

Anwendung moderner Auswerteverfahren in der  
Chemometrie und Geostatistik, Definition von Kenngrößen  
von Bioanalytsystemen und Charakterisierung eines Mach-  
Zehnder-Interferometers für die Bioanalytik

DISSERTATION

der Fakultät für Chemie und Pharmazie  
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines Doktors  
der Naturwissenschaften

2008

vorgelegt von

Thorsten Laib

Tag der mündlichen Prüfung: 17.06.2008

Dekan: Prof. Dr. Lars Wesemann

1. Berichterstatter: Herr Prof. Dr. Günter Gauglitz

2. Berichterstatter: Herr Prof. Dr. Heinz Oberhammer

## **Danksagung**

Herrn Prof. Dr. Günter Gauglitz danke ich für seine wertvollen Anregungen, seinem stetigen Interesse und seiner Unterstützung für diese Arbeit.

Meinen Kolleginnen und Kollegen danke ich für die aktive Mitarbeit und die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Insbesondere möchte ich Herrn Dr. Dipl.-phys. Rüdiger Frank für die Einweisung und Betreuung in das Mach-Zehnder-Interferometer, Frau Dr. Dipl.-Chem. Nina D. Käppel und Frau Dipl.-Chem. Christiane Albrecht für die Bereitstellung der TIRF-Messungen, Frau Dipl.-Chem. Stefanie Jäger und Frau Dipl.-Chem. Nina Schweizer für die Mithilfe bei den MIPs- Messungen, Herrn Dr. Dipl.- Chem. Stefan Busche für die Mitarbeit im AquaTerra-Projekt, Herrn Dipl.-Chem. Florian Pröll und Herrn Dipl.-Chem. Lutz Steinle für die Mitarbeit am Mach-Zehnder-Versuchsaufbau und Herrn Dr. Dipl.-Biol. techn. Günther Proll für seine wertvollen Hinweise.

Bei den AquaTerra-Projektpartnern möchte ich mich für die Bereitstellung der Daten bedanken. Insbesondere möchte ich mich bei Herrn PD Dr. Dipl.-Hydageol. Johannes Barth für seine stetige Unterstützung im AquaTerra-Projekt und bei Herrn Dr. Dipl.-Geol. Claudius Bürger für seine wertvollen Hinweise bedanken.

Bei den MENDOS-Projektpartnern möchte ich mich für ihre Kooperation und Unterstützung bedanken, insbesondere Herrn Dr. R.G.Heideman von der Firma LioniX BV und Herrn Prof. Dr. P.V.Lambeck von der Firma Optisense für die Bereitstellung der Mach-Zehnder- Interferometer-Chips.

Herrn Prof. Dr. Heinz Oberhammer danke ich für die Übernahme des Koreferats.

Nicht zuletzt danke ich meine Eltern und Verwandten, insbesondere meiner Großmutter, für ihre fortwährende Unterstützung in jeder Hinsicht.

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	<b>6</b>
<b>2. Grundlagen</b>	<b>6</b>
2.1 Evaneszentes Feld	6
2.2 Wellenleiter	8
2.3 TIRF	12
2.4 Mach-Zehnder-Interferometer	12
2.5 Molekular geprägte Polymere	20
2.6 Schadstoffe	20
2.7 Reaktionskinetik und Hook-Effekt bei Bindungshemmtests	20
2.8 Kenngrößen eines Messverfahrens	21
2.8.1 Reproduzierbarkeit	22
2.8.2 Präzision	22
2.8.3 Beurteilung der Qualität der einzelnen Messwerte mithilfe des Informationsmaßes	23
2.8.4 Statistische Verteilung der Konzentrationswerte für Kalibrierproben	23
2.8.5 Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze	24
2.9 Anwendung chemometrischer Methoden in der Geologie	31
2.9.1 Allgemeine Problemstellung	31
2.9.2 Interpolationsmethoden räumlich verteilter Daten	31
2.9.2.1 Kriging	32
2.9.2.2 Support Vector Machines (SVM)	32
2.9.2.3 Continuous Global Surfaces (CGS)	33
2.9.3 Zeitreihenanalyse	35
2.9.3.1 Backpropagation-Netz	36
2.9.3.2 Elman-Netz	36
2.9.4 Korrelationsanalyse	37
<b>3. Methoden</b>	<b>38</b>
3.1 Messgeräte und –aufbauten	38
3.1.1 Aufbau des TIRF-Messgerätes	38
3.1.2 Messaufbau des Mach-Zehnder-Interferometers	38
3.1.3 Geräte zur Präparation der Mach-Zehnder-Chips	41
3.1.4 Einbau der Chips in den Messaufbau	42
3.1.5 Präparation der Fluidik	44
3.1.6 Oberflächenpräparation der Chips	44
3.2 Weitere statistische Methoden	45
3.2.1 Auswertung der Messungen	45
3.2.2 Kalibriermethoden	45
3.2.2.1 Kalibrierung mit logistischen Kurven	45
3.2.2.2 Kalibrierung mit Support Vector Regression-Methoden	47

3.2.2.2.1	Lineares Regressionsproblem im höherdimensionalen Raum	47
3.2.2.2.2	Kerne	50
3.2.2.2.3	Muentz-Theorem	51
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion</b>	<b>51</b>
4.1	Mach-Zehnder-Interferometer	51
4.1.1	Messungen zum Testaufbau	51
4.1.1.1	Dunkelstrom der Photodiode	51
4.1.1.2	Stabilität des Laserlichts	53
4.1.1.3	Temperaturabhängigkeit der Intensität	54
4.1.2	Reproduzierbarkeits- und Kalibriermessungen	54
4.1.2.1	Reproduzierbarkeitsmessung mit Atrazincapronsäure	54
4.1.2.2	Reproduzierbarkeitsmessung mit molekular geprägten Polymeren	54
4.1.2.3	Messung der Kalibrierkurve mit Atrazincapronsäure	57
4.2	TIRF	63
4.2.1	Ergebnisse der Kalibriermessungen mit TIRF	63
4.2.1.1	Parameter der Interpolationskurven f. d. Distanzmaße ABS und RMSE	67
4.2.1.2	Auswertung der Messungen	68
4.2.1.3	Nachweisgrenzen für TIRF-Messungen	68
4.2.1.4	Informationstheoretischer Ansatz zur Bestimmung der Kenngrößen	70
4.2.1.5	Kalibriermethode bei Auftreten des Hook-Effekts	70
4.2.1.6	Auswirkungen der verschiedenen Probenverteilungen auf die Parameter der Kalibrierkurven	72
4.3	Anwendung chemometrischer Methoden in der Geostatistik	73
4.3.1	Anwendung der CGS-Interpolation auf Donau-Messwerte	73
4.3.2	Anwendung der Zeitreihenvorhersage bei Donau-Daten	74
4.3.3	Anwendung der Korrelationsanalyse bei Donau-Daten	79
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>82</b>
<b>6.</b>	<b>Literatur</b>	<b>83</b>

## **1. Einleitung**

Das Ziel dieser Arbeit ist die Bestimmung der Konzentration von Schadstoffen im Trinkwasser und die Demonstration von neuen Interpolationsmethoden und neue Methoden zur Zeitreihenanalyse für geostatistische Anwendungen unter Verwendung von Messdaten aus dem AquaTerra-Projekt. Zur Bestimmung der Schadstoffe wurde ein integriert optisches Mach-Zehnder-Interferometer sowie ein TIRF-Messgerät verwendet. Anhand von Kalibriermessungen wurden die charakteristischen Kenngrößen wie Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze, Reproduzierbarkeit, sowie Wiederfindungsrate und Präzision bestimmt.

Desweiteren wurden die verschiedenen Methoden zur Definition dieser Kenngrößen bei nichtlinearen Kalibrierkurven sowie Ansätze zur Kalibrierung bei Auftreten des Hook-Effekts näher beleuchtet.

Für die Messung mit molekular geprägten Polymeren wurde ebenfalls Atrazin als Analyt verwendet. Diese Messungen stammen aus dem EU-Projekt MENDOS. Die molekular geprägten Polymere wurden von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. K. Haupt von der Universität Lund, Schweden zur Verfügung gestellt.

Ziel des MENDOS-Projektes war es, einen auf molekular geprägten polymeren basierenden Sensor zu entwickeln, der die Detektion von EDCs in der Umwelt ermöglicht. Das Projekt hatte eine Laufzeit von 3 Jahren und umfasste die Beteiligung von zehn Projektpartnern europaweit.

Die TIRF-Messungen wurden für Progesteron in verschiedenen Matrizen und für TNF- $\alpha$  sowie für PSA durchgeführt. Ersteres ist ein Hormon, das beim Menstruationszyklus eine entscheidende Rolle spielt. Letztere sind Eiweißstoffe, welche bei der Signalübertragung eine entscheidende Rolle spielen. Diese Messungen wurden im Rahmen des CASCADE- und eines Projektes zur Kontrolle der Milchqualität durchgeführt.

Das CASCADE-Projekt dient zur Entwicklung eines Sensors zur Detektion von Schadstoffen in Nahrungsmitteln. Es umfasst 40 Projektpartner europaweit.

Die hier betrachteten geostatistischen Messungen wurden im Rahmen des AquaTerra-Projektes von der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Wolfgang Ahlf an der Technischen Universität Hamburg Harburg und in der Arbeitsgruppe um Herrn Prof. J. Slobodnik an der Universität Prag durchgeführt. Das Aquaterra-Projekt dient der Evaluation von Methoden zur Überwachung der Wasserqualität. Es umfasst 50 Projektpartner europaweit.

Die TIRF-Messungen wurden von Frau Dr. Dipl.-Chem. Nina D. Käppel und Frau Dipl.-Chem. Christiane Albrecht durchgeführt.

## **2. Grundlagen**

### **2.1 Evaneszentes Feld**

## Messprinzip über evaneszentes Feld

Die elektromagnetischen Felder enden nicht an der Begrenzung des Wellenleiters, wie man an den Gleichungen unter 2.1.1 erkennen kann, sondern dringen in das den Wellenleiter begrenzende Medium ein [4][5][6]. Diesen Effekt bezeichnet man als Goos-Hänchen-Shift. Die Feldstärke nimmt dabei exponentiell innerhalb des angrenzenden Mediums ab. Die Eindringtiefe ist dabei grob durch 2-3 Wellenlängen gegeben.

Aufgrund dieses Feldanteils im angrenzenden optischen Medium können Änderungen im Brechungsindex des angrenzenden Mediums durch eine Änderung der Ausbreitungsgeschwindigkeit der elektromagnetischen Welle im Wellenleiter gemessen werden. Dies kann formal durch die Berechnung des effektiven Brechungsindex aus den Brechungsindizes der einzelnen Schichten des Wellenleiters geschehen. Die Berechnung kann über folgende Formel geschehen:

$$(1) \quad n_{eff} = \frac{\beta}{k_0} = n_2 \sin \Theta_2$$

Das evaneszente Feld in der Umgebung des Wellenleiters ergibt sich aus den Maxwellgleichungen und den Randbedingungen im Wellenleiter wie folgt:

TE-Moden:

$$(2) \quad E_y = \begin{cases} A \exp(-rx) & \text{für } x \geq 0 \\ A \cos qx + B \sin qx & \text{für } 0 \geq x \geq -2a \\ (A \cos 2aq - B \sin 2aq) \exp[p(x+2a)] & \text{für } -2a \geq x \end{cases}$$

und

$$(3) \quad H_y = \frac{-i}{\omega \mu_0} \begin{cases} -A \exp(-rx) & \text{für } x \geq 0 \\ -q(-A \sin qx + B \cos qx) & \text{für } 0 \geq x \geq -2a \\ p(A \cos 2aq - B \sin 2aq) \exp[p(x+2a)] & \text{für } -2a \geq x \end{cases}$$

Die Größen  $p, q$  und  $r$  sind dabei durch die folgenden Beziehungen definiert:

$$(4) \quad q^2 = n_1^2 k^2 - \beta^2$$

$$(5) \quad p^2 = \beta^2 - n_2^2 k^2$$

$$(6) \quad r^2 = \beta^2 - n_3^2 k^2$$

Die Modengleichung für diesen Fall ist durch folgende Beziehung gegeben:

$$(7) \quad \tan(2aq) = \frac{q(p+r)}{q^2 - pr}$$

TM-Moden

$$(8) \quad H_y = \begin{cases} C \exp(-rx) & \text{für } x \geq 0 \\ C \cos(qx) + D \sin(qx) & \text{für } 0 \geq x \geq -2a \\ (C \cos 2aq - D \sin 2aq) \exp[p(x+2a)] & \text{für } -2a \geq x \end{cases}$$

und

$$(9) \quad E_z = \frac{-i}{\omega\mu_0} \begin{cases} -\frac{rC}{n_0^2} \exp(-rx) & \text{für } x \geq 0 \\ \frac{q}{n_0^2} (-C \sin qx + D \cos qx) & \text{für } 0 \geq x \geq -2a \\ \frac{p}{n_0^2} (A \cos 2aq - B \sin 2aq) \exp[p(x + 2a)] & \text{für } -2a \geq x \end{cases}$$

Da das evaneszente Feld die Beschichtung des Wellenleiters durchdringt, bewirkt eine Änderung des Brechungsindex dieser Schicht eine Änderung des effektiven Brechungsindex des Wellenleiters. Die veränderte Geschwindigkeit der geführten Mode bewirkt eine Phasenverschiebung der beiden Wellen in beiden Armen des Interferometers. Ferner bewirkt die Änderung des effektiven Brechungsindex in der sensitiven Schicht eine direkte Änderung der Phase der Welle beim Durchtritt.

## 2.2 Wellenleiter

Das einfachste Bauelement der integrierten Optik ist der Wellenleiter[4][5]. Diese bestehen aus mehreren Schichten mit unterschiedlichem Brechungsindex. Diese Schichten sind so angeordnet, dass eine einfallende Welle geeigneter Wellenlänge und Polarisation im Wellenleiter geführt wird. Es gibt mehrere Arten von Wellenleitern: Schichtwellenleiter, Schichtwellenleiter mit stufenförmigem Brechungsindexprofil, Schichtwellenleiter mit beliebigem Brechungsindexprofil, Mehrschichtwellenleiter, Streifenwellenleiter und kreiszylindrische Wellenleiter. Die Schichten des Wellenleiters können sowohl aus dielektrischem wie auch aus leitendem Material bestehen.

Die Beschreibung der Ausbreitung des Lichtes in einem Wellenleiter kann über die Maxwell'schen Gleichungen und die Materialgleichungen erfolgen.

$$(10) \quad \nabla \times \vec{E}(\vec{r}, t) = -\frac{\partial \vec{B}}{\partial t}(\vec{r}, t)$$

$$(11) \quad \nabla \times \vec{H}(\vec{r}, t) = \frac{\partial \vec{D}}{\partial t}(\vec{r}, t) + \vec{j}(\vec{r}, t)$$

$$(12) \quad \nabla \cdot \vec{D}(\vec{r}, t) = \rho(\vec{r}, t)$$

$$(13) \quad \nabla \cdot \vec{B}(\vec{r}, t) = 0$$

$$(14) \quad \vec{D}(\vec{r}, t) = \epsilon_0 \vec{E}(\vec{r}, t) + \vec{P}(\vec{r}, t)$$

$$(15) \quad \vec{H}(\vec{r}, t) = \mu_0^{-1} \vec{B}(\vec{r}, t) - \vec{M}(\vec{r}, t)$$



Diese müssen für die Randbedingungen gelöst werden, wie sie in einem Wellenleiter des Mach-Zehnder-Interferometers vorliegen. Bei den Wellenleitern im hier verwendeten Interferometer handelt es sich um einen durch die Diffusionstechnik hergestellten Schichtwellenleiter in Siliziumnitrid.

Allgemein ergeben sich in der integrierten Optik fünf verschiedene Fälle bei den Materialgleichungen. In den meisten Fällen werden dia-oder paramagnetische Materialien verwendet. In diesen ist die magnetische Permeabilität zeitlich und räumlich konstant. Aus den obigen Gleichungen ergibt sich dann:

$$(16) \quad \sum_{k=1}^3 \frac{\partial^2 E_k}{\partial x_k \partial x_j} - \frac{\partial^2 E_j}{\partial x_k^2} = -\mu_0 \sum_{k=1}^3 (\varepsilon_{jk} \ddot{E}_k + \sigma_{jk} \dot{E}_k) \quad j = 1, \dots, 3$$

Eine weitere Spezialisierung dieser Gleichungen ergibt sich, wenn räumlich inhomogene dielektrisch isotrope und isotrop leitfähige Medien betrachtet werden. Es ergibt sich dann folgendes Gleichungssystem:

$$(17) \quad \nabla^2 \vec{E} + \nabla \left\{ \frac{\nabla \varepsilon(\vec{r})}{\varepsilon(\vec{r})} \vec{E} \right\} = \mu_0 \varepsilon(\vec{r}) \ddot{\vec{E}} + \mu_0 \sigma(\vec{r}) \dot{\vec{E}}$$

Für dielektrisch und leitfähig homogene und isotrope Materialien gilt:  $\vec{\sigma} = \sigma, \vec{\varepsilon} = \varepsilon$ . Somit erhält man folgende Gleichungen:

$$(18) \quad \nabla^2 \vec{E} = \mu_0 \varepsilon \ddot{\vec{E}} + \mu_0 \sigma \dot{\vec{E}}$$

Falls dielektrisch anisotrope, homogene Medien mit homogener isotroper Leitfähigkeit eingesetzt werden, so erhält man:

$$(19) \quad \sum_{k=1}^3 \frac{\partial^2 E_k}{\partial x_k \partial x_j} - \frac{\partial^2 E_j}{\partial x_k^2} = -\mu_0 \sum_{k=1}^3 \varepsilon_{jk} \ddot{E}_k - \mu_0 \sigma \dot{E}_j \quad j = 1, \dots, 3$$

Werden magneto-optisch anisotrope bzw. dielektrisch anisotrope Medien eingesetzt, so kann man häufig das Koordinatensystem so wählen, dass dieser Fall auf einen der obigen zurückgeführt werden kann.

Da Wellenleiter eine Symmetrieachse besitzen, werden die obigen Gleichungen in kartesischen oder in Zylinderkoordinaten gelöst. Wird die Ausbreitungsrichtung parallel zur Symmetrieachse gewählt und diese parallel zur z-Achse, so kann man die Feldvektoren in einen Anteil parallel zur z-Achse und einen senkrecht dazu zerlegen:

$$(20) \quad \vec{E} = \vec{E}_t + \vec{E}_z, \vec{H} = \vec{H}_t + \vec{H}_z$$

Damit müssen die obigen Gleichungen nur noch für die z-Komponente gelöst werden. Die andere Komponente kann dann aus den Maxwell'schen Gleichungen berechnet werden.

Aus dem sich ergebenden Gleichungssystem ergeben sich mehrere Lösungen für die Ausbreitung elektromagnetischer Wellen in einem Wellenleiter. Die Lösungen dieses Gleichungssystems bezeichnet man als Ausbreitungsmoden des Lichtes. Es gibt folgende Grundlösungen:

$$(21) \quad \vec{E}(x, y, z) = \vec{E}_{pq}(x, y) \exp(-i\beta_{pq}z)$$

$$(22) \quad \vec{H}(x, y, z) = \vec{H}_{pq}(x, y) \exp(-i\beta_{pq}z)$$

Die Größe  $\beta$  lässt sich aus der Dispersionsrelation berechnen. Diese lautet:

$$(23) \quad \tan(ud - N\pi) = \frac{q_2 u (q_1 v + q_3 w)}{q_2^2 u^2 - q_1 q_3 v w}$$

Anschaulich beschreiben diese Grundlösungen Ausbreitungsmoden des Lichts. Bei der TE-Mode steht dabei der elektrische Feldvektor des Lichts senkrecht zur Ausbreitungsrichtung des Lichtes, d.h. es liegt eine lineare Polarisierung vor. Bei der TM-Mode des Lichts ist der elektrische Feldvektor parallel zur Ausbreitung des Lichts, es herrscht also zirkuläre Polarisierung vor.

Allgemein können alle Lösungen der obigen Gleichungen als Superposition von diesen diskreten Moden und kontinuierlichen Moden, den sogenannten Strahlungsmoden dargestellt werden:

$$(24) \quad \vec{E}(x, y) = \sum_p \sum_q a_{pq} \vec{E}_{pq}(x, y) + \iint_0^\infty dp dq a(p, q) \vec{E}(p, q; x, y)$$

$$(25) \quad \vec{H}(x, y) = \sum_p \sum_q a_{pq} \vec{H}_{pq}(x, y) + \iint_0^\infty dp dq a(p, q) \vec{H}(p, q; x, y)$$

Da die diskreten Moden und die Strahlungsmoden untereinander ein vollständiges orthonormales System bilden, können die Entwicklungskoeffizienten entsprechend folgenden Beziehungen berechnet werden:

$$(26) \quad a_{pq} = \frac{1}{2} \iint_{-\infty}^{\infty} dx dy (\vec{E} \times \vec{H}_{pq}^*) = \frac{1}{2} \iint_{-\infty}^{\infty} dx dy (\vec{E}_{pq}^* \times \vec{H})$$

$$(27) \quad a(p, q) = \frac{1}{2} \iint_{-\infty}^{\infty} dx dy (\vec{E} \times \vec{H}^*(p, q)) = \frac{1}{2} \iint_{-\infty}^{\infty} dx dy (\vec{E}^*(p, q) \times \vec{H})$$

Die im Mittel transportierte Leistung kann mithilfe des Poynting-Vektors berechnet werden. Aus den Amplituden ergibt sich die Leistung wie folgt:

$$(28) \quad P = \sum_p \sum_q a_{pq} a_{pq}^* + \iint_0^\infty dpdq a(p, q) a^*(p, q)$$

Sehr viele Probleme der integrierten Optik beruhen auf der Kopplung verschiedener Moden. Diese Kopplung kommt durch den Einfluss einer Mode auf die Polarisation zustande. Das beeinflusst wiederum die Ausbreitung der anderen Moden. Ausgangspunkt sind die Maxwellgleichungen für beide Moden mit der jeweiligen Polarisation:

$$(29) \quad \nabla \times \vec{E} = -i\omega\mu_0\vec{H}$$

$$(30) \quad \nabla \times \vec{H} = i\omega\varepsilon\vec{E} + i\omega\vec{P}$$

Skalare Multiplikation dieser Gleichungen mit dem jeweiligen anderen Feld, Subtraktion und Umformung ergibt folgende Gleichungen

$$(31) \quad \nabla(\vec{E}_1 \times \vec{H}_2^*) = i\omega(\varepsilon\vec{E}_1\vec{E}_2^* - \mu_0\vec{H}_1H_2^*) + i\omega\vec{E}_1\vec{P}_2^*$$

$$(32) \quad \nabla(\vec{E}_2^* \times \vec{H}_1) = -i\omega(\varepsilon\vec{E}_1\vec{E}_2^* - \mu_0\vec{H}_1H_2^*) - i\omega\vec{E}_2^*\vec{P}_1$$

Addition der beiden Gleichungen führt auf:

$$(33) \quad \nabla\{(\vec{E}_1 \times \vec{H}_2^*) + (\vec{E}_2^* \times \vec{H}_1)\} = -i\omega(\vec{P}_1\vec{E}_2^* - \vec{E}_1\vec{P}_2^*)$$

Mit der Abkürzung

$$(34) \quad \vec{g} = (\vec{E}_1 \times \vec{H}_2^*) + (\vec{E}_2^* \times \vec{H}_1), \vec{g} = (\vec{g}_t, g_z)$$

und der Integration über den Wellenleiterquerschnitt erhält man:

$$(35) \quad \iint_{-\infty}^{\infty} dx dy \nabla \vec{g} = -i\omega \iint_{-\infty}^{\infty} dx dy \vec{P} \vec{E}_2^*$$

Mithilfe des Satzes von Gauß und der Zerlegung von  $g$  in transversale und longitudinale Komponenten kann die Integration z.T. ausgeführt werden. Das entstehende Linienintegral verschwindet, da die Integration über eine Kurve mit beliebig großem Radius durchgeführt werden kann und das geführte zweite Feld exponentiell abfällt. Somit ergibt sich:

$$(36) \quad \iint_{-\infty}^{\infty} dx dy \frac{\partial}{\partial z} \vec{g}_z = -i\omega \iint_{-\infty}^{\infty} dx dy \vec{P} \vec{E}_2^*$$

Entwickelt man das erste Feld nach Moden und das zweite Feld nach einer in positiver z-Richtung verlaufenden Mode, ergibt sich folgende Beziehung für die Entwicklungskoeffizienten:

$$(37) \quad \frac{\partial a_{pq}(z)}{\partial z} + i\beta_{pq} a_{pq}(z) = -\frac{i\omega}{4} \iint_{-\infty}^{\infty} dx dy \vec{P} \vec{E}_{pq}^*$$

Die Verluste in Wellenleitern erfolgt im Wesentlichen auf zwei verschiedene Arten, den Absorptionsverlusten und den Verlusten durch Modenkopplung. Absorptionsverluste in Wellenleitern werden durch den Imaginärteil in der komplexen Dielektrizitätskonstante beschrieben:

$$(38) \quad \varepsilon = \varepsilon' + i(\varepsilon'' + \frac{\sigma}{\omega})$$

Die Ursache für diese Verluste sind Intraband -und Interband-Übergänge im Festkörper, die Anregung von Phononen und die Absorption durch Verunreinigungen und Eigendefekte, wie z.B. Farbzentren. Die Verluste durch Streuung kann auch als eine Kopplung von den geführten Moden mit den Strahlungsmoden beschrieben werden. Dabei ist es sinnvoll, zwischen der Volumen- und der Oberflächenstreuung zu unterscheiden. Die Beschreibung kann schon mithilfe der einfachen Lorentz-Lorenz-Theorie erfolgen. Der Brechungsindex des Festkörpers nach dieser Theorie kann aus der Polarisierbarkeit und der Teilchendichte der einzelnen Komponenten wie folgt berechnet werden:

$$(39) \quad \frac{\varepsilon' - 1}{\varepsilon' + 2} = \frac{n^2 - 1}{n^2 + 2} = \frac{1}{3\varepsilon_0} \sum_j \bar{N}_j \tilde{\alpha}_j$$

Somit bewirken Materialinhomogenitäten Brechungsindexinhomogenitäten, welche wiederum als Streuzentren im Material wirken. Durch Anregung von Strahlungsmoden an Ober- und Grenzflächeninhomogenitäten tritt Oberflächenstreuung auf. Der entsprechende Dämpfungskoeffizient ist proportional zu dem Quadrat des Verhältnisses von Rautiefe und Wellenlänge, er ist umgekehrt proportional zu der effektiven Dicke der wellenleitenden Schicht und nimmt zu mit steigender Modennummer.

### 2.3 TIRF

Funktionsweise des TIRF-Messgeräts

Das Funktionsprinzip des TIRF-Messgeräts besteht darin, fluoreszenzmarkierte Antikörper mithilfe des evaneszenten Feldes auf der Oberfläche eines Wellenleiters anzuregen. Die an die Oberfläche gebundenen Antikörper werden zur Fluoreszenz angeregt. Das TIRF-Gerät registriert die Fluoreszenzanregung in den sensitiven Schichten durch die Anbindung und Anregung der fluoreszenzmarkierten Antikörper. Bei den hier vorliegenden Wellenleitern handelt es sich um in BK7-Glas eingeprägte monomodige integriert optische Wellenleiter, welche die niedrigste TE-Mode leiten.

Im Einzelnen hat der verwendete Transducer Wellenleiter, die sich in mehrere Wellenleiter mit verschiedenen Messfenstern mit den oben beschriebenen Verzweigern aufteilen. Der Aufbau ist temperaturstabilisiert.

Die Beschichtung der einzelnen Messfenster erfolgt mittels des TopSpot® - Gerätes. Dazu wurde eine seit langem bewährte Vorgehensweise verwendet, welche in [117] beschrieben ist.

### 2.4 Mach-Zehnder-Interferometer

Funktionsweise des passiven Mach-Zehnder-Interferometers

Das Mach-Zehnder-Interferometer kann auf verschiedene Arten mit Wellenleitern realisiert werden[4][33][44][45][46]. So kann man zwei Wellenleiter parallel auf einem Chip aufbringen und

diese dann jeweils an beiden Enden über das evaneszente Feld an einen Wellenleiter zur Ein- bzw. Auskopplung koppeln [47][48][49][50][51]. Eine andere Bauform verwendet Y-Verzweiger [52][53][54][55][56][57][58][116]. Dabei handelt es sich um eine Y-förmige Gabel aus Wellenleitern. Das Feld des Lichtes wird an der Verzweigung aufgespalten. Beide Teilstrahlen werden in jeweils einem Wellenleiter separat geführt. Am anderen Ende werden ebenfalls über einen Y-Verzweiger wieder beide Teilstrahlen zu einem Strahl zusammengeführt. Dort interferieren beide Teilstrahlen miteinander. Je nach relativer Phasenverschiebung der beiden Teilstrahlen wird ein Teil der resultierenden Welle als TE-/TM-Mode in den Wellenleiter des Y-Verzweigers eingekoppelt und ein Teil wird als Strahlungsmode in den umgebenden Raum abgestrahlt.

Bei dem hier verwendeten Mach-Zehnder-Interferometer handelt es sich um die Ausführungsform mit zwei Y-Verzweigern. Die beiden Wellenleiter für die Teilstrahlen sind die Interferometerarme des Mach-Zehnder-Interferometers. Zur Verwendung als Sensor wird einer der Arme mit einer sensitiven Schicht beschichtet. Der andere Arm dient als Referenzarm. Er wird nicht oder nur mit einer unspezifischen Schicht beschichtet. Reagiert die sensitive Schicht mit dem Analyten, so bewirkt dies eine Änderung des effektiven Brechungsindex im sensitiven Arm. Der Referenzarm reagiert mit Analyten nicht oder nur unspezifisch. Somit ergibt sich für beide Arme eine unterschiedliche Änderung des effektiven Brechungsindex. Somit ist auch die Lichtgeschwindigkeit in beiden Armen für beide Teilstrahlen jeweils unterschiedlich. Das bewirkt wiederum eine relative Phasenverschiebung beider Teilstrahlen bei Durchgang durch beide Interferometerarme. Da die Intensität der resultierenden Welle von der relativen Phasenverschiebung abhängt, kann man aus der Intensität des Lichtes am Ausgang des Interferometers die unterschiedliche Oberflächenbelegung beider Messarme bestimmen.

Bei den hier verwendeten Wellenleitern handelt es sich um durch Diffusion hergestellte Wellenleiter. Die entstehenden Wellenleiter können somit in erster Näherung als dünn mit rechteckförmigem Querschnitt betrachtet werden. Die unterschiedlichen Brechungsindizes werden durch die Diffusion von Sauerstoff in das Siliziumnitrid-Substrat bewirkt. Damit lässt sich der Brechungsindex stufenlos zwischen 1,46 und 2,1 verändern.

Die Y-Verzweiger, welche in den Mach-Zehnder-Interferometern verwendet werden, bestehen aus fünf Abschnitten. Im ersten Abschnitt liegt ein gewöhnlicher monomodiger Wellenleiter vor. Dieser verbreitert sich über eine Länge  $L_1$  auf den doppelten Durchmesser. Die gaussförmige Wellenmode verbreitert sich und kann dann im folgenden Abschnitt in zwei monomodige Wellenleiter phasengleich weitergeleitet werden. Bei entsprechend genauer Ausführung werden während des ganzen Vorgangs in allen Wellenleitern nur die Grundmoden angeregt.

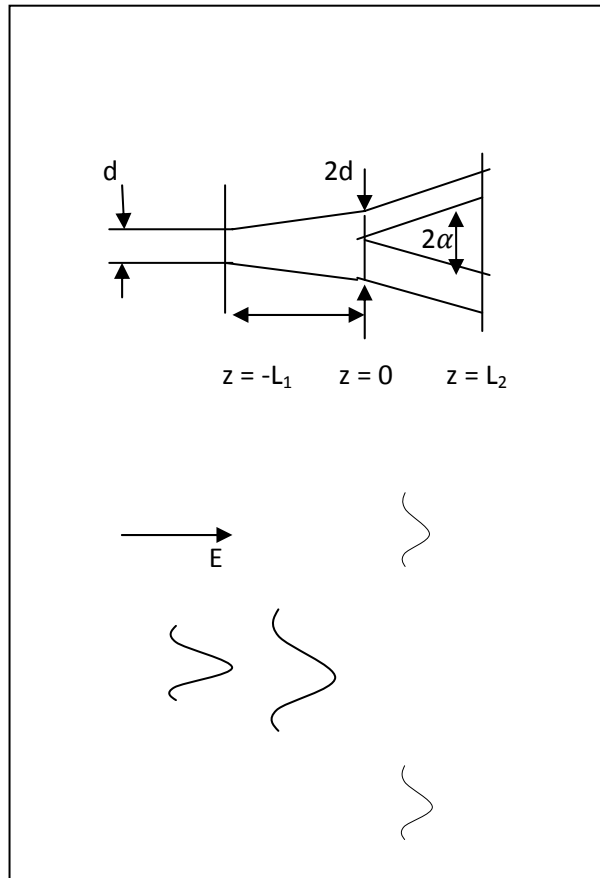


Abb.1: Struktur eines Y-Verzweigers

Auf der anderen Seite des Interferometers werden die beiden phasenverschobenen Wellen miteinander zur Interferenz gebracht. Je nach Phasenverschiebung erfolgt dabei eine Anregung einer diskreten Mode im Wellenleiter oder eine Anregung von Strahlungsmoden.

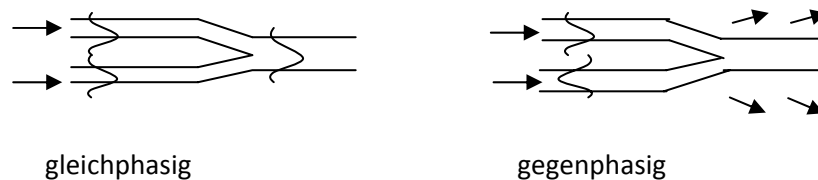


Abb.2: Y-Verzweiger als Verbindungselement

Es gibt für die Strukturierung der gekrümmten Wellenleiter mehrere Wege, die optimale Struktur zu berechnen. Denn der Übergang der schräg angeordneten Wellenleiter des Y-Verzweigers in die

horizontal angeordneten Wellenleiter der Arme des Interferometers wird durch ein gekrümmtes Stück Wellenleiter bewerkstelligt.

Gekrümmte Wellenleiter geben einen Teil ihrer geführten Moden als Strahlungsmode an die Umgebung ab. Denn um eine Mode in einem gekrümmten Wellenleiter zu führen, muss die tangentielle Phasengeschwindigkeit der geführten Welle proportional mit dem Abstand  $x$  von Ursprung des Krümmungsradius wachsen, damit die Phasenfronten erhalten bleiben. Ab einem gewissen Abstand überschreitet die Phasengeschwindigkeit jedoch die Lichtgeschwindigkeit  $c$ . Somit kann der Anteil der Welle, der diesen Abstand überschreitet, nicht mehr im Wellenleiter geführt werden. Dieser Anteil wird dann in die Umgebung abgestrahlt. Der maximale Abstand, ab dem die Welle nicht mehr geführt werden kann, berechnet sich wie folgt:

Bedingung zur Bestimmung von  $x_R$ :

$$(40) \quad (R + x_R) \frac{d\alpha'}{dt} = \frac{c}{n_1}$$

Ausbreitungskonstante  $\beta$  der Mode im Wellenleiter:

$$(41) \quad R \frac{d\alpha'}{dt} = \frac{\omega}{\beta}$$

Somit:

$$(42) \quad x_R = \frac{\beta - \frac{\omega}{c} n_1}{\frac{\omega}{c} n_1} R$$

Der Dämpfungskoeffizient aufgrund der Umwandlung in Strahlungsmoden kann dann folgendermaßen berechnet werden:

Der Dämpfungskoeffizient ist:

$$(43) \quad \alpha = - \frac{1}{P(x)} \frac{dP(x)}{dz}$$

falls der Leistungsverlust  $P_V$  gleich der Leistung in der geführten Welle für  $x > x_R$  ist:

$$(44) \quad P_V \sim \int_{x_R}^{\infty} |E(x)|^2 dx$$

die gesamte geführte Leistung P:

$$(45) \quad P \sim \int_{-\infty}^{\infty} |E(x)|^2 dx$$

und dz durch  $z_c$  ersetzt wird:

$$(46) \quad \alpha = \frac{1}{z_c} \frac{P_V}{P}$$

Für die TE-Mode ergibt sich im gekrümmten Wellenleiter mit stufenförmigem Brechungsindexprofil:

$$(47) \quad \alpha(R) = C_1 \exp(-C_2 R)$$

Der Gesamtverlust von S-Krümmern setzt sich dann aus drei Anteilen zusammen:

- $\alpha_t$  beim Übergang vom geraden zum gekrümmten Wellenleiter aufgrund der Modenfehlpassung
- $\alpha_{tp}$  am Wendepunkt zwischen den beiden entgegengesetzt gekrümmten Bögen
- $\alpha_c$  den Abstrahlverlusten der gekrümmten Wellenleiter

Es gibt nun Kurven, bei denen die beiden ersten möglichen Wellenleiterverluste ganz verschwinden. Solche Kurven sind:

- das Polynom-Profil:
- $$(48) \quad x(z) = 8h \left(\frac{z}{l}\right)^3 \left(1 - \frac{z}{l}\right), \alpha_t \neq 0, \alpha_{tp} = 0$$
- das Sinus-Profil:



$$(49) \quad x(z) = h \left( \frac{z}{l} - \frac{1}{2\pi} \sin \left( 2\pi \frac{z}{l} \right) \right), \alpha_{tp} = \alpha_t = 0$$

Betrachtet man den Übergang vom schrägen Wellenleiter in den horizontalen Arm des Interferometers als einen halben S-Krümmter, so ergibt sich daraus die optimale Form des Übergangs vom Taper in die Arme des Interferometers.

Die oben angegebene Dispersionsrelation gibt die Verhältnisse in diesen Wellenleitern richtig wieder.

Für die TE-Mode besteht folgende Abhängigkeit zwischen der relativen Phasenverschiebung und der Intensität am Ausgang[109]:

$$(50) \quad I_{TE} = \frac{1}{2} (1 + \cos(\theta_{TE1} - \theta_{TE2}))$$

wobei:

$$(51) \quad k = 2 \frac{\pi}{\lambda}$$

die Wellenzahl für die Wellenlänge  $\lambda$  ist. Ferner ist:

$$(52) \quad \theta_{TE1} = k(n_{TE\_Analyt} l_{2\delta l} + n_{TE\_Referenz} l_{1\delta l})$$

$$(53) \quad \theta_{TE2} = k n_{TE\_SiON} L$$

Hierbei sind L die Länge des Messfensters und die Größen  $n_{TE\_Analyt}$ ,  $n_{TE\_Referenz}$  und  $n_{TE\_SiON}$  die verschiedenen Brechungsindizes der optischen Medien für diese Wellenmode.

Für die TM-Mode ergibt sich eine entsprechende Formel:

$$(54) \quad I_{TM} = \frac{1}{2} (1 + \cos(\theta_{TM1} - \theta_{TM2}))$$

Dabei ist:

$$(55) \quad \theta_{TM1} = k(n_{TM\_Analyt} l_{2\delta l} + n_{TM\_Referenz} l_{1\delta l})$$

$$(56) \quad \theta_{TM2} = k n_{TM\_SiON} L$$

Beide Moden können auch gleichzeitig durch das Interferometer geleitet werden. Da die effektiven Brechungsindizes für beide Moden unterschiedlich sind, ergibt sich dann folgende Abhängigkeit der Intensität von der relativen Phasenverschiebung:

$$(57) \quad I = a_{TM}I_{TM} + a_{TE}I_{TE}$$

Mithilfe dieser Beziehung ist es möglich, die Intensität der geführten Mode für TE- und TM-Wellen am Ausgang in Abhängigkeit von der Phasenverschiebung zwischen beiden Wellen in den beiden Armen zu berechnen.

Um das Mach-Zehnder-Interferometer zu verwenden, ist es notwendig, mithilfe von Glasfasern Licht in das Interferometer ein- und auszukoppeln. Die Kopplung wird durch die Koppel-effektivität beschrieben, die wie folgt definiert ist:

$$(58) \quad \eta_k := \begin{cases} P_e/P_0 \\ P_a/P_w \end{cases}$$

Die obere Zeile gilt dabei für Lichteinkopplung, die untere für die Auskopplung von Licht.

$P_e$ : eingekoppelte Lichtleistung

$P_0$ : gesamte ankommende Lichtleistung

$P_a$ : ausgekoppelte Lichtleistung

$P_w$ : gesamte Lichtleistung im Wellenleiter

Aus dieser Definition ergibt sich folgende Berechnungsformel für die Koppel-effizienz aus den Feldverteilungen der beiden Wellenleiter:

$$(59) \quad \eta_k = \frac{\left| \iint_{-\infty}^{\infty} \psi_0(x, y) \psi_w^*(x, y) dx dy \right|^2}{\iint_{-\infty}^{\infty} |\psi_0(x, y)|^2 dx dy \iint_{-\infty}^{\infty} |\psi_w(x, y)|^2 dx dy}$$

Die Feldverteilung ist hierbei jeweils eine Komponente des elektrischen oder magnetischen Feldes der jeweiligen Mode. Die Kopplungseffizienz ist somit ein Maß dafür, wie stark eine Mode in einem Wellenleiter eine andere in einem anderen Wellenleiter anregt.

Man teilt die Koppel-elemente in transversale und longitudinale Elemente ein. Bei ersteren wird das Licht durch die Wellenleiterstirnfläche ein- und ausgekoppelt und bei den letzteren schräg auf die seitliche Grenzfläche des Wellenleiters.

Als Wellenleiterkopplung wird hier die Kopplung von Wellenleitern mit kreisförmigem Querschnitt an integriert optische Wellenleiter mit etwa rechteckförmigem Querschnitt verwendet. Dabei kann die Position des Wellenleiters senkrecht zur Ebene des Chips, der Abstand zwischen den beiden Wellenleitern und der Winkel zwischen den beiden Stirnflächen verändert werden.

Die Koppel-effizienz, falls eine Feldverteilung als gaußförmig und eines als elliptisch vorausgesetzt wird, ist dann:

$$(60) \quad \psi_L = A \exp\left(-\frac{x^2 + y^2}{a^2}\right)$$

$$(61) \quad \psi_W = B \exp\left(-\left[\frac{x^2}{w_x^2} + \frac{y^2}{w_y^2}\right]\right)$$

$$(62) \quad \eta_k = \frac{4}{\left(\frac{w_x}{a} + \frac{a}{w_k}\right)\left(\frac{w_y}{a} + \frac{a}{w_y}\right)}$$

Da die Wellenleiter bedingt durch den Herstellungsprozess jedoch nicht als exakt rechteckförmig betrachtet werden können, ergibt sich eine realistischere Betrachtungsweise durch die folgenden Feldverteilungen:

$$(63) \quad K = T \cdot \Gamma_{x1}^2 \cdot \Gamma_{y1}^2 \cdot \Gamma_2^4 \cdot \eta_k$$

$$(64) \quad \eta_K = \frac{\left[\left(\frac{1}{a^2} + \frac{1}{w_{x1}^2}\right)^{-1/2} + \left(\frac{1}{a^2} + \frac{1}{w_{x2}^2}\right)^{-1/2}\right]^2}{a^2 w_y (w_{x1} + w_{x2}) \left(\frac{1}{a^2} + \frac{1}{w_y^2}\right)}$$

Kleine Verschiebungen und Verkippungen wirken sich folgendermaßen auf die Koppelleffizienz aus:

$$(65) \quad \eta'_K = \eta_K \exp\left\{-\frac{2\delta_x^2}{w_x^2 + a^2}\right\} \cdot \exp\left\{-\frac{2\delta_y^2}{w_y^2 + a^2}\right\}$$

für kleine Verschiebungen in x- und y-Richtung

$$(66) \quad \eta'_K = \eta_K \exp\left(\frac{-k_0^2 a^2 w_y^2 \sin^2 \theta_x}{2(a^2 + w_y^2)}\right) \cdot \exp\left(\frac{-k_0^2 a^2 w_x^2 \sin^2 \theta_y}{2(a^2 + w_x^2)}\right)$$

für kleine Verkippungen um die x- oder y-Achse

Demnach lassen sich dann die höchsten Koppelleffizienzen erreichen, wenn es keine Verschiebungen und Verkippungen gibt. Experimentell wurde jedoch festgestellt, dass bei den eingesetzten Chips die höchste Koppelleffizienz bei einem Kippwinkel von etwa 30° erreicht wird. Da keine Verkippung der Stirnfläche des Wellenleiters im Chip festgestellt werden konnte, kann dieses Ergebnis nur darauf zurückzuführen sein, dass obige Formeln nur für kleine Kippwinkel gelten.

Eine erste anschauliche Begründung ist die, dass das kreisförmige Gaußbündel durch die schräge Ankopplung effektiv ein elliptisches Bündel an den Wellenleiter im Chip einstrahlt. Da die beiden Hauptachsen dieses elliptischen Bündels variabel sind, kann man die Koppelleffizienz somit optimieren.

## 2.5 Molekular geprägte Polymere

Molekular geprägte Polymere werden durch einen besonderen Prägeprozess hergestellt. Es handelt sich dabei um Polymere, in die durch das Einfügen eines Templates während der Polymerisation speziell strukturierte Kavitäten entstehen sollen[118]. In diese Kavitäten soll nach der Polymerisation und der Entfernung des Templates nur ein Templatemolekül passen. Die Qualität dieses Prozesses hängt stark vom Templatemolekül und dem verwendeten Lösungsmittel ab.

## 2.6 Schadstoffe

Atrazin:

Das Pflanzenschutzmittel Atrazin ist ein Triazinderivat mit dem Molekulargewicht 215,7. Es handelt sich in Reinform um ein farb- und geruchloses kristallines Pulver mit einem Schmelzpunkt zwischen 173°C und 175 °C. Es löst sich wenig in Wasser und organischen Lösungsmitteln. Die Wasserlöslichkeit ist innerhalb des pH - Bereichs 3,0 - 10,0 fast gleich. In trockenem Zustand, ebenso wie in wässriger Aufschlämmung mit pH - Werten um 7 ist Atrazin bei Raumtemperatur beständig. Bei höheren Temperaturen wird es bei niedrigen oder hohen pH - Werten in Hydroxyatrazin I umgewandelt. Intensive UV-Strahlung zersetzt Atrazin.

Seine phytotoxische Wirkung kann sehr lange anhalten. So wurde noch 3 Jahre nach Anwendung einer stark überhöhten Atrazin-Dosis (11,2kg/ha) der Ertrag auf einem Versuchsfeld noch beeinträchtigt. Im Boden kann Atrazin durch Absorption an Humus- oder Kohleteilchen inaktiviert werden. Somit kann eine überhöhte Atrazin-Konzentration im Boden durch Einarbeitung von Aktivkohle gesenkt werden.

Der Abbau des Atrazin im Boden erfolgt mikrobiell und chemisch an Oberflächen reaktionsfreudiger Bodenbestandteile (Montmorillonit). Die erste Stufe des Abbaus erfolgt durch Umwandlung in nicht phytotoxisches Hydroxyatrazin.

Die Wirkung des Atrazin auf Pflanzen erfolgt durch Hemmung der Kohlendioxid-Assimilation. Dadurch werden Vergilbungen und Dürreerscheinungen an den Pflanzen erzeugt, bis diese schließlich vertrocknen.

Die Mikroflora des Bodens wird durch Atrazin nur vorübergehend beeinflusst. Die Wirkung auf Pilze ist artspezifisch. Für Bienen ist Atrazin ungefährlich. Hingegen ist es für Fische recht toxisch. Für sie gelten Schwellistenkonzentrationen von 15 - 60 mg/l als tödlich. Für Wildgeflügel ist Atrazin wenig toxisch ( LC<sub>50</sub>: 20000 ppm).

Für Warmblüter ist Atrazin ebenfalls wenig toxisch. So liegt die orale LD<sub>50</sub> für den reinen Wirkstoff bei der Ratte bei ca. 3080 mg/kg Körpergewicht.

Im Organismus von Warmblütern wird das Atrazin dealkyliert. In geringem Maße erfolgt die Oxydation von Alkylseitenketten zu carboxylhaltigen Resten, wobei die C - Cl - Bindung erhalten bleibt.

## 2.7 Reaktionskinetik bei Bindungshemmtests und Hook-Effekt

Bei Bioassays ist der Verlauf der Kalibrierfunktion oft nicht umkehrbar, sondern steigt ausgehend vom Blindwertsignal zunächst mit der Konzentration leicht an bis zu einem Maximum und fällt dann

monoton bis zu einem Minimum ab. Dieser Effekt kann durch Änderungen am Modell für die Reaktionskinetik erklärt werden.

Das einfachste Modell für die Reaktionskinetik ist durch folgende Differentialgleichung beschrieben[76][21][59][72]:

$$(67) \quad \frac{d\Gamma(t)}{dt} = k_a[A](\Gamma_{lim} - \Gamma(t)) - k_d\Gamma(t)$$

Im Gleichgewicht wird die linke Seite gleich Null. Die einzelnen Größen in der Gleichung haben folgende Bedeutung:

[A]: Konzentration des bindenden Liganden in der Lösung, wobei [A] = const angenommen wird

$k_a$ : Ratenkonstante für die Bindung des Liganden an die Oberfläche

$k_d$ : Ratenkonstante durch die Diffusion

$\Gamma_{lim}$ : maximale Beladung der Oberfläche

$\Gamma(t)$ : Konzentration des Liganden zur Zeit t an der Oberfläche

Mithilfe dieses Modells erhält man folgende Beziehung zwischen dem Signal und der Konzentration:

$$(68) \quad \frac{\Gamma(t)}{\Gamma_{eq}} = 1 - \exp\left(-\frac{DKt}{\delta\Gamma_{lim}}\right)$$

Dieses einfache Modell erklärt jedoch nicht das Auftreten des High-/Low-dose-Hook- Effekts. Dieser tritt vor allem bei Messungen mit polyklonalen Antikörpern auf. Verursacht wird er dadurch, dass polykonal hergestellte Antikörper als Mischung verschiedener Typen von Antikörpern aufgefasst werden können, die bei der Reaktion mit dem Antigen verschiedene Ratenkonstanten aufweisen. Das führt bei den hier durchgeführten Messungen zu einer Überlagerung verschiedener sigmoidaler Kurvenverläufe, was das Auftreten des Hook-Effekts zur Folge hat.

Eine weitere mögliche Ursache ist eine unvollständige Regeneration nach den Messungen. Falls nach einer Einzelmessung die Regeneration der Oberfläche nicht vollständig durchgeführt worden ist, sind Bindungsstellen besetzt. Die nachfolgende Einzelmessung wird somit eine kleinere Konzentration für den Analyten ergeben, wie tatsächlich vorhanden ist. Das kann zu einer Delle im Kurvenverlauf führen.

## 2.8 Kenngrößen eines Messverfahrens

Die Kenngrößen eines Systems beschreiben die Güte eines Meßverfahrens.

Für das hier beschriebene System sind die Reproduzierbarkeit und die Präzision als Maß für die Qualität des Sensorsystems wichtig. Für den Vergleich mit den gesetzlichen Vorgaben ist die Bestimmung der Nachweis-, der Erfassungs- und der Bestimmungsgrenze entscheidend.

Univariate Messungen

Für univariate Messungen wird jeweils nur ein Analyt in verschiedenen Konzentrationen verwendet.

### 2.8.1 Reproduzierbarkeit

Die Reproduzierbarkeit eines Meßsystems gibt an, wie gut unter den gleichen Bedingungen dasselbe Meßergebnis erhalten werden kann[113][114]. Bei univariaten Messungen bei dem gegebenen System erfolgt die Bestimmung der Reproduzierbarkeit durch die Mehrfachbestimmung derselben Konzentration des Analyten. Aus den Messwerten werden dann Mittelwert und Standardabweichung berechnet. Die Reproduzierbarkeit der Messung wird nun mithilfe der statistischen Testtheorie überprüft. Dazu benötigt man zunächst eine Testhypothese und eine Alternativhypothese. Die zu testende Hypothese besagt, dass zwei beliebige Mehrfachbestimmungen des Mittelwerts der gleichen Konzentration nur zufällige Abweichungen besitzen dürfen. Der Test auf die Reproduzierbarkeit eines Meßsystems vergleicht also nur gemessene Werte miteinander. Im univariaten Fall kann man mit eindimensionalen Verteilungen arbeiten, da nur eine Konzentration aus dem Sensorsignal bestimmt wird. Dann kann man nach folgendem Prüfschema vorgehen:

- Prüfung auf Normalverteilung oder andere beliebig vorgegebene Verteilung:

Ob die gemessenen Werte einer Gaußschen Verteilung folgen, kann mithilfe des Jarque-Bera-Tests ermittelt werden. Dieser Test prüft die Hypothese, ob das dritte und vierte zentrale Moment gleich Null bzw. gleich Drei ist, auf dem Niveau  $\alpha$ . Ist dies der Fall, so ist die Hypothese, dass eine Gaußsche Verteilung vorliegt, bewiesen. Ansonsten liegt keine Gaußsche Verteilung vor. Die entsprechenden Teststatistiken sind asymptotisch  $\chi^2$ -verteilt bei einer großen Anzahl von Messwerten.

Um für die vorliegenden Messungen zuverlässige Ergebnisse bzgl. dieses Tests zu erhalten, wird hier der Lilliefors-Test als auch der Jarque-Bera-Test zum Test auf eine Gaußsche Verteilung verwendet[10]. Der Lilliefors-Test vergleicht die gemessenen Werte mit den Werten einer Gaußverteilung mit derselben Varianz und demselben Mittelwert wie die gemessenen Werte. Da die entsprechende Prüfverteilung auch bei einer kleinen Anzahl von Messwerten bekannt ist, kann die entsprechende Prüfung der Verteilung auch bei den hier auszuwertenden Messungen durchgeführt werden.

- Prüfung auf Reproduzierbarkeit:

Die Prüfung auf Reproduzierbarkeit der Messwerte kann durch die Bestimmung eines Vertrauensintervalls für ein vorgegebenes Niveau  $\alpha$  erfolgen. In dieses Intervall fallen dann die Messwerte mit der Irrtumswahrscheinlichkeit  $\alpha$ . Das Intervall mit der kleinsten Irrtumswahrscheinlichkeit  $\alpha$ , in das alle gemessenen Werte fallen, ist ein Maß für die Reproduzierbarkeit der Messungen. Je kleiner dieses Intervall bzw. die zugehörige Irrtumswahrscheinlichkeit  $\alpha$  gewählt werden kann, desto besser ist die Reproduzierbarkeit der Messungen.

### 2.8.2 Präzision

Die Präzision der Kalibriermessung ist durch die geschätzte Standardabweichung für einen beliebigen Messwert für die korrespondierende Konzentration gegeben. Die Präzision lässt sich aus der Standardabweichung der Konzentrationswerte und dem Fehlerfortpflanzungsgesetz folgendermaßen berechnen[112]:

$$(69) \quad s(y) = \frac{s(x)}{|y'|}$$

Die so erhaltene Kurve muss unter der von Horwitz angegebenen Referenzkurve liegen. Die von Horwitz angegebene Referenzkurve wird durch folgende Formel wiedergegeben[112]:

$$(70) \quad \sigma = Kc^\alpha$$

Dabei sind K und  $\alpha$  von der Messung unabhängige Konstanten.

### 2.8.3 Beurteilung der Qualität der einzelnen Messungen mithilfe des Informationsmaßes

Das Shannonsche Informationsmaß kann auch zur Beurteilung von Messungen herangezogen werden[77][78][79][80][81][82]. Dazu muss als a-priori-Verteilung die Gleichverteilung aller Messwerte im Messwertbereich angenommen werden. Als a-posteriori-Verteilung wird eine Gaußverteilung mit den gemessenen Werten als Parameter angenommen. Die systematische Abweichung zwischen den Messwerten und der aus der Interpolation gewonnenen Kalibrierkurve geht als systematischer Fehler  $d$  in die Berechnung ein. Mithilfe der Anzahl der Einzelmessungen  $n$  kann dann folgende Beziehung zur Berechnung des Informationsgehalts der Messungen gewonnen werden:

$$(71) \quad I = ld \frac{(y_{max} - y_{min})\sqrt{n}}{\sigma_y \sqrt{2\pi}e} - n \left( \frac{d}{\sigma_y} \right)^2 \left( \frac{1}{2} ld e \right)$$

Dabei ist  $y_{max}$  der größte und  $y_{min}$  der kleinste Wert des Messwertbereichs,  $\sigma_y$  ist die Standardabweichung der Messung und  $d$  ist die Differenz zwischen dem jeweiligen Messwert und der Kalibrierkurve.

### 2.8.4 Verteilung der Konzentrationswerte der Kalibrierproben

Auf die Varianz des Messwertsignals hat sowohl die Varianz des Messgeräts selbst, wie auch die Varianz der Kalibrierproben einen Einfluss. Im Gegensatz zur Messwert-Verteilung ist die Verteilungsfunktion der Konzentrationen in den Kalibrierproben jedoch zunächst nicht bekannt, da nur die mittlere Konzentration, aber nicht deren Varianz bekannt ist. Somit kann die Gaußverteilung nicht verwendet werden. Um dennoch zu einer adäquaten Verteilung zu kommen, kann die Maximum-Entropie-Methode verwendet werden. Dieser Methode liegt folgender Gedanke zugrunde: der Informationsgehalt einer Messung soll möglichst ein Maximum annehmen, da dann ein Maximum an Erkenntnis aus der Messung gezogen werden kann, was durch ein Maximum der Informationsentropie für diese Messung erreicht werden kann. Somit kann als grundlegende Beziehung für die Maximum-Entropie-Methode folgende grundlegende Formel betrachtet werden[32].

$$(72) \quad H = - \int_{-\infty}^{\infty} p(x) lb p(x) dx$$

Da nur die mittlere Konzentration bekannt ist, kommen zu dieser Beziehung noch der Mittelwert der Konzentration und die Normierung hinzu:

$$(73) \quad \int_0^{\infty} xp(x)dx = \bar{x}$$

$$(74) \quad \int_0^{\infty} p(x) dx = 1$$

Dabei wird die maximal mögliche Konzentration als Unendlich angenommen.

Der Extremwert der Informationsentropie nimmt dann folgende Form an:

$$(75) \quad -\ln p(x) - 1 + \lambda_1 x + \lambda_2 = \text{extr.}$$

Mithilfe der beiden Nebenbedingungen ergibt sich dann folgende Dichte der Verteilungsfunktion für die Konzentrationen:

$$(76) \quad p(x) = \frac{1}{\bar{x}} \exp\left(-\frac{x}{\bar{x}}\right)$$

Es handelt sich also um eine Exponentialverteilung mit der Konzentration  $\bar{x}$  als Mittelwert und  $\frac{1}{\bar{x}^2}$  als Varianz. Wäre die Varianz von vornherein bekannt, so müsste man die Varianz für die Messung als zusätzliche Bedingung einführen und würde eine der logarithmischen Normalverteilung ähnliche Verteilungsfunktion der Konzentrationen erhalten.

Dass man für die Verteilung der Konzentrationswerte auch eine evtl. verschobene logarithmische Normalverteilung annehmen kann, lässt sich durch Betrachtung der Logarithmen von auf eine Referenzkonzentration bezogenen Konzentrationen schließen. Denn alle Konzentrationswerte sind größer als Null. Die Logarithmen von Konzentrationen nehmen daher alle Werte auf der reellen Achse an und können somit, falls keine zusätzliche Bedingung gestellt wird, als gaußverteilt angenommen werden.

Falls für eine Probe mittels einer Messung eine Messwertverteilung zugeordnet werden kann, so kann mittels des Bayesschen Theorems mit der Kenntnis der Kalibrierkurve und evtl. weiterer Zusammenhänge, wie z.B. die Abhängigkeit der Varianz von der Konzentration auf die Verteilung der Konzentrationswerte der Probe bestimmt werden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die optimale Verteilung der Probenkonzentration stark von allen Informationen abhängt, die über eine Probe zur Verfügung stehen.

### 2.8.5 Nachweis-, Erfassungs-, und Bestimmungsgrenze

Für die Verwendung von Messgeräten in der Umweltanalytik ist es notwendig, dass die kleinste Konzentration eines Stoffes bestimmt wird, die das Messgerät bzw. das Analyseverfahren noch nachweisen kann.

Da bei Messungen generell immer statistische Fehler auftreten können, kann die Definition der Nachweis-, der Erfassungs- und der Bestimmungsgrenze nur unter Zuhilfenahme von statistischen Methoden geschehen.

Die genaue Definition nach DIN dieser Grenzen kann wie folgt geschehen [18][19][35][36][37][38][39][40][41][66][67]:

kritischer Wert:



Der kritische Wert ist der kleinste Messwert, der mit vorgegebener statistischer Sicherheit  $1 - \alpha$  vom Blindwert unterschieden werden kann. Er wird im allgemeinen Fall nach folgender Beziehung ermittelt:

$$(77) \quad y_c = E(y_B) + U(y_B)$$

Dabei bedeutet E der Erwartungswert der Blindwerte  $y_B$  und U die Unsicherheit der Blindwerte. Gelingt es, sämtliche Einflüsse auf die Blindwertmessung randomisiert als Zufallsstreuung zu erfassen, so erhält man folgende Beziehung:

$$(78) \quad y_c = E(y_B) + t_{1-\alpha, \nu} s_B$$

mit dem Erwartungswert  $E(y_B)$  des Blindwertes und der Streuung  $s_B$  der Blindwerte. Die Größe  $t_{1-\alpha, \nu}$  ist das Quantil der t - Verteilung für die Irrtumswahrscheinlichkeit  $\alpha$  und  $\nu = n - 1$  mit der Anzahl n der Messungen.

Mit dem Überschreiten des kritischen Wertes gilt der Analyt als nachgewiesen.

Nachweisgrenze:

Als Nachweisgrenze wird der zum kritischen Messwert gehörende Gehalt des Analyten bezeichnet. Er ist zur Ergebnisinterpretation allerdings nur insofern geeignet, als dass bei einem Wert größer als der Nachweisgrenze der Analyt vorhanden ist. Die Nachweisgrenze eignet sich jedoch nicht als Kriterium zum sinnvollen Nachweis eines Analyten, da nur für eine Art von statistischem Fehler eine definierte Fehlerwahrscheinlichkeit gibt. Für den anderen statistischen Fehler ist die Irrtumswahrscheinlichkeit vorgegeben als 50%.

Erfassungsgrenze:

Die Erfassungsgrenze gibt den Analysenwert an, der bis auf die Irrtumswahrscheinlichkeiten  $\alpha$  bzw.  $\beta$  für Fehler erster bzw. zweiter Art stets ein vom Blindwert unterscheidbares Signal erzeugt. Die Erfassungsgrenze charakterisiert ein Verfahren. Insbesondere kann durch die Vorgabe der beiden Irrtumswahrscheinlichkeiten für Fehler erster und zweiter Art der Mindestgehalt mit hoher vorgegebener Sicherheit nachgewiesen werden. Daher ist diese Kenngröße für die Charakterisierung eines Analyseverfahrens besonders geeignet. Somit kann die Erfassungsgrenze als Grenzgehalt angegeben werden, der höchstens in der Probe enthalten sein kann, wenn kein Signal gefunden wird.

Bestimmungsgrenze:

Die Bestimmungsgrenze ist in der Regel der Analysenwert, von dem an quantitative Bestimmungen der Konzentration unter Zugrundelegung einer Mindestpräzisionsanforderung möglich sind. Da letztere willkürlich festgelegt werden kann, sollte diese Präzisionsanforderung immer mit angegeben werden.

Für die vorliegende Arbeit sind lediglich die Nachweis- und die Erfassungsgrenze von Bedeutung. Sie können nach verschiedenen Methoden berechnet werden. Zunächst soll die Methode nach Hubaux und Vos behandelt werden. Nach dieser Methode können die beiden Größen können wie folgt für lineare Kalibrierkurven aus der  $I_{\max}$ -c-Kurve berechnet werden:

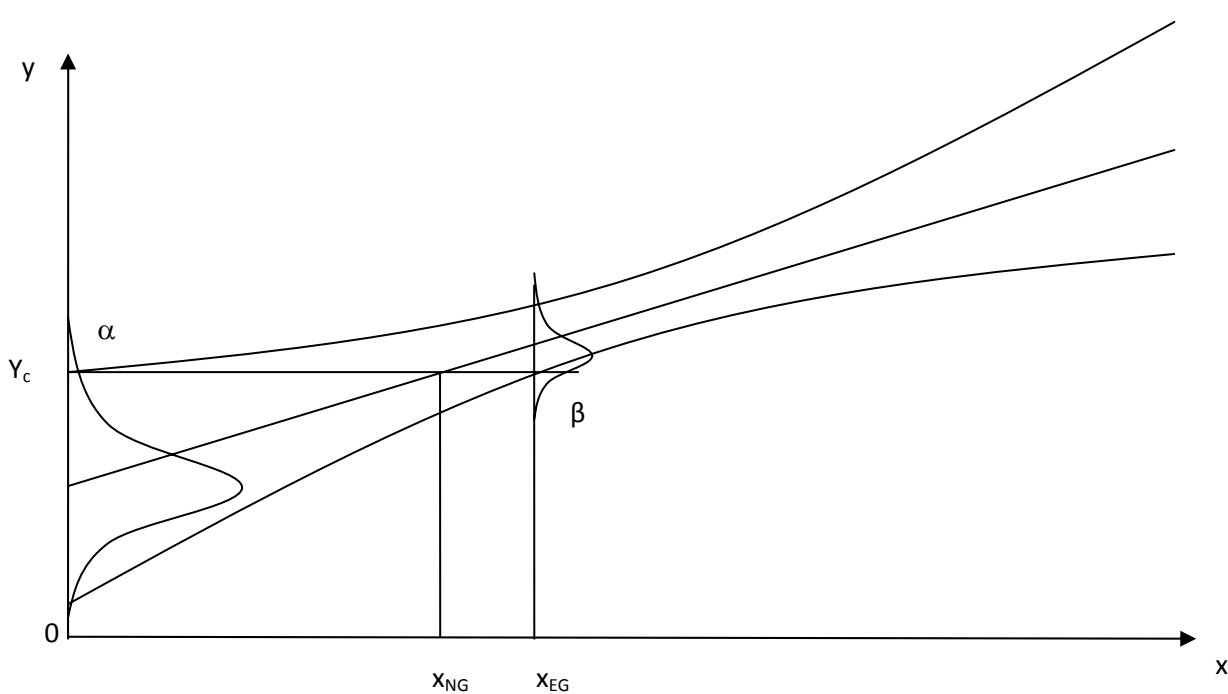


Abb.3: Gerade Kalibrierkurve mit Konfidenzband, kritischem Wert, Erfassungs- und Nachweisgrenze

Um die Kalibrierkurve herum wird ein Konfidenzband gelegt, das zu vorgegebenen Irrtumswahrscheinlichkeiten  $\alpha$  und  $\beta$  angibt, in welchen zulässigen Bereich die Messwerte mit den vorgegebenen Wahrscheinlichkeiten fallen. Der Schnittpunkt der oberen Kurve dieses Bandes mit der  $I_{\max}$ -Achse ergibt den kritischen Wert für das Analyseverfahren. Zieht man eine Parallele zur Konzentrationsachse, so ergeben sich zwei Schnittpunkte, jeweils mit der Kalibrierkurve und der unteren Kurve des Konfidenzbandes. Die Konzentration, welche zum Schnittpunkt mit der Kalibrierkurve gehört, ist die Nachweisgrenze. Die Konzentration zum Schnittpunkt mit der unteren Kurve des Konfidenzbandes ist die Erfassungsgrenze. Alle Schnittpunkte müssen eindeutig definiert sein.

Die obere und die untere Kurve des Konfidenzbandes ergeben sich aus folgender Formel[113]:

$$(79) \quad y_{o/u} = y \pm \sqrt{2F} \sqrt{\frac{\sum(y_i - \hat{y}_i)^2}{N-K-1}} \sqrt{\left[ \frac{1}{N} + \frac{(x_i - \bar{x})^2}{\sum(x_i - \bar{x})^2} \right]}$$

Dabei ist F das  $\alpha$ - bzw.  $\beta$ -Quantil der F-Verteilung, N ist die Anzahl der Messungen und K die Anzahl der statistischen Freiheitsgrade der Kalibrierfunktion.

Eine Verallgemeinerung auf nichtlineare Kalibrierkurven ist möglich. Dazu müssen die gemessenen Werte mit einer passenden Interpolationskurve interpoliert werden. Die so ermittelte Kurve muss dann mit einem Konfidenzband umgeben werden. Dieses kann bei einer direkten Übertragung der Methode von Hubaux und Vos durch die Berechnung der Restvarianz und die Interpolation der gemessenen Varianz mit einer geeigneten Interpolationsfunktion geschehen. Falls eine Gaußverteilung der Messwerte angenommen werden kann, ist die Summe der so ermittelten Varianzen die geschätzte Gesamtvarianz eines Messpunktes im Messbereich. Aus dieser Gesamtvarianz und der Interpolationskurve kann dann für jeden beliebigen Messpunkt ein Konfidenzintervall berechnet werden.

Für die hier vorliegenden Bindungshemmtests von TIRF und Mach-Zehnder-Interferometer können in vielen Fällen sigmoidale Kurven (logistischer Fit) als Interpolationskurve verwendet werden. Die gemessenen Varianzen können hier durch eine Gerade interpoliert werden. Die Gesamtvarianz aus

der Interpolation ergibt sich mithilfe des Fehlerfortpflanzungsgesetz unter Vernachlässigung der Kovarianzterme zu:

$$(80) \quad s_g^2 = \left(\frac{\partial y}{\partial A_1}\right)^2 s_{A_1}^2 + \left(\frac{\partial y}{\partial A_2}\right)^2 s_{A_2}^2 + \left(\frac{\partial y}{\partial p}\right)^2 s_p^2 + \left(\frac{\partial y}{\partial x_0}\right)^2 s_{x_0}^2$$

Dabei ist:

$$(81) \quad \frac{\partial y}{\partial A_1} = \frac{1}{1 + \left(\frac{x}{x_0}\right)^p}$$

$$(82) \quad \frac{\partial y}{\partial A_2} = 1 - \frac{1}{1 + \left(\frac{x}{x_0}\right)^p}$$

$$(83) \quad \frac{\partial y}{\partial p} = \frac{(A_1 - A_2) \frac{p}{x_0} \left(\frac{x}{x_0}\right)^p}{\left(1 + \left(\frac{x}{x_0}\right)^p\right)^2}$$

$$(84) \quad \frac{\partial y}{\partial x_0} = \frac{(A_1 - A_2) \ln \frac{x}{x_0} \left(\frac{x}{x_0}\right)^p}{\left(1 + \left(\frac{x}{x_0}\right)^p\right)^2}$$

Die Beiträge der Restvarianzterme können bei der sigmoiden Kurve im Bereich kleiner Konzentrationen vernachlässigt werden.

Aus der so gewonnen Gesamtvarianz kann dann ein Konfidenzintervall um jeden Messwert nach der Beziehung:

$$(85) \quad y_{o/u} = y \pm t_{1-\alpha, n-1} s_g$$

berechnet werden. Voraussetzung ist das Vorliegen von gaußverteilten Messwerten. Die beiden Grenzen des Konfidenzintervalls um die Interpolationskurve ergeben die obere und die untere Kurve. Falls die nichtlineare Interpolationskurve eine negative Steigung hat, muss dann die untere dieser Kurven verwendet werden, sonst die obere. Wird als Irrtumswahrscheinlichkeit zur Ermittlung des Konfidenzintervalls der Wert  $\alpha$  angenommen, so wird durch den Schnittpunkt der jeweiligen Kurve mit der Messwert-Achse eine Parallele zur Konzentrationsachse gezogen. Der Schnittpunkt dieser Geraden mit der Interpolationskurve ergibt die Nachweisgrenze zum Niveau  $\alpha$ .

Zur Ermittlung der Erfassungsgrenze wird bei fallenden Kalibrierkurven die obere Kurve, bei steigenden Kalibrierkurven die untere Kurve herangezogen. Der Schnittpunkt dieser Kurve mit der schon ermittelten Parallelen zur Konzentrationsachse ist die Erfassungsgrenze.

Die Methode nach Hubaux und Vos enthält Näherungen, die verbessert werden können. Deshalb soll im Folgenden eine weitere Methode zur Berechnung der Nachweis – und der Erfassungsgrenze vorgestellt werden. Diese Methode nach Luthardt soll zunächst für den Fall linearer Kalibrierkurven vorgestellt werden.

Dazu müssen die Konfidenzintervalle der Methode von Hubaux und Vos durch simultane Anteilsbereiche, auch als Toleranzintervall bezeichnet, ersetzt werden. Ein  $1 - \gamma$ -Toleranzintervall ist definiert als das Intervall, das mit der vorgegebenen Wahrscheinlichkeit  $1 - \alpha$  den Anteil  $1 - \gamma$  der gemessenen Werte enthält. Diese Erweiterung des Intervallbegriffs ist notwendig, da die zukünftig ermittelten Messungen stets durch eine Stichprobe aus mehreren Messwerten und nicht durch einen einzelnen Messwert bestimmt werden. Bei dem hier vorliegenden Problem ist der Toleranzbereich der Messwerte zu einem festen, aber unbekanntem Gehalt mit einer gegebenen Wahrscheinlichkeit zu ermitteln. Dazu ist in einem ersten Schritt ein simultanes Konfidenzband zu ermitteln. Mithilfe des F-Tests ergibt sich mit einer Schätzung der Reststreuung die folgende Abschätzung des Konfidenzbandes:

$$(86) \quad K_{\alpha/2} = \hat{a} + \hat{b} \pm A(x)\hat{\sigma}$$

wobei:

$$(87) \quad A(x) = \sqrt{2F_{2,v,1-\alpha/2} \left( \frac{1}{n} + \frac{(x_i - \bar{x})^2}{S_{xx}} \right)}$$

Mithilfe dieses Konfidenzbandes kann durch Umkehrung der Kalibrierfunktion die Nachweis- bzw. die Erfassungsgrenze ermittelt werden. Um zusätzlich das Toleranzintervall für Nachweis- bzw. Erfassungsgrenze ermitteln zu können, muss zusätzlich zum simultanen Konfidenzband das Toleranzintervall aus folgender Beziehung ermittelt werden:

$$(88) \quad T_{y(\gamma)} = y_0 \pm u_{1-\gamma/2} \frac{\sigma}{\sqrt{N}}$$

Da die Standardabweichung mithilfe eines  $\chi^2$ -Tests mit einer zu wählenden Irrtumswahrscheinlichkeit  $\alpha$  geschätzt werden muss, ergibt sich das entsprechende Intervall zu:

$$(89) \quad J_{y(\gamma,\alpha/2)} = \bar{y}_0 \pm B \frac{\hat{\sigma}}{\sqrt{N}}$$

mit

$$(90) \quad B = u_{1-\gamma/2} \sqrt{\frac{v}{\chi_{v,\alpha/2}^2}}$$

Aus diesen Beziehungen erhält man das Intervall:

$$(91) \quad H_{y(\gamma,\alpha)} = \hat{a} + \hat{b}x \pm \left( A(x) + \frac{B}{\sqrt{N}} \right) \hat{\sigma}$$

Zu einem beliebigen Messwert kann nun das entsprechende Intervall für die zugehörige Konzentration ermittelt werden. Dazu wird eine Parallele zur Konzentrationsachse durch diesen Messwert gezogen. Der Schnittpunkt mit der Kalibriergeraden ist der zugehörige Konzentrationswert, die Schnittpunkte mit der oberen bzw. unteren Kurve sind die untere bzw. obere Grenze des zugehörigen Toleranzintervalls des Konzentrationswerts.

Mithilfe dieser Intervalle können nun die Nachweis- und Erfassungsgrenze bestimmt werden.

Dazu wird zuerst der kritische Messwert bestimmt. Dieser ist die Obergrenze des beim Gehalt  $x=0$  geschätzten  $1 - \gamma$  Toleranzintervalls für den Blindwert  $y_{BL} = a$ , also:

$$(92) \quad y_c = \hat{a} + \left( A(x) + \frac{B}{\sqrt{N}} \right) \hat{\sigma}$$

Der diesem Messwert entsprechende Gehalt ist die Nachweisgrenze. Graphisch wird dieser Wert wie bei Hubaux und Vos ermittelt, jedoch mit dem oben definierten Intervall H. Entsprechend wird die Erfassungsgrenze definiert. Diese ergibt sich aus der folgenden Gleichung:

$$(93) \quad y_c = \hat{a} + \hat{b}x_{EG} + \left( A(x_{EG}) + \frac{B}{\sqrt{N}} \right) \hat{\sigma}$$

Diese Gleichung muss numerisch gelöst werden, da es keine symbolische Lösung gibt. Diese Methode kann auch auf nichtlineare Fälle erweitert werden, was aber hier zu numerischen Problemen führt[22].

Bei Bioassays wird sehr häufig auch die minimale detektierbare Konzentration (Minimal Detectable Concentration, MDC) verwendet. Brown et al.[20] diskutieren die fünf verschiedene am häufigsten verwendeten Ansätze zur Definition der MDC und wägen die verschiedenen Schwachpunkte dieser Definitionen gegeneinander ab. Als Kalibrierfunktion wird die am häufigsten verwendete sigmoidale Funktion verwendet. Die Varianz der Messwerte wird durch ein Exponentialgesetz dieser Kalibrierfunktion interpoliert. Die betrachteten Ansätze von Yalow-Bearson, Ekins-Newman und Currie wiesen folgende Mängel auf:

Yalow-Bearson, Ekins-Newman: diese Definitionen ergeben den Wert 0 bzw. sind nicht definiert, falls der Exponent in der sigmoidalen Kurve  $p < 1$  wird

Currie: die drei verschiedenen von Currie definierten Werte unterteilen den Messbereich in einen Bereich, wo der Analyt nicht nachgewiesen werden kann, in einen Bereich, wo nur seine Anwesenheit, aber seine genaue Konzentration nicht angegeben werden kann und in einen Bereich, wo seine Konzentration bestimmt werden kann. Diese Bereiche werden durch den „detection limit“ und den „determination limit“ voneinander abgetrennt. Diese Größen sind über statistische Tests definiert. Jedoch sind nicht für beide Größen für beide Fehlerarten die Irrtumswahrscheinlichkeiten angegeben. Ferner wird kein Weg angegeben, wie die Varianz dieser beiden Größen berechnet werden soll. Schließlich wird davon ausgegangen, dass die Messwerte und die Werte der Konzentrationen gaußverteilt sind.

Um besagte Schwierigkeiten bei der Definition des MDC zu überwinden, schlagen nun Brown et al. folgende Berechnungsmethode für den MDC vor:

Zunächst werden die Mittelwerte der Messungen mit der sigmoidalen Gleichung interpoliert. Es wird dann angenommen, dass die Varianz der Messwerte exponentiell von den Mittelwerten abhängt. Mit dem so gewonnenen Ansatz werden dann die Varianzen der Messwerte interpoliert.

Es wird ferner eine Gaußverteilung der Messwerte angenommen, deren Mittelwert und Varianz durch die Interpolationsfunktionen gegeben sind.

Diese so bestimmten Wahrscheinlichkeitsdichten der Verteilungen  $[Y|X,\theta]$  sind die geschätzten bedingten Verteilungen der Messwerte bei einer vorgegebenen Konzentration X und vorgegebener

Parameter der Kalibrierfunktionen. Aus diesen Wahrscheinlichkeitsdichten der Verteilungen kann dann mithilfe des Bayesschen Theorems die Wahrscheinlichkeitsdichte der Verteilung der Konzentration  $X$  für einen vorgegebenen Messwert  $Y$  bei gegebenen Parametern der Kalibrierfunktionen bestimmt werden. Dazu wird folgende Beziehung benötigt:

$$(94) \quad [X|Y, \theta] = \frac{[X][Y|X, \theta]}{[Y|\theta]}$$

Hierbei ist  $[X]$  die Dichte der a priori-Verteilung der Konzentrationen, welche hier als Gleichverteilung zwischen dem minimalen und dem maximalen Wert der messbaren Konzentration angenommen werden kann. Die Größe  $[Y|\theta]$  ist die Dichte der a priori-Verteilung der Messwerte bei vorgegebenen Parametern der Kalibrierfunktionen. Sie ist von  $X$  unabhängig und kann daher durch die Integration über alle  $X$ -Werte bestimmt werden.

Aus der so gewonnenen Dichte der Verteilung wird der MDC wie folgt bestimmt:

Für die Blankwerte wird die Dichte  $[X|Y_0, \theta]$  bestimmt. Die zugehörige Variable sei  $X_{Y_0}$ . Die Dichte  $[X|Y_0, \theta]$  sei die Wahrscheinlichkeitsdichte zur Variablen  $X_Y$ , welche die gesuchte MDC ist. Dann wird zur Variablen  $X_Y - X_{Y_0}$  die zugehörige Dichte der Verteilung bestimmt. Dies entspricht der Faltung der Dichten  $[X|Y_0, \theta]$  und  $[X|Y, \theta]$ . Zu dieser Dichte wird dann zu einem vorgegebenen Wert  $\rho$  das entsprechende Quantil bestimmt, indem der zugehörige Wert von  $Y$  bzw.  $X_Y$  bestimmt wird:

$$(95) \quad \int_{\{x>0\}} [X^*(x)|Y, \theta] dx = \rho$$

Mithilfe dieses so bestimmten Werts  $Y$  wird dann der Median des zugehörigen  $X$ -Wertes mithilfe der Dichte  $[X|Y, \theta]$  bestimmt:

$$(96) \quad \left\{ X_b : \int_0^{X_b} [X(x)|Y, \theta] dx = \int_{X_b}^{x_{max}} [X(x)|Y, \theta] dx = 0.5 \right\}$$

Dieser Wert ist der MDC. Der Median wird deshalb statt des Mittelwertes verwendet, da dieser bei den hier zu erwartenden schiefen Verteilungen ein besseres Lagemaß ist.

Brown zeigt, dass alle anderen gegebenen Definitionen Annäherungen für diese Berechnungsmethode sind.

## 2.9 Anwendung chemometrischer Methoden in der Geologie

### 2.9.1 Allgemeine Problemstellungen

Bei geologischen Messungen müssen häufig Interpolationen von räumlich verteilten Daten und Zeitreihenanalysen durchgeführt werden. Im Rahmen des AquaTerra-Projekts wurden eine Reihe von Schadstoffmessungen in Wasser und Boden durchgeführt und mit zahlreichen Analysemethoden mathematisch ausgewertet.

Innerhalb des AquaTerra-Projektes wurden Messdaten der größten europäischen Flüsse aus dem Flusswasser und den Einzugsgebieten von Konzentrationen von organischen Schadstoffen und

Schwermetallen, sowie einigen physikalischen Parametern in den Zeiträumen 1960-2007 erhoben. Ferner gibt es einige biologische Untersuchungen und zahlreiche Bodenmessungen. Es gibt insgesamt mehr als 15 Datenbanken von allen Projektpartnern. Einige dieser Messdaten werden im Folgenden mithilfe verschiedener Verfahren ausgewertet. Insbesondere werden dabei Interpolationen räumlich verteilter Messungen, Zeitreihenanalysen und Korrelationsanalysen durchgeführt.

### 2.9.2 Interpolationsmethoden räumlich verteilter Daten

Räumlich verteilte Messungen treten bei der Untersuchung von Bodenproben auf. Diese werden nach einem den örtlichen geologischen Gegebenheiten angepasstes Schema durchgeführt. Die erhaltenen Bodenproben werden nach ihren Schadstoffkonzentrationen oder nach biologischen Parametern, wie z.B. die Häufigkeit bestimmter Mikroorganismen untersucht. Die so erhaltenen Messdaten können abstrakt als Funktion von Ortskoordinaten nach Messdaten aufgefasst werden. Um die entsprechenden Werte in einem beliebigen Punkt in der konvexen Hülle des Probengitters bestimmen zu können, werden diese Werte räumlich interpoliert.

Dazu werden die Ortskoordinaten mithilfe eines allgemeinen Ansatzes auf die Messdaten abgebildet. Bei Annahme gaußverteilter Daten wird die Größe  $\chi^2$  minimiert, indem die freien Parameter des Ansatzes angepasst werden. Falls die Messdaten alle die gleiche Varianz haben, kann auch eine Minimierung des RMSE vorgenommen werden. Aus dieser Interpolationsfunktion kann man dann den Mittelwert einer Messung an einem beliebigen Bereich innerhalb der konvexen Hülle des Probengitters abschätzen. Als Interpolationsverfahren kommen neben dem Standardverfahren des sogenannten Krigings auch eine Interpolation mit neuronalen Netzen, Support Vector Machines und Continuous Global Surfaces (CGS) in Frage.

#### 2.9.2.1 Kriging

Das sogenannte Kriging ist die Standardmethode zur Lösung der Fragestellung der Interpolation räumlicher Daten. Unter dieser Bezeichnung wird eine Reihe von Interpolationsverfahren zusammengefasst. Das einfachste Verfahren besteht in der Annahme, dass der Schätzer für einen Probenmittelwert als Linearkombination der gemessenen Werte angesetzt werden kann[27]:

$$(97) \quad z_0^* = \sum_{i=1}^n \lambda_i z(x_i)$$

Ferner wird angenommen, dass der Schätzer erwartungstreu ist und der mittlere quadratische Fehler ein Minimum annimmt. Dazu ist es notwendig, Gaußverteilung und konstante Varianz über alle Messungen anzunehmen:

- a.  $z_0^*$  ist erwartungstreu, d.h.  $E[z_0^* - z_0] = 0$
- b. der mittlere quadratische Fehler  $E[z_0^* - z_0]^2 = \min$

Bei Abwesenheit eines Trends ist dann folgendes Gleichungssystem zu lösen:

$$(98) \quad \sum_{j=1}^N \lambda_j \gamma(x_i - x_j) + \mu = \gamma(x_i - x_0)$$

für  $i=1, \dots, N$

$$(99) \quad \sum_{j=1}^N \lambda_j = 1$$

Die Kriging-Schätzvarianz ergibt sich dann aus:

$$(100) \quad \sigma_K^2 = \text{Var}(z_0^* - z_0) = \mu + \sum_{i=1}^n \lambda_i (x_i - x_0)$$

Dieses Verfahren setzt einen konstanten Wert der zu schätzenden Größe im Beobachtungsgebiet voraus. In den meisten Fällen muss jedoch mit instationären Variablen gearbeitet werden, was einen allgemeineren Ansatz für den Mittelwert voraussetzt. Dieser wird im sogenannten Universal Kriging umgesetzt. Dies ist durch folgenden Ansatz für den Mittelwert realisiert:

$$(101) \quad m(x) = E[Z(x)]$$

$$(102) \quad Z(x) = m(x) + R(x) + \varepsilon$$

Meist wird für die Drift  $m(x, y)$  ein Polynom ersten oder zweiten Grades angesetzt. Die Variable  $R(x, y)$  ist eine regionalisierte Variable mit verschwindendem Erwartungswert und Variogramm  $\gamma(h)$ .  $\varepsilon$  ist eine gaußverteilte Variable mit Erwartungswert Null.

Andere Interpolationsverfahren:

Außer dem Kriging können auch andere Interpolationsverfahren für die räumliche Interpolation von Messdaten verwendet werden, wie z.B. neuronale Netze. Für die Interpolation häufig verwendete Verfahren sind:

### 2.9.2.2 Support Vector Machines:

Die SVM können in Form von Support Vector Regression-Verfahren wie oben beschrieben auch auf Interpolationsprobleme angewandt werden. Dazu sind sie lediglich für Funktionen von  $R$  nach  $R^2$  anzupassen.

### 2.9.2.3 Continuous global surfaces (CGS):

Bei den Continuous Global Surfaces (CGS) handelt es sich um stetige Funktionen von  $R^2$  nach  $R$ , die als Lösungen eines Variationsintegrals ähnlich wie bei Splines verstanden werden [1][12][13][14][15][16][17]. Diese werden als Entwicklungsfunktionen von Reihen verwendet. Diese Reihe, ergänzt um ein Polynom, ist der Interpolationsansatz für die CGS- Interpolation.

Als Interpolationsansatz wird folgende Reihe verwendet:



$$(103) \quad s = p + \sum_{i=1}^m \lambda_i \Phi(\cdot, x_j)$$

Dabei ist  $P(x, y)$  ein Polynom und  $\Phi(\cdot, x_j)$  ist eine CGS-Funktion. Damit nicht mehr freie Variablen als Messwerte vorhanden sind, muss folgende Nebenbedingung erfüllt sein:

$$(104) \quad \sum_{j=1}^m \lambda_j q(x_j) = 0$$

Die CGS-Splines können dabei über verschiedene Variationsintegrale definiert werden:

$$(105) \quad J(s) = \iint_{\mathbb{R}^2} \sum_{i=0}^{m+1} \binom{m+1}{i} \left( \frac{\partial^{m+1} s}{\partial x^i \partial y^{m+1-i}} \right)^2 dx dy$$

für Thin-Plate Splines

$$(106) \quad J(s) = \sum_{k=0}^{\infty} \sum_{\vec{a}: |\vec{a}|=k} B_{\vec{a}} \iint_{\mathbb{R}^2} \left( \frac{\partial^{|\vec{a}|} s}{\partial x^{a_x} \partial y^{a_y}} \right)^2 dx dy$$

mit

$$(107) \quad \vec{a} = (a_x, a_y), |\vec{a}| = a_x + a_y, B_{\vec{a}} = \frac{|\vec{a}|! \delta^{-2|\vec{a}|}}{[a_x! a_y! (|\vec{a}| - 1)!]} \text{ für } |\vec{a}| \neq 0, B_{\vec{a}} = 0 \text{ sonst}$$

Die am häufigsten verwendeten CGS-Funktionen sind:

Thin-Plate Splines:

$$(108) \quad \phi(r) = r^2 \ln r$$

Tension Splines:

$$(109) \quad \phi(r) = \ln[(r\delta)^2] + E_1[(r\delta)^2] + \gamma$$

Die Interpolation der Messwerte wird wie folgt durchgeführt. Es wird im Folgenden angenommen, dass die Messwerte gaußverteilt und von konstanter Varianz sind.

Dann kann man verschiedene Interpolations- und Fitting-Methoden definieren:

a. Einfache Interpolation:

Die zu erfüllende Gleichung ist:

$$(110) \quad s(\vec{x}_n) = f_n$$

Das ergibt zusammen mit dem obigen Interpolationsansatz folgendes System:

$$(111) \quad \begin{bmatrix} \mathbf{A} & \mathbf{P} \\ \mathbf{P}^T & \mathbf{0} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \boldsymbol{\lambda} \\ \mathbf{a} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \mathbf{f} \\ \mathbf{0} \end{bmatrix}$$

bzw.

$$(112) \quad \mathbf{C}\boldsymbol{\mu} = \mathbf{z}$$

mit:

$$(113) \quad \mathbf{C} = \mathbf{Q}_2^T \mathbf{A} \mathbf{Q}_2, \mathbf{z} = \mathbf{Q}_2^T \mathbf{f}, \boldsymbol{\lambda} = \mathbf{Q}_2 \boldsymbol{\mu}$$

Interpolation von verrauschten Daten:

Falls die Daten stochastisch sind, gilt folgendes:

$$(114) \quad f_n = y_n + \varepsilon_n$$

Als zu minimierende Größe ergibt sich unter den oben genannten Voraussetzungen der MSE.

Um ein Over- bzw. Underfitting zu vermeiden, muss eine Penalty-Funktion hinzuaddiert werden:

$$(115) \quad \min_s \sum_{s=1}^N [f_n - s(\mathbf{x}_n)]^2 + \nu J(s)$$

Diese ergibt sich für Thin-Plate Splines zu:

$$(116) \quad J(s) = \iint_{\mathbb{R}^2} \left[ \left( \frac{\partial^2 s}{\partial x^2} \right)^2 + 2 \left( \frac{\partial^2 s}{\partial x \partial y} \right)^2 + \left( \frac{\partial^2 s}{\partial y^2} \right)^2 \right] dx dy$$

Berücksichtigt man dies im Gleichungssystem, so ergibt sich:

$$(117) \quad \begin{bmatrix} (\nu \mathbf{I} + \mathbf{A}) & \mathbf{P} \\ \mathbf{P}^T & \mathbf{0} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \boldsymbol{\lambda} \\ \mathbf{a} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \mathbf{f} \\ \mathbf{0} \end{bmatrix}$$

Die Größe  $\nu$  gibt den Grad der Generalisierung wieder. Ist  $\nu$  zu klein, so liegt ein Overfitting vor, ist es zu groß, so liegt ein Underfitting vor. Eine Methode, diese Größe zu bestimmen, geht über folgende Gleichung:

$$(118) \quad G(\nu) = \frac{(N - K) \mathbf{z}^T (\mathbf{C} + \nu \mathbf{I})^{-2} \mathbf{z}}{[\text{tr}([\mathbf{C} + \nu \mathbf{I}]^{-1})]^2}$$

Diese Größe muss zur Bestimmung des  $\nu$  minimiert werden.

Interpolation von verrauschten Daten, wenn die Anzahl der Datenpunkte kleiner als die Anzahl der Reihenglieder ist:

Die oben angegebenen Gleichungen lassen sich nur dann exakt lösen, wenn die Anzahl der Datenpunkte größer, als die Anzahl der Reihenglieder ist. Um auch im umgekehrten Fall eine Lösung approximieren zu können, muss die Methode für die Auflösung der linearen Gleichung abgeändert werden. Dazu wird statt der exakten Auflösung der Gleichung

$$(119) \quad \min_{\lambda, a} : (\mathbf{f} - \mathbf{P}\mathbf{a} - \mathbf{A}\lambda)^T (\mathbf{f} - \mathbf{P}\mathbf{a} - \mathbf{A}\lambda) + \nu \lambda^T \mathbf{\Omega} \lambda$$

eine approximative Lösung durch Minimierung der Differenz der beiden Seiten dieser Gleichung gesucht.

Man erhält:

$$(120) \quad \min_{\mu} \|\mathbf{z} - \mathbf{C}\mu\|$$

### 2.9.3 Zeitreihenanalysen

Bei den Zeitreihenanalysen werden Messdaten zu verschiedenen Zeiten an immer der gleichen Stelle erhoben. Notiert man die Messdaten und die zugehörigen Zeiten, so erhält man zwei Zeitreihen, die mit verschiedenen Methoden in ihrem zukünftigen Verlauf abgeschätzt werden können.

Eine Zeitreihe kann mithilfe verschiedener Methoden extrapoliert werden [7][101][102][90][119].

#### Neuronale Netze

Das generelle Verfahren zur Extrapolation von Zeitreihen mit neuronalen Netzen kann in zwei Abschnitte unterteilt werden:

##### Trainingsabschnitt:

Es wird ein zusammenhängender Teilabschnitt der Messreihe als Eingabewert und der diesem Teilabschnitt folgende Wert als Ausgabe des Netzes zum Training verwendet. Nach diesem Trainingsschritt wird der erste Wert des letzten verwendeten Teilabschnitts weggelassen und der dem Teilabschnitt nachfolgende Wert angehängt. Dies ist die Eingabe für den nächsten Trainingsschritt. Die Ausgabe ist der diesem Abschnitt folgende Wert. Diese Ein- und Ausgabe wird für den nächsten Trainingsschritt verwendet. Für spezielle Netze, welche eine Art „Gedächtnis“, wie z.B. durch eine verzögerte Rückkopplung wie beim Elman-Netzwerk haben, wird die Anpassung des Netzes bei jedem Schritt besser.

##### Vorhersageschritt:

Aus dem letzten Teilabschnitt, der als Eingabe für das Netz verwendet wurde, wird der nachfolgende Wert der Reihe abgeschätzt und an die bestehende Reihe angehängt. Es wird für den nächsten Schritt wieder ein Trainingsschritt einschließlich des neu hinzugekommenen vorhergesagten Wertes durchgeführt. Die so gewonnenen Werte sind die vorhergesagte Reihe.

Die verwendeten Netze sind die folgenden:

#### 2.9.3.1 Backpropagation-Netzwerk:

Das Backpropagation-Netzwerk besteht aus drei Schichten, welche ohne Rückkopplung hintereinander verknüpft sind.

Die Eingabeschicht erhält einen Vektor  $\mathbf{p}$  gebildet aus dem Teilabschnitt der Zeitreihe, welcher für die Eingabe verwendet werden soll. Die einzelnen Werte des Input-Vektors werden mit den Kantengewichten der Verbindungen des Netzes multipliziert. Zum Ergebnis wird der Wert eines Bias-

Vektors addiert. Das Resultat wird mithilfe einer frei wählbaren Funktion, der Transferfunktion, in das endgültige Rechenergebnis der Schicht umgerechnet. Mehrere solcher Schichten bilden zusammen das Backpropagation-Netzwerk.

Als Transferfunktion wird meistens die tansig-Funktion in der ersten versteckten Schicht verwendet. Die zweite Schicht enthält hier die lineare Übertragungsfunktion.

Das Training dieses Netzwerks besteht in der Anpassung der Kantengewichte  $w$  des Netzwerkes.

Als Fehlermaß für die Anpassung des Netzes wird hier die mittlere quadratische Abweichung (MSE) verwendet, da davon ausgegangen werden kann, dass die Varianz aller Messwerte gleich groß ist.

Das Training des Netzes kann mit verschiedenen Methoden erfolgen, von denen zwei vorgestellt werden sollen. Eine ist die Backpropagation-Methode. Es handelt sich dabei um ein Gradienten-Abstiegsverfahren. Die Kantengewichte werden dabei in die Richtung verändert, in der das zugehörige Fehlermaß am stärksten abfällt. Die Kantengewichte ändern sich dabei nach folgender Beziehung bei jedem Schritt:

$$(121) \quad \vec{x}_{k+1} = \vec{x}_k - \alpha_k \vec{g}_k$$

Diese Methode kann jedoch je nach Problemstellung rechenzeitintensiv werden. Deshalb wurde das Verfahren weiterentwickelt von Levenberg und Marquardt.

Dieses Verfahren baut auf der recht schnellen Methode von Newton zum Finden einer Nullstelle auf. Diese Quasi-Newton Verfahren verwenden zur Änderung der Kantengewichte zusätzlich die Hesse-Matrix zur Änderung der Kantengewichte. Da die Berechnung dieser Matrix rechenzeitintensiv ist, wird beim Levenberg-Marquardt-Verfahren die Hesse-Matrix durch die Jakobi-Matrix angenähert mithilfe der folgenden Beziehung:

$$(122) \quad \vec{x}_{k+1} = \vec{x}_k - [J^T J + \mu I]^{-1} J \vec{e}$$

Da die Berechnung der Jakobi-Matrix schneller ist, aber die Annäherung an die Hesse-Matrix sehr gut ist, konvergiert das Verfahren recht schnell.

### 2.9.3.2 Elman-Netzwerk:

Das Elman-Netzwerk hat die gleiche Struktur, wie das Backpropagation-Netzwerk mit Ausnahme einer verzögerten Rückkopplung zwischen der Ausgabe der versteckten Schicht nach der Transferfunktion und der Addition vor der Transferfunktion. Somit ist dieses Netzwerk ein rekurrentes Netzwerk. Mithilfe dieser Rückkopplung wird eine Art „Gedächtnis“ realisiert, mit dem bei Zeitreihenanalysen aus der Autokorrelation der Reihe eine Struktur erkannt wird.

Wie das Backpropagation-Netzwerk kann dieses Netz jede beliebige stetige Funktion mit einer endlichen Anzahl von Sprungstellen mit beliebiger Genauigkeit approximieren (Weierstraßer Approximationssatz). Zusätzlich wird jedoch nach jedem Trainingsschritt die Ausgabe der ersten Schicht in der Verzögerungsschleife gespeichert und im nächsten Trainingsschritt weiter verwertet. Auf diese Weise können Informationen von einem Trainingsschritt gespeichert und im nächsten wiederverwendet werden.

Das Training selbst kann mit denselben Methoden geschehen, wie beim Backpropagation-Netzwerk.

## 2.9.4 Korrelationsanalysen

Um Schlussfolgerungen über den Zusammenhang von Schadstoffeintrag in die Umwelt und den Auswirkungen auf die Ökologie ziehen zu können, muss der Zusammenhang zwischen chemischen Parametern wie Schadstoffkonzentrationen und biologischen Parametern wie Anzahl von Mikroorganismen bestimmt werden. Dazu dienen Korrelationsanalysen zwischen diesen Messwerten.

### Standard-Korrelationsanalyse

Bei der Standardkorrelationsanalyse wird ein linearer Zusammenhang zwischen den gemessenen Zufallsvariablen angenommen. Ein Maß für die Stärke dieses Zusammenhangs ist der Korrelationskoeffizient, der aus der Kovarianz und den Varianzen der Messdaten nach folgender Beziehung bestimmt wird:

$$(123) \quad R := \frac{\sum_{j=1}^n (X_j - \bar{X})(Y_j - \bar{Y})}{\left(\sum_{j=1}^n (X_j - \bar{X})^2 (Y_j - \bar{Y})^2\right)^{1/2}}$$

Je näher der Betrag dieser Größe bei 1 liegt, desto stärker ist der funktionale Zusammenhang zwischen den beobachteten Messwerten. Liegt der betrachtete Wert nahe bei 0, so kann kein linearer funktionaler Zusammenhang zwischen den Zufallsvariablen bestimmt werden.

Dieser aus den Messwerten bestimmte Korrelationskoeffizient ist eine Schätzung, der mithilfe der folgenden Beziehung noch genauer abgeschätzt werden kann[114]:

$$(124) \quad r^* = r \left[ 1 + \frac{1 - r^2}{2(n - 3)} \right] \text{ für } n > 7$$

Um zu bestimmen, ob die Abweichungen zwischen dem so bestimmten Korrelationskoeffizienten und einem vorgegebenen Wert rein zufällig sind oder nicht, kann der Korrelationstest durchgeführt werden:

$$(125) \quad \frac{R\sqrt{n-2}}{\sqrt{1-R^2}} > t_{\alpha, n-2}$$

Generell muss bei einer Korrelationsanalyse darauf geachtet werden, dass es neben echten Korrelationen auch Scheinkorrelationen gibt, die alle ausgeschlossen werden müssen, um eine echte Korrelationsaussage machen zu können. Aus dem Vorliegen einer Korrelation zwischen zwei Zufallsvariablen kann noch nicht unmittelbar auf eine kausale Korrelation zwischen den Variablen geschlossen werden. Vielmehr können folgende Fälle auftreten:

### Formale Korrelation:

Eine formale Korrelation zweier Variablen liegt vor, wenn der Korrelationskoeffizient im Sinne des Korrelationstests ein positives Ergebnis erbracht hat. Liegt kein positives Ergebnis dieses Tests vor, so kann eine Korrelation der Variablen unter den oben genannten Voraussetzungen ausgeschlossen werden. Falls ein positives Ergebnis vorliegt, so muss weiter geprüft werden, ob eine der folgenden Möglichkeiten vorliegt.

Inhomogenitätskorrelation:

Eine Inhomogenitätskorrelation liegt vor, wenn in wenigstens eine der beiden Variablen für die Korrelationsanalyse die Werte von mehreren unabhängigen Variablen miteinander vermischt werden und mit diesen Variablen eine Korrelationsanalyse durchgeführt wird. Dieser Fehler kann auch eine vorhandene Korrelation verdecken.

Gemeinsamkeitskorrelation:

Eine Gemeinsamkeitskorrelation besteht zwischen Variablen, die von einer gemeinsamen Zufallsvariablen abhängen, jedoch selbst nicht ursächlich miteinander verknüpft sind.

Erst wenn geprüft worden ist, ob nicht eine dieser Möglichkeiten einer Korrelation vorliegen, kann auf das Vorliegen einer echten kausalen Korrelation geschlossen werden.

### **3. Methoden**

#### **3.1 Meßgeräte und -aufbauten**

##### **3.1.1 Aufbau des TIRF-Messgeräts**

Das TIRF-Messgerät, welches im AWACCS-Projekt verwendet wurde, besteht aus den IO-Chips, welche das Laserlicht zur Anregung der Fluoreszenz mittels Y-Verzweigern in verschiedene Wellenleiter leitet. Jeder Wellenleiter ist mit verschiedenen in äquidistanten Abständen aufbrachten sensitiven Schichten beschichtet. Das Fluoreszenzlicht von den verschiedenen sensitiven Schichten wird mit Wellenleitern aus einem Polymer an die jeweilige Diode geleitet. Die Intensität dieses Lichts wird von den Dioden gemessen. Es liegt eine temperaturstabilisierter Aufbau vor. Die Temperaturstabilisierung wird durch entsprechende temperaturempfindliche sensitive Schichten auf dem Chip erreicht.

##### **3.1.2 Messaufbau**

Der Messaufbau zur Charakterisierung der passiven Mach-Zehnder-Chips zeigt Abb.4 [110][111]. Schematisch besteht der Aufbau aus einem He-Ne-Laser als Lichtquelle. Über einen Polarisator wird das Laserlicht in die rechte Seite des Chips mit einer Single-Mode-Faser eingekoppelt. Dort durchläuft es die beiden Arme des Mach-Zehnder-Interferometers. Am anderen Ende des Interferometers befindet sich eine Multimode-Faser, die den in den geführten Moden erzeugten Anteil des Lichtes zur Photodiode weiter leitet. In dieser Diode wird dann die Intensität des Lichtes gemessen. Den Aufbau zeigt Abb.5.

Der zu vermessende Analyt wird mithilfe einer Flusszelle über den Chip gepumpt. Diese bildet mit dem Chip einen Kanal von ca. 30 µm Höhe. Durch diesen Kanal wird der Analyt mithilfe der Pumpe durch das Ventil über den Chip gepumpt. Die zuverlässigsten Messergebnisse erhält man hierbei bei niedrigen Pumpgeschwindigkeiten.

Das Ventil hat acht elektronisch ansteuerbare Ausgänge und einen Eingang. Vier werden für den Analyten verwendet. Ein Ausgang ist mit der Flusszelle verbunden. Er dient dazu, den Analyten über den Chip zu pumpen. Ein weiterer Aus-/Eingang ist mit dem Behälter für die Regenerationsflüssigkeit verbunden. Diese dient dazu, die sensitive Oberfläche des Chips nach einer Messung wieder

vollständig zu regenerieren. Denn nach einer Messung sind die Bindungsstellen der sensitiven Oberfläche mit Antikörpern z.T. belegt, die vor der nächsten Messung entfernt werden müssen.

Schließlich gibt es dann noch einen Ausgang zum Abfallbehälter. Der mittlere Anschluss des Ventils ist mit dem PBS-Vorratsbehälter verbunden. Dieser enthält entgastes PBS mit einem pH-Wert von 7.4.

Alle Geräte des Aufbaus lassen sich mit einem Steuerprogramm vom Messrechner aus ansteuern. Dazu dient eine Software, die von der Firma UMS im Rahmen des MENDOS-Projektes entwickelt wurde.

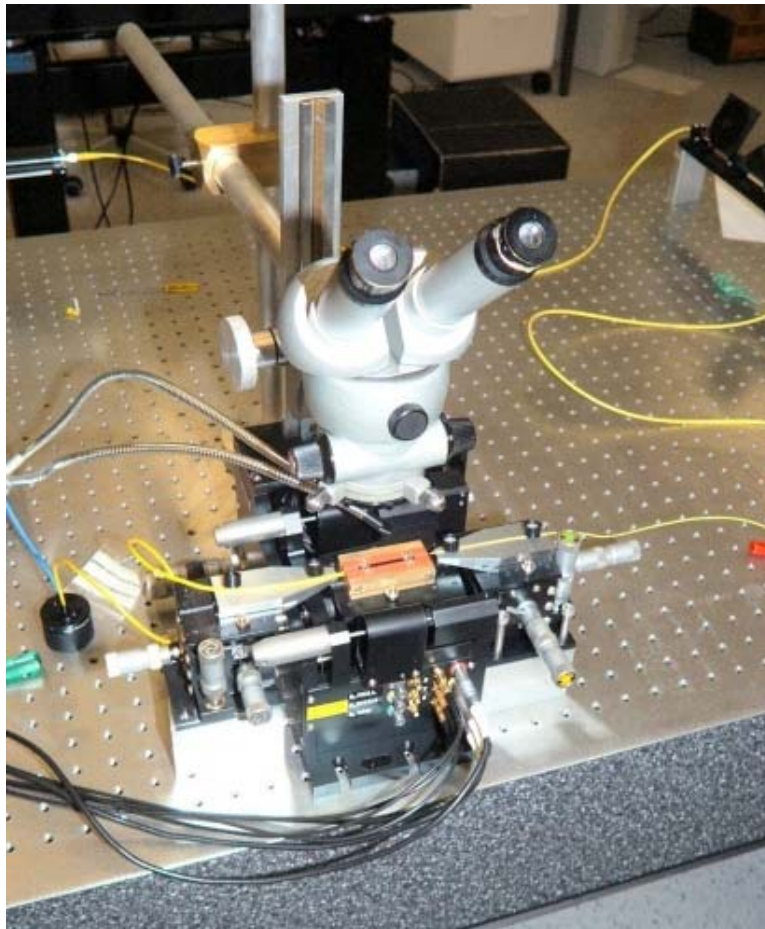


Abb.4: Mach-Zehnder-Versuchsaufbau mit eingebautem Chip ohne Flusszelle

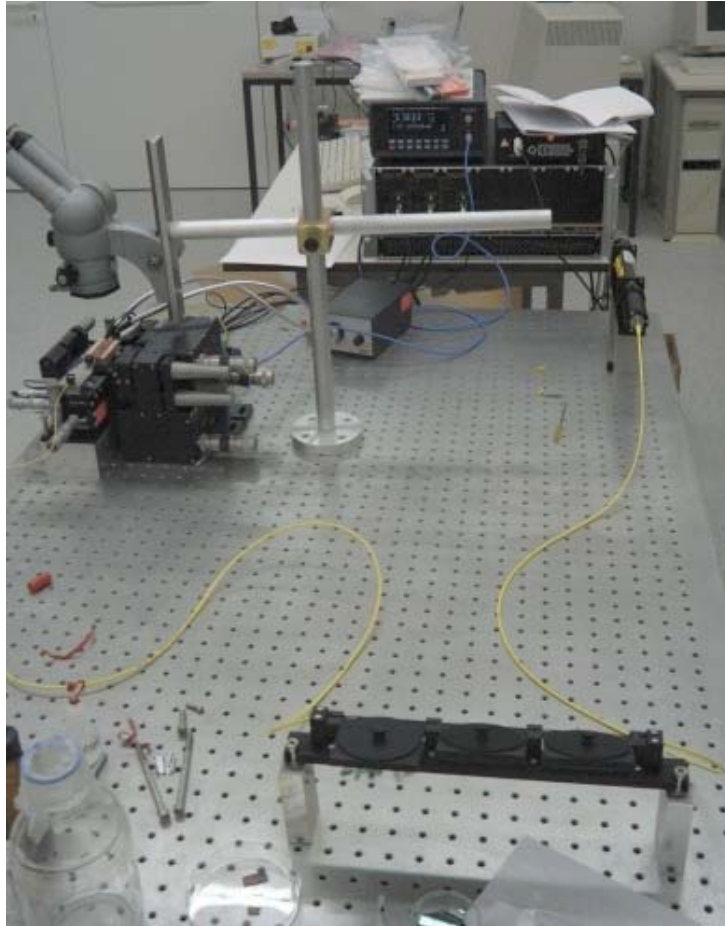


Abb.5 Übersicht über den gesamten Versuchsaufbau

Eine Messung läuft nun so ab, dass zunächst der Analyt aus einem der Behälter für den Analyten in die Probenschleife gesaugt wird. Das sind 1000  $\mu\text{l}$  Flüssigkeit. Dann wird der Analyt sehr langsam, d.h. mit einer Geschwindigkeit von 1  $\mu\text{l}/\text{sec}$  über den Chip gepumpt. Nach der Messung wird die gleiche Menge SDS zur Regeneration in die Probenschleife gesaugt und über den Chip gepumpt. Zwischen den einzelnen Phasen werden jeweils 1000  $\mu\text{l}$  PBS über den Chip gepumpt, um die einzelnen Messsignale der einzelnen Lösungen voneinander zu trennen.

Die verwendeten Standardchemikalien stammen von den Firmen Fluka, Neu-Ulm; Merck, Darmstadt oder Sigma-Aldrich, Deisenhofen. Die Chemikalien GOPTS und DIC wurden von Fluka, Neu-Ulm bezogen. Das Aminodextran, 170K MW, 66 amines/dextran wurde von Helix Research Company, Springfield, OR, USA bezogen (product # 1236). Die Atrazin- Antikörper IgG aus Schafen und die Atrazincapronsäure (ACA) stammen von Ram Abuknesha, Department of Life Sciences, Kings College, London.

Zur Durchführung des Bindungshemmtests werden weitere Chemikalien benötigt. Das sind phosphatgepufferte Kochsalzlösung hergestellt aus 8,76 g (150 mM) NaCl und 1,36 g (10 mM)  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  in doppelt gereinigtem Wasser (18,2 M $\Omega$  cm, SG, Barsbüttel) bei pH = 7,4. Diese Lösung muss vor der Benutzung mit doppelt gereinigtem Wasser 10-fach verdünnt und entgast werden.



Für die Regeneration wird eine Natriumlaurylsulfat-Lösung mit doppelt gereinigtem Wasser auf 0,5-Vol.-% verdünnt und mit konzentrierter Salzsäure auf pH= 1,8 eingestellt. Diese Lösung muss vor der Verwendung entgast werden.

Die Antikörper-Lösung wird durch Verdünnung der Reinsubstanz mit PBS hergestellt.

### **3.1.3 Geräte**

Für den Messaufbau wurden folgende Geräte verwendet:

Lichtquelle: Als Lichtquelle wurde ein Helium-Neon-Laser mit 15 mW Ausgangsleistung verwendet, dessen Licht durch einen Faraday-Isolator geleitet wird, um störende Einflüsse auf den Laser durch reflektiertes Laserlicht zu verhindern, was die Intensität stabilisiert und das Laserlicht linear polarisiert.

Polarisationscontroller: Der Polarisationscontroller für 633 nm stammt von Thorlabs GmbH, Karlsfeld. Er dient zur Rotation der Schwingungsebene des polarisierten Lichts, um eine optimale Einkopplung der TE-Mode in den Wellenleiter durch Einstellen der optimalen Polarisationsrichtung zu ermöglichen.

MZI-Chips: Die passiven Mach-Zehnder-Chips wurden von der Firma LioniX BV, Enschede, Niederlande, hergestellt. Ihr Aufbau gleicht dem in [33] beschriebenen, jedoch ohne die elektrooptische Korrektur.

Halterung für die Chips: NanoMaxHS von Melles-Griot dient zur Ausrichtung der Chips und der Glasfasern für das Pigtailling der Chips.

Flusszelle: Die Flusszelle für den Versuchsaufbau wurde in verschiedenen Varianten nach eigenen Zeichnungen gefertigt. Über Bohrungen an den Enden erfolgt der Zu- und der Abfluss des Analyten in den ca. 30 µm hohen Flusskanal über dem Chip. Die Abdichtung des Flusskanals erfolgt durch eine ca. 0.7 mm dicke Dichtung aus weichem Silikonmaterial. Die Stärke dieses Materials muss dabei vor jeder Herstellung geprüft werden, da diese Silikonmatten durch Aufsprühen von Silikon auf eine ebene Fläche hergestellt werden und daher in ihrer Stärke variieren.

Diese Dichtung wird mit der Flusszelle auf den Chip gedrückt und bildet zusammen mit der Flusszelle den Flusskanal auf dem Chip.

Pumpe: Als Pumpe wird eine Hamilton Microlab 500B mit 100 µl Spritzen für wässrige Lösungen bzw. mit 250 µl Spritzen für salzhaltige Lösungen verwendet.

Ventil: Als Ventil wird ein 8-Wege-Ventil mit Mittenanschluss MVP von Hamilton verwendet.

Detektor: Als Detektor für die Lichtintensität am Ausgang des Chips wird eine Silizium- Diode 818-SL am Leistungsmessgerät 2832-C beide von Newport verwendet. Die Verbindung zwischen dem Chip und der Diode erfolgt über eine Multimode-Glasfaser für 633nm-Licht.

X-Y-Z- Positionierer: Der X-Y-Z- Positionierer jeweils an beiden Enden des Chips von Photon Control dient zum Heranführen und Ausrichten der Glasfasern an den Chip.

Halterung: Als Halterung für den Chip und die Flusszelle dient ein nach eigenen Zeichnungen hergestellter Messinghalter.

Glasfasern: Für die Lichtleitung zwischen den einzelnen Geräten wurden folgende Glasfasern verwendet:

- Single-Mode-Glasfaser FS-SN-3224 von Thorlabs zur Verbindung von Laser und Polarisationscontroller und zur Verbindung von Polarisationscontroller und Chip.
- Multi-Mode-Glasfaser (Gradientenindex) GIF 625-100 von Thorlabs zwischen Mach-Zehnder-Interferometer und Detektor.

Zur Präparation dienten zusätzlich folgende Geräte:

F-BK2 Optical Fiber Cleaving Tool von Thorlabs zum Abschneiden der Glasfasern

T06S13 Fiber Stripping Tool von Thorlabs zum Entfernen der Schutzschicht der Glasfasern

Linsentücher MC-5 von Thorlabs zum Reinigen der Fasern

UV75 Curing Light von Thorlabs zum Aushärten des Klebers

### **3.1.4 Einbau der Chips**

Die fertig präparierten Chips werden auf die Messinghalterung in die Nut für die Chips vorsichtig mit einer Pinzette in die richtige Position mit der sensitiven Schicht an der Ausströmungsrichtung gelegt. Nach Kontrolle der Dicke des Dichtungsmaterials auf 0,7 mm wird mithilfe einer Schablone oder direkt mit der Unterseite der PMMA-Flusszelle ein Dichtungsring in Form eines Rechteckes mit einem Bodenmesser ausgeschnitten. Mithilfe eines Tropfens destillierten Wassers kann der Dichtungsring in die vorgesehene Nut mit der Adhäsionskraft angebracht werden, ohne dass diese beim Umdrehen der Flusszelle herunterfällt. Nach vorsichtigem Aufsetzen der Flusszelle wird diese mit vier Kreuzschlitzschrauben auf dem Chiphalter über dem Chip vorsichtig befestigt. Dabei ist beim Festziehen immer wieder die Dichtheit mithilfe der Fluidik zu kontrollieren. Ferner dürfen die Schrauben nur vorsichtig und gleichmäßig in allen vier Ecken festgezogen werden, da sonst durch ungleichmäßige Kräfteverteilung der Chip brechen kann.

Nach dem Einbau des Chips in die Flusszelle müssen die Glasfasern an die Wellenleiter befestigt werden. Dazu werden von einem Objektträger mehrere Glasteile mit einer maximalen Breite von ca. 4 mm mit einem Glasschneider abgetrennt. Diese dienen dazu, die Glasfasern in den V-Gruben beim Pigtailling zu halten. Desweiteren werden die Glasfasern zum Pigtailling vorbereitet, indem sie mit dem Bodenmesser von ihrer Schutzhülle und dem Kevlar-Gewebe vorsichtig befreit werden. Die innere Ummantelung wird mit einem einstellbaren Abisolierer entfernt. Mithilfe des Fiber Stripping Tools wird die Schutzschicht auf der freiliegenden Glasfaser entfernt und die freiliegende Glasfaser mit Alkohol und einem Linsentuch gereinigt. Danach wird diese mit dem Glasfaserschneider auf die richtige Länge abgeschnitten. Auf der Einkoppelseite kann die Schnittfläche kontrolliert werden, indem das Laserlicht durch die Faser geschickt wird und auf ein Stück Papier projiziert wird. Ergibt sich eine gleichmäßig ausgeleuchtete Fläche, so ist die Faser glatt und senkrecht zur Faserrichtung abgeschnitten. Dieselbe Prozedur wird mit der Faser auf der Auskoppelseite durchgeführt.

Die Faserenden werden an den Chip mithilfe der Positionierer in den V-Gruben unter Sichtkontrolle mit dem Mikroskop an die Enden de Wellenleiter am Chip herangeführt. Dabei ist zu beachten, dass das Laserlicht während der Beobachtung durch das Mikroskop ausgeschaltet ist. Sobald die Glasfaser am Wellenleiter anstößt, wird mit einer Stecknadel ein Tropfen des UV-Klebers auf die V-Grube aufgebracht. Danach wird eines der vorbereiteten Glasstückchen vorsichtig auf die V-Gruben gelegt. Nach Durchführung dieser Prozedur für beide Seiten des Chips wird das Laserlicht und die Photodiode eingeschaltet und das LabView-Messprogramm gestartet. Dieses zeigt nun die Intensität am Ausgang des Chips an. Die Mikrometerschrauben an den Positionierern an beiden Enden werden nun in allen drei Raumrichtungen solange behutsam gedreht, bis ein Maximum der Intensität am Ausgang erreicht wird. Durch die Glasplättchen werden die Glasfasern auch bei einer Veränderung der z-Richtung am Wellenleiter gehalten. Die Glasfasern werden dann schräg an den Wellenleiter geführt. Meist ergibt sich bei einem Winkel von ca.  $30^\circ$  zwischen Wellenleiter und Chipebene am Übergang zwischen Wellenleiter und Faser ein Maximum an Einkoppeleffizienz. Sobald das Maximum erreicht ist, kann der UV- Kleber mit der UV75-Lampe fixiert werden. Dabei ist die UV-Schutzbrille zu verwenden. Die Einkoppeleffizienz kann durch Verändern der Polarisationsrichtung am Polarisator weiter verbessert werden.

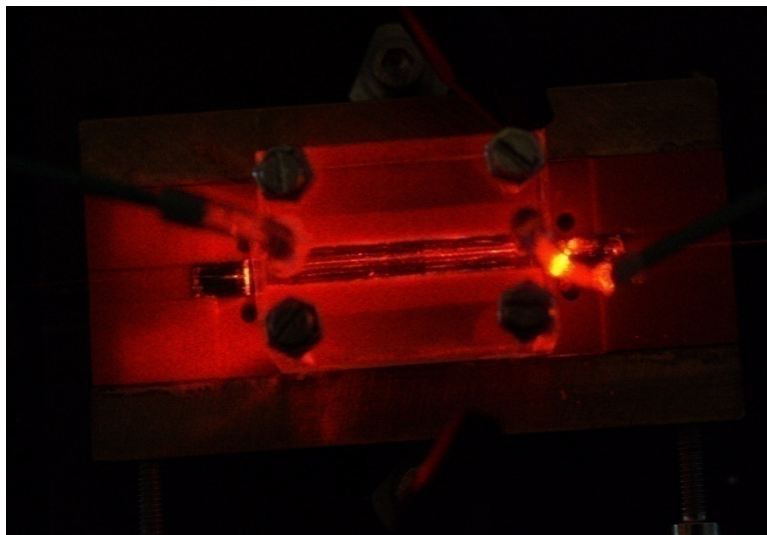


Abb.6: Chip mit eingekoppelter Glasfaser und Flusszelle

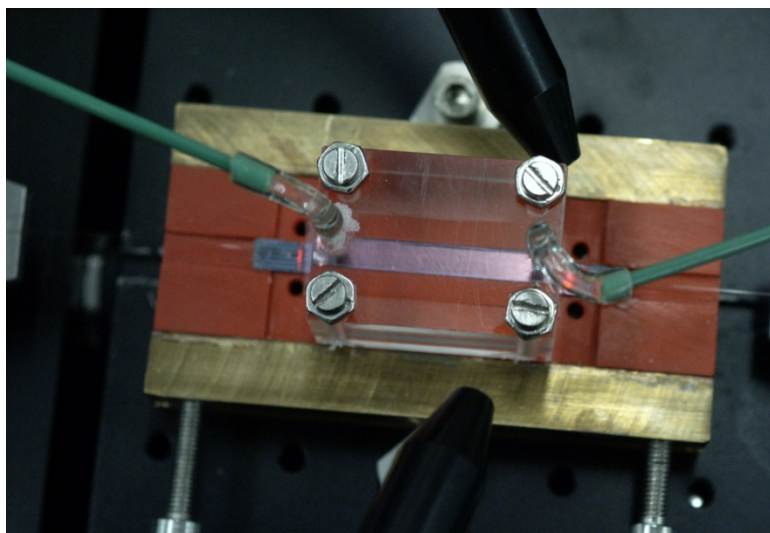


Abb.7: Chip mit Flusszelle

### 3.1.5 Präparation der Fluidik

Nach Anschluss aller entgasten Flüssigkeiten werden mit einem PBS-Spülvorgang alle Schläuche alle Luftblasen im System entfernt. Die Proben werden in frischen Cups vorbereitet. Die Probenschläuche werden mit destilliertem Wasser an den Enden äußerlich gereinigt und in die mit einer Pinzette vorbereiteten Löcher in den Deckeln der Cups in die Cups eingeführt. Wenn die Löcher nicht zu groß sind, werden die Schläuche in den Cups gehalten[110]. Der Einfluss der Fluidik und ihrer Parameter ist im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter untersucht worden [29][30][71].

### 3.1.6 Oberflächenpräparation der Chips

Die Chips werden zur Präparation der  $\text{Si}_3\text{N}_4$ -Oberfläche zunächst für 30s in den Plasmaverascher gelegt und in einer  $\text{O}_2$ -Atmosphäre oxidiert. Durch diesen Vorgang wird auf der  $\text{Si}_3\text{N}_4$ -Oberfläche der Fenster eine geringe Menge Sauerstoff in der Oberfläche eindiffundiert, was die Bildung von OH-Gruppen an der Oberfläche zur Folge hat. Ferner werden alle evtl. vorhandenen organischen Reste auf der Oberfläche durch Oxidation vernichtet [110]. An diese OH-Gruppen wird an die Oberfläche durch die Reaktion mit GOPTS eine silanisierte Oberfläche erzeugt. Dies geschieht, indem die Chips in eine leere Glaskammer gelegt werden und GOPTS mit einer Pipette auf den mittleren Teil aufgetragen wird. Der Glasbehälter wird verschlossen und eine Stunde stehen gelassen. Anschließend werden die Chips vorsichtig herausgenommen, mit trockenem Aceton abgespült, bis sich kein goldfarbenes Schimmern mehr zeigt, und im Stickstoffstrom getrocknet. Die hydrolyseempfindliche Oberfläche muss schnell weiter bearbeitet werden.

Die silanisierten Chips werden nun in eine mit Wasserdampf gesättigte Kammer gegeben und mit einer Lösung aus AMD in Wasser (Massenverhältnis 1:8) zwei Stunden lang bedeckt. Danach erfolgt Abspülen mit destilliertem Wasser und Trocknen im Stickstoffstrom.

Nach der Beschichtung mit AMD wird der Chip in eine Kammer mit gesättigter DMF- Atmosphäre gelegt und mit einer Lösung aus 1 mg ACA, 10 $\mu\text{L}$  trockenem DMF und 1,5  $\mu\text{L}$  trockenem DIC auf einer

Seite des Chips bedeckt. Nach ca. 15 Stunden Reaktionszeit wird der Chip mit DMF abgespült und im Stickstoffstrom getrocknet.

### 3.2 Weitere statistische Methoden

#### 3.2.1 Auswertung der Messungen

Die Auswertung der Messungen erfolgt anhand statistischer Methoden. Das Ziel der Auswertung ist die genaue Bestimmung wesentlicher Kenngrößen des gesamten Sensorsystems. Dazu ist zunächst eine optimale Kalibrierung des Systems notwendig. Dies erfolgt durch die Interpolation der Kalibriermessungen mithilfe verschiedener Kalibriermethoden. Aus den sich ergebenden Kalibrierkurven lassen sich dann mithilfe der standardisierten Definitionen die Kenngrößen des Sensorsystems bestimmen.

#### 3.2.2 Kalibriermethoden

Zur Kalibrierung sind Messungen mit Proben vorgegebener Konzentration durchzuführen. Die sich ergebenden Sensorsignale werden dann in einzelne Punkte einer Bindungskurve umgerechnet. Diese werden dann mit verschiedenen Interpolationmethoden zu einer Kalibrierkurve interpoliert.

Arbeitsbereich und Präzisionsprofil

Damit die Kalibrierkurve verwendet werden kann, muss der zulässige Bereich bestimmt werden, in dem diese gültig ist. Dies ist der Arbeitsbereich.

Es gibt mehrere Methoden, den Arbeitsbereich zu bestimmen. Meistens wird er für die vorliegenden Kalibrierkurven als den 10-90%-Bereich des dynamischen Signals angegeben. Eine andere Methode erfolgt über die Bestimmung des Präzisionsprofils und der Vergleich mit der Horwitz-Kurve. Das Präzisionsprofil wird aus den Standardabweichungen der Messwerte bestimmt. Mithilfe der Ableitung der Kalibrierkurve werden aus den Standardabweichungen der Messwerte die Standardabweichungen der Konzentrationen bestimmt[112].

$$(126) \quad y' = -\frac{p}{x} \frac{A_1 - A_2}{\left[1 + \left(\frac{x}{x_0}\right)^p\right]^2} \left(\frac{x}{x_0}\right)^p$$

$$(127) \quad s(x) = \frac{s(y)}{|y'|}$$

Diese Konzentrationen müssen kleiner als die durch die Horwitz-Kurve gegebenen Werte sein.

##### 3.2.2.1 Kalibrierung mit logistischen Kurven

Für die vorgegebenen Messkurven lassen sich sehr gut logistische Kurven einpassen. Diese haben die folgende Form:

$$(128) \quad y = \frac{A_1 - A_2}{1 + \left(\frac{x}{x_0}\right)^p} + A_2$$

Mit dieser Kurve werden die Messwerte interpoliert. Dazu wird der RMSE zwischen den Messwerten und der Kurve bestimmt. Die freien Parameter werden dann so schrittweise angepasst, dass der RMSE minimiert wird.

Hier wurde für die Interpolation der Messpunkte die Minimierung mithilfe des RMSE verwendet. Der Grund ist folgender:

Die eigentlich beste Anpassung der Kurve an die Messpunkte würde durch die  $\chi^2$ -Anpassung erfolgen, da dann eine Maximum-Likelihood-Schätzung der Parameter vorliegt. Da jedoch für die TIRF-Messungen die Standardabweichungen sehr klein sind, wirken sich kleine zufällige oder numerische Schwankungen sehr stark auf die Gewichtung der einzelnen Summanden in der  $\chi^2$ -Berechnung aus. Deshalb ergeben sich für die Parameter der Fit-Funktion falsche Werte bei einem  $\chi^2$ -Fit. Das könnte nur umgangen werden, wenn die Standardabweichungen exakt bekannt wären. Da aus den Messungen aber aufgrund der niedrigen Anzahl der Messungen nur grobe Schätzwerte für die Standardabweichung bekannt sind und eine Abschätzung mit dem F-Test mit der Irrtumswahrscheinlichkeit einen weiteren zusätzlichen willkürlichen Parameter einbringt, bleibt nur die Möglichkeit diese zufälligen Abweichungen durch Mittelwertbildung zu entfernen. Dazu gibt es zwei Wege:

- i. Es wird für alle Messwerte die gleiche mittlere Standardabweichung angenommen. Deren Schätzwert ergibt sich dann durch Mittelwertbildung aller gemessenen Standardabweichungen. Aus der Formel zur Berechnung von  $\chi^2$  fallen dann alle Gewichtungsfaktoren heraus und es bleibt die RMSE-Minimierung übrig.
- ii. Es wird statt der Gaußschen Verteilung eine Laplace-Verteilung [24][32] verwendet. Diese hat folgende Form:

$$(129) \quad p(x) = \frac{1}{2\Delta} \exp\left(-\frac{|x - \bar{x}|}{\Delta}\right)$$

Dabei ist  $\Delta$  der Schätzwert der mittleren Standardabweichung aus den Messungen und  $\bar{x}$  der Mittelwert der Variablen  $x$ . Dies ergibt sich mit der Maximum-Entropie-Methode und der folgenden Beziehung für Verteilungen, deren Parameter selbst Zufallszahlen mit bekannter Verteilung sind:

Sei  $p_1(x, s)$  die Verteilungsdichte der Zufallsvariablen  $x$ , welche von der Zufallsvariablen  $s$  als Parameter mit der Verteilungsdichte  $p_2(s)$  abhängt. Sei  $s \in [a, b]$ . Dann ist die beste Schätzung der Verteilungsdichte von  $x$ , die man nur aufgrund der Parameter von  $p_2(s)$  erhalten kann, gegeben durch:

$$(130) \quad \int_a^b p_1(x, s) p_2(s) ds = p(x)$$

Hier wird für  $p_1(x, s)$  die Gaußverteilung mit unbekannter Standardabweichung  $s$  und für  $p_2(s)$  eine Exponentialverteilung mit bekanntem Mittelwert angenommen.

Mithilfe dieser Laplace-Verteilung erhält man dann für die Minimierung den Absolutbetrag statt den RMSE als Distanzmaß.

### 3.2.2.2 Kalibrierung mit Support Vector Regression (SVR)

Die Methode der Support Vector Regression ist eine relativ neue Methode der Regression [2][23][25][28][91][92]. Sie stammt ursprünglich aus der künstlichen Intelligenz [93][94][95][97][98][99][100]. Die Methode besteht aus zwei Schritten. Im ersten Schritt wird ein nichtlineares Regressionsproblem mithilfe einer nichtlinearen Abbildung auf ein lineares Regressionsproblem zurückgeführt [107][108][73][88][89]. Diese so entstandene lineare Regressionsaufgabe wird dann mithilfe eines Fehlermaßes mit Standardmethoden gelöst [103][104][105][106]. Die Rücktransformation mit der Umkehrabbildung der nichtlinearen Abbildung führt dann zu einer optimalen Regressionsfunktion für das ursprüngliche Problem.

Die ursprüngliche Methode, das  $\varepsilon$ -SVR verwendet die lineare Regression mit einem Fehlermaß, das für Abweichungen zwischen Messwert und Funktion kleiner als eine vorgegebene Größe  $\varepsilon$  nicht empfindlich ist. Das ursprüngliche nichtlineare Problem wird mit einer nichtlinearen Abbildung auf dieses lineare Problem abgebildet.

#### 3.2.2.2.1 Lineares Regressionsproblem im höherdimensionalen Raum

Das lineare Regressionsproblem für den Datensatz  $(x_i, y_i)$  wird mithilfe einer Hyperebene interpoliert. Diese Ebene ist als Hesse-Normalform gegeben:

$$(131) \quad y = \langle w, x \rangle + b$$

Die zu bestimmenden Größen sind die Vektoren  $w$  und  $b$ . Dabei wird die Ebene so in den Datensatz gelegt, dass die sog.  $\varepsilon$ -insensitive Verlustfunktion minimiert wird. Diese ist folgendermaßen definiert:

$$(132) \quad |y - f(x)|_\varepsilon = \max(0, |y - f(x)| - \varepsilon)$$

Dieses Maß für den Regressionsfehler bewirkt im Vergleich zum gewöhnlichen Betrag eine Unempfindlichkeit des Regressionsverfahrens gegenüber Abweichungen kleiner als  $\varepsilon$  zwischen der Regressionsebene und den Datenpunkten. Dies ist insbesondere bei verrauschten Daten wichtig, um die Regression zu ermöglichen.

Somit erhält man folgendes Minimierungsproblem:

$$(133) \quad \frac{1}{2} |w|^2 = \min$$

$$(134) \quad y_i - \langle w, x_i \rangle - b < \varepsilon$$

$$(135) \quad \langle w, x_i \rangle + b - y_i < \varepsilon$$

Es kann nun vorkommen, dass dieses Minimierungsproblem nicht lösbar ist für ein vorgegebenes  $\varepsilon$ . Um trotzdem ein lösbares Minimierungsproblem zu erhalten, können sog. Slack-Variablen  $\xi_i, \xi_i^*$  eingesetzt werden. Diese Variablen werden durch den Algorithmus an das Problem angepasst und bewirken, dass die Optimierungsaufgabe lösbar wird. Das zu lösende Gleichungssystem hat dann folgende Form:

$$(137) \quad \frac{1}{2}|w|^2 + C \sum_{i=1}^l (\xi_i + \xi_i^*) = \min$$

$$(138) \quad y_i - \langle w, x_i \rangle - b < \varepsilon + \xi_i$$

$$(139) \quad \langle w, x_i \rangle + b - y_i < \varepsilon + \xi_i^*$$

$$(140) \quad \xi_i, \xi_i^* > 0$$

Die Konstante C muss im Voraus gewählt werden. Sie wird auf einen Wert zwischen 0 und 1 gesetzt. Die folgende Graphik veranschaulicht die Zusammenhänge graphisch.

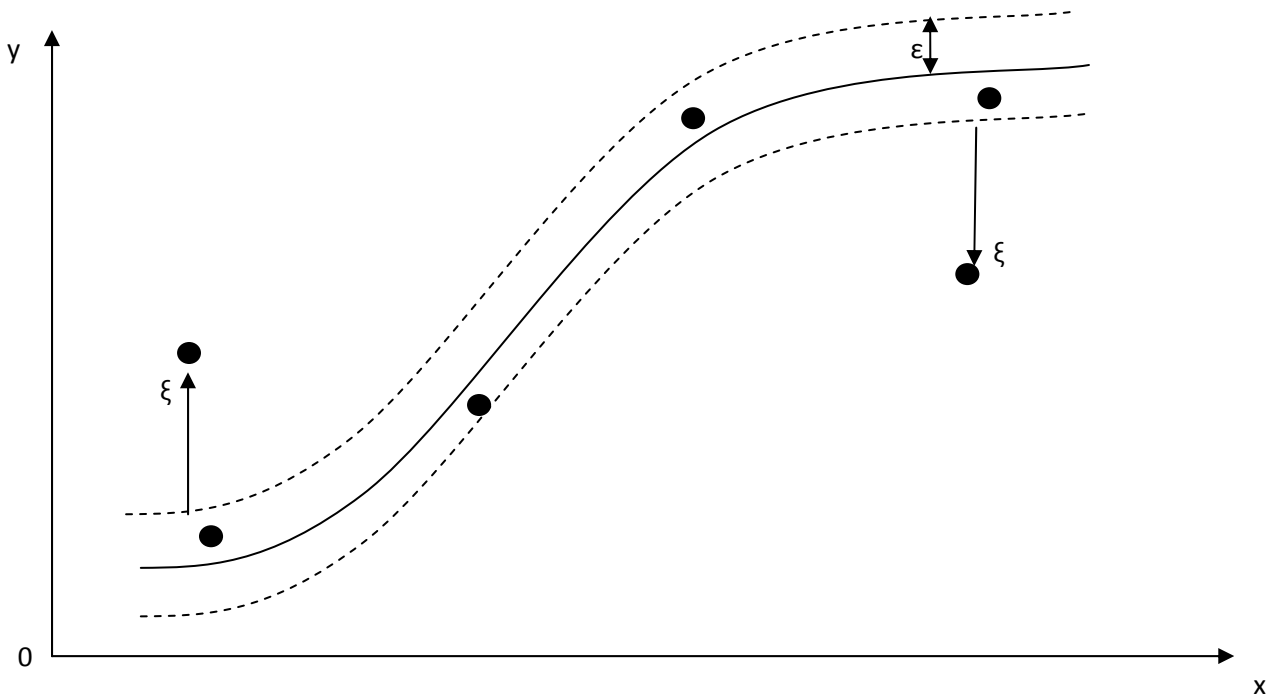


Abb.8: Regressionskurve mit  $\varepsilon$ -Band

Zur Vereinfachung der Berechnung wird das Duale dieser Minimierungsaufgabe gebildet. Dieses ergibt sich durch Ableiten der obigen Lagrange - Funktion. Man erhält das folgende Maximierungsproblem:

$$(140)L := \frac{1}{2}|w|^2 + C \sum_{i=1}^l (\xi_i + \xi_i^*) - \sum_{i=1}^l (\eta_i \xi_i + \eta_i^* \xi_i^*) - \sum_{i=1}^l \alpha_i (\varepsilon + \xi_i - y_i + \langle w, x_i \rangle + b) - \sum_{i=1}^l \alpha_i^* (\varepsilon + \xi_i^* + y_i - \langle w, x_i \rangle - b)$$

mit:

$$(141) \quad \alpha_i, \alpha_i^*, \eta_i, \eta_i^* > 0$$

Die Regressionsfunktion kann dann wie folgt formuliert werden:



$$(142) \quad -\frac{1}{2} \sum_{i,j=1}^l (\alpha_i - \alpha_i^*)(\alpha_j - \alpha_j^*) \langle x_i, x_j \rangle - \varepsilon \sum_{i=1}^l (\alpha_i + \alpha_i^*) + \sum_{i=1}^l y_i (\alpha_i - \alpha_i^*) = \min$$

mit:

$$(143) \quad \sum_{i=1}^l (\alpha_i - \alpha_i^*) = 0 \text{ und } \alpha_i, \alpha_i^* \in [0, C]$$

Die Berechnung von b kann wie folgt geschehen: aus den Karush-Kuhn-Tucker- Bedingungen können folgende Ungleichungen gewonnen werden:

$$(144) \quad \max\{-\varepsilon + y_i - \langle w, x_i \rangle \mid \alpha_i < C \text{ oder } \alpha_i^* < 0\} \leq b \\ \leq \min\{-\varepsilon + y_i - \langle w, x_i \rangle \mid \alpha_i > 0 \text{ oder } \alpha_i^* < C\}$$

In allen Formeln sind die Werte der Datenvektoren nur in Form von Skalarprodukten enthalten. Somit bleiben die obigen Beziehungen formal unverändert, wenn die Daten einer beliebigen nichtlinearen Transformation unterworfen werden, die Skalarprodukte unverändert lassen. Diese Beobachtung ist der Ausgangspunkt für die Erweiterung der Methode auf nichtlineare Regressionsaufgaben.

Die oben beschriebene Methode der linearen Regression wird in einem evtl. hochdimensionalen Hilfsraum mit transformierten Daten durchgeführt. Die transformierten Daten in diesem Raum erhält man aus den Originaldaten mithilfe einer nichtlinearen Transformation  $\phi(x)$ . Diese sog. Kernel-Funktion muss die Skalarprodukte zwischen den einzelnen Vektoren der ursprünglichen Daten erhalten. Es muss also gelten:

$$(145) \quad \langle \phi(x_i), \phi(x_j) \rangle = \langle x_i, x_j \rangle$$

Damit die Transformation diese Eigenschaft besitzt, muss sie die Mercer-Eigenschaft besitzen:

*Sei  $X$  ein kompakter Unterraum von  $\mathbb{R}^n$ . Angenommen  $K$  ist eine stetige symmetrische Funktion, so dass für den Integraloperator  $T_K: L_2(X) \rightarrow L_2(X)$  gilt:*

$$(146) \quad (T_K f)(\cdot) = \int_X K(\cdot, x) f(x) dx$$

*ist positiv definit, d. h.*

$$(147) \quad \int_{X \times X} K(x, z) f(x) f(z) dx dz \geq 0,$$

*für alle  $f \in L_2(X)$ .*

*Dann kann  $K(x, z)$  in eine uniform konvergente Reihe mit den*

*Eigenfunktionen von  $T_K'$ :  $\phi_j \in L_2(X)$ , entwickelt werden, so dass  $\|\phi_j\|_{L_2} = 1$  und mit den zugehörigen Eigenwerten  $\lambda_j \geq 0$ , gilt:*

$$(149) \quad K(x, z) = \sum_{j=1}^{\infty} \lambda_j \phi_j(x) \phi_j(z)$$

Mithilfe dieser Vortransformation kann nun aus dem nichtlinearen Problem ein lineares gemacht werden.

Mithilfe dieses Verfahrens können nun modellunabhängig Messwerte aus uni- und multivariaten Messungen interpoliert werden.

Die Mach-Zehnder-Messung wurde mit verschiedenen Funktionen interpoliert. Es wurden sowohl die sigmoide Funktion:

$$(150) \quad y = \frac{A_1 - A_2}{1 + \left(\frac{x}{x_0}\right)^p} + A_2$$

als auch die  $\nu$ -SVR mit folgenden Kernen verwendet. Die Kerne für die SVR werden im Folgenden diskutiert.

### 3.2.2.2 Kerne

Kombinierter Kern:

$$(151) \quad K(x, y) = K_1(x, y)^q + K_2(x, y)^r + K_3(x, y)^s$$

$$(152) \quad K_1(x, y) = \left( \frac{A_2 - A_1}{1 + \left(\frac{x}{x_0}\right)^p} + A_1 \right)^{0.5} \left( \frac{A_2 - A_1}{1 + \left(\frac{y}{x_0}\right)^p} + A_1 \right)^{0.5}$$

$$(153) \quad K_2(x, y) = \exp((\tan^{-1} x \tan^{-1} y)^{0.5})$$

$$(154) \quad K_3(x, y) = \exp((\sinh^{-1} x \sinh^{-1} y)^{0.5})$$

Polynomkern:

$$(155) \quad K(x, y) = (1 + \langle x, y \rangle)^d$$

Der Polynomkern wurde zu Vergleichszwecken getestet und zeigt keine guten Interpolationseigenschaften.

Der kombinierte Kern ist der dem Problem am besten angepasste Kern, wie aus der Tabelle für die RMSE-Werte zu entnehmen ist. Er kommt folgendermaßen zustande:

Zunächst müssen drei allgemein gültige Sätze für die Bildung von Kernen aus anderen SVR- Kernen betrachtet werden:

- i. Wenn  $f(x)$  eine reellwertige Funktion ist, so ist  $K(x, y) = f(x)f(y)$  ein Kern.
- ii. Wenn  $K_1(x, y)$  und  $K_2(x, y)$  Kerne sind, so ist  $K(x, y) = K_1(x, y) + K_2(x, y)$  auch ein Kern.
- iii. Wenn  $K(x, y)$  ein Kern ist, so ist auch  $\exp(K(x, y))$  ein Kern.

Mithilfe dieser drei Eigenschaften lässt sich der optimale Kern aufbauen. Dazu bildet man zunächst einen modellabhängigen Teil  $K_1(x, y)$ . Um diesen zu bilden, nimmt man eine Kalibrierfunktion, welche die gegebenen reellen Messdaten schon recht gut interpoliert. Das sei die Funktion  $f(x)$ . Daraus bildet man mithilfe des Satzes i. den modellabhängigen Teil des Gesamtkernes. Hier wurde

die sigmoide Funktion für den modellabhängigen Teil gewählt. Der Exponent 0.5 wurde später noch hinzugefügt, da sich dann noch bessere Interpolationsergebnisse ergaben.

Die beiden anderen Anteile  $K_2(x, y)$  und  $K_3(x, y)$  bilden den modellunabhängigen Teil des Gesamtkerns. Zunächst wurden wieder Funktionen gesucht, die die Daten gut interpolieren und sich von der sigmoiden Funktion unterscheiden. Die  $\tan^{-1}$ - und die  $\sinh^{-1}$ -Funktion sind hierfür gut geeignet. Daraus werden mit Satz i. wiederum Kerne gebildet. Damit diese jedoch in der SVR-Kalibrierfunktion eine Reihenentwicklung ergeben, kann man sie jedoch so nicht direkt verwenden. Daher wird mit Satz iii. die exp-Funktion auf diese Kerne angewandt. Das ergibt die Anteile  $K_2(x, y)$  und  $K_3(x, y)$ . Mithilfe von Satz ii. lässt sich daraus dann der Gesamtkern bilden.

Der Beweis der Modellunabhängigkeit dieser Anteile kann mit folgendem Satz erfolgen:

### 3.2.2.2.3 Muentz-Theorem:

Wenn  $-\frac{1}{2} < c < \lambda_n$  ist, dann ist  $\{x^{\lambda_n}\}_{n=1}^{\infty}$  vollständig in  $L^2[0,1]$  wenn  $\sum \left| \frac{1}{\lambda_n} \right| = \infty$ .

Mithilfe der folgenden Transformation:

$$z = (\tan^{-1}x)^{0.5}$$

$$u = (\sinh^{-1}x)^{0.5}$$

wird der modellunabhängige Teil des Kerns zu Funktionen der Form  $x^{\lambda_n}$  und erfüllt damit die Voraussetzungen des Muentz-Theorems, womit die Modellunabhängigkeit bewiesen ist.

## 4. Ergebnisse und Diskussion

### 4.1 Mach-Zehnder-Interferometer

#### 4.1.1 Messungen zum Testaufbau

Bevor die charakteristischen Eigenschaften der Chips selbst bestimmt werden, müssen vorab Messungen zum Aufbau durchgeführt werden.

##### 4.1.1.1 Dunkelstrom der Photodiode

Zunächst wird ohne Laserlicht der Dunkelstrom der Photodiode bestimmt. Aus dieser Messung lässt sich das Grundrauschen der Photodiode bestimmen. Die Messung ist in folgender Abbildung aufgezeigt.

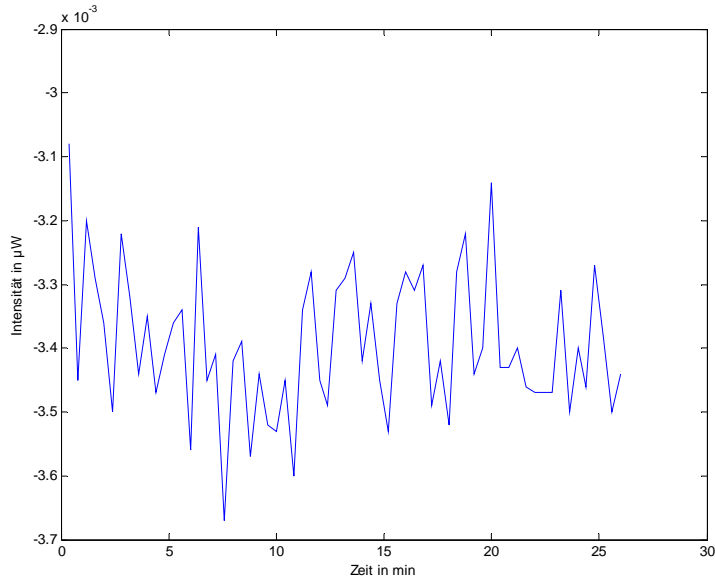


Abb.9: Dunkelstrommessung

Aus dieser Messung kann über eine Fouriertransformation die Art des Rauschens bestimmt werden. Die Größe des jeweiligen Frequenzanteils kann dabei über eine Fouriertransformation gewonnen werden. Das Frequenzspektrum des obigen Rauschens kann aus folgendem Diagramm abgelesen werden:

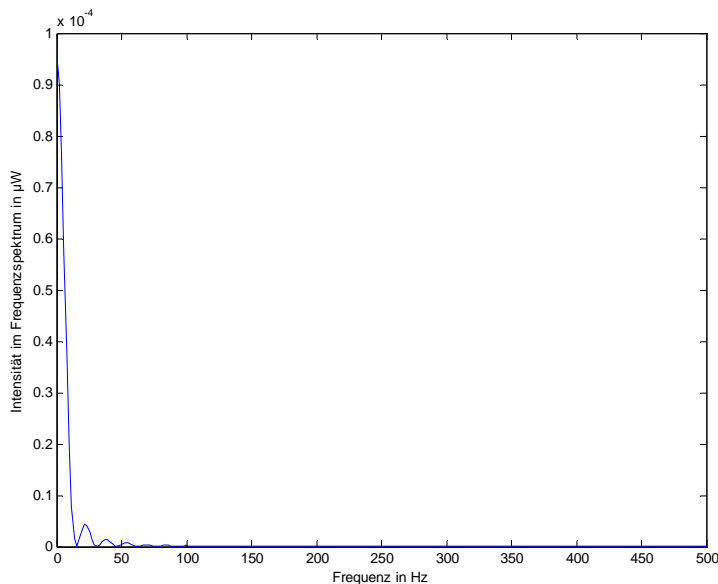


Abb.10: Fouriertransformierte des Dunkelstroms: x-Achse: Frequenz in Hz, y-Achse: Intensität im Frequenzspektrum in  $\mu\text{W}$

Aus diesem Spektrum ergibt sich, dass der konstante Frequenzanteil alle anderen Anteile überwiegt. Dies ist auf den konstanten Dunkelstrom bzw. die konstante Dunkelspannung innerhalb der Messelektronik zurückzuführen. Die anderen Frequenzspitzen sind auf die begrenzte Messdauer zurückzuführen. Es kann somit im Wesentlichen von einem weißen Rauschen ausgegangen werden.

Der geringfügige negative Dunkelstrom ist auf Alterungserscheinungen bzw. fehlerhafter Einstellungen innerhalb der Photodiode zurückzuführen. Er konnte nicht durch eine Nachregelung an der Elektronik der Diode beseitigt werden, ist aber aufgrund seiner Kleinheit vernachlässigbar.

#### 4.1.1.2 Stabilität des Laserlichts

Bei folgender Messung wurde der Laser eingeschaltet, um den Intensitätsverlauf direkt nach dem Einschalten zu beobachten.

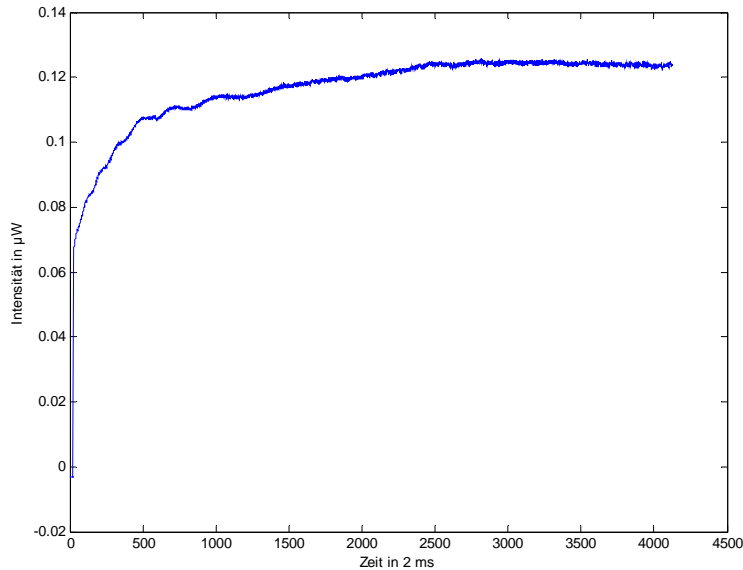


Abb.11: Intensitätsverlauf nach Einschalten des Lasers

Nach einer kurzen Phase des Anstiegs stabilisiert sich der Laser nach ca. 9 Minuten bei seiner Nennwertleistung, die er über einen langen Zeitraum beibehält.

#### 4.1.1.3 Temperaturabhängigkeit der Intensität

s der folgenden Messung ergibt sich eine langperiodische Schwankung der Laserintensität (obere Kurve), welche auf die Temperaturschwankungen im Reinraum durch die Nachtabschaltung der Heizung verursacht wird. Das verursacht die langperiodischen Schwankungen der Intensität, welche durch ein Hochpassfilter mit der Grenzfrequenz von  $5 \cdot 10^{-5}$  Hz beseitigt werden können (untere Kurve).

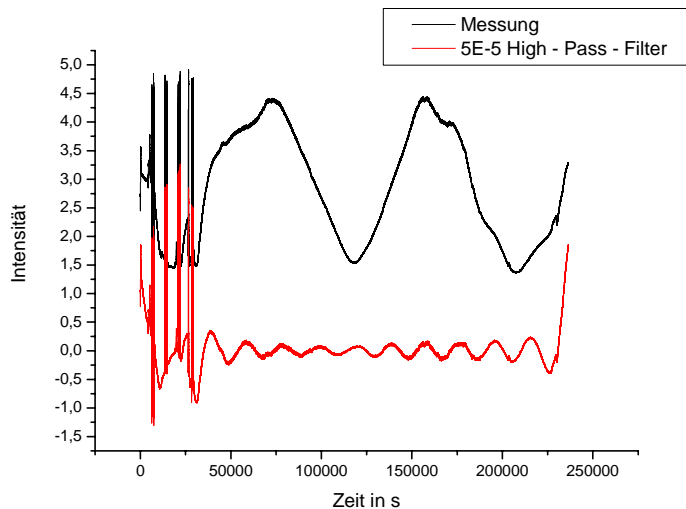


Abb.12: Intensitätsverlauf in Abhängigkeit von der Temperatur über einen längeren Zeitraum

Der Versuchsaufbau wird sowohl an den Chips wie auch an den Einkoppelstellen der Glasfasern an den Chips am empfindlichsten für Temperaturschwankungen sein. Denn durch die verschiedenen Ausdehnungskoeffizienten der verwendeten Materialien ergeben sich kleine Änderungen der Einkoppeleffektivität und des Brechungsindex der sensitiven Schicht. Beide Effekte zusammen bewirken die Temperaturempfindlichkeit des Aufbaus.

Da diese Schwankungen sehr langperiodisch im Vergleich zur Messdauer sind, können sie vernachlässigt werden.

#### 4.1.2 Reproduzierbarkeits- und Kalibriermessungen

Um die Reproduzierbarkeit der Messungen nachzuprüfen, müssen mehrere Messungen unter denselben Bedingungen durchgeführt werden. Die erhaltenen Messwerte werden dann mithilfe eines statistischen Tests ausgewertet. Die Kalibriermessungen werden mit verschiedenen vorgegebenen Analyt-Konzentrationen durchgeführt. Die erhaltenen Messsignale werden dann gegen die zugehörigen Konzentrationen aufgetragen und das Ergebnis wird interpoliert.

##### 4.1.2.1 Reproduzierbarkeitsmessung mit Atrazincapronsäure

Die Reproduzierbarkeitsmessung erfolgte für die Mach-Zehnder-Messung gleichzeitig mit der Kalibriermessung, indem jede Messung fünfmal wiederholt worden ist. Es wurde ein Bindungshemmtest mit konstanter Antikörperkonzentration verwendet. Die Ergebnisse wurden mit verschiedenen Auswerteverfahren ausgewertet.

##### 4.1.2.2 Reproduzierbarkeitsmessung mit molekular geprägten Polymeren

Bei molekular geprägten Polymeren handelt es sich um Nanopartikel, welche spezifisch für einen Analyten hergestellt werden. Es wird dazu der zu detektierende Analyt zusammen mit dem Polymer in ein Lösungsmittel gegeben. Mithilfe eines Polymerisationsstarters wird die Polymerisation gestartet. Durch die Einwirkung von Ultraschall entstehen kleine Nanopartikel innerhalb der Lösung.

Durch die Entfernung des Analyten aus den Nanopartikeln erhält man dann die molekular geprägten Polymere als Nanopartikel.

Innerhalb dieser Nanopartikel befinden sich durch den Analyten, das sogenannte Templat, kleine Kavitäten, welche möglichst spezifisch nur den Analyten binden sollen. Diese Nanopartikel werden elektrostatisch an die Oberfläche des Chips gebunden. Mit dem zugehörigen Analyten wurden Reproduzierbarkeitsmessungen durchgeführt. Die Nanopartikel wurden von der Arbeitsgruppe um Prof. Haupt, Universität Lund, zur Verfügung gestellt.

Die entsprechenden Messungen sind im Folgenden aufgezeigt:

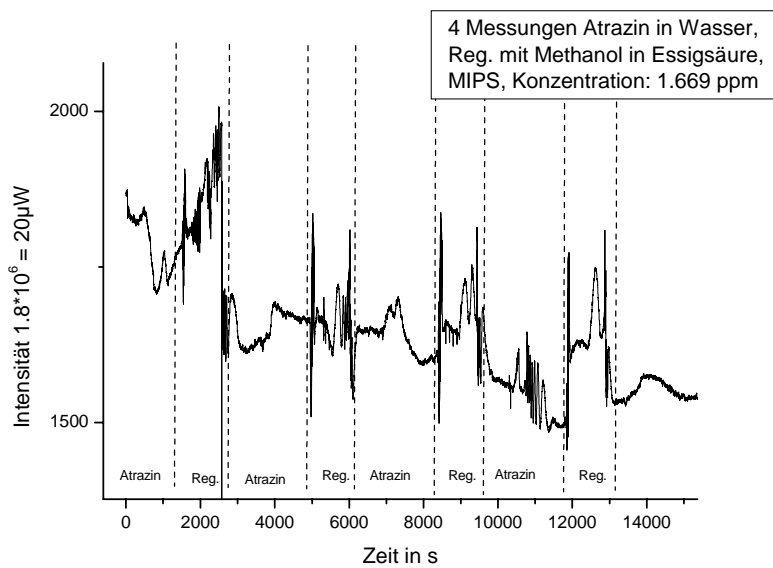


Abb.13: Reproduzierbarkeitsmessung mit Atrazin-geprägten MIPS

In dieser Messung sind vier Mach-Zehnder-Messungen mit Atrazin-geprägten MIPS aufgezeigt. Die Regeneration der MIPS erfolgt mit einer Mischung aus Methanol und Essigsäure im Verhältnis 4:1. Es sind vier Messsignale zu erkennen. Das letzte Signal ist durch eine Luftblase unbrauchbar. Aus den ersten drei Messungen kann durch die Auswertung der Extrema die Reaktionskinetik gewonnen werden. Es ergeben sich folgende Diagramme:

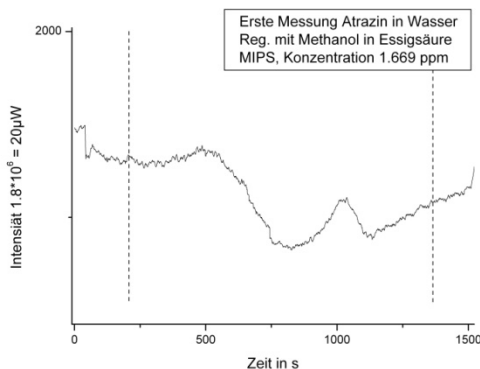


Abb.14: Erste Messung der MIP-Partikel mit Atrazin

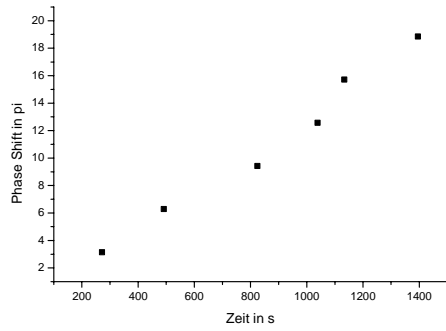


Abb.15: Bindungskinetik ermittelt aus obiger erster Messung

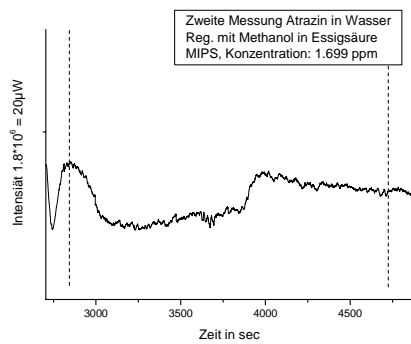


Abb.16: Zweite Messung der MIP-Partikel mit Atrazin

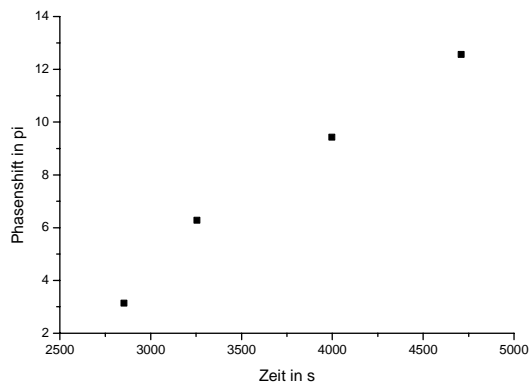


Abb.17: Bindungskinetik ermittelt aus obiger zweiter Messung



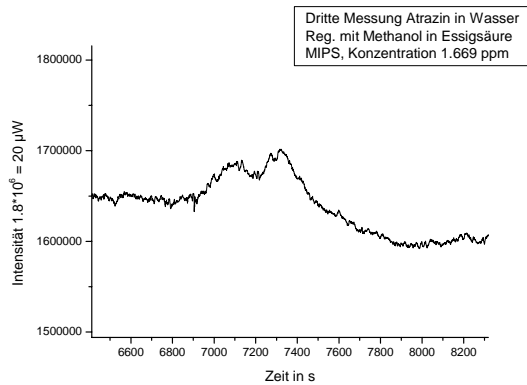


Abb.18: Dritte Messung der MIP-Partikel mit Atrazin

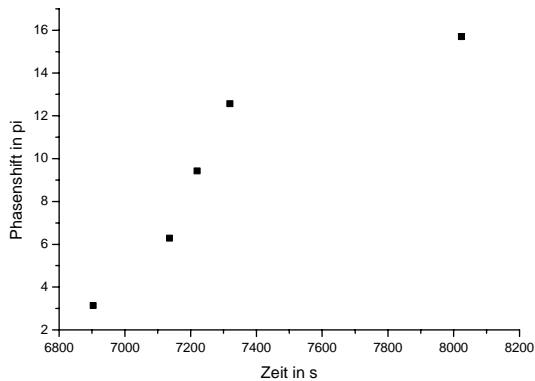


Abb.19: Reaktionskinetik ermittelt aus obiger dritter Messung

Aus den gezeigten Messungen lässt sich ableiten, dass das MIP-System reproduzierbare Ergebnisse mit einer recht großen Varianz erbringt. Jedoch lässt sich aus den Messungen nicht ablesen, ob die Reaktion zwischen den MIP-Partikeln und dem Analyten Atrazin eine spezifische Reaktion ist. Die große Varianz kann sowohl auf das MIP-System wie auch auf das Mach-Zehnder-Interferometer zurückgeführt werden.

#### 4.1.2.3 Messung der Kalibrierkurve mit Atrazincapronsäure

Mithilfe eines Bindungshemmtests wurden verschiedene Konzentrationen von Atrazincapronsäure (ACA) und einer konstanten Menge an Antikörper gemessen. Die erhaltenen Messergebnisse wurden gegen die Analytkonzentration aufgetragen und interpoliert[70][74][75].

Eine Einzelmessung hat nach den oben angegebenen Beziehungen einen cosinus-förmigen Verlauf. Eine einzelne Messung ist im Folgenden dargestellt.

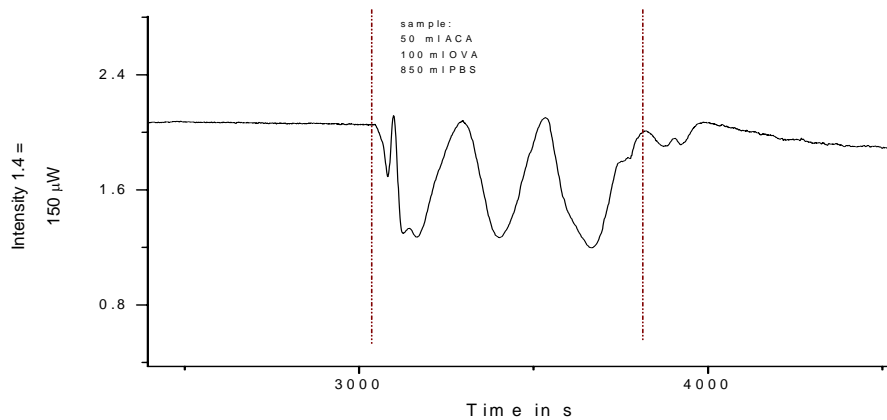


Abb.20: Intensitätsverlauf bei einer Messung mit sehr hoher Einkoppelintensität

Die sehr hohe Intensität am Ausgang konnte durch die oben beschriebene Einkoppelungsmethode erreicht werden.

#### Versuchsplan für Kalibrierung und Messergebnisse

Für die univariaten Kalibrierungen hat sich bei bioanalytischen Messungen folgender Versuchsplan bewährt:

Es werden zehn Blindwertmessungen, d.h. Messungen ohne Analyt durchgeführt. Dann werden zur Bestimmung der Kennlinie zehn Proben mit Analytkonzentrationen im Bereich von 0 bis 10 µg/L in logarithmischer Abstufung jeweils fünfmal vermessen. Der Versuchsplan, der für diese Messung verwendet wurde, ist der folgende:

Konzentration in ng/ml	100	30	10	3	1	0.3	0.1	0.03	0
------------------------	-----	----	----	---	---	-----	-----	------	---

Die so gewonnen Bindungskurven haben nach den oben angegebenen Formeln eine cos- Form. Daraus kann man nach folgenden Methoden die jeweilige Bindungskurve gewinnen:

#### Methode 1:

Jedem Extremum der Intensitätskurve wird das entsprechende Vielfache von  $\frac{\pi}{2}$  zugeordnet. Das ist die Phasenverschiebung, welche durch die Bindung an die Sensoroberfläche verursacht wird. Für den Bereich am rechten Ende wird die Phasenverschiebung zwischen dem letzten Extremum und dem Ende der Messung grob geschätzt. Die so gewonnen Phasenverschiebungen sind in folgender Tabelle zusammengefasst:

	1	2	3	4	5	Average	Std.Dev.
100ng/ml	1	1.5	1	0	2	1.1	0.7
30ng/ml	1.5	0.5	3	2	2.5	1.9	1

10ng/ml	2	1.5	2	4.5	3.5	2.7	1.3
3ng/ml	5	-	-	-	-	-	-
1ng/ml	6	2.5	5	2.5	4	4	1.5
0.3ng/ml	5	1	8	2	4.2	4.0	.7
0.1ng/ml	4.5	2.5	9	3	4	4.6	2.6
0.03ng/ml	6	2.5	7	-	3	4.6	2.2
0ng/ml	6	6	8	5	2	5.4	2.2

Methode 2:

Für eine genauere Auswertung der Mach-Zehnder-Messungen werden wiederum den Extrema die jeweilige Phasenverschiebung und die Meßzeit zugeordnet. Beide Größen werden in ein Diagramm eingetragen und mit folgender Funktion interpoliert:

$$(156) \quad y = y_0 + A_0 e^{-t/t_1}$$

Diese Interpolationsfunktion gibt die einfache Reaktionskinetik wieder, welche nur von der Bindung der Antikörper an die Oberfläche und die Diffusion bestimmt wird.

Die so erhaltenen Werte für  $y_0$ ,  $A_0$  und  $t_1$  sind in folgender Tabelle zusammengefasst:

Werte der einzelnen Interpolationskurven der MZI-Einzelmessungen

Parameter der Interpolationskurven für MZI-Messung, Konzentration in ng/ml	$y_0$	$A_0$	$t_1$
080107_kin1, 100	9.42+/-0	-9.73+/-0.84	494.06+/-95.71
080107_kin2, 30	-	-	-
080107_kin3, 10	9.42+/-0	-9.79+/-1.35	304.69+/-87.57
080107_kin4, 3	31.41+/-0	-32.82+/-2.11	508.83+/-61.86
090107_kin1, 100	9.42+/-0	-9.82+/-1.32	523.16+/-144.83
090107_kin2, 30	15.71+/-0	-15.98+/-0.76	446.33+/-47.73
090107_kin3, 10	21.99+/-0	-21.64+/-0.55	356.22+/-20.95
100107_2_kin1	-	-	-
100107_2_kin2	9.42+/-0	-8.8+/-0.84	327.13+/-97.47
100107_2_kin3	12.56+/-0	-12.87+/-1.03	431.48+/-75.24
100107_2_kin4	25.13+/-0	-25.03+/-0.58	398.77+/-20.7
110107_kin1, 100	6.28+/-0	-6.41+/-0.93	469.15+/-165.76
110107_kin2, 30	6.28+/-0	-6.36+/-0.54	402.04+/-92.48
110107_kin3, 10	9.42+/-0	-9.84+/-1.47	558.17+/-168.92
110107_kin4, 3	-	-	-

120107_2_kin1, 1	12.56+/-0	-12.88+/-0.62	294.31+/-32.16
120107_2_kin2, 0.3	25.13+/-0	-26.05+/-0.7	405.12+/-22.65
120107_2_kin3, 0.1	25.13+/-0	-26.43+/-0.97	367.31+/-26.93
120107_2_kin4,0.03	18.85+/-0	-18.88+/-0.71	401.94+/-33.87
150107_2_kin1, 1	15.71+/-0	-16.02+/-1.29	319.35+/-61.07
150107_2_kin2, 0.3	6.28+/-0	-6.33+/-0.35	192.84+/-31.03
150107_2_kin3, 0.1	12.56+/-0	-12.55+/-0.53	384.45+/-39.76
150107_2_kin4,0.03	18.85+/-0	-20.09+/-1.92	521.28+/-93.23
170107_kin1, 1	12.56+/-0	-13.02+/-1.07	593.39+/-104.00
170107_kin2, 0.3	15.71+/-0	-16.79+/-1.41	490.86+/-79.09
170107_kin3, 0.1	15.71+/-0	-15.92+/-1.41	405.75+/-75.44
170107_kin4,0.03	18.85+/-0	-20.31+/-1.93	422.47+/-74.55
240107_kin1	-	-	-
240107_kin2	-	-	-
240107_kin3,3	31.41+/-0	-7.43e06+/-321855.5	452+/-0
240107_kin4	21.99+/-0	-1.67e7+/-1.09e6	605+/-0
250107_kin1,3	34.55+/-0	-144.38+/-14.17	283.01+/-15.77
250107_kin2,3	28.27+/-0	-6.57e6+/-214074.766	244+/-0
250107_kin3,3	25.13+/-0	-3.72e8+/-1.27e7	343+/-0
250107_kin4,3	18.85+/-0	-4.07e10+/-1.59e9	385+/-0
100107_kin1,100	-	-	-
100107_kin2,30	9.42+/-0	-8.8+/-0.84	327.12+/-97.47
100107_kin3,10	12.6+/-0	-12.88+/-1.03	431.48+/-75.23
100107_kin4,3	25.13+/-0	-25.03+/-0.58	398.77+/-20.7
120107_kin1,1	12.56+/-0	-12.88+/-0.62	294.31+/-23.16
120107_kin2,0.3	25.13+/-0	-26.04+/-0.69	405.12+/-22.65
120107_kin3,0.1	25.13+/-0	-26.43+/-0.97	367.31+/-26.93
120107_kin4,0.03	18.85+/-0	-18.88+/-0.71	401.94+/-33.87
150107_kin1,1	15.71+/-0	-16.02+/-1.29	319.34+/-61.07
150107_kin2,0.3	6.28+/-0	-6.33+/-0.35	192.84+/-31.02
150107_kin3,0.1	12.56+/-0	-12.55+/-0.53	384.45+/-39.76
150107_kin4,0.03	18.85+/-0	-20.09+/-1.9	521.27+/-93.23
160407_kin1,0	12.56+/-0	-3.7e7+/-1.30e7	74.3+/-0
160407_kin2,0	18.85+/-0	-2.27e20+/-2.55e19	61.7+/-0
160407_kin3,0	40.83+/-0	-8.38e6+/-3.93e5	422+/-0
020407_kin2,0	18.85+/-0	-1.77e5+/-2.63e4	307+/-0

Daraus können jeweils Mittelwert und Standardabweichung bestimmt werden, welche in folgender Tabelle zusammengefasst sind:

Mittelwerte und Standardabweichungen zu den Werten  $y_0$ ,  $A_1$ ,  $t_1$

Konzentration	Mittelwert $y_0$	Mittelwert $A_1$	Mittelwert $t_1$	Standardabweichung $y_0$	Standardabweichung $A_1$	Standardabweichung $t_1$
100	8.58	-8.65	495.46	1.81	1.95	27.03
30	10.21	-9.9	375.65	3.95	4.16	58.88
10	13.19	-11.89	416.41	5.16	5.93	95.7275
3	26.87	-27.62	402.6	4.99	4.5	110.04
1	13.82	-14.16	364.14	1.72	1.69	128.76
0.3	15.08	-16.31	337.36	9.53	9.86	136.49
0.1	18.22	-18.78	381.85	6.44	7.12	15.87
0.03	18.85	-19.65	453.78	0	0.71	62.18
0	39.26	-5.7e19	216.25	2.22	1.14e20	177.58

Alle Berechnungen wurden mithilfe von Origin 6G durchgeführt. Der am genauesten bestimmbare Wert ist  $y_0$ . Daher wird mit diesem Wert die Kalibrierkurve bestimmt.

Die so erhaltenen Messwerte mit den Kalibrierkurven sind im Folgenden dargestellt:

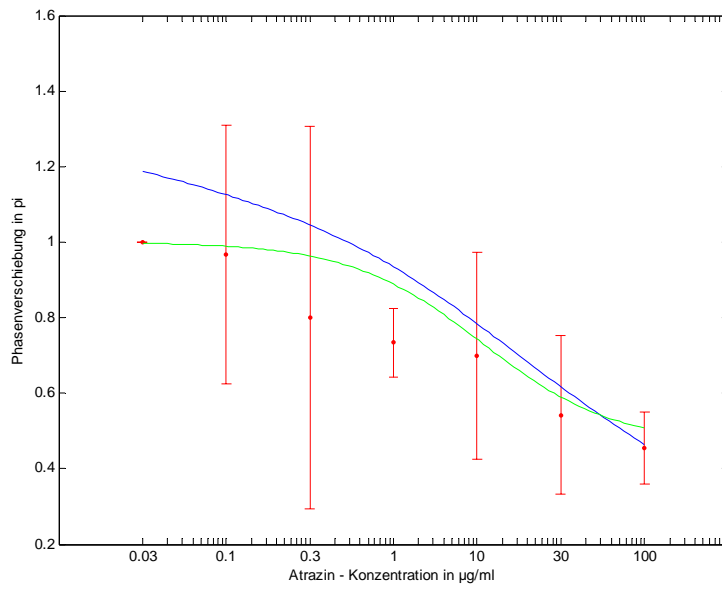


Abb.21: Mach-Zehnder-Kalibrierkurve mit sigmoider Kurve (dünn) und SVR-Kalibrierkurve (dick). Die Messpunkte sind mit ihren Fehlerbalken eingezeichnet. Die Ausreißer bei 0  $\mu\text{g/ml}$  und 3  $\mu\text{g/ml}$  wurden weggelassen. Es wurden die Methode 2 verwendet.

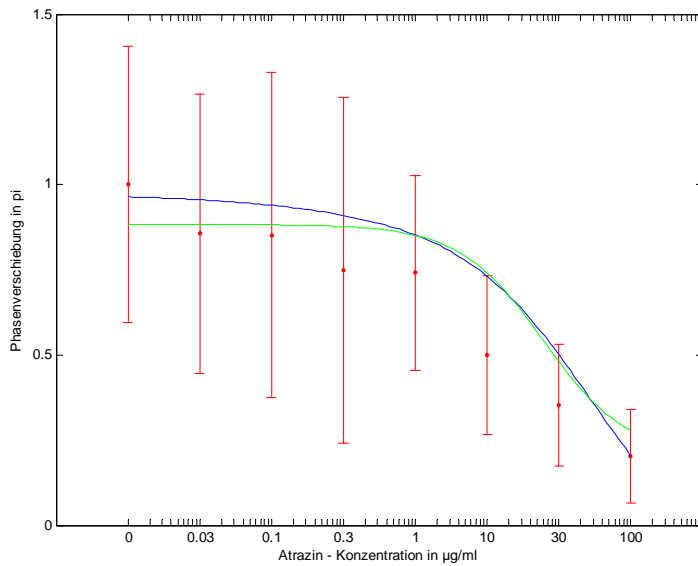


Abb.22: Mach-Zehnder-Kalibrierkurve mit sigmoidaler Kurve (dünn) und SVR-Kalibrierkurve (dick). Die Messpunkte sind mit ihren Fehlerbalken eingezeichnet. Es wurde die Methode 1 verwendet.

Aus den oben gezeigten Kurven kann abgelesen werden, dass das passive Mach-Zehnder-Interferometer trotz gutem Signal-Rausch-Verhältnis eine unakzeptable relative Standardabweichung in den Messwerten hat. Dies liegt bei Methode 1 an der Ungenauigkeit, mit der der letzte Messpunkt bestimmt werden kann. Bei Methode 2 ergeben sich bessere Ergebnisse, jedoch ist auch hier die relative Standardabweichung noch zu groß. Dies liegt an der nur mit begrenzter Genauigkeit möglichen Bestimmung der Extrema der Intensitätskurve. Die passiven Mach-Zehnder-Interferometer haben ferner eine nicht konstante Empfindlichkeit aufgrund des cos-förmigen Intensitätsverlaufs. Somit bewirkt eine kleine Änderung des effektiven Brechungsindex je nach momentan vorliegender Phasenverschiebung eine große oder kleine Intensitätsänderung. Somit hängt die Empfindlichkeit der passiven Mach-Zehnder-Interferometer von einer nicht zu beeinflussenden Größe ab.

Eine Verbesserung können elektrooptische Mach-Zehnder-Interferometer erbringen. Aufgrund fehlender funktionierender Flusszellen konnten die vorliegenden elektrooptisch korrigierten Chips nicht für entsprechende Messungen eingesetzt werden.

Die Ausreißer lassen sich durch die Alterung der sensitiven Oberflächen erklären, denn die entsprechenden Messungen wurden in einem zu großen zeitlichen Abstand zu den anderen Messungen durchgeführt.

#### Ergebnisse der statistischen Tests für die Mach-Zehnder-Messungen

Für die Mach-Zehnder-Messung ergeben sich für die einzelnen Messpunkte folgende P-Werte für die Prüfung auf das Vorliegen einer Gaußverteilung:

P-Werte für den Jarque-Bera-Test:

Konzentration der Probe	100	30	10	3	1	0.3	0.1	0.03
P-Wert des Tests	0.75	0.63	0.65	0.70	0.64	0.64	0.71	0.75
Hypothese auf Vorliegen einer Gaußverteilung	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja

P-Werte für den Lilliefors-Test:

Konzentration der Probe	100	30	10	3	1	0.3	0.1	0.03
P-Wert des Tests	NaN	NaN	0.1	NaN	NaN	0.11	NaN	NaN
Hypothese auf Vorliegen einer Gaußverteilung	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja

Aus den vorliegenden Tabellen ergibt sich, dass nichts gegen die Annahme für das Vorliegen einer Gaußverteilung spricht, wenn man den Jarque-Bera-Test heranzieht. Für den Lilliefors-Test liegen offenbar zu wenige Werte vor, als dass ein sinnvoller P-Wert berechnet werden kann. Auch die Werte des Jarque-Bera-Tests sind in diesem Fall aus dem gleichen Grund nicht unbedingt zuverlässig. Für eine größere Anzahl von Messwerten kann für die Messwertverteilung eine logarithmische Normalverteilung angenommen werden, da die aus den Messungen bestimmten Größen wie Phasenverschiebung und Interpolationskonstanten nicht jeden beliebigen reellen Wert annehmen können, sondern nur positive reelle Zahlen sein können. Erst bei Vorliegen einer größeren Anzahl von Messwerten geht diese Verteilung in eine Gaußverteilung über.

## 4.2 TIRF

### 4.2.1 Ergebnisse der Kalibrierungen bei den TIRF-Messungen

Die folgenden vier Bindungshemmtests wurden für ein Projekt zur Bestimmung des Menstruationszyklus von Kühen anhand des Progesteron-Gehalts in deren Milch mit dem TIRF-Messgerät durchgeführt. Jede Messung mit Ausnahme der Blankmessung wurde dreimal durchgeführt, die Blankmessung 12-mal. Die entsprechende Antikörperkonzentration betrug 30ng/ml. Die TIRF – Messungen wurden von Frau Dr. Dipl.-chem. Nina D. Käppel und Frau Dipl.-chem.

Christiane Albrecht zur Verfügung gestellt[117].

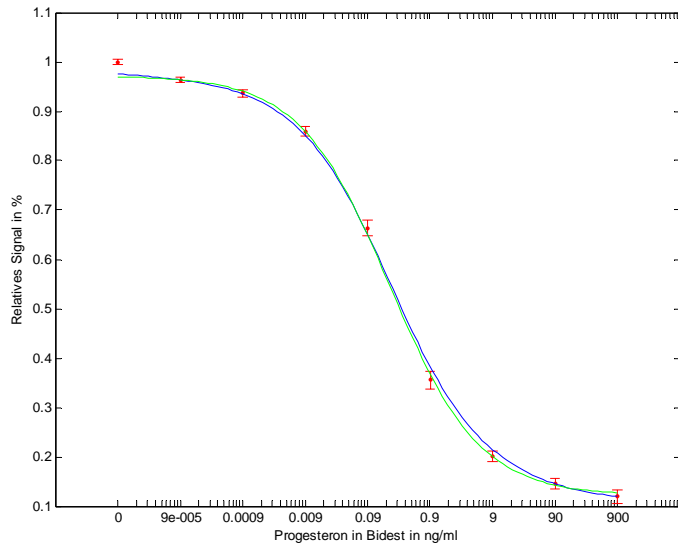


Abb.23: Kalibriermessung Progesteron in bidestilliertem Wasser

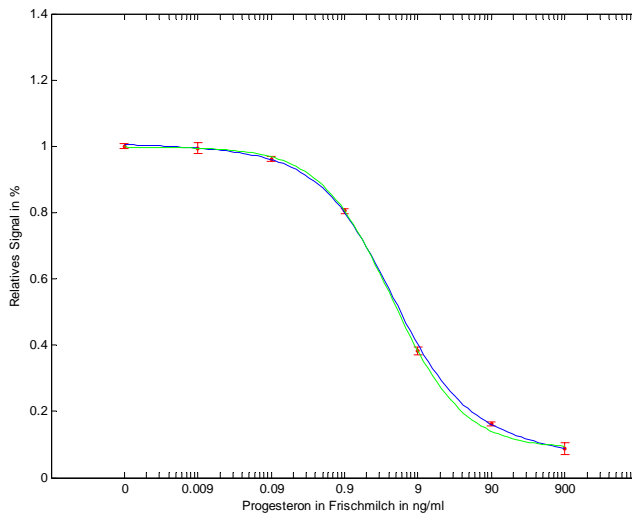


Abb.24: Messung von Progesteron in Frischmilch



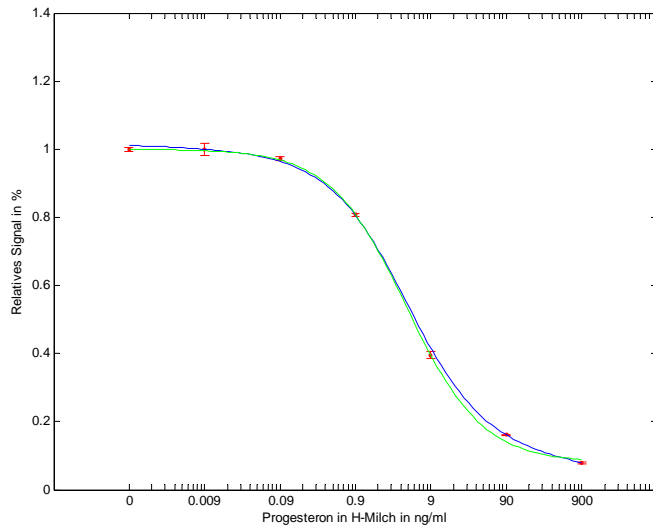


Abb.25: Progesteron in H-Milch

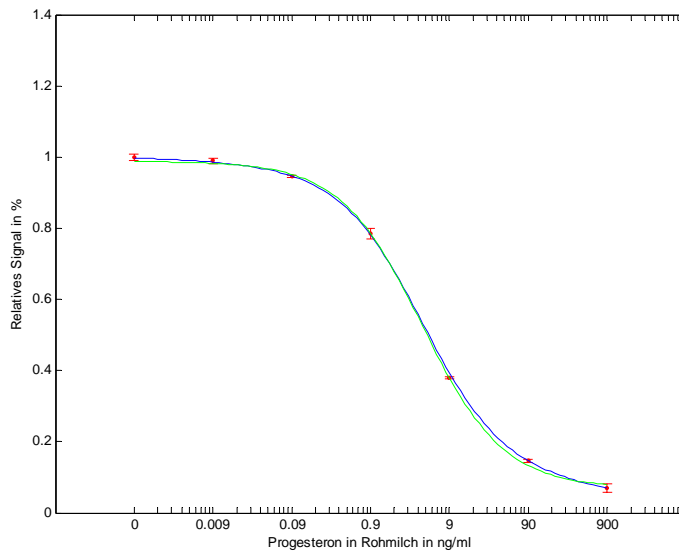


Abb.26: Messung von Progesteron in Rohmilch

Aus den ersten drei Messungen kann eine sehr gute relative Standardabweichung abgelesen werden. Die sigmoide Kalibrierkurve kann die Messwerte bereits sehr gut interpolieren. Die SVR-Interpolation ergibt eine geringfügige Verbesserung der Interpolation. Vor allem an den Enden ergeben sich Abweichungen zwischen den Messwerten und der Kalibrierkurve. Diese Abweichungen lassen sich bei den niedrigen Konzentrationen durch die höhere Anzahl der Messwerte und der damit verbundenen Verschiebung des Mittelwerts erklären. In den hohen Konzentrationsbereichen können die Abweichungen zwischen der Kalibrierkurve und den Messwerten durch die Sättigung der Kalibrierprobe erklären, d.h. die Probe hat keine Antikörper mit freien Bindungsstellen mehr, aber

die sigmoide Kalibrierkurve geht noch nicht in eine Parallele zur Konzentrationsachse über. Beide Effekte lassen sich mit der SVR- Kalibrierung berücksichtigen, so dass sich eine bessere Kalibrierkurve ergibt.

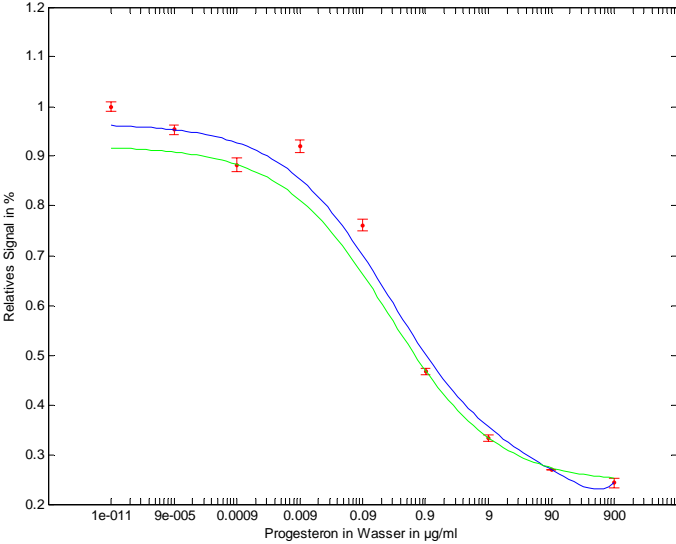


Abb.27: Messung von Progesteron in Wasser

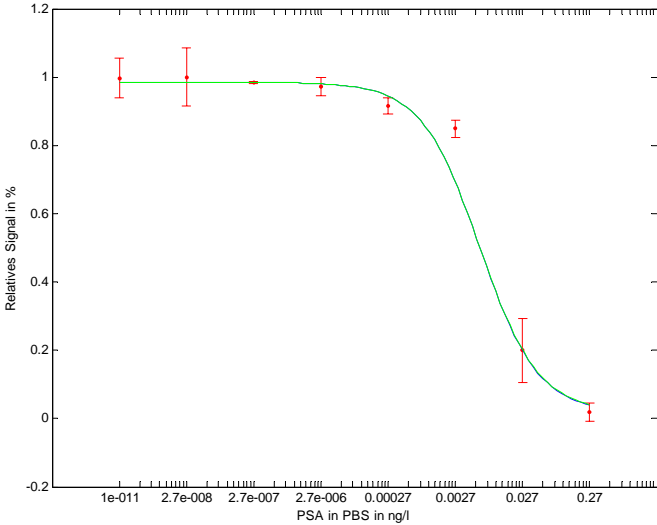


Abb.28: Messung von PSA in PBS

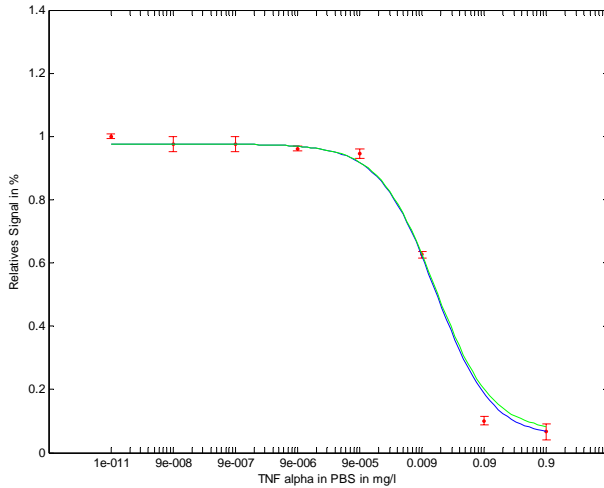


Abb.29: Messung von TNF- $\alpha$  in PBS

Diese Messungen zeigen deutlich den Hook-Effekt[34][42][43][69][84][85][87]. Dieser zeigt sich durch die Abweichung zwischen den Messpunkten und der Kalibrierkurve an den Stellen mit der stärksten Krümmung. Die Ursache dieses Effekts liegt darin, dass die verwendeten Antikörper polyklonal hergestellt worden sind. Somit wurden die Messungen mit einem Gemisch verschiedener Sorten Antikörper durchgeführt, womit die gesamte Bindungskurve als Summe mehrerer Bindungskurven mit verschiedenen Parametern betrachtet werden können. Besonders deutlich tritt dieser Effekt bei der Messung des Progesterons in Wasser auf.

#### 4.2.1.1 Parameter der Interpolationskurven für die Distanzmaße ABS und RMSE

Für die TIRF-Messungen Nr. 1-4 ergeben sich folgende Parameter für die beiden Distanzmaße:

RMSE	$A_1$	$A_2$	$x_0$	P
Progesteron in bidest. Wasser (TIRF 1)	98.11	11.76	0.2	0.6
Progesteron in Frischmilch (TIRF 2)	100.5	7.91	4.24	0.83
Progesteron in H-Milch (TIRF 3)	99.93	8.91	3.94	0.86
Progesteron in Rohmilch (TIRF 4)	99.69	6.27	4.03	0.79

ABS	$A_1$	$A_2$	$x_0$	p
Progesteron in bidest. Wasser (TIRF 1)	99.43	9.69	0.21	0.55
Progesteron in Frischmilch (TIRF 2)	100.51	6.97	4.28	0.85
Progesteron in H-Milch (TIRF 3)	99.86	7.99	4.07	0.88
Progesteron in Rohmilch (TIRF 4)	100.09	1.37	5.82	0.68

Es ist deutlich ein Unterschied in den Werten der Parameter zu erkennen. Für die Regression wurde hier der RMSE verwendet, da dieses Distanzmaß am gebräuchlichsten ist. Für Interpolationswerte mit Ausreißern ist das zweite Distanzmaß sinnvoller, da es unempfindlicher gegenüber Ausreißern ist.

#### 4.2.1.2 Auswertung der Messungen

Die optimalen Werte für die Parameter im Kern sind in folgender Tabelle aufgelistet

RMSE -/Parameter für Interpolation von MZI und TIRF mit SVR

RMSE	Exponent Kern q Teil 1	Exponent Kern r Teil 2	Exponent Kern s Teil 3	RMSE SVR Polynom kern	RMSE Logistische Funktion	RMSE SVR Kombinierter Kern
MZI	0.5	0.5	0.5	0.3	1.13	0.37
MZI	0.5	0.4	0.5	0.3	1.13	0.45
MZI	0.2	0.5	0.5	0.3	1.13	0.44
Progesteron in Frischmilch (TIRF 2)	0.5	0.5	0.5	61.26	29.37	25.98
Progesteron in H-Milch (TIRF 3)	0.5	0.5	1.8	51.18	25.51	18.87
Progesteron in Rohmilch (TIRF 4)	0.5	0.5	0.51	55.2	29.45	18.92

Aus dieser Tabelle kann geschlossen werden, dass die Interpolation der mit dem TIRF- Messgerät gewonnenen Messdaten mit der SVR-Interpolation und dem problemangepassten Kern am besten interpoliert werden können. Dies liegt daran, dass die Abweichungen zwischen der sigmoiden Kurve und den Messdaten, welche durch die polyklonalen Antikörper und unspezifische Bindungen verursacht werden, durch den Zusatzterm modelliert werden können, ohne ein spezielles Modell dafür zu erstellen zu müssen oder das Rauschen mit zu modellieren.

#### 4.2.1.3 Nachweisgrenzen für die TIRF-Messungen

Der von Brown beschriebene Ansatz wurde wie oben beschrieben versuchsweise umgesetzt, jedoch ist die Umsetzung dieses Ansatzes ist für die gegebenen TIRF-Werte problematisch. Die Berechnung der Verteilungsdichten eines beliebigen Konzentrationswertes aus den Verteilungsfunktionen der Messwerte, der Kalibrierfunktion und der Funktion für die Standardabweichung ist unproblematisch.

Somit wird auch am Vergleich der beiden Verteilungsdichten im Konzentrationsbereich und nicht im Meßbereich festgehalten, was den Vorteil einer quantitativen Auswertung erbringt. Es ergeben sich dann aber sehr schmale und hohe Verteilungsdichten für die Konzentrationen. Dies zieht numerische Schwierigkeiten bei der Berechnung der Integrale nach der Brownschen Methode nach sich, da dann die Integrationsgrenzen an die unbekannte Breite der Verteilungsdichten angepasst werden müssen, um korrekte Werte zu erhalten. Daher wurden in der folgenden Tabelle die Verteilungsdichten um den Blindwert und um die jeweilige Konzentrationsstufe miteinander verglichen. Die beiden Dichten wurden voneinander subtrahiert und vom Ergebnis der Absolutbetrag genommen. Es ergibt sich eine zweigipflige Funktion, bei der die Höhe der beiden Extrema, die Position des Minimums und die Position des zweiten Maximums sowie dessen Breite bestimmt wurden.

Für die TIRF-Messungen ergeben sich folgende Werte für die Nachweisgrenze:

Progesteron in bidestilliertem Wasser:

$x_{\min}$ in ng/ml	$y_c$ in %	Höhe Maximum von Differenz der Verteilungsdichten
0.00008	$100 - 10^{-8}$	$5 * 10^{-6}$
0.00008	$100 - 10^{-7}$	0.00004
0.00008	$100 - 10^{-6}$	0.0004
0.00008	$100 - 10^{-5}$	0.04

Das zweite Maximum liegt bei dieser Messung bei: 0.0008

Die Standardabweichung dieses Maximums liegt bei: 0.00072

Progesteron in Frischmilch:

$x_{\min}$ in ng/ml	$y_c$ in %	Höhe Maximum von Differenz der Verteilungsdichten
0.01	$100 - 10^{-8}$	0.0000023
0.01	$100 - 10^{-7}$	0.000023
0.01	$100 - 10^{-6}$	0.00023
0.01	$100 - 10^{-5}$	0.0023

Das zweite Maximum liegt bei dieser Messung bei: 0.85

Die Standardabweichung dieses Maximums liegt bei: 0.005

Progesteron in H-Milch:

$x_{\min}$ in ng/ml	$y_c$ in %	Höhe Maximum von Differenz der Verteilungsdichten
0.9	$100 - 10^{-8}$	$5.5 * 10^{-7}$
0.9	$100 - 10^{-7}$	$5.5 * 10^{-6}$
0.9	$100 - 10^{-6}$	$5.5 * 10^{-5}$
0.9	$100 - 10^{-5}$	$5.5 * 10^{-4}$

Das zweite Maximum liegt bei dieser Messung bei: 0.72

Die Standardabweichung dieses Maximums liegt bei: 0.02

Progesteron in Rohmilch:

$x_{\min}$ in ng/ml	$y_c$ in %	Höhe Maximum von Differenz der Verteilungsdichten
0.002	$100 - 10^{-8}$	0.00001
0.002	$100 - 10^{-7}$	0.0001
0.002	$100 - 10^{-6}$	0.001
0.002	$100 - 10^{-5}$	0.01

Das zweite Maximum liegt bei dieser Messung bei: 0.039

Die Standardabweichung dieses Maximums liegt bei: 0.003

Alle Konzentrationen sind in ng/ml angegeben. Diese Methode kann weiter ausgebaut werden, indem das in Spalte drei angegebene Maximum mit der Testverteilung des Kolmogorov-Smirnov-Tests verglichen wird, und somit dem in Spalte zwei angegebenen kritischen Wert eine Irrtumswahrscheinlichkeit zugeordnet wird[120][121][122].

#### 4.2.1.4 Informationstheoretischer Ansatz zur Bestimmung der Kenngrößen

Das Informationsmaß I kann auch zur direkten Definition der Kenngrößen eingesetzt werden. Jedoch ist dies nur im Messwertbereich sinnvoll, da im Konzentrationsbereich mit den sehr schmal zulaufenden Verteilungsdichten bei kleinen Konzentrationen der Term  $p(x)\ln(p(x))$  unter dem Integral zu numerischen Schwierigkeiten führt, wenn p gegen Null geht. Somit müssen die Integrationsgrenzen an die Breite des Integranden angepasst werden, was ebenfalls mit numerischen Schwierigkeiten verbunden ist[31].

#### 4.2.1.5 Kalibriermethode bei Auftreten des Hook-Effekts

Um bei Auftreten des Effekts einem Meßsignal den richtigen Konzentrationswert zuzuordnen, muss sowohl der Mittelwert des Messwertsignals als auch dessen Varianz verwendet werden. Zunächst werden beide Werte des Messwertsignals gegen die Konzentration aufgetragen und mit einer geeigneten Interpolationsfunktion interpoliert. Dann werden zu dem Signal für eine Probe mit unbekannter Konzentration alle zum Mittelwert gehörenden Konzentrationen bestimmt. Mithilfe der Varianz dieses Messwerts und der Interpolationskurve für die Varianzen der Messwerte wird dann durch Vergleich entschieden, welcher Konzentrationswert zum Messwertsignal gehört.

Das Modell, das für die Varianz verwendet wird, ist linear, da aufgrund der geringen Wiederholung der einzelnen Messungen (n=3) die Varianz berechnet aus den Messwerten selbst eine große Varianz aufweist und somit ein lineares Modell die Werte am besten interpoliert.

Es ist die getrennte Verwendung beider Kurven notwendig. Die Berechnung des Informationsgehaltes der einzelnen Messungen gegen die verwendete Konzentration ergab keine invertierbaren Kurven.

Bestimmung des Informationsgehaltes der einzelnen Messungen aus der Kalibrierkurve und den Messwerten

Die Kalibrierkurve wurde durch die Minimierung von  $\chi^2$  nach Korrektur der Standardabweichungen mit dem F-Test und einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 0.05 angepasst. Mithilfe obiger Beziehung zur Berechnung von I ergeben sich folgende Werte für den Informationsgehalt I:

Progesteron in bidestilliertem Wasser:

Konzentration in ng/ml	0	0.0001	0.0009	0.0090	0.0900	0.9000	9.0000	90.0000	900.00
Informationsgehalt in Bit	-46.07	-2.96	1.33	3.75	-0.69	1.90	3.67	4.45	3.45

Progesteron in Frischmilch:

Konzentration in ng/ml	0	0.0090	0.0900	0.9000	9.0000	90.0000	900.0000
Informationsgehalt in Bit	6.08	3.46	-0.95	5.67	-12.94	2.42	-48.47

Progesteron in H-Milch:

Konzentration in ng/ml	0	0.0090	0.0900	0.9000	9.0000	90.0000	900.0000
Informationsgehalt in Bit	5.27	3.89	4.50	4.39	3.07	4.40	0.09

Progesteron in Rohmilch:

Konzentration in ng/ml	0	0.0090	0.0900	0.9000	9.0000	90.0000	900.0000
Informationsgehalt in kBit	-5.2	-1.86	-12.45	-0.2	-10.11	-6.71	-0.95

Progesteron in Wasser:

Konzentration in ng/ml	0.0000	0.0001	0.0009	0.009	0.090	0.900	9.0000	90.000	900.00
Informationsgehalt in Bit	-91.41	1.53	-52.14	-0.98	-3.78	-2.34	-8.047	9.91	-1.13

TNF- $\alpha$  in PBS:

Konzentration in ng/ml	$10^{-11}$	$9 \cdot 10^{-8}$	$9 \cdot 10^{-7}$	$9 \cdot 10^{-5}$	0.009	0.09	0.9
Informationsgehalt in Bit	-33.41	3.27	-2.24	0.67	2.24	3.89	4.86

TNF- $\alpha$  in PBS:

Konzentration in ng/ml	$10^{-11}$	$9 \cdot 10^{-8}$	$9 \cdot 10^{-7}$	$9 \cdot 10^{-6}$	$9 \cdot 10^{-5}$	0.009	0.09	0.9
Informationsgehalt in Bit	-78.33	3.32	3.37	-4.35	-4.40	4.46	4.14	3.20

PSA in PBS:

Konzentration in ng/ml	$10^{-11}$	$2.7 \cdot 10^{-8}$	$2.7 \cdot 10^{-7}$	$2.7 \cdot 10^{-6}$	$2.7 \cdot 10^{-4}$	0.0027	0.027	0.27
Informationsgehalt in Bit	2.65	1.48	6.72	2.82	-9.9	3.11	1.31	2.83

Ein negativer Informationsgehalt ist ein Zeichen dafür, dass die Kalibrierkurve von den Messergebnissen zu stark abweicht. Man kann deutlich erkennen, dass dies bei den Messungen im Bereich des Blindwertes und im Bereich der höchsten Konzentration der Fall ist. Im Bereich des Blindwertes kommt dies durch die starke Abweichung des Mittelwertes von der Kalibrierkurve zustande. Dies hat seine Ursache vermutlich in der höheren Anzahl der Messungen dieses Wertes und der damit verbundenen höheren Anzahl der Regenerationen der Oberfläche. Im Bereich der höheren Konzentrationen machen sich systematische Fehler am Kalibriermodell für diesen Bereich bemerkbar. Für die Messungen, die einen starken Hook-Effekt zeigen, ist der Informationsgehalt ebenfalls im Bereich dieses Effekts negativ. Somit kann dieses Informationsmaß als sehr empfindliche Methode zur Prüfung der Qualität der Kalibrierung eingesetzt werden. Aufgrund der Empfindlichkeit dieses Maßes gegenüber kleinen Abweichungen wird man jedoch nur bei Messungen mit sehr gutem Ergebnis nur positive Informationswerte erhalten.

#### 4.2.1.6 Auswirkung der verschiedenen Probenverteilungen auf die Parameter der Kalibrierkurve für TIRF-Messungen.

Die oben beschriebenen Probenverteilungen ergeben jeweils einen anderen Wert für die Standardabweichung der Kalibrierproben. Für die einzelnen Verteilungen ergeben sich bei den ersten vier TIRF-Messungen folgende Werte[8][9][11] auf vier Stellen nach dem Komma:

Nur gaußverteilte y-Werte ohne Berücksichtigung der Standardabweichung der Kalibrierproben:

TIRF – Nr.	$A_1$	$A_2$	$x_0$	p
1 (Progesteron in bidestilliertem Wasser)	98.0699	11.9600	0.1979	0.6010
2 (Progesteron in Frischmilch)	100.0100	7.9400	4.2695	0.8763
3 (Progesteron in H-Milch)	99.8223	9.9751	3.8017	0.8814
4 (Progesteron in Rohmilch)	99.6121	6.9400	3.9393	0.8036



Annahme exponentiell verteilter Probenkonzentrationen:

TIRF – Nr.	$A_1$	$A_2$	$x_0$	p
1 (Progesteron in bidestilliertem Wasser)	98.0699	11.9600	0.1979	0.6010
2 (Progesteron in Frischmilch)	100.0100	7.9400	4.2695	0.8763
3 (Progesteron in H-Milch)	99.8223	9.9751	3.8017	0.8814
4 (Progesteron in Rohmilch)	99.6121	6.9400	3.9393	0.8036

Annahme gaußverteilter Probenkonzentrationen:

TIRF – Nr.	$A_1$	$A_2$	$x_0$	p
1 (Progesteron in bidestilliertem Wasser)	98.0699	11.9600	0.1979	0.6010
2 (Progesteron in Frischmilch)	100.0100	7.9400	4.2695	0.8763
3 (Progesteron in H-Milch)	99.8223	9.9751	3.8017	0.8814
4 (Progesteron in Rohmilch)	99.6121	6.9400	3.9393	0.8036

Offenbar ist der Einfluss der Verteilung der Probenkonzentration kleiner als die Rechengenauigkeit. Daher kann sie bei der Kalibrierung vernachlässigt werden. Die Gewichtung innerhalb der Berechnung von  $\chi^2$  ändert sich hingegen recht stark, wie aus den jeweiligen Standardabweichungen für die TIRF-Messung Nr.4 abgelesen werden kann:

Konzentrationsstufe	0	0.0090	0.0900	0.9000	9.0000	90.0000	900.0000
Keine Berücksichtigung der Probenverteilung	0.7240	0.7240	0.7241	0.7244	0.7280	0.7638	1.1216
Exponentialverteilung der Kalibrierproben	0.7240	0.9114	3.3340	13.3640	16.7229	5.2143	1.4530
Gaußverteilte Kalibrierproben	0.7240	12.3210	7.2681	3.0526	0.8172	0.7639	1.1216

### 4.3 Anwendung chemometrischer Methoden in der Geostatistik

#### 4.3.1 Anwendung der CGS-Interpolation auf Donau-Messwerte

Diese drei Methoden wurden auf eine Messung von Konzentrationen verschiedener Schadstoffe aus dem Donau-Gebiet angewandt und die Ergebnisse bzgl. des RMSE miteinander verglichen. Die Messwerte wurden von der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Slobodnik, Universität Prag, zur Verfügung gestellt. Die Ergebnisse sind in folgender Tabelle dargestellt:

Substanz	TPS – Interpolation	TPS – GCV – Interpolation	TPS – LSQR – Interpolation
Anthracene	$1.2708 \cdot 10^{-7}$	0.7426	1.0800
Naphthalene	$1.8572 \cdot 10^{-10}$	0.6754	0.8974
Acenaphthylene	$6.0302 \cdot 10^{-10}$	0.7253	0.6436
Acenaphthene,	$3.1827 \cdot 10^{-8}$	0.1096	0.2723
Fluorene	$6.5856 \cdot 10^{-8}$	0.1588	0.3133
Phenanthrene	$1.6410 \cdot 10^{-7}$	0.5050	0.8670
Fluoranthrene	$2.8640 \cdot 10^{-7}$	2.7696	1.9523
Chrysene	$6.2305 \cdot 10^{-7}$	2.1296	1.9085
Benzo(a)pyrene	$1.3761 \cdot 10^{-7}$	9.7022	39.2976

Aus dieser Tabelle kann abgelesen werden, dass die TPS-Interpolation auch zufällige Abweichungen in den Messwerten interpolieren wird. Besser sind die TPS-GCV und die TPS-LSQR-Interpolationen, welche realistischere Werte für RMSE liefern. Die TPS-GCV- Interpolationsmethode ist robuster gegenüber Ausreißern, als die TPS-LSQR-Interpolation, wie an dem Wert für Benzo(a)pyrene abgelesen werden kann.

#### 4.3.2 Anwendung der Zeitreihenvorhersage bei Donau-Daten

Die Proben wurden in den Jahren 1994 bis 2000 dem Seewasser am Hamburger Hafen entnommen. Die Daten wurden von der Arbeitsgruppe um Prof. W.Ahlf, TUHH, zur Verfügung gestellt.

Die verschiedenen beschriebenen Methoden wurden für Messdaten verschiedener biologischer Parameter aus dem Elbe-Gebiet angewandt.

Es wurden dabei Messwerte für den pH-Wert und die Leuchtintensitätsabnahme für verschiedene Verdünnungsstufen verwendet. Der Leuchtbakterientest wurde in Anlehnung an DIN 38412-34 durchgeführt. Es handelt sich um einen Kurzzeittest. Als Testorganismus diente *Vibrio fischeri*, ein anaerobes, gramnegatives Stäbchen mit polarer Begeißelung. Dieses Bakterium ist ein marines Bakterium, weshalb die Proben und das Verdünnungswasser vor ihrer Verwendung aufgesalzen werden müssen.

Der Test beruht auf der Messung der Lichtabgabe der Bakterien. Eine Abnahme der Lichtintensität wird als hemmende Wirkung auf diesen Testorganismus interpretiert. Hierzu wird in einer

Mikrotiterplatte das Testgut bzw. der Verdünnungsansatz mit der Leuchtbakteriensuspension vermischt und die Intensität nach 30 min mit der Intensität des Kontrollansatzes verglichen.

Im Einzelnen wurde wie folgt vorgegangen:

Die tiefgefrorenen Leuchtbakterien wurden mit 1 mL Rekonstitutionslösung vermischt und bei 3°C für 5 min inkubiert. Danach werden die Bakterien in 19 mL Nährmedium-ASW-Lösungsgemisch (1:10) suspendiert und 10 min im Kühlschrank gelagert. Diese Suspension war ca. 6h als Testsuspension geeignet. In Rundküvetten werden jeweils 200 µl dieser Suspension gegeben. Nach 15 min wurde das Ausgangsleuchten ( $IT_0$ ) gemessen und anschließend sofort 800 µl des jeweiligen Testguts zu den Leuchtbakterien pipettiert, bzw. für den Kontrollansatz 800 µl ASW-Lösung. Nach 30 min Kontaktzeit wird die Leuchtintensität ( $IT_{30}$ ) bestimmt. Die prozentuale Abnahme der Leuchtintensität nach 30 min im Testansatz im Verhältnis zum Kontrollansatz wird als Hemmung wie folgt berechnet:

$$Hemmung[\%] = 100 - \frac{IT_{30}(Probe) - IT_0(Probe)}{IT_{30}(Kontrolle) - IT_0(Kontrolle)} * 100$$

Dieser ist gültig, wenn der  $f_k$ -Wert zwischen 0.6 und 1.3 liegt. Dieser Korrekturfaktor ist der Quotient aus der Leuchtintensität nach der Kontaktzeit  $t$  und der Ausgangsintensität, ermittelt bei den Kontrollansätzen. Er ist ein Maß für die zeitliche Änderung der Leuchtintensität im Kontrollansatz und dient zur Berechnung der Bezugswerte für die Testauswertung.

Ferner dürfen die Abweichungen der Parallelbestimmungen von ihrem Mittelwert sowohl bei den Kontrollansätzen als auch bei den der  $G_L$ -bestimmenden Testansätzen nicht mehr als 3% betragen und die Referenzsubstanz 3,5-Dichlorphenol in der Konzentration 5 mg/L Ausgangslösung (was einer Testkonzentration von 4mg/L entspricht) eine 20% - 80% Hemmung verursacht.

Die ASW-Lösung ist dabei eine KCl-CaCl<sub>2</sub>-MgCl<sub>2</sub>-NaCl-Lösung im Konzentrationsverhältnis 10 mmol/L, 10 mmol/L, 50mmol/L und 250mmol/L.

Die Verdünnungsstufen sind dabei das ganzzahlige Volumenverhältnis der Mischung von Abwasser, Eluaten, Extrakten und Schadstofflösungen.

Der Test wurde für die Verdünnungsstufen G2, G4 und G8 durchgeführt.

Die erhaltenen Werte für die Extrapolation sind in folgenden Tabellen zusammengefasst:

Werte für Qualität der Zeitreihenvorhersage der Donau-/Elbedaten

Datum der Messung	pH	pH	G2	G4	G8
1-Oct-1994	A	7.554	82.553	49.47	25.185
1-Jan-1995	B	7.926	72.303	28.081	18.008
1-Jul-1995	C	7.947	72.65	44.6	29.43
1-Jul-1995	D	7.638	99.783	91.298	63.11

1-Oct-1995	E	7.315	27.464	10.02	4.936
1-Oct-1995	A				
1-Jan-1996	B	7.093	37.44	18.878	
1-Jul-1995	C				
1-Mar-1997	L	7.302	6.561	2.992	
1-Oct-2000	ZB	6.928			
1-Apr-1997	M	7.495	11.803	5.724	
1-Jul-1997	O	7.365	9.671	9.937	
1-Jul-1997	P	7.413	32.967	16.014	
1-Oct-1997	Q	6.907	18.573	8.103	
1-Oct-1997	S	7.498	42.565	19.782	
1-Juni-1998	U		46.974	18.92	
1-May-1997	V	6.917			
1-Aug-1999	X	7.334	53.487	27.241	24.513
1-Febr-1999	Z	7.276	77.264	53.916	56.24
1-Jun-2000	ZA	6.931			

RMSE der vorhergesagten pH-Werte von den Messungen im Hamburger Hafen, berechnet mit dem BPNN-Netzwerk:

RMSE	2	3	4	5	6	7
1	0.0012	0.0902	0.0024	0.342	0.0018	0.0017
2	0.0043	0.0051	0.0196	0.0196	0.0049	0.0932
3	0.4040	0.4046	0.4032	0.4050	0.4027	0.4049
4	0.4352	0.4285	0.4312	0.4295	0.4312	0.4318
5	0.3521	0.4372	0.3746	0.3366	0.3554	0.3566

6	0.8521	0.8537	0.7727	0.8530	0.8481	0.8557
---	--------	--------	--------	--------	--------	--------

RMSE der vorhergesagten G2-Werte von den Messungen im Hamburger Hafen, berechnet mit dem BPNN-Netzwerk (Anzahl Input – Neuronen gegen Anzahl vorhergesagter Werte):

RMSE	2	3	4	5
1	0.0022	0.0024	0.0029	0.0025
2	16.8165	16.8172	16.8151	16.8153
3	21.2525	21.2518	21.2520	21.2532
4	25.0195	25.0199	25.0209	25.0200
5	65.2861	65.2868	65.2884	65.2889
6	30.2295	30.2236	30.2288	30.2278

RMSE der vorhergesagten G4-Werte von den Messungen im Hamburger Hafen, berechnet mit dem BPNN-Netzwerk:

RMSE	2	3	4	5
1	0.0025	0.0027	0.0016	0.0028
2	18.8653	18.8654	18.8649	18.8652
3	25.0041	25.0037	25.0062	25.0066
4	20.3700	20.3695	20.3711	20.3716
5	39.1006	39.1025	39.1032	39.1029
6	19.5576	19.5588	19.5591	19.5557

RMSE der vorhergesagten Zeit-Werte von den Messungen im Hamburger Hafen, berechnet mit dem BPNN-Netzwerk:

RMSE	2	3	4	5
1	0.0029	0.0024	0.0028	0.0030
2	127.9831	127.9835	127.9840	127.9823
3	387.4067	387.4054	387.4052	387.4049
4	700.0059	700.0040	700.0056	700.0031

RMSE der vorhergesagten pH-Werte von den Messungen im Hamburger Hafen, berechnet mit dem Elman-Netzwerk:

RMSE	2	3	4	5
1	5.9280	5.9280	5.9280	5.9280
2	8.3856	8.3856	8.3856	8.3856
3	10.4704	10.4703	10.4703	10.4702
4	12.2397	12.2351	12.2345	12.2345
5	14.9290	13.5893	13.5927	13.5890
6	15.0578	15.0727	15.0578	15.0578

RMSE der vorhergesagten G2-Werte von den Messungen im Hamburger Hafen, berechnet mit dem Elman-Netzwerk:

RMSE	2	3	4	5
1	76.2640	76.2640	76.2640	76.2640
2	91.0407	91.0407	91.0407	91.0407
3	100.8775	100.8775	100.8775	100.8775
4	108.1450	108.1450	108.1450	108.1450
5	104.5867	104.5867	104.5867	104.5867
6	108.5246	108.5246	108.5246	108.5246

RMSE der vorhergesagten G4-Werte von den Messungen im Hamburger Hafen, berechnet mit dem Elman-Netzwerk:

RMSE	2	3	4	5
1	52.9160	52.9160	52.9160	52.9160
2	55.9725	55.9725	55.9725	55.9725
3	56.0474	56.0474	56.0474	56.0474
4	57.9295	57.9295	57.9295	57.9295
5	54.9903	54.9903	54.9903	54.9903
6	56.3285	56.3285	56.3285	56.3285

RMSE der vorhergesagten Zeit-Werte von den Messungen im Hamburger Hafen, berechnet mit dem Elman-Netzwerk:

RMSE	2	3	4
1	730151	730151	730151
2	$1.3027 \cdot 10^6$	$1.3027 \cdot 10^6$	$1.3027 \cdot 10^6$
3	$1.2646 \cdot 10^6$	$1.2646 \cdot 10^6$	$1.2646 \cdot 10^6$

Aus den Tabellen kann abgelesen werden, dass die Vorhersage der Werte bei dicht aufeinanderfolgenden Werten in einer Zeitreihe gut funktioniert, bei den hier vorliegenden relativ weit auseinanderliegenden Werten jedoch recht schlecht abschneidet. Dies gilt für alle vorliegenden Methoden.

Allgemein schneidet das BPNN-Netzwerk bei der Zeitreihenvorhersage besser ab, als das Elman-Netzwerk.

#### 4.3.3 Anwendung der Korrelationsanalyse bei Donau-Daten

Innerhalb des AquaTerra-Projektes wurden dem Donauwasser Proben an 32 Stellen entlang der gesamten Donau entnommen. Die Proben stammen sowohl aus dem Flusswasser wie auch aus dem Sediment. Sie wurden alle in den Jahren 2004 und 2005 gemessen. Es wurden insgesamt 42 Schadstoffe und die Anzahl einer Reihe von Organismen vermessen. Die vier häufigsten sind in der Tabelle aufgelistet.

Die Korrelationsanalyse wurde auf Messdaten von Schadstoffkonzentrationen und biologischen Parametern von Proben aus der Donau angewandt[60][61][62][63][64][65]. Es ergibt sich folgende Tabelle für die Korrelationswerte:

	<i>Dreissena polymorpha</i>	<i>Theodoxus fluviatilis</i>	<i>Anodonta anatine</i>	<i>Dikerogammarus villosus</i>
Naphtalene	0.1405	-0.1724	0.1757	-0.2166
Acenaphthylene	0.1890	0.0836	-0.0331	0.1226
Acenaphthene	-0.0516	-0.1555	0.0316	-0.1308
Fluorene	-0.2700	-0.3057	0.0537	-0.3608
Phenanthrene	-0.0456	-0.1701	0.1068	-0.0470
Anthracene	0.0430	-0.0817	-0.0434	-0.0544
Fluoranthene	0.3541	-0.0307	0.1296	-0.0451
Pyrene	0.3729	0.0308	0.1256	0.0435
Benz(a)anthracene	0.3345	0.0764	0.0415	0.0996
Chrysene	0.3492	0.0656	0.0767	0.1180
Benzo(b)fluoranthene	-0.1437	-0.1487	-0.1660	-0.1714
Benzo(k)fluoranthene	-0.1377	-0.1269	-0.1886	-0.1817
Benzo(a)pyrene	-0.1258	-0.0567	-0.2396	0.0062
Indeno(1,2,3-c,d)pyrene	-0.0973	-0.1070	-0.1270	-0.1443
Dibenzo(a,h)anthracene	0.3808	0.0823	0.0377	0.1743
Benzo(g,h,i)perylene	-0.1345	-0.1373	-0.1699	-0.1819
PCB 28 (2,4,4'-trichlorbiphenyl)	-0.1387	-0.1385	-0.1698	-0.1838
PCB 31 (2,4',5-trichlorbiphenyl)	-0.1387	-0.1385	-0.1698	-0.1838
PCB 52 (2,2',5,5'-tetrachlorbiphenyl)	-0.1479	-0.1304	-0.2180	-0.2169
PCB 101 (2,2',4,5,5'-pentachlorbiphenyl)	-0.2007	-0.1234	0.0888	-0.4744
PCB 77 (3,3',4,4'-tetrachlorbiphenyl)	-0.2007	-0.1234	0.0888	-0.4744
PCB 118 (2,3',4,4',5-pentachlorbiphenyl)	0.0498	0.0218 -	0.0439	-0.1487



PCB 105 (2,3,3',4,4'-pentachlorbiphenyl)	0.0635	-0.1001	0.0413	-0.1481
PCB 153 (2,2',4,4',5,5'-hexachlorbiphenyl)	-0.1728	0.0792	0.0233	-0.0945
PCB 138 (2,2',3,4,4',5-hexachlorbiphenyl)	-0.1807	0.0710	0.0242	-0.1001
PCB 126 (3,3',4,4',5-pentachlorbiphenyl)	-0.2061	0.0657	0.0204	-0.1050
PCB 128 (2,2',3,3',4,4'-hexachlorbiphenyl)	0.0046	-0.1931	0.3373	-0.0195
PCB 156 (2,3,3',4,4',5-hexachlorbiphenyl)	-0.0086	-0.1987	0.3354	-0.0081
PCB 180 (2,2',3,4,4',5,5'-heptachlorbiphenyl)	0.3939	0.1232	0.1453	0.2011
PCB 169 (3,3',4,4',5,5'-hexachlorbiphenyl)	0.4242	0.1104	0.1420	0.1436
PCB 170 (2,2',3,3',4,4',5-heptachlorbiphenyl)	0.3938	0.0478	0.0619	0.1129
Lindane (gamma-hexachlorocyclohexane)	0.3938	0.0478	0.0619	0.1129
Hexachlorobenzene	0.3991	0.2095	0.0093	0.1528
Hexachlorobutadiene	0.3991	0.2095	0.0093	0.1528
Di-(2-ethylhexyl)phtalate (DEHP)	0.2466	0.1230	0.2267	-0.1936
Pentachlorobenzene	0.2466	0.1230	0.2267	-0.1936
pp' DDT	0.2466	0.1230	0.2267	-0.1936
Nonylphenols	0.0770	0.0985	0.3342	-0.1814
Pentachlorophenol	0.0770	0.0985	0.3342	-0.1814
Octylphenols	0.0770	0.0985	0.3342	-0.1814
Bisphenol A	0.0960	0.2229	0.4882	-0.0012

Aus dieser Tabelle kann eine besonders starke Korrelation zwischen den Konzentrationen von PCBs und der Anzahl der angegebenen Organismen abgelesen werden. Dieses Ergebnis kann für die Entwicklung neuer Monitoring-Methoden basierend auf diesen Organismen ausgenutzt werden.

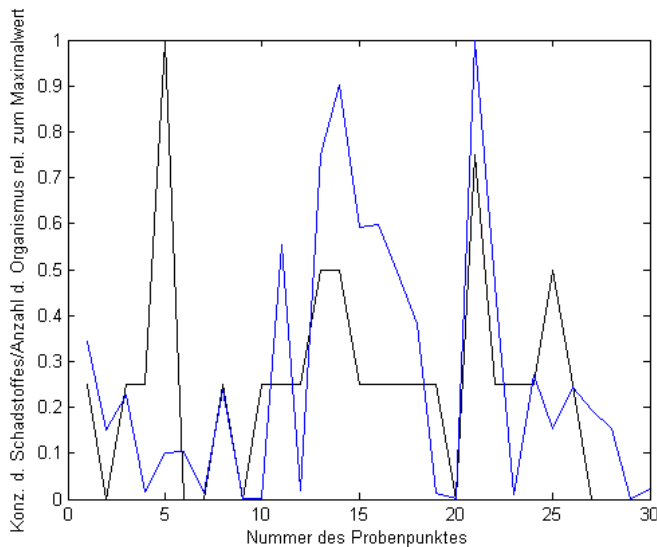


Abb.30: Beispiel der relativen Häufigkeit eines Organismus zur Konzentration eines Schadstoffes an verschiedenen Probenpunkten am Beispiel des Bisphenol A (dünn) und *Dreissena polymorpha* (dick)

Die Korrelation zwischen der Anzahl der Organismen in den Proben und den Schadstoffkonzentrationen kann auch anhand der Abb. 30 am Beispiel des Bisphenol A und *Dreissena polymorpha* demonstriert werden.

## 5. Zusammenfassung und Ausblick

In dieser Arbeit konnte ein integriert optisches Mach-Zehnder-Interferometer charakterisiert werden. Es stellte sich heraus, dass das verwendete Interferometer zusammen mit der verwendeten Auswertemethode nicht den Ansprüchen eines zweckmäßigen Meßgerätes genügt. Jedoch existieren Weiterentwicklungen dieses Meßprinzips über elektrooptisch korrigierte Chips, die diese Schwierigkeiten überwinden können.

Ferner wurden verschiedene Methoden zur Kalibrierung und zur Berechnung von Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenzen bei Immunoassays verglichen. Im Ergebnis zeigte sich, dass es einige erfolgversprechende Ansätze bei der Kalibrierung mithilfe modellfreier Methoden und der Definition der Kenngrößen in speziellen Fällen wie bei Auftreten des Hook-Effekts gibt. Dabei wurde insbesondere als modellfreie Methode die Support Vector Machine (SVM) verwendet und aufgezeigt, wie mithilfe eines schon gegebenen Modells auch bei Vorliegen weniger Messungen eine optimale modellfreie Methode gewonnen werden kann.

Für die Bindungshemmtests konnte eine numerisch stabile und einfache Methode zur Bestimmung der Nachweisgrenze ansatzweise entwickelt werden.

Desweiteren wurden die Einflüsse von verschiedenen Messwert- und Probenverteilungen auf die Kalibrierung von Daten von Bindungshemmtests untersucht. Dabei zeigte sich ein großer Einfluss der

Messwertverteilung auf die Parameter der Kalibrierkurven. Es wurde ferner eine allgemeine Methode zur Abschätzung optimaler Verteilungen aus vorgegebenen Kenntnissen über einen Messvorgang vorgestellt und zur Abschätzung von Probenverteilungen verwendet. Jedoch zeigte sich bei den hier verwendeten Messungen kein signifikanter Einfluss auf die Parameter der Kalibrierkurven.

Schließlich konnten einige Ergebnisse im Bereich der Geostatistik in den Gebieten der Interpolation, der Zeitreihenanalyse und der Korrelationsanalyse dargestellt werden. Dabei wurden insbesondere signifikante Ergebnisse bei der Korrelationsanalyse zwischen biologischen und chemischen Parametern von geostatistischen Messdaten gefunden werden.

Weitere Untersuchungen können mit elektrooptisch korrigierten Mach-Zehnder-Chips erfolgen. Ferner können mithilfe der statistischen Versuchsplanung [3] und der Transinformation [86] weitere Verbesserungen der Kalibrierungen erfolgen.

## 6.Literatur

[1] <http://www.geop.ubc.ca/~sbilling/cgs.html>

[2]<http://www.kyb.mpg.de/bs/people/spider/main.html>

[3]H.Bandemer, „Optimale Versuchsplanung“, H.Deutsch, 1976

[4]W.Karthe,R.Müller, „Integrierte Optik“, Leipzig, Akad. Verl. -Ges. Geest und Portig, 1991

[5]T.Tamir, E.Gamire, “Integrated Optics“, Springer, 1975

[6]F.deFornel, „Evanescant Waves – From newtonian Optics to atomic Optics“, Springer 2001

[7]The Mathworks, “Neural Network Toolbox“, The Math Works, 2001

[8]The Mathworks, “Curve Fitting Toolbox“, The Math Works, 2002

[9]The Mathworks, “Optimization Toolbox“, The Math Works, 2000

[10]The Mathworks, “Statistics Toolbox“, The Math Works, 2002

[11]The Mathworks, “Symbolic Math Toolbox“, The Math Works, 2002

[12]S.D.Billing, G.N.Newsam, R.K.Beatson, “Smooth fitting of geophysical data using continuous global surfaces“, Geophysics, Vol. 87, No.6, pp. 1823-1834

[13]S.D.Billings, R.K.Beatson, G.N.Newsam, “Interpolation of geophysical data using continuous global surfaces“, Geophysics Vol. 67, No. 6, pp. 1810-1822

[14][http://www.geop.ubc.ca/~sbilling/papers/fourier\\_transformation\\_using\\_cgs.PDF](http://www.geop.ubc.ca/~sbilling/papers/fourier_transformation_using_cgs.PDF)

[15]R.K.Beatson, W.A.Light, S.Billings, „Fast Solution of the Radial Basis Function

[16]Interpolation Equations: Domain decomposition methods“, SIAM Journal on Scientific Computing, Vol. 22, Issue. 5, 2000

[17]G.Donato, S.Belongie, “Approximate Thin Plate Spline Mappings“, NIPS, 2001

- [18]K.Danzer, H.Hobert, C.Fischbacher, K.-U.Jagemann, "Chemometrik", Springer, 2001
- [19]G.Ehrlich, K.Danzer, "Nachweis – und Erfassungsvermögen von Analyseverfahren", Springer, 2005
- [20]E.N.Brown, T.J.McDermott, K.J.Bloch, Alex D. McCollom, "Defining the smallest analyte concentration an immunoassay can measure", Clin.Chem. 42:6, pp. 893-903
- [21]M.J.Eddowes, „Direct Immunochemical Sensing: Basic Chemical Principles and Fundamental Limitations”, Biosensors 3, 1987/88, pp. 1-15
- [22]H.Scheffé, "A statistical theory of calibration", The annals of statistics, 1973,Vol.1,No.1,pp.1-37
- [23]B.Schölkopf, A.J.Smola, "Learning with Kernels", Cambridge, Mass., 2002
- [24]V.Vapnik, "Estimation of Dependence Based on Empirical Data", Springer, 1982
- [25]V.Vapnik, "The Nature of Statistical Learning Theory", Springer, 1998
- [26]G.P.Burth, "Aufbau und Test integriert-optischer Mach-Zehnder Interferometer zur Detektion von Schadstoffen in Wasser", Diplomarbeit, Universität Tübingen, 2004
- [27]M.-Th. Schafmeister, „Geostatistik für die hydrogeologische Praxis“, Springer, 1999
- [28]N.Cristianini, „An Introduction to Support Vector Machines“, Cambridge University Press, 2000
- [29]J.Růžička, E.H.Hansen, "Flow Injection Analysis", John Wiley, 1988
- [30]J.M.Reijn, "Flow Injection Analysis", Dissertation, Amsterdam, 1982
- [31]K.Eckschlager, K.Danzer, "Information Theory in Analytical Chemistry", John Wiley, 1994
- [32]N.Wu, "The Maximum Entropy Method", Springer, 1997
- [33]R.G.Heideman, P.V.Lambeck, "Remote opto-chemical sensing with extreme sensitivity: design, fabrication and performance of a pigtailed integrated optical phase-modulated Mach-Zehnder interferometer system", Sens. and Act. B 61, 1999, pp. 100-127
- [34]P.J.Munson, D.Rodbard, "A Versatile Computerized Approach for Characterization of Ligand-Binding Systems", Anal. Biochem. 107,1980, pp. 220-239
- [35]M.Luthardt, E.Than, H.Heckendorff, "Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze analytischer Verfahren", Fresenius Z. Anal. Chem., 1987, 326:pp. 331-339
- [36]H.Kaiser, „Zur Definition von Selektivität, Spezifität und Empfindlichkeit von Analyseverfahren“, Z.Anal. Chem 260, 1972, pp. 252-260
- [37]L.M.Schwartz, „Lowest Limit of Reliable Assay Measurement with Nonlinear Calibration“, Anal. Chem. 55, 1983, pp. 1424-1426
- [38]L.M.Schwartz, „Calibration Curves with Nonuniform Variance“, Anal. Chem., Vol 51, No.6, 1979
- [39]L.M.Schwartz, „Nonlinear Calibration Curves“, Anal. Chem. Vol. 48, No. 14, 1976

- [40]L.M.Schwartz, „Nonlinear Calibration”, Anal. Chem., Vol. 49, No. 13, 1977
- [41]G.Mücke, “Wie wenig ist ‘Nichts’? – Problematik der Nachweis – und Bestimmungsgrenzen”, Fresenius Z. Anal. Chem. 320, 1985, pp.639-641
- [42]D.Rodbard, Y.Feldman, „Kinetics of two-site Immunoradiometric („Sandwich’) Assays - I“, Immunochemistry, 1978, Vol. 15, pp. 71-76
- [43]D.Rodbard, Y.Feldman, M.L.Jaffe, L.E.M.Miles, „Kinetics of two-site Immunoradiometric („Sandwich’) Assays - II“, Immunochemistry, 1978, Vol. 15, pp. 77-82
- [44]K.Tiefenthaler, W.Lukas, “Sensitivity of grating couplers as integrated-optical chemical sensors”, J.Opt.Soc.Am. B, Vol.6, No.2
- [45]E.F.Schipper, A.M.Brugman, C.Dominguez, L.M.Lechuga, R.P.H. Kooyman, J.Greeve, “The realization of an integrated Mach-Zehnder waveguide immunosensor in silicon technology”, Sensors and Actuators B 40, 1997, pp. 147-153
- [46]A.Brandenburg, “Differential refractometry by an integrated-optical Young interferometer”, Sens. And Act. B, 1997, pp.266-271
- [47]R.G.Heideman, R.P.H.Kooyman,J.Greeve, “Performance of a highly sensitive optical waveguide Mach-Zehnder interferometer immunosensor”, Sens. And Act. B 10, 1993, pp. 209-217
- [48]A.Brandenburg, R.Kauter, C.Künzel, M.Stefan, H.Schulte, “Interferometric sensor for detection of surface-bound bioreactions”, Appl. Optics, Vol. 39, No. 344, 2000
- [49]J.Schwieder, R.Burow, K.-E. Elssner, J.Grzanna,R.Spolaczyk, K.Merkel, „Digital wave-front measuring interferometry: some systematic error sources“, Appl. Optics, Vol. 22, No. 21, 1983
- [50]L.M.Johnson, F.J.Leonberger, “Integrated optical temperature sensor”, Appl. Phys. Lett. 41(2), 1982
- [51]P.de Groot, X. Colonna de Lega, J.Kramer, M.Turzhitsky, “Determination of fringe order in white-light interference microscopy”, Appl. Optics, Vol. 41, No. 22, 2002
- [52]A.N.Sloper, M.T.Flanagan, “Scattering in planar surface waveguide immunosensors”, Sens. And Act. B 11, 1993, pp. 537-542
- [53]A.Brandenburg, R.Henninger, “Integrated optical Young interferometer”, Appl. Optics, Vol. 33, No. 25, 1994
- [54]E.F.Schipper, R.P.H.Kooyman, R.G.Heideman, J.Greeve, “Feasibility of optical waveguide immunosensors for pesticide detection: physical aspects”, Sens. And Act. B 24-25, 1995, pp. 90-93
- [55]A.Brandenburg, R.Edelhäuser, “Integrated optical gas sensors using organically modified silicates as sensitive films”, Sens. and Act. B 11, 1993, pp. 361-374
- [56]J.H.Bruning, D.H.Herriott, J.E.Gallagher, D.P.Rosenfeld, A.D.White, and D.J. Brangaccio, “Digital Wavefront Measuring Interferometer for Testing Optical Surfaces and Lenses”, Appl. Optics, Vol. 13, No. 11, 1974

- [57]M.Takeda, H.Ina, S.Kobayashi, "Fourier-transform method of fringe-pattern analysis for computer-based topography and interferometry", J.Opt.Soc.Am., Vol. 72, No.1 1982
- [58]A.Pförtner, J.Schwider, "Dispersion error in white-light Linnik interferometers and its implications for evaluating procedures", Appl. Optics, Vol. 40, No. 34, 2001
- [59]H.Mauser, "Formale Kinetik", Bertelsmann, 1974
- [60]R.C.Hale, C.L.Smith, „A Multiresidue Approach for Trace Organic Pollutants: Application to Effluents and Associated Aquatic Sediments and Biota from the Southern Chesapeake Bay Drainage Basin1985-1992“, Intern. J. Environ. Anal. Chem. , Vol. 64, pp. 21-33
- [61]D.J. Reid, G.R. MacFarlane, „Potential biomarkers of crude oil exposure in the gastropod mollusc, *Austrocochlea porcata*: laboratory and manipulative field studies“, Environmental Pollution 126 (2003) 147–155
- [62]J. Mouthon, „Molluscs and biodegradable pollution in rivers : proposal for a scale of sensitivity of species“, Hydrobiologia 317: 221 -229, 1996
- [63]G.G. Lauenstein, „Comparison of Organic Contaminants Found in Mussels and Oysters from a Current Mussel Watch Project with Those from Archived Mollusc Samples of the 1970s“, Marine Pollution Bulletin, Vol. 30, No. 12, pp. 826~33, 1995
- [64]E.Ma. Peña-Méndez, Ma.S. Astorga-España , F.J. García-Montelongo, "Chemical fingerprinting applied to the evaluation of marine oil pollution in the coasts of Canary Islands (Spain)" , Environmental Pollution 111 (2001) 177±187
- [65]K. Walsh, R. H. Dunstan, R. N. Murdoch, B. A. Conroy, T. K. Roberts, P. Lake, "Bioaccumulation of Pollutants and Changes in Population Parameters in the Gastropod Mollusc *Austrocochlea constricta*", Arch. Environ. Contam. Toxicol. 26, 367-373 (1994)
- [66]R. A. Dudley, P. Edwards, R. P. Eklms, D. J. Flinney, I. G. M. McKenzie, G. M. Raab, D. Rodbard, and R. P. C. Rodgers, "Guidelines for Immunoassay Data Processing", Clin. Chem. 31/8,1264-1271 (1985)
- [67]J. C. Miller, J. N. Miller, „Basic Statistical Methods for Analytical Chemistry Part 1. Statistics of Repeated Measurements A Review“, Analyst, 1988, Vol. 113
- [68]W. R. Wolf, D. E. LaCroix, R. Goel, and M. Kaur, "Total Fat Analysis in Milk- and Soy-Based Infant Formula Powder by Supercritical Fluid Extraction", JAOCS, Vol. 80, no. 9 (2003)
- [69]H. Feldman, D. Rodbard, D. Levine, "Mathematical Theory of Cross-Reactive Radioimmunoassay and Ligand-Binding Systems at Equilibrium", Anal. Biochem. 45, 530-556 (1972)
- [70]S.Reder, F.Dieterle, H.Jansen , S.Alcock, G.Gauglitz, „Multi-analyte assay for triazines using cross-reactive antibodies and neural networks“, Biosensors and Bioelectronics 19 (2003) 447\_ 455
- [71]B.Bjarnasona, N.Bousiosa, S.Ereminb, G.Johanssona, "Flow injection enzyme immunoassay of atrazine herbicide in water", Anal. Chim. Acta 347 (1997) 11 I-1 20

- [72]H. A. Feldman, „Mathematical Theory of Complex Ligand-Binding Systems at Equilibrium: Some Methods for Parameter Fitting“, *Anal. Biochem.* 48, 317-338 (1972)
- [73]Y.Zhou, H.Wang, G.Sun,Y,Fan, X. Chen, Z.Hu, “Application of artificial neural networks in multifactor optimization of an FIA system for the determination of aluminium“, *Fresenius J Anal Chem* (2000) 366 : 17–21
- [74]S.Busse, „Untersuchung molekularer Erkennungsreaktionen mit einem integriert-optischen Mach-Zehnder Interferometer“, Dissertation, Universität Mainz, 2000
- [75]K. Schmitt, „Un nouveau dispositif Interferometrique pour la detection de Biomolecules sans adjuvant“, Dissertation, Universität Louis Pasteur, 2006
- [76]J.Piebler, “Modifizierung von Oberflächen für die thermodynamische und kinetische Charakterisierung biomolekularer Erkennung mit optischen Transducern“, Diss., Universität Tübingen, 1997
- [77]K. Danzer, K. Eckschlager , M. Matherny, „Informationstheorie in der Analytik II. Mehrkomponentenanalyse“, *Fresenius Z Anal Chem* (1989) 334:1- 8
- [78]K. Danzer , K. Eckschlager und D. Wienke, „Informationstheorie in der Analytik I. Grundlagen und Anwendung auf Einkomponentenanalysen“, *Fresenius Z Anal Chem* (1987) 327 : 312- 328
- [79]I.Obrusnik, K. Eckschlager, „Application of Reference Materials for Quality Assessment in Neutron Activation Analysis - Use of Information Theory“, *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry, Articles*, Vol. 169, No. 2 (1993) 347-361
- [80]K. Eckschlager ,V. Štěpánek, „Information Theory Approach to Trace Analyses“, *Mikrochimica Acta [Wien]* 198111, 143—150
- [81]K. Eckschlager ,V. Štěpánek, “Information Content of Trace Analysis Results“, *Mikrochimica Acta [Wien]* 1978 I, 107—114
- [82]K. Eckschlager, „Informationsgehalt analytischer Ergebnisse“, *Z. Anal. Chem.* 277, 1-8 (1975) - \_9 by Springer-Verlag 1975
- [83]E.Limpert, W.A. Stahel , M. Abbt. „Log - normal Distributions across the Sciences: Keys and Clues“, *BioScience*, Vol. 51 No. 5, 2001
- [84]A.de Lean, A. A. Hancock, R. J. Lefkowitz, “Validation and Statistical Analysis of a Computer Modeling Method for Quantitative Analysis of Radioligand Binding Data for Mixtures of Pharmacological Receptor Subtypes“, *Molecular Pharmacology*, 21:5-16, 1981
- [85]A.de Lean, P. J. Munson, D. Rodbard, “Simultaneous analysis of families of sigmoidal curves: application to bioassay, radioligand assay, and physiological dose-response curves“, *Am. J. Physiol.* 235(Z): E97-E102, 1978
- [86]B. Pompe, „Die Messung von Informationsflüssen mit einer verallgemeinerten Transinformation“, Habilitation, Universität Greifswald, 1997

- [87]D. Rodbard, R. H. Lenox, H. Linton Wray, D. Ramseth, "Statistical Characterization of the Random Errors in the Radioimmunoassay Dose-Response Variable", *Clin. Chem.* 22/3, 350-358 (1976)
- [88]I.V. Kovalenko, G.R. Rippke, C. R. Hurburgh, "Determination of Amino Acid Composition of Soybeans (*Glycine max*) by Near-Infrared Spectroscopy", *J. Agric. Food Chem.*, **54** (10), 3485 -3491, 2006
- [89]A.Borin, M.Flôres Ferrão, C.Mello, D.Althmann Maretto, R. J. Poppi, "Least-squares support vector machines and near infrared spectroscopy for quantification of common adulterants in powdered milk", *Anal. Chim. Acta* 579 (2006) 25–32
- [90]L.Cao, "Support vector machines experts for time series forecasting", *Neurocomputing*, 1625, 2002, pp. 1-19
- [91]D.J.C.Mackay, "Gaussian Processes", 1998, D. J. C. MacKay. *Introduction to gaussian processes*. In C. M. Bishop, editor, *Neural Networks and Machine Learning*, volume 168 of *F: Computer and Systems Sciences*, pages 133--165, Berlin, Heidelberg, 1998. NATO Advanced Study Institute, Springer.
- [92]M. Pontil, S. Mukherjee, F. Girosi, "On the Noise Model of Support Vector Machines Regression", *Algorithmic Learning Theory*, 11th International Conference, ALT 2000, Sydney, Australia, December 2000, Proceedings
- [93]R.Rosipal, L.J. Trejo, "Kernel Partial Least Squares Regression in Reproducing Kernel Hilbert Space", *Journal of Machine Learning Research* 2 (2001) 97-123
- [94]A.J. Smola, B. Schölkopf, „A Tutorial on Support Vector Regression“, <http://eprints.pascal-network.org/archive/00002057/01/SmoSch03b.pdf>
- [95]O.Chapelle, V.Vapnik, "Choosing Multiple Parameters for Support Vector Machines", <http://citeseer.ist.psu.edu/cache/papers/cs/22859/http:zSzzSzwww.ai.mit.eduzSzprojectszSzcbclzSzpublicationszSzpszSzoptimal.pdf/chapelle01choosing.pdf>, 2001
- [96]S.Mukherjee, E.Osuna, F.Girosi, "Nonlinear Prediction of Chaotic Time Series Using Support Vector Machines", *Proc. of IEEE*, 1997
- [97]M.Pontil, S.Mukherjee, F.Girosi, "On the Noise Model of Support Vector Machine Regression", *A.I. Memo No. 1651* October 1998, C.B.C.L Paper No. 168
- [98]C.Saunders, A.Gammerman, V.Vovk, "Ridge Regression Learning Algorithm in Dual Variables", *Proc. 15th International Conf. on Machine Learning*
- [99]A.J.Smola, B.Schölkopf, "A Tutorial on Support Vector Regression", *NeuroCOLT2 Technical Support Series*, NC2-TR-1998-030, 1998
- [100]M.E.Tipping, "The Relevance Vector Machine", *Advances in Neural Information Processing Systems*, San Mateo, CA, 2000
- [101]K.-R. Müller, A.J.Smola, G.Rätsch, B.Schölkopf, J.Kohlmorgen, V.Vapnik, „Using Support Vector Machines for time Series Prediction“, W. Gerstner, A. Germond, M. Hasler, and J.-D. Nicoud, editors,



Artificial Neural Networks - ICANN'97, pages 999-1004. Springer, 1997.

<http://citeseer.ist.psu.edu/uller97predicting.html>

[102]K.-R. Müller, A.J.Smola, G.Rätsch, B.Schölkopf, J.Kohlmorgen, V.Vapnik, „Predicting Time Series with Support Vector Machines“, Proceedings of ICANN'97, Springer LNCS 1327, pp. 999-1004

[103]P.-H. Chen, C.-J. Lin, B. Schölkopf, „A tutorial on n-support vector machines“, Appl. Stochastic Models Bus. Ind., 2005; 21:111–136

[104]M.Pontil, R.Rifkin, T.Evgeniou, “From Regression to Classification in Support Vector Machines”, *ESANN*, 1999

[105]B.Schölkopf, P.Bartlett,A.Smola, R.Williamson, “Support Vector Regression with Automatic Accuracy Control”, Proc. Eighth Int'l Conf. Artificial Neural Networks, L. Niklasson, M. Boden, and T. Ziemke, eds., pp.111-116,1998. <http://svm.first.gmd.de>,  
<http://citeseer.ist.psu.edu/lkopf98support.html>

[106]S.R. Gunn, “Support Vector Machines for Classification and Regression”, Technical Report, Faculty of Engineering, Science and Mathematics, School of Electronics and Computer Science, University of Southampton

[107]B.Schölkopf, J. C. Platt, J.Shawe-Taylor, A. J. Smola, R. C. Williamson, “Estimating the Support of a High-Dimensional Distribution”, Technical Report MSR-TR-99-87, Microsoft Research Microsoft Corporation One Microsoft Way Redmond, WA 98052, 1999

[108]F. E.H. Tay , L. Cao, “Application of support vector machines in financial time series forecasting”, *Omega* 29 (2001) 309–317

[109]H.Eckstein, “Charakterisierung von integriert optischen Biosensoren”, Diplomarbeit, IOT, FH Mannheim, 1993

[110]G.P.Burth, „Aufbau und Test integriert-optischer Mach-Zehnder Interferometer zur Detektion von Schadstoffen in Wasser“, Diplomarbeit, Universität Tübingen, 2004

[111]R.Frank, „Reflektometrische und integriert optische Sensoren für die Bioanalytik“, Dissertation, Universität Tübingen, 2005

[112]G.Proll, „Biosensorsystem für vollständig automatisierte ultra-sensitive Multianalyt-Immunoassays“, Dissertation, Universität Tübingen, 2005

[113]H.Workman et al., „Statistics in Spectroscopy“, Academic Press, 1991

[114]L.Sachs, J.Hederich, “Angewandte Statistik”, Springer, 2006

[115]H.Mayer-Bode,“Herbizide und ihre Rückstände“, Ulmer, 1971

[116]B.Drapp, „Modellierung und Charakterisierung von integriert-optischen Wellenleitern im Zusammenwirken mit Polymerfilmen und flüssigkristallinen Schichten für die Umweltanalytik“, Dissertation, Universität Tübingen, 2001

[117]N.D.Käppel, „Immunoassay-Optimierung für verschiedene Probenmatrices“, Dissertation, Universität Tübingen, 2007

[118]M.Yan, O.Ramström, „Molecular Imprinted Materials“, Dekker, 2005

[119]B.Müller, J.Reinhardt, M.T.Strickland, „Neural Networks - An Introduction“, Springer, 1995

[120]E.F.Schipper, A.J.H. Bergevoet, R.P.H. Kooyman, J. Greve, „New detection method for atrazine pesticides with the optical waveguide Mach-Zehnder immunosensor“, *Analytica Chimica Acta* 341, pp. 171-176, 1997

[121]E.F.Schipper, R.P.H. Kooyman, R.G. Heideman, J. Greve, “Feasibility of optical waveguide immunosensors for pesticide detection: physical aspects”, *Sensors and Actuators B* 24-25, pp. 90-93, 1995

[122]E.F.Schipper, A.M. Brigman, C. Dominguez, L.M. Lechuga, R.P.H. Kooyman, J. Greve, “The realization of an integrated Mach-Zehnder waveguide immunosensor in silicon technology”, *Sensors and Actuators B* 40, pp. 147-153, 1997

**Meine akademischen Lehrer waren:**

M. Wolff, A. Schwenk, W.-D. Hartmann, M. Baumann, H. Lindel, O. Lutz, K. Gaukler, H. Clement, P. Grabmayr, G.J. Wagner, R.P. Hübener, W. Nakel, T. Hehl, O. Eibl, H. Müther, N. Schopohl, A. Fässler, T. Dahm, H. Pfister, A. Buchmann, H. Ruder, A. Kraus, W. Rosenstiel, H. Klären, W. Strasser, H. Schweizer, M. Kaufmann, A. Zell, W. Küchlin, M. Gerlinger, G. Gauglitz

## Lebenslauf

**Name** Thorsten Laib  
**Geburtstag** 7. Juni 1973  
**Familienstand** ledig  
**Staatsangehörigkeit** deutsch

### Schule

09/1990-05/1993 Ferdinand-von-Steinbeis-Schule in Reutlingen mit dem Abschluss der fachgebundenen Hochschulreife in Reutlingen  
07/1984-07/1990 Geschwister-Scholl-Realschule in Bad Urach  
07/1980-07/1984 Grundschule in Bad Urach

### Studium

10/1995-12/2001 Studium der Informatik an der Universität Tübingen mit Abschluss Diplom-Informatiker  
Thema der Diplomarbeit: „Parallelisierte Monte-Carlo-Simulation des Strahlungstransports bei akkretierenden Neutronensternen“ bei Prof.Dr. W. Rosenstiel  
08/1993-02/2000 Studium der Physik an der Universität Tübingen mit Abschluss Diplom-Physiker  
Thema der Diplomarbeit: „Parallelisierte Monte-Carlo-Simulation des Strahlungstransports bei akkretierenden Neutronensternen“ bei Prof. Dr. H. Ruder

### Promotionsstudium

3/2005-7/2008 Anfertigung der Dissertation mit dem Thema „Anwendung moderner Auswerteverfahren in der Chemometrie und Geostatistik, Definition von Kenngrößen von Bioanalytssystemen und Charakterisierung eines Mach-Zehnder-Interferometers für die Bioanalytik“ am Institut für Physikalische und Theoretische Chemie an der Universität Tübingen bei Herrn Prof. Dr. Gauglitz