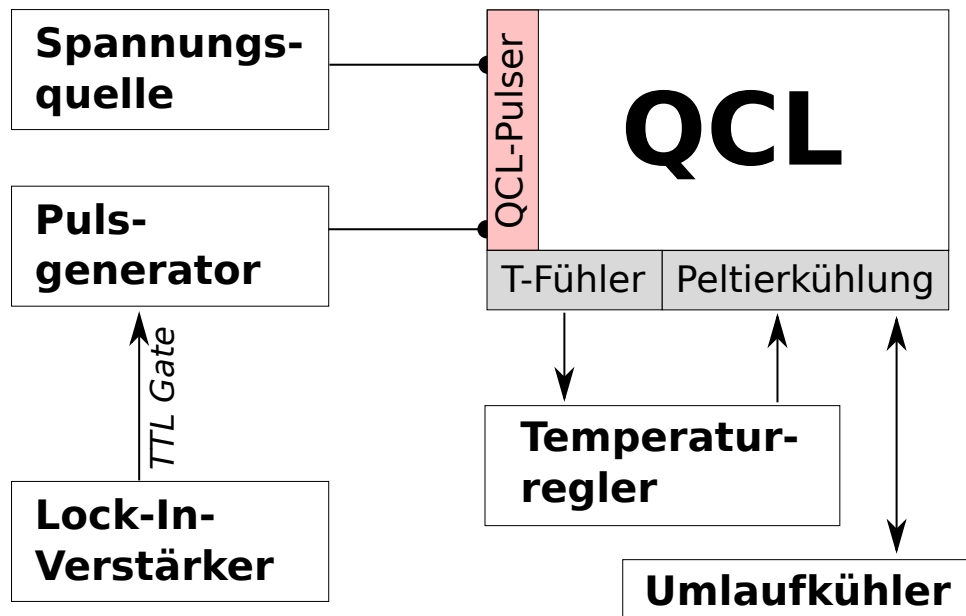


Abbildung 4.1.: Schematische Darstellung der elektronischen Ansteuerung sowie des Kühlkreislaufs der QCLs.

Modulation wurde dann, wie in Abschnitt 3.2.3 beschrieben, auf der Detektionsseite zur Filterung des Signals eingesetzt. Weiterhin wurde eine ausreichende Spannungsversorgung (HM 7044, HAMEG Instruments GmbH, Mainhausen) benötigt, die zusammen mit dem Pulssignal von einem QCL-Pulser verarbeitet wurde, der vom Fraunhofer-Institut für Physikalische Messtechnik in Freiburg angefertigt und für den ursprünglichen Messaufbau [53] optimiert wurde.

QCL *s1810a24* (QCL1) wurde, wenn nicht anders angegeben, bei einer Spannung von 22 V, einer Pulslänge von 50 ns und einer Periode von 3,3 μs (Auslastungsgrad 1,5%) betrieben. Die Solltemperatur des Peltierregelkreises betrug $-30\text{ }^\circ\text{C}$. QCL *sb2532up* (QCL2) operierte bei einer Pulslänge von 50 ns mit einer Periode von 2,5 μs (Auslastungsgrad 2%).

Zur Ermittlung der Spektren beider Strahlungsquellen wurden diese mittels einer selbstgefertigten Fasereinkopplung durch ein FT-IR-Spektrometer (MATRIX-M, Bruker Optik GmbH) aufgezeichnet. Dabei wurde bei einem Scan über 30 Spektren eine Auflösung von 1 cm^{-1} , ein Zero-Filling-Faktor von 2 und eine Blackmann-Harris 3-Term-Apodisierung genutzt.

In Abbildung 4.2 sind Spektren der beiden in der Arbeit verwendeten QCLs dargestellt, wobei die Intensitätsverteilung der Spektren normiert wurde. Man kann für

QCL1 ein Maximum der Intensität bei 1035 cm^{-1} (entspricht einer Wellenlänge von $9,66\text{ }\mu\text{m}$) bei einer Halbwertsbreite von 19 cm^{-1} (177 nm) feststellen. Die Emissionsbreite (min. 10% der Intensität) betrug 42 cm^{-1} (392 nm). QCL2 besitzt ein Intensitätsmaximum bei 872 cm^{-1} ($11,46\text{ }\mu\text{m}$), eine Halbwertsbreite von 10 cm^{-1} (131 nm) und eine Emissionsbreite von 35 cm^{-1} (460 nm).

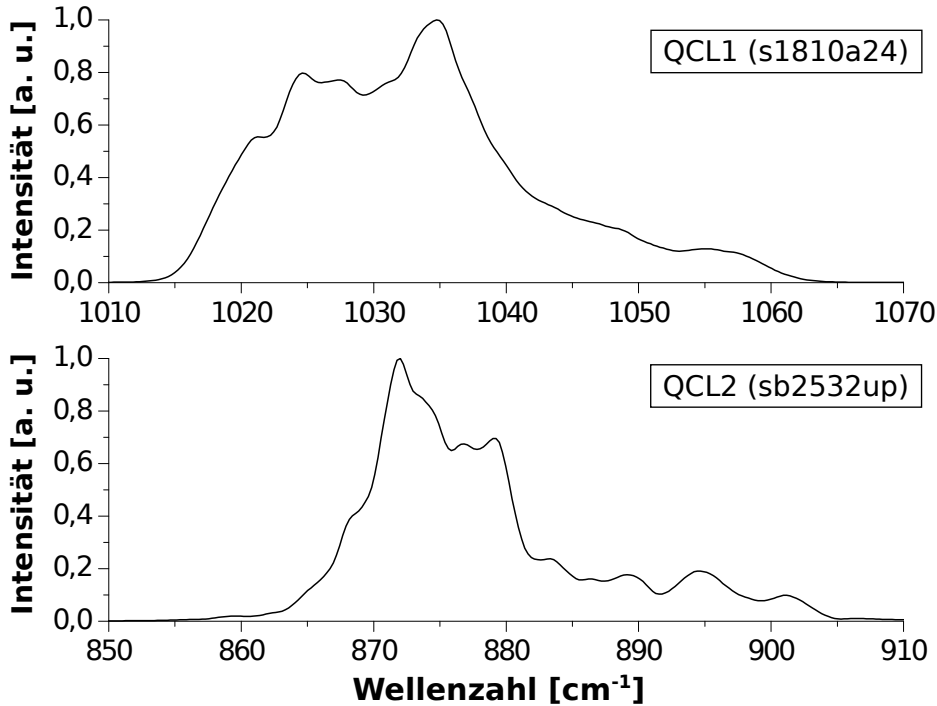


Abbildung 4.2.: Spektrale Intensitätsverteilung von beiden in den Arbeiten eingesetzten QCLs. Der Wellenzahlbereich ist zur Vergleichbarkeit in beiden Fällen auf 60 cm^{-1} begrenzt und die Intensität wurde jeweils auf den Maximalwert normiert.

Die Messung der optischen Laserausgangsleistung wurde bei unveränderten Messparametern mit einem thermischen Detektor (Thermal Power Sensor S302C mit Console PM100D, Thorlabs, München) durchgeführt.

Die Entwicklung der mittleren optischen Ausgangsleistung als Funktion der angelegten Spannung ist für beide Strahlungsquellen in Abbildung 4.3 zu sehen. Hierbei ist zur späteren Vergleichbarkeit zu beachten, dass auf die Verwendung der Lock-in-Technik (d. h. auf eine Modulation durch das TTL-Gatesignal des Lock-in-Verstärkers) verzichtet wurde, was zu einer Verdopplung der optischen Ausgangsleistungen gegenüber der Lock-in-Messung führte. Man kann erkennen, dass ab einer Spannung von $9,5\text{ V}$ (QCL1) bzw. $8,5\text{ V}$ (QCL2) die Laserschwelle überwunden wurde und die optische Ausgangsleistung für QCL2 wesentlich steiler mit der Spannung

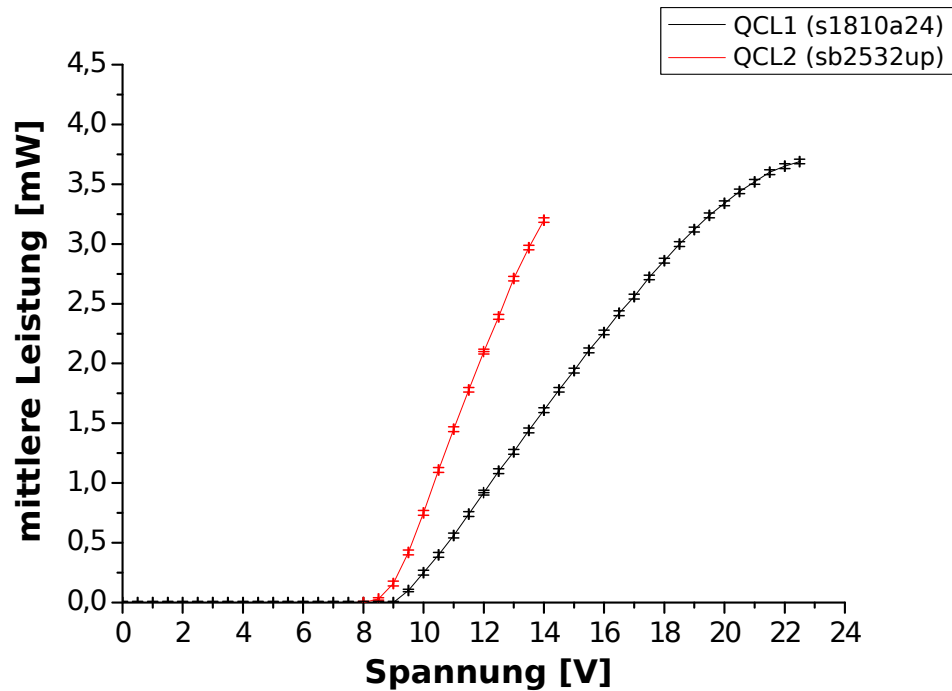


Abbildung 4.3.: Ausgangsleistung der verwendeten QCLs als Funktion der angelegten Spannung. Der Auslastungsgrad von QCL1 (*s1810a24*) betrug hierbei 1,5 % und für QCL2 (*sb2532up*) 2 %

anstieg.

Es ist anzumerken, dass der Betrieb von QCL2 bis zu einem Auslastungsgrad von 10 % empfohlen wurde, welcher in eine Ausgangsleistung von bis zu 16 mW resultierte. Bei QCL1 wurde der Auslastungsgrad immer unter 3 % belassen, aus Sicherheitsgründen im Normalfall bei 1,5 %. Die Entwicklung der Spektren für verschiedene Temperaturen ($-30\text{ }^{\circ}\text{C}$, $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ und $30\text{ }^{\circ}\text{C}$) und als Funktion der angelegten Spannung ist ebenso in den Referenzen zu finden wie die optische Ausgangsleistung unter Variation des Auslastungsgrads [129].

4.2. Glucosesensitivität

In diesem Abschnitt werden die *in-vitro*-Machbarkeit sowie das Potenzial und inhärente Begrenzungen des Messkonzepts aufgezeigt.

In einem ersten experimentellen Schritt wurde ein Fasersensor des Typs A mit einer Kavitätsbreite von etwa $30\text{ }\mu\text{m}$ charakterisiert.

Als Strahlungsquelle diente QCL1, welcher mit einer Spannung von 22 V, einer Pulsbreite von 50 ns und einer Periode von 3,3 μs (Auslastungsgrad 1,5 %) betrieben wurde. Das resultierte bei einer Peltiertemperatur von $-30\text{ }^\circ\text{C}$ und unter Modulation durch das TTL-Gatesignal des Lock-in-Verstärkers in einer optischen Ausgangsleistung von 1,8 mW.

Um zunächst den Einfluss der Wasserabsorption abschätzen zu können und die zusätzliche Hinzugabe von Glucose zu quantifizieren, wurden für unterschiedliche Befüllungen der Messkavität QCL Fasertransmissionsspektren aufgezeichnet. Dazu wurde der Fasersensor über einen selbst gefertigten Adapter in ein FT-IR-Spektrometer (MATRIX-M) eingekoppelt. Die Auflösung für 50 Scans wurde auf 1 cm^{-1} gesetzt in der spektralen Region von $(1010\text{--}1065)\text{ cm}^{-1}$. Außerdem wurde eine Blackmann-Harris 3-Term-Apodisierung und ein Zero-Filling-Faktor von 2 genutzt. Nach der Transmission durch eine luftgefüllte Kavität wurde diese sowohl mit VE-Wasser als auch mit einer wässrigen Glucoselösung mit einer Konzentration von $c_{\text{Glu}} = 500\text{ mg/dL}$ befüllt.

In Abbildung 4.4 sind die aufgezeichneten Spektren zu sehen, die nach Passieren der MIR-Strahlung durch Faser und Kavität entstanden sind. Aus der Literatur ist bekannt, dass Silberhalogenidfasern im betrachteten Wellenzahlbereich keine ausgeprägten Absorptionsbanden besitzen [130, 131]. Umspülte man die anfangs mit Luft gefüllte Kavität mit Wasser oder wässriger Glucoselösung, verringerte sich das über den aufgeführten Wellenzahlbereich integrierte Signal auf 27 % bzw. 26 % des Ausgangswertes. Mit anderen Worten bedeutete die Hinzugabe von 500 mg/dL Glucose zum VE-Wasser eine Signalreduzierung von 3,7 % relativ zu VE-Wasser ohne Glucose. Da angenommen werden kann, dass solch eine kleine Signaländerung linear von der Glucosekonzentration abhängt, ließ sich die relative Änderung des Signals mit $7,4 \times 10^{-5}$ pro mg/dL Glucosekonzentration beziffern.

Für die Bestimmung der Glucosesensitivität wurden zehn verschiedene Glucosekonzentrationen (Merck KGaA, Darmstadt) auf Phosphatpufferbasis hergestellt. Es wurden Konzentrationen c_{Glu} [mg/dL] von 40, 70, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500 and 600 vorbereitet und auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt (10 mM KH_2PO_4 / 10 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$). Darüber hinaus wurde ein Bakteriostatikum (0,095 wt% NaN_3) hinzugegeben, um den Glucoseverbrauch durch Mikroorganismen zu unterbinden. Außerdem wurde VE-Wasser zur Referenzierung ebenso wie eine Wasser/Ethanol-Mischung (90/10 wt%) zu Reinigungszwecken für die Spülvorgänge vorbereitet. Die beiden Lösungen wurden bei einer Pumprate von 10 mL/min für je 20 min durch die Messkammer geleitet, während die Glucoselösungen für 30 min mit 15 mL/min in randomisierter Reihenfolge befördert wurden.

Die detektierten Signale wurden zunächst basislinienkorrigiert, indem ein Polynom vierten Grades an die Wasserplateaus angepasst wurde. In der darauffolgenden Analyse der gemittelten Signale der Glucoseplateaus wurde jeweils ein Zeitintervall von 17 min ausgewertet, um zu gewährleisten, dass der Flüssigkeitswechsel in Durchflusskammer und Messkavität vollständig durchgeführt wurde sowie aus Konsistenzgründen mit folgenden Messreihen. Die Abstände zwischen den mittleren Glucosesignalen

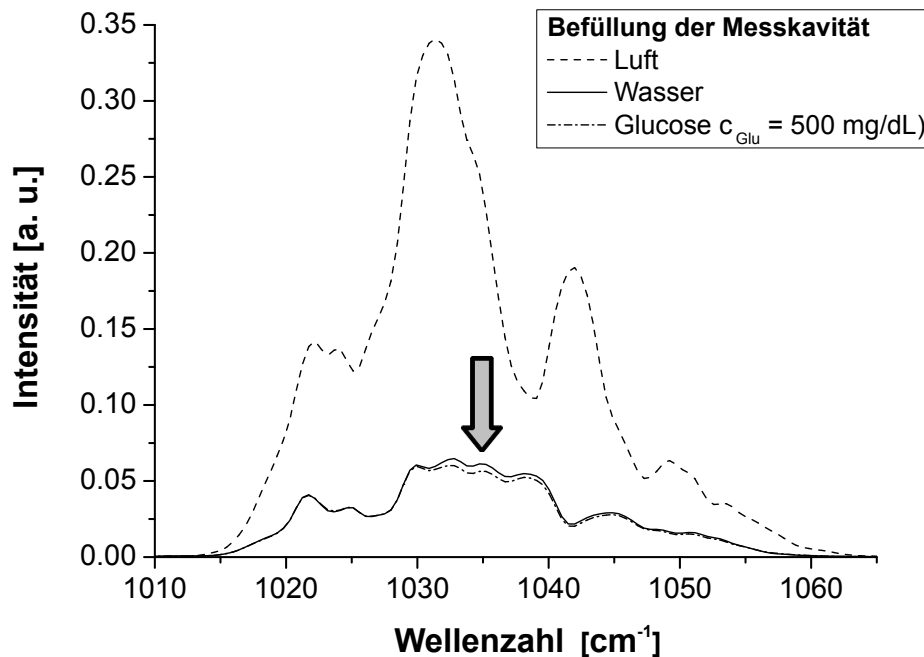


Abbildung 4.4.: QCL1 Emissionsspektren nach Transmission durch die Faser und Messkavität mit verschiedenen Füllungen. Die Spektren wurden aufgezeichnet, indem der Fasersensor in ein FT-IR-Spektrometer eingekoppelt wurde. Der Pfeil zeigt die Wellenzahl des bekannten Maximums der Absorbanz im Glucosespektrum [54].

und der Wasserbasislinie wurden nun berechnet, um die konzentrationsabhängigen Signaldifferenzen $U(c)$ zu erhalten. Die Sensitivität $\partial U/\partial c$ des betreffenden Fasersensors konnte anschließend durch eine lineare Anpassungsgerade an die Signaldifferenzen als Funktion der zugrundeliegenden Analytkonzentrationen abgeleitet werden. Die Auswertung der Messungen wurde automatisiert mithilfe der Software MATLAB (Version 7.0, The MathWorks, Inc., Natick, MA, USA).

Abbildung 4.5 zeigt den ermittelten Signalverlauf des pyroelektrischen Detektors (LTI Q2, DIAS Infrared GmbH, Dresden) als Funktion der Messzeit über einen Zeitraum von 750 min. Der stärkere Signalabfall für die Wasser/Ethanol-Lösung liegt in der starken Absorption von Ethanol in dieser spektralen Region begründet, die ein $0,74 \mu\text{m}$ (82 cm^{-1}) breites Absorptionsband um $9,51 \mu\text{m}$ (1051 cm^{-1}) aufweist, welches durch die antisymmetrische CCO-Streckschwingung von Ethanol hervorgerufen wird [132]. Weiterhin ist ein Signaldrift sowohl bei den Wasser- als auch Wasser/Ethanol-Signalen ersichtlich.

Während die Anstiegszeiten von einem Plateau zum nächsten etwa 60 s bei einer

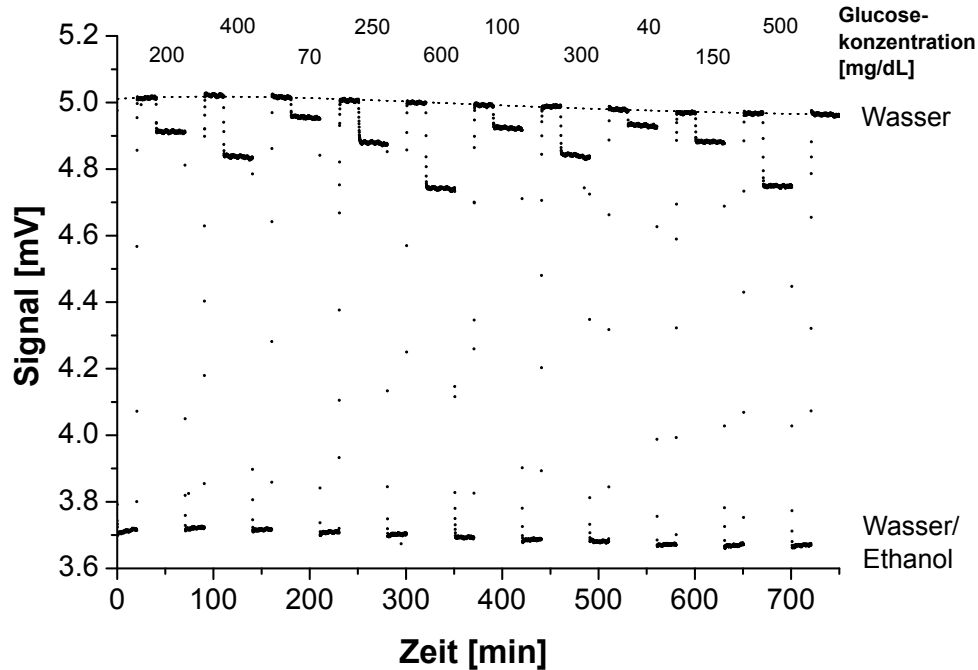


Abbildung 4.5.: Lock-in-Signal über die Dauer einer Messreihe mit zehn verschiedenen Glucoselösungen, Wasser und Wasser/Ethanol. Die Beschriftungen der Glucosekonzentrationen können über den jeweiligen Plateaus gefunden werden. Die gestrichelte Linie stellt die polynomiale Anpassungsgerade der Wasserbasislinie dar [54].

Pumprate von 15 mL/min betrug, summierte sich der zeitliche Abstand von Ventilwechsel und der Detektion eines stabilen Signals (Variation $< 0,2\%$) zu ungefähr 90 s auf. Der Wert spiegelt wahrscheinlich die Zeit wider, welche die Glucose braucht, um diffusiv in die Messkavität zu gelangen und so den vorhandenen Konzentrationsgradienten zwischen Messkavität und Umgebung auszugleichen.

Um nun eine Korrelation zwischen den beobachteten Signaländerungen und der zugrundeliegenden Glucosekonzentration zu etablieren, wurden die Differenzen zwischen den gemittelten Signalen der Glucoseplateaus und der Wasserbasislinie, wie zuvor beschrieben, ausgewertet. Dabei scheinen die abgeleiteten Signaldifferenzen linear von den Glucosekonzentrationen abzuhängen, wie in Abbildung 4.6 zu sehen ist. Dies ist allerdings nur gültig für kleine molare Konzentrationen verglichen mit Wasser (55,6 mol/L), da hier das Lambert-Beersche Gesetz entwickelt werden kann und Terme höherer Ordnung als der lineare vernachlässigt werden können.

Aus der Steigung der linearen Abhängigkeit lässt sich ableiten, dass eine Änderung der Glucosekonzentration von $\Delta c_{\text{Glu}} = 1 \text{ mg/dL}$ einem Abfall des Detektorsignals

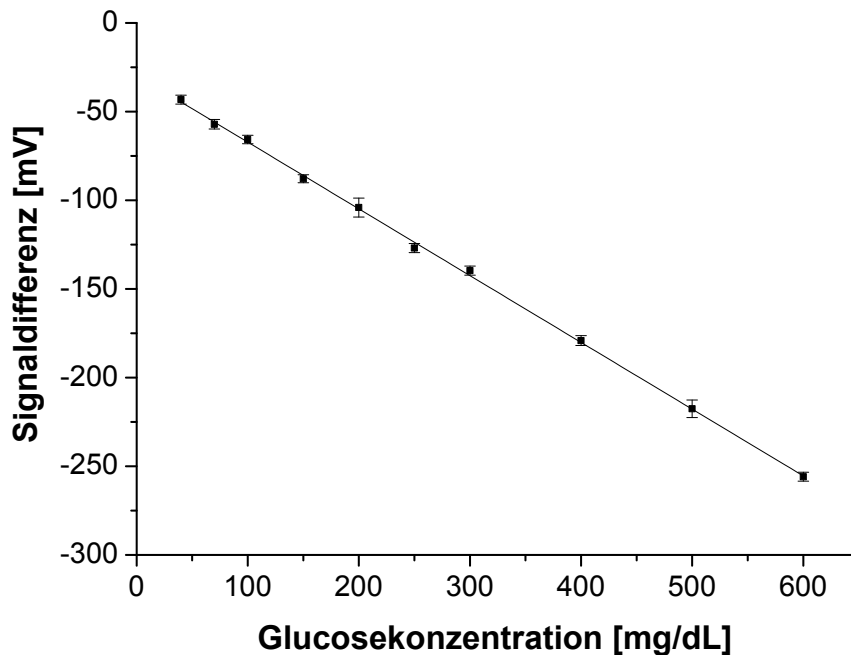


Abbildung 4.6.: Korrelation zwischen den Signaldifferenzen der Glucoseplanteaus und Wasserbasislinie als Funktion der zugrundeliegenden Glucosekonzentrationen. Der lineare Fit hat eine Steigung von (377 ± 4) nV mit einem Bestimmtheitsmaß von 0,9991 [54].

von $\Delta U = (377 \pm 4)$ nV zur Folge hatte. Das Bestimmtheitsmaß R^2 beläuft sich auf 0,9991. Des Weiteren ist anzumerken, dass die Extrapolation der Anpassungsgerade den Ursprung um (-30 ± 1) μ V verfehlt, was durch die zusätzliche Absorption des Phosphatpuffers in den Glucoselösungen und damit einer größeren Differenz zu der Wasserreferenz erklärt werden kann.

Eine Mittelung über mehrere bzgl. der Sollkonzentration identische Datenpunkte aus Abbildung 4.5 kann dabei helfen, schnelle Fluktuationen zu reduzieren, ist jedoch anfällig für Langzeitdrifts des Messaufbaus. Um hochfrequentes Rauschen ebenso wie die Langzeitstabilität zu quantifizieren, wurde abschließend der Allan-Formalismus auf die Langzeitmessungen angewendet, die über einen Zeitraum von 48 Stunden mit einer wasserbefüllten Messkammer und Kavität ausgeführt wurden.

Die Abhängigkeit der Signalstabilität vom Auslastungsgrad des QCLs wurde untersucht, indem die Periode der Pulsung jeweils um einen Faktor 3 auf Werte von 10 μ s, 30 μ s und 90 μ s erhöht wurde. Dies führte zu zusätzlichen Auslastungsgraden von 0,50 %, 0,17 % und 0,06 % neben dem ursprünglichen Wert von 1,50 %. Die Lock-in-Detektion erfolgte bei einer Zeitkonstanten von 30 ms und einer Dämpfungs-

konstanten von 18 db/Oktave, was 4 Filterstufen entsprach. Für jede Einstellung des Auslastungsgrads wurden sowohl die Kalibrationsmessung als auch die Langzeitmessung in Wasser unter identischen Bedingungen wiederholt.

Die Analyse der Langzeitmessungen, bei denen einzig VE-Wasser in der Messkammer belassen wurde, in Bezug auf die NEC als Funktion der Integrationszeit für verschiedene Perioden der QCL-Pulsung, sind in Abbildung 4.7 dargestellt.

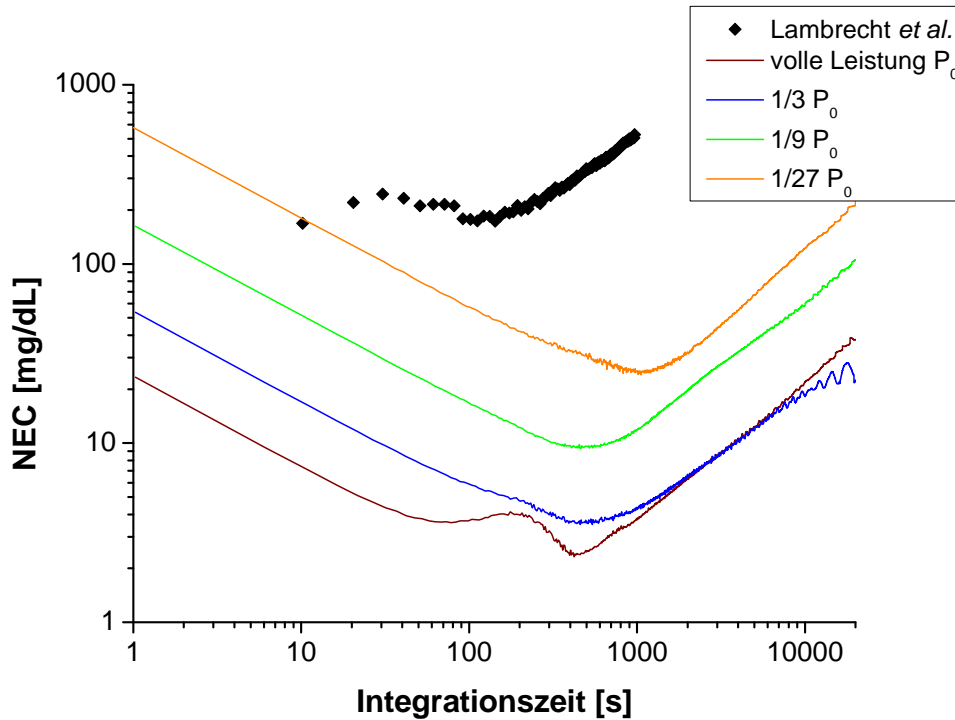


Abbildung 4.7.: Rauschäquivalente Konzentration (NEC) als Funktion der Integrationszeit für verschiedene Auslastungsgrade des QCLs, welche direkt mit den Ausgangsleistungen verknüpft sind. Zum Vergleich sind außerdem die Ergebnisse von Lambrecht *et al.* abgebildet, bei denen ein faseroptischer evaneszenter Feldsensor verwendet wurde mit einer QCL-Ausgangsleistung von 1 – 2 mW [53].

Die optimale Integrationszeit für jeden Auslastungsgrad zusammen mit den minimal erzielten NEC kann Tabelle 4.1 entnommen werden. Die erhaltenen Ergebnisse werden mit solchen eines Sensors verglichen, der auf der evaneszenten Feldmethode basiert (engl. *fiber optical evanescent field analysis*, FEFA) [53]. Zu beachten ist, dass der QCL im Zusammenspiel mit dem FEFA-Sensor bei einer Wellenzahl von 1010 cm^{-1} betrieben wurde, was zu einer geringeren Glucosesensitivität führen sollte.

Somit lässt sich für diesen Abschnitt zusammenfassen, dass eine grundlegende *in-*

Tabelle 4.1.: Optimale Integrationszeiten und die dazugehörigen minimalen NEC für verschiedene Ausgangsleistungen des QCLs.

durchschnittliche Leistung [mW]	optimale Integrationszeit [s]	minimale NEC [mg/dL]
1,80	430	2,4
0,60	460	3,5
0,20	460	9,3
0,07	1055	24,1

vitro-Machbarkeit des Konzepts gezeigt werden konnte. Das Minimum der NEC mit einem Wert von 2,4 mg/dL bei einer benötigten Integrationszeit von 430 s bedeutet eine sehr gute Vorhersagegenauigkeit bei einem für die kontinuierliche Glucosemessung akzeptablen Messintervall. Auch das Verhalten unter Reduktion der optischen Ausgangsleistung führte selbst für sehr geringe Auslastungsgrade immer noch zu einer Verbesserung gegenüber den publizierten Werten aus den Vorarbeiten [53] und lässt Schlüsse bzgl. einer Steigerung der Strahlungsleistung in der Zukunft zu.

4.3. Chemische Interferenzen

Bei einem Einsatz im subkutanen Fettgewebe ist damit zu rechnen, dass neben Glucose noch weitere Analyten in die Messkavität diffundieren. Damit könnte es zu einer Beeinflussung des Messsignals kommen, die mit Fehlinterpretationen der Glucosekonzentrationen einhergehen kann. Daher ist vor einer möglichen Kompensation solcher in der Analytischen Chemie häufig „Interferenzen“ genannter Effekte zu klären, welchen Einfluss Analyten im verwendeten Spektralbereich auf das Signal haben, die in nicht vernachlässigbarer Konzentration in der ISF zu erwarten sind.

Die Interferenz der Glucosevorhersage durch mögliche weitere Analyten wurde nach Leitlinien für Störsubstanzen untersucht [133]. Dabei handelte es sich zunächst um die weiteren Zucker Fructose, Lactose (beide Carl-Roth GmbH, Karlsruhe), Galactose (AppliChem GmbH, Darmstadt) und Maltose (Merck KGaA, Darmstadt). Weiterhin wurde der Einfluss von NaCl (Mallinckrodt Baker B. V., Deventer, Niederlande), KCl, MgCl₂, Natriumlaktat C₃H₅NaO₃ (alle AppliChem GmbH), CaCl₂, KH₂PO₄, NaHCO₃, Urea (alle Grüssing GmbH, Filsum), Ethanol (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen) und Ammoniak (VWR International S.A.S., Fontenay-sous-Bois, Frankreich) untersucht. Eine Übersicht der Substanzen, die empfohlenen Testkonzentrationen sowie die aus klinischen Studien ermittelten Standardabweichungen innerhalb der Gruppe von gesunden Patienten (darüber hinaus auch noch der Einfluss auf das Messsignal, siehe Ergebnisse in diesem Abschnitt) ist in Tabelle 4.2 zu finden.

Jeder Messbereich wurde durch zehn verschiedene Konzentrationen in einer Kalibrationsmessung untersucht. Aus technischen Gründen wurden die Messungen für NaHCO₃, Natriumlaktat und Ethanol mit Hilfe eines weiteren Sensors des Typs A

mit einer Spaltbreite von etwa $50\ \mu\text{m}$ durchgeführt. Deswegen wurde der Einfluss auf das Messsignal entsprechend der Glucosesensitivitäten des Sensors im Vergleich zum ursprünglichen mit einer Kavitätsbreite von etwa $30\ \mu\text{m}$ skaliert. Die Spülzeiten für Wasser/Ethanol bzw. VE-Wasser und Analytlösungen wurde auf 3 min bzw. 20 min reduziert mit einer allgemeinen Pumprate von $10\ \text{mL}/\text{min}$. Das Zeitintervall zur Analyse der Analytplateaus betrug 17 min. Die Driftkompensation des QCL Signals wurde analog zu der Analyse der Glucosemessreihe ausgeführt.

Die MIR-Spektren der Zucker wurden in wässriger Lösung mit einem FT-IR Spektrometer in Kombination mit einer CaF_2 Transmissionszelle aufgezeichnet, die eine Weglänge von etwa $7\ \mu\text{m}$ aufwies. Einzelheiten zu den Messparametern können in Abschnitt 2.3 gefunden werden. Die Zuckerkonzentrationen betragen jeweils $500\ \text{mg}/\text{dL}$.

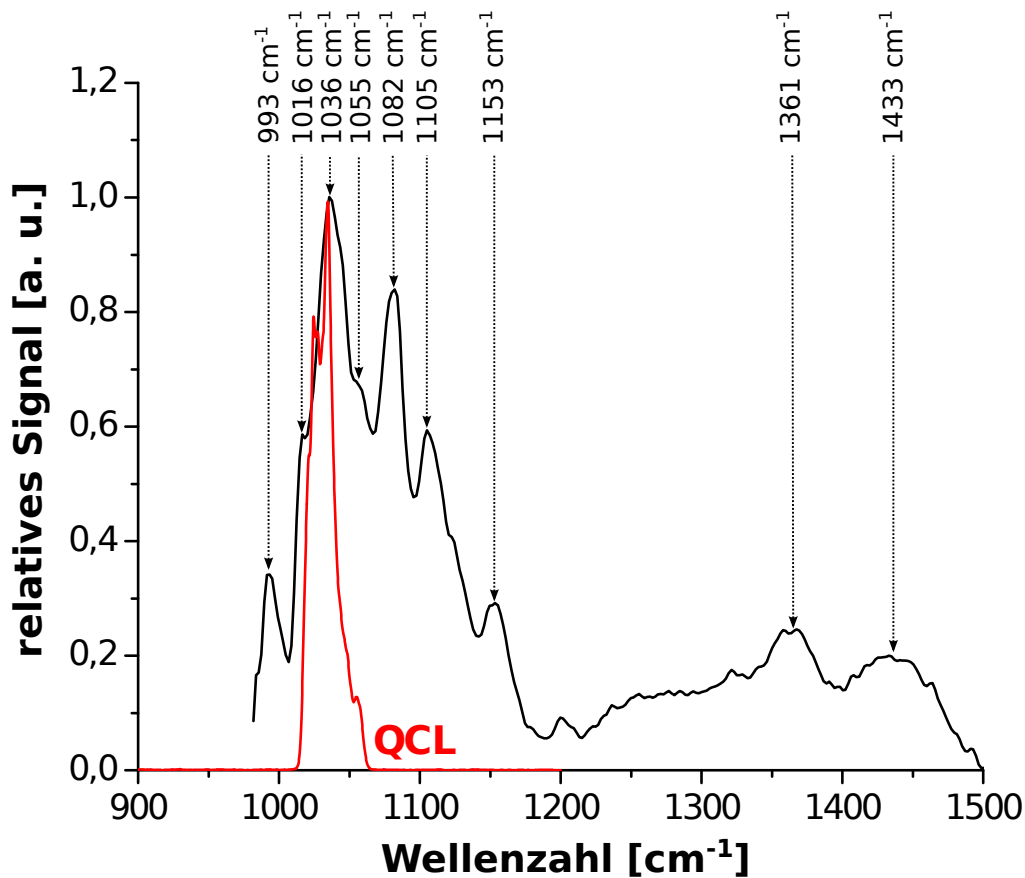


Abbildung 4.8.: Spektrum von wässriger Glucoselösung ($c_{\text{Glu}} = 500\ \text{mg}/\text{dL}$) im mittleren Infrarot zusammen mit dem Emissionsspektrum von QCL1. Die Absorbanz wurde für die Glucosespektren auf 1 skaliert, für die Ausgangsleistung des QCL1 würde der Wert bei $1036\ \text{cm}^{-1}$ als Referenz verwendet.

Tabelle 4.2.: Molekulargewichte, Leitlinienkonzentrationen, Standardabweichungen innerhalb gesunder Patienten und Messbereich für Glucose und mögliche Störsubstanzen [54], wobei die Literaturangaben auf Basis der Absorptionseigenschaften im Bereich von 1010 to 1065 cm^{-1} vorausgewählt wurden. Die Sensitivität spiegelt die Signaländerung als Funktion der Analytenkonzentration wider. Das Bestimmtheitsmaß R^2 gibt die qualitative Güte des linearen Fits an wie er in Abschnitt 4.2 beschrieben wurde. *) Die Sensitivität für NaHCO_3 , $\text{C}_3\text{H}_5\text{NaO}_3$ und Ethanol wurde skaliert aufgrund der Verwendung eines weiteren Fasersensors des Typs A, basierend auf dessen Glucosesensitivität.

Interferent	Mol.gewicht [g/mol]	CLSI Richtlinie [mg/dL]	Std.abweichung[134] [mg/dL]	Messbereich [mg/dL]	Sensitivität [nV/mg/dL]	R^2
Glucose	180,2	1 000	—	4 – 600	$-376,5 \pm 3,7$	0,9991
Fructose	180,2	18	—	0,5 – 100	$-126,1 \pm 16,0$	0,8714
Galactose	180,2	15	—	0,5 – 100	$-291,9 \pm 18,7$	0,9643
Lactose	342,3	—	—	0,5 – 100	$-254,5 \pm 28,4$	0,8981
Maltose	342,3	—	—	1 – 450	$-376,6 \pm 3,3$	0,9993
Na^+	23,0	414	5,8	8 – 3932	$31,5 \pm 0,1$	0,9998
Cl^-	35,5	420	9,8	12 – 6068		
K^+	39,1	27	1,6	10 – 5241	$25,9 \pm 0,2$	0,9993
Cl^-	35,5	420	9,8	10 – 4759		
Mg^{2+}	24,3	36	0,2	1 – 2550	$7,3 \pm 0,2$	0,9901
Cl^-	35,5	420	9,8	4 – 7450		
Ca^{2+}	40,1	20	0,4	4 – 3609	$13,8 \pm 0,3$	0,9950
Cl^-	35,5	420	9,8	6 – 6391		
Na^+	23,0	414	5,8	2 – 860	$-31,1 \pm 0,2^*$	0,9997
HCO_3^-	84,0	294	8,4	8 – 3140		
Na^+	23,0	414	5,8	2 – 1017	$-66,9 \pm 1,7^*$	0,9951
$\text{C}_3\text{H}_5\text{O}_3^-$	89,1	59	4,1	8 – 3983		
K^+	39,1	27	1,6	3 – 2873	$-61,4 \pm 0,3$	0,9998
H_2PO_4^-	97,0	—	—	7 – 7127		
Ethanol	46,1	400	—	10 – 10000	$-95,6 \pm 6,6^*$	0,9583
Urea	60,1	257	9,0	10 – 10000	$-2,0 \pm 0,2$	0,9013

Der Einfluss der vier weiteren untersuchten Zucker ist in Tabelle 4.2 zusammengefasst. Daraus ist ersichtlich, dass einzig Maltose eine spezifische Absorption für die verwendete Strahlungsquelle besitzt, die vergleichbar mit Glucose ist. In Abbildung 4.8 ist das Spektrum von wässriger Glucoselösung zu sehen mit der Beschriftung von lokalen Maxima zur besseren Vergleichbarkeit. Außerdem ist das Emissionsspektrum von QCL1 eingezeichnet. Die Absorbanz beider Spektren wurden zur besseren Vergleichbarkeit normiert. Die beiden Hauptmaxima der Absorption bei 1035 cm^{-1} sowie 1082 cm^{-1} sind ebenso klar ersichtlich wie die sehr gute Positionierung des QCL1-Emissionsspektrums in Relation zum Glucoseabsorptionsspektrum.

Die Auswirkungen der weiteren Kohlenhydrate Maltose, Fructose, Galactose und Lactose wurde ebenfalls spektral untersucht. Die grafische Darstellung der Resultate ist in Abbildung 4.9 zu finden. Zu erkennen ist, dass für beide Monosaccharide (Fructose und Galactose) das Maximum der Absorption im Gegensatz zu Glucose zu größeren Wellenzahlen verschoben ist, womit sich die geringere Sensitivität bzgl. QCL1 erklären lässt. Bei den beiden untersuchten Disacchariden Lactose und Maltose konnte man aufgrund der Zusammensetzung erwarten, dass die Absorption für die verwendete Strahlungslänge größer sein wird, da die zu bewertenden Zweifachzucker aus einem bzw. zwei Glucosemolekülen aufgebaut sind. So kann man für Maltose ein Absorptionsmaximum um 1035 cm^{-1} erkennen, das zu der hohen Sensitivität in den Studien führte.

Schließlich und wie aus der Literatur erwartet, lösten hohe Ammoniakkonzentrationen die Silberhalogenidfasern über den Verlauf der Messungen ($c_{\text{ammonia}} = 0,01 \dots 250\text{ g/L}$) fast vollständig auf, was zu einem deutlich erkennbaren Signalabfall führte. Mit der simplen Annahme, dass die Faserdegradation zeitlich und zur Ammoniakkonzentration linear abhängig ist, könnte man spekulieren, dass eine vorgeschlagene maximale Analytenkonzentration von $112\text{ }\mu\text{g/dL}$ [133] für eine Signalreduktion von weniger als 1% über einen Zeitraum von 20 Tagen verantwortlich wäre.

4.4. Signalfilterung

In diesem Abschnitt sollen Möglichkeiten der Signalfilterung auf ihren Einfluss auf die Glucosevorhersagegenauigkeit näher untersucht werden. Das soll exemplarisch an zwei Beispielen gezeigt werden, nämlich einerseits durch Variation der Einstellungen des Lock-in-Verstärkers (s. auch Referenz [18]) und zum anderen durch die Verwendung eines Bandpassfilters zur Unterdrückung periodischer Störquellen.

4.4.1. Lock-in-Einstellungen

Für die Messreihe fand ein weiterer Sensor des Typs A Einsatz, welcher eine etwas breitere Messkavität von etwa $50\text{ }\mu\text{m}$ aufwies. Zunächst wurde der Sensor mit den bisher verwendeten Lock-in-Einstellungen (Zeitkonstante 30 ms und Dämpfung 18 dB/Oktave) charakterisiert unter Nutzung des bisherigen pyroelektrischen Detektors. Die Bestimmung der Glucosesensitivität wurde durch eine verkürzte Abfolge von

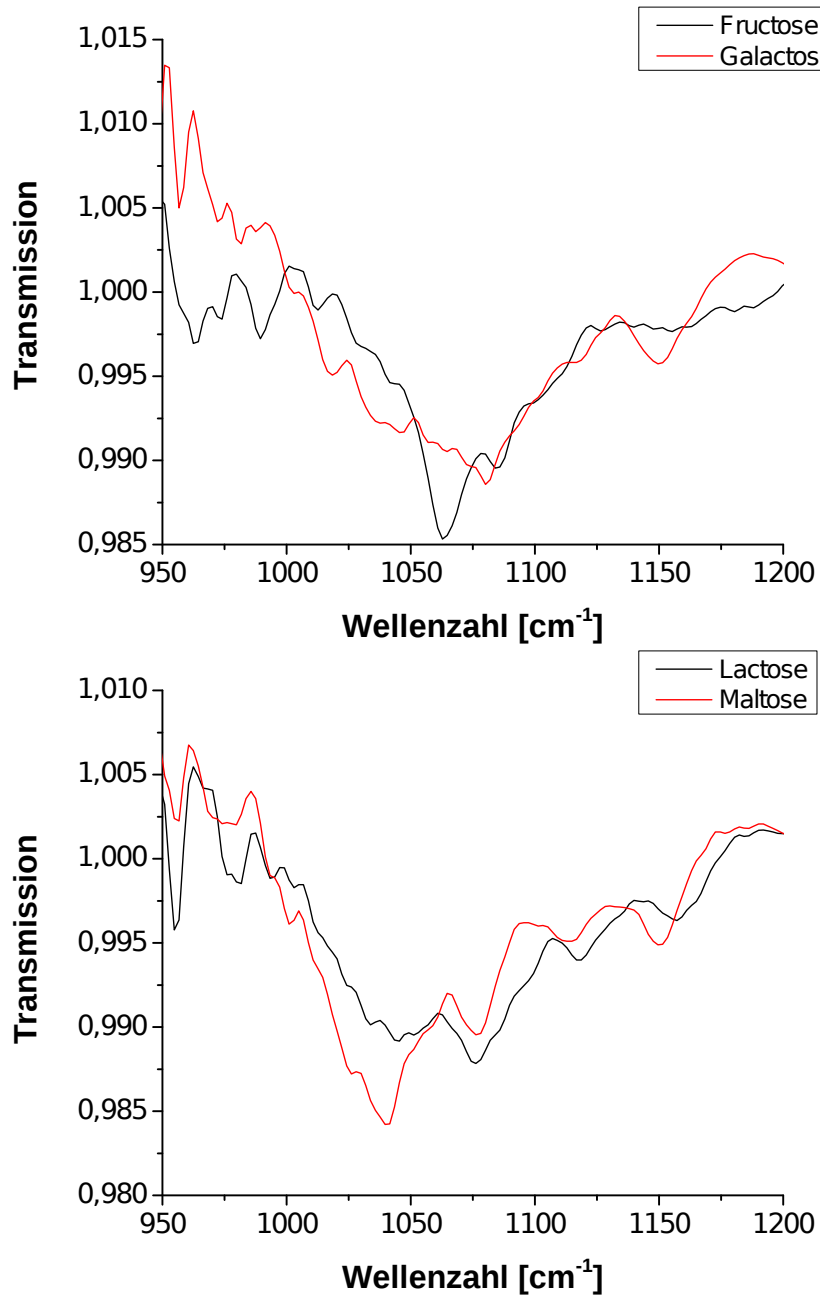


Abbildung 4.9.: Transmissionsspektrum von wässrigen Zuckerlösungen (Monosaccharide Fructose und Galactose (*oben*) sowie Disaccharide Lactose und Maltose (*unten*)) mit einer Konzentration von jeweils 500 mg/dL).

Wasser und gepufferten wässrigen Glucoselösungen (H_2O , 0 mg/dL, H_2O , 0 mg/dL, H_2O) zu je 20 min realisiert. Die letzte Wasserlösung wurde nur 10 min gespült.

Anschließend wurde die Zeitkonstante auf 100 ms und die Dämpfung auf 24 dB/Oktave erhöht. Als dritte Variante wurde der pyroelektrische Detektor auf ein Modell (LME-353, InfraTec GmbH, Dresden) gewechselt mit einer Verstärkerschaltung, die sich an den Herstellervorgaben orientierte (Schaltbild s. Abbildung A.1 in Anhang A). Die Kalibrationsmessungen für die beiden Fälle wurden analog zu Abschnitt 4.2 durchgeführt, mit dem Unterschied, dass Glucoselösungen für 20 min und Wasser/Ethanol für 10 min gespült wurden. Die Pumprate betrug bei allen Wiederholungen 15 mL/min.

Für alle drei Messreihen wurde nach den Kalibrationsmessungen jeweils eine Langzeitmessung über 48 Stunden durchgeführt, bei der die Messkammer mit VE-Wasser gefüllt war und die Pumpe deaktiviert wurde.

Die Ergebnisse der Kalibrationsmessungen für die drei verschiedenen Kombinationen von Lock-in-Einstellungen und pyroelektrischem Detektor können Tabelle 4.3 entnommen werden. Es ist dabei ersichtlich, dass ein Wechsel des Detektors die Vergleichbarkeit der Sensitivitäten zerstörte. Das liegt zum einen an den unterschiedlichen Detektivitäten, zum anderen auch an den abweichenden Verstärkerschaltungen.

Tabelle 4.3.: Optimale Integrationszeiten und die dazugehörigen minimalen NEC für verschiedene Ausgangsleistungen des QCLs.

Zeitkonstante [ms]	Dämpfung [dB/Oktave]	Detektor	Glucosesensitivität (QCL1) [$\mu\text{V}/\text{mg}/\text{dL}$]
30	18	LTI Q2	$0,256 \pm 0,001$
100	24	LTI Q2	$0,213 \pm 0,002$
100	24	LME-353	$49,2 \pm 0,5$

Die grafische Auswertung der Allan-Varianz und der damit verknüpften NEC ist in Abbildung 4.10 dargestellt.

Die rauschlimitierte Vorhersagegenauigkeit für die alten Lock-in-Einstellungen unter Verwendung des Detektors LTI Q2 besitzt ein globales Minimum von 2,5 mg/dL bei 336 s und ein lokales Minimum von 2,7 mg/dL bei 40 s. Die Kurve nach Erhöhung der Integrationszeit auf 100 ms und der Dämpfungskonstanten auf 24 dB/Oktave weist eine sehr ähnliche Form auf, mit einem globalen Minimum des NECs von 2,2 mg/dL bei 308 s und einem lokalen Minimum von 1,8 mg/dL bei 34 s. Ein Austausch des Detektors zu Modell LME-353 bringt eine grundsätzliche Veränderung des Kurvenverlaufs mit sich. Der Abfall für kleine Integrationszeiten wandelt sich fast in ein Plateau mit einem globalen Minimum von 0,6 mg/dL bei 4 s. Im Vergleich zu den beiden Messreihen zuvor erfährt das globale Maximum nur eine vergleichsweise geringe Verschiebung zu einem Wert von 1,8 mg/dL bei 264 s. Das Langzeitverhalten aller Kurven gleicht sich unabhängig von den Einstellungen oder der Detektorwahl. In allen Messreihen ist außerdem deutlich die Störung durch den Kühlkreislauf bei

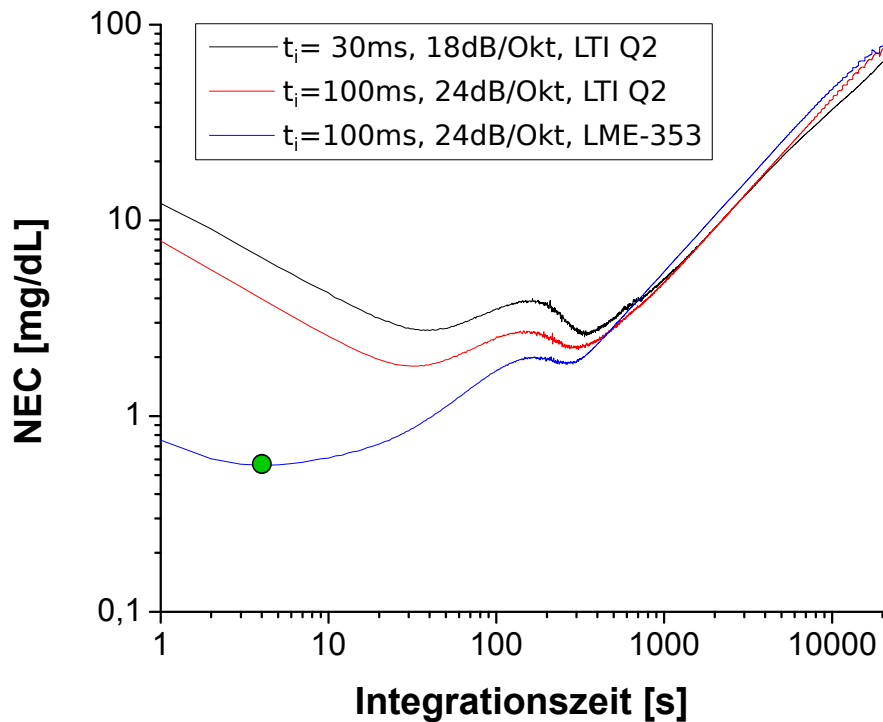


Abbildung 4.10.: Rauschäquivalente Konzentration (NEC) als Funktion der Integrationszeit für verschiedene Einstellmöglichkeiten (Zeitkonstante t_i , Dämpfung) des Lock-in-Detektors und unter Verwendung von zwei verschiedenen pyroelektrischen Detektoren. Der grüne Punkt markiert den bisherigen Bestwert der *in-vitro*-Messungen mit einer NEC von 0,6 mg/dL bei einer Integrationszeit von 4 s.

etwa 170 s sichtbar.

4.4.2. Fourierfilterung

Der Einfluss von periodischen Störquellen wurde in Abschnitt 4.2 eingeführt und kann in den experimentellen Ergebnissen zur Bestimmung der rauschlimitierten Vorhersagenauigkeit (s. Abb. 4.7) wiedergefunden werden. Der Ursprung konnte wie bereits berichtet als externer wassergetriebener Kühlkreislauf zur Abfuhr der überschüssigen Wärme am Peltierelement identifiziert werden. Da die justierbaren Parameter sich aus Zeitgründen auf die Zieltemperatur am Kühlgerät beschränken mussten, war man bei der Reduzierung des Effekts auf Mittel der Signalverarbeitung angewiesen. Als Werkzeug bot sich hierbei eine Filterung im Fourierraum an, da hier effektiv Band-

filter angewandt werden können, die den Einfluss der periodischen Störung möglichst ohne Beeinflussung der restlichen Signalcharakteristiken reduzieren können.

In Abbildung 4.11 ist das Fourierspektrum einer Langzeitmessung über 48 Stunden dargestellt, die eine ausgeprägte periodische Störung durch den wasserbetriebenen Kühlkreislauf aufwies. QCL1 diente als Strahlungsquelle mit einem Auslastungsgrad von 1,5 %.

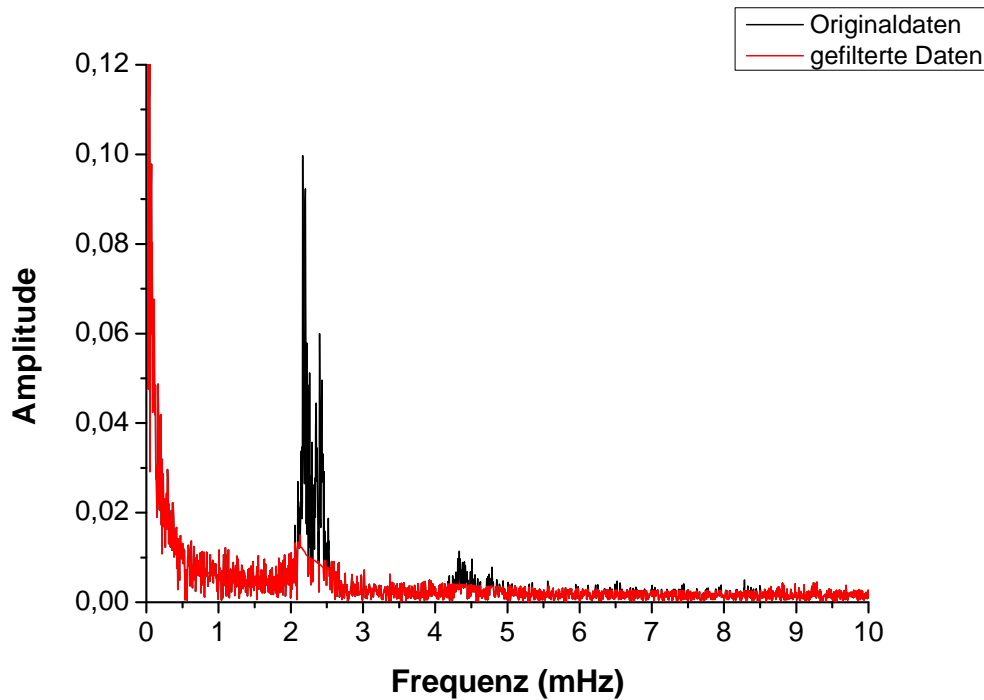


Abbildung 4.11.: Fourierspektrum der Langzeitmessung aus Abschnitt 4.2, wobei die Amplitude gegenüber der Frequenz aufgetragen ist.

Man kann hier bei Frequenzen um 2,2 mHz eindeutig sehr starke Frequenzanteile erkennen, die einer Periode von ungefähr 455 s entsprechen. Um eine möglichst unspezifische Filterung durchzuführen, wurde im nächsten Schritt eine automatische Routine mittels GNU Octave [135] programmiert, die im Fourierspektrum bis zu einer Frequenz von 10 mHz für jeden Datenpunkt analysierte, ob es sich dabei um einen außergewöhnlich großen Beitrag einer periodischen Störquelle handelte. Dazu wurde für jeden Datenpunkt überprüft, ob der aktuelle Wert gegenüber den Mittelwerten der 300 vorhergehenden und nachfolgenden Datenpunkte um mehr als das 1,6-fache überstieg. War dies der Fall, so wurde der Wert auf die Hälfte der Summe der beiden Mittelwerte gesetzt. Die Auswirkungen der Analyse auf das Fourierspektrum sind ebenfalls in Abbildung 4.11 zu finden. Neben der deutlichen Reduktion des Frequenzanteils bei 2,2 mHz kann außerdem eine Reduktion der Oberschwingungen

bei 4,4 mHz (und ggf. 6,6 mHz) beobachtet werden.

Nach einer Rücktransformation in den Ortsraum wurden sowohl die gefilterten als auch die Originaldaten erneut nach dem Allan-Formalismus analysiert. Das Ergebnis des Vergleichs der rauschlimitierten Vorhersagegenauigkeiten kann Abbildung 4.12 entnommen werden.

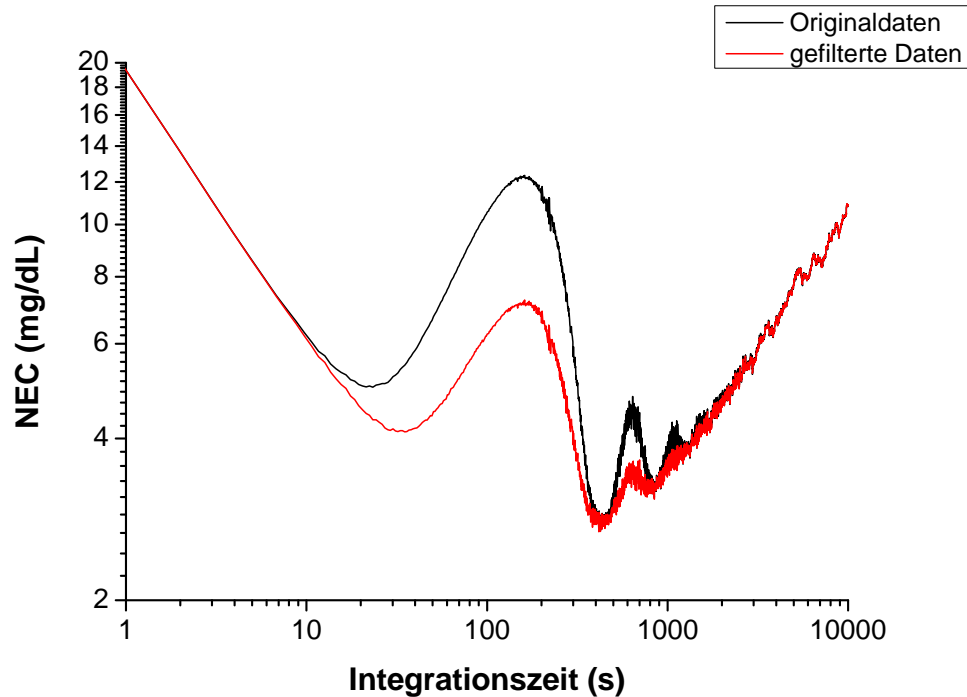


Abbildung 4.12.: Rauschlimitierte Vorhersagegenauigkeit (NEC) als Funktion der Integrationszeit für Originaldaten und fouriergefilterte Daten.

Eine signifikante Reduktion der periodischen Störungen ist klar erkennbar. Für eine Integrationszeit von 161 s kann der NEC-Wert im lokalen Maximum von 12,3 mg/dL auf 7,2 mg/dL bei 171 s gesenkt werden, entsprechend einer relativen Abnahme von 41 %. Auch das Absenken der NEC beim darauf folgenden Maximum um 600 s von 4,8 mg/dL auf 3,6 mg/dL bedeutet eine relative Abnahme von 25 %. Eine weitere wichtige Erkenntnis für die Validität des Filteransatzes ist, dass das Verhalten für kurze sowie lange Zeiten wie gewünscht von der Fourierfilterung unberührt bleibt.

4.5. Externe Störquellen

In den vorangegangenen Experimenten wurde die Betrachtung der Allan-Varianz für große Zeiten bisher ausgespart. Aber neben einer möglichst kleinen NEC für ei-

ne ebenfalls möglichst kurze Integrationszeit ist es mindestens ebenso wichtig, den Wert für große Zeiten so weit wie möglich zu reduzieren, um die Vergleichbarkeit von Vorhersagewerten über große Zeiträume zu gewährleisten und somit bei der Anwendung als kontinuierliches Glucosemesssystem die benötigte Anzahl an Kalibrationen mit Blutreferenzwerten zu reduzieren. Solche Systemdrifts können bspw. durch Schwankungen der Umgebungstemperatur und -luftfeuchtigkeit, Alterung der Strahlungsquelle oder Degradation des Fasersensors hervorgerufen werden. Deshalb ist eine Referenzierung zwingend erforderlich.

4.5.1. Referenzierung durch zweite Strahlungsquelle

Im Folgenden wurde eine zusätzliche Strahlungsquelle in den bestehenden Aufbau integriert, deren emittierte Wellenlänge fern von der untersuchten spektralen Region hoher Absorption durch Glucose liegt. Dabei handelte es sich um den in Abschnitt 4.1 vorgestellten Fabry-Pérot QCL2, der ebenso wie der bisher ausschließlich verwendete QCL1 über einen 50/50-Strahlteiler (ISP Optics Europe, Riga, Lettland) sowohl direkt auf einen pyroelektrischen Detektor (PyroB) als auch über die Einkopplung in einen Fasersensor auf einen zweiten pyroelektrischen Detektor (PyroA) geleitet wurde. Jeder Detektor (beide LME-353) wurde an einen separaten Lock-in-Verstärker angeschlossen (SR830), der jeweils eine Steigung von 24 dB, eine Zeitkonstante von 300 ms und Modulationsfrequenzen von 110 Hz (QCL1) bzw. 170 Hz (QCL2) nutzte. Mit diesen Parametern konnte eine Datenerfassungsrate von 85 mHz erzielt werden unter der Bedingung stabiler Messkanalwerte. QCL1 wurde mit denselben Einstellungen wie in Abschnitt 4.2 betrieben. Der gepulste Betrieb von QCL2 mit einer Pulsdauer von 50 ns und einer Periode von 1 μ s (Auslastungsgrad 5%) mündete in einer Ausgangsleistung von 6,1 mW. Beide Strahlungsquellen wurden auf -30 °C Peltier-gekühlt. Eine Übersicht des Aufbaus ist in Abbildung 4.13 dargestellt.

Der eingesetzte Fasersensor des Typs B wies eine Gesamtlänge von 16 cm auf, der Titanhalter deckte davon 4 cm ab, und wurde über die in Abschnitt 3.2.4 präsentierte Pipettierstation gehaltert und mit Probenflüssigkeit versorgt. Die Silberhalogenidfasern wurden nicht beschichtet. Für die Kalibration des Sensors wurden wiederum phosphatgepufferte Glucoselösungen angesetzt mit Konzentrationen c [mg/dL] von 0, 70, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500 und 600 und für jeweils 20 min automatisch in randomisierter Reihenfolge über den Fasersensor pipettiert. Die Pumprate betrug dabei 0,25 mL/min. Die Spülung mit VE-Wasser wurde ebenfalls für 20 min und für Wasser-/Ethanol-Gemisch (90/10 wt %) für 3 min durchgeführt. Im Anschluss an die Kalibrationsmessung fand für die Bestimmung der Allan-Varianz eine Langzeitmessung über 48 Stunden statt, bei der durchgehend VE-Wasser auf den Sensor pipettiert wurde.

Der Variationskoeffizient VK in der Bestimmung von Glucosekonzentrationen *in*

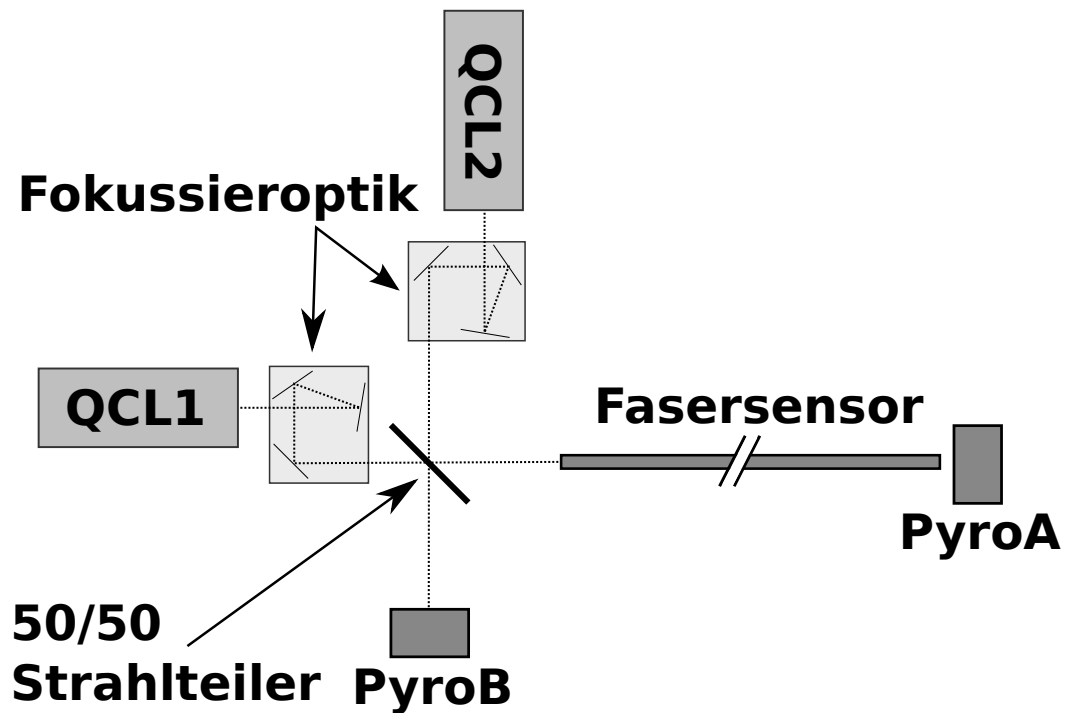


Abbildung 4.13.: Experimenteller Aufbau mit zwei Strahlungsquellen (QCL1 und QCL2), zwei pyroelektrischen Detektoren (PyroA und PyroB) und einem 50/50 Strahlteiler, der die Strahlungsgänge nach Durchlaufen der Fokussieroptik teilt. Dies führte insgesamt zu vier Messkanälen, die zur Auswertung zur Verfügung standen.

in vivo ist in der diabetes-relevanten Analytischen Chemie häufig definiert als

$$VK_{\leq 100} = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (c_i^{ref} - c_i)^2} \quad \forall c_i^{ref} \leq 100 \text{ mg/dL} \quad (4.1)$$

$$VK_{> 100} = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \left(\frac{c_i^{ref} - c_i}{c_i^{ref}} \times 100\right)^2} \quad \forall c_i^{ref} > 100 \text{ mg/dL}, \quad (4.2)$$

wobei N die Anzahl an Vorhersagedatenpunkten und c_{ref} die dazugehörige Referenzkonzentration beinhaltet. Obwohl diese medizinisch motivierte Definition einige Unwägbarkeiten mit sich bringt, wird sie im Folgenden genutzt, um eine bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse aus Anwendersicht zu gewährleisten.

Abbildung 4.14 zeigt das Ergebnis der Kalibrationsmessungen aus Messkanal A1, der aus dem Signal von QCL1 auf PyroA besteht. Der Kurvenverlauf ist vom Pendant der Messungen mit einem Sensor des Typs A, der in der Fluidik-Messkammer

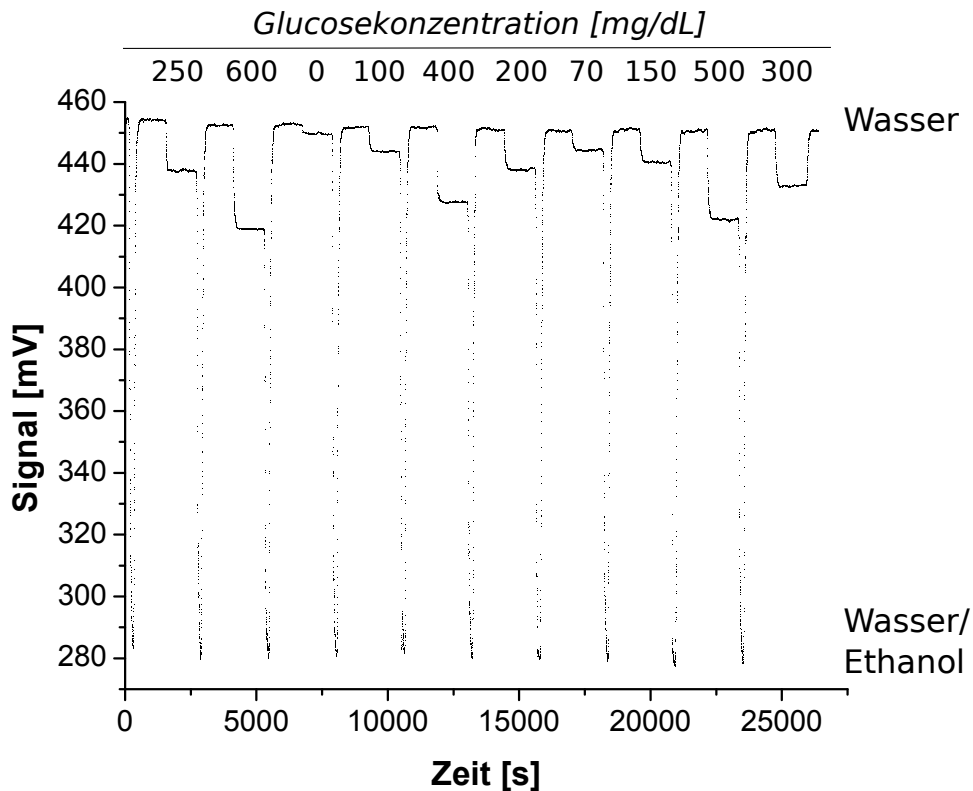


Abbildung 4.14.: Signalverlauf der Glucosekalibrationsmessung bei der abwechselnd VE-Wasser, phosphatgepufferte Glucoselösungen und Wasser/Ethanolspüllösungen auf den Fasersensor pipettiert wurden.

eingesetzt war, qualitativ nicht zu unterscheiden (s. Abb. 4.7 für volle Ausgangsleistung). Aufgrund der langsameren Flussrate im Vergleich zur Fluidik-Messkammer wurden pro Glucoseplateau jeweils lediglich 14 min analysiert, um einen vollständigen Flüsskeitsaustausch zu garantieren. Aus den Kalibrationsmessungen ergab sich nach Abzug der Wasser-Basislinie eine Glucosesensitivität in Messkanal A1 von $(52,3 \pm 0,2) \mu\text{V}/\text{mg}/\text{dL}$ mit einem Bestimmtheitsmaß R^2 von 0,9999. Das zeigt, dass sowohl der Wechsel auf die Pipettierstation als auch auf den Sensortyp B die *in-vitro*-Tauglichkeit nicht einzuschränken schienen.

Ein erster Eindruck von einer Korrektur durch einen Referenzkanal wurde im nächsten Schritt erzielt, indem die unkorrigierten Glucoseplateaus erneut ausgewertet wurden. Anstatt nun die experimentell erfasste Wasser-Basislinie von den Messdaten in Kanal A1 abzuziehen, wurde als Referenz der Messkanal B1 herangezogen und mit ein Polynom vierter Ordnung an die dazugehörigen Daten angepasst. Nach

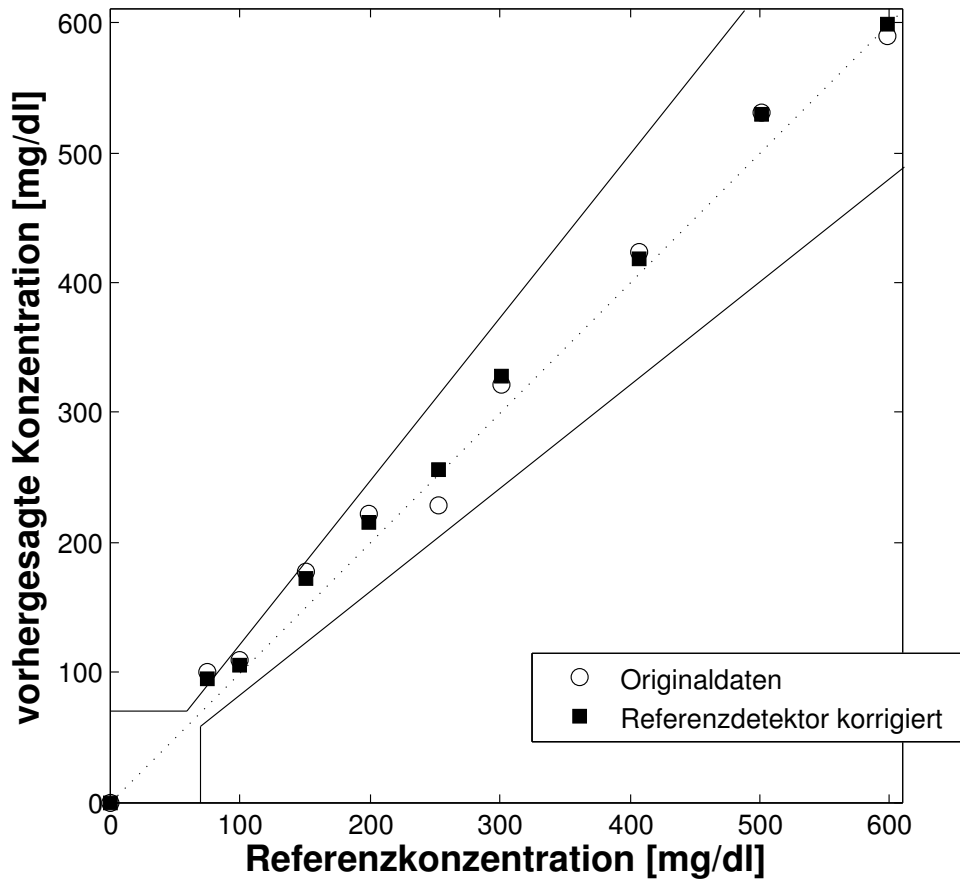


Abbildung 4.15.: Korrelation zwischen der vorhergesagten Glucosekonzentrationen und den Referenzwerten für die unkorrigierten Messdaten und einfach korrigierten Daten.

einer Normalisierung der Daten aus Messkanal B1 wurden die Daten des Kanals A1 durch diese dividiert. Die vorhergesagten Glucosekonzentrationen wurden anschließend abgeleitet, indem der Durchschnittswert jedes Plateaus von demjenigen einer Konzentration von $c_{Glu} = 0$ mg/dL subtrahiert wurde. Die oben angeführte Kalibrierung wurde dann genutzt, um die Signaldifferenz in eine Glucosekonzentration zu übersetzen. Die vorhergesagten Glucosekonzentrationen wurden schließlich mit den Referenzkonzentrationen verglichen.

Abbildung 4.15 zeigt das Ergebnis der Basislinienkorrektur, die ohne zusätzliche Wasserplateaus auskommt, im Vergleich zu Glucosekonzentrationsvorhersagen auf Basis der unkorrigierten Originalmessdaten aus Kanal A1. Der durchschnittliche VK für die Resubstitution beträgt 12,6 und wird durch die Wasserplateau-unabhängige

Basislinekorrektur um 22 % auf 9,8 reduziert.

Als nächstes stellte sich die Frage, welches Potenzial zur Korrektur in der Verwendung aller vier Messkanäle liegt. In Abbildung 4.16 sind die Signale aller Kanäle als Funktion der Messzeit dargestellt. Das vergleichsweise geringe Signal von Kanal A2 liegt in der höheren Wasserabsorption von QCL2 begründet, für dessen Wellenlängenbereich der Absorptionskoeffizient etwa einen Faktor 2,5 höher liegt als für QCL1 [120].

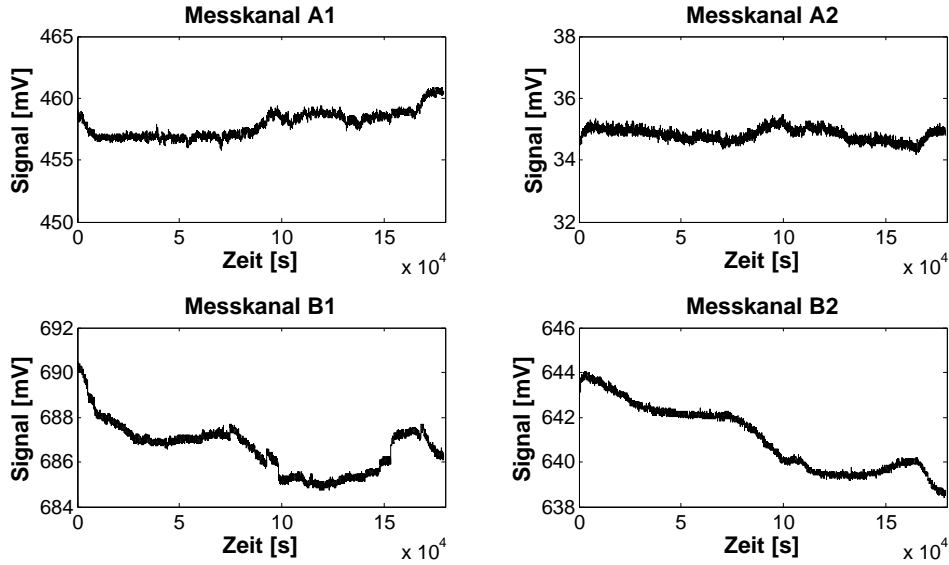


Abbildung 4.16.: Übersicht aller vier verwendeten Messkanäle als Funktion der Zeit.

Als erster Schritt in der Referenzierung wurden alle Kanäle bis auf A1 gefiltert nach Savitzky-Golay [136], mit einem Polynom fünfter Ordnung und einer Fenstergröße von 213. Der Filterungsprozess änderte das Langzeitverhalten der Messkanäle nicht und die Daten konnten somit zur weiteren Korrektur von niederfrequenten Drifts verwendet werden. Anschließend wurden diese drei Kanäle auf ihren Mittelwert normiert. Messkanal A2 wurde außerdem komprimiert, um sensorspezifische Abweichungen zu korrigieren, die von der exakten Kavitätsbreite und -form abhängen. Das wurde mathematisch umgesetzt, indem für jeden Datenpunkt die Abweichung zum Mittelwert der gesamten Messung variiert wurde.

Das referenzierte Signal I_{final} wurde dann nach folgender Formel berechnet:

$$I_{\text{final}} = \frac{I_{A1}}{I_{A2}^*} / \frac{I_{B2}^*}{I_{B1}^*},$$

wobei I_{A1} das Signal von Messkanal A1 bezeichnet und der Stern angibt, dass das Signal vor der Prozedur eine Filterung durchlaufen hat. Einen Vergleich zwischen I_{A1} und I_{final} kann man in Abbildung 4.17 sehen. Hier ist klar ersichtlich, dass die Referenzierung zu einer deutlich sichtbaren Verbesserung der Langzeitstabilität geführt hat.

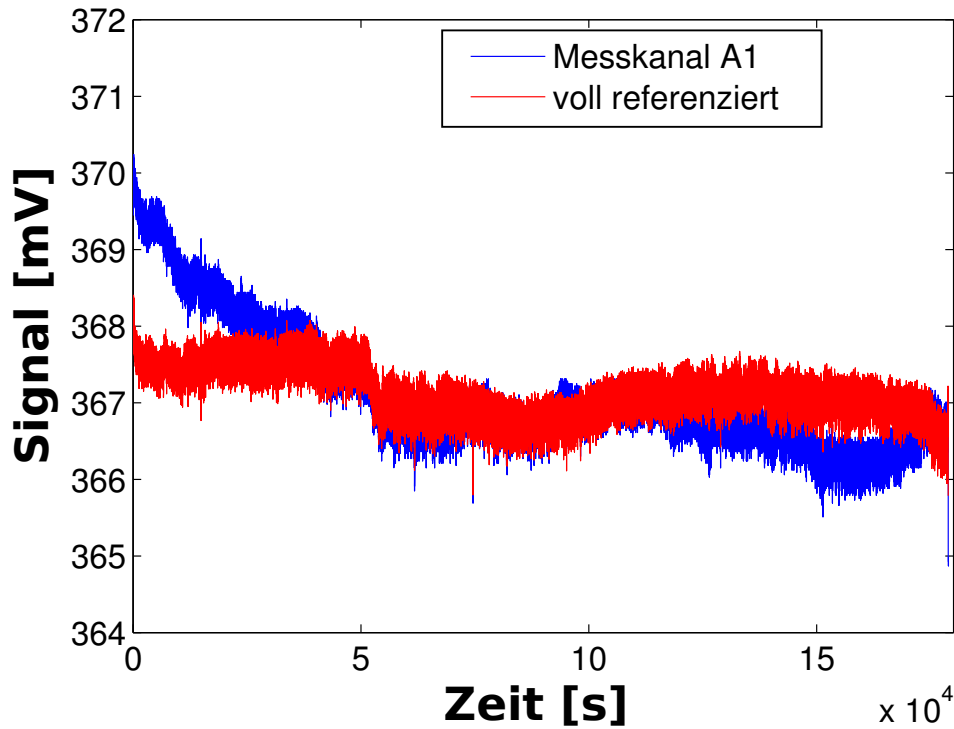


Abbildung 4.17.: Messsignal der Langzeitmessung zur Bestimmung des Einflusses der Referenzierung als Funktion der Zeit. Dargestellt sind sowohl die ungefilterten Daten des Messkanals A1 als auch die voll referenzierten Daten.

Um den Stabilitätsgewinn quantifizieren zu können, wurde im letzten Schritt der Allan-Formalismus sowohl auf das unkorrigierte Signal I_{A1} als auch auf das voll referenzierte Signal I_{final} angewandt, um einen Vergleich der NEC zu erhalten. Das Resultat ist Abbildung 4.18 zu entnehmen.

Das Verhalten für beide Datensätze ist für Integrationszeiten unter 250 s nahezu identisch. Da es sich wiederum um einen weiteren Sensor handelte, sind Abweichungen in den genauen Zahlenwerten für die minimale NEC gegenüber den vorausgesagten Messergebnissen zu erwarten und begründbar. Eine signifikante Reduzierung der NEC kann für Integrationszeiten über 1000 s beobachtet werden. Für ein Zeitinter-

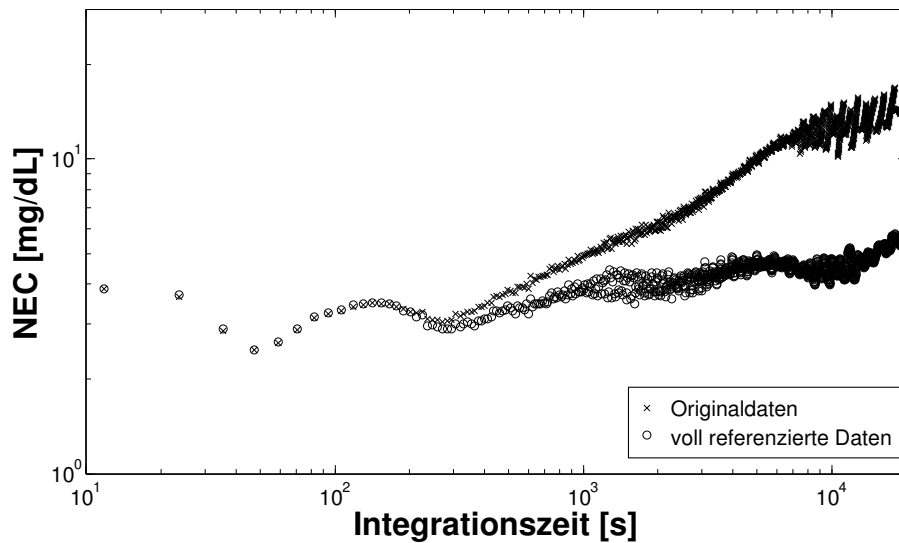


Abbildung 4.18.: Rauschlimitierte Vorhersagegenauigkeit (NEC) als Funktion der Integrationszeit für die unkorrigierten Originalmessdaten von Kanal A1 und für die voll referenzierten Daten, bei denen alle vier Messkanäle genutzt wurden.

vall von 1 Stunde kann der NEC bspw. durch die Referenzierung von 8,0 mg/dL um 44 % auf 4,5 mg/dL verringert werden, für ein Integrationszeit von 3 Stunden sogar um mehr als 60 %, von 12,5 mg/dL auf 4,6 mg/dL.

4.5.2. Einfluss von Temperaturschwankungen

Nachdem im vorigen Abschnitt gezeigt werden konnte, dass eine Referenzierung durch eine zweite Strahlungsquelle das Langzeitverhalten des Messsystems deutlich verbessern konnte, wird im nun folgenden Schritt quantitativ der Einfluss von Temperaturschwankungen der Messlösung und Möglichkeiten der Reduzierung dieser Störungen mit Hilfe der Referenzierung durch eine zweite Strahlungsquelle untersucht.

Zur Messung wurde ein Fasersensor des Typs B mit einer Gesamtlänge von 16 cm und einer Spaltbreite von etwa 40 μm in ein offenes, mit VE-Wasser gefülltes Gefäß gehängt, ohne dass die Endfacetten zur Ein- bzw. Auskopplung der Strahlung in Kontakt mit der Flüssigkeit kamen. Das Gefäß konnte mittels eines um ihn gewickelten Heizbandes (HTC-30, OMEGA Engineering, Inc., Stamford, CT) temperiert werden. Nach einem Vorlauf von 110 min beginnend bei einer Starttemperatur von etwa 29 °C folgte ein kurzer Heizvorgang von 5 min, bei der sich die Wassertemperatur von

etwa 21 °C auf 32 °C erhitzte. Anschließend wurde die Lösung wieder unbeheizt der Umgebungstemperatur ausgesetzt und kühlte so über einen Zeitraum von weiteren 100 min ab. Die Temperatur wurde mit einem Thermoelement Typ K (Temperatur Messelemente Hettstedt GmbH, Maintal) erfasst.

Die Referenzierung der vier Messkanäle erfolgte analog zu der Vorgehensweise im vorhergehenden Abschnitt (ohne Fourierfilterung), ebenso die übliche Anwendung des Allan-Formalismus.

In Abbildung 4.19 ist im oberen Teil die protokollierte Temperatur der Probenflüssigkeit dargestellt, im unteren Teil sind die Signale der Messkanäle A1 und A2 zu sehen. Man kann zunächst eine sehr gute qualitative Ähnlichkeit der drei Kurven feststellen. Die relative Signalzunahme, die mit einer Temperaturerhöhung einher geht, ist wie erwartet für Messkanal A2 deutlich größer, da der Absorptionskoeffizient von Wasser bei der Wellenlänge des QCL2, wie zuvor erwähnt, größer ist als bei Kanal A1 (QCL1). Eine Temperaturerhöhung sollte in erster Näherung damit auch eine größere Änderung des Absorptionskoeffizienten nach sich ziehen. Dabei wird angenommen, dass die Absorbanz näherungsweise linear von der Temperatur abhängt, ebenso wie das Signal linear von der Absorbanz.

Betrachtet man die Korrelation zwischen den erfassten Signalen und der zugrundeliegenden Temperatur $\partial S/\partial T$, so gelangt man zu folgenden Werten:

$$\begin{aligned} \text{MesskanalA1} \quad \frac{\partial S}{\partial T} &= 4,04 \pm 0,01 \text{ mV/K} \quad (R^2 = 0,935) \\ \text{MesskanalA2} \quad \frac{\partial S}{\partial T} &= 5,13 \pm 0,02 \text{ mV/K} \quad (R^2 = 0,912). \end{aligned} \quad (4.3)$$

Dies bedeutet relativ gesehen eine Signaländerung von 0,72 % für den Messkanal A1 bzw. 1,95 % für Messkanal A2 pro Grad Kelvin Temperaturänderung. Die guten Werte für das Bestimmtheitsmaß scheinen die linearen Näherungen zu rechtfertigen. Bei einer Glucosesensitivität des Kanals A1 von etwa 30 $\mu\text{V}/\text{mg}/\text{dL}$ für den verwendeten Sensor würde also eine Temperaturänderung von 1 K einen Fehler in der Glucosevorhersage von 135 mg/dL zur Folge haben.

Nach der vollständigen Referenzierung aller vier erfassten Messkanäle kann der Vergleich in Form der NEC für die Originaldaten des Messkanals A1 und der referenzierten Daten Abbildung 4.20 entnommen werden. Es kann festgestellt werden, dass eine deutliche Reduktion der NEC erreicht werden konnte. Für eine Integrationszeit von 100 s konnte der Wert um den Faktor 22,5 von 225 mg/dL auf 10 mV gesenkt werden, bei 1000 s gar um den Faktor 183 von 5317 mV auf 29 mV. Doch auch mit der deutlichen Reduktion des Einflusses von Temperaturschwankungen muss festgehalten werden, dass diese bei einer *in-vivo*-Anwendung ein ernsthaftes Problem bilden, welches durch geeignete Gegenmaßnahmen kompensiert werden muss. Ansonsten wären große Fehler in der Glucosevorhersage unvermeidlich.

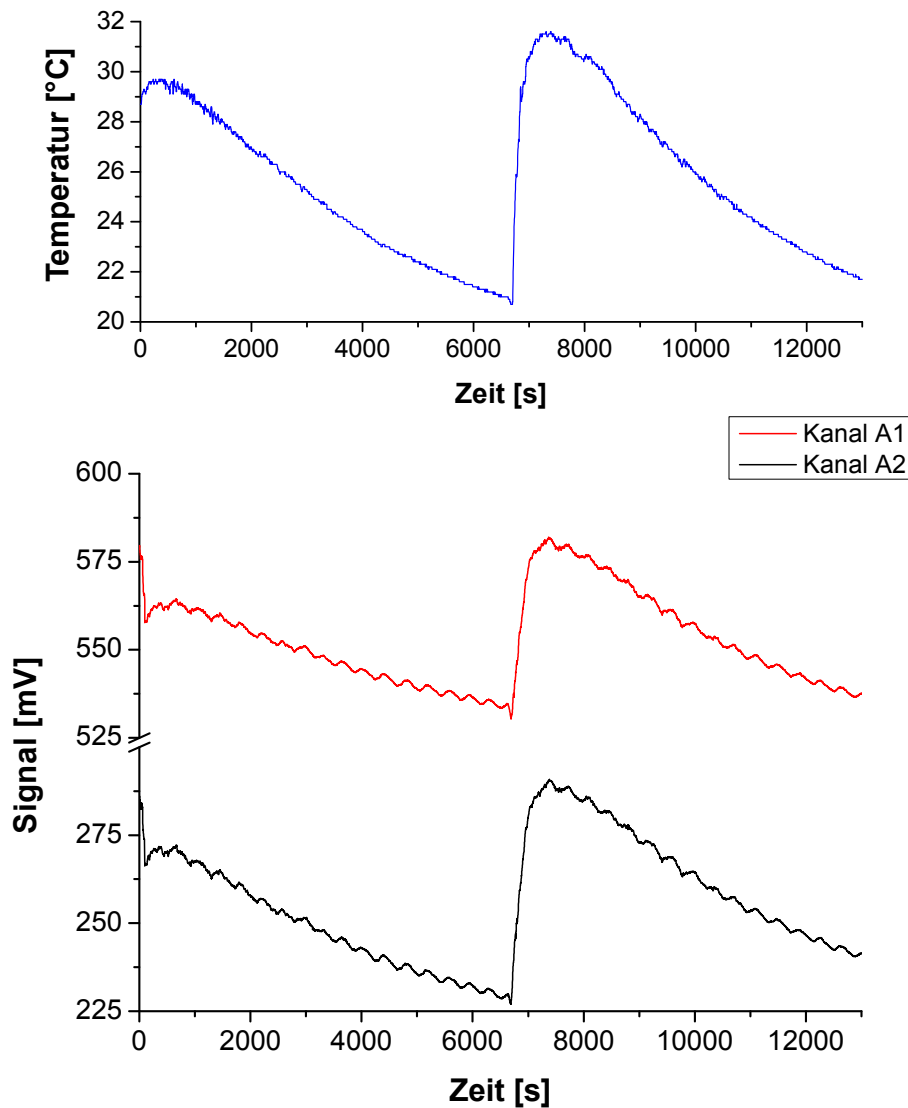


Abbildung 4.19.: Temperaturverlauf über einen Zeitraum von 13 000 s (217 min) als Funktion der Zeit (*oben*) und auf der gleichen Zeitskala der Signalverlauf der Messkanäle A1 und A2 (*unten*).

4.6. In-vivo-Erprobung

Unter Laborbedingungen konnten sich die optischen Fasersensoren als sehr präzises Instrument zur Vorhersage der Glucosekonzentration beweisen. Da in den weiteren Entwicklungsstufen sowohl die Biotoxizität der Silberhalogenidfasern durch Polymerbeschichtungen behoben als auch die Langzeitstabilität durch die Hinzunahme einer

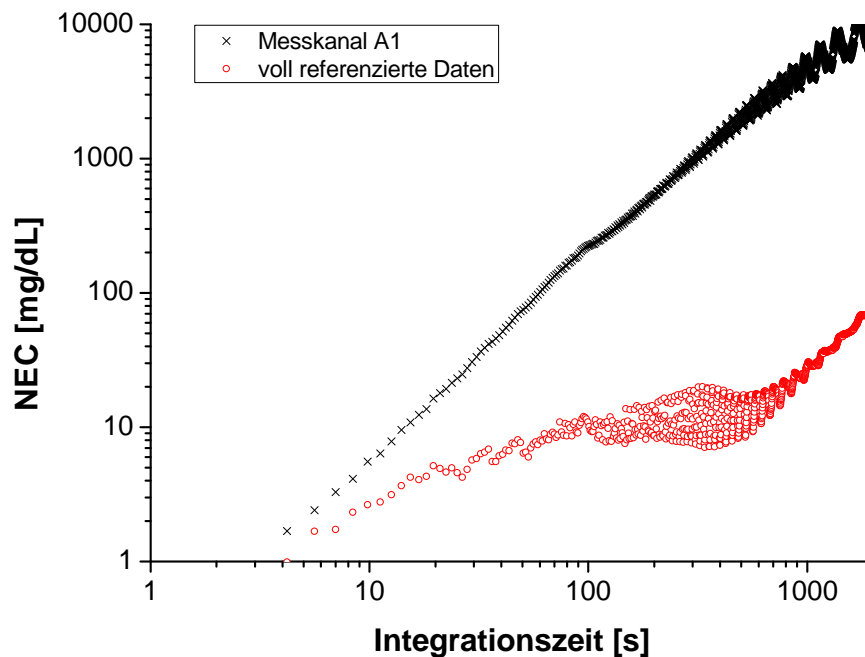


Abbildung 4.20.: Rauschäquivalente Vorhersagegenauigkeit (NEC) für die Untersuchung des Einflusses von Temperaturschwankungen als Funktion der Integrationszeit. Dargestellt sind die Originalmessdaten des Kanals A1 und die voll referenzierten Daten.

zweiten Strahlungsquelle zur Referenzierung verbessert werden konnten, stand als nächster Schritt die Erprobung der Sensoren in einer *in-vivo*-Versuchsreihe an.

Der optische Aufbau war identisch mit dem in Abschnitt 4.5.1 vorgestellten Referenzaufbau. Die QCLs wurden bei den bisherigen Standardeinstellungen (Auslastungsgrad QCL1 1,5 %, QCL2 10 %) betrieben. Als pyroelektrische Detektoren kamen die Modelle LME-353 und LTI Q2 zum Einsatz. Da deren Position zeitweise getauscht wurde, sollen zur späteren Unterscheidung die typischen Messsignale wässriger Lösungen dienen, die bei Detektor LME-353 bei mehreren 100 mV lagen, beim Modell LTI Q2 dagegen eher im Bereich von 5–10 mV. Bei den Lock-in-Einstellungen wurde durchgehend eine Steigung von 24 dB verwendet, was 4 Filterstufen entspricht. Die Kanäle ausgehend vom pyroelektrischen Detektor B wiesen dabei eine Zeitkonstante von 30 ms auf, während die Kanäle ausgehend von Detektor A mit einer Zeitkonstanten von 100 ms ausgewertet wurden.

Die Gesamtlänge der optischen Sensoren betrug etwa 45 cm bei einer Länge der Titanhalter von 8 cm. Es wurden außerdem sowohl beschichtete als auch unbeschich-

tete Sensoren implantiert, wobei Implantationsstellen auf Höhe der Schulterblätter und am Ansatz des Schwanzes verwendet wurden. Das Setzen der Sensoren wurde mittels eines Trochar Katheters (Argyle 16Fr x 25cm, Covidien plc, Dublin, Irland) mit einem Außendurchmesser von 3,5 mm durchgeführt, mit dessen Hilfe subkutan ein Hohlrohr platziert wurde, durch das der Sensor an die gewünschte Stelle geführt werden konnte und welches anschließend entfernt wurde. Zur Überwachung der Temperatur wurde ausserdem ein Temperaturfühler (s. Abschnitt 4.5.2) mit in den Stichkanal eingeführt, um die tatsächliche Temperatur der ISF am Ort der Messung möglichst genau zu protokollieren. Der Aufbau des Messsystems ist Abbildung 4.21 zu entnehmen.

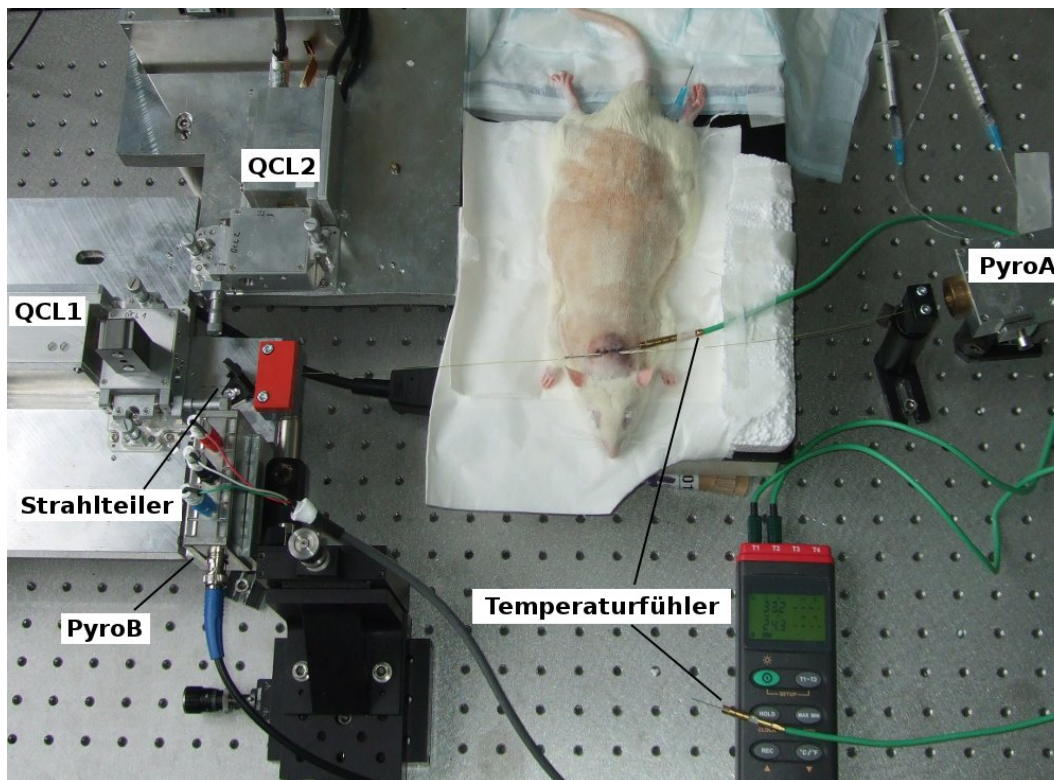


Abbildung 4.21.: Fotografische Aufnahme des *in-vivo*-Messaufbaus mit einem subkutan implantierten Fasersensor.

Bei den Versuchstieren handelte es sich um männliche Sprague-Dawley Ratten. Die Narkotisierung erfolgte durch einen intraperitonealen (i. p.) Zugang in den Bauchraum unter Verabreichung von Ketaminhydrochlorid (Ketamin 10%, Intervet, Unterschleißheim). Das Volumen und die Frequenz richteten sich nach dem jeweiligen Verhalten und Körpergewicht des Tieres.

Die Manipulation der Glucosekonzentration erfolgte über die intravenöse Injektion von 0,5 mL 50%iger Glucoselösung (G-50, B. Braun Melsungen AG, Melsungen) bzw. per Insulininjektion (1 iE [internationale Einheiten] pro 0,5 mL auf Basis von

Humalog Pen, Lilly Deutschland GmbH, Bad Homburg, mit 100 Einheiten/mL), welche einer 0,9%igen Natriumchloridlösung (DeltaSelect GmbH, Dreieich) beigefügt wurde. Die Zeitpunkte der Zugabe dieser Lösungen orientierte sich an der jeweiligen Blutglucosekonzentration des Tieres.

Punktuelle Referenzmessungen der Blutglucosekonzentration wurden mit einem handelsüblichen, handgehaltenen Glucosemeter (Accu-Chek Compact Plus, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) durchgeführt. Das Blut wurde in den Vorstudien durch einen venösen Katheterzugang gewonnen, später dann direkt aus dem Schwanz des Tieres extrahiert, um die Zugabe des Koagulationshemmers Heparin an das Tier zu begrenzen. Heparin wurde anfangs benötigt, um das Verstopfen des Katheters zu vermeiden, konnte im Gegenzug aber auch die Blutgerinnung zum Schließen der Schäden an den verletzten Gefäßen behindern und somit einen ständigen Nachfluss von Blut in den Stichkanal zur Folge haben. Alle Katheterzugänge erfolgten über die *Vena femoralis* und wurden jeweils vor Beginn der Messungen am Studientag operativ gelegt.

Alle *in-vivo*-Versuchsreihen wurden am Zentrum für Medizinische Forschung des Universitätsklinikums Mannheim durchgeführt und wurden von der zuständigen Ethikkommission unter dem Aktenzeichen 35-9185.81/G-66/09 genehmigt.

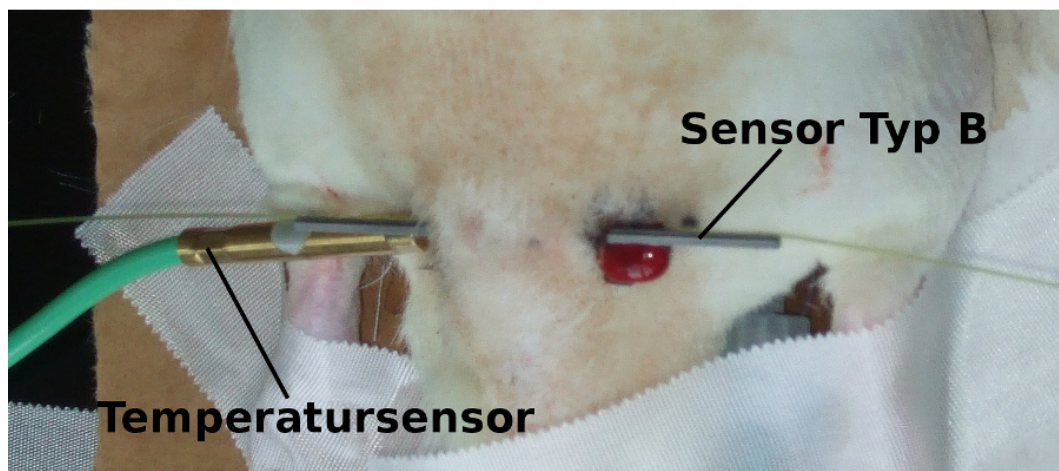


Abbildung 4.22.: Blutentwicklung im Stichkanal des Fasersensors während einer *in-vivo*-Messreihe. Zu sehen ist ein Sensor des Typs B sowie ein Temperatursensor, die beide in das subkutane Fettgewebe gesetzt wurden.

Initiale Experimente wurden zur Bestimmung geeigneter *in-vivo*-Konditionen (Applikationsort, Heparinisierung, Narkotisierung, Referenzierung, etc.) durchgeführt. Eine subkutane Implantation der Sensoren in der unteren Rückenpartie nahe des Schwanzansatzes führte bspw. zu einer starken Blutentwicklung im Stichkanal. Die Verletzungen wurden dabei beim Stechen des Kanals für den Sensor zugefügt und

waren teilweise so intensiv, dass es zum Austritt einer blutigen Flüssigkeit aus dem Stichkanal kam, wie es beispielhaft in Abbildung 4.22 zu sehen ist. Aus den erhobenen Messdaten konnte in diesem Fall keine Korrelation mit der Blutglucosekonzentration hergestellt werden und es ist davon auszugehen, dass der Sensor durch die Kontamination mit dem blutigen Gemisch funktionsuntüchtig wurde.

Weiterhin kam es gelegentlich zu Problemen bei der Anästhesie, bei der die Ketamingabe nicht ordnungsgemäß in den Bauchraum appliziert wurde, sondern sich vielmehr subkutan ansammelte und so zu einer verzögerten und verringerten Wirkung führte. Die Fehlapplikation erschwerte die verlässliche Narkotisierung sehr stark. Die Probleme mündeten z. B. in einer frühzeitigen Terminierung oder Bewegungen des Tieres, die Schäden am Sensor hervorriefen. Letztlich fanden zwei Messreihen unter Nutzung von unbeschichteten Sensoren statt, auf die im Folgenden näher eingegangen werden soll.

Die Abbildungen 4.23 und 4.24 zeigen eine Gegenüberstellung des Messsignals von Kanal A1 mit den dazugehörigen Referenzglucosekonzentrationen von der Messreihe #1 bzw #2. Man kann in beiden Fällen eine sehr gute qualitative Übereinstimmung der Messkurven, nach einem anfänglichen Abfall über etwa 1 Stunde, feststellen. Alle der insgesamt vier induzierten Glucosehübe finden sich mit einer kurzen Verzögerung im jeweiligen Messkanal wieder. Selbst ein zwischenzeitliches Plateau während eines Hubs, wie es in Messreihe #1 bei etwa 150 min zu sehen ist, kann in den Messdaten erkannt werden, was auf eine sehr gute Zeitaufösung der Messung schließen lässt. Der Zeitraum der Datenerfassung in den beiden Reihen betrug 240 bzw. 330 min.

Um den Zeitversatz zwischen der Erhebung der Referenzmesswerte und der zeitlich nachfolgenden Einstellung der Glucosekonzentration in der ISF quantifizieren zu können, wurde bei der Bestimmung der Korrelation beider Kurven jeweils eine Verschiebung der Zeitachse als freier Parameter belassen. Ein optimaler Pearsonscher Korrelationskoeffizient R konnte bei folgenden Zeitversätzen Δt gefunden werden:

$$\begin{aligned} \text{Messreihe \#1} \quad \Delta t_1 &= 0 \text{ s} \quad (R = -0,7973) \\ \text{Messreihe \#2} \quad \Delta t_2 &= 153 \text{ s} \quad (R = -0,7047). \end{aligned} \quad (4.4)$$

Entsprechend dieser Werte wurden die Referenzkonzentrationen für die weitergehenden Analysen auf der Ordinate verschoben.

Im nächsten Schritt wurde eine Kalibration der Sensoren anhand der Rohdaten des Kanals A1 durchgeführt. Dazu wurde zu jedem erfassten Wert der Referenzglucosekonzentration der zeitlich unmittelbar folgende Messwert in Beziehung gesetzt, ohne jegliche zusätzliche Mittelung über das Messsignal. Aufgrund des großen Signalabfalls zu Beginn der Studie wurde die erste Stunde der Messung jeweils ausgenommen. Die grafische Darstellung der Kalibration für Messreihe #2 kann Abbildung 4.25 entnommen werden.

Zusammengefasst konnten bei den Kalibrationen beider Messreihen die folgenden Ergebnisse für die Glucosesensitivität $\partial U/\partial c$ und den y-Achsenabschnitt U_0 der An-

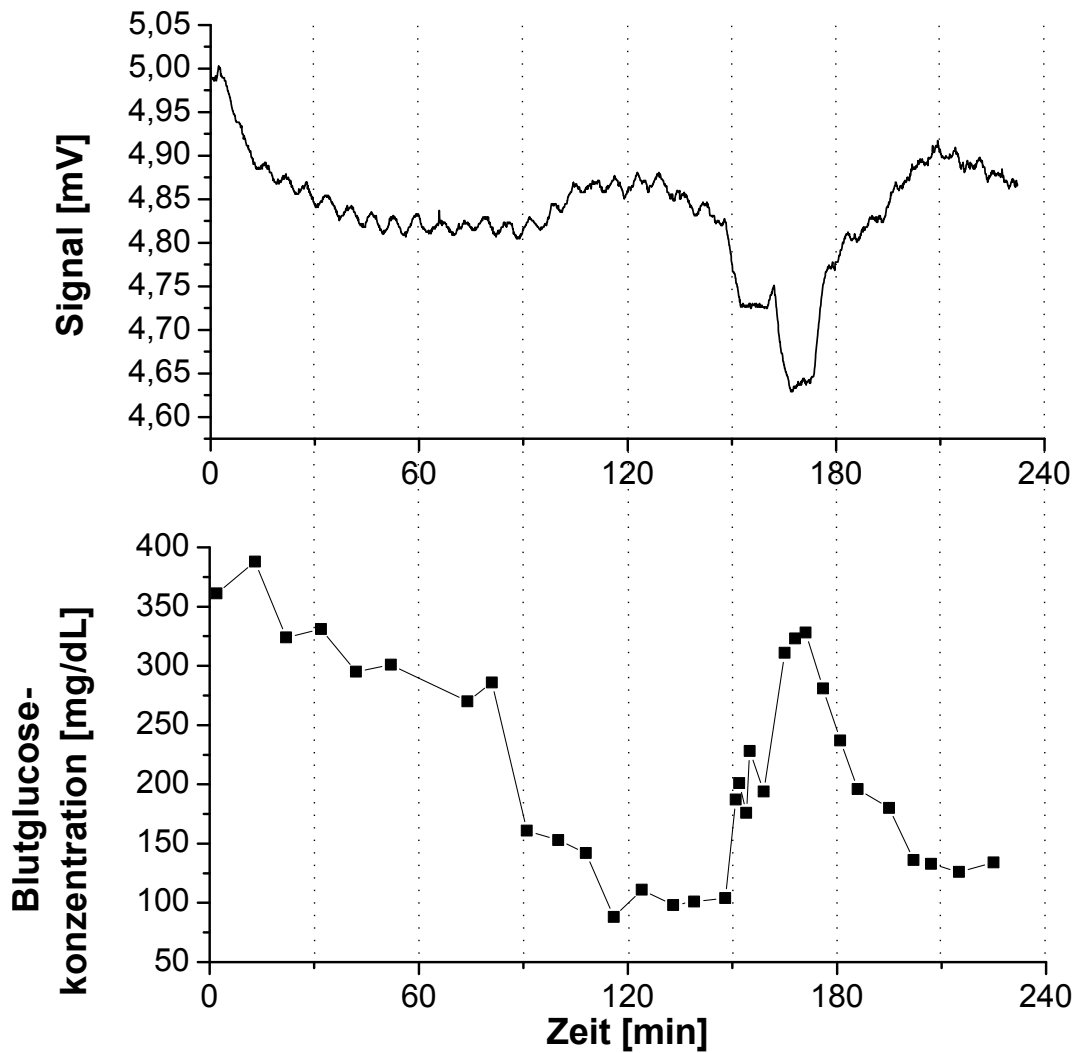


Abbildung 4.23.: Gegenüberstellung der gemessenen Referenzglucosekonzentrationen und des Messsignals von Kanal A1 als Funktion der Zeit für Messreihe #1.

passungsgeraden erzielt werden:

$$\begin{aligned}
 \text{Messreihe \#1} \quad \partial U / \partial c &= -859,6 \text{ nV/mg/dL}, \quad U_0 = 4,932 \text{ mV} \\
 \text{Messreihe \#2} \quad \partial U / \partial c &= -483,2 \text{ nV/mg/dL}, \quad U_0 = 10,311 \text{ mV}. \quad (4.5)
 \end{aligned}$$

Auffallend sind hier die hohen Glucosesensitivitäten verglichen mit Sensoren des Typs A (377 nV/mg/dL, s. Abschnitt 4.2), vor allem, da die obigen Werte durch die Verwendung des Strahlteilers bei halbiertem optischer Ausgangsleistung realisiert wurden.

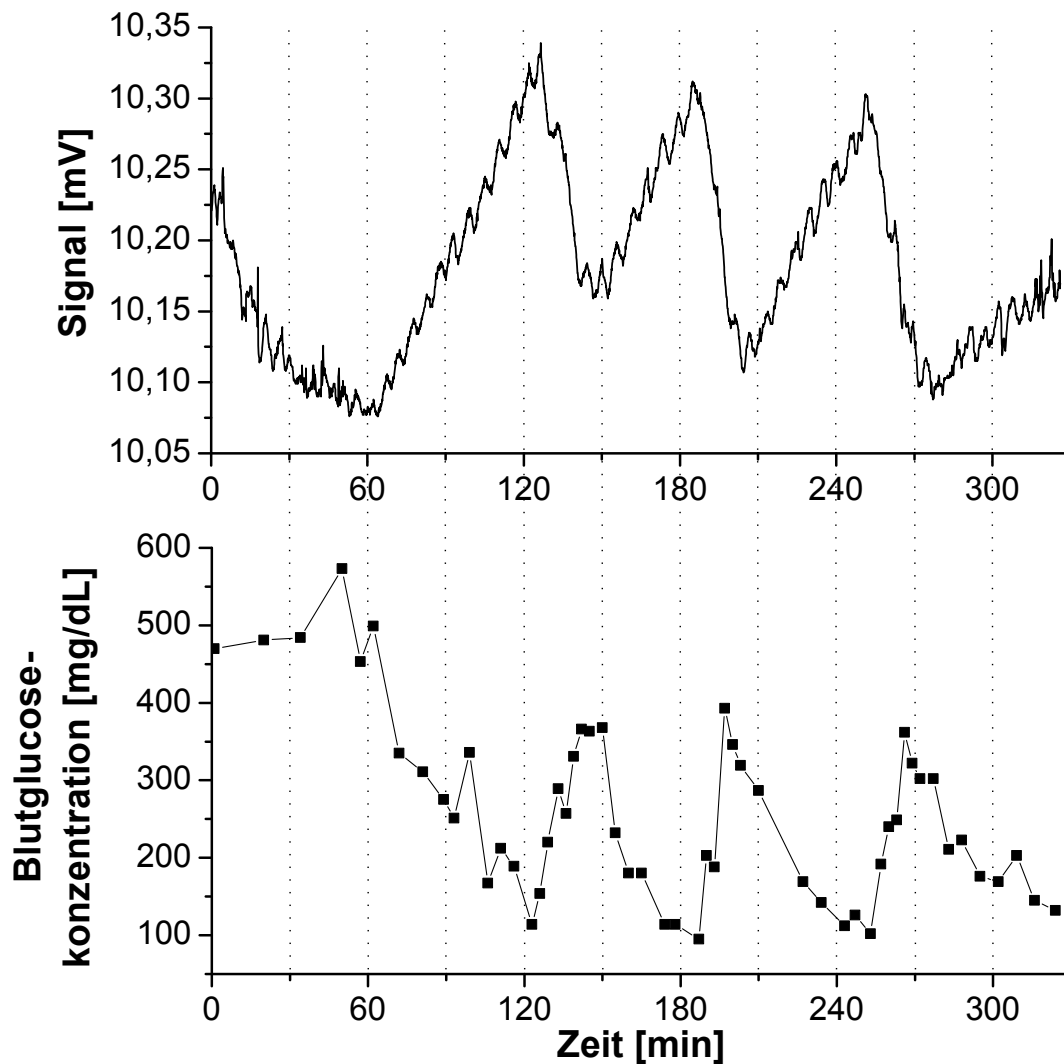


Abbildung 4.24.: Gegenüberstellung der gemessenen Referenzglucosekonzentrationen und des Messsignals von Kanal A1 als Funktion der Zeit für Messreihe #2.

Abschließend wurden die Messsignale zu den korrigierten Zeiten der Blutentnahme in Resubstitutions-Validierung¹ mittels der aufgestellten Kalibrierung in Glucosekonzentrationen übersetzt. Das Ergebnis findet sich in der anschaulichen Form einer Clarke-Error-Grid-Analyse [137] in Abbildung 4.26.

In dieser Darstellung werden die Vergleiche zwischen Referenz- und „vorhergesagten“ Werten in humanmedizinisch relevante Bereiche unterteilt, wobei es sich bei den

¹Auch wenn diese Art der Auswertung zu einem unterschätzten Fehler führen kann, wurde sie aufgrund des relativ kleinen Datensatzes fortgeschritteneren Methoden vorgezogen.

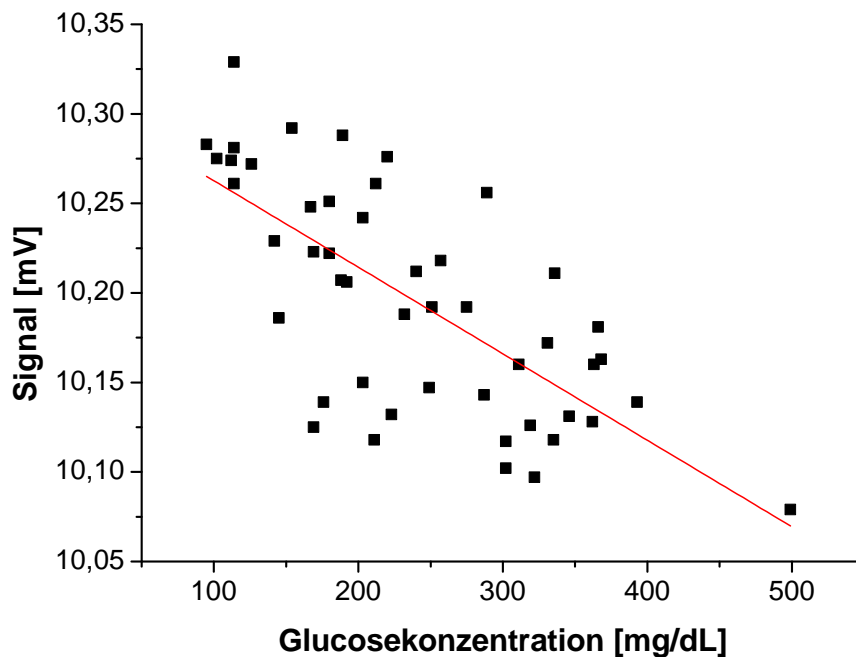


Abbildung 4.25.: Kalibration der Rohdaten des Messkanals A1 aus der Messreihe #2 mit den dazugehörigen Referenzglucosekonzentrationen ($R = -0,7047$). Die Anpassungsgerade besitzt eine Steigung von $-483,2 \mu\text{V}/\text{mg}/\text{dL}$ sowie einem angepassten y-Achsenabschnitt von $10,311 \text{ mV}$.

Bereichen A und B um die therapeutisch wünschenswerten handelt. Zu beachten ist, dass die Definitionen nur bis zu Glucosekonzentrationen von $400 \text{ mg}/\text{dL}$ aufgestellt sind. Daher wurde zur Vermeidung von Überschneidungen teilweise auf eine lineare Fortsetzung der Grenzen verzichtet. Eine Übersicht der Verteilungen der Clarke-Error-Grid-Analyse für vorhergesagte und Referenzwerte unter $400 \text{ mg}/\text{dL}$ sind in Tabelle 4.4 zusammengefasst.

Aus den oben aufgeführten Vergleichen von Werten aus dem jeweiligen Messkanal A1 mit den Referenzkonzentrationen ergaben sich Varitationskoeffizienten $VK_1 = 33 \%$ und $VK_2 = 48 \%$ für die Messreihen #1 und #2.

In der bisherigen Auswertung wurde einzig der Messkanal A1 zur Glucosevorsage genutzt. Im Folgenden soll nun abgeschätzt werden, ob sich die Referenzierung mittels QCL2 auch unter *in-vivo*-Bedingungen mit stark schwankenden Glucosekonzentrationen eignen würde. Dazu wurde für die Messreihe #2 die Korrelation der

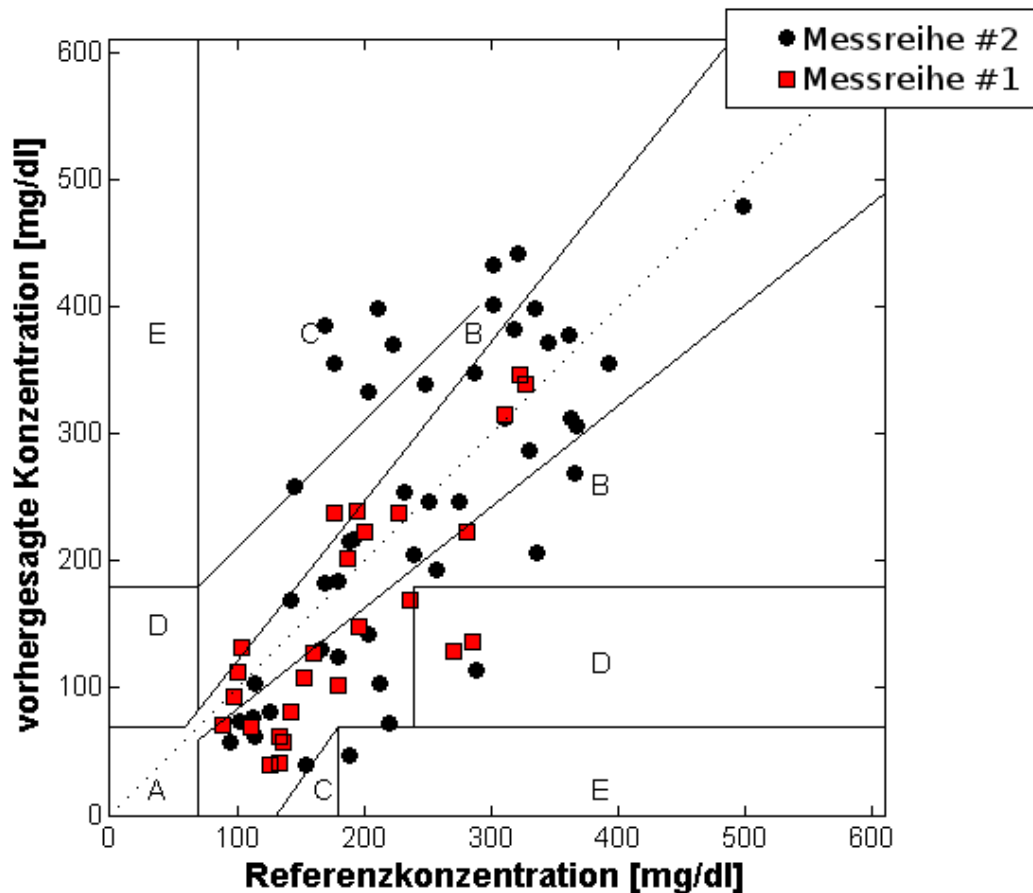


Abbildung 4.26.: Clarke-Error-Grid-Diagramm [137] der gemessenen Referenzwerte der Blutglucosekonzentrationen und den aus einzelnen Messwerten vorhergesagten Glucosekonzentrationen in Resubstitutionsvalidierung für beide untersuchte Messreihen.

gemessenen Temperatur im Stichkanal mit dem Messsignal von Kanal A2 nach einer Einlaufzeit von 60 min untersucht. Die Gegenüberstellung dieser beiden Größen über den Messzeitraum ist in Abbildung 4.27 zu sehen. Der Vergleich für Messreihe #1 zeigte keine gute qualitative Übereinstimmung, was auf eine fehlerhafte Positionierung des Temperatursensors hindeuten könnte.

Mit einem Pearsonschen Korrelationskoeffizienten von $R = 0,979$ kann hierbei ein sehr guter Zusammenhang der beiden Messgrößen festgestellt werden, ohne bedeutende Beeinflussung durch parallel induzierte Glucosehübe, die über die physiologischen Schwankungen hinausgehen, die bei Diabetes-Patienten zu erwarten sind. Nähert man den funktionalen Zusammenhang zwischen Temperatur und Messsignal wiederum linear an, so ergibt sich eine Änderung des Signals von 3,3 % pro Kelvin.

Tabelle 4.4.: Übersicht der Verteilung der Vergleiche zwischen vorhergesagten und Referenzwerten der Glucosekonzentration (jeweils unter 400 mg/dL) nach Clarke-Error-Grid-Analyse bei einer Gesamtzahl N der Referenzwerte von 26 bzw. 43 für zwei ausgewertete Messreihen.

	Messreihe	
	#1	#2
A	69 %	42 %
B	23 %	40 %
C	0 %	14 %
D	8 %	2 %
E	0 %	2 %

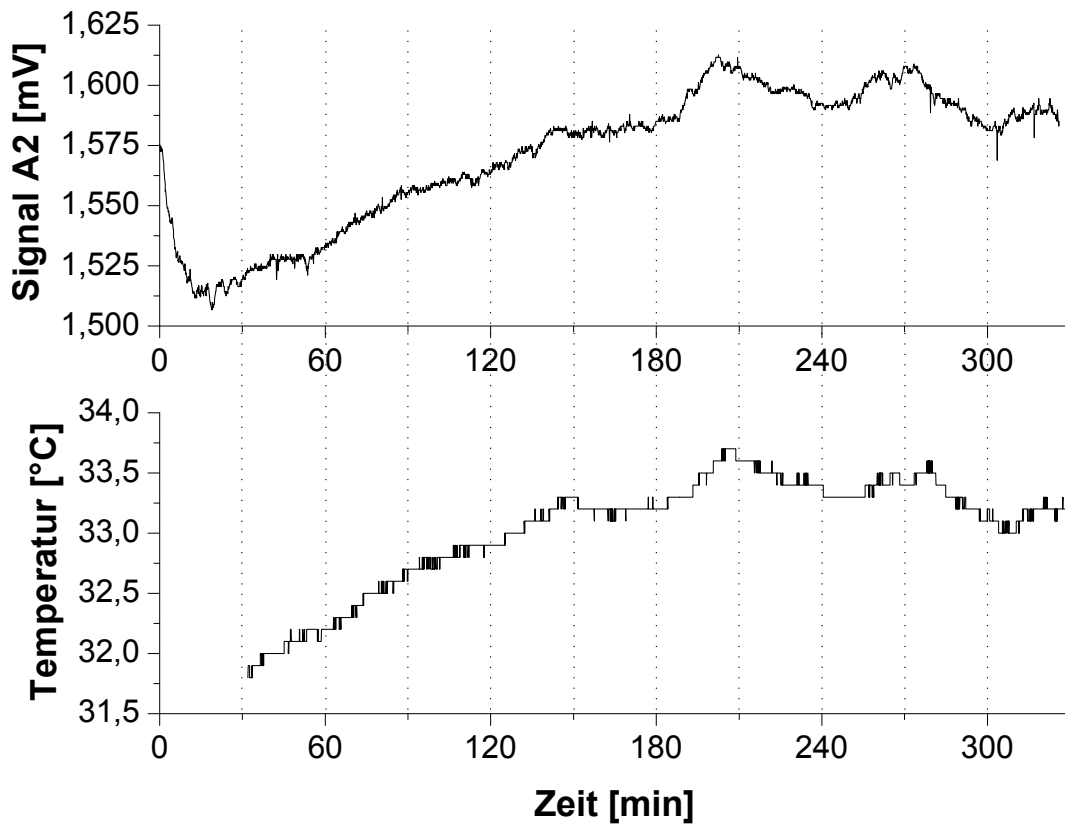


Abbildung 4.27.: Gegenüberstellung des Messsignals von Kanal A2 (*oben*) und der Temperatur im Stichkanal (*unten*) für Messreihe #2.

In Abbildung 4.28 ist die mikroskopische Aufnahme eines histologischen Präparats aus der Region der Sensorimplantation in der subkutanen Rückenpartie nahe des Schwanzansatzes zu sehen, welches direkt nach der Entfernung eines Sensors der ersten Messreihenserie zur späteren Analyse in Formalin konserviert wurde.

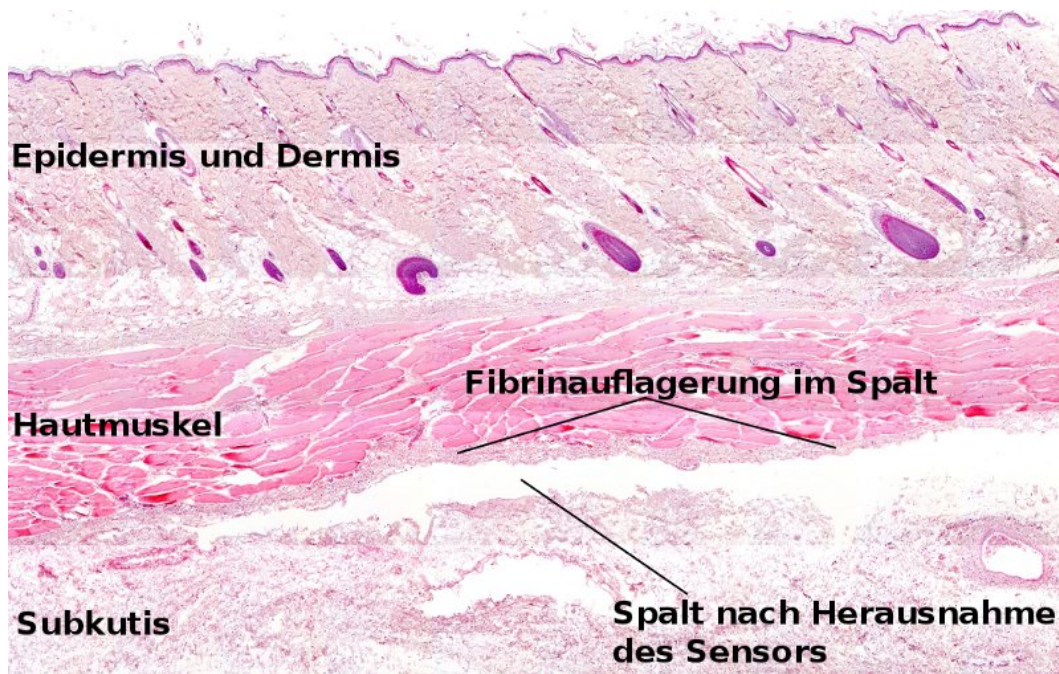


Abbildung 4.28.: Histologisches Präparat der Haut (Epidermis/Dermis), des Hautmuskels und der Unterhaut (Subkutis) im Rückenbereich einer Ratte, welcher für 5 Stunden ein Fasersensor im subkutanen Raum implantierte worden war.

Der entfernte Sensor hat im subkutanen Bindegewebe dicht unter dem Hautmuskel einen Spalt hinterlassen, dessen Saum teilweise von einer dünnen Fibrinschicht bedeckt ist. In dem Fibrin sind einzelne neutrophile Granulozyten und lamelläres Fremdmaterial zu erkennen. In der Nähe des Spalts, der durch den Sensor entstand, liegt ein venöses Gefäß, in dessen Lumen und in dessen Nähe viele Entzündungszellen auszumachen sind. Eine Auswanderung aus dem Gefäß in das umliegende Gewebe hat begonnen. Weiterhin sind einzelne Muskelzellen mit Anzeichen einer akuten Degeneration zu erkennen. Dies kann mit den mechanischen Einflüssen bei der Implantation des Sensors zusammenhängen. In der unmittelbaren Umgebung des ehemaligen Aufenthaltsorts des Sensors ist eine größere Blutung wahrzunehmen sowie mehrere arterielle und venöse Gefäße, in denen eine Leukozytostase vorliegt, was ein vermehrtes Auftreten von Entzündungszellen im Gefäß mit Anheftung an das Gefäßendothel bedeutet. Der Vorgang dient zur Vorbereitung der Migration in das umliegende Gewebe, um Aufgaben der zellulären Abwehr wahrzunehmen. Außerdem

sind viele Entzündungszellen im subkutanen Bindegewebe vorhanden.

5. Diskussion

Die vorliegende Dissertation untersuchte das Potenzial der fasergebundenen Mittelinfrarotspektroskopie zur kontinuierlichen, reagensfreien Bestimmung von Glucose. Die Entwicklung der dazugehörigen faseroptischen Sensoren hatte das Ziel der Applizierbarkeit *in vivo* durch die subkutane Implantation zur Überwachung der Glucosekonzentration in der ISF. Dem experimentellen Teil wurden dabei quantenchemische Simulationen vorangestellt, die den Einfluss des Solvationsprozesses in Wasser auf die Schwingungsspektren von Glucose untersuchen sollten. Anschließend wurden Sensoren konzipiert und entwickelt, deren Leistungsfähigkeit zunächst unter Laborbedingungen geprüft wurde. Begleitend zu den Studien wurden die Sensoren sukzessive dahingehend weiterentwickelt, um den Anforderungen einer *in-vivo*-Anwendung zu genügen. Dies beinhaltete u. a. ein ausreichendes Signal-zu-Rausch-Verhältnis, die Untersuchung auf chemische Interferenzen, das Verhalten unter Temperaturschwankungen sowie die Beiseitigung der Zytotoxizität der verwendeten Materialien zur Vermeidung von ungewünschten Immunreaktionen. Zum Abschluss der Studien konnten die Fasersensoren schließlich in ersten *in-vivo*-Messreihen erprobt und ihre Funktionstüchtigkeit auch unter solchen Bedingungen bewiesen werden.

In den quantenchemischen Molekülsimulationen wurde die Verwendung von effektiven Fragmentpotenzialen zur Beschreibung des Solvationsprozesses von Glucose untersucht. Das geschah mit der Zielstellung einer möglichst guten Vergleichbarkeit der berechneten IR-Spektren mit experimentellen Ergebnissen. Dabei konnte zunächst festgestellt werden, dass keine Konvergenz der Spektren innerhalb einer Konformergruppe durch eine Erhöhung der Anzahl der umgebenden expliziten Wassermoleküle erreicht werden konnte. Beim Vergleich mit dem Experiment zeigte sich, dass die Korrelation mit zunehmender Anzahl an Wassermolekülen ebenfalls nicht zunahm, weder unter Einschluss eines kontinuierlichen Solvationsmodells noch ohne ein solches. Erst die Steigerung der Anzahl an Iterationen, also der Zahl der Spektren, die für den Mittelungsprozess herangezogen wurden, brachte eine deutliche Zunahme der Korrelation mit dem Experiment, wobei auch hier die theoretischen Spektren untereinander nur schwach korrelierten. Dabei wurde mit 18 Wassermolekülen die Minimalzahl an Molekülen gewählt, ab der sich die Anzahl der ausgebildeten Wasserstoffbrücken zwischen Glucose und Hydrathülle in Sättigung befand. Außerdem wurden schließlich insgesamt 80 Einzelspektren für den Mittelungsprozess herangezogen, um zu einem Korrelationskoeffizienten von 0,941 zwischen Simulation und Experiment zu gelangen. Es handelte sich hierbei um den erstmaligen direkten Vergleich von quantenchemischen Berechnungen hydratisierter Glucosemoleküle mit experimentellen Daten unter Verwendung von effektiven Fragmentpotenzialen [54].

Die dargestellten Ergebnisse legen also nahe, dass eine größere Anzahl an Wiederholungen des Optimierungsprozesses mit unabhängigen Startbedingungen einer simplen Erhöhung der Anzahl an umgebenden Wassermolekülen vorzuziehen ist. Die Aussage geht einher mit der Feststellung einer sehr großen spektralen Varianz innerhalb von Glucose-Wasser-Konfigurationsgruppen für unterschiedliche geometrische Startbedingungen. Das ist im Hinblick auf die Übertragbarkeit der gewonnenen Erkenntnisse auf die Natur von Schwingungsspektren durchaus plausibel. Man betrachtet in diesem Fall das gemittelte Spektrum von unzähligen Einzelspektren von sich im Messvolumen befindlichen Molekülen, bei dem keine lokale Hydrathüllenumgebung, und daraus folgend auch keine Molekülgeometrie, der anderen gleicht. Über die Korrelation von Einzelmolekülspektren untereinander kann dabei experimentell keine Aussage getroffen werden, aber es ist durchaus vorstellbar, dass sie kaum miteinander korrelieren und sich erst durch die Mittelung zu dem experimentell erfassbaren Schwingungsspektrum aufaddieren.

Für zukünftige Untersuchungen, die den Einfluss von Solvationsprozessen auf Schwingungsspektren studieren, sowohl unter Einbeziehung weiterer Moleküle als auch unterschiedlicher Lösungsmittel bzw. Matrixmolekülen, gilt es, die vorgestellten Ergebnisse zu validieren. Dazu wäre auch das Heranziehen von weiteren physikalisch interessanten Eigenschaften wie elektronischen Anregungen hilfreich zur Überprüfung der gewonnenen Erkenntnisse. Auch wenn sich die Effekte unter Umständen auf anderen Energieskalen abspielen, lassen sie evtl. Rückschlüsse auf eine Verbesserung der Hydrathüllenmodellierung zu.

Weiterhin wäre es wünschenswert, einen akzeptablen Kompromiss zwischen der Anzahl an Lösungsmittelmolekülen und der daraus ableitbaren Korrelation mit den experimentellen Daten zu untersuchen. Das in dieser Studie verwendete Kriterium einer Sättigung der Anzahl an Wasserstoffbrücken erwies sich zwar als praktikabel, jedoch genügen unter Umständen bereits weniger Lösungsmittelmoleküle, dafür aber mit einer größeren Zahl an Wiederholungen, zur akzeptablen Abbildung der experimentellen Spektren. Außerdem wäre zu quantifizieren, welche Zahl an Einzelspektren abhängig vom untersuchten Molekül nötig ist, um eine hohe Korrelation mit dem Experiment zu erzielen. Schließlich wäre es vorstellbar, dass eine intensivere Vorselektierung und -optimierung im Konfigurationsraum zu besseren Ergebnissen führen könnte, was den Aufwand der Berechnung von Geometrieoptimierungen und IR-Spektren beträchtlich reduzieren könnte.

Die Entwicklung der optischen Sensoren stand vor der Herausforderung einer sehr starken Wasserabsorption im mittleren Infrarot und der sich daraus ergebenden Probleme. Durch die Nutzung eines faserbasierten Ansatzes konnte eine miniaturisierte Messküvette geschaffen werden, die optische Weglängen aufwies, die sich am theoretischen Wert zur Optimierung der Messsensitivität orientierten. Des Weiteren konnte die Küvette den daraus unmittelbar folgenden Anforderungen eines schnellen Flüssigkeitsaustausches per Diffusion genügen. Das Design der Sensoren unterlag einer stetigen Weiterentwicklung im Hinblick auf eine Anwendung in einer *in-vivo*-Umgebung. Diesbezüglich konnte u. a. der „Fertigungsprozess“ bedeutend be-

schleunigt und die Robustheit der Sensoren deutlich erhöht werden. Die bekannte Zytotoxizität des verwendeten Fasermaterials konnte außerdem durch eine für MIR-Transmissionsmessungen geeignete Polymerbeschichtung beseitigt werden, womit die grundlegende Beschränkung des Einsatzes von Silberhalogenidfasern für den Einsatz *in vivo* erstmals erwiesenermaßen aufgehoben werden konnte.

Bei der Untersuchung der Leistungsfähigkeit des vorgestellten Konzepts unter Laborbedingungen wurde der Allan-Formalismus zur Bewertung der Systemstabilität herangezogen. Hier wurde im Allgemeinen für kurze Integrationszeiten τ ersichtlich, dass die Abnahme der NEC einem $1/\sqrt{\tau}$ -Verhalten folgte, was typisch für thermisches Rauschen war: Während das Signal linear mit der Integrationszeit zunimmt, verhält sich der Anstieg des thermischen Rauschens proportional zur Quadratwurzel der Integrationszeit, woraus die beobachtete Abhängigkeit der NEC folgt. Auf der anderen Seite hatten große Integrationszeiten aufgrund von Drifts des Gesamtsystems eine Zunahme der NEC zur Folge.

Speziell für eine Integrationszeit von $\tau = 430$ s konnte mit Fasersensoren des Typs A eine NEC von 2,4 mg/dL erreicht werden, was eine Verbesserung von mehr als einer Größenordnung gegenüber den Werten bedeutete, die in den Vorarbeiten veröffentlicht wurden [53]. Die Einstellung kleinerer Auslastungsgrade verschob das Minimum der NEC zu größeren Werten bei höheren Integrationszeiten. Doch selbst bei einer optischen Ausgangsleistung des QCLs von $70 \mu\text{W}$ lag das Minimum der Vorhersagegenauigkeit noch immer unter den Werten von Lambrecht *et al.* [53]. Die Verbesserung galt selbst für den Vergleich mit Messungen, die den FEFA-Sensor in Zusammenspiel mit kryogen gekühlten Bleisalzlasern (engl. *lead salt lasers*, kurz LSLs) verwendeten und eine NEC von 40 mg/dL berichten konnten (die LSLs operierten im Dauerstrichbetrieb [engl. *continuous-wave*, kurz cw] bei einer Wellenzahl von 1035 cm^{-1}).

Eine Optimierung der Messtechnik, also der Austausch des pyroelektrischen Detektors in Zusammenspiel mit optimierten Einstellungen des Lock-in-Detektors, führten zu einer weiteren erheblichen Verbesserung der NEC. So konnte ein Rekordwert von 0,6 mg/dL bei einer gleichzeitigen Reduktion der optimalen Integrationszeit auf 4 s erzielt werden. Somit konnte gezeigt werden, dass die erforderliche Vorhersagegenauigkeit des Konzepts durch das Rauschen nicht gefährdet erscheint, sondern vielmehr durch Langzeitdrifts des Gesamtsystems limitiert ist.

Für eine zusätzliche Fourierfilterung konnte *in vitro* exemplarisch gezeigt werden, dass periodische Störquellen, wie das zyklische Kühlen des Wasserreservoirs zur Aufnahme der Abwärme des Peltierelements, durch einen herkömmlichen Bandpassfilter deutlich in ihrer Wirkung auf die NEC verringert werden können. Der Einsatz solch einer Filtertechnik wäre z.B. in der nachträglichen Korrektur von bereits erfassten Daten denkbar bzw. je nach Verhältnis von benötigter Integrationszeit und Periode der Störquelle auch in einer Online-Korrektur der aktuell erhobenen Messdaten.

Die Bewertung von möglichen Störsubstanzen legte nahe, dass innerhalb normaler physiologischer Grenzen keine der untersuchten Analyten zu einem großen Fehler in der Glucosevorhersage führen dürfte.

Im Gegensatz zu Glucose besitzen die beiden anderen Monosaccharide, Galactose und der diabetische Zuckerersatz Fructose, eine langsame physiologische Absorption und werden fast ausschließlich metabolisiert bzw. teilweise in der Leber zu Glucosederivaten konvertiert [138]. Obwohl unter sehr speziellen Umständen unüblich hohe Konzentrationen von Maltose [139] oder Fructose [140, 141] Einschränkungen hervorrufen können, scheint der Einfluss der analysierten Zucker im Allgemeinen aufgrund ihrer geringen Konzentration in der ISF klein zu sein.

Über die Bedeutung des absoluten Wertes der mittleren Konzentration von möglichen Störsubstanzen auf das Messsignal hinaus ist es essenziell, die Wichtigkeit der Konzentrationsschwankungen für die Glucosevorhersagegenauigkeit zu betonen. Anstatt einen konstanten Offset des Signals hervorzurufen, verursachen Abweichungen offensichtlich Signaländerungen, die zu falschen Glucosevorhersagen führen könnten. Von Salzionen ist darüber hinaus ein indirekter Effekt auf das IR-Spektrum von Analyten bekannt [142]. Zusammen mit einer experimentell bestimmten hohen Variabilität der Konzentrationen kann der Einfluss der Stoffe für den ungünstigsten Fall abgeschätzt werden, indem die gesamte hervorgerufene Signaländerung von NaCl, die sich auf 32 nV/mg/dL belief, komplett dem Chlorteil zugeschrieben wird (s. Tabelle 4.2). Mit einer Standardabweichung der Chlorkonzentration nach den verwendeten Richtlinien [133] von 9,8 mg/dL würde das eine Signaländerung von 314 nV zur Folge haben. Verglichen mit einer Glucosesensitivität von 377 nV/mg/dL und einer NEC von 4 mg/dL für den in diesen Untersuchungen verwendeten Sensor und den dazugehörigen Detektionseinstellungen ist es offensichtlich, dass die Beeinflussung durch mögliche Interferenzen innerhalb ihrer Referenzwerte als niedrig einzuschätzen ist, auch in Hinblick auf eine mögliche Faserdegradation wie sie für Ammoniak gezeigt werden konnte.

Eine grafische Übersicht der Einschätzung von chemischen Interferenzen in Relation zur Signaländerung, die durch Glucose hervorgerufen wird, ist Abbildung 5.1 zu entnehmen. Da eine gesteigerte Wirkung der Interferenzen nur durch eine Erhöhung der entsprechenden Konzentration in der ISF geschehen kann, sind außerdem Beispiele für außergewöhnlich hohe Analytenkonzentrationen aufgeführt. Diese können physiologisch gesehen durchaus vorkommen, wie beim Konsum von Alkohol oder bei Betrachtung der Lactatkonzentration während ausgiebiger sportlicher Betätigung. Auch die bereits angesprochenen hohen Maltosewerte, die bspw. bei der Einnahme des Medikaments Icodextrin beobachtet werden konnten [143], sind ebenfalls in der Darstellung enthalten.

Durch die Integration einer zweiten MIR-Strahlungsquelle, deren Emissionsspektrum sich in einem Bereich sehr schwacher Glucoseabsorption befand, konnte das Potenzial zur Reduzierung der Einflüsse externer Störquellen untersucht werden. So ermöglichte es die Erweiterung des Messaufbaus, die rauschlimitierte Vorhersagegenauigkeit für große Integrationszeiten unter konstanten Laborbedingungen auf akzeptable Werte zu reduzieren, z. B. auf unter 5 mg/dL für eine Integrationszeit von 3 Stunden, was im Vergleich zur Messgenauigkeit von handgehaltenen Messsystemen einen sehr guten Wert bedeutet.

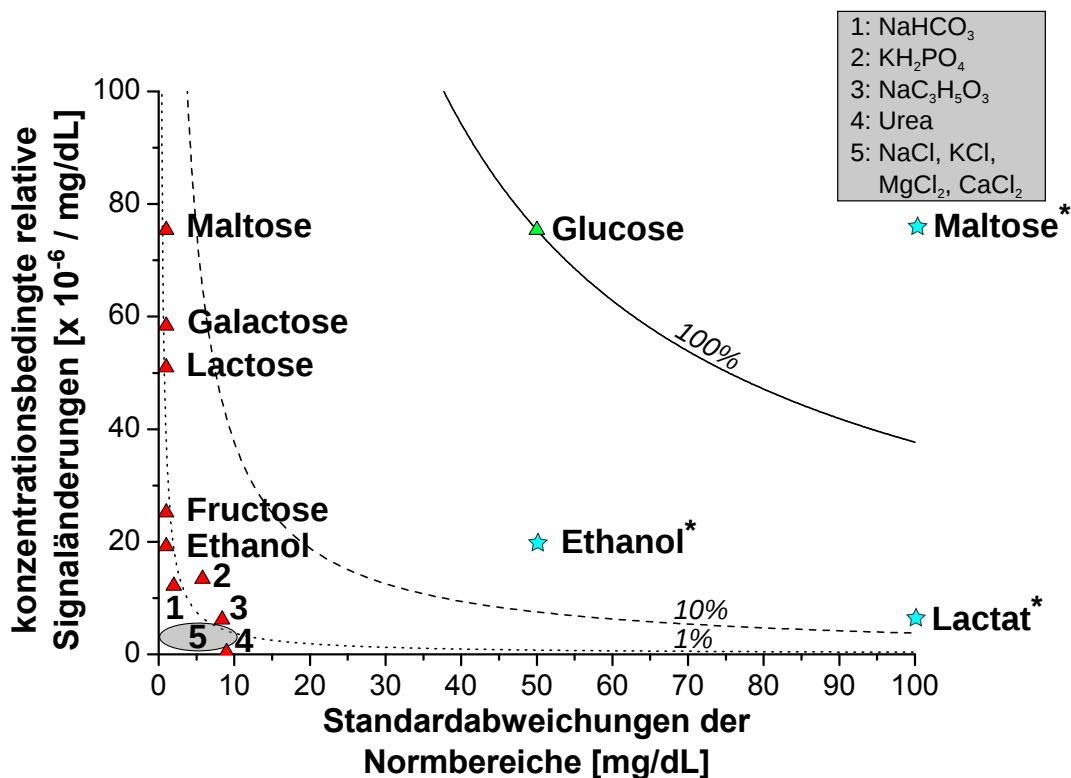


Abbildung 5.1.: Übersicht der durch die untersuchten Interferenzen induzierten konzentrationsbedingten relativen Signaländerungen basierend auf der Sensitivität unter QCL1 als Funktion der Standardabweichungen der physiologischen Normbereiche. Zur Orientierung sind drei weitere Hilfskurven eingezeichnet, die angeben, bei welchen Parametern 100 %, 10 % und 1 % der relativen Signaländerungen durch Glucose erreicht werden.

*) Die zusätzlichen Datenpunkte entsprechen starken Abweichungen von physiologischen Normwerten für Maltose unter Einnahme des Medikaments Icodextrin [143], Lactat unter hoher sportlicher Belastung und Ethanol, bei dem eine Blutalkoholkonzentration von 0,5 ‰ zugrunde gelegt wurde.

Allerdings mussten bei den vorgestellten Ergebnissen Einbußen bezüglich der Vorhersagegenauigkeiten für kurze Zeiten gemacht werden. Das lag jedoch zum einen an der Reduzierung der für die Transmissionsmessung zur Verfügung stehenden Ausgangsleistung durch den eingesetzten Strahlteiler. Zum anderen kann es durch eine Limitation in der Messtechnik erklärt werden, da die zwei zur Verfügung stehenden Lock-in-Verstärker jeweils zwischen zwei Referenzfrequenzen wechseln mussten und die interne Integrationszeit bis zum Erreichen eines stabilen Signals zu einer Reduktion der NEC führte. Eine Verwendung von ebenso vielen Lock-in-Verstärkern wie

Messkanälen sollte den limitierenden Effekt deutlich reduzieren.

Der Einfluss von Temperaturschwankungen erwies sich als ein ernstzunehmendes Problem, das sich darin zeigte, dass eine induzierte Temperaturänderung von 1 K *in vitro* einen Fehler in der nicht weiter referenzierten Glucosevorhersage von 135 mg/dL nach sich zog. Damit würden bereits Temperaturänderungen von 0,1 K ohne Korrekturen zu deutlichen Fehlern in der Vorhersagegenauigkeit führen. Es konnte weiter gezeigt werden, dass der Fehler durch die Verwendung einer Referenzwellenlänge deutlich reduziert werden konnte. Dabei ist allerdings zu beachten, dass der Zusammenhang der Temperaturabhängigkeit der Messsignale abhängig von den verwendeten Wellenlängen und Kavitätsbreiten ist und es damit einer Kalibration der optischen Sensoren bedarf, um diese Abhängigkeit vor der *in-vivo*-Anwendung zu quantifizieren. Eine weitere Möglichkeit zur Korrektur des Temperatureinflusses stellt die Verwendung von Temperatursensoren wie Mantelthermoelementen dar, die in biokompatibler Drahtform mit Durchmessern von weniger als 200 μm verfügbar sind. Die gute Korrelation zwischen Messsignal und Temperatur der Messlösung ließe dann eine Korrektur über deren sensorspezifische Beziehung zu, die ebenfalls in einem Kalibrationsprozess bestimmt werden müsste.

Um die hervorgerufenen Signaländerungen mit der Temperatur nachvollziehen zu können, soll im Folgenden ein vereinfachtes System mit zwei Zuständen betrachtet werden, welches einzig für die starke Glucoseabsorption bei 1036 cm^{-1} verantwortlich gemacht werden soll.¹ Eine Erhöhung der Temperatur von $30\text{ }^\circ\text{C}$ um 1 K würde die Besetzung im Grundzustand unter Veränderung der Maxwell-Boltzmann-Verteilung um etwa 1,6 % reduzieren. Das wiederum entspräche einer Abnahme der für die Absorption zur Verfügung stehenden Moleküle, deren entsprechende Schwingung angeregt werden kann. So ist ein Absinken der effektiven Konzentration und damit der Absorbanz bei fester Weglänge im Lambert-Beerschen-Gesetz die Folge. Ein aus der Literatur abgeleiteter Wert für den Absorptionskoeffizienten von Glucose von $0,782\text{ cm}^{-1}$ bei einer Konzentration c_{Glu} von 100 mg/dL [144] würde somit zusammen mit einem entsprechenden Wert für Wasser von 604 cm^{-1} [120] bei einer optischen Weglänge von $50\text{ }\mu\text{m}$ eine relative Signaländerung von insgesamt 5,07 % pro Kelvin hervorrufen. Dabei entfielen der Großteil der Änderung (99,86 %) auf die Reduktion der Wasserabsorbanz in qualitativer Übereinstimmung mit Beobachtungen in der Literatur [144]. Hierbei ist allerdings anzumerken, dass dieses einfache Modell wichtige weitere temperaturabhängige Effekte, wie bspw. der Änderung der internen, von der Anzahl und Geometrie der ausgebildeten Wasserstoffbrücken abhängigen Struktur des Wassers [145, 146], ebenso außer Acht lässt wie den Einfluss der Temperaturvariation auf die Transmissionseigenschaften der Silberhalogenidfasern. Die Auswirkungen einer Reduktion der Dichte von Wasser kann ausgeschlossen werden, da diese sich in einem Temperaturbereich von $4\text{--}40\text{ }^\circ\text{C}$ um weniger als 1 %

¹Eine der substanziellen Einschränkungen in diesem einfachen Modell ist natürlich, dass eine Absorption aus dem ersten angeregten Zustand nicht mehr möglich ist. Das wäre nur dann zu erwarten, wenn die Anharmonizität der Schwingung zu einer Verschiebung des zweiten Maximums führen würde, welche deutlich größer als die Emissionsbreite des Lasers wäre. In diesem Sinne kann die Abschätzung als eine Art „worst-case scenario“ angesehen werden.

verringert.

Jensen *et al.* berichten bei einer Temperatursteigerung von 30 °C auf 32 °C von einer Erhöhung der molaren Absorptivität von Wasser von $4,57 \text{ L M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ um 2 ‰ bei einer Wellenzahl von 1040 cm^{-1} [144]. Das würde unter Vernachlässigung des Einflusses der Änderung der Glucoseabsorption bei einer Weglänge von $50 \text{ }\mu\text{m}$ zu einer Signaländerung von 2,9 ‰ pro Kelvin führen, was einen wesentlichen Beitrag zu den experimentell beobachteten Abweichung von 7,2 ‰ pro Kelvin liefern würde. Die Veröffentlichung belegt weiterhin den Vorteil der spektralen Region um 1040 cm^{-1} zur Bestimmung von Glucose in wässriger Lösung, da hier neben den stärksten Vibrationsbanden von Glucose auch ein lokales Minimum der Wasserabsorbanz und eine minimale Temperaturabhängigkeit der Wasserabsorption zu verzeichnen sind. Bei diesem „best-case scenario“ muss jedoch noch die Halbwertsbreite von QCL1 (19 cm^{-1}) in Betracht gezogen werden, was zu einer weiteren Annäherung an die experimentellen Beobachtungen führen sollte.

Auch der Einfluss von Bewegungen auf das Messsignal ist eine nicht zu vernachlässigende Störquelle. Beim Einsatz von relativ kurzen Fasersensoren in den ersten Vorarbeiten zu den *in-vivo*-Studien mit einer Gesamtlänge von 16 cm konnte eine deutliche Signalschwankung hervorgerufen durch die Atembewegungen des Tieres festgestellt werden [18]. Das führte zu Fehlern in der Glucosevorhersagegenauigkeit der verwendeten Sensoren im Bereich von 200–500 mg/dL, was jegliche Interpretation der Messdaten von vornherein unmöglich machte. Die Bewegungen gingen zum einen auf die Atmung des Tieres zurück, bei dem flache Atemzüge gelegentlich von sehr tiefen unterbrochen wurden, und waren zum anderen durch den verlängerungslosen Katheterzugang zur Narkotisierung und der manuellen rektalen Temperaturfassung begründet, die gelegentlich kleine Verschiebungen des Rumpfs hervorriefen. In der Literatur wurde von geringen Verlusten aufgrund einer Änderung des Biegeradius bei Silberhalogenidfasern berichtet [147], was sich experimentell bestätigen ließ durch die Verwendung einer durchgehenden, doppelt-konfektionierten Silberhalogenidfaser, deren Mittelpunkt um mehrere Zentimeter verschoben werden konnte ohne eine deutliche Signaländerung zu verursachen. Deshalb ist davon auszugehen, dass die induzierten Bewegungen bei dem eingesetzten Sensortyp Auswirkungen auf die mechanische Stabilität der Messkavität gehabt haben müssen. Der Effekt ließe sich möglicherweise durch eine noch nicht vollständig ausgeprägte Modendurchmischung beim Passieren der Messkavität erklären, sodass eine mechanische Veränderung der Kavität je nach vorliegender Modenkombination unterschiedliche Auswirkungen auf die Transmission hätte.

Um die Auswirkungen auf die Vorhersagegenauigkeit zu minimieren, wurde die Gesamtlänge der Fasersensoren und die des Titanhalters in den weiteren *in-vivo*-Studien auf eine Länge von etwa 50 cm bzw. 8 cm erhöht, was deutliche Verbesserungen nach sich zog. Während in den Vorstudien mittlere relative Signalausschläge von $\pm 1 \%$ die Folge der Atembewegungen waren, machten diese nach der Verlängerung von Fasersensor und Titanteil nur noch etwa $\pm 0,5 \%$ aus und entsprachen damit bei gesteigerter Glucosesensitivität akzeptablen Änderungen der Glucosekon-

zentration von ± 3 mg/dL.

Beim Einsatz der optimierten Fasersensoren *in vivo* konnte erstmals die Funktionstüchtigkeit des Konzepts der faserbasierten Transmissionsspektroskopie zur subkutanen Bestimmung der Glucosekonzentration über einen Zeitraum von bis zu 5,5 Stunden nachgewiesen werden, wobei die Messzeit physiologisch begrenzt wurde. Mit einem minimalen Variationskoeffizienten in Resubstitutionsvalidierung des ungefilterten Signals aus Messkanal A1 von 33 % war eine medizinisch verlässliche Glucosevorhersage jedoch noch nicht gegeben. Da es sich allerdings um die ersten erfolgreichen Messreihen dieser Art *in vivo* handelte, dürfte sich ein großes Verbesserungspotenzial für die Zukunft bieten. Zu bedenken ist außerdem, dass der Wert ohne jegliche Referenzierung erzielt worden ist, da eine eingehende Kalibration der Sensoren im Vorfeld aus Zeitgründen nicht durchgeführt werden konnte. Eine eindeutige Beziehung zum Temperaturverhalten konnte in Messkanal A1 nicht ausgemacht werden. Das könnte darauf hindeuten, dass dem Signal weitere Effekte überlagert sind, deren Analyse Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein könnte.

Positiv hervorzuheben ist weiterhin die extrem kurze Ansprechzeit des Sensorsignals auf Änderungen der Blutglucosekonzentration, welche die *in-vitro*-Abschätzungen bestätigen konnten. Zu einer optimalen Korrelation führten hierbei Zeitversätze von 0 bzw. 153 s, was das Potenzial einer zeitnahen Datenerhebung mit dem vorgestellten Messprinzip untermauern konnte. Der Unterschied der Werte könnte auf physiologischen Eigenschaften des jeweiligen Tieres zurückzuführen sein sowie auf äußere Parameter wie den Anpressdruck des Sensors auf das subkutane Gewebe.

Die Auswirkungen einer Integration über weitere Messwerte am Beispiel der beiden vorgestellten Messreihen kann in Abbildung 5.2 betrachtet werden. Hierbei wurde die Korrelation der Messsignale mit den Referenzglucosekonzentrationen aufgestellt, indem vor dem Vergleich über vorhergehende Messwerte gemittelt wurde, um anschließend die Abhängigkeit von der Größe des Integrationsintervalls zu analysieren. Zu beachten ist hierbei, dass die Messreihe #2 um einen (zuvor ermittelten) optimalen Zeitversatz von 153 s korrigiert wurde, während bei Messreihe #1 keine Verschiebung vorgenommen wurde.

Für die Messreihe #1 kann eine anfängliche Zunahme der Korrelation mit einem Maximalwert von $|R| = 0,832$ bei einer Integrationszeit von etwa 7 min festgestellt werden. Der Effekt dürfte den relativ langen Phasen mit geringen Schwankungen der Glucosekonzentrationen und damit auch eines relativ konstanten Signals geschuldet sein. Eine größere Integrationszeit mittelte hier u. a. über die vom Kühlungsregelkreis verursachten Schwankungen hinweg und verbesserte so die Beziehung zu den Referenzwerten. Für Zeiten über 12 min kam es dann zu einer Verschlechterung der Korrelation, da hier in Abschnitten mit relativ großen Konzentrations- bzw. Signaländerungen ein Einschluss von Messwerten, die zunehmend von der Referenzkonzentration abwichen, die Folge war.

Bei der Messreihe #2 kann hingegen eine stetige Verschlechterung der Korrelation mit zunehmender Integrationszeit beobachtet werden. Der Grund für das Verhalten

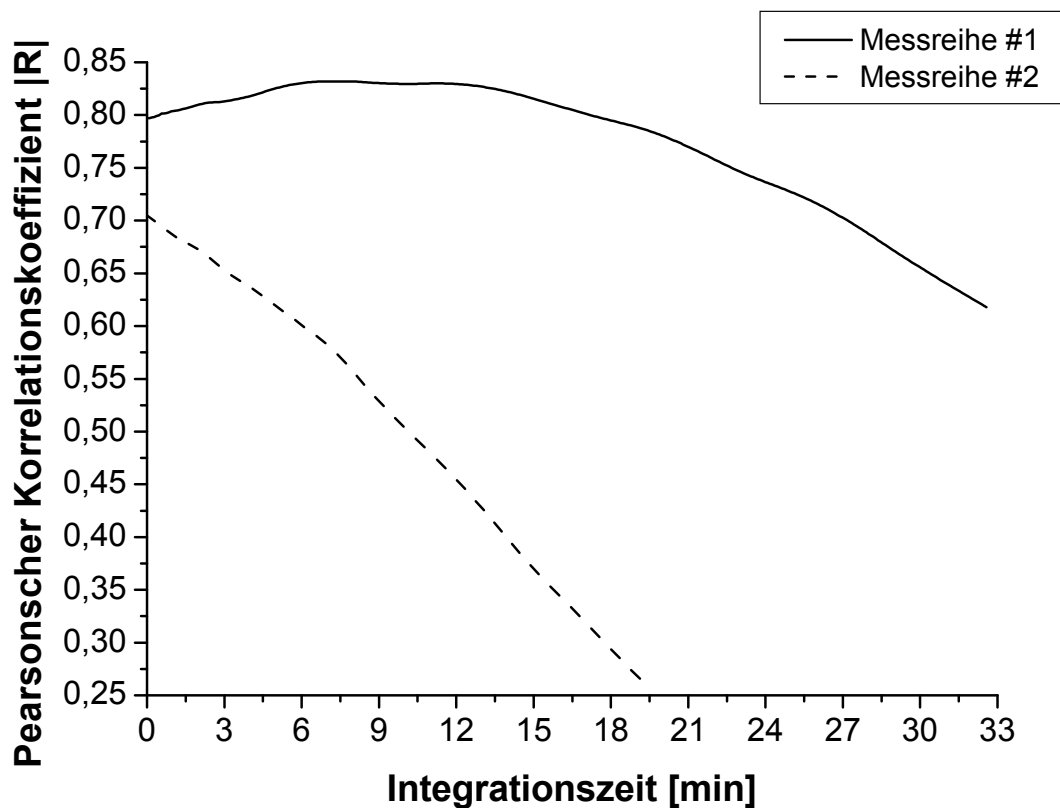


Abbildung 5.2.: Abhängigkeit des Betrags des Pearsonschen Korrelationskoeffizienten von der Integrationszeit zur Mittelung über Messwerte des Kanals A1 im Vergleich mit den Referenzglucosekonzentrationen. Dargestellt sind die Werte für Messreihe #1 (*durchgezogen*) und #2 (*gestrichelt*).

dürfte in den relativ wenigen Zeitabschnitten mit konstanter Glucosekonzentration bzw. konstantem Messsignal liegen. Damit führen bereits kurze Intervalle zu einer Verschlechterung, da selbst durch einen Einschluss von nur wenigen weiteren Werten oft über Bereiche relativ großer Glucosekonzentrationsgradienten integriert wird.

Für eine zukünftige Anwendung des Messprinzips bedeuten die Erkenntnisse, dass es unter Umständen durchaus Sinn machen kann, die Korrelation mit der Glucosekonzentration durch eine Integration über vorhergehende Messwerte zu erhöhen. Allerdings ist darauf zu achten, dass die Mittelung nicht über Bereiche geschieht, die eine hohe Schwankung des Messsignals beinhalten, welche durch große Glucosevariationen hervorgerufen wurden.

Beim Fokus auf eine *in-vivo*-Anwendung muss neben den dargestellten Forschungsergebnissen und ihren Hintergründen auch ein Blick in die Zukunft gerichtet werden und auf die Beeinflussung der vorliegenden Arbeit durch mögliche technologische

Entwicklungen. Dabei soll ein Hauptaugenmerk auf die Miniaturisierungsmöglichkeiten eines portablen Messsystems und vor allem der QCLs als zentrales Element gelegt werden.

Neben des präsentierten, diagnostischen Einsatzes von QCLs zur sensitiven Bestimmung von Analytkonzentrationen findet die Technologie ebenfalls Anwendung in der Rüstungstechnik, was in der Vergangenheit stets einen großen Innovationstreiber bedeutet hat. So ist z. B. ein militärischer Zweck wie die handgehaltene Zielortung ein Grund für Forschungsbestrebungen, QCLs auch für den portablen Einsatz zu entwickeln, welche mit herkömmlichen, tragbaren Batteriequellen auskommen sollen [148]. Viele Anstrengungen in der Forschung streben danach, die Ausgangsleistungen von QCLs immer weiter durch die Optimierung der Effizienz der Energieumsetzung (engl. *wall plug efficiency*, kurz WPE) von Eingangs- zu Ausgangsleistung zu erhöhen [149, 150, 151, 152]. Das kann durch eine verbesserte Dotierung oder Erhöhung der Gratsbreiten (engl. *ridge width*) bzw. Kavitätslängen geschehen. Aus den Mechanismen kann man aber ebenso lernen, wie eine Reduzierung der aufgenommenen Leistung unter Maximierung der Ausgangsleistung realisiert werden könnte.

Bai *et al.* veröffentlichten erst kürzlich Ergebnisse von einer Reduktion der Aufnahmeleistung auf einen Rekordwert der Schwellleistung von 0,83 W [153]. Hierbei konnte durch Beschichtungsverfahren mit dem verwendeten QCL im cw-Betrieb bei einer Emissionswellenlänge von 4,6 μm und einer Aufnahmeleistung von 1 W eine mittlere optische Ausgangsleistung von 30 mW bei Raumtemperatur erreicht werden. Dieser spezielle QCL wies im cw-Betrieb bei einem Strom von etwa 200 mA eine optische Ausgangsleistung von 213 mW auf, was einer WPE von 9,6 % gleichkam. Bei einem gepulstem Betrieb mit einem Auslastungsgrad von 5 % würde das einer mittleren elektrischen Aufnahmeleistung von ungefähr 10 mW entsprechen. Mittels Lithium-Ionen-Akkumulatoren, die eine Nennspannung von etwa 3,5 V aufweisen [154] und in aktuellen Generationen von Smartphones mit Akkukapazitäten von 1 500–2 000 mAh Verwendung finden, könnte man somit bei einem Einsatz von drei solcher Akkus einen Betrieb des QCLs über 150–200 Stunden sichern. Obwohl davon noch die Versorgung von Kühlung und Detektion abzuziehen wäre, soll das Rechenbeispiel verdeutlichen, dass bereits jetzt Strahlungsquellen in der Forschung verfügbar sind, die bei gleicher Bestromung ein Vielfaches der Ausgangsleistung der in der Studie verwendeten Quellen mit sich bringen und damit einen reduzierten Stromverbrauch bei vergleichbaren Ausgangsleistungen aufweisen, der mit herkömmlichen Akkus sichergestellt werden könnte.

Weiterhin wird von Bestrebungen für QCLs berichtet, bei denen ein Augenmerk auf die Integration von Optiken in einen kompakten Aufbau bei gleichzeitiger Reduzierung der Abwärmeleistung von typischerweise 10–15 W gelegt wurde [155], die momentan noch eine aufwendige und räumlich ausgedehnte Wärmeableitung benötigen. Kommerziell erhältlich sind mittlerweile EC-QCLs in Gehäusen mit einem Volumen von ungefähr 2 cm^3 und einem Gewicht von weniger als 60 g, was für ein langfristiges Tragen seitens der Patienten keine Einschränkung sein dürfte [156].

Auch die Durchstimmbereiche für EC-QCLs vergrößerten sich in den letzten Jahren rasant. Vor kurzem wurde beispielsweise von Hugi *et al.* ein gepulster QCL mit ei-

nem Wellenlängen-Durchstimmbereich von 7,6–11,4 μm und einer durchschnittlichen Ausgangsleistung von 15 mW vorgestellt [157], der eine vorgeschlagene Glucosereferenzierung über einen großen Spektralbereich ermöglichen würde und sicher auch zur gleichzeitigen Detektion mehrerer Analyten geeignet wäre. Neben solchen Anstrengungen wird auch der Ansatz verfolgt, auf einem Wellenleiter mehrere Emissionsquellen aufzubringen [158]. Das würde zum einen den Einsatz in FT-IR-Spektrometern ermöglichen, könnte aber auch für die simultane Analytendetektion genutzt werden, um das Durchstimmen von EC-QCLs zu vermeiden und so die Messungen deutlich zu beschleunigen. Auch für diese Art der Strahlungsquellen wurde erst kürzlich über die Möglichkeiten der Portabilität berichtet [159].

Es ist natürlich zu bedenken, dass auch die weitere Elektronik zur Ansteuerung des QCLs und zur Detektion miniaturisiert und durch die Produktion in einer hohen Stückzahl für den Massenmarkt erschwinglich werden müsste. Beispielhaft sei auf die Entwicklung zu kostengünstigen sowie analogen Varianten von Lock-in-Verstärkern hingewiesen [160, 161, 162]. Pyroelektrische Detektoren sind bereits jetzt relativ erschwinglich und in kleinen Abmessungen kommerziell erhältlich. Weiterhin geht die Entwicklung für MCT-Detektoren (Quecksilber-Cadmium-Tellurid, engl. *mercury cadmium telluride*) dahin, ebenfalls einen Betrieb bei Raumtemperatur zu ermöglichen, was aufgrund einer weitaus höheren Detektivität und zeitlich besseren Auflösung große Vorteile der Detektorfamilie mit sich bringen dürfte.

Die weitere Entwicklung des optischen Sensors sollte auf Basis der gewonnenen Erkenntnisse danach streben, die Langzeitstabilität des Messsystems weiter zu verbessern. Durch die Verfügbarkeit von durchstimmbaren EC-QCLs wäre es sehr interessant zu quantifizieren, wie groß der Nutzen der Einbindung von weiteren Referenzwellenlängen wäre und welche Kompromisse man bezüglich der Frequenz der Messwertausgabe eingehen müsste. Auch bei einer möglichen Kompensation von chemischen Störsubstanzen wie Ethanol, Lactat oder Maltose in außergewöhnlich hohen Konzentrationen könnte die Technologie zu einer Reduzierung der Einflüsse beitragen.

Bei der Quantifizierung des Potenzials der Referenzierung in einer *in-vivo*-Umgebung scheinen sich die Erkenntnisse, die *in vitro* gewonnen werden konnten, zu bestätigen. Mit einem Bestimmtheitsmaß von $R^2 = 0,958$ der Korrelation zwischen dem Messsignal von Kanal A2 und der erfassten Temperatur im Stichkanal ist die Korrelation sogar noch höher als bei den Messungen *in vitro*. Dabei wurde die Komplexität von einer alleinigen Variation der Temperatur deutlich erhöht, ohne einen negativen Effekt auf die sehr gute Korrelation des Referenzkanals mit der Temperatur der Probenflüssigkeit zu nehmen. Das Ergebnis bedeutet vor allem eine Verifikation der Eignung der Referenzwellenlänge von QCL2, dessen detektiertes Signal abgesehen von der temperaturinduzierten Änderung konstant zu sein scheint.

Weiterhin sollte die Entwicklung in Bezug auf mögliche durch Bewegungen hervorgerufenen Beeinträchtigungen darauf abzielen, jene weiter zu reduzieren, da bei einer möglichen Anwendung durch Diabetes-Patienten die Bewegungsamplituden weitaus größer sein können als die bisher beobachteten. Trotzdem muss sichergestellt werden,

dass die Folgen für die Glucosevorhersagegenauigkeit gerade unter den Bedingungen einer subkutanen Anwendung im Menschen auf ein akzeptables Niveau begrenzt werden können. Das könnte durch eine Erhöhung der Steifheit des Sensors geschehen, indem dieser bspw. auf der ganzen Länge durch ein zusätzliches Skelett ähnlich dem Titanhalter gestützt würde, was zu einer stabileren Messkavität führen sollte. Möglicherweise wäre auch eine Weiterentwicklung des Sensorkonzepts dahingehend ratsam, ein direktes Einbringen der Messkavität in die Faser zu realisieren, ohne die Faser dabei durchtrennen zu müssen.

Schließlich gilt es, das vorhandene Verbesserungspotenzial des Beschichtungsverfahrens zu nutzen und durch eine Optimierung der freien Parameter, die Dicke der Schichten zu reduzieren und die Homogenität als auch Reproduzierbarkeit zu erhöhen, ohne dabei die Biokompatibilität zu gefährden. So könnten zum einen die Transmissionsverluste deutlich verringert werden und auch die Fertigung der Sensoren würde sich deutlich einfacher gestalten, da keine störenden PE-Tropfen an den Endfacetten der Fasern zurückblieben.

Bei der Bewertung der histologischen Schnitte ist ein Urteil nach einer Verweildauer im Gewebe von 5 Stunden schwierig. Eine verlässliche Beurteilung der Zytotoxizität wird erst nach einigen Tagen Verweildauer des Implantats im Gewebe getroffen werden können. Eine große Gewebekapsel um das Implantat sowie persistierende entzündliche Prozesse mit Nekrosen in der unmittelbaren Umgebung sprächen dann für ein nicht biokompatibles Material [163].

Jedoch muss bei einer zukünftigen Implantation des Sensors, gerade in Zusammenspiel mit Narkose- und Glucosegabe, eine Blutung in der Nähe der Messkavität vermieden werden. Obwohl geeignete Gegenmaßnahmen in den Studien zu einer deutlichen Reduktion der Blutentwicklung führten, konnten auch in diesem Fall nach Entnahme des Sensors blutige Rückstände auf den Sensoren ausgemacht werden (s. Abb. 5.3), die aber durchaus auch erst durch die Sensorentnahme verursacht worden sein könnten.

Eine weitergehende Vermeidung der Blutentwicklung könnte auf Seiten der Sensorfertigung durch die Reduzierung des Durchmessers und damit der zugefügten Verletzungen realisiert werden. Ebenso wäre die Weiterentwicklung eines retroreflektierenden Modells möglicherweise von Vorteil, da man sich auf eine Einstichstelle beschränken könnte. Auch wäre in weiteren *in-vivo*-Studien ein vollständiger Verzicht auf Blutgerinnungsmittel wünschenswert, damit etwaig zugefügte Verletzungen sich möglichst schnell verschließen können. In der Implantationstechnik könnte die Entstehung von Verletzungen abgefangen werden, indem dem Tier bereits im Vorhinein ein Hohlröhrchen als Platzhalter implantiert werden könnte, durch welches dann zum Zeitpunkt des Messbeginns der Sensor nur noch geschoben werden müsste, in der Hoffnung, dass alle Verletzungen der Blutgefäße in der Zwischenzeit verheilt wären.

Abschließend sei noch auf die Universalität des verwendeten Ansatzes und auf die Übertragbarkeit der Messmethode auf weitere Analyten hingewiesen. Einzig durch

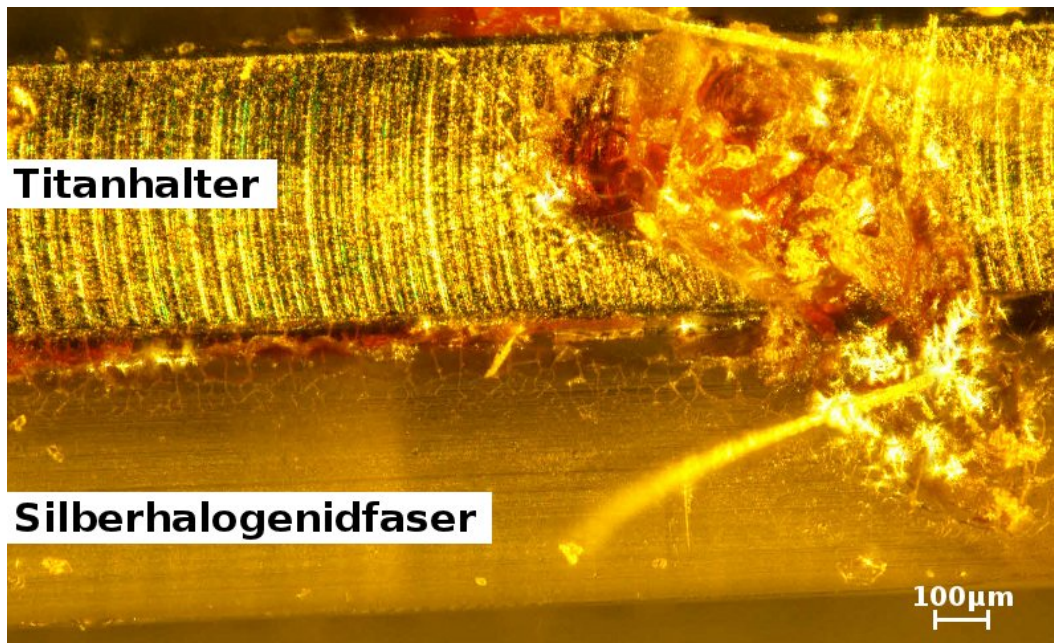


Abbildung 5.3.: Mikroskopische Aufnahme eines Fasersensors nach einer transkutanen Implantation. Zu sehen sind Blutgemischreste, die auf der Sensoroberfläche eingetrocknet sind.

das Austauschen der Strahlungsquelle(n) könnten eine Vielzahl von biochemisch relevanter Moleküle unter Nutzung des restlichen Aufbaus ohne weitere Änderungen auf eine kontinuierliche Weise überwacht werden. Vorstellbar wäre hier bspw. die Kontrolle der Lactatkonzentration unter körperlicher Belastung, um so ein deutlich besseres Profil der sportlichen Leistungsfähigkeit von Spitzenathleten zu erhalten. Vor allem hier könnte der Patient durch die Verfügbarkeit von breitbandig durchstimmbaren QCLs profitieren, da dann die Konzentrationen vieler Analyten simultan erfasst werden könnten.

Weiterhin wäre ein Einsatz der Sensoren in Bioreaktoren zur Überwachung chemischer Prozesse aus denselben Gründen vorstellbar, die auch als Motivation für eine Verwendung in der *in-vivo*-Diagnostik dienen. Da es sich bei den Prozessen nicht um wässrige Lösungen handeln muss, wäre eine Anpassung der Spaltbreite der Sensoren je nach verwendetem Lösungsmittel von Nöten wie sie in Abschnitt 3.3.1 theoretisch behandelt wurde. Ansonsten stünde neben einer Variation der Emissionswellenlänge einer kontinuierlichen Online-Prozesskontrolle ohne den Einsatz von Chemikalien und dem Zwang zu Probeentnahmen unter Nutzung des guten Signal-zu-Rausch-Verhältnisses der IR-Transmissionsspektroskopie nichts im Wege.

A. Anhang

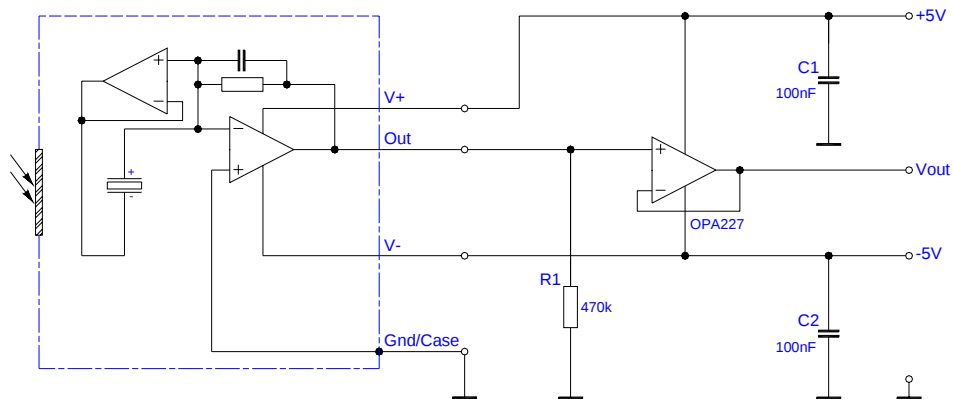


Abbildung A.1.: Elektronische Verstärkerschaltung des verwendeten Detektors LME-353, abgeleitet nach den Herstellerangaben [164].

Abbildungsverzeichnis

1.1.	Schematische Gegenüberstellung von punktueller Kontrolle (<i>rote Dreiecke</i>) mit 3–4 Messdaten pro Tag und kontinuierlicher Überwachung (<i>blaue Kurve</i>) der Glucosekonzentration c_{Glu} (nach [18]).	4
2.1.	Isoliertes α -G- (<i>links</i>) bzw. β -G+ (<i>rechts</i>) D-Glucopyranosemolekül samt konventioneller Nummerierung der Kohlenstoff-(C) und Sauerstoffatome (O).	8
2.2.	Grafische Übersicht der einzelnen Arbeitsschritte zur Berechnung der Schwingungsspektren.	17
2.3.	Grafische Darstellung einer optimierten Glucosegeometrie zusammen mit 52 EFP1 Wassermolekülen (angefertigt mit der GAMESS Visualisierungssoftware MacMolPlt [101], C: schwarz, O: gold, H: grau) [102].	19
2.4.	Berechnete gemittelte MIR-Spektren von Konfigurationen, die 1 Glucose und N EFP1 Wassermoleküle ($N = 1 \dots 229$) enthielten ohne Einbindung des PCM. Zum Zwecke der besseren Übersichtlichkeit ist jedes Spektrum mit einem Intensitätsoffset von 1 a. u. versehen [102].	20
2.5.	Anzahl der Wasserstoffbrücken nach Abschluss der Geometrieoptimierungen für alle 4 analysierten Glucosekonformere (jeweils 5 Spektren beinhaltend) als Funktion der Anzahl an EFP1 Wassermolekülen [102].	21
2.6.	Berechnete gemittelte MIR-Spektren von Konfigurationen mit 1 Glucose- und 18 EFP1 Wassermolekülen als Funktion der Anzahl M an Einzelspektren im Mittelungsprozess ($M = 8 \dots 80$) ohne Einbindung des PCM. Zum Zwecke der besseren Übersichtlichkeit ist jedes Spektrum mit einem Intensitätsoffset von 0,75 a. u. versehen [102].	22
2.7.	Pearsonscher Korrelationskoeffizient simulierter MIR-Spektren verglichen mit experimentellen Ergebnissen als Funktion der Anzahl umgebender Wassermoleküle. Die Resultate sind jeweils mit und ohne die Einbindung eines zusätzlichen kontinuierlichen Solvationsmodells (PCM) dargestellt [102].	23
2.8.	Gemittelter Pearsonscher Korrelationskoeffizient als Funktion der Anzahl an eingeschlossenen Einzelspektren. Das Inset zeigt den Pearsonschen Korrelationskoeffizient von Untergruppen aller 80 Einzelspektren für eine Mittelung über $M = 4, \dots, 24$ Spektren [102].	24

2.9.	Vergleich zwischen einem experimentell erfassten MIR-Spektrum von wässriger Glucoselösung in einer Durchflussküvette und einem simulierten Spektrum eines Glucosemoleküls umgeben von $N = 18$ EFP1 Wassermolekülen, bestehend aus $M = 80$ Einzelspektren [102].	25
3.1.	Vereinfachtes Energieschema von QCLs bei dem Elektronen in Mini-bändern der Injektorregionen in aktive Regionen transportiert werden. Unter Strahlungsaussendung findet an dieser Stelle die Rekombination von Elektron-Loch-Paaren im Leitungsband statt.	30
3.2.	Blockdiagramm zur Funktionsweise von Lock-in-Verstärkern.	33
3.3.	Schematische Darstellung der Fluidik-Messkammer mit Positionierung des Fasersensors (<i>links</i>) und dazu entsprechende Fotografie des Aufbaus (<i>rechts</i>) (nach [119]).	35
3.4.	Technische Zeichnung der Sensorarretierung zur vereinfachten Sensorcharakterisierung. Fasersensoren des Typs B werden hier mit dem Titanhalter in der Führungsnut festgeklemmt (s. auch Abschnitt 3.3.2). Alle Zahlenwerte sind in Millimeter angegeben.	36
3.5.	Verlauf von Gleichung 3.16 der relativen Intensität nach Durchlaufen einer Strecke mit $\mu_w = 0,0614 \mu\text{m}^{-1}$ und $\mu_2 = 1,3\mu_w = 0,798 \mu\text{m}^{-1}$	37
3.6.	Optimale Weglänge einer Messung zur Bestimmung einer Analytkonzentration in wässriger Lösung in Transmission als Funktion des Verhältnisses der Absorptionskoeffizienten von Wasser μ_w und der Summe der Absorptionskoeffizienten aller gelösten Analyten $\sum \mu_i$ bei einer Wellenzahl von 1030 cm^{-1} [119].	39
3.7.	Differenz der Transmission in Abhängigkeit der Weglänge durch die Kavität für Wasser und wässrige Glucoselösungen, deren Absorptionskoeffizient auf 101,5% des Koeffizienten für Wasser gesetzt wurde. Untersucht wurden rechteckige und elliptische Querschnittsflächen der Kavität (nach [119]).	41
3.8.	Schematische Darstellung des Fasersensors Typ A (<i>oben</i>) und Mikroskopieaufnahme des zusammengesetzten Sensors (<i>unten</i>) (nach [119]).	43
3.9.	Schematische Darstellung (<i>oben</i>) und mikroskopische Aufnahme (<i>unten</i>) des Fasersensors Typ B, der aus zwei Silberhalogenidfasern besteht, die auf einem Titanhalter mittels eines biokompatiblen Klebstoffes positioniert wurden (nach [54]).	44
3.10.	Foto des Dipcoating-Aufbaus bestehend aus elektronischer Steuerung, Motor, regelbarer Heizplatte und einem Faserhalter [18].	47
3.11.	Beispieldaten mit zufälligem Rauschen (<i>schwarze Kurve</i>), zusätzlichem Drift (<i>rote Kurve</i>) und zusätzlicher periodischer Störung (<i>blaue Kurve</i>).	50
3.12.	Auswertung der künstlich erzeugten Beispieldaten aus Abbildung 3.11 mit dem Allan-Formalismus zur Visualisierung des Effekts von Langzeitdrifts und periodischen Störungen auf die Allan-Varianz.	51

4.1. Schematische Darstellung der elektronischen Ansteuerung sowie des Kühlungskreislaufs der QCLs.	54
4.2. Spektrale Intensitätsverteilung von beiden in den Arbeiten eingesetzten QCLs. Der Wellenzahlbereich ist zur Vergleichbarkeit in beiden Fällen auf 60 cm^{-1} begrenzt und die Intensität wurde jeweils auf den Maximalwert normiert.	55
4.3. Ausgangsleistung der verwendeten QCLs als Funktion der angelegten Spannung. Der Auslastungsgrad von QCL1 (<i>s1810a24</i>) betrug hierbei 1,5% und für QCL2 (<i>sb2532up</i>) 2%	56
4.4. QCL1 Emissionsspektren nach Transmission durch die Faser und Messkavität mit verschiedenen Füllungen. Die Spektren wurden aufgezeichnet, indem der Fasersensor in ein FT-IR-Spektrometer eingekoppelt wurde. Der Pfeil zeigt die Wellenzahl des bekannten Maximums der Absorbanz im Glucosespektrum [54].	58
4.5. Lock-in-Signal über die Dauer einer Messreihe mit zehn verschiedenen Glucoselösungen, Wasser und Wasser/Ethanol. Die Beschriftungen der Glucosekonzentrationen können über den jeweiligen Plateaus gefunden werden. Die gestrichelte Linie stellt die polynomiale Anpassungsgerade der Wasserbasislinie dar [54].	59
4.6. Korrelation zwischen den Signaldifferenzen der Glucoseplateaus und Wasserbasislinie als Funktion der zugrundeliegenden Glucosekonzentrationen. Der lineare Fit hat eine Steigung von $(377 \pm 4)\text{ nV}$ mit einem Bestimmtheitsmaß von 0,9991 [54].	60
4.7. Rauschäquivalente Konzentration (NEC) als Funktion der Integrationszeit für verschiedene Auslastungsgrade des QCLs, welche direkt mit den Ausgangsleistungen verknüpft sind. Zum Vergleich sind außerdem die Ergebnisse von Lambrecht <i>et al.</i> abgebildet, bei denen ein faseroptischer evaneszenter Feldsensor verwendet wurde mit einer QCL-Ausgangsleistung von 1 – 2 mW [53].	61
4.8. Spektrum von wässriger Glucoselösung ($c_{\text{Glu}} = 500\text{ mg/dL}$) im mittleren Infrarot zusammen mit dem Emissionsspektrum von QCL1. Die Absorbanz wurde für die Glucosespektren auf 1 skaliert, für die Ausgangsleistung des QCL1 würde der Wert bei 1036 cm^{-1} als Referenz verwendet.	63
4.9. Transmissionsspektrum von wässrigen Zuckerlösungen (Monosaccharide Fructose und Galactose (<i>oben</i>) sowie Disaccharide Lactose und Maltose (<i>unten</i>)) mit einer Konzentration von jeweils 500 mg/dL).	66
4.10. Rauschäquivalente Konzentration (NEC) als Funktion der Integrationszeit für verschiedene Einstellmöglichkeiten (Zeitkonstante t_i , Dämpfung) des Lock-in-Detektors und unter Verwendung von zwei verschiedenen pyroelektrischen Detektoren. Der grüne Punkt markiert den bisherigen Bestwert der <i>in-vitro</i> -Messungen mit einer NEC von 0,6 mg/dL bei einer Integrationszeit von 4 s.	68

4.11. Fourierspektrum der Langzeitmessung aus Abschnitt 4.2, wobei die Amplitude gegenüber der Frequenz aufgetragen ist.	69
4.12. Rauschlimitierte Vorhersagegenauigkeit (NEC) als Funktion der Integrationszeit für Originaldaten und fouriergefilterte Daten.	70
4.13. Experimenteller Aufbau mit zwei Strahlungsquellen (QCL1 und QCL2), zwei pyroelektrischen Detektoren (PyroA und PyroB) und einem 50/50 Strahlteiler, der die Strahlungsgänge nach Durchlaufen der Fokussieroptik teilt. Dies führte insgesamt zu vier Messkanälen, die zur Auswertung zur Verfügung standen.	72
4.14. Signalverlauf der Glucosekalibrationsmessung bei der abwechselnd VE-Wasser, phosphatgepufferte Glucoselösungen und Wasser/Ethanolspüllösungen auf den Fasersensor pipettiert wurden.	73
4.15. Korrelation zwischen der vorhergesagten Glucosekonzentrationen und den Referenzwerten für die unkorrigierten Messdaten und einfach korrigierten Daten.	74
4.16. Übersicht aller vier verwendeten Messkanäle als Funktion der Zeit.	75
4.17. Messsignal der Langzeitmessung zur Bestimmung des Einflusses der Referenzierung als Funktion der Zeit. Dargestellt sind sowohl die ungefilterten Daten des Messkanals A1 als auch die voll referenzierten Daten.	76
4.18. Rauschlimitierte Vorhersagegenauigkeit (NEC) als Funktion der Integrationszeit für die unkorrigierten Originalmessdaten von Kanal A1 und für die voll referenzierten Daten, bei denen alle vier Messkanäle genutzt wurden.	77
4.19. Temperaturverlauf über einen Zeitraum von 13 000 s (217 min) als Funktion der Zeit (<i>oben</i>) und auf der gleichen Zeitskala der Signalverlauf der Messkanäle A1 und A2 (<i>unten</i>).	79
4.20. Rauschäquivalente Vorhersagegenauigkeit (NEC) für die Untersuchung des Einflusses von Temperaturschwankungen als Funktion der Integrationszeit. Dargestellt sind die Originalmessdaten des Kanals A1 und die voll referenzierten Daten.	80
4.21. Fotografische Aufnahme des <i>in-vivo</i> -Messaufbaus mit einem subkutan implantierten Fasersensor.	81
4.22. Blutentwicklung im Stichkanal des Fasersensors während einer <i>in-vivo</i> -Messreihe. Zu sehen ist ein Sensor des Typs B sowie ein Temperatursensor, die beide in das subkutane Fettgewebe gesetzt wurden.	82
4.23. Gegenüberstellung der gemessenen Referenzglucosekonzentrationen und des Messsignals von Kanal A1 als Funktion der Zeit für Messreihe #1.	84
4.24. Gegenüberstellung der gemessenen Referenzglucosekonzentrationen und des Messsignals von Kanal A1 als Funktion der Zeit für Messreihe #2.	85
4.25. Kalibration der Rohdaten des Messkanals A1 aus der Messreihe #2 mit den dazugehörigen Referenzglucosekonzentrationen ($R = -0,7047$). Die Anpassungsgerade besitzt eine Steigung von $-483,2 \mu\text{V}/\text{mg}/\text{dL}$ sowie einem angepassten y-Achsenabschnitt von 10,311 mV.	86

4.26. Clarke-Error-Grid-Diagramm [137] der gemessenen Referenzwerte der Blutglucosekonzentrationen und den aus einzelnen Messwerten vorhergesagten Glucosekonzentrationen in Resubstitutionsvalidierung für beide untersuchte Messreihen.	87
4.27. Gegenüberstellung des Messsignals von Kanal A2 (<i>oben</i>) und der Temperatur im Stichkanal (<i>unten</i>) für Messreihe #2.	88
4.28. Histologisches Präparat der Haut (Epidermis/Dermis), des Hautmuskels und der Unterhaut (Subkutis) im Rückenbereich einer Ratte, welcher für 5 Stunden ein Fasersensor im subkutanen Raum implantierte worden war.	89
5.1. Übersicht der durch die untersuchten Interferenzen induzierten konzentrationsbedingten relativen Signaländerungen basierend auf der Sensitivität unter QCL1 als Funktion der Standardabweichungen der physiologischen Normbereiche. Zur Orientierung sind drei weitere Hilfskurven eingezeichnet, die angeben, bei welchen Parametern 100 %, 10 % und 1 % der relativen Signaländerungen durch Glucose erreicht werden. *) Die zusätzlichen Datenpunkte entsprechen starken Abweichungen von physiologischen Normwerten für Maltose unter Einnahme des Medikaments Icodextrin [143], Lactat unter hoher sportlicher Belastung und Ethanol, bei dem eine Blutalkoholkonzentration von 0,5 ‰ zugrunde gelegt wurde.	95
5.2. Abhängigkeit des Betrags des Pearsonschen Korrelationskoeffizienten von der Integrationszeit zur Mittelung über Messwerte des Kanals A1 im Vergleich mit den Referenzglucosekonzentrationen. Dargestellt sind die Werte für Messreihe #1 (<i>durchgezogen</i>) und #2 (<i>gestrichelt</i>). . .	99
5.3. Mikroskopische Aufnahme eines Fasersensors nach einer transkutanen Implantation. Zu sehen sind Blutgemischreste, die auf der Sensoroberfläche eingetrocknet sind.	103
A.1. Elektronische Verstärkerschaltung des verwendeten Detektors LME-353, abgeleitet nach den Herstellerangaben [164].	105

Tabellenverzeichnis

3.1.	Übersicht von möglichen in der Sensorfertigung verwendbaren Materialien zum Transport der Strahlung im mittleren Infrarot. Kosten und Transmissionseigenschaften werden dreistufig durch (+, 0, -) bewertet.	49
4.1.	Optimale Integrationszeiten und die dazugehörigen minimalen NEC für verschiedene Ausgangsleistungen des QCLs.	62
4.2.	Molekulargewichte, Leitlinienkonzentrationen, Standardabweichungen innerhalb gesunder Patienten und Messbereich für Glucose und mögliche Störsubstanzen [54], wobei die Literaturvorgaben auf Basis der Absorptionseigenschaften im Bereich von 1010 to 1065 cm^{-1} ausgewählt wurden. Die Sensitivität spiegelt die Signaländerung als Funktion der Analytenkonzentration wider. Das Bestimmtheitsmaß R^2 gibt die qualitative Güte des linearen Fits an wie er in Abschnitt 4.2 beschrieben wurde. *) Die Sensitivität für NaHCO_3 , $\text{C}_3\text{H}_5\text{NaO}_3$ und Ethanol wurde skaliert aufgrund der Verwendung eines weiteren Fasersensors des Typs A, basierend auf dessen Glucosesensitivität.	64
4.3.	Optimale Integrationszeiten und die dazugehörigen minimalen NEC für verschiedene Ausgangsleistungen des QCLs.	67
4.4.	Übersicht der Verteilung der Vergleiche zwischen vorhergesagten und Referenzwerten der Glucosekonzentration (jeweils unter 400 mg/dL) nach Clarke-Error-Grid-Analyse bei einer Gesamtzahl N der Referenzwerte von 26 bzw. 43 für zwei ausgewertete Messreihen.	88

Literaturverzeichnis

- [1] WORLD HEALTH ORGANIZATION: *Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications*, 1999. Report of a WHO Consultation, Geneva.
- [2] HIEN, P., B. BÖHM und S. CLAUDI-BÖHM: *Diabetes-Handbuch: Eine Anleitung für Praxis und Klinik*. Springer, 2010.
- [3] KJOS, S. und T. BUCHANAN: *Gestational Diabetes Mellitus*. N. Engl. J. Med., 341:1749–1756, 1999.
- [4] INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION: *IDF Diabetes Atlas, 5th edition*, 2011.
- [5] AMERICAN DIABETES ASSOCIATION: *Executive summary: Standards of medical care in diabetes*. Diabetes Care, 33:Suppl 1: S4–10, 2010.
- [6] BREM, H. und M. TOMIC-CANIC: *Cellular and molecular basis of wound healing in diabetes*. J. Clin. Invest., 117:1219–1222, 2007.
- [7] MORBACH, S., E. MÜLLER, H. REIKE, A. RISSE, G. RÜMENAPF und M. SPRAUL: *Diabetisches Fußsyndrom*, Band 13 der Reihe *Scherbaum WA, Kiess W (Hrsg.): Praxis-Leitlinien der Deutschen Diabetes-Gesellschaft (DDG). Diabetes und Stoffwechsel*. Georg Thieme Verlag KG, 2004.
- [8] ST JOHN, A., W. A. DAVIS, C. P. PRICE und T. M. DAVID: *The value of self-monitoring of blood glucose: a review of recent evidence*. J. Diabetes Complications, 24:129–141, 2010.
- [9] ALLEMANN, S., C. HOURIET, P. DIEM und C. STETTLER: *Self-monitoring of blood glucose in non-insulin treated patients with type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis*. Curr. Med. Res. Opin., 25:2903–2913, Dec 2009.
- [10] BARNETT, A. H., A. J. KRENTZ, K. STROJEK, J. SIERADZKI, F. AZIZI, M. EMBONG, S. IMAMOGLU, J. PERUSICOVÁ, V. ULICIAANSKY und G. WINKLER: *The efficacy of self-monitoring of blood glucose in the management of patients with type 2 diabetes treated with a gliclazide modified release-based regimen. A multicentre, randomized, parallel-group, 6-month evaluation (DINAMIC 1 study)*. Diabetes Obes. Metab., 10:1239–1247, 2008.

- [11] MARTIN, S., B. SCHNEIDER, L. HEINEMANN, V. LODWIG, H.-J. KURTH, H. KOLB und W. SCHERBAUM: *Self-monitoring of blood glucose in type 2 diabetes and long-term outcome: an epidemiological cohort study*. Diabetologia, 49:271–278, 2006.
- [12] MALANDA, U. L., L. M. WELSCHEN, I. I. RIPHAGEN, J. M. DEKKER, G. NIJPELS und S. D. BOT: *Self-monitoring of blood glucose in patients with type 2 diabetes mellitus who are not using insulin*. Cochrane Database Syst. Rev., 1:CD005060, 2012.
- [13] O’KANE, M. J. und J. PICKUP: *Self-monitoring of blood glucose in diabetes: is it worth it?* Ann. Clin. Biochem., 46:273–282, Jul 2009.
- [14] SIMON, J., A. GRAY, P. CLARKE, A. WADE, A. NEIL, A. FARMER, D. FRENCH, R. HOLMAN, A. L. KINMONTH, D. MANT, S. ZIEBLAND, P. YUDKIN, N. STOTT, S. SUTTON, H. TEWSON, D. CHAPMAN, H. HEARNSHAW, E. GOYDER, P. GLASZIOU, M. JIWA, M. GORDON, D. FRENCH, A. L. KINMONTH, M. P. SELWOOD, A. CRAVEN, P. YUDKIN, A. FULLER, V. WALKER, C. BAIGENT, J. LEVY, K. WHEATLEY, H. KIRLOW, M. CHAPMAN, S. TURNER, A. CASBOLT, K. DOBSON, A. WILLERT, A. ROBERTS, H. WOOD und K. ISLAM: *Cost effectiveness of self monitoring of blood glucose in patients with non-insulin treated type 2 diabetes: economic evaluation of data from the DiGEM trial*. BMJ, 336:1177–1180, May 2008.
- [15] HÖNES, J., P. MÜLLER und N. SURRIDGE: *The technology behind glucose meters: Test strips*. Diabetes Technol. Ther., 10:S10–S26, 2008.
- [16] HEINEMANN, L. und D. BOECKER: *Lancing: quo vadis?* J. Diabetes Sci. Technol., 5:966–981, Jul 2011.
- [17] VRANČIĆ, C.: *Analyse biomedizinischer Proben im Nanoliterbereich*. Diplomarbeit, Universität Heidelberg, 2009.
- [18] KRÖGER, N.: *Fasergebundene Mittelinfrarotlaserspektroskopie auf dem Weg von in-vitro-Analytbestimmung zur in-vivo-Sensorik*. Diplomarbeit, Universität Heidelberg, 2011.
- [19] YOO, E.-H. und S.-Y. LEE: *Glucose biosensors: An overview of use in clinical practice*. Sensors, 10:4558–4576, 2010.
- [20] ROBERT, J.-J.: *Continuous monitoring of blood glucose*. Horm. Res., 57(suppl 1):81–84, 2002.
- [21] CLARK, L. C. und C. A. DUGGAN: *Implanted electroenzymatic glucose sensors*. Diabetes Care, 5:174–180, 1982.
- [22] SHICHIRI, M., R. KAWAMORI, Y. YAMASAKI, N. HAKUI und H. ABE: *Wearable artificial endocrine pancreas with needle-type glucose sensor*. Lancet, 2:1129–1131, 1982.

-
- [23] HENRY, C.: *Getting under the skin: implantable glucose sensors*. Anal. Chem., 70:594A–598A, Sep 1998.
- [24] BINDRA, D. S., Y. ZHANG, G. S. WILSON, R. STERNBERG, D. R. THEVENOT, D. MOATTI und G. REACH: *Design and in vitro studies of a needle-type glucose sensor for subcutaneous monitoring*. Anal. Chem., 63:1692–1696, 1991.
- [25] CENGIZ, E. und W. V. TAMBORLANE: *A tale of two compartments: interstitial versus blood glucose monitoring*. Diabetes Technol. Ther., 11 Suppl 1:S11–16, Jun 2009.
- [26] REBRIN, K. und G. M. STEIL: *Can interstitial glucose assessment replace blood glucose measurements?* Diabetes Technol. Ther., 2:461–472, 2000.
- [27] SCHMIDTKE, D. W., A. C. FREELAND, A. HELLER und R. T. BONNECAZE: *Measurement and modeling of the transient difference between blood and subcutaneous glucose concentrations in the rat after injection of insulin*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 95:294–299, Jan 1998.
- [28] COX, M.: *An overview of continuous glucose monitoring systems*. J. Pediatr. Health Care, 23:344–347, 2009.
- [29] MANG, A., J. PILL, N. GRETZ, B. KRÄNZLIN, H. BUCK, M. SCHOEMAKER und W. PETRICH: *Biocompatibility of an electrochemical sensor for continuous glucose monitoring in subcutaneous tissue*. Diabetes Technol. Therap., 7:163–173, 2005.
- [30] MALIK, B. H. und G. L. COTE: *Development of a real-time closed-loop dual wavelength optical polarimeter for glucose monitoring*. In: *Optical Diagnostics and Sensing X: Toward Point-of-Care Diagnostics*, Band 7572, Seite 757202. SPIE, 2010.
- [31] TUCHIN, V. V. (Herausgeber): *Handbook of optical sensing of glucose in biological fluids and tissues*. Taylor & Francis, Inc., Boca Raton, FL, 2008.
- [32] MCNICHOLS, R. J. und G. L. COTE: *Optical glucose sensing in biological fluids: an overview*. J. Biomed. Opt., 5:5–16, Jan 2000.
- [33] PETRICH, W.: *Mid-infrared and Raman spectroscopy for medical diagnostics*. Appl. Spectr. Rev., 36:181–237, 2001.
- [34] DIEM, M., P. R. GRIFFITHS und J. M. CHALMERS (Herausgeber): *Vibrational Spectroscopy for Medical Diagnosis*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, 2008.
- [35] LASCH, P. und J. KNEIPP (Herausgeber): *Biomedical Vibrational Spectroscopy*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, 2008.

- [36] ROHLEDER, D., G. KOCHERSCHIEDT, K. GERBER, W. KIEFER, W. KÖHLER, J. MÖCKS und W. PETRICH: *Comparison of mid-infrared and Raman spectroscopy in the quantitative analysis of serum*. J. Biomed. Opt., 10:031108, 2005.
- [37] MARTIN, W. B., S. MIROV und R. VENUGOPALAN: *Middle infrared, quantum cascade laser optoelectronic absorption system for monitoring glucose in serum*. Appl. Spectrosc., 59:881–884, 2005.
- [38] ROHLEDER, D.: *Quantitative Analyse von Humanserum und Serumultrafiltrat mittels Raman-Spektroskopie*. Dissertation, Universität Würzburg, 2005.
- [39] ROHLEDER, D., W. KIEFER und W. PETRICH: *Quantitative analysis of serum and serum ultrafiltrate by means of Raman spectroscopy*. Analyst, 129:906–911, 2004.
- [40] KÖLHED, M., M. HABERKORN, V. PUSTOGOV, B. MIZAIKOFF, J. FRANK, B. KARLBERG und B. LENDL: *Assessment of quantum cascade lasers as mid infrared light sources for measurement of aqueous samples*. Vib. Spectrosc., 29:283–289, 2002.
- [41] VONACH, R., J. BUSCHMANN, R. FALKOWSKI, R. SCHINDLER, B. LENDL und R. KELLNER: *Application of mid-infrared transmission spectrometry to the direct determination of glucose in whole blood*. Appl. Spectrosc., 52:820–822, 1998.
- [42] MAGARIAN, P. und B. STERLING: *Plasma-generating glucose monitor accuracy demonstrated in an animal model*. J. Diabetes Sci. Technol., 3:1411–1418, 2010.
- [43] HEISE, H. M., A. BITTNER, T. KOSCHINSKY und F. A. GRIES: *Ex-vivo determination of blood glucose by microdialysis in combination with infrared attenuated total reflection spectroscopy*. Fresenius J. Anal. Chem., 359:83–87, 1997.
- [44] PETRICH, W.: *Unsichtbare Spuren im Blut*. Physik Journal, 12:35–40, 2011.
- [45] CHARLTON, C., A. KATZIR und B. MIZAIKOFF: *Infrared evanescent field sensing with quantum cascade lasers and planar silver halide waveguides*. Anal. Chem., 77:4398–4403, 2005.
- [46] BEYER, T., M. BRAUN und A. LAMBRECHT: *Fast gas spectroscopy using pulsed quantum cascade lasers*. J. Appl. Phys., 93:3158–3160, 2003.
- [47] HEISE, H. M., L. KÜPPER und L. N. BUTVINA: *Bio-analytical applications of mid-infrared spectroscopy using silver halide fiber-optic probes*. Spectrochim. Acta, Part B, 57:1649–1663, 2002.

- [48] HVOZDARA, L., N. PENNINGTON, M. KRAFT, M. KARLOWITZ und B. MIZAIKOFF: *Quantum cascade lasers for mid-infrared spectroscopy*. Vib. Spectrosc., 30:53–58, 2002.
- [49] KOSTEREV, A. A., R. F. CURL, F. K. TITTEL, C. GMACHL, F. CAPASSO, D. L. SIVCO, J. N. BAILLARGEON, A. L. HUTCHINSON und A. Y. CHO: *Absorption spectroscopy with quantum cascade lasers*. Laser Phys., 11:39–49, 2001.
- [50] BINDIG, U., M. MEINKE, I. GERSONDE, O. SPECTOR, I. VASSERMAN, A. KATZIR und G. MÜLLER: *IR-biosensor: flat silver halide fiber for bio-medical sensing?* Sens. Actuators, B, 74:37–46, 2001.
- [51] JOHNSON, C. C. und L. T. TAYLOR: *Zero dead volume flow cell for microbore liquid chromatography with Fourier transform infrared spectrometric detection*. Anal. Chem., 56:2642–2647, 1984.
- [52] LENDL, B., J. FRANK, R. SCHINDLER, A. MÜLLER, M. BECK und J. FAIST: *Mid-infrared quantum cascade lasers for flow injection analysis*. Anal. Chem., 72:1645–1648, 2000.
- [53] LAMBRECHT, A., T. BEYER, K. HEBESTREIT, R. MISCHLER und W. PETRICH: *Continuous glucose monitoring by means of fiber-based, mid-infrared laser spectroscopy*. Appl. Spectrosc., 60:729–736, 2006.
- [54] VRANČIĆ, C., A. FOMICHOVA, N. GRETZ, C. HERRMANN, S. NEUDECKER, A. PUCCI und W. PETRICH: *Continuous glucose monitoring by means of mid-infrared transmission laser spectroscopy in vitro*. Analyst, 136:1192–1198, 2011.
- [55] ANGYAL, S. J.: *Zusammensetzung und Konformation von Zuckern in Lösung*. Angew. Chem., 81:172–182, 1969.
- [56] ABRAHAM, R. J., E. J. CHAMBERS und W. A. THOMAS: *Conformational analysis. Part 19: conformational analysis of 6-deoxy-6-fluoro-D-glucose (6DFG) in solution*. Magn. Reson. Chem., 30:S60–S65, 1992.
- [57] NISHIDA, Y., H. OHRUI und H. MEGURO: *¹H-NMR studies of (6R) and (6S) deuterated D-Hexoses: Assignment of the preferred rotamers about C5-C6 bond of D-Glucose D-Galactose and derivatives in solutions*. Tetrahedron Lett., 25:1575–1578, 1984.
- [58] KIRSCHNER, K. N. und R. J. WOODS: *Solvent interactions determine carbohydrate conformation*. Proc. Natl. Acad. Sci., 98:10541–10545, 2001.
- [59] SCHNUPF, U., J. WILLETT und F. MOMANY: *DFTMD studies of glucose and epimers: anomeric ratios, rotamer populations, and hydration energies*. Carbohydr. Res., 345:503–511, 2010.

- [60] SUZUKI, T. und T. SOTA: *Improving ab initio infrared spectra of glucose-water complexes by considering explicit intermolecular hydrogen bonds*. J. Chem. Phys., 119:10133–10137, 2003.
- [61] ONSAGER, L.: *Electric moments of molecules in liquids*. J. Am. Chem. Soc., 58:1486–1493, 1936.
- [62] MIERTUS, S., E. SCROCCO und J. TOMASI: *Electrostatic interaction of a solute with a continuum. A direct utilization of ab initio molecular potentials for the prevision of solvent effects*. Chem. Phys., 55:117–129, 1981.
- [63] TOMASI, J., B. MENNUCCI und R. CAMMI: *Quantum mechanical continuum solvation models*. Chem. Rev., 105:2999–3094, 2005.
- [64] GORDON, M. S., M. A. FREITAG, P. BANDYOPADHYAY, J. H. JENSEN, V. KAIRYS und W. J. STEVENS: *The effective fragment potential method: A QM-based MM approach to modeling environmental effects in chemistry*. J. Phys. Chem. A, 105:293–307, 2001.
- [65] GORDON, M. S., L. SLIPCHENKO, H. LI und J. H. JENSEN: *The effective fragment potential: A general method for predicting intermolecular interactions*. Ann. Rep. Comp. Chem., 3:177–191, 2007.
- [66] BRADY, J. W.: *Molecular dynamics simulations of α -D-glucose in aqueous solution*. J. Am. Chem. Soc., 111:5155–5165, 1989.
- [67] ARAUJO-ANDRADE, C., F. RUIZ, J. MARTÌNEZ-MENDOZA und H. TERRONES: *Infrared and Raman spectra, conformational stability, ab initio calculations of structure, and vibrational assignment of α and β glucose*. J. Mol. Struct. THEOCHEM, 714:143–146, 2005.
- [68] MOMANY, F. A. und J. L. WILLETT: *Computational studies on carbohydrates: in vacuo studies using a revised AMBER force field, AMB99C, designed for α -(1-4) linkages*. Carbohydr. Res., 326:194–209, 2000.
- [69] MOMANY, F. A. und J. L. WILLETT: *Computational studies on carbohydrates: solvation studies on maltose and cyclomaltooligosaccharides (cyclodextrins) using a DFT/ab initio-derived empirical force field, AMB99C*. Carbohydr. Res., 326:210–226, 2000.
- [70] LELONG, G., W. S. HOWELLS, J. W. BRADY, C. TALON, D. L. PRICE und M.-L. SABOUNGI: *Translational and rotational dynamics of monosaccharide solutions*. J. Phys. Chem. B, 113:13079–13085, 2009.
- [71] MOLTENI, C. und M. PARRINELLO: *Glucose in aqueous solution by first principles molecular dynamics*. J. Am. Chem. Soc., 120:2168–2171, 1998.

- [72] QIAN, X., M. R. NIMLOS, M. DAVIS, D. K. JOHNSON und M. E. HIMMEL: *Ab initio molecular dynamics simulations of β -D-glucose and β -D-xylose degradation mechanisms in acidic aqueous solution*. Carbohydr. Res., 340:2319–2327, 2005.
- [73] SUZUKI, T.: *The hydration of glucose: the local configurations in sugar-water hydrogen bonds*. Phys. Chem. Chem. Phys., 10:96–105, 2008.
- [74] SUZUKI, T., H. KAWASHIMA und T. SOTA: *Conformational properties of and a reorientation triggered by sugar-water vibrational resonance in the hydroxymethyl group in hydrated β -Glucopyranose*. J. Phys. Chem. B, 110:2405–2419, 2006.
- [75] MOMANY, F. A. und J. L. WILLETT: *Computational studies on carbohydrates: I. Density functional ab initio geometry optimization on maltose conformations*. J. Comp. Chem., 21:1204–1219, 2000.
- [76] MOMANY, F. A., M. APPELL, J. L. WILLETT und W. B. BOSMA: *B3LYP/6-311++G** geometry-optimization study of pentahydrates of α - and β -D-glucopyranose*. Carbohydr. Res., 340:1638–1655, 2005.
- [77] BAGNO, A., F. RASTRELLI und G. SAIELLI: *Prediction of the ^1H and ^{13}C NMR spectra of α -D-glucose in water by DFT methods and MD simulations*. J. Org. Chem., 72:7373–7381, 2007.
- [78] BRAUER, B., M. PINCU, V. BUCH, I. BAR, J. P. SIMONS und R. B. GERBER: *Vibrational spectra of α -glucose, β -glucose, and sucrose: Anharmonic calculations and experiment*. J. Phys. Chem. A, 115:5859–5872, 2011.
- [79] BOSMA, W. B., U. SCHNUPF, J. WILLETT und F. A. MOMANY: *Density functional study of the infrared spectrum of glucose and glucose monohydrates in the OH stretch region*. J. Mol. Struct. THEOCHEM, 905:59–69, 2009.
- [80] SZABO, A. und N. S. OSTLUND: *Modern Quantum Chemistry: Introduction to Advanced Electronic Structure Theory*. Dover Publications, Juli 1996.
- [81] JENSEN, F.: *Introduction to Computational Chemistry*. Wiley, 2 Auflage, 2006.
- [82] KOOPMANS, T.: *Über die Zuordnung von Wellenfunktionen und Eigenwerten zu den einzelnen Elektronen eines Atoms*. Physica, 1:104–113, 1934.
- [83] HOHENBERG, P. und W. KOHN: *Inhomogeneous Electron Gas*. Phys. Rev., 136:B864, 1964.
- [84] KOHN, W. und L. J. SHAM: *Self consistent equations including exchange and correlation effects*. Phys. Rev., 140:A1133, 1965.
- [85] ADAMOVIC, I., M. A. FREITAG und M. S. GORDON: *Density functional theory based effective fragment potential method*. J. Chem. Phys., 118:6725–6732, 2003.

- [86] SLIPCHENKO, L. V. und M. S. GORDON: *Water-benzene interactions: An effective fragment potential and correlated quantum chemistry study*. J. Phys. Chem. A, 113:2092–2102, 2009.
- [87] SHOLL, D. S. und J. STECKEL: *Density functional theory : a practical introduction*. Wiley, 1 Auflage, 2009.
- [88] BROWN, G. M. und H. A. LEVY: *α -D-glucose: Further refinement based on neutron-diffraction data*. Acta Cryst., B35:656–659, 1979.
- [89] CHU, S. S. C. und G. A. JEFFREY: *The refinement of the crystal structures of β -D-glucose and cellobiose*. Acta Cryst., B24:830–838, 1968.
- [90] MARTINEZ, L., R. ANDRADE, E. G. BIRGIN und J. M. MARTINEZ: *Packmol: A package for building initial configurations for molecular dynamics simulations*. J. Comput. Chem., 30:2157–2164, 2009.
- [91] PONDER, J. W.: *TINKER: Molecular Modeling Package (Version 5.1)*, 1990–2011.
- [92] DAMM, W., A. FRONTERA, J. TIRADO-RIVES und W. L. JORGENSEN: *OPLS All-Atom force field for carbohydrates*. J. Comput. Chem., 18:1955–1970, 1997.
- [93] BECKE, A. D.: *A new mixing of Hartree-Fock and local density functional theories*. J. Chem. Phys., 98:1372–1377, 1993.
- [94] BECKE, A. D.: *Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange*. J. Chem. Phys., 98:5648–5652, 1993.
- [95] LEE, C., W. YANG und R. G. PARR: *Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density*. Phys. Rev. B, 37:785–789, 1988.
- [96] IRIKURA, K. K., R. D. JOHNSON, R. N. KACKER und R. KESSEL: *Uncertainties in scaling factors for ab initio vibrational zero-point energies*. J. Chem. Phys., 130:114102, 2009.
- [97] TEIXEIRA, F., A. MELO und M. N. D. S. CORDEIRO: *Calibration sets and the accuracy of vibrational scaling factors: a case study with the X3LYP hybrid functional*. J. Chem. Phys., 133:114109, 2010.
- [98] SCHMIDT, M. W., K. K. BALDRIDGE, J. A. BOATZ, S. T. ELBERT, M. S. GORDON, J. H. JENSEN, S. KOSEKI, N. MATSUNAGA, K. A. NGUYEN, S. SU, T. L. WINDUS, M. DUPUIS und J. A. MONTGOMERY: *General atomic and molecular electronic structure system*. J. Comput. Chem., 14:1347–1363, 1993.
- [99] GORDON, M. S. und M. W. SCHMIDT: *Theory and applications of computational chemistry, the first forty years*. Elsevier Science, Amsterdam, 2005.

-
- [100] PETRICH, W. und P. LASCH: *Data Acquisition and Analysis in Biomedical Vibrational Spectroscopy*. In: MOSS, D. (Herausgeber): *Biomedical Applications of Synchrotron Infrared Microspectroscopy*, RSC Analytical Spectroscopy Series, Seiten 192–225. RSC Publishing, Cambridge, 2011.
- [101] BODE, B. M. und M. S. GORDON: *Macmolplt: a graphical user interface for GAMESS*. J. Mol. Graphics Mod., 16:133–138, 1998.
- [102] VRANČIĆ, C. und W. PETRICH: *Effective fragment potential study of the influence of hydration on the vibrational spectrum of glucose*. J. Phys. Chem. A, 115:12373–12379, 2011.
- [103] SIEBERT, F. und P. HILDEBRANDT: *Vibrational spectroscopy in life science*. Tutorials in biophysics. Wiley-VCH, 2008.
- [104] FAIST, J., F. CAPASSO, D. L. SIVCO, C. SIRTORI, A. L. HUTCHINSON und A. Y. CHO: *Quantum cascade laser*. Science, 264:553–556, 1994.
- [105] GMACHL, C., F. CAPASSO, D. L. SIVCO und A. Y. CHO: *Recent progress in quantum cascade lasers and applications*. Rep. Prog. Phys., 64:1533–1601, 2001.
- [106] CAPASSO, F., C. GMACHL, D. L. SIVCO und A. Y. CHO: *Quantum cascade lasers*. Phys. Today, 55:34–40, 2002.
- [107] FAIST, J., C. GMACHL, F. CAPASSO, C. SIRTORI, D. L. SIVCO, J. N. BAILLARGEON und A. Y. CHO: *Distributed feedback quantum cascade lasers*. Appl. Phys. Lett., 70:2670–2672, 1997.
- [108] CARROLL, J., J. WHITEAWAY und D. PLUMB: *Distributed feedback semiconductor lasers*. IEE circuits, devices and systems series. Institution of Electrical Engineers, 1998.
- [109] MAULINI, R., M. BECK, J. FAIST und E. GINI: *Broadband tuning of external cavity bound-to-continuum quantum-cascade lasers*. Appl. Phys. Lett., 84:1659, 2004.
- [110] HUGI, A., R. MAULINI und J. FAIST: *External cavity quantum cascade laser*. Semicond. Sci. Technol., 25:083001, 2010.
- [111] LANG, S. B.: *Pyroelectricity: From ancient curiosity to modern imaging tool*. Physics Today, 58:31–36, 2005.
- [112] CAPPER, P. und C. ELLIOTT: *Infrared detectors and emitters: materials and devices*. Electronic materials series. Kluwer Academic, 2001.
- [113] QUIMBY, R.: *Photonics and lasers: an introduction*. Wiley-Interscience, 2006.

- [114] ROGALSKI, A.: *Fundamentals of infrared detector technologies*. Taylor & Francis, 2009.
- [115] GHOSH, A.: *Introduction to Instrumentation and Control*. Prentice-hall of India Private Limited, 2004.
- [116] WITTEMAN, W. J.: *Detection and signal processing: technical realization*. Springer series in advanced microelectronics. Springer, 2006.
- [117] MARCELLIS, A. und G. FERRI: *Analog circuits and systems for voltage-mode and current-mode sensor interfacing applications*. Analog Circuits and Signal Processing. Springer, 2011.
- [118] SHEN, G. und X. HUANG: *Advanced Research on Computer Science and Information Engineering: International Conference, CSIE 2011, Zhengzhou, China, May 21-22, 2011. Proceedings*. Nummer 2 in *Communications in Computer and Information Science Series*. Springer, 2011.
- [119] HERRMANN, C.: *In-vitro Untersuchungen zur kontinuierlichen Glucosemessung auf Basis der fasergebundenen Mittelinfrarot-Spektroskopie*. Diplomarbeit, Universität Heidelberg, 2009.
- [120] HALE, G. M. und M. R. QUERRY: *Optical constants of water in the 200–nm to 200 – μm wavelength region*. *Appl. Opt.*, 12:555–563, 1973.
- [121] BRANDSTETTER, M. und B. LENDL: *Tunable mid-infrared lasers in physical chemosensors towards the detection of physiologically relevant parameters in biofluids*. *Sens. Actuators B: Chem*, in press.
- [122] VENYAMINOV, S. Y. und F. G. PRENDERGAST: *Water (H_2O and D_2O) molar absorptivity in the 1000-4000 cm^{-1} range and quantitative infrared spectroscopy of aqueous solutions*. *Anal. Biochem.*, 248:234–245, 1997.
- [123] FOMICHOVA, A.: *Bestimmung der Diffusions- und Integrationszeiten für die kontinuierliche Glucosemessung auf Basis der fasergebundenen Mittelinfrarot-Spektroskopie*. Diplomarbeit, Universität Heidelberg, 2011.
- [124] CUSSLER, E. L.: *Diffusion: Mass transfer in fluid systems*, Band 3. Cambridge University Press, 2009.
- [125] HEINRICH, P., R. WYZGOL, B. SCHRADER, A. HATZILAZARU und D. W. LÜBBERS: *Determination of organic compounds by IR/ATR spectroscopy with polymer-coated internal reflection elements*. *Appl. Spectrosc.*, 44:1641–1646, 1990.
- [126] GÖBEL, R., R. KRŠKA, R. KELLNER und A. KATZIR: *Development of protective polymer coatings for silver halide fibers and their application as threshold level sensors for chlorinated hydrocarbons in sea water*. *Fresenius J. Anal. Chem.*, 348:780–781, 1994.

-
- [127] BORMASHENKO, E., R. POGREB, S. SUTOVSKI, I. VASERMAN und A. KATZIR: *Use of polymer-coated AgClBr fibers for fiber optic evanescent wave spectroscopy (FEWS) of biological fluids*. In: *Biomedical Sensors, Fibers, and Optical Delivery Systems*, Proc. SPIE, 1999.
- [128] ALLAN, D. W.: *Atomic frequency standards*. Proceedings of the IEEE, 54:221–230, 1966.
- [129] ROHLACK, E.: *Mittelinfrarot assistierte Raman-Spektroskopie*. Diplomarbeit, Universität Heidelberg, 2009.
- [130] MOSER, F., D. BUNIMOVICH, A. DEROWE, O. EYAL, A. GERMAN, Y. GOTSHAL, A. LEVITE, L. NAGLI, A. RAVID, V. SCHARF, S. SHALEM, D. SHEMESH, R. SIMCHI, I. VASSERMAN und A. KATZIR: *Medical applications of infrared transmitting silver halide fibers*. IEEE J. Select. Topics Quantum Electron., 2:872–879, 1996.
- [131] DEKEL, B., Z. BARKAY und A. KATZIR: *The study of waveguides made by diffusion of Br into AgCl substrates and the transmission of mid-IR radiation through these waveguides*. Opt. Commun., 199:383–388, 2001.
- [132] NATIONAL INSTITUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY (AIST): *Spectral Database for Organic Compounds*, 2012. accessed 04-Jan-2012.
- [133] CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI): *Interference testing in clinical chemistry; Approved guideline*. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, 2 Auflage, 2005.
- [134] DÖRNER, K.: *Klinische Chemie und Hämatologie*. Thieme, Stuttgart, 5 Auflage, 2003.
- [135] EATON, J. W.: *GNU Octave Manual*. Network Theory Limited, 2002.
- [136] SAVITZKY, A. und M. J. E. GOLAY: *Smoothing and differentiation of data by simplified least squares procedures*. Anal. Chem., 36:1627–1639, 1964.
- [137] CLARKE, W. L., D. COX, L. A. GONDER-FREDERICK, W. CARTER und S. L. POHL: *Evaluating clinical accuracy of systems for self-monitoring of blood glucose*. Diabetes Care, 10:622–628, 1987.
- [138] GROPPER, S. S., J. L. SMITH und J. L. GROFF: *Advanced nutrition and human metabolism*. Wadsworth, Belmont, CA, 5. Auflage, 2009.
- [139] GAINES, A. R., L. R. PIERCE und P. A. BERNHARDT: *Fatal iatrogenic hypoglycemia: Falsely elevated blood glucose readings with a point-of-care meter due to maltose-containing intravenous immune globulin product*. Technischer Bericht, FDA, 2009.

- [140] MACDONALD, I., A. KEYSER und D. PACY: *Some effects, in man, of varying the load of glucose, sucrose, fructose, or sorbitol on various metabolites in blood.* Am. J. Clin. Nutr., 31:1305–1311, 1978.
- [141] TRUSWELL, A. S., J. M. SEACH und A. W. THORBURN: *Incomplete absorption of pure fructose in healthy subjects and the facilitating effect of glucose.* Am. J. Clin. Nutr., 48:1424–1430, 1988.
- [142] VOGT, F., M. KRAFT und B. MIZAIKOFF: *First results on infrared attenuated total reflection spectroscopy for quantitative analysis of salt ions in seawater.* Appl. Spectrosc., 56:1376–1380, 2002.
- [143] BURKE, R. A., J. B. MOBERLY, H. PATEL, T. R. SHOCKLEY und L. MARTIS: *Maltose and isomaltose in uremic plasma following icodextrin administration.* Adv Perit Dial, 14:120–123, 1998.
- [144] JENSEN, P. S., J. BAK und S. ANDERSSON-ENGELS: *Influence of temperature on water and aqueous glucose absorption spectra in the near- and mid-infrared regions at physiologically relevant temperatures.* Appl. Spectrosc., 57:28–36, 2003.
- [145] MARÉCHAL, Y.: *The molecular structure of liquid water delivered by absorption spectroscopy in the whole IR region completed with thermodynamics data.* J. Mol. Struct., 1004:146–155, 2011.
- [146] LIBNAU, F. O., J. TOFT, A. A. CHRISTY und O. M. KVALHEIM: *Structure of liquid water determined from infrared temperature profiling and evolutionary curve resolution.* J. Am. Chem. Soc., 116:8311–8316, 1994.
- [147] LAVI, A. MILLO und A. KATZIR: *Thin ordered bundles of infrared-transmitting silver halide fibers.* Appl. Phys. Lett., 87:241122, 2005.
- [148] MARSLAND, JR., R. und T. DAY: *Quantum cascade laser suitable for portable applications,* März 2008. Patent US7920608.
- [149] R. MAULINI, R., A. LYAKH, A. TSEKOUN, R. GO und C. K. N. PATEL: *High average power uncooled mid-wave infrared quantum cascade lasers.* Electron. Lett., 47:395–397, 2011.
- [150] BAI, Y., N. BANDYOPADHYAY, S. TSAO, S. SLIVKEN und M. RAZEGHI: *Room temperature quantum cascade lasers with 27 % wall plug efficiency.* Appl. Phys. Lett., 98:181102, 2011.
- [151] LIU, P. Q., A. J. HOFFMAN, M. D. ESCARRA, K. J. FRANZ, J. B. KHURGIN, Y. DIKMELIK, X. WANG, J.-Y. FAN und C. F. GMACHL: *Highly power-efficient quantum cascade lasers.* Nature Photonics, 4:95–98, 2010.

- [152] LYAKH, A., R. MAULINI, A. TSEKOUN, R. GO, C. PFLUGL, L. DIEHL, Q. J. WANG, F. CAPASSO und C. K. N. PATEL: *3 W continuous-wave room temperature single-facet emission from quantum cascade lasers based on nonresonant extraction design approach*. Appl. Phys. Lett., 95:141113, 2009.
- [153] BAI, Y., S. R. DARVISH, N. BANDYOPADHYAY, S. SLIVKEN und M. RAZEGHI: *Optimizing facet coating of quantum cascade lasers for low power consumption*. J. Appl. Phys., 109:053103, 2011.
- [154] AIFANTIS, K. E., S. A. HACKNEY und R. V. KUMAR: *High energy density lithium batteries: materials, engineering, applications*. Wiley-VCH, 2010.
- [155] DAY, T. und D. F. ARNONE: *Compact mid-IR laser*, Januar 2011. Patent US8050307.
- [156] TAKEUCHI, E., K. THOMAS und T. DAY: *QUANTUM-CASCADE LASERS: Applications multiply for external-cavity QCLs*. <http://www.laserfocusworld.com/articles/print/volume-45/issue-1/features/quantum-cascade-lasers-applications-multiplyfor-external-cavity-qcls.html>. (abgerufen am 08.02.2012).
- [157] HUGI, A., R. TERAZZI, Y. BONETTI, A. WITTMANN, M. FISCHER, M. BECK, J. FAIST und E. GINI: *External cavity quantum cascade laser tunable from 7.6 to 11.4 μm* . Appl. Phys. Lett., 95:061103, 2009.
- [158] BLANCHARD, R., C. GREZES, S. MENZEL, S. PFLÜGL, L. DIEHL, Y. HUANG, J.-H. RYOU, R. D. DUPUIS und F. CAPASSO: *Double-waveguide quantum cascade laser*. Appl. Phys. Lett., 100:033502, 2011.
- [159] WEIDA, M. J., E. FOTHERINGHAM, W. B. CHAPMAN und T. DAY: *Progress towards compact broadly tunable laser modules for high-resolution mid-IR spectroscopy and commercial applications*. In: RAZEGHI, M., E. TOURNIE und G. J. BROWN (Herausgeber): *Quantum Sensing and Nanophotonic Devices IX*, Band 8268, Seite 82682I. SPIE, 2012.
- [160] ALONSO, R., F. VILLUENDAS, J. BORJA, L. A. BARRAGÁN und I. SALINAS: *Low-cost, digital lock-in module with external reference for coating glass transmission/reflection spectrophotometer*. Meas. Sci. Technol., 14:551–557, 2003.
- [161] BARRAGAN, L. A., J. I. ARTIGAS, R. ALONSO und F. VILLUENDAS: *A modular, low-cost, digital signal processor-based lock-in card for measuring optical attenuation*. Rev. Sci. Instrum., 72:247–251, 2001.
- [162] FERRI, G., P. D. LAURENTIIS, A. D'AMICO und C. D. NATALE: *A low-voltage integrated CMOS analog lock-in amplifier prototype for LAPS applications*. Sens. Actuat. A: Physical, 92:263–272, 2001.
- [163] KRÄNZLIN, B. Persönliche Mitteilung, 2012.

- [164] INFRA_{TEC} GMBH: *Infrared detectors for IR sensors: Standard Products - LME-353*. <http://www.infratec-infrared.com/Data/LME-353.pdf>. (abgerufen am 02.03.2012).

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich die Aufmerksamkeit auf die Personen lenken, die mich während meiner Promotionszeit unterstützt haben und so ihren Teil zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Daher geht mein Dank an...

Prof. Dr. Wolfgang Petrich für die Betreuung meiner Arbeit und die Gelegenheit, meine Arbeiten in seiner Forschungsgruppe anfertigen zu dürfen. Nach einem Beschneppern während der Diplomzeit zögerte ich keine Minute, die Promotionsstelle anzutreten und rückblickend kann ich mir keine bessere Betreuung meiner Arbeiten vorstellen, die durch fundiertes Fachwissen ebenso zu unterstützen wusste wie durch eine menschlich überaus angenehme und motivierende Art und Weise.

Prof. Dr. Matthias Weidemüller für die Übernahme des Zweitgutachtens.

die Arbeitsgruppe Biophotonik für die fruchtbare Zusammenarbeit und spannende Diskussionen. Namentlich waren dies Anna Fomichova, Carina Herrmann und Moritz Weil. Besonders seien dabei Niels Kröger, Anton Kurz (im Exil im Bioquant) und Enno Rohlack erwähnt, die meine Arbeit nachhaltig unterstützt haben.

Prof. Dr. Annemarie Pucci und im allgemeinen ihrer Arbeitsgruppe, die am Kirchhoff-Institut immer die ersten Ansprechpartner für mich darstellten und durch deren ständige Unterstützung vieles erst ermöglicht wurde.

dem Zentrum für Medizinische Forschung, wo mir ebenfalls viele hilfbereite Menschen zur Seite standen - nämlich Cathleen Fichtner, Prof. Dr. Norbert Gretz, Peter Heinz und Dr. Bettina Kränzlin. Ein besonderer Dank geht an Dr. Sabine Neudecker, auf die über gesamte Projektzeit immer Verlass war und ohne die wir mit unserer Physik schnell an unsere Grenzen gestoßen wären.

der mechanischen Werkstatt in Person von Werner Lamade, Helmut Maier, Siegfried Spiegel und Ulrich Sudhölter für die vielen kleinen und großen Hilfestellungen und Anfertigungen, die auch in größter Zeitnot stets rechtzeitig zur Verfügung standen.

der Elektronikabteilung in Person von Knut Azeroth, Alexander Leonhard und Jürgen Schölles für die freundliche Unterstützung eines Elektroniknovizen.

der Baden-Württemberg Stiftung für die Finanzierung des Projektes KORGE, welches die Grundlage meiner Promotion bildete.

Die abschließenden Worte des tiefsten Danks gebühren meiner Freundin Fabienne, die mich in jeder Situation stets sicher auffangen und unterstützen konnte. Auch bei meinen großartigen Eltern möchte ich mich bedanken für all die bedingungslose Unterstützung während meiner gesamten Ausbildung und allen so selbstverständlich gewährten Freiheiten, die mir all dies erst ermöglicht haben.

Erklärung

Ich versichere, dass ich diese Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Mannheim, den 11. März 2012

.....

(Unterschrift)