

Raman-basierte Techniken im Bereich Patientensicherheit und medizinischer Diagnostik

12. Workshop Kleine Volumenströme in der Medizintechnik

Hainer Wackerbarth

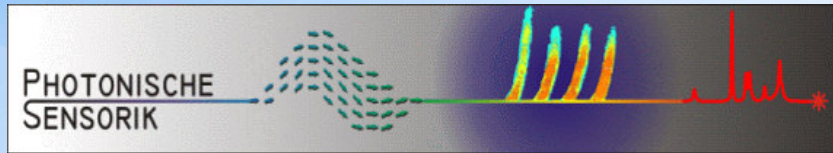
Laser-Laboratorium Göttingen e.V.
Hans-Adolf-Krebs Weg 1
D-37077 Göttingen
www.llg-ev.de



Laser-Laboratorium Göttingen



- Gegründet 1987
- Förderung von Wissenschaft und Forschung
- Mittlerfunktion zwischen Wissenschaft und Wirtschaft
- Anwendungsorientierte Grundlagenforschung auf dem Gebiet der Optischen Technologien

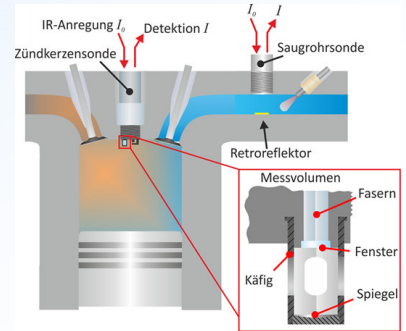
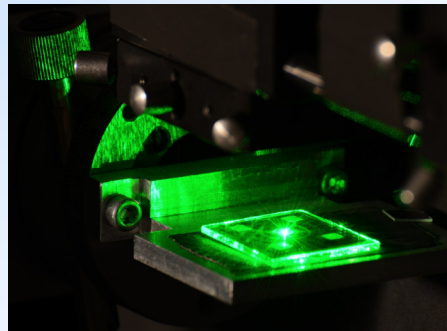
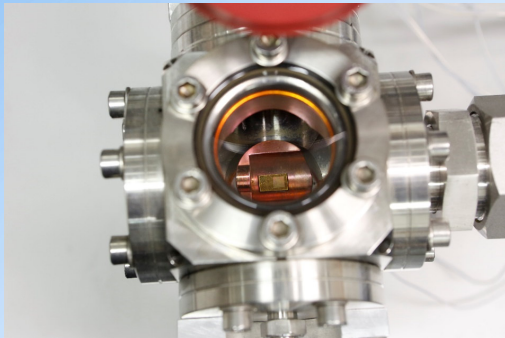


Dr. Georgios Ctistis
Dr. Christoph Lenth

Vera Schalles
Fabian Müller

Simon Göllner
Christian Niklas

Stefan Scholz
Florian Wieduwilt

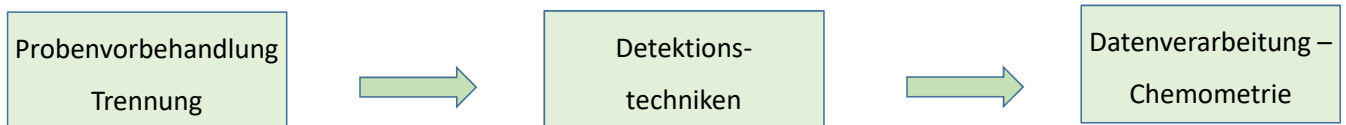


Entwicklung von Vor-Ort-Analyseverfahren



Anforderungen:

Einsetzbarkeit, Messgeschwindigkeit, Selektivität und Sensitivität, probenschonend



- Mikrofluidik
 - Chromatographie
 - Elektrophorese
 - Lab-on-Chip Technik
- Kryo-Fokussierung
- Filtrieren
- Aufkonzentrieren (SPME)
- Elektrochemie

- Optische Spektroskopie
 - Raman und erweiterte Raman Verfahren (SERS)
 - IR Techniken (MIR, NIR, ATR)
 - Fluoreszenz, Absorbanz
 - Plasmaspektroskopie (LIBS)
- Plasmonik / Oberflächenspektroskopie
- Bildgebende Verfahren
- Ionenmobilitätsspektrometrie

- Abgleich mit Datenbanken
- Sensorfusion
- Hard-Modelling
- Statistische Verfahren (PCA, PLS)

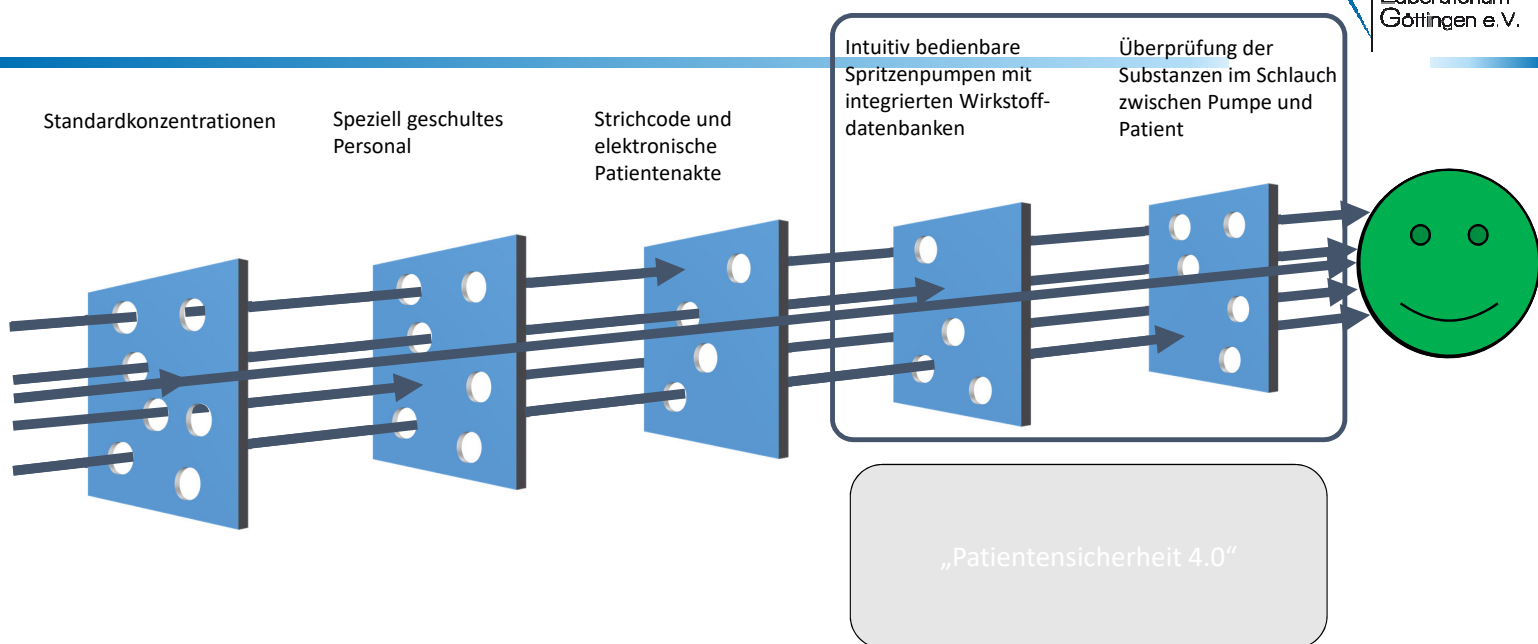
Alltag auf einer Intensivstation



5% Fehlerquote bei der Vergabe von Medikamenten

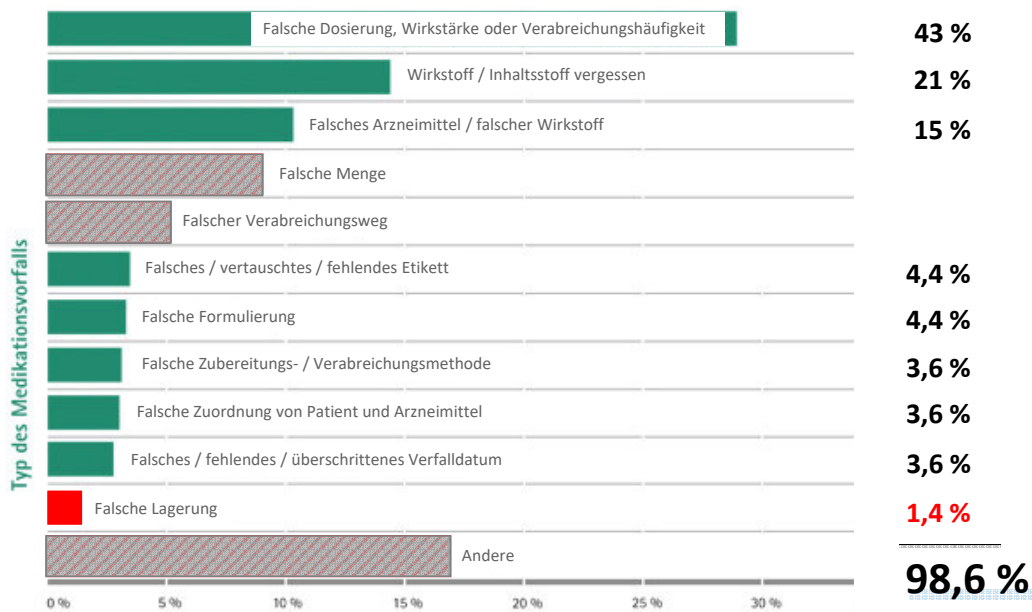
4

Motivation



5

Fehlerquellen

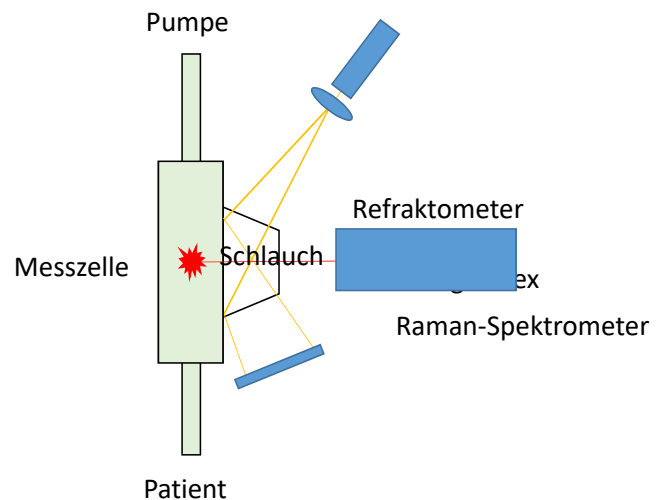


Quelle: BBM AG, <http://www.sichereinfusionstherapie.de>

6

Lösungsansatz

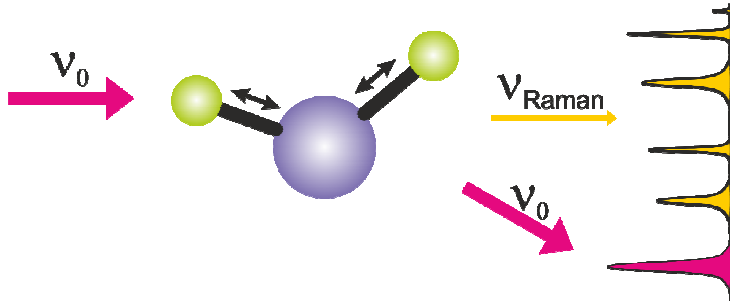
- In Wasser gelöste Wirkstoffe
 - Nicht-invasives Vorgehen
 - Keine chemischen und thermischen Veränderungen der Analyten und Lösungen durch optische Verfahren
-
- Raman-Spektroskopie bestens geeignet
 - Einige anorganische Salze nicht detektierbar
- Ergänzung durch Refraktometrie



7

Raman-Spektroskopie

Identifikation von molekularen Substanzen



Raman-Spektroskopie

- Streulichtuntersuchung
- Molekülschwingungsspektroskopie

Vorteile

- Hohe Selektivität: Raman-Spektrum = Fingerabdruck
- Zerstörungsfrei
- Miniaturisierbar
- Geeignet für on-line Monitoring
- Kostengünstig
- Keine Störung durch Wasser

Nachteil

- Schwache Signalausbeute
- Überlappung durch Fluoreszenz

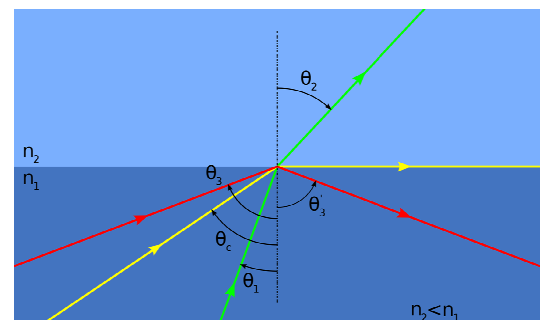
8

Refraktometrie

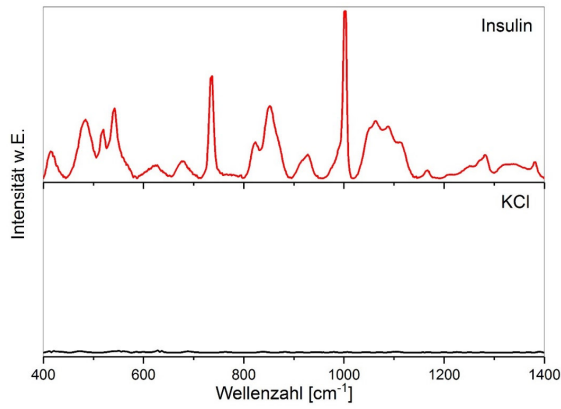
Brechungsindex von Flüssigkeiten

- Brechungsindex ist schnell und einfach zu bestimmen
- Bis auf die fünfte Nachkommastelle bestimmbar
- Temperaturkompensation muss durchgeführt werden (0,02°C)
- Wellenlängenabhängigkeit kann auch genutzt werden (Dispersion)
- Komplementäre Methode zur Raman-Spektroskopie

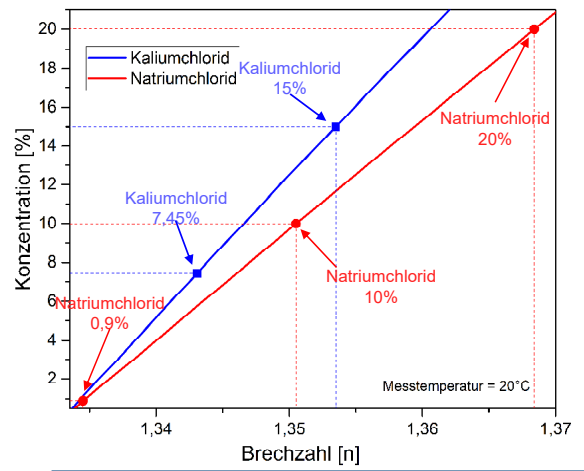
Totalreflexion – Bestimmung der Hell/Dunkel-Kante auf Detektor



9

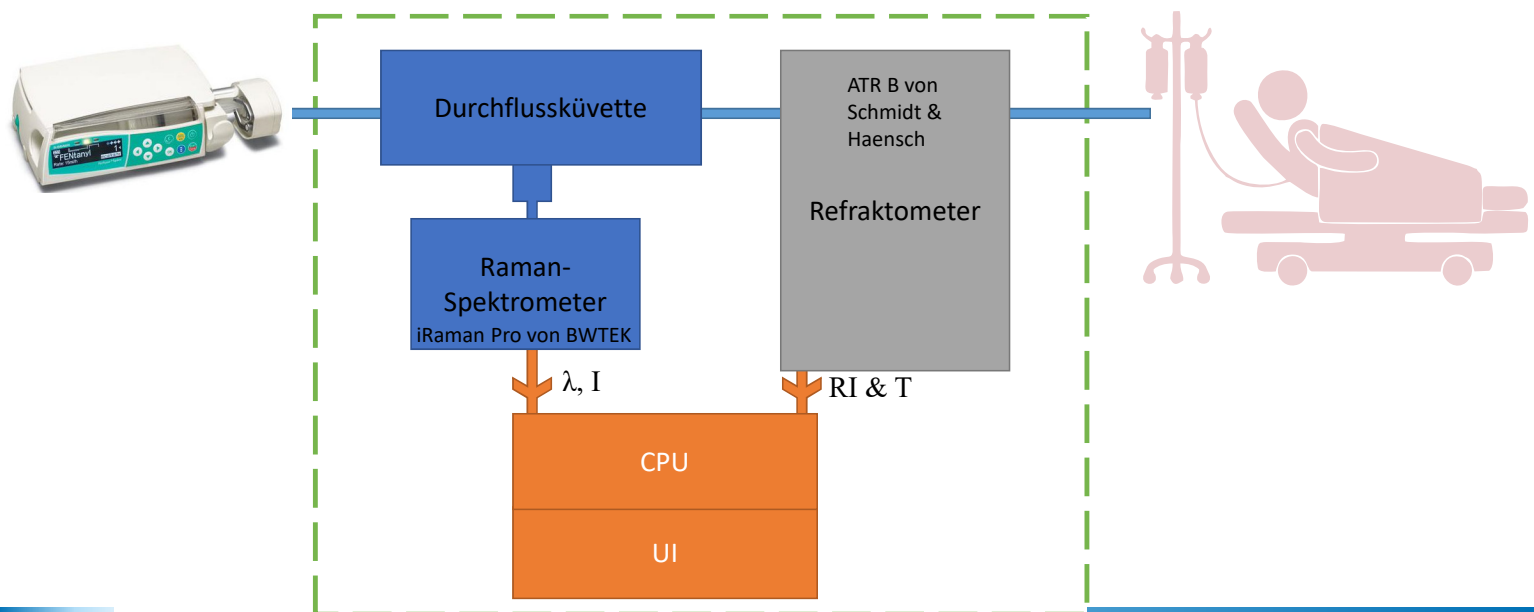


Raman-Spektroskopie



Refraktometrie

Schema Funktionsmuster



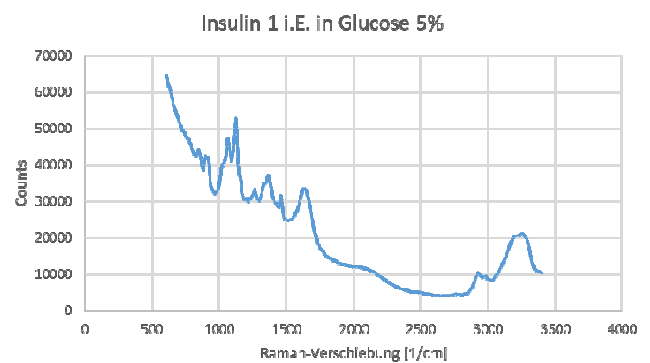
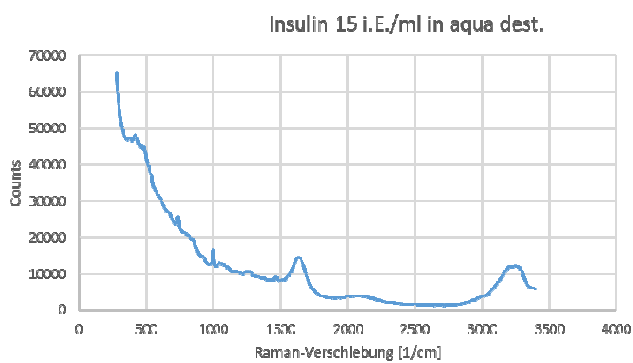
Funktionsmuster

- Funktionsmuster aufgebaut
- Planung Prototyp abgeschlossen
 - Multichannel-System
 - 4er-Racks stapelbar
 - Platzsparend
 - Kostenreduzierung



12

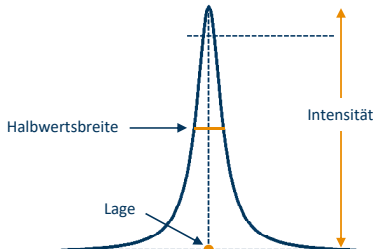
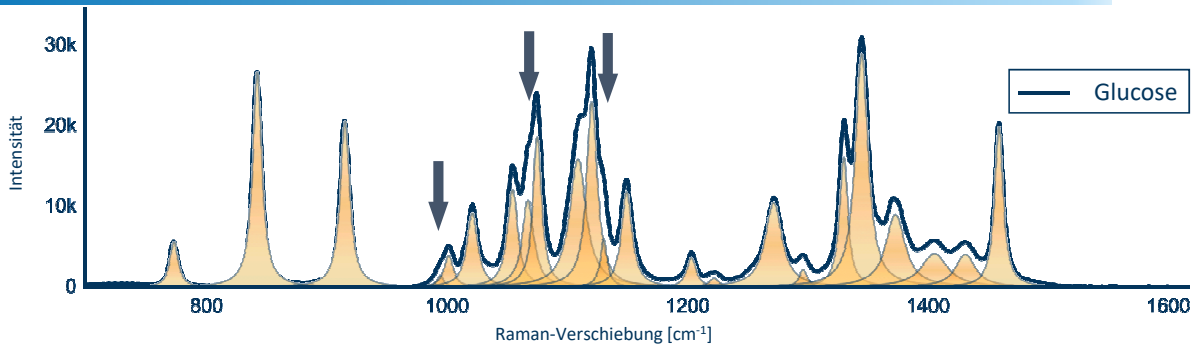
Ergebnisse Raman-Spektroskopie



Anregung 785 nm, Messzeit 15 s (links) und 30 s (rechts)

13

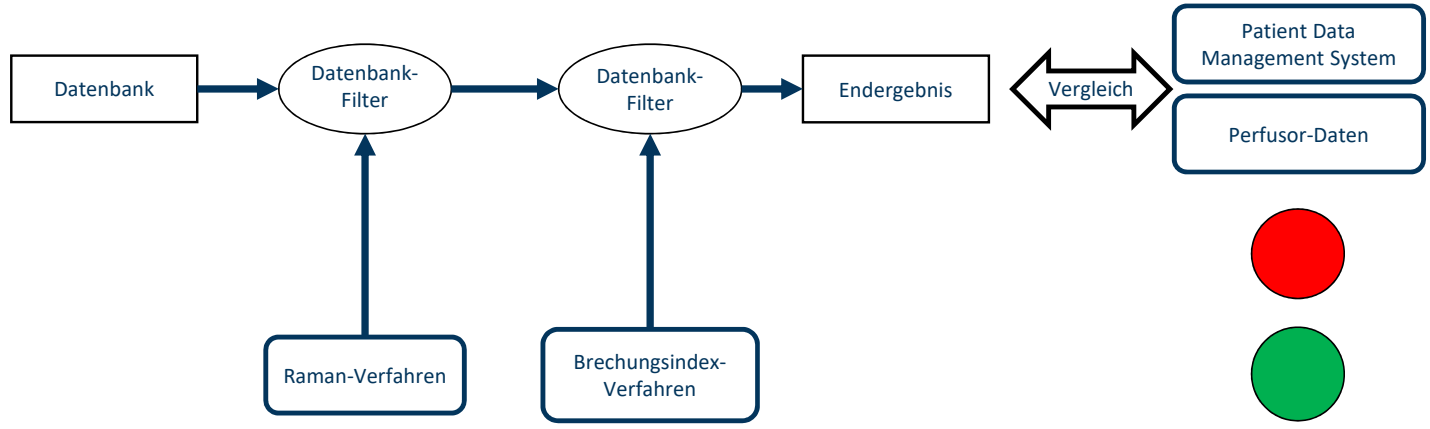
Analyse Raman-Spektren



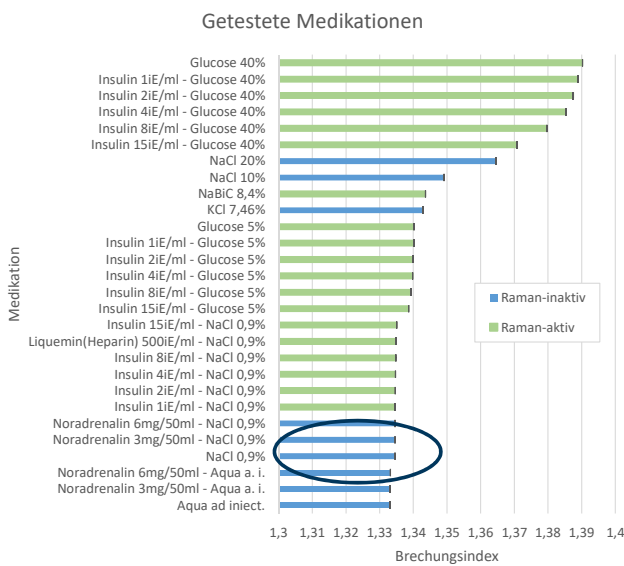
Signalform-analyse

- Erkennung der überlappenden Signale
- Multi-dimensionale Identifikation
- Bestandteile in Mischungen erkennbar
- Geringe Kalkulationsbelastung

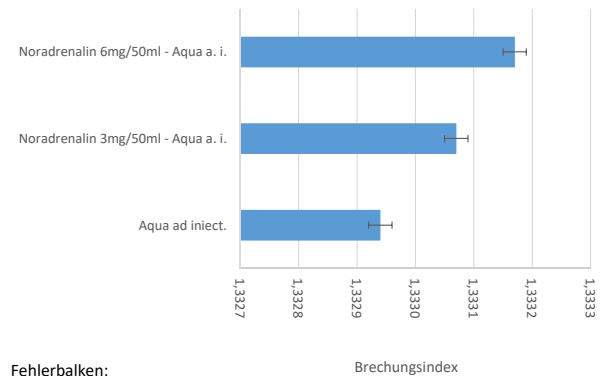
Datenfusion Raman und Refraktometrie



Ergebnisse: Wiedererkennung von Medikationen UMG



Trägerlösung: aqua ad iniectionabilia



Fehlerbalken:
Messgenauigkeit des
Refraktometers

16

Fazit

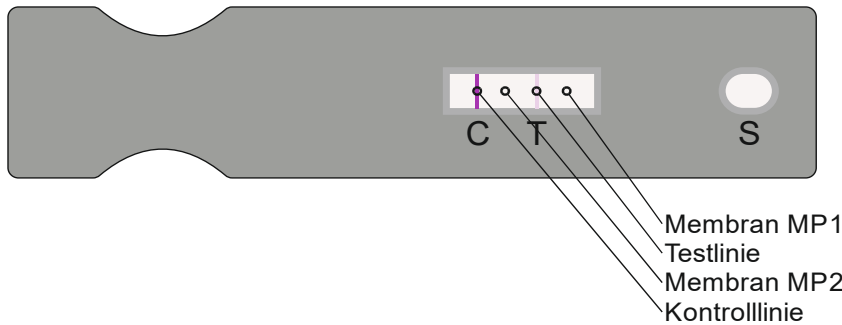
- Entwicklung eines Analyseautomats basierend auf Raman-Spektroskopie und Refraktometrie
- Auswertung von Raman-Spektren durch Signalformanalyse
- Entwicklung eines Algorithmus für die Datenfusion
- Untersuchungen in Universitätsmedizin Göttingen zeigen:
Analyseautomat kann Medikationen wiedererkennen
- Hochverdünnte Medikationen (Noradrenalin, Insulin) können noch nicht mittels Raman unterschieden werden



17

Lesen von Lateral-Flow-Tests unter Nutzung des „Surface-Enhanced Resonance Raman Scattering“-Effekts (SERRS)

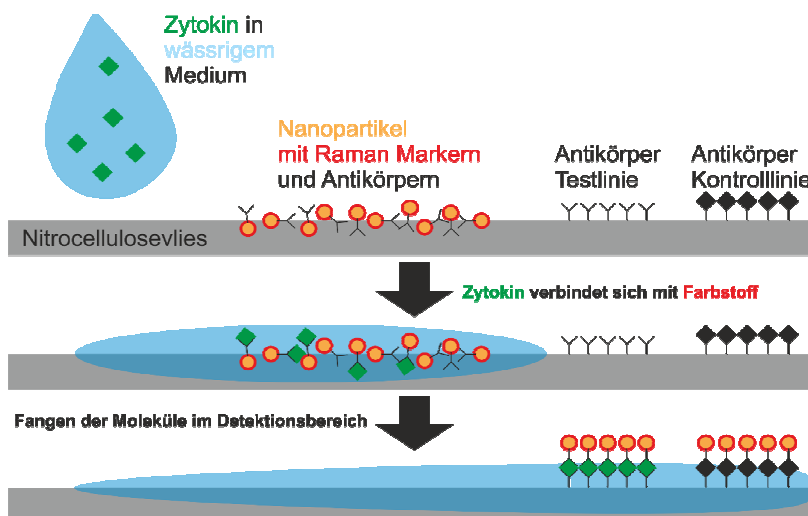
Aufbau des LFTs und Stellen, an denen Raman-Messungen erfolgt sind



- Anwendung: Detektion von Zytokinen, SEB und anderen Veterinärmedizin
- Quantifizierung
- Sehr niedrige Konzentrationen
- Multiplexing soll möglich sein

18

Funktionsprinzip Lateral-Flow-Test



19

SERS-Spektroskopie

Elektromagnetische Theorie

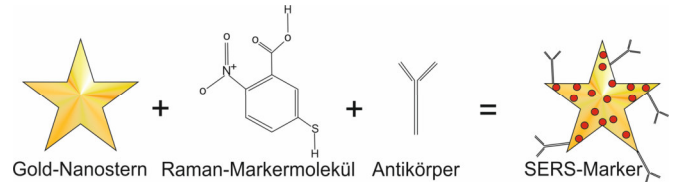
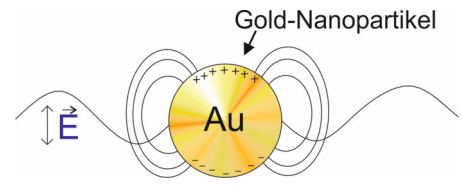
- Resonanz von Oberflächenplasmonen und Anregungswellenlänge
- Nanostrukturierte Oberfläche oder Nanopartikel (häufig Au oder Ag)¹
- Verstärkung der elektrischen Feldstärke bis Faktor 10^8 (Reichweite 10 nm)

Laserlicht = oszillierende elektromagnetische Welle

- führt zu Ladungstrennung in metallischen Nanopartikeln
- Anregung von Oberflächenplasmonen
- Verstärkung elektrisches Feld an Nanopartikeln

Feldverstärkung besonders groß an Polen und Spitzen

→ Aufbau SERS-Marker mit Gold-Nanosternen:



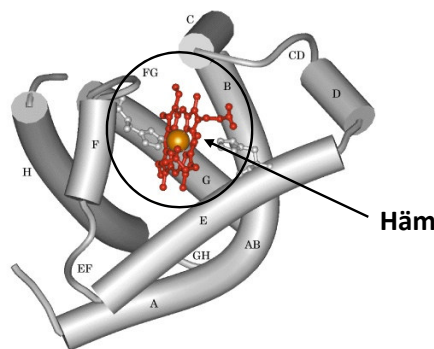
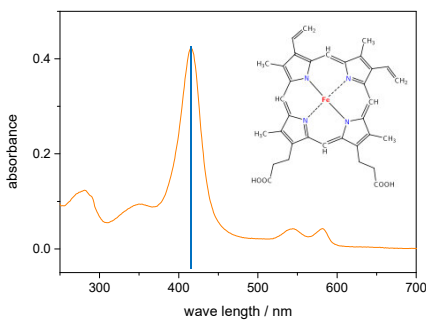
Resonante Anregung in elektronischen Übergang des Raman-Marker – Resonanz Raman(RR) Effekt

Kombination von SERS (10^8) und RR(10^3) ergibt SERRS (10^{11})

1) Wackerbarth H., Klar U., Günther W., Hildebrandt P., Novel time-resolved surface-enhanced (resonance) Raman spectroscopic technique for studying the dynamics of interfacial processes: Application to the electron transfer reaction of cytochrome c at a silver electrode, Applied Spectroscopy, 53, (3) 283-291, 1999.

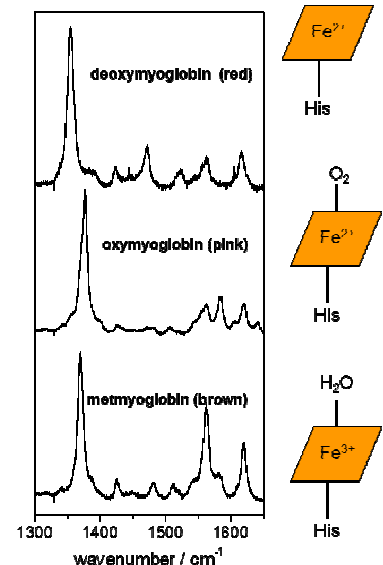
Resonanz Raman Effekt

Absorptionsspektrum von Oxy-myoglobin

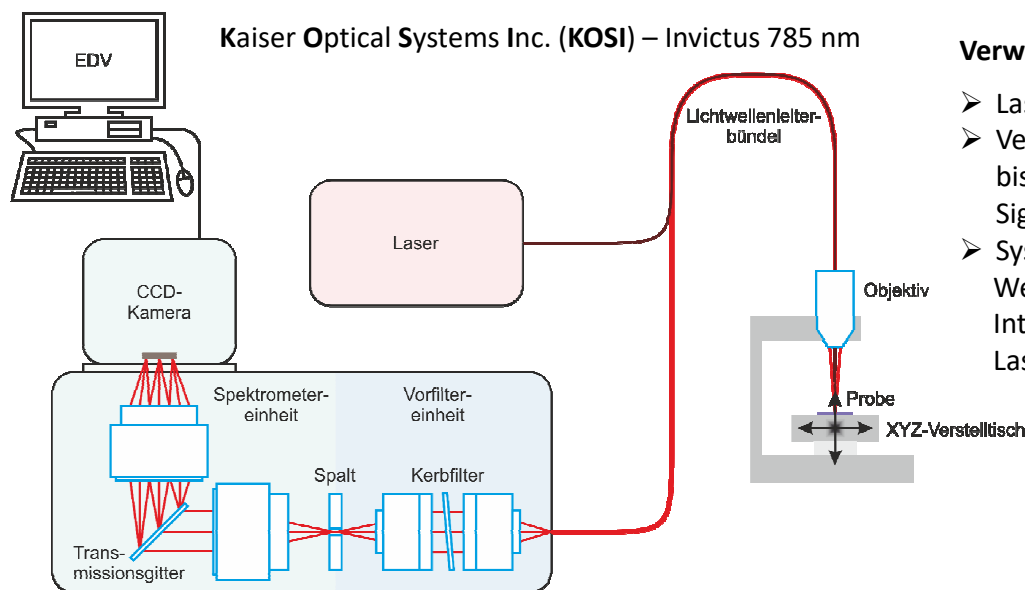


Häm ist Sonde für:

- Oxidationszustand
- Spinzustand
- Axiale Liganden
- Lokale Umgebung



Verwendetes Raman-System



Verwendete Betriebsparameter

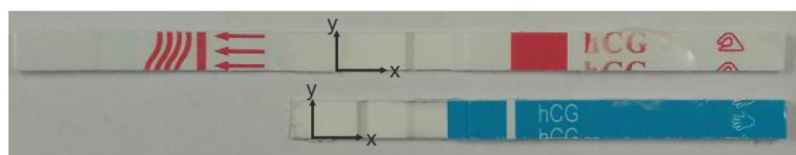
- Laserleistung am Messpunkt: 9,5 mW
- Verwendeter Spektralbereich von 250 bis 1750 cm^{-1} da ansonsten schlechtes Signal- zu Rausch-Verhältnis
- Systemkalibrierung: Wellenlänge, Intensität, Laserwellenlänge

22

Die Testmembrane

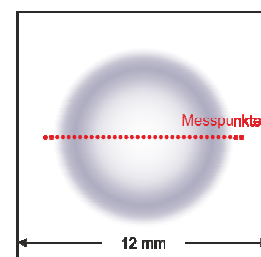
Material:

- UniSart CN 140-Membran von miprolab
- Nanosterne mit 2-Nitro-5-thiobenzoat als SERRS-Farbstoffmolekül: 0,76 μM
- Blutplasmaproben als künstliche Matrix
- Analyte: humanes Choriongonadotropin (hCG) und Staphylokokken-Enterotoxin-B (SEB)



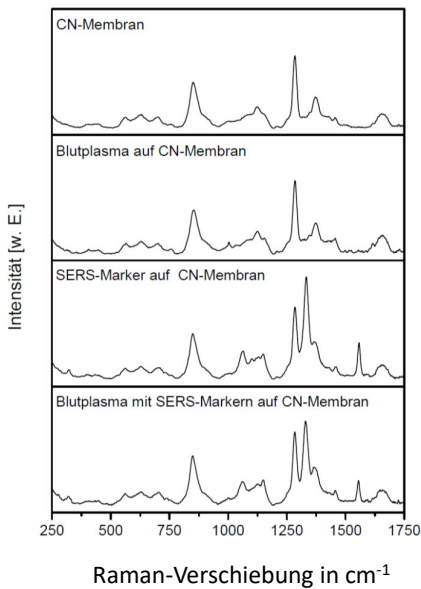
LFT-Teststreifen

Membranmaterial mit aufgetropfter Nanosternsuspension nach Trocken

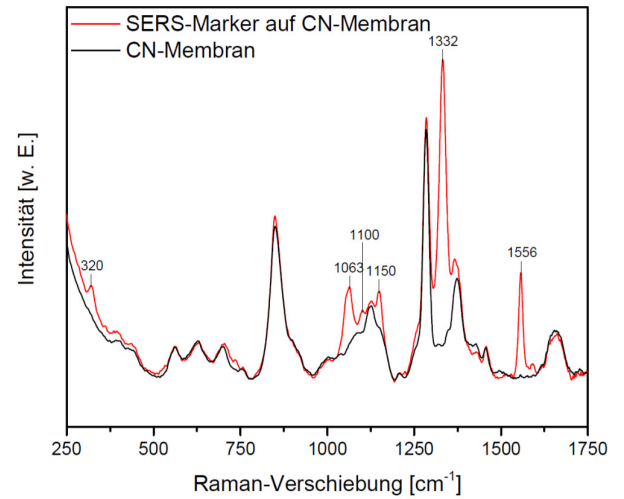


23

Eigenschaften der Raman-Spektren



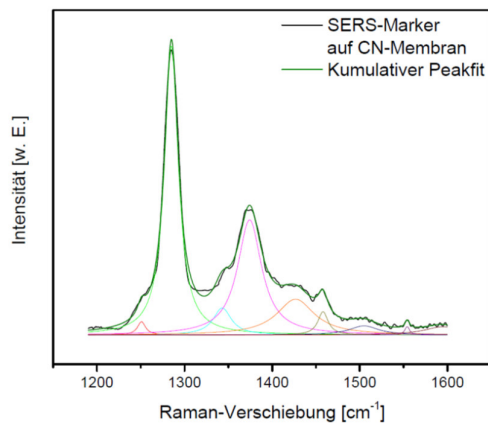
- SERS-Marker zeichnen sich durch scharfe Banden aus
- Überlagerung durch Signale der Membran
- Einfluss der Matrix bisher gering



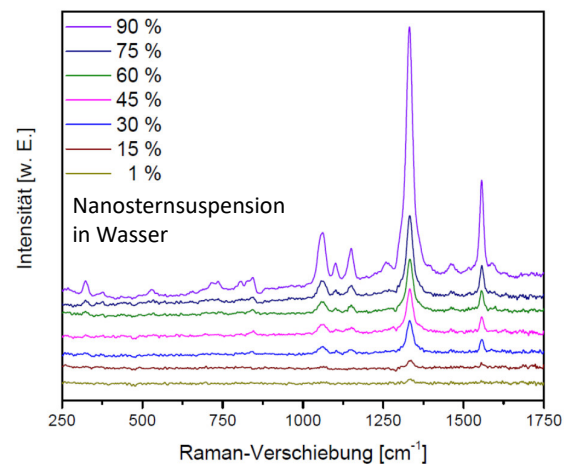
24

Quantifizierungsversuche: Separation der Markersignale

1. Differenzspektrum: SERS-Marker-Spektrum = Gesamtspektrum - $a \cdot$ Membranspektrum; a wird so ermittelt, dass im Differenzspektrum keine unerwarteten Extremwerte auftauchen
2. Dekompositionsverfahren: Klassisch mit Lorentz- oder Gauß-Profilen oder mit Wavelet-Verfahren

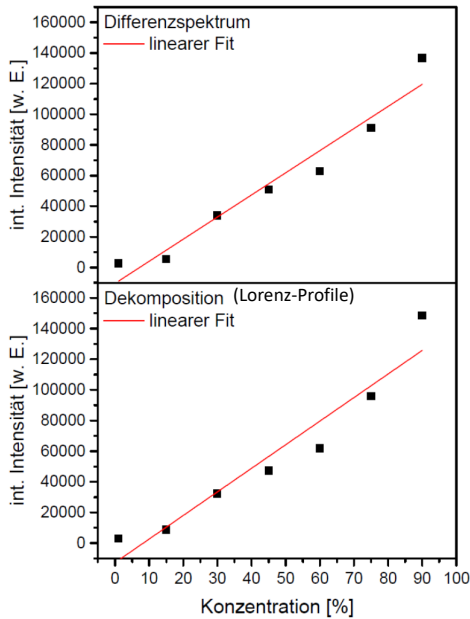


Verfahren des überwachten Lernens zum Glück nicht notwendig!

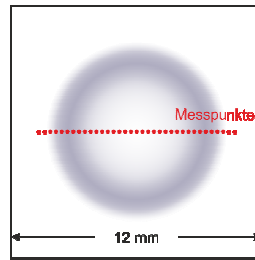


25

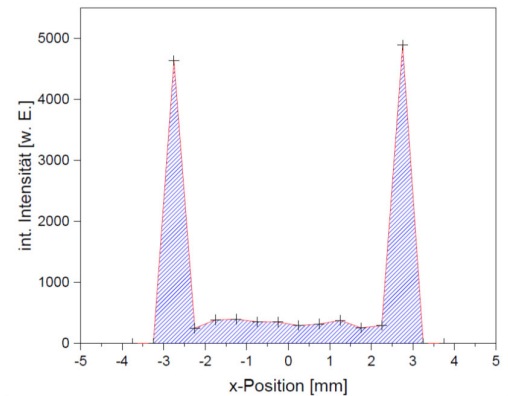
Quantifizierungsversuche anhand definiert aufgetropfter Nanostern-Mengen



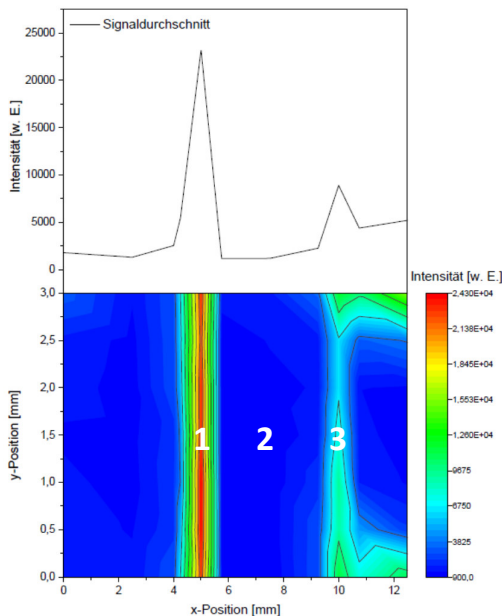
Vergleich der aus den Flächen der 1332 cm^{-1} -Linie bestimmten integrierten Intensität in Abhängigkeit der SERS-Marker-Konzentration zwischen Differenz- und Dekompositionsverfahren.



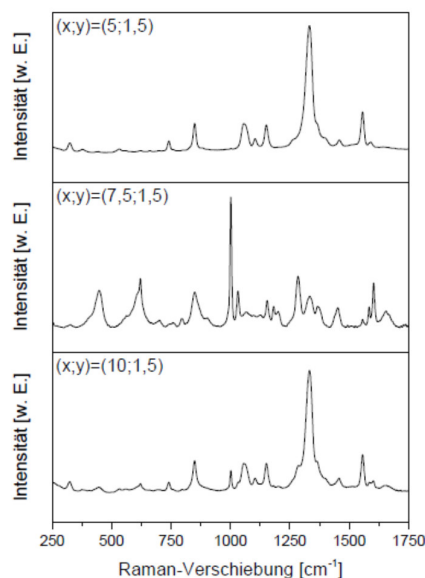
Membranmaterial mit aufgetropfter Nanosternsuspension nach Trocken



Untersuchungen mit hCG-LFTs



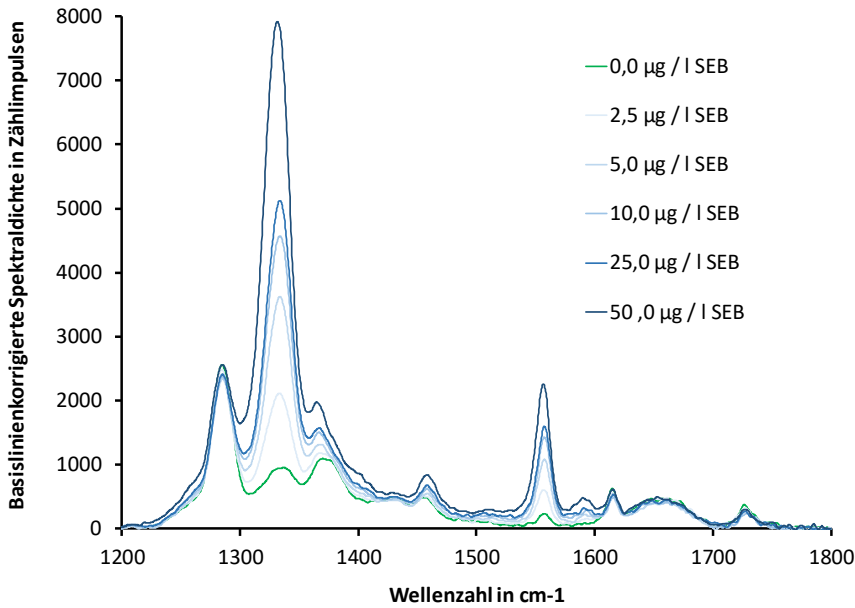
1. Testlinie
2. Membran
3. Kontrolllinie



- Quantifizierbar
- Nanosterne auch außerhalb der Test- bzw. Kontrolllinie
- Differenzverfahren bisher am besten geeignet

Untersuchungen mit SEB als Analyt:

Quantifizierung anhand der SERRS-Signale der Nanosterne



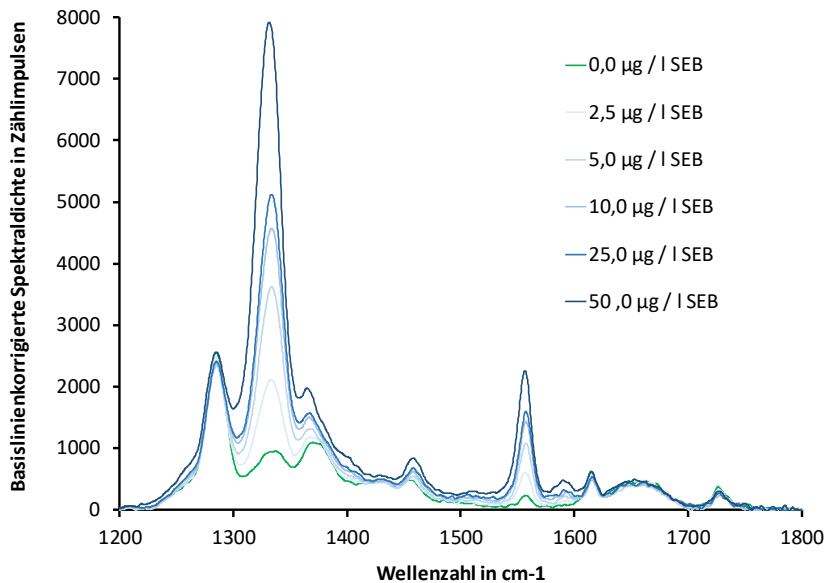
Bei Miprolab durchgeführter LFT-Versuch mit SEB als Analyten:

- Messungen „ganz frisch“
- 5 µl Gold-Nanostersuspension
- Spektren verschiedener Analytmengen (Staphylokokken-Enterotoxin-B, SEB)
- Basislinienkorrektur: Gerade durch die Minima an den Grenzen des ausgesuchten Spektralbereiches
- Raman-Punktmessung bei maximaler Signalhöhe, ermittelt durch manuelles Abrastern

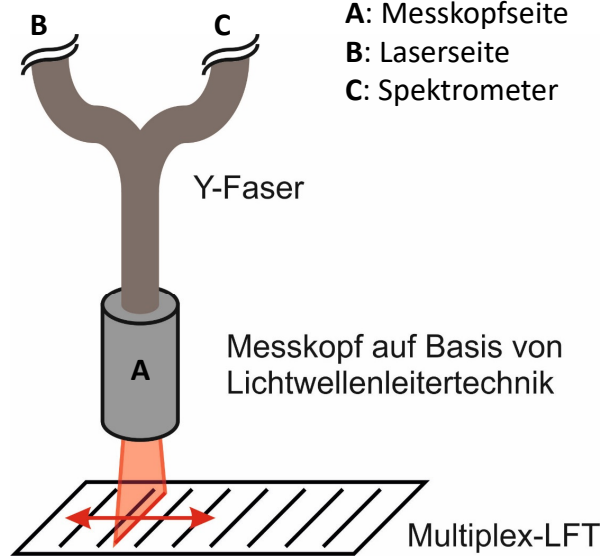
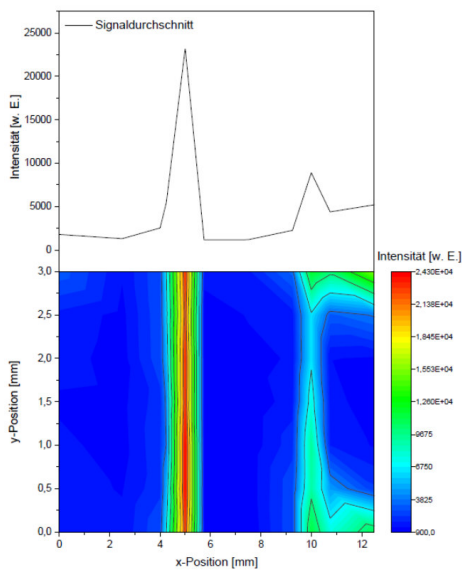
Fazit: **Quantifizierung sehr gut möglich**, aber Automatisierung erstrebenswert => **hyperspektrale Messung**

Untersuchungen mit SEB als Analyt:

Betrachtung der Kontrolllinie



Lösung des Auflösungsproblems



30

Fazit

- Nanosternsignale sind geeignet für anvisierte Nachweisgrenzen
- Nanosternsignale können von Blutplasma und Membran differenziert werden
- Auswertung der Raman-Spektren durch Differenzverfahren
- Intensität von spezifischen Banden der Markermoleküle korreliert mit Menge – Quantitative Analyse

31

Projekt PPA-LFT-Reader

„Entwicklung einer hochsensitiven Auswerteeinheit und chemometrischen Verfahren für das Lesen von Lateral-Flow Tests unter Nutzung des "surface enhanced resonance Raman Scattering"-Effekts (SERRS),“ gefördert vom BMWi

Patiensicherheit 4.0,

NMWK, 11-76251-99-33/12, Inkubationsvorhaben



Vielen Dank

GEFÖRDERT VOM



32

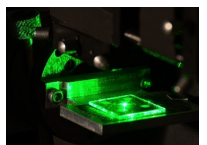
Vielen Dank für Ihre Aufmerksamkeit

Laser-Laboratorium Göttingen e.V.
Hans-Adolf-Krebs Weg 1
D-37077 Göttingen
www.llg-ev.de

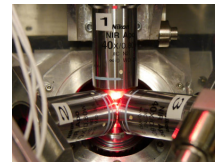


Wir sind die Experten in

Spektroskopie
Raman/SERS/IR/LIBS

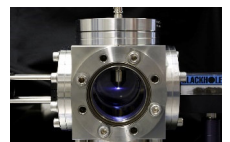


STED- und SMS-
Mikroskopie



Erzeugen kurzer Laser-Pulse
und Nano-Strukturierung

EUV-Quellen und
Strahlpropagation



33