



(12) **Offenlegungsschrift**

(21) Aktenzeichen: **10 2017 121 587.5**  
(22) Anmeldetag: **18.09.2017**  
(43) Offenlegungstag: **21.03.2019**

(51) Int Cl.: **G01N 15/14 (2006.01)**  
**G01N 15/02 (2006.01)**  
**G01N 21/31 (2006.01)**  
**G01N 21/47 (2006.01)**

(71) Anmelder:  
**Bundesrepublik Deutschland, vertreten durch  
das Bundesministerium für Wirtschaft und  
Energie, dieses vertreten durch den Präsidenten  
der Physikalischen Bundesanstalt, 38116  
Braunschweig, DE**

(72) Erfinder:  
**Gienger, Jonas Constantin, 10317 Berlin, DE;  
Neukammer, Jörg, Dr., 12203 Berlin, DE**

(74) Vertreter:  
**Gramm, Lins & Partner Patent- und  
Rechtsanwälte PartGmbB, 38122 Braunschweig,  
DE**

(56) Ermittelter Stand der Technik:

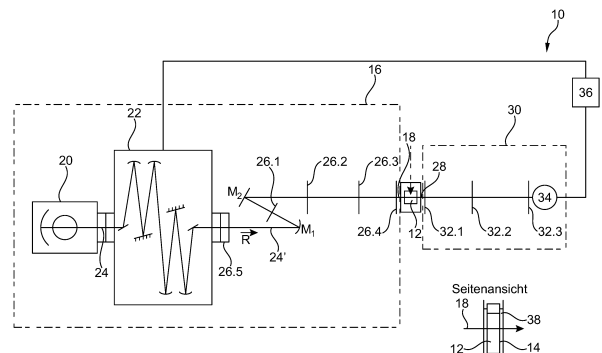
<b>DE</b>	<b>10 2008 003 037</b>	<b>B3</b>
<b>DE</b>	<b>10 2009 000 904</b>	<b>A1</b>
<b>US</b>	<b>7 999 936</b>	<b>B1</b>
<b>US</b>	<b>4 735 504</b>	<b>A</b>

Prüfungsantrag gemäß § 44 PatG ist gestellt.

**Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen.**

(54) Bezeichnung: **Verfahren zum simultanen Bestimmen von Proben-Eigenschaften und Partikelmess-  
Vorrichtung**

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Bestimmen von Proben-Eigenschaften in Form zumindest eines Kennwerts einer Größenverteilung von Partikeln in einem Fluid und eines spektralen Brechungsverlaufs ( $n(\lambda)$ ) der Partikel und/oder des Fluids und gegebenenfalls einer Konzentration der Partikel in dem Fluid, mit den Schritten: Bestrahlen einer Probe (12), die das Fluid und die Partikel enthält, mit einem Eingangs-Lichtstrahl (18) mit einer Vielzahl an Wellenlängen ( $\lambda_i$ ), sodass ein Ausgangs-Licht (28) entsteht, Vermindern von Streulichtanteilen im dem Ausgangs-Licht (28), Messen einer spektralen Transmission ( $T(\lambda_i)$ ) am Ausgangs-Licht (28), Berechnen eines mittleren spektralen Ist-Extinktionsquerschnitts ( $\bar{C}(\lambda_i)$ ) aus der einer spektralen Transmission ( $T(\lambda_i)$ ), Berechnen eines mittleren Modell-Extinktionsquerschnitts ( $\bar{C}_\psi(\lambda_i)$ ) aus einem Parametervektor  $\psi$ , der Parameter ( $a_j$ ) einer Modellfunktion ( $n(\lambda, \psi)$ ) zum Beschreiben des spektralen Brechungsindex ( $n(\lambda_i)$ ), eine mittlere Partikelgröße ( $\mu_R$ ) und einen Variationskoeffizienten ( $\sigma_R$ ) der Größenverteilung enthält, Anpassen des Parametervektors  $\psi$ , sodass eine Abweichung zwischen dem Modell-Extinktionsquerschnitts ( $\bar{C}_\psi(\lambda_i)$ ) und dem Ist-Extinktionsquerschnitt ( $\bar{C}(\lambda_i)$ ) minimiert wird, sodass ein Optimal-Parametervektor  $\psi_{opt}$  erhalten wird, und Berechnen der Proben-Eigenschaften aus dem Optimal-Parametervektor  $\psi_{opt}$ .



## Beschreibung

**[0001]** Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum, insbesondere simultanen, Bestimmen von Probeneigenschaften in Form (i) zumindest eines Kennwerts einer Größenverteilung von Partikeln in einem Fluid, (ii) eines spektralen Brechungsindexverlaufs der Partikel und/oder des Fluides und (iii) einer Konzentration der Partikel in dem Fluid sowie gegebenenfalls (iv) eines spektralen Brechungsindexverlaufs des Fluids bei Verwendung von Partikeln mit bekannten Eigenschaften. Gemäß einem zweiten Aspekt betrifft die Erfindung eine Partikelmess-Vorrichtung zum simultanen Bestimmen dieser Proben-Eigenschaften, die (a) eine multichromatische Lichtquelle zum Bestrahlen der Probe, die das Fluid und die Partikel enthält, mit einem Eingangs-Lichtstrahl aus multichromatischem Licht, sodass ein Ausgangs-Licht entsteht, sowie (b) ein Spektrometer zum Messen einer spektralen Transmission am Ausgangs-Licht und (c) eine Auswerteeinheit umfasst.

**[0002]** Das Problem bei der optischen Partikelcharakterisierung ist, dass die optischen Eigenschaften der Partikel bekannt sein müssen, um die Größenverteilung der Partikel zu bestimmen. Alternativ muss die Größenverteilung bekannt sein, um den frequenzabhängigen bzw. wellenlängenabhängigen Brechungsindex der Partikel zu bestimmen. Die sukzessive Messung der Größenverteilung und des wellenlängenabhängigen Brechungsindex ist jedoch aufwändig und erhöht die Messunsicherheit.

**[0003]** Eine Vorrichtung, die der Bestimmung der Größe von Mikropartikeln bei bekanntem spektralen Brechungsindexverlauf dient, ist in der US 8,760,646 B2 beschrieben. Die Bestimmung eines spektralen Brechungsindexverlaufs der Partikel oder des Fluids ist in der US 8,760,646 B2 nicht vorgesehen.

**[0004]** Der Erfindung liegt die Aufgabe zu Grunde, die Messung von Partikel-Eigenschaften von Partikeln in einem Fluid zu verbessern.

**[0005]** Die Erfindung löst das Problem durch ein Verfahren gemäß Anspruch 1. Gemäß einem zweiten Aspekt löst die Erfindung das Problem durch eine gattungsgemäße Partikelmess-Vorrichtung, bei der die multichromatische Lichtquelle ausgebildet ist zum Abgeben eines Eingangs-Lichtstrahls, der eine Divergenz von höchstens  $1^\circ$ , vorzugsweise höchstens 3 Bogenminuten, hat.

**[0006]** Die Auswerteeinheit ist vorzugsweise eingerichtet zum simultanen Bestimmen von Proben-Eigenschaften in Form von (i) zumindest eines Kennwerts einer Größenverteilung von Partikeln in einem Fluid, (ii) eines spektralen Brechungsindexverlaufs  $n(\lambda)$  der Partikel und/oder des Fluides und (iii) gegebenenfalls einer Konzentration der Partikel in dem Fluid.

**[0007]** Die Auswerteeinheit kann eingerichtet sein zum automatischen Ansteuern der Lichtquelle, sodass sie die Probe, die das Fluid und die Partikel enthält, mit einem Eingangs-Lichtstrahl mit einer Vielzahl an Wellenlängen bestrahlt, sodass ein Ausgangs-Licht entsteht, und zum Ansteuern des Spektrometers, so dass diese eine spektrale Transmission  $T(\lambda_i)$  am Ausgangs-Licht misst.

**[0008]** Die Auswerteeinheit ist eingerichtet zum automatischen (i) Berechnen eines mittleren spektralen Ist-Extinktionsquerschnitts  $\bar{C}(\lambda_i)$  aus der einer spektralen Transmission  $T(\lambda_i)$ , (ii) Berechnen eines mittleren Modell-Extinktionsquerschnitts  $\bar{C}_\psi(\lambda_i)$  aus einem Parametervektor  $\psi$ , der Parameter  $a_j$  einer Modellfunktion  $n(\lambda, \psi)$  zum Beschreiben des spektralen Brechungsindex  $n(\lambda_j)$  der Partikel und/oder des Fluides, eine mittlere Partikelgröße  $\mu_R$  und einen Variationskoeffizienten  $\sigma_R$  der Größenverteilung enthält, (iii) Anpassen des Parametervektor  $\Psi$ , sodass eine Abweichung zwischen dem Modell-Extinktionsquerschnitt  $\bar{C}_\psi(\lambda_i)$  und dem Ist-Extinktionsquerschnitt  $\bar{C}(\lambda_i)$  minimiert wird, sodass ein Optimal-Parametervektor  $\psi_{opt}$  erhalten wird und (iv) Berechnen der Proben-Eigenschaften aus dem Optimal-Parametervektor  $\psi_{opt}$ .

**[0009]** Vorteilhaft an dem Verfahren ist, dass sowohl die Größenverteilung der Partikel als auch der spektrale Brechungsindexverlauf der Partikel in dem Fluid simultan, das heißt in einer Messung, bestimmt werden können. Das führt einerseits dazu, dass die erreichbare Messunsicherheit in den meisten Fällen geringer ist. Zudem ist die Messung einfacher und schneller als ein Bestimmen der Größenverteilung und des spektralen Brechungsindex nacheinander, da dazu andere Verfahren, wie beispielsweise elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Größenbestimmung, erforderlich sind.

**[0010]** Im Rahmen der vorliegenden Beschreibung wird unter dem Kennwert der Größenverteilung insbesondere der Mittelwert und ein Wert verstanden, der eine Breite der Verteilung charakterisiert, beispielsweise die Standardabweichung oder die Varianz. Sofern die Partikel gemäß einer anderen Verteilungsfunktion verteilt sind, ist ein charakteristischer Wert dieser Verteilungsfunktion gemeint.

**[0011]** Unter dem spektralen Brechungsindexverlauf der Partikel wird diejenige Funktion verstanden, die der Wellenlänge den Brechungsindex der Partikel zuweist. Unter dem spektralen Brechungsindexverlauf des Fluids wird diejenige Funktion verstanden, die der Wellenlänge den Brechungsindex des Fluides zuweist.

**[0012]** Bei einem erfindungsgemäßen Verfahren werden stets einerseits der eine Kennwert der Größenverteilung der Partikel und andererseits der spektrale Brechungsindexverlauf der Partikel und/oder der spektrale Brechungsindexverlauf des Fluids berechnet. Es ist möglich, nicht aber notwendig, dass auch die Konzentration der Partikel in dem Fluid mitberechnet wird. Werden Partikeln mit bekannten Eigenschaften im Fluid verwendet, wird vorzugsweise der spektrale Brechungsindexverlauf des Fluids berechnet. Beim Berechnen werden die Parameter im Parametervektor, die den Brechungsindexverlauf der Partikel beschreiben, ebenfalls verändert.

**[0013]** Es ist möglich, nicht aber notwendig, dass die angegebenen Größen explizit berechnet werden. Es ist aber auch möglich, dass beispielsweise lediglich der zumindest eine Kennwert der Größenverteilung der Partikel berechnet wird. Der spektrale Brechungsindexverlauf von Partikeln ergibt sich implizit aus dem berechneten Optimal-Parametervektor, es ist daher nicht notwendig, wenngleich in der Regel vorteilhaft, auch den spektrale Brechungsindexverlauf explizit aus dem Parametervektor zu berechnen. Maßgeblich ist, dass bei der Berechnung des Optimal-Parametervektors zur Partikel-Charakterisierung sowohl der zumindest eine Kennwert der Größenverteilung verändert wird als auch solche Parameter, die den spektralen Brechungsindexverlauf beschreiben.

**[0014]** Das Vermindern der Streulichtanteile in dem Ausgangs-Licht erfolgt vorzugsweise mittels Blenden. Durch das Vermindern der Streulichtanteile wird, wie unten gezeigt, die physikalische Situation leichter berechenbar, sodass das angegebene Verfahren mit einer hohen Genauigkeit durchgeführt werden kann.

**[0015]** Das Anpassen des Parametervektors kann beispielsweise mittels des Levenberg-Marquardt-Algorithmus erfolgen. Es sind jedoch auch andere Standard-Verfahren bekannt, die eingesetzt werden können.

**[0016]** Vorzugsweise liegt der Mittelwert der Größenverteilung der Partikel unterhalb von 50  $\mu\text{m}$ . In diesem Fall ist die unten angegebene Theorie mit besonders hoher Genauigkeit anwendbar.

**[0017]** Unter der Größe der Partikel wird insbesondere der Durchmesser einer Kugel oder die Ausdehnung eines Rotationsellipsoiden verstanden, die die gleichen Streueigenschaften hat wie das Partikel. Es ist daher möglich, dass die so ermittelte Größe von anderen möglichen Größenmaßen abweicht, beispielsweise dem Durchmesser einer volumengleichen Kugel.

**[0018]** Erfindungsgemäß ist zudem ein Verfahren zum Bestimmen von Proben-Eigenschaften in Form (i) eines spektralen Brechungsindexverlaufs des Fluids, insbesondere artifiziellen oder biologischen Ursprungs, unter Verwendung von hinzugefügten Partikeln mit bekannten Eigenschaften, insbesondere dem spektralen Brechungsindexverlauf, mit den Schritten

- (i) Bestrahlen einer Probe, die das Fluid und die Partikel enthält, mit einem Eingangs-Lichtstrahl mit einer Vielzahl an Wellenlängen, sodass ein Ausgangs-Licht entsteht,
- (ii) Vermindern von Streulichtanteilen im dem Ausgangs-Licht,
- (iii) Messen einer spektralen Transmission am Ausgangs-Licht,
- (iv) Berechnen eines mittleren spektralen Ist-Extinktionsquerschnitts aus der einer spektralen Transmission,
- (v) Berechnen eines mittleren Modell-Extinktionsquerschnitts aus einem Parametervektor, der Parameter einer Modellfunktion zum Beschreiben des spektralen Brechungsindex des Fluids enthält,
- (vi) Anpassen des Parametervektors, sodass eine Abweichung zwischen dem Modell-Extinktionsquerschnitts und dem Ist-Extinktionsquerschnitt minimiert wird, sodass ein Optimal-Parametervektor erhalten wird, und
- (vii) Berechnen der Proben-Eigenschaften aus dem Optimal-Parametervektor.

**[0019]** Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform erfolgt das Vermindern von Streulichtanteilen mittels Blenden. Das ist eine besonders einfache Möglichkeit, eine geringe Divergenz herzustellen. Vorzugsweise hat der Eingangs-Lichtstrahl eine Divergenz, die kleiner ist als  $0,5^\circ$ , insbesondere kleiner als 3 Bogenminuten.

**[0020]** Vorzugsweise umfasst das Berechnen des Modell-Extinktions-Querschnitts ( $C_{\psi}(\lambda_i)$ ) aus dem Parametervektor  $\psi$  beim Bestimmen der Partikeleigenschaften die folgenden Schritte: (a) Berechnen von Extinktions-Querschnitten  $C_{\psi}(\lambda_i)$  für eine Vielzahl an Partikel-Radien  $R$  innerhalb eines vorgegebenen Radien-Intervalls  $I = [R_{\min}, R_{\max}]$  aus dem Parametervektor  $\psi$  und (b) Berechnen des mittleren Modell-Extinktionsquerschnitts  $\bar{C}_{\psi}(\lambda_i)$  aus den Extinktions-Querschnitten  $C_{\psi}(\lambda_i)$ .

**[0021]** Bei der Bestimmung des spektralen Brechungsindex des Fluids werden bei der Berechnung des Modell-Extinktions-Querschnitts die bekannten Partikeleigenschaften festgelegt und das Berechnen des Modell-Extinktions-Querschnitts aus dem Parametervektor erfolgt durch Verwendung geeigneter Startwerte für den spektralen Brechungsindexverlauf des Fluids. Gegebenenfalls kann auch eine Kennzahl der Partikel, z.B. die mittlere Größe der Partikel, im Parametervektor variiert werden.

**[0022]** Wird bei Berechnung des Modell-Extinktionsquerschnittes aus dem Parametervektor unter Verwendung der Mie-Theorie keine Übereinstimmung innerhalb der experimentellen Messunsicherheiten mit dem Ist-Extinktionsquerschnitt erreicht, werden vorzugsweise die folgenden Schritte ergänzt:

- (a) Berechnung von Extinktions-Querschnitten für Rotationsellipsoide mittels analytischer Verfahren oder der T-Matrix-Methode unter Verwendung von Startwerten für Partikelvolumen, Volumenverteilung und Brechungsindices, erhalten aus der Analyse mittels Mie-Theorie,
- (b) Ergänzung des Parametervektors um das Achsenverhältnis der Ellipsoide (lange Halbachse geteilt durch kurze Halbachse) und
- (c) Berechnung von Extinktions-Querschnitten für sphärische inhomogene Partikel, nicht-sphärische oder nicht-rotationselliptische Partikel mittels der Methode der T-Matrix-Methode, Approximation diskreter Dipole oder einer anderer geeigneten Methode, beispielsweise per Finite-Elemente-Methode.

**[0023]** Vorzugsweise wird die spektrale Transmission dadurch gemessen, dass der Eingangs-Lichtstrahl ein kontinuierliches Spektrum hat und das Ausgangs-Licht spektral zerlegt wird und mittels eines Multi-Pixel-Detektors erfasst wird. Auf diese Weise kann die Messung schnell durchgeführt werden.

**[0024]** Alternativ ist der Lichtstrahl monochromatisch, die Wellenlänge des Lichtstrahls wird verändert und die spektrale Transmission wird für eine Vielzahl an Wellenlängen gemessen. Je nachdem, wie schnell die Wellenlängen verändert werden und wie groß die Schritte zwischen den einzelnen vermessenen Wellenlängen sind, kann besonders hohe Messgenauigkeit erreicht werden.

**[0025]** Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform sind die Partikel biologischen Ursprungs. Beispielsweise sind die Zellen Algen, Bakterien, humane Zellen oder tierische Zellen. Die Analyse von Fluiden, die derartige biologische Partikel enthalten, sind häufig eingesetzte Massenverfahren, die die beispielsweise in der Laboratoriumsmedizin oder Umweltanalytik Anwendung finden. Das erfindungsgemäße Verfahren erlaubt daher auf diesem Gebiet besonders große Fortschritte.

**[0026]** Vorzugsweise umfasst das Verfahren zur Charakterisierung biologischer Partikel die Schritte (a) Berechnen des Brechungsindexverlaufs und zumindest eines Kennwerts einer Größenverteilung, insbesondere der mittleren Größe und der Standardabweichung, aus dem Optimal-Parametervektor und (b) eines Bestimmens eines Gehalts in Oxy-, Deoxy- und/oder Methämoglobin und/oder eines Aktivierungsgrads von Blutplättchen oder weißen Blutzellen aus dem Brechungsindexverlauf. Dieses Berechnen kann beispielsweise auf Basis von Vorversuchen geschehen, bei denen bei Proben der Oxy-, Deoxy- und/oder Methämoglobingehalt und/oder der Aktivierungsgrads von Blutplättchen in bekannter Weise geändert und der resultierende Brechungsindexverlauf bestimmt wird.

**[0027]** Vorzugsweise umfasst das Verfahren zur Charakterisierung biologischer Partikel die Schritte (a) Berechnen des Brechungsindexverlaufs und zumindest eines Kennwerts einer Größenverteilung, insbesondere der mittleren Größe und der Standardabweichung, aus dem Optimal-Parametervektor und (b) Bestimmen der Funktion von artifiziellen und biologischen Partikeln anhand eines spezifisch veränderten Brechungsindexverlaufes und/oder einer geänderten Größe und/oder einer geänderten Größenverteilung durch Bestimmung (i) eines Gehaltes an Oxy-, Deoxy- und/oder Methämoglobin von Erythrozyten oder als Blutersatzstoff geeigneten Partikeln oder (ii) eines Aktivierungsgrades von korpuskularen Bestandteilen von Körperflüssigkeiten wie Blutplättchen oder Zellen des Immunsystems, z.B. Lymphozyten oder (iii) von Stoffwechseländerungen bei Algen nach Veränderung der Nahrungszufuhr.

**[0028]** Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform hat das multichromatische Licht ein kontinuierliches Spektrum, das sich über einen Spektralbereich von zumindest 250 nm erstreckt. Insbesondere hat das multichromatische Licht ein kontinuierliches Spektrum, das sich über einen Spektralbereich im Ultravioletten und/oder Sichtbaren und/oder Infraroten erstreckt, dessen Breite mindestens 250nm beträgt und dessen Lage (z.B. von 300nm bis 550nm) an die spezifische Anwendung zur Partikelcharakterisierung oder Fluid-Charakterisierung angepasst sind.

**[0029]** Die Erfindung löst das Problem zudem durch eine Partikelmess-Vorrichtung mit den Merkmalen (a) bis (d) gemäß dem unabhängigen Sachanspruch, wobei die Auswerteeinheit eingerichtet ist zum automatischen Durchführen eines Verfahrens mit den Schritten (i), (iii) und iv) gemäß dem unabhängigen Sachanspruch, wobei Schritt (ii) ein Berechnen eines mittleren Modell-Extinktionsquerschnitts aus einem Parametervektor ist, der Parameter einer Modellfunktion zum Beschreiben des spektralen Brechungsindex des Fluids enthält.

**[0030]** Im Folgenden wird die Erfindung anhand der beigefügten Zeichnungen näher erläutert. Dabei zeigt

**Fig. 1** eine Funktionszeichnung einer erfindungsgemäßen Partikelmess-Vorrichtung,

**Fig. 2** ein Flussdiagramm, in dem die Berechnung des Extinktionsquerschnitts aus dem Parametervektor gezeigt ist,

**Fig. 3** ein Ablaufdiagramm für ein erfindungsgemäßes Verfahren und

**Fig. 4** ein Flussdiagramm für den Ablauf des Anpassens des Parametervektors, sodass der Optimal-Parametervektor erhalten wird.

**[0031]** **Fig. 1** zeigt eine schematische Ansicht einer Partikelmess-Vorrichtung **10** zum Bestimmen von Proben-Eigenschaften einer Probe **12**, die in einer Küvette **14** aufgenommen ist. Im vorliegenden Fall handelt es sich bei der Probe **12** um eine Suspension von Mikropartikeln mit einem mittleren Durchmesser von beispielsweise 10 µm in Wasser.

**[0032]** Die Partikelmess-Vorrichtung **10** besitzt eine Lichtquelle **16** zum Bestrahlen der Probe **12** mit einem Eingangs-Lichtstrahl **18**. Die Lichtquelle **16** umfasst einen Lichterzeuger **20**, der im vorliegenden Fall eine Xenon-Entladungslampe ist. In der vorliegenden Ausführungsform umfasst die Lichtquelle **16** zudem einen Monochromator **22**, der im vorliegenden Fall als Doppel-Monochromator ausgebildet ist.

**[0033]** Ein vom Lichterzeuger **20** ausgehender Lichtstrahl **24** verlässt den Monochromator **22** als monochromatischer Lichtstrahl **24'** in einer Strahlrichtung **R** hinter dem Monochromator **22** sind mehrere Blenden **26.1**, ... **26.5** angeordnet. Der Eingangs-Lichtstrahl **18**, der die Lichtquelle **16** verlässt, hat daher eine Divergenz **D** von höchstens 1 Bogenminute. Die Divergenz **D** bezieht sich auf den halben Öffnungswinkel des Kegels, in dem 99 % des Lichtstroms fließen.

**[0034]** Der Eingangs-Lichtstrahl **18** durchläuft die Probe **12**. Dabei entsteht ein Ausgangs-Lichtstrahl **28** in Form eines Ausgangs-Lichtstrahls, der in ein Spektrometer **30** eintritt. Das Spektrometer umfasst zumindest eine Blende **32**, im vorliegenden Fall die Blenden **32.1**, **32.2** und **32.3** zum Vermindern der Divergenz **D** des Ausgangs-Licht **28**, bevor dieser in einen Detektor **34** eintritt. Der Detektor **34** detektiert die Lichtintensität.

**[0035]** Der Detektor **34** ist mit einer Auswerteeinheit **36** verbunden, die gleichzeitig mit dem Monochromator **22** zum Einstellen der Wellenlänge  $\lambda$  des Eingangs-Lichtstrahls **18** verbunden ist.

**[0036]** In der kleinen Darstellung unten rechts ist zu erkennen, dass die Probe **12** in der Küvette **14** von einem Kontaktfluid **38** umgeben sein kann, mittels dem die Einkopplung des Eingangs-Lichtstrahls **18** verbessert wird.

**[0037]** Im Folgenden wird die Auswertung der Messergebnisse des Detektors **34** beschrieben.

#### Theorie der Lichtstreuung und Extinktion

**[0038]** Ganz allgemein gilt: wird ein elektrisches Wechselfeld (Licht) der Vakuumwellenlänge  $\lambda$  an einem Objekt endlicher Größe (Streuer) gestreut, so lässt sich der Vektor der elektrischen Feldstärke  $E(r)$  darstellen als Summe des einfallenden Feldes und des gestreuten Feldes:  $E(r) = E_i(r) + E_s(r)$ . Im Fernfeld (das heißt die Entfernung vom Streuer ist groß gegen Wellenlänge und Größe des Streuers) gilt dann

$\mathbf{E}_s(\mathbf{r}) = \frac{e^{ik(r-z)}}{-ikr} \mathbf{X}(\theta, \phi) E_i$ , wobei  $E_i$  die Amplitude des einfallenden Feldes ist,  $k = 2\pi \frac{n_m(\lambda)}{\lambda}$  der Wellenvektor im umgebenden Medium,  $n_m(\lambda)$  der Brechungsindex des umgebenden Materials,  $r = |\mathbf{r}|$  der Abstand vom Streuer und  $z$  die Abstandskomponente vom Streuer entlang der Einfallrichtung des Lichtstrahls.  $\mathbf{X}(\theta, \phi)$  ist die Vektor-Streuamplitude in Abhängigkeit von Polarwinkel  $\theta$  (bezogen auf die Ausbreitungsrichtung des einfallenden Lichts) und Azimuth  $\phi$  (bezogen auf die Polarisation des einfallenden Lichts). Es gilt  $z = r \cos \theta$ .

**[0039]** Der Feldstärke  $E_i$  entspricht eine Lichtintensität  $I_i \propto E_i^2$ . Das Zeichen  $\propto$  bezeichnet dabei Proportionalität. Fällt das Licht, beschrieben durch die Feldstärke  $E(\mathbf{r})$  auf einen auf der Achse des einfallenden Lichtstrahl platzierten Detektor  $\mathbf{D}$ , mit einer Oberfläche  $A(\mathbf{D})$  im Abstand  $r$  vom Streuer, so wird dort eine Leistung

$$U_{\text{Detektor}} = I_i \left[ A(\mathbf{D}) - C_{\text{ext}} + \frac{|\mathbf{X}|_{\theta=0^\circ}^2}{k^2} \Omega(\mathbf{D}) \right]$$

gemessen, wobei  $\Omega(\mathbf{D}) = \frac{A(\mathbf{D})}{r^2}$  der vom Detektor abgedeckte Raumwinkelbereich ist. Diese Gleichung gilt für kleine, aber endliche Raumwinkel  $\Omega(\mathbf{D})$  (d.h.  $\Omega(\mathbf{D})$  ist (i) klein gegen  $4\pi$ ) im Falle von Objekten sehr viel kleiner als die Wellenlänge, da diese Licht Isotrop streuen oder (ii) klein gegen den Raumwinkelbereich eingeschlossen vom ersten Nulldurchgang der Funktion  $\mathbf{X}(\theta, \phi)$  um die Richtung des einfallenden Strahls ( $\theta=0$ ) bzw. die Winkelausdehnung der Hauptkeule der Vorwärtstreueung. Diese wird mit der zunehmenden Größe des Streuers immer kleiner

**[0040]** Da  $U_i = I_i A(\mathbf{D})$  die Leistung ist, die in Abwesenheit des Streuers auf den Detektor fallen würde, beschreiben die beiden hinteren Terme auf der rechten Seite der o.g. Gleichung die Auslöschung von Licht durch den Streuer.  $C_{\text{ext}}$  ist der Extinktionsquerschnitt des Teilchens - eine Größe, die aus der Streutheorie gut zugänglich ist und in Abhängigkeit von Größe, Form und optischen Eigenschaften des Streuers berechnet werden kann (s. Abschnitt „Berechnung des Extinktionsquerschnitts“). Der Term

$$\frac{|\mathbf{X}|_{\theta=0^\circ}^2}{k^2} \Omega(\mathbf{D})$$

beschreibt Streulicht, das aus der Richtung des einfallenden Strahls abgelenkt wurde und auf den endlich großen Detektor fällt. Diesen Beitrag gilt es zu minimieren, da er von der genauen Kenntnis der Detektorgeometrie abhängt und somit die Messung des Extinktionsquerschnitts behindert. Theoretisch kann er durch eine kleine Detektorgröße beliebig verringert werden, so dass dann für die am Detektor gemessene Lichtleistung gilt

$$U_{\text{Detektor}} = U_i - I_i C_{\text{ext}}$$

bzw. umgeschrieben auf Intensitäten

$$I_{\text{Detektor}} = \frac{U_{\text{Detektor}}}{A(\mathbf{D})} = I_i - I_i \frac{C_{\text{ext}}}{A(\mathbf{D})}.$$

**[0041]** Im vorliegenden Messaufbau wird dies in guter Näherung erreicht durch einen Abstand des Detektors von der Probe von 120 cm und einen Blendendurchmesser von 2 mm vor dem Detektor.

Somit beträgt  $\Omega(\mathbf{D}) = \pi \frac{1\text{mm}^2}{120\text{cm}^2} = \pi (0,048^\circ)^2 = \pi (0,83\text{mrad})^2 = 2,2\mu\text{sr}$  bzw. einen Anteil von  $1,7 \times 10^{-7}$  von  $4\pi$  (dem Raumwinkel einer Kugel) entspricht. Somit ist die Messung von  $C_{\text{ext}}$  praktisch ohne Verfälschung durch mitgemessenes Streulicht möglich.

## Lichtstreuung an Ensembles (Suspensionen)

**[0042]** Der vorangehende Absatz beschreibt die Lichtstreuung und die Messung der daraus resultierenden Extinktion für ein einzelnes Teilchen. Im in **Fig. 1** gezeigten Aufbau werden verdünnte Suspensionen der Konzentration  $c$  (Dimension  $1/\text{Länge}^3$ ) in einer Küvette der Dicke  $d$  vermessen. Nun sei  $z$  die vom Lichtstrahl in der Küvette zurückgelegte Weglänge, gemessen von der der Lichtquelle zugewandten Innenwand aus ( $z = 0$ ). In einer dünnen Schicht mit Dicke  $dz$  der Probe befinden sich somit  $dN = c A dz$  Teilchen, die die Lichtleistung

um  $-dU = I(z) C_{\text{ext}} dN = I(z) C_{\text{ext}} c A dz$  verringern bzw. die Lichtintensität um  $dI = \frac{dU}{A} = -I(z) C_{\text{ext}} c dz$ .

**[0043]** Hierbei ist  $I(z)$  die Intensität im Abstand  $z$  von der vorderen Küvettenwand und  $A$  der beleuchtete Querschnitt. Diese Differenzialgleichung gilt für dünne Suspensionen, in denen der Teilchenabstand groß ist, sodass sich die Teilchen nicht gegenseitig beschatten. Dieses Kriterium ist erfüllt im Falle einer ausreichend hohen Lichttransmission (s.u.) und kann somit bei der Messung direkt überwacht werden.

**[0044]** Die Gleichung wird gelöst durch  $I(z) = I_0 \exp[-C_{\text{ext}} c z]$ , wobei  $I_0$  die in die Küvette einfallende Intensität ist. Beim Austritt aus der Küvette bei  $z = d$  misst man also die Intensität  $I = I_0 \exp[-C_{\text{ext}} c d]$ .

**[0045]** Im Falle einer Suspension nicht-identischer Teilchen gilt  $I = I_0 \exp[-\bar{C}_{\text{ext}} c d]$ . Hierbei ist

$\bar{C}_{\text{ext}} = \frac{1}{V} \sum_{j=1}^V C_{\text{ext}}^j$  der Ensemble-Mittelwert des Extinktionsquerschnitts über alle  $v = c A d$  Teilchen im Strahlquerschnitt.  $C_{\text{ext}}^j$  ist der Extinktionsquerschnitt des  $j$ -ten Teilchens. Trotz geringer Konzentrationen der Mikropartikel ist Ihre Gesamtzahl im makroskopischen Wechselwirkungsvolumen im Allgemeinen sehr groß (typisch  $10^5$ ), so dass die Summation bei der Mittelwertbildung durch eine Integration über eine kontinuierliche Größenverteilung ersetzt werden kann (siehe oben unter „Berechnung des Extinktionsquerschnitts“).

**[0046]** Durch Messung der Lichtintensität auf dem Detektor in Abwesenheit der Probe ( $I_0$ ) und anschließende

Messung mit Probe ( $I$ ) kann die dimensionslose Transmission  $T = \frac{I}{I_0}$  bestimmt werden. Durch einen Scan über die Wellenlänge  $\lambda$  des Lichts kann ein Transmissionsspektrum  $T(\lambda)$  gemessen werden. Der Scan kann sowohl quellenseitig als auch detektorseitig erfolgen. Hieraus kann der Ensemble-Mittelwert des spektralen Extinktionsquerschnitts der Partikelsuspension bestimmt werden

$$\bar{C}_{\text{ext}}(\lambda) = -\frac{1}{dc} \ln[T(\lambda)].$$

**[0047]** Die optische Weglänge  $d$  der Küvette ist dabei als Herstellerangabe bekannt. Die Konzentration kann mittels Durchflusszytometrie genau bestimmt werden. Alternativ kann mit einer Kombination aus grobem Schätzwert und Nachoptimierung als Modellparameter gearbeitet werden (siehe unten unter „Brechungsindexbestimmung von Fluiden“).

## Berechnung des Extinktionsquerschnitts

**[0048]** Bezogen auf das umgebende Medium (z.B. Wasser) haben die Partikel (z.B. Polystyrol) einen relativen Brechungsindex

$$m(\lambda) = \frac{n(\lambda)}{n_m(\lambda)}.$$

**[0049]** Hierbei bezeichnet  $n_m(\lambda)$  den Brechungsindex des Mediums und  $n(\lambda)$  den Brechungsindex der Partikel, in Abhängigkeit von der Vakuumwellenlänge  $\lambda$  des einfallenden Lichts. Für Materialien mit nicht-verschwindender Lichtabsorption hat der Brechungsindex der Teilchen  $n(\lambda)$  einen endlichen Imaginärteil. Daher ist auch der relative Brechungsindex  $m(\lambda)$  im Allgemeinen komplexwertig.

**[0050]** Dem Partikeldurchmesser  $R$  entspricht ein dimensionsloser Größenparameter

$$X = kR,$$

wobei  $k = 2\pi \frac{n_m(\lambda)}{\lambda}$  der Wellenvektor im umgebenden Medium ist.

**[0051]** Die Formel für den Extinktionsquerschnitt einer Kugel mit relativem Brechungsindex  $m$  und Größenparameter  $X$  lautet

$$C_{\text{ext}} = \frac{2\pi}{k^2} \sum_{\nu=1}^{\infty} (2\nu+1) \Re\{\alpha_{\nu} + \beta_{\nu}\},$$

mit den Streukoeffizienten

$$\alpha_{\nu} = \frac{m\tau_{\nu}(mX)\tau'_{\nu}(X) - \tau_{\nu}(X)\tau'_{\nu}(mX)}{m\tau_{\nu}(mX)\xi'_{\nu}(X) - \xi_{\nu}(X)\tau'_{\nu}(mX)}$$

und

$$\beta_{\nu} = \frac{\tau_{\nu}(mX)\tau'_{\nu}(X) - m\tau_{\nu}(X)\tau'_{\nu}(mX)}{\tau_{\nu}(mX)\xi'_{\nu}(X) - m\xi_{\nu}(X)\tau'_{\nu}(mX)}.$$

$\Re\{z\}$  bezeichnet den Realteil einer komplexen Zahl  $z$ . Hierbei sind

$$\tau_{\nu}(y) = yj_{\nu}(y) \text{ und } \xi_{\nu}(y) = yh_{\nu}^{(1)}(y)$$

die Riccati-Bessel Funktionen der Ordnung  $\nu = 1, 2, \dots$ , wobei wiederum  $j_{\nu}(y)$  die sphärische Besselfunktion Ordnung  $\nu = 1, 2, \dots$  und  $h_{\nu}^{(1)}(y)$  die sphärische Hankelfunktion erster Gattung der Ordnung  $\nu = 1, 2, \dots$  ist.

**[0052]**  $C_{\text{ext}}$  ist dabei das Verhältnis zwischen der Lichtleistung  $P_{\text{ext}}$  die das Teilchen aus einem Lichtstrahl (ebende Welle) der Intensität  $I_0$  (Intensität ist Leistung pro Fläche) auslöscht. Daher hat  $C_{\text{ext}} = P_{\text{ext}}/I_0$  die Dimension einer Fläche und man spricht vom Extinktionsquerschnitt. Die Auslöschung/Extinktion ist ein kombinierter Effekt von Absorption (Photon wird geschluckt) und Streuung (Photon propagiert in eine andere Richtung weiter).

**[0053]** Die oben angegebene Formel für den Extinktionsquerschnitt kann numerisch effizient ausgewertet werden, indem die Reihe durch eine Summation über endlich viele Terme angenähert wird. Diese Modellfunktion für den Extinktionsquerschnitt einer Kugel wird im Folgenden mit

$$C(\lambda; n, R) = \frac{2\pi}{k^2} \sum_{\nu=1}^{N_{\text{max}}} (2\nu+1) \Re\{\alpha_{\nu} + \beta_{\nu}\},$$

bezeichnet. Diese numerische Auswertung ist in vielen frei verfügbaren Softwarepaketen (z.B. für Fortran, Matlab, C) implementiert. Auch für nicht-kugelförmige Teilchen ist eine Berechnung des Extinktionsquerschnitts bei bekannter Form mit bekannten numerischen Methoden wie (a) T-Matrix Methoden, (b) finite-Elemente Methoden (FEM) oder (c) diskreter Dipol-Approximation (DDA) möglich. Für Spezialfälle wie lange Zylinder, Kugelschalen bzw. konzentrische Kugeln oder Ellipsoide existieren außerdem analytische Lösungen ähnlich der o.g. Lösung für Kugeln.

#### Größenverteilung

**[0054]** Um die Messgröße „Ensemble-Mittelwert des Extinktionsquerschnitts“ zu modellieren muss  $C(\lambda; n, R)$  über die Größenverteilung der Partikel gemittelt werden. Die Größenverteilung  $r(R)$ , kann beispielsweise eine Normalverteilung sein



$$r(R) \propto \exp\left[-\frac{(R-\mu_R)^2}{2\mu_R^2\sigma_R^2}\right],$$

mit Mittelwert (Erwartungswert) des Radius'  $\mu_R$  und Variationskoeffizient  $\sigma_R$ . Oder eine logarithmische Normalverteilung

$$r(R) \propto \frac{1}{R} \exp\left\{-\frac{\left[\ln\left(\frac{R}{\mu_R}\right)\right]^2}{2\sigma_R^2}\right\}.$$

**[0055]** Hier gibt  $\mu_R$  den Median des Radius' an und  $\sigma_R$  die logarithmische Standardabweichung. Das Zeichen  $\propto$  bezeichnet dabei Proportionalität. Andere Formen von Häufigkeitsverteilungen sind möglich. In jedem Fall ist die Verteilung durch einen geeigneten Vorfaktor normiert so dass  $\int_0^\infty r(R) dR = 1$  gilt, bzw. für die numerische Implementierung  $\int_{R_{\min}}^{R_{\max}} r(R) dR = 1$  mit endlichem minimalem und maximalem Radius  $R_{\min}$  und  $R_{\max}$ .

**[0056]** Die Wahl einer geeigneten Größenverteilung erfolgt vorzugsweise anhand von Vorwissen. So ist etwa bekannt, dass die Größe synthetischer Polymerpartikel in sehr guter Näherung einer Normalverteilung folgt wohingegen biologische Objekte (Zellen) häufig eine logarithmische Normalverteilung der Größe aufweisen. Für eine gegebene Größenverteilung lässt sich nun der Ensemble-Mittelwert des Extinktionsquerschnitt numerisch berechnen

$$\bar{C}(\lambda; n|r) = \int_{R_{\min}}^{R_{\max}} C(\lambda; n, R) r(R) dR$$

**[0057]** Die Integration wird dabei durch eine Summe angenähert: Entweder mit Integrationsregeln wie der Ober- oder Untersumme oder der Trapezsumme, die äquidistante Stützstellen verwenden. Oder mittels eines der gängigen Quadraturverfahren mit den zugehörigen nicht-äquidistanten Stützstellen, das dann auch an die Form der Größenverteilung adaptiert sein kann: So eignet sich die Gauß-Quadratur optimal zur Integration über Polynome und die Gauß-Hermite-Quadratur zur Berechnung von Integralen über eine Normalverteilung.

#### Mathematisches Modell des Brechungsindex

**[0058]** Die nach o.g. Formel numerisch berechneten Werte von  $\bar{C}(\lambda; n|r)$  sind ein mathematisches Modell für die Messwerte von  $\bar{C}_{\text{ext}}(\lambda)$ . Die Größenverteilung  $r(R)$  und der spektrale Brechungsindex  $n(\lambda)$  sind die Parameter dieses Modells. Der Ensemble-Mittelwert des Extinktionsquerschnitts  $\bar{C}_{\text{ext}}(\lambda)$  wird für Wellenlängen  $\lambda_1, \dots, \lambda_N$  gemessen (z.B. 260nm, 261nm, ..., 799nm, 800nm, also  $N = 541$ ). Die experimentellen Messwerte werden im Folgenden mit  $\bar{C}^*(\lambda_1), \dots, \bar{C}^*(\lambda_N)$  bezeichnet.

**[0059]** Kann der Brechungsindex  $n(\lambda)$  im vermessenen Spektralbereich als bekannt vorausgesetzt werden, so kann eine Größenbestimmung erfolgen, indem die mittlere Teilchengröße bzw. ggf. weitere Parameter der Größenverteilung wie deren Standardabweichung als freie Modellparameter aufgefasst werden. Diese wenigen Modellparameter können dann mit Methoden der mathematischen Optimierung an so bestimmt werden, dass die Abweichung zwischen Modell  $\bar{C}(\lambda_i; n|r)$  und Messdaten  $\bar{C}^*(\lambda_i)$  minimal wird (ggf. gewichtet mit den Messunsicherheiten). Voraussetzung ist, dass der Brechungsindex bekannt. Die Genauigkeit der Größenbestimmung hängt unmittelbar von der Genauigkeit der Kenntnis des Brechungsindex' ab.

**[0060]** Umgekehrt kann bei bekannter Partikelgröße bzw. Größenverteilung  $r(R)$  der Brechungsindex als freier Parameter aufgefasst und angepasst werden. Im Falle eines reellwertigen Brechungsindex' (nicht-absorbierendes Material) wären aus  $N$  Messwerten  $\bar{C}^*(\lambda_1), \dots, \bar{C}^*(\lambda_N)$   $N$  Parameter  $n(\lambda_1), \dots, n(\lambda_N)$  zu be-

stimmen. Dies kann für jede der Wellenlängen  $\lambda_1, \dots, \lambda_N$  separat erfolgen durch Nullstellensuche: Löse  $\bar{C}(\lambda_j; n_j | r) - \bar{C}^*(\lambda_j) = 0$  durch geeignete Wahl von  $n_j = n(\lambda_j)$ .

**[0061]** Es zeigt sich jedoch (beispielsweise unter Verwendung synthetischer Daten), dass dieser punktweise Ansatz (d.h. für alle Wellenlängen separat) nicht robust ist gegen geringe Fehler im als bekannt vorausgesetzten Partikelradius oder der Größenverteilung: Bei Polymerepartikeln genügen hier Abweichungen im Bereich von weniger als 1 nm. Daher ist es kaum unmöglich den Brechungsindex auf diese Weise zu bestimmen, solange die Größenverteilung als freier Modellparameter nicht mitoptimiert wird.

**[0062]** Andererseits ermöglicht die große Empfindlichkeit prinzipiell eine sehr genaue Bestimmung der Partikelgröße. Soll aber nun ein oder mehrere Parameter der Größenverteilung (Mittelwert, Standardabweichung, Schiefe,...) mitbestimmt werden, so wären aus N Messdaten N + 1 oder mehr Parameter zu bestimmen. Im Falle eines komplexen Brechungsindex kämen noch einmal N Werte für den Imaginärteil bei allen Wellenlängen hinzu. Ein derart unterbestimmtes System hat keine eindeutige Lösung. Der punktweise Ansatz ist daher problembehaftet.

**[0063]** Es ist daher vorteilhaft, die Anzahl der Modellparameter zu verringern. Dies wird erreicht durch eine geeignete Darstellung des Brechungsindex: Anstatt der expliziten Beschreibung durch die Werte bei allen Wellenlängen  $\lambda_1, \dots, \lambda_N$  wird die Funktion  $n(\lambda)$  in einem geeigneten System von M Basisfunktionen dargestellt, wobei M deutlich kleiner gewählt werden kann als N. Hierzu werden einige (physikalisch motivierte) Annahmen über die Funktion  $n(\lambda)$  gemacht:

1.  $n(\lambda)$  ist stetig, d.h. es treten keine plötzlichen Sprünge und Singularitäten auf
2. auch bei Materialien, die in einem bestimmten Spektralbereich (z.B. im Sichtbaren) kein Licht absorbieren wird der von 1 verschiedene (reelle) Brechungsindex durch Absorption von Licht (ggf. in einem anderen Spektralbereich, z.B. bei Wasser oder Polymeren dem Ultravioletten) verursacht.

**[0064]** Es gilt also einen geeigneten Satz stetiger Basisfunktionen zu finden, die die mathematischen Konsequenzen aus 2. erfüllen.

**[0065]** Genauer zu 2.: Zwischen dem Realteil  $\Re\{n(\lambda)\}$  und dem Imaginärteil des Brechungsindex  $\Im\{n(\lambda)\}$  (Absorptionsspektrum) gilt ganz allgemein die Kramers-Kronig-Beziehung

$$\Re\{n(\lambda)\} = 1 + \frac{1}{\pi} P \int_{-\infty}^{\infty} \left( \frac{1}{\Lambda} - \frac{1}{\Lambda - \lambda} \right) \Im\{n(\Lambda)\} d\Lambda.$$

Dabei bezeichnet  $P \int$  das Cauchy-Hauptwertintegral.

**[0066]** Das Absorptionsspektrum  $\Im\{n(\lambda)\}$  kann als Summe von einzelnen Absorptionslinien verstanden werden, woraus sich nach der o.g. Kramers-Kronig-Beziehung ergibt, dass der Realteil des Brechungsindex sich ebenfalls als Summe von Funktionen darstellen lässt, die mit den Absorptionslinien mathematisch verknüpft sind. Betrachtet man eine einzelne Absorptionslinie, die um eine Wellenlänge  $y_j$  zentriert ist und weit entfernt von dieser zentralen Wellenlänge mindestens abfällt wie  $1/(\lambda - y_j)^2$ , so ergibt sich aus dieser Absorptionslinie ein Beitrag zum Brechungsindex zusammengesetzt aus einer Konstanten und einem Term der wie  $1/(\lambda - y_j)$  abfällt für  $\lambda \rightarrow \pm\infty$ . Als konkretes Beispiel betrachten wir die generische Form einer Lorentz-Kurve

$$\Im\{n(\lambda)\} = \tilde{a}_j \frac{\gamma}{(\lambda - y_j)^2 + \gamma^2}$$

mit Amplitude  $\tilde{a}_j$  und halber Halbwertsbreite  $\gamma$ . Diese ergibt sich aus einfachen Modellen für Licht-Materie-Wechselwirkung (Elektron gebunden im gedämpften harmonischen Oszillator). Die o.g. Funktion stellt damit eine mögliche, idealisierte Form einer Absorptionslinie dar. In der Realität ist mit mehr oder weniger deutlichen Abweichungen zu rechnen, die dann nicht mehr mit einfachen mathematischen Funktionen beschrieben werden können. Mit der o.g. Funktion findet man für den Realteil des Brechungsindex

$$\Re\{n(\lambda)\} = 1 + \tilde{a}_j \frac{y_j}{y_j^2 + \gamma^2} + \tilde{a}_j \frac{\lambda - y_j}{(\lambda - y_j)^2 + \gamma^2}.$$

**[0067]** Die ersten beiden Terme sind positiv und konstant. Der dritte Term beschreibt die aus der Absorptionslinie resultierende Dispersion des Realteils des Brechungsindex'. Er kann sowohl positive Werte (für  $\lambda > y_j$ ) als auch negative Werte (für  $\lambda < y_j$ ) annehmen.

**[0068]** Daher kann aus physikalischen Gründen motiviert werden, den Brechungsindex in den folgenden Basisfunktionen auszudrücken:

$$f_j(\lambda) = \frac{\lambda - y_j}{(\lambda - y_j)^2 + \gamma^2}$$

für  $j = 2, \dots, M$  und zusätzlich der konstanten Funktion  $f_1(\lambda) = 1$ . Aus der physikalischen Motivation heraus würde man erwarten, dass zu diesen Funktionen für den Realteil ein Imaginärteil in Form einer Lorentzkurve gleicher Amplitude gehören muss bzw. dass  $y_j$  in einem Spektralbereich liegen muss, in dem Absorption auftritt. Es zeigt sich jedoch (durch Anpassen von Literaturdaten), dass die Funktionen  $f_j(\lambda)$  auch zur Beschreibung des realen Brechungsindex' nicht-absorbierender Materialien (wie Polystyrol, Glas oder Wasser im Sichtbaren) geeignet sind.

**[0069]** Daher betrachten wir im Folgenden einen reelwertigen Brechungsindex  $n(\lambda) = \Re\{n(\lambda)\}$ , der sich (in guter Näherung) ausdrücken lässt als

$$n(\lambda) = \sum_{j=1}^M \tilde{a}_j f_j(\lambda)$$

**[0070]** Die Breite der Absorptionslinien  $\gamma$  und die zentralen Wellenlängen  $y_j$  müssen noch geeignet festgelegt werden. Der Einfachheit halber wird  $\gamma$  für alle Funktionen gleich gewählt und die Zentralwellenlängen  $y_j$  liegen auf einem äquidistanten Gitter mit festem Abstand, also

$$y_j = y_2 + (j - 2) \Delta y$$

für  $j = 3, \dots, M$ . Für Polymere und den Spektralbereich von 260nm bis 800nm hat sich beispielsweise  $\gamma = 100$  nm,  $\Delta y = 30$  nm und  $y_2 = 230$  nm,  $y_M = 830$  nm als brauchbar erwiesen. Diese Werte sind aber nicht kritisch, Abweichungen sind möglich. Grob ungeeignete Werte führen zu einem quantifizierbar schlechten Resultat bei der Optimierung. Geeignete Werte können also im Zweifel durch Ausprobieren gefunden werden.

**[0071]** Um mit den gewählten Basisfunktionen numerisch stabil rechnen zu können, sollten diese möglichst orthogonal sein, d.h. das Skalarprodukt zwischen je zwei verschiedenen Basisfunktionen sollte 0 sein. Dies ist beispielsweise mit der o.g. Wahl nicht erfüllt. Daher werden die Funktionen orthogonalisiert (und normiert, also orthonormalisiert). Hierzu wird der Gram-Schmidt-Algorithmus angewendet:

- Beginne mit  $\tilde{g}_1(\lambda) = f_1(\lambda)$
- Berechne dann für  $j = 2, \dots, M$

$$\tilde{g}_j(\lambda) = f_j(\lambda) - \sum_{l=1}^{j-1} \frac{\langle \tilde{g}_l, f_j \rangle}{\langle \tilde{g}_l, \tilde{g}_l \rangle} \tilde{g}_l(\lambda),$$

dabei bezeichnet

$$\langle \tilde{g}_l, f_j \rangle = \sum_{i=1}^N \tilde{g}_l(\lambda_i) f_j(\lambda_i)$$

das Standard-Skalarprodukt für Vektoren.

**[0072]** Durch Normierung erhält man die orthonormalen Basisfunktionen:

$$g_j(\lambda) = \frac{\tilde{g}_j(\lambda)}{\langle \tilde{g}_j, \tilde{g}_j \rangle}$$

für  $j = 1, \dots, M$ .

**[0073]** Der Brechungsindex wird in diesen Funktionen dargestellt als

$$n(\lambda) = \sum_{j=1}^M a_j g_j(\lambda)$$

mit reellen Entwicklungskoeffizienten  $a_j$ .

### Parameteroptimierung

**[0074]** Das mathematische Modell für den gemessenen Ensemble-gemittelten spektralen Extinktionsquerschnitt ist damit charakterisiert durch die Entwicklungskoeffizienten  $a_1, \dots, a_M$  des Brechungsindex' sowie die Parameter der Größenverteilung  $r(R)$ , die im Vektor  $\theta$  zusammengefasst werden. Im Falle der Normalverteilung oder Log-Normalverteilung etwa

$$\theta = \begin{pmatrix} \mu_R \\ \sigma_R \end{pmatrix}.$$

Sämtliche Modellparameter werden im Parametervektor

$$\psi = \begin{pmatrix} a_1 \\ \vdots \\ a_M \\ \theta \end{pmatrix}$$

zusammengefasst. Nun kann ein numerisches Modell implementiert werden, das aus dem Parametervektor  $\psi$  den spektralen Extinktionsquerschnitt berechnet. Dieses wird mit  $M(\lambda; \psi)$  bezeichnet. Es ist schematisch in **Fig. 2** dargestellt.

**[0075]** Die Parameter dieses Modells können nun mittels nichtlinearer mathematischer Optimierung an die Messdaten  $\bar{C}^*(\lambda_1), \dots, \bar{C}^*(\lambda_N)$  angepasst werden. Hierzu können lokale least-squares Verfahren (**Abb. 3**) eingesetzt werden, wie der Levenberg-Marquardt-Algorithmus, oder der trust-region-reflexive-Algorithmus von Matlab. Diese Verfahren benötigen Startwerte für die Parameter, die grob in der Nähe der Lösung liegen. Diese können aus Vorwissen aufgestellt werden wie z.B.

- Herstellerangabe zur Größe (z.B. sind  $2,0\mu\text{m}$  ein ausreichend guter Startwert für  $1,9\mu\text{m}$  große Teilchen) oder grobe Abschätzung aus Betrachtung unter dem Lichtmikroskop.
- Existierende Literaturwerte zum Brechungsindex des Bulk-Materials (z.B. ist Bulk-Polystyrol gut vermessen, Messungen an Polystyrol-Mikropartikeln liegen nicht vor). Falls solche nur bei einzelnen Wellenlängen existieren (z.B. diskrete Laserwellenlängen) kann linear interpoliert werden. Ist nichts über das Material bekannt, kann evtl. von Werten für ein chemisch ähnliches Material ausgegangen werden.

**[0076]** Der Gesamtablauf der Datenerfassung und Auswertung ist in **Fig. 3** zusammengefasst. **Fig. 3** zeigt ein Flussdiagramm des Verfahrens zur Bestimmung von Partikelgrößenverteilung und Partikelbrechungsindex. Das mathematische Modell  $M(\lambda; \psi)$  ist in **Fig. 2** ausführlich dargestellt, der iterative Optimierungsalgorithmus in **Fig. 4**.

**[0077]** Fig. 4 zeigt ein Flussdiagramm eines generischen iterativen Algorithmus zur lokalen, nichtlinearen Optimierung (z.B. Levenberg-Marquardt oder trust-region-Verfahren). Es wird der Vektor der Residuen  $F_i$  minimiert.

Erweiterung des Verfahrens

Optimierung der Partikelkonzentration

**[0078]** Eine genaue Vorabmessung der Partikelkonzentration mittels Durchflusszytometrie ist u.U. aufwändig und kann auf einfache Weise umgangen werden, indem die Konzentration als Modellparameter aufgefasst wird. Sei  $c$  der unbekannte wahre Wert der Partikelkonzentration. Es kann dann mit einem groben Schätzwert

$$c_{\text{grob}} = (1 + \eta) c$$

für die Konzentration gearbeitet werden, wobei  $\eta$  der relative Fehler des Konzentrations-Schätzwertes ist. Für den Ensemble-Mittelwert des Extinktionsquerschnitts gilt dann

$$\bar{C}_{\text{ext}}(\lambda) = -\frac{1}{d c} \ln[T(\lambda)] = -\frac{1 + \eta}{d c_{\text{grob}}} \ln[T(\lambda)] = (1 + \eta) \bar{C}_{\text{grob}}(\lambda),$$

wobei  $\bar{C}_{\text{grob}}(\lambda)$  der Wert des Extinktionsquerschnitts ist, der sich unter Verwendung des groben Schätzwerts für die Konzentration ergibt. Das mathematische Modell kann in einfacher Weise erweitert werden:

$$\mathcal{M}(\lambda; \psi) = (1 + \eta) \bar{C}(\lambda; n | r(R)),$$

wobei auch der Parametervektor entsprechend erweitert wird

$$\psi = \begin{pmatrix} a_1 \\ \vdots \\ a_M \\ \theta \\ \eta \end{pmatrix}.$$

**[0079]** Aus dem durch Optimierung erhaltenen Parameterwert  $\eta_{\text{opt}}$  kann dann ein genauer Wert für die Konzentration bestimmt werden:

$$c_{\text{opt}} = \frac{c_{\text{grob}}}{1 + \eta_{\text{opt}}}$$

**[0080]** Da der Parameter  $\eta$  linear in das Modell eingeht ist eine eindeutige Optimierung numerisch in weiten Grenzen möglich (theoretisch können Startwerte beliebig weit vom wahren Wert entfernt liegen, praktisch getestet haben wir Fälle mit mindestens  $\pm 25\%$  Fehler, es sollte allerdings deutlich mehr möglich sein).

**[0081]** Die Funktion biologischer Objekte lässt sich z.B. durch Konzentrationsänderungen bestimmter Proteine nachweisen (Oxy-, Deoxy-, Methämoglobin und in biologische Signalwege involvierte Moleküle), durch veränderten DNA-Gehalt bei Zellteilung (d.h. das Verfahren ist geeignet für 3D Zellkulturen, bei denen die Zellen (auf einer Matrix) in Lösung sind), durch Größenänderung bei Aktivierung (Lymphozyten und Blutplättchen ändern nach Aktivierung ihre Größe).

**[0082]** Mit dem Verfahren lassen sich Konzentrationsänderungen von Proteinen innerhalb der Partikel durch die Änderung des Brechungsindex nachweisen. Es ist bekannt, dass der Brechungsindex einer wässrigen Proteinlösung der Massenkonzentration  $c_{\text{Protein}}$  beschrieben wird durch

$$n(\lambda) = n_{\text{H}_2\text{O}}(\lambda) + c_{\text{Protein}} B_{\text{Protein}}(\lambda),$$

wobei  $n_{\text{H}_2\text{O}}(\lambda)$  der spektrale Brechungsindexverlauf des Lösungsmittels, Wasser, ist und  $B_{\text{protein}}(\lambda)$  das (i.a. komplexwertige) wellenlängenabhängige spezifische Brechungsindexinkrement des jeweiligen Proteins. Diese Formel beschreibt auch den Brechungsindex biologischer Zellen und artifizierlicher Hämoglobinpartikel. Liegt eine Mischung verschiedener Proteine oder Proteinkomplexe vor, wie z.B. Oxy-, Deoxy- und Methämoglobin im Falle von Erythrozyten, so lautet die Formel für den Brechungsindex

$$n(\lambda) = n_{\text{H}_2\text{O}} + c_{\text{Oxy}} B_{\text{Oxy}}(\lambda) + c_{\text{Deoxy}} B_{\text{Deoxy}}(\lambda) + c_{\text{Met}} B_{\text{Met}}(\lambda),$$

wobei  $c_{\text{Oxy}}$ ,  $c_{\text{Deoxy}}$  und  $c_{\text{Met}}$  die Konzentrationen und  $B_{\text{Oxy}}(\lambda)$ ,  $B_{\text{Deoxy}}(\lambda)$  und  $B_{\text{Met}}(\lambda)$  die komplexwertigen wellenlängenabhängigen spezifischen Brechungsindexinkremente von jeweils Oxyhämoglobin, Deoxyhämoglobin und Methämoglobin sind.  $B_{\text{Oxy}}(\lambda)$ ,  $B_{\text{Deoxy}}(\lambda)$  und  $B_{\text{Met}}(\lambda)$  können als bekannt vorausgesetzt werden, da zum einen teilweise Messwerte in der Literatur verfügbar sind. Zum anderen können die spezifischen Brechungsindexinkremente aus den bekannten Absorptionsspektren der jeweiligen Hämoglobinvarianten (allgemeiner der Proteine) mit bekannten Methoden (Kramers-Kronig Beziehungen) berechnet werden. Durch Anpassung der (relativen) Konzentrationen dieser drei Komponenten an die Messung kann man die Konzentration ableiten.

**[0083]** Die Validierung der Ergebnisse erfolgt bevorzugt durch kinetische Untersuchungen, z.B. indem die Probe mit Argon gespült wird, um den Oxy-Hämoglobin-Gehalt auf 0% zu bringen.

#### Brechungsindexbestimmung von Fluiden

**[0084]** Das Verfahren kann angepasst werden um den Brechungsindex des Mediums  $n_m(\lambda)$  zu bestimmen. Hierzu wird die Rolle von Medium und Partikel im mathematischen Modell vertauscht. Partikel mit bekanntem Brechungsindex  $n(\lambda)$  (z.B. aus vorheriger Messung mit der beschriebenen Methode in wässriger Suspension) werden in dem zu untersuchenden Fluid (Flüssigkeit oder Gas z.B. Proteinlösung) suspendiert. Nun wird anstelle des Partikelbrechungsindex' der Brechungsindex des Mediums in der orthogonalen Basis entwickelt:

$$n_m(\lambda) = \sum_{j=1}^M a_j g_j(\lambda).$$

**[0085]** Das weitere Verfahren dem Prinzip nach bleibt unverändert: Startwerte aufstellen, Parametervektor  $\psi$  optimieren. Ggf. kann die zuvor genau bestimmte Größenverteilung bei der Optimierung festgehalten werden.

**[0086]** Die einzige grundlegende Bedingung an das Fluid ist, dass es als nicht-absorbierend angenommen werden kann. Die suspendierten Test-Partikel können einen reellen oder komplexen Brechungsindex haben, solange dieser vollständig bekannt ist.

#### Bezugszeichenliste

10	Partikelmess-Vorrichtung
12	Probe
14	Küvette
16	Lichtquelle
18	Eingangs-Lichtstrahl
20	Lichterzeuger
22	Monochromator
24	Lichtstrahl
26	Blende
28	Ausgangs-Licht
30	Spektrometer

<b>32</b>	Blende
<b>34</b>	Detektor
<b>36</b>	Auswerteeinheit
<b>38</b>	Kontaktfluid
$\lambda$	Wellenlänge
$\varphi$	Azimutwinkel
$\theta$	Polarwinkel
$\theta$	Vektor aus Mittelwert und Variationskoeffizient (z.B. Standardabweichung)
$\eta$	relativer Fehler des Konzentrations-Schätzwertes
$\Psi_{\text{opt}}$	Optimal-Parametervektor
$\Psi$	Parametervektor
$\mu_R$	Mittelwert (Erwartungswert) der Verteilung der Radien
$\sigma_R$	Variationskoeffizient der Verteilung der Radien
<b>A</b>	Oberfläche
<b>C</b>	Extinktionsquerschnitt
<b>c</b>	Konzentration
<b>d</b>	Dicke
<b>D</b>	Divergenz
<b>D</b>	Detektor
<b>E</b>	elektrische Feldstärke
<b>F</b>	Residuum
<b>I</b>	Intervall
<b>I</b>	Intensität
<b>k</b>	Wellenvektor
<b>n</b>	Brechungsindex der Partikel
<b>n<sub>m</sub></b>	Brechungsindex des Fluids
<b>N</b>	Zahl der Messdaten
<b>m</b>	relativer Brechungsindex
<b>M</b>	Zahl der Basisfunktionen
<b>r</b>	Abstand vom Streuer
<b>R</b>	Radius
<b>R<sub>min</sub></b>	untere Intervallgrenze für Radius
<b>R<sub>max</sub></b>	obere Intervallgrenze
<b>R</b>	Strahlrichtung
<b>T</b>	Transmission
<b>U</b>	Lichtleistung
<b>z</b>	Raumkoordinate

**ZITATE ENTHALTEN IN DER BESCHREIBUNG**

*Diese Liste der vom Anmelder aufgeführten Dokumente wurde automatisiert erzeugt und ist ausschließlich zur besseren Information des Lesers aufgenommen. Die Liste ist nicht Bestandteil der deutschen Patent- bzw. Gebrauchsmusteranmeldung. Das DPMA übernimmt keinerlei Haftung für etwaige Fehler oder Auslassungen.*

**Zitierte Patentliteratur**

- US 8760646 B2 [0003]



## Patentansprüche

1. Verfahren zum Bestimmen von Proben-Eigenschaften in Form
  - (i) zumindest eines Kennwerts einer Größenverteilung von Partikeln in einem Fluid und
  - (ii) eines spektralen Brechungsindexverlaufs ( $n(\lambda)$ ) der Partikel und/oder des Fluids und
  - (iii) gegebenenfalls einer Konzentration der Partikel in dem Fluid, mit den Schritten
    - (i) Bestrahlen einer Probe (12), die das Fluid und die Partikel enthält, mit einem Eingangs-Lichtstrahl (18) mit einer Vielzahl an Wellenlängen ( $\lambda_i$ ), sodass ein Ausgangs-Licht (28) entsteht,
    - (ii) Vermindern von Streulichtanteilen im dem Ausgangs-Licht (28),
    - (iii) Messen einer spektralen Transmission ( $T(\lambda_i)$ ) am Ausgangs-Licht (28),
    - (iv) Berechnen eines mittleren spektralen Ist-Extinktionsquerschnitts ( $\overline{C}(\lambda_i)$ ) aus der einer spektralen Transmission ( $T(\lambda_i)$ ),
    - (v) Berechnen eines mittleren Modell-Extinktionsquerschnitts ( $\overline{C}_\psi(\lambda_i)$ ) aus einem Parametervektor  $\psi$ , der
      - Parameter ( $a_i$ ) einer Modellfunktion ( $n(\lambda, \psi)$ ) zum Beschreiben des spektralen Brechungsindex ( $n(\lambda_i)$ ),
      - eine mittlere Partikelgröße ( $\mu_R$ ) und
      - einen Variationskoeffizienten ( $\sigma_R$ ) der Größenverteilung enthält,
    - (vi) Anpassen des Parametervektors  $\psi$ , sodass eine Abweichung zwischen dem Modell-Extinktionsquerschnitts ( $\overline{C}_\psi(\lambda_i)$ ) und dem Ist-Extinktionsquerschnitt ( $\overline{C}(\lambda_i)$ ) minimiert wird, sodass ein Optimal-Parametervektor  $\psi_{\text{opt}}$  erhalten wird, und
    - (vii) Berechnen der Proben-Eigenschaften aus dem Optimal-Parametervektor  $\psi_{\text{opt}}$ .
2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, dass
  - das Vermindern von Streulichtanteilen mittels Blenden (26) erfolgt und/oder
  - der Eingangs-Lichtstrahl (18) eine Divergenz (D) hat, die kleiner ist als  $1^\circ$ , insbesondere kleiner als 3 Bogenminuten.
3. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass das Berechnen des Modell-Extinktionsquerschnitts ( $\overline{C}_\psi(\lambda_i)$ ) aus dem Parametervektor  $\psi$ , die folgenden Schritte umfasst:
  - (a) Berechnen von Extinktions-Querschnitten ( $C_\psi(\lambda_i)$ ) für eine Vielzahl an Partikel-Radien (R) innerhalb eines vorgegebenen Radien-Intervalls ( $1=[R_{\text{min}}, R_{\text{max}}]$ ) aus dem Parametervektor  $\psi$  und
  - (b) Berechnen des mittleren Modell-Extinktionsquerschnitts ( $\overline{C}_\psi(\lambda_i)$ ) aus den Extinktions-Querschnitten ( $C_\psi(\lambda_i)$ ).
4. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass
  - die spektrale Transmission dadurch gemessen wird, dass der Eingangs-Lichtstrahl (18) ein kontinuierliches Spektrum hat, das Ausgangs-Licht (28) spektral zerlegt wird und mittels eines Multi-Pixel-Detektors erfasst wird oder
  - der Lichtstrahl (24) monochromatisch ist, die Wellenlänge ( $\lambda$ ) verändert wird und die spektrale Transmission für eine Vielzahl an Wellenlängen ( $\lambda$ ) gemessen wird.
5. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Partikel biologische Zellen sind.
6. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, **gekennzeichnet durch** die Schritte
  - (a) Berechnen des Brechungsindexverlaufs ( $n(\lambda)$ ) aus dem Optimal-Parametervektor  $\psi_{\text{opt}}$  und
  - (b) Bestimmen
    - eines Gehalts an Oxy-, Deoxy- und/oder Methämoglobin und/oder
    - eines Aktivierungsgrads von Blutplättchen oder weißen Blutzellen aus dem Brechungsindexverlaufs ( $n(\lambda)$ ).
7. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass das multichromatische Licht ein kontinuierliches Spektrum hat, das sich über einen Spektralbereich von zumindest 250 nm erstreckt.
8. Partikelmess-Vorrichtung (10) zum Bestimmen von Proben-Eigenschaften in Form eines Kennwerts einer Größenverteilung von Partikeln in einem Fluid, eines spektralen Brechungsindexverlaufs ( $n(\lambda)$ ) der Partikel und einer Konzentration der Partikel in dem Fluid und/oder eines spektralen Brechungsindexverlaufs ( $n(\lambda)$ ) des Fluids, mit
  - (a) einer Lichtquelle (16) zum Bestrahlen einer Probe (12), die das Fluid und die Partikel enthält, mit einem Eingangs-Lichtstrahl (18), sodass ein Ausgangs-Licht (28) entsteht,
  - (b) einem Spektrometer (30) zum Messen einer spektralen Transmission ( $T(\lambda_i)$ ) am Ausgangs-Licht (28), und
  - (c) einer Auswerteeinheit (36), **dadurch gekennzeichnet**, dass

(d) die multichromatische Lichtquelle (16) ausgebildet ist zum Abgeben eines Eingangs-Lichtstrahls (18), der eine Divergenz (D) von höchstens 10 Bogenminuten, insbesondere höchstens 3 Bogenminuten, hat, und dass (e) die Auswerteeinheit (36) eingerichtet ist zum automatischen Durchführen eines Verfahrens mit den Schritten:

- (i) Berechnen eines mittleren spektralen Ist-Extinktionsquerschnitts ( $\overline{C}(\lambda_i)$ ) aus der gemessenen spektralen Transmission ( $T(\lambda_i)$ ),
- (ii) Berechnen eines mittleren Modell-Extinktionsquerschnitts ( $\overline{C}_\psi(\lambda_i)$ ) aus einem Parametervektor  $\psi$ , der
  - Parameter ( $a_j$ ) einer Modellfunktion ( $n(\lambda, \psi)$ ) zum Beschreiben des spektralen Brechungsindex ( $n(\lambda_i)$ ),
  - eine mittlere Partikelgröße ( $\mu_R$ ) und
  - einen Variationskoeffizienten ( $\sigma_R$ ) der Größenverteilung enthält,
- (iii) Anpassen des Parametervektors  $\psi$ , sodass eine Abweichung zwischen dem Modell-Extinktionsquerschnitts ( $\overline{C}_\psi(\lambda_i)$ ) und dem Ist-Extinktionsquerschnitt ( $\overline{C}(\lambda_i)$ ) minimiert wird, sodass ein Optimal-Parametervektor  $\psi_{\text{opt}}$  erhalten wird, und
- (iv) Berechnen der Proben-Eigenschaften aus dem Optimal-Parametervektor  $\psi_{\text{opt}}$ .

9. Partikelmess-Vorrichtung (10) nach Anspruch 8, **dadurch gekennzeichnet**, dass

- (a) die Lichtquelle (16) zum Abgeben von multichromatischem Licht auf die Probe (12) aus den Partikeln und dem Fluid ausgebildet ist und das Spektrometer (30) einen Multi-Pixel-Detektor aufweist oder
- (b) die Lichtquelle (16) zum Abgeben von monochromatischem Licht auf die Probe (12) aus den Partikeln und dem Fluid und zum sukzessiven Verändern der Wellenlänge ( $\lambda$ ) des Lichts ausgebildet ist.

10. Partikelmess-Vorrichtung (10) nach Anspruch 8 oder 9, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Lichtquelle (16) zumindest einen Spiegel zum Verlängern einer Laufstrecke des Eingangs-Lichtstrahls (18) aufweist.

11. Partikelmess-Vorrichtung (10) nach einem der Ansprüche 8 bis 10, **dadurch gekennzeichnet**, dass

- die Lichtquelle (16) zumindest eine Eingangs-Blende zum Vermindern einer Divergenz (D) des Eingangs-Lichtstrahls (18) aufweist und/oder dass
- die Partikelmess-Vorrichtung (10) eine Ausgangs-Blende zum Vermindern einer Divergenz (D) des Ausgangs-Lichts (28) aufweist.

Es folgen 4 Seiten Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

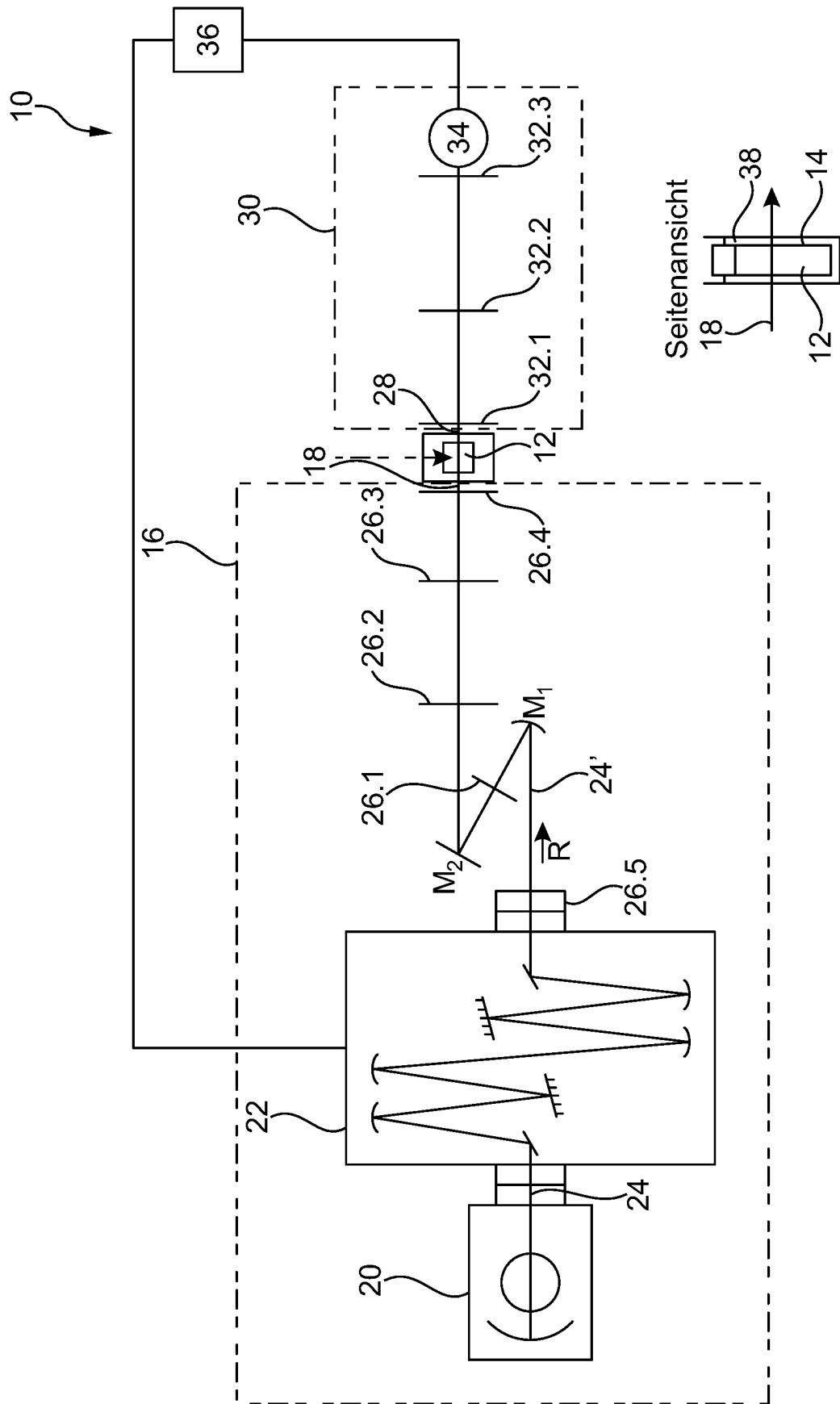
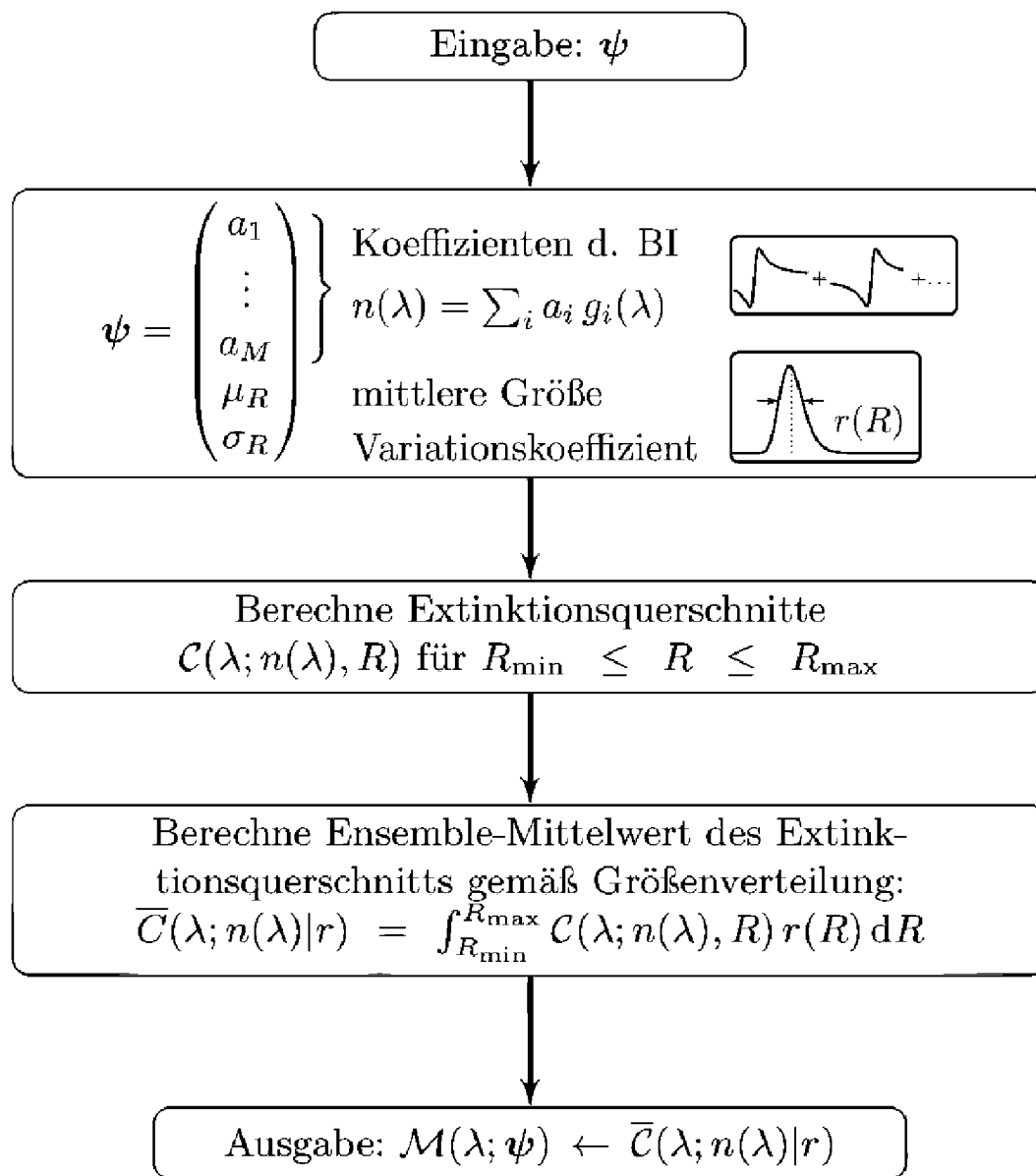


Fig. 1



BI: Brechungsindex

Fig. 2

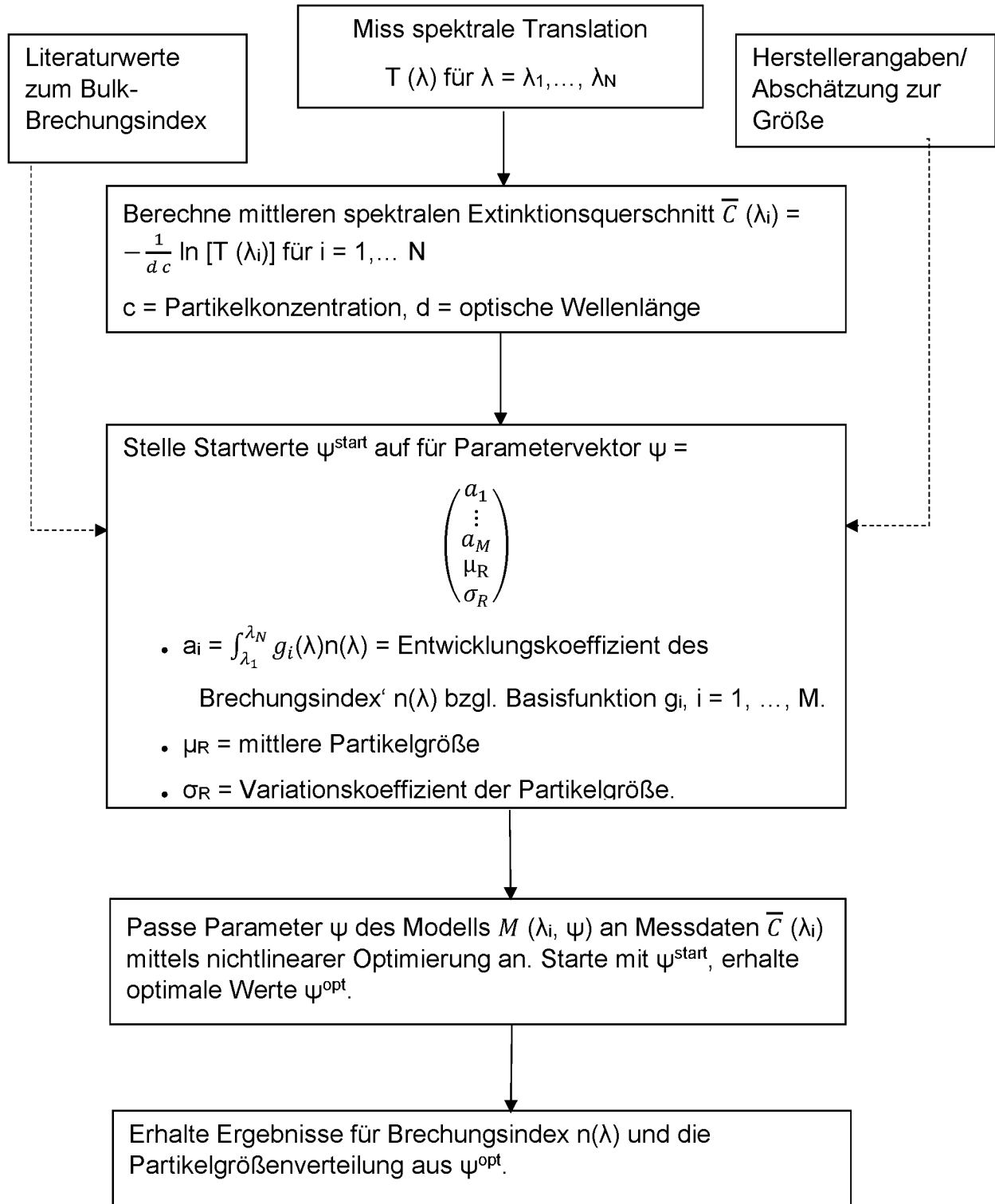


Fig. 3

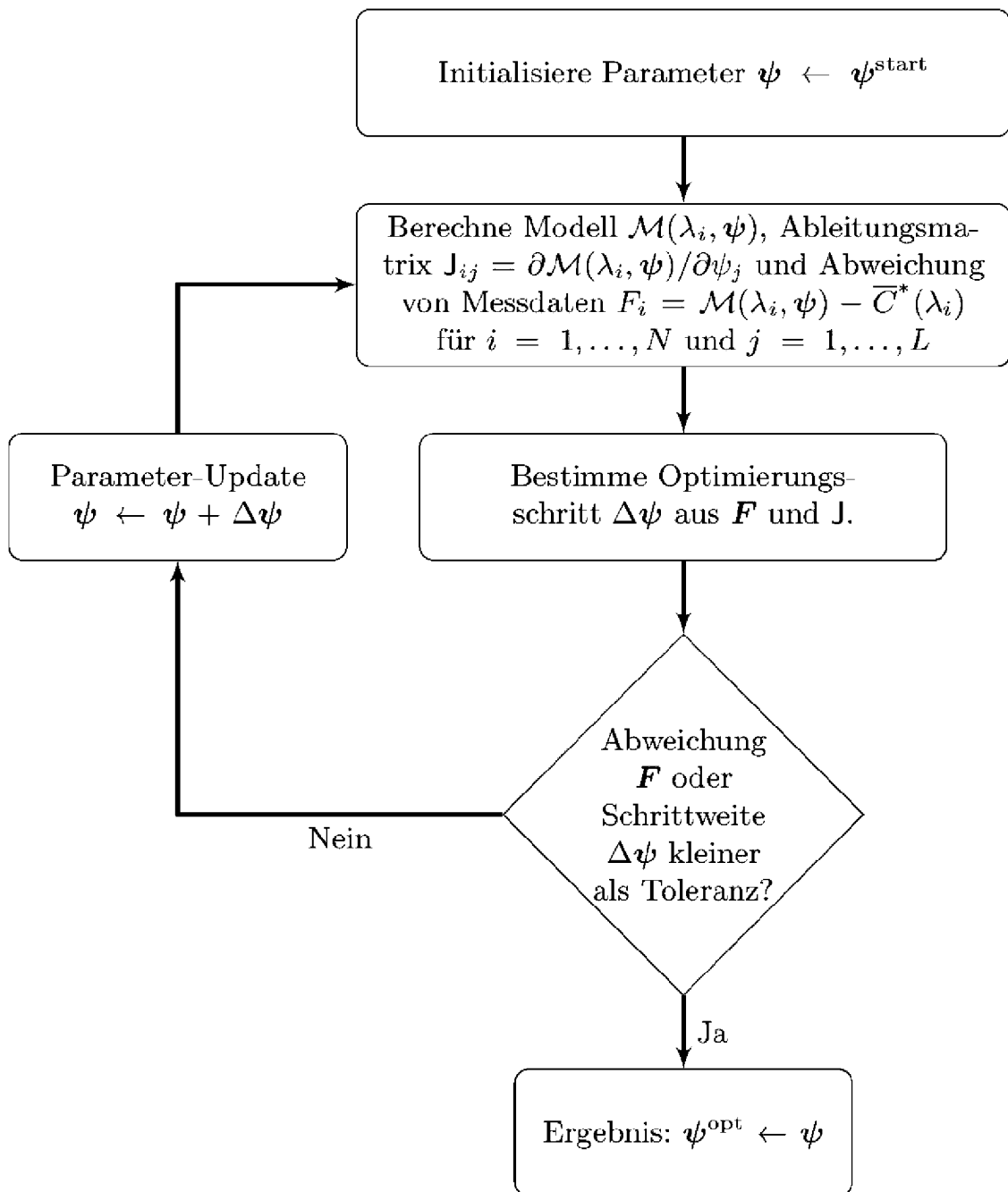


Fig. 4