

**Quantitative Analyse von Humanserum
und Serumultrafiltrat mittels
Raman-Spektroskopie**



Quantitative Analyse von Humanserum und Serumultrafiltrat mittels Raman-Spektroskopie

Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Daniel Rohleder
aus Olsberg

Würzburg 2005

Bibliografische Information Der Deutschen Bibliothek

Die Deutsche Bibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

1. Aufl. - Göttingen : Cuvillier, 2005
Zugl.: Würzburg, Univ., Diss., 2005
ISBN 3-86537-378-X

Eingereicht am: 28.01.2005
bei der Fakultät für Chemie und Pharmazie

1. Gutachter: PD Dr. Wolfgang Petrich
2. Gutachter: Prof. Dr. Wolfgang Kiefer
der Dissertation

1. Prüfer: PD Dr. Wolfgang Petrich
2. Prüfer: Prof. Dr. Wolfgang Kiefer
3. Prüfer: Prof. Dr. Bernd Engels
des Öffentlichen Promotionskolloquiums

Tag des Öffentlichen Promotionskolloquiums: 14.03.2005

Doktorurkunde ausgehändigt am:

© CUVILLIER VERLAG, Göttingen 2005
Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen
Telefon: 0551-54724-0
Telefax: 0551-54724-21
www.cuvillier.de

Alle Rechte vorbehalten. Ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages ist es nicht gestattet, das Buch oder Teile daraus auf fotomechanischem Weg (Fotokopie, Mikrokopie) zu vervielfältigen.

1. Auflage, 2005
Gedruckt auf säurefreiem Papier

ISBN 3-86537-378-X

Inhalt

1	Einleitung	1
1.1	Motivation	1
1.2	Glucose als Modellanalyt	5
1.3	Der Raman-Streuprozess	6
1.4	Fluoreszenz als Konkurrenzprozess zur Raman-Streuung	10
1.5	Vorgehensweise	11
2	Glucose aus quantenchemischer Sicht	13
2.1	Dichtefunktionaltheorie	13
2.2	α - und β -D-Glucose in Gasphase	18
2.3	Glucose in dielektrischem Medium	21
3	Studienkonzeption und experimenteller Aufbau	27
3.1	Studienkonzeption	27
3.1.1	Vorstudie	27
3.1.2	Studie an Humanmaterial	34
3.2	Experimenteller Aufbau	36
3.2.1	Gitter-Spektrometer	37
3.2.2	Kommerzieller Raman-Sensorkopf	39
3.2.3	Faseroptischer Sensorkopf	41
3.2.4	Das Fluoreszenzspektrometer	47
3.3	Methoden der multivariaten Datenanalyse	48
3.4	Methoden zur Bewertung der Analyseergebnisse	52
4	Ergebnisse	57
4.1	Quantifizierung von Glucose in Wasser	57
4.2	Einfluss anderer Zucker	63
4.3	Einfluss von Proteinen	65
4.4	Einfluss weiterer Serumbestandteile	67
4.5	Fluoreszenz von Humanserum	68
4.6	Quantifizierung von Glucose in Rinderserum	74

4.7	Quantitative Analyse von Humanserum	80
4.8	Quantitative Analyse von Humaserum-Ultrafiltrat	87
5	Diskussion	91
6	Zusammenfassung	101
7	Literaturverzeichnis	105
	Abkürzungen und Symbole	113
	Danksagung	117

1 Einleitung

1.1 Motivation

In der Medizin spielt die schnelle Verfügbarkeit klinischer Daten, wie beispielsweise die Konzentrationen verschiedener Parameter in Blut, eine wichtige Rolle. Standardverfahren zur Bestimmung dieser Parameter basieren häufig auf enzymatischen Reaktionen. Diese Methoden zeichnen sich durch eine hohe Sensitivität und Spezifität für den gesuchten Parameter aus. Häufig ist für die richtige Einordnung einer Erkrankung aber nicht die Konzentration *eines* Parameters ausschlaggebend, sondern das Gesamtbild, das aus der Gesamtinformation aller bestimmten Parameterkonzentrationen entsteht. Daraus folgt eine ähnlich große Zahl an Bestimmungsmethoden bzw. -reagenzien, da die meisten standardisierten Tests nur die Konzentration *einer* Substanz bestimmen können. Dies bewirkt einen hohen Zeit- und Kostenaufwand aufgrund der sequentiellen Abarbeitung der zu bestimmenden Parameter, der notwendigen Handhabung der Reagenzien, der Entsorgung der Reaktionsprodukte und ggf. der teilweise zeitraubender Aufbereitungsverfahren. Ein schnelles Verfahren zur gleichzeitigen Bestimmung mehrerer Analyte wäre also von großem Vorteil.

Viele optische Methoden sind auf ihr Potential zur Quantifizierung von Parametern wie Gesamtprotein, Humanserumalbumin, γ -Globulin, Glucose, Laktat, Triglyceride, Harnstoff und Cholesterin [Ber97, Dou96, Goe95, Hei02, Kan99, Kas04, Koo99, Li02, Liu02, Sch05, Qu01, Sap04, Sha00b] in den verschiedensten Körperflüssigkeiten wie z.B. Vollblut, Serum, Plasma, Urin und Fruchtwasser untersucht worden [Ene02, Hei98, Liu99, LY02, Sha00a, Von98, Wer98]. Insbesondere bieten sich in diesem Bereich aufgrund der hohen Selektivität Methoden aus der Schwingungsspektroskopie an, d.h. Mittelinfrarot- [Pet00, Sha00b], Nahinfrarot- [Haz98, Hei02] oder Raman-Spektroskopie [Ber97, Ber99, Kan99].

Einen ersten Schwerpunkt dieser Arbeit bildet die Raman-Spektroskopie als ein mögliches Verfahren für die simultane Quantifizierung mehrerer Analyte in Serum und Serumultrafiltrat. Dabei ist exemplarisch die Vorhersagegenauigkeit für acht häufig bestimmte Parameter der klinischen Chemie durch Aufnahme eines einzigen Raman-Spektrums pro untersuchter Probe bestimmt worden:



Abb. 1.1: Kommerziell erhältliches Blutzucker-Messgerät ACCU-CHEK® Compact von Roche Diagnostics¹, wie es von Diabetikern zur punktuellen Bestimmung der Glucosekonzentration im Blut verwendet wird. Die Stechhilfe rechts unten dient zur Gewinnung einer kleinen Menge an Kapillarblut aus dem Finger, die Trommel daneben enthält die Messstreifen mit Glucoseoxidase zur enzymatischen Reaktion mit Glucose.

Gesamtprotein, Glucose, Harnsäure, Harnstoff, Triglyceride, Cholesterin, HDL (High Density Lipoprotein) und LDL (Low Density Lipoprotein). Diese spielen in vielen Krankheitsbildern eine wichtige Rolle, z.B. bei der Diagnose von Diabetes mellitus, Lipidstoffwechselstörungen und Gicht [Psc02].

Ein zweiter Aspekt der vorliegenden Arbeit nutzt den reagenzfreien Charakter der Raman-Spektroskopie aus: Das Einbringen eines miniaturisierten, Raman-spektroskopischen Analysesystems in den Körper als Sonde für Metaboliten, insbesondere für Glucose, wäre so vorstellbar. Während reagenzbasierte, intrakorporale Glucosesensoren nur eingeschränkt biokompatibel sind und im Extremfall sogar toxische Komponenten enthalten [Man03, Man05], bietet ein reagenzfreier Glucosesensor eine konzeptionell deutlich verbesserte Biokompatibilität.

Die Bestimmung der Glucosekonzentration im Blut ist wichtig für Patienten, die an Diabetes mellitus, einer sehr verbreiteten Stoffwechselerkrankung, leiden. Da zudem ein Anstieg der an Diabetes Erkrankten von etwa 177 Millionen im Jahr 2001 [Int03] auf 366 Millionen weltweit im Jahr 2030 [Wor04] vorausgesagt wird, kommt der Glucosebestimmung umso mehr eine zunehmend wichtige Rolle zu.

Hervorstechendes Merkmal von Diabetes mellitus ist eine chronische Hyperglykämie, d.h. ein zu hoher „Zuckerspiegel“ im Blut. Dies wird durch eine zu geringe Ausschüttung und/oder eine verminderte Wirksamkeit des Hormons Insulin verursacht, welches in der Bauchspeicheldrüse produziert wird und den

¹ACCU-CHEK, GLUCO-QUANT und MODULAR sind Marken eines Unternehmens der Roche Gruppe.

Glucosehaushalt regelt. Diabetes mellitus wird in zwei Klassen eingeteilt: Mit Typ 1 („Jugenddiabetes“) wird jene Form bezeichnet, bei der Insulin, das die Zellen zur Aufnahme von Glucose stimuliert, nicht oder in nicht ausreichender Menge produziert wird. Dies kann z.B. durch eine Autoimmunreaktion des Körpers verursacht werden, bei der die Insulin-produzierenden β -Zellen in der Bauchspeicheldrüse zerstört werden. Unter Typ 2 („Altersdiabetes“) ist eine unzureichende Reaktion der Zellen auf Insulin zu verstehen, die sogenannte Insulinresistenz. Typisches Symptom ist daher auch eine Überproduktion an Insulin, die zu einer Erschöpfung der β -Zellen führen kann.²

Beide Typen von Diabetes erfordern u.U. eine Therapie mit Insulin, das dem Stoffwechsel von außen zugeführt werden muss. Um die richtige Insulinmenge zu wählen, ist eine vorherige Messung des Blutzuckerniveaus notwendig, die bequem mit kleinen Messgeräten vom Diabetiker selber vorgenommen werden kann. Ein Beispiel für einen solchen Glucosemonitor ist in Abb. 1.1 dargestellt. Mit der Stechhilfe wird ein Tropfen Kapillarblut aus der Fingerspitze gewonnen und auf einen Messstreifen, der z.B. das Enzym Glucoseoxidase enthält, aufgegeben. Anschließend wird im Messgerät die Blutzuckerkonzentration elektrochemisch oder photometrisch bestimmt. Für eine intensive Insulintherapie sollte der Diabetiker mehrmals täglich seinen Blutzuckerspiegel auf diese Art überprüfen. Eine enge Kontrolle führt zu einer Reduktion der möglichen Folgeschäden des Diabetes mellitus wie z.B. der Retinopathie und des sogenannten diabetischen Fußes.

Dass Hypo- und Hyperglykämien, also zu niedrige und zu hohe Blutzuckerkonzentrationen, dennoch nicht zu vermeiden sind, zeigt Abb. 1.2 [Kos02]. Hier ist der Verlauf der Blutzuckerkonzentration über drei Tage und Nächte eingezeichnet, welcher im Interstitium des Fettgewebes mit einem retrospektiv kalibrierten, elektrochemischen Sensor unter kontinuierlicher Probennahme gemessen worden ist. Die Punkte beschreiben die Kontrollmessungen, wie sie ein Diabetiker bisher selber vornimmt, z.B. mit dem in Abb. 1.1 gezeigten System. Trotz der guten Übereinstimmung der punktuellen Kontrollen des Diabetikers mit der kontinuierlichen Messung der Glucosekonzentration durchläuft er Zeiten zu hoher und zu niedriger Niveaus, die mit der punktuellen Messung unerkannt bleiben. Gerade nachts (grau schraffiert in Abb. 1.2) ist die Gefahr einer Hyper- oder Hypoglykämie am größten, daher kann ein kontinuierlicher Glucosemonitor die Situation von Diabetes mellitus-Patienten deutlich verbessern.

Aktuell erhältliche, kontinuierlich messende Systeme basieren auf enzymatischen Reaktionen mit Glucose außerhalb des Körpers (bei Mikrodialyse- oder Iontophorese-Systemen [Har03, Inn02, Jam02, Met02]). Dies begrenzt die Trage-

²Neuere Klassifizierungen gehen verstärkt zur Unterscheidung zwischen insulinpflichtigen und nicht-insulinpflichtigen Patienten mit Diabetes über.

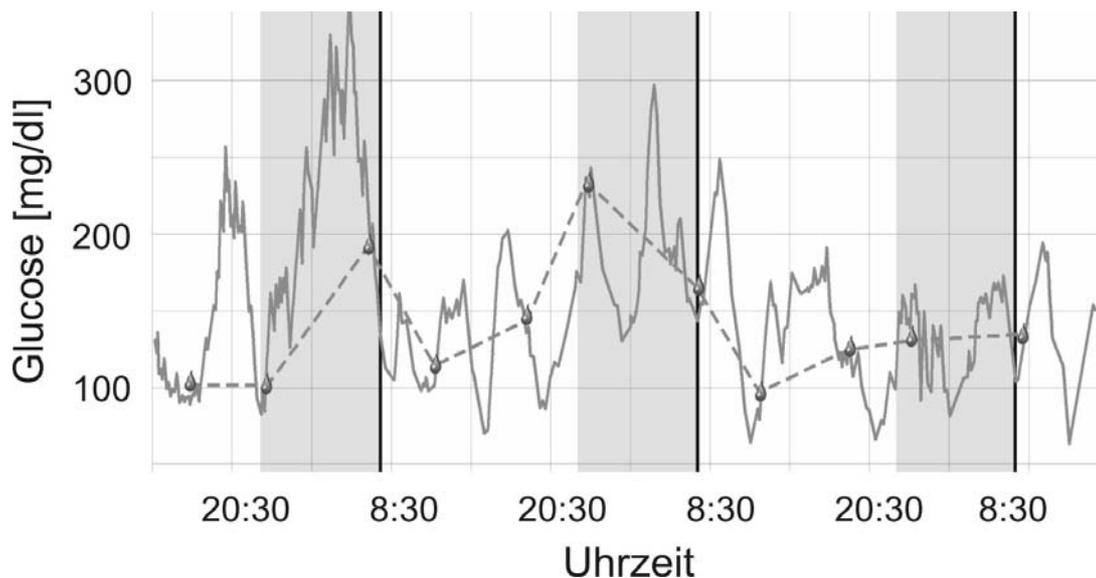


Abb. 1.2: Typischer Verlauf der Blutzuckerkonzentration über drei Tage und Nächte. Die durchgezogene Linie zeigt den Verlauf der Glucosekonzentration als Funktion der Tageszeit, welcher mit einem retrospektiv kalibrierten, elektrochemischen Sensor bestimmt worden ist. Im Gegensatz zu dieser kontinuierlichen Glucosebestimmung beschreiben die Punkte einzelne Messungen mit einem konventionellen Messgerät. (Die gestrichelte Linie dient zur Verdeutlichung der Unterschiede zwischen beiden Messverfahren [Kos02].)

zeit auf wenige Tage, da sich die benutzten Transportlösungen und das verwendete Enzym verbrauchen und ausgewechselt werden müssen. Ein physikalisches Messverfahren wie die Spektroskopie kommt ohne Verbrauchsmaterialien aus und ist in diesem Punkt somit nicht in der Tragedauer eingeschränkt. Zudem liefern die derzeitig erhältlichen Systeme zu ungenaue Werte und/oder sind im Dauerbetrieb zu unzuverlässig.

Zweiter Schwerpunkt dieser Arbeit ist daher die Fragestellung, wie die Raman-Spektroskopie als quantitatives Analyseverfahren so modifiziert werden kann, dass eine Messung von Körperflüssigkeiten nicht nur *in vitro*, sondern auch *in vivo* möglich wird. Untersuchungen mit nicht-invasiven Verfahren, die sich der Transmission durch [Haz98], der Reflexion an [Mar03b], der Absorption in [Ber99, Pet00] oder der Streuung von Licht in der Haut bedienen, scheitern meist an der Komplexität und mangelnden Homogenität der Haut. Daher sind in dieser Arbeit Grundlagen zur Vision eines minimal-invasiven Ansatzes untersucht worden, der eine Messung der Glucosekonzentration im subkutanen Fettgewebe mit Hilfe eines fasergestützten Sensors erlauben würde.

In Abb. 1.3 ist diese Vision eines möglichen, auf der Raman-Spektroskopie basierenden Messgerätes gezeigt.

Abb. 1.3: „Vision“ eines kontinuierlichen Monitors zur Ermittlung der Blutzuckerkonzentration mittels Raman-Spektroskopie und eines faser-gestützten, injizierbaren Sensors. Das von der Lichtquelle emittierte Licht wird über das Faserbündel zum Messort im Interstitium des subkutanen Fettgewebes transportiert, an dem der faser-gestützte Sensor Raman-gestreutes Licht mit hoher Effizienz sammelt. Das gestreute Licht wird nach Leitung durch das Faserbündel im Spektrometer spektral zerlegt und das Spektrum anschließend in der Basis-einheit ausgewertet. (Abb. entliehen aus [Wat97].)



1.2 Glucose als Modellanalyt

Der Zucker Glucose eignet sich in mehrfacher Hinsicht als Modellanalyt für eine Studie zur quantitativen Analyse von Molekülen in Flüssigkeiten mittels Raman-Spektroskopie: Zum einen stellt die korrekte Vorhersage der Glucosekonzentration in Körperflüssigkeit einen Interessenschwerpunkt in der Diagnose und Therapie von Patienten mit Diabetes Mellitus dar. Zweitens ist prinzipiell die Messbarkeit von Glucose mittels Raman-Spektroskopie in vielen Studien [Ber99, Haz98, Pet00, Sha00b] gezeigt. Eine offene Frage ist aber, ob die Genauigkeit dieser Messung so weit gesteigert werden kann, dass ein automatisches Messverfahren vorstellbar ist. Drittens verfügt Glucose über ein charakteristisches Raman-Spektrum mit einer Vielzahl an zuweisbaren Banden, die ein multivariates Analyseverfahren auf eine solide Basis stellen [Hen95]. Die Reproduzierbarkeit dieses Spektrums ist auch durch ein stabiles Gleichgewicht von α - zu β -D-Glucose in wässrigen Lösungen gewährleistet [Roe99]. Viertens ist Glucose aufgrund ihrer relativ geringen Größe und Komplexität (aus 24 Atomen gebildet, nur Kohlenstoff, Sauerstoff und Wasserstoff, $M_{Glucose} = 180,16 \text{ g/mol}$) ein Molekül, das auch auf einer theoretischen Basis – mit den Rechenverfahren der Quantenchemie, deren Genauigkeit mit zunehmender Komplexität des betrachteten Systems sinkt – zu plausiblen und realistischen Ergebnissen führt. Und fünftens ist Glucose – vermutlich aufgrund des großen Marktpotentials – mit zahlreichen verwandten Technologien, insbesondere der Infrarotspektroskopie, untersucht worden, so dass Vergleichsdaten vorliegen [Ber99, Haz98, Pet00,

Sha00b].

Der Name des in Abb. 1.4 dargestellten Moleküls lautet nach IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) D-Glucopyranose, wird im allgemeinen Sprachgebrauch aber mit D-Glucose oder Glucose abgekürzt, da die 5-Ring-Form (Furanose) der Glucose und die L-Glucose nur eine untergeordnete Rolle spielen [Roe99]. In Abb. 1.4 sind die drei in Lösung vorkommenden Strukturen α -, offenkettige und β -D-Glucose dargestellt. Glucose besteht aus sechs einfach gebundenen C-Atomen, von denen vier jeweils eine Hydroxy-Gruppe und ein Wasserstoff-Atom tragen. In der offenkettigen Form ist das C1-Atom Teil einer Aldehyd-Gruppe und C6 bindet ein zweites Wasserstoff-Atom. In der 6-Ring-Form binden die Moleküle C1 und C5 über das Sauerstoff-Atom des C5, wobei das frei werdende H-Atom an C1 bindet. α - und β -Form unterscheiden sich dann nur noch in der Stellung der OH-Gruppe am C1-Atom.

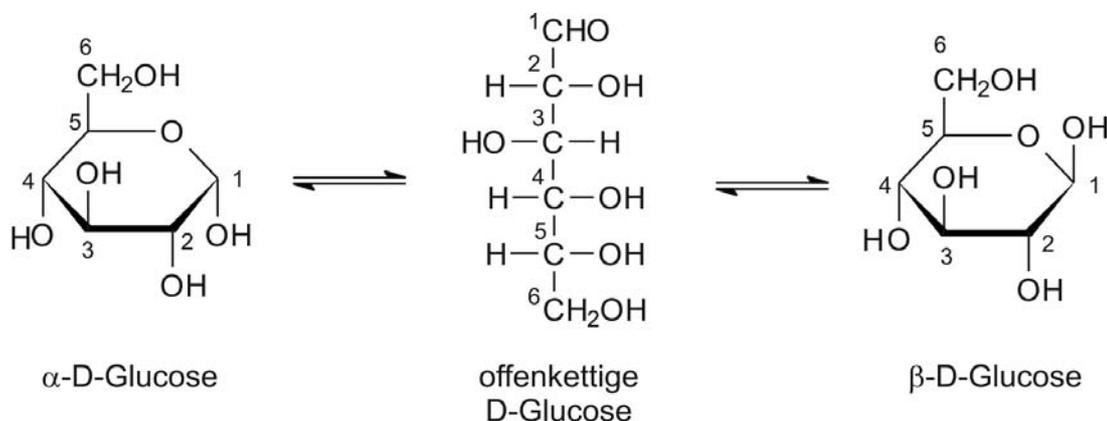


Abb. 1.4: Die drei Strukturformen der D-Glucose: In Lösung sind vor allen Dingen die beiden ringförmigen Strukturen von α - (36,5 %) und β -D-Glucose (63,6 %) vorhanden. Diese unterscheiden sich nur durch die Stellung der OH-Gruppe am Kohlenstoffatom C1.

In kristalliner Form tritt D-Glucose meist als Monohydrat der α -Form auf. In Lösung zeigt sie allerdings Mutarotation, da sich nach der Solvatisierung der α -D-Glucose durch Epimerisierung das oben genannte Gleichgewicht einstellt.

1.3 Der Raman-Streuprozess

Trifft ein Photon mit der Wellenlänge λ_{ex} und der damit verbundenen Energie E_{ex} auf ein Molekül, existieren verschiedene Möglichkeiten der Wechselwirkung:

Die am häufigsten auftretende ist im einfachsten Fall die Rayleigh-Streuung, bei der das Molekül durch die Energie des absorbierten Photons in einen virtuellen Zustand angeregt wird, der nach einer Lebensdauer von $\tau < 10^{-15}$ s wieder zerfällt und ein Photon mit der gleichen Energie E_{em} und Wellenlänge λ_{em} freisetzt (s. Abb. 1.5). Das Molekül befindet sich anschließend wieder im Ausgangszustand.

Während des Raman-Streuprozesses findet ebenfalls eine Anregung in einen vir-

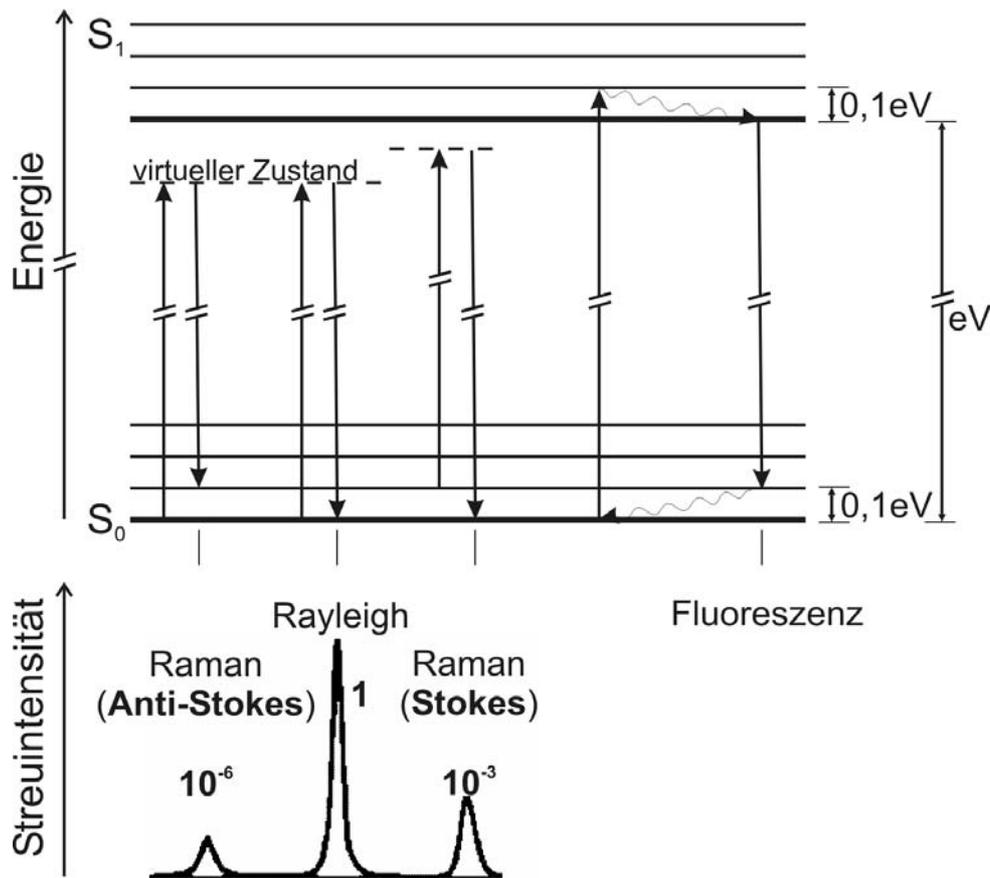


Abb. 1.5: Schematische Darstellung der elastischen und inelastischen Streuung von Licht an einem Molekül. Die elastische Streuung wird als Rayleigh-Streuung bezeichnet. Für Raman-Streuung erfolgt eine Anregung in einen virtuellen Zustand und ein schneller Zerfall ($< 10^{-15}$ s) zurück in ein Schwingungsniveau des Grundzustands. Die diskrete Energiedifferenz zwischen Ausgangs- und Zielniveau wird im Raman-Spektrum als schmalbandiger Peak beobachtet und das Vorzeichen bestimmt, ob ein Stokes-Raman- oder ein Anti-Stokes-Raman-Photon ausgesandt wird. Die Streuintensität der Rayleigh- und Raman-Streuung ist schematisch im unteren Teil gezeigt. Bei der Fluoreszenz, einem mit der Raman-Streuung konkurrierenden Prozess, erfolgt ein Übergang in einen angeregten Zustand, aus dem das Molekül durch eine Folge von strahlungslosen und strahlenden Prozessen in den Grundzustand zurück kehrt.

tuellen Zustand statt. Im Unterschied zur Rayleigh-Streuung kehrt das Molekül bei der Emission des Photons aber nicht in das gleiche Schwingungsniveau des Ausgangszustand zurück, sondern nimmt ein anderes, durch eine andere Schwingungsmoden gekennzeichnetes Niveau ein. In der klassischen Beschreibung des Raman-Effekts [Hak98] wird dies durch die Anregung eines induzierten Dipols $\vec{\mu}_{ind}$ im Molekül durch das elektrische Feld \vec{E} des einfallenden Photons erklärt:

$$\vec{\mu}_{ind} = \alpha \vec{E}. \quad (1.1)$$

Dabei ist α der sogenannte Polarisierbarkeitstensor, der die für die Raman-Streuung spezifischen, molekularen Eigenschaften beschreibt.

Durch die Änderung der Schwingungsmoden des Moleküls entsteht eine Energiedifferenz zwischen absorbiertem und emittiertem Photon, die nach

$$E_{vib} = E_{ex} - E_{em} \quad (1.2)$$

berechnet werden kann. Für positive Differenzen wird der Streuprozess als Stokes-Raman-Streuung bezeichnet, bei negativem Vorzeichen als Anti-Stokes-Raman-Streuung. Da sowohl Anregung als auch Emission direkte Übergänge zwischen diskreten Schwingungsniveaus und dem virtuellen Zustand darstellen, kann nach

$$\bar{\nu}_{vib} = \frac{1}{\lambda_{ex}} - \frac{1}{\lambda_{em}} \quad (1.3)$$

die zum Übergang vom Ausgangs- ins Endniveau des elektronischen Zustands gehörende Wellenzahl $\bar{\nu}_{vib}$ berechnet werden. Nach Gl. 1.3 wird Stokes-Streuprozessen ein positiver Wert der Wellenzahl zugeordnet, für Antistokes-Prozesse ist die Wellenzahl negativ. Bei Auftragung der Häufigkeit der Streuprozesse als Funktion ihrer zugehörigen Wellenzahl entsteht so ein Raman-Spektrum der untersuchten Substanz. Bei Untersuchung einer *reinen* Substanz, weist das Spektrum charakteristische Peaks und Banden mit reproduzierbaren Intensitäten bei Wellenzahlen auf, die eindeutig Schwingungsübergängen und damit Schwingungsmoden im Molekül zugeordnet werden können. Daher kann das Raman-Spektrum eines Moleküls auch als sein Fingerabdruck betrachtet werden. Die Lage der Banden dient zur Identifikation, die Intensität kann zur Berechnung der Konzentration in Lösungen herangezogen werden. Im Spektrum eines Gemischs aus mehreren Analyten sind unter der Annahme, dass die Moleküle nicht miteinander wechselwirken, die Einzelspektren der Moleküle gewichtet mit ihrer Konzentration linear kombiniert. Diese Überlagerung von Raman-Banden *verschiedener* Moleküle ist einer der Störfaktoren in der quantitativen Analyse, da die Konzentration einer speziellen Substanz im Prinzip aus der Intensität in den zugehörigen charakteristischen Wellenzahlbereichen vorhergesagt wird, die auch