

Polarimetrische Bestimmung von Glucose in Anwesenheit von Störstoffen

Christian Stark, M. Sc.

16.09.2020

1

1. Einleitung und Motivation

Medizinischer Hintergrund

Einleitung und Motivation

Grundlagen

Material und Methoden

Ergebnisse

Zusammenfassung, Diskussion und Ausblick

Blutgasanalyse

pH

pO₂

sO₂

Hb

Laktat

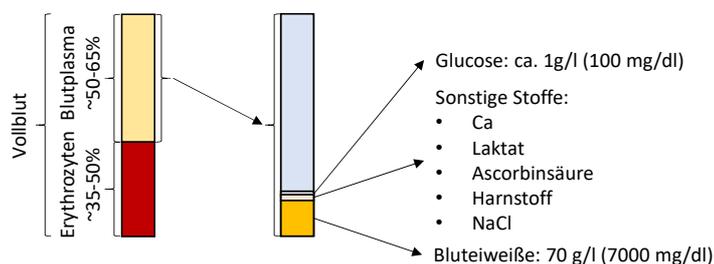
Glucose

Diabetes

→ Regulierung gestört

→ regelmäßige Kontrolle nötig

Schwierigkeiten



→ Heute gängig:
Enzymatische Messmethoden

2

1. Einleitung und Motivation

Glucose-Messverfahren – Stand der Technik

Einleitung und Motivation

Grundlagen

Material und Methoden

Ergebnisse

Zusammenfassung, Diskussion und Ausblick

Heute gängig: enzymatische Bestimmung

- + Etabliertes Verfahren
- Laufende Kosten
- Regelmäßige Wartung nötig
- Schwierige Lagerung der Enzyme

Alternativ: Entwicklung eines **optischen** Verfahrens →

Absorptionsspektroskopie

- + breiter Wellenlängenbereich
- + etablierte Auswertverfahren (multivariate Datenanalyse)
- nur schwache Absorption im NIR und MIR
- wenig sensitive Hardware
- hohe Wasserabsorption im NIR und MIR

Polarimetrie

- + hohes Signal im VIS
- + vernachlässigbare Wasserabsorption im VIS
- + sensitivere Hardware
- Empfindlich gegenüber Streuung und Absorption
- spektrale Überlagerung mit anderen Komponenten (insbesondere Eiweiße)

3

1. Einleitung und Motivation

Glucose-Messverfahren – Stand der Technik

Einleitung und Motivation

Grundlagen

Material und Methoden

Ergebnisse

Zusammenfassung, Diskussion und Ausblick

Breitbandpolarimetrie

- + hohes Signal im VIS
- + sensitivere Hardware
- + geringe Wasserabsorption
- + breiter Wellenlängenbereich
- + etablierte Datenauswertung
- ~~- nur schwache Absorption im NIR und MIR~~
- ~~- wenig sensitive Hardware~~
- ~~- hohe Wasserabsorption im NIR und MIR~~
- Empfindlich gegenüber Streuung und Absorption
- spektrale Überlagerung mit anderen Komponenten (insbesondere Eiweiße)

Absorptionsspektroskopie

- + breiter Wellenlängenbereich
- + etablierte Auswertverfahren (multivariate Datenanalyse)
- nur schwache Absorption im NIR und MIR
- wenig sensitive Hardware
- hohe Wasserabsorption im NIR und MIR

←

Aufgaben
• Kons
• Redu
• Unte
aktiv
• Best

Polarimetrie

- + hohes Signal im VIS
- + vernachlässigbare Wasserabsorption im VIS
- + sensitivere Hardware
- Empfindlich gegenüber Streuung und Absorption
- spektrale Überlagerung mit anderen Komponenten (insbesondere Eiweiße)

eters

4

2. Grundlagen

Optische Aktivität

Einleitung und Motivation

Grundlagen

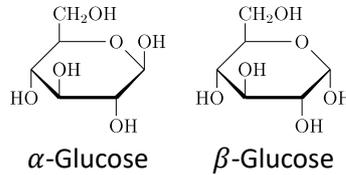
Material und Methoden

Ergebnisse

Zusammenfassung, Diskussion und Ausblick

Optisch aktive Moleküle

- Chiralität (Spiegelbildisomere)
- Glucose: α - und β -Glucose

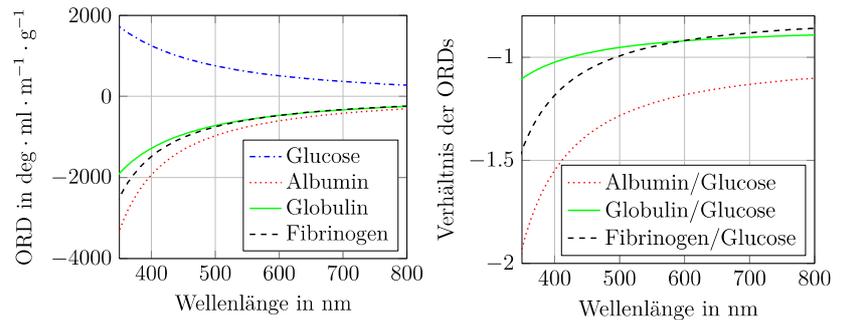


Rotationsdispersion nach Drude-Gleichung [QUELLE]

$$\alpha_\lambda = \frac{A}{\lambda^2 - \lambda_c^2}$$

A : Konstante
 λ_c : Resonanzwellenlänge
 α_λ : Spezifischer Drehwinkel

Stoff	A	λ_c in nm
Glucose	$1,72 \cdot 10^7$	150
Albumin	$-1,75 \cdot 10^7$	264
Globulin	$-1,48 \cdot 10^7$	211
Fibrinogen	$-1,37 \cdot 10^7$	260



5

2. Grundlagen

Polarimeterprinzip - Polarisationszustände

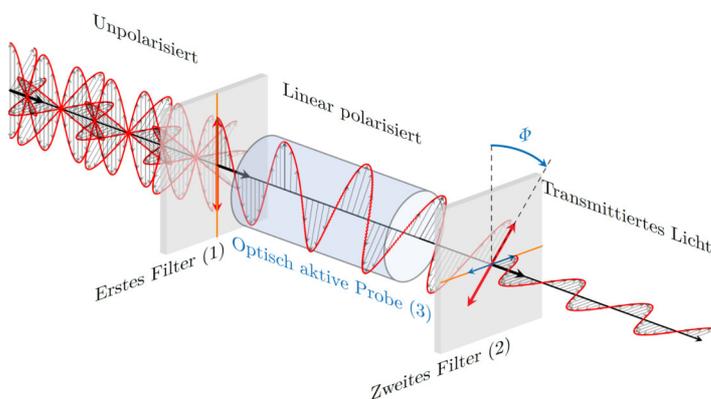
Einleitung und Motivation

Grundlagen

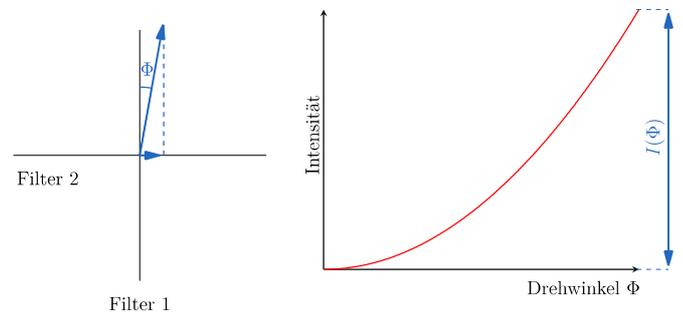
Material und Methoden

Ergebnisse

Zusammenfassung, Diskussion und Ausblick



- Licht wird vom ersten Filter linear polarisiert, das zweite Filter ist gekreuzt
→ vollständige Auslöschung des Lichts
- Durch optisch aktive Probe (Φ) steigt Transmission an



Intensität $I(\Phi)$ berechnet sich durch:

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

6

2. Grundlagen

Polarimeterprinzip - Polarisationszustände

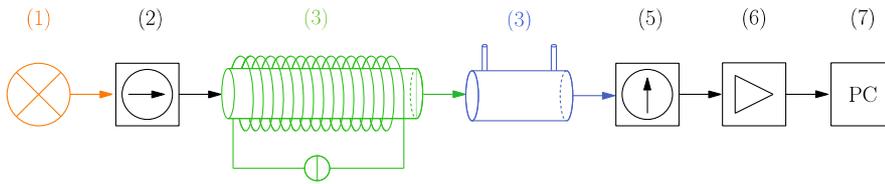
Einleitung und Motivation

Grundlagen

Material und Methoden

Ergebnisse

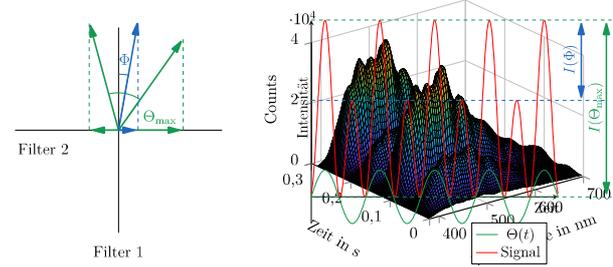
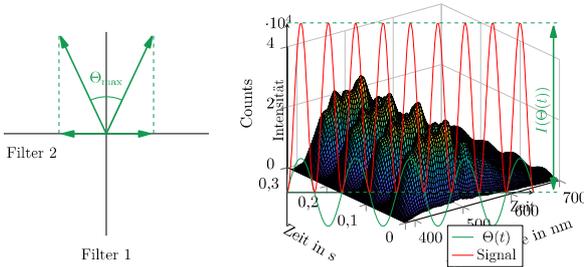
Zusammenfassung, Diskussion und Ausblick



$$I(t) = \sin(\Theta_m \cdot \sin(\omega \cdot t) + \Phi)^2 \cdot I_0$$

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

Θ_m : Modulationstiefe
 ω : Modulationsfrequenz
 Φ : Drehung durch Probe
 I_0 : Grundintensität



7

3. Material und Methoden

Messaufbau

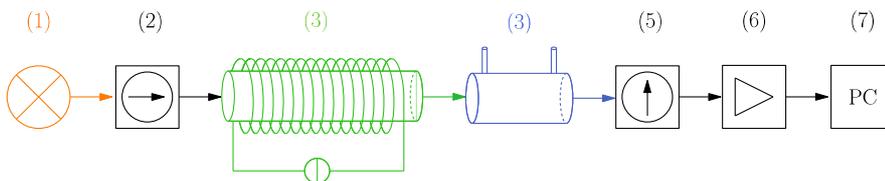
Einleitung und Motivation

Grundlagen

Material und Methoden

Ergebnisse

Zusammenfassung, Diskussion und Ausblick



Bauteil	Anforderungen	Modell
Lichtquelle (1)	Hohe Intensität Ab 350nm hohe Intensität Gute Kollimierbarkeit	Energetiq EQ99X
Polarisationsfilter (2,5)	Hohes Auslöschungsverhältnis Toleranz gegenüber Divergenz	Thorlabs GT10H
Faraday Rotator (3) • Optisches Glas • Elektrische Ansteuerung	Hohe Transmission Hohe Modulationstiefe Stabile Modulation	Eigenbau + SF6
Küvette (4)	Hohe Pfadlänge	Eigenbau
Spektrometer (6)	Hohe, präzise Abtastrate	Avantes ULS2048 EVO
Datenauswertung (7)	Automatische Datenverwertung	Eigene Software

8

3. Material und Methoden

Messaufbau

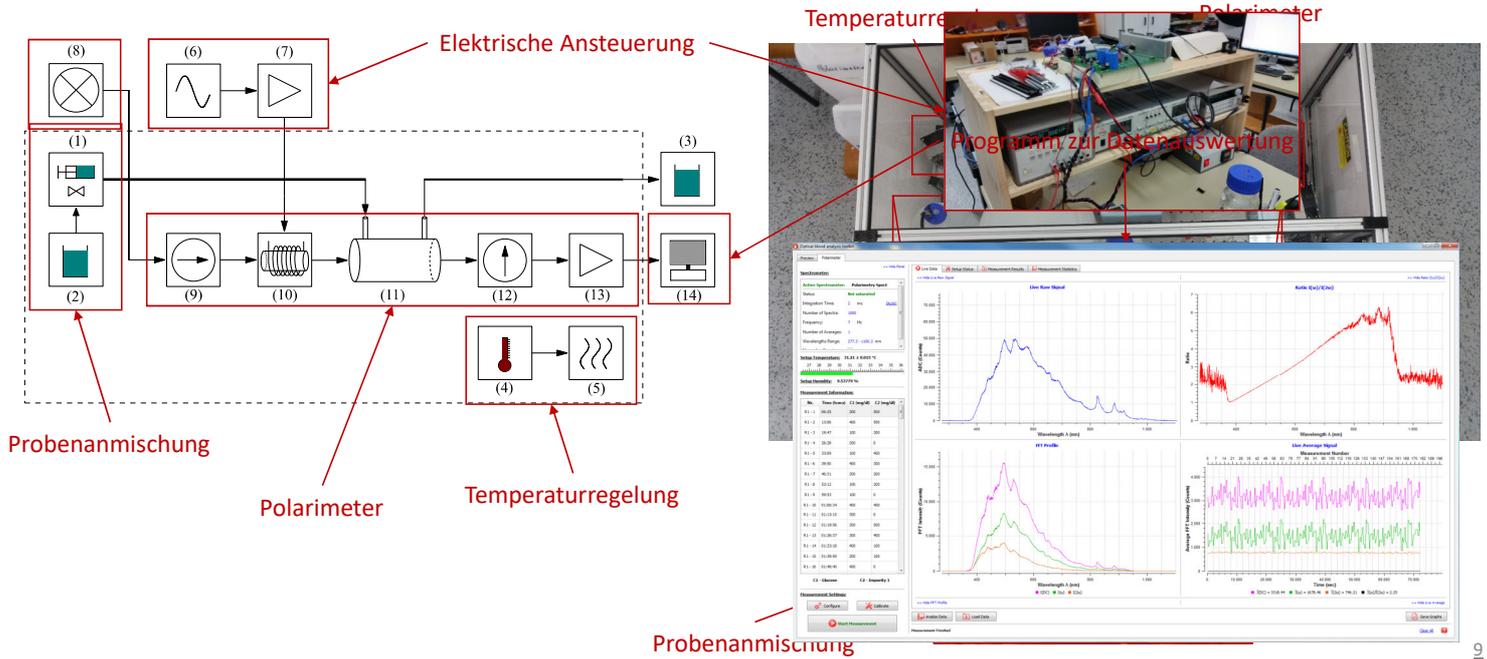
Einleitung und Motivation

Grundlagen

Material und Methoden

Ergebnisse

Zusammenfassung, Diskussion und Ausblick



9

3. Material und Methoden

Messdurchführung

Einleitung und Motivation

Grundlagen

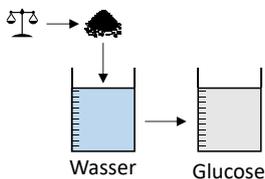
Material und Methoden

Ergebnisse

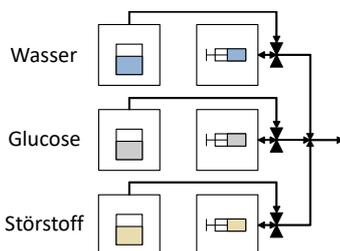
Zusammenfassung, Diskussion und Ausblick

Probenvorbereitung

- Erstellung von Stammlösungen
- Lösen von Pulver in dest. Wasser

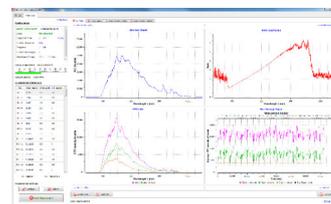


Probenanmischung



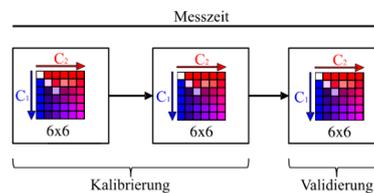
Messung

- Automatische Probenanmischung und Messung
- Automatische Speicherung und Berechnung von $I(\omega)$ und $I(2\omega)$



Konzentrationsbestimmung

- Multivariates Kalibrationsmodell → Validierung mit Testdatensatz



10

3. Material und Methoden

Untersuchung von Störeinflüssen

Einleitung und Motivation

Grundlagen

Material und Methoden

Ergebnisse

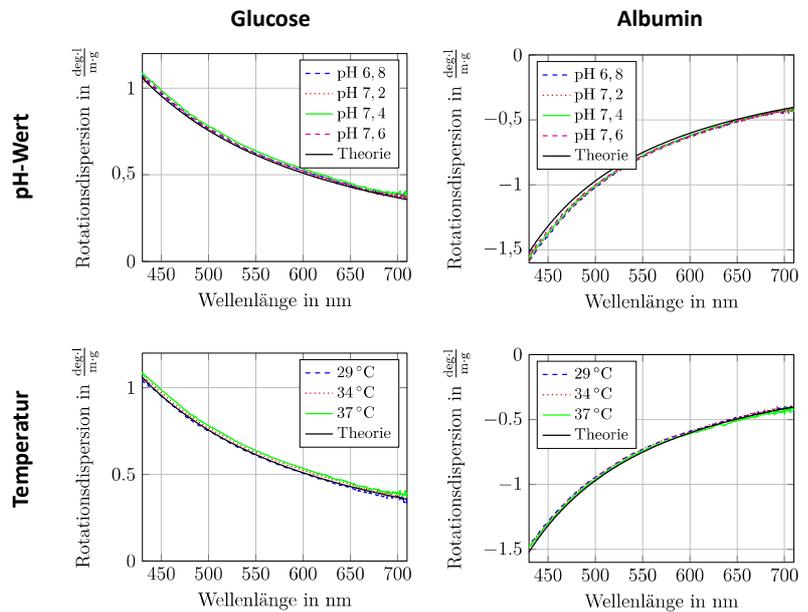
Zusammenfassung, Diskussion und Ausblick

- pH-Wert Einfluss auf Rotationsdispersion**

- Für Glucose und Albumin
- Stimmt mit Theorie überein
- Einfluss sehr gering
- pH-Wert später sehr konstant

- Temperatureinfluss auf Rotationsdispersion**

- Für Glucose und Albumin
- Stimmt mit Theorie überein
- Einfluss sehr gering
- Temperatur später sehr konstant



3. Material und Methoden

Untersuchung von Störeinflüssen

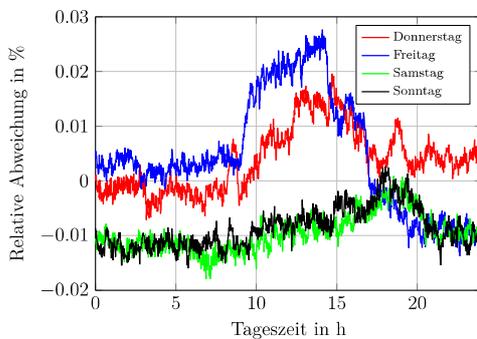
Einleitung und Motivation

Grundlagen

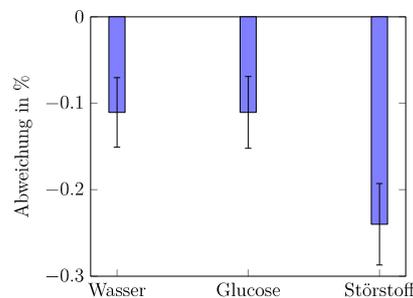
Material und Methoden

Ergebnisse

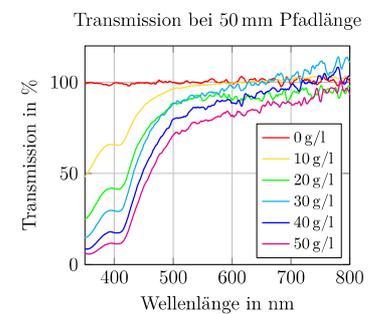
Zusammenfassung, Diskussion und Ausblick



Stromstabilität: ca. $\pm 0,01\%$
→ Störeinfluss vernachlässigbar



Probenanmischungsfehler: $\pm 0,3\%$
→ ebenfalls sehr gering



Absorption durch Albumin: bis 90%
→ **Starker Störeinfluss, muss kompensiert werden**

3. Material und Methoden

Kompensation von Störeinflüssen

Einleitung und Motivation

Grundlagen

Material und Methoden

Ergebnisse

Zusammenfassung, Diskussion und Ausblick

Erinnerung: $I(t) = \left[\frac{\left(\frac{\Theta_m^2}{2} + \Phi^2\right)}{DC} + \frac{2 \cdot \Phi \cdot \Theta_m \cdot \sin(\omega \cdot t)}{\omega} - \frac{\frac{\Theta_m^2}{2} \cdot \cos(2 \cdot \omega \cdot t)}{2\omega} \right] \cdot I_0$

$I(DC) \propto \left(\frac{\Theta_m^2}{2} + \Phi^2\right) \cdot I_0$

$I(\omega) \propto 2 \cdot \Phi \cdot \Theta_m \cdot I_0$

$I(2\omega) \propto \frac{\Theta_m^2}{2} \cdot I_0$

Θ_m : Modulationstiefe
 ω : Modulationsfrequenz
 Φ : Drehung durch Probe
 I_0 : Grundintensität

Daraus folgt:

$I(\omega) \propto 2 \cdot \Phi \cdot \Theta_m \cdot I_0 \rightarrow$ abhängig von Probendrehwinkel Φ , **abhängig** von absoluter Lichtintensität I_0

$\frac{I(\omega)}{I(2\omega)} \propto \frac{2 \cdot \Phi \cdot \Theta_m \cdot I_0}{\frac{\Theta_m^2}{2} \cdot I_0} = 4 \cdot \frac{\Phi}{\Theta_m} \rightarrow$ abhängig von Probendrehwinkel Φ , **unabhängig** von absoluter Lichtintensität I_0

3. Material und Methoden

Kompensation von Störeinflüssen

Einleitung und Motivation

Grundlagen

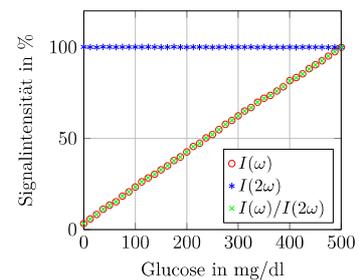
Material und Methoden

Ergebnisse

Zusammenfassung, Diskussion und Ausblick

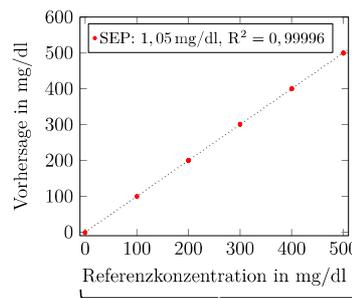
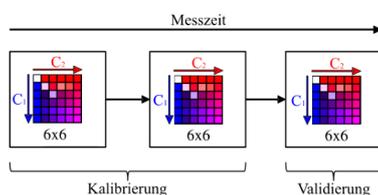
Experimenteller Nachweis: Glucose-Variation von 0-500mg/dl

- Zunächst für bessere Darstellung nur **eine Wellenlänge**
 $\rightarrow I(\omega)$ probenabhängig, $I(2\omega)$ probenunabhängig
 $\rightarrow I(\omega)$ und $\frac{I(\omega)}{I(2\omega)}$ gleiche relative Probenabhängigkeit

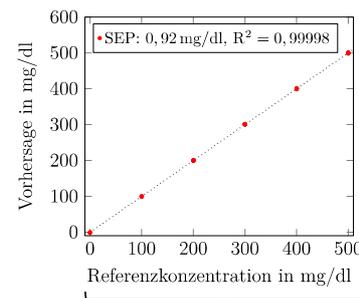


Konzentrationsbestimmung

- drei identische Datensätze zu je 6 x 6 Werten
- zwei für Kalibrierung, dritter für Validierung
- lineare Regression



$I(\omega) \propto 2 \cdot \Phi \cdot \Theta_m \cdot I_0$



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

3. Material und Methoden

Kompensation von Störeinflüssen

Einleitung und Motivation

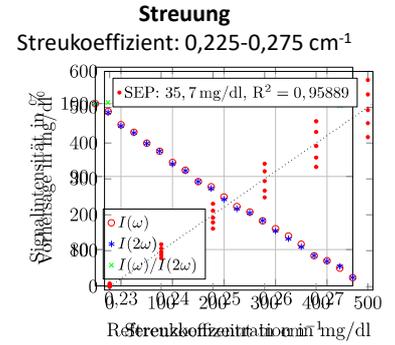
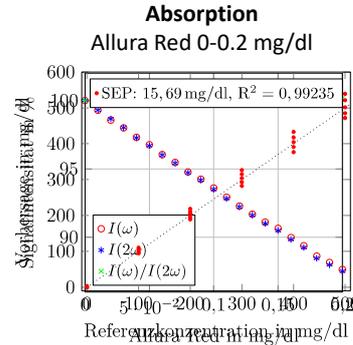
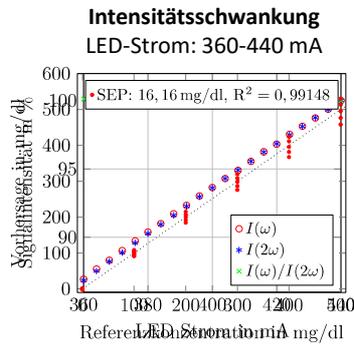
Grundlagen

Material und Methoden

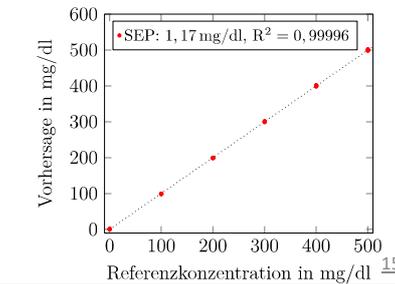
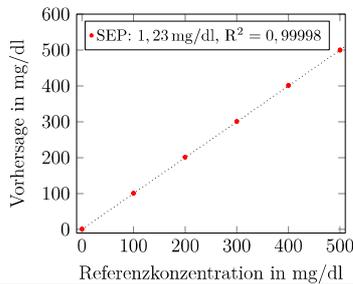
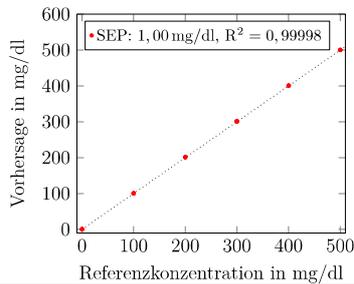
Ergebnisse

Zusammenfassung, Diskussion und Ausblick

$I(\omega)$
Vorhersagegenauigkeit mit unkompensiertem $I(\omega) \propto 2 \cdot \Phi \cdot \Theta_m \cdot I_0$ - Signal für alle Störquellen deutlich verschlechtert



$I(\omega)$
 $I(2\omega)$
Vorhersagegenauigkeit mit Kompensationsverhältnis $\frac{I(\omega)}{I(2\omega)} \propto 4 \cdot \frac{\Phi}{\Theta_m}$ unabhängig von Störung
→ identische Genauigkeit wie ohne Störung



4. Ergebnisse

Messung von Stoffgemischen optisch aktiver Substanzen

Einleitung und Motivation

Grundlagen

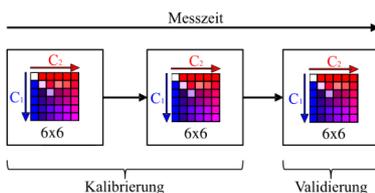
Material und Methoden

Ergebnisse

Zusammenfassung, Diskussion und Ausblick

Messung von Stoffgemischen

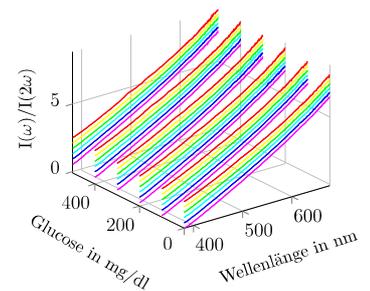
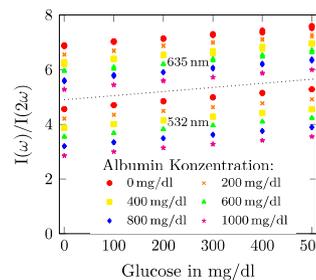
- Albumin repräsentativ für Bluteiweiße (>50% Anteil)
- Erstellung von Konzentrationsmatrizen
- 0-500 mg/dl Glucose
 - + 0-250 mg/dl Albumin (25% physiologische Schwankung)
 - + 0-500 mg/dl Albumin (50% physiologische Schwankung)
 - + 0-1000 mg/dl Albumin (100% physiologische Schwankung)
- Erstellung von 3 Matrizen zu je 6x6 Werten



- Kalibrierung mit Datensatz 1+2, Validierung mit Datensatz 3
- PLS-Regression, 380-680 nm, 5 Komponenten

Überlagerung der Rotationsdispersionen von Glucose und Albumin

- Glucose rechtsdrehend, Albumin linksdrehend
 - Signal steigt mit Glucose-Konzentration an und fällt mit Albumin
 - Bei 1 Wellenlänge Beitrag nicht unterscheidbar
 - Vergleich von 2 Wellenlängensystem (532+635 nm aus Literatur) mit breitbandiger Messung 380-680 nm



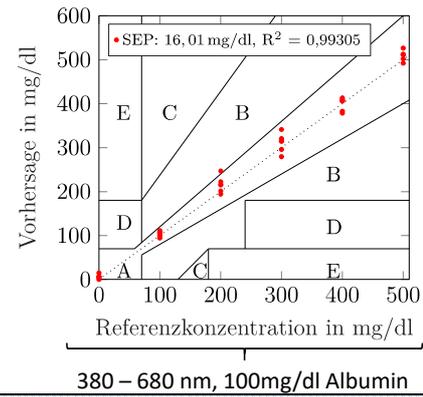
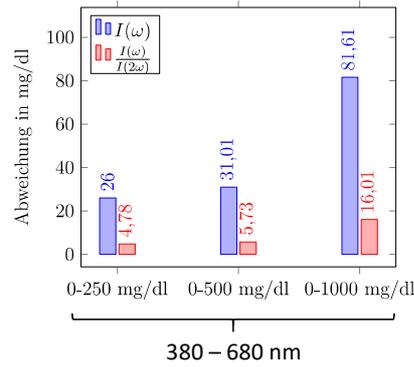
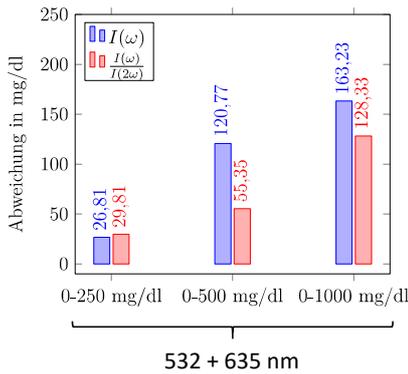
3. Material und Methoden

Kompensation von Störeinflüssen

Konzentrationsbestimmung für 3 verschiedene Stör-Albumin-Konzentrationen

- Fehler steigt mit höherer Albumin-Konzentration an
- Breitbandige Bestimmung deutlich besser als nur 2 Wellenlängen
- Kompensiertes Signal $\frac{I(\omega)}{I(2\omega)}$ deutlich besser als unkompensiertes $I(\omega)$
- Bei 100 % physiologischer Schwankung: $\pm 16,01$ mg/dl Fehler

- 10 mal höhere Albumin-Störkonzentration als in anderen Arbeiten (1000 mg/dl statt 100 mg/dl)
- Fehler trotzdem geringer (± 16 statt ± 20 mg/dl)



3. Material und Methoden

Kompensation von Störeinflüssen

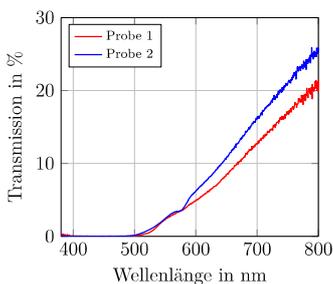
Konzentrationsbestimmung in Humanproben

- Verwendung verworfener Blutproben (Institut für Transfusionsmedizin, Uni Lübeck)
- Zentrifugation zur Abtrennung von Blutplasma (Streukoeffizient ca. 1 cm^{-1} statt ca. 100 cm^{-1})

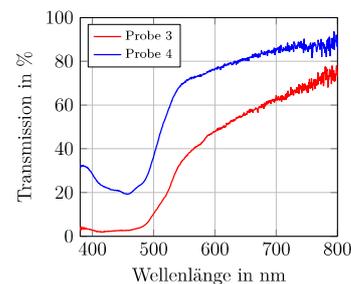
Überprüfung der Restintensität

- beeinflusst durch Absorption und Streuung
- Intensität unter 500 nm ca. 1%

- Restintensität deutlich größer
- Stark abhängig von Probe

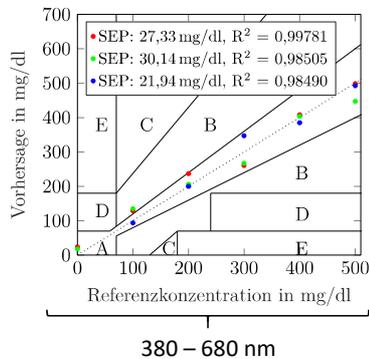


Reduktion der Pfadlänge von 50 mm auf 10 mm



Konzentrationsbestimmung in Humanproben

- Dotieren von Proben mit 0-500 mg/dl (Blutproben enthalten Glucose durch CPD-Puffer)



→ Vorhersagefehler: ca. ± 30 mg/dl

→ Bereiche A oder B in Clarke's Error Grid

Zusammenfassung und Diskussion

- Faraday-moduliertes Breitbandpolarimeter entworfen, optimiert und evaluiert
- Alle Einzelbauteile im Bezug auf Störanfälligkeit optimiert
- Störquellen identifiziert und den Beitrag charakterisiert
- Höchste Genauigkeit aller bekannten Polarimeter ohne Störeinflüsse $\approx \pm 1$ mg/dl
- Erstmalige Messung unabhängig von Intensitätsschwankungen, Absorption und Streuung in Echtzeit durch $\frac{I(\omega)}{I(2\omega)}$
- Nachweis von Unterscheidbarkeit der Rotationsdispersionen von Glucose und Albumin (10x höheres Albumin Level als bisher)
- Erstmalige Messung von Glucose in menschlichem Blutplasma ($\approx \pm 30$ mg/dl)

3. Material und Methoden

Kompensation von Störeinflüssen

Einleitung und Motivation

Grundlagen

Material und Methoden

Ergebnisse

Zusammenfassung, Diskussion und Ausblick

Ausblick

- Bisherige Grenze: kein Signal durch zu große Streuung → kein Vollblut
 - bei hoher Streuung: in Rückstreuung messen
 - für zukünftige Messungen: Modifikation des Messaufbaus
- Einfachere Version mit einer Wellenlänge für interstitielle Flüssigkeit denkbar (Implantierbar)
- Ergebnisse auch Anwendbar auf andere Bereiche
 - Z.B. Lebensmittelindustrie: Zuckerbestimmung in streuenden oder absorbierenden Medien $\frac{I(\omega)}{I(2\omega)}$

Fragen?

