



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 698 36 979 T2** 2007.11.08

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 037 553 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **698 36 979.3**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US98/24123**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **98 957 859.6**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1999/023939**

(86) PCT-Anmeldetag: **12.11.1998**

(87) Veröffentlichungstag  
der PCT-Anmeldung: **20.05.1999**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **27.09.2000**

(97) Veröffentlichungstag  
der Patenterteilung beim EPA: **24.01.2007**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **08.11.2007**

(51) Int Cl.<sup>8</sup>: **A61B 5/00** (2006.01)  
**G01N 21/65** (2006.01)

(30) Unionspriorität:

**65180 P 12.11.1997 US**

(73) Patentinhaber:

**Lightouch Medical, Inc., Bryn Athyn, Pa., US**

(74) Vertreter:

**Schwabe, Sandmair, Marx, 81677 München**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,  
LI, LU, MC, NL, PT, SE**

(72) Erfinder:

**CHAIKEN, Joseph, Fayetteville, NY 13066, US;  
PETERSON, M., Charles, Potomac, MD 20854, US**

(54) Bezeichnung: **VERFAHREN ZUR NICHT INVASIVEN ANALYTENMESSUNG**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

**Beschreibung**

**[0001]** Die Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren und eine Vorrichtung zum Messen eines Analyten in Blut und einem anderen Gewebe. Das Verfahren verwendet Raman-Spektroskopie, wobei eine Temperatursonde innerhalb des Gewebes mit elektromagnetischer Strahlung erregt wird. Das Verfahren führt zu verbesserten Spektralinformationen in Bezug auf die Konzentration des Analyten.

**[0002]** Es bestand lang ein erhebliches Interesse an der nicht invasiven Überwachung der Körperchemie. Es gibt 16 Millionen amerikanische Diabetiker, die alle von einem Verfahren für die nicht invasive Messung der Blutglucosespiegel profitieren würden. Unter Verwendung von derzeit anerkannten Verfahren zum Messen von Blutglucosespiegeln müssen viele Diabetiker fünf bis sieben Mal pro Tag Blut geben, um ihre Insulinbedürfnisse angemessen zu überwachen. Mit einer nicht invasiven Blutglucosemessung könnte eine engere Kontrolle geschaffen werden und die andauernde Beschädigung, Beeinträchtigung und die Kosten, die durch Diabetes verursacht werden, könnten minimiert werden.

**[0003]** Die Blutsauerstoffsättigungsmessung ist ein Beispiel für eine Anwendung der elektronischen Absorptionsspektroskopie auf die nicht invasive Überwachung des Gleichgewichts zwischen oxygeniertem und desoxygeniertem Blut (US-Patent Nr. 5 615 673, erteilt am 1. April 1997). Ebenso ist die Vibrationsspektroskopie eine zuverlässige Art der quantitativen und qualitativen Ex-vivo-Analyse für komplexe Gemische und es gibt Berichte von In-vitro-Anwendungen dieses Verfahrens auf metabolisch interessierende Analyte (S. Y. Wang et al., 1993, Analysis of metabolites in aqueous solution by using laser Raman spectroscopy, Applied Optics 32(6):925-929; A. J. Berger et al., 1996, Rapid, noninvasive concentration measurements of aqueous biological analytes by near-infrared Raman spectroscopy; Applied Optics 35(1):209-212). Infrarotmessungen wie z. B. Vibrationsabsorptionsspektroskopie, wurden auf Hautgewebe angewendet, jedoch mit einem durch die Unverfügbarkeit von geeigneten Lichtquellen und Detektoren bei den entscheidenden Wellenlängen und durch die Erwärmung des Gewebes auf Grund der Absorption von einfallender Strahlung begrenztem Erfolg (US-Patent Nr. 5 551 422, siehe auch R. R. Anderson und J. A. Parrish, 1981, The Optics of Human Skin, J. Investigative Dermatology 77(1):13-19). Vorherige Versuche, Verfahren für die nicht invasive Blutglucoseüberwachung bereitzustellen, sind im US-Patent Nr. 5 553 616, am 10. September 1996 erteilt, zusammengefasst. Das deutsche Patent Nr. 19538372 offenbart eine Vorrichtung zum Bestimmen der Blutglucose unter Verwendung der Raman-Spektroskopie des Auges und ein Fokussiersystem, das die Spektroskopie auf das Kammerwasser richtet. Die europäische Patentanmeldung Nr. 0587008 offenbart einen hinsichtlich der Oberfläche verbesserten Raman-Spektroskopie-Immuntest, bei dem Analyten mit Raman-aktiven Markern in In-vitro-Proben kombiniert werden.

**[0004]** Ein Aspekt der Erfindung schafft ein Verfahren zum Messen eines Analyten in einem Gewebe eines Subjekts, das umfasst:

- (a) Kontaktieren des Gewebes mit elektromagnetischer Strahlung mit einer ersten Erregungswellenlänge sowohl in Gegenwart als auch in Abwesenheit von elektromagnetischer Strahlung, die eine zweite Erregungswellenlänge besitzt, wobei die erste Erregungswellenlänge im Wesentlichen gleich einer Absorptionswellenlänge einer Temperatursonde in dem Gewebe ist, die das Auftreten einer Resonanz-Ramanstreuung hervorrufen kann, und wobei die zweite Erregungswellenlänge im Wesentlichen gleich einer Absorptionswellenlänge des Analyten ist, die das Auftreten einer Resonanz-Ramanstreuung hervorrufen kann, und wobei die Temperatursonde und der Analyt ausreichend nahe beieinander sind, damit die in einen von ihnen durch Strahlungsabsorption eingebrachte Energie an den jeweils anderen übertragen wird;
- (b) Sammeln der Raman-Spektren, die von dem Gewebe emittiert werden; und
- (c) Analysieren der gesammelten Spektren durch Vergleichen der Raman-Spektren, die von der Temperatursonde in Reaktion auf die erste Erregungswellenlänge in Gegenwart bzw. bei Abwesenheit der zweiten Erregungswellenlänge emittiert werden, um eine Konzentration des in dem Gewebe vorhandenen Analyten zu bestimmen.

**[0005]** In einer Ausführungsform wird die Konzentration des Analyten gemäß der folgenden Beziehung bestimmt:

$$C_A = \Delta T / (C_P I_A \epsilon \Delta t)$$

wobei  $C_A$  die Konzentration des Analyten ist;

wobei  $\Delta T$  die Temperaturverschiebung ist zwischen der Temperatur in Kelvin, die der von der Temperatursonde in Reaktion auf die erste und die zweite Erregungswellenlänge emittierten Ramanstreuung zugeordnet ist, und der Temperatur, die der durch die Temperatursonde in Reaktion auf die erste Erregungswellenlänge bei Abwesenheit der zweiten Erregungswellenlänge emittierten Ramanstreuung zugeordnet ist;

wobei  $C_p$  die Wärmekapazität des Gewebes ist;

wobei  $I_A$  die Intensität der elektromagnetischen Strahlung der zweiten Erregungswellenlänge ist;

wobei  $\epsilon_A$  der Absorptionskoeffizient für ein Molekül des Analyten ist;

und wobei  $\Delta t$  die Dauer des Kontakts mit der zweiten Erregungswellenlänge ist.

**[0006]** Ein weiterer Aspekt der Erfindung schafft ein Verfahren zum Messen eines Analyten in einem Blut enthaltenden Gewebe eines Subjekts, das umfasst:

- (a) Kontaktieren des Gewebes mit elektromagnetischer Strahlung, die eine erste Erregungswellenlänge besitzt, wenn das Gewebe mit Blut gefüllt ist und wenn das Gewebe von Blut entleert ist, wobei die erste Erregungswellenlänge im Wesentlichen gleich einer Absorptionswellenlänge einer Temperatursonde in dem Gewebe ist, die das Auftreten einer Resonanz-Ramanstreuung hervorrufen kann, und wobei die Temperatursonde und der Analyt ausreichend nahe beieinander sind, damit die in einen von ihnen durch Strahlungsabsorption eingebrachte Energie an den jeweils anderen übertragen wird;
- (b) Sammeln der Raman-Spektren, die von dem Gewebe emittiert werden; und
- (c) Analysieren der gesammelten Spektren durch Messen der Raman-Spektren, die dem Analyten zugeordnet sind, und Bestimmen der Differenz zwischen den Raman-Spektren, die in dem mit Blut gefüllten Zustand bzw. in dem von Blut entleerten Zustand gesammelt werden, um eine Konzentration des in dem Gewebe vorhandenen Analyten zu bestimmen.

**[0007]** Beispiele einer Temperatursonde umfassen, sind jedoch nicht begrenzt auf Hämoglobin, Carboxy-Hämoglobin, Myoglobin, Melanin und Bilirubin. Beispiele eines Analyten umfassen, sind jedoch nicht begrenzt auf Glucose, Kreatinin, Pyruvat, Arzneimittel, Blutgase und Urea.

**[0008]** Die Erfindung schafft auch eine Vorrichtung zum Messen eines Analyten in einem Gewebe in einem Subjekt, die umfasst:

- (a) eine erste Lichtquelle, die Licht mit einer ersten Erregungswellenlänge emittiert, die im Wesentlichen gleich einer Absorptionswellenlänge einer Temperatursonde in dem Gewebe ist und das Auftreten einer Resonanz-Ramanstreuung hervorrufen kann;
- (b) eine zweite Lichtquelle, die Licht mit einer zweiten Erregungswellenlänge emittiert, die im Wesentlichen gleich einer Absorptionswellenlänge des Analyten ist und das Auftreten einer Resonanz-Ramanstreuung hervorrufen kann;
- (c) einen Detektor, der so angeordnet ist, dass er Raman-Spektren empfängt, die von dem Gewebe in Reaktion auf eine Bestrahlung mit der ersten und mit der zweiten Erregungswellenlänge gestreut werden, und der Ausgangssignale erzeugt, die die gestreuten Raman-Spektren repräsentieren; und
- (d) einen Computer, der so angeschlossen ist, dass er die von dem Detektor erzeugten Ausgangssignale empfängt, und die Ausgangssignale verarbeitet, um einen Wert, der die Konzentration des Analyten in dem Gewebe angibt, anhand eines Vergleichs der Ausgangssignale, die die in Reaktion auf die erste und die zweite Erregungswellenlänge gestreuten Raman-Spektren repräsentieren, abzuleiten.

## KURZBESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

**[0009]** [Fig. 1](#) ist ein Blockdiagramm, das eine Ausführungsform einer Vorrichtung der Erfindung darstellt.

**[0010]** [Fig. 2](#) ist ein Blockdiagramm, das eine zweite Ausführungsform einer Vorrichtung der Erfindung darstellt.

## AUSFÜHRLICHE BESCHREIBUNG

**[0011]** Die hierin offenbarte Erfindung schafft ein Verfahren und eine Vorrichtung zum Messen eines Analyten in Blut oder einem anderen Gewebe eines Subjekts. Das Verfahren kann nicht invasiv durchgeführt werden und schafft einen verbesserten Rauschabstand gegenüber derzeit erhältlichen nicht invasiven Verfahren. Der Rauschabstand wird durch Verfahren verbessert, die das Signal verstärken, das Rauschen verringern, den Hintergrund verringern und/oder eine Spektralanhäufung entwirren. Das Verfahren erreicht den verbesserten Rauschabstand unter Verwendung von Raman-Spektroskopie und Auswählen von Einfallswellenlängen, die Temperatursonden erregen, die in Geweben des Körpers vorliegen. Eine Temperatursonde ist eine Komponente, die einem interessierenden Analyten ausreichend nahe liegt, so dass in entweder die Temperatursonde oder den Analyten durch Absorption von Strahlung eingebrachte Energie auf den anderen übertragen wird.

**[0012]** In einer Ausführungsform wird die Erregung der Temperatursonde verwendet, um eine Resonanzverstärkung des Raman-Spektrums der Temperatursonde zu erreichen, was das Raman-Signal gegenüber der

Hintergrundfluoreszenz besser nachweisbar macht. In dieser Ausführungsform wird die Raman-Streuung, die von der Temperatursonde in Reaktion auf eine Erregungswellenlänge erzeugt wird, die von der Temperatursonde absorbiert wird, mit und ohne gleichzeitig einfallende Erregung mit einer Wellenlänge, die vom Analyten absorbiert wird, gemessen. Die Verschiebung der Raman-Streuung, die durch Erregen des Analyten erzeugt wird, gibt die Menge an in dem Gewebe vorhandenem Analyten an.

**[0013]** In einer weiteren Ausführungsform wird die Störung durch Hintergrundfluoreszenz durch Verstärken der Antistokes-Komponente des Raman-Spektrums des Analyten verringert. In dieser Ausführungsform wird die durch den Analyten erzeugte Raman-Streuung nach der Erregung mit einer Wellenlänge, die von der Temperatursonde absorbiert wird, analysiert. Die Erregung der Temperatursonde induziert eine Temperaturerhöhung, die die Antistokes-Komponente des Raman-Spektrums des Analyten verstärkt.

**[0014]** Die Raman-Streuung ist der Begriff, der auf das Phänomen angewendet wird, durch das Licht, das von einer Stoffprobe gestreut wird, hinsichtlich der Wellenlänge gegenüber der Einfallswellenlänge verschoben wird. Die Menge der Wellenlängenverschiebung hängt von den Schwingungsbewegungen ab, die der Stoff erleiden kann, und dies schafft ein empfindliches Maß für die Molekularstruktur. Wenn gewählt wird, dass das einfallende Licht mit einer Wellenlänge zusammenfällt, die die interessierenden Moleküle absorbieren, tritt eine Resonanz-Raman-Streuung auf. Die Wechselwirkung zwischen der einfallenden Strahlung und dem Molekül wird in dem Umfang verstärkt, dass der Grad der Raman-Streuung eintausend bis eine Million mal stärker ist, als wenn gewählt wird, dass das einfallende Licht nicht mit einer Molekularabsorption zusammenfällt. Dies bedeutet, dass, wenn blau-grünes Licht auf eine Materialprobe, die Blut enthält (Hämoglobin absorbiert blau-grünes Licht) gerichtet wird, sie 99,9 % der einfallenden Photonen, die von der Probe nicht absorbiert werden, ohne Wellenlängenverschiebung der Photonen streut. Die anderen 0,1 % der Photonen werden hinsichtlich der Wellenlänge in Weisen verschoben, die von der Struktur, der lokalen chemischen und physikalischen Umgebung des Hämoglobins, Schwingungsbewegungen der Hämoglobinmoleküle und von der Temperatur der Probe abhängen.

**[0015]** Wenn eine andere Wellenlänge verwendet wird, wie z. B. eine längere Wellenlänge (z. B. 700 nm oder länger), die nicht einer Wellenlänge entspricht, die von Hämoglobin oder einer anderen Temperatursonde stark absorbiert wird, dann ist der Prozentsatz von mit verschobenen Wellenlängen gestreuten Photonen etwa tausendmal kleiner. Das heißt, typischerweise werden 99,9999 % ohne irgendeine Wellenlängenverschiebung gestreut, wenn keine Resonanzverstärkung besteht. Eine solche Verstärkung der Stärke der Raman-Streuung wird durch die Absorption der Wellenlänge des einfallenden Lichts verursacht.

**[0016]** Dies bedeutet, dass, wenn ein Gemisch von Substanzen einer einfallenden Wellenlänge ausgesetzt wird, dann diejenigen Komponenten des Gemisches mit einer Resonanzverstärkung die Erzeugung von gestreuten Photonen mit einer verschobenen Wellenlänge dominieren, d. h. Raman-Streuung. Dies ist das, was im Blut auf Grund der Resonanzverstärkung der Raman-Streuung durch Hämoglobin geschieht, wenn blau-grünes Licht als Sonde verwendet wird. Der blaue bis blau-grüne Spektralbereich wird nur von Hämoglobin unter den Blutbestandteilen bevorzugt absorbiert und stellt somit eine spezielle Gelegenheit für auf Blut basierende Temperaturverfahren dar. Hämoglobin ist eine allgemeine Temperatursonde, die in einem Beispiel verwendet werden kann, um den Temperaturanstieg auf Grund von Infrarotabsorption durch Glucose, wie z. B. wasserfreie D-Glucose (DAG), zu erfassen.

**[0017]** Die gemeinsame Lokalisierung von Glucose und Hämoglobin ist vorteilhaft. Temperaturgradienten sind unvermeidlich, so dass gilt, je näher die Temperatursonde an der Absorptionsstelle liegt, desto stärker die Wirkung auf die Temperatursonde ist. Die Temperatur wird durch Messen und Vergleichen der Menge an gestreuter Strahlung mit kürzeren Wellenlängen als das einfallende Licht, die als Antistokes-Streuung bezeichnet wird, mit der Menge an gestreutem Licht mit Wellenlängen, die länger sind als der einfallende Strahl, d. h. Stokes-Streuung, erhalten. Das Verhältnis der zwei Intensitäten für eine gegebene Wellenlängenverschiebung steht direkt damit in Beziehung, wie eine tatsächliche Temperatur berechnet wird. Dieser Effekt ermöglicht, die Temperatur des Hämoglobins und des unmittelbaren Umgebungsbereichs in einer vollständig nicht invasiven Weise zu messen. Überdies ist es nicht erforderlich, die tatsächliche Temperatur zu bestimmen. Durch Erfassen der Änderung, die in der einen oder der anderen der Stokes- oder Antistokes-Streuung auftritt, kann die relative Änderung der Raman-Streuung auf eine bekannte Glucose-Konzentration kalibriert werden.

#### Definitionen

**[0018]** Alle wissenschaftlichen und technischen Begriffe, die in dieser Anmeldung verwendet werden, haben Bedeutungen, die üblicherweise auf dem Fachgebiet verwendet werden, wenn nicht anders angegeben. Wie

in dieser Anmeldung verwendet, haben die folgenden Worte oder Ausdrücke die angegebenen Bedeutungen.

**[0019]** Wie hierin verwendet, bedeutet "Gewebe" irgendeinen Teil eines Organs oder Systems des Körpers, einschließlich, jedoch nicht begrenzt auf Haut, Kapillarbetten, Blut, Muskel, Brust und Gehirn.

**[0020]** Wie hierin verwendet, bezieht sich "Temperatursonde" auf eine Komponente, die im gleichen Gewebe wie der Analyt vorliegt. Wenn Energie entweder in die Temperatursonde oder den Analyten durch Absorption von Strahlung eingebracht wird, wird die Energie vom einen auf den anderen übertragen.

**[0021]** Wie hierin verwendet, bezieht sich "Raman-Spektren, die zugeordnet sind zu" einer gegebenen Komponente auf diejenigen emittierten Raman-Spektren, die ein Fachmann dieser Komponente zuschreiben würde. Es kann festgestellt werden, welche Raman-Spektren einer gegebenen Komponente zuzuschreiben sind, indem diese Komponente in einer relativ reinen Form bestrahlt wird und die durch die Komponente emittierten Raman-Spektren bei relativer Abwesenheit anderer Komponenten gesammelt und analysiert werden.

**[0022]** Wie hierin verwendet, bezieht sich "mit Blut gefüllt" auf einen Zustand, in dem der Blutfluss durch ein Gewebe durch beispielsweise eine Gefäßverengung, die durch Kühlen oder Anwendung von Druck induziert wird, unbehindert ist. Der mit Blut gefüllte Zustand kann durch Bedingungen, die die Gefäßerweiterung steigern, wie z. B. Erwärmung, verstärkt werden.

**[0023]** Wie hierin verwendet, bezieht sich "von Blut entleert" auf einen Zustand, in dem der Blutfluss durch ein Gewebe wesentlich eingeschränkt ist und das Blutvolumen minimiert ist. Ein von Blut entleerter Zustand kann beispielsweise durch Kühlen und/oder Aufbringen von Druck auf das Gewebe erreicht werden. Der Druck kann unter Verwendung einer statischen Kraft, wie z. B. durch Aufbringen eines makroskopischen Objekts auf das Gewebe (z. B. eines flachen optischen Fensters, eines gerichteten Stroms von Gas), oder in dynamischer Weise, wie z. B. durch Aufbringen von Ultraschallwellen oder Schallwellen mit anderer Frequenz auf das Gewebe, direkt aufgebracht werden.

#### Verfahren der Erfindung

**[0024]** Die Erfindung schafft ein Verfahren zum Messen eines Analyten in einem Gewebe eines Subjekts. In einer Ausführungsform umfasst das Verfahren das Kontaktieren des Gewebes mit elektromagnetischer Strahlung mit einer ersten Erregungswellenlänge. Die erste Erregungswellenlänge ist im Wesentlichen gleich einer Absorptionswellenlänge einer Temperatursonde innerhalb des Gewebes. Die Temperatursonde und der Analyt liegen ausreichend nahe beieinander, so dass in einen durch Absorption von Strahlung eingebrachte Energie auf den anderen übertragen wird. Beispiele einer Temperatursonde umfassen, sind jedoch nicht begrenzt auf Hämoglobin, Carboxy-Hämoglobin, Myoglobin, Melanin und Bilirubin. Beispiele eines Analyten umfassen, sind jedoch nicht begrenzt auf Glucose, Urea, Kreatinin, Pyruvat, Tyrosin, Tryptophan, Bicarbonat, Elektrolyte, Milchsäure, Arzneimittel und Blutgase wie z. B. O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> und NO. In einer bevorzugten Ausführungsform ist die Temperatursonde Hämoglobin und der Analyt ist Glucose. Das Verfahren umfasst ferner das Sammeln der vom Gewebe emittierten Raman-Spektren und das Analysieren der gesammelten Spektren, um die Menge an im Gewebe vorliegendem Analyten zu bestimmen. In einer Ausführungsform umfasst das Analysieren das Messen der Raman-Spektren, die der Temperatursonde zugeordnet sind.

**[0025]** Wahlweise kann das Verfahren ferner das Kontaktieren des Gewebes mit elektromagnetischer Strahlung mit einer zweiten Erregungswellenlänge umfassen. Das Gewebe wird mit der ersten und der zweiten Erregungswellenlänge gleichzeitig kontaktiert. Die zweite Erregungswellenlänge ist im Wesentlichen gleich einer Absorptionswellenlänge des Analyten und das Analysieren umfasst das Vergleichen der in Reaktion auf die erste und die zweite Erregungswellenlänge emittierten Spektren. Informationen über den Analyten können dann von der Auswirkung der zweiten Erregungswellenlänge auf die emittierten Spektren im Vergleich zu den in Reaktion auf die erste Erregungswellenlänge bei Abwesenheit der zweiten Erregungswellenlänge emittierten Spektren abgeleitet werden. Die analysierten Raman-Spektren können sowohl Stokes- als auch Antistokes-Spektren umfassen. In einer Ausführungsform umfasst das Analysieren das Bestimmen der Konzentration des Analyten aus einer Temperaturverschiebung, die in der Temperatursonde durch die zweite Erregungswellenlänge bewirkt wird, gemäß der folgenden Beziehung:

$$C_A = \Delta T / (C_p I_A \epsilon_A \Delta t)$$

wobei  $C_A$  die Konzentration des Analyten ist;

wobei  $\Delta T$  die Temperaturverschiebung ist zwischen der Temperatur in Kelvin, die der Raman-Streuung zugeordnet ist, die von der Temperatursonde in Reaktion auf die erste und die zweite Erregungswellenlänge emittiert wird.

tiert wird, und der Temperatur, die der Raman-Streuung zugeordnet ist, die durch die Temperatursonde in Reaktion auf die erste Erregungswellenlänge bei Abwesenheit der zweiten Erregungswellenlänge emittiert wird; wobei  $C_p$  die Wärmekapazität des Gewebes ist; wobei  $I_A$  die Intensität der elektromagnetischen Strahlung der zweiten Erregungswellenlänge ist; wobei  $\epsilon_A$  der Absorptionskoeffizient für ein Molekül des Analyten ist; und wobei  $\Delta t$  die Dauer des Kontakts mit der zweiten Erregungswellenlänge ist.

**[0026]** In einer weiteren Ausführungsform umfasst das Analysieren das Messen der Raman-Spektren, die dem Analyten zugeordnet sind. Die analysierten Raman-Spektren können Antistokes-Spektren umfassen, die die Raman-gestreuten Spektren mit kürzeren Wellenlängen als der Erregungswellenlänge sind. Die Intensität der Antistokes-Streuung ist gegen die Temperatur der Probe sehr empfindlich. Je höher die Temperatur ist, desto größer ist die Intensität des Antistokes-gestreuten Lichts auf Kosten des Stokes-gestreuten Lichts. Messungen von einer oder beiden der Stokes- und Antistokes-Komponenten können verwendet werden, um ein Signal zu erhalten, das zur Menge an Analyt proportional ist. Antistokes-Komponenten der Spektren sind, obwohl sie typischerweise schwächer sind als Stokes-Komponenten, nützlich, da sie weniger wahrscheinlich als die Stokes-Komponenten durch störenden Hintergrund versperrt werden. Stokes-Merkmale können verwendet werden, werden jedoch vorzugsweise vermieden, wenn eine Fluoreszenz oder andere Hintergrundstrahlung problematisch ist.

#### Gewebemodulation

**[0027]** In bevorzugten Ausführungsformen wird das Verfahren der Erfindung in Verbindung mit Gewebemodulation durchgeführt. Die Gewebemodulation, wie hierin verwendet, bezieht sich auf das Manipulieren des Gewebes, auf das das Verfahren angewendet wird, so dass Messungen sowohl im mit Blut gefüllten als auch von Blut entleerten Zustand durchgeführt werden können. Der Unterschied zwischen den im mit Blut gefüllten und von Blut entleerten Zustand durchgeführten Messungen stellt ein Maß bereit, das Komponenten im Blut anzeigt, während die Auswirkungen von äußeren spektroskopischen Signalen auf Grund von Schwielen, Schmutz, Seifenrest und anderen Quellen, die mit dem Umgebungsgewebe verbunden sind, minimiert werden. Wenn die Gewebemodulation verwendet wird, umfasst der Analyseschritt das Bestimmen des Unterschiedes zwischen den im mit Blut gefüllten und von Blut entleerten Zustand gesammelten Raman-Spektren.

**[0028]** In bevorzugten Ausführungsformen ist das Gewebe Blut, wie z. B. Blut, das im Kapillarbett der Fingerspitze zirkuliert. Andere Gewebe können verwendet werden, wie z. B. das Ohrläppchen, ein Muskel, Haut, Brust oder Gehirn. Das Subjekt ist vorzugsweise ein Wirbeltier wie z. B. ein Säuger, Vogel, Reptil oder Fisch. Beispiele von Säugern umfassen, sind jedoch nicht begrenzt auf den Menschen, Rind, Schwein, Schaf, Maus, Pferd, Hund und Katze. In einer am meisten bevorzugten Ausführungsform ist das Subjekt ein Mensch.

**[0029]** Das Verfahren kann ferner den Schritt des Bestimmens des Blutvolumens im interessierenden Gewebe umfassen. In dieser Ausführungsform umfasst die Analyse das Bestimmen der Menge an Analyt pro Einheit von Blutvolumen. Das Blutvolumen kann durch Kontaktieren des modulierten Gewebebereichs mit Licht, das so gewählt wird, dass es eine Wellenlänge an einem isosbestischen Punkt für das binäre Oxy-Desoxyhämoglobin-Gleichgewicht aufweist, d. h. 805 nm oder 580 nm, gemessen werden. Die Menge an Licht, die zurückkehrt, steht direkt mit dem Blutvolumen im kontaktierten Bereich in Beziehung.  $I_i$  ist die Intensität der Strahlung mit der Wellenlänge an den isosbestischen Punkten, die in das fragliche Gewebe eingeleitet wird.  $I_R$  ist die Intensität der Strahlung mit der Wellenlänge an den isosbestischen Punkten, die vom fraglichen Gewebe zurückgeführt wird. Das Verhältnis  $I_R/I_i$  das für die Veränderung des Blutvolumens über aufeinander folgende Anwendungen der Gewebemodulation normiert, ist für eine Reihe von Messungen, die im gleichen Gewebebereich mit denselben Lasern und Detektoren stattfinden, häufig konstant. Folglich kann dieser Faktor in den Gleichungen, die folgen, weggelassen werden und die Messung der Konzentration kann in Einheiten von Blutvolumen stattfinden, die durch  $I_R/I_i$  definiert sind.

**[0030]** Diese Einheiten des Blutvolumens (oder anderen Gewebevolumens) sind auch in Einheiten von  $\epsilon$  ersichtlich, so dass das abgefragte Volumen nicht explizit in den Gleichungen erscheinen muss, die einen Temperaturanstieg mit der Intensität der einfallenden Strahlung, der Konzentration der Temperatursonde, der Wärmekapazität des Mediums und der Aussetzungsdauer in Beziehung setzen. Das Volumen ist im Zahlenwert von  $\epsilon$  implizit enthalten und kann entweder empirisch gemessen oder aus den bekannten Extinktionskoeffizienten der relevanten Substanzen in In-vitro-Einrichtungen abgeschätzt werden. Dies ist auf Grund des Ziels der Bestimmung von relativen Änderungen in der Analytenkonzentration möglich. Die räumliche Überlappung zwischen dem abgefragten Blutvolumenbereich und dem abgefragten Analytenbereich muss nur eine relative Konstanz über den Verlauf der Messungen aufrechterhalten, um eine ausreichende Genauigkeit in der Ab-

schätzung der Temperaturänderung und dadurch Analytenkonzentration zu schaffen. Es würde erwartet werden, dass die Bereiche beträchtlich überlappen, obwohl die für verschiedene Aufgaben verwendeten verschiedenen Wellenlängen verschiedene Eindringtiefen aufweisen würden. In Anbetracht von anderen mit der Messung in Zusammenhang stehenden Einschränkungen ist es nicht erforderlich, eine vollständige Überlappung zu erzielen.

**[0031]** In einer Ausführungsform ist die erste Erregungswellenlänge etwa 647 bis etwa 400 nm. Vorzugsweise ist die Wellenlänge etwa 550 bis etwa 400 nm. In bevorzugteren Ausführungsformen ist die Wellenlänge etwa 588, 514, 473, 532 oder 457 nm. Die als Erregungswellenlänge in dem Verfahren zu verwendende elektromagnetische Strahlung besitzt vorzugsweise eine Bandbreite von etwa 0,03 nm bis etwa 0,000003 nm. In einer Ausführungsform ist die zweite Erregungswellenlänge etwa 0,98, etwa 1,42, etwa 1,89, etwa 2,15 oder etwa 9 bis etwa 11  $\mu\text{m}$ .

**[0032]** In einer bevorzugten Ausführungsform schafft die Erfindung ein Verfahren zum Messen der Blutglukosekonzentration in einem Subjekt. Das Verfahren umfasst das Kontaktieren von Gewebe des Subjekts mit elektromagnetischer Strahlung mit einer ersten Erregungswellenlänge im blauen bis blau-grünen Bereich, während sich das Gewebe des Subjekts in einem mit Blut gefüllten Zustand befindet. In einer Ausführungsform ist die erste Erregungswellenlänge etwa 550 bis etwa 400 nm. Das Verfahren umfasst ferner das Sammeln von Raman-Spektren, die vom Gewebe in Reaktion auf die erste Erregungswellenlänge emittiert werden, wobei die Raman-Spektren Stokes- und Antistokes-Spektren umfassen. Die gesammelten Spektren werden dann analysiert, um die Hämoglobin zugeordneten Spektren zu bestimmen. Das Verfahren umfasst ferner das Kontaktieren von Gewebe des Subjekts mit elektromagnetischer Strahlung mit einer zweiten Erregungswellenlänge von etwa 0,98, etwa 1,42, etwa 1,89, etwa 2,15 oder etwa 9 bis etwa 11  $\mu\text{m}$ , während sich das Gewebe des Subjekts in einem mit Blut gefüllten Zustand befindet. Das Gewebe wird mit der ersten und der zweiten Erregungswellenlänge gleichzeitig kontaktiert. Die Raman-Spektren, einschließlich Stokes- und Antistokes-Spektren, die vom Gewebe in Reaktion auf die zweite Erregungswellenlänge emittiert werden, werden gesammelt und analysiert, um die Glucose zugeordneten Spektren zu bestimmen. Die obigen Schritte werden auch durchgeführt, während sich das Gewebe in einem von Blut entleerten Zustand befindet, entweder vor, nach oder abwechselnd mit der Durchführung der Schritte, während sich das Gewebe in einem mit Blut gefüllten Zustand befindet. Das Verfahren umfasst ferner das Bestimmen der Nettospektren, die in Reaktion auf die erste und die zweite Erregungswellenlänge emittiert werden, wobei die Nettospektren die Differenz zwischen den im mit Blut gefüllten Zustand und im von Blut verarmten Zustand erhaltenen Spektren umfassen, und das Bestimmen eines ersten Verhältnisses von Antistokes- zu Stokes-Spektren, die in Reaktion auf die erste Erregungswellenlänge emittiert werden, und eines zweiten Verhältnisses von Antistokes- zu Stokes-Spektren, die in Reaktion auf die zweite Erregungswellenlänge emittiert werden. Das zweite Verhältnis wird durch das erste Verhältnis dividiert, um einen Wert zu erhalten, der die Konzentration von Glucose darstellt.

**[0033]** In einer Ausführungsform umfasst das Analysieren das Bestimmen der Konzentration von Glucose aus einer Temperaturverschiebung, die in Hämoglobin durch die zweite Erregungswellenlänge bewirkt wird, gemäß der folgenden Beziehung:

$$C_G = \Delta T / (C_p I_G \epsilon_G \Delta t)$$

wobei  $C_G$  die Konzentration von Glucose ist;

wobei  $\Delta T$  die Temperaturverschiebung ist zwischen der Temperatur in Kelvin, die der Raman-Streuung zugeordnet ist, die durch Hämoglobin in Reaktion auf die erste und die zweite Erregungswellenlänge emittiert wird, und der Temperatur, die der Raman-Streuung zugeordnet ist, die von Hämoglobin in Reaktion auf die erste Erregungswellenlänge bei Abwesenheit der zweiten Erregungswellenlänge emittiert wird;

wobei  $C_p$  die Wärmekapazität des Gewebes ist;

wobei  $I_G$  die Intensität der elektromagnetischen Strahlung der zweiten Erregungswellenlänge ist;

wobei  $\epsilon_G$  der Absorptionskoeffizient für ein Glucosemolekül ist;

und wobei  $\Delta t$  die Dauer des Kontakts mit der zweiten Erregungswellenlänge ist.

**[0034]** In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform schafft die Erfindung ein Verfahren zum Messen von Blutglucose in einem Subjekt. Das Verfahren umfasst das Kontaktieren von Gewebe des Subjekts mit elektromagnetischer Strahlung mit einer ersten Erregungswellenlänge im blauen bis blau-grünen Bereich, während sich das Gewebe des Subjekts in einem mit Blut gefüllten Zustand befindet. In einer Ausführungsform ist die Wellenlänge etwa 550 nm bis etwa 400 nm. Das Verfahren umfasst ferner das Sammeln von Raman-Spektren, einschließlich Antistokes-Spektren, die vom Gewebe emittiert werden, und das Analysieren der gesammelten Spektren, um die Glucose zugeordneten Spektren zu bestimmen. Die obigen Schritte werden auch durchgeführt, während sich das Gewebe in einem von Blut entleerten Zustand befindet, entweder vor, nach oder ab-

wechselnd mit der Durchführung der Schritte, während sich das Gewebe in einem mit Blut gefüllten Zustand befindet. Das Verfahren umfasst ferner das Bestimmen der Nettospektren, die in Reaktion auf die erste Erregungswellenlänge emittiert werden, wobei die Nettospektren die Differenz zwischen den im mit Blut gefüllten Zustand und im von Blut entleerten Zustand erhaltenen Spektren umfassen, um einen Wert zu erhalten, der die Konzentration von Glucose darstellt. Die Begrenzung der Analyse auf den Antistokes-Teil der emittierten Spektren beseitigt viel des im Stokes-Teil der Spektren gefundenen Hintergrundes.

#### Vorrichtung

**[0035]** Die Erfindung schafft eine Vorrichtung zum Messen eines Analyten in einer Probe. Die Probe kann ein Gewebe in einem Subjekt, einschließlich beispielsweise Haut, Muskel, Kapillarbetten, Blut, Brust oder Gehirn, sein. Ein Diagramm, das eine Vorrichtung der Erfindung darstellt, ist in [Fig. 1](#) gezeigt. Die Vorrichtung umfasst eine erste Lichtquelle **100**, einen Detektor **120** und einen Signalprozessor **130**. Die Vorrichtung ist zur Verwendung bei den hierin offenbarten Verfahren der Erfindung geeignet. Geeignete Komponenten und spezielle Ausführungsformen der Vorrichtung können von anderen Raman-Spektroskopiesystemen angepasst werden, die auf dem Fachgebiet bekannt sind (siehe z. B. US-Patent Nrn. 5 553 616; 5 510 894; 5 615 673; und 5 551 422).

**[0036]** Die erste Lichtquelle **100** emittiert elektromagnetische Strahlung mit einer ersten Erregungswellenlänge, wobei die erste Erregungswellenlänge im Wesentlichen gleich einer Absorptionswellenlänge einer Temperatursonde innerhalb der Probe ist. Vorzugsweise ist die Lichtquelle ein Laser. Beispiele von Lasern, die zur Verwendung bei der Erzeugung der ersten Erregungswellenlänge geeignet sind, umfassen, sind jedoch nicht begrenzt auf, Diodenlaser mit externem Hohlraum, CO<sub>2</sub>-Laser und Halbleiterlaser. In einer bevorzugten Ausführungsform umfasst die Vorrichtung ferner eine zweite Lichtquelle **110**, die elektromagnetische Strahlung mit einer zweiten Erregungswellenlänge emittiert, die im Wesentlichen gleich einer Absorptionswellenlänge des Analyten ist. Beispiele von Lasern, die zur Verwendung bei der Erzeugung der zweiten Erregungswellenlänge geeignet sind, umfassen, sind jedoch nicht begrenzt auf Argonionen-, Kryptonionen- und frequenzverdoppelte YAG-Laser. In einer Ausführungsform ist die erste Erregungswellenlänge etwa 550 bis etwa 400 nm und die zweite Erregungswellenlänge ist etwa 0,98, 1,41, 1,89, 2,15 oder etwa 9 bis etwa 11 µm.

**[0037]** Der Detektor **120** ist eine lichtempfindliche Vorrichtung, die angeordnet ist, um von der Probe emittierte Raman-Spektren zu empfangen. Der Detektor **120** kann eine Wellenlängenauswahlvorrichtung **210** umfassen. In einer Ausführungsform ist die Wellenlängenauswahlvorrichtung **210** ein Wellenlängenauswahl-Spektrograph, der vorzugsweise ein holographisches Durchlassgitter und eine Erfassung mit einer Anordnung von ladungsgekoppelten Vorrichtungen (CCD) verwendet. Gestreutes Licht kann vor dem Eintritt in den Spektrographenschlitz unter Verwendung eines holographischen Sperrfilters vorgefiltert werden. In einer Ausführungsform besitzt das Filter eine Bandsperrbreite von etwa 250 cm<sup>-1</sup> (oder etwa 1 nm), die an der entsprechenden Erregungswellenlänge zentriert ist. In einer anderen Ausführungsform ist die Wellenlängenauswahlvorrichtung **210** ein Einkanal-detektor. Beispiele eines Einkanal-detektors umfassen, sind jedoch nicht begrenzt auf eine Photodiode wie z. B. eine Lawinenphotodiode und eine Photovervielfacherröhre. Licht, das in den Einkanal-detektor eintritt, kann beispielsweise unter Verwendung eines einzelnen Sperrfilters oder eines dielektrischen Stapels gefiltert werden. In bevorzugten Ausführungsformen wird der Detektor **120** beispielsweise unter Verwendung von flüssigem Stickstoff oder einem anderen auf dem Fachgebiet bekannten Kühlverfahren gekühlt. Der Detektor **120** erzeugt Ausgangssignale, die die Raman-Spektren darstellen, die von der Probe in Reaktion auf die Bestrahlung mit der ersten und/oder zweiten Lichtquelle **100**, **110** gestreut werden.

**[0038]** Der Prozessor **130** ist zum Empfangen der vom Detektor **120** erzeugten Ausgangssignale gekoppelt. In einer Ausführungsform ist der Prozessor **130** ein Computer, der zum Empfangen der vom Detektor erzeugten Ausgangssignale gekoppelt ist. Der Computer verarbeitet die Ausgangssignale, um einen Wert, der die Konzentration des Analyten im Gewebe angibt, von einem Vergleich von Ausgangssignalen, die die in Reaktion auf die erste und zweite Erregungswellenlänge gestreuten Raman-Spektren darstellen, abzuleiten. In einer Ausführungsform verarbeitet der Computer die Ausgangssignale gemäß der folgenden Beziehung:

$$C_A = \Delta T / (C_P I_A \epsilon_A \Delta t)$$

wobei C<sub>A</sub>, ΔT, C<sub>P</sub>, I<sub>A</sub>, ε<sub>A</sub> und Δt wie vorstehend definiert sind.

**[0039]** Eine weitere Ausführungsform der Vorrichtung ist in [Fig. 2](#) gezeigt. Von der ersten Lichtquelle **100** emittiertes Licht tritt durch einen Amplitudenmodulator **230** zu ersten und zweiten Reflektoren **240**, **250** hindurch, so dass sich das Licht dem Weg von Licht anschließt, das von der zweiten Lichtquelle **110** emittiert wird. Das Licht bestrahlt dann die Probe **200**. Von der Probe gestreutes Licht erreicht eine Wellenlängenauswahlvorrichtung **210**, die ein Filter umfasst, das zum Durchlassen eines ausgewählten Raman-Merkmals abge-



stimmt ist. Ein solches Merkmal umfasst Wellenlängen von 1008 nm bis 1029 nm für Hautkeratin, das mit 785 nm angeregt wird. In einer Ausführungsform hat die Wellenlängenauswahlvorrichtung **210** einen Schlitz von 250 µm und verwendet ein holographisches Durchlassgitter.

**[0040]** Das ausgewählte Signal wird dann von einem Detektor **120** empfangen. In einer Ausführungsform ist der Detektor **120** eine Anordnung von ladungsgekoppelten Vorrichtungen (CCD), die mit flüssigem Stickstoff gekühlt werden kann. Alternativ kann der Detektor **120** einen Einkanal-detektor umfassen. Der Detektor **120** umfasst wahlweise räumliche Charakteristiken wie z. B. eine räumliche Quadrantenanordnung, die eine gleichzeitige Verwendung von räumlicher (Hadamard/anderer/Gewebemodulation) Codierung/Modulation ermöglicht.

**[0041]** Das Signal läuft dann zu einem phasenempfindlichen Verstärker **220**, der einen synchronisierten Verstärker/torgesteuerten Integratorsatz umfasst, um das vom Modulator **230** stimulierte Signal zu demodulieren. Der Prozessor **130** nimmt dann das analoge demodulierte Signal vom phasenempfindlichen Verstärker **220** und führt eine Digitalisierung, Speicherung und Datenverarbeitung durch. Außerdem kann der Prozessor **130** eine Synchronisation mit der gleichzeitigen Gewebemodulation oder räumlichen Codierung schaffen.

**[0042]** Beispiele von Temperatursonden umfassen, sind jedoch nicht begrenzt auf Hämoglobin, Carboxy-Hämoglobin, Myoglobin, Melanin und Bilirubin. Beispiele von Analyten umfassen, sind jedoch nicht begrenzt auf Glucose, Urea, Kreatinin, Pyruvat, Tyrosin, Tryptophan, Bicarbonat, Elektrolyte, Milchsäure, Arzneimittel und Blutgase wie z. B. O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> und NO. In einer Ausführungsform ist die Temperatursonde Hämoglobin und der Analyt ist Glucose.

## BEISPIELE

**[0043]** Die folgenden Beispiele werden dargestellt, um die vorliegende Erfindung zu erläutern und um einen Fachmann bei der Durchführung und Verwendung derselben zu unterstützen. Die Beispiele sind in keiner Weise vorgesehen, um den Schutzbereich der Erfindung ansonsten zu begrenzen.

Beispiel 1 Verwendung der Resonanzverstärkung von Hämoglobin, um eine In-vivo-Glucosemessung zu erhalten

**[0044]** Für ein gegebenes Molekül ist es möglich, verschiedene Wellenlängen von Licht vom Infrarot- bis zum Ultraviolettteil des elektromagnetischen Spektrums zu identifizieren, die im Vergleich zur gesamten Absorption durch alle anderen Komponenten des Bluts und der Gewebe bevorzugt absorbiert werden würden. Wasserfreie d-Glucose (DAG) hat einen molekularen Extinktionskoeffizienten bei oder nahe dem Wellenlängenbereich von 9-11 µm, der signifikant größer ist als jener der meisten Proteine, Salze, Fette und sogar von Wasser, umfassend menschliche Gewebe und Blut. Eine Anzahl von Zuckern, insbesondere phosphorylierten Zuckern, und anderen Zwischenprodukten im Zuckerstoffwechsel absorbieren bei verschiedenen Wellenlängen innerhalb desselben Wellenlängenbereichs.

**[0045]** Die Konzentrationen einer Mehrheit dieser Zucker und naher Zucker sind durch die Gleichgewichte, die zum Zuckerstoffwechsel gehören, eng miteinander korreliert. Individuelle Zucker und verwandte Komponenten absorbieren Infrarotlicht bei deutlich unterschiedlichen Wellenlängen innerhalb und jenseits des vorstehend erwähnten Wellenlängenbereichs. Es war jedoch nicht möglich, diese Erregung unter Verwendung von herkömmlichen Mitteln zu erfassen, die auf Messungen beruhen, die auf dieselbe Wellenlänge wie jene, die auf die Probe einfällt, gerichtet sind. Die Erfassung von rückgestreutem Licht mit derselben Wellenlänge, die als Rayleigh-gestreute Strahlung bekannt ist, ist beispielsweise nicht selektiv, da sie Beiträge vom Blutvolumen sowie vom Gewebe enthält. Eines dieser Streuzentren kann ausreichend variabel sein, um eine nicht selektive gesamte Leistungsmessung sinnlos zu machen.

**[0046]** Da die Absorption von Licht Energie in den beleuchteten Bereich einbringt, bewirkt sie einen Temperaturanstieg. Das Ausmaß des Temperaturanstiegs ist zur Anzahl von absorbierten Photonen, zur Wärmekapazität des Absorbers und des unmittelbar umgebenden Bereichs und zu den relativen Raten der Energieabsorption und Energieleitung in die umgebenden Gewebe und Fluide proportional. Durch Messen des Temperaturanstiegs kann beim Aussetzen einer bestimmten Blut- oder Gewebeprobe in vivo der Strahlung mit einer geeigneten Wellenlänge die Absorption der absorbierenden Spezies erfasst werden. Folglich verringert sich die Messung der Absorption von Licht beispielsweise durch Absorption durch DAG bei Beleuchtung mit der (den) korrekten spezifischen Wellenlänge(n) auf das Problem der Messung des zugehörigen Temperaturanstiegs. Dieses Beispiel beschreibt ein einfaches, vielseitiges Verfahren zum Erhalten von nicht invasiven Tem-

peraturmessungen.

**[0047]** Für den Spezialfall von DAG hängt das Verfahren vom Erhalten von Messungen von Raman-gestreuter Strahlung von den Erythrozyten ab, in denen wasserfreie d-Glucose lokalisiert ist. Das Verfahren kann auf eine Vielfalt von Analyten und Temperatursonden angewendet werden. Freie DAG ist in Blut im Zytoplasmavolumen der Erythrozyten zu finden. Das Aussetzen des Blutvolumens durch die Haut über die Kapillarbetten einer Infrarotstrahlung mit der korrekten Wellenlänge (beispielsweise einer spezifischen Wellenlänge im Wellenlängenbereich von 9-10  $\mu\text{m}$ ), so dass sie durch DAG bevorzugt absorbiert wird, verursacht, dass die Temperatur der Materialien in den Erythrozyten ansteigt. Eine Substanz in unmittelbarer Nähe zum Absorptionspunkt, die dadurch durch die in die DAG eingebrachte Energie erwärmt wird, ist Hämoglobin.

**[0048]** Das Blutvolumen kann durch Kontaktieren des modulierten Gewebebereichs mit Licht, das so gewählt wird, dass es eine Wellenlänge an einem isosbestischen Punkt für das binäre Oxy-Desoxyhämoglobin-Gleichgewicht aufweist, d. h. 805 nm oder 580 nm, gemessen werden. Die Menge an Licht, das zurückkehrt, steht direkt mit dem Volumen von Blut im kontaktierten Bereich in Beziehung.  $I_i$  ist die Intensität der Strahlung mit der Wellenlänge an den isosbestischen Punkten, die in das fragliche Gewebe eingeleitet wird.  $I_R$  ist die Intensität der Strahlung mit der Wellenlänge an den isosbestischen Punkten, die vom fraglichen Gewebe zurückgeführt wird. Das Verhältnis  $I_R/I_i$ , das für die Veränderung des Blutvolumens über aufeinander folgende Anwendungen der Gewebemodulation normiert, ist für eine Reihe von Messungen, die im gleichen Gewebebereich mit denselben Lasern und Detektoren stattfinden, häufig konstant. Folglich kann dieser Faktor in den Gleichungen, die folgen, weggelassen werden und die Messung der Konzentration kann in Einheiten von Blutvolumen stattfinden, die durch  $I_R/I_i$  definiert sind.

**[0049]** Ein Normierungsfaktor in Bezug auf die Qualität des optischen Kontakts zwischen dem optischen Instrumentensystem und dem interessierenden Gewebebereich wird durch Kontaktieren des Bereichs mit einer Wellenlänge, die von keiner Komponente des Bereichs absorbiert wird, und Erfassen der Menge an Licht, das zurückkehrt, erhalten.  $I_N$  ist die Intensität der Strahlung mit nicht absorbierter Wellenlänge, die in das fragliche Gewebe eingeleitet wird.  $I_S$  ist die Intensität der Strahlung mit nicht absorbierter Wellenlänge, die vom fraglichen Gewebe zurückgeführt wird. Es sollte darauf hingewiesen werden, dass das Verhältnis  $I_S/I_N$ , das für die Veränderung des Blutvolumens über aufeinander folgende Anwendungen der Gewebemodulation normiert, häufig für eine Reihe von Messungen, die im gleichen Gewebebereich mit denselben Lasern und Detektoren stattfinden, konstant ist. Folglich wird dieser Faktor in den Gleichungen, die folgen, ausgelassen und die Messung der Konzentration findet in Einheiten von Blutvolumen statt, die durch  $I_S/I_N$  definiert sind.

**[0050]** Schritt 1: Während dieses Schritts wird kein externer Druck auf das untersuchte Gewebe aufgebracht. Ein Raman-Spektrum, Stokes und Antistokes, wird durch optisches Kontaktieren der Haut einer Fingerspitze und des Gewebes/Kapillarbett unter der Haut mit Licht mit schmaler Spektralbandbreite erhalten. Das Licht, das auf Grund der Wechselwirkung dieses "Erregungs"-Lichts mit dem Gewebe streut, wird gesammelt und nach Wellenlänge analysiert. Das Erregungslicht wird so gewählt, dass die Intensität des Raman-Spektrums von Hämoglobin hinsichtlich der Resonanz verstärkt wird.

**[0051]** Der Stokes-Teil des Raman-Spektrums, das während Schritt 1 erhalten wird, wird als  $R_o(\lambda)_{s1}$  bezeichnet. Der Antistokes-Teil des Raman-Spektrums, das während Schritt 1 erhalten wird, wird als  $R_o(\lambda)_{as1}$  bezeichnet.

**[0052]** Das Raman-gestreute Licht, d. h. das hinsichtlich der Wellenlänge verschobene Licht, hat seinen Ursprung in der Wechselwirkung des einfallenden Lichts, d. h. des Erregungslichts, mit den verschiedenen chemischen Spezies im Gemisch. Zusätzlich zu irgendeiner Fluoreszenz, die die Absorption induziert haben kann, tritt ein Teil des Raman-Spektrums bei längeren Wellenlängen als das einfallende Licht auf. Dies wird Stokes-Streuung genannt. Im Gegensatz zur Fluoreszenz nach der Absorption eines einzelnen Photons kann ein anderer Teil des Raman-gestreuten Lichts auch bei kürzeren Wellenlängen beobachtet werden. Dies wird Antistokes-Streuung genannt. Die Intensität dieser Streuung bei kürzeren Wellenlängen ist gegen die Temperatur der Probe sehr empfindlich. Je höher die Temperatur ist, desto größer ist die Intensität des Antistokes-gestreuten Lichts auf Kosten der Stokes-gestreuten Photonen. Der gewöhnliche Raman-Streuprozess, der die Wechselwirkung der Schwingungen der Moleküle mit dem einfallenden Licht beinhaltet, erzeugt gewöhnlich ein hinsichtlich der Wellenlänge verschobenes Lichtphoton für jeweils  $10^6$  einfallende Photonen. Im Gegensatz dazu erzeugt die gewöhnliche Fluoreszenz ein Photon für jeweils  $10^3$  einfallende Photonen.

## Temperatur

**[0053]** Die folgende Gleichung bringt die Intensität von allgemeinen Stokes- $(I_S)$  und Antistokes- $(I_{AS})$  Komponenten einer Schwingungsmoden mit einer Frequenz  $(\nu)$  mit der Temperatur  $(T)$  des Systems, der Frequenz  $(\nu_0)$  der Erregungsstrahlung und  $q$ , dem Verhältnis der Detektorantwort bei den zwei  $\nu_{AS}$  und  $\nu_S$  entsprechenden Wellenlängen in Beziehung.  $h$  ist die Planck-Konstante und  $k$  ist die Boltzmann-Konstante.

$$I_{AS}/I_S = (\nu_{AS} - \nu_0)^4 / (\nu_S - \nu_0)^4 \cdot q \exp(h\nu/kT)$$

**[0054]** Glucose hat ein starkes Raman-Merkmal bei  $200 \text{ cm}^{-1}$ . Ein Temperaturanstieg von  $\approx 12^\circ\text{C}$ , der auf einer vorübergehenden Basis vorkommen würde und unter der statischen Temperatur liegt, von der bekannt ist, dass sie eine histologische Beschädigung verursacht, würde eine Änderung von 10 % des Verhältnisses  $I_{AS}/I_S$  verursachen. Der vorübergehende Temperaturanstieg auf Grund der Absorption von Strahlung,  $\Delta T$ , ist proportional zur gesamten Menge (Energie) von absorbierter Strahlung,  $E_A$ , und zur Nettowärmekapazität des Mediums,  $C_p$ . Die Wärmekapazität von menschlichem Gewebe liegt in derselben Größenordnung wie Wasser. Auf der Basis eines bestrahlten Volumens in der Größenordnung von Mikrolitern reicht das Absorbieren von nur der Größenordnung von  $10^0$ - $10^1$  Mikrojoule aus, um einen solchen Temperaturanstieg zu verursachen. Diese Menge an Energie kann durch  $\text{CO}_2$ -Laser in einem Durchlassband um  $9$ - $10 \mu\text{m}$  in der Wellenlänge erzeugt werden, die durch Glucose und eine Anzahl ihrer unmittelbaren metabolischen Nachkommen zufällig absorbiert wird. Es gibt andere Wellenlängen im nahen Infrarotspektralbereich, wie z. B.  $980$ ,  $1410$ ,  $1890$ ,  $2150 \text{ nm}$ , von denen auch angenommen wird, dass sie durch Glucose selektiv absorbiert werden und unter Verwendung von Halbleiterlasern zweckmäßiger erzeugt werden.

$$\Delta T = C_p E_A$$

**[0055]** Die innerhalb des bestrahlten Volumens absorbierte Energie ist zur Konzentration von absorbierenden Spezies, d. h. Glucosemolekülen,  $C_G$ , zur Intensität der Strahlung bei der fraglichen Wellenlänge und zum Absorptionskoeffizienten pro solchem Molekül proportional.  $E_A$  wird ausgedrückt als:

$$E_A = C_G I_G \epsilon_G \Delta t$$

**[0056]** Glucose und Hämoglobin sind gewöhnlich räumlich in den Erythrozyten lokalisiert, so dass die in eines durch Absorption von Strahlung eingebrachte Energie gewöhnlich auf das andere (und andere Komponenten des lokalisierten Bereichs) übertragen wird, was bevorzugt die Spektren von jedem beeinflusst. Die absorbierte Energie ist zur Intensität der einfallenden Strahlung, zur Dauer  $(\Delta t)$ , die die Absorber ausgesetzt werden, zur Konzentration der Absorber (Glucose,  $C_G$ ) und zum Extinktionskoeffizienten der Absorber bei der Wellenlänge der einfallenden Strahlung, z. B.  $\epsilon_G$  für Glucose, proportional.

**[0057]** Das Beer-Gesetz gilt für die Absorption von Strahlung durch Gewebe in der folgenden relativen Hinsicht. Die effektive Weglänge für eine spezielle Wellenlänge kann während der Spektralabfrage konstant gehalten werden und die einfallende Strahlung kann auf einer konstanten Intensität gehalten werden. Dies gilt unabhängig von der Tatsache, dass sich Licht in Gewebe in der Mehrfachstreuung ausbreitet (R. R. Anderson und J. A. Parrish, 1981, The Optics of Human Skin, J. Investigative Dermatology 77(1):13-19). Außerdem kann die zeitliche Synchronisation der verschiedenen Aussetzungen und Messungen konstant gehalten werden, so dass die relative Absorption nur von der relativen Konzentration der Absorber abhängt. Folglich hängt die relative Temperaturänderung des Hämoglobins von der Konzentration von Glucose ab.

## Resonanzverstärkung

**[0058]** Es gibt einen Bereich von Wellenlängen, der sich über den blau-grünen Teil des sichtbaren Spektrums und in einem schwächeren Ausmaß sogar über den Bereich von  $600 \text{ nm}$  hinaus erstreckt, die der elektronischen Absorption des Hämoglobins in Erythrozyten entsprechen. Die Erregung von Raman-Spektren von Hämoglobin, entweder oxygeniert oder Desoxyhämoglobin, unter Verwendung von einfallendem Licht in diesen Bereichen (insbesondere im blau-grünen) führt zu einer nicht geringeren als  $10^3$ - $10^6$  fachen Verstärkung der Raman-Intensität. Diese Verstärkung liegt an der elektronischen Wechselwirkung, die den Streuprozess intensiviert, und sie macht die Raman-Spektroskopie zu einer besonders empfindlichen Sonde solcher Moleküle, insbesondere in Gegenwart eines Fluoreszenzhintergrundes.

**[0059]** Schritt 2: Während dieses Schritts wird kein externer Druck auf das untersuchte Gewebe aufgebracht. Ein weiteres hinsichtlich der Resonanz verstärktes Raman-Spektrum, Stokes und Antistokes, wird durch optisches Kontaktieren der Haut einer Fingerspitze mit Licht mit schmaler Spektralbandbreite erhalten. Gleichzeitig wird das Gewebe mit einer Lichtquelle mit der Intensität  $I_G$  kontaktiert, die von Glucose gegenüber anderen

Spezies im Gewebe/Blut bevorzugt absorbiert werden kann.

**[0060]** Der Stokes-Teil des Raman-Spektrums, das während Schritt 2 erhalten wird, wird als  $R_o(\lambda)_{s2}$  bezeichnet und der Antistokes-Teil des Raman-Spektrums, das während Schritt 2 erhalten wird, als  $R_o(\lambda)_{as2}$ .

**[0061]** Schritt 3: Während dieses Schritts wird ein externer Druck auf das untersuchte Gewebe aufgebracht. Ein Raman-Spektrum, Stokes und Antistokes, wird durch optisches Kontaktieren der Haut einer Fingerspitze und des Gewebes/Kapillarbett unter der Haut mit Licht mit schmaler Spektralbandbreite erhalten. Das Licht, das auf Grund der Wechselwirkung dieses "Erregungs"-Lichts mit dem Gewebe streut, wird gesammelt und nach Wellenlänge analysiert. Das Erregungslicht wird so gewählt, dass die Intensität des Raman-Spektrums hinsichtlich der Resonanz für die Temperatursonde verstärkt wird.

**[0062]** Der Stokes-Teil des Raman-Spektrums, das während Schritt 3 erhalten wird, wird als  $R_p(\lambda)_{s3}$  bezeichnet und der Antistokes-Teil des Raman-Spektrums, das während Schritt 3 erhalten wird, als  $R_p(\lambda)_{as3}$ .

**[0063]** Schritt 4: Während dieses Schritts wird ein externer Druck auf das untersuchte Gewebe aufgebracht. Ein weiteres hinsichtlich der Resonanz verstärktes Raman-Spektrum, Stokes und Antistokes, wird durch optisches Kontaktieren der Haut einer Fingerspitze mit Licht mit schmaler Spektralbandbreite erhalten. Gleichzeitig wird das Gewebe mit einer Lichtquelle mit der Intensität  $I_G$  kontaktiert, die von Glucose gegenüber anderen Spezies im Gewebe/Blut bevorzugt absorbiert werden kann.

**[0064]** Der Stokes-Teil des Raman-Spektrums, das während Schritt 4 erhalten wird, wird als  $R_p(\lambda)_{s4}$  bezeichnet und der Antistokes-Teil des Raman-Spektrums, das während Schritt 4 erhalten wird, als  $R_p(\lambda)_{as4}$ . Es soll gelten:

$$(R_o(\lambda)_{s1} - R_p(\lambda)_{as1}) / (R_o(\lambda)_{s1} - R_p(\lambda)_{s1}) = A$$

$$(R_o(\lambda)_{s1} - R_p(\lambda)_{as1}) / (R_o(\lambda)_{s1} - R_p(\lambda)_{s1}) = (\nu_{AS} - \nu_0)^4 / (\nu_S - \nu_0)^4 q \exp(h\nu/kT_0)$$

**[0065]** Wobei  $T_0$  der Temperatur in Kelvin entspricht, die den Raman-Streuungen ohne bevorzugte Erregung von Glucose zugeordnet ist.

**[0066]** Ebenso soll gelten:

$$(R_o(\lambda)_{s2} - R_p(\lambda)_{as2}) / (R_o(\lambda)_{s2} - R_p(\lambda)_{s2}) = B$$

$$(R_o(\lambda)_{s2} - R_p(\lambda)_{as2}) / (R_o(\lambda)_{s2} - R_p(\lambda)_{s2}) = (\nu_{AS} - \nu_0)^4 / (\nu_S - \nu_0)^4 q \exp(h\nu/kT)$$

**[0067]** Wobei  $T$  der Temperatur in Kelvin entspricht, die den Raman-Streuungen mit der bevorzugten Erregung von Glucose zugeordnet ist.

**[0068]** So dass:

$$B/A = C \exp(\Delta T / TT_0)$$

$$\ln(B/A) = \ln(C) + (\Delta T / TT_0)$$

**[0069]** Folglich kann das gemessene Verhältnis  $B/A$  im Folgenden verwendet werden:

$$\Delta T = TT_0 \ln(B/A)$$

mit

$$\Delta T = C_P E_A = C_P C_G I_G \epsilon_G \Delta t$$

oder

$$\Delta T / (C_P I_G \epsilon_G \Delta t) = C_G$$

**[0070]** Es ist möglich, die Konzentration von Glucose,  $C_G$ , direkt aus dem Satz von Messungen zu berechnen, wobei sich viele störenden Einflüsse entlang des Weges durch Division aufheben.

**[0071]** Die Messungen des relativen Temperaturanstiegs können mit unabhängig gemessenen Glucosekonzentrationen empirisch korreliert werden. Die obige Erörterung demonstriert einen Algorithmus und zeigt, dass eine strenge Basis für die empirische Anwendung von zwei Variationen des Verfahrens für die nicht invasive Analytenquantifizierung besteht.

Beispiel 2: Verwendung von Antistokes-Raman-Spektren, um eine In-vivo-Glucosemessung zu erhalten

**[0072]** Die Stärke der Antistokes-Komponente des Glucosespektrums hängt von der Intensität der Erregungsstrahlung ab, die das Hämoglobin erregt und die Glucose erwärmt. Die Intensität der Antistokes-Streuung ist gegen die Temperatur der Probe sehr empfindlich. Je höher die Temperatur ist, desto größer ist die Intensität des Antistokes-gestreuten Lichts auf Kosten des Stokes-gestreuten Lichts. Antistokes-Komponenten der Spektren sind nützlich, da sie weniger wahrscheinlich als die Stokes-Komponenten durch störenden Hintergrund versperrt werden. In diesem Beispiel wird eine Erregungswellenlänge, die Hämoglobin erregt, verwendet, um Glucose zu erwärmen, wodurch die der Glucose zugeordneten Antistokes-Spektren verstärkt werden.

**[0073]** Schritt 1: Während dieses Schritts wird kein externer Druck auf das untersuchte Gewebe aufgebracht. Ein Raman-Spektrum, Stokes und Antistokes, wird durch optisches Kontaktieren der Haut einer Fingerspitze und des Gewebes/Kapillarbett unter der Haut mit Licht mit schmaler Spektralbandbreite erhalten. Das Licht, das auf Grund der Wechselwirkung dieses "Erregungs"-Lichts mit dem Gewebe streut, wird gesammelt und nach Wellenlänge analysiert. Das Erregungslicht wird so gewählt, dass es eine Wellenlänge aufweist, die durch Hämoglobin absorbiert wird. Das Ziel besteht darin, so wenig Fluoreszenz wie möglich zu induzieren, während ausreichend Energie in das Hämoglobin eingeleitet wird. Dies erwärmt die Glucose in der unmittelbaren Nähe des erregten Hämoglobins und verursacht, dass die Intensität von Antistokes-Merkmalen beobachtet wird. Moden mit niedriger Frequenz, wie z. B. etwa 200 bis etwa 600  $\text{cm}^{-1}$ , sind für diesen Zweck geeignet.

**[0074]** Der Stokes-Teil des Raman-Spektrums, das während Schritt 1 erhalten wird, wird als  $R_o(\lambda)_{s1}$  bezeichnet und der Antistokes-Teil des Raman-Spektrums, das während Schritt 1 erhalten wird, als  $R_o(\lambda)_{as1}$ .

**[0075]** Schritt 2: Während dieses Schritts wird ein externer Druck auf das untersuchte Gewebe aufgebracht. Ein Raman-Spektrum, Stokes und Antistokes, wird durch optisches Kontaktieren der Haut einer Fingerspitze und des Gewebes/Kapillarbett unter der Haut oder eines anderen analogen Abschnitts eines menschlichen Körpers mit Licht mit schmaler Spektralbandbreite erhalten. Das Licht, das auf Grund der Wechselwirkung dieses "Erregungs"-Lichts mit dem Gewebe streut, wird gesammelt und nach Wellenlänge analysiert. Das Erregungslicht besitzt eine Wellenlänge, die von Hämoglobin absorbiert wird.

**[0076]** Der Stokes-Teil des Raman-Spektrums, das während Schritt 2 erhalten wird, wird als  $R_p(\lambda)_{s2}$  bezeichnet und der Antistokes-Teil des Raman-Spektrums, das während Schritt 1 erhalten wird, als  $R_p(\lambda)_{as2}$ .

**[0077]** Ein Ziel besteht darin, eine Temperaturänderung zu bewirken, die in den Raman-Spektren erkennbar ist, wodurch die Nachweisbarkeit der Antistokes-Komponenten verbessert wird und eine andere Form von Signalmodulation von Stokes-Komponenten erhalten wird, die alle zu einer besseren qualitativen und quantitativen Analyse führen.

**[0078]** Eine Strategie besteht darin, die Stokes-Merkmale zur Analyse zu verwenden. Wenn Fluoreszenz oder andere Hintergrundstrahlung die Verwendung von Stokes-Merkmalen ausschließt, kann jedoch die folgende Berechnung mit den Antistokes-Komponenten verwendet werden:

$$(R_o(\lambda)_{s1} - R_p(\lambda)_{s2}) = P(\lambda)C_G\sigma$$

wobei  $P(\lambda)$  die einfallende Leistung des Erregungslichts ist,  $C_G$  die Glucosekonzentration ist und  $\sigma$  die Querschnittsfunktion ist. Wenn die Werte auf der linken Seite der obigen Gleichung einmal gemessen werden, um einen Wert zu erhalten, der mit einer unabhängigen Messung von  $C_G$  verglichen werden kann, dann kann  $P(\lambda)\sigma$  bestimmt werden und das Instrument zur Verwendung bei der Überwachung von anschließenden Änderungen von  $C_G$  kalibriert werden.

**[0079]** Das Subtrahieren der Ergebnisse von Schritt 1 von Schritt 2, Stokes oder Antistokes, ergibt eine Zahl,

die zur Konzentration von Glucose proportional ist.

**[0080]** Eine Vorrichtung, die zur Verwendung in dieser Ausführungsform des Verfahrens geeignet ist, ist in **Fig. 2** gezeigt. Licht, das von der ersten Lichtquelle **100** emittiert wird, tritt durch einen Amplitudenmodulator **230** zu ersten und zweiten Reflektoren **240**, **250** durch, so dass sich das Licht dem Weg des von der zweiten Lichtquelle **110** emittierten Lichts anschließt. Das Licht bestrahlt dann die Probe **200**. In dieser speziellen Ausführungsform ist die erste Erregungswellenlänge 785 nm und besitzt eine Spektralbandbreite von  $0,3\text{ cm}^{-1}$ . Die hinsichtlich des Hintergrundes verstärkte spontane Emission ist vorzugsweise geringer als 1 Teil in  $10^8$  des Teils mit 785 nm. Wenn die Leistung von 785 nm mindestens 100 mW an der Hautoberfläche ist, kann das Stokes-Glucose-Raman-Spektralmerkmal in etwa 10 Minuten erhalten werden.

**[0081]** Durch die Probe gestreutes Licht erreicht eine Wellenlängenauswahlvorrichtung **210**, die ein Wellenlängenauswahl-Spektrograph mit einem Filter ist, das zum Durchlassen eines ausgewählten Raman-Merkmals wie z. B. 1008 nm oder 1029 nm für Hautkeratin, das mit 785 nm erregt wird, abgestimmt ist. Die Wellenlängenauswahlvorrichtung **210** besitzt einen Schlitz von 250  $\mu\text{m}$  und verwendet ein holographisches Durchlassgitter. Das gestreute Licht wird vor dem Eintritt in den Spektrographenschlitz unter Verwendung eines holographischen Sperrfilters mit einer Bandsperrbreite von etwa  $250\text{ cm}^{-1}$  (etwa 1 nm), die bei 785 nm zentriert ist, vorgefiltert. Die optische Dichte des Filters bei 785 nm ist vorzugsweise mindestens 6 bis 8. Das Lichtsammelsystem enthält keine Faseroptik und besitzt eine effektive f-Zahl von 1,4. Dies kann unter Verwendung von bekannten optischen Komponenten wie z. B. herkömmlichen Kameralinsen mit 35 mm durchgeführt werden. Die Fokussierlinsen für die Raman-Erregung und Hämoglobinabsorption können von etwa 2 cm bis etwa 18 cm in Abhängigkeit von der Größe des zu prüfenden Bereichs sein.

**[0082]** Das ausgewählte Signal wird dann von einem Detektor **120** empfangen. Der Detektor **120** ist eine Anordnung von ladungsgekoppelten Vorrichtungen (CCD), die mit flüssigem Stickstoff gekühlt werden kann. Der Detektor **120** kann einen Einkanal-detektor umfassen und umfasst wahlweise räumliche Charakteristiken, wie z. B. eine räumliche Quadrantenanordnung, die die gleichzeitige Verwendung einer räumlichen (Hadmaard/anderen/Gewebemodulation) Codierung/Modulation ermöglicht.

**[0083]** Das Signal läuft dann zu einem phasenempfindlichen Verstärker **220**, der einen synchronisierten Verstärker/torgesteuerten Integratorsatz umfasst, um das vom Modulator **230** stimulierte Signal zu demodulieren. Der Prozessor **130** nimmt dann das analoge demodulierte Signal vom phasenempfindlichen Verstärker **220** und führt eine Digitalisierung, Speicherung und Datenverarbeitung durch. Außerdem kann der Prozessor **130** eine Synchronisation mit gleichzeitiger Gewebemodulation oder räumlicher Codierung schaffen. Der Prozessor ist vorzugsweise ein Computer.

**[0084]** Fachleute werden andere Variationen und Modifikationen erkennen, die für das Verfahren und die Vorrichtung, die hierin offenbart sind, verwendet werden können.

### Patentansprüche

1. Verfahren zum Messen eines Analyten in einem Gewebe eines Subjekts, das umfasst:
  - (a) Kontaktieren des Gewebes mit elektromagnetischer Strahlung mit einer ersten Erregungswellenlänge sowohl in Gegenwart als auch in Abwesenheit von elektromagnetischer Strahlung, die eine zweite Erregungswellenlänge besitzt, wobei die erste Erregungswellenlänge im Wesentlichen gleich einer Absorptionswellenlänge einer Temperatursonde in dem Gewebe ist, die das Auftreten einer Resonanz-Ramanstreuung hervorrufen kann, und wobei die zweite Erregungswellenlänge im Wesentlichen gleich einer Absorptionswellenlänge des Analyten ist, die das Auftreten einer Resonanz-Ramanstreuung hervorrufen kann, und wobei die Temperatursonde und der Analyt ausreichend nahe beieinander sind, damit die in einen von ihnen durch Strahlungsabsorption eingebrachte Energie an den jeweils anderen übertragen wird;
  - (b) Sammeln der Raman-Spektren, die von dem Gewebe emittiert werden;
  - und
  - (c) Analysieren der gesammelten Spektren durch Vergleichen der Raman-Spektren, die von der Temperatursonde in Reaktion auf die erste Erregungswellenlänge in Gegenwart bzw. bei Abwesenheit der zweiten Erregungswellenlänge emittiert werden, um eine Konzentration des Analyten in dem Gewebe zu bestimmen.
2. Verfahren nach Anspruch 1, bei dem die analysierten Raman-Spektren Stokes und Antistokes-Spektren umfassen.
3. Verfahren nach Anspruch 1, bei dem die Konzentration des Analyten gemäß der folgenden Beziehung

bestimmt wird:

$$C_A = \Delta T / (C_P I_A \epsilon_A \Delta t)$$

wobei  $C_A$  die Konzentration des Analyten ist;

wobei  $\Delta T$  die Temperaturverschiebung ist zwischen der Temperatur in Kelvin, die der von der Temperatursonde in Reaktion auf die erste und die zweite Erregungswellenlänge emittierten Ramanstreuung zugeordnet ist, und der Temperatur, die der durch die Temperatursonde in Reaktion auf die erste Erregungswellenlänge bei Abwesenheit der zweiten Erregungswellenlänge emittierten Ramanstreuung zugeordnet ist;

wobei  $C_P$  die Wärmekapazität des Gewebes ist;

wobei  $I_A$  die Intensität der elektromagnetischen Strahlung der zweiten Erregungswellenlänge ist;

wobei  $\epsilon_A$  der Absorptionskoeffizient für ein Molekül des Analyten ist;

und wobei  $\Delta t$  die Dauer des Kontakts mit der zweiten Erregungswellenlänge ist.

4. Verfahren zum Messen eines Analyten in einem Blut enthaltenden Gewebe eines Subjekts, das umfasst:

(a) Kontaktieren des Gewebes mit elektromagnetischer Strahlung, die eine erste Erregungswellenlänge besitzt, wenn das Gewebe mit Blut gefüllt ist und wenn das Gewebe von Blut entleert ist, wobei die erste Erregungswellenlänge im Wesentlichen gleich einer Absorptionswellenlänge einer Temperatursonde in dem Gewebe ist, die das Auftreten einer Resonanz-Ramanstreuung hervorrufen kann, und wobei die Temperatursonde und der Analyt sich ausreichend nahe beieinander befinden, damit die in einen von ihnen durch Strahlungsabsorption eingebrachte Energie an den anderen übertragen wird;

(b) Sammeln der von dem Gewebe emittierten Raman-Spektren; und

(c) Analysieren der gesammelten Spektren durch Messen der Raman-Spektren, die dem Analyten zugeordnet sind, und Bestimmen der Differenz zwischen den Raman-Spektren, die in dem mit Blut gefüllten Zustand bzw. in dem von Blut entleerten Zustand gesammelt werden, um eine Konzentration des Analyten in dem Gewebe zu bestimmen.

5. Verfahren nach Anspruch 4, bei dem die analysierten Raman-Spektren Antistokes-Spektren umfassen.

6. Verfahren nach Anspruch 1 oder 4, bei dem das Gewebe Blut ist.

7. Verfahren nach Anspruch 1 oder 4, das ferner den Schritt des Bestimmens des Blutvolumens umfasst.

8. Verfahren nach Anspruch 1 oder 4, bei dem die erste Erregungswellenlänge im Bereich von etwa 647 bis etwa 400 nm liegt.

9. Verfahren nach Anspruch 1 oder 4, bei dem die erste Erregungswellenlänge im Bereich von etwa 550 bis etwa 400 nm liegt.

10. Verfahren nach Anspruch 1 oder 4, bei dem die erste Erregungswellenlänge eine Bandbreite im Bereich von etwa 0,03 nm bis etwa 0,000003 nm hat.

11. Verfahren nach Anspruch 1 oder 4, bei dem die Temperatursonde Hämoglobin ist.

12. Verfahren nach Anspruch 1 oder 4, bei dem der Analyt Glucose ist.

13. Verfahren nach Anspruch 1 oder 4, bei dem der Analyt Kreatinin, Pyruvat oder Urea ist.

14. Verfahren nach Anspruch 1, bei dem der Analyt Glucose ist, die Temperatursonde Hämoglobin ist, die erste Erregungswellenlänge im Bereich von etwa 550 bis 400 nm liegt, der Schritt (a) ausgeführt wird, wenn das Gewebe in einem mit Blut gefüllten Zustand ist, die gesammelten Raman-Spektren Stokes- und Antistokes-Spektren umfassen und das Analysieren das Bestimmen der den Hämoglobin zugeordneten Raman-Spektren umfasst, ferner umfassend:

(d) Kontaktieren des Gewebes mit elektromagnetischer Strahlung mit einer zweiten Erregungswellenlänge, wobei die zweite Erregungswellenlänge im Bereich von etwa 9 bis 11  $\mu\text{m}$  liegt, und wobei das Gewebe in einem mit Blut gefüllten Zustand ist;

(e) Sammeln von Raman-Spektren, die von dem Gewebe in Reaktion auf die zweite Erregungswellenlänge emittiert werden, wobei die Raman-Spektren Stokes- und Antistokes-Spektren umfassen;

(f) Analysieren der im Schritt (e) gesammelten Spektren, um die Glucose zugeordneten Spektren zu bestimmen;

(g) Wiederholen der Schritte (a)-(f), während sich das Gewebe in einem von Blut geleerten Zustand befindet;

- (h) Bestimmen von Nettospektren in Reaktion auf die erste und die zweite Erregungswellenlänge, wobei die Nettospektren die Differenz zwischen den Spektren, die in dem mit Blut gefüllten Zustand erhalten werden, und den Spektren, die in dem von Blut geleerten Zustand erhalten werden, umfassen;
- (i) Bestimmen der Temperaturverschiebung zwischen der Temperatur in Kelvin, die der Ramanstreuung zugeordnet ist, die durch Hämoglobin in Reaktion auf die erste und die zweite Erregungswellenlänge emittiert wird, und der Temperatur, die der Ramanstreuung zugeordnet ist, die von Hämoglobin in Reaktion auf die erste Erregungswellenlänge bei Abwesenheit der zweiten Erregungswellenlänge emittiert wird; und
- (j) Bestimmen der Konzentration von Glucose anhand der im Schritt (i) bestimmten Temperaturverschiebung.

15. Verfahren nach Anspruch 14, bei dem die Konzentration von Glucose gemäß der folgenden Beziehung bestimmt wird:

$$C_G = \Delta T / (C_p I_G \epsilon_G \Delta t)$$

wobei  $C_G$  die Konzentration von Glucose ist;

wobei  $\Delta T$  die Temperaturverschiebung ist zwischen der Temperatur in Kelvin, die der Ramanstreuung zugeordnet ist, die von Hämoglobin in Reaktion auf die erste und die zweite Erregungswellenlänge emittiert wird, und der Temperatur, die der Ramanstreuung zugeordnet ist, die von Hämoglobin in Reaktion auf die erste Erregungswellenlänge bei Abwesenheit der zweiten Erregungswellenlänge emittiert wird;

wobei  $C_p$  die Wärmekapazität des Gewebes ist;

wobei  $I_G$  die Intensität der elektromagnetischen Strahlung der zweiten Erregungswellenlänge ist;

wobei  $\epsilon_G$  der Absorptionskoeffizient für ein Glucosemolekül ist; und

wobei  $\Delta t$  die Kontaktdauer der zweiten Erregungswellenlänge ist.

16. Verfahren nach Anspruch 1, bei dem der Analyt Glucose ist, die Temperatursonde Hämoglobin ist, die erste Erregungswellenlänge im Bereich von etwa 550 bis 400 nm liegt, der Schritt (a) ausgeführt wird, wenn sich das Gewebe in einem mit Blut gefüllten Zustand befindet, die gesammelten Ramanspektren Antistoke-Spektren umfassen und das Analysieren das Bestimmen der Glucose zugeordneten Raman-Spektren umfasst, ferner umfassend:

(d) Wiederholen der Schritte (a)-(c), während sich das Gewebe in einem von Blut geleerten Zustand befindet; und

(e) Bestimmen von Nettospektren, die in Reaktion auf die erste Erregungswellenlänge emittiert werden, wobei die Nettospektren die Differenz zwischen den Spektren, die in dem mit Blut gefüllten Zustand erhalten werden, und den Spektren, die in dem von Blut entleerten Zustand erhalten werden, umfassen, um einen die Konzentration von Glucose repräsentierenden Wert zu erhalten.

17. Vorrichtung zum Messen eines Analyten in einem Gewebe in einem Subjekt, die umfasst:

(a) eine erste Lichtquelle (**100**), die Licht mit einer ersten Erregungswellenlänge absorbiert, die im Wesentlichen gleich einer Absorptionswellenlänge einer Temperatursonde in dem Gewebe ist und das Auftreten einer Resonanz-Ramanstreuung hervorrufen kann;

(b) eine zweite Lichtquelle (**110**), die Licht mit einer zweiten Erregungswellenlänge emittiert, die im Wesentlichen gleich einer Absorptionswellenlänge des Analyten ist und das Auftreten einer Resonanz-Ramanstreuung hervorrufen kann;

(c) einen Detektor (**120**), der so angeordnet ist, dass er Raman-Spektren empfangen kann, die von dem Gewebe in Reaktion auf eine Bestrahlung mit der ersten und mit der zweiten Erregungswellenlänge gestreut werden, und der Ausgangssignale erzeugt, die die gestreuten Ramanspektren repräsentieren; und

(d) einen Computer (**130**), der so angeschlossen ist, dass er die von dem Detektor erzeugten Ausgangssignale empfängt, und die Ausgangssignale verarbeitet, um einen Wert, der die Konzentration des Analyten in dem Gewebe angibt, anhand eines Vergleichs der Ausgangssignale, die die in Reaktion auf die erste und die zweite Erregungswellenlänge gestreuten Raman-Spektren repräsentieren, abzuleiten.

18. Vorrichtung nach Anspruch 17, bei der das Gewebe Blut ist.

19. Vorrichtung nach Anspruch 17, bei der die Temperatursonde Hämoglobin ist.

20. Vorrichtung nach Anspruch 17, bei der der Analyt Glucose ist.

21. Vorrichtung nach Anspruch 17, bei der die erste Erregungswellenlänge im Bereich von etwa 550 bis etwa 400 nm liegt.



22. Vorrichtung nach Anspruch 17, bei der die zweite Erregungswellenlänge etwa 0,98, etwa 1,42, etwa 1,89, etwa 2,15 oder etwa 9 bis etwa 11  $\mu\text{m}$  beträgt.

23. Vorrichtung nach Anspruch 17, bei der der Detektor (**120**) einen Wellenlängenauswahl-Spektrographen und eine Anordnung einer ladungsgekoppelten Vorrichtung umfasst.

24. Vorrichtung nach Anspruch 17, bei der der Computer (**130**) die Ausgangssignale gemäß der folgenden Beziehung verarbeitet:

$$C_A = \Delta T / (C_P I_A \epsilon_A \Delta t)$$

wobei  $C_A$  die Konzentration des Analyten ist;

wobei  $\Delta T$  die Temperaturverschiebung ist zwischen der Temperatur in Kelvin, die der Ramanstreuung zugeordnet ist, die durch die Temperatursonde in Reaktion auf die erste und die zweite Erregungswellenlänge emittiert wird, und der Temperatur, die der Ramanstreuung zugeordnet ist, die durch die Temperatursonde in Reaktion auf die erste Erregungswellenlänge bei Abwesenheit der zweiten Erregungswellenlänge emittiert wird;

wobei  $C_P$  die Wärmekapazität des Gewebes ist;

wobei  $I_A$  die Intensität der elektromagnetischen Strahlung der zweiten Erregungswellenlänge ist;

wobei  $\epsilon_A$  der Absorptionskoeffizient für ein Molekül des Analyten ist;

und wobei  $\Delta t$  die Kontaktdauer mit der zweiten Erregungswellenlänge ist.

Es folgen 2 Blatt Zeichnungen

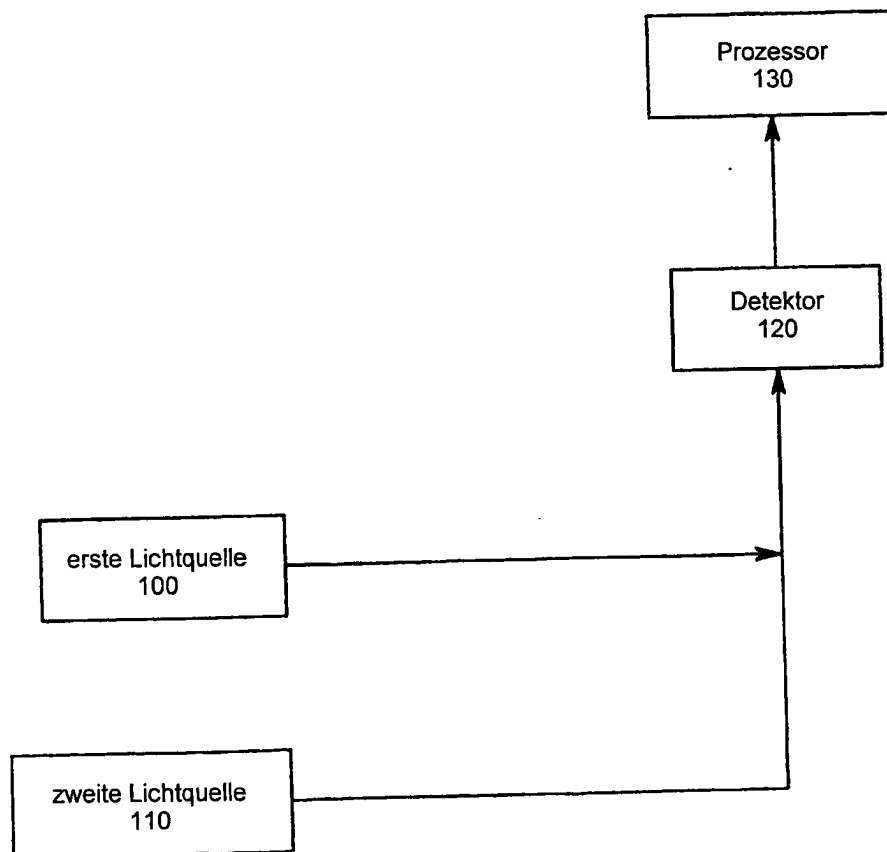


FIG. 1

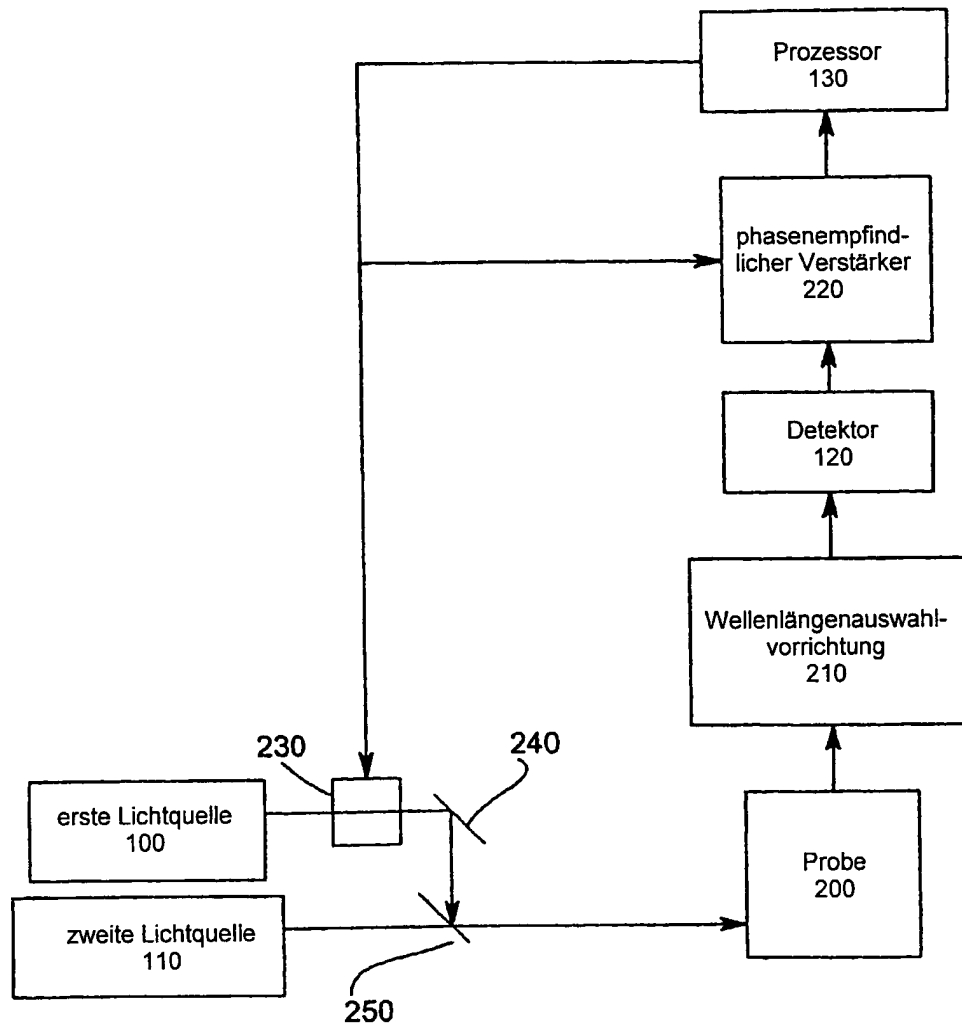


FIG. 2