universität wien

DIPLOMARBEIT / DIPLOMA THESIS

Titel der Diplomarbeit / Title of the Diploma Thesis

„Ermittlung der Messtiefe des Infrarotlichts in der ATR-IR-Spektroskopie“

verfasst von / submitted by

Alexander Götz

angestrebter akademischer Grad / in partial fulfilment of the requirements for the degree of

Magister der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2016 / Vienna, 2016

Studienkennzahl lt. Studienblatt / degree programme code as it appears on the student record sheet:	A 449
Studienrichtung lt. Studienblatt / degree programme as it appears on the student record sheet:	Diplomstudium Pharmazie
Betreut von / Supervisor:	ao. Univ. Prof. Dr. Johannes Saukel

Danksagung

Ich möchte mich vor allem bei meinem Betreuer Ao. Univ. Prof. Dr. Johannes Saukel bedanken, der mir bei auftretenden Problemen stets mit großem Wissen beiseite stand und mich dazu anregte mir eigene Gedanken zu machen anstatt nur einem Leitfaden zu folgen.

Zudem möchte ich mich auch bei Ramin Nikzad, MSc. bedanken der mir bei der statistischen Auswertung der Daten geholfen hat und mich motivierte tiefer in die Welt der Informatik einzutauchen. Des Weiteren war er Antreiber in Phasen geringerer Produktivität und hielt immer dazu an "speditiv" zu sein.

Ich danke außerdem Anke Bellaire und dem Departement für Botanik für das Vermessen meiner Proben mittels Mikro-CT und die fachkundige Einführung in die Probenvorbereitung.

Zu guter Letzt danke ich meiner Familie für die Geduld und Unterstützung in den letzten Jahren, sowie Freundin und Freunden für die Motivation, wann immer sie nötig war.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung **3**

2 Zielsetzung **5**

3 Material und Methoden **6**
3.1 Versuchsaufbau 6
3.2 Material 8
3.3 Infrarot-Spektroskopie 12
3.3.1 ATR-IR-Spektroskopie 15
3.3.2 Eindringtiefe 18
3.4 Datenverarbeitung 20
3.4.1 Vorbereitung der Rohdaten mittels OPUS 21
3.4.1.1 Grundlinienkorrektur 21
3.4.1.2 Vektornormierung 23
3.4.2 Hauptkomponentenanalyse 24
3.4.3 Varianzanalyse 26
3.5 Mikro-CT 26

4 Ergebnisse **29**
4.1 ATR-IR-Spektroskopie 29
4.1.1 Vorgehensweise 29
4.1.2 Hauptkomponentenanalyse 32
4.1.3 Varianzanalyse 42
4.2 Micro-CT 43

5 Diskussion und Ausblick **47**

6 Zusammenfassung **50**

7 Abstract **51**

Abbildungsverzeichnis **52**

Tabellenverzeichnis **54**

Literaturverzeichnis **55**

1 Einleitung

Die Infrarotspektroskopie stellt zusammen mit der Chromatographie eines der wichtigsten Werkzeuge in der instrumentellen Analytik dar. Nachdem William Herschel 1800 in einem Prismenexperiment das erste Mal eine farblose hochenergetische Strahlung [Herschel, 1800], später durch ihre Nähe zum roten Farbbereich Infrarot genannt, beobachten konnte, dauerte es bis ins Jahr 1937 bis das erste moderne Spektrophotometer durch Lehrer entwickelt wurde [Gey, 2015, S.283]. Ein weiterer Meilenstein war die erstmalige Markteinführung von computergestützten Fourier-Transform-Infrarotspektrometern durch die Firma Digilab im Jahre 1969 [Barth and Haris, 2009, S.14]. Von diesem Zeitpunkt an wurde die Methodik immer weiter entwickelt und verbessert, sodass es heute möglich ist in kurzer Zeit, unter minimalen Materialaufwand und unter Verwendung einer geeigneten Infrarot-Messmethode nahezu jede Art von Probe zu vermessen. Die Anwendungsmöglichkeiten fanden zunächst vor allem im Bereich der Chemie großen Anklang. Neben der Strukturaufklärung und Reinheitsbestimmung, war es auch möglich quantitative Aussagen über Stoffe und Stoffgemische zu machen. Mittlerweile hat sich die Infrarotspektroskopie in fast allen Bereichen der Wissenschaft etabliert und wird von Mineralogen und Geologen genauso genutzt wie von Medizinern, Biologen und Pharmazeuten. So rückte die Methode auch nach und nach in den Fokus der pflanzlichen Erforschung. Eine Spezial-Form der Infrarot-Spektroskopie, die sogenannte ATR-IR-Spektroskopie findet dabei schon jetzt breite Anwendung in der landwirtschaftlichen Industrie. So wird sie beispielsweise zur Überprüfung der Produktqualität und Gesundheit der Pflanzen eingesetzt. Samantha A. Hawkins et al. beschreiben in ihrer Arbeit etwa den Nutzen der ATR-IR-Spektroskopie zur Erkennung der "Citrus Greening" Krankheit bei Zitrusfrüchten [Hawkins et al., 2010]. Die spektroskopische Untersuchung der Pflanze bietet hierbei gegenüber herkömmlicher Überprüfung den Vorteil die Krankheit bereits kurz nach der Infektion sichtbar zu machen, wenn sich visuelle Veränderungen an der Pflanze noch nicht feststellen lassen. Zudem ist die Methode schnell und preiswert. Ein weiterer Einsatz liegt in der Charakterisierung industriell wichtiger Nutzpflanzen und der Verbesserung ihrer Anbaubedingungen, wie Yongliang Liu et al. in ihrer Arbeit zur Baumwollpflanze feststellen konnten [Liu et al., 2016]. Neben der Verteilung der In-

haltsstoffe in den verschiedenen Pflanzenteilen, konnten auch Rückschlüsse vom Erntezeitpunkt auf diese Zusammensetzung gemacht werden. Während in den genannten Arbeiten die Proben ausschließlich in Pulverform vermessen wurden, verfolgt die Arbeitsgruppe um Beatriz Ribeiro da Luz einen anderen Ansatz [Ribeiro da Luz, 2006]. Der Fokus liegt weniger auf der industriellen Nutzung der Pflanze, als vielmehr auf dem botanischen Aspekt der ATR-IR-Spektroskopie. Diese soll dazu genutzt werden sowohl im Feld als auch im Labor ein schnelles, unkompliziertes Instrument zur Identifizierung von Pflanzen zur Hand zu haben. Aus dieser Überlegung heraus wurden die Blätter der Pflanzen ohne Vorbehandlung, also frisch und ungemahlen vermessen. Die ATR-IR-Spektroskopie stellte hierbei ein probates Mittel dar, um auch dicke Proben, wie etwa Blätter, vermessen zu können. Die Resultate der Arbeit zeigten bereits, dass die Identifizierung verschiedener Spezies möglich ist. Auch im Department der Pharmakognosie gibt es Untersuchungen ob die ATR-IR-Spektroskopie hinsichtlich Reproduzierbarkeit und Robustheit zur Charakterisierung und Identifizierung von Pflanzen herangezogen werden kann. Aus den Beobachtungen die in den Versuchen gemacht wurden, eröffneten sich weitere Fragen, die die Grundlagen für die Entstehung dieser Arbeit bilden sollen.

2 Zielsetzung

Neben der statistischen Auswertung von Ergebnissen und der Validierung einer Methode ist es auch wichtig zu begreifen, wie diese Ergebnisse zustande kommen. Wie einleitend bereits erwähnt, wurden am Department etliche Pflanzen und Pflanzenteile mittels ATR-IR-Spektroskopie vermessen und die gewonnen Daten statistisch erfasst. Während dieser Analyse kam vermehrt die Frage auf, was eigentlich genau an und in der Probe gemessen wird. Entspricht der vermessene Teil der Pflanze (Epidermis, Kutikula...) dem Bereich der direkt mit der Infrarot-Strahlung wechselwirkt, oder sind noch weitreichendere Informationen im Spektrum wiederzufinden. Anders als etwa in der Chromatographie werden in der ATR-IR-Spektroskopie nicht homogene aufbereitete Systeme, sondern wie im Fall von Blattdrogen, komplexe, vielschichtige organische Strukturen vermessen, die abhängig vom Ort des Strahleneinfalls unterschiedliche Spektren liefern. Ein weiterer Faktor der das Spektrum beeinflusst ist die tatsächliche Eindringtiefe des Infrarotstrahls. In der Arbeit von Ribeiro da Luz [Ribeiro da Luz, 2006] konnten nicht nur erste Zuweisungen von Spektren und Arten gemacht werden, sondern es konnten des Weiteren Banden eines Spektrums verschiedenen Bestandteilen der Kutikula der vermessenen Pflanze zugeordnet werden. Dies ist insofern von Relevanz, als aus den physikalischen Grundlagen heraus die Eindringtiefe des Infrarotlichts in der ATR-IR-Spektroskopie im vom Departement genutzten Gerät in etwa zwischen 0.3 und 1.7µm liegen sollte [Ribeiro da Luz, 2006, S.306]. Damit wäre die Eindringtiefe anatomisch gesehen im Bereich der Kutikula zu vermuten, deren Dicke zwar Werte zwischen 30nm (*Arabidopsis thaliana*) und 30µm (Frucht des *Malus domestica*) annehmen kann, aber für Blätter durchschnittlich bei 2-3 µm liegt [Schreiber and Schönherr, 2009]. Die Fragestellung die sich für mich daraus ergab, war die, ob sich das Spektrum tatsächlich nur aus Signalen der Kutikula zusammensetzt oder vielmehr der tatsächliche Messbreich über die theoretische Eindringtiefe des Infrarotlichts hinausgeht. Dieser Frage soll in dieser Arbeit nachgegangen werden und im Falle der Bestätigung dieser Hypothese, sollen mögliche Erklärungen für dieses Phänomen gegeben werden.

3 Material und Methoden

3.1 Versuchsaufbau

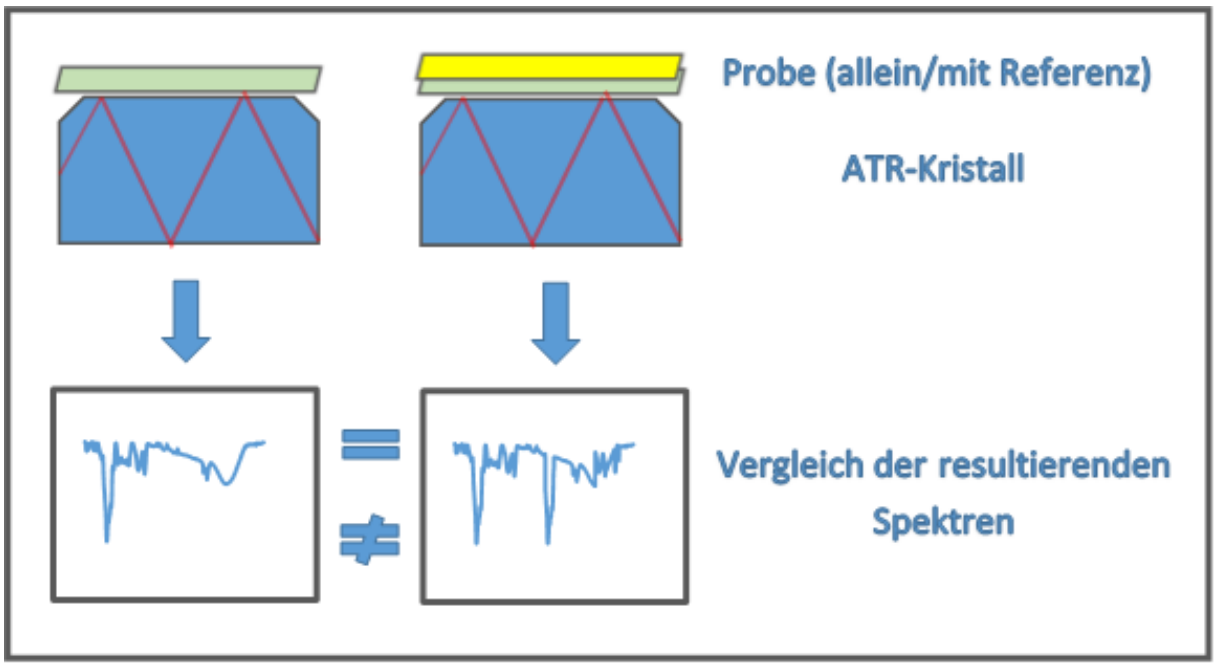


Abbildung 3.1.1: Versuchsaufbau

Die Hypothese dieser Arbeit besagt, dass der Messbereich des ATR-IR-Spektrometers tiefere Bereiche der Probe erfasst als theoretisch durch die Eindringtiefe erklärbar sind. Um diese Hypothese experimentell bestätigen zu können ist es also notwendig diese tieferen Bereiche im Spektrum sichtbar zu machen. Das Konzept war nun, verschiedene Materialien (Zwiebelhäutchen, Klarsichtfolie, Butterbrotpapier) auf dem ATR-Kristall zu vermessen. Die Materialien stellten dabei definierte Schichten da, mit denen die Dicke der Probe angepasst werden konnte. Jede Schichtanzahl wurde dabei unter zwei verschiedenen Bedingungen gemessen (siehe Abb.3.1.1). Zum einen allein, zum anderen mit einer zusätzlichen Lage eines Referenzpapiers. Die Idee dahinter war

es durch den Vergleich der resultierenden Spektren Aussagen darüber treffen zu können, ob das Infrarotlicht die Lage(n) durchdrungen hat und das Referenzpapier mitgemessen wurde. Tritt dieser Fall ein müssten die beiden Spektren unterscheidbar sein. Die parallelen Messungen wurden nun mit steigender Anzahl an Lagen wiederholt und statistisch ausgewertet. Der Punkt an dem die Unterscheidbarkeit der Lagen nicht mehr gegeben war konnte nun dazu herangezogen werden den Messbereich des ATR-Spektrometers anzunähern. Dazu wurden die Dicken der einzelnen Lagen bestimmt und aufaddiert. Während für die Dicke der Klarsichtfolie und des Butterbrotpapiers Referenzwerte des Herstellers vorlagen, musste diese für die Zwiebellagen experimentell ermittelt werden. Dazu wurden die Zwiebelhäutchen mithilfe der micro-CT vermessen und somit ihre Dicke bestimmt. Zu guter Letzt wurde aufgrund der ersten Messergebnisse eine weitere Versuchsreihe mit dem ATR-IR-Spektrometer durchgeführt. Ähnlich wie oben beschrieben wurden wieder parallel Messungen mit und Messungen ohne Referenzpapier durchgeführt, wobei diesmal keine wechselnden Lagen von Material die Probe bildeten sondern ganze Blätter von Valeriana officinalis.

3.2 Material

Um die Hypothese zu überprüfen, war es wichtig Material zu verwenden, dass folgende Eigenschaften aufweist: Das Material sollte möglichst dünn sein, um eine genaue Abstufung der Messtiefe zu ermöglichen, es sollte passend zur Ausgangsfrage organischer, genauer pflanzlicher Herkunft sein, es sollte über möglichst ähnliche anatomische Strukturen wie die später zu vermessenden Proben verfügen, sprich Kutikula und Epidermiszellen aufweisen, zudem sollte es in gleichbleibender Qualität und zu einem vernünftigen Preis erhältlich sein.

Die Wahl fiel hierbei auf Häutchen (Epidermis und Cuticula) der Küchenzwiebel allium cepa L. Diese wurden von einem Lebensmittelkonzern bezogen, wobei darauf geachtet wurde, dass Hersteller, Herkunft und Packungsgröße immer dieselben waren. Von diesen Küchenzwiebeln (80 – 100mm Durchmesser) wurden Schuppenblätter herauspräpariert und das Häutchen (Epidermis + Cuticula) an deren Innenseite abgezogen (Abb. 3.2.1). Verwendet wurden hierbei immer nur Blätter die optisch gleichmäßig waren und keinerlei Verletzungen oder andere Makel aufwiesen. Zudem wurde jeweils das erste fleischige Schuppenblatt verworfen um die Qualität möglichst gleichmäßig zu gewährleisten. Des Weiteren wurden nur ausreichend große Blätter benutzt um die Vergleichbarkeit zwischen den Proben hochzuhalten.

Die Häutchen wurden mit der Epidermis-Seite auf die Mündung eines Glases aufgespannt (Abb. 3.2.2) und 7 Tage lang an einem kühlen und gut belüfteten Raum getrocknet (Abb. 3.2.3). Waren die Zwiebelhäutchen gut durchgetrocknet, wurden sie anschließend mithilfe einer Rasierklinge entlang des Glasrandes ausgeschnitten (Abb. 3.2.4) und in beschrifteten Papiersäckchen gesammelt.

Abbildung 3.2.1: Ablösen des Zwiebelhäutchens vom Schuppenblatt

Abbildung 3.2.2: Aufbringen des Zwiebelhäutchens auf die Öffnung des Glases

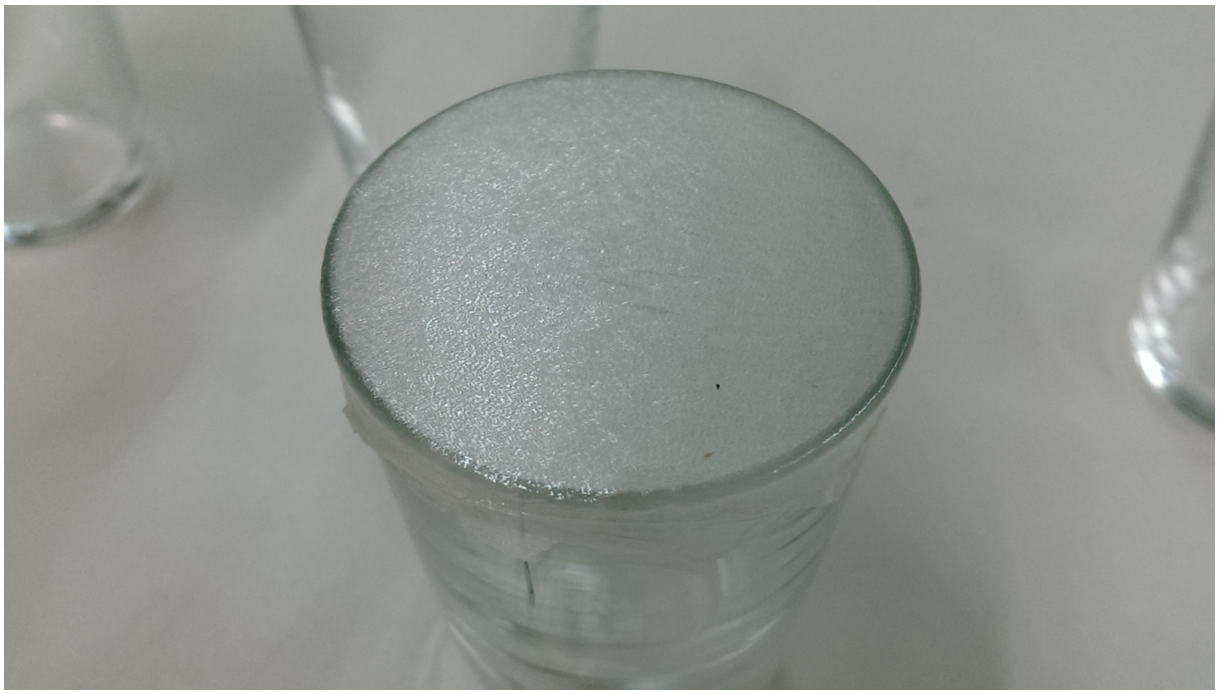


Abbildung 3.2.3: Trocknung des aufgespannten Zwiebelhäutchens

Abbildung 3.2.4: Ausgeschnittenes Zwiebelhäutchen

Diese Art der Probenvorbehandlung hat sich am geeignetsten für die Durchführung der Messungen erwiesen. Da mit einer Art der Infrarot-Spektroskopie gearbeitet wurde, war es wichtig die Proben möglichst trocken zu vermessen, da die Absorption des

Wassers sonst das gesamte Spektrum zu sehr überlagern würde. Durch die Trocknung im gespannten Zustand konnten, im Vergleich zur Pressung unter Druck, beide Seiten der Probe mit Luft in Kontakt treten und die Probe war insgesamt schneller getrocknet. Zudem erhielt man durch das Aufspannen annähernd gleichmäßig, flache Proben, die sich leicht stapeln ließen.

Neben den Zwiebelhäutchen wurden zur Vergleichbarkeit Stücke von Klarsichtfolie und Butterbrotpapier zur Vermessung herangezogen. Diese erfuhren keine weitere Vorbehandlung und konnten direkt vermessen werden. Es handelte sich hierbei zum einen um Frischhaltefolie der Marke Billa und zum anderen Butterbrotpapier der Marke AluFix. Die Klarsichtfolie hatte hierbei eine vom Hersteller deklarierte Dicke von 11µm, das Butterbrotpapier wurde mit 35 µm angegeben. Bei Butterbrotpapier handelt es sich um ein holzfreies Produkt aus Pflanzenfasern, das mittels mechanischen Verfahren, gemahlen und gewalzt wird. Es ist fettdicht und leicht transparent [Schwedt, 2013, S.26].

Die abschließende Beurteilung der Messtiefe anhand von ganzen Blattdrogen erfolgte mit Präparaten von Valeriana officinalis aus der Sammlung des Departments für Pharmakologie der Uni Wien.

Abbildung 3.2.5: Verwendete Präparate - von links nach rechts: Zwiebelhäutchen, Klarsichtfolie, Butterbrotpapier

Neben den Materialien die zum Schichtaufbau benötigt wurden, wurde farbiges Papier verwendet um bei einem der parallelen Messungen eine Veränderung des Spektrums herbeizuführen. Hierfür wurde gelbes Papier aus einem Notizblock der Marke Donau (Art. Nr.: 75890015-99) herangezogen. Auch dieses Material wurde nicht weiter behandelt.

3.3 Infrarot-Spektroskopie

Die Infrarot-Spektroskopie stellt eine analytische Methode dar, um strukturelle Informationen unterschiedlicher Stoffe zu erhalten, bzw. Verbindungen anhand der gewonnenen Spektren zu identifizieren. So ist es mithilfe der IR-Spektroskopie möglich direkte Aussagen zur Struktur einer Probe zu machen, da etwa die An- oder Abwesenheit funktioneller Gruppen (Carbonylfunktionen, Hydroxy- , Aminogruppen, etc.) durch Lage und Intensität von Absorptionsbanden im Spektrum angezeigt wird [Günzler and Gremlich, 2003, S.3 f.]. Zudem besitzt jeder Stoff ein spezifisches Absorptionsmuster bzw. Spektrum anhand dessen er ähnlich einem Fingerabdruck identifiziert werden kann. Hierzu wurden in den letzten Jahren riesige Spektren-Bibliotheken aufgebaut, alleine die Firma *Bio-Rad Laboratories* bietet ein Paket mit über 235.000 Spektren [BioRad Labratories,], die als Referenz zur Identifizierung unbekannter Substanzen herangezogen werden können.

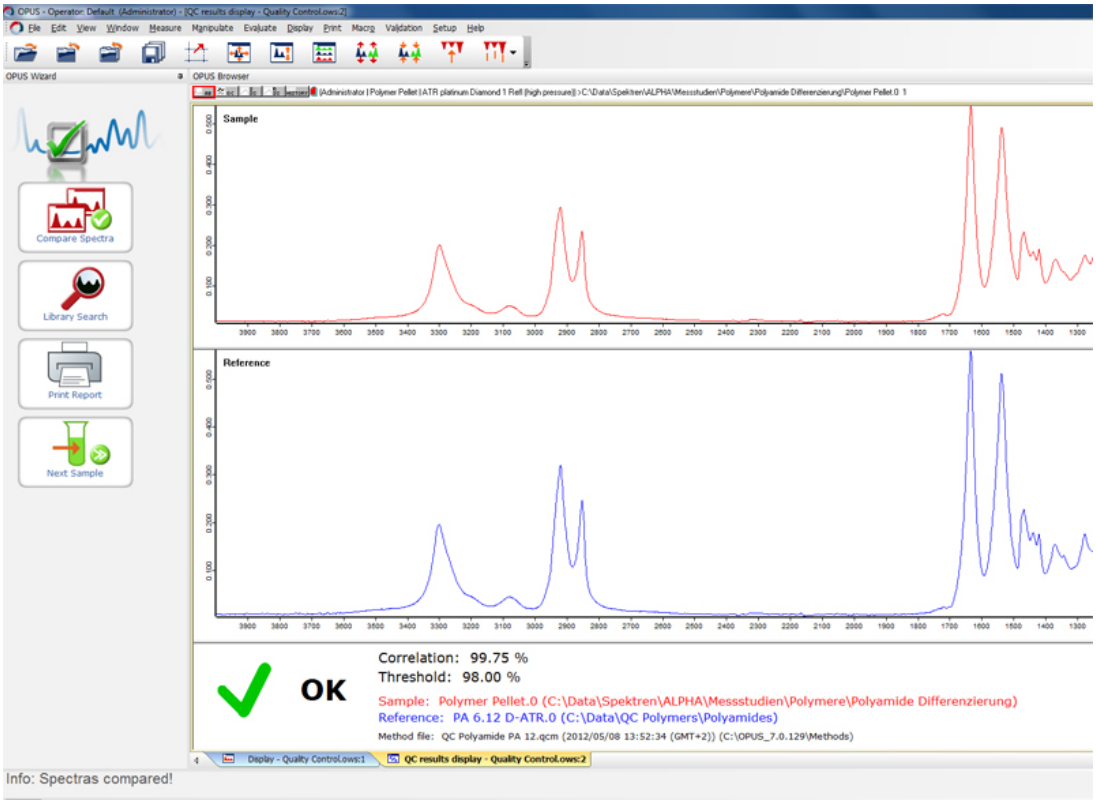


Abbildung 3.3.1: Spektrenvergleich mit Referenz [Bruker Corporation, a]

Eine weitere Anwendungsmöglichkeit der IR-Spektroskopie ist die Quantifizierung von einzelnen Komponenten eines Stoffgemisches. Hierzu wird mithilfe verschieden konzentrierter Lösungen der Reinsubstanzen und deren Extinktionen eine Kalibrie-

rungsgerade angefertigt, anhand derer man die Extinktion der Probe auf ihren Masseanteil abbilden kann [Gottwald and Wachter, 1997, S. 233, 239]. Anwendung findet diese Quantifizierungsmethode beispielsweise in der Analyse von Polymeren oder Gehaltsbestimmungen, wie beispielsweise Zucker (siehe Abb.3.3.2).

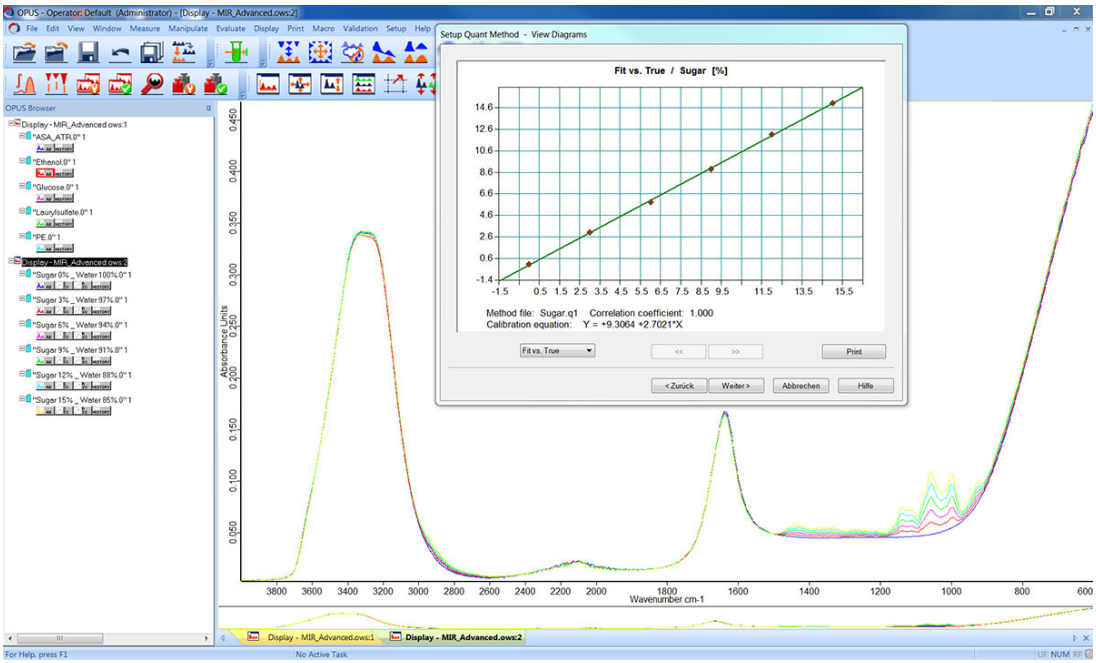


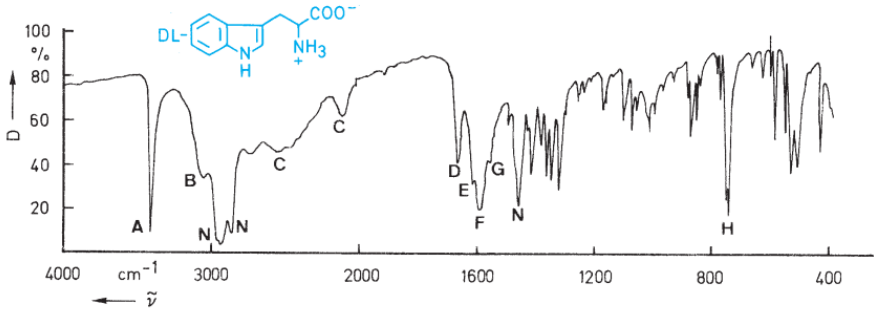
Abbildung 3.3.2: Quantifizierung mithilfe der OPUS Software [Bruker Corporation, b]

Die Vorteile der IR-Spektroskopie liegen in ihrer einfachen Handhabung, dem geringen Zeitaufwand, ihrer Selektivität und ihrer hohen Empfindlichkeit. Dies macht sie zudem auch zu einer kostengünstigen Methode (geringer Materialeinsatz, hoher Probendurchsatz, kein Fachpersonal notwendig) [Rees, 2010, VII]. Die IR-Spektroskopie gehört methodisch zur Gruppe der Molekülspektroskopie. In der Molekülspektroskopie wird der Einfluss von elektromagnetischen Wellen auf die Molekülstruktur beobachtet [Banwell, 1999, S.1]. Die Infrarot-Spektroskopie macht sich hierbei den Umstand zu Nutze, dass bei Anregung durch Energie, im Fall der IR-Spektroskopie die Strahlungsenergie des Infrarotlichts, nicht nur die einzelnen Elektronen auf ein höheres Energieniveau gehoben werden, sondern das gesamte Molekül mit Rotationen und Schwingungen der Atombindungen reagiert. Essentiell für das Auftreten eines Energieübertrags ist die Erfüllung der Bohrschen Frequenzbedingung. Diese beschreibt, dass Elektronenverschiebung nur dann auftreten kann, wenn die Differenz der Energieniveaus eines Elektrons gleich der Frequenz des anregenden Lichtstrahls ist [Günzler and Gremlich, 2003, S.13 f.].

$$E_1 - E_2 = h * v \tag{3.1}$$

$E_1, E_2 = Energie\ des\ Elektrons\ auf\ unterschiedlichen\ Umlaufbahnen$
$h = Planck - Konstante$
$v = Frequenz\ der\ emittierten\ Strahlung$

Wird nun kurzwellige Strahlung, wie etwa UV (ca. 180 - 400 nm) oder auch sichtbares Licht (VIS, 400 - 800 nm) als Strahlungsquelle verwendet, kommt es zur zuvor angesprochenen Überführung von Elektronen in höhere Energiezustände, sprich Absorption [Gottwald and Wachter, 1997, S.9]. Diesen Effekt macht sich beispielsweise die UV/VIS-Spektroskopie zunutze. Da neben der Energie der Elektronen auch die Schwingungsenergie nur bestimmte "gequantelte" Werte annehmen kann, ist auch hier die Einhaltung des Frequenzprinzips notwendig. Die hierfür benötigten Frequenzen finden sich wiederum im Bereich der IR-Strahlung (etwa 780nm - 50 µm) und ermöglichen somit die Manipulation von Molekülen durch die Infrarot-Spektroskopie [Günzler and Gremlich, 2003, S.14]. Abhängig von der Anzahl der Atome im Molekül und ihrer Anordnung (linear, nicht-linear) bilden sich unterschiedliche Schwingungstypen aus: die symmetrische Valenzschwingung, die asymmetrische Valenzschwingung und die Deformationsschwingung. Mit Ausnahme der nicht IR-aktiven symmetrischen Valenzschwingung eines **linearen** Moleküls, erzeugen die oben genannten Schwingungstypen Banden in einem IR-Spektrum, da die elektromagnetische Strahlung des Infrarot-Lichts durch die Substanz absorbiert wird und somit Resonanz erfolgt [Günzler and Gremlich, 2003, S.25 ff.]. Die Ausprägungen dieser Schwingungen können nun spezifischen Bindungen oder auch funktionellen Gruppen zugeordnet werden. Exemplarisch für die Interpretation von Banden soll hier das Spektrum des Tryptophans gezeigt werden (Abb.3.3.3).



D,L-Tryptophan (in Nujol)

A	3400 cm^{-1}	Indol-(N—H)-Valenzschwingung
B	3030 cm^{-3}	breite „Ammonium"-Bande von $-NH_3^+$
C	≈2500 und ≈2100 cm^{-1}	zwei Banden, sehr häufig bei Aminosäuren, treten auch bei primären Ammonium-Salzen auf
D	1665 cm^{-1}	Aminosäure I; ungewöhnlich stark
E	1610 cm^{-1}	wahrscheinlich Aryl-Gruppe
F	1585 cm^{-1}	Aminosäure II; ionisierte Carboxylat-Gruppe $-COO^-$
G	1555 cm^{-1}	$-NH_3^+$-Deformationsschwingung
H	755 oder 745 cm^{-1}	(C—H)-*out-of-plane*-Schwingungen eines 1,2-disubstituierten Benzol-Ringes
N		Nujol-Banden

Abbildung 3.3.3: Interpretation des Spektrums von Tryptophan [Hesse et al., 2005, S.67]

Das Infrarotlicht kann allgemein nach seiner Wellenzahl in drei große Gruppen unterteilt werden, das ferne IR im Bereich von 10 – 200 cm-1, das mittlere IR von 200 – 4000 cm-1 und das nahe Infrarot im Bereich von 4000 – 12800 cm-1 [Skoog and Leary, 2013, S.274]. Die höchste Informationsdichte findet sich in der Region des mittleren Infrarotspektrums. Ein Teilbereich dessen stellt der Fingerprintbereich dar, dieser erstreckt sich von ca. 600 – 1500cm-1 [Stuart, 1997, S.61]. Dieser weist sehr viele und intensive Banden auf und ist besonders repräsentativ für die jeweilige Verbindung, bzw. Probe. Für die vorliegende Arbeit wurde mit Wellenzahlen im Bereich von 600 – 4000cm-1 gemessen. Wie bereits oben erwähnt, bringt die IR-Spektroskopie einige Vorteile mit sich, was das Handling betrifft, so können feste, gasförmige als auch flüssige Proben direkt vermessen werden. Da in der pharmakognostischen Forschung allgemein und in dieser Arbeitsgruppe im speziellen überwiegend Pflanzen und Pflanzenteile, wie etwa Blätter, Rinde etc. vermessen werden, die naturgemäß selten Transmission zulassen, musste sich mit einer Spezialform des IR-Spektrometers beholfen werden.

3.3.1 ATR-IR-Spektroskopie

Die ATR-IR-Spektroskopie hat den Vorteil, dass sie keine Maximaldicke von Proben vorschreibt. Gerade bei dicken Blättern oder Rinden ist dies von Vorteil. Im Gegensatz zur herkömmlichen IR-Spektroskopie muss die Strahlung die Probe nicht kom-

plett durchwandern, sondern nur wenige Mikrometer tief eindringen. Die ATR-IR-Spektroskopie ist eine Form der Infrarot-Reflexionsspektroskopie. Grundlage dieser Methode ist das Phänomen der Inneren Reflexion. Tritt ein Lichtstrahl von einem Medium in ein anderes Medium, ist das Verhalten an der Grenzfläche von mehreren Faktoren abhängig.

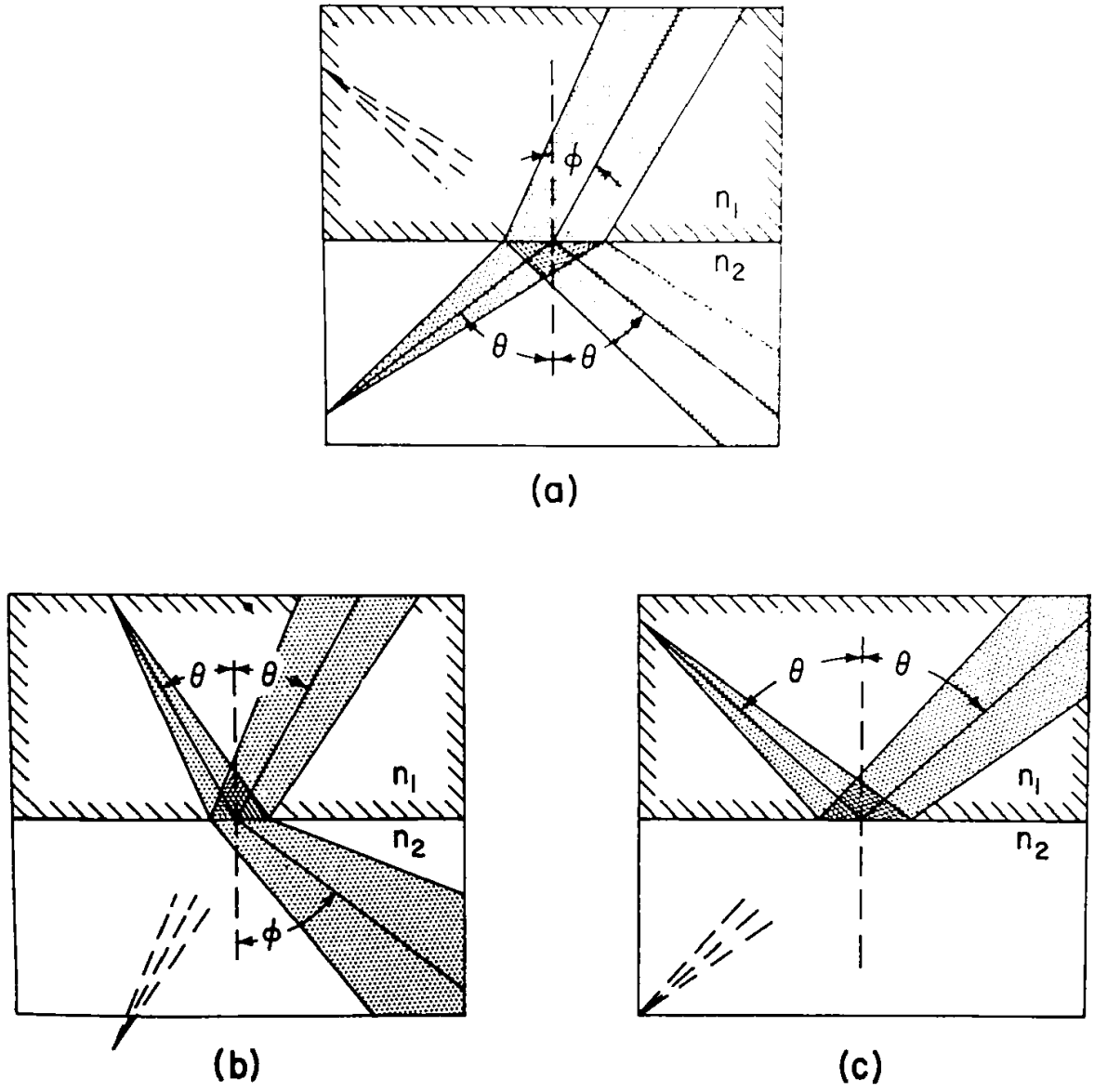


Abbildung 3.3.4: Arten der Reflexion und Brechung eines Lichtstrahls [Harrick, 1967, S.15]

Ein wichtiger Faktor ist die optische Dichte der aneinandergrenzenden Materialien. Fällt beispielsweise das Licht über das optisch dünnere Medium (n_2, mit geringerem Brechungsindex) in das optisch dichtere Medium (n_1) ein, so kommt es zur externen Reflexion (Abb3.3.4, a). Diese ist beispielsweise zu beobachten, wenn ein Strohhalm

beim Übergang von Luft in Wasser geknickt erscheint. Der Lichtstrahl wurde an dieser Stelle gebrochen. Für die ATR-IR-Spektroskopie ist dagegen das Auftreten der inneren Reflexion entscheidend. Diese tritt ein, wenn ein Strahl durch ein optisch dichteres Medium (n_1) auf die Grenzfläche eines optisch dünneren Mediums (n_2) trifft (Abb.3.3.4, b,c). In diesem Fall kann es zur Ausbildung einer Totalreflexion (Abb. 3.3.4, c) kommen [Harrick, 1967, S.14 f.]. Dazu ist neben den Brechungsindices der Medien, auch der Einfallswinkel des Lichtstrahls auf die Grenzfläche und dessen Verhältnis zum Grenzwinkel der Totalreflexion von Bedeutung. Dieser Grenzwinkel kann über nachstehende Formel anhand des Snelliusschen Brechungsgesetzes errechnet werden.

$$sin\alpha_g = \frac{n_1}{n_2} \tag{3.2}$$

$\alpha_g = Grenzwinkel\ der\ Totalreflexion$
$n_1 = Brechungsindex\ des\ dichteren\ Mediums$
$n_2 = Brechungsindex\ des\ dünneren\ Mediums$

Übersteigt der Einfallswinkel α den Grenzwinkel der Totalreflexion α_g kommt es zur totalen inneren Reflexion (Abb. 3.3.4, c) [Lerner and Lawrence, 1997, S.960].

Vergleicht man allerdings Einfallspunkt der Strahlung und Ausfallspunkt, lässt sich beobachten dass diese um eine gewisse Distanz verschoben sind. Dieses Phänomen wird auch als Goos-Hänchen Effekt bezeichnet, da es erstmals experimentell durch Fritz Goos und Hilda Hänchen nachgewiesen wurde [Goos and Hänchen, 1947]. Der Versatz des Lichtstrahls resultiert aus dem evaneszenten Verhalten einer Welle beim Eintritt vom optisch dichteren ins dünnere Medium. Die Reflexionsebene scheint hierbei nicht direkt an der Grenzfläche, sondern leicht versetzt im dünneren Medium zu liegen.

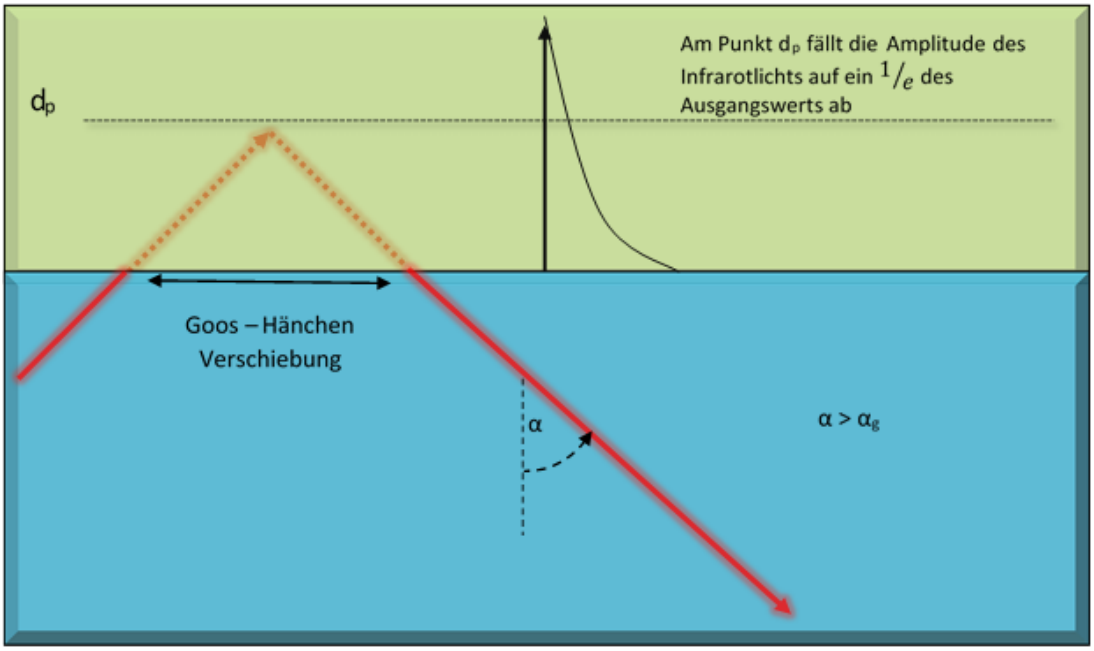


Abbildung 3.3.5: Vorgänge an der Grenzfläche des ATR-Kristalls

Der Grund dieser Verlagerung des Reflexionspunktes über die Grenzfläche hinaus, liegt in der Ausbreitung der elektromagnetischen Welle in das optisch dünnere Medium hinein. Die Amplitude des elektromagnetischen Feldes fällt somit nicht direkt an der Grenzfläche von Probe und ATR-Kristall auf Null ab, sondern klingt exponentiell im optisch dünneren Medium ab. Den Teil der Infrarotstrahlung der auf diese Weise in die Probe übertritt bezeichnet man als evaneszente Welle [Harrick, 1967, S.30 f.]. Die ATR-Infrarot-Spektroskopie forciert nun gezielt das Auftreten einer Totalreflexion und im weiteren Verlauf einer evaneszenten Welle, indem Materialien mit einem hohen Brechungsindex, wie etwa Germanium, Zinkselenid oder Diamant als ATR-Kristall verwendet werden und nach obenstehender Formel (3.2) ein geeigneter Einfallswinkel gewählt wird. Wird nun eine Probe (fest oder flüssig) nah genug an den Kristall gebracht, kann diese mit dem evaneszenten Feld wechselwirken und somit Teile der einfallenden Infrarotstrahlung absorbieren ([Harrick, 1967, S.40]. Der andere Teil der Strahlung wird reflektiert und gelangt zum Detektor des Spektrometers.

3.3.2 Eindringtiefe

Die Eindringtiefe d_p ist ein Wert, der angibt in welcher Distanz zur Grenzfläche der Totalreflexion das elektrische Feld auf 1/e seines Ursprungswertes abgefallen ist (Abb: 3.3.5). Die Eindringtiefe ist dabei, wie nachstehende Formel zeigt, von mehreren Faktoren abhängig.

$$d_p = \frac{\lambda}{2\pi(n_1^2 \sin^2 \alpha_1 - n_2^2)^{\frac{1}{2}}} \tag{3.3}$$

λ = *Wellenlänge des Lichts*
n_1 = *Brechungsindex des ATR − Kristalls*
n_2 = *Brechungsindex der Probe*
α = *effektiver Einfallswinkel*

Formel aus [PikeM, 2015, s.16]

So haben neben dem Einfallswinkel des Infrarotstrahls auch die Brechungsindizes des IRE (internal reflection element) und der Probe, sowie die verwendete Wellenlänge Einfluss auf die Eindringtiefe. So führt etwa ein kleinerer Einfallswinkel zu größerer und das Verwenden von IREs mit großem Brechungsindex zu kleinerer Eindringtiefe. Auf Grundlage der Gleichung (3.3) könnte nun eine Probe mehrmals unter veränderten Parametern vermessen werden und daraus ein Tiefenprofil der Probe gewonnen werden. Die Zusammenhänge sind in nachfolgender Abbildung 3.3.6 noch einmal verdeutlicht. Ge stellt hierbei Germanium (Brechungsindex = 4.0) und ZnSe Zinkselenid (Brechungsindex = 2.42) dar. Vermessen wurde eine Probe mit einem Brechungsindex von 1.5.

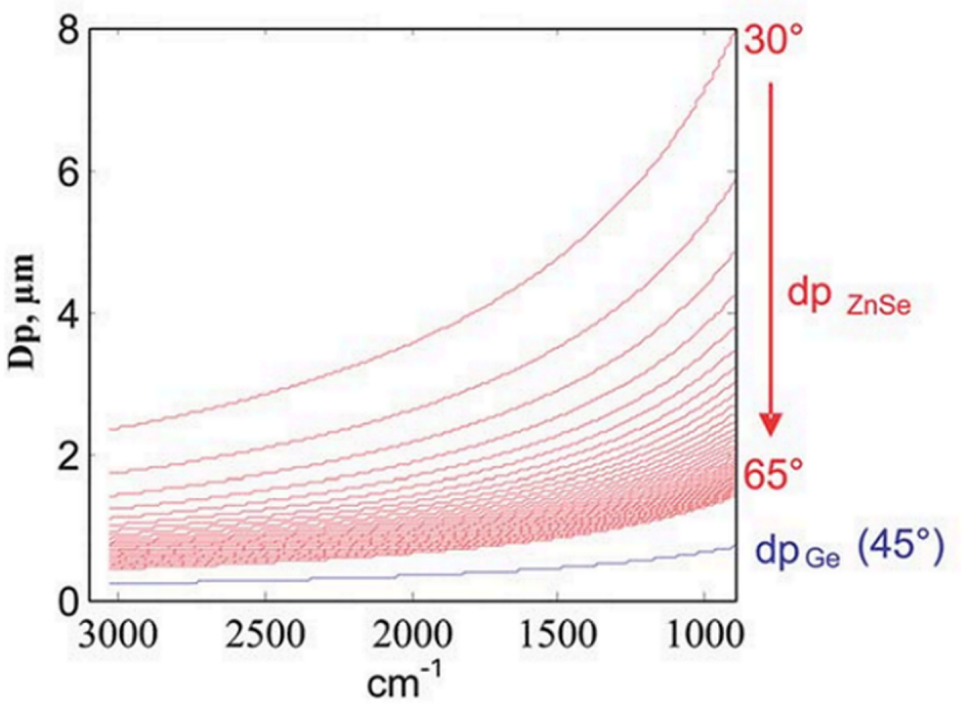


Abbildung 3.3.6: Vergleich der Eindringtiefe verschiedener Einfallswinkel und IREs [Gaigneaux and Goormaghtigh, 2013, S.4072]

Wie man anhand der Abbildung 3.3.6 sehen kann, können verschiedene Faktoren auf die Eindringtiefe der IR-Strahlung Einfluss nehmen. Diese wiederum beeinflusst den Grad der Absorption an bestimmten Wellenlängen. Beachtet man nun noch die Umstände, dass in diesem Fall organisches Material vermessen wird, das naturgemäß niemals ident hinsichtlich seines molekularen Aufbaus sein kann und die energetischen Schwankungen denen die Infrarotlichtquelle unterworfen ist, kommt man schnell zu dem Schluss dass selbst ein und dieselbe Probe nicht zweimal hintereinander das exakt gleiche Spektrum liefert. Um diesen Umstand zu umgehen und die Vergleichbarkeit der Spektren zu gewährleisten, wurden im Laufe der Zeit zahlreiche Spektrenmodulationen entwickelt.

3.4 Datenverarbeitung

Die Spektren wurden mithilfe des Programms OPUS der Firma Bruker aufgenommen. Die erhaltenen Daten wurden allesamt im OPUS-Format abgespeichert. Da die Spektren unbehandelt, wie oben beschrieben, sehr heterogen waren, wurden sie in weiterer Folge verschiedenen Manipulationen unterworfen und anschließend mit statistischen Verfahren ausgewertet.

3.4.1 Vorbereitung der Rohdaten mittels OPUS

3.4.1.1 Grundlinienkorrektur

Im theoretische Idealfall sollte die Grundlinie eine flache horizontale Gerade darstellen, die entweder bei 100% (im Falle eines Transmissionsspektrums) oder bei 0% (bei Absorptionsspektren) liegt. In der Praxis tritt dieser Fall aber nicht ein, da es nicht möglich ist Einflüsse wie Streuverluste, Temperaturschwankungen und andere äußere Einwirkungen gänzlich auszuschließen [Griffiths and Haseth, 2007, S.225]. Zudem zeigt die ATR-Spektroskopie aufgrund der ihr zugrundeliegenden physikalischen Regeln eine höhere Eindringtiefe bei niedrigen Wellenzahlen (siehe Abb. 3.3.6) und somit auch eine steigende Absorption. Das heißt die Grundlinie stellt somit keine Waagerechte mehr da, sondern eine steigende Gerade. Da die Grundlinie von Spektrum zu Spektrum variiert, ist es notwendig eine geeignete Methode zur Grundlinienkorrektur anzuwenden. Anzumerken ist, dass es hierbei nicht die eine "beste" Korrekturmethode gibt, da für jeden Fall neu geprüft werden muss[Liland et al., 2010, S.1007,1016]. Auch ist nicht garantiert, dass die optisch ansprechendste Korrektur auch als Ausganspunkt für Analysen die am besten geeignete ist. Die Spektren, die als Grundlage dieser Arbeit dienten, wurden allesamt mithilfe der "rubberband" -Methode grundlinienkorrigiert, da sich diese Methode als geeignet erwiesen hatte und zudem im OPUS-Softwarepaket enthalten war. Dadurch konnten Aufnahme und Manipulation in einem Arbeitsgang erledigt werden.

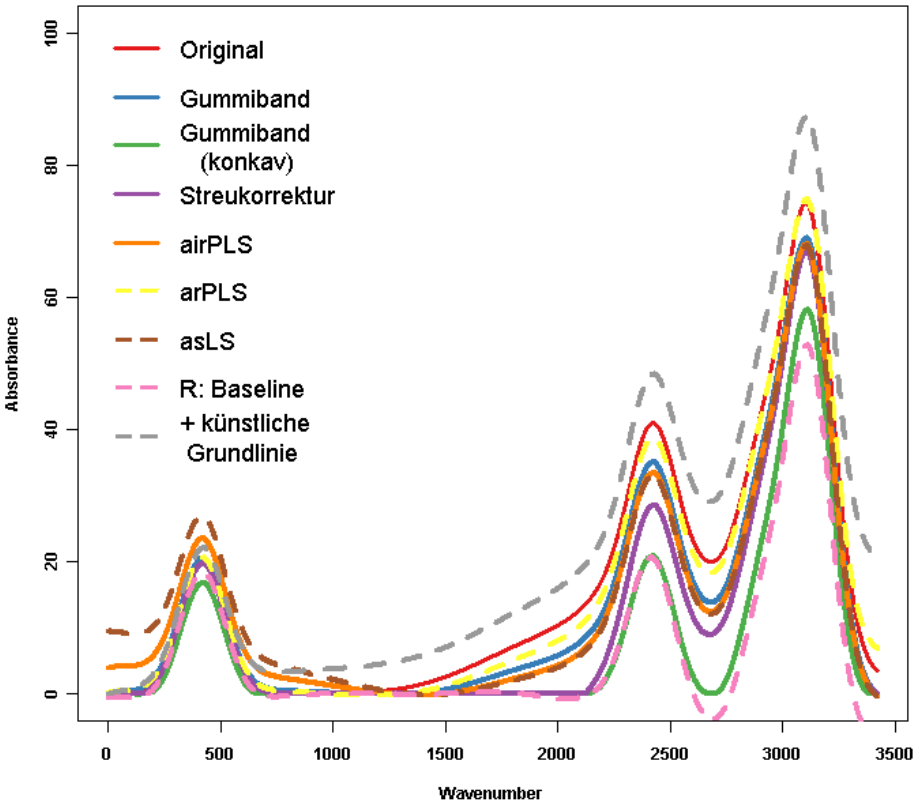
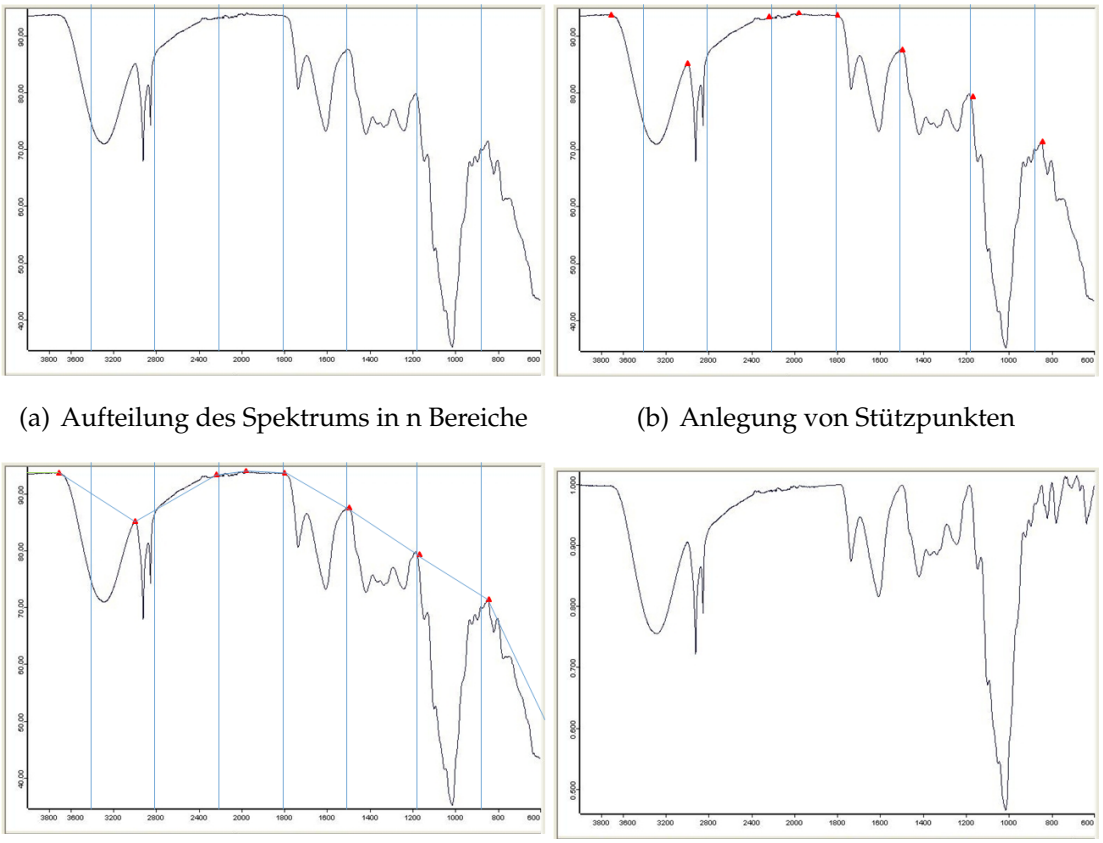


Abbildung 3.4.1: Anwendung verschiedener Arten der Grundlinienkorrektur

Neben der "rubberband"-Methode existieren viele weitere Korrekturen, die teilweise selbst modifizierbar sind. Um die Qualität der unterschiedlichen Methoden beurteilen zu können, wurde zu Testzwecken ein künstlich generiertes Spektrum mit einer definierten Grundlinie versetzt und verschiedene Korrekturmethoden an diesem angewandt. In Abbildung 3.4.1 ist das Ausgangsspektrum als rote und das mit künstlicher Grundlinie versehene Spektrum als grau gestrichelte Linie dargestellt. Die durch unterschiedliche Grundlinienkorrekturen entstandenen Spektren wurden ebenfalls aufgetragen. Je geringer die Abweichung der Datenpunkte der korrigierten Spektren zum Originalspektrum, desto besser ist die Korrektur gelungen. Auch hier zeigte sich, dass die Gummiband-Korrektur eine geeignete Methode zur Spektrenbearbeitung ist (siehe Abb. 3.4.1). Die Gummiband-Methode stellt eine automatisierte Grundlinienkorrektur dar. Der Name rührt daher, dass die Grundlinie ähnlich einem Gummiband über die Peaks des Spektrums gespannt wird. Das Spektrum wird hierbei in n gleich große Bereiche geteilt, wobei n eine Zahl zwischen 10 und 200 darstellt (Abb. 3.4.2(a)). In dieser Arbeit wurde jeweils der vorgegebene Wert n=64 übernommen. In jedem dieser Bereiche wird nun das lokale Maximum errechnet und als Basislinien-Punkt, also Stützpunkt der Grundlinie gesetzt (Abb. 3.4.2(b)). Diese wird nun generiert indem eine Linie durch alle Stützpunkte gezeichnet wird (Abb. 3.4.2(c)). Die so erhaltene Grundlinie

wird anschließend vom Ausgangsspektrum subtrahiert und man erhält das korrigierte Spektrum (Abb. 3.4.2(d))[BUKER OPUS Manual, 2003, S.102].



(a) Aufteilung des Spektrums in n Bereiche

(b) Anlegung von Stützpunkten

(c) Generierung der Grundlinie

(d) korrigiertes Spektrum

Abbildung 3.4.2: Ablauf der Gummiband-Grundlinienkorrektur

3.4.1.2 Vektornormierung

Die Grundlinienkorrektur hilft bereits verschiedene Spektren besser vergleichen zu können. Betrachtet man die Spektren aber anhand ihrer Absorption an bestimmten Wellenlängen, so wird man feststellen dass diese in den seltensten Fällen gleiche Werte aufweisen. Das wiederum bedeutet aber nicht zwingend dass sich die Spektren nicht sehr ähnlich sein können. Der Grund hierfür kann beispielsweise in den Schwankungen des Infrarotlichts oder der Eindringtiefe liegen. Um diese Fehler zu vermeiden, wird das Spektrum normiert. Das bedeutet, dass Spektren hinsichtlich ihrer Absorptionswerte angeglichen werden, aber trotzdem ihre Form, sprich Peakverhältnisse behalten. Die Vektornormierung dividiert dabei, wie in nachfolgender Formel zu sehen, jeden Absorptionswert des Spektrums durch den Betrag des gesamten Spektrums [Kessler, 2007, S.186].

$$a_k^{norm} = \frac{a_k}{\sqrt{\sum_{k=1}^{n} a_k^2}} \tag{3.4}$$

Das Spektrum richtet sich somit um den Nullpunkt herum aus.

3.4.2 Hauptkomponentenanalyse

Nachdem die Spektren mittels der OPUS-Software vergleichbar gemacht wurden, werden sie nun mithilfe statistischer Verfahren analysiert. Die folgenden Operationen wurden alle mithilfe des Programms $R^{©}$ durchgeführt. Betrachtet man jedes Spektrum als eine Datenmatrix, wird man sich schnell der Unmenge an Variablen bewusst durch die es definiert ist. Daraus folgt auch, dass das Verhältnis von Variablen zu Beobachtungen zu groß ist. Jedes Spektrum dieser Arbeit enthält alleine bereits 1762 Variablen. Ein weiteres Problem ist, dass zwei nebeneinanderliegende Absorptionswerte immer voneinander abhängig sind. Ziel der Hauptkomponentenanalyse ist es deshalb, große, voneinander abhängige Datensätze hinsichtlich ihrer Dimensionen zu reduzieren und dabei trotzdem einen möglichst großen Informationsgehalt zu konservieren. Dazu wird aus den ursprünglich korrelierten Variablen mittels Linearkombination ein neuer Satz von unabhängigen Variablen erzeugt [Everitt, 2011, S.61-63]. Stellt man sich beispielsweise einen Datensatz mit Objekten vor, die durch jeweils drei Variablen definiert sind und diese Variablen sind Werte auf der x, y und z Achse eines Koordinatensystems, so kann man diese in einem dreidimensionalen Raum abbilden.

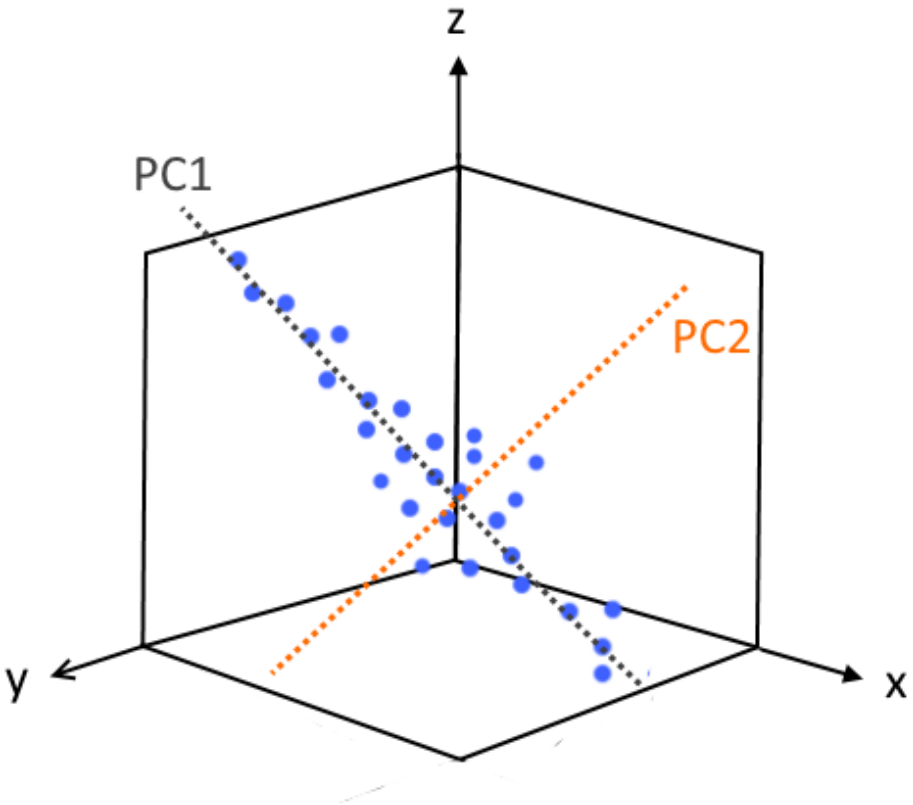


Abbildung 3.4.3: Darstellung der Hauptkomponenten

Jeder dieser Objekte ist nun durch einen Punkt dargestellt. Die 1. Hauptkomponente (PC1) wird nun als Ordinate in der Orientierung generiert, in der die größte Varianz der Punktwolke abgedeckt werden kann. Da die Hauptkomponenten untereinander unabhängig sein müssen, wird die zweite Hauptkomponente (PC2) senkrecht zur 1.Hauptkomponente gezogen. Auch hier ist die Lage so zu wählen, dass am meisten Varianz durch sie beschrieben werden kann. Die Reduzierung der Dimensionalität der Objekte wird dadurch erreicht, dass nur diejenigen Hauptkomponenten in die weitere Analyse mit einbezogen werden, die auch den größten Anteil der Gesamtvarianz abdecken. In der Praxis benötigt man dazu meist nur die ersten zwei bis drei Hauptkomponenten. Werden die Objekte nun anhand ihrer PC Werte in ein Koordinatensystem übertragen, kann man sie etwa benutzen um vorhandene oder eben fehlende Gruppenmerkmale aufzuzeigen. Ein weiterer Vorteil ist die Erhöhung des Signal zu Rausch Verhältnisses, da das Rauschen über alle Hauptkomponenten verteilt wird, die analytische wichtigen Informationen aber massiert in den ersten Hauptkomponenten auftritt [Danzer et al., 2013, S.105 f.].

3.4.3 Varianzanalyse

Obwohl die Hauptkomponentenanalyse in dieser Arbeit die wichtigste Rolle zur Spektrenauswertung einnimmt, beruht ihre Interpretation immer auf einer mehr oder weniger subjektiven Betrachtungsweise. Um die Ergebnisse der PCA und letztendlich auch dieser Arbeit anhand klarer Grenzwerte zu bestätigen, wurden die Daten einer MANOVA (multivariate analysis of variance) unterzogen. Die multivariate Varianzanalyse ist gegenüber der univariaten Varianzanalyse (ANOVA) deshalb besser geeignet, da mit ihr mehrere abhängige Variablen in die Berechnung aufgenommen und ausgewertet werden können. Ziel dieser Methode ist es herauszufinden, ob ein signifikanter Unterschied hinsichtlich von metrischen Variablen (Datenpunkte des Spektrums) auf die Zugehörigkeit zu einer Gruppe (nominale Variable) zurückzuführen ist. Im Umkehrschluss erlaubt dies eine Aussage darüber ob die vermessenen Spektren einer oder unterschiedlichen Gruppen zugeordnet werden können. Dazu werden zwei Arten von Streuung betrachtet. Zum einen die erklärte Streuung, welche die Streuung zwischen zwei Gruppen darstellt und zum anderen die nicht erklärte Streuung, die die Streuung innerhalb der Gruppe beschreibt. Über das Verhältnis der Streuungen können somit Unterscheidungen getroffen werden. In der Auswertung über das Statistikprogramm *R*© wurde als Prüfgröße Wilks Lambda verwendet. Die Trennung zweier Gruppen wird anhand des p-Werts beurteilt. Liegt dieser unter dem Signifikanzniveau von 0,05 so muss die Nullhypothese verworfen werden.

3.5 Mikro-CT

Die Mikro Computertomografie (micro-CT) ist eine Form der konventionellen Computertomografie, bei der 3D Röntgenbilder generiert werden. Der Unterschied zum CT, wie es beispielsweise in Spitälern verwendet wird besteht in ihrem kleinen Format und der stark erhöhten Auflösung. Die mikro-CT erlaubt es zerstörungsfrei und nicht invasiv räumliche Bilder im inneren von Proben darzustellen. Die System erreicht dabei Auflösungen von unter 1µm pro Pixel.

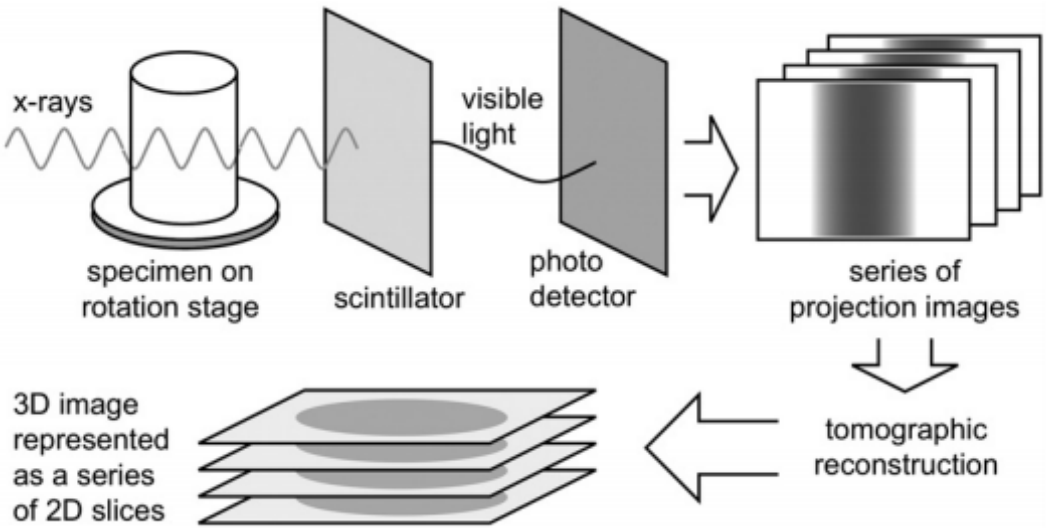
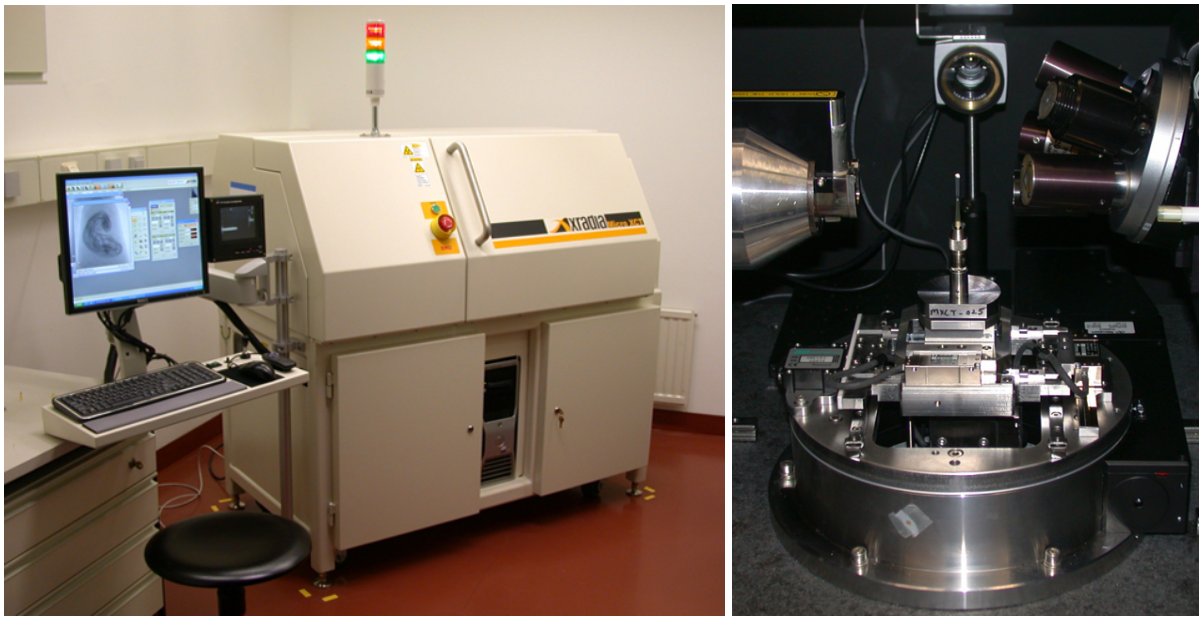


Abbildung 3.5.1: Funktionsweise der micro-CT ([Landis and Keane, 2010, S.1306]

Die zu vermessende Probe wird auf eine Halterung im Gerät aufgebracht und über eine Strahlungsquelle mit Röntgenstrahlen "beschossen". Die Röntgenstrahlen interagieren nun mit den Elektronen der Probe und werden dabei je nach Material mehr oder weniger absorbiert. Die Reststrahlung wird nun vom Photodetektor aufgefangen und ein Kontrastbild erzeugt. Biologisches Material besteht größtenteils aus sogenannten Low-Z Elementen, wie beispielsweise Kohlenstoff und Sauerstoff. Diese erzeugen nur schwache Kontraste auf dem Röntgenbild. Aus diesem Grund werden die meisten Proben zunächst mit Kontrastmitteln infiltriert, die High-Z Elemente aufweisen, wie beispielsweise die in dieser Arbeit verwendete Wolframatophosphorsäure [Mizutani and Suzuki, 2012, S.105]. Um nun ein räumliches Bild zu bekommen werden nun während Strahlungsquelle und Detektor um die Probe herum rotieren, viele weitere Röntgenbilder aufgenommen. Aus dieser Serie aus Einzelbildern wird nun computergestützt ein 3D-Bild rekonstruiert, in dem jeden Voxel ein Absorptionsgrad zugeteilt wird ([Landis and Keane, 2010, S.1306]. In dieser Arbeit wurde die micro-CT dazu benutzt, die Dicke eines Zwiebelhäutchens zu bestimmen.

Die Vorbereitung der Proben erfolgte mit Unterstützung des Departments für Botanik und Biodiversität, im speziellen durch Anke Bellaire, die in weiterer Folge auch die Vermessung der Proben durchführte. Die Proben wurden in folgender Art und Weise vorbereitet und vermessen. Die Zwiebelhäutchen wurden wie unter Material 3.2 beschrieben aus der Zwiebel herauspräpariert und in eine 1% Lsg PTA (Phosphotungstic acid) in FAA (Formalin, Alkohol, Eisessig) eingelegt. Dies diente der besseren Kontrastierung im Mikro CT. Die Proben wurden nun 7 Tage lang in dieser Lösung infiltriert, wobei das Kontrastmittel alle 2 Tage erneuert wurde. Nach dem ersten Wechsel

der Infiltrationslösung wurde statt dem Anfangs verwendetet FAA als Lösungsmittel 70%iger Ethanol verwendet. Die Lösungsmittel können ohne Verschlechterung des Endergebnisses untereinander ausgetauscht werden. Anschließend wurden die Zwiebelhäutchen in gleicher Art wie die unter dem Spektrometer gemessenen Proben getrocknet und, um die Vergleichbarkeit zu gewähren, nach erfolgter Trocknung flächendeckend mithilfe des Stempels der ATR-Einheit komprimiert. 10 Lagen der wie oben beschrieben behandelten Zwiebelhäutchen wurden nun zwischen zwei Plexiglasstreifen geklemmt und um den Pressdruck zu gewährleisten mit Klebestreifen fixiert. Das so entstandene Probenbündel wurde nun auf die Halterung des micro-CT´s (siehe Abb. 3.5.2b Mitte) aufgeklebt und vermessen.



(a) Xradia MicroCT-200 - Aussenansicht

(b) MicroCT - Messkammer mit Röntgenröhre und Detektor

Abbildung 3.5.2: Aufbau des MicroCT
[Universität Wien, Department für theoretische Biologie,]

4 Ergebnisse

4.1 ATR-IR-Spektroskopie

4.1.1 Vorgehensweise

Die Messung der, wie in Abschnitt 3.2 vorbereiteten Proben erfolgte am Bruker Tensor 27 ATR-Infrarot-Spektrometer. Hierzu wurden die einzelnen Lagen lose übereinandergestapelt und mithilfe des Stempels fixiert. Im Falle des Zwiebelhäutchens wurde darauf geachtet, dass die Kutikula-Seite dem ATR-Kristall zugewandt ist. Das Referenzpapier wurde ebenfalls lose auf den Stapel aufgebracht. Die Vermessung als loser Stapel hat sich aufgrund verschiedener Vorproben als geeignet erwiesen. Maßgeblich entscheidend dafür war die schlechte Reproduzierbarkeit und Vergleichbarkeit der Proben unter alternativen Vorbehandlungen (Trocknung der Lagen im Verbund, zwischen Papier, frei aufliegend, mit Vortrocknung und im Trockenschrank nachgetrocknet).

Die in Tabelle 4.1 aufgelisteten Varianten wurden jeweils 10 mal mit und 10 mal ohne Referenz vermessen.

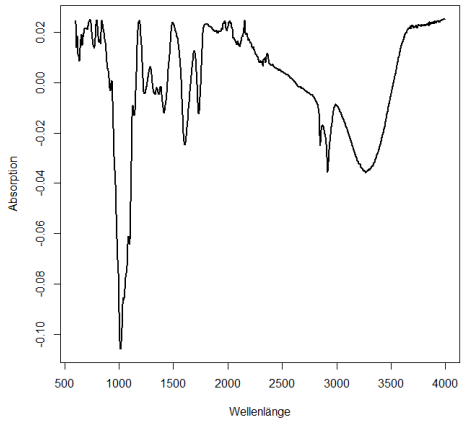
Tabelle 4.1: Übersicht der vermessenen Lagen

Material	**Lagen**
Zwiebelhäutchen	1, 2, 3, 4, 5, 10
Klarsichtfolie	1, 2, 3, 4, 5, 6, 10
Butterbrotpapier	1, 2, 3, 4

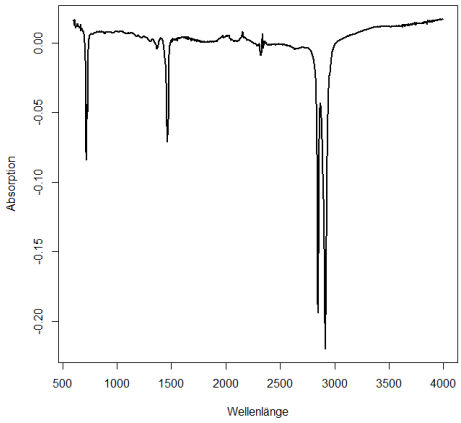
Aufgrund der teils widersprüchlichen Ergebnisse in der Hauptkomponentenanalyse wurden die Lagen Zwiebelhaut 4X, 5X und Klarsichtfolie 5X erneut jeweils 10 mal gemessen. Nach Auswertung aller obenstehenden Messungen wurden noch jeweils 10 Proben aus der Sammlung der verschiedenen Valeriana-officinalis Ploidiegrade (siehe Kapitel 2) gezogen. Diese wurden jeweils 2 mal mit und 2 mal ohne Referenzpapier

gemessen. Dabei wurde nur jeweils ein Blatt mit der adaxialen Seite zum ATR-Kristall vermessen.

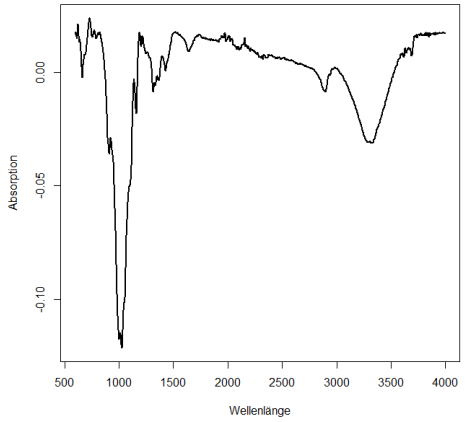
Da diese Arbeit im Großen und Ganzen auf der Beeinflussung bekannter Spektren durch Fremdspektren und folglich ihrer Veränderung fußt, ist es nötig neben der reinen Datenanalyse auch das einzelne Spektrum, der in der Arbeit verwendeten Proben darzustellen. In weiterer Folge sollen die einzelnen Spektren von Zwiebelhäutchen, Klarsichtfolie, Butterbrotpapier, Baldrianblatt und Referenzpapier gezeigt werden (Abb. 4.1.1)



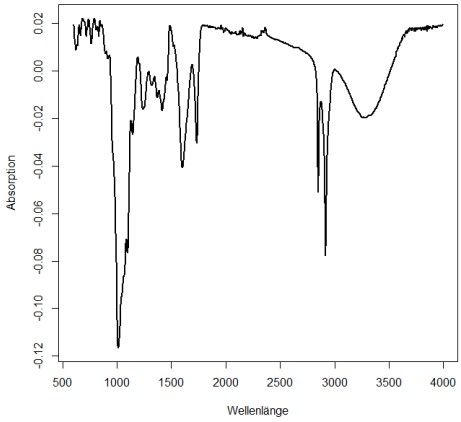
(a) Spektrum - Zwiebelhäutchen



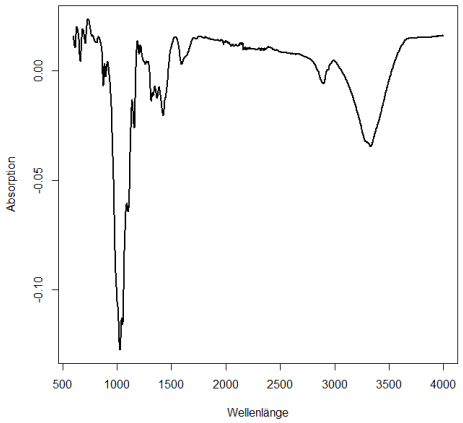
(b) Spektrum - Klarsichtfolie



(c) Spektrum - Butterbrotpapier



(d) Spektrum - Valeriana officinalis



(e) Spektrum - Referenzpapier

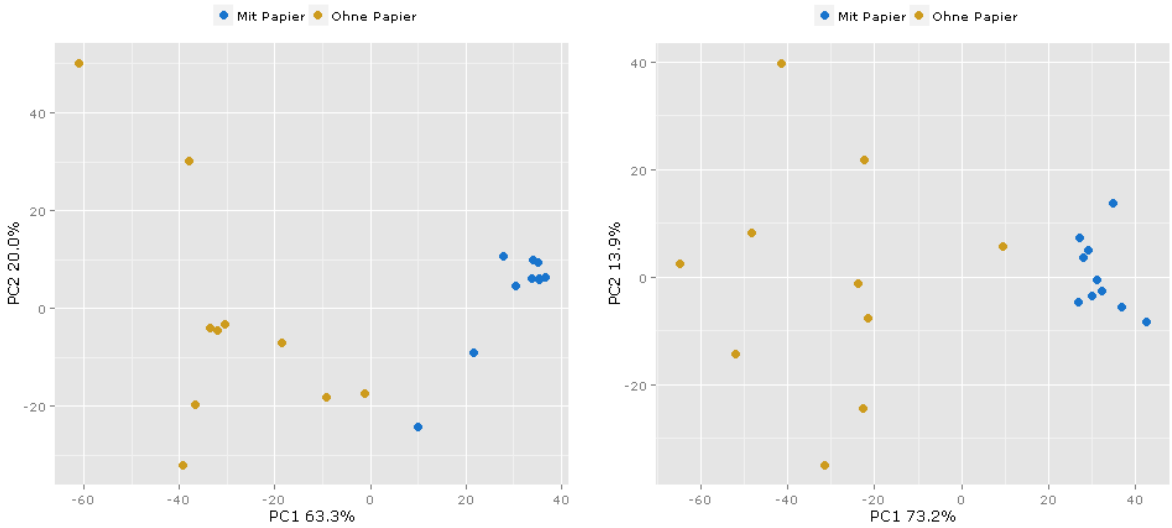
Abbildung 4.1.1: IR-Spektren des vermessenen Probenmaterials

4.1.2 Hauptkomponentenanalyse

Das Hauptaugenmerk der Auswertung lag zunächst auf der Hauptkomponentenanalyse. Die Spektren wurden mithilfe der OPUS-Software vorbereitet und in das Statistikprogramm *R*© eingelesen. Dort wurden sie einer Hauptkomponentenanalyse unterzogen und die Ergebnisse graphisch aufbereitet. Als Darstellungsformat wurde der Scatterplot gewählt. Er zeigt die Hauptkomponenten als Ordinaten eines Koordinatensystems. Jede Messung entspricht einem Punkt in diesem Koordinatensystem. Die Zahl hinter den Hauptkomponenten gibt an welcher Anteil der Gesamtvarianz durch diese Hauptkomponente dargestellt wird. Im Folgenden werden die Plots der verschiedenen Materialien einzeln ausgewertet.

Zwiebelhäutchen

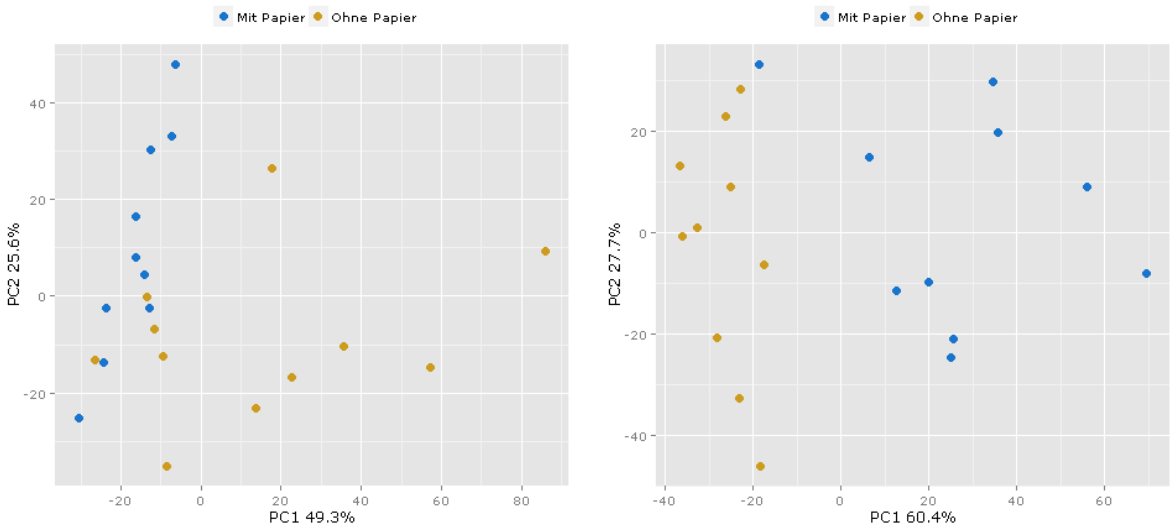
Betrachtet man die PCA-Analyse von einer Schicht Zwiebelhäutchen (Abb. 4.1.2a), kann man eine deutliche Trennung zwischen den Messungen mit (blau) und ohne Referenz (orange) erkennen. Die Messungen mit Papier scheinen zudem weniger stark zu streuen als diejenigen ohne Referenzpapier. Zudem bilden die beiden Hauptkomponenten gemeinsam 83,3% der Gesamtvarianz ab. Die Analyse bei 2 Lagen zeigt ein ähnliches Bild (Abb. 4.1.2b). Auch hier gibt es eine scharfe Trennung zwischen beiden Gruppen. Die Streuung ist ebenfalls in den Messungen ohne Papier höher.



(a) PCA - 1 Lage Zwiebelhäutchen

(b) PCA - 2 Lagen Zwiebelhäutchen

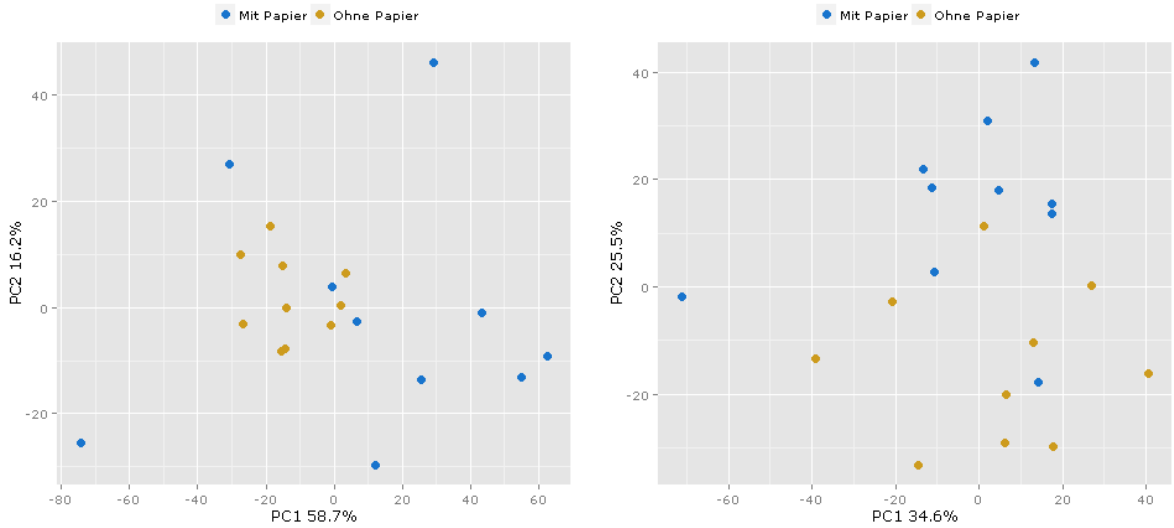
Abbildung 4.1.2: PCA - Vergleich von 1 bis 2 Lagen des Zwiebelhäutchens mit und ohne Referenz



(a) PCA - 3 Lagen Zwiebelhäutchen (b) PCA - 4 Lagen Zwiebelhäutchen

Abbildung 4.1.3: PCA - Vergleich von 3 bis 4 Lagen des Zwiebelhäutchens mit und ohne Referenz

Abbildung 4.1.3a zeigt den Vergleich bei 3 Lagen. Hier scheint die Trennung weniger klar zu sein. Die Gruppen überschneiden sich leicht an ihren Rändern. Außerdem ist die Streuung nun in beiden Gruppen erhöht. Auch die beschriebene Gesamtvarianz liegt hier etwas niedriger als in den vorhergehenden Plots. Die Streuung der beiden Gruppen setzt sich auch bei 4 Lagen fort (Abb. 4.1.3b). Allerdings scheint die Trennung der beiden Gruppen wieder etwas besser.

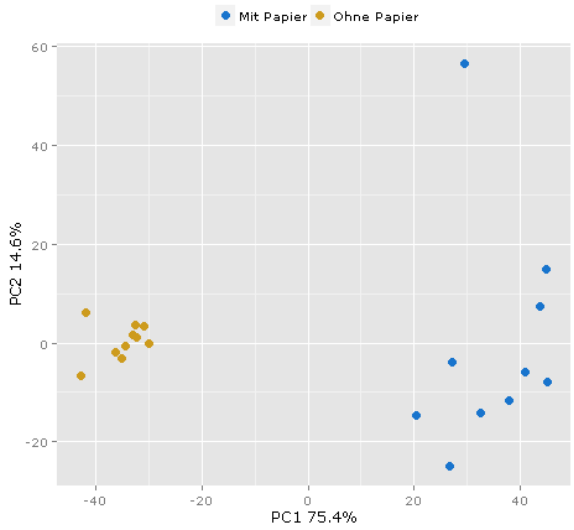


(a) PCA - 5 Lagen Zwiebelhäutchen (b) PCA - 10 Lagen Zwiebelhäutchen

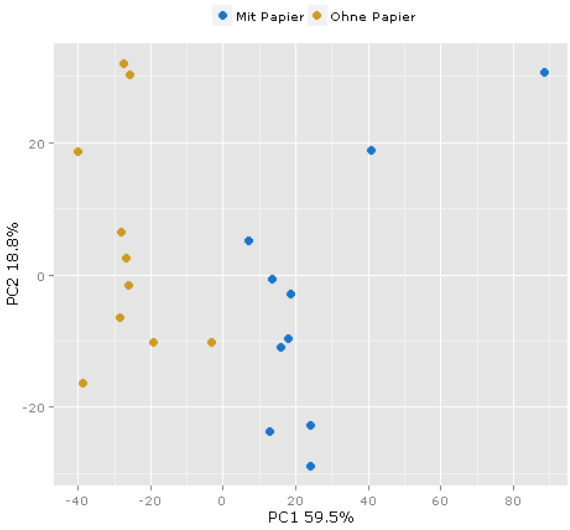
Abbildung 4.1.4: PCA - 5 und 10 Lagen Zwiebelhäutchen mit und ohne Referenz

In weiterer Folge wurden 5 Lagen vermessen und analysiert. Hier zeigte sich ein interessantes Bild (Abb. 4.1.4a). Die Streuung innerhalb der Gruppe die ohne Referenz vermessen wurde nahm ab, während die Streuung der Referenzgruppe merklich zunahm. Aber auch hier sind deutlich Gruppen zu erkennen. Da bereits 5 Lagen vermessen wurden und keine Annäherung der Gruppen zu beobachten war, wurde beschlossen die nächste Messung mit 10 Lagen des Zwiebelhäutchens durchzuführen. Doch selbst bei 10 Lagen scheinen die einzelnen Gruppen durch ihre Hauptkomponenten trennbar (Abb. 4.1.4b). Zu beobachten ist auch eine relativ geringe Beschreibung der Gesamtvarianz durch die beiden Hauptkomponenten (60,1%).

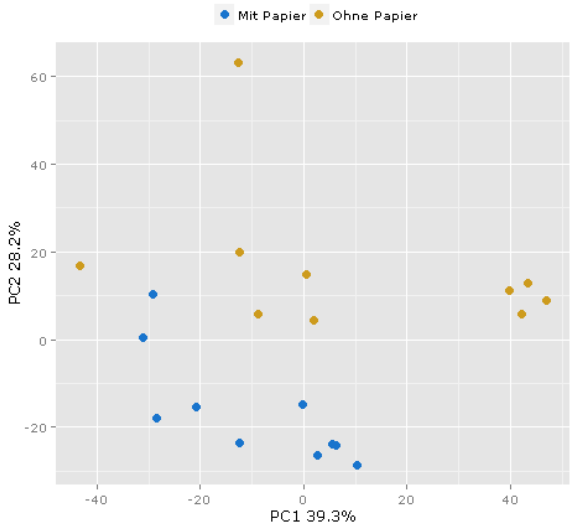
Klarsichtfolie



(a) PCA -1 Lage Klarsichtfolie



(b) PCA - 2 Lagen Klarsichtfolie

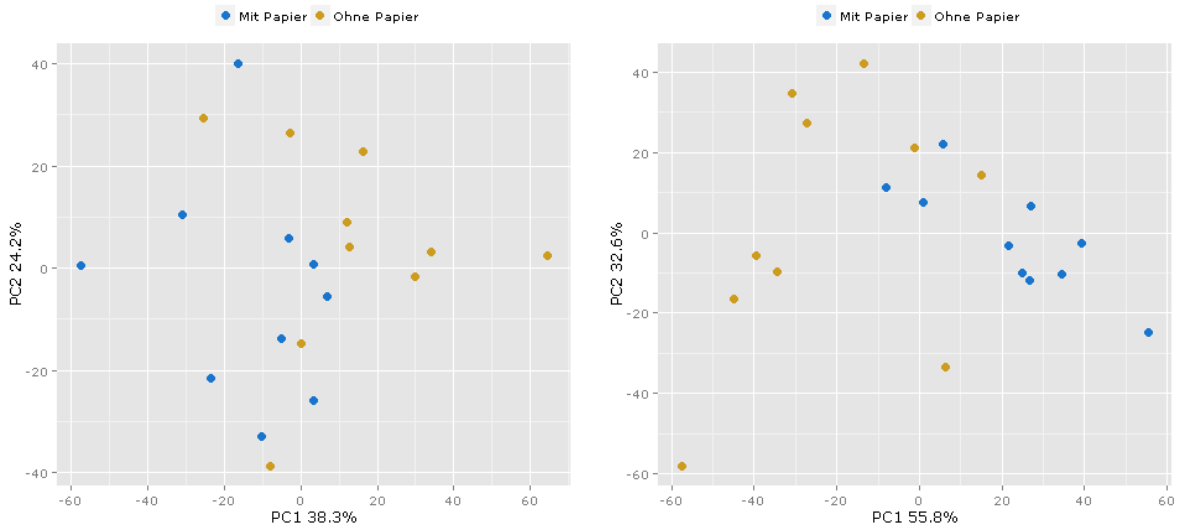


(c) PCA - 3 Lagen Klarsichtfolie

Abbildung 4.1.5: PCA - Vergleich von 1 bis 3 Lagen Klarsichtfolie mit und ohne Referenz

Neben dem Zwiebelhäutchen als Hauptaugenmerk des Experiments, sollten hier auch Stapel von Klarsichtfolie vermessen werden. Ihr Vorteil liegt in der Dünne, der Homogenität und der einfachen Handhabung. Die Erwartung war, dass auch hier der Messbereich des Infrarotlichts relativ zur Schichtdicke beobachtet werden kann. Die

PVC-Folie zeigt auch anfangs ein ähnliches Bild wie es bei den Zwiebelhäutchen zu beobachten war. Lage 1 (Abb. 4.1.5a) zeigt zwei deutlich getrennte Gruppen, die links und rechts der 1. Hauptkomponente aufgespalten sind. Ebenso scheint die Trennung auch bei Lage 2 (Abb. 4.1.5b) entlang der 1. Hauptkomponente zu erfolgen, während beide Gruppen in Richtung der 2. Hauptkomponente stärker streuen. Die Trennung der Gruppen bei 3 Lagen (Abb. 4.1.5c) ist zwar weniger stark ausgeprägt als es noch bei den ersten beiden Lagen der Fall war, aber auch hier ist eine Unterscheidung möglich. Interessant ist hierbei, dass die Unterscheidung zum Großteil über die 2. Hauptkomponente erfolgt.

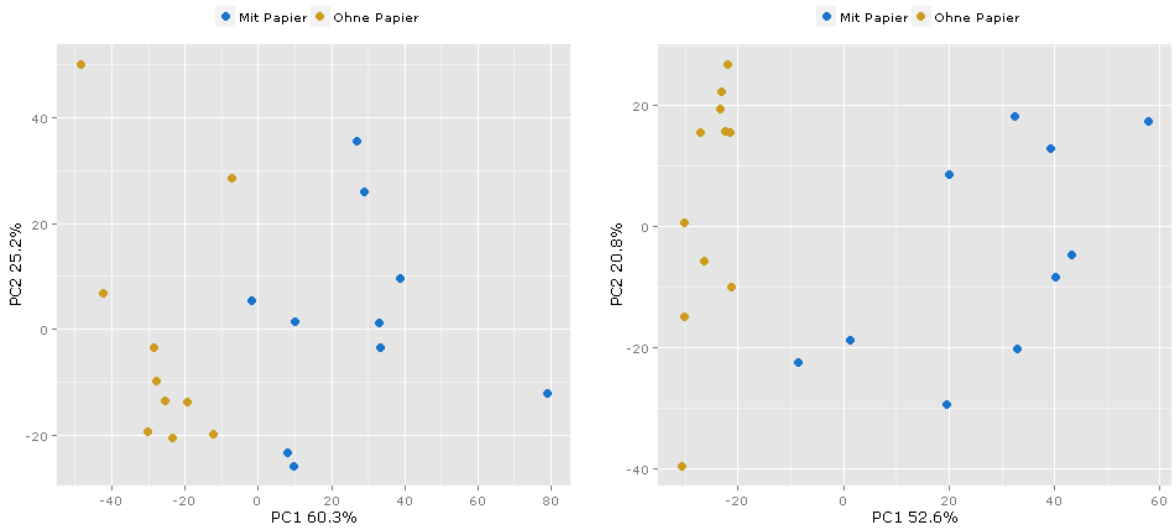


(a) PCA - 4 Lagen Klarsichtfolie

(b) PCA - 5 Lagen Klarsichtfolie

Abbildung 4.1.6: PCA - Vergleich von 4 und 5 Lagen Klarsichtfolie mit und ohne Referenz

Bei Betrachtung der 4. Lage (Abb. 4.1.6a) fällt auf, dass die Trennung der beiden Gruppen schwächer geworden ist. Der Großteil der Messpunkte der jeweiligen Gruppen befindet sich zwar in ähnlicher Lage, allerdings gibt es auf beiden Gruppen Ausreißer die die Unterscheidungsqualität mindern. Zudem ist mit 62,5% relativ wenig Gesamtvarianz durch beide Hauptkomponenten abgedeckt. Bei Lage 5 dagegen ist der durch die Hauptkomponenten beschriebene Anteil der Gesamtvarianz mit 88,4% wieder stark gestiegen und auch die Trennung entlang der PC1-Achse ist erhöht (Abb. 4.1.6b).



(a) PCA - 6 Lagen Klarsichtfolie

(b) PCA - 10 Lagen Klarsichtfolie

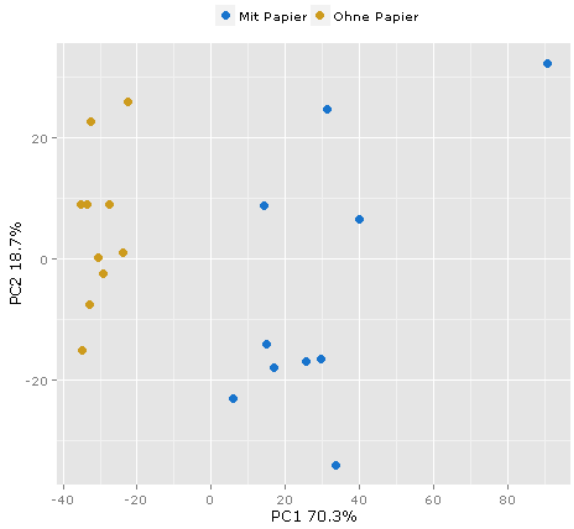
Abbildung 4.1.7: PCA - Vergleich von 6 und 10 Lagen Klarsichtfolie mit und ohne Referenz

In weiterer Folge zeigte sich sowohl bei 6 Lagen als auch bei 10 Lagen Klarsichtfolie (Abb. 4.1.7a, b) eine deutliche Verbesserung der Gruppenunterscheidbarkeit. Mit 85,5 und 73,4% liegt die beschriebene Gesamtvarianz ebenfalls in einem hohen Bereich.

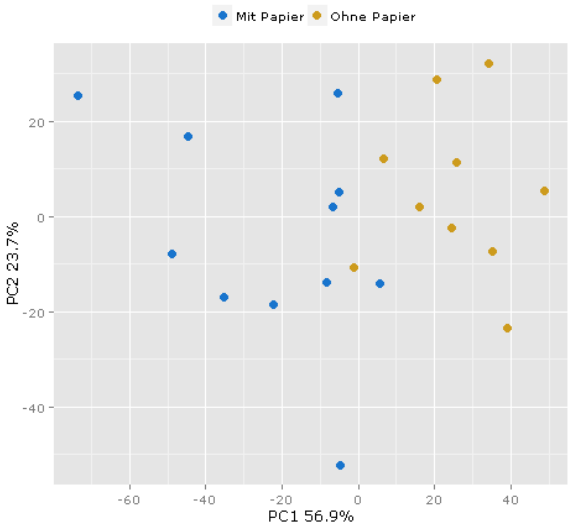
Butterbrotpapier

Neben dem Zwiebelhäutchen und der Klarsichtfolie wurden auch Lagen von Butterbrotpapier vermessen. Da das Papier eine höhere Dicke aufwies konnte so mit weniger Schichten ein größerer Messbereich simuliert und eventuelle Interferenzen zwischen den Schichten minimiert werden. Die erste Lage zeigte eine gute Trennbarkeit beider Gruppen, wobei die Streuung der Gruppe mit Referenz etwas höher war (Abb. 4.1.8a). Die Trennung erfolgte deutlich über ihre Lage entlang der 1. Hauptkomponente. Vergleicht man diese mit den Messwerten über 2 Lagen (Abb. 4.1.8b), kann man bei zwei Lagen eine Annäherung der Gruppen erkennen, wobei diese immer noch klar getrennt werden können. Sowohl die PCA über 1 Lage, als auch die über 2 Lagen, zeigen eine gute Abdeckung der Gesamtvarianz über ihre Hauptkomponenten von über 80%. Die Trennung der Messpunkte bei 3 Lagen, scheint optisch weniger gut gelungen (Abb. 4.1.8c). Während die Gruppe ohne Referenz relativ kompakt erscheint, streuen Messpunkte der Referenzgruppe um diese herum. Die Trennung beider Gruppen erfolgt

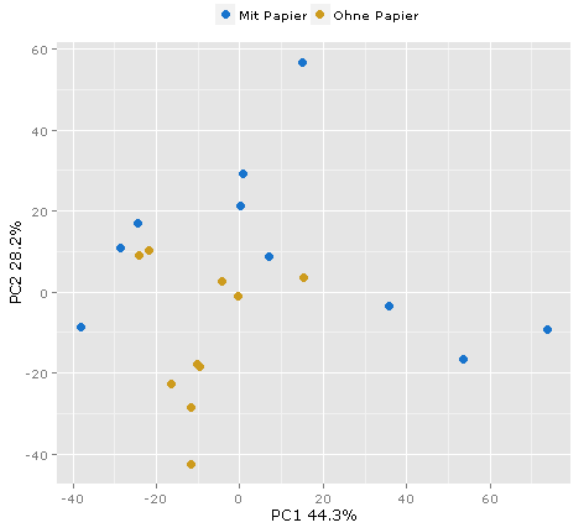
hauptsächlich entlang der PC2-Achse. Mit 72,5 % abgedeckter Gesamtvarianz liegt der Wert auch unter dem der ersten beiden PCAs. Die vierte Lage zeigt ein ähnliches Bild (Abb. 4.1.8d). Die Gruppe ohne Papier ist bis auf einen Ausreißer sehr kompakt, überschneidet sich allerdings mit der Referenzgruppe. Die Trennlinie ist hier unscharf und auch die Gesamtvarianz liegt mit 73,1% unter der der ersten beiden Analysen.



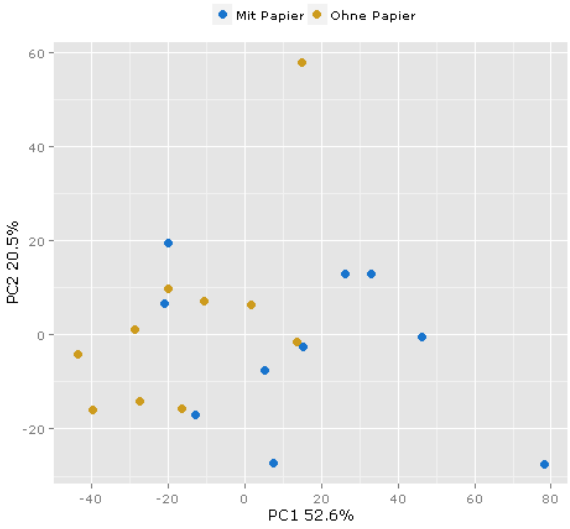
(a) PCA - 1 Lage Butterbrotpapier



(b) PCA - 2 Lagen Butterbrotpapier



(c) PCA - 3 Lagen Butterbrotpapier



(d) PCA - 4 Lagen Butterbrotpapier

Abbildung 4.1.8: PCA - Vergleich von 1 bis 4 Lagen Butterbrotpapier mit und ohne Referenz

Baldrianblatt

Die vorhergehenden Messungen lieferten erste Erkenntnisse über die Messtiefe der ATR-Spektroskopie. Um die daraus gezogenen Schlüsse (siehe Abschnitt 5) zu bestätigen, wurden nun ganze Blätter von Valeriana officinalis mit Referenz und ohne Referenzpapier vermessen. Es sollte untersucht werden, ob das Infrarotlicht sogar über ein ganzes Baldrianblatt hinaus Signale erfassen kann.

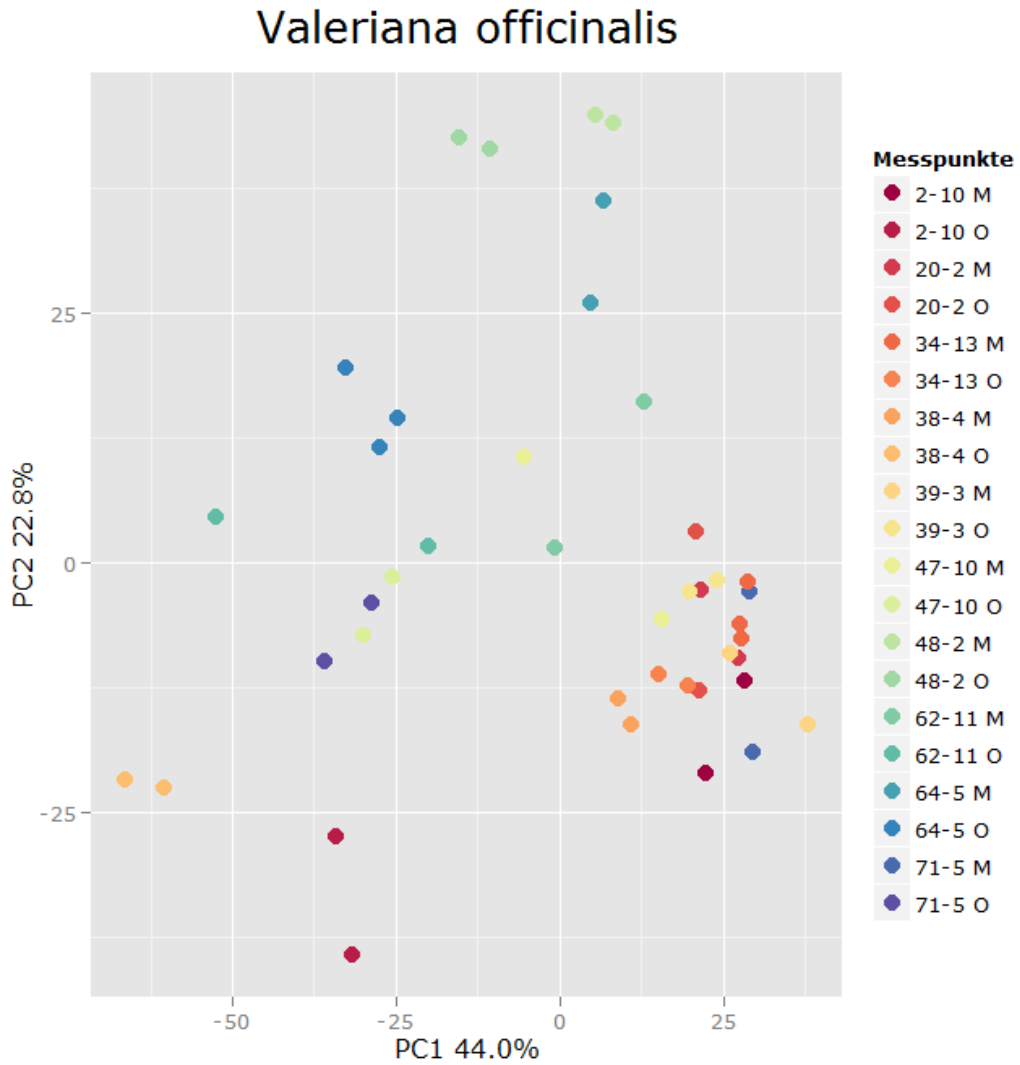


Abbildung 4.1.9: PCA - Vergleich von verschiedenen Blättern der Art Valeriana officinalis mit und ohne Referenzpapier (Proben 1- 10)

Bei der Analyse der Baldrianproben mit dem Referenzpapier und der anschließenden graphischen Aufbereitung der Ergebnisse zeigte sich, dass die Darstellung aller Pro-

ben in einem Plot zu Missverständnissen und Fehlinterpretation derselben aufgrund mangelnder visueller Unterscheidbarkeit der Datenpunkte führen konnte.

Eine qualitative Farbpalette ist, wie in Abbildung 4.1.9 gezeigt, mit 20 Abstufungen nicht mehr zu bewerkstelligen. Deshalb wurde der Datensatz zur besseren Unterscheidung in zwei Gruppen mit jeweils 5 Proben aufgeteilt, wobei jede Probe zweimal mit (M) und zweimal ohne Referenz (O) vermessen wurde.

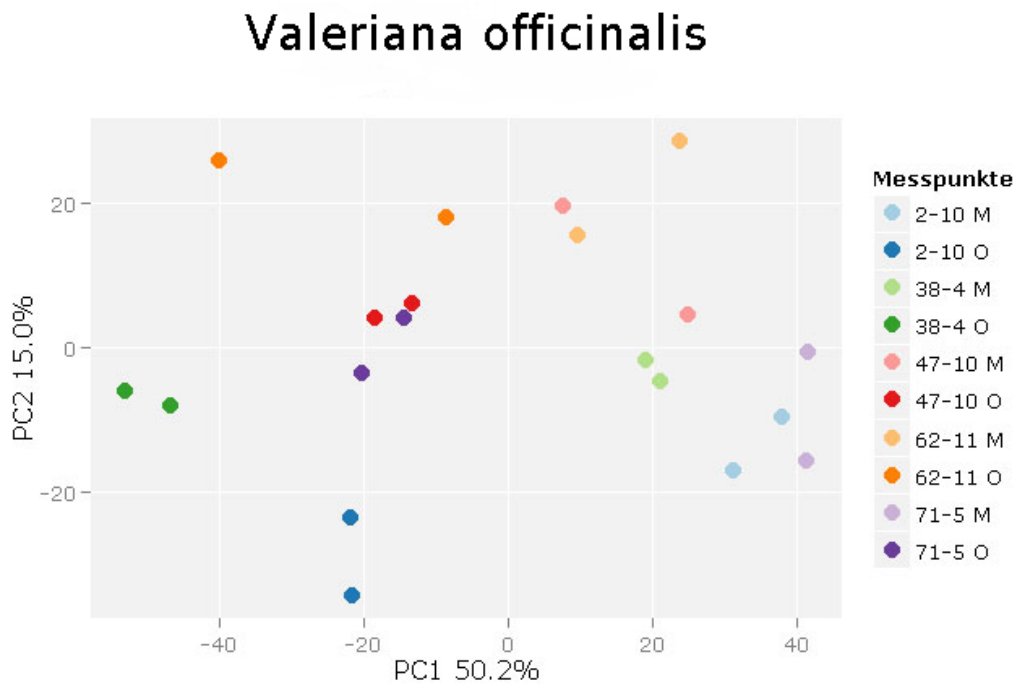


Abbildung 4.1.10: PCA - Vergleich von verschiedenen Blättern der Art Valeriana officinalis mit und ohne Referenzpapier (Proben 1-5)

Abbildung 4.1.10 zeigt die Hauptkomponentenanalyse der Proben 1-5. Die Legende beschreibt die Probenbezeichnung sowie Messart (M = mit Referenzpapier, O = ohne Referenzpapier). Um die Zuordnung einfacher zu gestalten sind die verschiedenen Messarten derselben Probe im gleichen Farbton, aber mit unterschiedlicher Sättigung

dargestellt. Die vermessenen Gruppen (mit Referenz/ohne Referenz) sind im Plot gut getrennt dargestellt, wobei die Streuung innerhalb einer Gruppe gering ist. Der durch die Hauptkomponenten beschriebene Anteil der Gesamtvarianz ist mit 65,2 % allerdings etwas gering. Bei den Proben 5-10 (Abb. 4.1.11) zeigt sich ein ähnliches Bild, wobei die Trennung vor allem bei Probe 20-2, sowie 39-3 schwächer ausgeprägt ist. Alles in allem ist aber der Unterschied zwischen den Gruppen deutlicher als die Streuung innerhalb einer Gruppe. Der Anteil der Gesamtvarianz ist mit 74,7% höher als bei den ersten 5 untersuchten Proben.

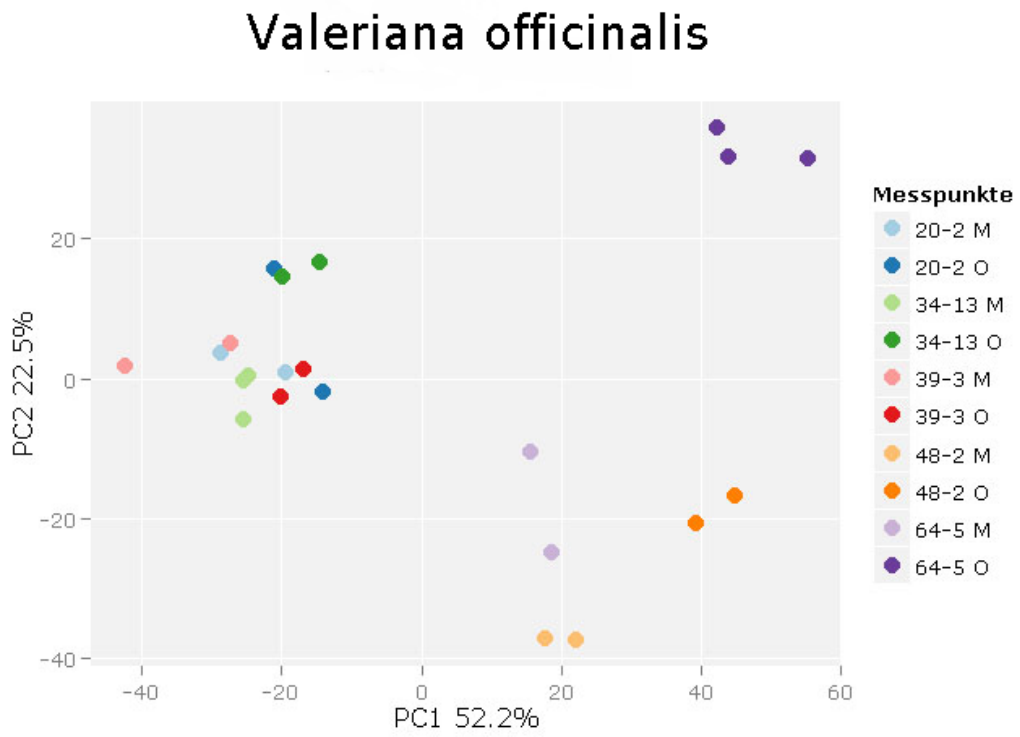


Abbildung 4.1.11: PCA - Vergleich von verschiedenen Blättern der Art Valeriana officinalis mit und ohne Referenzpapier (Proben 6-10)

4.1.3 Varianzanalyse

Da die Beurteilung eines Plots auch immer auf subjektiver Wahrnehmung beruht, wurde um die Trennbarkeit der Spektren besser bewerten zu können, im Anschluss an die PCA eine Varianzanalyse durchgeführt. Auch diese erfolgte über das Statistikprogramm $R^{©}$. Da bei der Varianzanalyse überprüft wird, ob sich der Mittelwert mehrerer Gruppe unterscheidet lautet die Nullhypothese: Alle Gruppen sind gleich. Ist der errechnete p-Wert nun unter dem Signifikanzniveau von 5% muss die Nullhypothese verworfen werden und die Gruppen sind somit unterschiedlich. Folgende Ergebnisse wurden durch die MANOVA errechnet:

Tabelle 4.2: Manova Ergebnisse (angegeben als p-Value, Signifikanzniveau: 0,05)

Lagen	**Klarsichtfolie**	**Zwiebelhäutchen**	**Butterbrotpapier**
1	2.271E-12	2.504E-08	9.442E-10
2	4.25E-13	1.595E-06	0.0003326
3	1.361E-08	2.798E-07	0.08684
4	3.084E-06	8.788E-05	0.04366
5	0.003509	0.2128	
6	1.901E-07		
10	4.15E-10	7.657E-05	

Beim Blick auf Tabelle 4.2 kann man sehen, dass die Lagen 1 - 10 der Klarsichtfolie alle einen p-Wert unter dem Signifikanzniveau von 0.05 aufweisen. Die Nullhypothese muss somit über alle Lagen hinaus verworfen werden. Betrachtet man die Ergebnisse für die Zwiebelhäutchen fällt einem sofort der hohe p-Wert bei 5 Lagen ins Auge. Er liegt mit 0.2128 deutlich über dem Signifikanzniveau und es muss deshalb die Nullhypothese verworfen werden. Gleiches gilt für Lage 3 des Butterbrotpapiers. Auch hier findet sich ein p-Wert, der mit 0.08684 über dem Signifikanzniveau liegt. Zusammenfassend kann man sagen, dass sowohl bei den Zwiebelhäutchen als auch beim Butterbrotpapier in jeweils einer Lage die Nullhypothese verworfen werden muss, wobei aber die nächst höhere vermessene Lage wieder innerhalb des Signifikanzniveaus liegt.

4.2 Micro-CT

Die vorhergehenden Messungen und ihre Resultate lieferten Hinweise für den Messbereich der ATR-IR-Spektroskopie. Mithilfe der statistischen Auswertung von Klarsichtfolie und Butterbrotpapier sowie den zugehörigen Dicken, die über den Hersteller angefragt wurden, kann nun die Messtiefe errechnet werden. Im Fall des Zwiebelhäutchens gestaltet sich die Sache allerdings etwas schwieriger, da keine verbindlichen Daten über ihre Dicke vorliegen. Aus diesem Grund wurde die Dicke mithilfe der micro-CT bestimmt. Die Proben wurden dazu wie im Methodenteil 3.5 beschrieben vermessen. Die eigentliche Errechnung der Dicke am Computer folgte auf zwei verschiedene Arten. Bei der direkten Messung werden die einzelnen Zellen der Zwiebelhäutchen direkt markiert und ihre Ausmaße anhand der Skala abgelesen. Als Referenz dienen hierbei Voxel die eine definierte Länge besitzen. Für die Bestimmung wurden Aufnahmen von Quer-, Längs-, und Flächenschnitt gemacht. Für die Dicke eines Zwiebelhäutchens konnten je nach Messpunkt Werte zwischen 5,5 µm (Abb. 4.2.2, S.44) , 16 µm (Abb. 4.2.1, S.43) und 16,5 µm (Abb. 4.2.3, S.44) gefunden werden.

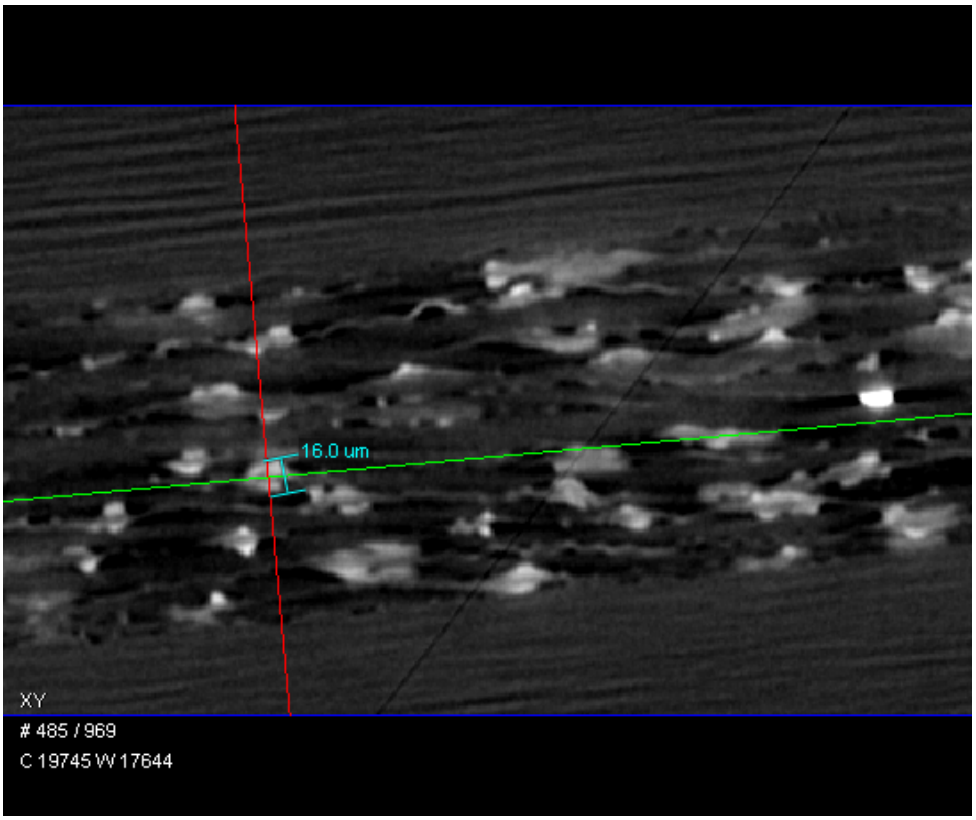


Abbildung 4.2.1: direkte Bestimmung der Dicke der Zwiebelhaut über microCT Querschnitt

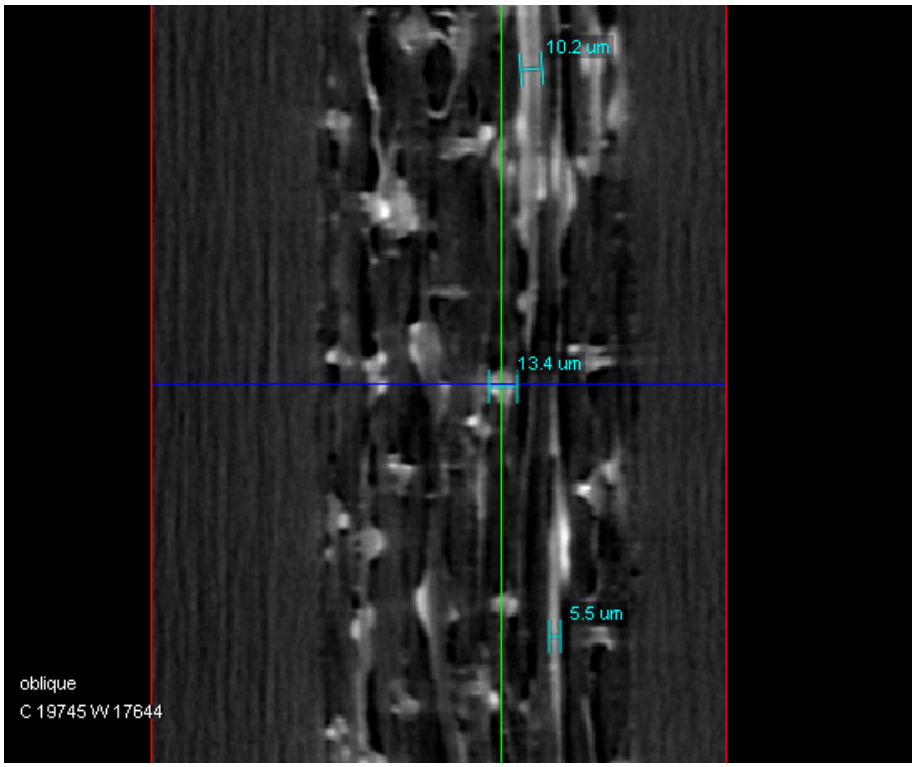


Abbildung 4.2.2: direkte Bestimmung der Dicke der Zwiebelhaut über microCT Längsschnitt

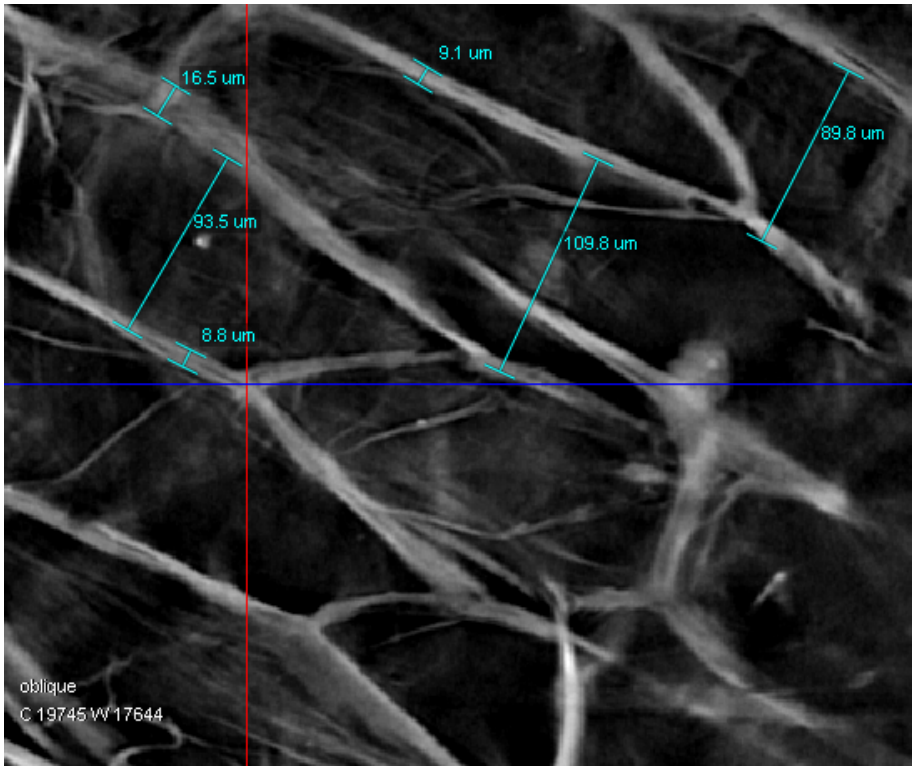
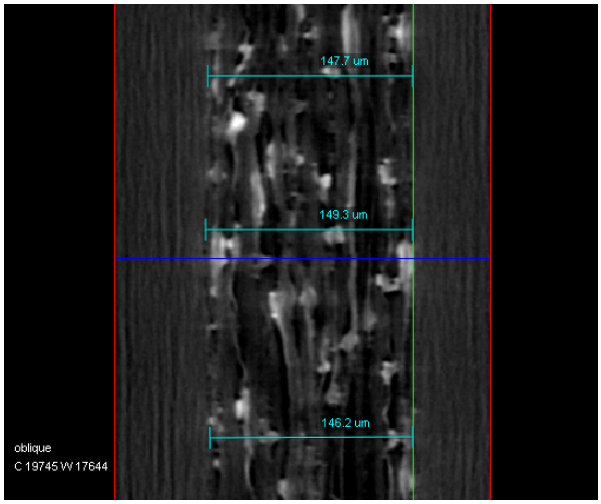
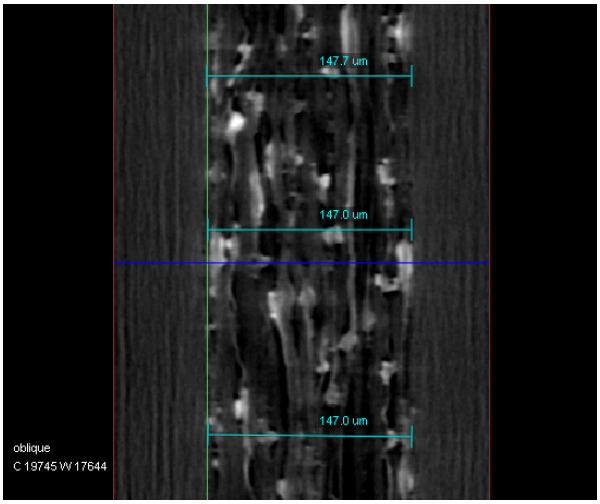


Abbildung 4.2.3: direkte Bestimmung der Dicke der Zwiebelhaut über microCT Flächenschnitt

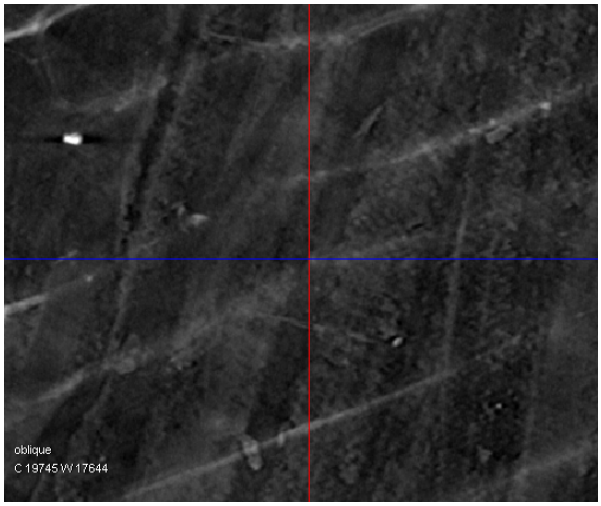
Wie in den Abbildungen 4.2.1 bis 4.2.3 zu sehen ist, ist die direkte Bestimmung den Grenzen der Auflösung unterworfen. Deshalb wurde die Dicke der Zwiebelhäutchen in einem zweiten Arbeitsschritt nochmals indirekt bestimmt. Dazu wurden die gestapelten Zwiebelhäutchen anhand des Abstands der Plexiglasscheiben, die sie zusammenpressen, vermessen. Am Computer wurden Messbalken an den zwei Grenzflächen von Zwiebelhäutchen und Plexiglas angesetzt. Die genaue Ermittlung der Grenzfläche erfolgte über einen Flächenschnitt der Probe.



(a) Setzen des ersten Messbalkens



(b) Setzen des zweiten Messbalkens



(c) Flächenschnitt zur Bestimmung der Grenzfläche

Abbildung 4.2.4: Indirekte Bestimmung der Dicke eines Zwiebelhäutchens im micro-CT

Der gefundene Abstand der beiden Plexiglasscheiben und folglich die Dicke von 10 Lagen Zwiebelhäutchen betrug 147 µm im Mittel. Durch Division des Werts durch 10

erhält man einen Durchschnittswert von 14,7 µm pro Zwiebelhäutchen. Dieser Wert wird in der weiteren Diskussion der Ergebnisse als Referenzwert verwendet, da er anders als die in der direkten Bestimmung ermittelten Werte einem statistischen Mittelwert darstellt.

5 Diskussion und Ausblick

Ausgangspunkt dieser Arbeit war die Feststellung, dass in der Literatur beschriebene Phänomene, wie die Eindringtiefe des Infrarotlichts, nicht ausreichend für die Erklärung der in der Praxis gemachten Beobachtungen (siehe 2) sind. So sagt die von Harrick [Harrick, 1967] postulierte Gleichung über die Eindringtiefe (siehe Gleichung 3.3) für das Setup unserer Versuchsreihe eine Eindringtiefe von ca 0.3 bis 1.7µm voraus. Wie im Versuchsaufbau (Abschnitt 3.1) bereits erläutert, soll die tatsächliche Messtiefe deshalb auf experimentellem Wege erfasst werden. Die verwendeten Materialien, also Zwiebelhäutchen, Klarsichtfolie und Butterbrotpapier wurden alle bis zu einer Stapeldicke von über 100 µm vermessen. Genauer gesagt wurden Stapel von 147 µm (Zwiebelhäutchen), 110 µm (Klarsichtfolie), sowie 140 µm (Butterbrotpapier) vermessen. Betrachtet man die Ergebnisse der Hauptkomponentenanalyse findet man rein optisch gesehen, die beste Trennung bei den ersten beiden Lagen des Zwiebelhäutchens (Abb. 4.1.2), den ersten drei Lagen der Klarsichtfolie (Abb. 4.1.5), sowie der ersten Lage des Butterbrotpapiers (Abb. 4.1.8a). Multipliziert man diese Lagen mit den Werten, die sich für die Dicke der einzelnen Materialien gefunden haben kommt man auf 29,4 µm für die Zwiebelhäutchen, 33 µm für die Klarsichtfolie, sowie 35 µm für das Butterbrotpapier. Auch die für diese Lagen erhaltenen p-Werte bestätigen den Eindruck der Hauptkomponentenanalyse. Diese liegen für die genannten Lagen zwischen 1.595E-6 und 4.25E-13 und sind damit signifikant zu unterscheiden (siehe Tabelle 4.2). Führt man sich noch einmal in Erinnerung, dass die theoretische Eindringtiefe des Infrarotlichts bei circa 2 µm liegt, zeigt bereits dieses Zwischenergebnis dass die tatsächliche Messtiefe um ein Vielfaches höher liegen muss. Erhöht man nun jede Stapel um eine weitere Lage und sieht sich die Ergebnisse der Hauptkomponentenanalyse an (Abb. 4.1.3a, 4.1.6a, 4.1.8b), zeigt sich dass die Trennung scheinbar schlechter gelungen ist als in den Lagen davor. Abgesehen davon, dass trotz schlechterer Trennung die Interpretation der Plots eindeutig eher in Richtung Unterscheidbarkeit denn in Richtung Gleichheit gehen, möchte ich mögliche Gründe für diese Entwicklung angeben. Zum einen fällt beispielsweise auf, dass die Streuung innerhalb der Gruppen sehr hoch ist. Besonders im Fall der Zwiebelhäutchen liegen die Messpunkte der Gruppe mit Referenzpapier viel weiter auseinander als noch in den Lagen 1 und 2 zu sehen war. Auch

bei der 4. Lage der Klarsichtfolie und der 2.Lage des Butterbrotpapiers lässt sich dies beobachten. Eine weitere Erklärung wäre die Abnahme der durch die Hauptkomponenten beschrieben Varianz. So nimmt diese in den beschriebenen Plots zwischen 5 und 10 Prozent ab. Hier könnte es sich eventuell als nützlich erweisen, weitere Hauptkomponenten in die Analyse mit aufzunehmen. Allerdings zeigt auch hier die Anwendung der MANOVA (Tabelle 4.2), dass eine Unterscheidbarkeit der Gruppen anzunehmen ist (p Werte: 4. Lage Klarsichtfolie = 3.084E-06, 3.Lage Zwiebelhäutchen = 2.798E-07, 2.Lage Butterbrotpapier = 3.326E-04). Im Falle des Zwiebelhäutchens wird dieses Bild in der 4.Lage bestätigt. Die Unterscheidung beider Gruppen kann entlang der 1. Hauptkomponente erfolgen und ist deutlich besser zu sehen als noch bei 3 Lagen. Zudem ist die beschriebene Gesamtvarianz mit 88,1 % deutlich angestiegen. In der 5. Lage der Klarsichtfolie ist die Trennung ähnlich wie in Lage 4 gelungen. Wieder ist eine verhältnismäßig hohe Streuung in der Gruppe ohne Referenzpapier zu beobachten. Mit 88,6% wird durch die Hauptkomponenten allerdings eine hohe Abdeckung der Gesamtvarianz erzielt. Mit einem p-Wert von 0.0035 ist diese Lage im Verhältnis zu den Lagen 1-4 qualitativ am schlechtesten getrennt. Dieser Trend setzt sich auf Seiten der Klarsichtfolie in den Lagen 6 und 10 allerdings nicht weiter fort (Abb.4.1.7). Trotz der teils großen Streuung innerhalb der Gruppen sind diese untereinander optisch gut trennbar, was auch die Varianzanalyse bestätigt (tab.4.2). Weniger gelungen ist die Trennung der Gruppen in der 3. Lage des Butterbrotpapiers (Abb. 4.1.8c). Hierbei könnte wieder die Streuung der Referenzgruppe eine Rolle spielen, da die Gruppe ohne Papier relativ kompakt erscheint. Auch die Varianz ist mit 72,5 % weniger gut beschrieben. Noch deutlicher wird die unzureichende Trennung bei Betrachtung der Manova-Resultate (tab.4.2). Mit einem p-Wert von 0.08684 liegt die dritte Lage des Butterbrotpapiers damit über dem gewählten Signifikanzniveau von 0,05. Dasselbe Bild zeigt sich auch bei der 5. Lage des Zwiebelhäutchens (Abb.4.1.4a . Es ist ebenfalls eine kompakte Gruppe ohne Papier zu sehen, wobei die Referenzgruppe um diese herum stark streut. Mit einem p-Wert von 0.2128 liegt die 5. Lage des Zwiebelhäutchens sehr deutlich über dem Signifikanzniveau. Mit 74,9 % ist die beschriebene Gesamtvarianz eigentlich recht gut. Da sowohl für die folgende Lage des Zwiebelhäutchens als auch des Butterbrotpapiers die p-Werte wieder sinken, ist wohl die sehr starke Streuung der Referenzgruppe für die Ausreißer verantwortlich. Die 4. Lage des Butterbrotpapiers und die 10.Lage des Zwiebelhäutchens liegen mit einem p-Wert von 0.04366 bzw. 7.657E-05 unter dem Signifikanzniveau. Abschließend kann man sagen, dass die Trennung der beiden Gruppen der Klarsichtfolie über alle Schichten hinaus belegt werden konnte. Die Trennung der Gruppen bei Zwiebelhäutchen und Butterbrotpapier scheint in Lage 5 (Zwiebelhäutchen) und Lage 3 (Butterbrotpapier) zwischenzeitlich nicht mehr gegeben. Allerdings wird dieses Bild durch die Trennbar-

keit bei weiteren Schichten widerlegt (Manova, Tabelle 4.2). Um diese Teilergebnisse weiter zu überprüfen und noch praxisnäher zu gestalten wurden anschließend ganze Baldrianblätter als Schicht verwendet. Betrachtet man die verwendeten Schichten so kann man nun den Bogen von rein chemischen Materialien (Frischhaltefolie) über mechanisch verarbeitete Pflanzenbestandteile (Butterbrotpapier) zu natürlichen Pflanzenstrukturen (Zwiebelhäutchen) spannen. Ein gesamtes Blatt stellt damit die logische Folge der Versuchsreihe dar. In den Abbildungen 4.1.10 und4.1.11 sind alle verwendeten Blattproben, mit und ohne Papier vermessen, aufgetragen worden. Die Analyse zeigt deutlich, dass selbst chemische Informationen über den Durchmesser eines gesamten Blattes hinaus mithilfe der ATR-IR-Spektroskopie sichtbar werden. Für die Interpretation eines Spektrums bedeutet das, dass die Absorption des IR-Lichts zwar in den durch die Eindringtiefe festgelegten Arealen stattfindet, diese Areale, bzw. Molekülbindungen aber von tiefergelegenen atomaren Strukturen beeinflusst sind. Eine Untersuchung der atomaren und molekularen Wechselwirkungen innerhalb der Probe zum Zeitpunkt der Messung würde den Rahmen dieser Arbeit sprengen und wäre ein Ansatzpunkt für weitere Untersuchungen. Zudem ist die oben beschriebene alternierende Trennungsqualität zwischen den einzelnen Lagen eventuell auf das Auftreten von Interferenzen zwischen zwei Schichten zurückzuführen. Um diese zu minimieren müsste eine Methode gefunden werden die eine luftfreie Kontaktfläche zwischen den einzelnen Schichten gewährleisten kann.

6 Zusammenfassung

Mit der Entwicklung der Infrarotspektroskopie gelangte ein Analysetool auf den Markt, dass in weiten Teilen der Naturwissenschaften breite Anwendung findet. Ihre einfache Handhabung und die universelle Einsetzbarkeit in vielen Bereichen macht sie zu einem unersetzbaren Instrument in der chemischen Analytik. Mit dem Aufkommen der ATR (*attenuated total reflection*) Infrarot-Spektroskopie kam eine weitere Technologie hinzu, die es ermöglichte auch stark absorbierende und sehr dicke Proben zu vermessen. Dieser Umstand fand besonders in der Analytik von pflanzlichen Drogen und Frischpflanzen großen Anklang. Es war nun möglich ganze Teile der Pflanze ohne Vorbereitung direkt zu vermessen und anhand der Spektren zu analysieren, sogar zu identifizieren. Während der Messung gelangt durch Auftreten einer evaneszenten Welle ein Teil der Infrarotstrahlung in die Probe und generiert durch die daraus resultierende Abschwächung ein Spektrum. Ziel dieser Arbeit war die Feststellung, wie weit die Infrarot-Strahlung in die Probe eindringt und ob dieser Wert die physikalisch gegebene Eindringtiefe übersteigt. Zu diesem Zweck wurden Messungen mit Materialschichten durchgeführt, die durch Stapelung gewisse Probendurchmesser annehmen konnten. Die verwendeten Materialien hatten eine definierte Schichtdicke. Durch statistische Auswertungen konnte gezeigt werden, dass die ursprüngliche Annahme, die Signale des Spektrums stammen allein aus Schichten, die der theoretischen Eindringtiefe entsprechen, verworfen werden müsse. Es zeigte sich viel mehr, dass dieser Wert um ein Vielfaches übertroffen wurde.

7 Abstract

With the development of infrared spectroscopy an analysis tool came on the market, that is widely used in many areas of science. The ease of use and the universal applicability in many areas makes it an irreplaceable tool in chemical analysis. With the advent of the ATR (*attenuated total reflection*) infrared spectroscopy, there was added another technology, which allowed to measure also highly absorbent and very thick samples. This circumstance was received very well especially in the analysis of plant drugs and fresh plants. It now was possible to measure all parts of the plant directly without preparation and to analyze, or even identify them by the use of their spectra. During the measurement, a part of the infrared-radiation penetrates the sample through occurrence of an evanescent wave and generates a spectrum by the resulting weakening of that radiation . The aim of this work was to determine how far the infrared radiation penetrates the sample and if this value exceeds the physically given depth. To this end, measurements were made with layers of material which could accept certain sample diameter by stacking them . The materials used have a defined layer thickness. From the statistical analysis it was shown, that the original assumption that the signals of the spectrum originate solely from layers that correspond to the theoretical depth should be discarded. It rather shows that this value was exceeded by a multiple.

Abbildungsverzeichnis

3.1.1 Versuchsaufbau 6
3.2.1 Ablösen des Zwiebelhäutchens vom Schuppenblatt 9
3.2.2 Aufbringen des Zwiebelhäutchens auf die Öffnung des Glases 9
3.2.3 Trocknung des aufgespannten Zwiebelhäutchens 10
3.2.4 Ausgeschnittenes Zwiebelhäutchen 10
3.2.5 Verwendete Präparate - von links nach rechts: Zwiebelhäutchen, Klarsichtfolie, Butterbrotpapier 11
3.3.1 Spektrenvergleich mit Referenz [Bruker Corporation, a] 12
3.3.2 Quantifizierung mithilfe der OPUS Software [Bruker Corporation, b] . . 13
3.3.3 Interpretation des Spektrums von Tryptophan [Hesse et al., 2005, S.67] 15
3.3.4 Arten der Reflexion und Brechung eines Lichtstrahls [Harrick, 1967, S.15] 16
3.3.5 Vorgänge an der Grenzfläche des ATR-Kristalls 18
3.3.6 Vergleich der Eindringtiefe verschiedener Einfallswinkel und IREs [Gaigneaux and Goormaghtigh, 2013, S.4072] 20
3.4.1 Anwendung verschiedener Arten der Grundlinienkorrektur 22
3.4.2 Ablauf der Gummiband-Grundlinienkorrektur 23
3.4.3 Darstellung der Hauptkomponenten 25
3.5.1 Funktionsweise der micro-CT ([Landis and Keane, 2010, S.1306] 27
3.5.2 Aufbau des MicroCT [Universität Wien, Department für theoretische Biologie,] 28

4.1.1 IR-Spektren des vermessenen Probenmaterials 31
4.1.2 PCA - Vergleich von 1 bis 2 Lagen des Zwiebelhäutchens mit und ohne Referenz 32
4.1.3 PCA - Vergleich von 3 bis 4 Lagen des Zwiebelhäutchens mit und ohne Referenz 33
4.1.4 PCA - 5 und 10 Lagen Zwiebelhäutchen mit und ohne Referenz 33
4.1.5 PCA - Vergleich von 1 bis 3 Lagen Klarsichtfolie mit und ohne Referenz 35
4.1.6 PCA - Vergleich von 4 und 5 Lagen Klarsichtfolie mit und ohne Referenz 36
4.1.7 PCA - Vergleich von 6 und 10 Lagen Klarsichtfolie mit und ohne Referenz 37

4.1.8 PCA - Vergleich von 1 bis 4 Lagen Butterbrotpapier mit und ohne Referenz 38
4.1.9 PCA - Vergleich von verschiedenen Blättern der Art Valeriana officinalis mit und ohne Referenzpapier (Proben 1- 10) 39
4.1.10 PCA - Vergleich von verschiedenen Blättern der Art Valeriana officinalis mit und ohne Referenzpapier (Proben 1-5) 40
4.1.11 PCA - Vergleich von verschiedenen Blättern der Art Valeriana officinalis mit und ohne Referenzpapier (Proben 6-10) 41
4.2.1 direkte Bestimmung der Dicke der Zwiebelhaut über microCT Querschnitt 43
4.2.2 direkte Bestimmung der Dicke der Zwiebelhaut über microCT Längsschnitt 44
4.2.3 direkte Bestimmung der Dicke der Zwiebelhaut über microCT Flächenschnitt 44
4.2.4 Indirekte Bestimmung der Dicke eines Zwiebelhäutchens im micro-CT . 45

Tabellenverzeichnis

4.1 Übersicht der vermessenen Lagen 29
4.2 Manova Ergebnisse (angegeben als p-Value, Signifikanzniveau: 0,05) . . 42

Literaturverzeichnis

[Banwell, 1999] Banwell, C. N. (1999). *Molekülspektroskopie - ein Grundkurs*. Oldenbourg, Deutschland.

[Barth and Haris, 2009] Barth, A. and Haris, P. I. (2009). *Biological and Biomedical Infrared Spectroscopy* -. IOS Press, MÃ¼nchen.

[BioRad Labratories,] BioRad Labratories. Knowitall® ir spectral library. `http://www.bio-rad.com/de-at/product/ir-spectral-databases`.

[Bruker Corporation, a] Bruker Corporation. Alpha quality control. `https://www.bruker.com/products/infrared-near-infrared-and-raman-spectroscopy/ft-ir-routine-spectrometers/alpha/alpha-quality-control/alpha-quality-control/overview.html`.

[Bruker Corporation, b] Bruker Corporation. Quantifizierung nach dem lambert-berschen gesetz. `https://www.bruker.com/de/products/infrared-near-infrared-and-raman-spectroscopy/opus-spectroscopy-software/base-package/evaluation.html`.

[BUKER OPUS Manual, 2003] BUKER OPUS Manual (2003). *OPUS 4.2 - Reference Manual*. Rudolf-Plank-Straße 27, D-76275 Ettlingen, BRUKER OPTIK GmbH.

[Danzer et al., 2013] Danzer, K., Hobert, H., Fischbacher, C., and Jagemann, K.-U. (2013). *Chemometrik - Grundlagen und Anwendungen*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York.

[Everitt, 2011] Everitt, B. (2011). *An Introduction to Applied Multivariate Analysis with R* -. Springer Science and Business Media, Berlin Heidelberg, 2011. aufl. edition.

[Gaigneaux and Goormaghtigh, 2013] Gaigneaux, A. and Goormaghtigh, E. (2013). A new dimension for cell identification by ftir spectroscopy: depth profiling in attenuated total reflection. *Analyst*, 138:4070–4075.

[Gey, 2015] Gey, M. (2015). *Instrumentelle Analytik und Bioanalytik - Biosubstanzen, Trennmethoden, Strukturanalytik, Applikationen*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York.

[Günzler and Gremlich, 2003] Günzler, H. and Gremlich, H.-U. (2003). *IR-Spektroskopie - Eine Einführung*. John Wiley and Sons, New York.

[Goos and Hänchen, 1947] Goos, F. and Hänchen, H. (1947). Ein neuer und fundamentaler versuch zur totalreflexion. *Annalen der Physik*, 436:333–346.

[Gottwald and Wachter, 1997] Gottwald, W. and Wachter, G. (1997). *IR-Spektroskopie für Anwender* -. Wiley, New York, 1. auflage edition.

[Griffiths and Haseth, 2007] Griffiths, P. R. and Haseth, J. A. D. (2007). *Fourier Transform Infrared Spectrometry* -. John Wiley and Sons, New York.

[Harrick, 1967] Harrick, N. J. (1967). *Internal reflection spectroscopy*. Interscience Publishers.

[Hawkins et al., 2010] Hawkins, S. A., Park, B., Poole, G. H., Gottwald, T., Windham, W. R., and Lawrence, K. C. (2010). Detection of citrus huanglongbing by fourier transform infrared–attenuated total reflection spectroscopy. *Applied Spectroscopy*, 64(1):100–103.

[Herschel, 1800] Herschel, W. (1800). *Experiments on the refrangibility of the invisible rays of the sun*.

[Hesse et al., 2005] Hesse, M., Meier, H., and Zeeh, B. (2005). *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie* -. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 7. aufl. edition.

[Kessler, 2007] Kessler, W. (2007). *Multivariate Datenanalyse - für die Pharma, Bio- und Prozessanalytik*. John Wiley and Sons, New York.

[Landis and Keane, 2010] Landis, E. N. and Keane, D. T. (2010). X-ray microtomography. *Materials Characterization*, 61(12):1305 – 1316.

[Lerner and Lawrence, 1997] Lerner, L. S. and Lawrence, S. L. (1997). *Physics for Scientists and Engineers* -, volume 2. Jones and Bartlett Learning, Sudbury, Massachuetts.

[Liland et al., 2010] Liland, K. H., Almøy, T., and Mevik, B.-H. (2010). Optimal choice of baseline correction for multivariate calibration of spectra. *Appl. Spectrosc.*, 64(9):1007–1016.

[Liu et al., 2016] Liu, Y., He, Z., Shankle, M., and Tewolde, H. (2016). Compositional features of cotton plant biomass fractions characterized by attenuated total reflection fourier transform infrared spectroscopy. *Industrial Crops and Products*, 79:283 – 286.

[Mizutani and Suzuki, 2012] Mizutani, R. and Suzuki, Y. (2012). X-ray microtomography in biology. *Micron*, 43(2–3):104 – 115.

[PikeM, 2015] PikeM (2015). *MIRacleTM Single Reflection Horizontal ATR Accessory - User Guide*. Madison, WI 53719, PIKE Technologies, Inc.

[Rees, 2010] Rees, O. J. (2010). *Fourier Transform Infrared Spectroscopy - Developments, Techniques, and Applications*. Nova Science Publishers, Hauppauge, New York.

[Ribeiro da Luz, 2006] Ribeiro da Luz, B. (2006). Attenuated total reflectance spectroscopy of plant leaves: a tool for ecological and botanical studies. *New Phytologist*, 172(2):305–318.

[Schreiber and Schönherr, 2009] Schreiber, L. and Schönherr, J. (2009). *Water and Solute Permeability of Plant Cuticles - Measurement and Data Analysis*. Springer Science and Business Media, Berlin Heidelberg.

[Schwedt, 2013] Schwedt, G. (2013). *Experimente rund um die Kunststoffe des Alltags*. Wiley.

[Skoog and Leary, 2013] Skoog, D. A. and Leary, J. J. (2013). *Instrumentelle Analytik - Grundlagen - Geräte - Anwendungen*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York.

[Stuart, 1997] Stuart, B. H. (1997). *Biological Applications of Infrared Spectroscopy -*. John Wiley and Sons, New York, 1. auflage edition.

[Universität Wien, Department für theoretische Biologie,] Universität Wien, Department für theoretische Biologie. Xradia microct-200. `http://homepage.univie.ac.at/brian.metscher/MicroCT.html`.