

**Untersuchungen zur Implementierung der
Raman-Spektroskopie für die Diagnostik am
Innenohr**

Martin Ulrich Höhl

2019

Untersuchungen zur Implementierung der Raman-Spektroskopie für die Diagnostik am Innenohr

Von der Fakultät für Mathematik und Physik
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation von

M.Sc. Martin Ulrich Höhl

2019

Referent: Prof. Dr. Uwe Morgner - Institut für Quantenoptik

Korreferent: Prof. Dr. Bernhard Roth - Hannoversches Zentrum für Optische Technologien

Korreferent: Prof. Dr. Theodor Doll - Fraunhofer-Institut für Toxikologie und Experimentelle Medizin

Tag der Promotion: 22.02.2019

Für Alexandra

Kurzzusammenfassung

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Anwendung von Raman-Spektroskopie als Hilfsmittel in der klinischen Diagnostik von Hörbeeinträchtigungen. Erst seit kurzem ist bekannt, dass die pathophysiologischen Parameter, die den verschiedenen Krankheitsbildern zugeordnet werden können, mit Konzentrationsänderungen bestimmter Innenohrproteine korrelieren. Untersuchungen dieser Proteine sind bisher nur invasiv (durch Probenentnahme) möglich. Das Ziel war die experimentelle Etablierung einer nichtinvasiven Spektroskopie zur Identifizierung dieser Moleküle durch die Rundfenstermembran hindurch, die das Innenohr nach außen abschließt. Zunächst wurden die optischen Eigenschaften dieser Membran bestimmt, um die für die Raman-Spektroskopie optimale Anregungswellenlänge von Proteinen durch die Membran zu ermitteln. Die technische Umsetzung der Spektroskopie im Innenohr wurde aufgrund des geringen Platzes im Ohr über ein maßgeschneidertes Glasfaserbündel realisiert. Die Spitze des Bündels besteht aus verschiedenen Optiken, die die Anregung und Einsammlung von Raman-gestreutem Licht optimieren.

Neben den experimentellen Aspekten wurde zum einen ein Algorithmus zur Datennachbearbeitung entwickelt, der die Raman-Spektren unter anderem von Störeinflüssen befreit hat, zum anderen ist mittels multivariater Datenanalyse eine Methode etabliert worden, mit der Raman-Spektren ausgewertet werden können, um die chemische Zusammensetzung der dem Spektrum zugrundeliegenden Probe zu bestimmen.

Anhand der Messung und multivariaten Analyse der Raman-Spektren von Hitzeschockproteinen wurde die prinzipielle Funktionsweise der nichtinvasiven Diagnostik von Hörbeeinträchtigungen mithilfe von Raman-Spektroskopie demonstriert.

Schlagwörter: Raman-Spektroskopie, Glasfaserbündel, Rundfenstermembran, Aminosäure, Hitzeschockprotein, Perilymphe, multivariate Datenanalyse

Abstract

In this work, the utilization of Raman spectroscopy as a tool for the clinical diagnosis of hearing impairments is evaluated. Only recently it is known that the pathophysiological parameters associated to specific kinds of diseases are correlated to changes in concentrations of inner ear proteins. So far, investigations of these proteins can only be performed invasively (via extraction of samples). The goal was the development of an experimental approach aiming at noninvasive spectroscopy to identify the relevant molecules through the round window membrane which closes the inner ear from the outside. For determining the optimal excitation wavelength for Raman spectroscopy, the optical properties of this membrane were measured. Due to the little space inside the ear, the technical implementation of Raman spectroscopy for inner ear application was done via a fiber optic probe. The tip of the probe consists of several optics optimizing the excitation and collection efficiencies of Raman scattered light. In addition to the experimental approach, an algorithm for data postprocessing was developed for removing any disturbing influences on the collected Raman signals. Furthermore, multivariate data analysis was evaluated for interpreting Raman spectra to obtain the underlying chemical constitution of the samples under study. By means of measuring and analyzing the Raman spectra of heat shock proteins, the working principle of the noninvasive diagnosis of hearing impairment via Raman spectroscopy was demonstrated.

Keywords: Raman spectroscopy, fiber optic probe, round window membrane, amino acid, heat shock protein, perilymph, multivariate data analysis

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Grundlagen der Vibrationsspektroskopie	5
2.1	Wechselwirkungen in der Spektroskopie	5
2.2	Von der Symmetrie zum Spektrum	7
2.3	Anwendbarkeit der Vibrationsspektroskopie im Innenohr	9
3	Die menschliche Rundfenstermembran	11
3.1	Optische Eigenschaften der Rundfenstermembran	12
3.1.1	Geometrische Betrachtungen	12
3.1.2	Transmission	17
3.1.3	Elastische Streuung	22
3.1.4	Raman-Streuung	26
4	Resonanz-Raman-Spektroskopie	29
4.1	Absorption und Resonanz	29
4.2	Experimentelle Umsetzung	32
4.2.1	Experimenteller Aufbau	33
4.2.2	Kalibration des Aufbaus	35
4.3	Anregungs-Emissions-Karten	42
4.3.1	Datennachbearbeitung	43
4.3.2	Resonanzprofile	46
5	Multivariate Datenanalyse in der Raman-Spektroskopie	49
5.1	Mathematische Grundlagen	50
5.1.1	Hauptkomponentenanalyse	50
5.1.2	Partial Least Square-Regression	51
5.2	Multivariate Analyse von Aminosäuren	52
5.2.1	Partial Least Square-Regression von zwei Aminosäuren	56
5.2.2	Partial Least Square-Regression von drei Aminosäuren	63
5.2.3	Partial Least Square-Regression von vier Aminosäuren	66

6	Glasfasergestützte Raman-Spektroskopie	73
6.1	Fluoreszenz und Raman-Streuung in Glasfasern	73
6.2	Maßgeschneiderte Glasfaserbündel	77
7	Glasfasergestützte Analyse von Aminosäuren	81
7.1	Experimenteller Aufbau	81
7.2	Multivariate Analyse von Pulvern	82
7.2.1	Regressionsmodell mit zwei Aminosäuren	84
7.2.2	Regressionsmodell mit drei Aminosäuren	86
8	Multivariate Analyse von Innenohrproteinen	91
8.1	Hitzeschockproteine	91
8.2	Wahl der optimalen Anregungswellenlänge	93
8.3	Messung pathophysiologischer Parameter	95
8.3.1	Raman-Spektroskopie von Hitzeschockproteinen	96
8.3.2	Regressionsmodell	97
9	Zusammenfassung und Ausblick	101
	Literatur	105
	Liste der Publikationen	113
	Abbildungsverzeichnis	115
	Tabellenverzeichnis	119
	Abkürzungsverzeichnis	121
	Symbolverzeichnis	123
	Lebenslauf	125
	Danksagung	127
	Selbstständigkeitserklärung	129

1 Einleitung

Bei der Interaktion mit seiner Umgebung ist der Mensch auf seine verschiedenen Wahrnehmungsorgane angewiesen. Das Hörvermögen, also die Aufnahme, Verarbeitung und Interpretation von akustischen Signalen (Schallwellen), spielt dabei eine zentrale Rolle. Beeinträchtigungen des Hörvermögens, nicht nur infolge des Alterungsprozesses, erfordern aufgrund ihrer Vielfältigkeit eine individuelle Diagnostik. Da es in der Regel keine präventiven Maßnahmen gegen die Abnahme bzw. den Verlust des Hörvermögens gibt, wurden vielfältige Ansätze verfolgt, dem Nachlassen des Hörvermögens entgegenzuwirken. Diese reichen von herkömmlichen Hörgeräten bis hin zu Implantaten, die eine direkte Kommunikation mit dem Gehirn ermöglichen.¹ Während es sich bei dem Letztgenannten um ein invasives Verfahren handelt, wird vermehrt versucht, über nichtinvasive Methoden, insbesondere in der Diagnostik, die Belastung für den menschlichen Körper so gering wie möglich zu halten.

Der Einsatz von optischen Verfahren in der medizinischen Diagnostik bietet ein vielseitiges Potenzial, insbesondere im Hinblick auf eine nichtinvasive (zerstörungsfreie) Untersuchung von Gewebe und Flüssigkeiten. Techniken, wie beispielsweise die optische Kohärenztomografie [engl.: optical coherence tomography] (OCT)² oder fotoakustische Tomografie,³ ermöglichen eine tiefenaufgelöste Darstellung von Gewebe. Diese nichtinvasiven bildgebenden Verfahren besitzen allerdings den Nachteil, dass die maximale Eindringtiefe nur wenige mm beträgt. Für eine nichtinvasive Diagnostik des Hörvermögens ist eine höhere Eindringtiefe erforderlich, da viele Ursachen des Hörverlusts ihren Ursprung im Mittel- oder Innenohr haben. Als ein pathophysiologischer Parameter konnte die chemische Zusammensetzung der Innenohrflüssigkeit, der Perilymphe, ausgemacht werden.⁴ Sie besteht im Wesentlichen aus Wasser und Proteinen, aber auch Aminosäuren sowie Ionen sind darin enthalten. Die Analyse der Zusammensetzung der Perilymphe erfolgt bislang nach Entnahme der Flüssigkeit während eines medizinischen Eingriffs, beispielsweise bei dem Einsetzen eines Cochlea-Implantats, durch anschließende Massenspektrometrie.^{4,5} Diese Technik bietet eine deutlich höhere Sensitivität im Vergleich zu optischen Verfahren und ist in der Lage, kleine Volumina ($\sim \mu\text{l}$) zu untersuchen. Allerdings können nur geringe Mengen an Perilymphe entnommen werden, da diese für den Hörvorgang essentiell ist. In der Regel wird nur bei Patienten Perilymphe entnommen, bei denen bereits

eine Beeinträchtigung des Hörvermögens diagnostiziert wurde. Aus diesen Gründen wäre die Etablierung einer nichtinvasiven Diagnostik wünschenswert.

Zu diesem Zweck wurde im Rahmen dieser Arbeit die Anwendung der Raman-Spektroskopie (RS) hinsichtlich der nichtinvasiven Analyse biologischer Flüssigkeiten evaluiert. Durch das Messen des Raman-Spektrums einer Probe wird deren biochemischer Fingerabdruck erstellt, ohne dass die Probe verändert wird. Die anhand des Fingerabdrucks gewonnenen Informationen reichen von der Identifikation der Bestandteile und deren Konzentrationen in einer Probe,⁶ der Charakterisierung (z. B. Bindung von Medikamenten oder Adsorption von Molekülen an Oberflächen)^{7,8} und der molekularen Struktur von Stoffen⁹⁻¹¹ bis zu der Faltung von Molekülen¹² sowie dem Schaltverhalten von Proteinkanälen.¹³ In der medizinischen Diagnostik hat diese Technik bereits ein breites Anwendungsfeld gefunden.¹⁴⁻¹⁸ Ein nichtinvasiver Zugang zur Perilymphe mittels optischer Technologie ist nur durch die Rundfenstermembran (RFM) möglich. Diese Membran verschließt die Cochlea an einem von zwei Zugängen. Die andere Seite wird von dem ovalen Fenster verschlossen. Da sich daran aber die Gehörknöchelchen anschließen, ist dort kein geeigneter Zugang zum Innenohr gegeben. Daher fand die Erprobung der RS unter diesen Randbedingungen statt. Hierzu zählen vor allem die Bestimmung der optimalen Anregungswellenlänge für die Spektroskopie unter Berücksichtigung der optischen Eigenschaften (z. B. Transmission) der RFM sowie die technische Umsetzung einer effizienten Messung von Raman-Spektren im Innenohr. Für die optische Charakterisierung der RFM wurden verschiedene humane Membranen *ex vivo* untersucht. Eine Raman-spektroskopische Analyse der Perilymphe unter klinischen Bedingungen erfordert eine räumlich begrenzte Einkopplung von Licht in das Innenohr. Deshalb wurde ein spezielles Glasfaserbündel für die effiziente Anregung und Einsammlung von Raman-gestreutem Licht entwickelt.

Neben der experimentellen Umsetzung der RS in der Diagnostik wurde nach einer Möglichkeit gesucht, das Raman-Spektrum einer Perilymph-Probe dem entsprechenden Krankheitsbild zuzuordnen zu können. Für diese Aufgabe wurde die multivariate Datenanalyse herangezogen.¹⁹ Hierbei handelt es sich um eine mathematische Methode, die in der Lage ist, Raman-Spektren so zu interpretieren, dass physikalische Größen daraus abgeleitet werden können. Werden die einzelnen Bestandteile der Perilymphe Raman-spektroskopisch erfasst, lässt sich aus den Spektren ein mathematisches Modell erstellen, das die entsprechenden Konzentrationen aus den Spektren von unbekanntem Proben ableiten kann. Die Evaluation erfolgte durch die Vorhersage der Konzentrationen von Aminosäuren in wässriger Lösung und dem Vergleich mit den tatsächlichen Konzentrationen. Die glasfasergestützte Bestimmung der Konzentrationen von Innenohrproteinen mittels RS demonstriert schließlich die Anwendbarkeit dieser Technik in der medizinischen Diagnostik des Hörvermögens.

Die vorliegende Arbeit ist folgendermaßen strukturiert:

Im Kapitel „Grundlagen der Vibrationsspektroskopie“ wird beschrieben, wie mithilfe von Licht der chemische Fingerabdruck eines Moleküls gewonnen werden kann. Anschließend wird die Anwendbarkeit der Vibrationsspektroskopie im Innenohr diskutiert.

Die optischen Eigenschaften der RFM werden im Kapitel „Die menschliche Rundfenstermembran“ vorgestellt. Von besonderer Bedeutung sind die Transmission und das Streuvermögen der Membran.

Das Kapitel „Resonanz-Raman-Spektroskopie“ stellt zunächst den experimentellen Aufbau vor, mit dem unterschiedliche Arten von Biomolekülen untersucht wurden. Im Weiteren wird beschrieben, wie die gemessenen Raman-Spektren bearbeitet werden, um sie untereinander vergleichbar zu machen. So kann beispielsweise die optimale Anregungswellenlänge für RS bestimmt werden. Die Funktionsweise wird anhand zweier Aminosäuren gezeigt.

Im Kapitel „Multivariate Datenanalyse in der Raman-Spektroskopie“ wird zunächst der mathematische Hintergrund der Methode erklärt. Anschließend wird am Beispiel verschiedener Probenmischungen die Fähigkeit demonstriert, mithilfe eines mathematischen Modells die Konzentrationen von Biomolekülen aus Raman-Spektren zu berechnen.

Um die RS in der klinischen Diagnostik einsetzen zu können, muss eine flexible und miniaturisierte Zuführung von Licht, gekoppelt mit einer Möglichkeit zur effizienten Einsammlung des gestreuten Lichts gegeben sein. Im Kapitel „Glasfasergestützte Raman-Spektroskopie“ werden die Herausforderungen bezüglich dieses Vorhabens diskutiert und ein maßgeschneidertes Bündel aus Glasfasern vorgestellt, mit dem die RS den Einzug in die Innenohrdiagnostik finden sollte.

Die Evaluation des Bündels wird im Kapitel „Glasfasergestützte Analyse von Aminosäuren“ durchgeführt.

Das Kapitel „Multivariate Analyse von Innenohrproteinen“ stellt zunächst zwei Proteine der Perilymphe vor. Anhand der multivariaten Auswertung der Raman-Spektren dieser Proteine wird schließlich die nichtinvasive Messung von pathophysiologisch relevanten Parametern gezeigt.

Abschließend werden in der Zusammenfassung die bisherigen Ergebnisse resümiert und ein Ausblick auf die weitere Anwendung der RS in der Diagnostik von Hörbeeinträchtigungen gegeben.

2 Grundlagen der Vibrationsspektroskopie

In den letzten Jahren haben sich optische Methoden zu einer festen Größe in der Untersuchung und Charakterisierung verschiedenster Materialien entwickelt. Die Wechselwirkung von Licht mit Materie gibt Aufschluss über deren räumliche Anordnung und chemische Zusammensetzung. In der Spektroskopie macht man sich im Allgemeinen die Absorption und Streuung von Licht zunutze, um den chemischen Fingerabdruck (Spektrum) einer Probe zu erhalten.

Die spektroskopischen Verfahren lassen sich anhand der ihnen zugrunde liegenden physikalischen Prozesse in zwei Gruppen einteilen. Zum einen betrachtet man die Extinktion bestimmter Wellenlängen beim Durchgang durch ein Medium (z. B. Infrarotspektroskopie), zum anderen das Entstehen neuer Wellenlängen aufgrund des Auftretens von Lumineszenz (z. B. Fluoreszenzspektroskopie) oder unelastischer Streuung (z. B. RS). Jedes dieser Verfahren liefert ein für die Probe charakteristisches Spektrum. Die von einem Molekül emittierte Fluoreszenz ist spektral deutlich breiter und dadurch unspezifischer als Licht, das infolge von Raman-Streuung entstanden ist. Da für die Analyse der Perilymphe eine Vielzahl von unterschiedlichen Proteinen untersucht werden soll, kommt die Fluoreszenzspektroskopie nicht in Frage.

Im Folgenden wird zunächst anhand der Infrarot- und RS erläutert, wie mithilfe von Licht die Zusammensetzung einer unbekanntem Flüssigkeit ermittelt werden kann. Beide Verfahren basieren auf Vibrationsmoden, die für das zu untersuchende Molekül charakteristisch sind. Im Anschluss werden beide Verfahren im Hinblick auf ihre Anwendbarkeit in der nichtinvasiven Analyse der Perilymphe bewertet.

2.1 Wechselwirkungen in der Spektroskopie

Die physikalischen Grundlagen der Vibrationsspektroskopie werden im Folgenden kurz erklärt. Eine theoretische Beschreibung findet sich in der Literatur.²⁰⁻²² Der Raman-Effekt beschreibt die unelastische Streuung eines Photons an einem Objekt, z. B. einem Molekül. Bei diesem Prozess induziert das einfallende Photon ein oszillie-

rendes Dipolmoment im Molekül und es findet ein Austausch von Energie zwischen dem streuenden Photon und dem Molekül statt. Im Gegensatz zur Absorption eines Photons findet die Streuung an einem virtuellen Niveau statt. Anhand eines Jablonski-Diagramms werden die in dieser Arbeit relevanten Wechselwirkungsprozesse erklärt (siehe Abbildung 2.1).

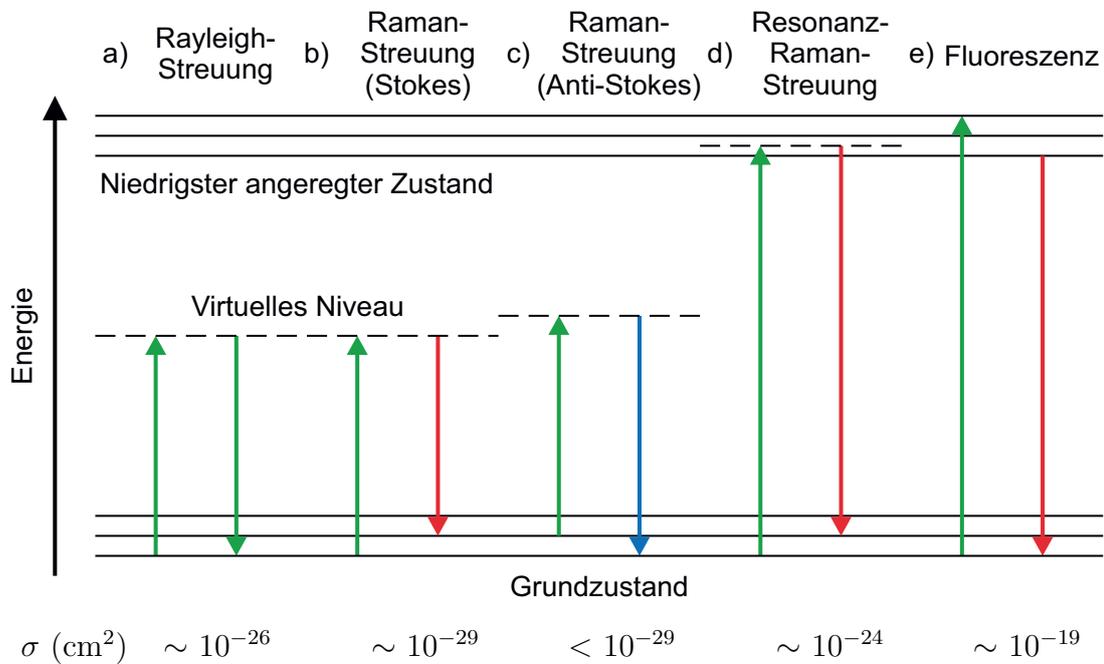


Abbildung 2.1: Die Abbildung zeigt das Jablonski-Diagramm für die in dieser Arbeit relevanten Wechselwirkungsprozesse. Die entsprechenden Wirkungsquerschnitte σ sind zum weiteren Vergleich angegeben.²³

Als weiterer Vergleich sind die zugehörigen Wirkungsquerschnitte σ angegeben.²³ Die Länge eines Pfeils ist ein Maß für die Energiemenge, die bei einem bestimmten Übergang ausgetauscht wird. Ausgehend vom Grundzustand geht bei der Rayleigh-Streuung ein Elektron in einen virtuellen Zustand über und von dort wieder in den Grundzustand zurück. Da es sich hier um einen elastischen Prozess handelt, findet kein Austausch von Energie statt (Abbildung 2.1 a). Bei der Raman-Streuung geht ein Teil der Energie des Photons auf das Molekül über und regt es zu einer bestimmten Schwingung an (Abbildung 2.1 b). Letztere ist ein Eigenzustand des Moleküls, der sich durch das Auftreten einer neuen (größeren) Wellenlänge neben der Anregungswellenlänge im detektierten Spektrum äußert. Man spricht in diesem Fall von einer Stokes-Verschiebung und bezeichnet den Prozess als normale Raman-Streuung. Abhängig von der Komplexität des Moleküls treten unterschiedlich viele Schwingungen auf, die anhand des Raman-Spektrums einzelnen Molekülbindungen

zugeordnet werden können. Auf diese Weise lässt sich mithilfe des Raman-Spektrums der chemische Fingerabdruck des Moleküls ermitteln. In der RS können auch kürzere Wellenlängen als die eingestrahlte Wellenlänge beobachtet werden. Befindet sich das Molekül bereits in einem angeregten Vibrationszustand, so kann ein streuendes Photon die der Schwingung entsprechende Energie aufnehmen (Anti-Stokes-Verschiebung, Abbildung 2.1 c). Diese Form der Raman-Streuung bietet den Vorteil, dass die gemessenen Spektren frei von Fluoreszenz sind. Allerdings ist der Wirkungsquerschnitt für diesen Raman-Prozess deutlich kleiner als bei der normalen Raman-Streuung. Ein Spezialfall der Raman-Streuung tritt auf, wenn die Anregungswellenlänge mit einem Absorptionsband des Moleküls zusammenfällt oder sich in der Nähe davon befindet (Abbildung 2.1 d). In dieser sogenannten Resonanz-Raman-Spektroskopie (RRS) werden elektronische Resonanzen des Analyten genutzt, was zu einer erheblichen Steigerung der Raman-gestreuten Intensität führt.^{24,25} Abhängig vom Absorptionsspektrum des Analyten wird in der RS auch die Emission von Fluoreszenz beobachtet, die aufgrund ihres Wirkungsquerschnitts einen signifikanten Anteil an der gemessenen Intensität ausmachen kann (Abbildung 2.1 e). Nach dem Übergang in ein höheres (elektronisches) Energieniveau findet zunächst eine strahlungslose Relaxation in ein energetisch niedrigeres elektronisches Niveau statt (interne Konversion). Im Anschluss daran geht das Elektron unter Emission eines langwelligeren Photons in den Grundzustand über.

2.2 Von der Symmetrie zum Spektrum

Nicht alle Molekülschwingungen tragen zum gemessenen Raman-Spektrum bei, nicht alle sind also Raman-aktiv. Damit eine Molekülschwingung Raman-aktiv ist, muss die Änderung der molekularen Polarisierbarkeit α an der Gleichgewichtsposition von Null verschieden sein $[(\partial\alpha/\partial q)_0 \neq 0]$.²⁰ Dabei ist q die Normalkoordinate der entsprechenden Schwingung. Ist eine Molekülschwingung nicht Raman-aktiv, kann sie aber infrarot-aktiv sein, wenn die Änderung des molekularen Dipolmoments μ an der Gleichgewichtsposition ungleich Null ist $[(\partial\mu/\partial q)_0 \neq 0]$.²⁰ In diesem Fall kann die Schwingung mittels Infrarotspektroskopie gemessen werden. Je nach Anordnung der Atome in einem Molekül kann eine Schwingung sowohl Raman- als auch infrarot-aktiv sein.

Diese Unterscheidung kann anhand von Symmetrien, die bei den Schwingungen vorliegen, veranschaulicht werden. Im Folgenden wird an drei unterschiedlichen Beispielmolekülen gezeigt, wann eine Schwingung nur Raman-aktiv bzw. infrarot-aktiv ist oder beide Charakteristika zeigt.

	a)	b)	c)
Vibrationsmode			
Molekulares Dipolmoment	$\left(\frac{\partial \mu}{\partial q}\right)_0 = 0$ Infrarot-inaktiv	$\left(\frac{\partial \mu}{\partial q}\right)_0 \neq 0$ Infrarot-aktiv	$\left(\frac{\partial \mu}{\partial q}\right)_0 \neq 0$ Infrarot-aktiv
Molekulare Polarisierbarkeit	$\left(\frac{\partial \alpha}{\partial q}\right)_0 \neq 0$ Raman-aktiv	$\left(\frac{\partial \alpha}{\partial q}\right)_0 = 0$ Raman-inaktiv	$\left(\frac{\partial \alpha}{\partial q}\right)_0 \neq 0$ Raman-aktiv

Abbildung 2.2: Dargestellt sind Beispiele der verschiedenen Vibrationsmoden unterschiedlicher Moleküle unter Angabe ihrer Raman- bzw. infrarot-Aktivität.²⁰

Der einfachste Fall ist ein homonukleares zweiatomiges Molekül (z. B. H_2), das in Abbildung 2.2 a) schematisch dargestellt ist. Es besitzt nur eine Vibrationsmode. Die Symmetrie der Elektronenverteilung dieser Konfiguration ändert sich während der Schwingung nicht. Daher verschwindet die Änderung des molekularen Dipolmoments an der Gleichgewichtsposition und die Schwingung ist infrarot-inaktiv. Da die Änderung der molekularen Polarisierbarkeit an der Gleichgewichtsposition ungleich Null ist, ist die Schwingung aber Raman-aktiv.

Ein weiteres lineares Beispielmolekül ist CO_2 . Dieses heteronukleare dreiatomige Molekül besitzt mehrere Vibrationsmoden, von denen eine vorgestellt wird (Abbildung 2.2 b). Man erkennt bei dieser Schwingung, dass sich die Symmetrie der Elektronenverteilung ändert. Die Schwingung ist demnach infrarot-aktiv. Die Polarisierbarkeit weist an der Gleichgewichtsposition ein Minimum auf, was dazu führt, dass die Schwingung Raman-inaktiv ist.

Als letztes Beispiel dient Wasser. Da die Perilymphe zum größten Teil aus Wasser besteht, ist die Behandlung dieses Moleküls von besonderer Bedeutung. Daher wurde für viele der in dieser Arbeit untersuchten Proben Wasser als Lösungsmittel gewählt. Das Molekül besitzt eine Vielzahl an Vibrationsmoden, von denen eine in Abbildung 2.2 c) gezeigt ist. Die Symmetrie der Elektronenverteilung und der Verlauf der Polarisierbarkeit während der Bewegung führen dazu, dass diese Schwingung sowohl infrarot- als auch Raman-aktiv ist.

Bei größeren Molekülen (z. B. Proteinen) werden die Symmetrieüberlegungen immer komplexer. Allgemein gilt, dass bei Molekülen mit relativ geringer Symmetrie alle oder nahezu alle Vibrationsmoden infrarot- und Raman-aktiv sind.²⁰ Unter diesen Gesichtspunkten eignen sich sowohl die Raman- als auch die Infrarotspektroskopie als Methode für die nichtinvasive Analyse der Perilymphe.

2.3 Anwendbarkeit der Vibrationsspektroskopie im Innenohr

In der RS wird die gemessene Intensität üblicherweise in Abhängigkeit von der Wellenzahl ν (angegeben in cm^{-1}) dargestellt. Da die Positionen der Raman-Linien im Spektrum nicht von der Anregungswellenlänge λ_0 abhängen, wird diese Darstellung um eine Verschiebung relativ zur Anregungswellenlänge erweitert:

$$\nu = \frac{1}{\lambda_0} - \frac{1}{\lambda}. \quad (2.1)$$

Diese Darstellung bietet den Vorteil, dass die Position einer Linie im Raman-Spektrum direkt der Energie entspricht, die bei dem Streuprozess ausgetauscht wird und demzufolge charakteristisch für die Vibrationsmode ist. Da die Abszisse in der Literatur weiterhin als Wellenzahl bezeichnet wird, wurde auch in der vorliegenden Arbeit diese Benennung gewählt.

Anhand von Wasser sollen die beiden spektroskopischen Verfahren verglichen werden. In Abbildung 2.3 ist das Raman-Spektrum von Wasser bei einer Anregungswellenlänge von $\lambda_0 = 248 \text{ nm}$ gezeigt (schwarze Kurve).

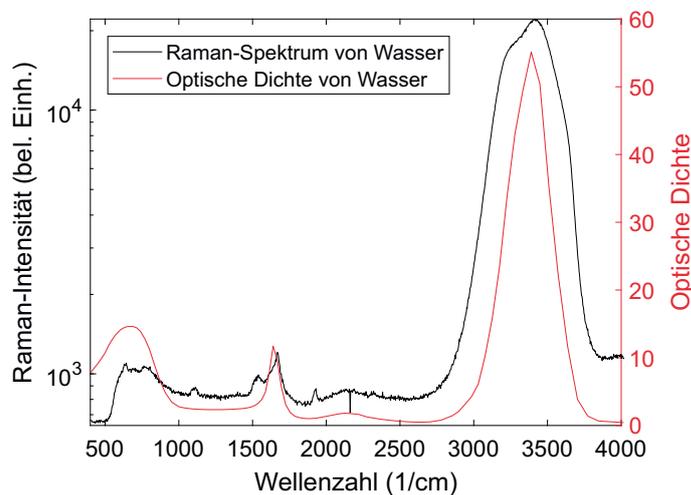


Abbildung 2.3: Die Abbildung zeigt das Raman-Spektrum ($\lambda_0 = 248 \text{ nm}$, schwarze Kurve) und die optische Dichte (rote Kurve) von Wasser. Letztere wurde für eine Schichtdicke von $100 \mu\text{m}$ berechnet.²⁶

Besonders auffällig ist das spektral breite Signal bei etwa 3400 cm^{-1} . Bei etwa 1650 cm^{-1} befindet sich ebenfalls ein für Wasser charakteristisches Raman-Signal. Um den Vergleich zur Infrarotspektroskopie zu ziehen, ist neben dem Raman-Spektrum von Wasser auch dessen optische Dichte OD dargestellt (rote Kurve). Sie wurde aus Literaturwerten für eine beispielhafte Schichtdicke von $100\text{ }\mu\text{m}$ berechnet.²⁶ Der Zusammenhang zwischen optischer Dichte und Transmission T ist über die Relation $OD = \log_{10} \{1 / T\}$ gegeben. Um die einzelnen Raman-Signaturen von Wasser besser hervorzuheben, wurde eine logarithmische Darstellung gewählt. An den gleichen Stellen wie im Raman-Spektrum können auch bei der optischen Dichte charakteristische Signale erkannt werden. Es handelt sich also um Molekülschwingungen, die sowohl Raman- als auch infrarot-aktiv sind.

An dem Verlauf der optischen Dichte ist erkennbar, dass über den dargestellten Bereich (400 cm^{-1} bis 4.000 cm^{-1} bzw. umgerechnet 2500 nm bis 25.000 nm) eine starke Dämpfung auftritt ($OD > 0,4$), was einer Transmission von $T < 36\%$ entspricht. Für die Analyse von Biomolekülen ist der spektrale Bereich von 400 cm^{-1} bis 1800 cm^{-1} besonders wichtig, da dort die charakteristischen Raman-Signale auftreten. Dieser Bereich wird daher als Fingerabdruckbereich (FAB) bezeichnet. Hier ist $OD > 1,2$ ($T < 6\%$). Da die Perilymphe größtenteils aus Wasser besteht, wird eine spektroskopische Untersuchung dieser Flüssigkeit mittels Infrarotspektroskopie somit erheblich erschwert. Außerdem wird bei der Infrarotspektroskopie in Transmission gemessen, was im Innenohr ohne Weiteres nicht möglich ist. Daher wurden die weiteren Untersuchungen mittels RS durchgeführt. Die in dieser Arbeit verwendeten Wellenlängen (nicht nur für RS) liegen im Bereich von 200 nm bis 1300 nm . Die Transmission von Wasser ist bei diesen Wellenlängen $> 93\%$.

3 Die menschliche Rundfenstermembran

In der Medizin werden bereits seit einigen Jahren optische Verfahren zu diagnostischen Zwecken eingesetzt.²⁷⁻²⁹ Dabei ist Licht das Werkzeug, mit dem eine nichtinvasive Untersuchung von biologischen Proben ermöglicht wird, ohne dass die Eigenschaften der Proben verändert werden (z. B. durch Entnahme). Dieser Vorteil wird dadurch relativiert, dass die Wechselwirkung von Licht mit biologischen Substanzen, wie etwa Gewebe, komplex ist.³⁰⁻³² Deren inhomogene Zusammensetzungen haben einen großen Einfluss auf die Propagation von Licht, insbesondere auf die elastische Streuung von Licht, was eine tiefenaufgelöste Untersuchung erschwert. Die einzelnen Wechselwirkungsprozesse weisen im Allgemeinen eine starke Abhängigkeit von der Wellenlänge auf. Die Wahl der optimalen Wellenlänge spielt daher eine wichtige Rolle.

Eine Möglichkeit der individuellen Diagnostik des Hörvermögens ist über die chemische Analyse der Innenohrflüssigkeit, der Perilymphe, gegeben. Es konnte gezeigt werden, dass die Änderung der Konzentration bestimmter Proteine in der Perilymphe mit der Beeinträchtigung des Hörvermögens korreliert ist.^{4,5} Die Messung der Zusammensetzung der Perilymphe kann also zur Bestimmung der pathophysiologischen Parameter genutzt werden.

Die Perilymphe befindet sich in einem Kanal der Hörschnecke (Cochlea) und dient dazu, die ursprünglich vom Trommelfell aufgenommenen Schallwellen zu den Haarzellen zu transportieren, wo sie schließlich frequenz aufgelöst registriert und zum Hörnerv weitergeleitet werden. Die Perilymphe wird von zwei Membranen im runden bzw. ovalen Fenster der Cochlea begrenzt. Das ovale Fenster ist mit den Gehörknöchelchen verbunden, weshalb ein optischer Zugang nur über die RFM gegeben ist. Für eine effiziente Raman-spektroskopische Untersuchung der Flüssigkeit müssen also die optischen Eigenschaften dieser Membran bekannt sein. Zu diesem Zweck wurden vier verschiedene menschliche RFM (*ex vivo*) untersucht.

3.1 Optische Eigenschaften der Rundfenstermembran

Eine nichtinvasive Analyse der Perilymphe erfordert eine sorgfältige Untersuchung der optischen Eigenschaften der RFM, da die Anregungswellenlänge und die Raman-gestreuten Wellenlängen diese Membran durchqueren sollen. Für eine optische Charakterisierung der RFM wurde die Transmission in einem großen Wellenlängenbereich gemessen, um die optimale Anregungswellenlänge für die RS zu bestimmen. Dazu wurde die Membran zwischen zwei Glasfasern platziert. Für eine effiziente Anregung und Einsammlung von Raman-gestreutem Licht ist zudem die Kenntnis des elastischen Streuvermögens der Membran erforderlich. Zu diesem Zweck wurde die raum aufgelöste Streuung der RFM bei unterschiedlichen Wellenlängen gemessen. Weiterhin wurde das Raman-Spektrum der Membran aufgenommen, um einen möglichen Einfluss dieses Spektrums auf das Raman-Spektrum der Perilymphe zu erfassen. Die Herausforderung bei der Bestimmung der optischen Eigenschaften bestand in der Handhabung der Proben. Die menschliche RFM besitzt einen Durchmesser von ≈ 1 mm und eine mittlere Dicke von $70 \mu\text{m}$.³³ Im Folgenden werden die experimentellen Aufbauten vorgestellt und die damit erzielten Werte in Relation zu den Daten vergleichbarer biologischer Substanzen gesetzt. Teile der in diesem Kapitel vorgestellten Arbeiten wurden bereits an anderer Stelle veröffentlicht.³⁴

3.1.1 Geometrische Betrachtungen

Die Charakterisierung der RFM umfasst neben den optischen Eigenschaften auch die Kenntnis der geometrischen Abmessungen, um dieses Gewebe mit anderen biologischen Materialien vergleichen zu können (z. B. hinsichtlich der Extinktion von Licht). Der bereits erwähnte Durchmesser wurde mikroskopischen Aufnahmen entnommen, die während des Präparationsprozesses der Membranen gemacht wurden. Eine solche Aufnahme ist in Abbildung 3.1 zu sehen.

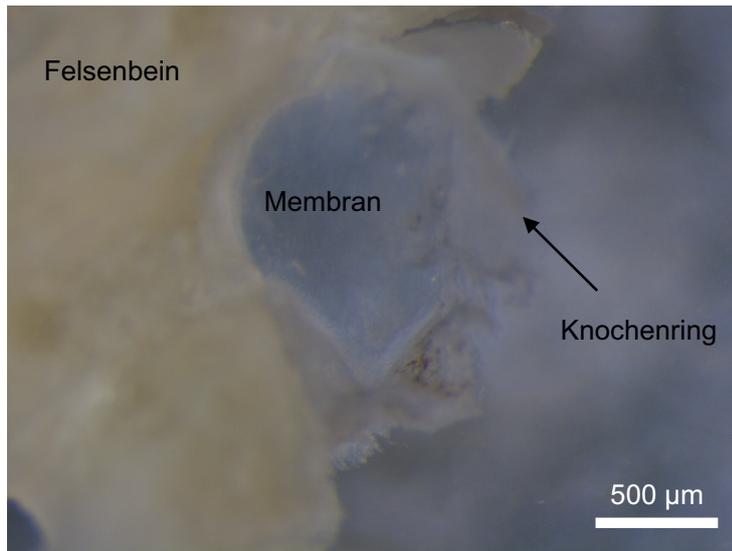


Abbildung 3.1: In der Abbildung ist eine mikroskopische Aufnahme einer extrahierten menschlichen RFM zu sehen. Die Membran ist von Knochen umgeben, der für mechanische Spannung und strukturelle Stabilität sorgt.³⁴

Die Membran ist am Rand von Knochen umgeben, der sie aufspannt und für strukturelle Stabilität sorgt. Bei der Präparation der Proben wurde darauf geachtet, den Knochen zwar weitestgehend zu reduzieren, die mechanische Spannung der RFM aber nicht zu verringern. Ohne Knochen würde sich die Geometrie der Membran verändern, wodurch die Vergleichbarkeit mit RFM *in vivo* und anderen Gewebearten nicht mehr gegeben wäre.

Für die Bestimmung der Dicke d einer Membran wurde ein OCT-System (TELESTO II, Thorlabs) verwendet. Es arbeitet bei einer Zentralwellenlänge von $1,3\ \mu\text{m}$ und besitzt eine maximale Abbildungstiefe von $3,5\ \text{mm}$ bei einer axialen Auflösung von $4,2\ \mu\text{m}$ (in Wasser). Für die Messungen wurden die einzelnen Proben auf einen Objektträger aus Glas gelegt. Als Medium zum Einbetten der RFM wurde phosphatgepufferte Salzlösung [engl.: phosphate buffered saline] (PBS) verwendet, um die physiologischen Bedingungen im Innenohr bestmöglich nachzustellen und ein Degenerieren der Membran zu minimieren. Die RFM waren zu jedem Zeitpunkt, auch zwischen den Messungen, in PBS gelagert.

Von jeder RFM wurde eine dreidimensionale Aufnahme gemacht. Für die Berechnung der Membrandicke wurden aus jedem Datensatz zwei zueinander senkrechte vertikale Schnitte (Tiefenprofile) ausgewählt. Die Schnitte verlaufen jeweils durch die Mitte der Membran, wo auch die Transmissionsmessung durchgeführt wurde. In einem Abstand von $100\ \mu\text{m}$ zur Mitte wurde an vier unterschiedlichen Stellen (zwei in jedem Tiefenprofil) die Dicke d der Membran gemessen. Die Abstände ergeben sich aus der

für die Messung der Transmission gewählten Beleuchtungsgeometrie (Kerndurchmesser der Glasfaser von 200 μm , siehe Abbildung 3.4). Zusammen mit dem Messwert aus der Mitte der Membran ergeben sich fünf Werte, aus denen die mittlere Dicke \bar{d} berechnet wurde. Die Datennachbearbeitung und Dickenbestimmung sind an anderer Stelle ausführlich beschrieben.³⁵ Die Ergebnisse der OCT-Messungen sind in den Abbildungen 3.2 und 3.3 dargestellt und zusammen mit weiteren Informationen in Tabelle 3.1 aufgelistet.

Tabelle 3.1: Informationen zu den für die Bestimmung der optischen Eigenschaften verwendeten menschlichen RFM. Die Daten der Messung (dritte Spalte) beziehen sich auf die Transmissionspektren. Die Fehler der mittleren Membrandicken \bar{d} wurden mithilfe der Standardabweichung aus fünf Messwerten pro Membran ermittelt.

Probe	Entnahme	Messung	Knochenring	Lagerung	\bar{d} (μm)
RFM1	01.01.2015	23.06.2016	entfernt	flüssige PBS	260 ± 50
RFM2	14.04.2016	23.06.2016	erhalten	gefrorene PBS	76 ± 9
RFM3	18.07.2017	05.09.2017	entfernt	flüssige PBS	160 ± 40
RFM4	18.07.2017	05.09.2017	erhalten	flüssige PBS	108 ± 19

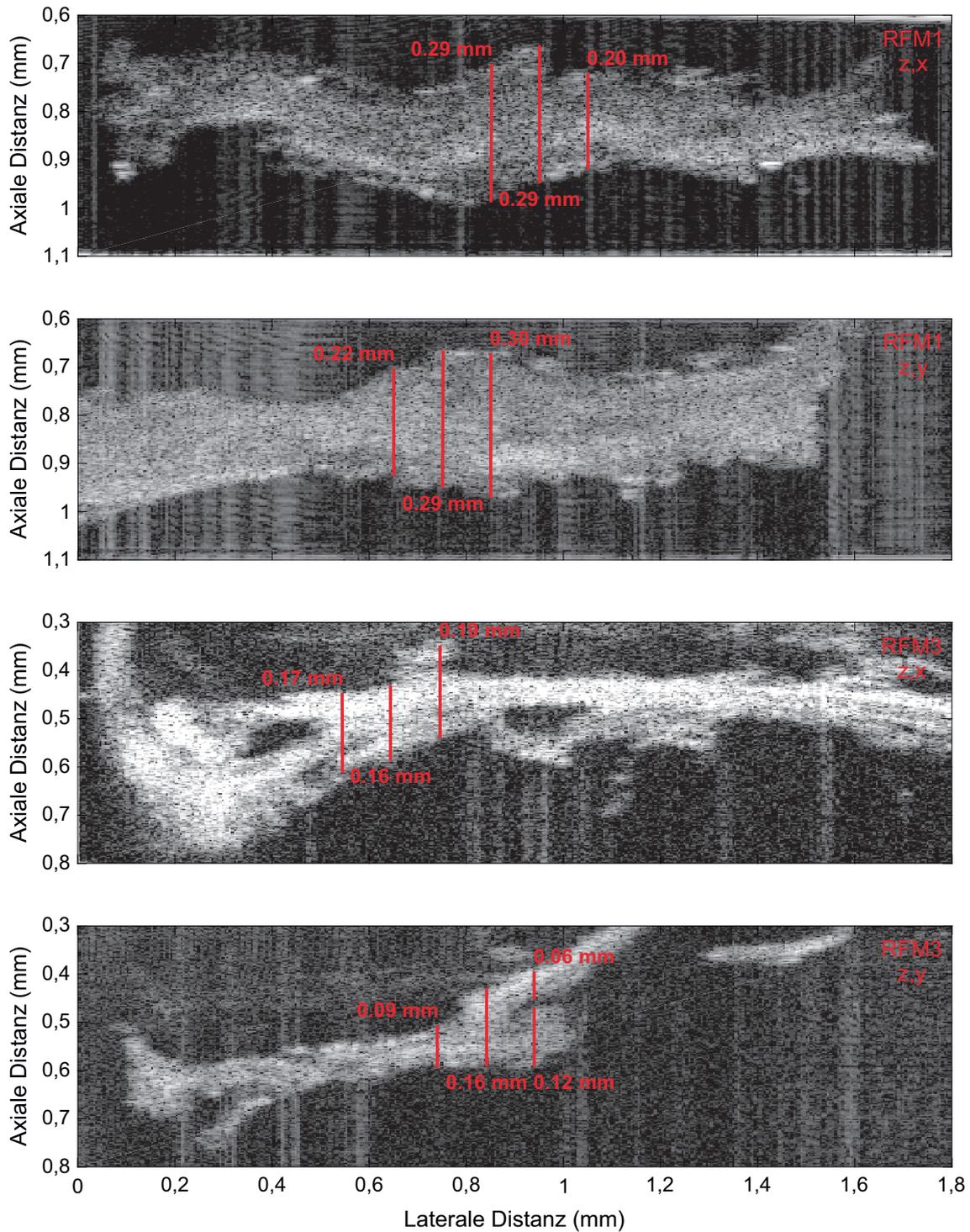


Abbildung 3.2: Die Bilder zeigen OCT-Aufnahmen von zwei menschlichen RFM (RFM1 und RFM3). Die Ebene, in der das entsprechende Tiefenprofil gemacht wurde, ist jeweils oben rechts angegeben. Bei beiden Membranen ist der Knochenring während der Präparation nicht erhalten geblieben.³⁴

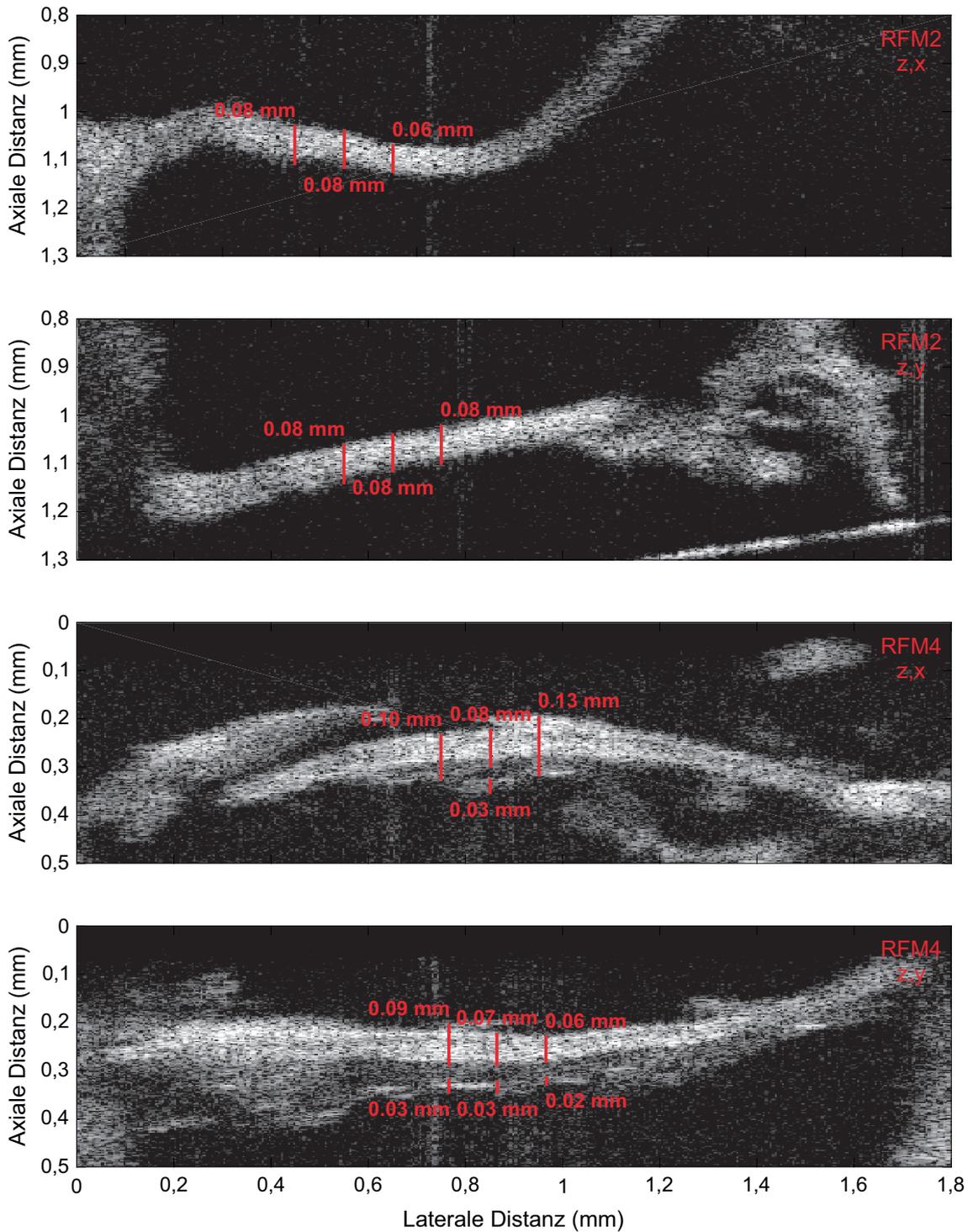


Abbildung 3.3: Die Bilder zeigen OCT-Aufnahmen von zwei menschlichen RFM (RFM2 und RFM4). Die Ebene, in der das entsprechende Tiefenprofil gemacht wurde, ist jeweils oben rechts angegeben. Bei beiden Membranen ist der Knochenring während der Präparation erhalten geblieben.³⁴

Die von dem OCT-System ermittelten optischen Abmessungen wurden bereits in geometrische Abstände umgerechnet. Dazu wurde ein Brechungsindex von 1,32 für Wasser bei der Zentralwellenlänge ($1,3\mu\text{m}$) angenommen. Da die Knochenringe bei RFM1 und RFM3 während der Präparation nicht erhalten geblieben sind, haben diese Proben ihre ursprüngliche mechanische Spannung verloren, was zu einer Faltung und einem Aufquellen der Membran geführt haben kann. Das zeigt sich auch an den gemessenen Dicken, die größer sind als bei den Proben mit Knochenring. Trotzdem stehen die Ergebnisse in gutem Einklang mit der aus der Literatur erwarteten mittleren Dicke von $70\mu\text{m}$.³³

3.1.2 Transmission

Für die Messung der Transmission wurde ein experimenteller Aufbau entwickelt, in dem die zu untersuchende RFM zwischen zwei sich gegenüberliegenden Glasfasern platziert werden kann. Letztere besitzen einen Kerndurchmesser, der jeweils kleiner ist als der Durchmesser der Membranen. Diese Konfiguration bietet den Vorteil, dass aufgrund der definierten Lichtverteilung zwischen den Glasfasern nur von der Membran transmittiertes Licht detektiert werden kann. Der Aufbau ist in Abbildung 3.4 schematisch dargestellt.

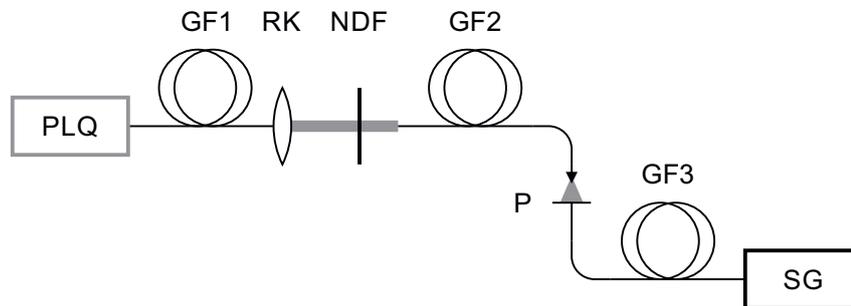


Abbildung 3.4: Schematische Darstellung des experimentellen Aufbaus zur Messung der Transmission von menschlichen RFM. Die Proben werden zwischen zwei sich gegenüberliegenden Glasfasern (GF2 und GF3) platziert (PLQ: Plasmalichtquelle, GF: Glasfaser, RK: reflektiver Kollimator, NDF: Neutraldichtefilter, P: Plattform mit Probe und SG: Spektrograf).³⁴

In der Plasmalichtquelle (PLQ, EQ-99FC-Plus-UV-4-EU, Energetiq) erhitzt ein fokussierter Laserstrahl ein Xenon-Plasma, was zur kontinuierlichen Emission von spektral breitbandigem Licht (170 nm bis 2100 nm) führt. Direkt daran angeschlossen ist eine mehrmodige Glasfaser (GF1, UVFiber-230-2M-0022-REV4, Energetiq,

Kerndurchmesser von 230 μm), die das Licht zu einem reflektiven Kollimator (RK, RC12SMA-F01, Thorlabs) leitet, wo es als kollimierter Strahl ausgekoppelt wird. Mithilfe eines Neutraldichtefilters (NDF, NDC-50C-4M, Thorlabs) kann die Leistung, mit der die Membranen bestrahlt werden, kontinuierlich eingestellt werden. Eine zweite mehrmodige Glasfaser (GF2, FG200AEA, Thorlabs, Kerndurchmesser von 200 μm) sammelt das gefilterte Licht ein und leitet es weiter zur Probe (P). Die dritte mehrmodige Glasfaser (GF3, UM22-600, Thorlabs, Kerndurchmesser von 600 μm) befindet sich in einer konfektionierten Steckverbindung (SMA-Stecker), die einen sicheren Halt der Glasfaser ermöglicht und gleichzeitig als Plattform für die RFM dient. Das von der Membran transmittierte Licht wird über die dritte Glasfaser zum Spektrografen (SG, Maya2000 Pro, Ocean Optics) geleitet, wo es detektiert wird. Zwecks optimaler Vergleichbarkeit der gemessenen Spektren wurde ein festes Beugungsgitter in dem Spektrografen eingebaut. Um damit einen großen spektralen Bereich abzudecken, wurde ein Gitter mit 300 Linien pro mm gewählt. Die Beugungseffizienz des Gitters wurde für eine Wellenlänge von 300 nm optimiert, da kurzwelliges Licht ($< 400 \text{ nm}$) in biologischen Proben in der Regel eine starke Dämpfung erfährt. Um der geringen spektralen Auflösung, die mit einer kleinen Linienzahl einhergeht, entgegenzuwirken, befindet sich in der Eintrittsebene des Spektrometers ein Spalt mit einer Breite von 10 μm . Die spektrale Auflösung wurde zu 0,63 nm berechnet. Die Bestimmung der spektralen Auflösung eines Spektrografen wird in Abschnitt 5.2 näher beschrieben. Insgesamt wird ein spektraler Bereich von 250 nm bis 1100 nm abgedeckt.

Die wellenlängenabhängige Transmission $T(\lambda)$ der RFM ist eine relative Angabe. Für ihre Berechnung muss das von der Membran transmittierte Spektrum $M(\lambda)$ in Relation zu einem Referenzspektrum $R(\lambda)$ gesetzt werden. Letzteres enthält die spektralen Eigenschaften der optischen Komponenten des experimentellen Aufbaus und wird daher auch als spektrale Gerätefunktion (SGF) bezeichnet. Mit

$$T(\lambda) = \frac{M(\lambda) - H(\lambda)}{R(\lambda) - H(\lambda)} \quad (3.1)$$

kann aus den Einzelspektren die Transmission der RFM berechnet werden. Das Hintergrundspektrum $H(\lambda)$ ist ein Korrekturterm, der das Hintergrundlicht während der Messung und den Dunkelstrom der Kamera im Spektrografen beschreibt. Für die Messung von $M(\lambda)$ wurde eine Membran zwischen den beiden Glasfasern GF2 und GF3 platziert und mit einer mittleren Leistung $\bar{P} = 0,5 \text{ mW}$ für eine Belichtungszeit $t = 100 \text{ ms}$ beleuchtet. Das Referenzspektrum $R(\lambda)$ wurde analog dazu ohne Membran (nur PBS) gemessen. Für die Messung des Hintergrundspektrums $H(\lambda)$ wurde

die Lichtquelle blockiert. Diese drei Messungen wurden jeweils dreimal durchgeführt und gemittelt. In Abbildung 3.5 sind die resultierenden Spektren am Beispiel von RFM1 dargestellt.

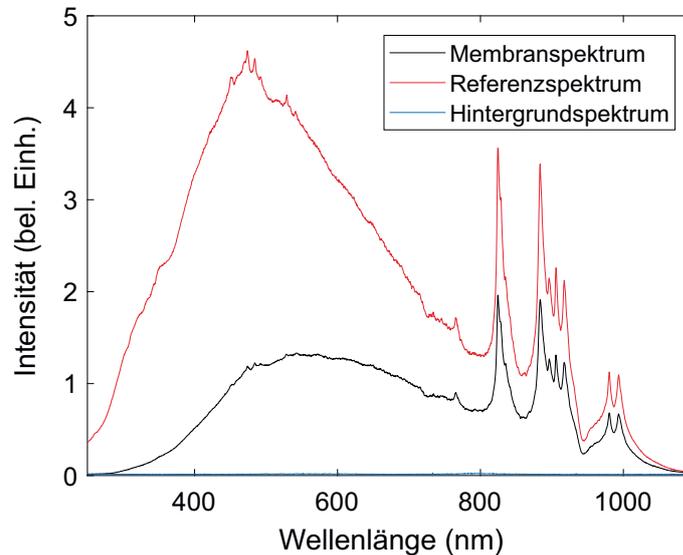


Abbildung 3.5: Die Abbildung zeigt die zur Berechnung des Transmissionsspektrums $T(\lambda)$ verwendeten Einzelspektren (hier am Beispiel von RFM1 gezeigt). Die schwarze Kurve ist das von der Membran transmittierte Spektrum $M(\lambda)$, eine Messung ohne Probe ergibt das Referenzspektrum $R(\lambda)$ (blaue Kurve) und $H(\lambda)$ ist das Hintergrundspektrum (rote Kurve).

Die einzelnen Linien im Referenz- und Membranspektrum sind charakteristisch für Xenon.³⁶ Die drei Spektren aus Abbildung 3.5 wurden analog für alle vier RFM ermittelt und nach Gleichung 3.1 in das zugehörige Transmissionsspektrum $T(\lambda)$ umgerechnet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.6 gezeigt.

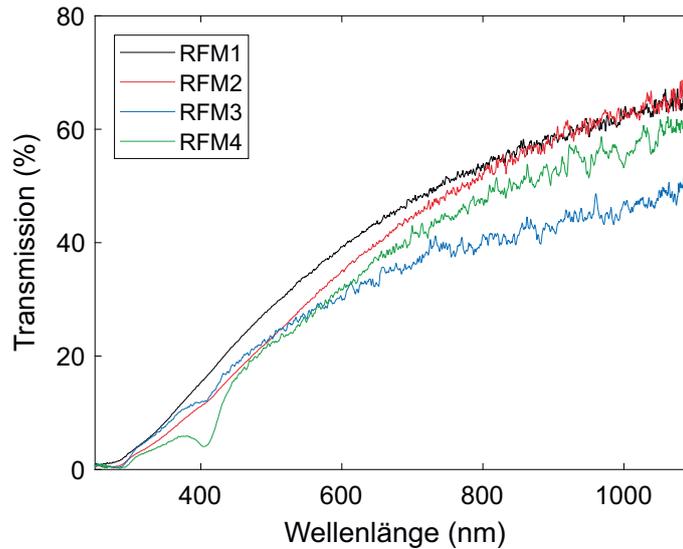


Abbildung 3.6: Transmissionsspektren $T(\lambda)$ der vier menschlichen RFM.³⁴

Die Kurven wurden entsprechend der spektralen Auflösung des Spektrografen (0,63 nm) geglättet. Qualitativ zeigen die Kurven eine steigende Transmission bei ansteigender Wellenlänge. Für eine quantitative Aussage wurde die mittlere Transmission aus den vier Kurven berechnet. Unterhalb von 400 nm ist die Transmission $< 11\%$, während sie für Wellenlängen > 800 nm über 48% liegt. Allgemein betrachtet erfährt ultraviolettes Licht in biologischen Substanzen eine hohe Extinktion aufgrund von Absorption und Streuung.^{37,38} Der Unterschied zwischen den Transmissionskurven wird auf eine variierende Anatomie und unterschiedliche Lagerungsbedingungen der RFM zurückgeführt. Insbesondere das Fehlen des Knochenrings bei RFM1 und deren lange Lagerungszeit können zu einem Aufquellen der Membran geführt haben, was wiederum die Dichte der Membranmoleküle verringert und schließlich die Transmission erhöht hat. Die Abnahme der Transmission von RFM3 und RFM4 um 400 nm kann durch Rückstände von Blut im Gewebe erklärt werden, da es sich hier um relativ frische Proben handelt. Blutgefäße durchziehen die Membran³³ und oxygeniertes sowie desoxygeniertes Blut zeigen eine starke Absorption von Licht in diesem Spektralbereich.³²

Die Transmission eines Mediums hängt neben der Zusammensetzung auch von dessen Ausdehnung ab. Der Extinktionskoeffizient $\kappa(\lambda)$ setzt die Transmission $T(\lambda)$ eines Mediums in Relation zu seiner Ausdehnung. Der Zusammenhang ist über

$$\kappa(\lambda) = -\frac{1}{d} \ln \{T(\lambda)\} \quad (3.2)$$

gegeben,³⁹ wobei d hier der Membrandicke entspricht. Auf diese Weise können die transmissiven Eigenschaften der RFM mit anderen Gewebearten verglichen werden. Die in Abbildung 3.6 gezeigten Transmissionsspektren wurden mit den mittleren Membrandicken aus Tabelle 3.1 nach Gleichung 3.2 umgerechnet. Die Ergebnisse für die Extinktionskoeffizienten $\kappa(\lambda)$ sind in Abbildung 3.7 dargestellt.

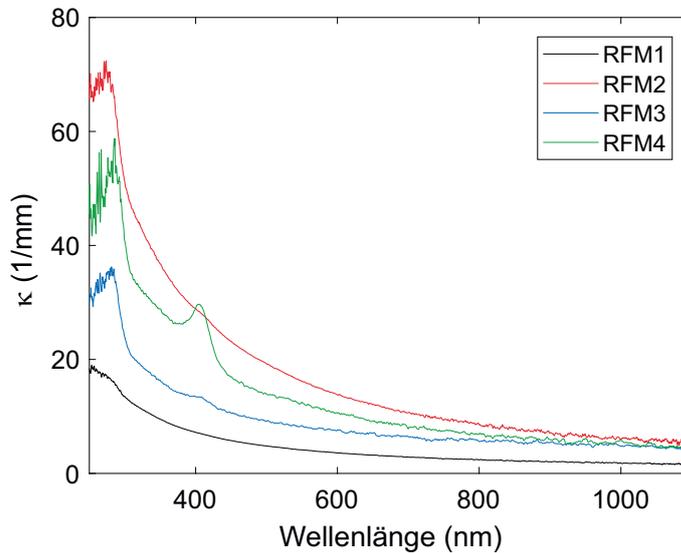


Abbildung 3.7: Extinktionskoeffizienten $\kappa(\lambda)$ der vier menschlichen RFM.³⁴

Wie anhand der Transmissionsspektren bereits zu erwarten war, sinkt die Extinktion mit steigender Wellenlänge. Die Unterschiede zwischen den Kurven, die sich trotz Berücksichtigung der Membrandicken ergaben, werden darauf zurückgeführt, dass bei der Messung der Transmission eine bestimmte Fläche der Membran durchleuchtet wurde, während für die Dicke nur ein einzelner Wert verwendet wurde. Die OCT-Messungen haben gezeigt, dass die Membranen keine homogene Dicke aufweisen. Für RFM1 und RFM3 wurden in den OCT-Messungen die größten Werte bestimmt, was wiederum auf das Fehlen des Knochenrings zurückzuführen ist. Die Ergebnisse stehen in guter Übereinstimmung mit Daten aus der Literatur für vergleichbare Gewebearten.³⁹

Die bezüglich der Transmission von Licht durch die menschliche RFM gewonnenen Erkenntnisse legen die Anwendung von sichtbarem und nahinfrarotem Licht für eine nichtinvasive Analyse der Perilymphe durch dieses Gewebe nahe.

3.1.3 Elastische Streuung

Das elastische Streuvermögen der RFM wurde mithilfe eines Goniometers bestimmt. Der experimentelle Aufbau ist in Abbildung 3.8 schematisch dargestellt.

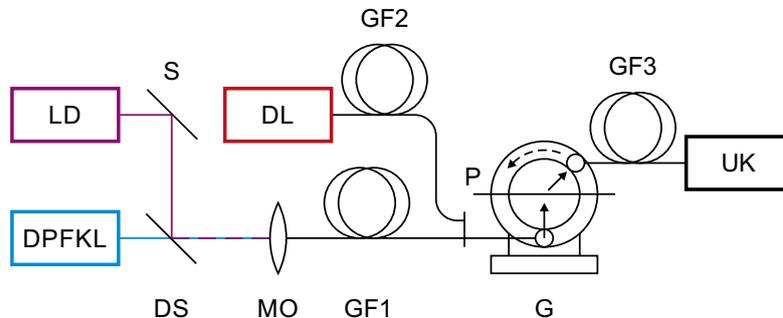


Abbildung 3.8: Schematische Darstellung des experimentellen Aufbaus zur Messung des elastischen Streuvermögens von menschlichen RFM. Die Proben werden in der Brennebene des Goniometers (G) platziert (LD: Laserdiode, S: Spiegel, DPFKL: diodengepumpter Festkörperlaser, DS: dichroitischer Spiegel, MO: Mikroskopobjektiv, GF: Glasfaser, DL: Diodenlaser, G: Goniometer, P: Plattform mit Probe und UK: Ulbrichtsche Kugel).³⁴

Das Streuvermögen wurde bei drei verschiedenen Wellenlängen gemessen. Das Licht einer Laserdiode (LD, CPS405, Thorlabs, Emissionswellenlänge von 404 nm) und eines diodengepumpten Festkörperlasers (DPFKL, Excelsior-473-50-CDRH, Spectra-Physics, Emissionswellenlänge von 473 nm) wurde mithilfe eines Spiegels (S, PF10-03-P01, Thorlabs) und eines dichroitischen Spiegels (DS, DMLP425R, Thorlabs) räumlich überlagert. Beide Strahlen wurden mit einem Mikroskopobjektiv (MO, 10X DIN Semi-Plan Finite Objective, Edmund Optics, $NA = 0,25$) in eine einmodige Glasfaser (GF1, SM400, Thorlabs, Kerndurchmesser von $2,2\ \mu\text{m}$) eingekoppelt, die das Licht zum Goniometer (G, GON 360, Instrument Systems) leitete. Der Einsatz von einmodigen Glasfasern liefert die kleinstmögliche Lichtverteilung in der Brennebene des Goniometers. Die dritte Wellenlänge wurde von einem Diodenlaser (DL, XTRA, Toptica, Emissionswellenlänge von 785 nm) bereitgestellt, der eine direkte Einkopplung in eine einmodige Glasfaser (GF2, S630-HP, Thorlabs, Kerndurchmesser von $3,5\ \mu\text{m}$) ermöglichte, die das Licht zum Goniometer leitete. An diesem kann je nach Bedarf die gewünschte Glasfaser angeschlossen werden. Die zu untersuchende Membran wurde in der Brennebene des Goniometers platziert (P). In Abhängigkeit vom eingestellten Winkel wurde das vorwärtsgestreute Licht gesammelt und mithilfe einer mehrmodigen Glasfaser (GF3, OFG-312, Instrument Systems GmbH, Kerndurchmesser von $600\ \mu\text{m}$) zu einer Ulbrichtschen Kugel (UK, S140C, Thorlabs) geleitet, wo das gestreute Licht schließlich detektiert wurde.

Für die Messungen wurden die RFM nacheinander auf einem Objektträger platziert. Der Knochenring, der bei RFM2 und RFM4 noch vorhanden war, führte zu einer Beeinflussung der gestreuten Lichtverteilung. Für die korrekte Bestimmung des Streuvermögens wurden die Knochenringe entfernt. Das Entfernen führte bei RFM2 zu einem Riss, der durch die Mitte der Membran verlief, weshalb die Streueigenschaften im Folgenden an den übrigen Proben gemessen wurden. Die in Vorwärtsrichtung gestreute Intensität wurde in einem Winkelbereich von -10° bis 10° detektiert. In Abbildung 3.9 sind die Intensitätsverteilungen von RFM1 bei den drei Wellenlängen gezeigt. Als Referenz ist die gestreute Intensität ohne Probe (nur PBS) bei 404 nm aufgetragen. Sie repräsentiert die Streueigenschaften eines Mediums mit geringem Streuvermögen.

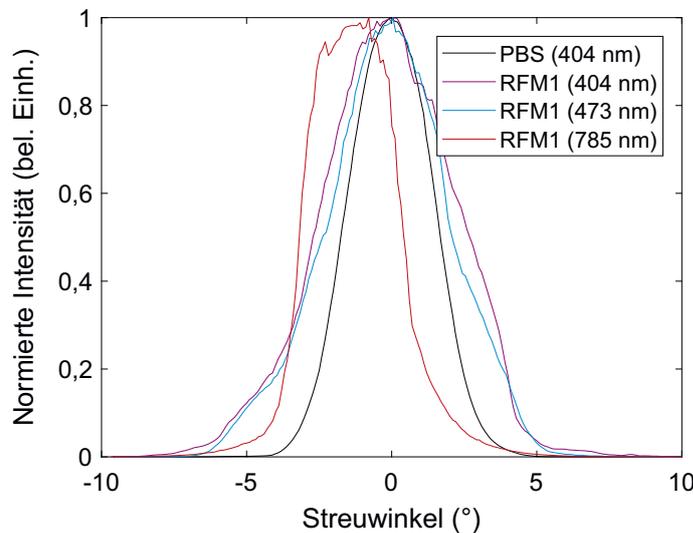


Abbildung 3.9: Winkelaufgelöste Verteilung von vorwärtsgestreutem Licht, das hinter einer menschlichen RFM (RFM1) bei drei unterschiedlichen Wellenlängen mit einem Goniometer gemessen wurde. Die Messung ohne Probe (nur PBS) dient als Referenz für ein schwach streuendes Medium.³⁴

Um eventuelle Ungenauigkeiten in der Kalibration des Goniometers auszugleichen, wurde für jede Wellenlänge eine Messung von Luft durchgeführt. Die gemessenen Intensitätsverteilungen wurden mittels Regression in Form einer Gauß-Verteilung angepasst, um die Abweichungen der Orte der Intensitätsmaxima von den entsprechenden Nullpositionen zu ermitteln. Diese Korrektur ist in Abbildung 3.9 bereits enthalten. Die Intensitätsverteilung, die bei $\lambda = 785$ nm gemessen wurde, ist in Richtung der negativen Winkel gekippt. Dies wird auf eine gekrümmte Oberfläche des die Membran umgebenden Mediums zurückgeführt. Im Verlauf des Experiments hat sich die Flüssigkeit soweit verflüchtigt, dass es zu einem Linseneffekt des Medi-

ums gekommen ist. Es wird jedoch nicht von einem signifikanten Einfluss auf die gemessene Lichtverteilung ausgegangen.

Als Maß für das Streuvermögen der RFM wurde die Halbwertsbreite Λ der gestreuten Intensität gewählt. Zum besseren Vergleich sind alle Intensitätsverteilungen unabhängig voneinander normiert worden. Die Breiten wurden ebenfalls mittels Regression in Form einer Gauß-Verteilung berechnet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.2 zusammengefasst.

Tabelle 3.2: Winkelaufgelöste Halbwertsbreiten Λ von drei menschlichen RFM, gemessen mit einem Goniometer bei drei verschiedenen Wellenlängen λ mit den entsprechenden Anisotropiefaktoren g . Die Ergebnisse für PBS dienen als Referenz für ein schwach streuendes Medium.

λ (nm)	Λ_{PBS} (°)	$\Lambda_{\text{RFM1;3;4}}$ (°)	$\Lambda_{\text{RFM1;3;4}} / \Lambda_{\text{PBS}}$	$g_{\text{RFM1;3;4}}$
404	3,31	5,32; 5,74; 6,59	1,61; 1,73; 1,99	0,94; 0,94; 0,93
473	3,19	4,88; 5,52; 7,22	1,53; 1,73; 2,27	0,95; 0,94; 0,92
785	3,19	3,38; 4,60; 5,50	1,06; 1,44; 1,72	0,96; 0,95; 0,94

Allgemein betrachtet werden kürzere Wellenlängen stärker gestreut als längere Wellenlängen. Die berechneten Halbwertsbreiten Λ_{RFM} der RFM wurden in Relation zu den Breiten Λ_{PBS} des Mediums (PBS) gesetzt, um die Verbreiterung $\Lambda_{\text{RFM}} / \Lambda_{\text{PBS}}$ zu erhalten. Sie nimmt mit steigender Wellenlänge ab. Bei RFM4 tritt bei $\lambda = 404$ nm eine Abweichung auf, die auf die erhöhte Extinktion von Licht im Bereich um 400 nm zurückgeführt wird (vergleiche Abbildung 3.7).

Die Streuprozesse, die innerhalb eines Mediums stattfinden, können dazu führen, dass das von außen eingestrahlte Licht zurückgestreut wird (Mehrfachstreuung). Ein Maß für die Menge von vorwärtsgestreutem Licht wird durch den Anisotropiefaktor g beschrieben. Er kann mithilfe der Henyey-Greenstein-Phasenfunktion $p(\theta)$ berechnet werden.³¹

$$p(\theta) = \frac{1 - g^2}{2[1 + g^2 - 2g \cos(\theta)]^{3/2}}. \quad (3.3)$$

Der Definitionsbereich von g reicht von -1 bis 1 , wobei $g = 1$ bedeutet, dass das gesamte Licht in Vorwärtsrichtung gestreut wird. Um den Anisotropiefaktor für die RFM zu ermitteln, wurden die winkelaufgelösten Intensitätsverteilungen mittels Regression in Form von Gleichung 3.3 angepasst. Als Referenz für ein schwach streuendes Medium ergab sich für PBS ein Wert von $g = 0,97$ (bei $\lambda = 404$ nm). Am

Beispiel von RFM1 (bei $\lambda = 404\text{ nm}$) ist in Abbildung 3.10 die vom Goniometer gemessene Intensität (violette Punkte) zusammen mit den Regressionen in Form einer Gauß-Verteilung (schwarze Kurve) und der Phasenfunktion $p(\theta)$ (rote Kurve) dargestellt.

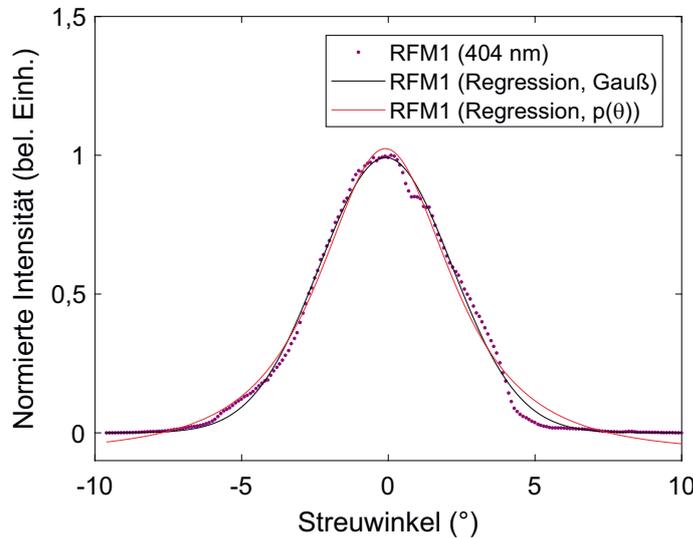


Abbildung 3.10: Vom Goniometer gemessene winkelaufgelöste Intensität von RFM1 bei $\lambda = 404\text{ nm}$ (violette Punkte). Die Regression in Form einer Gauß-Verteilung (schwarze Kurve) dient der Bestimmung der Halbwertsbreite Λ , während die Regression in Form der Phasenfunktion $p(\theta)$ (rote Kurve) der Bestimmung des Anisotropiefaktors g dient.³⁴

Qualitativ betrachtet sind beide Regressionsfunktionen geeignet, um das Streuvermögen der RFM anzupassen und somit zu quantifizieren. Im Fall der Gauß-Funktion lässt sich die Abweichung der Regression von den gemessenen Werten dadurch erklären, dass die transversale Lichtverteilung, die die Glasfaser (GF1 oder GF2) verlässt und vom Goniometer in die Probe fokussiert wird, nur näherungsweise einer Gauß-Verteilung entspricht. Im Fall der Regression mittels Phasenfunktion lässt sich die Abweichung dadurch erklären, dass die Funktion $p(\theta)$ ursprünglich für eine andere Anwendung konzipiert wurde, aber trotzdem eine hinreichende Approximation biologischer Daten liefert.³¹ Die Anisotropiefaktoren der RFM befinden sich in Tabelle 3.2. Aufgrund der geringen Dicke der Membranen wurde für g ein Wert nahe 1 erwartet, was in den Experimenten bestätigt werden konnte. Die Ergebnisse stehen zudem in Übereinstimmung mit Literaturdaten für andere biologische Gewebearten.³⁰⁻³²

Die Messungen zum Streuvermögen der menschlichen RFM haben gezeigt, dass zum einen eine räumlich begrenzte Lichtverteilung hinter der Membran erreicht werden kann und zum anderen ein Großteil des eingestrahlt Lichts in Vorwärtsrichtung

gestreut wird. Im Hinblick auf eine glasfasergestützte Analyse der Perilymphe hinter der RFM sind dies grundlegende Voraussetzungen für eine effiziente Messung von Raman-Spektren.

3.1.4 Raman-Streuung

Das Raman-Spektrum der menschlichen RFM wurde mit einem konfokalen Raman-Mikroskop (CRM200, WITec) aufgenommen. Als Lichtquelle zur Anregung der Raman-Streuung diente ein frequenzverdoppelter Nd:YAG-Dauerstrichlaser (mit $\lambda_0 = 532 \text{ nm}$). Das Laserlicht wurde mithilfe eines Mikroskopobjektivs (LU Plan ELWD 50X, Nikon, $NA = 0,55$) in die Probe fokussiert. Über dieselbe Optik wurde das Raman-gestreute Licht eingesammelt. Die für ein konfokales Mikroskop essentielle Lochblende wurde durch den Einsatz einer mehrmodigen Glasfaser (Kerndurchmesser von $50 \mu\text{m}$), die zum Transport des Raman-gestreuten Lichts zum Spektrometer (UHTS 300, WITec) dient, realisiert. Das Gitter im Spektrometer besaß 600 Linien pro mm. Die Raman-Spektren wurden mit einer Kamera (DU970N-BV-353, Andor) detektiert.

Für die Messung der Raman-Spektren der vier RFM wurden die Proben auf einem Objektträger in der Brennebene des Mikroskops platziert. Aufgrund der hohen numerischen Apertur des Objektivs ($NA = 0,55$) war es trotz des Risses in der Membran möglich, auch bei RFM2 das Raman-Spektrum aufzunehmen. Die Proben RFM1 und RFM2 wurden mit einer mittleren Leistung von $\bar{P}_{\text{RFM1,2}} = (35,60 \pm 0,18) \text{ mW}$ bestrahlt. Bei RFM3 und RFM4 waren es $\bar{P}_{\text{RFM3,4}} = (35,8 \pm 0,3) \text{ mW}$. Die Leistungen wurden jeweils vor dem Mikroskopobjektiv gemessen, das bei $\lambda = 532 \text{ nm}$ eine Transmission von $T = 70\%$ besaß. Die Belichtungszeit betrug $t = 60 \text{ s}$. Um eventuelle Inhomogenitäten des Membrangewebes zu berücksichtigen, wurde an fünf verschiedenen Stellen innerhalb einer RFM jeweils ein Raman-Spektrum gemessen. In Abbildung 3.11 sind die gemittelten Raman-Spektren der vier RFM dargestellt.

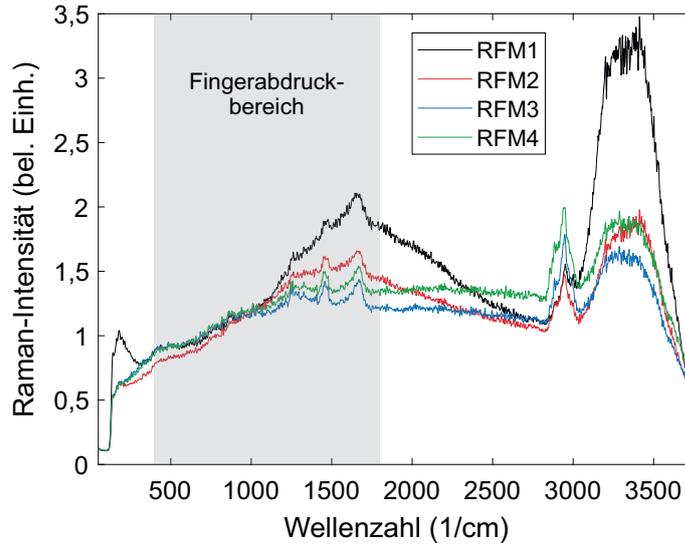


Abbildung 3.11: Mit einem konfokalen Raman-Mikroskop gemessene Raman-Spektren der vier menschlichen RFM ($\lambda_0 = 532 \text{ nm}$). In dem grau hinterlegten FAB treten die für Biomoleküle charakteristischen Raman-Linien auf.³⁴

Die für Biomoleküle charakteristischen Raman-Linien treten in einem Spektralbereich von 400 cm^{-1} bis 1800 cm^{-1} auf. Die menschliche RFM besteht zum Teil aus Kollagen,³³ weshalb eine Ähnlichkeit zwischen den Raman-Spektren von Kollagen und dem Membrangewebe erwartet wurde. Im Bereich von 1200 cm^{-1} bis 1700 cm^{-1} (innerhalb des FAB) und bei etwa 2950 cm^{-1} (außerhalb des FAB) treten Raman-Linien auf, die in Übereinstimmung mit Literaturdaten für Kollagen stehen.⁴⁰ Das spektral breite Signal bei etwa 3400 cm^{-1} entspricht dem hohen Wasseranteil der RFM sowie dem des umgebenden Mediums (PBS). Im Fall von RFM1 ist dieses Signal besonders dominant, was auf das Aufquellen der Membran infolge eines erhöhten Wasseranteils zurückgeführt wird.

Bei der nichtinvasiven Analyse hat auch die Raman-Streuung der RFM selbst Einfluss auf das Raman-Spektrum der Perilymphe. Daher wurden die hier eingesetzten Energiedichten E mit den zur Messung der Raman-Spektren von Proteinen üblichen Energiedichten, verglichen. Mittels

$$E = \frac{\bar{P} t}{\pi r^2} \quad \text{und} \quad r = 0,61 \frac{\lambda}{NA} \quad (3.4)$$

wurde die hier verwendete Energiedichte zu $E = 140 \text{ MJ cm}^{-2}$ berechnet. Dieser Wert ist deutlich größer als die Energiedichten, die für vergleichbare Experimente mit einem konfokalen Raman-Mikroskop bei $\lambda_0 = 532 \text{ nm}$ gefunden wurden ($0,7 \text{ MJ cm}^{-2}$ bis $46,1 \text{ MJ cm}^{-2}$).^{13,40} Aus diesem Grund und wegen der Tatsache,

dass das zur Analyse der Perilymphe verwendete Licht nicht in die RFM fokussiert wird, wird davon ausgegangen, dass die RFM keinen nennenswerten Beitrag zum Raman-Spektrum der Perilymphe beiträgt. Trotz der hohen Energiedichte wurde keine mikroskopisch sichtbare Degeneration des Membrangewebes festgestellt.

Die optische Charakterisierung der menschlichen RFM hat gezeigt, dass die Anwendung von sichtbarem und nahinfrarotem Licht aufgrund der hohen Transmission und geringen elastischen Streuung der Membran in diesen Spektralbereichen geeignet ist, um das Raman-Spektrum der Perilymphe hinter der RFM zu messen.

4 Resonanz-Raman-Spektroskopie

Die vielfältigen Informationen, die mithilfe der RS erlangt werden können, erfordern einen sensitiven experimentellen Aufbau. Da der Wirkungsquerschnitt für Raman-Streuung ($\sigma \sim 10^{-29} \text{ cm}^2$) im Allgemeinen deutlich kleiner ist als der für die Absorption von Licht ($\sigma \sim 10^{-18} \text{ cm}^2$) oder Emission von Fluoreszenz ($\sigma \sim 10^{-19} \text{ cm}^2$),²³ ist eine effiziente Anregung und Einsammlung der Raman-gestreuten Strahlung erforderlich. Es gibt Erweiterungen der RS, die einen deutlich größeren Wirkungsquerschnitt besitzen (z. B. oberflächenverstärkte RS mit $\sigma \sim 10^{-16} \text{ cm}^2$),²³ allerdings sind solche Methoden mit einer aufwendigen Probenpräparation verbunden, was ihren Einsatz für nichtinvasive Untersuchungen verhindert.

Eine Variante der RS, die einen größeren Wirkungsquerschnitt bietet, aber keine zusätzliche Probenpräparation erfordert, ist die Resonanz-Raman-Spektroskopie (RRS, $\sigma \sim 10^{-24} \text{ cm}^2$).²³ In Kapitel 2.1 wurden die Grundlagen bereits kurz vorgestellt. Die Steigerung der Raman-gestreuten Intensität hängt vom spektralen Abstand der Anregungswellenlänge zum Absorptionsband des Moleküls ab. Fällt die Anregungswellenlänge mit dem Absorptionsmaximum zusammen, erreicht die Raman-gestreuete Intensität ihr Maximum (Resonanz). Auch in der Nähe eines Absorptionsbandes kann der Resonanzeffekt noch genutzt werden. Man spricht in diesem Fall von Präresonanz. Jedes Molekül besitzt sein eigenes, charakteristisches Absorptionsspektrum. Folglich ist die optimale Wellenlänge zur Anregung einer resonanten Raman-Streuung molekülspezifisch.

In diesem Kapitel werden ein experimenteller Aufbau und ein Algorithmus zur Datennachbearbeitung vorgestellt, mit denen die optimale Anregungswellenlänge eines Moleküls effizient ermittelt werden kann. Teile der hier vorgestellten Arbeiten wurden bereits an anderer Stelle veröffentlicht.⁴¹

4.1 Absorption und Resonanz

Große Biomoleküle, wie etwa Proteine, besitzen in der Regel ein Absorptionsmaximum im UV-Spektralbereich. Kleinere Biomoleküle, wie z. B. Aminosäuren, die die Bausteine der Proteine sind, weisen ein Absorptionsmaximum auf, das noch

tiefer im UV-Bereich liegt.^{42,43} Das Absorptionsspektrum eines Moleküls besteht in der Regel nicht aus einem einzigen schmalen Absorptionsband, sondern aus einer komplexen Struktur mehrerer Bänder. Um die optimale Anregungswellenlänge zur Messung des Raman-Spektrums eines Biomoleküls zu ermitteln, wird die wellenlängenabhängige Resonanzverstärkung in Form eines Resonanzprofils bestimmt. Eine detaillierte Messung dieses Profils erfordert den Einsatz eines breiten Spektrums von Anregungswellenlängen und einen experimentellen Aufbau, der dafür kalibriert ist. Beides ist im kurzwelligen Spektralbereich schwer zu realisieren, da die Anzahl von schmalbandigen Lichtquellen zur Anregung von Raman-Streuung und Kalibration des Aufbaus klein ist. Dieser Umstand hat dazu beigetragen, dass der Umfang von verfügbarer Literatur auf diesem Gebiet gering ist.^{9,11,44–54} Die Studien beschränken sich auf den Einsatz von diskreten Wellenlängen. Die Verwendung eines breiten Spektrums von Anregungswellenlängen bietet eine höhere Sicherheit die optimale Anregungswellenlänge zu finden.

Die Aufnahme eines Resonanzprofils wird hier anhand der Aminosäuren Prolin (PRO) und Glycin (GLY) demonstriert. Von allen proteinogenen Aminosäuren besitzen diese Moleküle die höchste Löslichkeit in Wasser ($C_{\max, \text{PRO}} = 14,1 \text{ M}$ und $C_{\max, \text{GLY}} = 3,3 \text{ M}$).⁵⁵ Die Berechnung der Konzentration wird in Abschnitt 5.2.1 erläutert. Da die Raman-gestreuete Intensität linear mit der Konzentration der streuenden Moleküle skaliert, können mit diesen Stoffen hohe Raman-Intensitäten bei kurzen Belichtungsdauern generiert werden. Hohe Konzentrationen führen allerdings auch zu einer starken Absorption von Licht, besonders im UV-Spektralbereich. Daher spielen Effekte wie Selbstabsorption des Raman-gestreuten Lichts oder Fotodissoziation/Fotodegradation in der RRS eine wichtige Rolle. Die Korrektur von Raman-Wirkungsquerschnitten bestimmter Molekülbindungen aufgrund von Selbstabsorption wird in der Literatur beschrieben.^{51–53} Fotodissoziation/Fotodegradation lässt sich reduzieren, indem die Moleküle in der Probe bewegt werden.⁵⁶

Die resonante Verstärkung von Raman-gestreutem Licht ist mit dem Absorptionsverhalten eines Moleküls verbunden. Daher kann von einem qualitativen Zusammenhang zwischen dem Absorptionsspektrum eines Moleküls und dem zugehörigen Resonanzprofil ausgegangen werden. Um dies zu verifizieren, wurden die Absorptionsspektren von PRO und GLY gemessen. Dazu wurden aus den Pulvern dieser Aminosäuren (81709-25G bei PRO und G7126-100G bei GLY, Sigma-Aldrich) wässrige Lösungen hergestellt, in Küvetten aus Quarzglas gefüllt und dann in einem Spektralfotometer (Uvikon 931, Kontron Instruments) vermessen. Eine Küvette mit entionisiertem Wasser diente als Referenz. Die Proben wurden direkt nach ihrer Herstellung analysiert, um eine eventuelle Bildung von Dipeptiden oder größeren Molekülen zu minimieren. Die Konzentrationen betragen $C_{\text{PRO}} = 3,0 \text{ M}$ und $C_{\text{GLY}} = 2,4 \text{ M}$. Damit auch

Spektralbereiche mit hoher Absorption vermessen werden konnten, sind die Proben solange verdünnt worden, bis die optimalen Messbedingungen erreicht wurden. Die Absorptionsspektren von PRO und GLY sind in Abbildung 4.1 dargestellt.

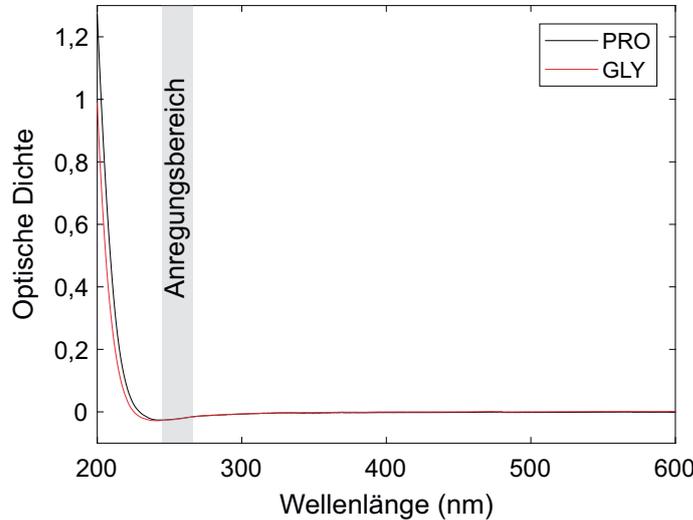


Abbildung 4.1: Die Abbildung zeigt die Absorptionsspektren (optische Dichte) von PRO (schwarze Kurve) und GLY (rote Kurve). Zum Erreichen der optimalen Messbedingungen wurden die Proben verdünnt. Der Anregungsbereich (λ_0) für die RRS ist grau hinterlegt.⁴¹

Aufgrund der individuell durchgeführten Verdünnung der Proben sind die optischen Dichten nicht vergleichbar. Die Aminosäuren weisen über einen großen Spektralbereich praktisch keine Absorption auf, da sie keine Chromophore enthalten. Unterhalb von etwa 240 nm tritt eine starke Dämpfung von Licht auf. Das Absinken der optischen Dichten im Bereich von 200 nm bis 300 nm wird auf Ungenauigkeiten in der Kalibration des Spektralfotometers zurückgeführt. Der Anregungsbereich (λ_0 , siehe nächster Abschnitt) befindet sich in den Ausläufern der Absorptionsspektren beider Moleküle. Die Messung der Resonanzprofile von PRO und GLY findet demnach unter präresonanten Bedingungen statt. Für eine qualitative Aussage über den Resonanzverlauf wurden die Absorptionsspektren der unverdünnten Proben gemessen, also von Konzentrationen, die mit denen vergleichbar sind, die in der RRS eingesetzt wurden. Zwecks Vergleichbarkeit wurden die gemessenen optischen Dichten durch die entsprechende Konzentration der Probe geteilt. Die dadurch erhaltene molare Absorption ist in Abbildung 4.2 gezeigt.

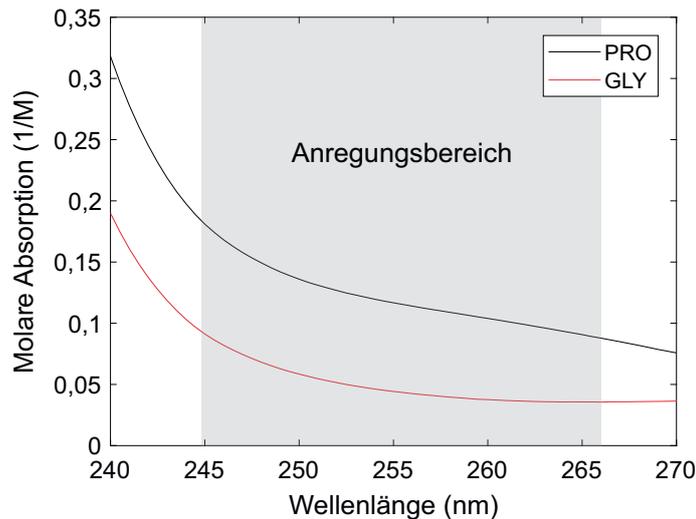


Abbildung 4.2: Die molaren Absorptionen von PRO ($C_{\text{PRO}} = 3,0 \text{ M}$, schwarze Kurve) und GLY ($C_{\text{GLY}} = 2,4 \text{ M}$, rote Kurve) sind in Abhängigkeit der Wellenlänge dargestellt. Der Anregungsbereich (λ_0) für die RRS ist grau hinterlegt.⁴¹

Die unverdünnten Proben weisen im Anregungsbereich eine steigende Absorption in Richtung kürzerer Wellenlängen auf. Hinsichtlich der Resonanzverstärkung von PRO und GLY wird ein ähnliches Verhalten erwartet. Verglichen mit den Verläufen in Abbildung 4.1 wird hier kein Absinken der Kurven beobachtet, was auf die wesentlich höheren Konzentrationen und der damit verbundenen Absorptionen der Proben zurückgeführt wird. Ohnehin ist für die Abschätzung des Resonanzprofils einer Probe nur der qualitative Verlauf der Absorption wichtig.

4.2 Experimentelle Umsetzung

Die Bestimmung des Resonanzprofils eines Moleküls erfordert die Messung vieler Raman-Spektren bei unterschiedlichen Anregungswellenlängen. Da sowohl die Anregungs- als auch Detektionseffizienz von Raman-gestreutem Licht wellenlängenabhängig sind, müssen die Spektren nachbearbeitet werden, um den korrekten Resonanzverlauf zu erhalten. Ändert sich beispielsweise die applizierte Energie infolge des Wechsels der Anregungswellenlänge, wird eine abweichende Raman-Intensität gemessen und folglich ein verändertes Resonanzprofil aufgenommen. Demzufolge werden ein geeigneter experimenteller Aufbau und ein Algorithmus zur Datennachbearbeitung benötigt, die auch die experimentellen Parameter, wie etwa die applizierte Energie bei jeder Messung, berücksichtigen.

Das Resonanzprofil eines Moleküls wird als sogenannte Anregungs-Emissions-Karte (AEK) visualisiert, die die Abhängigkeit der gemessenen Raman-Intensität von der eingesetzten Anregungswellenlänge wiedergibt. Zunächst wird ein experimenteller Aufbau vorgestellt, der für die Messung der AEK von PRO und GLY im Bereich von 244,8 nm bis 266,0 nm, in Schritten von 0,1 nm, verwendet wurde. Anschließend wird eine Möglichkeit der Kalibration des Aufbaus ohne externe Lichtquelle erläutert.

4.2.1 Experimenteller Aufbau

Für die Bestimmung der optimalen Anregungswellenlänge in der RRS wurde ein Aufbau entwickelt, der einen großen Bereich von Wellenlängen unterstützt und die Energie, die während einer Messung in die Probe eingetragen wird, überwacht. Der Aufbau ist in Abbildung 4.3 schematisch dargestellt.

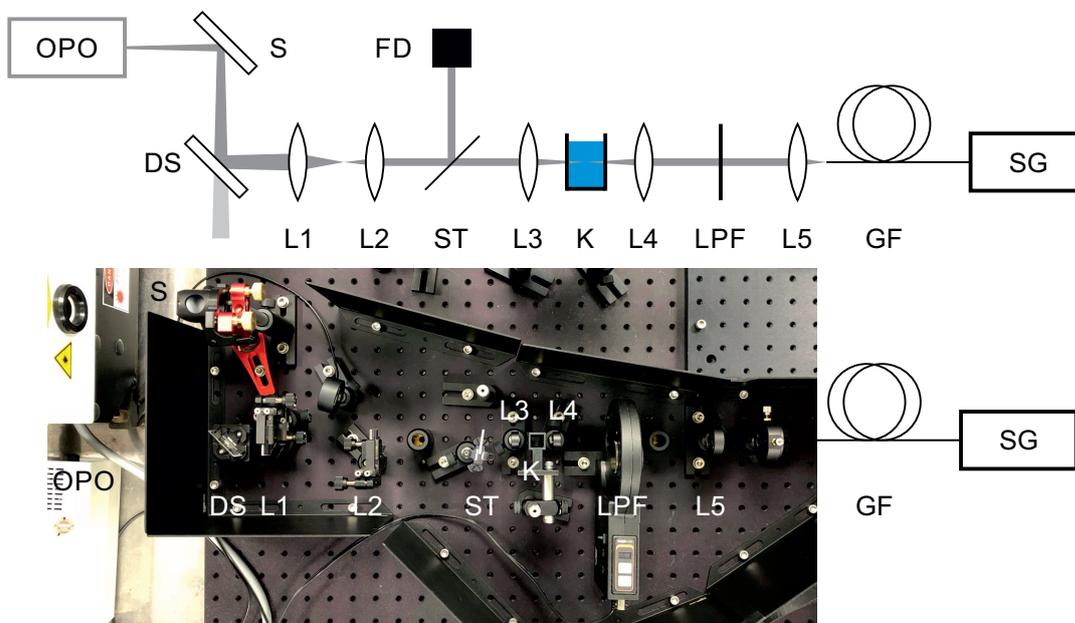


Abbildung 4.3: Schematische Darstellung des experimentellen Aufbaus zur Bestimmung der optimalen Anregungswellenlänge in der RRS. Die zu untersuchenden Moleküle werden in gelöster Form in einer Küvette in den Strahlengang eingebracht (OPO: optischer parametrischer Oszillator, S: Spiegel, DS: dichroitischer Spiegel, L: Linse, ST: Strahlteiler, FD: Fotodiode, K: Küvette, LPF: Langpassfilter, GF: Glasfaser und SG: Spektrograf).⁴¹

Ausgangspunkt für die Bereitstellung der UV-Wellenlängen ist ein blitzlampengepumpter Nd:YAG-Laser (NL303G, Ekspla), der mittels Güteschaltung Laserimpulse

mit einer Dauer im Bereich von 3 ns bis 6 ns bei einer Zentralwellenlänge von 1064 nm und einer spektralen Breite $< 1 \text{ cm}^{-1}$ erzeugt (Herstellerangaben). Der Laser kann im Einzelimpuls-Modus oder mit einer Repetitionsrate von 10 Hz betrieben werden. Durch Frequenzverdopplung wurde ein Teil des Lichts konvertiert (532 nm). Mittels Summenfrequenzerzeugung wurde aus beiden Wellenlängen (1064 nm und 532 nm) die Pumpwellenlänge (355 nm) für einen optischen parametrischen Oszillator (OPO, PG122/UV, Ekspla) generiert. Dieser erzeugt Laserimpulse im Bereich von 420 nm bis 709 nm (Signal) mit einer spektralen Breite $< 5 \text{ cm}^{-1}$ (Herstellerangaben). Die UV-Wellenlängen wurden schließlich durch Frequenzverdopplung der Signalwellenlängen des OPOs erzeugt. Sie waren im Bereich von 210,0 nm bis 354,0 nm in 0,1 nm-Schritten durchstimmbar.

Bevor das vom OPO emittierte Licht für RS genutzt werden konnte, wurde es spektral und räumlich verändert. Bedingt durch die limitierte Konversionseffizienz wurden neben den UV-Wellenlängen auch die sichtbaren Signalwellenlängen vom OPO emittiert. Zur spektralen Trennung wurde das Licht zunächst mithilfe eines Spiegels (S, PF10-03-F01, Thorlabs) zu einem dichroitischen Spiegel (DS, SEM-FF347-Di01-25x36, Semrock) geleitet, wo UV-Wellenlängen reflektiert und sichtbare Wellenlängen transmittiert wurden. Weiterhin wurde vom OPO ein elliptisches Strahlprofil emittiert, das in einer Raumdimension kollimiert war. Die andere Raumdimension wurde mit einem Teleskop, bestehend aus zwei Zylinderlinsen (L1, LJ4878, Thorlabs, Brennweite von 75 mm und L2, LJ4305, Thorlabs, Brennweite von 30 mm), korrigiert. Der auf diese Weise spektral und räumlich geformte Strahl wurde mithilfe eines Strahlteilers (ST, 48201, Edmund Optics) in zwei Teile aufgespalten. Ein kleiner Teil wurde auf eine Fotodiode (FD, DET10A/M, Thorlabs) reflektiert, die zur Überwachung der in die Probe eingetragenen Energie diente. Der größte Anteil wurde mittels einer Linse (L3, LA4647, Thorlabs, Brennweite von 20 mm) in eine Küvette (K, 117.104-QS, 117.104F-QS, oder 117.100F-QS, Hellma) fokussiert. Für die Messung von Raman-Spektren in Transmission wurden in dieser Arbeit Küvetten aus Quarzglas mit einem Lichtweg von 10 mm verwendet. Das transmittierte Licht wurde von einer weiteren Linse (L4, LA4647, Thorlabs, Brennweite von 20 mm) eingesammelt.

Bei der Anregung von Raman-Streuung kommt es auch zum Auftreten von Rayleigh-Streuung. Aufgrund des deutlich größeren Wirkungsquerschnitts (vergleiche Kapitel 2.1) gelangt neben dem Raman-gestreuten Licht ein erheblicher Anteil elastisch gestreuten Lichts zum Detektor, wodurch dieser in der Regel gesättigt wird und das eigentliche Raman-Spektrum nicht mehr messbar ist. Aus diesem Grund war eine spektrale Trennung beider Anteile essentiell. Üblicherweise werden in der RS absorbierende Langpassfilter eingesetzt, die nur Licht mit Wellenlängen transmittieren, die größer sind als die Kantenwellenlänge des Filters. Für die hier vorgestellten Messun-

gen wurden abhängig von der Anregungswellenlänge drei verschiedene Langpassfilter (LPF, SEM-LP02-248RS-25, SEM-LP02-257RU-25 oder SEM-LP02-266RU-25, Semrock) eingesetzt. Das Raman-gestreute Licht wurde mit einer Linse (L5, LA4148, Thorlabs, Brennweite von 50 mm) in eine mehrmodige Glasfaser (GF, UM22-100, Thorlabs, Kerndurchmesser von 100 μm) eingekoppelt, die das Licht zu einem Spektrografen (SG, Shamrock SR-500i-C-R, Andor mit Newton DU940P-BU, Andor) leitete, wo es schließlich detektiert wurde. Die Glasfaser diente zugleich als Eintrittsspalt des Spektrometers. Dieses war mit einem Reflexionsgitter ausgestattet, das 2400 Linien pro mm besaß und für eine Wellenlänge von 300 nm optimiert war. Die spektrale Auflösung wurde zu 0,08 nm bzw. 12 cm^{-1} ($\lambda = 261,4\text{ nm}$) bestimmt. Die Bestimmung der spektralen Auflösung eines Spektrografen wird in Abschnitt 5.2 näher beschrieben. Eine hohe Liniendichte resultiert in einer hohen Winkeldispersion, was wiederum zu einer hohen spektralen Auflösung des Spektrometers führt. Für eine feste Gitterposition konnte nur ein kleiner Spektralbereich auf der Kamera abgebildet werden. Um die unterschiedlichen Raman-Spektren für die Bestimmung des Resonanzprofils aufnehmen zu können, musste das Gitter gedreht werden. Entsprechend der im Bereich von 244,8 nm bis 266,0 nm angeregten Raman-Streuung wurde ein Minimum von drei unterschiedlichen Gitterpositionen ermittelt, um alle Raman-Spektren aufnehmen zu können. Für die kürzeste Anregungswellenlänge wird ein Bereich von 242,5 nm bis 262,6 nm bzw. -395 cm^{-1} bis 2769 cm^{-1} auf der Kamera abgebildet. Das negative Vorzeichen gibt an, dass auch Wellenzahlen links von der Position des Rayleigh-gestreuten Lichts im Spektrum abgebildet werden.

4.2.2 Kalibration des Aufbaus

Das Absorptionsspektrum eines Moleküls erstreckt sich in der Regel über einen großen Spektralbereich. Für die Bestimmung der optimalen Anregungswellenlänge sollte daher im Idealfall der gesamte Bereich untersucht werden und in Form eines Resonanzprofils erfasst werden. Die experimentelle Umsetzung dieses Vorhabens gibt unterschiedliche Randbedingungen vor, die den tatsächlich verwendbaren Anregungsbereich einschränken. Ausgehend von der Lichtquelle ist für gewöhnlich nur ein bestimmter Bereich von durchstimmbaren Wellenlängen verfügbar. Der entscheidende Faktor ist im vorliegenden Fall die Verfügbarkeit von für die RS geeigneten Langpassfiltern im UV-Bereich.

Anregungs- und Kalibrationsbereiche

Für die Messung der Resonanzprofile wurden die oben bereits erwähnten Filter ausgewählt. Langpassfilter werden in erster Linie anhand ihrer Kantenwellenlänge spezifiziert. Hierbei handelt es sich um die Wellenlänge, die noch eine hohe optische Dichte erfährt. Größere Wellenlängen werden mit zunehmendem spektralen Abstand zur Kantenwellenlänge immer besser transmittiert. Ein solcher Filter ist demzufolge für eine einzelne Wellenlänge optimiert. Um dennoch einen möglichst großen spektralen Bereich von Anregungswellenlängen nutzen zu können, wurde für jeden Filter ein kompatibles Wellenlängenband ausgewählt. Die kürzeste Wellenlänge aus dem jeweiligen Band wurde so gewählt, dass der damit verbundene Fingerabdruckbereich (FAB) noch zur Hälfte vom Filter transmittiert wurde. Die längste Wellenlänge wurde so gewählt, dass das Rayleigh-gestreute Licht, das mit zunehmendem spektralen Abstand zur Kantenwellenlänge immer besser transmittiert wurde, in etwa auf dem gleichen Intensitätslevel lag wie das Raman-gestreute Licht. Unter diesen Bedingungen haben sich die in Tabelle 4.1 aufgelisteten Wellenlängenbänder für die Anregung der Raman-Streuung (λ_0) und Kalibration des experimentellen Aufbaus ($\lambda_{\text{Kalibration}}$) ergeben. Zur Demonstration der Resonanzverstärkung wurde ein verkürzter FAB gewählt (500 cm^{-1} bis 1700 cm^{-1}), in dem die einzelnen Raman-Spektren nachbearbeitet wurden. Da die Anregungsbänder spektral separiert sind, ist auch die entsprechende Anregungs-Emissions-Karte (AEK) nicht kontinuierlich.

Tabelle 4.1: Angaben zu den Wellenlängenbändern, aus denen ein Resonanzprofil zusammengesetzt ist. Die Anregungswellenlängen λ_0 wurden entsprechend der spektralen Eigenschaften der Langpassfilter experimentell ermittelt. Bei den Kantenwellenlängen λ_{LPF} handelt es sich um Herstellerangaben. Die Kalibrationsbereiche $\lambda_{\text{Kalibration}}$ geben diejenigen Spektralbereiche an, für die der experimentelle Aufbau kalibriert werden musste, damit eine AEK erstellt werden konnte.

Gitterposition	λ_0 (nm)	λ_{LPF} (nm)	$\lambda_{\text{Kalibration}}$ (nm)
I	244,8 – 249,7	251,1	251,5 – 260,8
II	252,4 – 257,6	259,2	259,6 – 269,5
III	260,3 – 266,0	268,6	267,9 – 278,7

Für das Erstellen einer AEK müssen die darin enthaltenen Raman-Spektren untereinander vergleichbar sein, was hohe Anforderungen an die Messbedingungen, insbesondere an die Reproduzierbarkeit stellt. Für das Auffinden der optimalen Anregungswellenlänge in der RRS ist der qualitative Verlauf der Resonanzverstärkung ausreichend, weshalb die gemessene Raman-Intensität nicht in Form von absoluten

Werten vorliegen muss. Daher wurde für die Kalibration des experimentellen Aufbaus dieselbe Lichtquelle wie für die Anregung der Raman-Streuung verwendet. Weiterhin sind die Spektralbereiche $\lambda_{\text{Kalibration}}$, in denen die Raman-gestreuten Photonen auftreten, relativ schmal, weshalb für jede Kombination von λ_0 und $\lambda_{\text{Kalibration}}$ eine feste Gitterposition festgelegt werden konnte. Somit wurde auf ein Drehen des Gitters innerhalb eines Anregungsbandes verzichtet, was wiederum die Reproduzierbarkeit der Messungen erheblich gesteigert hat.

Fotodiode

Die Kalibration des experimentellen Aufbaus wurde durch die Bestimmung der spektralen Gerätefunktion (SGF) des Aufbaus erreicht. Die Funktion gibt an, in welchem Ausmaß eine bestimmte Wellenlänge vom Aufbau transmittiert wird. Für das Erlangen der SGF wurde zunächst die Fotodiode kalibriert. Bedingt durch die wellenlängenabhängigen nichtlinearen Prozesse, die bei der Erzeugung der durchstimmbaren Laserimpulse involviert waren, ergab sich für jede Anregungswellenlänge eine unterschiedliche mittlere Energie der Laserimpulse. Sie lag im Bereich von 0,28 mJ bis 1,30 mJ. Ferner wiesen die einzelnen Laserimpulse bei einer festen Wellenlänge eine starke Schwankung der Energie auf. Für die Kalibration der Fotodiode wurde ein pyroelektrischer Energiesensor (ES111C, Thorlabs) in den Strahlengang zwischen Strahlteiler (ST) und dritter Linse (L3) eingesetzt (vergleiche Abbildung 4.3). Aus Tabelle 4.1 geht hervor, dass Wellenlängen im Bereich von 244,8 nm bis 278,7 nm für die Kalibration der Fotodiode berücksichtigt werden mussten, um sämtliche Anregungswellenlängen λ_0 und Kalibrationsbereiche $\lambda_{\text{Kalibration}}$ abzudecken. Aufgrund der Diskontinuitäten des Resonanzprofils wurde die Fotodiode für 323 Wellenlängen kalibriert. Bei jeder dieser Wellenlängen wurden vom OPO 50 Laserimpulse emittiert und simultan von der Fotodiode und dem pyroelektrischen Energiesensor detektiert. Während der Energiesensor die absorbierte Energie direkt quantifizierte, wurde das Spannungssignal der Fotodiode zunächst mit einem Analog-Digital-Konverter (NI PCIe-6361, National Instruments) aufgezeichnet. Bedingt durch die elektronische Ausführung der Signalerfassung wurde ein exponentiell abklingender Spannungsverlauf registriert. Als Maß für die Energie des Laserimpulses wurde die Amplitude des Verlaufs bestimmt. Zuvor wurde das Signal geglättet, da im Bereich des Maximums Spannungsspitzen aufgenommen wurden und das Signal verrauscht war. Die Glättung erfolgte mittels exponentiell gleitendem Mittelwert. Die Differenz aus Maximum und Minimum des geglätteten Signals ergab schließlich die gesuchte Amplitude. Durch lineare Regression der Spannungsamplituden und Energien ergaben sich die Kalibrationskoeffizienten für jede Emissionswellenlänge des OPOs.

Zum Erreichen eines akzeptablen Signal-Rausch-Verhältnisses eines Raman-Spektrums wurde eine kumulierte Mindestenergie von 250 mJ festgelegt. Um die Anzahl der Laserimpulse, die dafür bei jeder Anregungswellenlänge in die Probe eingebracht werden mussten, zu bestimmen, wurden neben den Kalibrationskoeffizienten der Fotodiode die mittleren Energien der Laserimpulse festgehalten. Für die Anregungswellenlängen lagen die mittleren Energien im Bereich von 0,28 mJ bis 1,18 mJ. Die Anzahl von zu applizierenden Laserimpulsen pro aufgenommenem Spektrum lag somit im Bereich von 212 bis 893.

Optische Elemente

Für die optische Charakterisierung des experimentellen Aufbaus wurde eine Küvette mit entionisiertem Wasser verwendet. Der Spektralbereich, in dem die Raman-gestreute Intensität auftrat, befand sich im Transmissionsbereich der Langpassfilter, weshalb ein Neutraldichtefilter (NDUV40A, Thorlabs) zwischen vierter Linse (L4) und einem Langpassfilter (LPF) installiert wurde (vergleiche Abbildung 4.3). Wenn die intensiven Laserimpulse nicht ausreichend abgeschwächt werden, führen sie zu einer Sättigung der Kamera des Spektrografen und verhindern damit eine korrekte Messung der SGF. Benachbarte Kalibrationsbereiche $\lambda_{\text{Kalibration}}$ überlagern sich in einem schmalen spektralen Bereich (siehe Tabelle 4.1). Jeder Bereich entspricht einer bestimmten Gitterposition. Da die Beugungseffizienz eines Gitters von seiner Orientierung relativ zum eintreffenden Licht abhängt, wurden die überlappenden Bereiche doppelt vermessen.

Als Maß für die Transmission einer bestimmten Wellenlänge durch den experimentellen Aufbau wurde die Amplitude der spektralen Intensitätsverteilung bestimmt, die vom Spektrografen bei dieser Wellenlänge detektiert wurde. In Abbildung 4.4 ist das gemessene Spektrum gezeigt, das einem Laserimpuls entspricht, der vom OPO bei einer Wellenlänge von $\lambda_{\text{Kalibration}} = 278 \text{ nm}$ emittiert wurde. Die Energie dieses Laserimpulses wurde mithilfe der Fotodiode zu 0,73 mJ bestimmt. Die Belichtungszeit des Spektrografen betrug $t = 1 \text{ s}$.

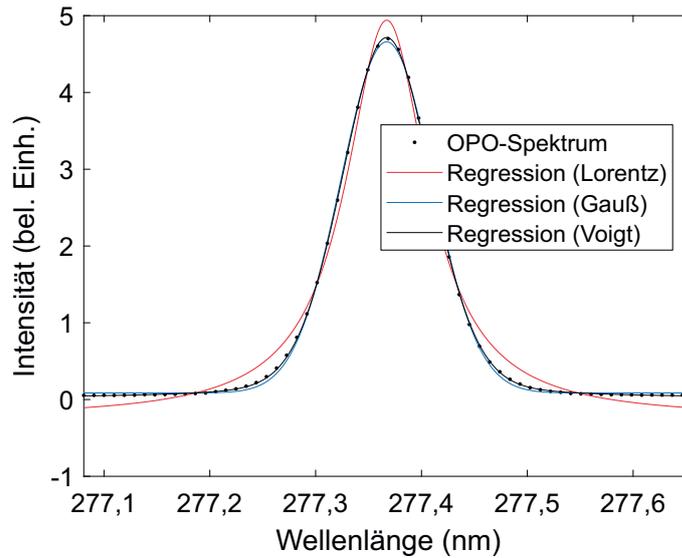


Abbildung 4.4: Gezeigt ist das gemessene Spektrum eines Laserimpulses bei $\lambda_{\text{Kalibration}} = 278 \text{ nm}$ (schwarze Punkte). Zur Quantifizierung des Spektrums wurde eine Regression in Form eines Voigt-Profiles durchgeführt (schwarze Kurve). Zum Vergleich sind Regressionen anhand eines Lorentz-Profiles (rote Kurve) und eines Gauß-Profiles (blaue Kurve) eingezeichnet.

An dem Spektrum ist auffällig, dass das Zentrum des Signals nicht bei 278 nm oder in unmittelbarer Nähe davon liegt. Die Abweichung von der eingestellten Wellenlänge wird auf Ungenauigkeiten in der Kalibration des OPOs und/oder des Spektrografen zurückgeführt. Die Korrektur dieser Abweichung ist daher der erste Schritt der Datennachbearbeitung, die im weiteren Verlauf des Kapitels vorgestellt und verwendet wird, um die Raman-Spektren vergleichbar zu machen. Die Anregungswellenlänge sollte zwar so genau wie möglich bekannt sein, in der RS muss insbesondere die spektrale Position der Raman-Signale relativ zur Position des Rayleigh-gestreuten Lichts genau stimmen, um Spektren vergleichen zu können.

Die Quantifizierung von spektralen Merkmalen wie etwa Raman-Linien erfolgt in dieser Arbeit mittels Regression in Form eines Voigt-Profiles. Das Profil ergibt sich aus der Faltung einer Lorentz- und einer Gauß-Funktion.²¹ Zwecks Implementierung der Regression in MATLAB wurde anstelle des Voigt-Profiles die Pseudo-Voigt-Funktion $F_{\text{PV}}(x)$ gewählt, die sich aus einer Linearkombination von Lorentz- und Gauß-Funktion ergibt:⁵⁷

$$F_{\text{PV}}(x) = \eta \left[1 + 4 \left(\frac{x - x_0}{\Lambda} \right)^2 \right]^{-1} + (1 - \eta) \exp \left\{ -4 \ln(2) \left(\frac{x - x_0}{\Lambda} \right)^2 \right\}. \quad (4.1)$$

Bei der Variablen x kann es sich um Wellenlängen oder Wellenzahlen handeln. Der Parameter η gibt an, zu welchem Anteil die Regression eines spektralen Verlaufs aus einer Lorentz- bzw. einer Gauß-Funktion besteht. Der spektrale Versatz x_0 gibt den spektralen Abstand zwischen der eingestellten (erwarteten) Wellenlänge/Wellenzahl und der Wellenlänge/Wellenzahl an, bei der das Zentrum des regressierten Intensitätsverlaufs berechnet wurde. Dieser Versatz wird in der Datennachbearbeitung verwendet, um die Raman-Signale an den korrekten spektralen Positionen zu erhalten. Der Parameter Λ ist die Halbwertsbreite der Funktion und wird entweder in Wellenlängen oder Wellenzahlen angegeben.

In Abbildung 4.4 ist das Ergebnis der Regression als schwarze Kurve eingetragen. Zum Vergleich wurden zwei weitere Regressionen in Form eines Gauß- und eines Lorentz-Profiles durchgeführt und ebenfalls eingezeichnet. Das berechnete Lorentz-Profil liegt im Bereich der Flanken und des Maximums oberhalb der gemessenen Daten. Das Gauß-Profil regressiert das Spektrum des OPOs wesentlich besser. Es liegt im Bereich der Flanken sowie des Maximums geringfügig unterhalb der gemessenen Werte. Das Voigt-Profil vereint beide Eigenschaften und liefert eine präzise Regression der gemessenen Daten. Folglich hat die Lorentz-Funktion nur einen geringen Anteil an der Regression in Form eines Voigt-Profiles ($\eta = 0,1954$). Die qualitative Beurteilung der Güte einer Regression kann visuell erfolgen, eine genaue, quantitative Beurteilung erfolgt über die Angabe des Bestimmtheitsmaßes R^2 . Der Wert von R^2 liegt zwischen 0 und 1, wobei ein Wert von 1 eine ideale Regression der gemessenen Werte widerspiegelt. Wird eine Regressionsfunktion mit vielen Freiheitsgraden (Regressionskoeffizienten) verwendet, bietet sich die Angabe des korrigierten Bestimmtheitsmaßes R_K^2 an, das die Anzahl der verwendeten Regressionskoeffizienten berücksichtigt.⁵⁸ Für die in Abbildung 4.4 gezeigten Regressionen ergaben sich die korrigierten Bestimmtheitsmaße zu $R_K^2 = 0,9886$ (Lorentz), $R_K^2 = 0,9994$ (Gauß) und $R_K^2 = 0,9999$ (Voigt).

Die Akquisition der einzelnen Spektren, also die Ansteuerung des Lasers, das Durchstimmen des OPOs, das Auslesen der Fotodiode sowie das Wechseln des Langpassfilters und die Aufnahme des Spektrums wurden in LABVIEW automatisiert durchgeführt. Aufgrund von Schwankungen der Energie der Laserimpulse oder Abweichungen in der Synchronisation der Automatisierung wurden für die Regression in MATLAB nur Spektren berücksichtigt, deren Maxima größer als der Mittelwert des Spektrums multipliziert mit 1,5 waren. Weiterhin wurden Spektren, die bei Sättigung der Kamera gemessen wurden, ausgeschlossen. Um die Energie der Laserimpulse zu berücksichtigen, fand eine Energienormierung der regressierten Amplituden statt. Dazu wurde der entsprechende Regressionskoeffizient durch die gemessene Energie geteilt. Für den Erhalt einer aussagekräftigen und verlässlichen SGF ist jede Wellen-

länge fünfmal vermessen worden. Zudem wurden nur Regressionen mit $R_K^2 > 0,95$ in die anschließende Mittelung einbezogen. Die Ergebnisse für alle drei Gitterpositionen sind in Abbildung 4.5 in Form von Punkten dargestellt.

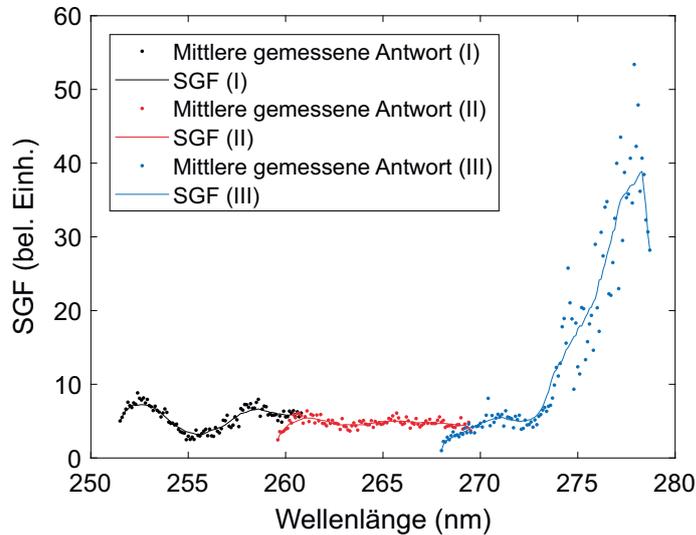


Abbildung 4.5: Mittlere gemessene Antwort für alle drei Gitterpositionen (Punkte) und daraus erstellte kontinuierliche SGF (Kurven) zur Kalibration des experimentellen Aufbaus.⁴¹

Die Datenpunkte weisen eine Streuung auf, insbesondere bei der dritten Gitterposition (blaue Punkte). Die Streuung wird auf Ungenauigkeiten in der Erzeugung der Laserimpulse (bezüglich ihrer Zentralwellenlänge und Energie) sowie in der Kalibration der Fotodiode zurückgeführt. Daher wurden die Datenpunkte gemittelt und zwecks Erstellung einer kontinuierlichen Gerätefunktion für jede Gitterposition linear interpoliert. Die resultierenden SGF sind als Kurven in Abbildung 4.5 enthalten. Indem die einzelnen Intensitätswerte eines Spektrums durch die entsprechenden Werte einer SGF geteilt wurden, sind die einzelnen Raman-Spektren korrigiert worden, um die Transmission der optischen Komponenten zu berücksichtigen. Neben der spektralen Intensität müssen die einzelnen Raman-Spektren einer AEK auch bezüglich ihrer spektralen Position entlang der Abszisse vergleichbar sein. Der spektrale Versatz x_0 wurde für jede Anregungswellenlänge λ_0 nach dem gleichen Verfahren wie bei der Bestimmung der SGF ermittelt, wobei sich kein Langpassfilter im Strahlengang befand.

4.3 Anregungs-Emissions-Karten

Für die Bestimmung der optimalen Anregungswellenlänge zur Aufnahme von Raman-Spektren der Aminosäuren PRO und GLY wurden von diesen Stoffen zunächst wässrige Lösungen mit einer Konzentration von $C_{\text{PRO, GLY}} = 2,8 \text{ M}$ hergestellt und in verschiedene Küvetten gefüllt. Die einzelnen Raman-Spektren wurden mit dem in Abbildung 4.3 gezeigten, kalibrierten Aufbau gemessen. Als Beispiel sind die Raman-Spektren der beiden Aminosäuren bei $\lambda_0 = 266,0 \text{ nm}$ in den Abbildungen 4.6 und 4.7 dargestellt.

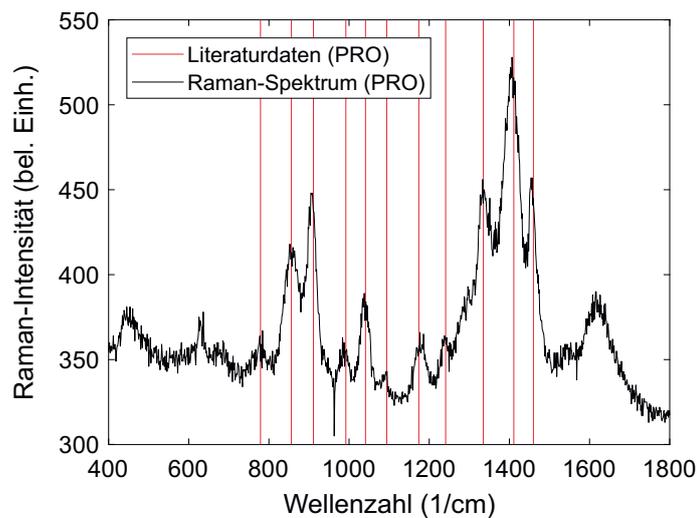


Abbildung 4.6: Raman-Spektrum von PRO, das mit $\lambda_0 = 266,0 \text{ nm}$ aufgenommen wurde. Als Referenz sind (der Literatur entnommene) spektrale Positionen der Raman-Linien/Banden in Form von roten Strichen eingetragen.⁵⁹

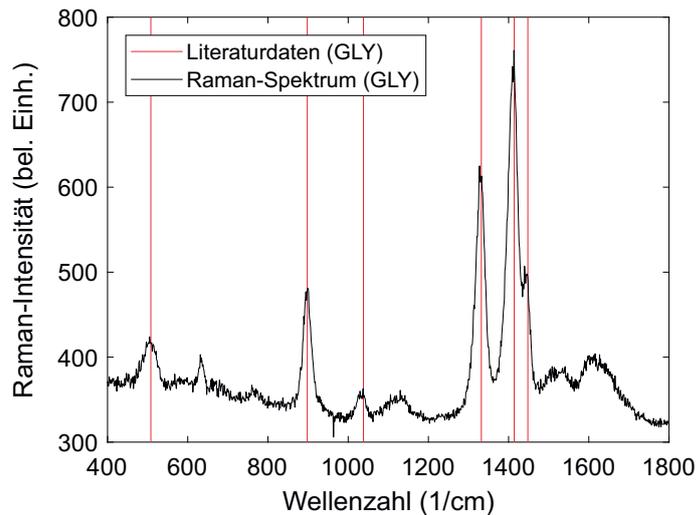


Abbildung 4.7: Raman-Spektrum von GLY, das mit $\lambda_0 = 266,0$ nm aufgenommen wurde. Als Referenz sind (der Literatur entnommene) spektrale Positionen der Raman-Linien/Banden in Form von roten Strichen eingetragen.⁵⁹

Die Raman-Spektren weisen im dargestellten FAB einige charakteristische Signaturen auf, die in genauer Übereinstimmung mit Positionen aus der Literatur stehen.⁵⁹ Grundsätzlich lassen sich Raman-Spektren bei verschiedenen Anregungswellenlängen vergleichen. Insbesondere die Position bleibt bei den meisten Raman-Linien gleich, sofern das Molekül in derselben Form und Lösung vorliegt. Unter Resonanzbedingungen können sich die Spektren (stark) ändern. Im einfachsten Fall sind also bei anderen Anregungswellenlängen nur die Intensitäten der Raman-Linien unterschiedlich ausgeprägt. Bei den abgebildeten Spektren handelt es sich um Rohdaten, die bereits entlang der Abszisse verschoben wurden. Dies war der erste Schritt der Datennachbearbeitung, die durchgeführt wird, um die einzelnen Raman-Spektren für die Erstellung einer AEK vergleichbar zu machen.

4.3.1 Datennachbearbeitung

Im Folgenden wird die Nachbearbeitung von Raman-Spektren erläutert. Sie kann anhand des Flussdiagramms in Abbildung 4.8 nachvollzogen werden:

(1) Verschiebung

Im ersten Schritt der Datennachbearbeitung werden die einzelnen Raman-Spektren entlang der Abszisse verschoben. Die Verschiebung setzt sich aus zwei Termen zusammen. Ein Term ergibt sich aus dem spektralen Versatz (x_0), der im Rahmen der Kalibration des experimentellen Aufbaus für die Anregungswellenlängen und

unabhängig von den Raman-Spektren ermittelt wurde (siehe Abschnitt 4.2.2). Der Wert berücksichtigt Ungenauigkeiten in der Kalibration des OPOs sowie des Spektrografen. Der andere Term korrigiert die mechanischen Ungenauigkeiten, die durch das Drehen des Gitters aufgetreten sind. Diese Ungenauigkeiten ließen sich erst nach Aufnahme der Raman-Spektren für die AEK bestimmen. Dazu wurde für jede Gitterposition eine mittlere Verschiebung aus allen der jeweiligen Gitterposition zugeordneten Raman-Spektren bestimmt. Durch die Verschiebung ist die Korrektur der Abszisse eines Raman-Spektrums abgeschlossen und die Raman-Signale treten an den korrekten spektralen Positionen auf. Letzteres konnte anhand des Vergleichs von gemessenen Raman-Spektren mit Literaturdaten validiert werden (siehe Abbildungen 4.6 und 4.7). Die verbleibenden vier Schritte dienen der Korrektur der spektralen Intensität.

(2) Entfernung von Artefakten

In diesem Schritt werden Artefakte in den Spektren entfernt, die unter anderem durch das Auftreten kosmischer Strahlung hervorgerufen werden können. Hochenergetische Teilchen durchdringen die aktive Fläche der Kamera und führen zur Sättigung eines bzw. einiger weniger Pixel. Für die Entfernung eines Artefakts wird die gemessene Intensität nach Werten durchsucht, die starke Abweichungen von den beiden benachbarten Werten aufweisen. Überschreiten diese beiden Abweichungen einen Schwellenwert, wird der gerade untersuchte Datenpunkt durch den Mittelwert der beiden benachbarten Punkte ersetzt. Die Schwelle wurde so gewählt, dass keine Raman-Signale beeinflusst werden und entspricht dem zehnfachen Mittelwert aller Differenzen von benachbarten Datenpunkten.

(3) Grundlinienkorrektur

Die Art der Datennachbearbeitung, die in der RS die meiste Aufmerksamkeit erfordert, ist die Grundlinienkorrektur. Neben dem Raman-gestreuten Licht wird vom Spektrografen Fluoreszenzlicht aufgenommen, das, abhängig von der Anregungswellenlänge, einen erheblichen Einfluss auf das gemessene Spektrum haben kann. In der RRS von kleinen Biomolekülen (z. B. Aminosäuren) kommt es zwar zum Auftreten von Fluoreszenz, diese liegt für Anregungswellenlängen < 250 nm aber außerhalb des FAB.⁶⁰ Da hier Wellenlängen bis 266,0 nm eingesetzt werden, wird aus Konsistenzgründen bei allen Raman-Spektren eine Grundlinienkorrektur vorgenommen. Der Hintergrund eines Raman-Spektrums besteht neben Fluoreszenz aus einem Anteil, der aus dem Dunkelstrom der Kamera resultiert und wellenlängenunabhängig ist. Für die Normierung eines Spektrums (z. B. Energienormierung) ist es daher ebenfalls nötig, den Hintergrund im Vorfeld zu entfernen.

In der Grundlinienkorrektur wird der spektrale Verlauf des Hintergrunds bestimmt und vom Spektrum abgezogen. In der RS haben sich diverse Algorithmen zur Grundlinienkorrektur von Spektren etabliert.⁶¹⁻⁶⁷ In dieser Arbeit wurde der von Koch *et al.* entwickelte Algorithmus verwendet.⁶⁸ Für einen Vergleich mit anderen Verfahren und eine detaillierte Erklärung der hier verwendeten Methode wird auf die referenzierte Arbeit verwiesen.⁶⁸

(4) Spektrale Gerätefunktion

Im vierten Schritt werden die Raman-Spektren bezüglich ihrer spektralen Intensität korrigiert, um die wellenlängenabhängige Transmission des experimentellen Aufbaus zu berücksichtigen. Dazu werden die einzelnen Intensitätswerte eines Spektrums durch die entsprechenden Werte der SGF geteilt. Dabei wird derjenige Teil der SGF gewählt, der der eingestellten Gitterposition entspricht (vergleiche Tabelle 4.1).

(5) λ^{-4} + Energie

Der letzte Schritt behandelt die starke Wellenlängenabhängigkeit des Wirkungsquerschnitts der Raman-Streuung ($\sim \lambda^{-4}$), sowie die tatsächlich in die Probe eingetragene Energie. Für die Berücksichtigung des Wirkungsquerschnitts wird der Quotient aus der aktuellen und kürzesten Anregungswellenlänge gebildet. Das Spektrum wird dann mit der vierten Potenz dieses Quotienten multipliziert. Dadurch beschränkt sich die Entwicklung des Resonanzprofils auf die resonante Verstärkung.

Um die Schwankung der Energie der Laserimpulse und die daraus resultierende Abweichung der in die Probe eingetragenen Energie von der Vorgabe zu berücksichtigen, werden die Raman-Intensitäten durch die applizierte Gesamtenergie geteilt, es findet also eine Energienormierung statt.

Die auf diese Weise korrigierten Raman-Spektren konstituieren eine AEK. Alle Spektren befinden sich an den korrekten spektralen Positionen und sind bezüglich ihrer Intensitätswerte nachbearbeitet worden, um den Resonanzverlauf korrekt widerzuspiegeln.

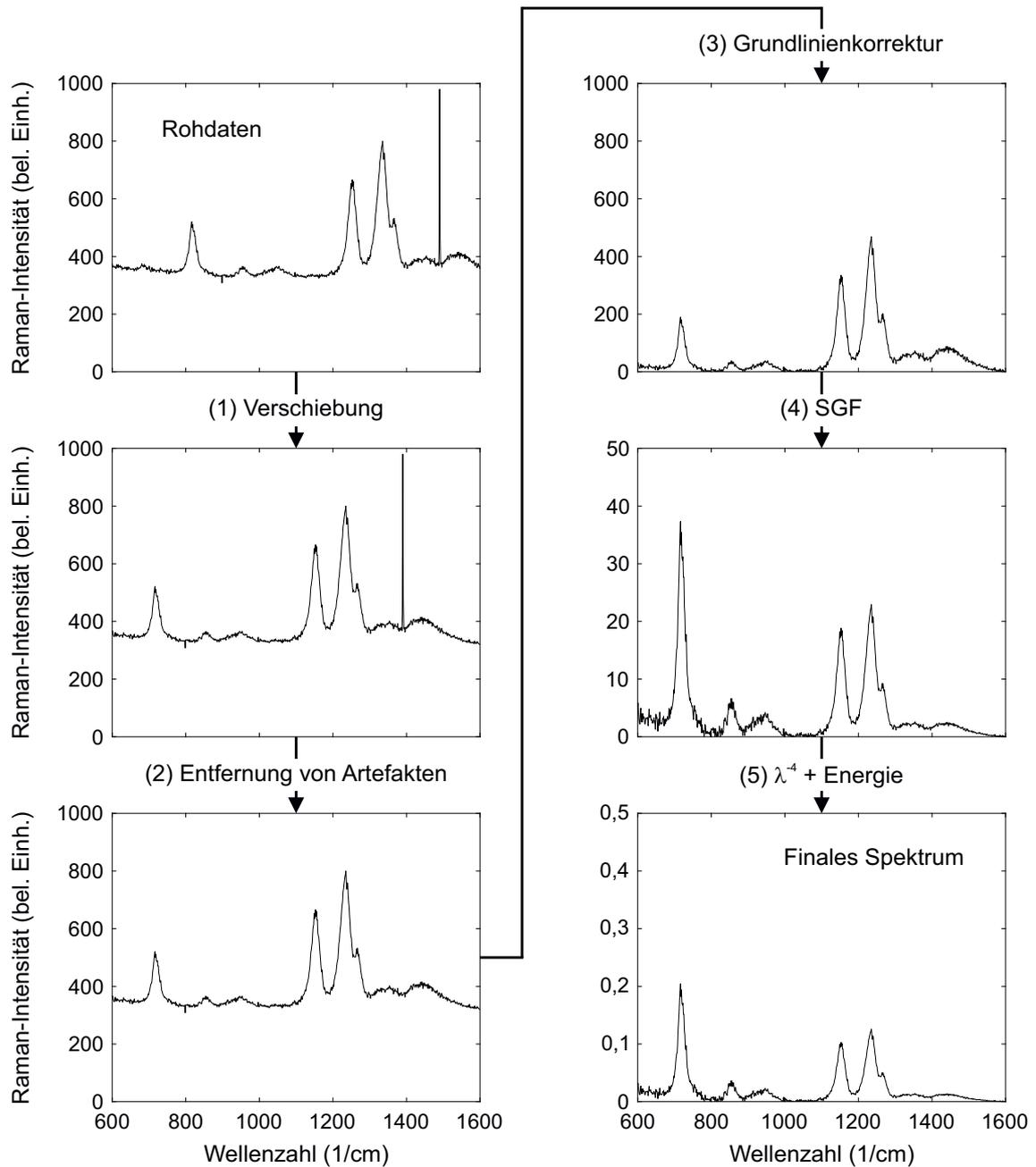


Abbildung 4.8: Die Abbildung zeigt das Flussdiagramm der Datennachbearbeitung von Raman-Spektren in der RRS. Die Spektren werden bezüglich ihrer spektralen Position und Intensität korrigiert.⁴¹

4.3.2 Resonanzprofile

Für die Erstellung der AEK von PRO und GLY wurden jeweils 161 Raman-Spektren aufgenommen und mit dem im vorangegangenen Abschnitt vorgestellten Algorithmus

nachbearbeitet. In den Abbildungen 4.9 und 4.10 sind die Resonanzverläufe für die beiden Aminosäuren dargestellt.

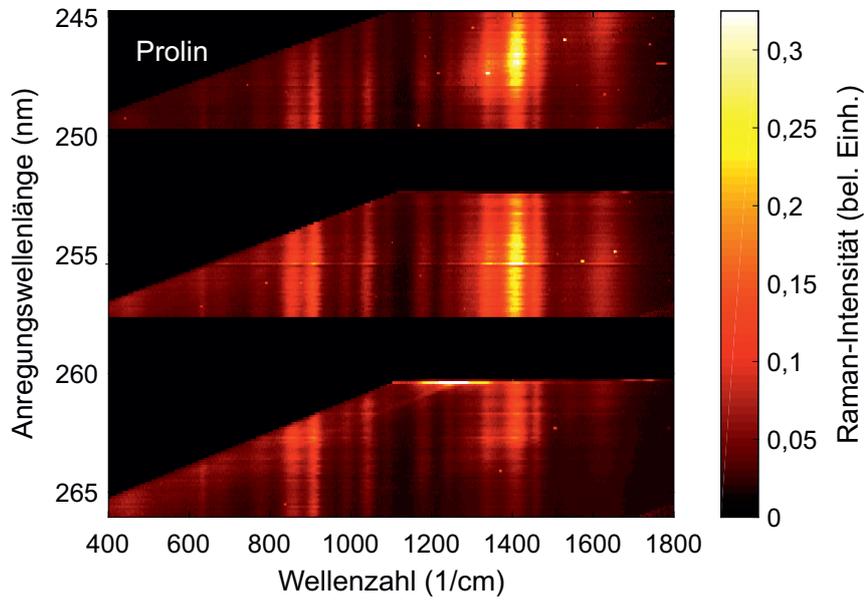


Abbildung 4.9: AEK von PRO: Raman-Signale werden als vertikale Linien und optimale Resonanzbedingungen als maximale Raman-Intensität dargestellt.⁴¹

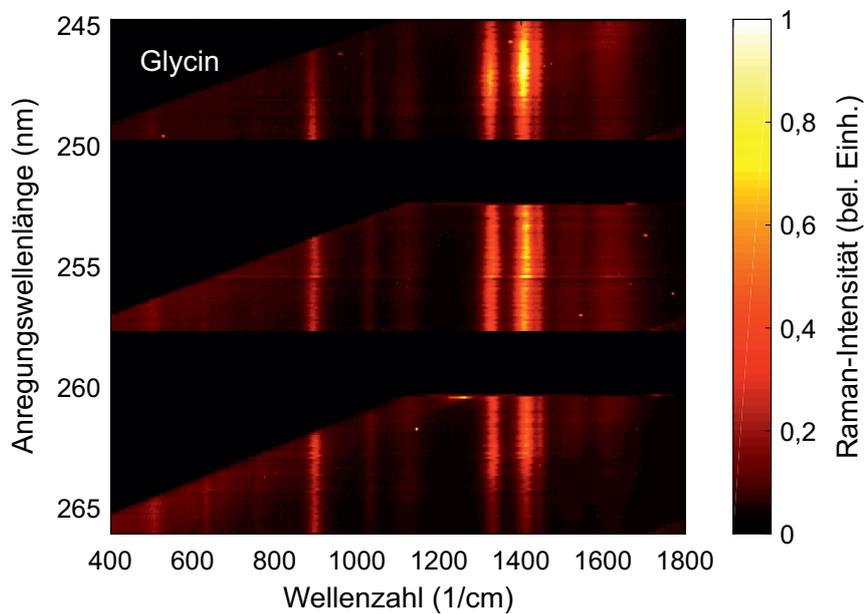


Abbildung 4.10: AEK von GLY: Raman-Signale werden als vertikale Linien und optimale Resonanzbedingungen als maximale Raman-Intensität dargestellt.⁴¹

Die AEK sind in drei Abschnitte unterteilt, die den Gitterpositionen entsprechen (siehe Tabelle 4.1). Aufgrund der begrenzten Verfügbarkeit von geeigneten Langpassfiltern treten in den Karten jeweils zwei Bereiche auf, in denen keine Raman-Spektren aufgenommen werden konnten. Wie den Absorptionsspektren der beiden Aminosäuren bereits zu entnehmen war (vergleiche Abbildung 4.2), nimmt die Raman-gestreuete Intensität in Richtung kürzerer Anregungswellenlängen zu. Eine steigende Absorption führt zu einer Zunahme des Wirkungsquerschnitts für Raman-Streuung. Im Gegensatz zum Absorptionsspektrum besitzt die Resonanzverstärkung keine monotone Steigung. Dies wird auf Ungenauigkeiten in der Bestimmung der SGF des experimentellen Aufbaus zurückgeführt. Es ist eine Tendenz in den AEK beider Stoffe erkennbar, die die Resonanzverstärkung in der RRS belegt.

Im Hinblick auf die nichtinvasive Analyse der Perilymphe ist die Identifikation der optimalen Anregungswellenlänge von besonderem Interesse. Die Proteine der Perilymphe weisen eine verstärkte Absorption im kurzwelligen Spektralbereich auf (siehe Abschnitt 8.1). Folglich ist eine Wellenlänge zur Anregung der Raman-Streuung aus diesem Bereich besonders effizient. Die optischen Eigenschaften der RFM haben allerdings gezeigt, dass Licht in diesem Spektralbereich eine starke Dämpfung im Membrangewebe erfährt (vergleiche Abschnitt 3.1).

Als Kompromiss muss demzufolge eine Wellenlänge ausgewählt werden, die einerseits mit den optischen Eigenschaften der RFM konform ist und andererseits in der Nähe des Absorptionsbereichs der Innenohrproteine liegt. Wie sich im weiteren Verlauf dieser Arbeit zeigt, wurde die Wahl der optimalen Anregungswellenlänge noch von weiteren (technischen) Umständen beeinflusst.

5 Multivariate Datenanalyse in der Raman-Spektroskopie

Das Raman-Spektrum eines Moleküls liefert Informationen über dessen chemische Struktur, wobei die Linien/Banden im Spektrum den einzelnen chemischen Bindungen des Moleküls entsprechen (sofern die zugehörigen Schwingungen Raman-aktiv sind). Wird das Raman-Spektrum einer Probe gemessen, die aus zwei oder mehreren unterschiedlichen Stoffen besteht, kann das aufgenommene Raman-Spektrum als eine Superposition der beiden Einzelspektren aufgefasst werden. Es ist aber auch möglich, dass einzelne Raman-Linien/Banden nicht zum Vorschein kommen. Die möglichen Schwingungen werden maßgeblich durch die Umgebung beeinflusst. In wässriger Lösung wirken Van-der-Waals-Kräfte (Wasserstoffbrücken des Lösungsmittels) auf die Atome des Analyten. Im Festkörper wirken hingegen die Kräfte, die von den gleichartigen (benachbarten) Molekülen stammen. Es können sowohl die Schwingungsenergien beeinflusst werden (Verschiebung der Linienlage), als auch ganze Raman-Banden durch starke Deformation im Spektrum auftreten oder verschwinden. Hinsichtlich der nichtinvasiven Analyse der Perilymphe kann davon ausgegangen werden, dass das Raman-Spektrum dieser Flüssigkeit aus einer Vielzahl von Raman-Linien/Banden besteht und das Resultat einer Superposition von vielen verschiedenen Proteinen ist. Um in einem solchen Spektrum einzelne Proteine zu identifizieren, wird eine Methode benötigt, die die Konzentrationen von einzelnen Proteinen einem Raman-Spektrum entnehmen kann. Je nach Krankheitsbild kann es auch diagnostisch signifikant sein, die Änderung der Gesamtkonzentration aller Proteine bzw. einer Gruppe von Proteinen zu ermitteln.

In der Interpretation und Klassifizierung von großen Datenmengen hat sich die Hauptkomponentenanalyse [engl.: principal component analysis] (PCA) etabliert.^{19,69–71} Es handelt sich hierbei um einen mathematischen Algorithmus, mit dem man Gemeinsamkeiten sowie Unterschiede in einem Datensatz identifizieren und die Daten entsprechend dieser Merkmale kategorisieren kann. Um damit zusätzlich physikalische Größen (z. B. Konzentrationen) aus dem Datensatz zu extrahieren, kann eine Erweiterung der PCA, die Partial Least Square-Regression (PLSR), angewendet werden.

In diesem Kapitel werden diese beiden Methoden vorgestellt. Am Beispiel einiger Aminosäuren wird das Funktionsprinzip erläutert und die Anwendbarkeit zur Bestimmung der Konzentrationen von Molekülen in wässrigen Lösungen demonstriert. Die hier gewonnenen Erkenntnisse dienen als Grundlage für die Messung von klinisch relevanten Proteinen (siehe Kapitel 8).

5.1 Mathematische Grundlagen

In der multivariaten Datenanalyse wird eine Hauptachsentransformation durchgeführt. Ausgehend von dem Koordinatensystem, in dem die zu untersuchenden Daten vorliegen, wird ein neues Koordinatensystem berechnet, in das die Daten überführt werden. Das neue System wird so berechnet, dass die neuen Koordinatenachsen in die Richtung der größten Varianz der Daten zeigen. Auf diese Weise werden in einer großen Datenmenge bestimmte Muster identifiziert, die eine Strukturierung der Daten entsprechend der darin vorkommenden Gemeinsamkeiten und Unterschiede ermöglicht. Daten, die sich keinem Muster zuordnen lassen, also wenig zur Aussagekraft beitragen, können bei der anschließenden Auswertung unberücksichtigt bleiben. Auf diese Weise findet eine Datenreduktion statt. Die Aussagekraft der Daten wird in der multivariaten Datenanalyse durch den Anteil an der gesamten Varianz quantifiziert, der von einem bestimmten Muster (z. B. einem Raman-Spektrum) erklärt wird. Der mathematische Hintergrund wird zunächst anhand der PCA erklärt. Die PLSR beschreibt eine Methode, die eine multivariate Analyse unter Einbeziehung bestimmter Eigenschaften der zu untersuchenden Proben durchführt. Auf diese Weise wird ein mathematisches Modell berechnet, das einen Zusammenhang zwischen den Daten und diesen Eigenschaften herstellt. Für eine umfassende Beschreibung der multivariaten Datenanalyse wird auf die Literatur verwiesen.⁷²

5.1.1 Hauptkomponentenanalyse

Für die multivariate Datenanalyse von Raman-Spektren werden alle gemessenen Spektren in die Zeilen der Matrix $X_{i,j}$ eingetragen. Der Index i ordnet eines der gemessenen Raman-Spektren einer Zeile i in der Matrix zu, während der Index j die spektrale Koordinate x angibt. Für die korrekte Durchführung einer PCA müssen die einzelnen Spektren vergleichbar sein. Ein Algorithmus zur Datennachbearbeitung muss beispielsweise eine gemeinsame Abszisse für alle Spektren bestimmen und unterschiedliche applizierte Energien bei der Messung berücksichtigen (siehe hierzu Kapitel 4.3.1).

Als Maß für die Gemeinsamkeiten und Unterschiede in den Spektren wird die Varianz der Daten betrachtet. Im Fall von mehrdimensionalen Daten (mehrere Raman-Spektren) betrachtet man die Kovarianz K , die folgendermaßen definiert ist.⁵⁸

$$K_{j,k} = \frac{1}{N-1} \sum_{i=1}^N (x_{i,j} - \bar{x}_j)(x_{i,k} - \bar{x}_k). \quad (5.1)$$

Genau wie j ist k ein Index, der eine Spalte der Datenmatrix X benennt. Der Parameter N gibt die Anzahl der für die multivariate Analyse verwendeten Raman-Spektren, also die Anzahl der Zeilen der Matrix X , an. Der Mittelwert \bar{x} wird aus allen Elementen einer Spalte berechnet. Für $j = k$ ist die Kovarianz gleich der Varianz.

Aus den einzelnen Kovarianzen $K_{j,k}$ wird als Nächstes die Kovarianzmatrix erstellt. Es ist eine quadratische Matrix, deren Dimension der Anzahl der Spalten der Datenmatrix X entspricht. Auf der Hauptdiagonalen befinden sich die Varianzen. Die Kovarianzmatrix ist symmetrisch bezüglich der Hauptdiagonalen, da der Ausdruck für die einzelnen Elemente kommutativ ist. Für diese Matrix werden die Eigenvektoren und Eigenwerte berechnet. Bei den Eigenvektoren handelt es sich um die Hauptkomponenten. Die Vektoren sind zueinander orthogonal und spannen das neue Koordinatensystem auf, das durch die Hauptachsentransformation entstanden ist. Die Eigenwerte geben an, wie viel von der gesamten Varianz durch den entsprechenden Eigenvektor erklärt wird. In der multivariaten Datenanalyse sind die Eigenvektoren (Hauptkomponenten), die den größten Teil der Varianz erklären, am wichtigsten. Üblicherweise werden die einzelnen Vektoren dementsprechend sortiert. Die eingangs erwähnte Datenreduktion erfolgt dadurch, dass Hauptkomponenten, die einen geringen Anteil an der gesamten Varianz erklären, in der weiteren Untersuchung unberücksichtigt bleiben.

Besteht die Datenmatrix X aus Raman-Spektren, haben die Hauptkomponenten ebenfalls die Form von Spektren. Die Hauptkomponente mit dem größten Eigenwert weist die größte Ähnlichkeit mit den Spektren in der Matrix X auf. Auf diese Weise können spektrale Komponenten aus einer großen Datenmenge extrahiert werden, die in dieser Menge besonders dominant sind.

5.1.2 Partial Least Square-Regression

In der PLSR wird nach einem Partial Least Square-Regressionsmodell β gesucht, das Parameter (z. B. die Konzentration eines Stoffs) aus einem Raman-Spektrum

errechnen kann. Dazu wird zunächst ein Modell auf Grundlage der gemessenen Raman-Spektren und Konzentrationen der Stoffe in den Proben berechnet, das dann eine Vorhersage der Konzentrationen von Stoffen treffen kann, die nicht Teil des Modells sind. Die Genauigkeit der Vorhersage wird von der Robustheit des Modells bestimmt. Letztere hängt von der Vielseitigkeit der Datenmatrix X ab, also der Anzahl der Raman-Spektren, die bei unterschiedlichen Konzentrationen aufgenommen wurden. Neben der Matrix $X_{i,j}$ wird die entsprechende Eigenschaftsmatrix $y_{i,l}$ benötigt. Die Zeilen der Matrix y enthalten die Eigenschaften (Konzentrationen) der Stoffe, die die entsprechenden Proben ausmachen. Der Index l benennt den jeweiligen Stoff. Für die Matrizen X und y wird jeweils eine PCA durchgeführt. Anders als bei der Berechnung, die im vorangegangenen Abschnitt vorgestellt wurde, beeinflussen sich die Hauptkomponentenanalysen gegenseitig. Bei der Identifikation der Komponenten wird die Eigenschaftsmatrix y hinzugezogen. Das Ergebnis einer PLSR ist ein mathematisches Modell β (Matrix), das in folgendem Zusammenhang mit den Raman-Spektren und Konzentrationen steht:

$$y_{i,l} = X_{i,j} \cdot \beta_{j,l}. \quad (5.2)$$

In der PLSR wird die Datenmatrix X im Vorfeld üblicherweise in einen Kalibrationsdatensatz X_K und einen Validierungsdatensatz X_V aufgeteilt. Mit der Eigenschaftsmatrix y wird analog verfahren (y_K und y_V). Mit den beiden Kalibrationsdatensätzen (X_K und y_K) wird zunächst das Regressionsmodell berechnet, welches anschließend mithilfe des anderen Datensatzes (X_V und y_V) validiert wird, indem die vorhergesagten Konzentrationen mit den tatsächlichen (gemessenen) Werten verglichen werden. Wie schon bei der PCA findet auch bei der PLSR eine Datenreduktion statt. Für die Berechnung des optimalen Modells wird zunächst die Anzahl der Komponenten bestimmt, mit denen das Modell berechnet werden soll. Dies wird im weiteren Verlauf dieses Kapitels anhand der RS von einigen Aminosäuren näher erläutert und demonstriert.

5.2 Multivariate Analyse von Aminosäuren

Die Vorgehensweise in der multivariaten Datenanalyse wird im Folgenden anhand der Auswertung von Raman-Spektren verschiedener Aminosäuren erläutert und demonstriert. Neben den Reinstoffen wurden auch Mischungen aus Aminosäuren

hergestellt und untersucht. Die Spektren wurden mit dem aus Abbildung 4.3 bekannten experimentellen Aufbau aufgenommen, der geringfügig verändert wurde. Die in diesem Kapitel vorgestellten Messungen wurden bei einer Anregungswellenlänge von $\lambda_0 = 248 \text{ nm}$ des OPOs durchgeführt. Die aus der RRS gewonnenen Erkenntnisse haben gezeigt, dass diese Wellenlänge besonders geeignet ist, um Aminosäuren zu untersuchen. Einerseits liegt sie in den Ausläufern der Absorptionsspektren der Aminosäuren (Präresonanz), andererseits in der Nähe der Kantenwellenlänge des entsprechenden Langpassfilters, was wichtig ist, um den FAB weitestgehend im Transmissionsbereich des Filters zu erzeugen. Anstelle der Fotodiode wurde ein pyroelektrischer Energiesensor (ES111C, Thorlabs) eingesetzt. Bei den Messungen der Resonanzprofile wurde auf eine Fotodiode zurückgegriffen, da die vom OPO emittierten Laserimpulse bei bestimmten Wellenlängen eine zu geringe Energie besaßen, um sie mit einem pyroelektrischen Sensor zu erfassen. Die Sensoren haben die Energie der absorbierten Laserimpulse direkt ausgegeben. Somit musste nur das Reflexionsvermögen des Strahlteilers bestimmt werden, um die in die Probe eingetragene Energiemenge ermitteln zu können. Für die Kalibration wurde ein weiterer Energiesensor (ES111C, Thorlabs) hinter dem Strahlteiler in den Aufbau eingesetzt. Vom OPO wurden 100 Laserimpulse emittiert und simultan von beiden Sensoren erfasst. Mittels linearer Regression wurden zwei Kalibrationskoeffizienten berechnet, mit denen die (während einer Raman-spektroskopischen Messung) in die Probe eingetragene Energie bestimmt werden konnte. Bei $\lambda_0 = 248 \text{ nm}$ werden 8 % der Energie zum Sensor reflektiert, während der Rest in die Probe eingetragen wird. Die Glasfaser, die das Raman-gestreute Licht zum Spektrografen leitete, wurde durch ein Bündel aus 18 Glasfasern (SO-106873, CeramOptec, Kerndurchmesser von jeweils $200 \mu\text{m}$) ersetzt, um mehr Licht einsammeln zu können. Das dem Spektrografen zugewandte Ende des Bündels bestand aus einer linearen Anordnung der Glasfasern. Für die optimale Einkopplung des Lichts in das Spektrometer wurde ein Adapter (SR-ASM-0039, Andor) eingesetzt, der die numerische Apertur der Glasfasern an die des Spektrometers angepasst hat. Der Adapter bestand aus zwei gekrümmten Spiegeln, die das Licht zum Eintrittsspalt des Spektrometers geleitet haben. Zum Erreichen einer hohen spektralen Auflösung wurde eine Spaltbreite von $100 \mu\text{m}$ eingestellt. Das Gitter im Spektrometer besaß 1200 Linien pro mm und war für eine Wellenlänge von 300 nm optimiert.

Zur Bestimmung der spektralen Auflösung wurde eine Küvette mit entionisiertem Wasser verwendet. Anstelle des Langpassfilters wurden zwei Neutraldichtefilter (NDUV40A und NDUV10A, Thorlabs) in den Strahlengang eingebracht, um eine Sättigung der Kamera zu verhindern. Mit einer Belichtungsdauer von $t = 10 \text{ s}$ wurde ein Spektrum des Rayleigh-gestreuten Lichts aufgenommen. Mittels Regression in

Form eines Voigt-Profiles (siehe Gleichung 4.1) wurde die spektrale Breite der gemessenen Intensität zu 25 cm^{-1} berechnet.

Die Aminosäuren, anhand derer die multivariate Datenanalyse evaluiert werden sollte, waren neben den aus Kapitel 4 bereits bekannten Stoffen GLY ($m_0 = 75,067 \text{ g mol}^{-1}$) und PRO ($m_0 = 115,131 \text{ g mol}^{-1}$) die Stoffe Alanin (ALA) (05129-25G, Sigma-Aldrich, $m_0 = 89,094 \text{ g mol}^{-1}$), Arginin (ARG) (11009-25G-F, Sigma-Aldrich, $m_0 = 174,201 \text{ g mol}^{-1}$), Threonin (THR) (T8441-25G, Sigma-Aldrich, $m_0 = 119,119 \text{ g mol}^{-1}$) und Valin (VAL) (94619-25G, Sigma-Aldrich, $m_0 = 117,147 \text{ g mol}^{-1}$).⁵⁵ Diese Stoffe wurden gewählt, da sie jeweils eine hohe Löslichkeit in Wasser aufweisen. Zusammen mit PBS wurden aus den Pulvern der Aminosäuren Lösungen mit den Konzentrationen $C_{\text{ALA}} = 1,5 \text{ M}$, $C_{\text{ARG}} = 0,8 \text{ M}$, $C_{\text{GLY}} = 3,0 \text{ M}$, $C_{\text{PRO}} = 3,0 \text{ M}$, $C_{\text{THR}} = 0,5 \text{ M}$ und $C_{\text{VAL}} = 0,5 \text{ M}$ hergestellt und in Küvetten gefüllt. Mit einer Belichtungszeit von $t = 200 \text{ s}$ (für ALA, ARG, THR und VAL) bzw. $t = 100 \text{ s}$ (für GLY und PRO) wurden die einzelnen Raman-Spektren aufgenommen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5.1 dargestellt.

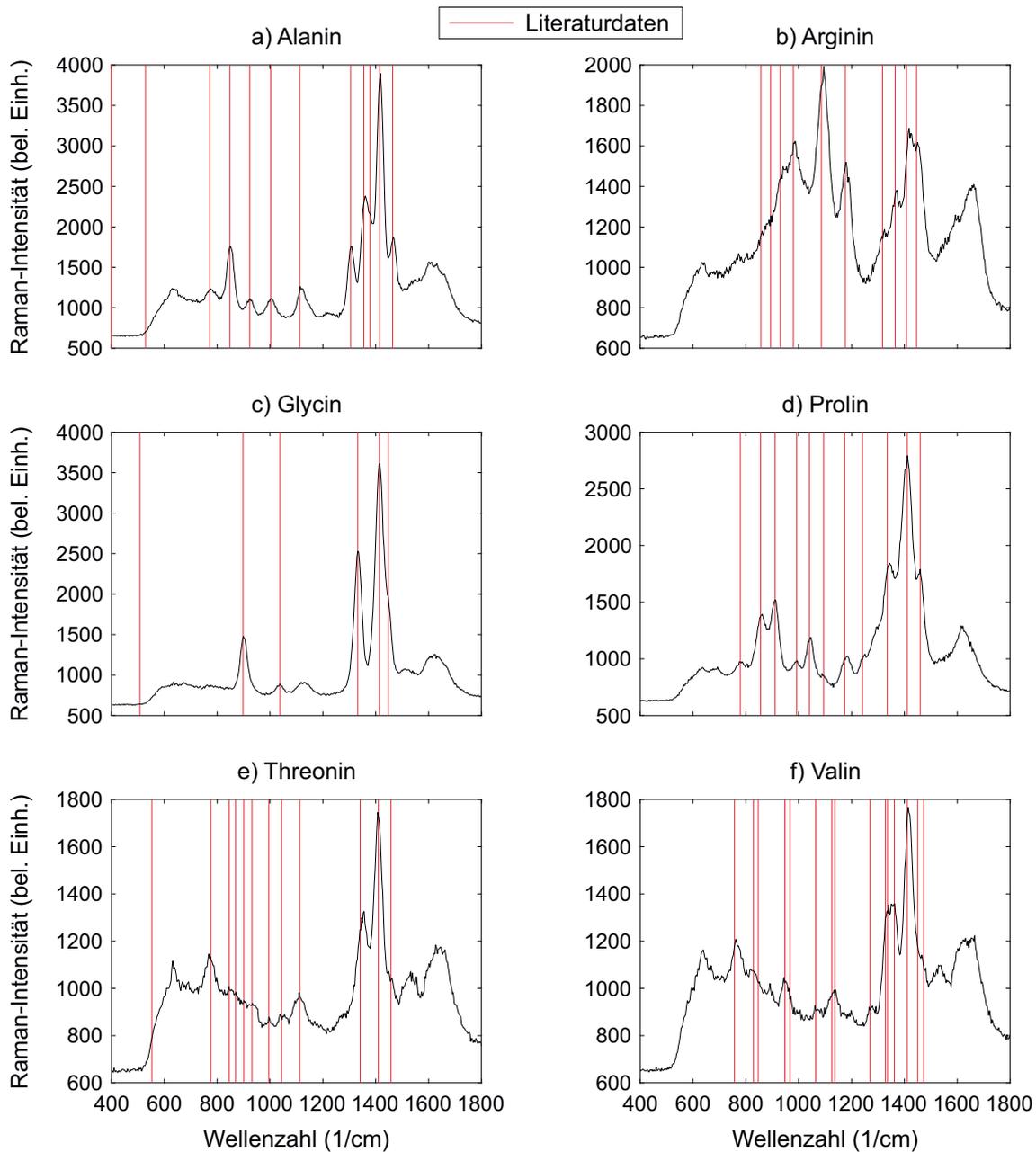


Abbildung 5.1: Raman-Spektren der sechs Aminosäuren, die für die Evaluation der multivariaten Datenanalyse verwendet wurden ($\lambda_0 = 248 \text{ nm}$). Als Referenz sind (der Literatur entnommene) spektrale Positionen der Raman-Linien/Banden in Form von roten Strichen eingetragen.⁵⁹

Bei den Raman-Spektren handelt es sich um Rohdaten, die entlang der Abszisse verschoben wurden, um die Raman-Linien/Banden an den korrekten spektralen Positionen zu erhalten. Da sich die Anregungswellenlänge in der Nähe der Kantenwellenlänge des Langpassfilters befand, konnte der spektrale Versatz für jedes Spektrum

individuell ermittelt werden, indem der spektrale Verlauf des Rayleigh-gestreuten Lichts regressiert wurde. Zum Vergleich sind in Form von roten Strichen die Positionen der Raman-Linien/Banden aus Literaturdaten eingetragen.⁵⁹ Die gemessenen Linien/Banden stimmen mit denen aus der Literatur überein.

Die hier vorgestellten Proben bildeten die Grundlage für die folgenden multivariaten Analysen von Aminosäuren verschiedener Mischungen.

5.2.1 Partial Least Square-Regression von zwei Aminosäuren

Die einfachste Zusammensetzung einer artifiziellen Perilymphe besteht aus zwei verschiedenen Aminosäuren. Für diese Konstellation wird zunächst eine Hauptkomponentenanalyse durchgeführt, bevor mithilfe der PLSR versucht wird, die Konzentration der einzelnen Bestandteile aus Spektren vorherzusagen, die nicht Teil des Modells sind (Validierungsdatensatz).

Ausgangspunkt einer jeden multivariaten Analyse ist die Datenmatrix X . Die Genauigkeit einer PCA/PLSR hängt von der Vielseitigkeit der Daten in X ab, die der Analyse zugrunde liegen. Aus den Stammlösungen der beiden Aminosäuren GLY ($C_{\text{GLY}} = 3,0\text{ M}$) und PRO ($C_{\text{PRO}} = 3,0\text{ M}$) wurden neun Mischungen hergestellt, wobei der Stoffmengenanteil von PRO (A_{PRO}) 10 % bis 90 % (in Schritten von 10 %) der gesamten Stoffmenge ausmachte:

$$A_{\text{PRO}} = \frac{n_{\text{PRO}}}{n_{\text{GLY}} + n_{\text{PRO}}} \quad \text{bzw.} \quad n_{\text{PRO}} = \frac{A_{\text{PRO}} n_{\text{GLY}}}{1 - A_{\text{PRO}}}. \quad (5.3)$$

Hier ist n die Stoffmenge. Über $C = n / V$ ist der Zusammenhang von n mit der Konzentration C und dem Volumen V des Lösungsmittels gegeben. Die Relation $n = m / m_0$ verknüpft die Stoffmenge mit der Masse des Pulvers einer Aminosäure m und der molekülspezifischen molaren Masse m_0 . Die Mischungen wurden mit einer Belichtungsdauer von $t = 100\text{ s}$ Raman-spektroskopisch untersucht. Zusammen mit den Raman-Spektren der Reinstoffe von GLY und PRO (Abbildung 5.1 c) und d) wurden die Spektren in die Zeilen der Matrix X eingetragen. In Abbildung 5.2 sind die einzelnen Raman-Spektren untereinander dargestellt.

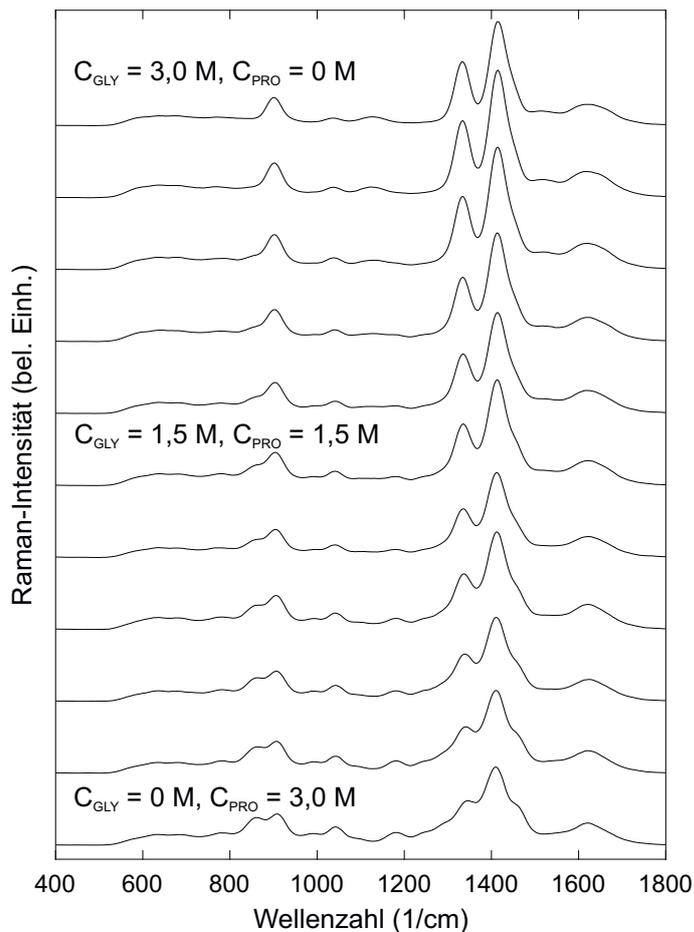


Abbildung 5.2: Raman-Spektren von Lösungen, die aus unterschiedlichen Mischungen der beiden Aminosäuren GLY und PRO zusammengesetzt wurden. Der Stoffmengenanteil von PRO an der gesamten Stoffmenge wurde in Schritten von 10 % (0,3 M) erhöht (ausgehend vom obersten Spektrum). Die Spektren wurden bei $\lambda_0 = 248 \text{ nm}$ und mit $t = 100 \text{ s}$ aufgenommen.

Um die einzelnen Raman-Spektren für die multivariate Datenanalyse vorzubereiten (vergleichbar zu machen), wurde der in Kapitel 4.3.1 vorgestellte Algorithmus zur Datennachbearbeitung in einer modifizierten Form angewendet. Der erste Schritt (Verschiebung) wurde eingangs bereits diskutiert. Da die Spektren mit dem Programm des Spektrografen aufgenommen wurden, konnte auf den zweiten Schritt (Entfernung von Artefakten) verzichtet werden. Dieser war bereits implementiert. Weiterhin wurde auf die Einbeziehung einer SGF verzichtet, da nur eine einzige Anregungswellenlänge benutzt wurde. Aus demselben Grund fand auch keine Korrektur des Streuquerschnitts statt. Um den Einfluss durch Rauschen auf die multivariate Analyse zu minimieren, wurden die Spektren entsprechend der spektralen Auflösung des Spektrografen geglättet. Ausgehend von dem Raman-Spektrum von

GLY ($C_{\text{GLY}} = 3,0\text{ M}$ und $C_{\text{PRO}} = 0\text{ M}$, oberstes Spektrum) wurde der Anteil von PRO sukzessive erhöht. Das unterste Spektrum ist das Raman-Spektrum von PRO ($C_{\text{GLY}} = 0\text{ M}$ und $C_{\text{PRO}} = 3,0\text{ M}$). Durch visuelle Betrachtung der Spektren lassen sich bereits Unterschiede erkennen. Für eine quantitative Beurteilung der zugehörigen Konzentrationen reicht diese Herangehensweise allerdings nicht aus.

Die Datenmatrix X wurde um zwei weitere Raman-Spektren der Reinstoffe von GLY ($C_{\text{GLY}} = 1,0\text{ M}$) und PRO ($C_{\text{PRO}} = 1,0\text{ M}$) ergänzt. Auf dieser Grundlage wurde in MATLAB eine PCA durchgeführt. Die beiden Eigenvektoren (Hauptkomponenten) mit den größten Eigenwerten (erklärte Varianz) sind in den Abbildungen 5.3 und 5.4 dargestellt.

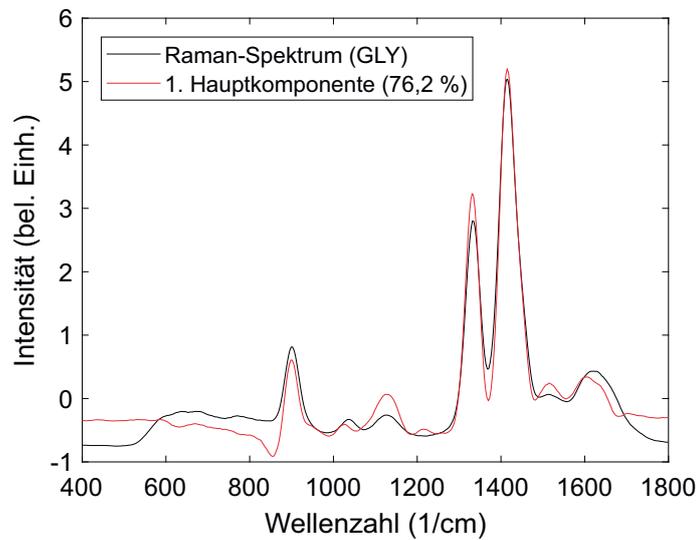


Abbildung 5.3: Raman-Spektrum von GLY (schwarze Kurve) und erste Hauptkomponente der PCA der Datenmatrix X , die für die Aminosäuren GLY und PRO berechnet wurde (rote Kurve). Der Anteil an der gesamten Varianz, die von der ersten Hauptkomponente erklärt wird, ist in Klammern angegeben. Zum besseren Vergleich der beiden Kurven sind die z-standardisierten Werte abgebildet.

Zum besseren Vergleich einer Hauptkomponente mit einem Raman-Spektrum wurden aus den Verläufen jeweils die z-standardisierten Werte berechnet. Dazu wurde von jedem Datenpunkt zunächst der Mittelwert aus allen Datenpunkten subtrahiert. Anschließend wurde die Differenz durch die Standardabweichung (ebenfalls aus allen Datenpunkten berechnet) dividiert. Die erste Hauptkomponente weist eine starke Ähnlichkeit zu dem Raman-Spektrum von GLY auf. Der zugehörige Eigenwert ist hier als Anteil an der gesamten Varianz der Datenmatrix X angegeben. Ein Anteil von 76,2% bestätigt die starke Ähnlichkeit.

Demnach wurden die einzelnen Spektren von der Aminosäure GLY dominiert. Dieser Umstand lässt sich dadurch erklären, dass das Raman-Spektrum von GLY unter gleichen experimentellen Voraussetzungen eine deutlich größere Raman-Intensität aufzeigt, als PRO (vergleiche Abbildung 5.1 c) und d).

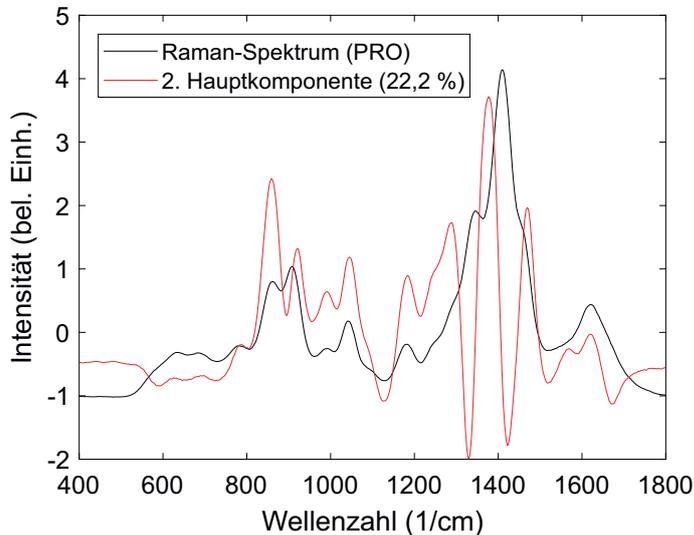


Abbildung 5.4: Raman-Spektrum von PRO (schwarze Kurve) und zweite Hauptkomponente der PCA der Datenmatrix X für zwei verschiedene Aminosäuren (rote Kurve). Der Anteil an der gesamten Varianz, die von der zweiten Hauptkomponente erklärt wird, ist in Klammern angegeben. Zum besseren Vergleich der beiden Kurven sind die z-standardisierten Werte abgebildet.

Die zweite Hauptkomponente erklärt 22,2% der gesamten Varianz. An den Stellen, an denen sich die Raman-Spektren der beiden Aminosäuren unterscheiden, weist das Spektrum von PRO Ähnlichkeiten mit der zweiten Hauptkomponente auf (z. B. bei etwa 850 cm^{-1} und 1150 cm^{-1}). Dies sind Stellen, die von der ersten Hauptkomponente nicht oder nur geringfügig erklärt werden.

Zusammen erklären die beiden Hauptkomponenten mehr als 98% der gesamten Varianz in der Datenmatrix X . Alle höheren Hauptkomponenten tragen praktisch nicht zu der erklärten Varianz bei und können unberücksichtigt bleiben (Datenreduktion). In der PLSR können Komponenten, die nur einen geringen Anteil an der gesamten Varianz erklären, zu genaueren Vorhersagen führen, wenn sie bei der Berechnung des Modells hinzugenommen werden. Neben der Varianz spielt auch der Fehler des Regressionsmodells eine wichtige Rolle.

Bislang fanden die Konzentrationen der Aminosäuren bei der Berechnung einer PCA keine Berücksichtigung. Damit eine Prognose der Zusammensetzung einer Flüssigkeit auf Grundlage eines Raman-Spektrums gemacht werden kann, müssen die Konzen-

trationen als Faktor bei einer PCA involviert werden. Am Beispiel der PLSR zweier Aminosäuren wird im Folgenden ein mathematisches Modell β erstellt, das diesen Zusammenhang herstellt.

Ausgangspunkt ist neben der Datenmatrix X die Eigenschaftsmatrix y , in der die einzelnen Konzentrationen der beiden Aminosäuren enthalten sind. Beide Matrizen wurden zwecks Validierung des noch zu berechnenden Modells in eine Kalibrationsmatrix X_K und eine Validierungsmatrix X_V aufgeteilt. Mit der Matrix y wurde analog verfahren (y_K und y_V). Für die Kalibration wurden neben den vier Raman-Spektren der Reinstoffe vier Spektren unterschiedlicher Mischungen gewählt (A_{PRO} : 20 %, 40 %, 60 % und 80 %). Ähnlich wie bei einem Spektrografen kann auch ein Regressionsmodell nur in einem Bereich verlässliche Ergebnisse liefern, für den es kalibriert ist. Daher wurden Raman-Spektren ausgewählt, die den Wertebereich gleichmäßig abdecken. Die Validierung erfolgte mit den restlichen fünf Spektren der Mischungen. Die Vorhersagegenauigkeit des Modells kann im Vorfeld bereits geschätzt werden, indem der Fehler des Regressionsmodells (geschätzter mittlerer quadratischer Fehler (GMQF)) mittels Kreuzvalidierung bestimmt wird. In Abbildung 5.5 ist der GMQF zusammen mit den erklärten Varianzen in den Matrizen X_K und y_K in Abhängigkeit der Anzahl der Komponenten, die bei der Berechnung des jeweiligen Modells verwendet wurden, gezeigt.

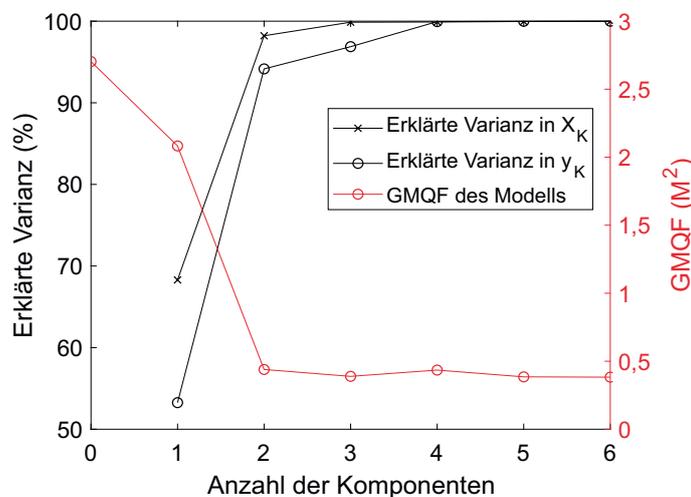


Abbildung 5.5: Statistische Spezifikationen der PLSR-Modelle, die auf Basis des Kalibrationsdatensatzes X_K berechnet wurden (zwei verschiedene Aminosäuren, $\lambda_0 = 248 \text{ nm}$). Die schwarzen Kurven geben die Anteile der erklärten Varianzen an der gesamten Varianz in der Datenmatrix X_K (schwarze Kreuze) und der Eigenschaftsmatrix y_K (schwarze Kreise) an. Der GMQF ist in Rot angegeben. Die drei Verläufe hängen von der Anzahl der bei der Berechnung des jeweiligen Modells verwendeten Komponenten ab.

Der Fehler für Null Komponenten ist die Varianz der Konzentrationen um den Mittelwert. Die durch dieses Modell erklärte Varianz ist Null. Dem Verlauf des GMQF ist zu entnehmen, dass ein PLSR-Modell, das mit zwei Komponenten berechnet wurde, bereits eine gute Vorhersage liefert. Das Hinzunehmen weiterer Komponenten führt kaum zu einer Veränderung des Fehlers. Zwei Komponenten erklären zudem bereits mehr als 98 % der gesamten Varianz in X_K und mehr als 94 % der gesamten Varianz in y_K . Zum Vergleich: Die ersten beiden Hauptkomponenten einer PCA, die für die Matrix X_K berechnet wurde, erklären zusammen ebenfalls mehr als 98 % der gesamten Varianz in X_K (ohne Berücksichtigung der Konzentrationen). Wie sich später zeigen wird, gibt es auch Modelle, die ein deutliches Minimum des entsprechenden GMQF aufweisen.

Aufgrund der statistischen Aussagen aus Abbildung 5.5 wurde ein Modell mit zwei Komponenten berechnet. Die Komponenten lassen sich erneut den Raman-Spektren der beiden Reinstoffe zuordnen (siehe Abbildungen 5.6 und 5.7).

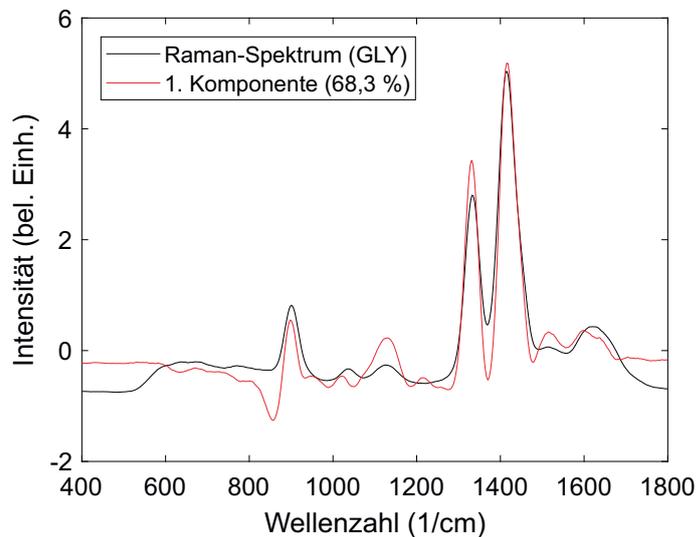


Abbildung 5.6: Raman-Spektrum von GLY (schwarze Kurve) und die erste Komponente einer PLSR der Datenmatrix X_K , die mit zwei Komponenten berechnet wurde (rote Kurve, zwei verschiedene Aminosäuren). Der Anteil an der gesamten Varianz in X_K , der von der ersten Komponente erklärt wird, ist in Klammern angegeben. Zum besseren Vergleich der beiden Kurven sind die z-standardisierten Werte abgebildet.

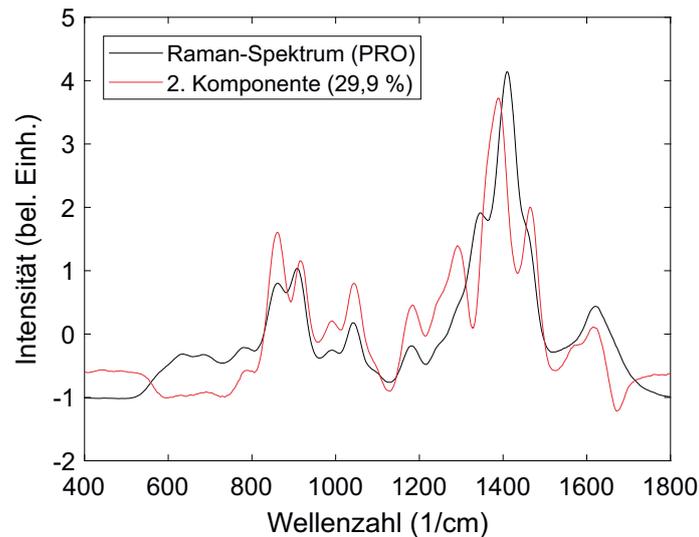


Abbildung 5.7: Raman-Spektrum von PRO (schwarze Kurve) und die zweite Komponente einer PLSR der Datenmatrix X_K , die mit zwei Komponenten berechnet wurde (rote Kurve, zwei verschiedene Aminosäuren). Der Anteil an der gesamten Varianz in X_K , der von der zweiten Komponente erklärt wird, ist in Klammern angegeben. Zum besseren Vergleich der beiden Kurven sind die z-standardisierten Werte abgebildet.

Durch die Berücksichtigung der Konzentrationen bei der PLSR wurde der Aminosäure PRO mehr erklärte Varianz beigemessen (29,9% statt 22,2%). Entsprechend hat sich die durch GLY erklärte Varianz verringert (68,3% statt 76,2%). Die Validierung des Modells wurde durch die Vorhersage der Konzentrationen aus den Raman-Spektren der Datenmatrix X_V getätigt. Gemäß Gleichung 5.2 wurde diese Matrix mit dem Regressionsmodell β multipliziert. In Abbildung 5.8 sind die gemessenen Konzentrationen y_V den vorhergesagten gegenübergestellt worden.

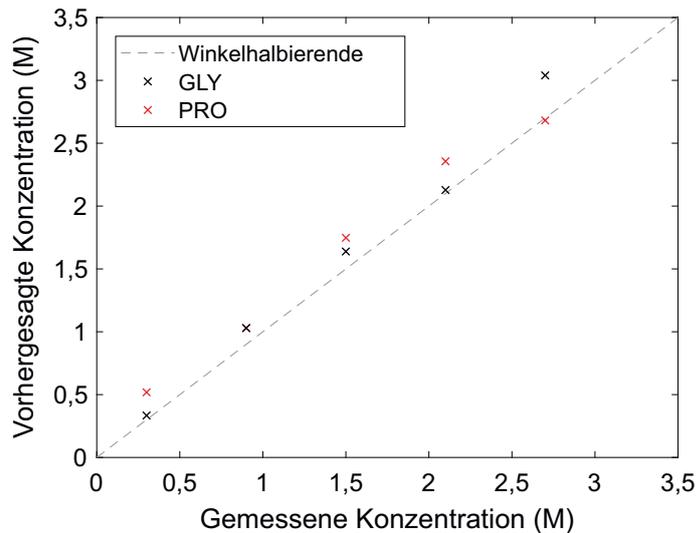


Abbildung 5.8: Gegenüberstellung der von dem PLSR-Modell β vorhergesagten Konzentrationen und der gemessenen Konzentrationen y_V der Aminosäuren GLY (schwarze Kreuze) und PRO (rote Kreuze). Die gestrichelte Linie repräsentiert die ideale Verteilung der Konzentrationen.

Die vorhergesagten Konzentrationen von GLY (schwarze Kreuze) und PRO (rote Kreuze) weichen nur geringfügig von den gemessenen Werten ab, haben also einen geringen Abstand zur Winkelhalbierenden (gestrichelte Linie), die den idealen Zusammenhang zwischen vorhergesagten und gemessenen Konzentrationen widerspiegelt. Um die Validierung des PLSR-Modells zu quantifizieren, wurden die Bestimmtheitsmaße für beide Stoffe berechnet. Es ergaben sich die Werte $R^2_{\text{GLY}} = 0,96$ und $R^2_{\text{PRO}} = 0,95$.

In diesem Abschnitt wurde für zwei verschiedene Aminosäuren ein Modell berechnet, das die Konzentrationen der Stoffe aus Raman-Spektren, die nicht Teil des Modells waren, in gutem Maß vorhergesagt hat. Im nächsten Abschnitt wird die Komplexität durch das Hinzunehmen einer weiteren Aminosäure erhöht.

5.2.2 Partial Least Square-Regression von drei Aminosäuren

Die Aminosäuren ALA, ARG und GLY bildeten die Grundlage für eine PLSR mit drei verschiedenen Stoffen. Aus den Lösungen der Aminosäuren ($C_{\text{ALA}} = 1,5 \text{ M}$; $C_{\text{ARG}} = 0,7 \text{ M}$ und $C_{\text{GLY}} = 3,0 \text{ M}$) wurden wieder neun Mischungen hergestellt, wobei diesmal der Stoffmengenanteil von GLY (A_{GLY}) 10% bis 90% (in Schritten von 10%) an der gesamten Stoffmenge ausmachte:

$$A_{\text{GLY}} = \frac{n_{\text{GLY}}}{n_{\text{ALA}} + n_{\text{ARG}} + n_{\text{GLY}}} \quad \text{bzw.} \quad n_{\text{GLY}} = \frac{A_{\text{GLY}}}{1 - A_{\text{GLY}}} (n_{\text{ALA}} + n_{\text{ARG}}). \quad (5.4)$$

Die Raman-Spektren der Mischungen wurden mit einer Belichtungsdauer von $t = 100$ s aufgenommen und zusammen mit den Spektren der Reinstoffe (Abbildung 5.1 a) - c) in die Datenmatrix X eingetragen. Ergänzt wurden die Daten durch drei weitere Spektren der Reinstoffe, die bei den Konzentrationen $C_{\text{ALA}} = 1,0$ M; $C_{\text{ARG}} = 0,5$ M und $C_{\text{GLY}} = 1,0$ M gemessen wurden. Die Datennachbearbeitung wurde, wie im vorangegangenen Abschnitt beschrieben, durchgeführt. Für die Anwendung einer PLSR wurde aus den Raman-Spektren der Datenmatrix X die Kalibrationsmatrix X_{K} , bestehend aus den Raman-Spektren der Reinstoffe und vier Spektren der Mischungen (Auswahl wie zuvor) erstellt. Die restlichen fünf Spektren bildeten die Validierungsmatrix X_{V} . Mit der Eigenschaftsmatrix y wurde analog verfahren. In Abbildung 5.9 sind die erklärten Varianzen in den Matrizen X_{K} und y_{K} zusammen mit dem GMQF des entsprechenden PLSR-Modells dargestellt.

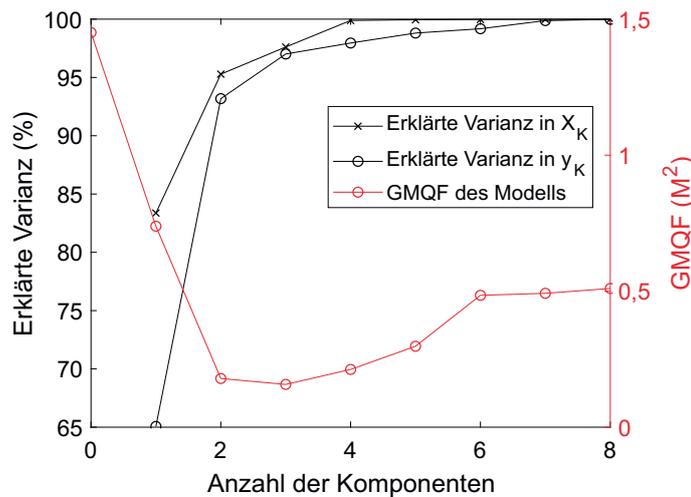


Abbildung 5.9: Statistische Spezifikationen der PLSR-Modelle, die auf Basis der Matrix X_{K} berechnet wurden (drei verschiedene Aminosäuren, $\lambda_0 = 248$ nm). Die schwarzen Kurven geben die Anteile der erklärten Varianzen, der gesamten Varianz in der Datenmatrix X_{K} (schwarze Kreuze) und der Eigenschaftsmatrix y_{K} (schwarze Kreise) an. Der GMQF ist in Rot angegeben.

Der GMQF besitzt bei drei Komponenten ein Minimum. Mit dieser Anzahl von Komponenten werden zudem mehr als 97% der gesamten Varianzen in X_{K} und y_{K}

erklärt. Auf der Basis dieser Ergebnisse wurde ein PLSR-Modell mit drei Komponenten berechnet. Letztere ließen sich wieder den Raman-Spektren der Reinstoffe zuordnen (siehe Abbildung 5.10).

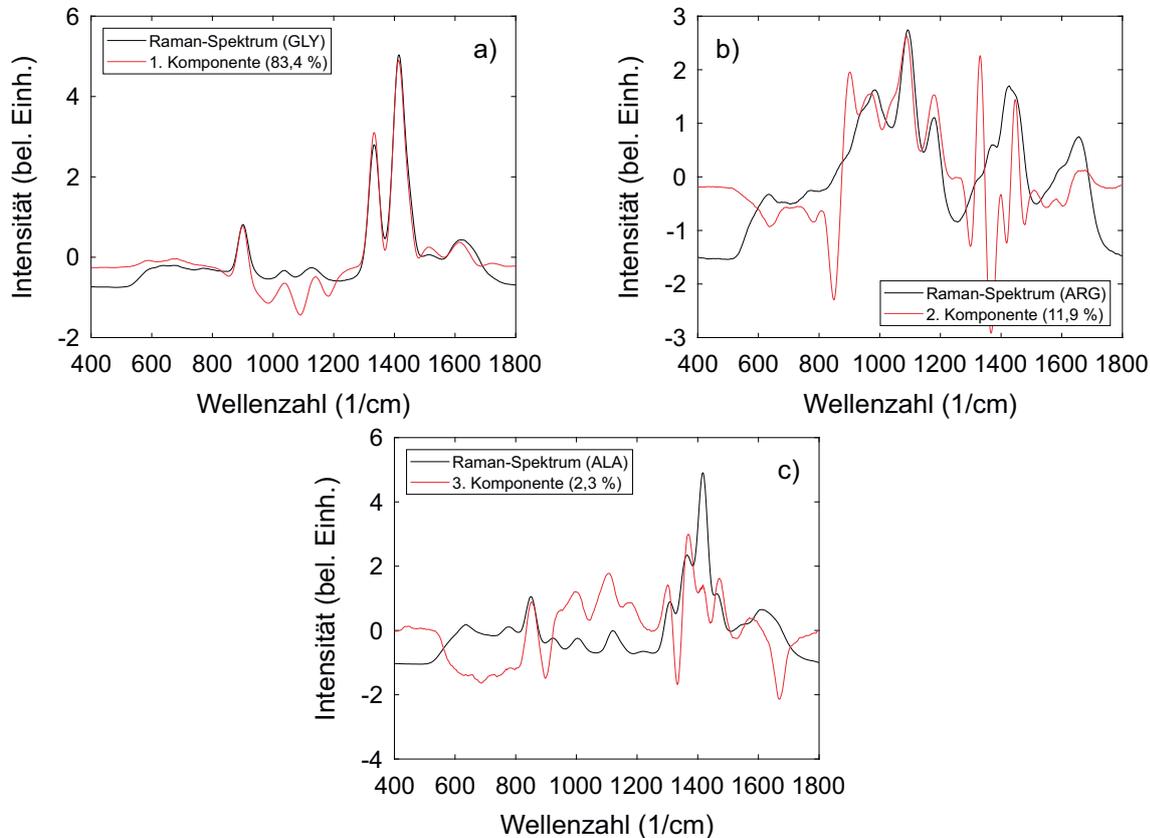


Abbildung 5.10: Raman-Spektren der Reinstoffe ALA, ARG und GLY (schwarze Kurven) sowie Komponenten einer PLSR der Datenmatrix X_K , die mit drei Komponenten berechnet wurde (rote Kurven, drei verschiedene Aminosäuren). Die Anteile an der gesamten Varianz in X_K , die von den Komponenten erklärt werden, sind in Klammern angegeben. Zum besseren Vergleich der jeweiligen Kurven sind die z-standardisierten Werte abgebildet.

Die erste Komponente erklärt 83,4% der gesamten Varianz in X_K und lässt sich dem Raman-Spektrum von GLY zuordnen (Abbildung 5.10 a). Aufgrund der höheren Konzentration dieses Stoffs wurden die einzelnen Raman-Spektren der Mischungen von dieser Aminosäure dominiert. Es verblieb ein kleiner Anteil, der von den anderen Komponenten erklärt wurde. Daher ließen sich diese Komponenten nur bedingt den Raman-Spektren von ARG und ALA zuordnen, z. B. über Raman-Signale bei etwa 1100 cm^{-1} und 1200 cm^{-1} im Fall der zweiten Komponente sowie bei etwa 850 cm^{-1} im Fall der dritten Komponente (Abbildung 5.10 b) und c).

Zwecks Validierung des Modells wurden die Konzentrationen anhand der Raman-Spektren in der Matrix X_V vorhergesagt und den gemessenen Konzentrationen y_V gegenübergestellt (siehe Abbildung 5.11).

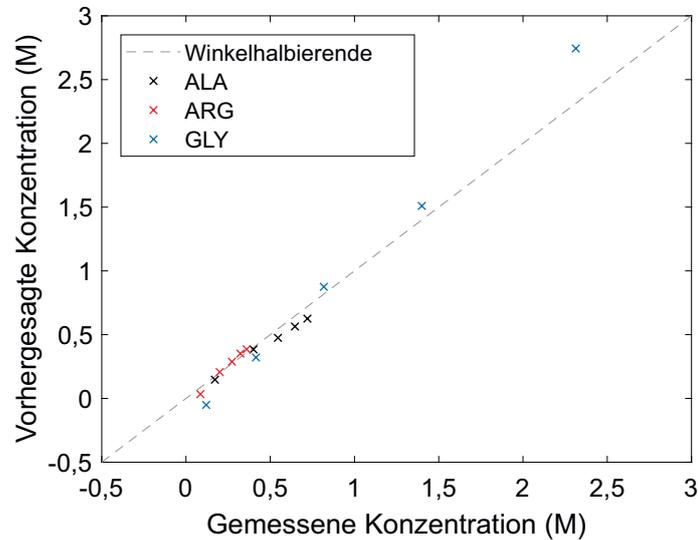


Abbildung 5.11: Gegenüberstellung der von dem PLSR-Modell β vorhergesagten Konzentrationen und der gemessenen Konzentrationen y_V der Aminosäuren ALA (schwarze Kreuze), ARG (rote Kreuze) und GLY (blaue Kreuze). Die gestrichelte Linie repräsentiert die ideale Verteilung der Konzentrationen.

Für die Quantifizierung der Validierung wurden die Bestimmtheitsmaße ermittelt und zu $R^2_{ALA} = 0,89$; $R^2_{ARG} = 0,91$ und $R^2_{GLY} = 0,92$ berechnet.

Obwohl die Raman-Spektren der Mischungen von der Aminosäure GLY dominiert wurden, konnten die Konzentrationen von ALA und ARG mit großer Sicherheit vorhergesagt werden. Die zweite und dritte Komponente erklären zwar nur wenig Varianz (siehe Abbildung 5.10 b) und c), das Modell β wird aber mit allen drei Komponenten berechnet. Die spektralen Merkmale der Aminosäuren sind über alle Komponenten verteilt und müssen daher nicht zwangsläufig aus einer Komponente hervorgehen. Im letzten Abschnitt wird die Komplexität ein weiteres Mal erhöht, indem eine vierte Aminosäure hinzugenommen wird.

5.2.3 Partial Least Square-Regression von vier Aminosäuren

Eine PLSR von vier unterschiedlichen Aminosäuren wurde mit den Stoffen ALA, ARG, THR und VAL durchgeführt. Aus den gelösten Aminosäuren ($C_{ALA} = 1,5\text{ M}$;

$C_{\text{ARG}} = 0,8 \text{ M}$; $C_{\text{THR}} = 0,5 \text{ M}$ und $C_{\text{VAL}} = 0,5 \text{ M}$) wurden neun Mischungen hergestellt. Der Stoffmengenanteil von ALA (A_{ALA}) machte 10 % bis 90 % (in Schritten von 10 %) der gesamten Stoffmenge aus:

$$A_{\text{ALA}} = \frac{n_{\text{ALA}}}{n_{\text{ALA}} + n_{\text{ARG}} + n_{\text{THR}} + n_{\text{VAL}}} \quad \text{bzw.}$$

$$n_{\text{ALA}} = \frac{A_{\text{ALA}}}{1 - A_{\text{ALA}}} (n_{\text{ARG}} + n_{\text{THR}} + n_{\text{VAL}}). \quad (5.5)$$

Von den Mischungen wurden Raman-Spektren mit einer Belichtungsdauer von $t = 200 \text{ s}$ gemessen. Zusammen mit den Reinstoffen aus Abbildung 5.1 und weiteren Spektren der Reinstoffe ALA ($C_{\text{ALA}} = 1,0 \text{ M}$) sowie ARG ($C_{\text{ARG}} = 0,5 \text{ M}$) wurden die Raman-Spektren der Mischungen in die Datenmatrix X eingetragen, nachdem sie zwecks Vergleichbarkeit nachbearbeitet wurden (siehe Abschnitt 5.2.1). Die Aufteilung in eine Kalibrations- und Validierungsmatrix erfolgte wie im vorangegangenen Abschnitt. Die statistischen Daten verschiedener Regressionsmodelle sind in Abbildung 5.12 gezeigt.

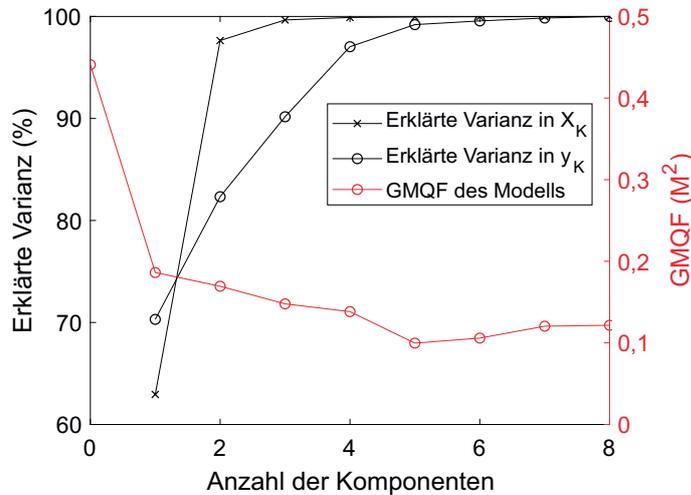


Abbildung 5.12: Statistische Spezifikationen der PLSR-Modelle, die auf Basis der Matrix X_K berechnet wurden (vier verschiedene Aminosäuren, $\lambda_0 = 248 \text{ nm}$). Die schwarzen Kurven geben die Anteile der erklärten Varianzen an der gesamten Varianz in der Datenmatrix X_K (schwarze Kreuze) und der Eigenschaftsmatrix y_K (schwarze Kreise) an. Der GMQF ist in Rot angegeben.

Ein PLSR-Modell, das mit fünf Komponenten berechnet wurde, besitzt den kleinsten GMQF. Darüber hinaus werden von diesem Modell mehr als 99 % der gesamten Varianzen in X_K und y_K erklärt. Daher wurde für den weiteren Verlauf ein PLSR-Modell mit fünf Komponenten berechnet. Die ersten beiden Komponenten erklären 63,0 % bzw. 34,7 % der gesamten Varianz in X_K . Die dritte und vierte Komponenten erklären allerdings nur 2,0 % bzw. 0,2 % der gesamten Varianz in X_K , weshalb es nicht möglich war, diese Komponenten eindeutig dem Raman-Spektrum einer Aminosäure zuzuordnen.

Für die Validierung des Modells wurden wieder die vorhergesagten mit den gemessenen Konzentrationen verglichen (siehe Abbildung 5.13).

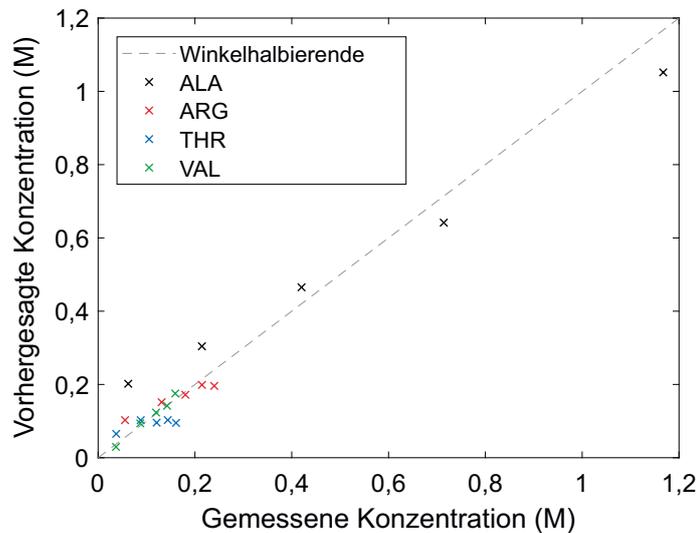


Abbildung 5.13: Gegenüberstellung der von dem PLSR-Modell β vorhergesagten Konzentrationen und der gemessenen Konzentrationen y_V der Aminosäuren ALA (schwarze Kreuze), ARG (rote Kreuze), THR (blaue Kreuze) und VAL (grüne Kreuze). Die gestrichelte Linie repräsentiert die ideale Verteilung der Konzentrationen.

Für die Aminosäuren ALA und VAL konnte ein Modell generiert werden, mit dem die Konzentrationen dieser Stoffe mit einer hohen Genauigkeit vorhergesagt werden konnten ($R^2_{\text{ALA}} = 0,94$ und $R^2_{\text{VAL}} = 0,96$). Während die Konzentrationen von ARG noch mit einer guten Sicherheit vorhergesagt werden konnten ($R^2_{\text{ARG}} = 0,77$), war dies für THR nicht möglich ($R^2_{\text{THR}} = 0,21$). Mit Blick auf die Raman-Spektren der Stoffe THR und VAL lässt sich bei etwa 950 cm^{-1} ein Unterschied erkennen (siehe Abbildung 5.1 e) und f). An dieser Stelle befindet sich im Spektrum von VAL ein Raman-Signal, das im Spektrum von THR nicht gemessen wurde. Da die Lösungen beider Stoffe die gleichen Konzentrationen besaßen, war es im Fall von

THR schwieriger als bei VAL, charakteristische Merkmale im Spektrum mittels PLSR auszumachen.

Abschließend wurde aus allen Raman-Spektren, die in diesem Kapitel Verwendung fanden, eine PLSR durchgeführt. Für die Validierung wurden aus den drei Mischungsdatensätzen jeweils diejenigen Spektren verwendet, die bislang für die Kalibration ausgewählt wurden. Mit den restlichen Daten wurden in Abhängigkeit der Anzahl der Komponenten verschiedene PLSR-Modelle berechnet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5.14 dargestellt.

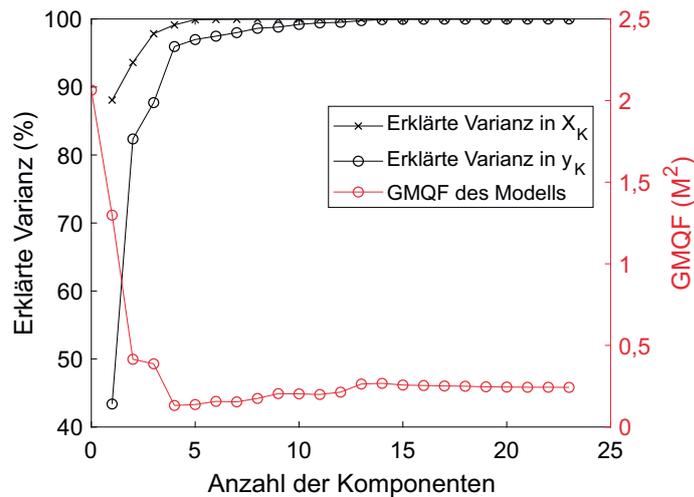


Abbildung 5.14: Statistische Spezifikationen der PLSR-Modelle, die auf Grundlage aller bisher verwendeten Aminosäuren berechnet wurden ($\lambda_0 = 248 \text{ nm}$). Die schwarzen Kurven geben die Anteile der erklärten Varianzen an der gesamten Varianz in der Datenmatrix X_K (schwarze Kreuze) und der Eigenschaftsmatrix y_K (schwarze Kreise) an. Der GMQF ist in Rot angegeben.

Der GMQF durchläuft bei vier Komponenten ein Minimum. An dieser Stelle werden mehr als 99% der gesamten Varianz in X_K und mehr als 95% der gesamten Varianz in y_K erklärt.

Die Ergebnisse der Validierung eines Modells aus vier Komponenten ist in Abbildung 5.15 gezeigt.

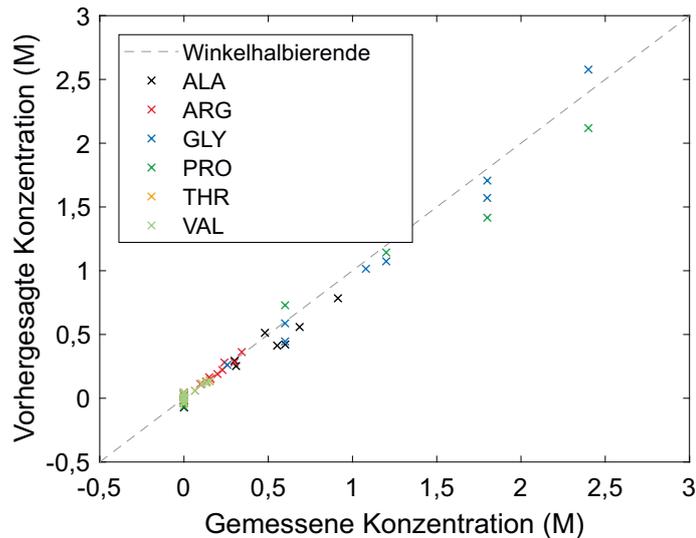


Abbildung 5.15: Gegenüberstellung der von dem PLSR-Modell β vorhergesagten Konzentrationen und der gemessenen Konzentrationen y_V der Aminosäuren ALA (schwarze Kreuze), ARG (rote Kreuze), GLY (blaue Kreuze), PRO (grüne Kreuze), THR (orange Kreuze) und VAL (hellgrüne Kreuze). Die gestrichelte Linie repräsentiert die ideale Verteilung der Konzentrationen.

Die vorhergesagten Konzentrationen ähneln den gemessenen, was durch hohe Bestimmtheitsmaße bestätigt wurde ($R^2_{\text{ALA}} = 0,91$; $R^2_{\text{ARG}} = 0,98$; $R^2_{\text{GLY}} = 0,98$; $R^2_{\text{PRO}} = 0,97$; $R^2_{\text{THR}} = 0,84$ und $R^2_{\text{VAL}} = 0,86$). Da in jeder Mischung mindestens eine Aminosäure nicht vertreten war, ergab sich an der Stelle $C = 0$ M der gemessenen Konzentrationen eine hohe Dichte an Datenpunkten, die vom Modell mit geringen Abweichungen auch so vorhergesagt wurde.

Die Vereinigung aller Mischungen in einem einzigen Modell führte zur einer Verbesserung der Vorhersagegenauigkeit für Konzentrationen, die zuvor nur bedingt prognostiziert werden konnten (siehe THR im vorangegangenen Abschnitt). Durch die Verwendung aller Raman-Spektren konnte ein robustes Modell berechnet werden, das mehr Freiheitsgrade besitzt, um molekülspezifische Signaturen klarer zu identifizieren und aus Raman-Spektren vorherzusagen, die nicht Teil der Kalibration des Modells waren. Darüber hinaus hängt die Präzision einer Vorhersage von der Genauigkeit ab, mit der die gemessenen Konzentrationen in die PLSR eingehen.

Durch die Evaluation der multivariaten Datenanalyse von Aminosäuren in wässrigen Lösungen konnte gezeigt werden, dass sich mathematische Modelle berechnen lassen, die in der Lage sind, unbekannte Raman-Spektren so zu interpretieren, dass sich die Konzentrationen der darin enthaltenen Stoffe mit hoher Sicherheit vorhersagen lassen.

Auch Substanzen, die im Vergleich zu anderen Stoffen eine geringe Konzentration ($< 0,5 \text{ M}$) aufweisen, können mit einer hohen Genauigkeit identifiziert werden. Die untere Nachweisgrenze ergibt sich einerseits aus der Messbarkeit der Raman-Spektren von Proben mit geringen Konzentrationen, also der Sensitivität des experimentellen Aufbaus. Andererseits müssen die entsprechenden Konzentrationen vom Modell noch hinreichend genau vorhergesagt werden können. Für das hier bestimmte Modell beträgt die untere Nachweisgrenze etwa 100 mM (siehe Abbildung 5.15).

6 Glasfasergestützte Raman-Spektroskopie

Die nichtinvasive Analyse der Perilymphe im Innenohr erfordert eine gezielte und effiziente Zuführung von Licht zur Anregung von Raman-Streuung hinter der RFM sowie die Aufnahme des Raman-gestreuten Lichts. Wellenleiter in Form von Glasfasern bieten eine nahezu verlustfreie und räumlich definierte Bereitstellung von Licht. Sie lassen sich desinfizieren und sind aufgrund ihrer kompakten und flexiblen Handhabung während einer klinischen Operation (z. B. Cochlea-Implantation) als zusätzliches Hilfsmittel geeignet.

Glasfasern mit einem Kern aus Quarzglas weisen im sichtbaren und nahinfraroten Spektralbereich zwar eine geringe Dämpfung von Licht auf, allerdings kommt es zum Auftreten von Fluoreszenz und Raman-Streuung im Kern des Wellenleiters. Wird eine Glasfaser für die Bereitstellung von Licht verwendet, gelangen auch Fluoreszenz sowie im Kern Raman-gestreutes Licht in die Probe. Diese Beiträge werden zusammen mit dem Raman-Spektrum der Probe detektiert. Aufgrund der langen Strecken (üblicherweise mehrere Meter), über die das Licht mit dem Kern der Glasfaser wechselwirkt, haben sowohl die Fluoreszenz als auch das Raman-gestreute Licht einen großen Einfluss auf das von der Probe gemessene Raman-Spektrum. Je nach Größe des Wirkungsquerschnitts für die Raman-Streuung des Analyten und dessen Konzentration kann das gesuchte Raman-Spektrum von diesen Beiträgen überlagert werden, was eine Analyse der Probe erschwert.

In diesem Kapitel werden zunächst die Fluoreszenz- und Raman-Spektren einer Glasfaser bei drei verschiedenen Wellenlängen untersucht. Auf Grundlage der Ergebnisse wird ein Glasfaserbündel (GFB) für die nichtinvasive Analyse der Perilymphe vorgestellt und charakterisiert.

6.1 Fluoreszenz und Raman-Streuung in Glasfasern

Um die spektralen Beiträge, die im Kern einer Glasfaser aus Quarzglas entstehen können, zu messen, wurde das Licht dreier schmalbandiger Laser abwechselnd in den

Kern einer mehrmodigen Glasfaser (FG910UEC, Thorlabs, Kerndurchmesser von 910 μm) eingekoppelt. Als Lichtquellen kamen ein diodengepumpter Festkörperlaser (Excelsior-473-50-CDRH, Spectra-Physics, Emissionswellenlänge von 473 nm und spektrale Linienbreite von $< 10^{-3} \text{ cm}^{-1}$), ein Diodenlaser (TLB-6704-P, New Focus, Emissionswellenlänge von 638 nm und spektrale Linienbreite von $< 10^{-5} \text{ cm}^{-1}$) und ein weiterer Diodenlaser (XTRA, Toptica, Emissionswellenlänge von 785 nm und spektrale Linienbreite von $< 10^{-3} \text{ cm}^{-1}$) zum Einsatz. Vor dem Eintritt in die Glasfaser wurde das von den Lasern emittierte Licht mit dem entsprechenden Bandpassfilter (LD01-473/10-12.5, LL01-638-12.5 oder LL01-785-12.5, Semrock) spektral gefiltert, um nur die Zentralwellenlänge des Lasers in die Glasfaser einzukoppeln und den Einfluss eventueller Störquellen zu minimieren. Das von der Glasfaser emittierte Licht wurde mit einem Spektrografen (Shamrock SR-500i-C-R, Andor mit Newton DU940P-BU, Andor) detektiert. In der Eintrittsebene des Spektrometers befand sich ein Spalt mit einer Breite von 10 μm . Rayleigh-gestreutes Licht wurde mithilfe des entsprechenden Langpassfilters (LP02-473RU-25, LP02-638RE-25 oder LP02-785RE-25, Semrock) entfernt. Das Beugungsgitter im Spektrometer besaß 1200 Linien pro Millimeter und war für eine Wellenlänge von 500 nm optimiert.

Die Anregungswellenlängen und zugehörigen FAB sind über einen weiten Spektralbereich verteilt. Die Detektionseffizienz eines Spektrografen weist generell eine starke Abhängigkeit von der Wellenlänge auf. Das Beugungsgitter ist in der Regel für eine bestimmte Wellenlänge optimiert und die Kamera besitzt für gewöhnlich eine Beschichtung, um im gewünschten Spektralbereich möglichst viel Licht zu absorbieren. Daher wurden die gemessenen Spektren zwecks Vergleichbarkeit nachbearbeitet. Das Vorgehen entsprach dem Algorithmus aus Abschnitt 4.3.1. Der spektrale Versatz wurde ohne Langpassfilter im Spektrometer bestimmt, indem das Spektrum des Rayleigh-gestreuten Lichts in Form eines Voigt-Profiles regressiert wurde (erster Schritt der Datennachbearbeitung). Aufgrund der Abwesenheit von Artefakten konnte auf den zweiten Schritt der Datennachbearbeitung verzichtet werden. Im dritten Schritt (Grundlinienkorrektur) wurde darauf geachtet, nur den Hintergrund zu entfernen, der aus dem Dunkelstrom der Kamera resultiert, um die gemessene Fluoreszenz nicht zu entfernen. Die wellenlängenabhängige Transmission des experimentellen Aufbaus wurde im vierten Schritt korrigiert. Aus den Reflektivitäten der drei spiegelnden Oberflächen im Spektrometer, der Beugungseffizienz des Gitters und der Quanteneffizienz der Kamera wurde die Detektionseffizienz des Spektrografen in Abhängigkeit der Wellenlänge ermittelt. Sie ist in Abbildung 6.1 zusammen mit den drei Anregungswellenlängen (λ_0) und den zugehörigen FAB dargestellt.

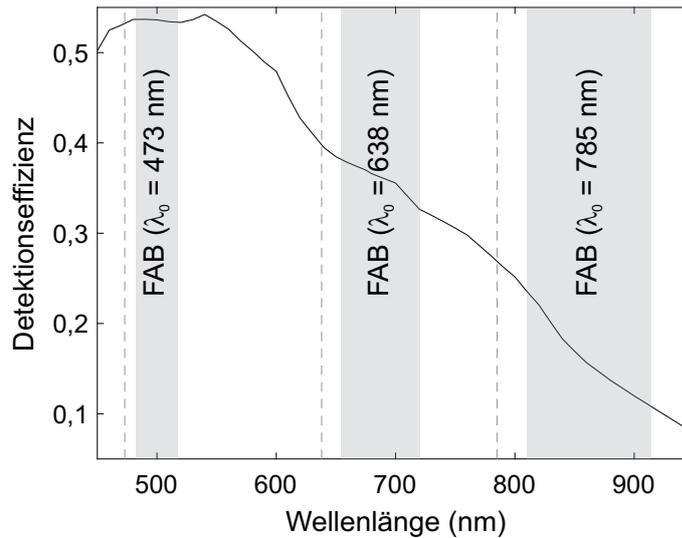


Abbildung 6.1: Detektionseffizienz des Spektrografen in Abhängigkeit der Wellenlänge: die Anregungswellenlängen (λ_0) dreier Laser (gestrichelte Linien) sind zusammen mit den entsprechenden FAB (grau hinterlegte Flächen) eingezeichnet. Die für die Berechnung der schwarzen Kurve verwendeten Daten wurden von der LOT-Quantum Design GmbH zur Verfügung gestellt.

An dem Verlauf der Detektionseffizienz ist erkennbar, dass das System für den mittleren sichtbaren Spektralbereich optimiert wurde. Zudem wird deutlich, dass für steigende Anregungswellenlängen immer mehr Wellenlängen auf der Kamera abgebildet werden müssen, um den zugehörigen FAB detektieren zu können. Da Glasfasern aus Quarzglas über den in Abbildung 6.1 gezeigten Wellenlängenbereich eine relativ flache spektrale Antwort zeigen, wurde die Detektionseffizienz des Spektrografen als SGF des experimentellen Aufbaus definiert. Das Einbeziehen der SGF sowie die Korrektur des Streuquerschnitts und die Berücksichtigung der applizierten Energie (fünfter Schritt) schlossen die Datennachbearbeitung ab. Die korrigierten Spektren sind in Abbildung 6.2 gezeigt. Für eine bessere Vergleichbarkeit wurden die Kurven reskaliert, um ähnliche maximale Amplituden zu erreichen.

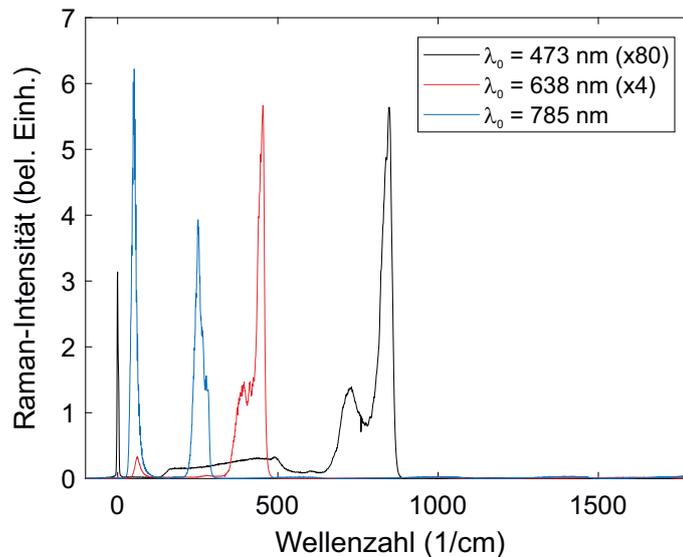


Abbildung 6.2: Von einer mehrmodigen Glasfaser aus Quarzglas emittierte Spektren, bei Führung von schmalbandigem Laserlicht der Wellenlänge λ_0 im Kern dieser Glasfaser. Zwecks Vergleichbarkeit wurde die schwarze Kurve mit dem Faktor 80 und die rote Kurve mit dem Faktor 4 multipliziert.

Das mit einer Anregungswellenlänge von $\lambda_0 = 473 \text{ nm}$ gemessene Spektrum weist im Bereich von 150 cm^{-1} bis 550 cm^{-1} einen großen Anteil von Fluoreszenz auf. Von 650 cm^{-1} bis 900 cm^{-1} treten zudem Signale auf, die aufgrund ihrer spektralen Breite auf Raman-Streuung im Kern der Glasfaser zurückgeführt werden. Das Spektrum mit $\lambda_0 = 638 \text{ nm}$ zeigt praktisch keine Fluoreszenz, allerdings tritt bei etwa 400 cm^{-1} eine starke Raman-Signatur auf. Bei $\lambda_0 = 785 \text{ nm}$ wurde keine Fluoreszenz detektiert. Bei etwa 50 cm^{-1} und 250 cm^{-1} wurden zwei intensive Raman-Signaturen beobachtet. Außer bei $\lambda_0 = 785 \text{ nm}$ treten die gemessenen Raman-Signale im FAB auf. Selbst spektrale Anteile, die nicht auf der Kamera des Spektrografen abgebildet werden, können sich störend auf ein Raman-Spektrum auswirken. In Form von Streulicht im Spektrografen können diese Anteile unerwünschte Signale erzeugen. Da das Gehäuse eines Spektrografen für eine Reduktion von Streulicht sorgt, wird unterstellt, dass diese Signale schwächer als das direkt gemessene Licht sind.

Bei den hier vorgestellten Messungen wurden mittlere Leistungen von $\bar{P} < 2 \text{ mW}$ eingesetzt. In der glasfasergestützten RS von Proteinen werden für gewöhnlich höhere Leistungen eingesetzt, sodass Signale, wie sie beispielsweise in Abbildung 6.2 dargestellt sind, einen erheblichen Anteil an dem Raman-Spektrum eines Analyten ausmachen können.

6.2 Maßgeschneiderte Glasfaserbündel

In den vergangenen Jahren wurde viel Forschungsarbeit auf dem Gebiet der Entwicklung von maßgeschneiderten GFB geleistet, um unter anderem die Fluoreszenz und Raman-Streuung in Glasfasern zu minimieren.^{73–82} Dabei sind die unterschiedlichsten Geometrien entstanden, die verschiedene Optiken (z. B. spektrale Filter und Linsen) in die Spitze eines GFB integrieren, um damit die Anregung und Einsammlung von Raman-gestreutem Licht zu optimieren. Hinsichtlich der hohen Transmission ($\bar{T} = 48\%$) und geringen elastischen Streuung ($\bar{g} = 0,95$) der RFM bei $\lambda = 785\text{ nm}$ wurde nach einem GFB gesucht, das für diese Wellenlänge ausgelegt war. Aufgrund der Anatomie des Innenohrs war zudem ein Bündel mit einem möglichst geringen Durchmesser erforderlich. Ein geeignetes GFB wurde von der Firma EmVision LLC (USA) erworben. Die Spitze besaß einen Außendurchmesser von 2,1 mm. Die Anordnung der einzelnen Glasfasern im Bündel und Optiken in der Spitze ist in Abbildung 6.3 schematisch dargestellt.

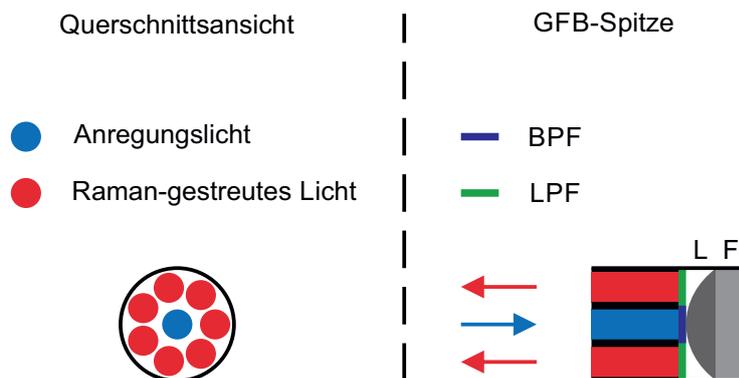


Abbildung 6.3: Schematische Darstellung des GFB für die RS: die Glasfaser, die das Licht in die Probe leitet, ist in Blau gezeigt. Die sieben Glasfasern, die das Raman-gestreuete Licht einsammeln und zum Spektrografen leiten, sind in Rot dargestellt. Die Spitze besteht aus Optiken, die die Aufnahme eines Raman-Spektrums optimieren (BPF: Bandpassfilter, L: Linse, F: Fenster und LPF: Langpassfilter).

Das Anregungslicht wird in die zentrale Glasfaser des Bündels eingekoppelt. Sie besitzt einen Kerndurchmesser von $300\ \mu\text{m}$ und eine numerische Apertur von 0,22. Mit einem Bandpassfilter (BPF) wird das von der Glasfaser emittierte Licht spektral gefiltert, um die oben diskutierten Störeinflüsse zu reduzieren. Das gefilterte Licht wird mithilfe einer Linse (L) aus Saphir durch ein Fenster (F) aus Magnesiumfluorid in die Probe fokussiert. Das Raman-gestreuete Licht wird über dieselben Optiken in sieben Glasfasern (Kerndurchmesser von jeweils $300\ \mu\text{m}$ und numerische Apertur

von jeweils 0,22) eingekoppelt, die das Licht zum Spektrografen leiten. Zuvor wird es mit einem Langpassfilter (LPF) spektral verändert, um ausschließlich Raman-gestreutes Licht zum Spektrografen zu leiten und gleichzeitig zu verhindern, dass Rayleigh-gestreutes Licht unerwünschte spektrale Anteile in den Glasfasern erzeugen kann. Die dem Spektrografen zugewandten Glasfasern befanden sich in einer linearen Anordnung, um mithilfe eines Adapters (SR-ASM-0039, Andor) an die Form des Eintrittsspalts und die numerische Apertur des Spektrometers angepasst zu werden. Für die Charakterisierung des GFB wurden die optischen Eigenschaften der beiden Filter in der Spitze des Bündels untersucht. Mithilfe einer Wolfram-Halogen-Lichtquelle (SLS201L/M, Thorlabs) und eines Spektrografen (Maya2000 Pro, Ocean Optics) wurden die Transmissionsspektren der Filter gemessen. Da die Filter fest eingebaut sind, beinhalteten die gemessenen Spektren auch die spektralen Eigenschaften der anderen Optiken. Im untersuchten Spektralbereich um die Anregungswellenlänge (739 nm bis 838 nm bzw. $-800 \text{ rel. cm}^{-1}$ bis 800 rel. cm^{-1}) wurde von einer näherungsweise konstanten Transmission dieser Optiken ausgegangen. Das spektral breitbandige Licht (360 nm bis 2600 nm) wurde über eine mehrmodige Glasfaser (ZFQ-6058, Ocean Optics, Kerndurchmesser von 50 μm) in die Anregungsglasfaser des Bündels eingekoppelt. Das von der Spitze emittierte Licht wurde von einer weiteren mehrmodigen Glasfaser (QP600-2-SR-BX, Ocean Optics, Kerndurchmesser von 600 μm) zum Spektrografen geleitet. In der Eintrittsebene des Spektrometers befand sich ein Spalt mit einer Breite von 10 μm . Im Inneren war ein Beugungsgitter mit 300 Linien pro Millimeter verbaut, das für eine Wellenlänge von 300 nm optimiert war. Für die Aufnahme des Transmissionsspektrums des Langpassfilters wurde das Licht der Quelle über eine mehrmodige Glasfaser (FG910UEC, Thorlabs, Kerndurchmesser von 910 μm) in die Spitze des Bündels eingekoppelt und wie zuvor beschrieben detektiert. In Abbildung 6.4 sind die gemessenen Transmissionsspektren in Abhängigkeit der Wellenzahl für eine Anregungswellenlänge von $\lambda_0 = 785 \text{ nm}$ zu sehen. Da die Filter fest in der Spitze des GFB verbaut sind, lassen die Transmissionsspektren nur eine qualitative Aussage über die optischen Eigenschaften der Filter zu.

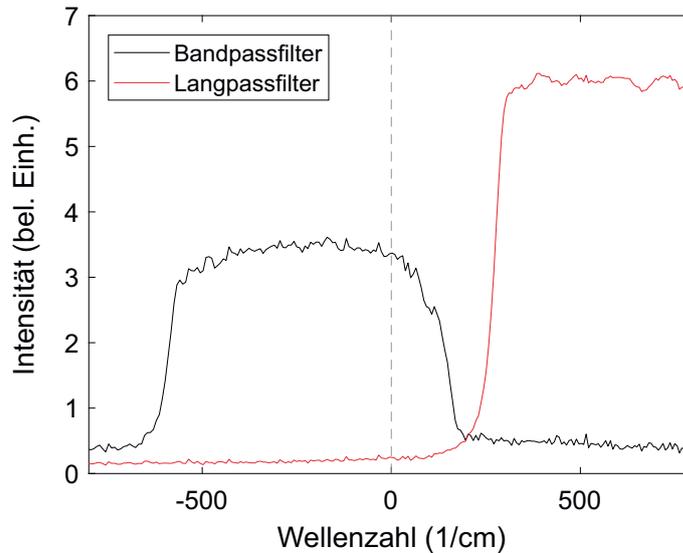


Abbildung 6.4: Die Abbildung zeigt die qualitativen Transmissionsspektren des Band- (schwarze Kurve) und Langpassfilters (rote Kurve). Die gestrichelte Linie entspricht einer Anregungswellenlänge von $\lambda_0 = 785$ nm.

Die Kurven der Filter schneiden sich bei etwa 200 cm^{-1} . Bezogen auf die Anregungswellenlänge von 785 nm transmittiert der Bandpassfilter also bis 200 rel. cm^{-1} und der Langpassfilter transmittiert ab dieser Wellenzahl. Somit ist das GFB geeignet, um Raman-Spektren mit einer Anregungswellenlänge von 785 nm zu erzeugen und aufzunehmen.

Die Performanz des GFB wurde anhand der Messung des Raman-Spektrums von Aspirin verifiziert. Dieser Stoff weist viele Raman-Linien auf, anhand derer die spektrale Genauigkeit des experimentellen Aufbaus überprüft werden kann. Der verwendete Aufbau wird im nächsten Kapitel ausführlich beschrieben. Das Licht eines Diodenlasers (XTRA, Toptica, Emissionswellenlänge von 785 nm und spektrale Linienbreite von $< 10^{-3} \text{ cm}^{-1}$) wurde in die Anregungsglasfaser des Bündels eingekoppelt. Unmittelbar davor wurde eine Leistung von $P = 50 \text{ mW}$ gemessen. Hinter der Spitze des Bündels waren es $P = 34,5 \text{ mW}$, sodass die Transmission der Anregungsglasfaser 69% betrug (bei $\lambda = 785 \text{ nm}$). Die spektrale Auflösung des Aufbaus wurde zu 3 cm^{-1} berechnet. Das Raman-Spektrum von einer Aspirin-Tablette wurde unmittelbar hinter der Spitze des Bündels mit einer Belichtungsdauer von $t = 10 \text{ s}$ aufgenommen. In Abbildung 6.5 ist das Spektrum dargestellt.

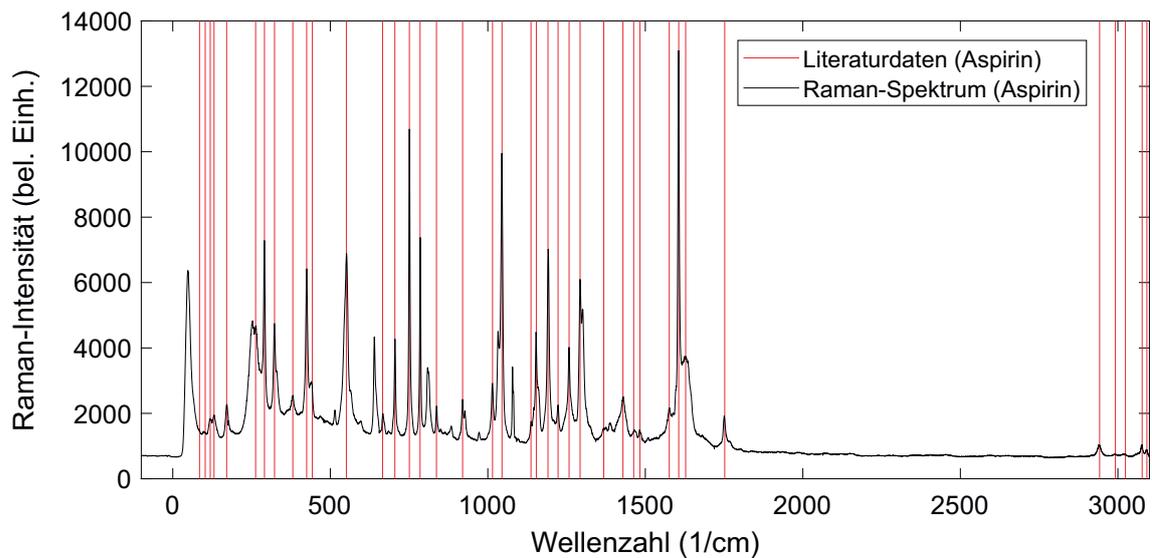


Abbildung 6.5: Raman-Spektrum von Aspirin, das mit $\lambda_0 = 785$ nm aufgenommen wurde. Als Referenz sind (der Literatur entnommene) spektrale Positionen der Raman-Linien/Banden in Form von roten Strichen eingetragen.⁸³

Das Spektrum von Aspirin wurde bereits entlang der Abszisse verschoben und weist über einen weiten Spektralbereich viele scharfe Raman-Linien/Banden auf. Die gemessenen Signale treten an Positionen auf, die mit denen aus der Literatur übereinstimmen.⁸³ Zusätzliche Raman-Linien sind wahrscheinlich auf Füllstoffe (z. B. Cellulose) zurückzuführen.

Die Charakterisierung und Erprobung des Bündels haben gezeigt, dass maßgeschneiderte GFB ein effektives Werkzeug für die Messung von Raman-Spektren sind. Im nächsten Kapitel wird das Bündel eingesetzt, um Raman-Spektren von Aminosäuren zu messen. Mit diesen Spektren wird mittels multivariater Datenanalyse ein Modell erstellt, mit dem man schließlich Vorhersagen über die Zusammensetzung einer Probe anhand ihres Raman-Spektrums treffen kann.

7 Glasfasergestützte Analyse von Aminosäuren

In den vorangegangenen Kapiteln wurde der Grundstein für die nichtinvasive RS von Biomolekülen hinter einer RFM gelegt. Auf Grundlage der optischen Eigenschaften dieser Membran wurde ein GFB für die Messung von Raman-Spektren ausgewählt. Zudem wurde ein Algorithmus entwickelt, mit dem die gemessenen Raman-Spektren für eine multivariate Datenanalyse vorbereitet werden können. Die Erprobung des GFB erfolgte anhand der Messung von Raman-Spektren von Aminosäuren und anschließender multivariater Analyse der Spektren.

Zunächst wird der experimentelle Aufbau beschrieben, mit dem die nichtinvasive Analyse von Innenohrproteinen in die klinische Diagnostik von Hörproblemen eingeführt werden könnte. Mithilfe der gemessenen Raman-Spektren werden verschiedene Modelle berechnet, die die Stoffmengenanteile der Aminosäuren vorhersagen (unter Verwendung von Spektren, die nicht Teil dieser Modelle waren).

7.1 Experimenteller Aufbau

Der Aufbau, mit dem schon das Raman-Spektrum von Aspirin gemessen wurde (siehe Abbildung 6.5), ist in Abbildung 7.1 schematisch dargestellt. Das Licht eines Diodenlasers (DL, XTRA, Toptica, Emissionswellenlänge von 785 nm und spektrale Linienbreite von $< 10^{-3} \text{ cm}^{-1}$) wurde mit einer Kombination aus einer Halbwellenplatte (HWP) und einem polarisierendem Strahlteiler (PST) abgeschwächt (VA5-780/M, Thorlabs). Mit einem Bandpassfilter (BPF, LL01-785-12.5, Semrock) wurden Wellenlängen neben der Zentralwellenlänge des Lasers entfernt. Das spektral gefilterte Licht wurde mit einer Linse (L, LA1540-B, Thorlabs, Brennweite von 15 mm) in die Anregungsglasfaser des GFB eingekoppelt. Diese Glasfaser leitete das Licht in die Spitze des Bündels. Die Anordnung der Glasfasern und Optiken in der Spitze sowie die Funktion der Optiken wurde in Abschnitt 6.2 erläutert. In der Spitze wurde das Licht zunächst spektral gefiltert und anschließend in die Probe fokussiert, die sich auf einer Plattform (P) befand. Das von der Probe gestreute Licht wurde mit der

Spitze des Bündels eingesammelt, spektral gefiltert und zu einem Spektrografen (SG, Shamrock SR-500i-C-R, Andor mit Newton DU940P-BU, Andor) geleitet, wo es detektiert wurde. Der Spalt in der Eintrittsebene des Spektrometers hatte eine Breite von 100 μm . Der Langpassfilter in der Spitze des GFB hat das elastisch gestreute Licht nicht ausreichend gedämpft, weshalb ein weiterer Langpassfilter (LP02-785RE-25, Semrock) im Spektrometer platziert wurde. Das Beugungsgitter im Spektrografen besaß 1200 Linien pro Millimeter und war für eine Wellenlänge von 500 nm optimiert. Die spektrale Auflösung wurde zu 3 cm^{-1} berechnet.

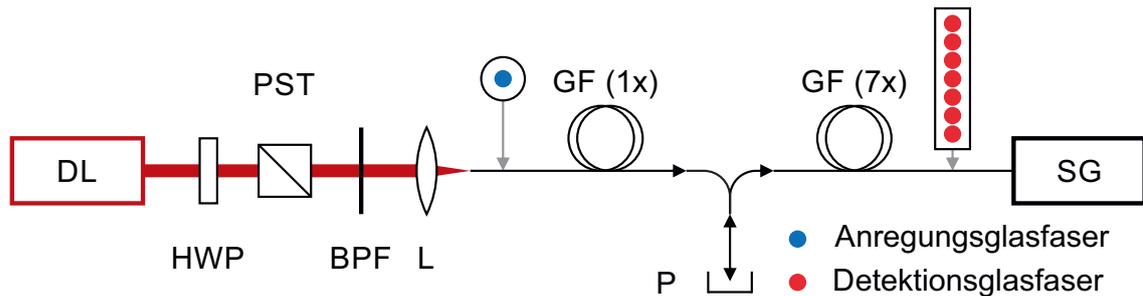


Abbildung 7.1: Die Abbildung zeigt die schematische Darstellung des experimentellen Aufbaus zur glasfasergestützten Messung von Raman-Spektren (DL: Diodenlaser, HWP: Halbwellenplatte, PST: polarisierender Strahlteiler, BPF: Bandpassfilter, L: Linse, GF: Glasfaser, P: Plattform mit Probe und SG: Spektrograf).

7.2 Multivariate Analyse von Pulvern

Mit dem GFB aufgenommene Raman-Spektren waren nicht mit Spektren vergleichbar, die von den gleichen (in Wasser gelösten) Biomolekülen bei einer anderen Anregungswellenlänge gemessen wurden. Es zeigte sich zudem eine starke Ähnlichkeit zum Raman-Spektrum des Lösungsmittels. Es wird davon ausgegangen, dass die Wirkungsquerschnitte für Raman-Streuung bei dieser Wellenlänge zu klein waren, um ein Raman-Spektrum des Analyten zu erhalten. Trotz der spektralen Filter in der Spitze des Bündels gelangte ein Hintergrundsignal in den Spektrografen, das die Raman-Spektren der gelösten Biomoleküle überlagerte.

Um die Anwendbarkeit des GFB für die multivariate Analyse von Biomolekülen dennoch evaluieren zu können, wurden Raman-Spektren der Pulver der bereits bekannten Aminosäuren gemessen. Die Aminosäuren ARG, PRO und VAL lagen in Form von feinkörnigen Pulvern vor, sodass hier eine homogene Durchmischung erwartet wurde. Für die Messungen wurde das GFB in die Pulverproben getaucht. Alle Messungen in diesem Kapitel wurden mit einer Laserleistung von $P = 62 \text{ mW}$

und einer Belichtungsdauer von $t = 10$ s durchgeführt. In Abbildung 7.2 sind die Raman-Spektren der Reinstoffe gezeigt.

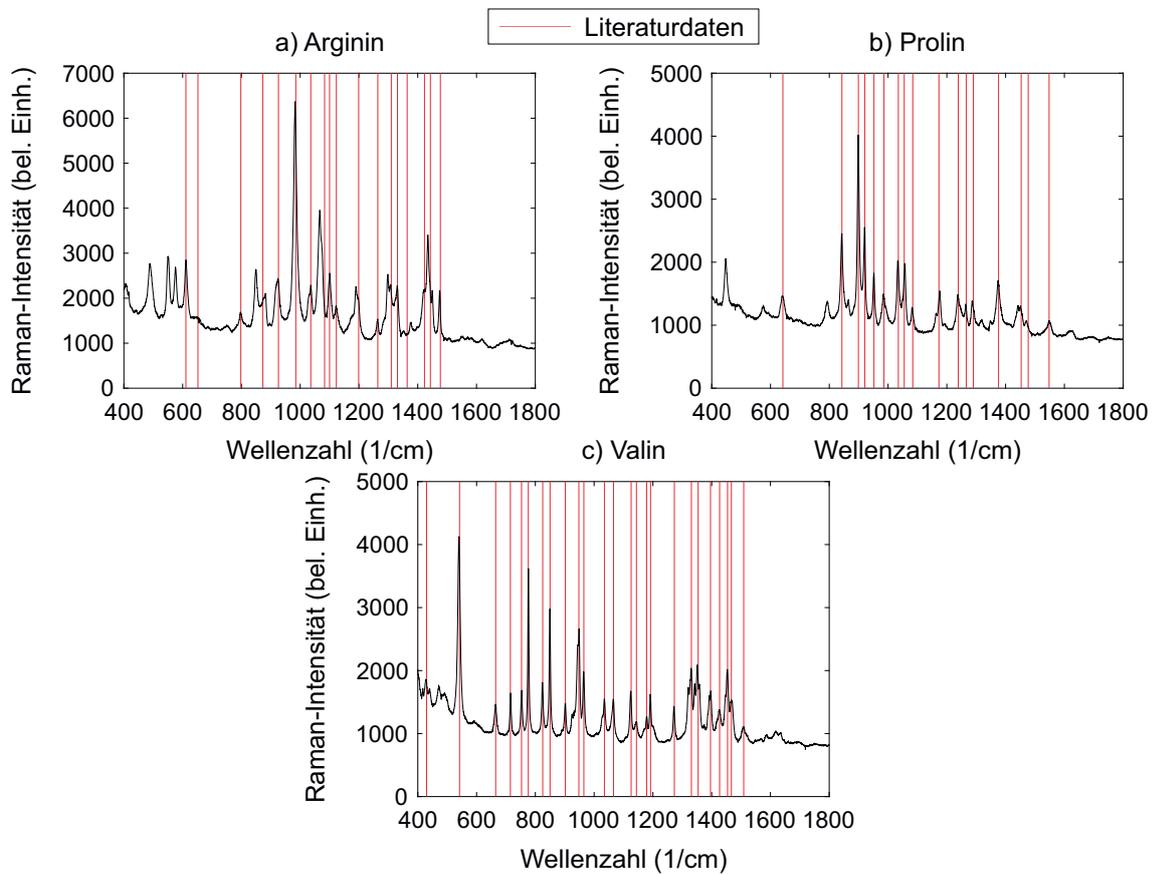


Abbildung 7.2: Raman-Spektren der drei Aminosäuren (Pulver), die für die Evaluation der glasfasergestützten multivariaten Analyse verwendet wurden ($\lambda_0 = 785$ nm). Als Referenz sind (der Literatur entnommene) spektrale Positionen der Raman-Signale in Form von roten Strichen eingetragen.⁵⁹

Bei den Spektren handelt es sich um Rohdaten, die entlang der Abszisse verschoben wurden, um die Raman-Signale an den korrekten spektralen Positionen zu erhalten. Die gemessenen Signale stimmen mit denen aus der Literatur überein.⁵⁹ Aus diesen Proben wurden im Folgenden verschiedene Mischungen hergestellt. Die davon gemessenen Raman-Spektren wurden mittels multivariater Datenanalyse ausgewertet.

7.2.1 Regressionsmodell mit zwei Aminosäuren

Aus den Aminosäuren ARG und PRO wurden neun Mischungen hergestellt. Der Stoffmengenanteil von PRO (A_{PRO}) machte 10 % bis 90 % (in Schritten von 10 %) an der gesamten Stoffmenge aus. Mithilfe von Gleichung 5.3 wurden die benötigten Massen der beiden Stoffe berechnet. Die Raman-Spektren der durch Schütteln gemischten Pulverproben wurden mit den oben genannten Parametern gemessen. Die Nachbearbeitung der Rohdaten erfolgte entsprechend dem Algorithmus aus Kapitel 4.3.1, wobei auf die Entfernung von Artefakten, das Einbeziehen einer SGF, die Korrektur des Wirkungsquerschnitts für Raman-Streuung und die Energienormierung (aufgrund konstanter Leistung) verzichtet werden konnte (siehe dazu Kapitel 5.2.1). Die nachbearbeiteten Raman-Spektren der Reinstoffe und Mischungen wurden in die Datenmatrix X eingetragen. Da für Pulver keine Konzentrationsangaben gemacht werden können, wurden die Stoffmengenanteile der Aminosäuren als Faktor in die Eigenschaftsmatrix y eingetragen. Für die Berechnung eines Regressionsmodells wurden die Spektren der Reinstoffe sowie fünf Spektren der Mischungen (A_{PRO} : 10 %, 30 %, 50 %, 70 % und 90 %) gewählt und in die Kalibrationsmatrix X_K eingetragen. Die restlichen vier Spektren bildeten die Validierungsmatrix X_V . Die Eigenschaftsmatrix wurde entsprechend aufgeteilt. Die Ergebnisse der PLSR, die auf Grundlage von X_K durchgeführt wurde, sind in Abbildung 7.3 dargestellt.

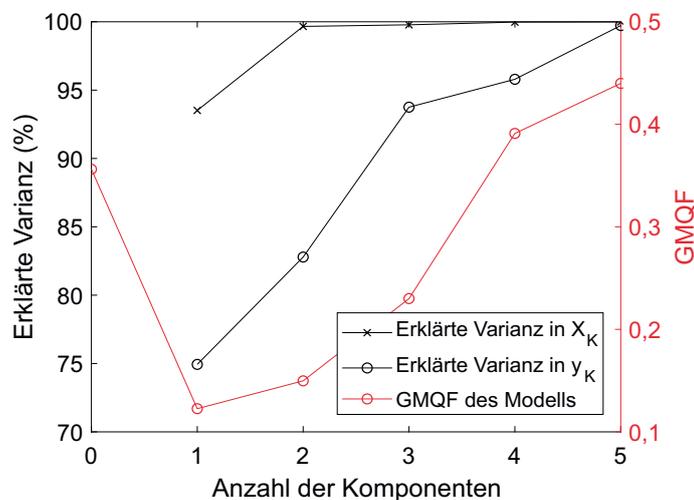


Abbildung 7.3: Statistische Spezifikationen der PLSR-Modelle, die auf Basis von X_K berechnet wurden (zwei verschiedene Aminosäuren (Pulver), $\lambda_0 = 785 \text{ nm}$). Die schwarzen Kurven geben die Anteile der erklärten Varianzen an der gesamten Varianz in der Datenmatrix X_K (schwarze Kreuze) und der Eigenschaftsmatrix y_K (schwarze Kreise) an. Der GMQF ist in Rot angegeben.

Das PLSR-Modell, das mit nur einer Komponente berechnet wurde, zeigt den kleinsten GMQF. Diese Komponente erklärt mehr als 93 % der gesamten Varianz in X_K und mehr als 74 % der gesamten Varianz in y_K . Daher wurde für das weitere Vorgehen ein Modell mit dieser Komponente berechnet. Letztere konnte dem Raman-Spektrum von ARG zugeordnet werden (siehe Abbildung 7.4).

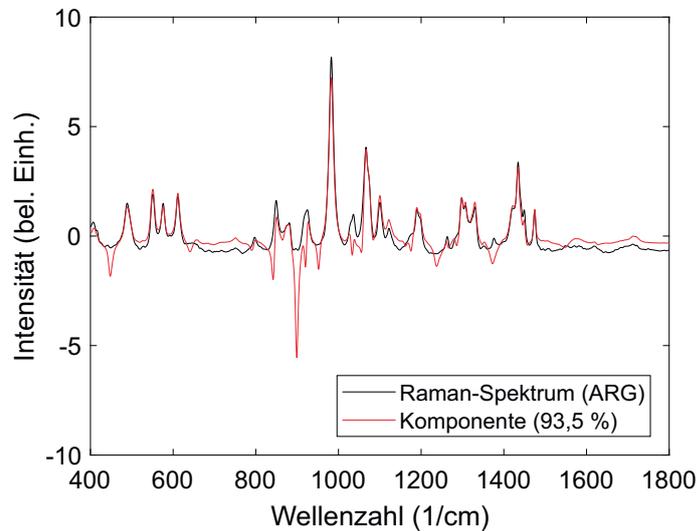


Abbildung 7.4: Raman-Spektrum von ARG (schwarze Kurve) und die Komponente einer PLSR der Datenmatrix X_K , die mit einer Komponente berechnet wurde (rote Kurve, zwei verschiedene Aminosäuren (Pulver)). Der Anteil an der gesamten Varianz in X_K , der von dieser Komponente erklärt wird, ist in Klammern angegeben. Zum besseren Vergleich der beiden Kurven sind die z-standardisierten Werte abgebildet.

An Stellen, wo sich Unterschiede zwischen den Kurven ergaben (z. B. bei etwa 900 cm^{-1}), treten bei der Komponente Signale auf, die dem Raman-Spektrum von PRO zugeordnet werden können (vergleiche Abbildung 7.2). Für die Validierung wurden die Anteile der Aminosäuren aus den Raman-Spektren der Matrix X_V vorhergesagt und in Abbildung 7.5 mit den gemessenen Anteilen aus y_V verglichen.

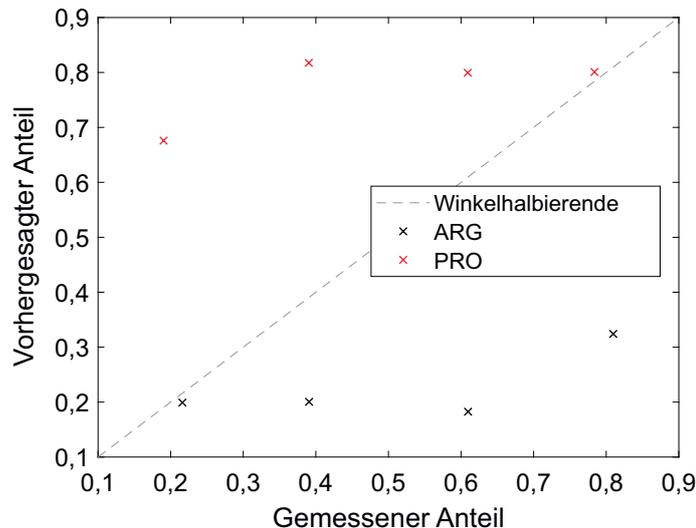


Abbildung 7.5: Gegenüberstellung der von dem PLSR-Modell vorhergesagten und der gemessenen Anteile y_V der Aminosäuren (Pulver) ARG (schwarze Kreuze) und PRO (rote Kreuze). Die gestrichelte Linie repräsentiert die ideale Verteilung der Anteile.

Die stellenweise erhebliche Abweichung der vorhergesagten von den gemessenen Anteilen wird auf eine inhomogene Durchmischung der beiden Pulver zurückgeführt. Zudem werden von der PLSR-Komponente 93,5% der gesamten Varianz in X_K erklärt. Es verbleibt nur ein geringer Teil, der von höheren Komponenten erklärt werden könnte. Obwohl sich die Anteile von Spektrum zu Spektrum geändert haben, wurden vom Modell nahezu unveränderte Anteile vorhergesagt. Aus diesem Grund konnten keine aussagekräftigen Bestimmtheitsmaße angegeben werden. Im nächsten Abschnitt wurden Mischungen aus drei Aminosäuren untersucht.

7.2.2 Regressionsmodell mit drei Aminosäuren

Für die multivariate Analyse von drei verschiedenen Pulvern wurden aus den Aminosäuren ARG, PRO und VAL neun Mischungen hergestellt. Der Stoffmengenanteil von PRO wurde, wie im vorherigen Abschnitt beschrieben, variiert. Von den Pulvern der Aminosäuren ARG und VAL wurden jeweils 0,1 g für jede Mischung verwendet. Die Messung und Nachbearbeitung der Raman-Spektren sowie die Aufteilung in einen Kalibrations- und Validierungsdatensatz erfolgte ebenfalls wie im vorangegangenen Abschnitt beschrieben. Die Ergebnisse der PLSR sind in Abbildung 7.6 gezeigt.

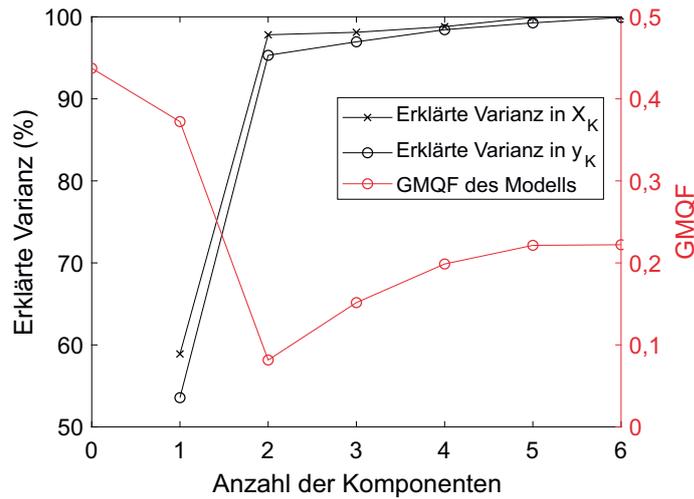


Abbildung 7.6: Statistische Spezifikationen der PLSR-Modelle, die auf Basis von X_K berechnet wurden (drei verschiedene Aminosäuren (Pulver), $\lambda_0 = 785 \text{ nm}$). Die schwarzen Kurven geben die Anteile der erklärten Varianzen an der gesamten Varianz in der Datenmatrix X_K (schwarze Kreuze) und der Eigenschaftsmatrix y_K (schwarze Kreise) an. Der GMQF ist in Rot angegeben.

Der kleinste GMQF wird von einem Modell erreicht, das mit zwei Komponenten berechnet wurde. Von diesen Komponenten werden mehr als 97% der gesamten Varianz in X_K und mehr als 95% der gesamten Varianz in y_K erklärt. Daher wurde ein Regressionsmodell mit zwei Komponenten berechnet. Die Komponenten konnten den Reinstoffen ARG und VAL zugeordnet werden (siehe Abbildung 7.7).

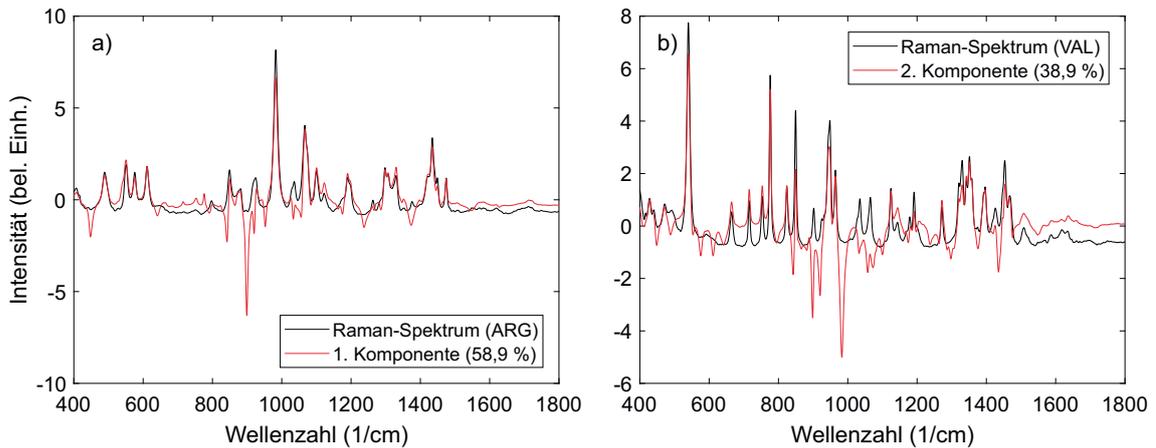


Abbildung 7.7: Raman-Spektren von ARG und VAL (schwarze Kurven) sowie Komponenten einer PLSR der Datenmatrix X_K , die mit zwei Komponenten berechnet wurde (rote Kurven, drei verschiedene Aminosäuren (Pulver)). Die Anteile an der gesamten Varianz in X_K , die von den Komponenten erklärt werden, sind in Klammern angegeben. Zum besseren Vergleich der jeweiligen Kurven sind die z-standardisierten Werte abgebildet.

Die erste Komponente erklärt 58,9% der gesamten Varianz in X_K und konnte dem Raman-Spektrum von ARG zugeordnet werden. Die zweite Komponente erklärt 38,9% der gesamten Varianz in X_K und ist mit dem Raman-Spektrum von VAL vergleichbar. An Stellen, an denen die Komponenten Unterschiede zum jeweiligen Raman-Spektrum aufweisen, untereinander aber qualitativ übereinstimmen, befinden sich Signale, die im Raman-Spektrum von PRO auftreten (z. B. bei etwa 850 cm^{-1} und 900 cm^{-1} , vergleiche Abbildung 7.2). Zwecks Validierung wurden die gemessenen Anteile mit den vorhergesagten verglichen (siehe Abbildung 7.8).

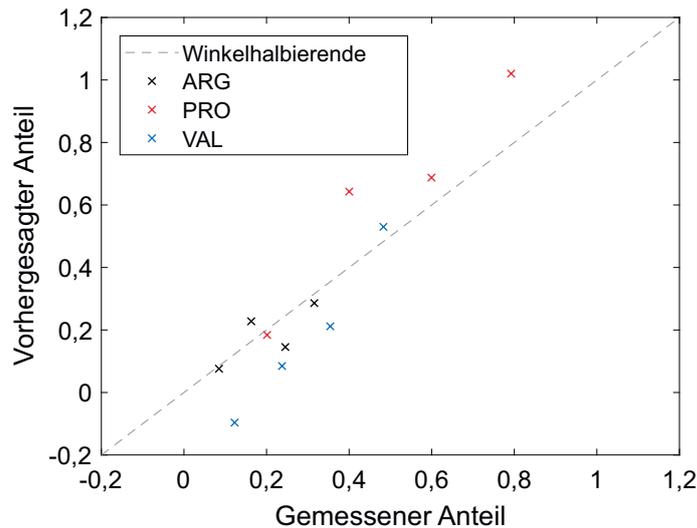


Abbildung 7.8: Gegenüberstellung der von dem PLSR-Modell vorhergesagten und der gemessenen Anteile y_V der Aminosäuren (Pulver) ARG (schwarze Kreuze), PRO (rote Kreuze) und VAL (blaue Kreuze). Die gestrichelte Linie repräsentiert die ideale Verteilung der Anteile.

Die vorhergesagten Anteile orientieren sich an der Winkelhalbierenden (ideale Verteilung der Anteile), was auf eine homogenere Durchmischung der drei Pulver verglichen mit dem vorangegangenen Ansatz zurückgeführt wird ($R^2_{\text{ARG}} = 0,50$ und $R^2_{\text{PRO}} = 0,39$, für VAL konnte kein aussagekräftiges Bestimmtheitsmaß angegeben werden). Dies wird auch an den beiden Komponenten aus Abbildung 7.7 deutlich, die zusammen einen Großteil der gesamten Varianz in X_K erklären.

Die glasfasergestützte multivariate Analyse von Pulverproben hat gezeigt, dass das GFB geeignet ist, um die Raman-Spektren von Biomolekülen zu messen und daraus ein mathematisches Modell zu erstellen, das eine Prognose über weitere als die verwendeten Raman-Spektren treffen kann (eine homogene Durchmischung der Pulver wird vorausgesetzt). Aufgrund des geringen Wirkungsquerschnitts für die Raman-Streuung der Biomoleküle bei der gewählten Anregungswellenlänge konnten jedoch keine wässrigen Lösungen dieser Moleküle untersucht werden. Für die nichtinvasive Analyse von Proteinen, die eine deutlich geringere (physiologische) Konzentration aufweisen (verglichen mit den Aminosäuren in Kapitel 5), wurde daher nach einer kürzeren Anregungswellenlänge für die RS gesucht, die nach wie vor mit den optischen Eigenschaften der RFM konform ist. Im nächsten Kapitel wird ein weiteres GFB vorgestellt, mit dem schließlich die multivariate Datenanalyse von Innenohrproteinen demonstriert werden konnte.

8 Multivariate Analyse von Innenohrproteinen

Die menschliche Perilymphe besteht aus einer Vielzahl unterschiedlicher Proteine.^{4,5} Ohne das Vorliegen einer Beeinträchtigung des Hörvermögens beträgt der gesamte Proteingehalt der Perilymphe $2 \mu\text{g} \mu\text{l}^{-1}$.⁵ Die Konzentration einzelner Proteine bzw. Protein-Gruppen kann bestimmten Krankheitsbildern zugeordnet werden.^{4,5} Eine der prominentesten Gruppen von Innenohrproteinen trägt den Namen Hitzeschockprotein (HSP). Zwei dieser Proteine (HSP70, $m_0 = 70.000 \text{ g mol}^{-1}$ und HSP90, $m_0 = 90.000 \text{ g mol}^{-1}$) wurden für die Evaluation der glasfasergestützten multivariaten Analyse von komplexen Biomolekülen (mehrere 100 Aminosäuren) mit geringen Konzentrationen ($\sim 10^{-5} \text{ M}$) ausgewählt. Da die Raman-spektroskopische Untersuchung von deutlich höher konzentrierten Aminosäuren im nahinfraroten Spektralbereich mittels GFB nicht erfolgreich war, wurde eine Anregungswellenlänge im sichtbaren Bereich verwendet (bei der die RFM noch hinreichend transparent ist) und ein speziell dafür angefertigtes GFB eingesetzt.

In diesem Kapitel wird zunächst auf die beiden HSP-Spezies eingegangen, bevor die Wahl der Anregungswellenlänge und der damit verbundene Umbau des experimentellen Aufbaus diskutiert werden. Die Messung der Raman-Spektren der Proteine, das Erstellen eines PLSR-Modells und dessen Validierung mithilfe von Spektren, die nicht Teil des Modells waren, demonstrieren schließlich die experimentelle Realisierung der nichtinvasiven Konzentrationsbestimmung von Innenohrproteinen auch in einfachen Mischungen und legt damit die Grundlage für die nichtinvasive Messung von pathophysiologisch relevanten Parametern. Teile der hier vorgestellten Arbeiten wurden bereits an anderer Stelle veröffentlicht.⁸⁴

8.1 Hitzeschockproteine

Die HSP übernehmen verschiedene Aufgaben im menschlichen Körper. Sie stabilisieren andere Proteine unter Extrembedingungen und ermöglichen so das Überleben von Zellen in kritischen Situationen. Außerdem sind sie Indikatoren für neurode-

generative Erkrankungen.⁸⁵ Formen von Stress sind beispielsweise Änderungen des Drucks, der Temperatur oder des pH-Wertes. Bei Patienten mit Hörproblemen kann die Anwesenheit von HSP70-Unterarten in der Perilymphe mit dem Nachlassen des Hörvermögens korreliert werden. Induzierbare Isoformen des HSP70 helfen unter Stressbedingungen bei der Aktivierung oder Reifung von Proteinen.

Ein Beleg dafür, dass zellulärer Stress mit einem erhöhten Proteingehalt des Stress-Proteoms einhergeht, zeigen Untersuchungen am HSP90, welches ebenfalls maßgeblich am Aufbau funktionierender Proteine beteiligt ist. Bei diesem HSP werden im Ruhezustand Konzentrationen von 1 % bis 2 % des gesamten Proteingehalts beobachtet.^{86,87} Unter Stress kann der HSP-Gehalt Konzentrationen von 4 % bis 5 % des gesamten Proteingehalts erreichen und im μM -Bereich liegen.⁸⁸

Für eine effiziente Messung der Raman-Spektren während einer klinischen Operation wurde bei der Wahl der Anregungswellenlänge das Absorptionsverhalten der HSP berücksichtigt. Das Absorptionsspektrum von HSP70 in PBS wurde mit einem Spektrofotometer (Uvikon 931, Kontron Instruments, Lichtweg von 10 mm) gemessen. Ausgehend von $C_{\text{HSP70}} = 34 \mu\text{M}$ wurde die Probe verdünnt, um innerhalb der optimalen Messparameter des Spektrofotometers zu bleiben. Als Referenz wurde eine Küvette mit PBS verwendet. Der qualitative Verlauf der Absorption von HSP70 ist in Abbildung 8.1 dargestellt.

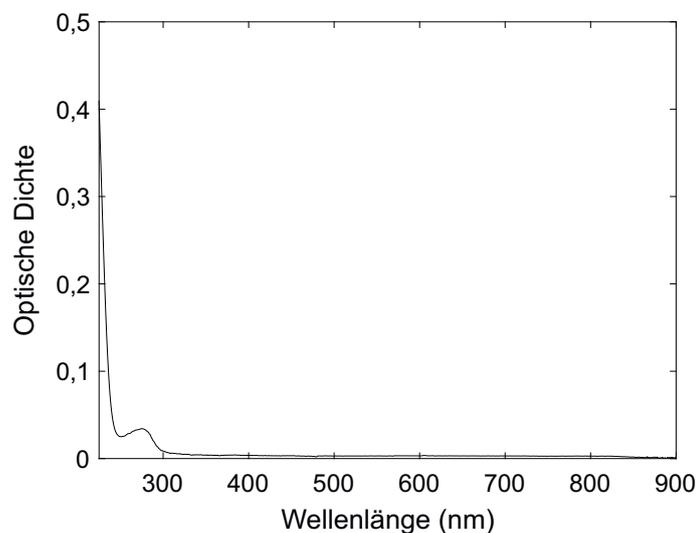


Abbildung 8.1: Die Abbildung zeigt das Absorptionsspektrum von HSP70 in PBS.⁸⁴

Für Wellenlängen $< 300 \text{ nm}$ nimmt die Absorption stark zu, was den Einsatz von RRS zur Erhöhung der Sensitivität ermöglicht. Hinsichtlich der Transmission der RFM sind daher Wellenlängen aus dem kurzwelligen sichtbaren Spektralbereich zu

bevorzugen. Dort können zudem Effekte wie Selbstabsorption in der Probe vernachlässigt werden.

8.2 Wahl der optimalen Anregungswellenlänge

Im vorherigen Kapitel wurde für die Untersuchung von Aminosäuren eine Anregungswellenlänge von $\lambda_0 = 785 \text{ nm}$ verwendet. Es hatte sich herausgestellt, dass die Vorteile dieser Wellenlänge (hohe Transmission der RFM und Abwesenheit von Fluoreszenz und Raman-Streuung innerhalb des FAB im Kern der Anregungsglasfaser) die Nachteile (kleiner Wirkungsquerschnitt für Raman-Streuung und geringe Quanteneffizienz des Spektrografen) nicht überwiegen. Durch die Wahl einer Anregungswellenlänge aus dem sichtbaren Spektralbereich wurden diese Aspekte neu bewertet. Bei $\lambda_0 = 473 \text{ nm}$ wurde ein größerer Wirkungsquerschnitt aufgrund des verkürzten spektralen Abstands dieser Wellenlänge zum Absorptionsmaximum von Biomolekülen erwartet. Weiterhin ist die Quanteneffizienz des Spektrografen deutlich höher (siehe Abbildung 6.1). Demgegenüber stehen allerdings eine geringere Transmission der RFM ($\bar{T} = 22\%$ bei $\lambda = 473 \text{ nm}$ verglichen mit $\bar{T} = 48\%$ bei $\lambda = 785 \text{ nm}$) sowie das Auftreten von Fluoreszenz und Raman-Streuung im Kern der Anregungsglasfaser.

Das GFB, das für $\lambda_0 = 473 \text{ nm}$ ausgelegt war, basiert auf dem Konzept, welches in Abschnitt 6.2 beschrieben wurde. Der experimentelle Aufbau, mit dem die nachfolgenden Messungen durchgeführt wurden, entspricht dem in Abbildung 7.1 gezeigten mit dem Unterschied, dass als Lichtquelle ein diodengepumpter Festkörperlaser (Excelsior-473-50-CDRH, Spectra-Physics, Emissionswellenlänge von 473 nm und spektrale Linienbreite von $< 10^{-3} \text{ cm}^{-1}$) verwendet wurde. Bedingt durch den kleinen Durchmesser und die geringe Divergenz des Strahls wurde das Licht direkt in die Anregungsglasfaser eingekoppelt. Unmittelbar vor dieser Glasfaser wurde eine Leistung von $P = 51 \text{ mW}$ gemessen. Hinter der Spitze des GFB betrug sie $P = 34 \text{ mW}$. Somit ergab sich eine Transmission von $T = 67\%$ ($\lambda = 473 \text{ nm}$), die mit der des anderen GFB vergleichbar ist. Für $\lambda_0 = 473 \text{ nm}$ wurde eine spektrale Auflösung von 12 cm^{-1} ermittelt.

Die Performanz des Bündels wurde wieder durch die Aufnahme des Raman-Spektrums von Aspirin evaluiert. Alle in diesem Kapitel gezeigten Raman-Spektren wurden mit einer Leistung von $P = 34 \text{ mW}$ und (wenn nicht anders angegeben) einer Belichtungsdauer von $t = 2 \text{ s}$ gemessen. Das Spektrum von Aspirin ist in Abbildung 8.2 gezeigt.

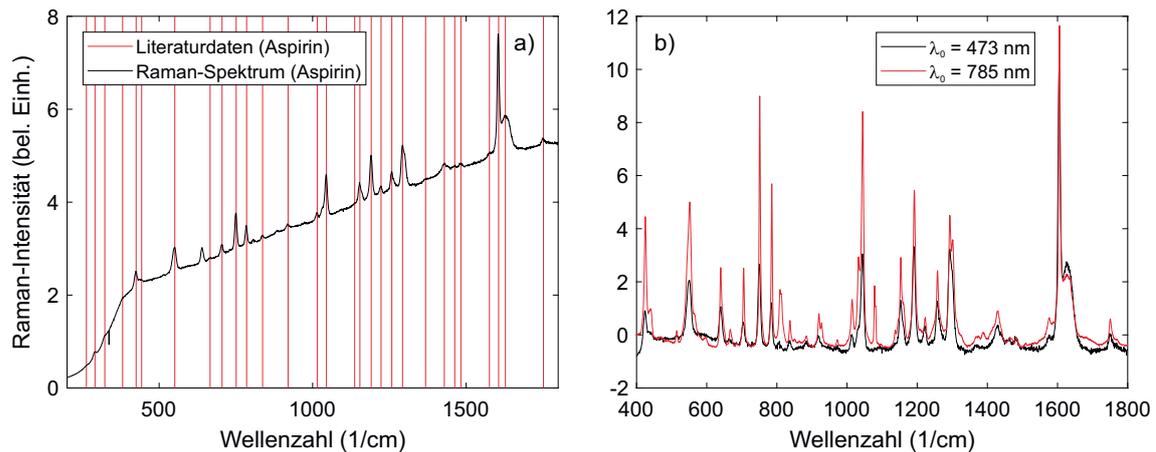


Abbildung 8.2: Raman-Spektrum von Aspirin, das mit $\lambda_0 = 473$ nm aufgenommen wurde (a). Als Referenz sind (der Literatur entnommene) spektrale Positionen der Raman-Linien/Banden in Form von roten Strichen eingetragen.⁸³ In b) sind die Raman-Spektren von Aspirin bei $\lambda_0 = 473$ nm (schwarze Kurve) und $\lambda_0 = 785$ nm (rote Kurve) dargestellt. Zum besseren Vergleich sind die z-standardisierten Werte abgebildet.⁸⁴

Der spektrale Versatz wurde bereits korrigiert. Auch in diesem Fall konnte eine Vielzahl an Signalen beobachtet werden, die mit den Literaturdaten übereinstimmen.⁸³ Verglichen mit dem Spektrum aus Abbildung 6.5 ($\lambda_0 = 785$ nm) ist der hohe Fluoreszenzanteil auffällig. Er wird größtenteils auf die Anregungsglasfaser zurückgeführt. Der Bandpassfilter in der Spitze des GFB konnte diesen Beitrag nur teilweise unterdrücken. In Abbildung 8.2 b) sind die Raman-Spektren von Aspirin gezeigt, die mit $\lambda_0 = 473$ nm ($P = 34$ mW, $t = 2$ s) und $\lambda_0 = 785$ nm ($P = 34,5$ mW, $t = 10$ s) aufgenommen wurden. In beiden Fällen wurde eine Grundlinienkorrektur durchgeführt. Die Spektren ähneln sich stark bezüglich der Positionen der einzelnen Raman-Signale. Zur weiteren Erprobung des Bündels wurde eine Probe aus in PBS gelöstem PRO untersucht ($C_{\text{PRO}} = 1$ M, $t = 6$ s). Das Raman-Spektrum ist in Abbildung 8.3 dargestellt.

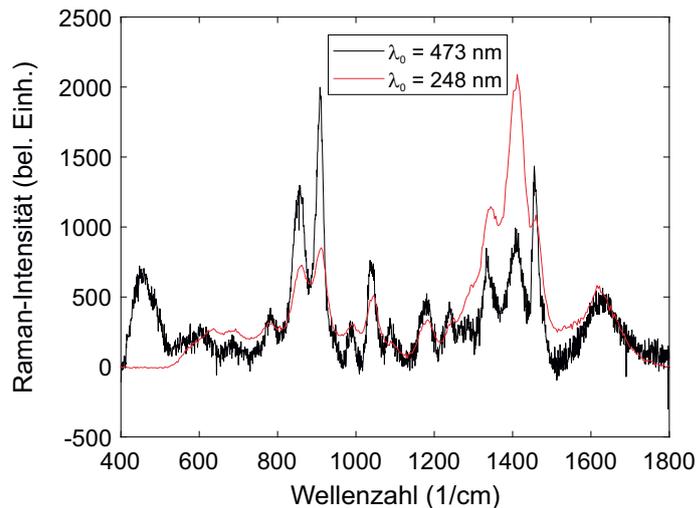


Abbildung 8.3: Raman-Spektren von PRO, die mit $\lambda_0 = 473 \text{ nm}$ (schwarze Kurve) und $\lambda_0 = 248 \text{ nm}$ (rote Kurve) aufgenommen wurden.⁸⁴

Das gemessene Raman-Spektrum wurde bereits entlang der Abszisse verschoben, um den spektralen Versatz zu korrigieren. Weiterhin wurde eine Grundlinienkorrektur vorgenommen, um die Fluoreszenz zu entfernen. Aufgrund der vernachlässigbaren Absorption von PRO bei $\lambda = 473 \text{ nm}$ wurde der Ursprung der Fluoreszenz dem GFB zugeordnet. Das Spektrum mit $\lambda_0 = 473 \text{ nm}$ weist einige charakteristische Signale auf, die auch im Raman-Spektrum mit $\lambda_0 = 248 \text{ nm}$ beobachtet wurden (vergleiche auch Abbildung 5.1 d). Aufgrund der höheren spektralen Auflösung (12 cm^{-1} bei $\lambda_0 = 473 \text{ nm}$ verglichen mit 25 cm^{-1} bei $\lambda_0 = 248 \text{ nm}$) sind die Signale im sichtbaren Spektralbereich schmäler und die drei sich überlagernden Signale bei etwa 1400 cm^{-1} spektral separiert. Daher war das GFB, das für $\lambda_0 = 473 \text{ nm}$ ausgelegt war, besser bzw. überhaupt geeignet, um Raman-Spektren von Biomolekülen zu messen (vergleichen mit dem GFB aus Kapitel 7) und wurde im Folgenden für die multivariate Analyse von HSP verwendet.

8.3 Messung pathophysiologischer Parameter

Zur Demonstration der nichtinvasiven Messung von pathophysiologisch relevanten Parametern, beispielsweise der Bestimmung der Konzentrationen von HSP in der Perilymphe, wurden Raman-Spektren von HSP70 und HSP90 mit unterschiedlichen Konzentrationen sowie verschiedenen Mischungen beider Proteine aufgenommen. Anhand der Daten wurde ein PLSR-Modell berechnet, um die Konzentrationen dieser Stoffe aus an der Berechnung unbeteiligten Spektren zu ermitteln. Zunächst

werden die Raman-Spektren der Reinstoffe vorgestellt. Anschließend wird ein Modell kalibriert und validiert.

8.3.1 Raman-Spektroskopie von Hitzeschockproteinen

Um das Funktionsprinzip der multivariaten Analyse zu zeigen, wurden Proben mit einer Konzentration von $C_{\text{HSP70}} = 65 \mu\text{M}$ und $C_{\text{HSP90}} = 56 \mu\text{M}$ hergestellt (jeweils in PBS gelöst). Die Proteine sind kommerziell erhältlich aber sehr kostenintensiv, und die Bereitstellung von HSP ist ein aufwendiger Prozess, was die Verfügbarkeit stark limitiert hat. Daher wurden Proben mit einem Volumen von jeweils $V = 30 \mu\text{l}$ in Küvetten mit einem Innendurchmesser von 3 mm gefüllt. Die in dieser Arbeit verwendeten HSP-Proben entstanden im Rahmen einer Kooperation mit Carsten Zeilinger vom Biomolekularen Wirkstoffzentrum der Leibniz Universität Hannover. Für die Messungen wurde das GFB in die Flüssigkeiten eingetaucht. Die Raman-Spektren der Reinstoffe von HSP70 und HSP90 sind in Abbildung 8.4 gezeigt.

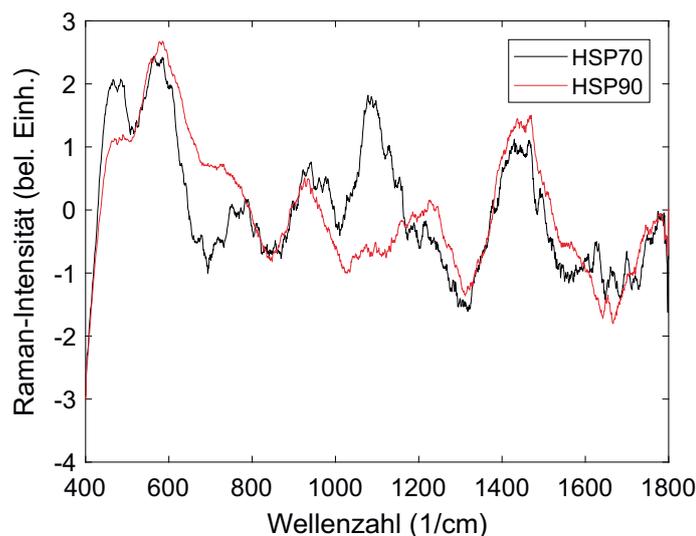


Abbildung 8.4: Raman-Spektren von HSP70 (schwarze Kurve) und HSP90 (rote Kurve), die mit $\lambda_0 = 473 \text{ nm}$ aufgenommen wurden. Zum besseren Vergleich sind die z-standardisierten Werte abgebildet.⁸⁴

Die Abszissen der Spektren wurden bereits korrigiert. Weiterhin wurde jeweils eine Grundlinienkorrektur vorgenommen, um die Fluoreszenz zu entfernen, deren Ursprung aufgrund des Absorptionsspektrums in Abbildung 8.1 auf das GFB zurückgeführt wurde. Die Raman-Spektren der Proteine waren stark verrauscht und wurden entsprechend der spektralen Auflösung des Spektrografen geglättet. Da die

Spektren zum ersten Mal überhaupt gemessen wurden, konnte kein Vergleich mit Literaturdaten vorgenommen werden. Eine Kenntnis bzw. Zuordnung der einzelnen Raman-Linien zu spezifischen Schwingungen innerhalb der HSP-Molekülstruktur ist für eine multivariate Auswertung nicht erforderlich.

8.3.2 Regressionsmodell

Für die Kalibration des PLSR-Modells wurden von beiden Proteinen Verdünnungsreihen hergestellt (10 % bis 100 % der Konzentration der Stammlösung in Schritten von 10 %) und um eine Probe des Lösungsmittels ergänzt. Weiterhin wurden Mischungen aus beiden Stoffen vorbereitet, wobei der Stoffmengenanteil von HSP90 10 % bis 90 % (in Schritten von 10 %) an der gesamten Stoffmenge ausmachte. Die Raman-Spektren dieser Proben wurden wie oben beschrieben aufgenommen und nachbearbeitet. Fünf Spektren der Mischungen wurden für die Validierung (X_V) ausgewählt (A_{HSP90} : 10 %, 30 %, 50 %, 70 % und 90 %). Die restlichen Spektren bildeten die Kalibrationsmatrix (X_K). Die Konzentrationen der Proteine gingen als Faktoren in die PLSR ein und wurden entsprechend in die Matrizen y_K und y_V eingetragen. Auf Basis dieser Matrizen wurde zunächst eine PLSR durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 8.5 dargestellt.

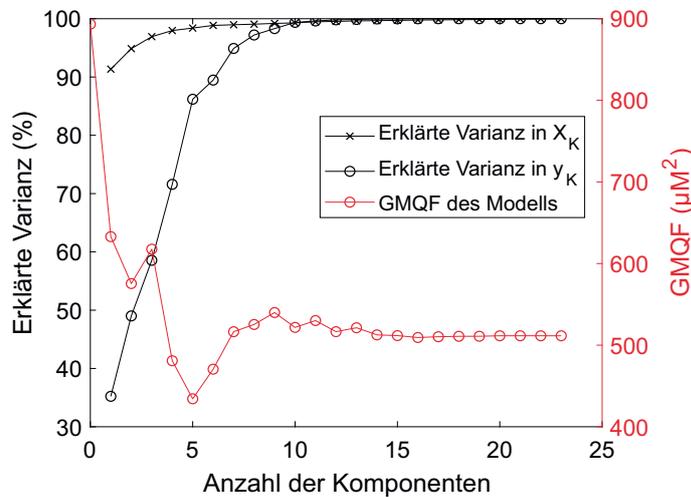


Abbildung 8.5: Statistische Spezifikationen der PLSR-Modelle, die auf Basis von X_K berechnet wurden (zwei verschiedene HSP, $\lambda_0 = 473 \text{ nm}$). Die schwarzen Kurven geben die Anteile der erklärten Varianzen an der gesamten Varianz in der Datenmatrix X_K (schwarze Kreuze) und der Eigenschaftsmatrix y_K (schwarze Kreise) an. Der GMQF ist in Rot angegeben.⁸⁴

Der GMQF besitzt bei fünf Komponenten ein Minimum. Mit dieser Anzahl an Komponenten werden mehr als 98 % der gesamten Varianz in X_K und mehr als 86 % der gesamten Varianz in y_K erklärt. Daher wurde ein Modell mit fünf Komponenten berechnet. Die erste Komponente ließ sich dem Raman-Spektrum von HSP90 zuordnen (siehe Abbildung 8.6).

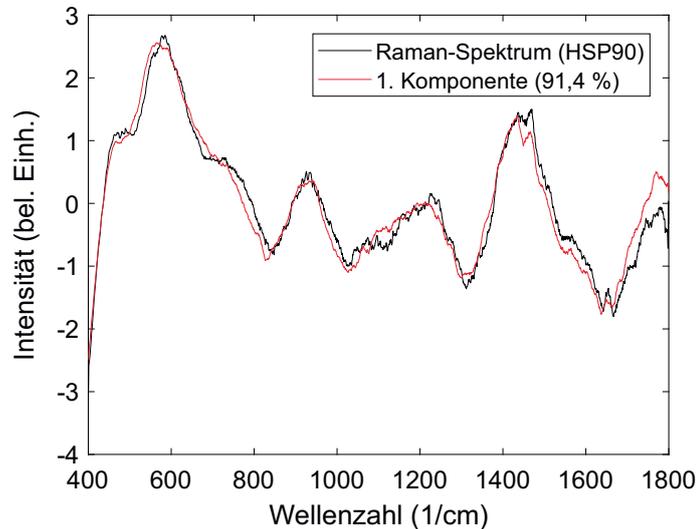


Abbildung 8.6: Raman-Spektrum von HSP90 (schwarze Kurve) und die erste Komponente einer PLSR der Datenmatrix X_K , die mit fünf Komponenten berechnet wurde (rote Kurve, zwei verschiedene HSP). Der Anteil an der gesamten Varianz in X_K , der von dieser Komponente erklärt wird, ist in Klammern angegeben. Zum besseren Vergleich der beiden Kurven sind die z-standardisierten Werte abgebildet.⁸⁴

Die große Ähnlichkeit zwischen der ersten Komponente und dem Raman-Spektrum von HSP90 belegt, dass die Mischungen von diesem Protein dominiert wurden (91,4 % der gesamten Varianz in X_K wurden von dieser Komponente erklärt). Die zweite Komponente erklärte weniger als 4 % der gesamten Varianz in X_K und konnte weder dem Raman-Spektrum von HSP70, noch dem des Lösungsmittels zugeordnet werden. Da der GMQF bei fünf Komponenten minimal war, wurde postuliert, dass die Informationen über HSP70 und das Lösungsmittel (Hintergrundspektrum mit Beiträgen aus dem GFB) in den vier höheren Komponenten enthalten waren.

Die Vorhersagegenauigkeit des Modells wurde mithilfe der Raman-Spektren der Matrix X_V validiert. Die vorhergesagten Konzentrationen wurden in Abbildung 8.7 den gemessenen (y_V) gegenübergestellt.

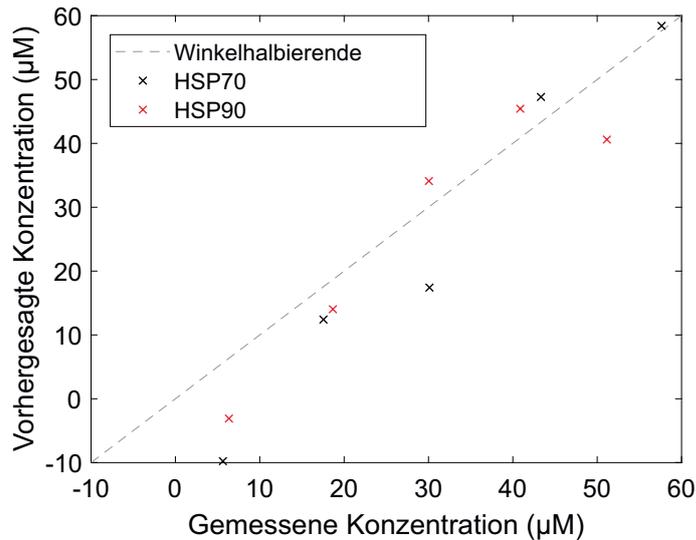


Abbildung 8.7: Gegenüberstellung der von dem PLSR-Modell vorhergesagten und der gemessenen Konzentrationen y_V der Stoffe HSP70 (schwarze Kreuze) und HSP90 (rote Kreuze). Die gestrichelte Linie repräsentiert die ideale Verteilung der Konzentrationen.⁸⁴

Die Konzentrationen der HSP wurden durch das Modell ausreichend präzise vorhergesagt ($R^2_{\text{HSP70}} = 0,74$ und $R^2_{\text{HSP90}} = 0,79$), um Konzentrationsänderungen dieser Proteine in der Perilymphe zu diagnostizieren (die mitunter deutliche Änderungen infolge einer Erkrankung aufweisen können).

Mit dem Umstieg auf ein GFB, das für eine Anregungswellenlänge im sichtbaren Spektralbereich ausgelegt war, ist die glasfasergestützte Messung der Raman-Spektren von Biomolekülen in wässriger Lösung gelungen. Es konnte ein mathematisches Modell berechnet werden, das die Konzentrationen von Innenohrproteinen aus Raman-Spektren vorhersagen konnte, die nicht Teil dieses Modells waren. Die Vorhersagegenauigkeit war ausreichend hoch, um die teilweise deutlichen Konzentrationsänderungen (bis zu einem Faktor von 5, siehe Abschnitt 8.1) von diagnostisch relevanten Proteinen in der Perilymphe zu detektieren, womit schließlich eine Korrelation mit dem zugrundeliegenden Krankheitsbild hergestellt werden kann. Bei der Untersuchung von nativen Proben gilt zu beachten, dass die HSP nur einen kleinen Teil des gesamten Proteingehalts der Perilymphe ausmachen. Wird gezielt nach einem bestimmten Krankheitsbild gesucht, müssen die entsprechenden Signaturen im Raman-Spektrum der Perilymphe identifiziert werden. Neben den HSP können auch andere Proteine starke Raman-Signale zeigen, die gemessen und Krankheitsbildern zugeordnet werden können.

9 Zusammenfassung und Ausblick

Das Ziel dieser Arbeit war die Evaluation der Raman-Spektroskopie für den Einsatz in der klinischen Diagnostik von Hörbeeinträchtigungen im Rahmen des Exzellenz-Clusters „Hearing4all“. Vorausgegangene sowie parallele Untersuchungen in einem Partnerprojekt an der Medizinischen Hochschule Hannover haben gezeigt, dass die nichtinvasive Diagnostik anhand der Zusammensetzung der Perilymphe erfolgen kann. Die Aufgabe umfasste die optische Charakterisierung der menschlichen Rundfenstermembran, um die Randbedingungen zu ermitteln, unter denen Raman-spektroskopische Messungen im Innenohr möglich sind. Dazu wurden Untersuchungen zur Extinktion von Licht in der Membran sowie Messungen des elastischen und unelastischen Streuvermögens durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass Wellenlängen im sichtbaren und nahinfraroten Spektralbereich aufgrund ihrer hohen Transmission durch die Rundfenstermembran und geringen Streuung im Gewebe für Raman-Spektroskopie geeignet sind.

Im Weiteren wurde eine technische Umsetzung der Spektroskopie von Biomolekülen unter physiologischen Bedingungen, d. h. kleinen Volumina ($\sim \mu\text{l}$) und geringen Konzentrationen ($\sim \mu\text{M}$), in der Cochlea gesucht (ohne Beeinträchtigung des Hörvermögens ist der gesamte Proteingehalt der Perilymphe $2 \mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$).⁵ Zu diesem Zweck wurde ein spezielles Glasfaserbündel eingesetzt, das eine definierte räumliche Lichtverteilung hinter der Membran ermöglichte und Raman-gestreutes Licht effizient einsammelte. Mit verschiedenen Optiken in der Spitze des Bündels wurden Störsignale minimiert, die in den Glasfasern auftraten.

Neben der experimentellen Realisierung der Raman-Spektroskopie wurde eine Methode gesucht, die eine Verbindung zwischen dem Raman-Spektrum eines Stoffs und seiner Konzentration herstellen konnte. Die multivariate Datenanalyse stellte das dafür nötige mathematische Konstrukt bereit. Weiterhin wurde ein Algorithmus zur Datennachbearbeitung entwickelt, der die gemessenen Raman-Spektren so bearbeitet hat, dass diese untereinander vergleichbar waren. Der wichtigste Schritt dabei war die Grundlinienkorrektur. Es wurde darauf geachtet, dass keine Informationen verloren gegangen sind oder verfälscht wurden und nur der Einfluss des experimentellen Aufbaus korrigiert wurde sowie Artefakte entfernt wurden. Der Algorithmus wurde anhand der Bestimmung der optimalen Anregungswellenlänge für die Resonanz-

Raman-Spektroskopie von Aminosäuren im ultravioletten Spektralbereich evaluiert. Eine umfassende Erprobung an Aminosäuren in wässriger Lösung belegte die Anwendbarkeit der multivariaten Datenanalyse in der Raman-Spektroskopie.

Die gewonnenen Erkenntnisse haben zur Verwendung eines Glasfaserbündels mit einer Anregungswellenlänge von 473 nm für die Messung von Innenohrproteinen geführt. Die multivariate Analyse von Hitzeschockproteinen hat schließlich die Möglichkeit der nichtinvasiven Messung von pathophysiologischen Parametern demonstriert.

Für den Einsatz des Glasfaserbündels während eines chirurgischen Eingriffs muss der Außendurchmesser der Spitze so verringert werden, dass diese in Kontakt mit der Rundfenstermembran gebracht werden kann. Nur so ist eine effiziente Aufnahme von Raman-Spektren der Perilymphe möglich. Dies könnte beispielsweise durch das Verwenden von Glasfasern mit einem kleineren Kerndurchmesser oder weniger Glasfasern im Bündel geschehen.

Das Partial Least Square-Regressionsmodell ist bislang für zwei verschiedene Proteine kalibriert worden. Damit einzelne Krankheitsbilder identifiziert werden können, müssen weitere Proteine in das Modell aufgenommen werden. Dazu sollten wieder unterschiedliche Mischungen der Proteine Raman-spektroskopisch gemessen werden, um ein robustes Partial Least Square-Regressionsmodell erstellen zu können.

Ein Modell, das viele verschiedene Proteine analysieren soll, setzt wiederum eine hohe Sensitivität des experimentellen Aufbaus voraus. Eine Möglichkeit, diese weiter zu steigern, ist die Anwendung von nichtlinearer Raman-Spektroskopie. Die stimulierte Raman-Streuung beispielsweise wäre dazu in der Lage und böte darüber hinaus den Vorteil, dass dort meistens größere Wellenlängen eingesetzt werden, die wiederum eine geringere Wechselwirkung mit dem Glasfaserbündel und der Rundfenstermembran aufweisen. Die Wellenlängen, die dazu erforderlich sind, können über das Glasfaserbündel in das Innenohr transportiert werden. Eine Evaluation der nichtlinearen Raman-Spektroskopie ist mithilfe der in dieser Arbeit verwendeten Ressourcen prinzipiell möglich.

Letztlich muss in einer klinischen Studie eine große Anzahl von Patienten mit zuvor diagnostizierter Hörbeeinträchtigung untersucht werden, indem zunächst mit dem Glasfaserbündel das Raman-Spektrum der Perilymphe durch die Rundfenstermembran aufgenommen wird. Anschließend muss ein Teil der Flüssigkeit entnommen und mithilfe von Massenspektrometrie analysiert werden. In einer parallelen Studie wurden *ex vivo* Proben gesammelt. Es liegt aber nur zu wenigen Proben eine ursächliche Diagnose vor. Außerdem betragen die Probenmengen nur wenige μl , weshalb der experimentelle Aufbau weiterentwickelt werden muss, damit die Proben nicht während der Messung eintrocknen und somit ihre Konzentration verändern. Über

die Korrelation der Ergebnisse beider Techniken kann dann die Funktionsweise der nichtinvasiven Diagnostik von Hörproblemen mittels Raman-Spektroskopie belegt und zukünftig als zusätzliches Werkzeug in der klinischen Diagnostik eingesetzt werden.

Literatur

- [1] H. H. Lim und T. Lenarz: Auditory midbrain implant: Research and development towards a second clinical trial; *Hear. Res.* **322**, 212 (2015).
- [2] W. Drexler, M. Liu, A. Kumar, T. Kamali, A. Unterhuber und R. A. Leitgeb: Optical coherence tomography today: speed, contrast, and multimodality; *J. Biomed. Opt.* **19**, 071412 (2014).
- [3] L. V. Wang und S. Hu: Photoacoustic tomography: in vivo imaging from organelles to organs; *Science* **335**, 1458 (2012).
- [4] A. C. Lysaght, S.-Y. Kao, J. A. Paulo, S. N. Merchant, H. Steen und K. M. Stankovic: Proteome of human perilymph; *J. Proteome Res.* **10**, 3845 (2011).
- [5] H. A. Schmitt, A. Pich, A. Schröder, V. Scheper, G. Lilli, G. Reuter und T. Lenarz: Proteome Analysis of Human Perilymph Using an Intraoperative Sampling Method; *J. Proteome Res.* **16**, 1911 (2017).
- [6] D. Pratiwi, J. Fawcett, K. C. Gordon und T. Rades: Quantitative analysis of polymorphic mixtures of ranitidine hydrochloride by Raman spectroscopy and principal components analysis; *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **54**, 337 (2002).
- [7] A. L. Jenkins, R. A. Larsen und T. B. Williams: Characterization of amino acids using Raman spectroscopy; *Spectrochim. Acta, Part A* **61**, 1585 (2005).
- [8] E. Podstawka-Proniewicz, N. Piergies, D. Skořuba, P. Kafarski, Y. Kim und L. M. Proniewicz: Vibrational characterization of L-leucine phosphonate analogues: FT-IR, FT-Raman, and SERS spectroscopy studies and DFT calculations; *J. Phys. Chem. A* **115**, 11067 (2011).
- [9] Z. Chi, X. G. Chen, J. S. Holtz und S. A. Asher: UV resonance Raman-selective amide vibrational enhancement: quantitative methodology for determining protein secondary structure; *Biochemistry* **37**, 2854 (1998).
- [10] S. Kecel, A. E. Ozel, S. Akyuz, S. Celik und G. Agaeva: Conformational analysis and vibrational spectroscopic investigation of L-proline-tyrosine (L-Pro-Tyr) dipeptide; *J. Mol. Struct.* **993**, 349 (2011).

- [11] S. A. Oladepo, K. Xiong, Z. Hong und S. A. Asher: Elucidating Peptide and Protein Structure and Dynamics: UV Resonance Raman Spectroscopy; *J. Phys. Chem. Lett.* **2**, 334 (2011).
- [12] E. Vass, M. Hollósi, F. Besson und R. Buchet: Vibrational spectroscopic detection of beta- and gamma-turns in synthetic and natural peptides and proteins; *Chem. Rev.* **103**, 1917 (2003).
- [13] A.-K. Kniggendorf, M. Meinhardt-Wollweber, X. Yuan, B. Roth, A. Seifert, N. Fertig und C. Zeilinger: Temperature-sensitive gating of hCx26: high-resolution Raman spectroscopy sheds light on conformational changes; *Biomed. Opt. Express* **5**, 2054 (2014).
- [14] Q. Tu und C. Chang: Diagnostic applications of Raman spectroscopy; *Nanomedicine* **8**, 545 (2012).
- [15] C. Eklouh-Molinier, V. Gaydou, E. Froigneux, P. Barlier, V. Couturaud, M. Manfait und O. Piot: In vivo confocal Raman microspectroscopy of the human skin: highlighting of spectral markers associated to aging via a research of correlation between Raman and biometric mechanical measurements; *Anal. Bioanal. Chem.* **407**, 8363 (2015).
- [16] F. M. Lyng, D. Traynor, I. R. M. Ramos, F. Bonnier und H. J. Byrne: Raman spectroscopy for screening and diagnosis of cervical cancer; *Anal. Bioanal. Chem.* **407**, 8279 (2015).
- [17] W. Wang, J. Zhao, M. Short und H. Zeng: Real-time *in vivo* cancer diagnosis using Raman spectroscopy; *J. Biophotonics* **8**, 527 (2015).
- [18] H. K. Yosef, L. Mavarani, A. Maghnoij, S. Hahn, S. F. El-Mashtoly und K. Gerwert: In vitro prediction of the efficacy of molecularly targeted cancer therapy by Raman spectral imaging; *Anal. Bioanal. Chem.* **407**, 8321 (2015).
- [19] S. Wold, M. Sjöström und L. Eriksson: PLS-regression: a basic tool of chemometrics; *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **58**, 109 (2001).
- [20] D. A. Long: The Raman effect: A unified treatment of the theory of Raman scattering by molecules; John Wiley & Sons Ltd, Chichester (2002).
- [21] W. Demtröder: Laserspektroskopie 1: Grundlagen; Springer-Verlag, Berlin Heidelberg (2011).
- [22] W. Demtröder: Laserspektroskopie 2: Experimentelle Techniken; Springer-Verlag, Berlin Heidelberg (2013).
- [23] R. Aroca: Surface-Enhanced Vibrational Spectroscopy; John Wiley & Sons Ltd, Chichester (2006).

-
- [24] S. A. Asher: UV Resonance Raman Spectroscopy for Analytical, Physical, and Biophysical Chemistry; *Anal. Chem.* **65**, 59A (1993).
- [25] S. A. Asher: UV Resonance Raman Spectroscopy for Analytical, Physical, and Biophysical Chemistry; *Anal. Chem.* **65**, 201A (1993).
- [26] G. M. Hale und M. R. Querry: Optical Constants of Water in the 200-nm to 200- μm Wavelength Region; *Appl. Opt.* **12**, 555 (1973).
- [27] J. C. Hebden, S. R. Arridge und D. T. Delpy: Optical imaging in medicine: I. Experimental techniques; *Phys. Med. Biol.* **42**, 825 (1997).
- [28] C. Balas: Review of biomedical optical imaging—a powerful, non-invasive, non-ionizing technology for improving *in vivo* diagnosis; *Meas. Sci. Technol.* **20**, 104020 (2009).
- [29] M. A. Calin, S. V. Parasca, R. Savastru, M. R. Calin und S. Dontu: Optical techniques for the noninvasive diagnosis of skin cancer; *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **139**, 1083 (2013).
- [30] A. N. Bashkatov, E. A. Genina, V. I. Kochubey und V. V. Tuchin: Optical properties of human skin, subcutaneous and mucous tissues in the wavelength range from 400 to 2000 nm; *J. Phys. D: Appl. Phys.* **38**, 2543 (2005).
- [31] T. Lister, P. A. Wright und P. H. Chappell: Optical properties of human skin; *J. Biomed. Opt.* **17**, 090901 (2012).
- [32] S. L. Jacques: Optical properties of biological tissues: a review; *Phys. Med. Biol.* **58**, R37 (2013).
- [33] M. V. Goycoolea und L. Lundman: Round window membrane. Structure function and permeability: A review; *Microsc. Res. Tech.* **36**, 201 (1997).
- [34] M. Höhl, D. DeTemple, S. Lyutenski, G. Leuteritz, A. Varkentin, H. A. Schmitt, T. Lenarz, B. Roth, M. Meinhardt-Wollweber und U. Morgner: Optical properties of the human round window membrane; *J. Biomed. Opt.* **22**, 105007 (2017).
- [35] A. Varkentin, M. Mazurenka, E. Blumenröther, M. Meinhardt-Wollweber, M. Rahlves, S. M. C. Broekaert, S. Schäd-Trcka, S. Emmert, U. Morgner und B. Roth: Comparative study of presurgical skin infiltration depth measurements of melanocytic lesions with OCT and high frequency ultrasound; *J. Biophotonics* **10**, 854 (2017).
- [36] T. Jacksier und R. M. Barnes: Atomic Emission Spectra of Xenon, Krypton, and Neon: Spectra from 200 to 900 nm by Sealed Inductively Coupled Plasma/Atomic Emission Spectroscopy; *Appl. Spectrosc.* **48**, 65 (1994).

- [37] A. H. Fradkin, O. Mozziconacci, C. Schöneich, J. F. Carpenter und T. W. Randolph: UV photodegradation of murine growth hormone: chemical analysis and immunogenicity consequences; *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **87**, 395 (2014).
- [38] A. Stylianou, D. Yova und E. Alexandratou: Investigation of the influence of UV irradiation on collagen thin films by AFM imaging; *Mater. Sci. Eng., C* **45**, 455 (2014).
- [39] H. Key, E. R. Davies, P. C. Jackson und P. N. T. Wells: Optical attenuation characteristics of breast tissues at visible and near-infrared wavelengths; *Phys. Med. Biol.* **36**, 579 (1991).
- [40] A. Rygula, K. Majzner, K. M. Marzec, A. Kaczor, M. Pilarczyk und M. Baranska: Raman spectroscopy of proteins: a review; *J. Raman Spectrosc.* **44**, 1061 (2013).
- [41] M. Höhl, B. Roth, U. Morgner und M. Meinhardt-Wollweber: Efficient procedure for the measurement of preresonant excitation profiles in UV Raman spectroscopy; *Rev. Sci. Instrum.* **88**, 073105 (2017).
- [42] E. R. Holiday: Spectrophotometry of proteins; *Biochem. J.* **30**, 1795 (1936).
- [43] K. Imahori und J. Tanaka: Ultraviolet absorption spectra of poly-L-glutamic acid; *J. Mol. Biol.* **1**, 359 (1959).
- [44] F. Inagaki, M. Tasumi und T. Miyazawa: Excitation profile of the resonance Raman effect of β -carotene; *J. Mol. Spectrosc.* **50**, 286 (1974).
- [45] L. D. Ziegler und B. Hudson: Resonance Raman scattering of benzene and benzene- d_6 with 212.8 nm excitation; *J. Chem. Phys.* **74**, 982 (1981).
- [46] R. L. Benson, K. Iwata, W. L. Weaver und T. L. Gustafson: Improvements in the Generation of Quasi-Continuous, Tunable Ultraviolet Excitation for Raman Spectroscopy: Applications to Drug/Nucleotide Interactions; *Appl. Spectrosc.* **46**, 240 (1992).
- [47] S. A. Asher, R. W. Bormett, X. G. Chen, D. H. Lemmon, N. Cho, P. Peterson, M. Arrigoni, L. Spinelli und J. Cannon: UV Resonance Raman Spectroscopy Using a New cw Laser Source: Convenience and Experimental Simplicity; *Appl. Spectrosc.* **47**, 628 (1993).
- [48] S. J. Doig und F. G. Prendergast: Continuously Tuneable, Quasi-Continuous-Wave Source for Ultraviolet Resonance Raman Spectroscopy; *Appl. Spectrosc.* **49**, 247 (1995).

-
- [49] X. Zhao und T. G. Spiro: Ultraviolet resonance Raman spectroscopy of hemoglobin with 200 and 212 nm excitation: H-bonds of tyrosines and prolines; *J. Raman Spectrosc.* **29**, 49 (1998).
- [50] X. Zhao, R. Chen, C. Tengroth und T. G. Spiro: Solid-State Tunable kHz Ultraviolet Laser for Raman Applications; *Appl. Spectrosc.* **53**, 1200 (1999).
- [51] B. Sharma, S. V. Bykov und S. A. Asher: UV resonance raman investigation of electronic transitions in α -helical and polyproline II-like conformations; *J. Phys. Chem. B* **112**, 11762 (2008).
- [52] B. Sharma und S. A. Asher: UV resonance Raman investigation of the conformations and lowest energy allowed electronic excited states of tri- and tetraalanine: Charge transfer transitions; *J. Phys. Chem. B* **114**, 6661 (2010).
- [53] B. Sharma und S. A. Asher: UV resonance Raman finds peptide bond-Arg side chain electronic interactions; *J. Phys. Chem. B* **115**, 5659 (2011).
- [54] F. Rwere, P. J. Mak und J. R. Kincaid: Resonance Raman determination of vinyl group disposition in different derivatives of native myoglobin and its heme-disoriented form; *J. Raman Spectrosc.* **45**, 97 (2014).
- [55] David R. Lide: *CRC Handbook of Chemistry and Physics*; CRC Press, Boca Raton (2005).
- [56] C. R. Johnson, M. Ludwig und S. A. Asher: Ultraviolet resonance Raman characterization of photochemical transients of phenol, tyrosine, and tryptophan; *J. Am. Chem. Soc.* **108**, 905 (1986).
- [57] G. K. Wertheim, M. A. Butler, K. W. West und D. N. E. Buchanan: Determination of the Gaussian and Lorentzian content of experimental line shapes; *Rev. Sci. Instrum.* **45**, 1369 (1974).
- [58] L. Fahrmeir, T. Kneib, S. Lang und B. Marx: *Regression: Models, Methods and Applications*; Springer-Verlag, Berlin Heidelberg (2013).
- [59] G. Zhu, X. Zhu, Q. Fan und X. Wan: Raman spectra of amino acids and their aqueous solutions; *Spectrochim. Acta, Part A* **78**, 1187 (2011).
- [60] S. A. Asher und C. R. Johnson: Raman spectroscopy of a coal liquid shows that fluorescence interference is minimized with ultraviolet excitation; *Science* **225**, 311 (1984).
- [61] C. A. Lieber und A. Mahadevan-Jansen: Automated method for subtraction of fluorescence from biological Raman spectra; *Appl. Spectrosc.* **57**, 1363 (2003).

- [62] G. Schulze, A. Jirasek, M. M. L. Yu, A. Lim, R. F. B. Turner und M. W. Blades: Investigation of selected baseline removal techniques as candidates for automated implementation; *Appl. Spectrosc.* **59**, 545 (2005).
- [63] A. Cao, A. K. Pandya, G. K. Serhatkulu, R. E. Weber, H. Dai, J. S. Thakur, V. M. Naik, R. Naik, G. W. Auner, R. Rabah und D. C. Freeman: A robust method for automated background subtraction of tissue fluorescence; *J. Raman Spectrosc.* **38**, 1199 (2007).
- [64] J. Zhao, H. Lui, D. I. McLean und H. Zeng: Automated autofluorescence background subtraction algorithm for biomedical Raman spectroscopy; *Appl. Spectrosc.* **61**, 1225 (2007).
- [65] Z.-M. Zhang, S. Chen, Y.-Z. Liang, Z.-X. Liu, Q.-M. Zhang, L.-X. Ding, F. Ye und H. Zhou: An intelligent background-correction algorithm for highly fluorescent samples in Raman spectroscopy; *J. Raman Spectrosc.* **41**, 659 (2010).
- [66] H. G. Schulze, R. B. Foist, K. Okuda, A. Ivanov und R. F. B. Turner: A model-free, fully automated baseline-removal method for Raman spectra; *Appl. Spectrosc.* **65**, 75 (2011).
- [67] K. Chen, H. Wei, H. Zhang, T. Wu und Y. Li: A Raman peak recognition method based automated fluorescence subtraction algorithm for retrieval of Raman spectra of highly fluorescent samples; *Anal. Methods* **7**, 2770 (2015).
- [68] M. Koch, C. Suhr, B. Roth und M. Meinhardt-Wollweber: Iterative morphological and mollifier-based baseline correction for Raman spectra; *J. Raman Spectrosc.* **48**, 336 (2017).
- [69] A. J. Durkin, M. N. Ediger und G. H. Pettit: Quantification of polydimethylsiloxane concentration in turbid samples using raman spectroscopy and the method of partial least squares; *Lasers Med. Sci.* **13**, 32 (1998).
- [70] R. Hori und J. Sugiyama: A combined FT-IR microscopy and principal component analysis on softwood cell walls; *Carbohydr. Polym.* **52**, 449 (2003).
- [71] X. Huang, Y. Yuan, T. A. Bielecki, B. C. Mohapatra, H. Luan, E. Silva-Lopez, W. W. West, V. Band, Y. Lu, H. Band und T. C. Zhang: Discrimination of tumor from normal tissues in a mouse model of breast cancer using CARS spectroscopy combined with PC-DFA methodology; *J. Raman Spectrosc.* **48**, 1166 (2017).
- [72] W. Kessler: *Multivariate Datenanalyse: für die Pharma-, Bio- und Prozessanalytik*; WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim (2007).

-
- [73] L. S. Greek, H. G. Schulze, M. W. Blades, C. A. Haynes, K.-F. Klein und R. F. B. Turner: Fiber-optic probes with improved excitation and collection efficiency for deep-UV Raman and resonance Raman spectroscopy; *Appl. Opt.* **37**, 170 (1998).
- [74] M. G. Shim, Wong Kee Song, Louis-Michel, N. E. Marcon und B. C. Wilson: *In vivo* Near-infrared Raman Spectroscopy: Demonstration of Feasibility During Clinical Gastrointestinal Endoscopy; *Photochem. Photobiol.* **72**, 146 (2000).
- [75] C. Krafft, S. Dochow, I. Latka, B. Dietzek und J. Popp: Diagnosis and screening of cancer tissues by fiber-optic probe Raman spectroscopy; *Biomed. Spectrosc. Imaging* **1**, 39 (2012).
- [76] I. Latka, S. Dochow, C. Krafft, B. Dietzek und J. Popp: Fiber optic probes for linear and nonlinear Raman applications - Current trends and future development; *Laser Photonics Rev.* **7**, 698 (2013).
- [77] M. Agenant, M. Grimbergen, R. Draga, E. Marple, R. Bosch und C. van Swol: Clinical superficial Raman probe aimed for epithelial tumor detection: Phantom model results; *Biomed. Opt. Express* **5**, 1203 (2014).
- [78] S. Dochow, D. Ma, I. Latka, T. Bocklitz, B. Hartl, J. Bec, H. Fatakdawala, E. Marple, K. Urmeiy, S. Wachsmann-Hogiu, M. Schmitt, L. Marcu und J. Popp: Combined fiber probe for fluorescence lifetime and Raman spectroscopy; *Anal. Bioanal. Chem.* **407**, 8291 (2015).
- [79] I. E. Iping Petterson, J. C. C. Day, L. M. Fullwood, B. Gardner und N. Stone: Characterisation of a fibre optic Raman probe within a hypodermic needle; *Anal. Bioanal. Chem.* **407**, 8311 (2015).
- [80] J. Wang, K. Lin, W. Zheng, K. Y. Ho, M. Teh, K. G. Yeoh und Z. Huang: Comparative study of the endoscope-based bevelled and volume fiber-optic Raman probes for optical diagnosis of gastric dysplasia *in vivo* at endoscopy; *Anal. Bioanal. Chem.* **407**, 8303 (2015).
- [81] O. Stevens, I. E. Iping Petterson, J. C. C. Day und N. Stone: Developing fibre optic Raman probes for applications in clinical spectroscopy; *Chem. Soc. Rev.* **45**, 1919 (2016).
- [82] I. J. Pence, D. B. Beaulieu, S. N. Horst, X. Bi, A. J. Herline, D. A. Schwartz und A. Mahadevan-Jansen: Clinical characterization of *in vivo* inflammatory bowel disease with Raman spectroscopy; *Biomed. Opt. Express* **8**, 524 (2017).

- [83] M. Boczar, M. J. Wójcik, K. Szczeponek, D. Jamróz, A. Zięba und B. Kawałek: Theoretical modeling of infrared spectra of aspirin and its deuterated derivative; Chem. Phys. **286**, 63 (2003).
- [84] M. Höhl, C. Zeilinger, B. Roth, M. Meinhardt-Wollweber und U. Morgner: Multivariate discrimination of heat shock proteins using a fiber optic Raman setup for *in situ* analysis of human perilymph; Rev. Sci. Instrum. **90**, 043110 (2019).
- [85] H. Schmitt, A. Roemer, C. Zeilinger, R. Salcher, M. Durisin, H. Staecker, T. Lenarz und A. Warnecke: Heat Shock Proteins in Human Perilymph: Implications for Cochlear Implantation; Otol. Neurotol. **39**, 37 (2018).
- [86] S. Lindquist und E. A. Craig: The heat-shock proteins; Annu. Rev. Genet. **22**, 631 (1988).
- [87] T. Scheibel, S. Neuhofen, T. Weikl, C. Mayr, J. Reinstein, P. D. Vogel und J. Buchner: ATP-binding Properties of Human Hsp90; J. Biol. Chem. **272**, 18608 (1997).
- [88] M. Yoshida und Y. Xia: Heat shock protein 90 as an endogenous protein enhancer of inducible nitric-oxide synthase; J. Biol. Chem. **278**, 36953 (2003).

Liste der Publikationen

Journale

M. Höhl, B. Roth, U. Morgner und M. Meinhardt-Wollweber: Efficient procedure for the measurement of preresonant excitation profiles in UV Raman spectroscopy; Rev. Sci. Instrum. **88**, 073105 (2017).

M. Höhl, D. DeTemple, S. Lyutenski, G. Leuteritz, A. Varkentin, H. A. Schmitt, T. Lenarz, B. Roth, M. Meinhardt-Wollweber und U. Morgner: Optical properties of the human round window membrane; J. Biomed. Opt. **22**, 105007 (2017).

M. Höhl, C. Zeilinger, B. Roth, M. Meinhardt-Wollweber und U. Morgner: Multivariate discrimination of heat shock proteins using a fiber optic Raman setup for *in situ* analysis of human perilymph; Rev. Sci. Instrum. **90**, 043110 (2019).

Konferenzbeiträge (Proceedings)

M. Höhl, M. Meinhardt-Wollweber, H. Schmitt, T. Lenarz und U. Morgner: UV-resonance Raman spectroscopy of amino acids; Proc. of SPIE Vol. 9704 970404.

M. Höhl, M. Meinhardt-Wollweber, U. Morgner, H. Schmitt und T. Lenarz: Resonance Raman spectroscopy of amino acids and proteins; DGaO Proceedings 2016.

Konferenzbeiträge (Vorträge)

M. Höhl, M. Wollweber, U. Morgner, H. Schmitt und T. Lenarz: Raman spectroscopy for analysis of inner ear fluids; ICORS 2014, Jena, Germany (2014).

M. Höhl, M. Wollweber, U. Morgner, H. Schmitt und T. Lenarz: Resonance Raman Spectroscopy for Analysis of Amino Acids; ICAVS8, Wien, Austria (2015).

M. Höhl, M. Meinhardt-Wollweber, H. Schmitt, T. Lenarz und U. Morgner: UV-resonance Raman spectroscopy of amino acids; SPIE Photonics West, San Francisco, USA (2016).

M. Höhl, M. Meinhardt-Wollweber, U. Morgner, H. Schmitt und T. Lenarz: Resonance Raman spectroscopy of amino acids and proteins; 117th Annual Meeting of DGaO, Hannover, Germany (2016).

Abbildungsverzeichnis

2.1	Jablonski-Diagramm der Wechselwirkungsprozesse	6
2.2	Vibrationsmoden und ihre Symmetrien	8
2.3	Raman-Spektrum und optische Dichte von Wasser	9
3.1	Mikroskopische Aufnahme einer menschlichen RFM	13
3.2	OCT-Aufnahmen zweier RFM ohne Knochenringe	15
3.3	OCT-Aufnahmen zweier RFM mit Knochenringen	16
3.4	Experimenteller Aufbau zur Messung der Transmission von RFM	17
3.5	Zur Berechnung des Transmissionsspektrums verwendete Einzelspektren	19
3.6	Transmissionsspektren der RFM	20
3.7	Extinktionskoeffizienten der RFM	21
3.8	Experimenteller Aufbau zur Messung des elastischen Streuvermögens von RFM	22
3.9	Gemessene Lichtverteilung hinter einer menschlichen RFM	23
3.10	Regressionsfunktionen zur Bestimmung von Λ und g	25
3.11	Raman-Spektren der RFM	27
4.1	Optische Dichte von PRO und GLY	31
4.2	Molare Absorption von PRO und GLY	32
4.3	Experimenteller Aufbau zur Bestimmung der optimalen Anregungs- wellenlänge in der RRS	33
4.4	Regressionen des Spektrums eines Laserimpulses	39
4.5	SGF des experimentellen Aufbaus für die RRS	41
4.6	Raman-Spektrum von PRO bei $\lambda_0 = 266,0$ nm	42
4.7	Raman-Spektrum von GLY bei $\lambda_0 = 266,0$ nm	43
4.8	Flussdiagramm der Datennachbearbeitung in der RRS	46
4.9	AEK von PRO	47
4.10	AEK von GLY	47
5.1	Raman-Spektren der für die multivariate Datenanalyse verwendeten Aminosäuren	55
5.2	Raman-Spektren von Mischungen aus PRO und GLY	57

5.3	Raman-Spektrum von GLY und erste Hauptkomponente der PCA für zwei Aminosäuren	58
5.4	Raman-Spektrum von PRO und zweite Hauptkomponente der PCA für zwei Aminosäuren	59
5.5	PLSR-Spezifikationen bei zwei verschiedenen Aminosäuren	60
5.6	Raman-Spektrum von GLY und erste Komponente einer PLSR mit zwei Komponenten bei zwei Aminosäuren	61
5.7	Raman-Spektrum von PRO und zweite Komponente einer PLSR mit zwei Komponenten bei zwei Aminosäuren	62
5.8	Ergebnis der PLSR mit zwei Aminosäuren	63
5.9	PLSR-Spezifikationen bei drei verschiedenen Aminosäuren	64
5.10	Raman-Spektren von GLY, ALA und ARG sowie Komponenten einer PLSR mit drei Komponenten bei drei Aminosäuren	65
5.11	Ergebnis der PLSR mit drei Aminosäuren	66
5.12	PLSR-Spezifikationen bei vier verschiedenen Aminosäuren	67
5.13	Ergebnis der PLSR mit vier Aminosäuren	68
5.14	PLSR-Spezifikationen bei allen Aminosäuren	69
5.15	Ergebnis der PLSR mit allen Aminosäuren	70
6.1	Detektionseffizienz des Spektrografen	75
6.2	Fluoreszenz und Raman-Streuung einer Glasfaser	76
6.3	Skizze des GFB	77
6.4	Transmissionsspektren des Band- und Langpassfilters des GFB	79
6.5	Raman-Spektrum von Aspirin bei $\lambda_0 = 785 \text{ nm}$	80
7.1	Experimenteller Aufbau zur glasfasergestützten Messung von Raman-Spektren	82
7.2	Raman-Spektren der für die glasfasergestützte multivariate Analyse verwendeten Aminosäuren (Pulver)	83
7.3	PLSR-Spezifikationen bei zwei verschiedenen Aminosäuren (Pulver)	84
7.4	Raman-Spektrum von ARG und Komponente einer PLSR bei zwei Aminosäuren (Pulver)	85
7.5	Ergebnis der PLSR mit zwei Aminosäuren (Pulver)	86
7.6	PLSR-Spezifikationen bei drei verschiedenen Aminosäuren (Pulver)	87
7.7	Raman-Spektren von ARG und VAL sowie Komponenten einer PLSR mit zwei Komponenten bei drei Aminosäuren (Pulver)	88
7.8	Ergebnis der PLSR mit drei Aminosäuren (Pulver)	89
8.1	Absorptionsspektrum von HSP70	92

8.2	Raman-Spektren von Aspirin bei $\lambda_0 = 473$ nm und $\lambda_0 = 785$ nm . . .	94
8.3	Raman-Spektren von PRO bei $\lambda_0 = 473$ nm und $\lambda_0 = 248$ nm	95
8.4	Raman-Spektren von HSP70 und HSP90 bei $\lambda_0 = 473$ nm	96
8.5	PLSR-Spezifikationen bei zwei verschiedenen HSP	97
8.6	Raman-Spektrum von HSP90 und erste Komponente einer PLSR bei zwei HSP	98
8.7	Ergebnis der PLSR mit zwei HSP	99

Tabellenverzeichnis

3.1	Informationen zu den Membranen	14
3.2	Ergebnisse der Messungen zu den Streueigenschaften der RFM mit einem Goniometer	24
4.1	Mit den Gitterpositionen verbundene Wellenlängenbänder	36

Abkürzungsverzeichnis

Bezeichnung	Beschreibung
AEK	Anregungs-Emissions-Karte
ALA	Alanin
ARG	Arginin
FAB	Fingerabdruckbereich
GFB	Glasfaserbündel
GLY	Glycin
GMQF	geschätzter mittlerer quadratischer Fehler
HSP	Hitzeschockprotein
OCT	optische Kohärenztomografie [engl.: optical coherence tomography]
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung [engl.: phosphate buffered saline]
PCA	Hauptkomponentenanalyse [engl.: principal component analysis]
PLSR	Partial Least Square-Regression
PRO	Prolin
RFM	Rundfenstermembran
RRS	Resonanz-Raman-Spektroskopie
RS	Raman-Spektroskopie
SGF	spektrale Gerätefunktion
THR	Threonin
VAL	Valin

Symbolverzeichnis

Bezeichnung	Beschreibung
A	Stoffmengenanteil
α	molekulare Polarisierbarkeit
β	Partial Least Square-Regressionsmodell
C	Konzentration
d	Dicke
E	Energiedichte
η	Gewichtungsfaktor
F_{PV}	Pseudo-Voigt-Funktion
g	Anisotropiefaktor
H	Hintergrundspektrum
K	Kovarianz
κ	Extinktionskoeffizient
Λ	Halbwertsbreite
λ	Wellenlänge
λ_0	Anregungswellenlänge
M	Membranspektrum
m	Masse
m_0	molare Masse
μ	molekulares Dipolmoment
N	Probenanzahl
n	Stoffmenge
NA	numerische Apertur
ν	Wellenzahl
OD	optische Dichte
P	Leistung
p	Phasenfunktion (Henyey-Greenstein)
q	Normalkoordinate
R	Referenzspektrum
R^2	Bestimmtheitsmaß

Bezeichnung	Beschreibung
R_K^2	korrigiertes Bestimmtheitsmaß
σ	Wirkungsquerschnitt
T	Transmission
t	Belichtungsdauer
θ	Streuwinkel
V	Volumen
X	Datenmatrix
x	spektrale Koordinate
x_0	spektraler Versatz
y	Eigenschaftsmatrix

Martin Ulrich Höhl

Lebenslauf

Persönliche Angaben

geboren am 21.05.1987 in Münster
verheiratet

Ausbildung und Studium

- 1997 – 2006 **Abitur**, Königin-Mathilde-Gymnasium, Herford
- 2006 – 2007 **Zivildienst**, Biologische Station Ravensberg, Kirchlengern
- 10/2007 – 09/2010 **B.Sc.** (Physik), Institut für Angewandte Physik, Westfälische Wilhelms-Universität Münster, Münster
Thema der Abschlussarbeit: *Raumaufgelöste Vermessung optischer Rückstreukegel*
- 10/2010 – 05/2013 **M.Sc.** (Physik), Institut für Angewandte Physik, Westfälische Wilhelms-Universität Münster, Münster
Thema der Abschlussarbeit: *Untersuchungen zur Fotopolymerisation für photonische Strukturen*
- 08/2013 – 02/2019 **Doktorand** (Physik), Institut für Quantenoptik, Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover, Hannover

Berufserfahrung

- 06/2013 – 07/2013 **Wissenschaftlicher Mitarbeiter**, Westfälische Wilhelms-Universität Münster, Münster
- 08/2013 – 04/2018 **Wissenschaftlicher Mitarbeiter**, Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover, Hannover
- 07/2018 – heute **Entwicklungsingenieur**, IAV GmbH, Gifhorn

Danksagung

Bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Uwe Morgner möchte ich mich für die Vergabe des interessanten Themas und die vielseitige Unterstützung, die ich jederzeit in Anspruch nehmen konnte, bedanken.

Prof. Dr. Bernhard Roth danke ich für seine Funktion als Korreferent sowie die zahlreichen Diskussionen, die ich zu jedem Zeitpunkt und über jedes Thema mit ihm führen konnte.

Ich danke Prof. Dr. Theodor Doll für seine Unterstützung als Korreferent.

Bei PD Dr. Merve Wollweber bedanke ich mich für die kompetente fachliche Unterstützung und das Korrekturlesen sämtlicher Texte, Vorträge und Poster.

PD Dr. Carsten Zeilinger verdanke ich die aufwendige Präparation der Innenohrproteine, sowie die wertvolle Beratung zur Handhabung von Biomolekülen im Allgemeinen. Großer Dank gilt auch Prof. Prof. Dr. Thomas Lenarz für die Kooperation im Rahmen von „Hearing4all“ und das Bereitstellen wichtiger Ressourcen für die Charakterisierung der menschlichen Rundfenstermembran.

Dr. Heike Schmitt verdanke ich ebenfalls die reibungslose Zusammenarbeit im Exzellenz-Cluster und die fortwährende Unterstützung bei allen Fragen rund um das Innenohr.

Dr. Stefan Lyutenski danke ich für die Präparation der Membranen, sowie seine Unterstützung für die Vorbereitung der anschließenden Messungen.

Dr. Daphne DeTemple und Georg Leuteritz danke ich für die unermüdliche Hilfe bei den Messungen der optischen Eigenschaften der Rundfenstermembran.

Besonderer Dank gilt meinem lieben Kollegen Dr. Arthur Varkentin einerseits für die Messungen an den Membranen und andererseits für seine Verfügbarkeit als wertvoller Diskussionspartner sowie seine technischen Fähigkeiten, die ich jederzeit in Anspruch nehmen konnte.

In Fragen der Raman-Spektroskopie hatten Dr. Ann-Kathrin Kniggendorf und Dr. Matthias Koch stets ein offenes Ohr. Letzterem danke ich insbesondere für seinen Algorithmus zur Grundlinienkorrektur, der in dieser Arbeit oft zum Einsatz kam.

Meinen Kollegen vom Hannoverschen Zentrum für Optische Technologien danke ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre und vielen Unternehmungen als Gruppe.

Vera Vollmert, Elke Hünitzsch und Natalie Sengstock danke ich herzlich für die Unterstützung in allen organisatorischen Fragen.

Allen im Exzellenz-Cluster verdanke ich die vielen interdisziplinären Eindrücke, die mir beim Verständnis der Physiologie des Hörens geholfen haben. Zudem danke ich der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Finanzierung meiner Arbeit.

Ganz besonderer Dank gilt meiner Familie. Meinen Eltern verdanke ich die frühe Begeisterung für die Naturwissenschaften und sämtliche Unterstützung, die sie mir mein ganzes Leben lang haben angedeihen lassen. Meiner lieben Frau Alexandra möchte ich für ihre Liebe und unerschütterliche Geduld danken, aufgrund derer ich mich stets voll und ganz auf meine Arbeit konzentrieren konnte.

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt sowie die Zitate deutlich kenntlich gemacht zu haben.

Hannover, den 19. April 2019

Martin Ulrich Höhl

