

# **Infrarot Laserspektroskopie zum hochempfindlichen Nachweis von CO und NO in biomedizinischen Anwendungen**

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

zur  
Erlangung des Doktorgrades der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von  
Thomas Fritsch  
aus Mönchengladbach

Düsseldorf  
im September 2008

Referent: Prof. Dr. P. Hering  
Koreferent: Prof. Dr. K. Kleinermanns

Tag der mündlichen Prüfung: Donnerstag, 6.11.2008

Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

HUMAN BEINGS MAKE LIFE SO INTERESTING —  
DO YOU KNOW THAT IN A UNIVERSE SO FULL OF WONDERS,  
THEY MANAGED TO INVENT BOREDOM?

T. PRATCHETT



## Kurzfassung

In den letzten Jahrzehnten ist das Interesse an den Molekülen Kohlenmonoxid (CO) und Stickstoffmonoxid (NO) in der biomedizinischen Forschung stetig gewachsen. Inzwischen ist bekannt, dass beide Moleküle vielfältige Aufgaben in verschiedenen Bereichen wie Blutdruckregulierung, Immunabwehr, Signalübertragung und Zellschutz übernehmen.

Mit steigendem Interesse an diesen Molekülen wächst auch die Notwendigkeit der Entwicklung von höchst empfindlichen und selektiven Nachweismethoden. Dieser Herausforderung stellt sich die vorliegende Arbeit durch die Weiterentwicklung von zwei Laserspektrometern im Wellenlängenbereich um 5  $\mu\text{m}$ .

Bei den verwendeten Spektroskopiemethoden handelt es sich um die Faraday-Modulations Spektroskopie (FAMOS) und die Cavity Leak-Out Spektroskopie (CALOS). Beide Spektrometer verbinden eine gute Zeitauflösung mit hoher Selektivität und Empfindlichkeit.

Nach der Verbesserung der Spektrometer weist CALOS eine Nachweisgrenze von 0,34 ppb (parts per billion)  $^{13}\text{CO}$ , 0,029 ppb  $^{14}\text{NO}$  und 0,023 ppb  $^{15}\text{NO}$  bei einer Sekunde Integrationszeit auf, und ist damit das empfindlichste Laserspektrometer für den Nachweis dieser Moleküle. Der systematische Vergleich des CALO-Spektrometers mit dem „Gold-Standard“ der NO-Analytik, einem Chemilumineszenzdetektor (CLD), zeigt eine nahezu identische Empfindlichkeit der Methoden, wobei CALOS den bedeutenden Vorteil hat, zwischen den Isotopologen differenzieren zu können.

Das FAMO-Spektrometer wurde durch den Einsatz eines Zimmertemperatur-Quantenkaskadenlasers um die Möglichkeit des Nachweises von  $^{15}\text{NO}$  erweitert und erreicht nun eine Nachweisgrenze von 6 ppb  $^{15}\text{NO}$  in einer Sekunde Integrationszeit.

Mit den verbesserten Spektrometern werden verschiedene Fragestellungen untersucht. Die isotopologenselektive Analyse ermöglicht den Nachweis eines Transports von  $^{15}\text{NO}$ , das mittels einer Salbe auf die Haut aufgebracht wird, in die Blutbahn.

Die experimentelle und theoretische Untersuchung des zeitlichen Verlaufs der CO-Konzentration in der ausgeatmeten Luft zeigt eine starke bislang unbekannte Abhängigkeit von verschiedenen Atemparametern.

Das CO in der Atemluft kommt zum größten Teil aus dem Blut, wo es als Carboxyhämoglobin vorliegt. Es wird untersucht, ob die Carboxyhämoglobin-Konzentration mittels eines Atemtests bestimmt werden kann, worauf eine nichtinvasive Methode zur Bestimmung der Hämoglobinmasse aufbaut.

Eine Untersuchung des Zusammenhangs der CO-Konzentration im Atem mit einer erhöhten Blutzuckerkonzentration kommt zu dem Ergebnis, dass die CO-Konzentration um etwa 5 % des Ausgangswertes sinkt.

Abschließend zeigt diese Arbeit, dass FAMOS durch den Einsatz eines modernen QCL zu einem querempfindlichkeitsfreien, empfindlichen und isotopologenselektiven Nachweis-system wird, das mit vergleichsweise geringem experimentellem Aufwand verbunden ist.

CALOS weist im mittleren Infrarot nicht nur eine vergleichbare oder sogar bessere Empfindlichkeit wie etablierte Methoden auf, sondern ist diesen durch die Möglichkeit des isotopologenselektiven Nachweises in biomedizinischen Anwendungen deutlich überlegen.



## Abstract

Growing interest in the physiological role of small molecules like Carbonmonoxide (CO) and Nitric Oxide (NO) rises the necessity of the development of highly sensitive and selective gas analyzing methods. This work meets this challenge by improving two laser spectrometers in the 5  $\mu\text{m}$  wavelength region, based on Faraday Modulation Sepctroscopy (FAMOS) and Cavity Leak-Out Spectroscopy (CALOS). Both spectrometers combine high sensitivity with selectivity and a time resolution below 1 s.

After improvement, CALOS shows a detection limit of 0.34 ppb (parts per billion)  $^{13}\text{CO}$ , 0.029 ppb  $^{14}\text{NO}$  and 0.023 ppb  $^{15}\text{NO}$  at a 1 s integration time. This is the best sensitivity of a laser spectrometer reported to the present day. The systematic comparison to a state of the art chemiluminescence detector (CLD) proves the practically equal sensitivity of the both methods. The possibility of isotopologue selective measurements makes CALOS a far more valuable method.

The FAMO-spectrometer is improved by implementing a room-temperature Quantum Cascade Laser (QCL), which enables isotopologue selective analysis without any cross sensitivity. The detection limit of this spectrometer is 6 ppb with a 1 s integration time.

The improved spectrometers enable the investigation of a variety of questions. By analyzing the isotopologue ratio of  $^{15}\text{NO}$  and  $^{14}\text{NO}$  in blood samples after application of nitrite containing lotion, the NO transport through the skin is shown.

Investigation of CO concentration in breath during exhalation shows a strong dependence of exhaled CO on breath parameters. The dependence is well reproduced by a mathematical model developed in this work. The exhaled CO mainly originates from blood carboxyhemoglobin. Promising results are obtained investigating the question, whether the blood carboxyhemoglobin concentration can be determined by breath tests.

Based on these results a non-invasive method of total hemoglobin mass determination using a  $^{13}\text{CO}$  breath test is discussed.

The investigation of the relation of blood glucose concentration to exhaled CO concentration by an oral glucose tolerance test shows a significantly decreased CO concentration at the maximum of blood glucose level.

As a conclusion, this work shows that FAMOS becomes a sensitive and isotopologue selective method without any cross-sensitivity by implementation of a state-of-the-art QCL with the benefit of relative small experimental effort. CALOS in the mid infrared spectral region is comparable or even better than established methods regarding sensitivity and time resolution. The possibility of isotopologue selective analysis is an outstanding advantage of CALOS in biomedical applications.



# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2. Grundlagen</b>	<b>3</b>
2.1. Spurengase . . . . .	3
2.1.1. Physiologische Bedeutung . . . . .	3
2.1.2. Atemtests als diagnostisches Instrument . . . . .	4
2.1.3. Physikalische Eigenschaften von NO . . . . .	5
2.2. Laserquellen im 5 $\mu\text{m}$ -Bereich . . . . .	6
2.2.1. CO-Seitenband Laser . . . . .	7
2.2.2. Quanten-Kaskadenlaser . . . . .	9
2.2.3. Alternativen . . . . .	10
2.3. Faraday Modulationsspektroskopie . . . . .	12
2.3.1. Der Zeeman-Effekt . . . . .	12
2.3.2. Der Faraday-Effekt . . . . .	13
2.3.3. Der Brechungsindex . . . . .	14
2.4. Cavity Leak-Out Spektroskopie . . . . .	16
2.4.1. Prinzip . . . . .	16
2.4.2. Berechnung des Absorptionskoeffizienten . . . . .	16
2.5. Weitere Nachweismethoden . . . . .	17
2.5.1. Elektrochemische Sensoren . . . . .	17
2.5.2. Chemilumineszenz . . . . .	18
<b>3. Weiterentwicklung des Cavity Leak-Out Spektrometers</b>	<b>19</b>
3.1. Versuchsaufbau . . . . .	19
3.2. Eine neue Absorptionszelle . . . . .	20
3.3. Ergebnisse und Diskussion . . . . .	22
3.3.1. Stabilität und rauschäquivalente Absorption . . . . .	23
3.3.2. CO-Nachweis: Empfindlichkeit und Querempfindlichkeit . . . . .	24
3.3.3. NO-Nachweis: Empfindlichkeit und Querempfindlichkeiten . . . . .	25
3.3.4. Laserleistung und Transmission . . . . .	28



3.3.5.	Bandbreiteneffekte . . . . .	30
3.3.6.	Optimaler Fit-Bereich . . . . .	31
3.3.7.	Weitere Fehlerquellen . . . . .	33
3.3.8.	Vergleich mit anderen laserspektroskopischen Methoden . . . . .	33
3.4.	Zusammenfassung . . . . .	33
<b>4.</b>	<b>Optimierung des Faraday-Modulations-Spektrometers</b>	<b>35</b>
4.1.	Simulation von FAMOS-Signalen . . . . .	35
4.1.1.	Programmablauf . . . . .	35
4.1.2.	Simulationsergebnisse . . . . .	37
4.2.	Versuchsaufbau . . . . .	38
4.2.1.	Charakterisierung des Quantenkaskadenlasers . . . . .	40
4.3.	Vergleich der Simulation mit Messungen . . . . .	42
4.3.1.	Vergleich mit früheren Simulationen . . . . .	42
4.3.2.	Vergleich mit neuen Daten . . . . .	44
4.4.	Nachweisgrenzen . . . . .	45
4.5.	Fazit . . . . .	47
<b>5.</b>	<b>Isotopologenselektiver CO-Nachweis</b>	<b>50</b>
5.1.	Onlineanalyse von CO im menschlichen Atem . . . . .	50
5.1.1.	Experimentelle Untersuchung von CO-Exspirogrammen . . . . .	51
5.1.2.	Entwicklung eines mathematischen Modells der CO-Abatmung . . . . .	59
5.1.3.	Vergleich der Simulation mit dem Experiment . . . . .	63
5.1.4.	Bestimmung von [HbCO] . . . . .	64
5.2.	Messung der HbCO-Konzentration mittels Blutgasanalyse . . . . .	65
5.2.1.	Versuchsdurchführung . . . . .	66
5.2.2.	Ergebnisse und Diskussion . . . . .	68
5.3.	Bestimmung der Hämoglobinmasse mittels eines <sup>13</sup> CO-Atemtests . . . . .	70
5.3.1.	Etablierte Verfahren . . . . .	71
5.3.2.	Versuchsdurchführung . . . . .	72
5.3.3.	Ergebnisse und Diskussion . . . . .	73
5.4.	Zusammenhang zwischen Blutzuckerkonzentration und CO in der Atemluft	74
5.4.1.	Messgeräte . . . . .	74
5.4.2.	Der orale Glukose-Toleranztest (OGTT) . . . . .	76
5.4.3.	Ergebnisse . . . . .	77
5.4.4.	Diskussion . . . . .	77
5.5.	Zusammenfassung . . . . .	78

<b>6. Isotopologenselektiver NO-Nachweis</b>	<b>80</b>
6.1. NO aus biologischen Proben . . . . .	80
6.1.1. Prüfgasgemische . . . . .	80
6.1.2. Bestimmung optimaler Analyseparameter anhand einer wässrigen Nitritlösung . . . . .	81
6.1.3. Vergleich von CLD und CALOS anhand wässriger Nitrit-Lösungen .	83
6.1.4. Blutplasma . . . . .	84
6.1.5. Diskussion . . . . .	85
6.2. NO-Transport durch die Haut . . . . .	86
6.2.1. Versuchsdurchführung . . . . .	86
6.2.2. Ergebnisse und Diskussion . . . . .	87
6.3. NO-Nachweis mittels FAMOS . . . . .	88
6.3.1. Vergleich körpereigener Radikalfänger . . . . .	89
6.4. Fazit . . . . .	90
<b>7. Zusammenfassung</b>	<b>92</b>
<b>A. LabVIEW-Programme</b>	<b>94</b>
<b>B. Mathematica-Programme</b>	<b>97</b>
B.1. Simulation von Exspiogrammen . . . . .	97
B.2. Fitprogramm für $^{14}\text{NO}/^{15}\text{NO}$ -Nachweis . . . . .	102
B.3. Berechnung von FAMOS-Signalen . . . . .	105
<b>Literatur</b>	<b>110</b>



# 1. Einleitung

Es ist bereits lange bekannt, dass Stickstoffmonoxid (NO) und Kohlenmonoxid (CO) höchst giftige Gase sind, die für den Menschen bereits in geringen Konzentrationen tödlich sein können.

Dagegen weiß man erst seit einigen Jahren, dass beide Moleküle nicht nur im menschlichen Organismus produziert werden, sondern auch weitreichende physiologische Bedeutung haben: Ihre Konzentration im Atem ist mit verschiedenen Krankheitsbildern korreliert [Kha01], sie dienen als Neurotransmitter, können die Blutgefäße erweitern oder schützen den Körper sowohl vor Infektionen als auch vor oxidativem Stress, der vielfältige Ursachen haben kann [Wu05, Ryt04, Lun96b]. NO in sehr niedrigen Konzentrationen wird darüber hinaus in der Asthma-Therapie-Kontrolle eingesetzt und fördert die Wundheilung.

All diesen Prozessen liegt eine außerordentlich komplexe Biochemie zugrunde. Um grundlegende Fragestellungen im Zusammenhang mit diesen Gasen zu untersuchen, sind vor allem hochpräzise Methoden erforderlich, die in der Lage sind, kleinste Konzentrationen im ppb-Bereich (engl.: parts per billion,  $1 : 10^9$ ) in komplexen Gasgemischen wie beispielsweise dem menschlichen Atem quantitativ nachzuweisen. Besonders wertvoll sind hierbei Methoden, die darüber hinaus zwischen verschiedenen Isotopologen, also Molekülen mit unterschiedlicher Isotopenzusammensetzung, unterscheiden können. Hierdurch wird es möglich, Transport- und Synthesemechanismen dieser Moleküle nachzuverfolgen.

Zielsetzung dieser Arbeit ist die Optimierung zweier Nachweisverfahren für NO und CO mit besonderem Blick auf die seltenen Isotopologe  $^{13}\text{CO}$  und  $^{15}\text{NO}$ , sowie die Untersuchung der Eignung der Verfahren in biomedizinischen Anwendungen.

Zu Beginn dieser Arbeit standen zwei Spektrometer zur Verfügung. Die Cavity Leak-Out Spektroskopie (CALOS) basiert auf der Absorption von Laserstrahlung im mittleren Infrarot (MIR). Zur Verstärkung des Effektes wird ein Resonator hoher Güte benutzt. Die Faraday Modulations Spektroskopie (FAMOS) bedient sich der magnetisch induzierten Doppelbrechung. Da dieser Effekt lediglich bei paramagnetischen Molekülen stark ausgeprägt ist, kann diese Methode ausschließlich zur Spektroskopie an Radikalen genutzt werden und ist hochspezifisch für den Nachweis von NO einsetzbar.

Das zweite Kapitel dieser Arbeit beschreibt die theoretischen Grundlagen der Methoden. Darüber hinaus wird ein Überblick über den Stand der Wissenschaft bezüglich der NO



und CO Analyse in Biologie und Medizin gegeben.

Bereits zu Beginn dieser Arbeit war der Nachweis von  $^{15}\text{NO}$  mit dem CALO-Spektrometer möglich, während das FAMO-Spektrometer auf das Hauptisotopolog  $^{14}\text{NO}$  festgelegt war. Die Kapitel 3 und 4 beschreiben die Weiterentwicklung beider Spektrometer, wobei bei CALOS die Stabilität und bei FAMOS der Nachweis beider Isotopologe im Vordergrund stehen. Die wesentlichen Fortschritte beim Versuchsaufbau sind eine Verbesserung der Nachweiszelle des CALO-Spektrometers sowie der Einsatz eines Quantenkaskadenlasers (QCL) beim FAMOS Experiment, der zum Einen die stärkste  $^{15}\text{NO}$ -Linie zugänglich macht und zum Anderen auf flüssigen Stickstoff als Kühlmittel verzichten kann.

Das fünfte Kapitel widmet sich dem CO-Nachweis. Die Möglichkeiten des CALO-Spektrometers zum Echtzeit-Nachweis von CO werden untersucht und diskutiert. Die gewonnenen Daten werden darüber hinaus mit einem theoretischen Modell verglichen und diskutiert, inwiefern physiologische Daten wie die Carboxyhämoglobin-Konzentration mittels einer Atemgasanalyse messbar sind. Weitere mögliche Anwendungen wie der Nachweis von Blutdoping, bei dem die Gesamtmasse des Hämoglobins im Körper künstlich erhöht wird, und der Zusammenhang zwischen der Blutzuckerkonzentration und dem CO-Gehalt im Atem werden untersucht und diskutiert.

Untersuchungen zum NO-Nachweis finden sich schließlich im sechsten Kapitel. Der NO Nachweis wird hier diskutiert und mit der am stärksten etablierten Methode, der Chemilumineszenzdetektion, verglichen. Eine Anwendung der CALOS-Methode ist die Untersuchung des NO-Transports durch die Haut. Der Einsatz von isotonenmarkiertem Nitrit ermöglicht die Unterscheidung zwischen körpereigenem und von außen auf die Haut aufgebrachtem NO und somit eine Aussage darüber, ob NO aus Nitrit auf der Haut durch die Haut in die Blutbahn gelangen kann, und in welcher Form es dann vorliegt. Auf der Grundlage einer solchen Untersuchung kann die Verabreichung von nitrithaltiger Salbe als mögliche Darreichungsform von NO untersucht werden.

Die Stärke der FAMO-Spektroskopie, die ohne jegliche Gasaufbereitung ein Gasgemisch spezifisch auf NO analysiert, wird ebenfalls im sechsten Kapitel anhand der UV-induzierten Freisetzung von NO aus wässrigen Nitritlösungen diskutiert. Hier werden auch die Auswirkungen verschiedener Radikalfänger auf den Freisetzungsmechanismus untersucht.

Im letzten Kapitel wird ein Ausblick auf die weiteren herausragenden Möglichkeiten der Spektroskopiemethoden und deren Grenzen aufgezeigt und schließlich die Arbeit zusammengefasst. Diese Arbeit beinhaltet die Entwicklung verschiedener Programme, die im Anhang kommentiert sind.

## 2. Grundlagen

### 2.1. Spurengase

Im menschlichen Atem finden sich mehr als 400 flüchtige Verbindungen, die meist in sehr kleinen Konzentrationen (ppb-Bereich und darunter) vorliegen. Zwei dieser Gase haben in den vergangenen Jahren ein besonderes Interesse geweckt, nämlich NO und CO. Im Jahr 1998 wurde der Medizin-Nobelpreis an Ignarro, Furchgott und Murad verliehen, die erkannten, dass NO eine wesentliche Rolle als Signalmolekül im kardiovaskulären System spielt.

Darauf folgte eine große Zahl von weiteren Veröffentlichungen, inzwischen gibt es sogar die Zeitschrift „Nitric Oxide“, die sich ausschließlich mit diesem Molekül und seiner Bedeutung in Biologie und Medizin befasst.

CO erfüllt im Körper eine Reihe sehr ähnlicher Funktionen wie das NO-Molekül, so dass mit dem Interesse an NO auch das Interesse an CO wächst.

#### 2.1.1. Physiologische Bedeutung

Beide Moleküle kommen in der Umgebungsluft vor (NO:  $< 1$  ppb... 1 ppm, CO: 100 ppb... 2 ppm) und werden im Körper produziert [Kha01, Ryt04, Sch06]. Sie haben im Vergleich zu Sauerstoff eine sehr hohe Affinität zu Hämoglobin, was sie für den Menschen bereits in Konzentrationen von wenigen 100 ppm lebensgefährlich macht, da sie den Sauerstofftransport blockieren.

Die Produktion im Körper erfolgt über Enzyme, beim NO über die NO-Synthase (NOS), die aus L-Arginin neben NO auch L-Citrullin produziert, beim CO über die Häm-Oxygenase (HO), die Häm-Moleküle abbaut und CO, Eisen und Bilirubin produziert [Mor05]. Es gibt drei Isoformen von NOS: neuronale NOS (nNOS) tritt in erster Linie in Neuronen auf, während endotheliale NOS (eNOS) in Endothelzellen anzutreffen ist. Beide Formen kommen aber auch in zahlreichen weiteren Zellen vor. Die dritte Isoform ist die induzierbare NOS (iNOS). Mit der Aktivierung von iNOS reagiert der Körper auf schädigende Einflüsse wie Entzündungen, oxidativen Stress und Infektionen. Dieselben Stimuli aktivieren auch HO-1, die induzierbare Isoform der HO [Wu05]. Darüber hinaus



beeinflussen NO und CO die Aktivität des Enzyms, das das jeweils andere Molekül produziert [Mor05, Wu05].

Beide Moleküle wirken gefäßerweiternd und dienen somit der Blutdruckregulation. Desweiteren dienen sie als Neurotransmitter und weisen protektive Eigenschaften sowohl an isolierten Zellen als auch in vivo auf [Wu05].

### 2.1.2. Atemtests als diagnostisches Instrument

Sowohl NO als auch CO können im Atem nachgewiesen werden, wobei der Ursprung jedoch unterschiedlich ist. Während fast der gesamte NO-Gehalt im Atem auf eine Produktion in den Atemwegen zurückzuführen ist, gelangt das CO in erster Linie aus dem Blut in die Atemluft. Dieser Unterschied begründet sich darin, dass CO verhältnismäßig reaktionsträge ist, während NO als Radikal extrem schnell reagiert und als NO nicht mehr zur Verfügung steht. Im Blut reagiert es schnell zu Nitrit und Nitrat oder bindet an Hämoglobin und Proteine. In den Atemwegen dient NO vor allem der Immunabwehr.

In verschiedenen Studien wurden Zusammenhänge zwischen den beiden Gasen und Krankheiten gefunden. Bei Atemwegserkrankungen wie Asthma oder entzündlichen Infektionen sind die Konzentrationen im Atem beider Gase erhöht [Kha01]. Auch der Konsum von Tabakwaren beeinflusst die Konzentration beider Moleküle, allerdings gegensätzlich: die NO Konzentration wird gesenkt, während die CO-Konzentration erhöht wird. Tabelle 2.1 zeigt einen Überblick über einige Krankheiten, die die CO- und NO-Konzentration im Atem verändern. Im Falle von Asthma fällt auf, dass es hier widersprüchliche Veröffentlichungen gibt. Eine mögliche Ursache ist die Verwendung unterschiedlicher Messmethoden. Während Zetterquist einen Analysator auf Basis der nicht-dispersiven Infrarot (NDIR) Spektroskopie nutzte, wurden in den übrigen Studien elektrochemische Detektoren verwendet. Insbesondere ältere Detektoren entwickeln häufig Querempfindlichkeiten, beispielsweise gegen Wasserstoff, der im Atem in Konzentrationen von wenigen ppm vorkommt. In Kapitel 5.4 wird dieser Umstand genauer beschrieben.

Die Analyse des menschlichen Atems bietet eine für den Patienten besonders schonende Methode, eine Diagnose zu stellen. Zur medizinischen Anwendung ist bislang die Beobachtung des Verlaufs der Neugeborenen-Gelbsucht mittels eines CO-Atemtests gelangt [Her02].

Die Neugeborenen-Gelbsucht tritt bei der Umstellung des Stoffwechsels nach der Geburt auf, wenn übermäßig viel Hämoglobin abgebaut und hierdurch Bilirubin produziert wird, das die Gelbfärbung der Haut verursacht. Da mit jedem Häm-Molekül, das abgebaut wird, auch ein CO-Molekül produziert wird, ist die Konzentration im Atem mit der Rate des Abbaus korreliert.

Faktor	Einfluss auf NO		Einfluss auf CO
	nasal	oral	
Tabakkonsum	—	↘ [Kha01]	↗ [Kha01, Ryt04]
Diabetes	—	—	↗ [Par99a]
Asthma	↔ [Alv93]	↗ [Alv93]	↔ [Zet02] ↗ [Hor98a, Zay97]
Mukoviszidose	↘ [Lun96a]	↔ [Lun96a]	↔ [Zet02] ↗ [Par99b]
Chronische Bronchitis	—	↗ [Alv94]	↗ [Hor98b]
Rhinitis	↗ [Lun96a]	↗ [Lun96a]	↗ [Mon99]
Atemwegsinfektionen	—	↗ [Kha95, Alv93]	↗ [Bie01]

**Tabelle 2.1.:** Übersicht über Faktoren, die die CO- und NO-Konzentrationen im Atem beeinflussen können. ↔ bedeutet keine Änderung der Konzentration, ↗ bedeutet eine erhöhte, ↘ eine gesenkte Konzentration.

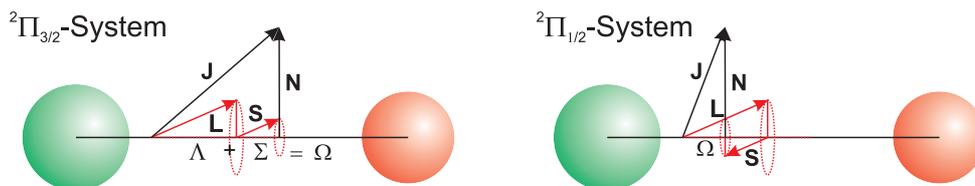
Eine weitere Anwendung eines Atemtests ist die Erfolgskontrolle bei der Behandlung von Asthma mit Kortikosteroiden. Die bei Asthma erhöhte NO-Konzentration sinkt bei erfolgreicher Behandlung. Auf diese Weise kann die Medikation an die individuellen Erfordernisse angepasst werden.

Neben Atemtests sind Gasanalysen auch bei der Untersuchung von Zellkulturen oder Blutproben von großem Interesse. Hierbei wird die (chemisch) freigesetzte oder durch die Zellkultur produzierte Menge NO oder CO gemessen. Die Analyse des freigesetzten Gases kann dabei Aufschlüsse über Produktionsraten oder biochemische Reaktionspfade geben [Mor01]. In den Kapiteln 5.2, 6.2 und 6.3 wird die Analyse von NO und CO aus flüssigen Proben zur Bestimmung der Carboxyhämoglobin-Konzentration, zur Untersuchung des Transports von NO durch die menschliche Haut und zum Vergleich der Stärke verschiedener körpereigener Antioxidantien angewandt.

Sowohl Atemproben als auch die Gasgemische, die aus flüssigen Proben freigesetzt werden, bestehen aus verschiedenen Molekülen. Die Herausforderung besteht darin, ein Gas in diesem Gemisch spezifisch und quantitativ zu messen. Laserbasierte Absorptionsspektroskopie bietet aufgrund der charakteristischen Absorptionsstrukturen von NO und CO im Wellenlängenbereich um 5 µm diese Möglichkeit. Dieser Spektralbereich bietet darüber hinaus den Vorteil, dass andere Gase wie Wasserdampf und Kohlendioxid, die in den genannten Gasgemischen in hohen Konzentrationen vorkommen können, hier nur eine vergleichsweise geringe Absorption aufweisen.

### 2.1.3. Physikalische Eigenschaften von NO

Insbesondere für das Verständnis der in Kapitel 4.1 vorgestellten Berechnung von FAMOS-Signalen ist eine Betrachtung der Struktur des NO-Moleküls notwendig.



**Abbildung 2.1.:** Die Grundzustandssysteme des NO-Moleküls werden durch die Ausrichtung des Spins des ungepaarten Elektrons bestimmt. Die Projektionen des Bahndrehimpulses  $\Lambda$  und des Spins  $\Sigma$  addieren sich zur Gesamtdrehimpulsquantenzahl  $\Omega$ . Der Gesamtdrehimpuls  $\mathbf{J}$  setzt sich aus dem Drehimpuls des Moleküls  $\mathbf{N}$ , dem Bahndrehimpuls des Elektrons  $\mathbf{L}$  und dessen Spin  $\mathbf{S}$  zusammen. Dieser Fall einer starken Spin-Bahn-Kopplung wird als Hund'scher Fall (a) bezeichnet.

NO besitzt eine ungerade Anzahl von Elektronen, was zu einem ungepaarten Elektron in der äußeren Schale führt, womit NO zu den Radikalen zählt. Da alle übrigen Schalen abgeschlossen sind, bestimmt dieses Elektron den Beitrag der Elektronenhülle zum Gesamtdrehimpuls  $\mathbf{J}^1$  im Grundzustand des Moleküls. Im elektronischen Grundzustand ist die Projektion des Hüllendrehimpulses  $\Lambda$  auf die Molekülachse 1. Für die Projektion des Spins des Elektrons  $\Sigma$  besteht die Möglichkeit einer parallelen oder antiparallelen Ausrichtung:  $\Sigma = \pm 1$ . Damit ergeben sich für die Projektion des Gesamtdrehimpulses  $\Omega = \Lambda + \Sigma$  zwei mögliche Einstellungen, nämlich  $\Omega = 1/2$  oder  $\Omega = 3/2$ . Das Grundzustandssystem wird dem entsprechend als  ${}^2\Pi_{1/2}$ - bzw.  ${}^2\Pi_{3/2}$ -System bezeichnet. Das NO-Molekül mit den relevanten Quantenzahlen ist in Abbildung 2.1 dargestellt.

Auswirkungen hat das Grundzustandssystem vor allem auf die Landé-Faktoren  $g_J$ , die die Stärke der Aufspaltung der Niveaus im äußeren Magnetfeld bestimmen. Wird der Hund'sche Fall (a) einer starken Spin-Bahn-Kopplung angenommen, so ist  $g_J$  in erster Näherung durch

$$g_J = \frac{(2\Sigma + \Lambda) \cdot \Omega}{J(J + 1)} \quad (2.1)$$

gegeben. Demnach gilt im  ${}^2\Pi_{1/2}$ -System  $g_J \approx 0$ , im  ${}^2\Pi_{3/2}$ -System sind sie dagegen insbesondere für kleine  $J$  groß.

Die Gleichung 2.1 kann durch verschiedene Korrekturterme ergänzt werden, eine Berechnung der  $g_J$ , die auch in den Rechnungen in Kapitel 4.1 benutzt werden, findet sich in [Her80].

<sup>1</sup>Vektoren werden in dieser Arbeit fett dargestellt.

## 2.2. Laserquellen im 5 $\mu\text{m}$ -Bereich

Neben der Wellenlänge gibt es weitere Anforderungen an einen Laser, der für die in dieser Arbeit verwendeten Methoden genutzt werden kann. Sowohl für CALOS als auch für FAMOS ist ein kontinuierlicher (cw, continuous wave) Betrieb erforderlich. Der cw-Betrieb ist darüber hinaus eine Voraussetzung für die Schmalbandigkeit der Laserstrahlung, die notwendig ist, um einerseits eine hinreichende Transmission durch den Resonator bei CALOS und andererseits eine gute Selektivität zu erreichen. Für eine gute Einkopplung in den CALOS-Resonator ist darüber hinaus eine gute Strahlqualität erforderlich. Auch sollte der Laser über eine nicht zu geringe Leistung verfügen. Während dies bei CALOS nicht der kritischste Parameter ist – hier sind Leistungen in der Größenordnung von 100  $\mu\text{W}$  durchaus ausreichend – ist das zu erwartende Signal bei FAMOS von der Laserleistung abhängig. Eine möglichst hohe Leistung ist also wünschenswert, wobei auf eine gute Strahlqualität verzichtet werden kann.

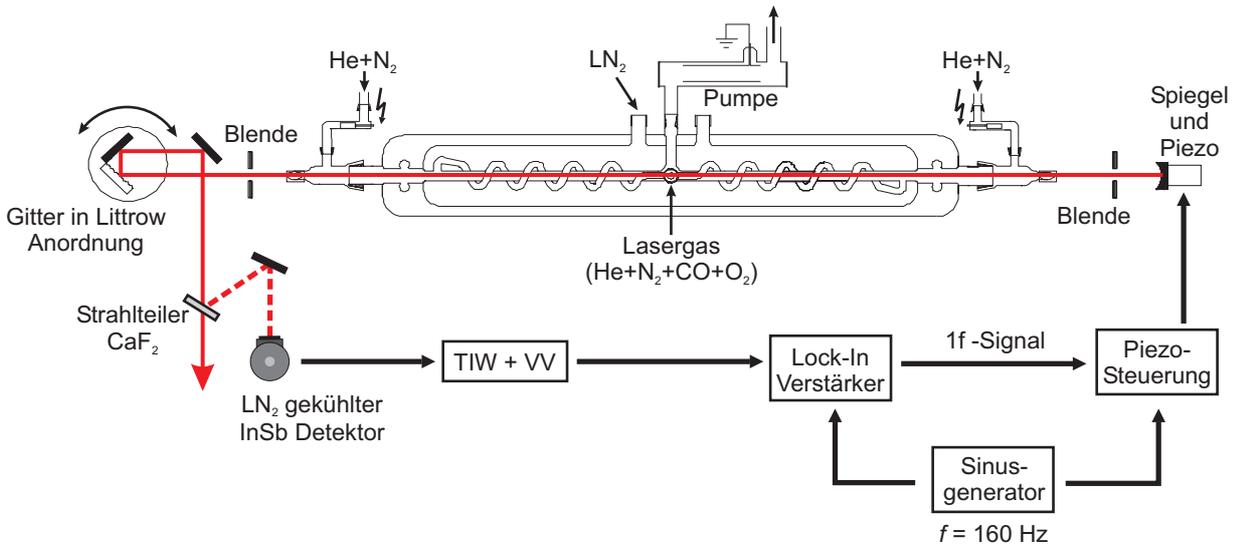
Eines der ersten Systeme für diesen Spektralbereich stellt der CO-Laser dar. Hierbei handelt es sich nicht um einen kontinuierlich durchstimmbaren Laser. Durch Mischen mit Mikrowellenstrahlung kann jedoch durchstimmbares Laserlicht erzeugt werden.

Erst in jüngerer Zeit beginnen Quantenkaskadenlaser (QCL) eine Alternative zum CO-Laser zu bieten.

In den folgenden Abschnitten soll auf diese Laserquellen detaillierter eingegangen werden. Dem CO-Seitenband System und dem QCL wird dabei jeweils ein eigenes Kapitel gewidmet, da dies die Systeme sind, die in dieser Arbeit Anwendung finden. Weitere Möglichkeiten sind Bleisalzdiolenlaser und Systeme, die mittels nichtlinearer optischer Prozesse Laserstrahlung erzeugen. Zu nennen sind hier die Differenzfrequenzerzeugung (DFG) und ein optisch parametrischer Oszillator (OPO), deren Vor- und Nachteile im abschließenden Abschnitt diskutiert werden.

### 2.2.1. CO-Seitenband Laser

Die Lasertätigkeit beim CO-Laser basiert auf Übergängen zwischen verschiedenen Vibrations-Rotations-Übergängen im elektronischen Grundzustand des CO-Moleküls. Die partielle Besetzungsinversion wird dabei in erster Linie durch Stöße der CO-Moleküle mit angeregten Stickstoffmolekülen und anderen CO-Molekülen erzeugt [Mue02]. Die Besetzungsinversion kann nur bei sehr niedrigen Temperaturen erzeugt werden. Daher ist es notwendig, das Gasgemisch, dem auch Helium und Sauerstoff beigemischt wird, auf möglichst niedrige Temperaturen zu kühlen. Das Gasgemisch wird nach Durchlaufen einer Vorkühlung in flüssigem Stickstoff durch ein spiralförmig um das Entladungsrohr verlaufendes Rohr gekühlt. Das gesamte Entladungsrohr befindet sich dabei in einem Glasdewar,



**Abbildung 2.2.:** Schematischer Aufbau des CO-Seitenband-Lasers (aus [Hei07]). Der Resonator wird durch ein Gitter in Littrow-Anordnung und einen Spiegel gebildet, der auf einem Piezo-Tubus montiert ist, so dass die Länge des Resonators regelbar ist. Das Laserrohr befindet sich zur Kühlung in flüssigem Stickstoff. Die Stabilisierung folgt einem Standard 1f-Lock-In Verfahren.

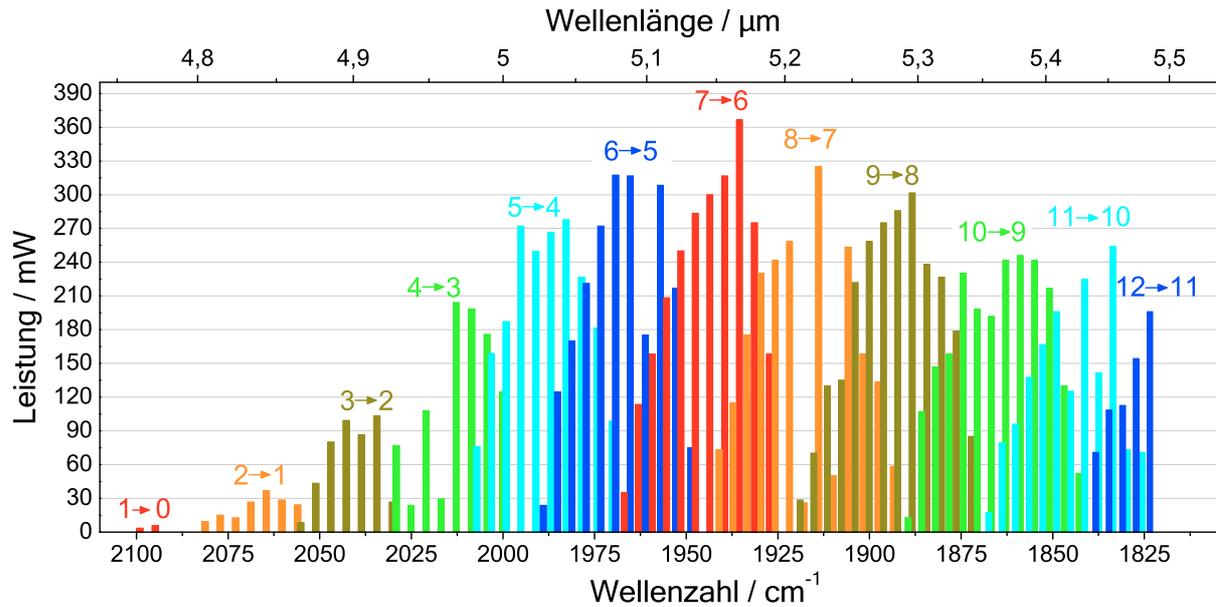
der mit flüssigem Stickstoff gefüllt ist. Die Konstruktion des Laserrohres ist in Abbildung 2.2 dargestellt. Das Helium dient hierbei primär als Träger der Gasentladung und sorgt aufgrund seiner geringen Masse für eine gute Kühlung des Gasgemisches. Der Sauerstoff unterdrückt die Dissoziation des CO.

Der Laserresonator (Länge: 2 m) wird bei diesem System durch einen Silberspiegel und ein Gitter (320 Linien/mm, Blazewinkel:  $45^\circ$ ) gebildet. Die Linienauswahl erfolgt dabei durch Drehung des Gitters, das in Littrow-Anordnung angebracht ist. Dies bedeutet, dass die -1. Beugungsordnung in den Resonator zurückgekoppelt wird, während die 0. Beugungsordnung ausgekoppelt wird.

Lasertätigkeit ist mit diesem System auf etwa 100 Linien zwischen 4,75 und  $5,5 \mu\text{m}$  möglich, wobei dieser Wellenlängenbereich durch die Wahl des Gitters gegeben ist. Ein Emissionsspektrum des Lasers ist in Abbildung 2.3 dargestellt. Die Leistung auf den einzelnen Linien liegt zwischen wenigen mW auf der Fundamentalbande und mehreren hundert mW bei den höheren Banden.

### Frequenzstabilisierung

Die Frequenzstabilisierung des Lasers erfolgt durch Modulation der Laserfrequenz (Frequenz: 160 Hz, Modulationstiefe: 50 kHz) durch das Anlegen einer Wechselspannung an den Piezotubus. Das Stabilisierungssignal wird dabei aus einem Teil der Laserstrahlung erzeugt, der mittels eines InSb-Detektors nachgewiesen und mit einem Lock-In Verstärker



**Abbildung 2.3.:** Das Emissionsspektrum des CO-Lasers (aus [Bas04]). Die Laserlinien einer Rotationsbande sind farblich hervorgehoben.

(391A Lock-In Amplifier, Ithaco-Dynatrac) demoduliert wird. Das so erzeugte Signal wird nach Durchgang durch einen Integrator auf die Wechselspannung zur Modulation des Lasers addiert.

Auf diese Weise wird die Laserfrequenz auf das jeweilige Maximum des Verstärkungsprofils stabilisiert.

### Seitenbanderzeugung

Als Molekülgaslaser kann dieses System zwar auf verschiedenen Linien betrieben werden, ist aber nicht kontinuierlich durchstimmbar. Zur Erzeugung durchstimmbarer Laserstrahlung wird das erzeugte Licht in einem nichtlinearen Kristall (Cadmiumtellurid, CdTe), der sich in einem Mikrowellen-Hohlleiter befindet, mit Mikrowellenstrahlung gemischt. Die Mikrowellenstrahlung wird dabei von einem Synthesizer (SMP 02, Rhode und Schwarz) erzeugt und von einem Mikrowellenverstärker (Hughes TWTA-8000H) auf eine Leistung von 20 W verstärkt [Dah02].

Kristall und Hohlleiter sind auf Mikrowellenfrequenzen zwischen 8 und 18 GHz optimiert, so dass ein Bereich von etwa  $0,33 \text{ cm}^{-1}$  kontinuierlich durchgestimmt werden kann.

Der Mikrowellensynthesizer kann über eine GPIB-Schnittstelle mit dem Computer gesteuert werden.

Der CO-Seitenband Laser ist zwar ein System, das aufgrund seiner Größe, der Kühlung durch flüssigen Stickstoff und der Verwendung von hochgiftigen Gasen nicht für einen



Einsatz außerhalb des Labors geeignet ist, dennoch stellt dieser Laser eine hervorragende Strahlquelle dar. Die herausragenden Merkmale sind die ausgezeichnete Strahlqualität ( $M^2 = 1$ ) aufgrund des langen, wohldefinierten Resonators, die Frequenzstabilität und eine ausgezeichneten Linienbreite ( $< 50$  kHz) sowie eine hinreichende Leistung im Bereich mehrerer hundert  $\mu$ W.

### 2.2.2. Quanten-Kaskadenlaser

Quanten-Kaskadenlaser (QCL) sind Laser auf Halbleiterbasis. Anders als bei herkömmlichen Halbleiterlasern bewegen sich die Elektronen im QCL ausschließlich im Leitungsband. Beim QCL werden verschieden dotierte Halbleitermaterialien wie AlInAs und GaInAs abwechselnd in dünnen Schichten auf ein Substrat aufgebracht. Hierdurch entstehen Quantentöpfe verschiedener Höhe und Breite. Zwischen zwei Töpfen können sich Elektronen durch den Tunneleffekt bewegen. Eine QCL-Struktur ist in Abbildung 2.4 dargestellt. Nach Durchlaufen der Injektor-Region kann das Elektron in die eigentliche Laserstruktur tunneln. Es tunnelt dabei direkt in den angeregten Zustand (4), der aufgrund eines geringen Überlapps der Wellenfunktionen in den beiden Niveaus 3 und 4 langlebig ist. Der untere Zustand wird, aufgrund eines starken Überlapps der Wellenfunktion mit den untersten Energieniveaus (1 und 2), schnell entleert, wodurch die Besetzungsinversion erreicht wird.

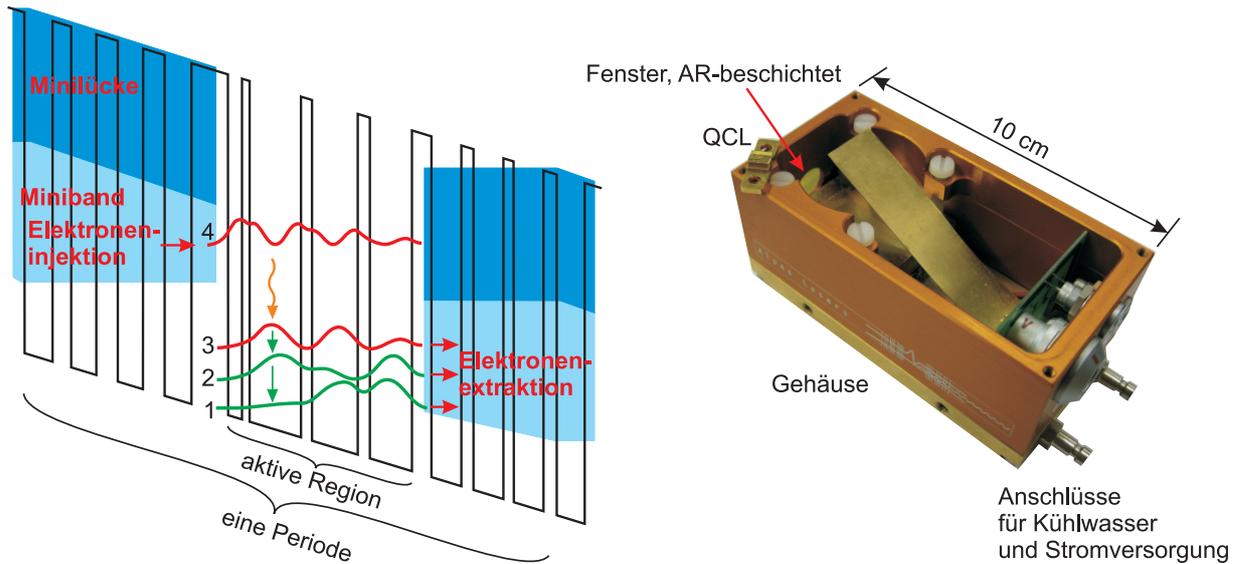
Es ist möglich, mehrere aktive Regionen übereinander zu erzeugen, wodurch ein einzelnes Elektron mehrere Photonen erzeugen kann, was eine hohe Effizienz des Lasers bewirkt.

Die Wellenlänge des Lasers ist durch das Design der Quantentopfstruktur gegeben, daher ist es möglich, mit dieser Technik ein breites Spektrum von Frequenzen bis in den THz-Bereich abzudecken.

QCL arbeiten inzwischen im Zimmertemperaturbereich, das heißt in dem Bereich, in dem ein Peltierkühler für den Wärmetransport ausreicht (ca.  $-30$  bis  $30$  °C). Die Leistung reicht bis zu vielen hundert mW. Im Wellenlängenbereich um  $5,2 \mu\text{m}$ , der für das FAMOS-System zum isotopologenselektiven Nachweis von NO notwendig ist, liegen typische Leistungen im Bereich mehrerer 10 mW.

Damit ein QCL im Single-Mode Betrieb funktioniert, wird der Brechungsindex in der laseraktiven Region periodisch moduliert. Durch diese Modulation findet eine Modenselektion derjenigen Lasermode statt, die am Besten an die periodische Struktur angepasst ist. Diese Methode wird als „distributed feed back“ (DFB) bezeichnet und wird in [Buu98] detailliert beschrieben.

Neuere Entwicklungen sind QCL mit externen Resonatoren (EC-QCL). Ein solches System wurde bereits im Bereich um  $5,2 \mu\text{m}$  demonstriert [Wys05a], kommerziell sind solche



**Abbildung 2.4.:** Das Strukturschema eines 4-Topf-QCL (links, nach [Bec02]) und der in dieser Arbeit genutzte QCL mit seinem Peltier-Kühler (rechts). Das Strukturschema zeigt eine Periode der Quantentopf-Struktur eines QCL. Etwa 40 solcher Strukturen werden nacheinander aufgebracht. Da ein Elektron in jeder aktiven Region ein Photon erzeugen kann, ist ein höchst effizienter Betrieb des Lasers möglich. Die Topfstruktur gibt die Wellenlänge des Lasers vor.

Systeme inzwischen auch erhältlich, allerdings war ein EC-QCL um  $5,2\mu\text{m}$ , wie er für FAMOS benötigt wird, nicht lieferbar.

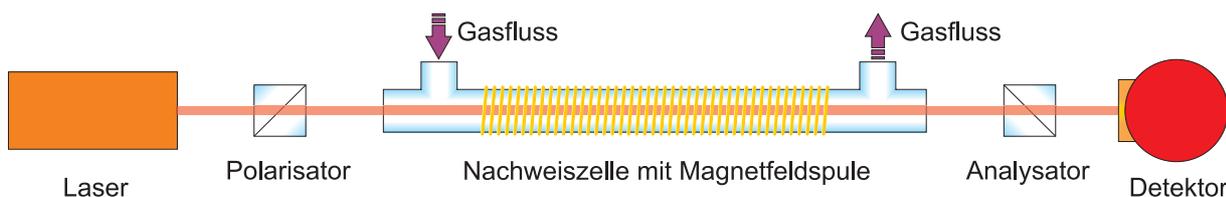
Vorteile eines EC-QCL sind eine erhöhte Leistung, ein größerer Durchstimmbereich und ein besseres Strahlprofil aufgrund des besser definierten Resonators, allerdings sind diese Vorteile mit erheblich höheren Anschaffungskosten verbunden.

### 2.2.3. Alternativen

Alternativen zu den vorgestellten Systemen gibt es nur wenige.

*Bleisalzdiodenlaser* liefern nur eine geringe Leistung ( $100\text{-}250\mu\text{W}$ ) im Single-Mode Betrieb bei Wellenlängen zwischen  $3$  und  $10\mu\text{m}$ . Sie sind über einen Bereich von über  $100\text{ cm}^{-1}$  durchstimmbar, allerdings treten Modensprünge auf, die den Nutzen dieser Laser für spektroskopische Anwendungen beschränkt; darüber hinaus müssen sie mit flüssigem Stickstoff gekühlt werden [Mue02].

Systeme, die auf *Frequenzmischung* basieren, benötigen ein nichtlineares Medium, das für den Wellenlängenbereich transparent ist. Lithiumniobat, das für Frequenzmischung häufig verwendet wird, ist nur schlecht geeignet, da es nur unterhalb von  $5\mu\text{m}$  transparent ist. Als Material kommt allerdings GaAs in Frage, das eine hohe Nichtlinearität mit der Möglichkeit verbindet, die Kristallstruktur periodisch zu modulieren. Mit einem solchen Kristall wurden durch *Differenzfrequenzerzeugung* bereits Leistungen im Bereich weniger



**Abbildung 2.5.:** Bei FAMOS wird das Licht des Lasers zunächst polarisiert. Befindet sich NO in der Nachweis zelle, wird die Polarisations ebene aufgrund des Faraday-Effektes gedreht. Diese Drehung kann mittels des zweiten Polarisators in eine Intensitätsänderung umgewandelt und durch den Detektor nachgewiesen werden. Durch Modulation des Magnetfeldes wird auch die Drehung moduliert und kann mittels eines Lock-In Verfahrens verstärkt werden.

100  $\mu$ W im Bereich zwischen 7,5 und 8,2  $\mu$ m erreicht [Vas08].

*Optisch Parametrische Oszillatoren* (OPO) bieten im Frequenzbereich um 5  $\mu$ m momentan lediglich Laserpulse [Hai03, Vod99] eignen sich aber für die Cavity Ring-Down Spektroskopie (CRDS), um Stoffe nachzuweisen, die breitbandige Absorptionsstrukturen im mittleren Infrarot besitzen, wie z.B. verschiedene Sprengstoffe [Tod02].

*Frequenzverdopplung* eines CO<sub>2</sub>-Lasers bei 10,6  $\mu$ m in LiGaTe<sub>2</sub> (LGT) führt zur erforderlichen Wellenlänge bei 5,3  $\mu$ m, allerdings liegt die bislang erreichte Leistung unter einem  $\mu$ W [Zon07]. Ungeachtet dieser niedrigen Leistung hat das Material vielversprechende Eigenschaften für die Frequenzkonversion. Es ist über einen weiten Spektralbereich transparent (2,4-12  $\mu$ m) und besitzt einen verhältnismäßig hohen nichtlinearen optischen Koeffizienten [Zon07].

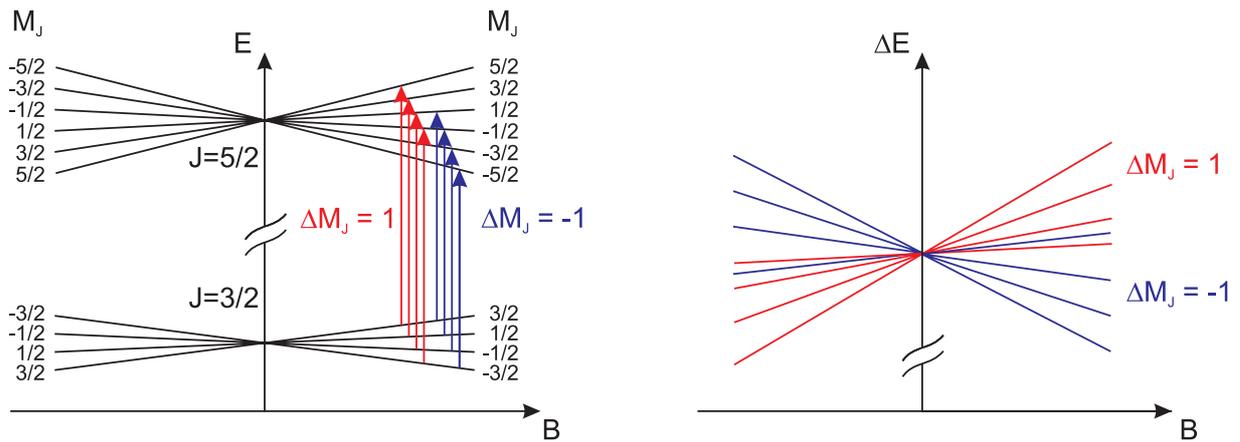
Es existieren weitere interessante Ansätze, wie DFG in einem OPO-Resonator [Che01] allerdings ist fraglich, ob diese extrem komplexen und damit teuren Systeme gegenüber den vergleichsweise einfachen QCL-Systemen konkurrenzfähig sein werden.

## 2.3. Faraday Modulationspektroskopie

In diesem Kapitel werden die Grundlagen der Faraday-Modulations-Spektroskopie vorgestellt, die zum Verständnis der in Kapitel 4.1 diskutierten Simulation der zu erwartenden Signale unverzichtbar sind.

FAMOS basiert auf der Drehung der Polarisations ebene linear polarisierten Lichtes in einem magnetischen Feld (Faraday-Effekt). Dieser Effekt ist bei Radikalen um Größenordnungen stärker als bei Molekülen, deren Hülle ausschließlich aus Elektronenpaaren besteht. Aus diesem Grund kann NO sehr empfindlich und ohne Querempfindlichkeiten zu anderen Molekülen wie beispielsweise Wasser oder Kohlendioxid nachgewiesen werden.

Die Drehung der Polarisations ebene kann mittels zweier gekreuzter Polarisatoren in eine



**Abbildung 2.6.:** Der Zeeman-Effekt beschreibt die Aufspaltung der Energieniveaus in einem äußeren Magnetfeld (links). Unter Berücksichtigung der quantenmechanischen Auswahlregel  $\Delta M_J = \pm 1$  führt dies zu einer Verschiebung der Resonanzfrequenzen der Übergänge (rechts).

Intensitätsänderung der genutzten Laserstrahlung umgewandelt werden, die mit einem empfindlichen Detektor nachweisbar ist (vgl. Abbildung 2.5). Wird darüber hinaus das Magnetfeld moduliert, so ist es möglich, einen Lock-in Nachweis zu nutzen.

Der Faraday-Effekt lässt sich aus dem Zeeman-Effekt herleiten, der im folgenden Abschnitt beschrieben werden soll.

### 2.3.1. Der Zeeman-Effekt

Der Zeeman-Effekt beschreibt die Aufhebung der Energieentartung eines Energieniveaus in einem äußeren Magnetfeld und die damit verbundene Aufspaltung der Übergangsfrequenzen [Hak96]. Die Zusatzenergie aufgrund des angelegten Magnetfeldes  $B$  ist abhängig von der magnetischen Quantenzahl  $M_J$  und dem gyromagnetischen Verhältnis  $g_J$ . Bei halbzahligen  $J$  kann  $M_J$  alle halbzahligen Werte zwischen  $-J$  und  $+J$  annehmen. Das Energieniveau spaltet also in  $2J + 1$  Niveaus auf. Die Zusatzenergie eines Übergangs in einem externen Magnetfeld berechnet sich nach

$$\tilde{E}(g_J, M_J, B) = (M_J \cdot g_J) \mu_B \cdot B \quad (2.2)$$

$\mu_B$  bezeichnet hierbei das Bohrsche Magneton. Der Spezialfall, dass alle  $g_J$  identisch sind, wird als normaler Zeeman Effekt bezeichnet, bei NO jedoch liegt eine starke Abhängigkeit von  $J$  vor, was aus historischen Gründen als anomaler Zeeman Effekt bezeichnet wird. Die Übergangsenergie berechnet sich zu

$$\begin{aligned}
 \Delta\tilde{E}(J',J'',M_{J'},M_{J''},B) &= \tilde{E}'(J',M_{J'},B) - \tilde{E}''(J'',M_{J''},B) \\
 &= (M_{J'}g_{J'} - M_{J''}g_{J''})\mu_B \cdot B
 \end{aligned}
 \tag{2.3}$$

Wenn die optische Achse parallel zum Magnetfeld verläuft, kann ein Lichtfeld aufgrund quantenmechanischer Auswahlregeln nur Übergänge anregen, für die sich die magnetischen Quantenzahlen  $M_J$  um  $+1$  oder  $-1$  unterscheiden. Hierbei spielt die Polarisation des Lichtes eine entscheidende Rolle: rechtszirkular polarisiertes Licht wechselwirkt ausschließlich mit Übergängen mit  $\Delta M_J = M_{J'} - M_{J''} = +1$ , für linkszirkular polarisiertes Licht muss  $\Delta M_J = -1$  gelten. Dies führt zu unterschiedlichen Übergangsenergien und mit  $\Delta\nu_0 = \Delta\tilde{E} \cdot \hbar$  zu verschobenen Resonanzfrequenzen.

Die Aufspaltung der Energieniveaus ist in Abbildung 2.6 illustriert. Die Übergänge für rechtszirkular polarisiertes Licht sind in rot, für linkszirkular polarisiertes Licht in blau dargestellt.

### 2.3.2. Der Faraday-Effekt

Die unterschiedliche Verschiebung der Übergänge für links- bzw. rechtszirkular polarisiertes Licht führt zu unterschiedlichen Brechungsindizes für die beiden Polarisationsrichtungen. Abbildung 2.7 illustriert diesen Umstand. Die Brechungsindizes für die beiden Polarisationsrichtungen setzen sich aus allen Komponenten zusammen, für die  $\Delta M_J = +1$  (rot) bzw.  $\Delta M_J = -1$  (blau) gilt. Diese Doppelbrechung führt wiederum zu einem Gangunterschied der beiden Komponenten nach Durchgang durch das Medium. Falls linear polarisiertes Licht in das Medium eingestrahlt wurde, führt dies zu einer Drehung der Polarisationssebene.

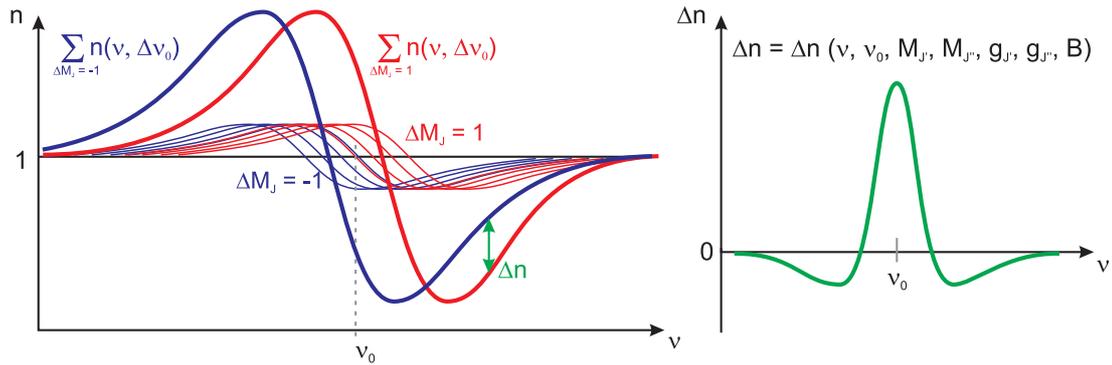
Die magnetisch induzierte Doppelbrechung eines Mediums und die damit verbundene Drehung linear polarisierten Lichtes wird als Faraday-Effekt bezeichnet.

Der Drehwinkel  $\alpha$  ergibt sich aus dem Unterschied der Brechungsindizes der beiden zirkularen Polarisationskomponenten des Laserlichtes nach

$$\alpha = \Delta n \cdot k_0 \cdot l
 \tag{2.4}$$

Hierbei ist  $\Delta n$  die Differenz der Brechungsindizes, die in Abbildung 2.7 dargestellt ist,  $k_0$  der Wellenvektor des Laserstrahls und  $l$  die Länge der Wechselwirkungsstrecke des Lichts mit dem Gas.

Zur Analyse des Rotationswinkels wird ein Polarisationsfilter, der fast senkrecht zur ursprünglichen Polarisationsrichtung des Lasers orientiert ist, eingesetzt. Die transmittierte



**Abbildung 2.7.:** Der Zeeman-Effekt bewirkt eine Verschiebung der Übergangsfrequenzen. Die beiden zirkularen Polarisationskomponenten setzen sich aus den verschiedenen Übergängen mit  $\Delta M_J = +1$  (rot) bzw.  $\Delta M_J = -1$  (blau) zusammen. Die Differenz  $\Delta n$  (rechts) ist proportional zur Drehung der Polarisations Ebene.

Laserleistung  $P(\alpha)$  ergibt sich aus der eingestrahlenen Leistung  $P_0$  nach

$$P(\alpha) = P_0 \sin(\alpha)^2 \approx P_0 \alpha^2 \quad (2.5)$$

Die Winkeldrehung aufgrund des Faraday-Effektes ist sehr gering (etwa  $10^{-4}^\circ$ ), daher ist auch die transmittierte Intensität bei gekreuzten Polarisatoren gering. Wird der Analysator aber um einen Winkel  $\phi$  aus der Senkrechten verkippt, ergibt sich für die transmittierte Leistung

$$P(\alpha) = P_0 \sin(\alpha + \phi)^2 \approx P_0(\phi^2 + 2\phi\alpha + \alpha^2) \approx P_0(\phi^2 + 2\phi\alpha) \quad (2.6)$$

Durch die Drehung des Analysators wird eine Vergrößerung des Signals um mehrere Größenordnungen erreicht. Allerdings erhöht sich auch die Hintergrundstrahlung ( $P_0\phi^2$ ). Das Signal-zu-Rausch Verhältnis muss also mittels des Analysatorwinkels optimiert werden.

### 2.3.3. Der Brechungsindex

Der Brechungsindex ergibt sich aus der Wechselwirkung des Lichtes mit den Molekülen im Gas. Ein einzelnes Molekül bewirkt in der Nähe einer Übergangsfrequenz ein Brechungsindexprofil [Dem00]

$$n'(\nu) = 1 + \frac{\nu - \nu_0}{\left(\frac{\gamma_p}{2}\right)^2 + (\nu - \nu_0)^2} \quad (2.7)$$

$\gamma_p$  ist dabei die volle Halbwertsbreite (engl.: FWHM), die sich aus



$$\gamma_p = \gamma \cdot p \left( \frac{T_0}{T} \right)^{T_c} \quad (2.8)$$

ergibt, wobei  $\gamma$  der Druckverbreiterungskoeffizient,  $p$  der Druck,  $T_0$  die Referenztemperatur (296 K),  $T$  die Temperatur und  $T_c$  der Koeffizient für die Temperaturabhängigkeit ist.

Aufgrund der thermischen Bewegung der Moleküle verschieben sich die Resonanzfrequenzen der Molekülübergänge durch den Doppler-Effekt, so dass für  $N$  wechselwirkende Moleküle die resultierende Dispersionsrelation eine Faltung aus der Gauß-Funktion  $G$  und dem Profil eines einzelnen Moleküls (Gleichung 2.7) ist

$$\begin{aligned} n(\nu) &= (n' * G)(\nu) \\ &= 1 + N \cdot \frac{\sqrt{\ln 2}}{\pi \sqrt{\pi}} \cdot \int_{-\infty}^{\infty} \frac{\nu - \tau - \nu_0}{\left(\frac{\gamma_p}{2}\right)^2 + (\nu - \tau - \nu_0)^2} \exp\left(-\frac{\tau^2}{\left(\frac{\gamma_d}{2\sqrt{\ln 2}}\right)^2}\right) d\tau \end{aligned} \quad (2.9)$$

Diese Faltung aus Lorentz- und Gauß-Profil wird als Voigt-Profil bezeichnet. Hierbei ist  $\gamma_d$  die Doppler-Linienbreite des Übergangs, die nur von der Temperatur  $T$ , der Masse  $m$  des Moleküls und der Übergangsfrequenz  $\nu_0$  abhängt:

$$\gamma_d = \frac{\nu_0}{c} \sqrt{\frac{8k_B T \ln 2}{m}} \quad (2.10)$$

Für NO im Bereich von 5,42  $\mu\text{m}$  bei Zimmertemperatur (293 K) liegt die Doppler-Linienbreite bei 152 MHz.

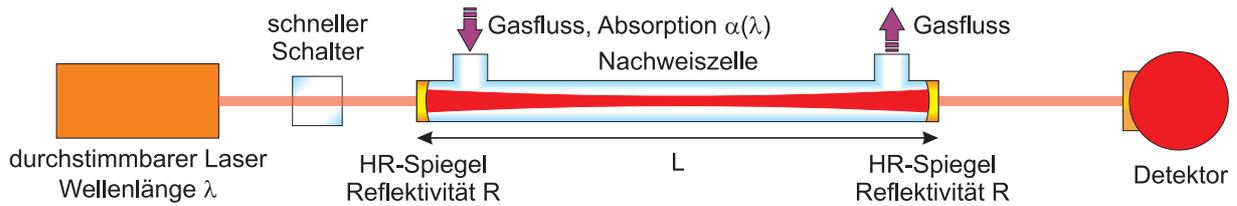
Ist die Linienbreite aufgrund der Druckverbreiterung deutlich größer als die Doppler-Linienbreite (ab etwa 100 mbar), kann die Dispersionslinie in guter Näherung als Lorentz-Linie betrachtet werden.

Mit Gleichung 2.9 und 2.4 sowie der Kenntnis der Übergangs- und Besetzungswahrscheinlichkeit der beteiligten Zustände kann nun der Brechungsindex für jeden Molekülübergang und jede Frequenz berechnet werden.

Ein wichtiges Ergebnis dieser Betrachtungen ist, dass die transmittierte Leistung  $P$  proportional zum Unterschied der Brechungsindizes  $\Delta n$  ist, der wiederum proportional zur Anzahl der wechselwirkenden Moleküle  $N$  ist:

$$P \propto \alpha \propto \Delta n \propto N \quad (2.11)$$

Die Messung der transmittierten Leistung kann also zur Bestimmung der Konzentration von NO-Molekülen dienen.



**Abbildung 2.8.:** Das Prinzip der Cavity Leak-Out Spektroskopie. Die wichtigsten Elemente sind ein durchstimmbarer Laser, der mittels eines Schalters schnell abgeschaltet werden kann, ein Resonator hoher Güte und ein Detektor.

## 2.4. Cavity Leak-Out Spektroskopie

### 2.4.1. Prinzip

Cavity Leak-Out Spektroskopie basiert auf der Absorptionsspektroskopie. Das Gesetz von Lambert und Beer beschreibt die Abschwächung eines Lichtstrahls beim Durchgang durch ein absorbierendes Medium:

$$I = I_0 \cdot e^{-\alpha(\lambda) \cdot l} \quad (2.12)$$

Hierbei ist  $I_0$  die einfallende und  $I$  die transmittierte Lichtintensität,  $\alpha(\lambda)$  der Absorptionskoeffizient, der von der Wellenlänge  $\lambda$  des einfallenden Lichtes abhängig ist und  $l$  die Länge des Absorbers.

Gase mit Konzentrationen im Bereich von wenigen ppb bis ppt (parts per trillion,  $10^{-12}$ ) erzeugen typischerweise Absorptionskoeffizienten in der Größenordnung von  $10^{-9}$  bis  $10^{-12} \text{ cm}^{-1}$ , womit deutlich wird, dass die direkte Messung der Lichtabschwächung bei Absorptionslängen von wenigen Metern schwer realisierbar ist.

Die Cavity Leak-Out Spektroskopie benutzt einen Resonator, um die Wechselwirkungstrecke eines Photons mit dem Absorber durch Vielfachreflexion zu erhöhen. Stimmt die Frequenz des Lasers mit der Resonanzfrequenz des Resonators überein, wird darin ein Lichtfeld erzeugt, das um ein Vielfaches stärker ist als der einfallende Laserstrahl. Dieses Lichtfeld wird anhand des durch den Resonator transmittierten Lichtes nachgewiesen. Übersteigt die Leistung im Resonator eine Schwelle, wird der Laser abgeschaltet und das Abklingen des Laserlichtes beobachtet. Eine schematische Darstellung des CALOS-Prinzips findet sich in Abbildung 2.8.

### 2.4.2. Berechnung des Absorptionskoeffizienten

Die Abschwächung des Laserlichtes aufgrund eines absorbierenden Gases zwischen den Spiegeln kann mittels des Lambert-Beer'schen Gesetzes 2.12 beschrieben werden. Eine



zusätzliche Abschwächung erfährt der Lichtstrahl durch jede Reflexion an einem der Spiegel. Hat das Licht im Resonator eine Strecke  $z$  zurückgelegt, wurde es  $n = z/L$  Mal reflektiert. Bezeichnet  $R$  die Reflektivität der Spiegel, so berechnet sich die Intensität des Lichtes bei einer zurückgelegten Strecke  $z$

$$\begin{aligned} I(z) &= I_0 \cdot e^{-\alpha(\lambda)z} \cdot R^{\frac{z}{L}} \\ &= I_0 \cdot e^{-\alpha(\lambda)z} \cdot e^{\frac{z}{L} \ln R} \\ &= I_0 \cdot e^{-\frac{z(1-R)}{L} - \alpha(\lambda)z} \end{aligned}$$

Hierbei wurde ausgenutzt, dass für  $R \approx 1$   $\ln R \approx -(1 - R)$  gilt. Mit  $z = c \cdot t$  ( $c$  ist die Lichtgeschwindigkeit) kann der zeitliche Verlauf der Intensität berechnet werden:

$$I(t) = I_0 \cdot e^{-\left(\alpha(\lambda) + \frac{(1-R)}{L}\right)ct}$$

Die Abklingzeit  $\tau(\lambda)$ , in der das Signal auf  $I_0/e$  abfällt

$$\frac{1}{\tau(\lambda)} = \alpha(\lambda) \cdot c + \underbrace{\frac{(1-R)}{L}}_{=: 1/\tau_0} \cdot c$$

kann also benutzt werden, den Absorptionskoeffizienten  $\alpha(\lambda)$  zu bestimmen, wenn die Abklingzeit ohne Absorber  $\tau_0$  bekannt ist:

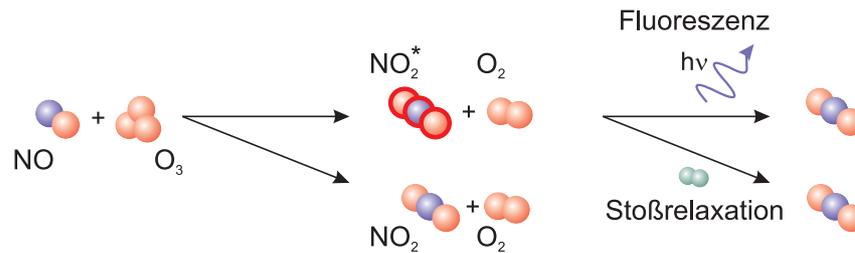
$$\alpha(\lambda) = \frac{1}{c} \left( \frac{1}{\tau(\lambda)} - \frac{1}{\tau_0} \right) \quad (2.13)$$

Diese Gleichung zeigt, dass der Absorptionskoeffizient absolut bestimmt werden kann - es ist also keine Kalibrierung des Systems notwendig. Darüber hinaus ist das Verfahren vollkommen unempfindlich gegenüber Intensitätsschwankungen des Lasers - während der eigentlichen Messung ist dieser nämlich ausgeschaltet.

## 2.5. Weitere Nachweismethoden

### 2.5.1. Elektrochemische Sensoren

Elektrochemische Sensoren bieten eine sehr kostengünstige Möglichkeit, verschiedene Gase bis in den niedrigen ppm-Bereich nachzuweisen. Zu den Gasen, die für kommerzielle Sensoren messbar sind, zählen CO, NO und Wasserstoff. Das Verfahren basiert auf einer Brennstoffzelle. Das zu messende Gas wird an der katalytischen Schicht der Arbeitselektrode oxidiert. Auf der Gegenseite wird an der Kathode Umgebungssauerstoff reduziert. Der aus



**Abbildung 2.9.:** Chemilumineszenzdetektion basiert auf der Reaktion von Ozon mit NO. Ein Teil des produzierten Nitrits befindet sich in einem angeregten Zustand. Bei der Relaxation ausgesendetes Fluoreszenzlicht kann mittels eines Detektors nachgewiesen werden.

der chemischen Reaktion resultierende Elektronenstrom kann über einen Lastwiderstand gemessen werden. Die elektrochemischen Reaktionen an den Katalysatoroberflächen sind komplexe temperaturabhängige chemische Prozesse, ebenso ist der durch die Zelle fließende Strom temperaturabhängig. Deshalb muss der Sensorstrom temperaturkompensiert oder der Sensor auf einer konstanten Temperatur gehalten werden.

Trotz des Auftretens von Querempfindlichkeiten erfreuen sich elektrochemische Sensoren aufgrund ihrer einfachen Handhabung und Kompaktheit in Kombination mit geringen Kosten in der medizinischen Grundlagenforschung großer Beliebtheit.

### 2.5.2. Chemilumineszenz

Chemilumineszenzdetektoren (CLD) gelten im NO-Nachweis als der „Goldstandard“. Die Empfindlichkeit kommerziell erhältlicher Geräte bewegt sich im niedrigen ppb-Bereich und sogar darunter, bei einer Zeitauflösung von wenigen Sekunden. Neben diesen Leistungsmerkmalen hat auch die einfache Bedienbarkeit und die kompakten Abmessungen zur Etablierung der Methode in der biomedizinischen Forschung beigetragen.

Die Methode basiert auf der Reaktion des nachzuweisenden NO mit Ozon zu  $\text{NO}_2$  (siehe Abbildung 2.9). Ein geringer Teil (etwa 10 %) des erzeugten  $\text{NO}_2$  befindet sich in einem angeregten Zustand. Eine Relaxation dieses Zustands kann unter Aussendung eines Fluoreszenzphotons erfolgen, das nachgewiesen werden kann. Ein strahlungsloser Konkurrenzprozess ist die Stoßrelaxation mit dem Gas in der Probe. Um diesen Prozess zu minimieren, findet die Reaktion bei niedrigem Druck statt.

CLD können nicht zwischen verschiedenen Isotopologen unterscheiden, da die Methode auf der oben beschriebenen chemischen Reaktion basiert, was zu einer unspezifischen Energie der erzeugten Fluoreszenz-Photonen führt. Der Nachweis ist aufgrund unterschiedlicher Stoßquerschnitte auch vom Trägergas abhängig.

Zur Evaluation wird in Kapitel 6.1 das CALO-Spektrometer mit einem kommerziell erhältlichen CLD verglichen.

# 3. Weiterentwicklung des Cavity Leak-Out Spektrometers

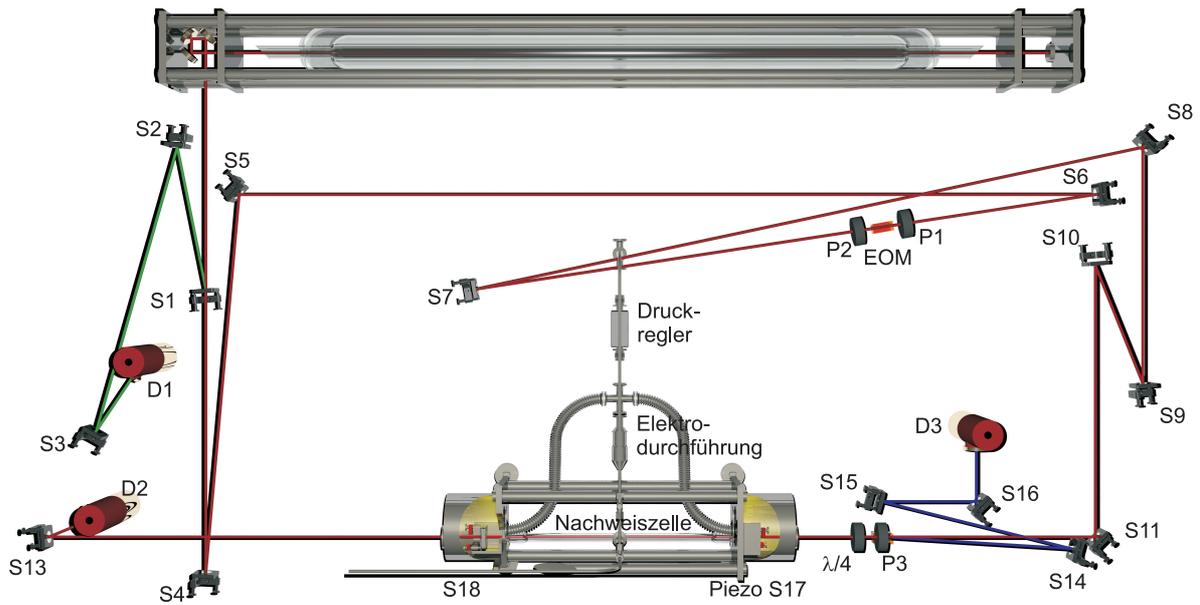
Das CALO-Spektrometer wurde im Verlauf verschiedener Arbeiten entwickelt. Möglichkeiten einer Weiterentwicklung ergeben sich hinsichtlich einer neuen Konstruktion der Nachweiszelle und einer Verbesserung des Stabilisierungsschemas, die in den folgenden Kapiteln diskutiert werden. Die aktuelle Software zur Auswertung der Abklingsignale wird schließlich analysiert und Änderungen diskutiert.

Den Abschluss dieses Kapitels bildet eine Aufstellung aller Ergebnisse der Optimierung des Spektrometers und ein Vergleich mit aktuellen Ergebnissen anderer Forschungsgruppen.

## 3.1. Versuchsaufbau

Als Laserquelle für das CALO-Spektrometer dient der CO-Laser, der bereits in Kapitel 2.2.1 beschrieben wurde. Von der erzeugten Strahlung werden etwa 4% am Strahlteiler S1 (s. Abbildung 3.1) getrennt, mittels eines zweiten Strahlteilers (S2, Reflektivität  $R \approx 4\%$ ) weiter abgeschwächt und mit dem Parabolspiegel S3 auf den Detektor D1 fokussiert. Die auf den Detektor auftreffende Leistung liegt im Bereich weniger  $100\ \mu\text{W}$ . In der Abbildung ist der Strahl, der zur Stabilisierung des Lasers dient, grün dargestellt.

Der Hauptteil des Lasers fällt zunächst auf den Spiegel S4 (Krümmungsradius  $r = 5\ \text{m}$ ) und wird von S5 auf S6 (Krümmungsradius  $r = 1\ \text{m}$ ) umgelenkt. Diese Kombination fokussiert den Laserstrahl in den elektrooptischen Modulator (EOM), wo durch nichtlineare Frequenzmischung des Laserstrahls mit einer Mikrowelle Seitenbänder erzeugt werden. Vor dem Eintritt in den EOM wird das Laserlicht durch den Polarisator P1 polarisiert. Die Seitenbänder werden mit zur ursprünglichen Welle senkrechter Polarisation erzeugt, so dass sie mittels des Polarisators P2 von der Fundamentalstrahlung getrennt werden können. Die Spiegel S7 (Krümmungsradius  $r = 1\ \text{m}$ ) und S9 ( $r = 1,5\ \text{m}$ ) dienen der Modenanpassung an den Resonator (Strahltaile im Zentrum des Resonators:  $r = 1006\ \mu\text{m}$ ). Hierbei wird auch die Linsenwirkung des Einkoppelspiegels S17 berücksichtigt. Die Planspiegel S8, S10



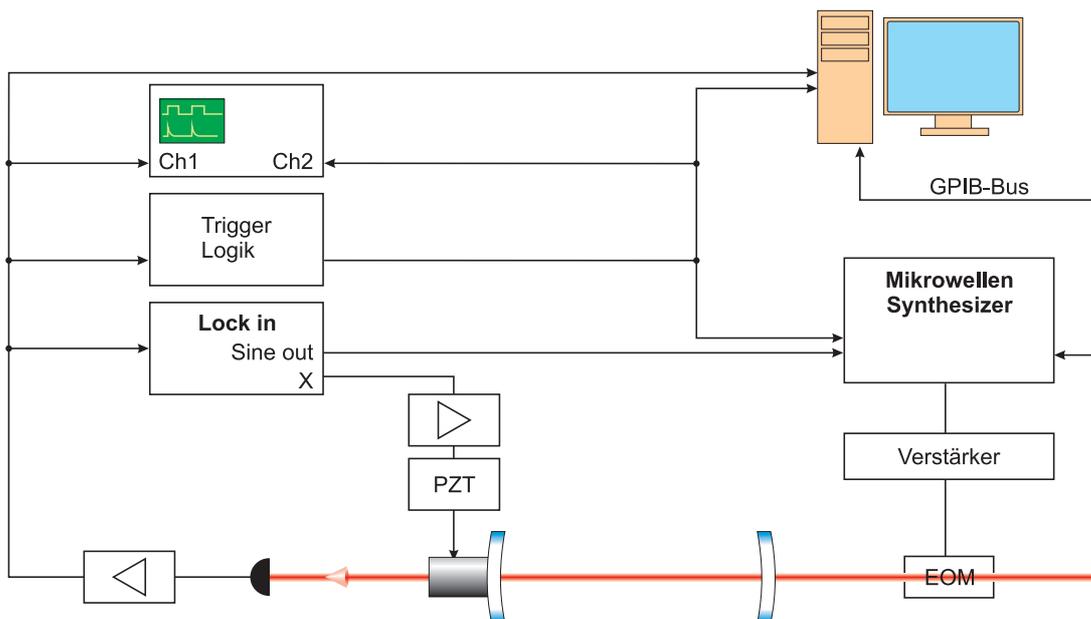
**Abbildung 3.1.:** Der optische Aufbau des optimierten CALOS-Spektrometers. rot: Strahlverlauf des Messtrahls, grün: Stabilisierung des Lasers auf das Maximum des Verstärkungsprofils, blau: Möglichkeit einer Pound-Drever-Hall Stabilisierung.

und S11 dienen zur Strahlführung. Nach Durchgang durch den Resonator wird der Strahl mittels eines Parabolspiegels in den Detektor D2 fokussiert.

Der Resonator wird mittels eines Piezos, auf dem der Einkoppelspiegel S17 montiert ist, in der Länge stabilisiert. Hierzu dient eine 1f-Lock In Stabilisierung, wobei die Mikrowellenfrequenz zur Erzeugung des Fehlersignals moduliert wird (Frequenz 300 Hz-1,2 kHz, Modulationstiefe 1,8 MHz). Das durch den Resonator transmittierte Signal wird mittels eines Lock-In Verstärkers demoduliert und auf den Piezo des Resonators zurückgekoppelt.

Das Signal am Detektor D2 wird vorverstärkt und vom Rechner mittels einer AD-Wandlerkarte (GageScope) aufgezeichnet. Es wird weiterhin an die Triggerlogik gegeben, die bei Überschreiten einer einstellbaren Schwelle einen Triggerpuls an die Mikrowelle und den Computer sendet (s. Abbildung 3.2). Mit Eintreffen des Pulses schaltet die Mikrowelle für einen Zeitraum von wenigen 10  $\mu\text{s}$  ab und der Computer beginnt mit der Aufzeichnung des Abklingsignals. Das Abklingsignal wird vom Speicher der AD-Wandlerkarte in den Hauptspeicher des Computers transportiert. Sobald dies geschehen ist, kann die Karte ein neues Signal aufnehmen. Gleichzeitig kann der Computer das zuvor eingelesene Signal auswerten. Hierzu wird ein schneller Fit-Algorithmus verwendet, der auf der Methode der sukzessiven Integration beruht [Hal04].

Mittels dieser Technik sind Signalraten von 2 kHz möglich, die im Wesentlichen durch die Geschwindigkeit des Computers und die mit steigender Modulationsfrequenz sinkende Resonatortransmission beschränkt sind.



**Abbildung 3.2.:** Das transmittierte Signal dient neben der Messung der Absorption auch der Stabilisierung des Resonators auf die Laserfrequenz, die mittels einer 1f Lock-In Technik realisiert ist. Die notwendige Modulation der Laserfrequenz erfolgt über den Mikrowellensynthesizer.

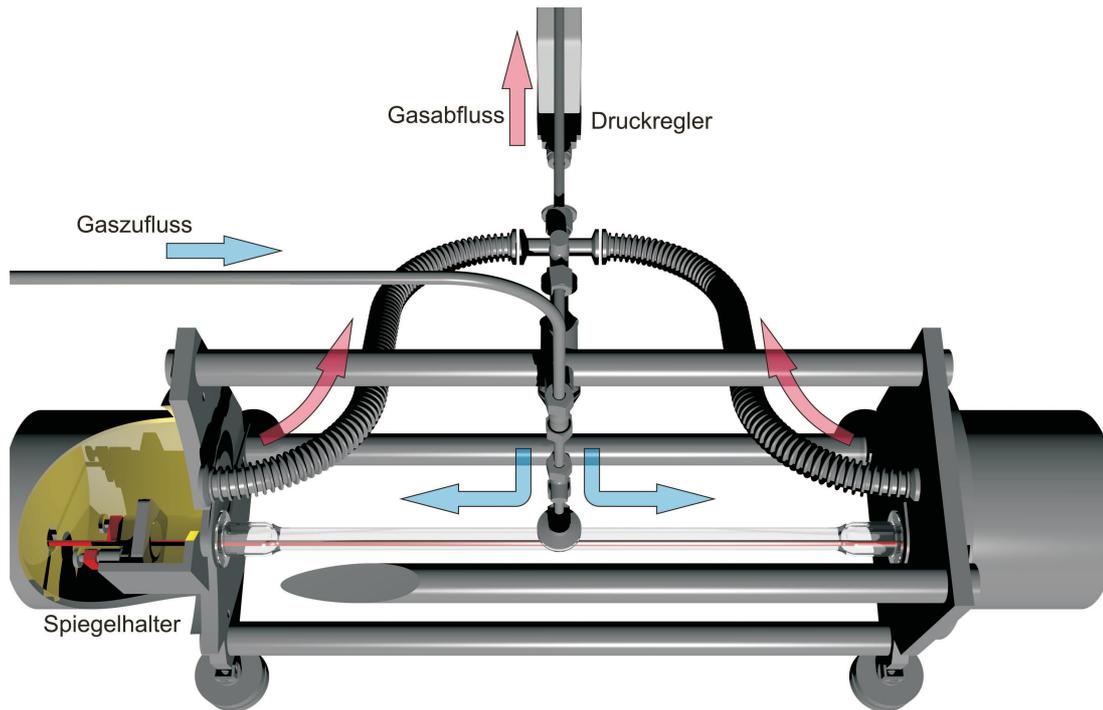
## 3.2. Eine neue Absorptionszelle

Die ursprüngliche Zelle bestand im Wesentlichen aus zwei Spiegelhaltern, die durch ein Edelstahlrohr verbunden waren. Beide Enden wurden durch Edelstahltöpfe abgeschlossen. Die Zelle wurde mit je drei Stahlschrauben in drei Halterungen fixiert [Kay99].

Durch die Stahlkonstruktion war die Zelle anfällig gegenüber Temperaturschwankungen, auch Erschütterungen konnten die Justierung der Zelle leicht so stark verschlechtern, dass eine Neujustierung erforderlich wurde. Eine Justierung der alten Zelle war aufwändig, da diese geöffnet sein musste, um die Spiegel zu bewegen. Nachdem aber die Vakuumentöpfe wieder montiert waren, führte dies zu einer Verbiegung des Rohrs, was durch eine schlecht berechenbare Justierung mittels der Halteschrauben korrigiert werden musste. Bereits eine Druckwelle durch ein zu schnelles Wechseln des Gasflusses durch die Zelle konnte die Spiegeljustierung verschlechtern.

Die Länge der Zelle betrug 73 cm, der Spiegelabstand 51 cm, womit ein freier Spektralbereich von 294 MHz gegeben war.

Die verbesserte Zelle ist in Abbildung 3.3 dargestellt. Sie besteht aus zwei InVar-Platten, die mit vier InVar-Stangen verbunden sind. Diese Platten stehen auf vier höhenverstellbaren InVar-Füßen. Invar (36 % Nickel, 64 % Eisen) ist eine Legierung, die bei einer Temperatur von 20-90 °C einen besonders geringen Längenausdehnungskoeffizienten von  $1,7 \cdot 10^{-6} \text{ K}^{-1}$  besitzt. Dieses InVar-Gerüst dient als Halterung für Spiegelhalter und



**Abbildung 3.3.:** Die Nachweiszelle besteht aus einem Invar-Gerüst, das als Halterung für die Spiegel und Vakuümtöpfe dient. Ein Glasrohr wird zwischen den beiden Enden eingeklemmt. Das Design verbindet eine gute Stabilität mit hoher Variabilität. Durch die motorisierten Spiegelhalter ist eine komfortable Justierung bei evakuierter Zelle möglich.

ein Vakuumrohr aus Glas, sowie Edelstahlköpfe, die die Enden abschließen. In den Vakuümtöpfen befinden sich Siliziumfenster, die für den Spektralbereich um  $5\ \mu\text{m}$  antireflexbeschichtet sind.

Die Spiegelhalter sind motorisiert (picomotor, Newfocus), so dass der Resonator auch bei evakuierter Vakuumkammer mittels eines Steuerprogramms justiert werden kann. Dies vereinfacht die Justierung drastisch – während die Justierung der Edelstahlzelle mehrere Stunden in Anspruch nahm und viel „Fingerspitzengefühl“ erforderte, ist die Justierung mit den motorisierten Spiegelhaltern im Allgemeinen in weniger als 20 min abgeschlossen, wobei einem einfachen Algorithmus gefolgt werden kann.

Die Zelle ist so konstruiert, dass die Vakuümtöpfe Platz für jeweils zwei Spiegelhalter bieten, so dass auch eine Bow-Tie Anordnung möglich ist – diese Möglichkeit wurde eingebaut, um zukünftige Experimente mit QCL, die anfällig gegen Rückkopplung der Laserstrahlung in den Laser sind, zu ermöglichen.

Durch Einsetzen verschiedener Verbindungsrohre (Durchmesser, Länge) kann darüber hinaus das Probenvolumen und der freie Spektralbereich variiert werden.

Zusammenfassend bringt die neue Konstruktion drei Vorteile mit sich:

1. erhöhte Stabilität gegenüber Temperaturschwankungen und Erschütterungen



2. vereinfachte Justierung bei evakuierter Zelle

3. hohe Variabilität

Neben der Konstruktion der Zelle wurde das Gasleitungssystem optimiert. Insbesondere dickere „Abgasschläuche“ (Wellschlauch,  $d = 25,4$  mm) und ein neuer integrierter Druckregler (Type 640, MKS Deutschland GmbH) sorgen für einen erhöhten maximalen Gasdurchfluss von 1600 sccm bei einem Druck zwischen 10 und 100 mbar. Abbildung 3.3 zeigt die Konstruktion der Zelle mit den Gaszu- und -abflüssen. Um den Resonatorspiegel im linken Teil der Vakuumkammer sehen zu können, wurde ein Teil des Vakuumtopfes und der Halteplatte ausgeschnitten. Zur Illustration wurde ein roter Laserstrahl eingezeichnet.

Die dielektrischen Spiegel (Substrat: Silizium, Reflektivität:  $R > 99,98$  %, Krümmungsradius:  $r = 6$  m) sind in einem Abstand von 55 cm angebracht, was zu einem freien Spektralbereich von 274 MHz führt.

### 3.3. Ergebnisse und Diskussion

Zur Charakterisierung der Stabilität des Spektrometers und deren Auswirkungen auf die Nachweisgrenze dienen Messungen der Allan-Varianz. Im Anschluss wird der Einfluss der Laserleistung auf die Nachweisgrenze untersucht sowie die Auswirkung der Detektorbandbreite und des verwendeten Auswertalgorithmus auf die Messergebnisse diskutiert.

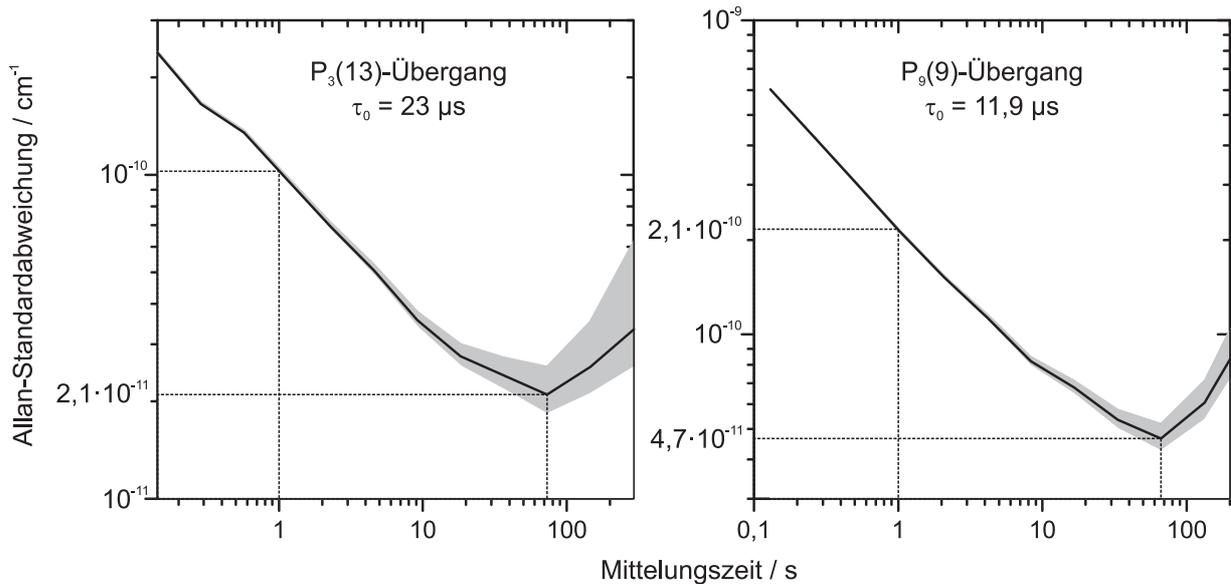
#### 3.3.1. Stabilität und rauschäquivalente Absorption

Die Allan-Varianz diente ursprünglich zur Analyse der Stabilität von Uhrwerken und Oszillatoren [All97]. Es handelt sich hierbei um eine Zwei-Wert Varianz, die durch

$$\sigma_y^2(\tau) = \frac{1}{2} \langle (y_{n+1} - y_n)^2 \rangle \quad (3.1)$$

definiert ist. Die eckigen Klammern bedeuten eine Mittelwertbildung. Bei der Anwendung der Allan-Varianz auf die Bestimmung der Absorption werden die Messwerte in  $n$  Gruppen geteilt.  $y_n$  ist dann der Mittelwert über die Werte der  $n$ -ten Gruppe,  $\tau$  ist die Zeit, die zur Aufnahme der Messwerte einer Gruppe benötigt wird.

Das Ergebnis einer solchen Analyse für den  $P_3(13)$ - und  $P_9(9)$ -Laserübergang ist in Abbildung 3.4 dargestellt, wobei hier die Wurzel aus der Allanvarianz – die Allan-Standardabweichung – gegen die Mittelungszeit  $\tau$  aufgetragen ist. Es zeigt sich zunächst ein Abfall bis zu einem Minimum, das für beide Linien bei 70 s liegt. Die Allan-Standardabweichung an diesem Punkt liegt bei  $2,1 \cdot 10^{-11} \text{ cm}^{-1}$  für die  $P_3(13)$ - und  $4,7 \cdot 10^{-11} \text{ cm}^{-1}$  für den  $P_9(9)$ -Laserübergang.



**Abbildung 3.4.:** Die Allan-Standardabweichungen (Quadratwurzel aus der Allanvarianz) wurden für die wichtigsten in dieser Arbeit behandelten Laserübergänge gemessen. Auf der  $P_3(13)$ -Linie ergibt sich daraus ein rauschäquivalenter Absorptionskoeffizient von  $\alpha = 1,0 \cdot 10^{-10} \text{ cm}^{-1} \text{ Hz}^{-1/2}$  und auf der  $P_9(9)$ -Linie von  $\alpha = 2,1 \cdot 10^{-10} \text{ cm}^{-1} \text{ Hz}^{-1/2}$ . Die Minima liegen bei beiden Linien bei etwa 70 s Mittelungszeit. Bei dieser Zeit beträgt der rauschäquivalente Absorptionskoeffizient  $\alpha = 2,1 \cdot 10^{-11} \text{ cm}^{-1}$  bzw.  $\alpha = 4,7 \cdot 10^{-11} \text{ cm}^{-1}$ .

Das Auftreten dieses Minimums ist dadurch zu erklären, dass sich die Mittelwerte zunächst durch längeres Mitteln aneinander annähern. Erst bei langen Mittelungszeiten wirken sich Driften im System aus, die die exaktere Bestimmung des Mittelwertes vereiteln. Eine Ursache solcher Driften kann z.B. eine Temperaturänderung im Labor sein.

Im Vergleich zum ursprünglichen Spektrometer hat sich die Mittelungszeit im Minimum der Allanvarianz versechsfacht, was auf den niedrigeren Längenausdehnungskoeffizienten der InVar-Konstruktion zurückgeführt werden kann. Dies ermöglicht deutlich längere Messzeiten und damit eine verbesserte Empfindlichkeit.

Auch die höhere mechanische Stabilität wirkt sich in einer niedrigeren rauschäquivalenten Absorption auf der  $P_9(9)$ -Linie von  $\alpha = 2,1 \cdot 10^{-10} \text{ cm}^{-1} / \text{Hz}^{1/2}$ , was zu einer Empfindlichkeit für NO von 23 ppt/ $\text{Hz}^{1/2}$  führt (vergleiche Kapitel 3.3.3). Im Vergleich zum Vorgängermodell mit  $\alpha = 3,0 \cdot 10^{-10} \text{ cm}^{-1} / \text{Hz}^{1/2}$  bedeutet dies eine Verbesserung um einen Faktor 1,5 [Hal05].

Die Messung auf dem  $P_3(13)$ -Laserübergang zeigt noch erheblich bessere Werte von  $\alpha = 4,7 \cdot 10^{-11} \text{ cm}^{-1} / \text{Hz}^{1/2}$ , was auf die mit der höheren Spiegelreflektivität zurückzuführende größere Abklingzeit ( $\tau_0 = 23 \mu\text{s}$ ) zurückzuführen ist.

Aus der rauschäquivalenten Absorption folgen die Nachweisgrenzen für CO und NO, deren Nachweis im Folgenden diskutiert wird.



### 3.3.2. CO-Nachweis: Empfindlichkeit und Querempfindlichkeit

Zur Analyse von  $^{13}\text{CO}$  wird das Spektrometer auf dem  $\text{P}_3(13)$ -Laserübergang betrieben. Die wesentlichen Parameter der Messung sind in Tabelle 3.1 zusammengefasst. Der zugängliche Frequenzbereich, der in Abbildung 3.5 dargestellt ist, hat einige Vorteile für die Spektroskopie von CO im Atem.

Die  $\text{P}(21)$ -Linie des  $^{13}\text{CO}$  bietet eine passende Absorption bei den zu erwartenden Konzentrationen. Die untere Nachweisgrenze ergibt sich aus der rauschäquivalenten Absorption und der Absorption von 1 ppb  $^{13}\text{CO}$  ( $2,976 \cdot 10^{-9} \text{ cm}^{-1}$ ). Die obere Nachweisgrenze ist durch die Detektorbandbreite gegeben, die für kleine Abklingzeiten die Signale verfälscht. Dies wird im späteren Verlauf dieses Kapitels ausführlicher diskutiert.

$^{13}\text{CO}$  Konzentrationen zwischen 0,34 ppb und 300 ppb (entspricht 30 ppb bis 30 ppm CO im natürlichen Isotopenverhältnis) können in diesem Frequenzfenster gemessen werden.

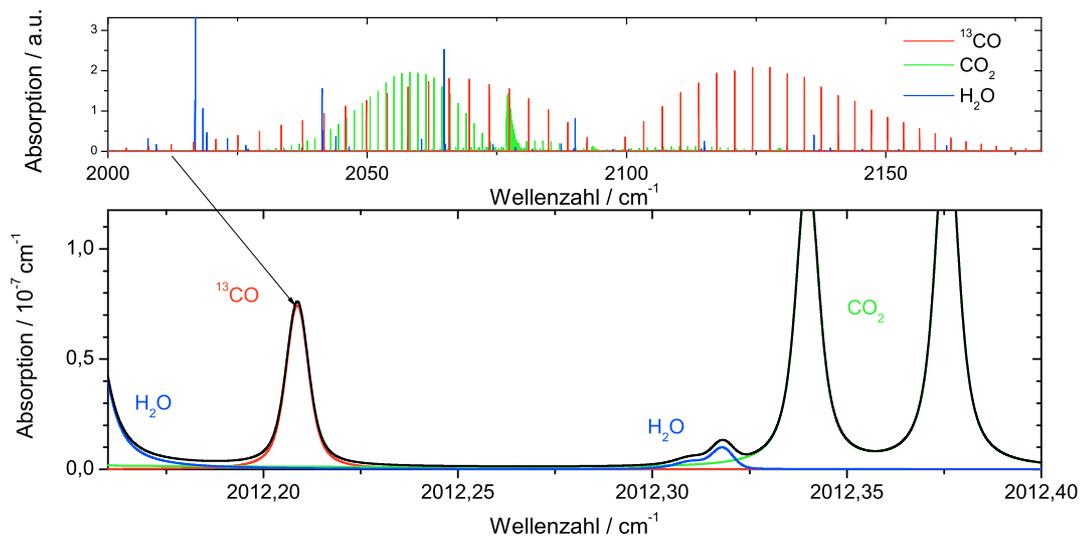
Ein Faktor, der speziell bei Atemgasmessungen berücksichtigt werden muss, ist die Querempfindlichkeit zu Wasser oder Kohlendioxid, da beide Gase in verhältnismäßig hohen Konzentrationen im Atem vorhanden sind. Querempfindlichkeiten werden durch einen Überlapp zwischen der interessierenden CO-Absorptionslinie und benachbarten  $\text{H}_2\text{O}$ - bzw.  $\text{CO}_2$ -Linien hervorgerufen.

Für normale Atemgaskonzentrationen ( $^{13}\text{CO}$ : 25 ppb,  $\text{CO}_2$ : 4 %) liegt die Erhöhung der CO-Konzentration aufgrund des Überlapps mit einer benachbarten  $\text{CO}_2$ -Linie bei 1,6 %. Dieser Fehler kann durch eine gleichzeitige Messung der  $\text{CO}_2$ -Konzentration mittels des Spirometers nachträglich korrigiert werden.

Die nächstgelegene Wasserabsorptionslinie ( $2012,154 \text{ cm}^{-1}$ ) kann bei Verwendung eines Nafion-Schlauches, der die Konzentration des Wassers im Atem auf etwa 0,1 % senkt, vernachlässigt werden, da der Überlapp mit CO sehr gering ist ( $< 0,1 \%$ ) und darüber hinaus die Wasserkonzentration im Gas, das das Spektrometer erreicht, während der Atmung konstant bleibt. Die Ursache hierfür ist die Kondensation von Wasser im Schlauchsystem vor dem NAFION-Schlauch während der Expirationsphasen. Umgebungsluft, die beim Einatmen in das Spektrometer strömt, nimmt dieses Kondensat auf, so dass nach Durchlaufen des NAFION-Schlauches die Konzentration konstant ist. In der Praxis zeigt sich, dass

Parameter	Wert	Parameter	Wert
Laserlinie	$\text{P}_3(13)$	Laserleistung	300 mW
Laserfrequenz	$2012,734 \text{ cm}^{-1}$	Übergangsfrequenz	$2012,209 \text{ cm}^{-1}$
Mikrowellenfrequenz	15736,4 MHz	Absorption (1 ppb)	$2,976 \cdot 10^{-9} \text{ cm}^{-1}$
$\tau_0$	23 $\mu\text{s}$	Druck	40 mbar
untere Nachweisgrenze	0,34 ppb	obere Nachweisgrenze	300 ppb

**Tabelle 3.1.:** Parameter zur Online-Analyse von  $^{13}\text{CO}$



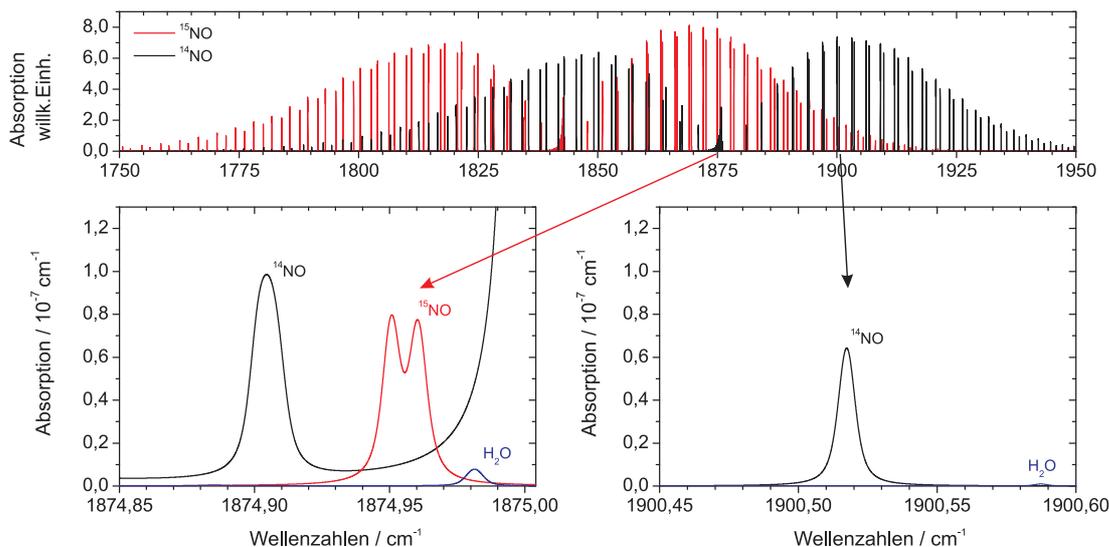
**Abbildung 3.5.:** Oben: Ein komplettes Rotations-Vibrationspektrum des  $^{13}\text{CO}$  Moleküls (rot). Zusätzlich sind die Wasser- und Kohlendioxid-Absorptionslinien dargestellt, die die CO-Linien teilweise überlagern. Unten: Die Überlagerung der P(21) Linie des  $^{13}\text{CO}$ -Moleküls durch Wasser kann vernachlässigt werden, wenn ein Nafion-Schlauch benutzt wird. Es gibt einen schwachen Überlapp mit der  $\text{CO}_2$ -Linie. Die Konzentration des Wassers beträgt hier 0,1 % und des  $\text{CO}_2$  4%. Den Graphen liegt die HITRAN-Datenbank zugrunde [Rot05].

Konzentrationsunterschiede im Bereich der 3-fachen Nachweisgrenze, also etwa 1 ppb gut nachgewiesen werden können.

### 3.3.3. NO-Nachweis: Empfindlichkeit und Querempfindlichkeiten

Der CO-Laser bietet auf dem  $\text{P}_8(9)$  Übergang einen guten Überlapp des oberen Seitenbandes des Lasers mit der  $\text{R}(6,5)$  Absorptionslinie bei  $1900,52\text{ cm}^{-1}$  des Hauptisotopologs. Bei einer Konzentration von 1 ppb NO und einem Druck von 40 mbar liegt das Maximum der Absorption bei  $6,43 \cdot 10^{-9}\text{ cm}^{-1}$ . Die rauschäquivalente Absorption liegt in diesem Bereich bei  $1,86 \cdot 10^{-10}\text{ cm}^{-1} \cdot \text{Hz}^{-1/2}$ , woraus sich eine rauschäquivalente Konzentration von  $29\text{ ppt} \cdot \text{Hz}^{-1/2}$  ergibt. Auch im Fall des NO gilt, dass die in der Praxis minimal nachweisbare Menge NO etwa der 3-fachen rauschäquivalenten Absorption, in diesem Fall also 0,1 ppb entspricht.

Abbildung 3.6 zeigt das komplette Spektrum (oben) sowie die Linien zum  $^{14}\text{NO}$ - (rechts) und zum  $^{15}\text{NO}$ -Nachweis (links). Im kompletten Spektrum sind beide Isotopologe in gleicher Konzentration dargestellt, da im natürlichen Isotopenverhältnis das  $^{15}\text{NO}$  nicht zu erkennen wäre. In dieser Arbeit wird die Freisetzung von NO aus Flüssigkeiten beschrieben, was dazu führt, dass das Gasgemisch, in dem NO nachgewiesen wird, große Wasserkonzentrationen aufweist. Nach der Trocknung des Gases in einem Nafion-Schlauch verbleiben



**Abbildung 3.6.:** Das obere Spektrum zeigt das komplette Fundamentalband von  $^{14}\text{NO}$  und  $^{15}\text{NO}$  bei identischen Gasmengen. Links unten ist das Spektrum im Bereich des  $\text{P}_9(9)$  Laserübergangs dargestellt. Im natürlichen Isotopenverhältnis gibt es einen deutlichen Überlapp der beiden Spezies. Soll nur  $^{14}\text{NO}$  gemessen werden, bietet sich die unten rechts dargestellte Absorptionslinie an, die keinen Überlapp zu Wasser zeigt. Druck: 50 mbar, NO-Konzentration: 10 ppb,  $\text{H}_2\text{O}$ -Konzentration: 0,1 %. Alle Spektren wurden mit dem Programm Spectmaster berechnet und basieren auf Daten aus der HITRAN-Datenbank.

die Wasserlinien, die in den unteren Graphen in blau eingezeichnet sind.

Zum Nachweis von  $^{15}\text{NO}$  wird der Laser auf dem  $\text{P}_9(9)$ -Übergang des Lasers betrieben. In diesem Spektralbereich findet sich die starke  $\text{R}(9,5)$   $^{15}\text{NO}$ -Doppellinie, die allerdings durch die (im natürlichen Isotopenverhältnis) deutlich schwächere Flanke der  $\text{Q}(6,5)$ -Linie des  $^{14}\text{NO}$  zum Teil überlagert wird. Die rauschäquivalente Absorption ist in diesem Spektralbereich  $2,1 \cdot 10^{-10} \text{cm}^{-1} \cdot \text{Hz}^{-1/2}$ , dies resultiert in einer Sensitivität von  $23 \text{ppt} \cdot \text{Hz}^{-1/2}$ . Die Absorption durch 1 ppb  $^{14}\text{NO}$  beträgt bei den Zentralfrequenzen des  $^{15}\text{NO}$ -Übergangs  $4 \cdot 10^{-12} \text{cm}^{-1}$ , aufgrund der größeren rauschäquivalenten Absorption ist eine  $^{14}\text{NO}$ -Konzentration unter 30 ppb also nicht messbar.

1 ppb  $^{15}\text{NO}$  erzeugt bei  $1874,95 \text{cm}^{-1}$  eine Absorption von  $7,97 \cdot 10^{-9} \text{cm}^{-1}$ . Wird die Absorption des  $^{14}\text{NO}$  nicht berücksichtigt, wird durch die Absorptionsmessung das  $^{15}\text{NO}$  also um  $5 \cdot 10^{-4} \text{ppb}(^{15}\text{NO})/\text{ppb}(^{14}\text{NO})$  zu hoch eingeschätzt. Im natürlichen Isotopenverhältnis bedeutet dies eine Fehleinschätzung um 14 %.

Bei Messungen, bei denen  $^{15}\text{NO}$  bei gleichzeitigem Vorhandensein von großen Mengen  $^{14}\text{NO}$  gemessen werden muss, also beispielsweise nahe dem natürlichen Isotopenverhältnis, ist es unbedingt erforderlich, auch die  $^{14}\text{NO}$ -Konzentration zu bestimmen. Ein Verfahren hierzu wurde in [Hal05] ausführlich dargestellt und soll im folgenden Abschnitt kurz beschrieben werden, da es für die Messungen in Kapitel 6.2 benötigt wird.

<sup>15</sup> NO-Nachweis			
Parameter	Wert	Parameter	Wert
Laserlinie	P <sub>9</sub> (9)	Laserleistung	350 mW
Laserfrequenz	1874,452 cm <sup>-1</sup>	Übergangsfrequenz	1874,951 cm <sup>-1</sup>
Mikrowellenfrequenz	14973,0 MHz	Absorption (1 ppb)	7,974 · 10 <sup>-9</sup> cm <sup>-1</sup>
τ <sub>0</sub>	11,9 μs	Druck	40 mbar
untere Nachweisgrenze	0,023 ppb	obere Nachweisgrenze	0,1 ppm

<sup>14</sup> NO-Nachweis			
Parameter	Wert	Parameter	Wert
Laserlinie	P <sub>8</sub> (9)	Laserleistung	350 mW
Laserfrequenz	1900,043 cm <sup>-1</sup>	Übergangsfrequenz	1900,517 cm <sup>-1</sup>
Mikrowellenfrequenz	14236,0 MHz	Absorption (1 ppb)	6,430 · 10 <sup>-9</sup> cm <sup>-1</sup>
τ <sub>0</sub>	14,7 μs	Druck	40 mbar
untere Nachweisgrenze	0,029 ppb	obere Nachweisgrenze	0,1 ppm

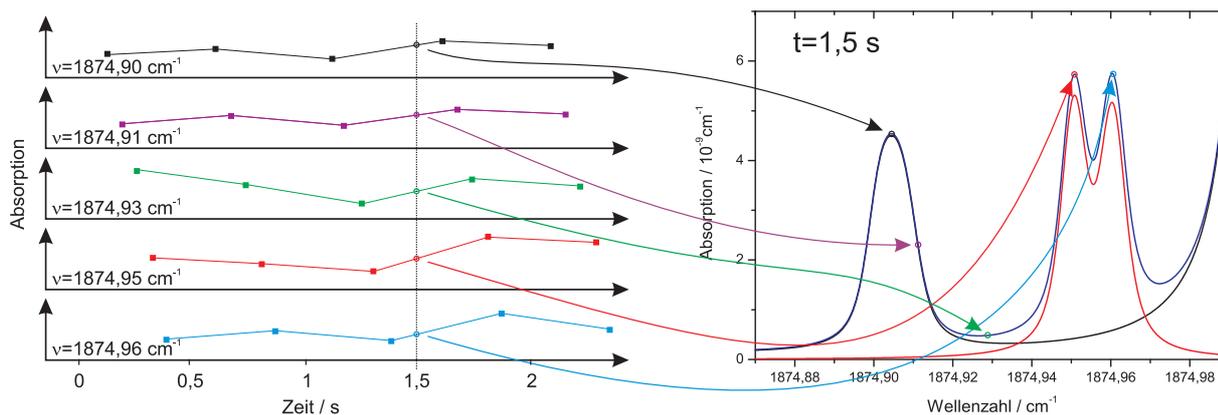
**Tabelle 3.2.:** Parameter zur Online-Analyse von <sup>14</sup>NO und <sup>15</sup>NO

### Gleichzeitiger Nachweis

Genauer ausgedrückt ist der gleichzeitige Nachweis der beiden Isotopologe ein abwechselnder Nachweis auf verschiedenen Frequenzen. Durch ein schnelles Wechseln können mit dem Spektrometer mehrere charakteristische Punkte des Spektrums in weniger als einer Sekunde gemessen werden. Allerdings wird hierdurch die Empfindlichkeit des Spektrometers aufgrund der kürzeren Messzeit pro Frequenz und der Totzeit während des Frequenzwechsels reduziert. Abbildung 3.7 zeigt den Frequenzbereich der Messung, wobei die Frequenzen, auf denen gemessen wird, markiert sind.

Aus den Absorptionmessungen wird für eine diskrete Menge von Zeitpunkten jeweils ein Spektrum erzeugt. Hierzu wird die Absorption für jeden Zeitpunkt aus den Messungen linear interpoliert (vgl. Abb. 3.7, links). An die so erzeugten Spektren wird mittels der Methode der kleinsten Fehlerquadrate jeweils ein Absorptionsspektrum mit unabhängigen Konzentrationen des <sup>14</sup>NO, <sup>15</sup>NO und eines konstanten Untergrunds angepasst (Abb. 3.7, rechts). Diese Prozedur wird durch ein Mathematica-Programm (s. Anhang B.2) für alle Zeitpunkte durchgeführt. Das Ergebnis wird in einer ASCII-Datei gespeichert und kann mittels der Datenanalysesoftware Origin weiterverarbeitet werden.

Durch das Messen auf verschiedenen Frequenzen ist die Messzeit pro Frequenz deutlich reduziert: Innerhalb einer Sekunde kann auf allen Frequenzen gemessen werden, allerdings benötigt der Mikrowellensynthesizer zum Umschalten zwischen zwei Frequenzen etwa 100 ms, was zu einer effektiven Messzeit von 500 ms führt, die auf fünf Frequenzen aufgeteilt ist, es ergibt sich also eine Messzeit pro Frequenz von lediglich 100 ms.



**Abbildung 3.7.:** Aus den Absorptionsmessungen wird die Absorption zu einem bestimmten Zeitpunkt  $t_i$  durch lineare Interpolation bestimmt (links). Zu diesen Absorptionswerten werden die zugehörigen NO-Konzentrationen mittels der Methode der kleinsten Fehlerquadrate ermittelt (rechts). Dargestellt sind die Messpunkte sowie die  $^{14}\text{NO}$ -Konzentration (schwarz), die  $^{15}\text{NO}$ -Konzentration (rot) und die Summe (blau).

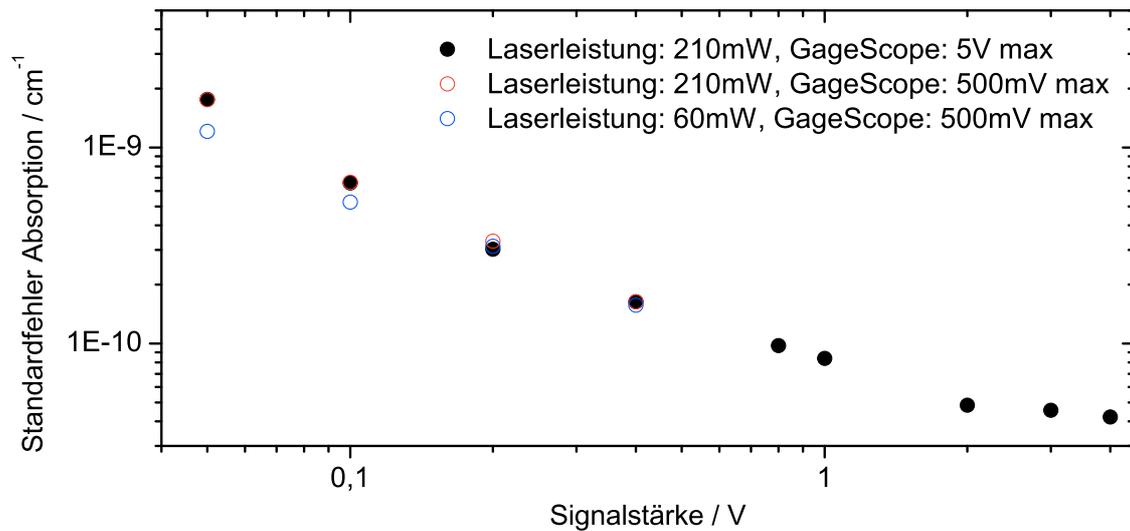
Aufgrund der geringeren Messzeit liegt die rauschäquivalente Konzentration mit diesem Verfahren bei  $1,7 \text{ ppb/Hz}^{1/2}$   $^{14}\text{NO}$  und bei  $0,9 \text{ ppb/Hz}^{1/2}$   $^{15}\text{NO}$ . In der Praxis sind wiederum Konzentrationen unterscheidbar, die dem 3-fachen dieser Werte entsprechen. Eine Anwendung dieser Technik wird in Kapitel 6.2 diskutiert.

### 3.3.4. Laserleistung und Transmission

Der Vergleich der Allan-Varianzen bei unterschiedlichen Abklingzeiten im vorangegangenen Abschnitt zeigt, dass eine höhere Abklingzeit zu einer niedrigeren Nachweisgrenze führt, und das trotz einer geringeren transmittierten Leistung. Auf dem  $P_3(13)$ -Übergang beträgt die Signalamplitude auf dem Detektor  $100 \text{ mV}$ , auf dem  $P_9(9)$ -Übergang hingegen  $1 \text{ V}$ .

Es stellt sich die Frage, ob eine Erhöhung der Laserleistung, die mit dem Einbau eines neuen Lasersystems verbunden wäre, eine signifikante Verbesserung der Nachweisempfindlichkeit bewirken würde.

Um diese Fragestellung zu untersuchen, wurde der Standardfehler in Abhängigkeit von der Signalhöhe gemessen. Der Standardfehler ist definiert als der Quotient aus der Standardabweichung und der Wurzel aus der Anzahl der Einzelmessungen. Bei der Messzeit von  $100 \text{ s}$  und der Datenrate von  $1,3 \text{ kHz}$  wurde folglich über  $1,3 \cdot 10^5$  Messwerte gemittelt. Der Laser wurde auf dem  $P_{10}(8)$ -Übergang betrieben, da hier neben einer hohen Laserleistung eine hohe Resonatortransmission vorhanden ist, die auf die niedrigere Reflektivität der Spiegel zurückzuführen ist. Durch die Kombination aus hoher Transmission und Leistung ist ein Detektorsignal von bis zu  $5 \text{ V}$  erreichbar. Durch eine Veränderung

Laserlinie: 10P8, oben, Abklingzeit: 7,2  $\mu$ s


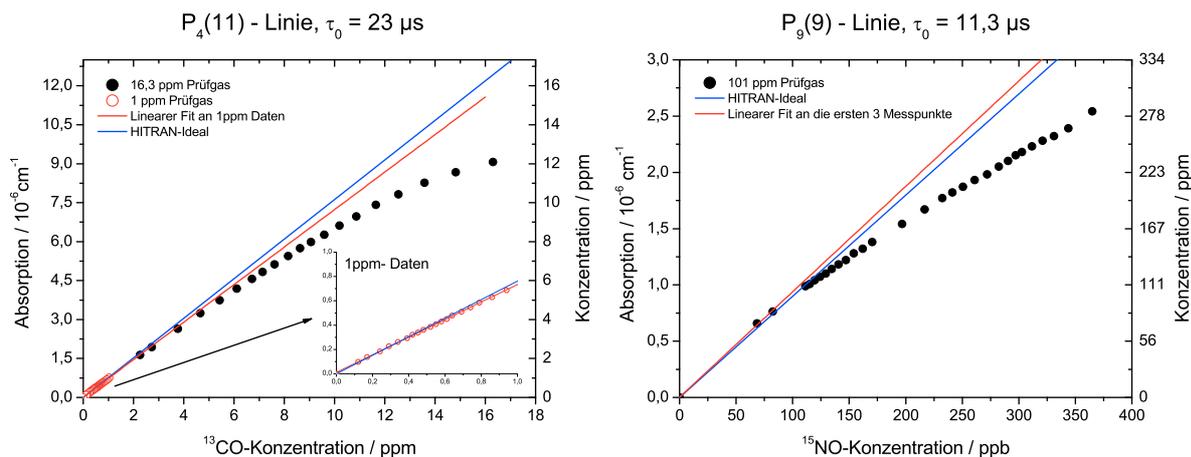
**Abbildung 3.8.:** Bei kleinerer Signalamplitude wächst der Standardfehler an, allerdings hat der Digitalisierungsbereich des AD-Wandlers keinen messbaren Effekt auf den Standardfehler. Gemessen wurde auf dem  $P_{10}(8)$ -Übergang des CO-Lasers bei 210 mW (schwarze und rote Kreise) bzw. 60 mW (blaue Kreise), jeweils für 100 s. Die Abklingzeit beträgt auf dieser Linie 7,2  $\mu$ s.

der Schwellspannung, bei der der Laser abgeschaltet wurde, konnte die Signalhöhe eingestellt werden. Abbildung 3.8 zeigt das Ergebnis dieser Messung. Bei Signalstärken von über 2 V zeigt die Kurve einen flachen Verlauf und liegt bei  $(4 \pm 1) \cdot 10^{-11} \text{ cm}^{-1}$ . Unterhalb von 2 V steigt der Standardfehler stark an und erreicht bei einer Signalstärke von 50 mV einen Wert von  $1,8 \cdot 10^{-9} \text{ cm}^{-1}$ , also das mehr als das zwanzigfache des Fehlers bei hohen Signalstärken.

Der höhere Standardfehler bei niedrigen Signalamplituden wird durch das Detektorrauschen verursacht, dessen Bedeutung mit zunehmender Signalstärke abnimmt. Das Digitalisierungsrauschen der Analog-Digital-Wandlerkarte ist unbedeutend, was ein Vergleich von zwei unterschiedlichen Messbereichen zeigt. In Abbildung 3.8 sind zwei Messbereiche dargestellt: Rote Kreise stehen für einen Messbereich von 500 mV, schwarze Punkte für 5 V.

Für Messungen von NO, die auf der  $P_9(9)$ -Linie durchgeführt werden, wird also eine Steigerung der Laserleistung zu einer Verbesserung der Nachweisempfindlichkeit von etwa einem Faktor 2 führen, da hier leicht Signalhöhen von 1 V erreicht werden.

Für die Bestimmung von CO auf der  $P_3(13)$ -Linie liegt die Signalhöhe aufgrund der höheren Spiegelreflektivität allerdings bei etwa 100 mV. Die Auswirkungen einer Steigerung der Laserleistung auf das Signalrauschen wären drastisch: Bei gleichen Strahlei-



**Abbildung 3.9.:** Die endliche Bandbreite des Detektors führt zu einer Vergrößerung der gemessenen Abklingzeit bei hohen Prüfgaskonzentrationen, also kleinen Abklingzeiten. Links: CO auf der  $P_4(11)$ -Linie. Es wurde eine geringe Konzentration (1 ppm, rote Kreise) und eine hohe Konzentration (16 ppm, schwarze Kreise) benutzt, um sicherzustellen, dass der beobachtete Effekt nicht auf Fehler im Mischsystem zurückzuführen ist. Die blauen Linien zeigen die erwartete Konzentration aufgrund der HITRAN-Daten, die roten Linien sind lineare Regressionen an die Messwerte bei kleinen Prüfgaskonzentrationen.

genschaften wie beim CO-Laser würde eine Steigerung der Laserleistung auf 6 mW eine Verbesserung der Nachweisempfindlichkeit von mehr als einer Größenordnung bewirken.

Wird die rauschäquivalente Absorption bei einer Abklingzeit von  $23 \mu\text{s}$  als Basis für eine Extrapolation der Nachweisgrenze für NO genommen ( $4,7 \cdot 10^{-11} \text{ cm}^{-1}/\text{Hz}^{1/2}$ ), und die durch eine Erhöhung der Laserleistung zu erwartende Verbesserung der Nachweisgrenze berücksichtigt ( $1/15$ ), so liegt die erreichbare Nachweisgrenze bei 0,4 ppt NO (beide Isotopologe) und 23 ppt CO.

Diese Verbesserung betrifft die untere Nachweisgrenze und würde die obere Nachweisgrenze nicht beeinflussen, sie würde also den Dynamikbereich des Spektrometers erweitern. Liegt das Interesse ausschließlich bei möglichst niedrigen Nachweisgrenzen, so lässt sich die Nachweisgrenze für CO noch dadurch verbessern, dass eine stärkere Absorptionslinie gewählt wird. Die stärkste CO-Absorptionslinie R(7) ist 15 mal stärker als die hier genutzte P(21)-Linie. Auf dieser Linie würde also eine Nachweisgrenze von 1,5 ppt möglich sein. Durch die Einschränkung im Dynamikbereich ist auf einer solchen Linie allerdings kein Nachweis von CO im menschlichen Atem möglich.

Für NO besteht diese Möglichkeit nicht, da der Nachweis bereits auf den stärksten Absorptionslinien erfolgt.

### 3.3.5. Bandbreiteneffekte

Typische Abklingzeiten bei dem hier vorgestellten Spektrometer liegen im Bereich zwischen 3 und 25  $\mu\text{s}$ . Die Bandbreite der Kombination aus InSb-Detektor und Verstärker liegt bei diesem Aufbau bei 1 MHz. Dies wirft die Frage auf, inwiefern die Bandbreite der Detektor-Verstärker-Kombination das Abklingsignal beeinflusst.

Um dies zu untersuchen, wurden auf relevanten Absorptionslinien von CO und NO Messungen durchgeführt, bei denen Prüfgase in verschiedenen Verdünnungsstufen analysiert wurden. Bei diesen Messungen zeigte sich, dass das Spektrometer im Bereich niedriger Konzentrationen und somit hoher Abklingzeiten eine lineare Abhängigkeit zwischen Prüfgaskonzentration und gemessener Absorption aufweist.

Bei hohen Prüfgaskonzentrationen zeigt sich allerdings ein Abknicken vom linearen Verlauf (s. Abbildung 3.9). Dieses Abknicken ist auf die Detektorbandbreite zurückzuführen – bei weiter abfallender Abklingzeit ist zu erwarten, dass die Kurve gegen die Abklingzeit der Detektor-Verstärker-Kombination konvergiert.

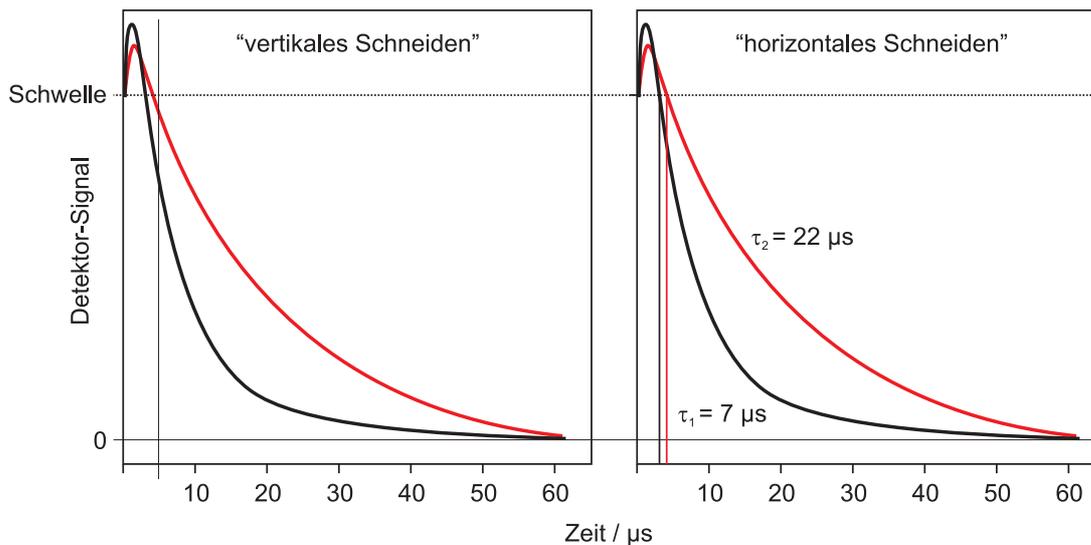
Als Konsequenz ist festzuhalten, dass das Spektrometer nur im linearen Bereich der dargestellten Kurven betrieben werden kann, also bis 2 ppm  $^{13}\text{CO}$  auf der  $\text{P}_4(11)$ -Linie, bis 300 ppb  $^{13}\text{CO}$  auf der  $\text{P}_3(3)$ -Linie, und jeweils bis zu 100 ppb  $^{14}\text{NO}$  und  $^{15}\text{NO}$  auf der  $\text{P}_8(9)$  bzw.  $\text{P}_9(9)$ -Linie. Auf der  $\text{P}_9(9)$ -Linie kann darüber hinaus auch bis zu 30 ppm  $^{14}\text{NO}$  gleichzeitig mit  $^{15}\text{NO}$  gemessen werden.

### 3.3.6. Optimaler Fit-Bereich

Sobald die transmittierte Laserleistung eine Schwelle überschreitet, wird ein Triggerpuls ausgelöst und die AD-Wandlerkarte nimmt  $n = 1024$  Punkte mit einer Sample-Rate von  $f = 10$  MHz auf. Gleichzeitig wird die Mikrowelle und damit das Seitenband ausgeschaltet. Das Detektorsignal steigt unmittelbar nach dem Abschalten für wenige  $\mu\text{s}$  weiter an (s. Abbildung 3.10), so dass für die Auswertung des exponentiellen Abfalls der korrekte Startzeitpunkt gefunden werden muss.

Eine einfache Möglichkeit ist, einen festen Teil des Anfangs des Signals abzuschneiden und den verbleibenden exponentiellen Abfall an die Fit-Routine zu übergeben („vertikales Schneiden“). Der Teil des Signals, der nicht berücksichtigt wird, wird dabei der Abklingzeit der leeren Zelle angepasst und beträgt bei einer Abklingzeit von 11  $\mu\text{s}$  30 Punkte und bei 25  $\mu\text{s}$  70 Punkte.

Diese Methode führt allerdings dazu, dass bei großen Absorptionen ein großer Teil des Abklingsignals abgeschnitten wird und das Signal, aus dem die Abklingzeit bestimmt wird, nahe bei 0 liegt, was zu einem Überschätzen der Abklingzeit führt und somit zu einem Unterschätzen der Absorption.



**Abbildung 3.10.:** Zwei Möglichkeiten der Auswertung von Abklingsignalen. Beim „vertikalen Schneiden“ wird ein fester Zeitpunkt zum Abschneiden des Beginns der Abklingsignale gewählt. Beim „horizontalen Schneiden“ wird das Signal beim Unterschreiten der Schwelle abgeschnitten. Hierdurch werden Signale mit unterschiedlichen Abklingzeiten bei verschiedenen Zeitpunkten abgeschnitten.

Eine zweite Möglichkeit besteht darin, das Signal ab dem Zeitpunkt auszuwerten, ab dem das Signal nach dem Überschreiten der Schwelle wieder unter die Schwelle abfällt („horizontales Schneiden“). Vorteile bringt diese Methode aber erst bei Messungen außerhalb des linearen Bereichs (Vgl. Abb. 3.11).

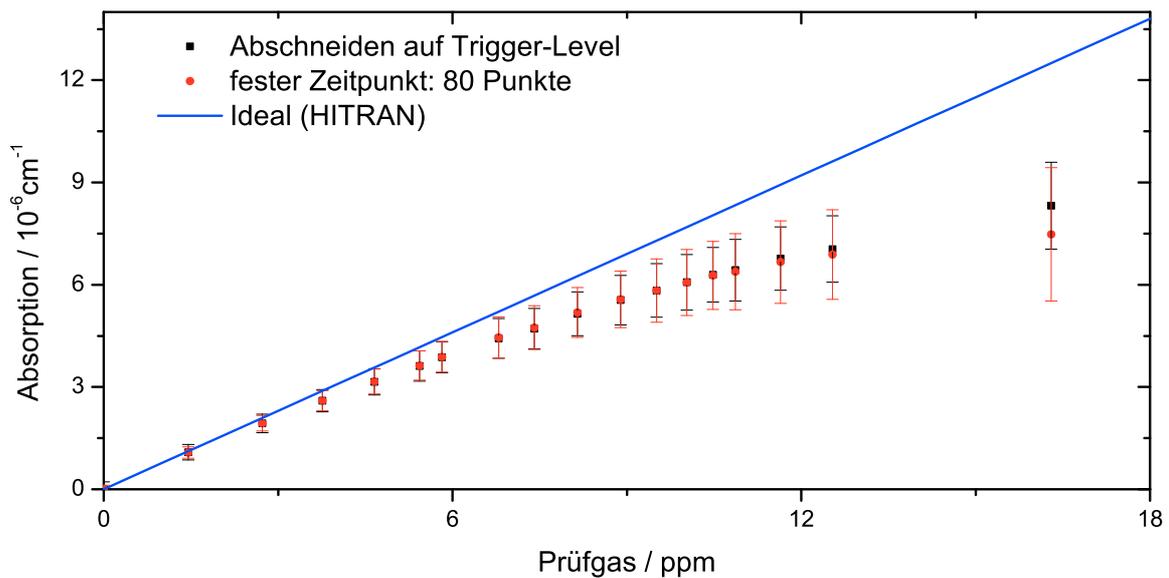
Bei Messungen im unteren Empfindlichkeitsbereich zeigt sich, dass die Standardabweichung beim Mitteln über viele Abklingzeiten bei dieser Technik größer ist, als beim vertikalen Schnitt. Darüber hinaus ist der Zeitaufwand größer, da der Schnittpunkt erst bestimmt werden muss, bevor die Fit-Routine starten kann, was zu einer geringeren Datenrate und damit zu einer geringeren Präzision führt.

Da in dieser Arbeit im Wesentlichen im linearen Bereich gearbeitet wurde, wurde der Schnitt zu einem festen Zeitpunkt (30 Datenpunkte bzw.  $3 \mu\text{s}$  für NO, 70 Datenpunkte bzw.  $7 \mu\text{s}$  für CO) für die hier aufgeführten Messungen verwendet.

### 3.3.7. Weitere Fehlerquellen

Neben den bisher diskutierten Fehlerquellen gibt es eine Reihe weiterer Faktoren, die für Unsicherheiten in der Bestimmung der Konzentration einer Gasprobe sorgen.

Zur Bestimmung der Gaskonzentration aus den Absorptionskoeffizienten kann einerseits die HITRAN-Datenbank genutzt werden, andererseits kann auch ein zertifiziertes Prüfgas genutzt werden, um das Spektrometer zu kalibrieren. In beiden Fällen liegt die Unsicher-



**Abbildung 3.11.:** Zum Vergleich von horizontalem (schwarz) mit vertikalem (rot) Schneiden wurde die Absorption in Abhängigkeit von der Konzentration gemessen. Es zeigt sich, dass die Standardabweichung beim vertikalen Schneiden im linearen Bereich der Kurve kleiner ist als beim horizontalen Schneiden. Das horizontale Schneiden ergibt erst bei Konzentrationen außerhalb des linearen Bereichs bessere Werte.

heit der Bestimmung der Konzentration bei 5 %.

Sollen Stoffmengen bestimmt werden, wird der Gasfluss der untersuchten Proben wichtig. Die Bestimmung des Gasflusses ist mit den verwendeten Massenflussreglern mit einer Unsicherheit von 2 % des maximalen Gasflusses möglich. Wird nicht mit dem maximalen Fluss gearbeitet, so erhöht sich die relative Messunsicherheit.

### 3.3.8. Vergleich mit anderen laserspektroskopischen Methoden

Neben CALOS gibt es eine Reihe anderer Ansätze der Laserspektroskopie zum Nachweis von NO. Tabelle 3.3 gibt einen Überblick über die Nachweisgrenzen und Zeitauflösungen der Methoden. Die einfachste Methode ist der einfache Durchgang durch eine Absorptionzelle, wodurch bereits eine Nachweisgrenze von 100 ppb erreicht werden kann [Wys05b]. Durch eine Verlängerung des Strahlweges durch die Probe und durch die Verwendung von Mehrfachreflexionszellen oder Resonatoren werden um Größenordnungen bessere Ergebnisse im sub-ppb Bereich erzielt [Nel02, McC07, McM06].

Für den Nachweis von CO finden sich in der Literatur Veröffentlichungen über das Hauptisotopolog, das aus dem menschlichen Atem nachgewiesen wurde. Hierbei wurden sowohl Probenbeutel genutzt [Lee94], als auch Echtzeit-Atemmessungen durchgeführt [Moe06]. Die Nachweisempfindlichkeit lag bei beiden Veröffentlichungen im ppb-Bereich.



Lasertyp	Methode	Molekül	Nachweisgrenze ppb	Integr. Zeit s	Referenz
pulsed-QCL	LAS single-pass	$^{14}\text{NO}$	100	1	[Wys05b]
pulsed-QCL	LAS multi-pass	$^{14}\text{NO}$	0,12	1	[Nel02]
cw-QCL	off-axis ICOS	$^{14}\text{NO}$	0,4	1	[McC07]
cw-QCL	LAS	$^{14}\text{NO}$ , $^{15}\text{NO}$	nicht spezifiziert		[Yi06]
cw-QCL	LAS multi-pass	$^{14}\text{NO}$	0,03	30	[McM06]
CO-Laser	PAS	$^{14}\text{NO}$	1	n. spez.	[Mur05]
Farbstoff	REMPI	$^{14}\text{N}^{18}\text{O}$	13	n. spez.	[Goe90]
pulsed-QCL	LAS single-pass	$^{12}\text{CO}$	175	0,2	[Moe06]
Diodenlaser	LAS double-pass	$^{12}\text{CO}$	< 1000	n. spez.	[Lee94]
CO-Seitenb.	CALOS	$^{14}\text{NO}$	0,029	1	—
CO-Seitenb.	CALOS	$^{15}\text{NO}$	0,023	1	—
CO-Seitenb.	CALOS	$^{13}\text{CO}$	0,34	1	—

**Tabelle 3.3.:** Vergleich verschiedener Laser-basierter Methoden zum NO-Nachweis. LAS: Laser Absorption Spektroskopie, ICOS: Integrated Cavity-Output Spectroscopy, PAS: Photoacoustic Spektroskopie, REMPI: Resonance-enhanced multiphoton ionization

Die Cavity Leak-Out Spektroskopie erfordert zwar ein hohes Maß an technischem Aufwand, stellt aber die empfindlichste laserspektroskopische Methode zum Nachweis von NO und CO dar.

### 3.4. Zusammenfassung

Das weiterentwickelte CALO-Spektrometer ist aufgrund des InVar-Gerüsts deutlich stabiler als das Vorgängermodell, wodurch längere Messzeiten möglich werden, und zeigt darüber hinaus eine um einen Faktor 2 verbesserte rauschäquivalente Absorption, was sich direkt auf die Nachweisgrenze überträgt.

Die Nachweisgrenzen (rauschäquivalente Konzentrationen) für  $^{15}\text{NO}$ ,  $^{14}\text{NO}$  und  $^{13}\text{CO}$  liegen bei 29 ppt, 23 ppt bzw. 340 ppt. In der Literatur findet sich zum aktuellen Zeitpunkt kein Laserspektrometer, das diese herausragende Empfindlichkeit erreicht. In der Praxis sind Konzentrationen unterscheidbar, die etwa der dreifachen rauschäquivalenten Konzentration entsprechen.

Der Vergleich der rauschäquivalenten Absorption bei unterschiedlichen Spiegelreflektivitäten zeigt, dass eine höhere Reflektivität, die eine höhere Abklingzeit bewirkt, zu besseren Ergebnissen führt. Trotz einer um einen Faktor 10 geringeren Signalstärke beim CO-Nachweis im Vergleich zum NO-Nachweis, ist die rauschäquivalente Absorption beim CO um einen Faktor 3 geringer.

Eine höhere Signalstärke wirkt sich positiv auf die Nachweisgrenze aus, da das Detektorrauschen so geringeren Einfluss auf die Berechnung der Abklingzeit hat.

Durch eine Erhöhung der Laserleistung in Kombination mit besseren Spiegeln kann eine Empfindlichkeit für den NO-Nachweis erreicht werden, die um zwei Größenordnungen über der in dieser Arbeit gezeigten liegt. Für CO muss hierzu allerdings ein anderer Spektralbereich gewählt werden. Die Spiegelreflektivität ( $R = 99,988\%$ ) und Laserleistung (6 mW), die dieser Extrapolation zugrunde liegt, wird in kommerziell erhältlichen Systemen zum heutigen Zeitpunkt erreicht.

## 4. Optimierung des Faraday-Modulations-Spektrometers

Die weitreichendste Veränderung ursprünglichen Systems besteht im Austausch des Lasersystems. Der aktuelle Laser, ein Zimmertemperatur QCL, ermöglicht es, die beiden Isotopologe  $^{14}\text{NO}$  und  $^{15}\text{NO}$  nachzuweisen. Hiermit wird auch ein quasi-gleichzeitiger Nachweis dieser Moleküle möglich. Weitere Optimierungen beziehen sich auf die Parameter Druck und Magnetfeld in der Nachweiszelle sowie die Kompaktheit und Benutzerfreundlichkeit des Systems.

Im Vorfeld dieser Verbesserungen wurden FAMOS-Signale berechnet. Neben der Bestimmung optimaler Parameter für die Spektroskopie kann diese Simulation auch angewandt werden, um aus gemessenen Signalen auf die Konzentration in der Gasprobe zurückzuschließen.

Diese Simulation wird zunächst beschrieben und mit experimentellen Ergebnissen verglichen. Im Anschluss daran wird das optimierte System charakterisiert und die wichtigsten Ergebnisse des Kapitels in einem Fazit zusammengefasst.

Die Simulation von FAMOS-Signalen und der Vergleich mit experimentellen Daten wurde in *Applied Physics B: Lasers and Optics* veröffentlicht [Fri08b].

### 4.1. Simulation von FAMOS-Signalen

Das Programm zur Berechnung der FAMOS-Signale wurde in der Mathematik-Software Mathematica 5.0 entwickelt und basiert auf früheren Arbeiten, die am Institut für Lasermedizin durchgeführt wurden [Hor05, Gan03]. Im Unterschied zu diesen Arbeiten wurde die Absorption der Laserstrahlung im Prüfgas sowie die realistischere Voigt-Linienform (Gleichung 2.9) implementiert. Mit Hilfe dieser Simulation kann die zu erwartende Signalstärke und die Linienform in Abhängigkeit verschiedener Parameter wie der Konzentration, des Drucks und der Magnetfeldstärke für alle Linien, die in der HITRAN-Datenbank aufgeführt sind, berechnet werden, wodurch eine Vorhersage der optimalen Parameter möglich ist.

### 4.1.1. Programmablauf

Das Programm berechnet in einem Frequenzintervall  $\nu_0 \pm \Delta\nu$ , das vom Anwender vorgegeben wird,  $n$  äquidistante Punkte. Das Signal an jedem Punkt setzt sich aus den Beiträgen aller Linien mit Resonanzfrequenzen  $\nu_i$  im betrachteten Intervall zusammen, wobei jede Linie aufgrund des Zeeman-Effektes aufspaltet. Der Index  $i$  laufe hier über alle betrachteten Linien. Einfach gestrichene Größen sind dabei dem oberen Niveau, doppelt gestrichene dem unteren Niveau zugeordnet.

$$D(\nu, B, p, T) = \sum_i \sum_{M_{J''}} \sum_{\Delta M_J} \Delta M_J \cdot D_i(\nu, B, p, T, g_{J'}, g_{J''}, M_{J'}, M_{J''}) \quad (4.1)$$

Die möglichen Übergänge ergeben sich aus den Rotationsquantenzahlen, wobei für deren Differenz  $\Delta J = J' - J'' = 0, \pm 1$  gilt, da nur die Fundamentalbande simuliert werden soll.

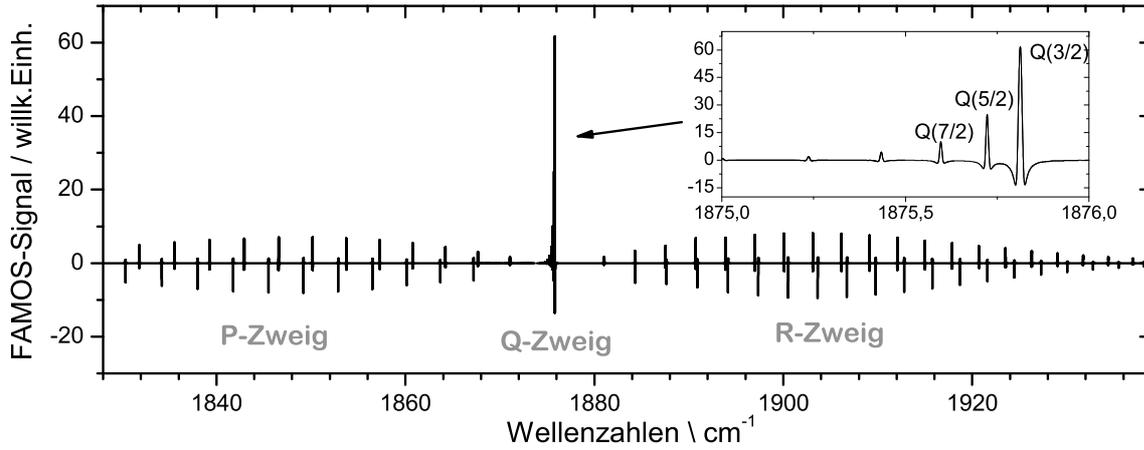
P-Zweig ( $J' = J'' - 1$ )     $\Delta M_J = 1$ :     $M_{J''} = -J'' \rightarrow -J'' + 1$  bis  $M_{J''} = J'' - 2 \rightarrow J'' - 1$   
                                    $\Delta M_J = -1$ :     $M_{J''} = -J'' + 2 \rightarrow -J'' + 1$  bis  $M_{J''} = J'' \rightarrow J'' - 1$   
                                   insgesamt  $(4 \cdot J'' - 2)$  Übergänge

Q-Zweig ( $J' = J''$ )         $\Delta M_J = 1$ :     $M_{J''} = -J'' \rightarrow -J'' + 1$  bis  $M_{J''} = J'' - 1 \rightarrow J''$   
                                    $\Delta M_J = -1$ :     $M_{J''} = -J'' + 1 \rightarrow -J''$  bis  $M_{J''} = J'' \rightarrow J'' - 1$   
                                   insgesamt  $(4 \cdot J'')$  Übergänge

R-Zweig ( $J' = J'' + 1$ )     $\Delta M_J = 1$ :     $M_{J''} = -J'' \rightarrow -J'' + 1$  bis  $M_{J''} = J'' \rightarrow J'' + 1$   
                                    $\Delta M_J = -1$ :     $M_{J''} = -J'' \rightarrow -J'' - 1$  bis  $M_{J''} = J'' \rightarrow J'' - 1$   
                                   insgesamt  $(4 \cdot J'' + 2)$  Übergänge

Die Stärke jeder einzelnen Dispersionslinie  $D_i$  berechnet sich aus der Intensität  $S_{\nu_i}$  des entarteten Übergangs und der Verteilung der Gesamtintensität auf die aufgespaltenen Niveaus. Diese Verteilung ist dabei durch das 3J-Symbol gegeben.

Darüber hinaus ist für die Signalstärke die thermische Besetzung des unteren Energieniveaus relevant. Die Intensität  $S_{\nu_i}$  ist in der HITRAN-Datenbank für die Temperatur 296 K tabelliert. Zur Anpassung an die tatsächliche Temperatur dient der letzte Faktor der folgenden Gleichung. Das obere Niveau kann bei Zimmertemperatur aufgrund der großen Energielücke als nicht besetzt angenommen werden.



**Abbildung 4.1.:** Die Simulation eines kompletten FAMOS-Spektrums zeigt, dass eine maximale Signalstärke im Q-Zweig des Spektrums auftritt. Die Linien des  $^2\Pi_{3/2}$ -Zustands sind negativ, die Linien des  $^2\Pi_{1/2}$ -Zustands positiv. Das Spektrum wurde mit  $T = 350$  K,  $p = 75$  mbar und  $B = 15$  mT berechnet.

$$D_i(\nu, B, p, T, g_{J'}, g_{J''}, M_{J'}, M_{J''}) = D_i^*(\nu, \Delta\nu_i(B, g_{J'}, g_{J''}, M_{J'}, M_{J''}), p, T) \quad (4.2)$$

$$\cdot S_{\nu_i}(T_0) \cdot \underbrace{\begin{pmatrix} J' & 1 & J'' \\ -M_{J'} & \Delta M_J & M_{J''} \end{pmatrix}^2}_{3J\text{-Symbol}} \cdot e^{\frac{1}{k_B} \cdot \frac{E''(T-T_0)}{T \cdot T_0}}$$

In dieser Gleichung beschreibt die erste Zeile die Linienform, die zweite Zeile die Linienstärke. In  $D_i^*$  findet die Absorption  $A_i$  Berücksichtigung. Die Abhängigkeit der Verschiebung der Resonanzfrequenzen  $\Delta\nu_i$  (vgl. Gleichung 2.3) von Magnetfeld, magnetischen Quantenzahlen und Landé-Faktoren wird im Folgenden nicht explizit notiert.

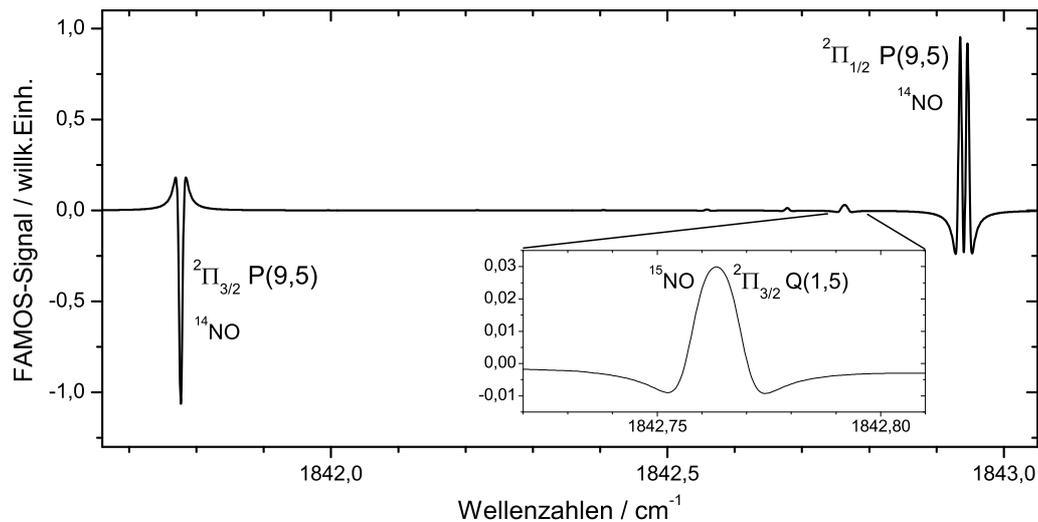
$$D_i^*(\nu, \Delta\nu_i, p, T) = n_i(\nu, \Delta\nu_i, p, T) \cdot (1 - A_i(\nu, \Delta\nu_i, p, T)) \quad (4.3)$$

Die Absorption  $A_i(\nu, \Delta\nu_i, p, T)$  wird hier als Voigt-Profil angenommen

$$A_i(\nu, \Delta\nu_i, p, T) = \sqrt{\frac{\ln 2}{\pi^3}} \cdot \int_{-\infty}^{\infty} \frac{\gamma_p/\gamma_d}{(\nu - (\nu_i + \Delta\nu_i) - \tau)^2 + (\frac{\gamma_p}{2})^2} \cdot e^{-\frac{\tau^2}{\gamma_d^2}} d\tau \quad (4.4)$$

Hierbei ist  $\gamma_p$  und  $\gamma_d$  die Druck- bzw. Doppler-Linienbreite, und  $\nu_i$  die Zentralfrequenz des betrachteten Übergangs. In dieser Gleichung ist  $\gamma_p$  vom Druck  $p$ ,  $\gamma_d$  von der Temperatur abhängig (Gleichungen 2.8 und 2.10).

Das Brechungsindexprofil  $n_i(\nu)$  wird nach Gleichung 2.9 berechnet. Die numerische Fal-



**Abbildung 4.2.:** Simulation des Q-Zweigs von  $^{15}\text{NO}$  und der benachbarten  $^{14}\text{NO}$  Linien im natürlichen Isotopenverhältnis. Druck: 60 mbar, Magnetfeld: 15 mT. Bei diesen Parametern ist die  $^{14}\text{NO}$ -Linie um einen Faktor 30 stärker als die  $^{15}\text{NO}$ -Linie.

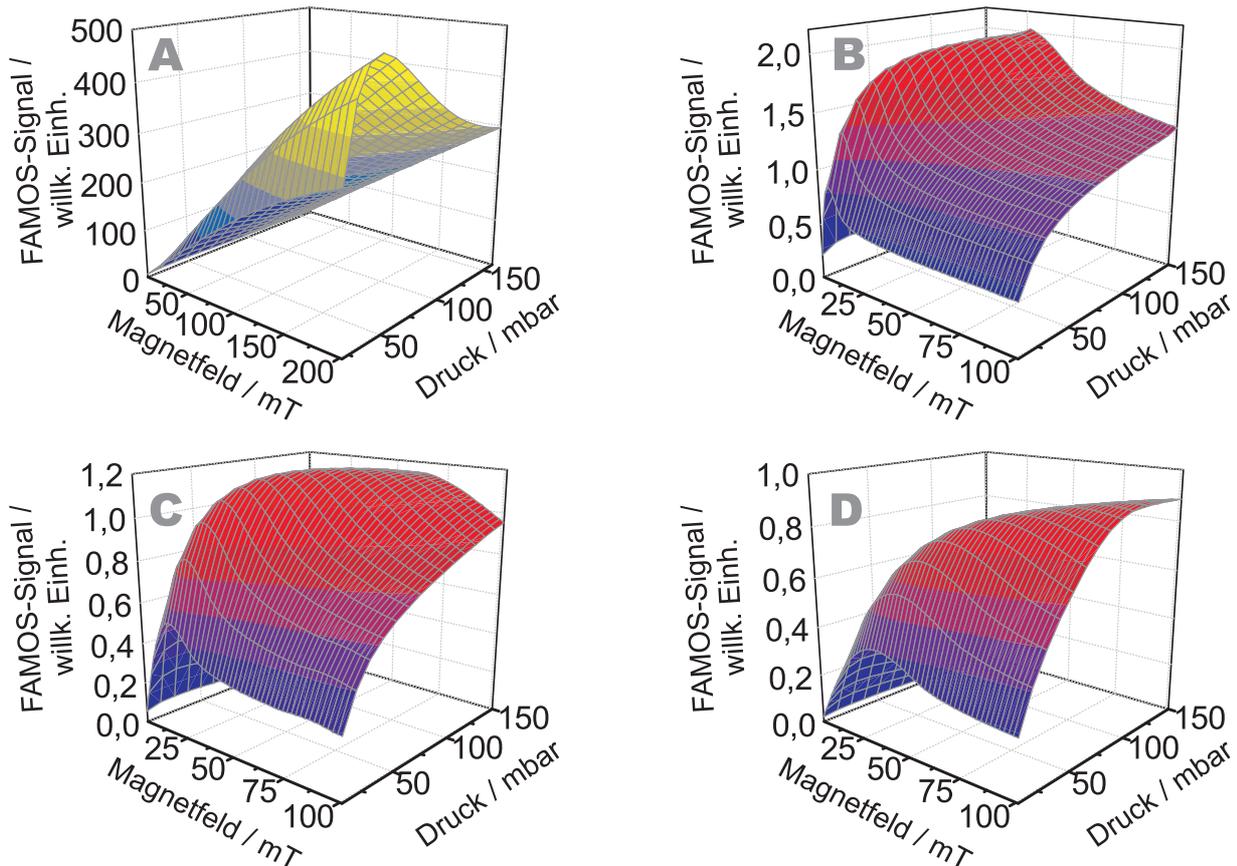
tung, die sowohl in der Absorptionslinie als auch in der Dispersionslinie durchgeführt werden muss, ist eine rechenaufwändige Operation. Die Verschiebung der Resonanzfrequenzen wird nach der Faltung durchgeführt, so dass die Faltung nur einmal für jedes  $i$  berechnet werden muss.

Für die Simulation sind verschiedene Größen notwendig. Der Druckverbreiterungskoeffizient  $\gamma$ , die Resonanzfrequenz  $\nu_i$  und die Linienstärke  $I_{\nu_i}$  sind der HITRAN-Datenbank [Rot05] entnommen, die Landé-Faktoren  $g_J$  stammen aus [Her80].

#### 4.1.2. Simulationsergebnisse

Einen Überblick über das so berechnete FAMOS-NO-Spektrum bietet Abbildung 4.1. Hier fällt auf, dass das absolute Maximum im Q-Zweig des Spektrums auftritt, der den optimalen Bereich für die Spektroskopie darstellt. Für einen isotopologenselektiven Nachweis ist der Q(1,5) Übergang des selteneren Isotopologs zu wählen. Dieser liegt bei 1842,7 Wellenzahlen. Abbildung 4.2 zeigt die Linien in der näheren Umgebung dieses Übergangs. Bei einem Magnetfeld von 15 mT, einem Druck von 75 mbar und einer Temperatur von 350 K ist die  $^{14}\text{NO}$ -Linie im natürlichen Isotopenverhältnis um einen Faktor 30 stärker als die  $^{15}\text{NO}$ -Linie.

Neben der optimalen Frequenz für den Spurengasnachweis lassen sich mittels der Simulation auch die optimalen Einstellungen für Druck und Magnetfeldamplitude ermitteln, um ein größtmögliches Signal zu erhalten. Hierzu werden für die drei stärksten Linien des Q-Zweiges von  $^{15}\text{NO}$  und für die benachbarte  $^{14}\text{NO}$ -Linie (P(9,5)) in der Simulation Druck

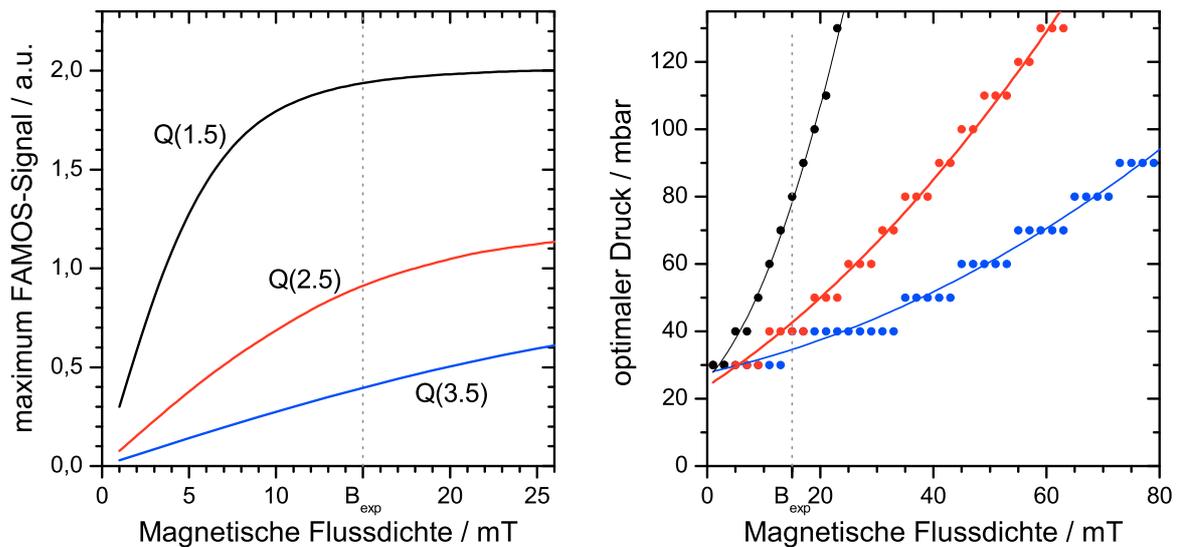


**Abbildung 4.3.:** Simulation der Signalstärken von  $^{14}\text{NO}$  (gelb) und  $^{15}\text{NO}$  (rot). Für die  $^{15}\text{NO}$ -Linie liegt das Maximum bei 80 mbar und 15 mT. Der optimale Druck bei der  $^{14}\text{NO}$ -Linie liegt im simulierten Magnetfeldbereich bei 60 mbar, das optimale Magnetfeld liegt außerhalb des simulierten Bereichs.

und Magnetfeld im Bereich zwischen 10 und 150 mbar bzw. zwischen 1 und 101 mT ( $^{14}\text{NO}$ : 202 mT) variiert. Die Schrittweite beträgt 10 mbar bzw. 2 mT ( $^{14}\text{NO}$ : 4 mT). Abbildung 4.3 zeigt die Ergebnisse. Bei den  $^{15}\text{NO}$ -Linien (blau-rot) fällt auf, dass die Signalstärken einen ausgeprägten „Bergrücken“ zeigen, auf dem die optimalen Arbeitspunkte liegen. Mit steigendem  $J$  verschieben sich die Arbeitspunkte zu höheren Magnetfeldstärken und Drücken. Der Grund hierfür liegt in den niedrigeren  $g$ -Faktoren für höhere  $J$ . Dies spiegelt sich auch in der  $^{14}\text{NO}$ -Linie wider (blau-gelb), bei der der Bergrücken – trotz des größeren Simulationsbereichs – allerdings noch nicht voll ausgeprägt ist.

Aufgrund der stärkeren  $^{14}\text{NO}$ -Linie ist es für den isotopologenselektiven Nachweis sinnvoll, die Parameter für den schwächeren  $^{15}\text{NO}$ -Übergang zu optimieren.

Hierzu wurde das maximale FAMOS-Signal in Abhängigkeit von Druck und Magnetfeld bestimmt, indem bei einem festen Magnetfeld das maximale Signal und der zugehörige Druck bestimmt wurde. Abbildung 4.4 zeigt das Ergebnis dieser Optimierung für die drei stärksten Linien des Q-Zweigs. Für ein optimales Signal (linker Graph) ist es demnach



**Abbildung 4.4.:** Bestimmung der optimalen Parameter für die Bestimmung von  $^{15}\text{NO}$ . Das linke Bild zeigt die maximale Signalstärke in Abhängigkeit von der magnetischen Flussdichte bei jeweils optimalem Druck. Die Abhängigkeit des optimalen Drucks vom Magnetfeld ist im rechten Bild dargestellt. Die Graphen wurden aus simulierten Spektren erstellt, die in Schritten von 10 mbar und 2 mT berechnet wurden, was die Stufen im rechten Bild erklärt.

sinnvoll, die Q(1,5)-Linie zu nutzen. Die Abbildung zeigt, dass es im Bereich bis 25 mT kein Maximum gibt, allerdings flacht die Kurve für große Magnetfelder immer stärker ab. Für eine höchstempfindliche Messung ist also das maximal mögliche Magnetfeld von 15 mT zu wählen. Für eine weitere Erhöhung des Magnetfeldes ist erheblicher experimenteller Aufwand notwendig, der durch die geringe zu erwartende Steigerung im Signal (ca. 5 %) nicht zu rechtfertigen ist. Darüber hinaus verbreitern sich die Signale durch hohen Druck und hohe Magnetfelder und werden schließlich überlappen, was zu Querempfindlichkeiten zwischen  $^{14}\text{NO}$  und  $^{15}\text{NO}$  führen würde.

Der rechte Graph in Abbildung 4.4 zeigt, dass der optimale Druck bei 80 mbar liegt. Die Punkte im Graphen repräsentieren die simulierten Ergebnisse. Da der Druck in Schritten von 10 mbar variiert wurde, zeigt sich eine ausgeprägte Stufenstruktur. Die durchgezogenen Linien sind an diese Punkte angepasste Parabelbögen.

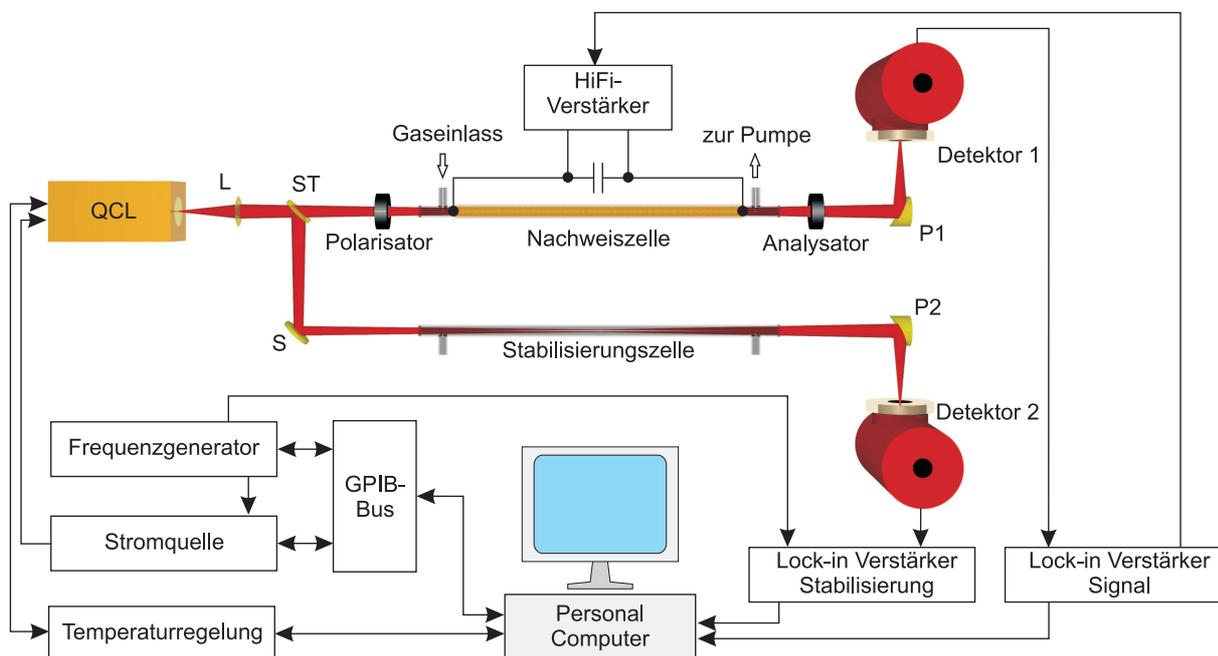
Eine Variation der in Gleichung 4.3 berücksichtigten Absorption ergab, dass diese im Konzentrationsbereich bis 100 ppm das Signal lediglich im Promille-Bereich beeinflusst. Um Rechenzeit zu sparen, wurden die hier vorgestellten Simulationsergebnisse unter Vernachlässigung der Absorption berechnet.

## 4.2. Versuchsaufbau

Der verbesserte Aufbau des FAMO-Spektrometers unterscheidet sich vom ursprünglichen im Wesentlichen in der Laserquelle, der im späteren Verlauf des Kapitels ein eigener Abschnitt gewidmet ist. Der Aufbau ist in Abbildung 4.5 schematisch dargestellt.

Das stark divergente Licht des QCL (Divergenzwinkel  $60^\circ$  vertikal,  $20^\circ$  horizontal) wird zunächst durch eine f/1-Linse (Brennweite = Durchmesser = 25,4 mm) kollimiert. Ein ZnSe-Strahlteiler lenkt etwa 4% des Lichtes in den Stabilisierungsstrahl, der Rest steht zum Nachweis des NO zur Verfügung. Zunächst wird das Licht in einem Rochon-Prisma linear polarisiert. Nach Durchgang durch die Nachweiszelle wird die Drehung der Polarisations Ebene mit dem zweiten Polarisator und einem InSb-Detektor mit eingebautem Vorverstärker (Verstärkung  $10^5$  V/A, Fa. Polytec) nachgewiesen.

Die Nachweiszelle wurde unverändert aus dem ursprünglichen Experiment übernommen. Die magnetische Wechselfeld wird durch die um die Nachweiszelle gewickelte Kupferspule erzeugt. Die Wechselspannung wird mittels eines Lock-In Verstärkers erzeugt und mit einem HiFi-Verstärker verstärkt. Die Spannung kann bis zu  $130\text{ V}_{\text{rms}}$  bei 6 kHz betragen, wodurch ein Magnetfeld von bis zu 15 mT erzeugt werden kann. Höhere Spannungen (bzw.



**Abbildung 4.5.:** Im optimierten FAMOS-Aufbau wird der Laserstrahl weiterhin mittels eines ZnSe-Strahlteilers (ST) in einen Stabilisierungsstrahl und einen Messstrahl geteilt. Die Linse L kollimiert den Strahl. Die Stabilisierungszelle ist mit einem Gemisch aus je 50%  $^{14}\text{NO}$  und  $^{15}\text{NO}$  gefüllt. Das Fehlersignal wird mittels einer 1f-Lock-In Technik erzeugt. Alle Signale werden vom Computer ausgewertet, der auch den Frequenzgenerator, die Stromquelle und die Temperaturregelung steuert.

Ströme) führen zu einer Überhitzung der Spule.

Die Stabilisierung des Lasers wurde neu aufgebaut. Die Stromquelle (LDX 3232, ILX Lightwave) wird mittels eines Frequenzgenerators (Agilent 33220A) mit einer Frequenz von 10 kHz moduliert. Die Stabilisierung des Lasers folgt einem Standard 1f-Lock-In Schema, wobei ein Gemisch von jeweils 50 %  $^{14}\text{NO}$  und  $^{15}\text{NO}$  in einer Absorptionszelle als Referenz dient.

Das gesamte Spektrometer wird durch ein LabView-Programm gesteuert. Dieses Programm protokolliert sowohl die FAMOS-Signale als auch das Signal des Stabilisierungs-Lock-In Verstärkers, das genutzt wird, um die Frequenz des Lasers auf die NO-Absorptionslinien zu stabilisieren.

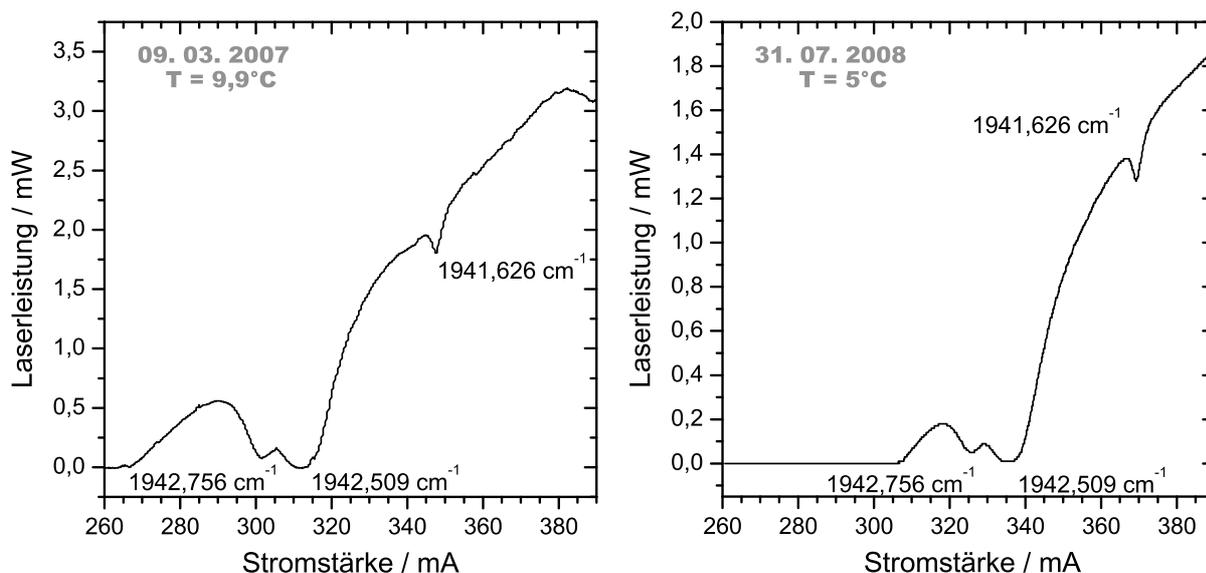
### 4.2.1. Charakterisierung des Quantenkaskadenlasers

Der Laser wurde von der Firma Alpes Lasers in der Schweiz entwickelt und kann in einem Temperaturbereich von  $-30$  bis  $+20$  °C betrieben werden. Mittels Peltierelementen in einem wassergekühlten Gehäuse kann die Lasertemperatur auf jeden Wert in diesem Bereich stabilisiert werden. Der Laser deckt Frequenzen von  $1838,5$  bis  $1848,6$   $\text{cm}^{-1}$  ab. Um die für den  $^{15}\text{NO}$ - bzw.  $^{14}\text{NO}$ -Nachweis notwendige Wellenlängen um  $1842,7$   $\text{cm}^{-1}$  zu erzeugen, wird der Laser bei  $5$  °C betrieben.

Zur Charakterisierung der Durchstimmbarkeit über eine Temperatur- und Stromänderung wurde die Frequenzänderung mittels eines Germanium-Etalons (FSR: 480 MHz) in eine Amplitudenmodulation umgewandelt. Bei Veränderung des Laserstroms beträgt die Änderung der Laserfrequenz  $0,0297 \pm 0,001$   $\text{cm}^{-1}/\text{mA}$ , bei Änderung der Temperatur  $0,176 \pm 0,002$   $\text{cm}^{-1}/\text{K}$ .

Zur Charakterisierung des Lasers wurde die Strom-Spannungs- und die Strom-Leistungskennlinie aufgenommen. In der Strom-Leistungskennlinie finden sich Wasser-Absorptionsstrukturen, durch die die Laserfrequenz bestimmt werden kann. Darüber hinaus hat der Hersteller ein Datenblatt erstellt, das die Laserfrequenz in Abhängigkeit von Strom und Temperatur angibt, so dass die Frequenz grob ( $\pm 0,5$   $\text{cm}^{-1}$ ) eingestellt werden kann. Die Laserschwelle wird vom Hersteller bei  $-30$  °C mit 220 mA und 8,7 V angegeben. Bei den für die Spektroskopie von  $^{15}\text{NO}$  interessierenden Frequenzen muss der Laser bei  $5$  °C betrieben werden. Der Laser entwickelte über einen Zeitraum von 2 Jahren deutliche Alterungserscheinungen, die sich in einer zu höheren Stromstärken verschobenen Laserschwelle und einer geringeren optischen Leistung bemerkbar machen (vgl. Abbildung 4.6). Insbesondere die geringere Leistung mindert die Nachweisempfindlichkeit des Systems.

Neben der Leistung ist die Strahlqualität ein wesentlicher Parameter des Lasers. Zwar sind die Anforderungen bei der FAMO-Spektroskopie nicht besonders hoch. Dennoch

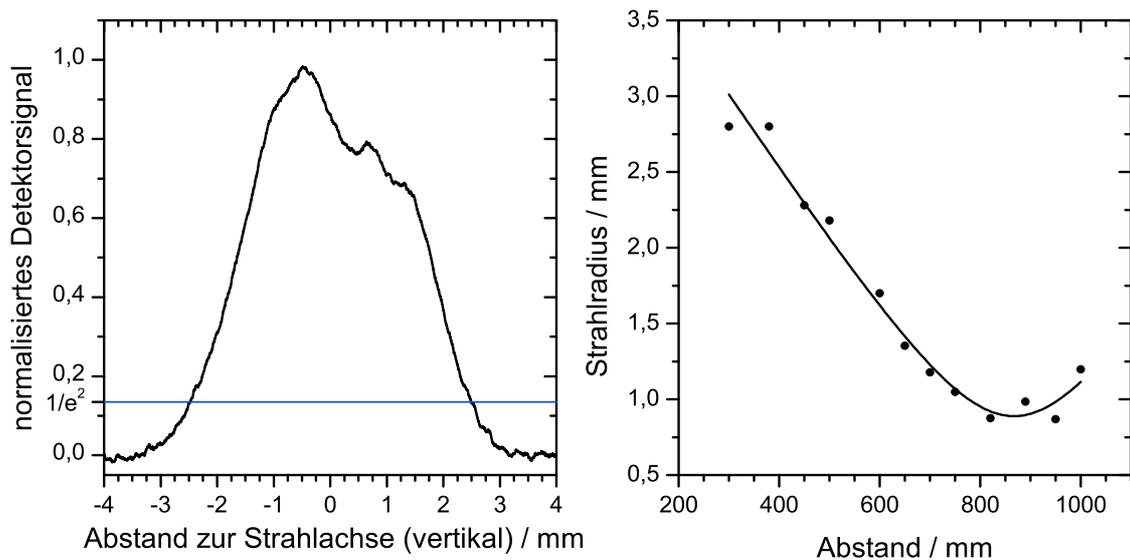


**Abbildung 4.6.:** Die Kennlinien wurden im Abstand von etwa 16 Monaten aufgenommen. Die Einbrüche sind auf Absorptionslinien von Wasser in der Umgebungsluft zurückzuführen. Neben der Leistungsabnahme von 33 % fällt bei der späteren Messung auf, dass die Kennlinie deutlich zu höheren Stromstärken verschoben ist.

darf der Laser über eine Strecke von etwa 50 cm einen Strahlradius von 3 mm nicht überschreiten, damit er durch die Nachweiszelle und die übrigen optischen Elemente nicht abgeschattet wird.

Abbildung 4.7 zeigt eine Messung des vertikalen (links) und longitudinalen Strahlprofils (rechts). Zur Vermessung des Strahls wurde die Rasierklingenmethode benutzt. Das longitudinale Strahlprofil ergibt sich aus Messungen des vertikalen Profils an verschiedenen Stellen des Strahls, wobei als Ursprung das Austrittsfenster des Gehäuses angenommen wurde. Die starke Abweichung vom Gauß-Profil in transversaler Richtung lässt auf eine niedrige Strahlqualität schließen. Wird ein Gaußstrahl an das longitudinale Profil angepasst, so ergibt sich ein Qualitätsfaktor  $M^2 = 6,9$ .

Die Messung zeigt allerdings auch, dass der Strahl problemlos über eine Strecke von etwa 1 m bei einem Strahlradius von unter 3 mm gehalten werden kann, was für die FAMOS-Spektroskopie ausreicht.



**Abbildung 4.7.:** Das normalisierte Strahlprofil des QCL (links) wurde mittels der Rasierklingemethode aufgenommen. Starke Abweichungen vom Gauß-Profil sind offensichtlich. Als Strahlradius wird der halbe Abstand der beiden Punkte bei  $1/e^2$  bezeichnet. Das Profil wurde im Abstand von 450 mm vom Austrittsfenster des Lasers aufgenommen. Der Strahlradius wurde an verschiedenen Stellen entlang der Strahlachse gemessen (rechts). Der Ursprung der Strahlachse liegt auf dem Austrittsfenster des Lasers. Auch im Strahlverlauf zeigt sich eine starke Abweichung vom Gauß-Strahl (Qualitätsfaktor  $M^2 = 6,9$ , Position der Strahltaille:  $z_0 = 867$  mm, Taillenradius:  $w_0 = 0,89$  mm). Die Werte wurden nach Fokussierung mittels einer 1f-Linse aufgenommen.

## 4.3. Vergleich der Simulation mit Messungen

### 4.3.1. Vergleich mit früheren Simulationen

Die experimentellen Daten, die zum Vergleich mit den Ergebnissen der Simulation herangezogen werden, wurden während der Promotion von M. Horstjann [Hor05] aufgenommen. Als Laserquelle diente hierzu der bereits in Kapitel 2.2.1 beschriebene CO-Laser. Auch hier sollen diese Daten zum Vergleich mit der Simulation benutzt werden, da die Nutzung des CO-Lasers mit großen Vorteilen verbunden ist. Er deckt einen großen Frequenzbereich ab, wobei die Frequenz des Laserlichtes stets sehr genau bekannt ist. Darüber hinaus besitzt der CO-Laser ein hervorragendes Strahlprofil und eine Linienbreite von einigen kHz, die in der Simulation vernachlässigt werden kann. Die verwendeten Parameter sind in Tabelle 4.1 aufgeführt.

Die verbesserte FAMOS-Simulation zeigt insbesondere in den Flanken der Linien bessere Ergebnisse. Bei den Linien im P- und R-Zweig liegen die Abweichungen bei 8 % für die Voigt-Form und bei maximal 15 % beim Lorentz-Profil. Am stärksten wirkt sich die

Parameter	Symbol	Einheit	P(3,5)		P(9,5)	Q(1,5)	R(6,5)
Übergangsfrequenz	$\nu_0$	$\text{cm}^{-1}$	1864,23	1864,24	1841,78	1875,81	1900,52
Subsystem	$\Omega$	—	1/2	1/2	3/2	3/2	3/2
Int. Linienstärke	$\mu_{\Omega J' J''}$	$10^{-20} \frac{\text{cm}}{\text{Molekül}}$	3,64	3,64	5,35	3,16	6,60
g-Faktor, o. Niveau	$g'$	—	0,026	0,026	0,0096	0,78	0,019
g-Faktor, u. Niveau	$g''$	—	0,027	0,027	0,0026	0,78	0,034
Dopp. Linienbr.	$\gamma_d$	$10^{-3} \text{cm}^{-1}$	4,55	4,55	4,50	4,58	4,64
Hom. Linienbr.	$\gamma_p$	$10^{-3} \text{cm}^{-1}$	4,80	4,80	4,54	4,74	4,66
Temperatur	$T$	K	350				
Druck	$p$	mbar	40				
Magnetfeld	$B$	mT (RMS)	7,5				

**Tabelle 4.1.:** Die Parameter, die der Simulation und den Messungen zu Grunde liegen.

geänderte Linienform bei der Q(1,5)-Linie aus. Hier liegt die maximale Abweichung für die Voigt-Linie ebenfalls bei 8 % und für die Lorentz-Linie bei 20 %.

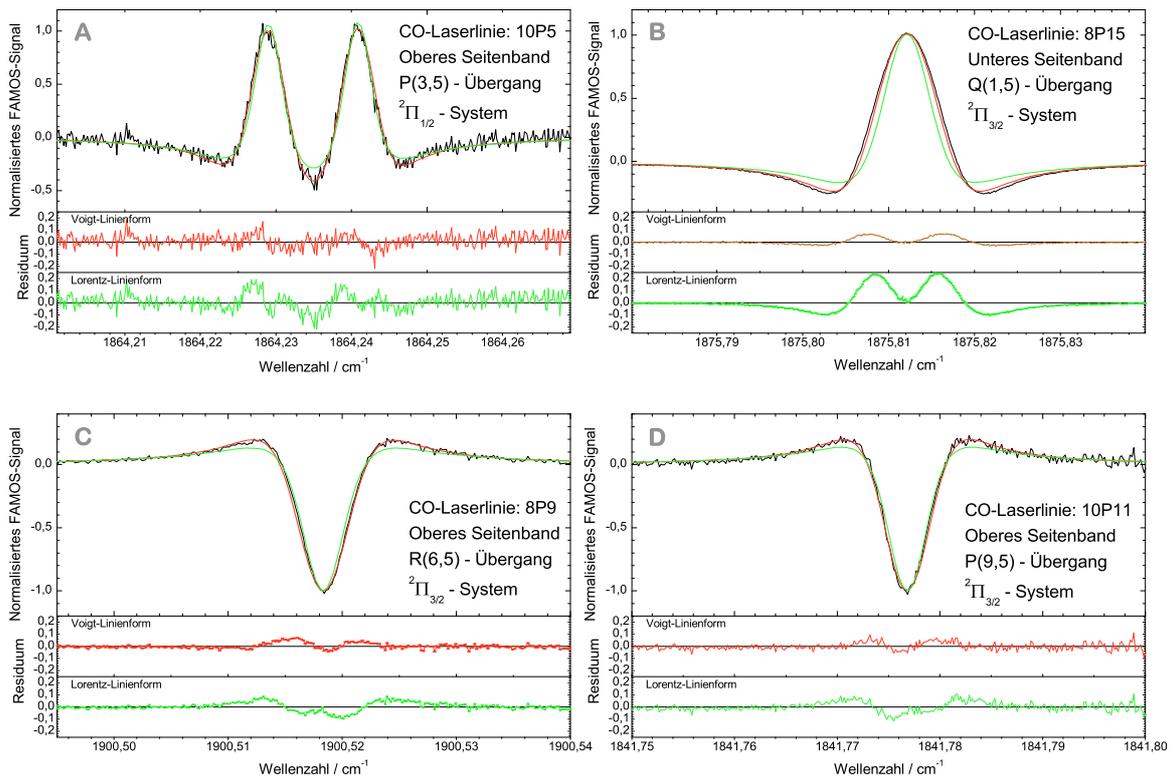
Auch die Übereinstimmung der theoretischen Signalhöhe mit der gemessenen ist verbessert, was allerdings aufgrund der Normierung nicht aus der Abbildung zu entnehmen ist. Während mittels der Lorentz-Linienform Abweichungen von bis zu 60 % vorkamen, ist die maximale Abweichung mit Voigt-Linienform 29 %.

Ursachen für die verbleibende Abweichung können in der Unsicherheit der genutzten Parameter Druck, Temperatur und vor allem Magnetfeld liegen, da diese zur Anpassung der Simulation an das Experiment nicht variiert wurden. Auch können die verwendeten g-Faktoren Fehler aufweisen, die allerdings in der verwendeten Publikation nicht spezifiziert sind [Her80].

Eine weitere mögliche Fehlerquelle ist die Leistungsmessung der CO-Laserstrahlung, mit der die Signale normiert wurden. Die Laserleistung variiert zwischen den Messungen stark, da für die unterschiedlichen Frequenzen unterschiedliche Laserübergänge genutzt werden müssen. Darüber hinaus ist die Sensitivität des InSb-Detektors in dem betrachteten Frequenzbereich stark von der Frequenz abhängig.

Temperaturunterschiede zwischen zwei Messungen können ebenso das Ergebnis der Messung beeinflussen, da eine veränderte Temperatur im Gas bei gleichem Druck die Teilchenzahl und damit die Signalstärke beeinflusst.

Neben den in Abbildung 4.8 dargestellten Linien wurden weitere Linien aus beiden Grundzustandssystemen und allen Zweigen der Fundamentalbande verglichen, was zu ähnlichen Ergebnissen führte.



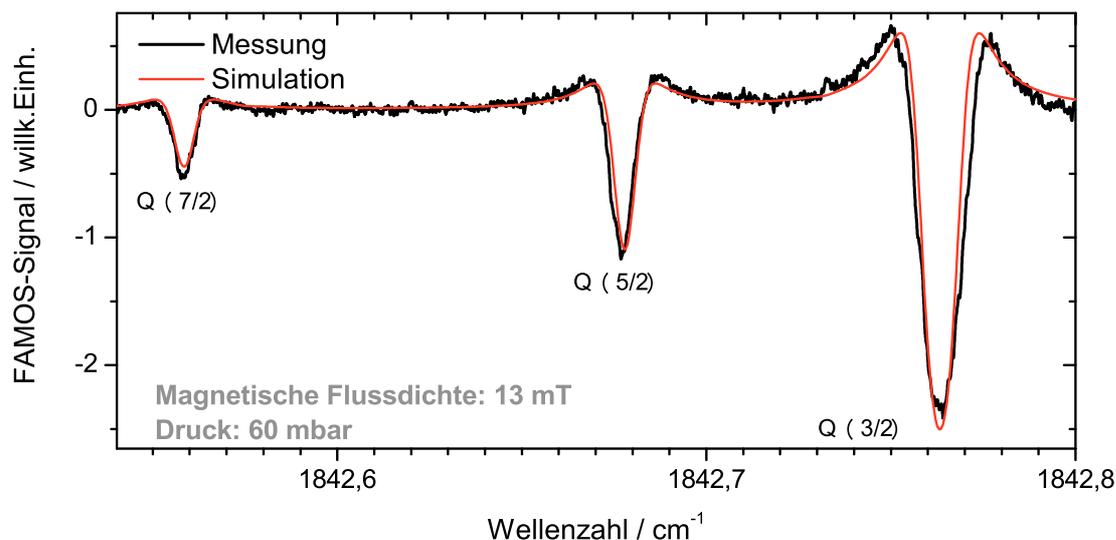
**Abbildung 4.8.:** Vergleich der Simulation (rot) mit dem Experiment (schwarz) und der Simulation mit einem Lorentz-Profil (grün) anhand von Daten, die mittels des CO-Lasers aufgenommen wurden. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die Daten normiert. Im Druckbereich zwischen 10 und 100 mbar ist die Beschreibung der Linienform durch ein Voigtprofil notwendig, was die bessere Übereinstimmung der neuen Simulation erklärt. Die Abweichungen in den Flanken liegen beim Voigt-Profil bei unter 8 %, beim Lorentz-Profil bei maximal 20 %.

### 4.3.2. Vergleich mit neuen Daten

Mit dem QCL-FAMOS-Aufbau wurden Spektren der 3 stärksten  $^{15}\text{NO}$ -Linien des Q-Zweiges sowie in weiteren Messungen der benachbarten  $^{14}\text{NO}$  P(9,5)-Linie gemessen. Die Temperatur wurde dabei im Verlauf einer Stunde von  $5,5\text{ }^{\circ}\text{C}$  auf  $7,5\text{ }^{\circ}\text{C}$  geändert, wodurch die Wellenzahl von  $1842,51\text{ cm}^{-1}$  bis  $1842,81\text{ cm}^{-1}$  durchgestimmt wurde. Der Laserstrom betrug 390 mA, die Integrationszeit des Lock-In Verstärkers 30 s und die Sensitivität  $50\text{ }\mu\text{V}$ .

Ein auf diese Weise bei einem Druck von 60 mbar und einer Magnetfeldamplitude von 13 mT gemessenes Spektrum zeigt Abbildung 4.9 (schwarze Linie). Die Lasertemperatur wurde anhand der Zentralfrequenzen in Wellenzahlen umgerechnet. Zur Korrektur des Signal-Offsets, der durch Einstrahlung des magnetischen Wechselfeldes in die Lock-In-Elektronik verursacht wird, wurden alle gemessenen Spektren vertikal verschoben.

In derselben Abbildung ist ein berechnetes Spektrum für die beschriebenen Parameter dargestellt (rote Linie). Zur Anpassung an die experimentellen Werte wurde lediglich die



**Abbildung 4.9.:** Vergleich eines gemessenen Spektrums mit der Simulation. Die Frequenzänderung wurde durch eine Temperaturvariation von 2 K in einem Zeitraum von 1 Stunde erreicht. Die Lock-In Zeitkonstante betrug 30 s, die Sensitivität  $50 \mu\text{V}$ . Das gemessene Spektrum wurde zur Korrektur des Untergrunds vertikal verschoben. Im Spektrum ist eine Abweichung der gemessenen Linienbreiten von der Simulation zu erkennen. Dies ist wahrscheinlich auf die Linienbreite des Lasers zurückzuführen, die in der Simulation nicht berücksichtigt wurde.

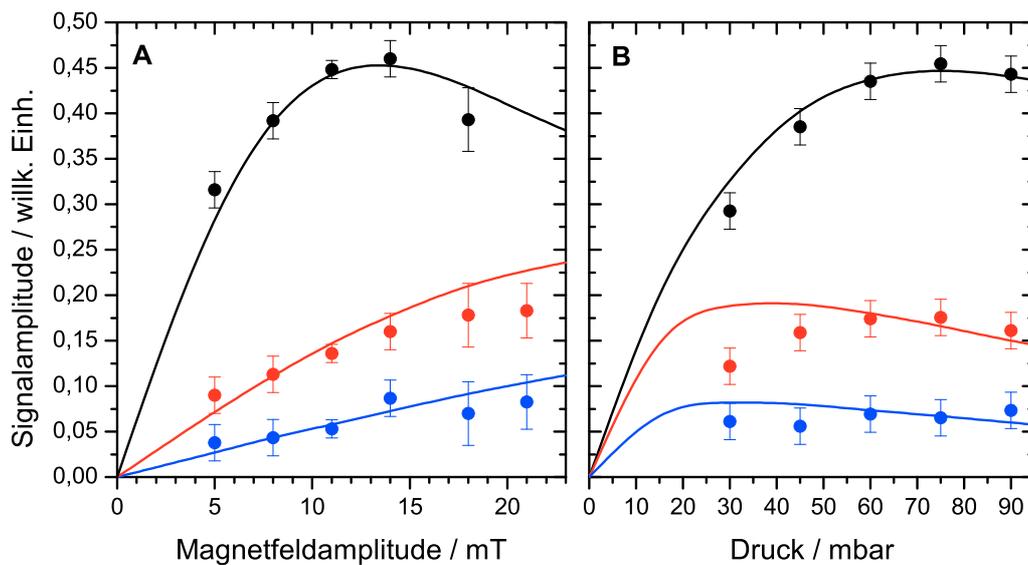
Signalstärke skaliert.

Eine Abweichung in der Linienbreite wurde im vorangegangenen Abschnitt bereits festgestellt. Im Falle des CO-Lasers kann die Laserlinienbreite von unter einem MHz vernachlässigt werden, die Linienbreite des QCL liegt nach Herstellerangaben bei 20 MHz, was zu einer stärkeren Verbreiterung der gemessenen Linien führt.

Einen Vergleich der Signalamplituden, die als die Signalthöhe über der Nulllinie angenommen werden, zeigt Abbildung 4.10. Hier sind die Signalthöhen der gemessenen Spektren (Punkte) und der berechneten (Linien) gegen die Magnetfeldamplitude (A) und den Druck (B) aufgetragen. Bei der Variation der Magnetfeldamplitude wurde der Druck konstant gehalten (60 mbar) und bei der Variation des Drucks die Magnetfeldamplitude (14 mT). Eine Änderung der Magnetfeldamplitude zeigt eine gute Übereinstimmung der Signalamplituden in Experiment und Theorie. Bei der Variation des Drucks fallen hingegen Abweichungen bei niedrigen Drücken vor allem bei der Q(2,5)-Linie auf. Mögliche Ursachen hierfür wurden bereits diskutiert.

Insgesamt bestätigen die experimentellen Daten die Simulation hinsichtlich der Berechnung der optimalen Parameter.

Im folgenden Abschnitt werden die Nachweisgrenzen bei optimalen Parametern für beide Isotopologe getrennt wie auch quasi-simultan untersucht.



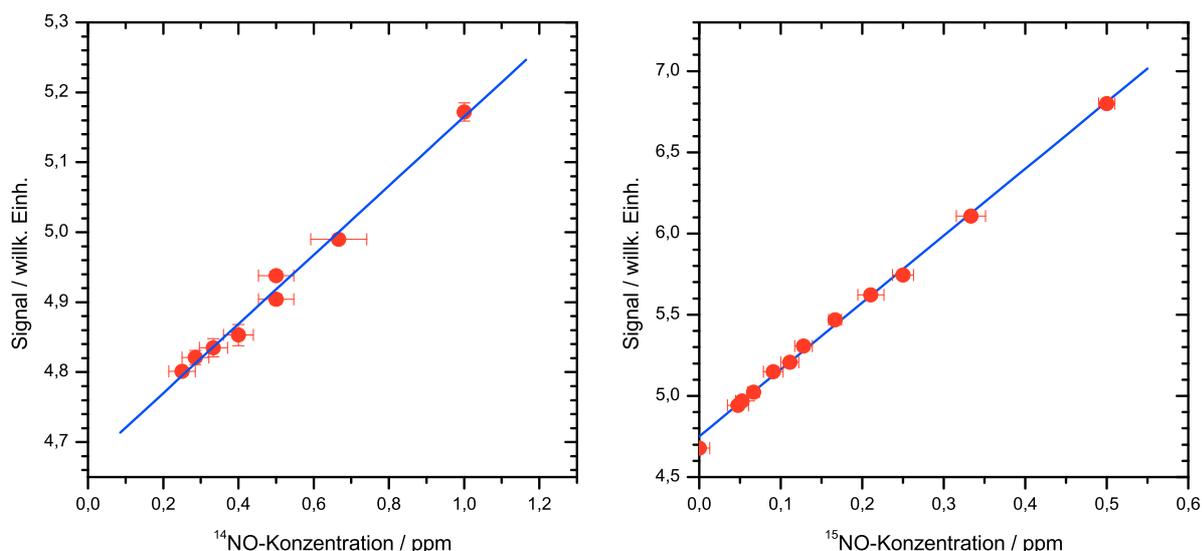
**Abbildung 4.10.:** Vergleich der Simulation mit dem Experiment am Q(1,5)- (schwarz), Q(2,5)- (rot) und Q(3,5)-Übergang (blau) des  $^{15}\text{NO}$ -Moleküls. Die Fehlerbalken symbolisieren das Rauschen des Signals abseits der Resonanzen. Die Frequenzänderung wurde durch eine Temperaturvariation von 2 K in einem Zeitraum von 1 Stunde erreicht. Die Lock-In Zeitkonstante betrug 30 s, die Sensitivität  $50 \mu\text{V}$ .

## 4.4. Nachweisgrenzen

Interessiert bei einer Messung lediglich eines der beiden NO-Isotopologe, so kann der Laser auf einer NO-Linie stabilisiert und das maximale Signal zur Messung der Konzentration genutzt werden. Die Zeitauflösung des Systems ist in diesem Fall durch die Integrationszeit des Lock-In Verstärkers und der Gasaustauschzeit der Zelle bestimmt.

Für diesen Fall wurden zur Bestimmung der Nachweisgrenzen von  $^{14}\text{NO}$  und  $^{15}\text{NO}$  Prüfgasgemische mittels zweier Massenflussregler (MKS Typ 1479A, 1000 sccm, MKS Instruments Deutschland GmbH) hergestellt und vermessen. Der Lock-In Verstärker wurde hierbei auf eine Empfindlichkeit von  $50 \mu\text{V}$  und eine Integrationszeit von 10 s eingestellt. Die Signalstärke wurde in Abbildung 4.11 gegen die analysierte Prüfgaskonzentration aufgetragen. Die Nachweisgrenze kann aus dem Signal-zu-Rausch Verhältnis der niedrigsten Konzentrationsstufe bestimmt werden, indem die Differenz des Signals bei niedriger Konzentration zum Signal bei reinem Stickstoff durch die Standardabweichung dividiert wird.

Dieses Verhältnis beträgt bei den hier beschriebenen Parametern für  $^{15}\text{NO}$  2 ppb und für  $^{14}\text{NO}$  20 ppb. Zur Bestimmung dieser Werte wurden Prüfgasmischungen verwendet, die jeweils 1 ppm  $^{15}\text{NO}$  bzw.  $^{14}\text{NO}$  enthielten. Das Signal bei der Analyse von reinem Stickstoff weicht deutlich von 0 ab. Diese Abweichung lässt sich durch elektromagnetische Einstrahlung des Wechselfeldes an der Spule in die Verstärker-Elektronik erklären.



**Abbildung 4.11.:** Kalibrationsgeraden für  $^{14}\text{NO}$  (links) und  $^{15}\text{NO}$  (rechts). Die linearen Regressionen ergeben einen deutlichen Offset, was auf Einstrahlungen des Magnetfeldes in die Nachweis-Elektronik zurückzuführen ist. Aus dem Rauschen der Messungen ergibt sich eine Nachweisgrenze von 20 ppb für  $^{14}\text{NO}$  und 2 ppb für  $^{15}\text{NO}$ . Für diese Messungen wurden Prüfgasmischungen verwendet, die jeweils 1 ppm  $^{14}\text{NO}$  bzw.  $^{15}\text{NO}$  enthielten.

Wird eine biologische Probe untersucht, kann es sinnvoll sein, die NO-Konzentrationen beider Isotopologe zeitaufgelöst zu verfolgen. Neben der Verwendung von zwei Spektrometern besteht eine Möglichkeit des Nachweises darin, analog zu Kapitel 3.3.3 schnell zwischen zwei verschiedenen Frequenzen zu wechseln. Der Frequenzsprung kann hierbei durch eine Änderung des Stromes erreicht werden. Diese Technik des alternierenden Nachweises stellt hohe Anforderungen an die Stabilisierung, da diese den Laser abwechselnd auf zwei Frequenzen halten muss.

Das LabVIEW-Steuerprogramm kann hierbei den Sprung übernehmen, indem es zwischen zwei Sätzen von Stabilisierungsparametern (Stromoffset, Stabilisierungspunkt, Stabilisierungsfenster, Gain) hin- und herschaltet. Nach einem solchen Sprung benötigen die Lock-In Verstärker für Stabilisierung und Nachweis jedoch einen Zeitraum  $t$ , um die Detektionsphase anzupassen. Dieser Zeitraum ist abhängig von der Zeitkonstanten und liegt bei einer Zeitkonstanten von 100  $\mu\text{s}$  bei etwa 2 Sekunden. Die niedrige Zeitkonstante in Kombination mit der verhältnismäßig langen Zeit, die zum Auffinden des Stabilisierungspunktes benötigt wird, verschlechtert die Nachweisgrenze dramatisch. Wird nur alle 5 Sekunden zwischen den beiden Frequenzen gewechselt, liegt die Nachweisgrenze für  $^{14}\text{NO}$  bei 1 ppm, für  $^{15}\text{NO}$  bei 100 ppb. Die Zeitauflösung ist zur Untersuchung biologischer Proben nur bei langsam ablaufenden Prozessen geeignet.

## 4.5. Fazit

Im diesem Kapitel wurde erstmals ein peltier-gekühlter Quantenkaskadenlaser in Verbindung mit der Faraday-Modulationsspektroskopie genutzt. Im Verlauf der Experimente degradierte der Laser allmählich. Während anfangs noch etwa 5 mW Ausgangsleistung für die Experimente zur Verfügung standen, waren für die Charakterisierung des Spektroskopiesystems lediglich etwa 2 mW nutzbar.

Dieser Leistungsverlust ist möglicherweise auf Einlagerungen von Wasser im Lasermaterial zurückzuführen. Das Gehäuse wurde zwar beim Einbau des Lasers mit reinem Stickstoff gespült und ist abgedichtet, aber ein Eindringen von Wasser kann dennoch nicht vollkommen ausgeschlossen werden. Zur Reduzierung der Restfeuchtigkeit innerhalb des Gehäuses wurde ein Trockenmittel (Silica Gel) gegen Ende der hier beschriebenen Arbeiten in das Lasergehäuse gelegt.

Im Vergleich zu früheren Experimenten hat sich insbesondere die Lebensdauer des QCL stark verbessert, so dass die Möglichkeit der breiten Anwendung in der Laserspektroskopie realistisch ist [Hor05]. Neben dem technologischen Fortschritt ist zu bemerken, dass sich auch die Kosten für QCL's aufgrund wachsender Konkurrenz halbiert haben.

Mit diesem Laser als „Herzstück“ des FAMOS-Aufbaus war eine Erweiterung des Systems auf den Nachweis von  $^{15}\text{NO}$  möglich. Die Nachweisempfindlichkeit für dieses Isotopolog liegt mit  $6 \text{ ppb/Hz}^{1/2}$  aufgrund der starken Q(1,5)-Linie trotz geringerer Laserleistung noch um einen Faktor 2 über der Empfindlichkeit für  $^{14}\text{NO}$  die in der Vorgängerarbeit erreicht wurde.

Es wurde darüber hinaus erstmalig demonstriert, dass mittels eines FAMOS-Spektrometers ein alternierender Nachweis der beiden häufigsten NO-Isotopologe mit einer Zeitauflösung im Bereich mehrerer Sekunden möglich ist.

Eine Verbesserung der Nachweisempfindlichkeit ist sicherlich möglich. Die einfachste Möglichkeit ist hier die Verwendung eines Lasers mit höherer Ausgangsleistung. Sowohl einfache Laserchips als auch komplexe QCL-Systeme mit externem Resonator (EC-QCL) stehen hierzu bereits zur Verfügung [Kos08, Day08]. Ein EC-QCL bringt hierbei neben einer erhöhten Ausgangsleistung auch eine bessere Durchstimbarkeit (bis zu  $155 \text{ cm}^{-1}$ ) und ein gutes Strahlprofil.

Eine weitere Möglichkeit stellt ein Nachweis des FAMOS-Signals auf der Summenfrequenz der Magnetfeldmodulation und der Laserfrequenzmodulation dar. Diese Möglichkeit führte bereits in einer Staatsexamensarbeit, die im Rahmen dieser Arbeit betreut wurde, zu leicht verbesserten Nachweisempfindlichkeiten [Rei05]. Eine Verbesserung der elektronischen Filter zur Selektion der Nachweisfrequenz könnte hier weitere Fortschritte bringen.

Letztlich könnte noch untersucht werden, inwiefern ein Mehrfachdurchgang durch die



Nachweiszelle bis hin zur Kombination mit einem Resonator Vorteile bringen kann.

## 5. Isotopologenselektiver CO-Nachweis

Im menschlichen Organismus wird kontinuierlich CO durch den Abbau von Häm-Molekülen gebildet, das über den Blutkreislauf und die Lunge an die Umgebungsluft abgegeben wird. In diesem Kapitel wird zunächst die CO-Abatmung experimentell untersucht und anschließend theoretische Erklärungen für die Beobachtungen hergeleitet. Bei der theoretischen Betrachtung wird ein Zusammenhang zwischen dem CO im Blut, das als Carboxyhämoglobin vorliegt, und der CO-Konzentration in der ausgeatmeten Luft hergestellt, der es ermöglicht, die Carboxyhämoglobin-Konzentration (abgekürzt: [HbCO]) mittels einer Atemprobe zu messen.

Zur Überprüfung dieses Zusammenhangs wird eine Methode entwickelt, [HbCO] in einer Blutprobe mit dem CALO-Spektrometer zu messen.

Eine Anwendung der Bestimmung von isotonen-markiertem [Hb<sup>13</sup>CO] ist die Bestimmung der Hämoglobin-Gesamtmasse *tHb* im Körper. In Abschnitt 5.3 wird untersucht, ob eine Bestimmung von *tHb* durch Atemanalysen möglich ist.

Der Einfluss eines erhöhten Blutzuckerspiegels auf die CO-Konzentration wird im letzten Abschnitt dieses Kapitels untersucht. Diese Untersuchung wird durch die Hypothese motiviert, dass ein erhöhter Blutzuckerspiegel zu oxidativem Stress führt. Hierdurch kann HO-1 aktiviert werden, was zu einer Erhöhung der CO-Konzentration führen kann [Par99a].

### 5.1. Onlineanalyse von CO im menschlichen Atem

Kohlenmonoxid diffundiert aus dem Blut in die Lunge, so dass ein alveolarer Ursprung hierfür außer Frage steht. Die Frage, ob CO auch in den Atemwegen produziert wird, ist allerdings noch nicht hinreichend beantwortet und wird in der Literatur kontrovers diskutiert. So wurde beispielsweise die Hypothese aufgestellt, dass die Erhöhung der CO-Konzentration bei Asthma und anderen Atemwegserkrankungen auf eine CO-Produktion in den Epithelzellen der Bronchien zurückzuführen ist [Kha01]. Andere Studien kamen zu dem Ergebnis, dass die CO-Konzentration bei Asthma und Mukoviszidose nicht erhöht ist [Zet02]. Die wahrscheinlichste Ursache für diese Diskrepanz liegt in den verwendeten Nachweismethoden.



Grundsätzlich wird zwischen Online- und Offline-Methoden unterschieden. Offline-Methoden erfordern eine aufwändige Probenaufbereitung vor dem eigentlichen Nachweis, wo hingegen Online-Methoden die CO-Konzentration noch während des Atemvorganges messen. Der Vorteil der Offline-Messung ist, dass Proband und Messsystem sowohl zeitlich als auch räumlich voneinander getrennt sein können, allerdings bringen die Probenaufbereitung und -aufbewahrung zusätzliche Fehlerquellen mit sich. Online-Verfahren ermöglichen eine Analyse während des Atemvorgangs, was auch eine schnelle Erkennung unbrauchbarer Atemproben ermöglicht. Darüber hinaus kann auch die Dynamik der CO-Konzentration während des Atmens gemessen werden, während bei einem Offline-Verfahren über die gesamte Probe gemittelt wird.

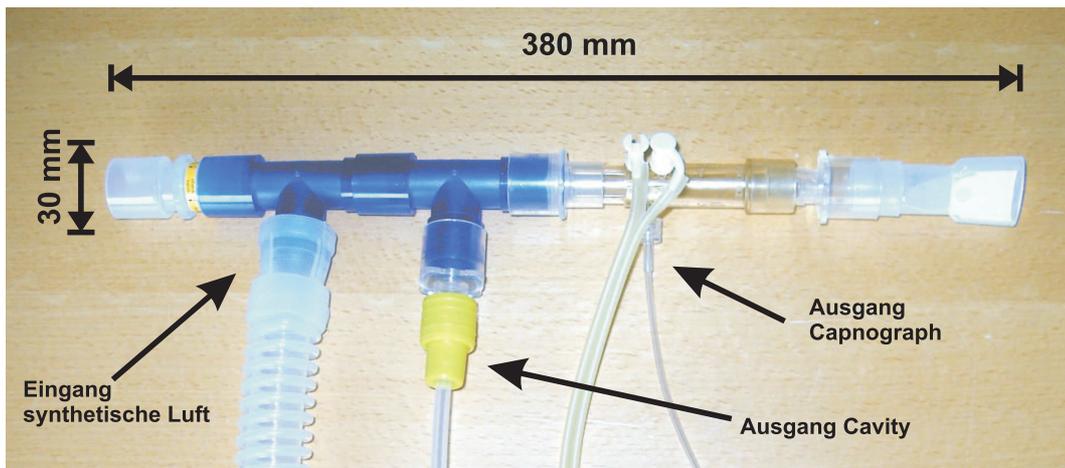
Die meist genutzte Nachweismethode für Kohlenmonoxid im Atem beruht auf elektrochemischen Sensoren, wie sie bereits im Kapitel 2.3.3 vorgestellt wurden. Die Vorteile dieser Nachweismethode sind niedrige Kosten und einfache Handhabung sowie eine Empfindlichkeit, die ausreicht, um CO im Atem nachzuweisen. Aufgrund der zu geringen Zeitauflösung im Bereich mehrerer Sekunden sind elektrochemische Sensoren ungeeignet, atemzugsaufgelöste Messungen durchzuführen. Darüber hinaus können sie zwar die CO-Konzentration im Atem messen, aufgrund ihrer geringen Sensitivität im Bereich von 1 ppm allerdings nur große Änderungen zuverlässig nachweisen. Die in dieser Arbeit verwendete CALOS-Methode vereint eine Zeitauflösung im Bereich unter einer Sekunde mit einer exzellenten Nachweisempfindlichkeit. Im Folgenden werden hiermit durchgeführte atemzugsaufgelöste Messungen beschrieben und diskutiert.

### 5.1.1. Experimentelle Untersuchung von CO-Exspirogrammen

Ziel dieser Untersuchungen war die Analyse der CO-Konzentration in Abhängigkeit von verschiedenen Atemparametern wie der Atemflussrate oder dem Atemvolumen und von anderen Spurengasen im Atem. Darüber hinaus sollte ein Atem- und Messprotokoll gefunden werden, das möglichst reproduzierbare Größen liefert. Hierzu wurde ein Modell der Atmung entwickelt, das die expiratorische CO-Konzentration mit den relevanten Größen in einen Zusammenhang bringt. Die Analyse der CO-Konzentration erfolgte nach der Beschreibung in Kapitel 3.3.2.

#### Probanden und Probennahme

An diesen Versuchen nahmen 3 männliche und ein weiblicher Nichtraucher im Alter zwischen 25 und 31 Jahren teil. An den Experimenten zur Auswirkung des Zigarettenrauchens nahm zusätzlich eine Raucherin teil, die nach eigenen Angaben etwa 1 Schachtel pro Tag raucht, sowie ein Gelegenheitsraucher. Alle Teilnehmer waren zum Zeitpunkt des Experi-



**Abbildung 5.1.:** Das bei der Online-Probennahme benutzte Mundstück besteht aus verschiedenen kommerziell erhältlichen Einzelteilen. Hierdurch kann das Mundstück an verschiedene Anforderungen schnell angepasst werden. (Aus [Tam07])

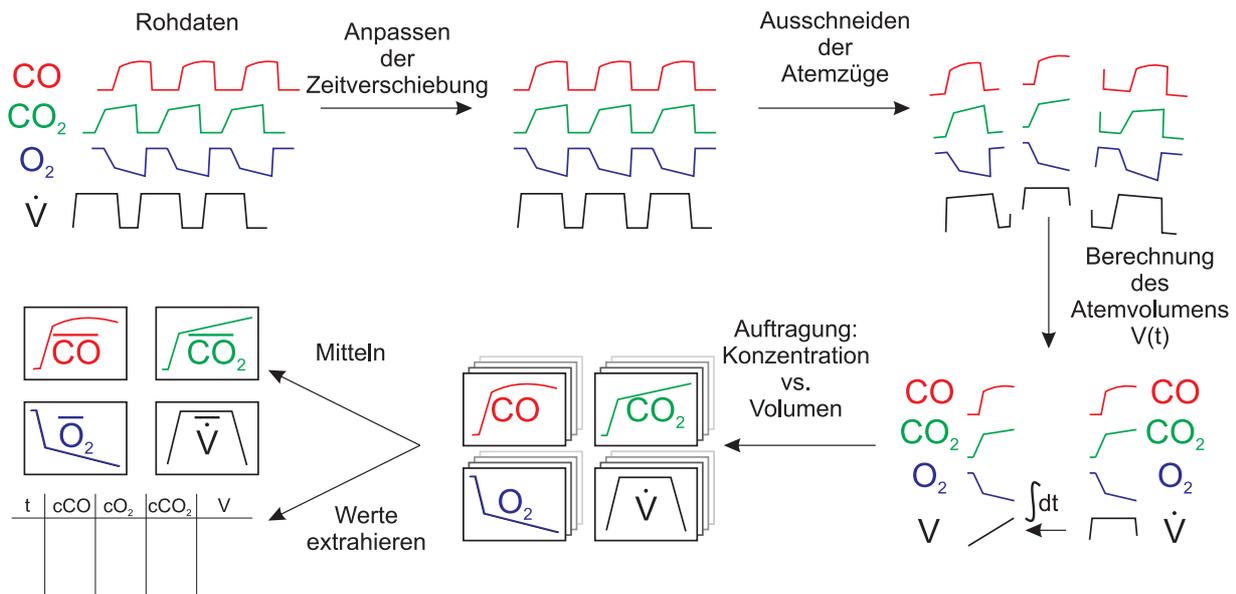
ments gesund und hatten seit mindestens 3 Tagen keine Medikamente zu sich genommen. Die Teilnehmer saßen während des Versuchs in einer angenehmen, entspannten Position. Nach einer Ruhephase von einigen Minuten wurden die Teilnehmer aufgefordert, tief und gleichmäßig durch das Mundstück zu atmen. Die Atemgeschwindigkeit wurde durch das Computerprogramm, das auch die Daten aufnahm, vorgegeben und kontrolliert.

Das Mundstück wurde im Rahmen einer Diplomarbeit entwickelt und setzt sich aus einem Einwegmundstück sowie verschiedenen T-Stücken zusammen, die dazu dienen, die Atemluft dem Spirometer und dem Spektrometer zuzuführen (siehe auch Abb. 5.1) [Tam07].

### Auswertung der Daten

Während der Messung zeichnete ein LabVIEW-Programm die Zeit, Atemflussrate, Sauerstoff- und  $\text{CO}_2$ -Konzentration sowie die Absorption auf und legte sie in einer ASCII-Datei ab. Nach der Durchführung wurden diese Daten durch ein zweites LabVIEW-Programm ausgewertet, indem es die folgenden Schritte durchführte (vgl. auch Abbildung 5.2):

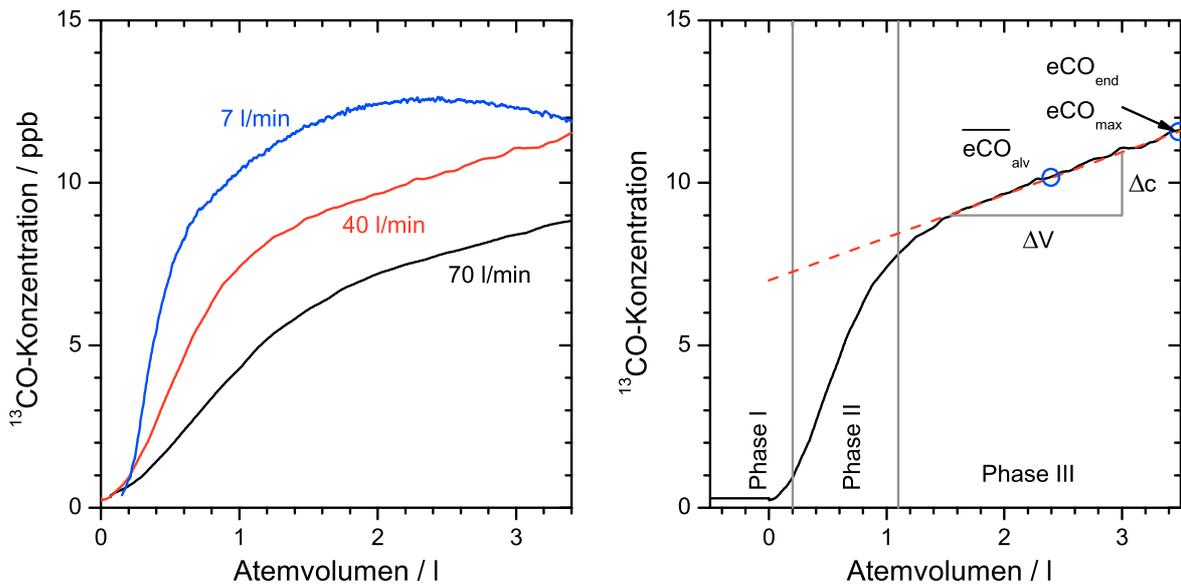
1. Aufgrund der unterschiedlichen Zeit, die der Transport des Atemgases zum Spektrometer und zum Spirometer benötigt, tritt eine Zeitverschiebung zwischen den Daten für den Fluss und die  $\text{O}_2$ -,  $\text{CO}_2$ - und CO-Konzentrationen auf. Diese wird durch die Eingabe der Zeitdifferenzen durch den Benutzer korrigiert.



**Abbildung 5.2.:** Illustration des Auswertungsverfahrens. Zunächst wird die Zeitverschiebung korrigiert und anschließend die einzelnen Atemzüge aus den Rohdaten extrahiert. Zur Ermittlung des Atemvolumens wird der Fluss integriert. Die Expirogramme werden durch Auftragung der Konzentrationen über das Atemvolumen erzeugt, gemittelt und die charakteristischen Werte extrahiert.

2. Durch Eingabe des Absorptionskoeffizienten wird die gemessene Absorption in eine Konzentration umgerechnet. Hierbei können evtl. auftretende Abweichungen der Nulllinie korrigiert werden.
3. Anhand der CO<sub>2</sub>-Messdaten werden die Positionen der einzelnen Atemzüge automatisch bestimmt. Der Atemfluss wird zur Berechnung des Atemvolumens integriert und Expirogramme der O<sub>2</sub>-, CO<sub>2</sub>- und CO-Konzentrationen werden erstellt.
4. Der Benutzer gibt an, über welchen Teil der Expirogramme gemittelt werden soll. Die entsprechenden Mittelwerte werden für die drei gemessenen Gase und den Fluss berechnet.
5. In einer ASCII-Datei werden die Startzeiten der Expirogramme, die mittleren und maximalen Konzentrationen, sowie der mittlere Fluss abgelegt.
6. Die Expirogramme werden in einzelnen Dateien in einem eigenen Verzeichnis abgespeichert.

Die weitestgehend automatisierte Auswertung reduziert den Zeitaufwand, der zur Auswertung der Daten benötigt wird erheblich. Eine detaillierte Beschreibung des Programms findet sich im Anhang A. Im Verlauf dieses Experiments wurden zur Entwicklung eines



**Abbildung 5.3.:** Links: CO Expirogramme zeigen eine starke Abhängigkeit von der Atemflussrate. Bei den dargestellten Expirogrammen wurde für jede Atemflussrate über die Expirogramme eines Probanden gemittelt. Rechts: Illustration zur Ermittlung der Parameter, die in Tabelle 5.1.1 zusammengefasst sind. Die Steigung des Alveolarplateaus ist  $\Delta c / \Delta V$ , zur Berechnung der normierten Alveolarsteigung  $S_n$  wird diese durch die mittlere Konzentration  $e\text{CO}_{\text{alv}}$  in der Phase III dividiert.

optimierten Atemprotokolls verschiedene Atemparameter variiert. CO-Auswaschprozesse bei Rauchern und Nichtrauchern wurden untersucht.

### Abhängigkeit vom Atemfluss

Die Nichtraucher atmeten mit Atemflussraten von 4, 7, 10, 15, 25, 35, 40 und 70 l/min durch das Mundstück. Bei den Flussraten unter 15 l/min wurde zwischen zwei Atemzügen normal geatmet. Für jede Flussrate wurden mindestens 3 Atemzüge aufgezeichnet. Zur Auswertung wurde bei einem Atemfluss über alle Versuchsteilnehmer und die aufgenommenen Atemzüge gemittelt.

Sowohl die gemessenen Konzentrationen an ausgezeichneten Punkten (Tabelle 5.1.1) als auch die Formen der Expirogramme (Abbildung 5.3) zeigen eine starke Abhängigkeit vom Atemfluss. Im linken Teil der Abbildung 5.3 sind drei typische Expirogramme eines Probanden dargestellt, die durch Mittelung über jeweils 7 einzelne Atemzüge entstanden.

Bei niedrigen Flussraten im Bereich unter 15 l/min wird Phase III gekrümmt und zeigt bei einem Fluss von 7 l/min ein ausgeprägtes Maximum bei 2,35 l.

Ein Expirogramm lässt sich in drei Phasen einteilen. Die Phase I bezeichnet dabei das Volumen, das zu Beginn der Expiration die Atemwege verlässt. Diese Phase ist dadurch



Flussrate	Max eCO	eCO	Ende eCO	Steigung Phase III	eCO Phase III	S <sub>n</sub>	N
l/min	ppm	ppm	ppm	ppm/l	ppm	l <sup>-1</sup>	
4	3,61	3,13	2,82	—	—	—	9
7	3,53	3,09	3,17	—	—	—	9
10	3,61	2,96	3,51	—	—	—	14
15	3,67	2,92	3,67	0,30	3,16	0,09	16
25	3,58	2,72	3,58	0,32	3,03	0,10	21
35	3,16	2,33	3,16	0,35	2,68	0,13	21
40	2,93	2,11	2,93	0,29	2,44	0,12	20

**Tabelle 5.1.:** Charakteristische Werte der gemessenen Exspirogramme. Gemittelt wurde über 3 Probanden. Die mittlere Standardabweichung liegt bei 26 % des Mittelwertes für die verschiedenen CO-Konzentrationen, bei 31 % für die Steigung des Alveolarplateaus und bei 10 % für die normierte Steigung des Alveolarplateaus. Die Standardabweichung von Atemzug zu Atemzug bei einer einzelnen Person ist deutlich geringer (unter 3 %), wobei Schwankungen von Tag zu Tag bei einer Person bis zu 100 % betragen können.

gekennzeichnet, dass die Konzentration in der Atemluft der Konzentration in der Umgebungsluft entspricht. Die Luft stammt aus den oberen Atemwegen. In Phase II steigt die CO-Konzentration rapide an, bis sie in Phase III ein leicht ansteigendes (bei niedrigen Flüssen gekrümmtes) Plateau erreicht. Der Ursprung der Luft in Phase II liegt in den Atemwegen, während Phase III überwiegend Luft aus den Alveolen enthält.

Im rechten Teil der Abbildung 5.3 sind die Phasen sowie einige charakteristische Größen an einem Beispielexspirogramm eingezeichnet.

Für Atemflüsse über 15 l/min fällt die maximale CO-Konzentration  $eCO_{\max}$  und die CO-Konzentration am Ende der Ausatmung  $eCO_{\text{end}}$  zusammen. Da Phase III bei niedrigeren Flüssen gekrümmt ist, liegt hier  $eCO_{\max}$  über  $eCO_{\text{end}}$ . In den meisten Studien, die die CO-Konzentration im Atem mit verschiedenen Krankheitsbildern in einen Zusammenhang brachten, wurde diese Größe gemessen. Auch in dem in Kapitel 5.4 vorgestellten Experiment wird dieser Wert genutzt. Zur Bestimmung der mittleren CO-Konzentration  $\overline{eCO}$  wird das Exspirogramm über alle Phasen gemittelt. Einige wenige Studien verwenden Offline-Methoden, bei denen Atemproben in Probenbehältern gesammelt und anschließend, ggf. nach einer Vorbehandlung, analysiert werden. Eine solche Probensammlung entspricht ebenfalls einer Mittelung über den gesamten Atemzug. Zum Vergleich mit solchen Studien sollte demnach  $\overline{eCO}$  benutzt werden.

Im Fall von CO<sub>2</sub>-Exspirogrammen wird häufig die normierte Alveolarsteigung  $S_n$  angegeben. Diese ist der Quotient aus der Steigung der Phase III  $\Delta c/\Delta V$  und der mittleren Konzentration  $\overline{eCO}_{\text{alv}}$  in dieser Phase.

Die Standardabweichung der charakteristischen Größen liegt bei den Exspirogrammen aller Flussraten unter 3 %, was eine ausgezeichnete Reproduzierbarkeit von Atemzug zu

Atemzug bedeutet.

Werden allerdings Atemzüge verschiedener Messtage verglichen, treten Schwankungen von über 100 % in der CO-Konzentration auf, die sich durch eine unterschiedliche CO-Exposition des Probanden erklären lassen. Ursachen für eine erhöhte CO-Konzentration im Atem können Autoabgase oder der Aufenthalt in einem Raum mit Rauchern sein.

Von Proband zu Proband treten ebenfalls Schwankungen im Bereich von bis zu 100 % auf.

Diese hohen Schwankungen treten nicht bei der Betrachtung der normierten Alveolarplateauanstiegung  $S_n$  auf. Hier liegt die Standardabweichung bei 10 % des Mittelwertes, sowohl im Vergleich zwischen unterschiedlichen Probanden als auch im Vergleich eines Probanden an verschiedenen Tagen.

Die gemessenen Werte sind in Tabelle 5.1.1 zusammengefasst.

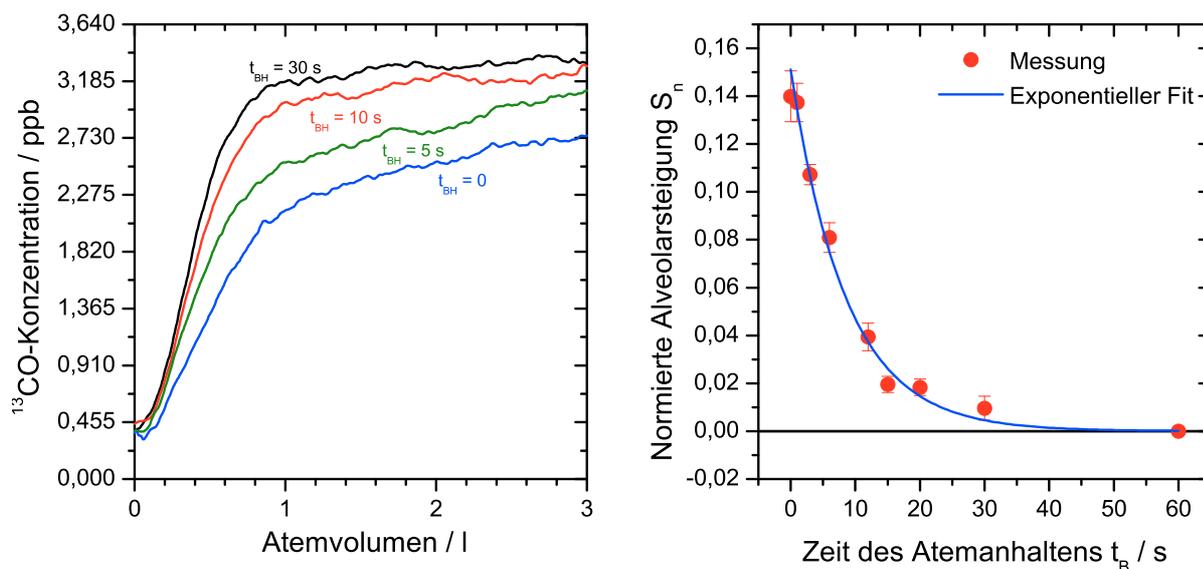
### Abhängigkeit vom Atemanhalten

Dieser Versuch wurde wiederum nur mit den Nichtraucher durchgeföhrt. Zwischen dem Ein- und dem Ausatmen sollten die Probanden für eine Zeit  $t_{BH}$  den Atem anhalten. Es wurden jeweils mindestens 5 Expirogramme für eine Zeit  $t_{BH}$  von 0, 1, 3, 5, 10, 15, 20 und 30s aufgenommen. Diese Versuchsreihe wurde mit einer Atemflussrate von 30l/min und 4l/min durchgeföhrt. Zur Auswertung wurde bei einem Atemfluss über alle Versuchsteilnehmer und die aufgenommenen Atemzüge gemittelt.

Bei einem Atemfluss von 30l/min behalten die Expirogramme in der Phase III unabhängig von der Zeit des Atemanhaltens einen linearen Verlauf, bei längerem Atemanhalten verringert sich jedoch die Steigung. Wird die normalisierte Alveolarsteigung gegen die Zeit des Atemanhaltens aufgetragen (Abbildung 5.4, rechts), so zeigt sich ein exponentieller Abfall der Steigung mit einer Abklingzeit von 8,6s. Ein Modell, das die Lunge als Röhre behandelt, in der lediglich Diffusion stattfindet, reproduziert diese Beobachtung. Die Messung bei langsamem Atemfluss ist mit einem derart vereinfachten Modell allerdings nicht zu erklären.

Bei langsamen Atemflüssen geht das Maximum mit steigender Zeit des Atemanhaltens in ein Plateau über, das im späteren Verlauf der Atmung abfällt. Erwähnenswert ist, dass die CO-Konzentration im letzten Teil des Expiogramms im Rahmen der Messunsicherheit unabhängig von der Zeit des Atemanhaltens wird.

Zur Erklärung der Effekte beim Atemanhalten und der Flussabhängigkeit ist die Entwicklung eines mathematischen Modells der CO-Abatmung notwendig. Dies wird in Kapitel 5.1.2 behandelt.



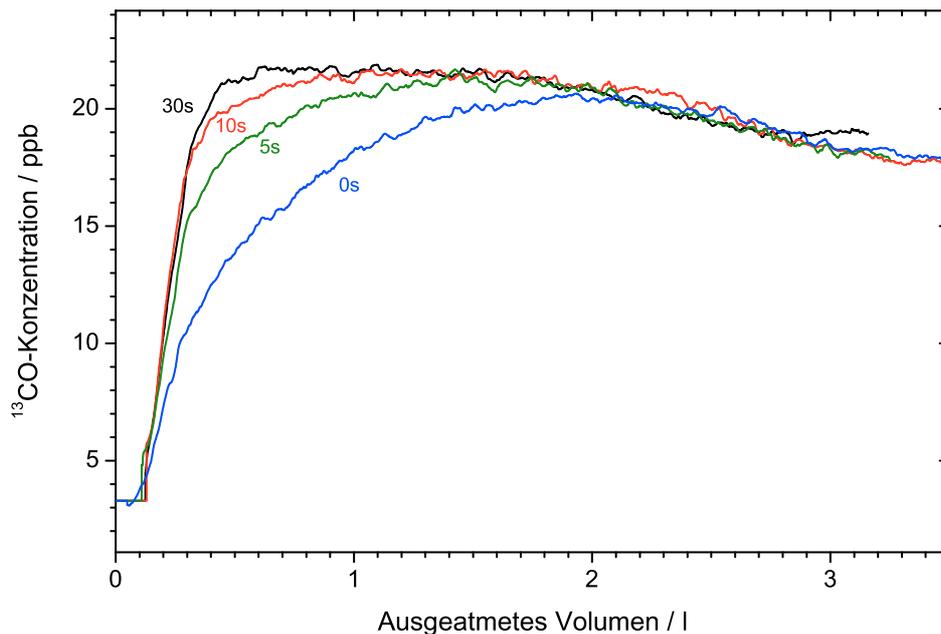
**Abbildung 5.4.:** Die CO-Expirogramme zeigen neben einer Flussabhängigkeit auch eine Abhängigkeit von der Zeit des Atemanhaltens vor der Expiration (links). Die normierte Alveolarsteigung fällt mit steigender Zeit des Atemanhaltens exponentiell ab (rechts). Atemfluss: 30l/min

### Auswaschprozess nach CO-Exposition

Kohlenmonoxid, das über die Atemluft in die Blutbahn gelangt, bindet am Hämoglobin und verbleibt dort, bis es über die Lunge wieder an die Atemluft abgegeben wird. Diese Ausscheidung des CO erfolgt nicht instantan; vielmehr folgt die CO-Konzentration im Blut einem exponentiellen Abfall. Die Zeitkonstante für diesen Abfall kann bestimmt werden, indem die Probanden zunächst einer erhöhten CO-Konzentration ausgesetzt werden. Hierzu dient für zwei Probanden (1 Nichtraucher, 1 Raucherin) der Rauch jeweils einer Zigarette. Der Nichtraucher hat niemals zuvor geraucht, die Raucherin rauchte 4 Stunden vor dem Versuch ihre letzte Zigarette. Mehrere Wochen nach diesem Experiment atmete der Nichtraucher ein Gemisch aus 15 ppm  $^{13}\text{CO}$  in synthetischer Luft für 15 min ein.

Nach diesen unterschiedlichen CO-Expositionen wurde die CO-Konzentration im Atem gemessen, wobei die erste Atemprobe innerhalb der ersten 10 min nach dem Rauchen gemessen wurde. Zur Messung wurden jeweils 10 Atemzüge bei einem Atemfluss von 30l/min aufgezeichnet.

In einem zeitlichen Abstand von etwa 30 min wurden weitere Expirogramme gemessen. Die maximale CO-Konzentration wurde über die Zeit aufgetragen. Das Ergebnis dieser Messungen zeigt Abbildung 5.6. Die Linie zeigt den exponentiellen Fit an die experimentellen Daten. Bei dem Experiment mit der Raucherin gibt es vor  $t = 0$  keine konstante Basislinie, da der Abstand zur vorherigen Zigarette noch nicht lang genug war. Die Zeit-



**Abbildung 5.5.:** Bei einem Atemfluss von  $41/\text{min}$  wird auch bei langen Zeiten mit angehaltenem Atem kein Plateau in der Phase III der Expiration erreicht. Das Atemanhalten führt vielmehr zu einem Plateau in der ersten Hälfte des Ausatmens und zu einem anschließenden Abfall.

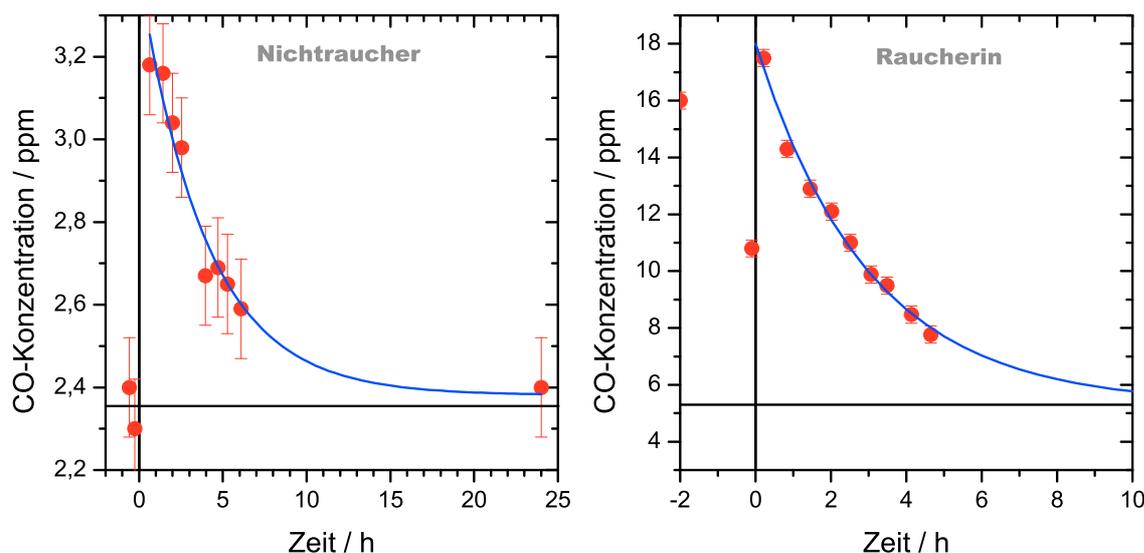
konstanten sind  $180 \pm 40$  min für das Abklingen bei der Raucherin und  $240 \pm 40$  min für den Nichtraucher.

Die Messung nach der Prüfgasexposition ist nicht dargestellt, sie ergab eine Abklingzeit von  $240 \pm 40$  min.

Diese Messungen erklären die großen Schwankungen von Person zu Person und von Tag zu Tag bei der selben Person. Bereits eine kurze Exposition zu erhöhten CO-Werten führt zu einer langfristigen Veränderung der CO-Konzentration. Dies erschwert die Anwendung der CO-Atemanalyse in der Diagnostik, da Rückschlüsse auf Prozesse im Körper nur dann zulässig sind, wenn Einflüsse aus der Umwelt ausgeschlossen werden können.

Neben den Messungen zum Abklingen der CO-Konzentration wurden vor und nach dem Rauchen Atemzüge bei niedrigem ( $41/\text{min}$ ) und hohem ( $301/\text{min}$ ) Atemfluss aufgezeichnet. Bei niedrigen Atemflussraten ist ein deutlicher Unterschied am Ende der Phase II zwischen Raucher und Nichtraucher zu erkennen (Abbildung 5.7). Hierbei ist zu beachten, dass die Skalierung der beiden Expirogramme aufgrund der unterschiedlichen CO-Konzentrationen in der Atemluft von Rauchern und Nicht-Rauchern unterschiedlich gewählt wurde, um den Unterschied in der Form deutlicher heraus zu stellen.

Im Vergleich zum Nichtraucher zeigt der Raucher in diesem Bereich eine weiter erhöhte CO-Konzentration. Zur Ursache dieser Erhöhung lässt sich spekulieren, dass in den Atem-



**Abbildung 5.6.:** Abklingen der CO-Konzentration nach Rauchen einer Zigarette. Links: Nichtraucher, Rechts: Raucherin. Die Raucherin rauchte ihre letzte Zigarette 4 Stunden vor dem Experiment, der Nichtraucher hat vorher nie geraucht. Rot dargestellt sind die Messungen, in blau ist ein exponentieller Abfall angefitet. Die Abklingzeiten sind 180 min für die Raucherin und 240 min für den Nichtraucher.

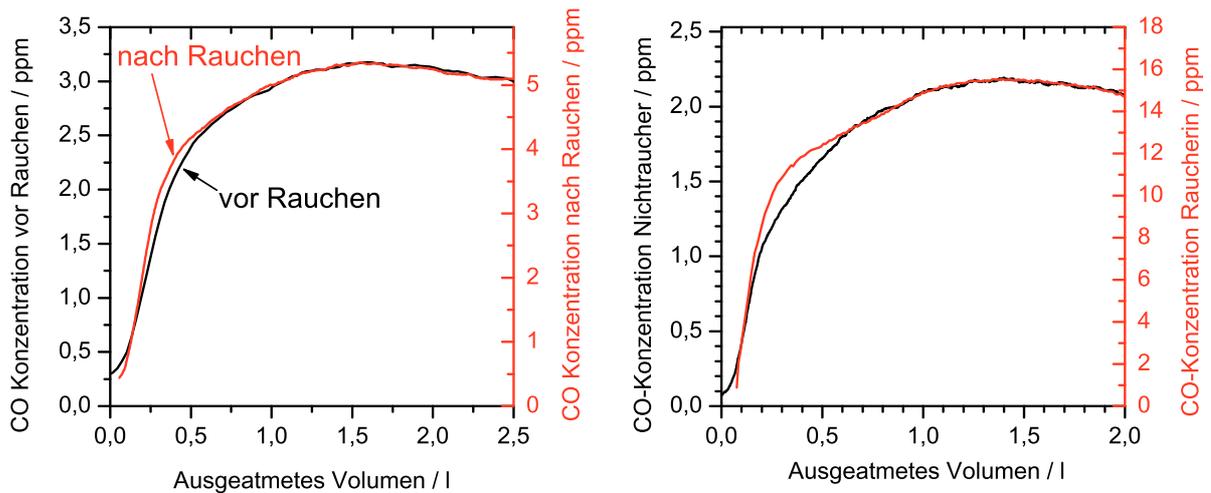
wegen CO produziert wird. Diese Produktion könnte bei Rauchern erhöht sein, da die Luftwege hier durch den Zigarettenrauch einer starken Belastung ausgesetzt sind. Unterstützt wird diese Vermutung durch den Vergleich von Exspirogrammen eines Nichtrauchers, der eine einzelne Zigarette raucht. Auch hier zeigt sich eine Erhöhung in dem oben genannten Bereich, auch wenn diese Erhöhung nicht so stark ausgeprägt ist.

Um diese Spekulation zu untermauern sind zwar Untersuchungen an weiteren Probanden notwendig. Allerdings zeigt diese Untersuchung, welche Möglichkeiten der Echtzeit-Nachweis bietet – jegliche Mittlung oder eine schlechtere Zeitauflösung würde die gemessenen Informationen in der Phase II der Expiration zunichte machen. Die Ergebnisse dieses Abschnitts wurden im *Journal of Breath Research* veröffentlicht [Fri07].

Zur Erklärung der experimentellen Beobachtungen soll nun die CO-Abatmung mathematisch beschrieben werden.

### 5.1.2. Entwicklung eines mathematischen Modells der CO-Abatmung

Die menschliche Lunge besteht aus zwei Lungenflügeln, die über die Luftröhre mit dem Rachenraum verbunden sind. Der kleinere linke Lungenflügel unterteilt sich in zwei Lungenlappen, der rechte in drei. Das Gewebe der Lunge besteht aus einem luftführenden Teil und den Alveolen, in denen der Gasaustausch mit dem Blut durch Diffusion durch die

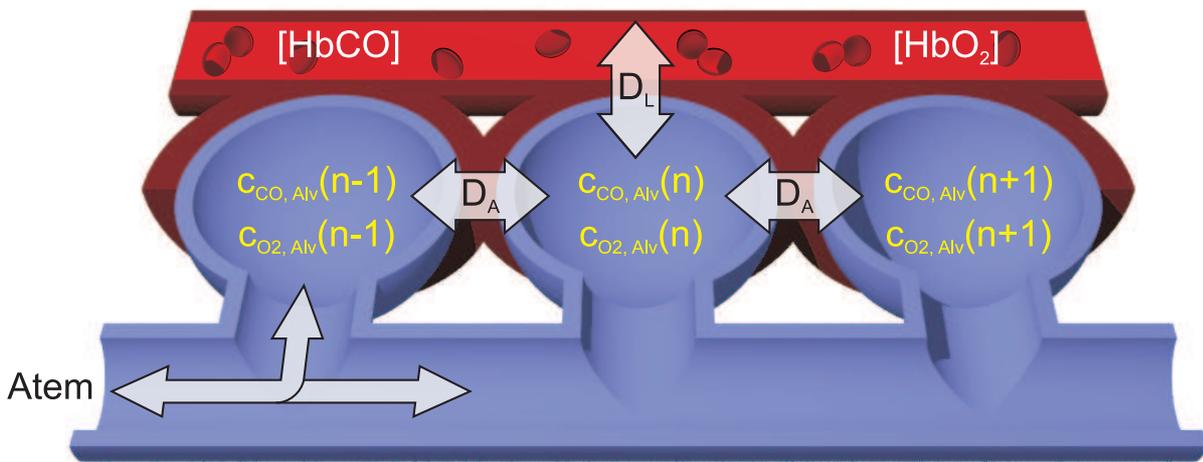


**Abbildung 5.7.:** Die Form der Phase III von Rauchern und Nicht-Rauchern zeigt eine gute Übereinstimmung. Am Ende der Phase II jedoch zeigt sich eine Abweichung (rechts). Eine mögliche Erklärung hierfür ist eine CO-Produktion in den Atemwegen, die bei Rauchern aufgrund der Belastung erhöht sein könnte. Einen weiteren Hinweis auf diese Möglichkeit stellt der direkte Vergleich zwischen Expirogrammen eines Nichtrauchers vor und nach dem Rauchen dar (links).

Membranen der Alveolen und Blutgefäße stattfindet. Die Lunge selbst verfügt über kein Muskelgewebe, sondern folgt der Bewegung der Rippen und des Zwerchfells aufgrund von Adhäsionskräften.

Es soll ein möglichst einfaches Modell der Lunge entwickelt werden. Hierzu wird die Lunge in  $N$  Segmente geteilt, die linear angeordnet sind (vgl. Abbildung 5.8). Jedes dieser Segmente ist mittels einer Membran vom Blut getrennt, durch die der Gasaustausch stattfinden kann. Bei der Einatmung werden die Segmente nacheinander mit der Umgebungsluft gefüllt, bei der Ausatmung werden sie in umgekehrter Reihenfolge wieder entleert, so dass das erste gefüllte Segment das letzte ist, das entleert wird. Ein Gasaustausch zwischen den Segmenten soll nur zwischen nächsten Nachbarn durch Diffusion möglich sein. Das Modell basiert auf einer Veröffentlichung von N.M. Tsoukias zum Gasaustausch von NO und wird hier um die Diffusion zwischen nächsten Nachbarn erweitert und auf das CO Molekül übertragen [Tso00].

Im Folgenden wird von einer vollständigen Füllung und Entleerung der Lungen ausgegangen. Dies entspricht einem Atemvolumen von etwa 3 Litern. Durch die Einatmung vermischt sich die Luft in den Segmenten mit der eingeatmeten Luft, wodurch eine Ausgangskonzentration  $c_{CO,0}$  erreicht wird. Jedes einzelne Segment hat ein Volumen von  $\delta V = V/N$ , das in der Zeit  $\delta t = \delta V/\dot{V}$  gefüllt wird.  $V$  ist hierbei das Gesamtvolumen,  $N$  die Anzahl der Segmente und  $\dot{V}$  die Atemflussrate. Das 1. Fick'sche Gesetz beschreibt die Änderung des CO-Partialdrucks im  $n$ -ten Segment  $p_{CO,Alv}(n)$  in Abhängigkeit von



**Abbildung 5.8.:** Die Lunge ist in  $N$  Kammern unterteilt, die nacheinander gefüllt und wieder entleert werden. Den Gasaustausch zwischen Blut und Luft vermittelt die Diffusionskapazität  $D_L$ . Da Kohlenmonoxid und Sauerstoff um die Bindungsstellen am Hämoglobin konkurrieren, ist die zur Verfügung stehende CO Menge im Blut auch von der Sauerstoffkonzentration abhängig, welche die Affinität zum Hämoglobin beeinflusst. Ein Gasaustausch zwischen unterschiedlichen Segmenten ist nur zwischen nächsten Nachbarn möglich und wird durch einen alveolaren Diffusionskoeffizienten  $D_A$  vermittelt.

der Diffusionskapazität  $D_L$  und dem Partialdruckunterschied zwischen Blut und Alveolen  $p_{CO,Bl}(n) - p_{CO,Alv}(n)$  in der Zeit  $\delta t$ :

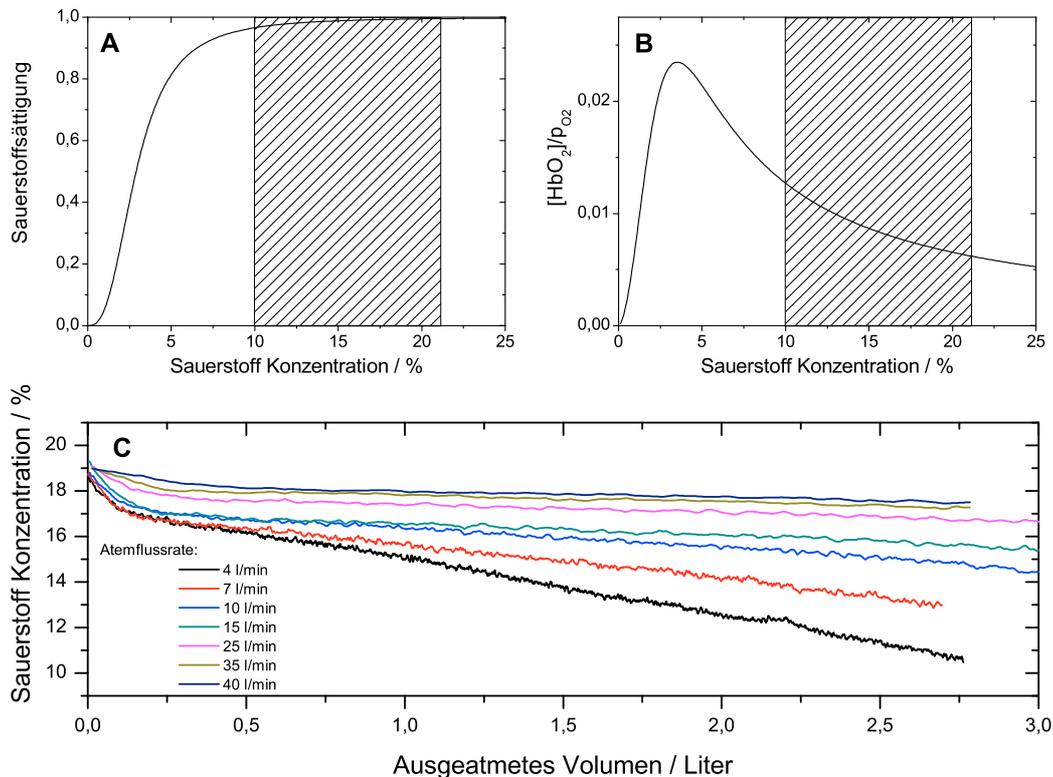
$$\delta c_{CO,Alv}(n) = \frac{\delta p_{CO,Alv}(n)}{p_{Alv}(n)} = \frac{D_L}{V} \cdot (p_{CO,Bl}(n) - p_{CO,Alv}(n)) \cdot \delta t \quad (5.1)$$

Dieselbe Gesetzmäßigkeit beschreibt den Austausch zwischen Segment  $n$  und seinen nächsten Nachbarn  $n + 1$  und  $n - 1$ :

$$\begin{aligned} \delta p_{CO,Alv}(n) &= D_A/V \cdot (p_{CO,Alv}(n-1) - p_{CO,Alv}(n)) \cdot \delta t \\ &+ D_A/V \cdot (p_{CO,Alv}(n+1) - p_{CO,Alv}(n)) \cdot \delta t \end{aligned} \quad (5.2)$$

Hierbei beschreibt der erste Term auf der rechten Seite den Austausch mit dem linken Nachbarn, der zweite den Austausch mit dem rechten Nachbarn.  $D_A$  ist die vermittelnde Diffusionskapazität. Zur Berechnung der CO-Konzentration in den Segmenten fehlt nun noch der Partialdruck im Blut. Dieser hängt im chemischen Gleichgewicht im Blut über die Haldane-Gleichung mit der Carboxyhämoglobin-Konzentration  $[HbCO]$ , der Oxyhämoglobin-Konzentration  $[HbO_2]$  sowie dem Sauerstoffpartialdruck zusammen [Hal97]:

$$\frac{[HbCO]}{p_{CO}} = \frac{[HbO_2]}{p_{O_2}} \cdot M \quad (5.3)$$



**Abbildung 5.9.:** Bild A zeigt die Sauerstoffsättigungskurve unter normalen physiologischen Bedingungen. Der Bereich, in dem normale Atmung stattfindet, ist schraffiert dargestellt. Der Quotient aus Sättigung und Konzentration wird als Affinität bezeichnet. Diese nimmt ihr Maximum bei etwa 3% an und fällt anschließend ab (B). Der Simulation liegen reale Sauerstoffkonzentrationen zu Grunde (C). Hierzu wurde die Sauerstoffkonzentration von 3 Probanden mehrfach bei verschiedenen Flüssen gemessen und gemittelt. Für die Simulation wurden lineare bzw. quadratische Funktionen an die Kurven gefittet.

Der Haldane-Faktor  $M = 250$  gibt dabei das Verhältnis der Affinitäten von Hämoglobin zu CO und O<sub>2</sub> an [Cob65]. Wichtig ist diese Relation, da die beiden Gase um dieselben Bindungsstellen am Hämoglobin konkurrieren.

Gängige Modelle zur Berechnung der Sauerstoff-Affinität des Hämoglobins gehen von den Reaktionsgleichungen von O<sub>2</sub> mit den Häm-Gruppen der roten Blutkörperchen und den zugehörigen Ratenkoeffizienten aus [Das04]. Das Ergebnis ist aufgrund der kooperativen Wechselwirkung der 4 Häm-Gruppen ein sigmoidaler Verlauf wie in Abbildung 5.9A dargestellt. Der zur Berechnung der Expirogramme benötigte zeitliche Verlauf der Sauerstoffkonzentration wurde bei verschiedenen Atemflussraten bei 3 Personen gemessen. Die gewonnenen Daten wurden über die Personen gemittelt (Abbildung 5.9C). An die



Parameter	Formelzeichen	Wert	Einheit	Referenz
Lungendiffusionskapazität	$D_L$	25	ml/min/torr	[Tso00]
		0,30	ml/s/hPa	
Austauschdiffusionskapazität	$D_A$	0,83	ml/min/torr	-
		0,0099	ml/s/hPa	
Zahl der Segmente	$N$	1000	-	-
Atemzugvolumen	$V$	3000	ml	-
Atemflusrate	$\dot{V}$	4...40	l/min	-
Ausgangskonzentration	$c_{CO,0}$	1,8	ppm	-
Alveolarer Luftdruck	$p_{Alv}$	101,3	kPa	-
Carboxyhämoglobinkonzentration	$[HbCO]/[Hb]$	0,45	%	-
Haldane-Konstante	$M$	250	-	[Cob65]

**Tabelle 5.2.:** Parameter für die Berechnung der Expirogramme

Messdaten wurden Polynome zweiter Ordnung gefittet, die schließlich zur Berechnung der Sauerstoffkonzentration in der Simulation benutzt wurden. Zur detaillierten Herleitung der Sauerstoffaffinität sei auf die Veröffentlichung [Das04] verwiesen.

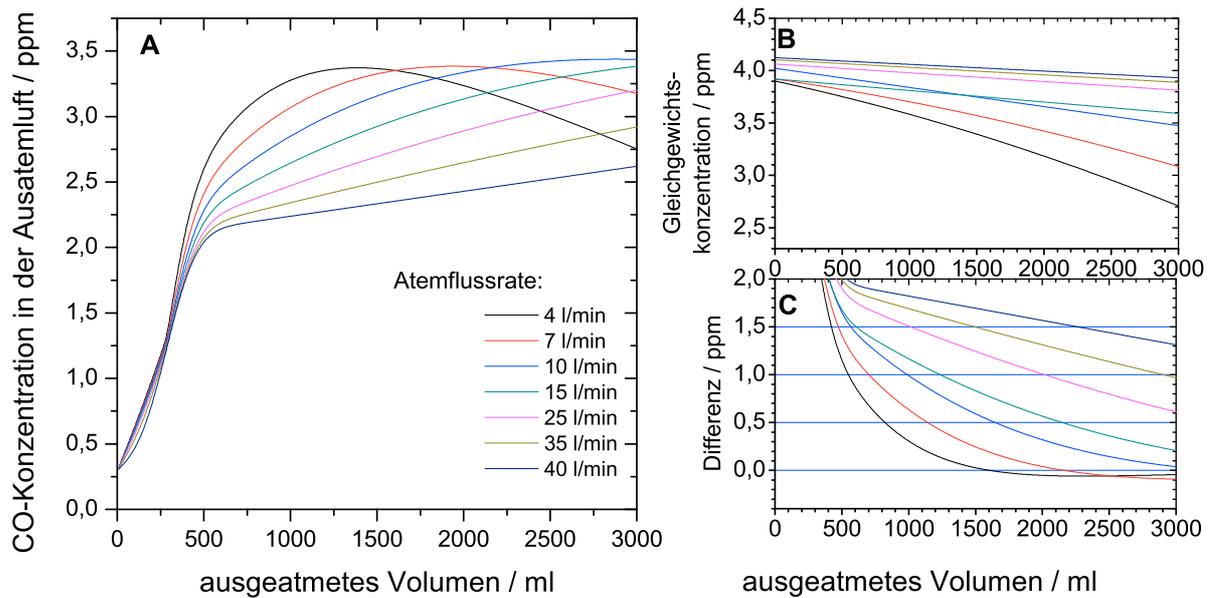
Die Berechnung der CO-Konzentration in den Segmenten erfolgt mittels eines Algorithmus in der Mathematik-Software Mathematica 5.0 (s. Anhang B.1). Hierbei wird zunächst das Element  $N$  auf die Ausgangskonzentration  $c_{CO,0}$  gesetzt. Anschließend wird mittels der Gleichung 5.1 die Änderung aufgrund der Diffusion aus dem Blut und mittels 5.3 der Gasaustausch mit dem benachbarten Element für die Elemente  $N$  und  $N - 1$  berechnet.

Im nächsten Zeitschritt wird die Diffusion aus dem Blut für die Elemente  $N$  und  $N - 1$  sowie der Austausch zwischen den Elementen  $N$  bis  $N - 2$  berechnet. Dies wird bis zum Element 1 fortgesetzt, bei dem die Einatmung abgeschlossen ist. Die Ausatmung erfolgt in einer zweiten identischen Schleife mit dem Unterschied, dass als Ausgangskonzentration die Konzentration nach der Einatmung angenommen wird. Insgesamt beträgt also die Zeit, in der CO aus dem Blut in das  $n$ -te Segment diffundiert

$$T_n = n \cdot (\delta t_{ein} + \delta t_{aus}) \quad (5.4)$$

Die Indizes „ein“ und „aus“ bezeichnen hierbei die Zeitschritte bei der Ein- bzw. Ausatmung, es können also unterschiedliche Atemflussraten bei der Ein- und Ausatmung berücksichtigt werden.

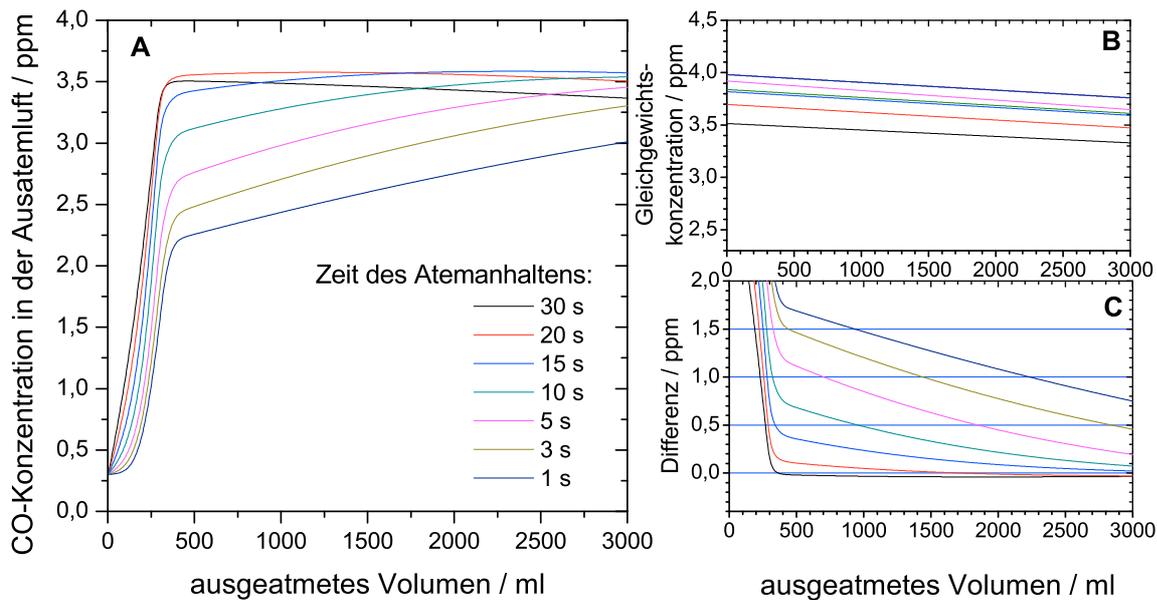
Die zur Berechnung der Expirogramme benutzten Konstanten sind der Tabelle 5.1 zu entnehmen. Das Ergebnis (Abbildung 5.10A) zeigt während der ersten 600 ml Atemluft einen steilen Anstieg der CO-Konzentration. Dem schließt sich eine Phase an, die für



**Abbildung 5.10.:** Berechnete Expirogramme (A) zeigen eine starke Abhängigkeit von der Atemflussrate. Darüber hinaus zeigen sie ein ausgeprägtes Maximum bei niedrigen Flüssen, wie es bei anderen Gasen nicht vorkommt. Diese Form ist auf ein Abfallen der Gleichgewichtskonzentration (B) aufgrund der höheren Affinität zum Hämoglobin bei niedrigen Sauerstoffkonzentrationen zurückzuführen. Es zeigt sich, dass die CO-Konzentration im Atem nur bei langsamen Flüssen und im späteren Verlauf des Expirogramms nahe bei der Gleichgewichtskonzentration liegt, wie die in C dargestellte Differenzkurve zeigt.

hohe Flüsse (20-40 l/min) langsam linear ansteigt. Für geringere Flüsse ist der Graph gekrümmt und zeigt sogar für Flüsse unter 10 l/min ein Abfallen der CO-Konzentration nach Erreichen eines ausgeprägten Maximums, was die experimentellen Beobachtungen reproduziert. Dieser Abfall begründet sich in einer Zunahme der Affinität des CO zu Hämoglobin aufgrund sinkender Sauerstoffsättigung, womit eine Abnahme der Gleichgewichtskonzentration (Abbildung 5.10B) verbunden ist. Bei solch geringen Flüssen dauert ein Atemzug bereits etwa 1 Minute, was sich drastisch auf die Sauerstoffkonzentration und damit auf die Sättigung auswirkt.

Darüber hinaus zeigt sich, dass für hohe Atemflüsse ein Gleichgewicht zwischen alveolarer CO-Konzentration und dem Partialdruck im Blut selbst am Ende der Expiration noch nicht erreicht ist (Abbildung 5.10C). Dieses bildet sich erst bei Atemflüssen von unter 15 l/min zum Ende des Atemzugs hin aus. Für niedrigere Flüsse kann von einem Erreichen des Gleichgewichtes im Maximum der CO-Konzentration ausgegangen werden. Das Einstellen eines Gleichgewichts zwischen alveolarer CO-Konzentration und Partialdruck im Blut nimmt etwa 20 Sekunden in Anspruch. Das Erreichen dieses Gleichgewichts ist aus zwei Gründen sinnvoll. Zum Einen wird die CO-Konzentration im Atemgas nicht mehr durch die Lungendiffusionskapazität beeinflusst, die von Mensch zu Mensch unterschied-



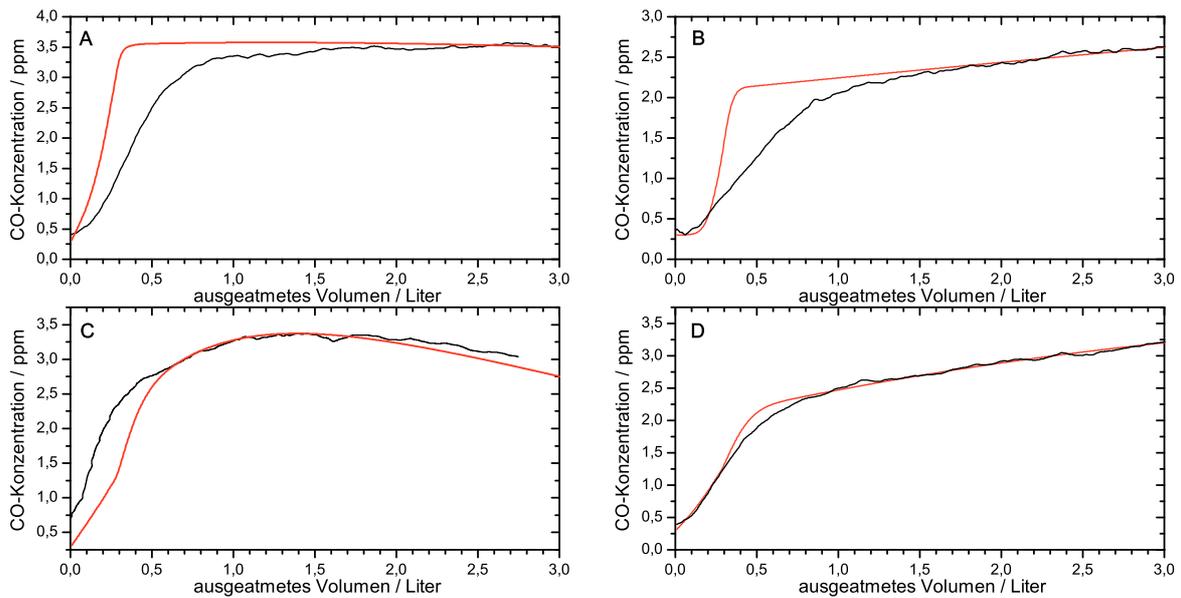
**Abbildung 5.11.:** Nach dem Anhalten des Atems für einige Sekunden verlaufen die Expirogramme (A) mit zunehmender Zeitspanne flacher. Die Differenz (C) aus CO-Konzentration im Atem und Gleichgewichtskonzentration (B) zeigt, dass die Gleichgewichtskonzentration bei einem Atemanhalten von 15 s am Ende der Expirationsphase erreicht wird, bei längeren Zeiten liegt die Differenz während der gesamten Ausatmung nahe bei 0. Die Expirogramme wurden für einen Ausatemfluss von 25 l/min berechnet. Wird die Luft länger als 15 Sekunden angehalten, bewegt liegt die alveolare CO Konzentration im Bereich der Gleichgewichtskonzentration.

lich ist. Zum Anderen kann mittels der Haldane-Gleichung (5.3) die Carboxyhämoglobin-Konzentration aus der CO- und O<sub>2</sub>-Konzentration im Atem bestimmt werden.

Langsame Atmung konstant aufrecht zu erhalten erfordert einige Übung und ist darüber hinaus mit einiger Anstrengung verbunden. Um die erforderliche Zeit bis zum Eintreten eines Gleichgewichts zu erreichen, kann alternativ zwischen Einatmung und Ausatmung für eine gewisse Zeit die Luft angehalten werden. Auch dies kann mittels der oben dargestellten Berechnungen simuliert werden. Hierzu wird für alle Segmente nach dem Einatmen der Austausch mit dem Blut und den nächsten Nachbarn für die Zeit des Atemanhaltens berechnet und erst anschließend die Ausatmung nach dem oben beschriebenen Algorithmus simuliert.

Wenn der Atem für mehr als 15 Sekunden angehalten wird, verlaufen die Expirogramme bei höheren Volumina fast waagrecht (Abbildung 5.11A); die Differenz zur Gleichgewichtskonzentration liegt bei langen Atemzügen unter 100 ppb, allerdings wird diese auch hier nicht erreicht (Abbildung 5.11C).

Aus dem Modell geht hervor, dass die Krümmung der Phase III bei kleinen Flüssen auf die Änderung der Affinität zum Hämoglobin zurückzuführen ist, die wesentlich von der Sauerstoffsättigung des Blutes abhängig ist. Lange Ausatemphasen führen zu einer



**Abbildung 5.12.:** Vergleich zwischen gemessenen (schwarz) und berechneten (rot) Expirogrammen. oben: mit Atemanhalten (A: 20 s, B: 1 s) unten: mit unterschiedlichen Flüssen (C: 41 l/min, D: 25 l/min). Die Übereinstimmung der simulierten Expirogramme mit den experimentellen Daten ist in der Phase III der Expiration gut. Die mangelnde Übereinstimmung in Phase II ist darauf zurückzuführen, dass der Einfluss der Atemwege nicht berücksichtigt wurde.

Senkung der Sauerstoffsättigung, was eine erhöhte Affinität bewirkt, wodurch weniger CO abgegeben wird. Weiterhin geht aus dem Modell hervor, dass erst nach Erreichen des Maximums bei niedrigen Flussraten die alveolare CO-Konzentration mit der CO-Konzentration im Blut im Gleichgewicht ist.

### 5.1.3. Vergleich der Simulation mit dem Experiment

Zum Vergleich der experimentellen Ergebnisse mit den berechneten Expirogrammen dient die grafische Darstellung 5.12, in der die theoretischen und experimentellen Daten der vorangegangenen Abschnitte für jeweils unterschiedliche Parameter aufgetragen sind. Die Bilder A und B zeigen Expirogramme, bei denen der Atem für 20 s (A) bzw. 1 s (B) angehalten wurde. Der Atemfluss beträgt hier 25 l/min. In den Graphen C und D sind Expirogramme dargestellt, bei denen der Atemfluss 41 l/min (C) und 25 l/min (D) beträgt. Der Atem wurde bei diesen Messungen nicht angehalten.

Die Simulation wurde mit dem Ziel entwickelt, die Phase III der Expirogramme zu reproduzieren und den ungewöhnlichen Konzentrationsabfall gegen Ende der Phase III bei langsamen Atemflüssen zu erklären. Phase II, also das Durchmischen von alveolarer Luft mit der Luft aus dem Totraum, ist in der Simulation nicht berücksichtigt. Dies spiegelt sich auch im Vergleich der Simulation mit dem Experiment wider: In der Phase II der



Exspirogramme zeigt sich eine deutliche Diskrepanz, während die Übereinstimmung in Phase III als gut bezeichnet werden kann.

Zur Anpassung der Simulation an die experimentellen Daten wurde lediglich die Carboxyhämoglobin-Konzentration variiert. Auf der Grundlage dieser guten Übereinstimmung lässt sich die Hypothese aufstellen, dass [HbCO] mit einer Analyse der CO-Konzentration in der ausgeatmeten Luft bestimmt werden kann. Herkömmlich wird zur Bestimmung von [HbCO] eine Blutprobe entnommen. Die Atemanalyse würde hier eine nichtinvasive Alternative bieten.

#### 5.1.4. Bestimmung von [HbCO]

Am leichtesten ist die Bestimmung von [HbCO], wenn sich die CO-Partialdrücke im Blut und in den Alveolen im Gleichgewicht befinden, da in diesem Fall für die CO-Konzentration im Atem nur die Affinität des Hämoglobins zum CO eine Rolle spielt. Wird auf ein Anhalten des Atems verzichtet, stellt sich dieser Gleichgewichtszustand nur bei sehr geringen Atemflüssen ein. Wird vor dem Ausatmen der Atem für mehr als 15 s angehalten, wird das Gleichgewicht allerdings am Ende der Ausatmung bei einer Atemflussrate von 25 l/min erreicht.

Da das Anhalten der Luft als weniger belastend empfunden wird als das sehr langsame Ausatmen, kann ein Atemprotokoll empfohlen werden, das eine Zeit von 15 s, in der der Atem angehalten wird, und eine anschließende Ausatmung bei 25 l/min vorsieht.

Zur Bestimmung von [HbCO] führt ein Proband einen Atemzug nach diesem Protokoll aus. Die CO- und Sauerstoffkonzentration in der Atemluft wird während der Atmung gemessen. Aus der Sauerstoff-Konzentration kann nun nach [Das04] die Affinität des Hämoglobin zu Sauerstoff bestimmt werden (vgl. Abbildung 5.9B). Mit der Haldane Gleichung (5.3) kann daraus mit der gemessenen CO-Konzentration [HbCO] bestimmt werden.

Da das Gleichgewicht der Partialdrücke im Blut und in den Alveolen erst am Ende der Ausatmung erreicht wird, dient zur Bestimmung der CO- und O<sub>2</sub>-Konzentration nur das letzte Fünftel jedes Atemzugs. Das Ausschneiden und Mitteln über diesen Bereich wird von einem LabVIEW-Programm durchgeführt, das im Anhang (A) beschrieben ist.

Zur Abschätzung statistischer Fehler wurden 10 aufeinander folgende Atemzüge nach diesem Protokoll innerhalb von 6 min aufgenommen. Die Standardabweichung lag bei diesen Messungen bei 5 % des Mittelwertes. Um die Methode weiter zu evaluieren, ist die Bestimmung von [HbCO] mit einer unabhängigen Methode und ein Vergleich mit der Atemanalyse notwendig.

## 5.2. Messung der HbCO-Konzentration mittels Blutgasanalyse

Zur Bestimmung der HbCO-Konzentration aus einer Blutprobe stehen zum jetzigen Zeitpunkt verschiedene kommerzielle Systeme zur Verfügung. Eine Möglichkeit ist die Absorptionsspektroskopie im Blut: HbO<sub>2</sub> besitzt, anders als HbCO, ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 920 µm. Bereits 1955 war lediglich eine Menge von 0,2 ml Blut erforderlich, um mit einer spektroskopischen Untersuchung eine Genauigkeit von 2 % zu erreichen. Neuere nichtinvasive Methoden basieren ebenfalls auf Absorptionsspektroskopie [Bre03]. Hierbei wird die Absorption von bis zu 8 Wellenlängen beim Durchgang des Lichtes durch die Fingerkuppe oder das Ohrläppchen gemessen. Die Messung auf verschiedenen Wellenlängen ist notwendig, um Querempfindlichkeiten zu HbO<sub>2</sub> und Methämoglobin zu vermeiden. Die Nachweisgrenze dieser Methode liegt im niedrigen Prozentbereich, eine Unterscheidung zwischen unterschiedlichen Kohlenstoffisotopen ist nicht möglich. In Einzelfällen kommen beim Menschen Formen von Hämoglobin vor, die abweichende Absorptionsspektren aufweisen [Zur08]. Isotopologenselektiver Nachweis von HbCO ist mit kommerziell erhältlichen Systemen noch nicht realisiert.

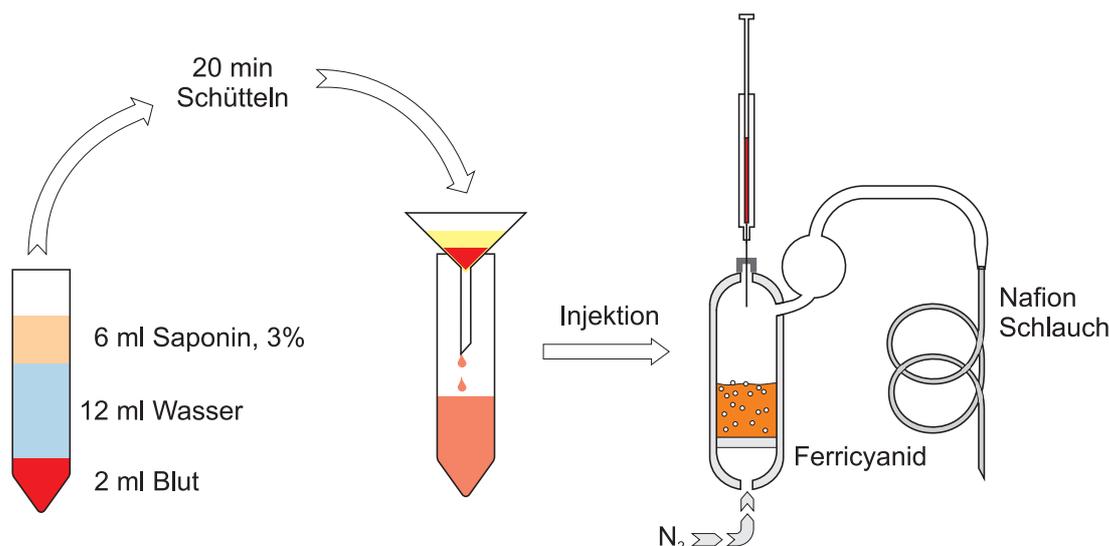
Eine Methode, die prinzipiell auch auf den Hb<sup>13</sup>CO-Nachweis anwendbar ist, löst in einer Blutprobe das CO vom Hämoglobin. Die freigesetzte CO-Menge wird anschließend bestimmt [Iff72]. In der erwähnten Publikation wird zum CO-Nachweis ein Gaschromatograph verwendet. Im Folgenden wird dieser durch das CALO-Spektrometer ersetzt, was zu einer Verbesserung der Nachweisempfindlichkeit und zur Möglichkeit des isotopologenselektiven Nachweises führt.

### 5.2.1. Versuchsdurchführung

Die Carboxyhämoglobin-Konzentration [HbCO] im Blut kann bestimmt werden, indem das aus einer Blutprobe gelöste CO mit der freigesetzten Menge aus einer vollständig gesättigten Probe verglichen wird:

$$[HbCO] = \frac{N_{CO,original}}{N_{CO,gesättigt}} \quad (5.5)$$

Bevor das CO vom Hämoglobin gelöst werden kann, wird die Blutprobe (2 ml) mit 12 ml destilliertem Wasser und 6 ml einer 3 %igen Saponinlösung verdünnt und 20 min lang leicht geschüttelt, was zu einer Zerstörung der roten Blutkörperchen führt. Anschließend werden die Fragmente der zerstörten Zellen durch Filtration vom Plasma, in dem die Häm-Moleküle gelöst sind, getrennt.



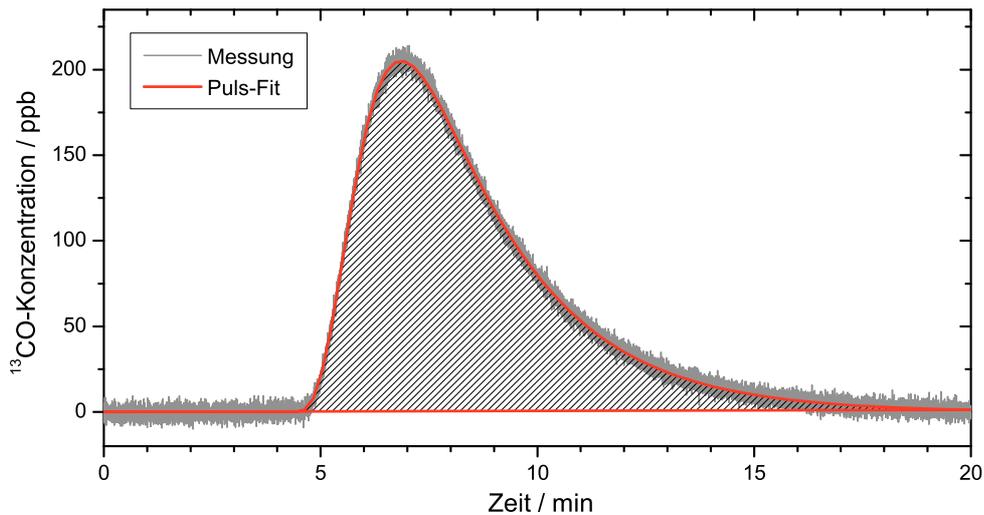
**Abbildung 5.13.:** Illustration der Vorbereitung der Blutprobe. Zunächst wird das Gemisch aus Saponin, Wasser und Blut 20 min zur Lyse der Blutzellen leicht geschüttelt. Anschließend wird die Probe filtriert und 5 ml des Filtrats in die Reaktionskammer injiziert.

5 ml dieses Filtrats werden dann zusammen mit wenigen Tropfen Octanol in eine Reaktionskammer gegeben, die in Abbildung 5.13 skizziert ist. Von unten fließt Stickstoff in die Reaktionskammer, der nach Durchgang durch eine Glasfritte durch die Probe strömt. Die Glasfritte dient dabei der Verteilung des Gasflusses auf einen möglichst großen Probenquerschnitt. Am oberen Ende des Reaktionsgefäßes tritt der Stickstoff mit dem aufgenommenen Gas aus der Kammer aus, durchläuft einen Tropfenfänger, und schließlich den Nafion-Trockner.

Das Octanol im Filtrat dient hierbei der Vermeidung von Schaumbildung, hat aber keinen Einfluss auf die CO-Freisetzung. Um das CO von den Häm-Molekülen zu trennen, wird in die Reaktionskammer eine 3,3 %ige Kaliumferricyanid-Lösung gegeben. Das Cyanid verdrängt hierbei das CO, das in Lösung geht und durch den Stickstofffluss durch die Reaktionskammer ausgewaschen und in die Nachweiszelle transportiert wird. Der Fluss durch die Zelle muss hierbei so gewählt werden, dass die Schaumbildung minimiert und das Signal maximiert wird.

Vorversuche zeigen, dass ein Stickstofffluss von 100 sccm eine gute Signalstärke erzeugt. Bei diesem Fluss ist die Schaumbildung nur gering. Höhere Flüsse führen zu einer stärkeren Verdünnung des CO, wodurch die CO-Konzentration geringer und damit die Nachweisgrenze und Messunsicherheit erhöht wird. Bei niedrigeren Flüssen muss ein geringerer Druck im Spektrometer eingestellt werden, was wiederum zu einer Verringerung der Empfindlichkeit führt.

Das Spektrometer wird mit den gleichen Parametern betrieben wie bei der Echtzeit-



**Abbildung 5.14.:** Die Freisetzung von CO folgt einer Puls-Funktion. Dem exponentiellen Anstieg beim Einsetzen der Reaktion folgt ein exponentieller Abfall durch den Verbrauch des HbCO.

Atemanalyse im vorangegangenen Kapitel.

### Auswertung der Daten

Die Kohlenmonoxidkonzentration im Trägergas wird aus der Absorption mit Hilfe der in der HITRAN-Datenbank enthaltenen Absorptionskoeffizienten ermittelt. Der zeitliche Verlauf folgt der Puls-Funktion

$$c(t) = A \cdot \left(1 - e^{-\frac{t-t_0}{t_1}}\right)^P \cdot e^{-\frac{t-t_0}{t_2}} \quad (5.6)$$

Anschaulich ist diese Funktion eine Multiplikation aus einem exponentiellem Anstieg der Freisetzung aufgrund des Einsetzens der Reaktion und Füllung der Reaktionskammer mit der Zeitkonstanten  $t_1$  und einem exponentiellen Abfall aufgrund des Verbrauchs des HbCO und der Entleerung der Reaktionskammer mit der Zeitkonstanten  $t_2$ . Diese Funktion wurde mit Hilfe der Auswertungs- und Visualisierungssoftware Origin 7.5 an die experimentellen Daten angefitet und extrapoliert (Abbildung 5.14). Die Gesamtmenge  $N_{CO}$  des freigesetzten CO berechnet sich dann als Produkt aus der Fläche unter dem Puls und dem Gasfluss  $\dot{V}$ , dividiert durch das Molvolumen  $V_{mol}$ :

$$N_{CO} = \frac{\int_{t_0}^{\infty} c(t) dt \cdot \dot{V}}{V_{mol}} \quad (5.7)$$

Durch die Verwendung der Pulsfunktion wird das gemessene Signal „intelligent geglättet“; Fluktuationen und Rauschen im Signal werden somit entfernt. Darüber hinaus kann



die Funktion bis ins Unendliche fortgesetzt werden, wodurch auch der „Schwanz“ der Exponentialfunktion ausgewertet wird, der beim Messsignal im Rauschen untergehen würde.

Ein weiterer Vorteil dieser Methode ist, dass auch die Basislinie mit gefittet wird. Bei einer Integration des Messsignals müsste der auswertende Wissenschaftler entscheiden, wo die Basislinie liegen soll. Diese Subjektivität wird der Auswertung mittels des Fitalgorithmus genommen.

Um die freigesetzte CO-Menge aus einer vollständig gesättigten Probe zu bestimmen, wurde eine Probe von 1 ml nach der Behandlung mit Saponinlösung mit 5 ml reinem CO-Gas 20 min lang geschüttelt. Anschließend wurden 100  $\mu$ l dieser Probe als Referenz 3 mal gemessen. Die Menge der gemessenen CO-Moleküle entspricht dabei der Menge der Häm-Moleküle, wenn das Hämoglobin vollständig gesättigt ist.

## 5.2.2. Ergebnisse und Diskussion

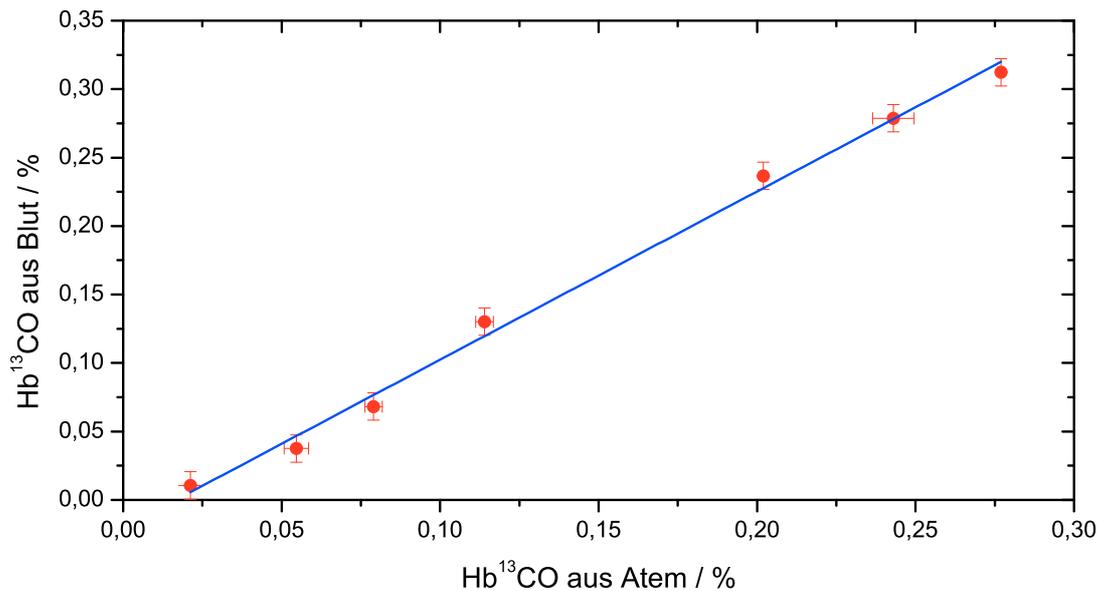
### Nachweisgrenze

Zur Bestimmung der Nachweisgrenze wurde eine Blutprobe, die bei normalem CO-Gehalt des Blutes entnommen wurde, mit destilliertem Wasser und Saponinlösung wie oben beschrieben versetzt und filtriert. Das Filtrat wurde anschließend in mehreren Schritten so weit verdünnt, bis die Höhe des erzeugten Signals der doppelten Rauschhöhe entsprach. Die so ermittelte CO Menge wird als untere Nachweisgrenze bezeichnet (engl: lower limit of detection, LLOD).

In dieser Verdünnung wurde die Probe 4 mal analysiert und die Standardabweichung der ermittelten CO Menge bestimmt. Die Standardabweichung wird als untere Quantifizierungsgrenze (engl: lower limit of quantification, LLOQ) bezeichnet.

Die untere Nachweisgrenze beträgt für diese Methode 50 pmol  $^{13}\text{CO}$ , die untere Quantifizierungsgrenze liegt bei dieser Stoffmenge bei 7 pmol. Bei Erreichen der unteren Nachweisgrenze war die Blutprobe um den Faktor 0,075 verdünnt, was einer analysierten Blutmenge von 150  $\mu$ l entspricht.

Die  $[\text{Hb}^{13}\text{CO}]$ -Konzentration in der betrachteten Probe liegt bei 0,011 %. Legt man die Verdünnung zu Grunde, beträgt die Nachweisgrenze  $8 \cdot 10^{-4}$  %, was durch andere Methoden unerreichbar ist. Selbst wenn aus der Konzentration des seltenen Isotopologs auf die Konzentration beider Isotopologe geschlossen wird, liegt die Nachweisgrenze um einen Faktor 91 höher. Diese Nachweisgrenze wird von den empfindlichsten alternativen Methoden erreicht [Wid02].



**Abbildung 5.15.:** Die HbCO-Messung mittels einer Blutprobe, aufgetragen gegen die HbCO-Messung mittels Atemprobe. Die Ausgleichsgerade schneidet die y-Achse unterhalb des Ursprungs bei  $-0,023\%$  und hat eine Steigung von  $1,2$ .

### Vergleich der Methoden

Zum Vergleich der Bestimmung des Carboxyhämoglobins aus dem CO-Gehalt des Atems und einer direkten Analyse des Blutes muss das Blut noch im Körper mit Kohlenmonoxid angereichert werden. Der Versuchsperson wurden zunächst 5 ml Blut abgenommen. Zeitgleich wurde die CO-Konzentration nach dem im vorigen Kapitel beschriebenen Protokoll gemessen. Anschließend wurde 1 min lang ein Prüfgasgemisch von 30 ppm <sup>13</sup>CO in synthetischer Luft (20 % Sauerstoff, 80 % Stickstoff) durch das bereits beschriebene Mundstück eingeatmet. Diese Konzentration entspricht der maximalen Arbeitsplatzkonzentration, also der Konzentration, der ein Mensch 40 Stunden pro Woche ausgesetzt sein darf, ohne dass gesundheitliche Schäden zu erwarten sind.

Nach dieser Minute wurde zunächst für 1 min normale Luft geatmet, um das CO aus der Lunge auszuwaschen. Anschließend wurde eine Blutprobe von 5 ml genommen sowie 3 Atem-CO-Messungen durchgeführt. Diese Prozedur wurde 8 mal wiederholt. Nach der Probennahme wurde das Blut eingefroren, um sämtliche Reaktionen in der Blutprobe, die das Ergebnis verfälschen könnten, zu stoppen. Die Analyse der Blutproben wurde 3 Tage nach der Probennahme durchgeführt.

Zur Analyse der Proben wurde jeweils nur eine einzelne Probe aufgetaut und analysiert, bevor die nächste Probe aufgetaut wurde, um für alle Proben ähnliche Bedingungen zu gewährleisten. Zur Analyse des an das Hämoglobin gebundene CO wird dieses vom Häm-Molekül getrennt, und dann das freigesetzte CO mittels des CALO-Spektrometers



nachgewiesen.

Zum Vergleich der Methoden zum Nachweis von  $[\text{Hb}^{13}\text{CO}]$  wurden die Messergebnisse beider Methoden gegeneinander aufgetragen (Abbildung 5.15).

Die Ausgleichsgerade schneidet die y-Achse nicht im Ursprung. Dies bedeutet, dass die Blutgasmessung im Mittel um einen konstanten Betrag unter der Atemmessung liegt. Eine Ursache hierfür kann in einer CO-Quelle in den Atemwegen liegen. Hierdurch würde CO in die Atemluft gelangen, das im Blut nicht nachweisbar wäre.

Die Steigung der Ausgleichsgeraden von 1,2 weist auf einen systematischen Fehler bei der Bestimmung der HbCO-Werte hin; die aus dem Blut gewonnenen Werte könnten zu groß, die aus dem Atem gemessenen Werte aber auch zu klein bestimmt worden sein.

Ein Überschätzen der aus dem Blut gewonnenen Messwerte kann durch unvollständige Sättigung der Referenzprobe mit CO erfolgen. Weitere Unsicherheiten liegen in der Gasflussmessung durch die Reaktionskammer.

Eine Fehleinschätzung der Messung aus der Atemprobe kann durch die Unsicherheit der Haldane-Konstanten und der Sauerstoffsättigungskurve (Abbildung 5.9B) erfolgen. Für beide Parameter wurden Durchschnittswerte angenommen, die auch bei gesunden Probanden vom realen Wert abweichen können. Für eine abschließende Bewertung der Methode ist es sinnvoll, diese Parameter in folgenden Untersuchungen zu bestimmen, um Unsicherheiten auszuschließen.

Auch ein Vergleich mit einer weiteren Referenzmethode sollte Gegenstand einer weiterführenden Evaluation sein.

### 5.3. Bestimmung der Hämoglobinmasse mittels eines $^{13}\text{CO}$ -Atemtests

Die jüngsten Dopingkandale haben die Bestimmung der Hämoglobinmasse ( $t\text{Hb}$ ) im menschlichen Körper ins Interesse der Sportmedizin gerückt. Die künstliche Erhöhung der Hämoglobinmasse, die durch Medikamente oder Injektion von Eigen- oder Fremdblut erreicht werden kann, führt zu einer Steigerung der Ausdauerleistung des Sportlers. Es existieren Methoden, durch die die Anwendung von Medikamenten und Fremdblut erkennbar wird, allerdings ist dies unter anderem deshalb schwierig, weil stets neue Medikamente entwickelt werden [Jel07].

Im Falle der Injektion von Eigenblut ist das Doping bislang nicht nachweisbar. Eine Möglichkeit besteht lediglich in der kontinuierlichen Kontrolle der Hämoglobinmasse, die sich selbst bei intensivem Training nur langsam erhöht. Plötzliche Sprünge in der Konzentration sind daher ein deutlicher Hinweis auf Doping. Eine solche Kontrolle würde neben

Eigenblutdoping selbstverständlich auch die anderen Fälle einer künstlichen Erhöhung der Hämoglobinmasse aufdecken.

### 5.3.1. Etablierte Verfahren

In etablierten Verfahren wird ein Teil des Gesamthämoglobins mit einer bekannten Menge eines Markeratoms oder -moleküls gekennzeichnet, und anschließend die Konzentration der gekennzeichneten Moleküle gemessen. Sind solche Markermoleküle im Organismus bereits vor der Messung vorhanden (z.B. CO) muss auch vor der Markierung die Konzentration gemessen werden.

Als Gold-Standard wird zurzeit die Markierung mittels radioaktiver  $^{51}\text{Cr}$ -Atome betrachtet, allerdings ist diese Methode aufgrund der mit der Radioaktivität verbundenen Gesundheitsrisiken nicht zur regelmäßigen Anwendung geeignet [Sch05].

Wird CO als Marker benutzt, so gilt für die Änderung der Carboxyhämoglobin-Konzentration  $\Delta[\text{HbCO}]$  nach Verabreichung einer CO-Dosis  $V_{\text{CO}}$

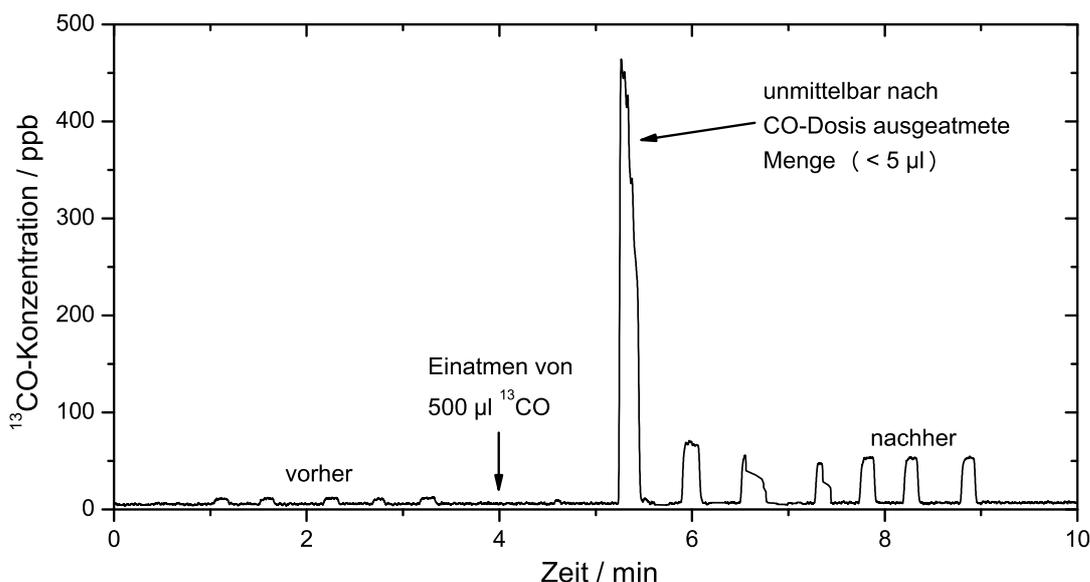
$$\Delta[\text{HbCO}] = \frac{\Delta m_{\text{HbCO}}}{t\text{Hb}} = \frac{V_{\text{CO}}}{c_H} \cdot \frac{1}{t\text{Hb}} \quad (5.8)$$

$c_H$  bezeichnet in dieser Gleichung die Hüfner-Zahl, für die unter physiologischen Standard-Bedingungen  $c_H = 1,306 \text{ ml/g}$  gilt [Gor04],  $\Delta m_{\text{HbCO}}$  ist die Änderung der Masse des Carboxyhämoglobins und  $t\text{Hb}$  die gesamte Hämoglobinmasse. Die Hüfner-Zahl ist die Sauerstoff-Bindungskapazität des Hämoglobins. Die Bindungskapazität für CO ist identisch, da jeweils ein  $\text{O}_2$ -Molekül durch ein CO-Molekül ausgetauscht wird.

Erstmals fand die Markierung mittels CO im Jahr 1912 Anwendung und wurde seitdem in mehreren Schritten weiterentwickelt [Dou12, Arn21, Bur95, Hüt00]. In der jüngsten Variante [Sch05] wird eine CO Dosis zwischen 0,6 bei Frauen und 1 ml/kg Körpergewicht bei Männern eingeatmet. Nach 5 min wird ein Tropfen Blut aus dem Ohrläppchen entnommen, womit die HbCO-Menge bestimmt wird.

In dieser Weise ist dieses Verfahren bereits routinemäßig anwendbar; der Test ist innerhalb kurzer Zeit minimalinvasiv durchführbar und die verwendeten Materialien und Messgeräte sind wenig kostenintensiv.

Verbesserungen in der Methode sind dennoch denkbar. Durch die Messung des HbCO mittels einer Atemprobe kann auf die Entnahme von 2 Blutproben verzichtet werden, und durch Verwendung des seltenen Isotopologs  $^{13}\text{CO}$  kann die verwendete CO Menge drastisch reduziert werden, ohne die Empfindlichkeit der Methode zu beeinträchtigen.



**Abbildung 5.16.:** Verlauf der CO-Konzentration während einer Bestimmung der Gesamthämoglobin-Masse. Die Menge, die unmittelbar nach dem Einatmen der CO-Dosis wieder ausgeatmet wird, liegt bei 5  $\mu\text{l}$  und wird daher vernachlässigt.

### 5.3.2. Versuchsdurchführung

Aus Gleichung 5.8 geht hervor, dass die Messung von  $\Delta[\text{HbCO}]$  und der eingeatmeten CO-Dosis  $V_{\text{CO}}$  die Genauigkeit der Bestimmung der Hämoglobingesamtmasse festlegen.

In einer im Rahmen dieser Arbeit betreuten Diplomarbeit wurde zur Bestimmung der eingeatmeten CO-Dosis stark verdünntes  $^{13}\text{CO}$  in synthetischer Luft (16 ppm) eingeatmet [Sow08]. Sowohl während der Ein- als auch während der Ausatmung wurde die CO-Konzentration im Atem gemessen. Durch Integration der ein- und ausgeatmeten CO-Konzentration wurde schließlich die gesamte aufgenommene Dosis berechnet. Als eine wesentliche Fehlerquelle bei dieser Methode wurde die Messung des Atemflusses und deren Zeitverschiebung zur Bestimmung der CO-Konzentration im Atem gefunden, was zu einer Standardabweichung von 10 % führte. Eine weitere Fehlerquelle war die Notwendigkeit, sowohl hohe CO-Konzentrationen (16 ppm Prüfgas) als auch niedrige CO-Konzentrationen (20 ppb) zu messen. Zur Messung der hohen Konzentrationen war der Betrieb des Spektrometers auf einer schwächeren Absorptionslinie notwendig, was zu einer Verringerung der Genauigkeit in der Bestimmung der CO-Konzentration im Atem führte. Darüber hinaus wurde für eine Messung etwa eine halbe Stunde Messzeit benötigt. 15 min dieser Zeit musste der Proband das Prüfgas atmen, was zu einer unangenehmen Trockenheit des Rachenraumes führte, da das Prüfgas keine natürliche Luftfeuchtigkeit enthält.

Um diese Fehlerquellen zu umgehen, wird hier eine kleine Menge (500  $\mu\text{l}$ ) reines  $^{13}\text{CO}$  in einem einzigen Atemzug eingeatmet. Anschließend wird die Luft angehalten, so dass das

$\text{CO}$  ins Blut diffundieren kann. Die absorbierte  $\text{CO}$ -Menge entspricht etwa der Menge, die auch in dem zuvor beschriebenen Verfahren aufgenommen wurde.

Die  $\text{CO}$ -Dosis wird mittels einer 500  $\mu\text{l}$ -Spritze zu Beginn der Einatmung in ein Mundstück gespritzt. Die Unsicherheit des Spritzenvolumens liegt bei 1 %.

Eine Messung zur Bestimmung von  $t\text{Hb}$ , bei der die Parameter zur Echtzeit  $\text{CO}$ -Bestimmung aus Tabelle 3.1 benutzt wurden, zeigt Abbildung 5.16. Nach 5 Atemzügen zur Bestimmung der  $\text{CO}$ -Konzentration vor der  $\text{CO}$ -Aufnahme werden 500  $\mu\text{l}$  reines  $^{13}\text{CO}$  eingeatmet. Hierzu wird ein zweites Mundstück verwendet, um durch die Gasflüsse in das Spektrometer und das Spirometer die aufgenommene  $\text{CO}$ -Menge nicht zu verfälschen.

Nach etwa einer Minute, in der die Luft angehalten wurde, atmete der Proband durch das Mundstück am Spektrometer wieder aus. Es zeigt sich, dass die ausgeatmete  $\text{CO}$ -Konzentration nach dem Luftanhalten gering genug ist, um auf der empfindlichen  $\text{P}_3(13)$ -Linie messbar zu sein. Die ausgeatmete  $\text{CO}$ -Menge liegt unter 5  $\mu\text{l}$ , es wurden also mehr als 495  $\mu\text{l}$   $^{13}\text{CO}$  aufgenommen.

Innerhalb der folgenden 2 Minuten fällt die  $\text{CO}$ -Konzentration im Atem ab. Dies ist die Zeit, in der in der Lunge verbliebenes  $\text{CO}$  mit der Atemluft ausgewaschen wird. Anschließend kann aus der Atemluft die Carboxyhämoglobin-Konzentration bestimmt werden, wie in Kapitel 5.1.4 beschrieben. Zur Bestimmung von  $t\text{Hb}$  werden die bestimmten Konzentrationen aus 5 aufeinanderfolgenden Atemzügen gemittelt. Die Differenz der Mittelwerte vor und nach der  $\text{CO}$ -Gabe dient dann zur Berechnung von  $t\text{Hb}$  nach Gleichung 5.8.

Zur Reduktion des Messfehlers wurden 3 Einzelmessungen in einem Zeitraum von 20 min für jeden Probanden durchgeführt und über die gemessenen Werte gemittelt.

### 5.3.3. Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 5.2 zeigt die Messergebnisse von drei Probanden. Die gemessenen Werte decken sich im Rahmen der Messunsicherheit mit den theoretischen Erwartungen, die aus Geschlecht und Körpermasse der Probanden abgeschätzt wurden und den Ergebnissen der betreuten Diplomarbeit.

Die wesentlichen Vorteile dieser weiter entwickelten Methode zur Bestimmung von  $t\text{Hb}$  liegt in der kürzeren Messzeit, was eine Mehrfachbestimmung der Hämoglobinmasse für den Probanden zumutbar macht und die Messunsicherheit durch die Mittelung reduziert. So ist es möglich, in kürzerer Zeit eine genauere Bestimmung der Hämoglobinmasse vorzunehmen.

Darüber hinaus ist die Datenauswertung deutlich vereinfacht worden.

Der Erfolg dieser Methode ist wesentlich von der Bestimmung der Carboxyhämoglobin-Konzentration im Atem abhängig. Insbesondere eine mögliche Abhängigkeit der Haldane-



Proband	tHb <sub>theo</sub>	Messung ± Standardfehler
1	551 g	(563 ± 28) g
2	755 g	(724 ± 29) g
3	1047 g	(999 ± 51) g

**Tabelle 5.3.:** Die theoretischen Werte wurden aus dem Gewicht und dem Geschlecht der Probanden abgeschätzt. Die Messwerte ergeben sich aus dem Mittel über 3 aufeinanderfolgende Messungen innerhalb eines Zeitraumes von 20 min. Der angegebene Standardfehler liegt bei 5 % des Mittelwerts.

Konstanten  $M$  von sich verändernden physiologischen Parametern muss untersucht werden, um eine verlässliche Messung zu gewährleisten.

Sollte es notwendig sein,  $M$  individuell zu bestimmen, ist fraglich, ob der nichtinvasive Atemtest weiterhin zweckmäßig ist, oder ob es sinnvoller ist, [HbCO] aus Blutproben zu bestimmen.

Durch die Verwendung des seltenen Isotopologs wird bei dieser Methode im Vergleich zu Methoden, die auf natürliches CO zurückgreifen, die aufgenommene CO-Menge um ein Vielfaches reduziert. Während bei anderen Methoden 1 ml CO pro kg Körpergewicht des Probanden verwendet wird, was bei einem durchschnittlichen männlichen Erwachsenen etwa der Belastung durch den Rauch von 7,5 Zigaretten entspricht, liegt die Belastung durch den <sup>13</sup>CO-Atemtest nur bei 0,5 ml (bei einfacher Bestimmung) bis 1,5 ml (bei dreifacher Bestimmung), entsprechend etwa der Menge, die bei einem Zug an einer Zigarette inhaliert wird.

## 5.4. Zusammenhang zwischen Blutzuckerkonzentration und CO in der Atemluft

In diesem Abschnitt wird eine weitere praktische Anwendung der CALOS Methode zur Bestimmung der CO-Konzentration im Atem vorgestellt. Ausgangspunkt der hier vorgestellten Untersuchung ist die Hypothese, dass ein erhöhter Blutzuckerspiegel oxidativen Stress im menschlichen Organismus erzeugt, wofür in der Vergangenheit zahlreiche Hinweise gefunden wurden. Die Frage, die sich nun stellt ist, ob hierdurch die Häm-Oxygenase aktiviert wird, um dem oxidativen Stress entgegenzuwirken, und ob das hierbei freigesetzte Kohlenmonoxid im Atem nachweisbar ist. Im Jahr 1999 untersuchten Paredi und Mitarbeiter diese Frage und kamen zu einem positiven Ergebnis [Par99a]. An einer Stichprobe von 5 gesunden Probanden führten sie einen oralen Glukose Toleranztest (OGTT) durch, in dessen Verlauf sie den Blutzuckerspiegel und die ausgeatmete CO-Konzentration

bestimmen. Die Messung des CO-Gehalts erfolgte mittels eines etablierten elektrochemischen Sensors, die Bestimmung der Blutzuckerkonzentration mittels eines kommerziell erhältlichen Messgeräts.

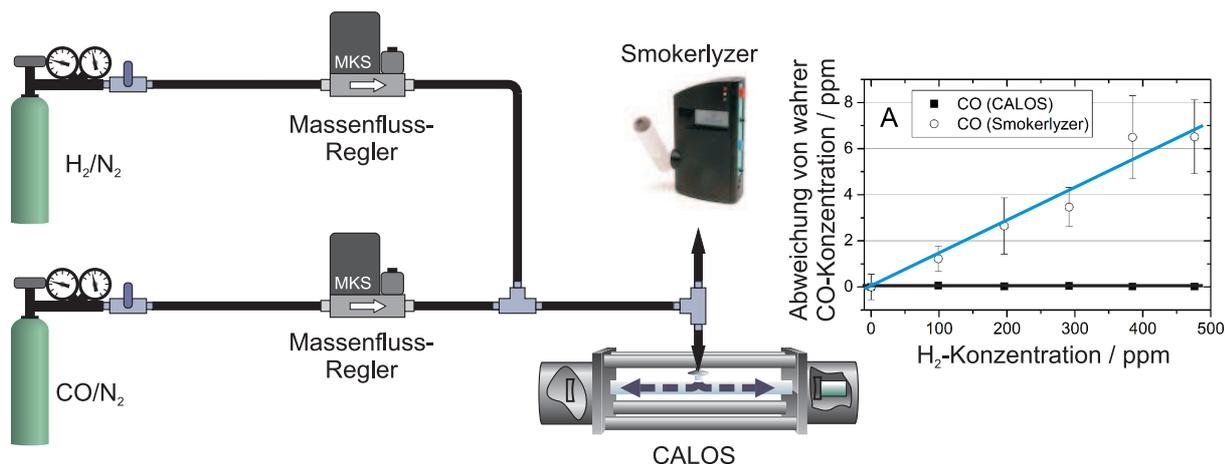
Wie bereits im Kapitel 2.5.1 erwähnt, neigen elektrochemische Sensoren zu Querempfindlichkeiten, insbesondere zu Wasserstoff. Gerade bei der Verdauung von Glukose kann es im Dünn- und Dickdarm aber zu einer Produktion von Wasserstoff kommen, der über die Blutbahn in die Atemluft gelangen kann [Gas07]. In den folgenden Abschnitten wird untersucht, ob die festgestellte Korrelation zwischen Blutzuckerspiegel und CO-Konzentration auf einer Fehlmessung beruht. Das CALO-Spektrometer ist hierzu hervorragend geeignet, da es frei von Querempfindlichkeiten – insbesondere zu Wasserstoff – ist.

### 5.4.1. Messgeräte

Zur Durchführung dieses Experimentes wurden verschiedene Messgeräte benutzt. Zum direkten Vergleich mit der Veröffentlichung von Paredi et al. wurde ein elektrochemischer Sensor (Smokerlyzer micro 4, freundlicherweise zur Verfügung gestellt durch Bedfont Scientific Ltd.) parallel zum CALO-Spektrometer benutzt. Dieses Gerät ist das Nachfolgemodell des damals benutzten Smokerlyzer EM50. Laut Herstellerspezifikation liegt die Querempfindlichkeit zu Wasserstoff bei unter 2% – bei einer Wasserstoffkonzentration von 50 ppm sollte der gemessene CO-Wert also maximal 1 ppm zu hoch sein. Um diese Angabe zu überprüfen, wurde ein Prüfgasgemisch aus 3 ppm CO in Stickstoff mit einem Gemisch aus 1% Wasserstoff in Stickstoff gemischt, um unterschiedliche CO- und H<sub>2</sub>-Konzentrationen einzustellen. Zur Herstellung der Gasgemische wurden Massenflussregler (MKS Instruments) eingesetzt.

Hierbei stellte sich heraus, dass für den Smokerlyzer im Bereich bis zu 500 ppm H<sub>2</sub> eine lineare Abhängigkeit zur H<sub>2</sub>-Konzentration besteht. Abbildung 5.17 zeigt den Versuchsaufbau sowie die Messergebnisse. Die Steigung der Regressionsgeraden an die Messdaten in diesem Bereich beträgt 0,014, was den Angaben des Herstellers entspricht. Die Messung der selben Gasgemische mit dem CALO-Spektrometer ergab keine Abhängigkeit von der Wasserstoffkonzentration, was aufgrund der nicht vorhandenen Absorption im 5 µm-Wellenlängenbereich auch zu erwarten ist.

Da der Smokerlyzer eine Querempfindlichkeit zu Wasserstoff zeigt, sollte eine Wasserstoffmessung im Atem während des Experiments durchgeführt werden, da keineswegs klar war, ob Wasserstoff bei einer normalen Verdauung von Glukose im Atem nachweisbar ist. Eine weitere Frage, die auf diese Weise geklärt werden konnte ist, wann der Wasserstoff freigesetzt wird. Glukose geht im Dünndarm ins Blut über, in dem aber lediglich bei einer bakteriellen Fehlbesiedlung Wasserstoff produziert werden sollte. Bei einer Glukose-



**Abbildung 5.17.:** Zum Test der Querempfindlichkeit zu Wasserstoff wurde ein Gasmischung mit Hilfe zweier Massenflussregler hergestellt und mit dem CALO-Spektrometer und dem Smokerlyzer vermessen. Der Smokerlyzer zeigt eine leichte Abhängigkeit der gemessenen CO-Konzentration von der Wasserstoffkonzentration, während dies beim CALO-Spektrometer nicht auftritt.

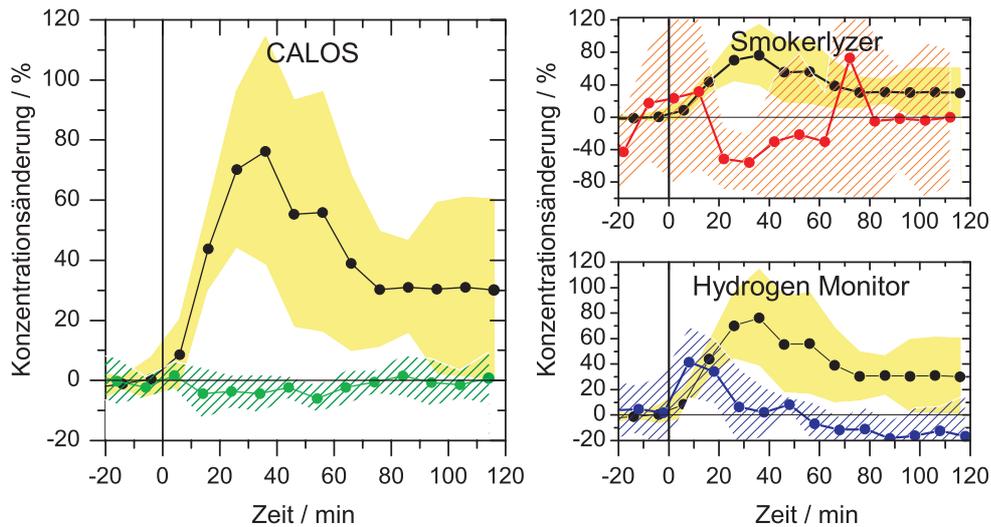
Intoleranz wird die Glukose im Dünndarm nicht vollständig absorbiert und gelangt in den Dickdarm, wo sie dann von Bakterien zersetzt wird, was zu einer Wasserstoff-Produktion führt. Die Freisetzung im Dickdarm sollte allerdings zeitversetzt zur Blutzuckererhöhung erfolgen, während eine evtl. Freisetzung im Dünndarm gleichzeitig stattfinden sollte.

Zur Messung der H<sub>2</sub>-Konzentration im Atem wurde ein elektrochemischer Sensor (Hydrogen Monitor, GMI MedicalLtd.) eingesetzt. Dieser misst Wasserstoffkonzentrationen im Bereich von 0 bis 500 ppm mit einer Genauigkeit von 1 ppm. Zur Probennahme atmet der Proband durch eine Spritze, die ein Loch unterhalb des Stempels bei etwa 30 ml Volumen hat. Am Ende der Exhalation wird der Stempel auf 20 ml eingestellt, wodurch das Loch verschlossen wird. Die letzten 20 ml des Atemzugs werden dann in das Gerät injiziert. Nach etwa einer Minute kann die H<sub>2</sub>-Konzentration abgelesen werden.

Zur Bestimmung der Blutzuckerkonzentration wurde das kommerziell erhältliche Messgerät accucheck Aviva (Hersteller: roche) benutzt. Hierbei wird ein Tropfen Blut aus der Fingerkuppe auf einen Teststreifen gegeben, der von dem Messgerät ausgelesen wird. Der Nachweis erfolgt elektrochemisch. Die Nachweisempfindlichkeit beträgt 60 µmol/l (1 mg/dl).

#### 5.4.2. Der orale Glukose-Toleranztest (OGTT)

An dieser Studie nahmen 6 gesunde Nichtraucher im Alter von 24 bis 32 Jahren teil. Der OGTT wird nüchtern durchgeführt, die letzte Mahlzeit der Probanden lag mindestens 10 Stunden vor dem Beginn des Versuchs. Zur Durchführung des Tests nimmt der Proband



**Abbildung 5.18.:** Die Graphen zeigen die Ergebnisse der Untersuchungen zur Korrelation des Blutzuckerspiegels mit der CO-Konzentration im Atem. In allen Graphen ist zum Vergleich die Blutzuckermessung aufgetragen (schwarz). Die gelbe Fläche ist durch die Standardabweichung der Messpunkte begrenzt und ersetzt somit die Fehlerbalken, durch die die Graphen unübersichtlich werden würden. Links ist die mittels CALOS gemessene Änderung der CO-Konzentration aufgetragen (grün), rechts oben die CO-Messung mit dem Smokerlyzer (rot) und rechts unten die Wasserstoffmessung mit dem „Hydrogen Monitor“ (blau). Die Konzentrationsänderung ist jeweils auf den Mittelwert der jeweiligen Messungen bei  $t < 0$  bezogen.

zum Zeitpunkt  $t = 0$  300 ml einer Glukose-Lösung (Accu-Chek Dextro O.G.T., Roche Pharma AG) zu sich, die im Handel erhältlich ist und einer Menge von 75 g wasserfreier Glukose entspricht.

30 min vor und 120 min nach der Einnahme der Lösung werden in Abständen von 10 min Messungen der CO-Konzentration mit CALOS und Smokerlyzer sowie der  $H_2$ - und Blutzuckerkonzentration vorgenommen. Bei allen Atemproben wird dabei zunächst 15 s lang die Luft angehalten und dann bei einem Fluss von 30 l/min durch das Mundstück ausgeatmet. Die CALOS-Daten wurden wie bereits in vorangegangenen Kapiteln beschrieben ausgewertet. Die gesammelten Werte wurden über alle Probanden gemittelt und graphisch dargestellt (siehe Abb. 5.18).

### 5.4.3. Ergebnisse

Nach der Einnahme der Glukose-Lösung steigt der Blutzuckerspiegel innerhalb von 30 min auf sein Maximum, das bei etwa 175 % der Startkonzentration liegt, und fällt in den kommenden 40 min wieder auf einen Wert, der etwa 30 % oberhalb der Konzentration bei  $t = 0$  liegt. Die Basislinie liegt bei 83 mg/dl bei einer Standardabweichung von 9,1 mg/dl, wobei alle Werte zwischen 74 und 96 mg/dl liegen. Dies entspricht einer normalen Blutzuckerkonzentration bei gesunden Menschen.



Die Basislinie der CO-Messung mit CALOS liegt für die einzelnen Probanden zwischen 1,3 und 3,8 ppm bei einer mittleren Konzentration von 2,4 ppm und einer Standardabweichung von 0,72 ppm. Entgegen der Studie von Paredi et al. steigt die Konzentration nach der Glukose-Gabe aber nicht an, sondern fällt während der Phase, in der die Blutzuckerkonzentration maximal ist, signifikant um  $(4,2 \pm 1,4)$  % ab. Ein Student-t-Test ergibt für diese Absenkung ein Signifikanzniveau von 0,04.

Mit dem Smokerlyzer ist ebenfalls keine Erhöhung der CO-Konzentration messbar. Auch hier findet sich eher eine Absenkung, allerdings mit einem relativ schlechten Signifikanzniveau von 0,08, womit diese Änderung in der Medizin als nicht signifikant betrachtet wird. Die Basislinie liegt bei den Messungen mit diesem Sensor zwischen 0 und 4 ppm mit einer mittleren CO-Konzentration von 1,6 ppm und einer Standardabweichung von 1,3 ppm.

Die Wasserstoffkonzentration im Atem unterliegt einer starken Schwankung zwischen den teilnehmenden Probanden. Die minimal gemessene Startkonzentration liegt bei 3 ppm, das Maximum bei 97 ppm. Für die Basislinie ergibt sich eine mittlere Wasserstoffkonzentration von 23 ppm. Bereits innerhalb der ersten 10 min nach der Glukoseeinnahme erreicht die Wasserstoffkonzentration ihr Maximum bei 140 % des Startwertes und fällt in den kommenden 40 min auf den Startwert zurück.

#### 5.4.4. Diskussion

Der Vergleich der hier erzielten Ergebnisse mit der Veröffentlichung von Paredi et al. zeigt eine Diskrepanz, wie sie deutlicher kaum sein kann, liefert aber auch eine plausible Erklärung dafür, auch wenn ein letztendlicher Nachweis nur durch eine Wiederholung des Experiments mit dem Originalgerät und gleichzeitiger Messung der Wasserstoffkonzentration erbracht werden könnte.

Die Messungen mit dem Wasserstoffmessgerät zeigen einen qualitativ sehr ähnlichen Verlauf wie die „CO-Messung“ in dem zitierten Artikel. Laut Hersteller kann die Querempfindlichkeit der Smokerlyzer Serie zu Wasserstoff mit dem Alter der Sensoren zunehmen. Bei den hier beobachteten Änderungen der Wasserstoffkonzentration von bis zu 20 ppm ist eine Querempfindlichkeit von 10 % ausreichend, um die Werte von Paredi zu reproduzieren. Eine Änderung in diesem Bereich scheint durchaus möglich zu sein.

Darüber hinaus liefert sowohl die verbesserte Version des Smokerlyzers als auch CALOS das Ergebnis, dass die CO-Konzentration nicht erhöht ist. Hier zeigt sich, dass der Smokerlyzer signifikant verbessert wurde. Die Empfindlichkeit und damit die Messunsicherheit ist zwar - gerade im Vergleich zum CALO-Spektrometer, zu groß, um signifikante Änderungen im Atem festzustellen, qualitativ ergeben sich aber ähnliche Ergebnisse.

Die Absenkung der CO-Konzentration im Atem bei erhöhtem Blutzuckerspiegel wirkt

die Frage auf, was mit dem CO, das normalerweise im Atem nachgewiesen werden kann, geschieht. Eine Möglichkeit wäre, dass es, um der Lipid-Peroxidation entgegenzuwirken, verbraucht wird, eine andere, dass die Expression von CO im Körper durch den hohen Blutzuckerspiegel gehemmt wird. Eine Entscheidung zwischen diesen beiden Möglichkeiten ist auf der Grundlage der hier durchgeführten Experimente allerdings nicht möglich.

Leider ist die Senkung der CO-Konzentration verhältnismäßig gering und ist in dieser Eindeutigkeit auch nur im Mittel über alle Probanden erkennbar. Andernfalls hätte die Atemanalyse eine komfortable Möglichkeit eröffnet, die Blutzuckerbestimmung beim OGTT mittels einer Blutprobe durch eine Atemprobe zu ersetzen. Die Ergebnisse dieses Kapitels wurden in *Journal of Biomedical Optics* veröffentlicht [Fri08c].

## 5.5. Zusammenfassung

Die Möglichkeit, CO höchstempfindlich, isotopologenselektiv und mit hoher Zeitauflösung messen zu können, ermöglicht wertvolle Erkenntnisse. In diesem Kapitel wurde gezeigt, dass die CALOS-Methode die Aufzeichnung von CO-Exspirogrammen ermöglicht. Die systematische Untersuchung dieser Exspirogramme zeigt, dass die CO-Konzentration in der ausgeatmeten Luft eine deutliche Abhängigkeit von der Atemflussrate und von einem möglichen Atemanhalten vor der Ausatmung aufweist.

Die Entwicklung eines mathematischen Modells der Ausatmung, das eine gute Übereinstimmung mit den experimentellen Daten zeigt, enthüllt darüber hinaus eine Abhängigkeit von der Affinität des Hämoglobins zu CO.

Aus dem Modell und der Analyse der experimentellen Daten wurde ein Atemprotokoll erstellt, das es ermöglicht, aus der CO-Konzentration in der ausgeatmeten Luft auf die Carboxyhämoglobin-Konzentration im Blut zu schließen.

Eine weitere Methode, die Carboxyhämoglobin-Konzentration isotopologenselektiv zu bestimmen, wurde hier basierend auf Arbeiten von Iffland et al. entwickelt [Iff72]. Hierbei wird das CO aus einer Blutprobe chemisch freigesetzt und anschließend quantitativ analysiert. Durch den Einsatz des CALO-Spektrometers erlangt diese Methode eine bislang unerreichte Empfindlichkeit.

Ein Vergleich der beiden Methoden zeigt eine Abweichung, deren Grund in Abhängigkeiten der Haldane-Konstanten  $M$  von physiologischen Parametern, die hier nicht berücksichtigt wurden, vermutet wird.

Basierend auf der Bestimmung der Carboxyhämoglobin-Konzentration wurde eine nichtinvasive Messmethode zur Bestimmung der Hämoglobinmasse im menschlichen Körper entwickelt und charakterisiert. Die Methode liefert ermutigende Resultate, allerdings überträgt sich die Unsicherheit der Carboxyhämoglobin-Bestimmung auch auf diese



Methode.

Dieses Kapitel zeigt, dass die CALOS-Methode durch die Kombination aus höchster Empfindlichkeit, guter Zeitauflösung und Selektivität ein wertvolles Instrument zur isotopologenselektiven CO-Analyse in biomedizinischen Anwendungen darstellt, das insbesondere gaschromatographischen [Iff72] und elektrochemischen [Par99a] Verfahren weit überlegen ist.

## 6. Isotopologenselektiver NO-Nachweis

Laserspektroskopische Verfahren bieten eine Reihe von Vorteilen gegenüber etablierten Methoden. Sie vereinen eine extrem hohe Empfindlichkeit mit guter Zeitauflösung und hoher Spezifität. In den folgenden Kapiteln wird die CALOS-Methode zunächst in einem Vergleich mit einem Chemilumineszenz-Detektor zum Spurengasnachweis von NO evaluiert. Daran schließt sich die Untersuchung des Transports von NO durch die menschliche Haut und die UV-induzierte NO-Freisetzung aus einer wässrigen Nitritlösung und deren Wechselwirkung mit Antioxidantien an.

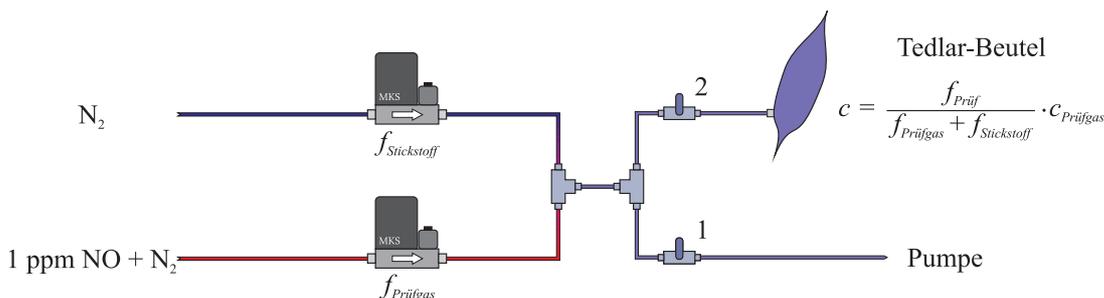
### 6.1. NO aus biologischen Proben

Abgesehen von dem NO, das in den oberen Atemwegen produziert wird und damit auch in die Atemluft gelangt, liegt NO im menschlichen Körper stets in gebundener Form als Nitrit, Nitrat oder in Nitroso-Verbindungen vor. Der „Gold-Standard“ zur Analyse von NO im Körper ist der Nachweis in der Gasphase mittels eines Chemilumineszenz-Detektors (CLD) nach chemischer Freisetzung des NO aus dem Blut. Hier soll – auch aus Gründen der Etablierung der CALOS-Methode – ein systematischer Vergleich zwischen einem kommerziell erhältlichen CLD (Modell CLD 88 NOe, Ecophysics) und dem CALO-Spektrometer vorgestellt werden.

Zunächst werden beide Systeme anhand von Prüfgasgemischen verglichen, anschließend wird der Vergleich anhand von NO-Freisetzung aus definierten wässrigen Nitritlösungen, die ein Modellsystem für biologische Proben darstellen, durchgeführt. Abschließend werden menschliche Blutplasma-Proben untersucht, die mit einer bekannten Menge  $^{15}\text{N}$ -Nitrit angereichert wurden. Diese Untersuchungen wurden in Zusammenarbeit mit der CardioBioTech-Gruppe der Medizinischen Klinik I im Universitätsklinikum Aachen durchgeführt und in *Nitric Oxide* publiziert [Fri08a].

#### 6.1.1. Prüfgasgemische

Die verwendeten Gasgemische wurden aus Prüfgasen (Linde Therapeutics, Deutschland) und Stickstoff (Stickstoff 5.0, Linde) hergestellt. Die Prüfgase waren mit 1,02 ppm  $^{14}\text{NO}$



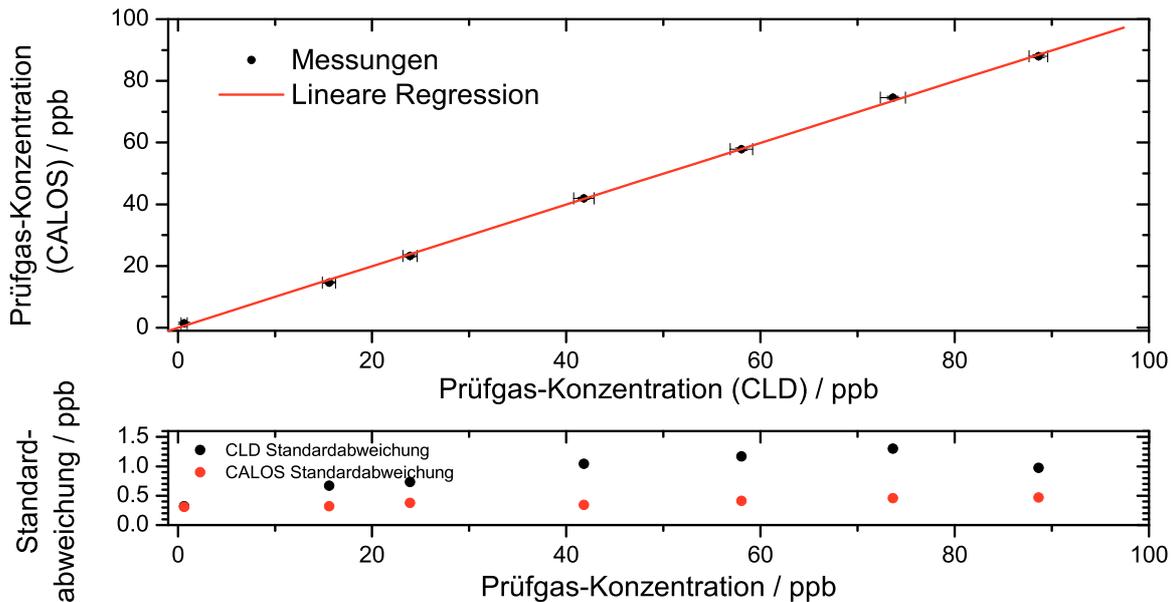
**Abbildung 6.1.:** Massenflussregler dienen zur Herstellung eines Prüfgasgemisches. Vor der Befüllung des Beutels wird dieser mehrfach mit reinem Stickstoff gespült. Nachdem das Gasleitungssystem evakuiert und der Beutel verschlossen wurde, wird das gewünschte Mischungsverhältnis eingestellt. Nach etwa einer Minute wird das Ventil 2 am Beutel geöffnet und das Ventil 1 an der Pumpe geschlossen; der Beutel füllt sich mit dem Gemisch.

bzw. 1,05 ppm  $^{15}\text{NO}$  in Stickstoff spezifiziert. Zur Einstellung der Mischungsverhältnisse wurden Massenflussregler (Type 1479A, MKS Deutschland GmbH) mit einem maximalen Gasfluss von 1000 sccm verwendet.

Das Gasgemisch wurde in zuvor ungenutzte Tedlar-Probenbeutel (Firma SKC) gefüllt, die vor dem Befüllen mit Stickstoff 5.0 gespült wurden. Bevor ein Beutel befüllt wurde, wurde ein konstanter Gasstrom in dem gewünschten Mischungsverhältnis bei niedrigem Druck ( $< 1$  mbar) in den zur Befüllung verwendeten Leitungen hergestellt, um sicherzustellen, dass das Gemisch durch das vorhandene Gas im Leitungssystem nicht verunreinigt wird. Die Befüllung ist in Abbildung 6.1 schematisch dargestellt. Die Vermessung aus den Probenbeuteln heraus ist notwendig, da der CLD bei Raumdruck betrieben werden muss. Das CALO-Spektrometer ist aufgrund seiner unabhängigen Druck- und Flusskontrolle prinzipiell bei (fast) beliebigem Druck und Gasfluss zu benutzen.

Der CLD misst eine Konzentration nicht absolut, daher ist eine Kalibrierung des Geräts mit bekannten Konzentrationen erforderlich. CALOS hingegen misst den Absorptionskoeffizienten, aus dem mit Hilfe der HITRAN-Datenbank [Rot05] die Konzentration berechnet werden kann. In diesem Vergleich wurden beide Systeme dennoch mit einer Prüfgasmischung kalibriert um die Messunsicherheit zu minimieren. Die Unsicherheit der Prüfgasmischung ist zwar gleich der Unsicherheit der HITRAN-Datenbank (5%) [Rot05]. Wird aber für beide Systeme derselbe Standard benutzt, tritt bei beiden Methoden derselbe systematische Fehler auf, der im Vergleich schließlich nicht sichtbar ist.

Etwa 1 Stunde nach dem Befüllen der Beutel wurden diese sowohl mit dem CLD als auch mit CALOS vermessen. Zum Vergleich wurden die Ergebnisse in einem Diagramm gegeneinander aufgetragen (siehe Abbildung 6.2). Es zeigt sich deutlich, dass beide Methoden im Rahmen ihrer jeweiligen Messunsicherheit identische Konzentrationen messen. Beim Vergleich der Standardabweichungen beider Methoden fällt auf, dass CALOS bei

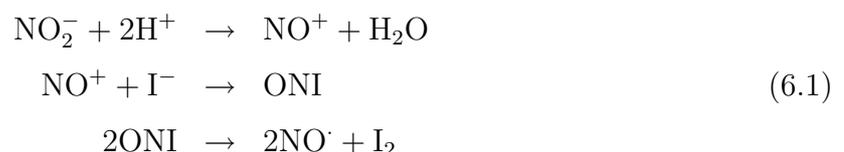


**Abbildung 6.2.:** Der obere Graph zeigt den Vergleich zwischen CALOS und CLD anhand von Prüfgasgemischen. Auf der x-Achse ist die mit dem CLD gemessene Konzentration, auf der y-Achse die CALOS-Messung aufgetragen. Die Regressionsgerade hat eine Steigung von  $0,999 \pm 0,005$  und einen Offset von  $0,04 \pm 0,22$ . Im unteren Graphen sind die Standardabweichungen der Messungen von CLD (schwarz) und CALOS (rot) aufgetragen.

hohen Konzentrationen deutlich geringere Standardabweichungen aufweist. Auch steigen die Standardabweichungen bei CALOS langsamer als beim CLD. Die Präzision ist bei hohen Konzentrationen beim CALOS Spektrometer höher als beim CLD, bei niedrigen Konzentrationen allerdings vergleichbar.

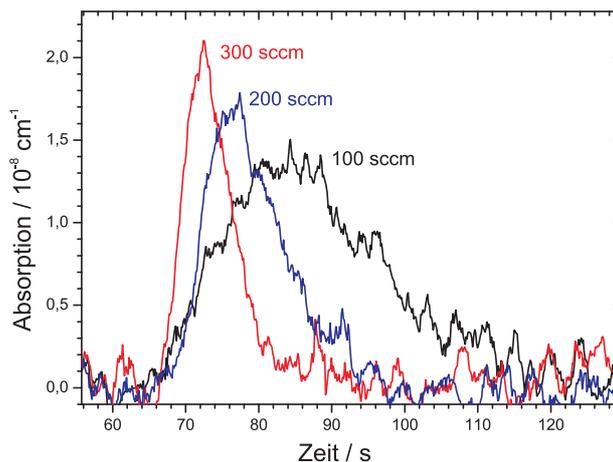
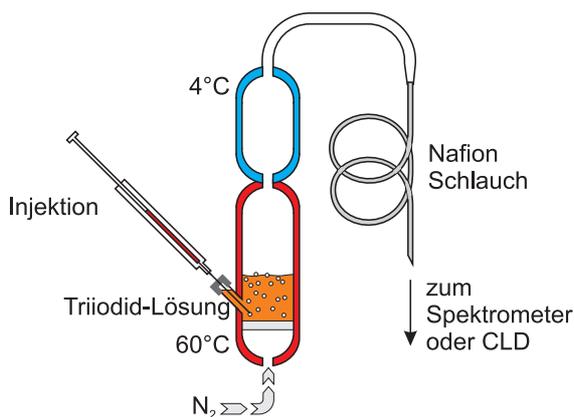
### 6.1.2. Bestimmung optimaler Analyseparameter anhand einer wässrigen Nitritlösung

Als (stark vereinfachtes) Modellsystem für biologische Flüssigkeiten dient eine wässrige Nitritlösung. In einer Triiodid-Lösung<sup>1</sup> kann das darin enthaltene Nitrit zu NO reduziert werden:



Zur Analyse findet diese Reaktion in einem temperierten Reaktionsgefäß bei 60°C statt (Abbildung 6.3, links). Die Einstellung der Temperatur erfolgt über zwei Umwälzthermos-

<sup>1</sup>KI+I<sub>2</sub> in Essigsäure gelöst



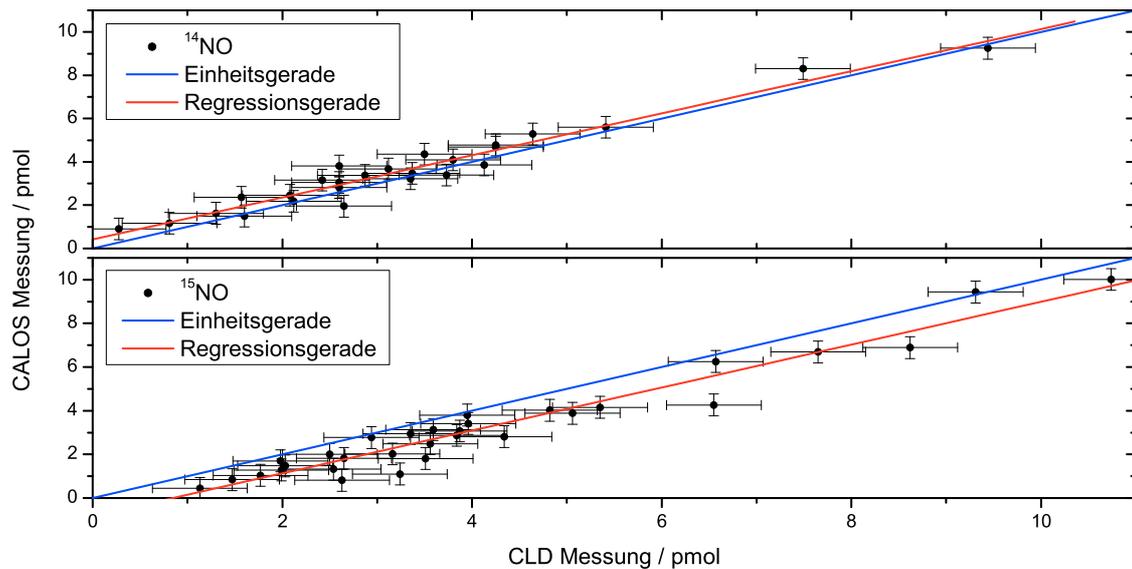
**Abbildung 6.3.:** Links: Die Reaktionskammer zum Nachweis von NO aus Flüssigkeiten ist ähnlich aufgebaut, wie das Vorgängermodell, das in Kapitel 5.2 vorgestellt wurde. Die Kammer besteht jedoch aus zwei Abschnitten, die mittels Wasserbädern auf unterschiedliche Temperaturen gebracht werden können. Rechts: Der Konzentrationsverlauf des freigesetzten NO ist flussabhängig. Druck: 40 mbar, NO-Menge: 6 pmol.

tate, die temperiertes Wasser durch die doppelte Gefäßwand pumpen.

Als Trägergas für das freigesetzte NO dient Helium, das mit dem freigesetzten NO zunächst durch einen gekühlten (4°C) Bereich des Reaktionsgefäßes geleitet wird. Hierdurch wird verdampfte Reaktionslösung zu einem großen Teil kondensiert und tropft in den unteren Bereich zurück. Eine anschließende NaOH-Falle entfernt verdampfte Säure aus dem Gasstrom. Durch einen Nafion-Schlauch wird die Wasserkonzentration auf 0,1 % reduziert. Das so vorbehandelte Gas wird mittels des CALO-Spektrometers und des CLD analysiert.

Unmittelbar nach der Injektion der Probe vermischt sich die Probe mit der Triiodid-Lösung und die Reaktion setzt ein, was zu einem exponentiellen Anstieg der NO-Konzentration führt. Nach einigen Sekunden ist das Nitrit aus der Probe aufgebraucht und ein exponentielles Abklingen der NO-Konzentration setzt ein. Das Resultat ist ein zeitlicher Konzentrationsverlauf, der mittels der Puls-Funktion (s. Gleichung 5.6) beschrieben werden kann, wie bereits in Kapitel 5.2 beschrieben wurde. Analog zu den dort beschriebenen Verfahren kann hier die NO-Menge bestimmt werden. Der Gasfluss hat auf die beobachtete Signalform einen wesentlichen Einfluss. Zunächst einmal verbessert sich die Zeitauflösung mit steigendem Gasfluss, da die Gasaustauschzeit in Reaktionskammer und Nachweiszelle abnimmt.

Wird das Gas, wie im Fall der Reduktion von Nitrit, schnell freigesetzt, führt ein höherer Gasfluss zu einem schnellen Auswaschen der freigesetzten Gasmenge und somit zu einer geringeren Verdünnung und zu einem stärkeren Signal (Vgl. Abbildung 6.3). Es ist also sinnvoll, den Gasfluss zu optimieren. Aufgrund der Konstruktion der Reaktionszelle ist ein



**Abbildung 6.4.:** Ein Vergleich zwischen den Geräteantworten auf Nitrit-Lösungen mit  $^{14}\text{N}$ -Nitrit (oben) und  $^{15}\text{N}$ -Nitrit (unten). Die Steigungen beider Regressionsgeraden sind  $0,98 \pm 0,05$ . Beim  $^{14}\text{N}$ -Nitrit zeigt sich eine mittlere Abweichung von  $0,4 \pm 0,2$  pmol und beim  $^{15}\text{N}$ -Nitrit von  $-0,83 \pm 0,22$  pmol. Die große Abweichung beim  $^{15}\text{N}$ -Nitrit ist durch die Verunreinigung des Wassers durch natürliches Nitritvorkommen zu erklären, die beim  $^{15}\text{NO}$ -Nachweis mittels CALOS keine Rolle spielt, bei der CLD-Messung allerdings mit gemessen wird.

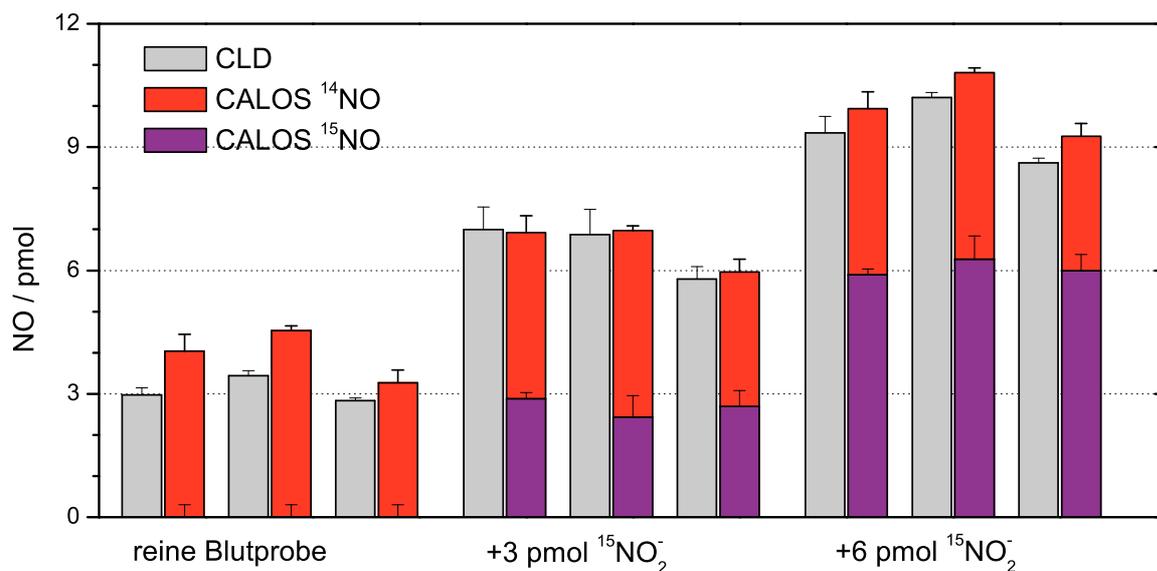
Gasfluss von mehr als 300 sccm nicht möglich, da die Reaktionslösung dann stark schäumt und in das Gasleitungssystem gedrückt wird. Um ein möglichst hohes Signal zu erreichen, wurden alle folgenden Versuche mit dem CALO-Spektrometer bei einem Gasfluss von 300 sccm durchgeführt; der CLD ist auf einen Gasfluss von 130 sccm festgelegt.

### 6.1.3. Vergleich von CLD und CALOS anhand wässriger Nitrit-Lösungen

Der Vergleich der beiden Systeme erfolgt anhand von Kalibrationsreihen. Hierzu wurden Nitritlösungen unterschiedlicher Verdünnung in die Triiodid-Lösung im Reaktionsgefäß gespritzt. Die erste Reihe eines Versuchstages diente der Kalibration der Systeme.

Um die Nachweisgrenze beider Systeme zu bestimmen, wurden 100  $\mu\text{l}$  einer Nitritlösung (10 nM) 5 mal mit beiden Systemen vermessen. Die Standardabweichung dieser Messergebnisse gibt die untere Quantifizierungsgrenze an und liegt bei dem CLD bei 0,17 pmol und bei CALOS bei 0,27 pmol. Die Empfindlichkeit beider Systeme liegt also in einem vergleichbaren Bereich, wobei der CLD leicht überlegen ist.

Die benutzten Konzentrationen reichten von 0 bis 100 nM. Selbst „nitritfreies“ Wasser enthält noch Spuren von Nitrit, die mit CALOS und dem CLD messbar sind. Diese Spuren



**Abbildung 6.5.:** Das Diagramm zeigt, dass die Summe der CALOS-Messungen von <sup>14</sup>NO und <sup>15</sup>NO mit der CLD-Messung derselben Proben übereinstimmt. Die Plasma-Proben wurden künstlich mit 3 pmol bzw. 6 pmol <sup>15</sup>N-Nitrit angereichert.

verfälschen insbesondere das Messergebnis des <sup>15</sup>NO bei den CLD-Messungen, da dieses System zwischen den Isotopologen nicht unterscheiden kann. Der Effekt führt in einem „Scatter-Plot“, in dem die Messergebnisse beider Methoden gegeneinander aufgetragen sind, zu einer konstanten Abweichung von der Einheitsgeraden, wie in Abbildung 6.4 zu erkennen ist. Im Falle des <sup>14</sup>NO tritt keine Abweichung auf, da hier beide Systeme die gleiche Verunreinigung messen.

Von diesem Offset abgesehen, liegen die Punkte der Vergleichsmessungen in Abbildung 6.4 im Rahmen der Messunsicherheit auf der Einheitsgeraden. Dies bedeutet, dass beide Systeme zu praktisch identischen Ergebnissen kommen.

#### 6.1.4. Blutplasma

NO reagiert im Blut sehr schnell zu Nitrit ( $\text{NO}_2^-$ ) oder bindet an Proteine und bildet so Nitrosothiole oder S-Nitrosamine. Als Sammelbegriff für auf diese Arten gebundenes NO wird RX-NO benutzt. Die Triiodid-Lösung löst auch aus diesen Verbindungen das NO, so dass der selbe Aufbau wie im vorangegangenen Abschnitt auch für die Analyse von Blutplasma-Proben genutzt werden kann. Vor der Analyse des Blutplasmas wurden die Systeme mittels verschieden konzentrierter Nitritlösungen kalibriert. Zur Herstellung der Plasma-Proben wurde 3 Probanden Blut aus der mittleren Vene der Ellenbeuge (Vena mediana cubiti) entnommen, im Verhältnis 1:5 in einer PBS-Lösung verdünnt und anschlie-

ßend 15 min bei einer Temperatur von 4 °C zentrifugiert, um die festen Zellbestandteile aus der Plasma-Probe zu entfernen. Jede Probe wurde 3 mal mit beiden Systemen analysiert. Anschließend wurde jeder Probe  $^{15}\text{N}$ -Nitrit (3 pmol/100 µl) beigefügt, und erneut mit beiden Systemen 3 mal analysiert. In einem letzten Schritt wurde nochmals dieselbe Menge  $^{15}\text{N}$ -Nitrit hinzugefügt und anschließend gemessen.

Der CLD misst als Ergebnis eine in jedem Schritt um 3 pmol erhöhte Stoffmenge, während CALOS zwischen  $^{14}\text{NO}$  und  $^{15}\text{NO}$  differenziert, wobei die Summe der beiden Stoffmengen der Messung des CLD entspricht.

### 6.1.5. Diskussion

Die Vergleiche anhand von Prüfgasgemischen und Blutplasma zeigen im Rahmen der Messgenauigkeit eine hervorragende Übereinstimmung. Der Vergleich der  $^{14}\text{NO}$ -Freisetzung aus wässrigen Nitritlösungen zeigt ebenfalls eine gute Übereinstimmung, lediglich die  $^{15}\text{NO}$ -Proben weichen deutlich von einander ab. Diese Abweichung kann auf Verunreinigungen der Proben mit  $^{14}\text{NO}_2^-$  zurück geführt werden, die aufgrund der fehlenden Selektivität von dem CLD mitgemessen wird, und somit zu einem Offset gegenüber den CALOS-Messungen führt.

In dieser Selektivität liegt der entscheidende Vorteil der CALOS-Methode gegenüber CLD. In biologischen Proben findet sich eine große Menge NO-Verbindungen im natürlichen Isotopenverhältnis. Sollen Veränderungen in den NO-Verbindungen nachgewiesen werden, ist dieser Offset ein begrenzender Faktor der Genauigkeit einer Analyse. Da  $^{15}\text{NO}$  in einer um einen Faktor 300 kleineren Konzentration vorliegt, können Veränderungen aufgrund isotopenmarkierter Substanzen mit einer vielfach höheren Empfindlichkeit nachgewiesen werden. Darüber hinaus stören unbeabsichtigte Verunreinigungen der Proben mit nitrithaltigen Substanzen (wie beispielsweise Wasser) die Analyse praktisch nicht.

Aus den analysierten Blutplasmaproben wurden im Mittel 3,5 pmol  $^{14}\text{NO}$  freigesetzt (vgl. Abb. 6.5). Die untere Quantifizierungsgrenze liegt sowohl für CALOS als auch für CLD bei unter 10 % dieser Menge, wodurch eine akzeptable Unsicherheit bei der Analyse von Blutproben gegeben ist. Zur Analyse von natürlich vorkommendem  $^{15}\text{NO}$  in einer Blutprobe ist die verwendete Plasmamenge (100 µl) jedoch zu gering. Mit der 30-fachen Menge, also 3 ml, würde die freigesetzte  $^{15}\text{NO}$ -Menge der Quantifizierungsgrenze entsprechen, so dass zusätzliche Erhöhungen messbar würden.

Die beiden wichtigsten etablierten Verfahren, um NO isotopologenselektiv in biologischen Proben nachweisen zu können sind die Elektronen-Spin-Resonanz (ESR) [Uts06] und gaschromatographische Verfahren, die mit einem Massenspektrometer kombiniert werden [Eij07, Tsi94, Wev99]. Beide Verfahren benötigen allerdings sehr aufwändige Proze-



duren der Probenaufbereitung. ESR ist auf die Verwendung sog. „Spin-Trap“-Moleküle angewiesen, bei chromatographischen Verfahren muss die Probe zunächst angereichert werden. Diese Probenaufbereitung bringt zusätzliche Quellen für Querempfindlichkeiten und Messunsicherheiten mit sich [Tar01, Rub94, Hel07]. Die Verfahren wurden mit der Chemilumineszenz-Methode verglichen [Hun04, Kle03, Hua06, Gla02] und ergaben eine gute Korrelation der Messergebnisse, allerdings liegt die Empfindlichkeit bei beiden Methoden unter der der CLD und CALOS.

Qualitativ wurde die Möglichkeit des  $^{14}\text{NO}$  und  $^{15}\text{NO}$  Nachweises in biologischen Proben mit einem Laserspektrometer bereits von Yi et al. erbracht, allerdings wurde die Nachweisempfindlichkeit lediglich im ppb Bereich abgeschätzt [Yi06].

Als wichtigstes Ergebnis dieses Kapitels kann festgehalten werden, dass das CALO-Spektrometer eine mit modernen Chemilumineszenz-Detektoren vergleichbare Empfindlichkeit aufweist, darüber hinaus aber auch zwischen verschiedenen Isotopologen unterscheiden kann. Diese außergewöhnliche Selektivität ist ein entscheidender Vorteil, der neue Wege in der biologischen und medizinischen Forschung öffnet. Ein Anwendungsbeispiel dieses Systems wird im folgenden Kapitel behandelt.

## 6.2. NO-Transport durch die Haut

Der Transport von NO durch die Haut in die Blutbahn ist für Biologie und Medizin von großem Interesse. NO ist im menschlichen Schweiß vorhanden [Gan04] und wird auf der Haut spontan aufgrund des pH-Wertes von 5,5 aus Nitrit, das im Schweiß vorhanden ist, freigesetzt [Sus06]. Die NO-Freisetzung kann durch UV-Einstrahlung weiter verstärkt werden [Sus03]. Bislang ungeklärt ist die Frage, ob das auf der Haut produzierte NO durch die Haut in die Blutbahn gelangen kann, wo es ggf. weitere Effekte, wie z.B. die Senkung des Blutdruckes, hervorruft.

Zur Untersuchung des NO-Transports durch die Haut soll ein Experiment mit  $^{15}\text{N}$ -markiertem Nitrit vorgestellt werden, bei dem eine Salbe, die das Nitrit enthält, auf die Haut aufgetragen wird. In verschiedenen Zeitabständen wird anschließend eine Blutprobe entnommen und untersucht. Im Folgenden wird die Versuchsdurchführung detailliert beschrieben und die Ergebnisse diskutiert. Dieses Experiment wurde in Kooperation mit der Klinik für plastische Chirurgie des Universitätsklinikums in Aachen durchgeführt.

### 6.2.1. Versuchsdurchführung

Vor dem Auftragen von 10 ml einer 100 mM  $^{15}\text{N}$ -Nitrit-Salbe auf die Haut der Probanden ( $N = 5$ , 2 weiblich, Alter 25-47, Gewicht 55-90 kg), wurde diesen jeweils 18 ml Blut

als Nullmessung abgenommen. Weitere Blutabnahmen wurden nach 15 und 30 min sowie nach 1, 3, 6 und 24 Stunden durchgeführt. Die Blutproben wurden zentrifugiert und der Plasmaüberstand mit Azeton versetzt, um die Proteine zu fällen. Die Proteine wurden anschließend in Wasser gelöst und bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Diese Vorbereitung der Proteinproben wurde von den Kooperationspartnern in Aachen durchgeführt.

Zur Analyse der in der Proteinlösung und im Zentrifugationsüberstand enthaltenen NO-Menge wurden die Proben in das Labor in Düsseldorf transportiert. Der Zeitraum zwischen Blutentnahme und Analyse betrug mehrere Tage.

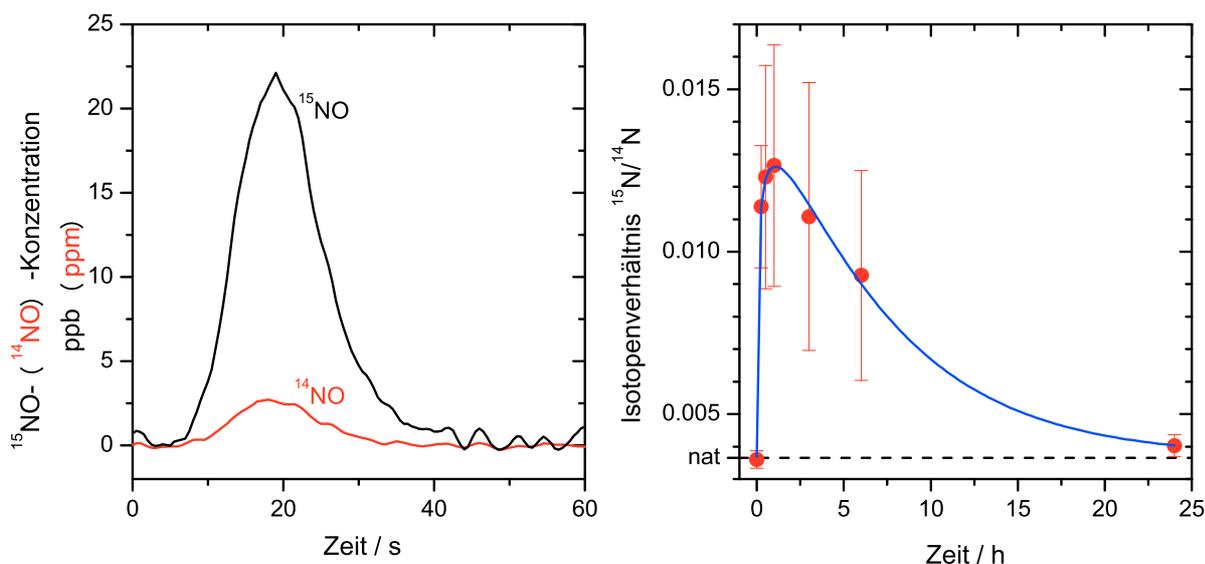
Nach dem Auftauen einer Probe wurde diese mit dem Enzym Nitratreductase versetzt. Hierdurch wird zu Nitrat oxidiertes NO zu Nitrit reduziert, das in der Triiodid-Lösung weiter zu NO reduziert werden kann. Das zur Verfügung stehende Probenvolumen betrug mehr als 9 ml. Aus jeder Probe wurden zwei mal 4 ml entnommen und in die Triiodid-Lösung im bereits beschriebenen Reaktionsgefäß bei  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  gespritzt. Die beiden Messungen werden gemittelt, als Messunsicherheit wird die Standardabweichung aus den Messungen betrachtet. Die Messung erfolgte wie in Kapitel 3.3.3 beschrieben.

Ein Probenvolumen von 4 ml setzt eine ausreichende Menge beider NO-Isotopologe frei. Werden beide Isotopologe untersucht, kann sichergestellt werden, dass ein Anstieg der  $^{15}\text{NO}$ -Menge nicht auf eine Erhöhung der natürlichen NO-Menge im Blut zurückzuführen ist.

### 6.2.2. Ergebnisse und Diskussion

Als Beispiel einer Einzelmessung ist die gleichzeitige Messung von  $^{14}\text{NO}$  und  $^{15}\text{NO}$  im Zentrifugationsüberstand nach der Fällung der Proteine aus der Plasma-Probe in Abbildung 6.6 (links) dargestellt. In diesem Graphen sind die  $^{14}\text{NO}$ - und  $^{15}\text{NO}$ -Konzentrationen gegen die Zeit nach dem Einspritzen der Probe in die Reaktionskammer aufgetragen. Das Isotopenverhältnis entspricht dem Verhältnis der Flächen unter den beiden Kurven. Eine Alternative stellt die Bestimmung des Isotopenverhältnisses zu jedem Zeitpunkt aus einzelnen Messpunkten dar, allerdings führen in diesem Fall nur Messpunkte zu einem sinnvollen Ergebnis, die deutlich über dem Rauschen liegen. Werden nur Punkte betrachtet, bei denen die  $^{14}\text{NO}$ -Konzentration mindestens 1 ppm beträgt (entspricht in etwa der vollen Halbwertsbreite des Pulses), so beträgt das mittlere Isotopenverhältnis 0,0084 bei einer Standardabweichung von weniger als 10 %.

Die Analyse der freigesetzten NO-Isotopologe in der Proteinlösung zeigt einen signifikanten Anstieg im Isotopenverhältnis  $^{15}\text{NO}/^{14}\text{NO}$  ( $p = 0,0015$ , paarweiser Student-t-Test). Der maximale Anstieg um das 3,6-fache des natürlichen Isotopenverhältnisses wird etwa 1,2 h nach dem Einreiben mit der  $^{15}\text{NO}$ -Salbe erreicht (vgl. Abb. 6.6, rechts). An die

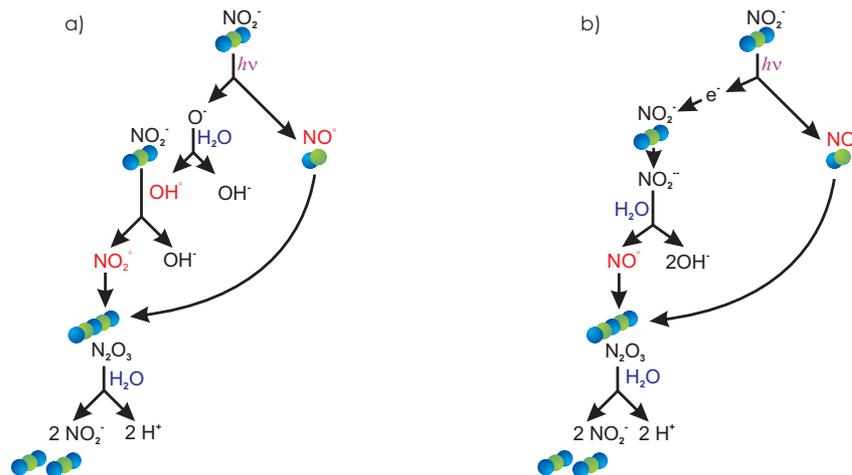


**Abbildung 6.6.:** Zur Bestimmung des Isotopologenverhältnisses  $^{15}\text{NO}/^{14}\text{NO}$  in Blutproben von 5 Probanden wurden beide Konzentrationen simultan gemessen. Die linke Abbildung zeigt eine Messung 30 min nach Applikation der Salbe. Das Isotopenverhältnis wird aus den Flächen unter den Pulsen bestimmt. Die Ergebnisse aller Messungen sind im rechten Bild dargestellt. An die Protein-Messung (Punkte) wurde die Pulsfunktion 5.6 (blaue Linie) gefittet. Das natürliche Isotopenverhältnis wird durch die schwarze gestrichelte Linie dargestellt. Die Messpunkte stellen die Mittelwerte über alle Probanden, die Fehlerbalken die Standardabweichung dar.

Messpunkte ist eine Pulsfunktion angefittet. Die Messpunkte sind die Mittelwerte über alle Probanden, während die Fehlerbalken die Standardabweichung dieser Messwerte darstellen. Die relative Standardabweichung über alle Isotopenverhältnisse vor dem Einreiben mit der Salbe beträgt 8,3%. Dieser Wert kann als der relative Fehler des Spektrometers bei der Bestimmung des Isotopenverhältnisses in Blutproben betrachtet werden. Die ungleich höheren Schwankungen nach dem Einreiben sind hingegen auf unterschiedlich starke Auswirkungen der Salbe auf die verschiedenen Versuchspersonen zurückzuführen.

Die Änderung im Isotopenverhältnis ist ausschließlich auf einen Anstieg der  $^{15}\text{NO}$ -Konzentration im Blut zurückzuführen, da keine signifikante Änderung der  $^{14}\text{NO}$  Konzentration festzustellen ist ( $p = 0,28$ ). Eine solche Änderung hätte bedeutet, dass die Applikation der NO-Salbe eine NO-Produktion im Körper ausgelöst hätte.

Diese Messungen zeigen, dass Nitrit, das auf der Haut appliziert wird, einen Weg durch die Haut findet und an Proteine bindet. Das Nitrit in der Salbe wird bei pH 5,5 zu NO reduziert und diffundiert als solches durch die Haut, bis es in den Blutgefäßen, die die Haut durchsetzen, an Proteine gebunden wird. Es ist zwar denkbar, dass das Nitrit durch die Haut diffundiert, in der Blutbahn zu NO reduziert wird und dann an die Proteine bindet. Diese Reaktion findet allerdings nur unter Sauerstoffmangel statt und kann daher



**Abbildung 6.7.:** Die Reaktionspfade für die UV-induzierte NO-Freisetzung aus wässriger Nitrit-Lösung. Pfad a) ist um einen Faktor 4 wahrscheinlicher als Pfad b). [Hor05]

als unwahrscheinlich betrachtet werden [Lun05, Sus06].

Das Isotopenverhältnis im Zentrifugationsüberstand steigt ebenfalls an, hier liegt der Anstieg aber nur bei etwa dem doppelten natürlichen Isotopenverhältnis.

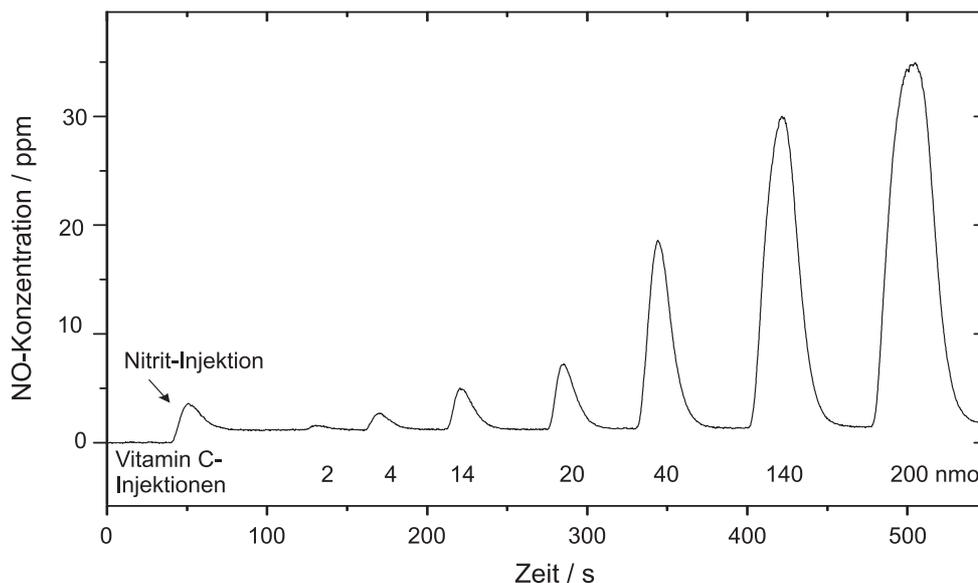
## 6.3. NO-Nachweis mittels FAMOS

Das FAMO-Spektrometer wurde in Kapitel 4.2 ausführlich charakterisiert. In diesem Kapitel soll eine Anwendung dieser Methode vorgestellt werden. FAMOS zeichnet sich vor allem durch seine extrem hohe Spezifität aus. Da prinzipiell ausschließlich paramagnetische Stoffe nachgewiesen werden können, sind Querempfindlichkeiten praktisch ausgeschlossen. Daher eignet sich diese Methode hervorragend, um NO in wasserhaltigen Gasgemischen wie Atem oder nach der Freisetzung aus Flüssigkeiten ohne vorherige Probentrocknung nachzuweisen.

### 6.3.1. Vergleich körpereigener Radikalfänger

Hier wird ein Modell für die NO-Produktion aus Nitrit im Schweiß unter UV-Einstrahlung untersucht. Gerade unter UV-Einstrahlung ist die Haut einem erhöhten Stress ausgesetzt, dem die Produktion von NO entgegenwirken kann [Sus03]. Anhand eines Modellsystems kann die Wirkung verschiedener körpereigener Substanzen wie Vitamin C und E auf die NO-Freisetzung untersucht werden.

Als Modellsystem dient hier eine wässrige Nitritlösung (1 ml, 100 mM in 20 ml PBS), die in eine Reaktionskammer gefüllt wird, durch die Stickstoff bei konstantem Gasfluss (600 sccm) geleitet wird. Unter Bestrahlung mit einer UV-Lampe (2000 W, 290 bis 420 nm,



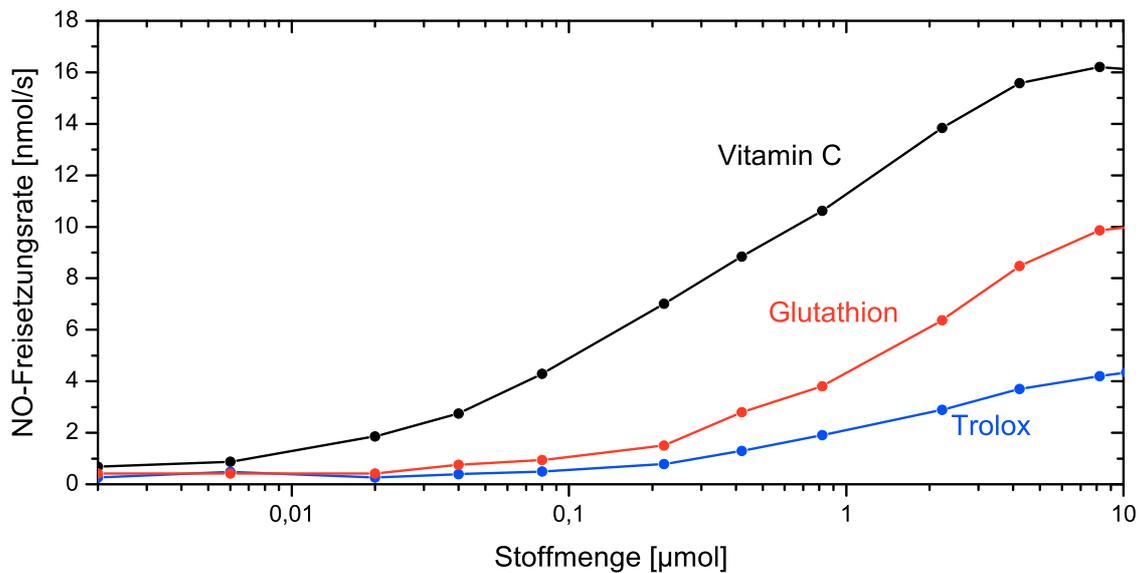
**Abbildung 6.8.:** Zeitlicher Verlauf mehrerer Injektionen von Vitamin C in eine wässrige Nitrit-Lösung.

Fa. Sellas Medizinische Geräte GmbH, Gevelsberg) wird NO gemäß der in Abbildung 6.7 dargestellten Reaktionspfade freigesetzt und kann mittels des FAMO-Spektrometers nachgewiesen werden.

Aufgrund der Rückreaktion des NO zu Nitrit in wässriger Lösung stellt sich eine konstante NO-Freisetzungsrates ein. Im Folgenden wird nun die Wirkung von Glutathion, Vitamin C und Vitamin E auf die Freisetzungsrates untersucht.

Die drei hier untersuchten körpereigenen Stoffe fungieren alle als Antioxidantien und sind somit in der Lage, freie Radikale einzufangen. Die Vitamine C und E können vom Menschen nicht produziert werden, werden dem Körper allerdings bei normaler Ernährung in ausreichender Menge zugeführt. Glutathion kann vom Körper selbst produziert werden und ist in nahezu allen Zellen in hoher Konzentration vorhanden. Unklar ist, wie stark das Potenzial der Stoffe zum Einfang freier Radikale ist. Im Reaktionspfad in Abbildung 6.7 treten als freie Radikale OH, NO und NO<sub>2</sub> auf (rot dargestellt). NO wird von allen Antioxidantien erst bei sehr hohen Konzentrationen eingefangen, für OH und NO<sub>2</sub> reichen allerdings bereits relativ geringe Mengen.

Wird einer UV-bestrahlten Nitritlösung einer der Stoffe zugefügt, so erhöht sich kurzfristig die NO-Konzentration. Durch das Einfangen der Radikale wird die Rückreaktion des NO zu Nitrit verhindert, wodurch mehr NO in das Trägergas gelangt. Sobald der Stoff aufgebraucht ist, kehrt die Freisetzungsrates wieder auf ihren Ursprungswert zurück. Abbildung 6.8 zeigt eine Reihe von Messungen mit Vitamin C als Antioxidans. Beim Einspritzen des Nitrits wird ein Ansteigen der NO-Konzentration und das Einstellen des



**Abbildung 6.9.:** Die drei körpereigenen Antioxidantien im Vergleich. Dargestellt ist Vitamin C (schwarz), Glutathion (rot) und Trolox (blau). Anhand dieser Graphen ist ein quantitativer Vergleich der Antioxidantien möglich.

Gleichgewichts nach etwa 30 s beobachtet. Bei der Injektion von Vitamin C ergibt sich jeweils ein pulsartiges Signal. Für Glutathion und Vitamin E ergeben sich ähnliche Bilder, zur weiteren Auswertung wird jedoch lediglich die maximale Freisetzungsrates gegen die eingespritzte Stoffmenge aufgetragen (Abbildung 6.9). Die Graphen (schwarz: Vitamin C, rot: Glutathion, blau: Trolox) zeigen einen mit der eingespritzten Antioxidansmenge steigenden Verlauf, der bei 10  $\mu\text{mol}$  Vitamin C bzw. Glutathion ein Sättigungsverhalten zeigt.

Eine erhöhte Anzahl Oxidantien bewirkt eine höhere Wahrscheinlichkeit für den Einfang eines freien Radikals. Stehen weniger freie Radikale zur Verfügung, findet die Rückreaktion zu Nitrit in Abbildung 6.7 mit geringerer Wahrscheinlichkeit statt und mehr NO kann freigesetzt werden.

Anhand dieser Graphen lässt sich das Reduktionspotenzial der drei Radikalfänger miteinander vergleichen. Bei einer Normierung auf die Freisetzungsrates von Vitamin C ergibt sich für die höchste untersuchte Konzentration (10  $\mu\text{mol}$ ) für Glutathion ein Wert von 0,6 und für Vitamin E ein Wert von 0,27.

Neben diesem Vergleich des Reduktionspotenzials von Vitamin C, E und Glutathion demonstriert dieses Kapitel die Möglichkeit des Einsatzes der FAMOS-Methode in praktischen biomedizinischen Anwendungen. Zwar ist die gleiche Untersuchung auch mit dem CALO-Spektrometer möglich. Da allerdings die hohe Empfindlichkeit bei CALOS mit einem erheblich höheren experimentellen Aufwand verbunden ist, bietet die FAMOS-



Methode eine gute Alternative.

## 6.4. Fazit

Der Vergleich des CALO-Spektrometers mit dem „Gold-Standard“ der NO-Analytik zeigt praktisch eine Übereinstimmung der Empfindlichkeiten. Da CALOS jedoch isotopologenselektive Analysen ermöglicht, und somit den in biologischen Systemen vorhandenen NO-Hintergrund „ausblenden“ kann, ist dieses System einem Chemilumineszenz-Detektor in der biomedizinischen Praxis weit überlegen.

Diese Überlegenheit kommt beim Nachweis, dass NO durch die Haut in den Blutkreislauf gelangt und dort an Proteine bindet, zum Einsatz.

Lediglich die Komplexität des Laborsystems verhindert den klinischen Einsatz. Einer Vereinfachung des Systems stehen jedoch keine prinzipiellen Schwierigkeiten im Weg – erste Systeme, die die Cavity Ring-Down Spektroskopie nutzen, sind bereits zum Nachweis einer Vielzahl von Spurengasen kommerziell erhältlich [Tig08].

Das FAMO-Spektrometer zeigt eine deutlich geringere Empfindlichkeit als CALOS, ist aber auch in der Lage, NO isotopologenselektiv mit hoher Zeitauflösung zu analysieren. Ein besonderer Vorteil der FAMOS-Methode ist die Selektivität des Verfahrens, die keinerlei Probenaufbereitung wie das Trocknen des Gases erforderlich macht.

Im Vergleich zu CALOS fällt darüber hinaus der relativ einfache Aufbau des Systems auf. Dieser Faktor begünstigt eine Nutzung des Prinzips in einem kommerziellen Messgerät, da sich die Komplexität des Systems vor allem auf die Kosten auswirkt.

Mit dem Einsatz moderner QCL, die im 5  $\mu\text{m}$  Wellenlängenbereich bereits Leistungen von mehreren 10 mW zur Verfügung stellen, ist neben einer weiteren Verbesserung der Nachweisempfindlichkeit beider Systeme auch mit der Entwicklung eines kompakten CALO-Spektrometers möglich.

## 7. Zusammenfassung

Im Verlauf dieser Arbeit wurden zwei laserspektroskopische Verfahren zur isotoposelektiven Analyse von CO und NO in komplexen Gasgemischen wie dem menschlichen Atem oder dem freigesetzten Gas aus biologischen Proben weiterentwickelt.

Zur Bestimmung optimaler Parameter mittels FAMOS wurden die Signale der Fundamentalbande berechnet. Der Vergleich mit gemessenen Signalen ergab eine gute Übereinstimmung. Das Spektrometer erreicht nun eine Nachweisgrenze von 6 ppb/Hz<sup>1/2</sup> <sup>15</sup>NO und 60 ppb/Hz<sup>1/2</sup> <sup>14</sup>NO. Verglichen mit dem Vorgängermodell wurde eine Verbesserung um einen Faktor 2 erreicht, sowie die Möglichkeit geschaffen, beide Isotopologe nachzuweisen. Durch den Einsatz eines Zimmertemperatur-QCL ist das Spektrometer wesentlich kompakter und benutzerfreundlicher geworden.

Die minimale Nachweisgrenze des CALO-Spektrometers wurde durch die Konstruktion einer stabilen Nachweiszelle um einen Faktor 6 bei einer Mittelungszeit von 70 s verbessert. Durch die massive Konstruktion wurde auch die Kurzzeitstabilität verbessert, wodurch eine rauschäquivalente Absorption von  $\alpha = 2,1 \cdot 10^{-10} \text{ cm}^{-1}/\text{Hz}^{1/2}$  auf dem P<sub>9</sub>(9)-Übergang des CO-Lasers im Vergleich zu  $\alpha = 3,0 \cdot 10^{-10} \text{ cm}^{-1}/\text{Hz}^{1/2}$  der Vorgängerzelle erreicht wurde. Die erreichten Nachweisgrenzen sind in Tabelle 7.1 zusammengefasst. Ein Vergleich mit Veröffentlichungen über andere laserspektroskopische Verfahren zeigt, dass CALOS zur Zeit die empfindlichste Spektroskopiemethode zum Nachweis von CO und NO ist.

Die herausragenden Eigenschaften des Spektrometers ermöglichen die Untersuchung von CO im menschlichen Atem in Echtzeit. Die gemessenen Exspirogramme zeigen im Vergleich mit anderen Gasen im Atem eine ungewöhnliche Abhängigkeit vom Atemfluss. Zur Erklärung dieser Anomalie wurde ein mathematisches Modell der CO-Atmung entwickelt,

Methode	Molekül	Laserübergang	Absorption cm <sup>-1</sup> Hz <sup>-1/2</sup>	Nachweisgrenze ppb Hz <sup>-1/2</sup>
FAMOS	<sup>14</sup> NO	–	–	60
FAMOS	<sup>15</sup> NO	–	–	6
CALOS	<sup>14</sup> NO	P <sub>8</sub> (9)	1,9 · 10 <sup>-10</sup>	0,029
CALOS	<sup>15</sup> NO	P <sub>9</sub> (9)	2,1 · 10 <sup>-10</sup>	0,023
CALOS	<sup>13</sup> CO	P <sub>3</sub> (13)	1,0 · 10 <sup>-10</sup>	0,34

**Tabelle 7.1.:** Gemessene Nachweisgrenzen der Spektrometer



das die Beobachtungen erklären kann. Darüber hinaus ist mittels der Erkenntnisse aus den Messungen und dem Modell ein Atemprotokoll entwickelt worden.

Mögliche Anwendungen dieses Protokolls sind die Bestimmung der Carboxyhämoglobin-Konzentration im Blut sowie die Bestimmung der totalen Hämoglobinmasse im Körper. In diesem Zusammenhang wurde festgestellt, dass es bislang nicht erfasste Faktoren gibt, die den CO-Austausch zwischen Atem und Blut beeinflussen und unter veränderten physiologischen Bedingungen, wie nach einer Blutspende, zum Tragen kommen.

Eine weitere Möglichkeit zur Bestimmung der Carboxyhämoglobin-Konzentration im Blut besteht in der Freisetzung des CO aus einer Blutprobe. Die Empfindlichkeit dieser Methode mit dem CALO-Spektrometer ist bislang unerreicht.

Der systematische Vergleich mit dem „Gold-Standard“ der NO-Analytik in der biomedizinischen Forschung, einem Chemilumineszenzdetektor, zeigt neben einer ähnlichen Nachweisempfindlichkeit die Überlegenheit der CALOS-Methode aufgrund der Möglichkeit, zwischen den Isotopologen zu unterscheiden.

# A. LabVIEW-Programme

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Programme entwickelt, die zur Automatisierung der zeitaufwändigen Datenauswertung dienen oder die experimentell gemessenen Daten auf der Grundlage theoretischer Überlegungen reproduzieren. Hier wird zunächst ein LabVIEW-Programm zur Erzeugung von Exspirogrammen aus den Rohdaten des Messprogramms vorgestellt.

In Anhang B folgen die Programme, die in der Mathematik-Software Mathematica entwickelt wurden. Hier findet sich das Programm zur Simulation der CO-Exspirogramme aus Kapitel 5.1.2 und zur Berechnung der FAMOS-Signale aus Kapitel 4.1.

## Erzeugen von Exspirogrammen

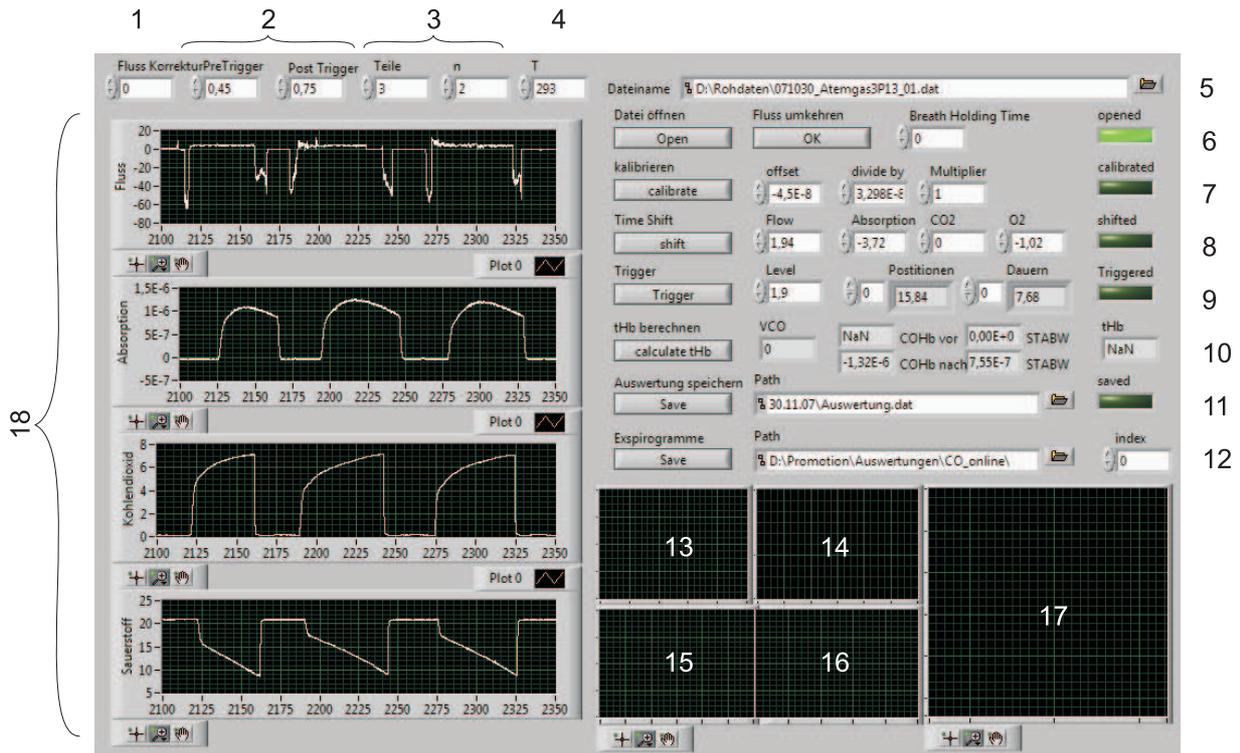
Dieses Programm erfüllt drei Funktionen: Es erstellt aus einer zusammenhängenden Folge von Atemzügen einzelne Exspirogramme, extrahiert die zugehörigen Parameter und berechnet die totale Hämoglobinmasse, falls eine Messung gemäß des entsprechenden Messprotokolls durchgeführt wurde.

Hierzu benötigt das Programm eine Reihe von Eingaben durch den Benutzer, die in der Abbildung der Benutzeroberfläche (Abb. A.1) durchnummeriert sind.

Zunächst ist die Eingabe der Messdatei notwendig (5), die mittels des Buttons „Datei öffnen“ (6) geöffnet wird. Die darin enthaltenen Daten werden in den Graphen (18) dargestellt. Zur Umrechnung der Absorption in die CO-Konzentration können im Punkt (7) die entsprechenden Parameter angegeben werden. „Offset“ gibt die Absorption auf der Basislinie an. Dieser Wert wird zunächst vom Signal abgezogen, anschließend werden alle Werte durch den unter „divide by“ angegebenen Wert dividiert und mit dem Wert „Multipliert“ multipliziert.

Unter (8) können die Zeitverschiebungen der einzelnen Messreihen angegeben werden. Mit dem Button „Shift“ wird diese Verschiebung ausgeführt.

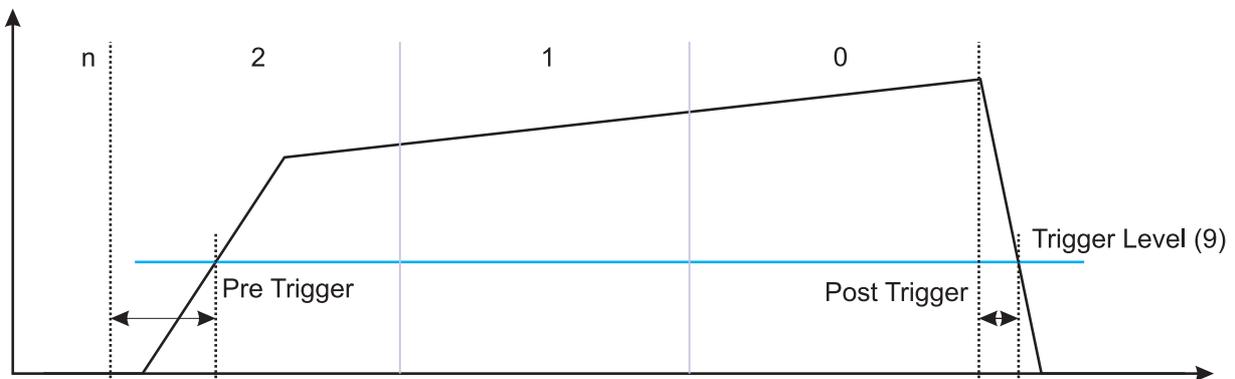
Die Funktion „Trigger“ sucht die aufsteigenden und absteigenden Flanken jedes Atemzugs und generiert die einzelnen Exspirogramme. Hierzu werden die CO<sub>2</sub>-Daten genutzt. „Level“ bezeichnet dabei die Höhe, auf der nach den Flanken gesucht werden soll (blaue Linie in Abbildung A.2).



**Abbildung A.1.:** Das Frontpanel des Programms zur Erzeugung von Exspirogrammen.

Die Schnittpunkte für die einzelnen Exspirogramme werden mit den ermittelten Flankenpositionen und den Werten „Pre Trigger“ (2, Start des Exspirogramms) und „Post Trigger“ (Ende des Exspirogramms) berechnet. Zur Veranschaulichung dient Abbildung A.2 (gestrichelte Linien).

Der unter (12) angegebene Index bestimmt das Exspirogramm, das in den Graphen 13-16 dargestellt wird. Graph 17 stellt alle Atemvolumina dar. Die Darstellung der Exspirogramme kann dazu genutzt werden, die Trigger-Positionen zu kontrollieren und ggf. durch Änderung der Verschiebung und der Trigger zu korrigieren.



**Abbildung A.2.:** Die Parameter zum Zuschneiden von Exspirogrammen.

Die Funktion „calculate tHb“ extrahiert alle Parameter aus den erzeugten Exspiogrammen. Als Benutzereingaben werden die Parameter (3) benötigt. Jedes Exspiogramm wird in eine unter „Teile“ angegebene Anzahl Abschnitte unterteilt. Der („Teile“-„n“)-te Anteil (3) wird schließlich benutzt. Dies dient dazu, die Teile der Exspiogramme auszuschließen, in denen sich die Konzentration stark ändert (Anfang und Ende). Die Signale in dem ausgewählten Teil werden gemittelt und deren Standardabweichung bestimmt. Aus den mittleren CO- und O<sub>2</sub>-Konzentrationen wird die Carboxyhämoglobin-Konzentration im Blut berechnet.

# B. Mathematica-Programme

## B.1. Simulation von Expirogrammen

Dieses Programm berechnet Expirogramme auf der Basis einer seriellen Befüllung/Entleerung der Lunge. Im ersten Teil wird die Affinität des CO in Abhängigkeit von der Sauerstoffkonzentration in der Lunge berechnet. Diese Berechnung stammt aus [Das04].

### Berechnung der CO-Affinität

#### Feste Parameter

```
Wpl = 0.94; (*fractional water space in plasma, unitless*)
Wrbc = 0.65; (*fractional water space in RBCs, unitless*)
Rrbc = 0.69; (*Gibbs - Donnan ratio across RBC membrane, unitless*)
Hbrbc = 5.18*10^-3; (*hemoglobin concentration in RBCs, M *)
K2 = 2.95*10^-5; (*CO2 + HbNH2 equilibrium constant, unitless*)
K2dp = 1.0*10^-6; (*HbNHCOOH dissociation constant, M*)
K2p = K2/K2dp; (*kf2p/kb2p, 1/M*)
K3 = 2.51*10^-5; (*CO2 + O2HbNH2 equilibrium constant, unitless*)
K3dp = 1.0*10^-6; (*O2HbNHCOOH dissociation constant, M*)
K3p = K3/K3dp; (*kf3p/kb3p, 1/M*)
K5dp = 2.63*10^-8; (*HbNH3 + dissociation constant, M*)
K6dp = 1.91*10^-8; (*O2HbNH3 + dissociation constant, M*)
nhill = 2.7; (*Hill index, unitless*)
n0 = nhill - 1.0;
(*deviation of Hill index or cooperativity from the stoichiometry of O2 for
each heme site*)
```

### Parameter unter physiologischen Standard-Bedingungen

```
pO20 = 100.0;(*standard O2 partial pressure in blood, mmHg*)
pCO20 = 40.0;(*standard CO2 partial pressure in blood, mmHg*)
pH0 = 7.24; (*standard pH in RBCs, unitless*)
DPG0 = 4.6510^-3;(*standard 2, 3 - DPG concentration in RBCs, M*)
Temp0 = 37.0;(*standard temperature in blood; degC*)
fact = 1.0*10^-6/Wpl;(*a multiplicative factor, M/mmHg*)
alphaO20 = fact*1.37;(*solubility of O2 in water at 37 C, M/mmHg*)
alphaCO20 = fact*30.7;(*solubility of CO2 in water at 37 C, M/mmHg*)
O20 = alphaO20*pO20;(*standard O2 concentration in RBCs, M*)
CO20 = alphaCO20*pCO20;(*standard CO2 concentration in RBCs, M*)
Hp0 = 10^(-pH0);(*standard H + concentration in RBCs, M*)
pHp10 = pH0 - Log[Rrbc];(*standard pH in plasma, unitless*)
P500 = 26.8;(*standard pO2 at 50% SHbO2, mmHg*)
C500 = alphaO20*P500;(*standard O2 concentration at 50% SHbO2, M*)
```

### Variablen, die unter physiologischen Bedingungen variiert werden können.

```
Hct = 0.45; (*hematocrit, unitless*)
pCO2 = 41.0; (*CO2 partial pressure in blood, mmHg*)
pH = 7.24; (*pH in RBCs, unitless*)
DPG = 4.65*10^-3; (*2, 3 - DPG concentration in blood, M*)
Temp = 37.0; (*temperature in blood; degC*)
```

### Berechnung verschiedener wichtiger Variablen

```
Wbl = (1 - Hct)*Wpl + Hct*Wrbc;
pHp1 = pH - Log[Rrbc];
pHp1diff = pHp1 - pHp10;
pHdiff = pH - pH0;
pCO2diff[CO2_] = CO2/alphaCO2 - pCO20;
DPGdiff = DPG - DPG0;
Tempdiff = Temp - Temp0;
alphaO2 = fact*(1.37 - 0.0137*Tempdiff + 0.00058*Tempdiff^2);
alphaCO2 = fact*(30.7 - 0.57*Tempdiff + 0.02*Tempdiff^2);
pK1 = 6.091 - 0.0434*pHp1diff + 0.0014*Tempdiff*pHp1diff;
```



```

K1 = 10^(-pK1);
Hp = 10^(-pH);
Hpp1 = 10^(-pHp1);

Term1 = K2p*(1 + K2dp/Hp);
Term2 = K3p*(1 + K3dp/Hp);
Term3 = (1 + Hp/K5dp);
Term4 = (1 + Hp/K6dp);
Term10 = K2p*(1 + K2dp/Hp0);
Term20 = K3p*(1 + K3dp/Hp0);
Term30 = (1 + Hp0/K5dp);
Term40 = (1 + Hp0/K6dp);
Term5[C02_] = (Hp0/Hp)^n1*(C020/C02)^n2[C02]*(DPG0/DPG)^n3*(Temp0/Temp)^n4;
Kratio10 = (Term10*C020 + Term30)/(Term20*C020 + Term40);
Kratio11 = (Term1*C020 + Term3)/(Term2*C020 + Term4);
Kratio12[C02_] = (Term10*C02 + Term30)/(Term20*C02 + Term40);
K4dp = Kratio10*020^n0/C500^nhill;
K4tp = K4dp/020^n0;
Kratio20 = Kratio10/K4tp;
Kratio21 = Kratio11/K4tp;
Kratio22[C02_] = Kratio12[C02]/K4tp;

P501 = 26.765 - 21.279*pHdiff + 8.872*pHdiff^2;
P502[C02_] = 26.80 + 0.0428*pC02diff[C02] + 3.64*10^-5*pC02diff[C02]^2;
P503 = 26.78 + 795.633533*DPGdiff - 19660.8947*DPGdiff^2;
P504 = 26.75 + 1.4945*Tempdiff + 0.04335*Tempdiff^2 + 0.0007*Tempdiff^3;
C501 = alpha020*P501;
C502[C02_] = alpha020*P502[C02];
C503 = alpha020*P503;
C504 = alpha02*P504;
n1 = If [Abs[pH - pH0] < 1.0*10^-6,
  1.0, (Log[Kratio21] - nhill*Log[C501])/(pH - pH0)];
n2[C02_] = If [Abs[C02/alphaC02 - pC020] < 1.0*10^-6,
  1.0, (Log[Kratio22[C02]] - nhill*Log[C502[C02]])/(Log[C020] - Log[C02])];
n3 = If[Abs[DPG - DPG0] < 1.0*10^-6,
  1.0, (Log[Kratio20] - nhill*Log[C503])/(Log[DPG0] - Log[DPG])];
n4 = If[Abs[Temp - Temp0] < 1.0*10^-6,

```

$$1.0, (\text{Log}[\text{Kratio20}] - \text{nhill} * \text{Log}[\text{C504}]) / (\text{Log}[\text{Temp0}] - \text{Log}[\text{Temp}]);$$

### Hier finden die Berechnungen aller erwünschten Größen statt.

In diesem Programmteil werden verschiedene Größen berechnet. Wichtig für die Simulation der Expirogramme ist hier allerdings lediglich SHbO<sub>2</sub>[O<sub>2</sub>,CO<sub>2</sub>].

```

K4p[O2_, CO2_] = K4dp*(O2/O20)^n0*Term5[CO2];
KHbO2[O2_, CO2_] = K4p[O2, CO2]*(Term2*CO2 + Term4)/(Term1*CO2 + Term3);
KHbCO2 = (Term1 + Term2*K4p*O2)/(Term3 + Term4*K4p*O2);
SHbO2[O2_, CO2_] = KHbO2[O2, CO2]*O2/(1 + KHbO2[O2, CO2]*O2);
SHbCO2 = KHbCO2*CO2/(1 + KHbCO2*CO2);
O2free = Wb1*alphaO2*pO2;
O2bound = 4*Hct*Hbrbc*SHbO2;
O2total = O2free + O2bound;
O2content = 2225.6*O2total;
CO2free = Wb1*alphaCO2*pCO2;
CO2bicarb = ((1 - Hct)*Wp1 + Hct*Wrbc*Rrbc)*(K1*alphaCO2*pCO2/Hppl);
CO2bound = 4*Hct*Hbrbc*SHbCO2;
CO2total = CO2free + CO2bicarb + CO2bound;
CO2content = 2225.6*CO2total;
HbNH2 = Hbrbc/((Term1*CO2 + Term3) + K4p*O2*(Term2*CO2 + Term4));
HbNH3p = HbNH2*Hp/K5dp;
O2HbNH2 = K4p*O2*HbNH2;
O2HbNH3p = O2HbNH2*Hp/K6dp;
HbNHCOOH = K2p*CO2*HbNH2;
HbNHCOOm = K2dp*HbNHCOOH/Hp;
O2HbNHCOOH = K3p*CO2*O2HbNH2;
O2HbNHCOOm = K3dp*O2HbNHCOOH/Hp;
SHbO2kin = (O2HbNH2 + O2HbNH3p + O2HbNHCOOH + O2HbNHCOOm)/Hbrbc;
SHbCO2kin = (HbNHCOOH + HbNHCOOm + O2HbNHCOOH + O2HbNHCOOm)/Hbrbc;
O2freep1 = Wp1*(1 - Hct)*alphaO2*pO2;
O2freep2 = 2225.6*O2freep1;
O2freerbc1 = Wrbc*Hct*alphaO2*pO2;
O2freerbc2 = 2225.6*O2freerbc1;
O2boundrbc1 = 4*Hct*Hbrbc*SHbO2;
O2boundrbc2 = 2225.6*O2boundrbc1;

```



```

C02freep1 = Wpl*(1 - Hct)*alphaC02*pC02;
C02freep2 = 2225.6*C02freep1;
C02freerbc1 = Wrbc*Hct*alphaC02*pC02;
C02freerbc2 = 2225.6*C02freerbc1;
C02bicarbpl1 = Wpl*(1 - Hct)*K1*alphaC02*pC02/Hppl;
C02bicarbpl2 = 2225.6*C02bicarbpl1;
C02bicarbrbc1 = Wrbc*Hct*Rrbc*K1*alphaC02*pC02/Hppl;
C02bicarbrbc2 = 2225.6*C02bicarbrbc1;
C02boundrbc1 = 4*Hct*Hrbc*SHbC02;
C02boundrbc2 = 2225.6*C02boundrbc1;

```

## Hier beginnt die Berechnung der Expirogramme

```

cAlv[t_, V_, DL_] = cAlv0*Exp[-DL*t/V] + cBl(1 - Exp[-DL*t/V]);
imin = 80; imax = 1000;
Vmax = 3500; (*Atemzugvolumen in Millilitern*)
VRes = 1500; (*Residualkapazität*)
Vi = Vmax/(imax - imin); (*Volumen einer Lungeneinheit*)
Flowin = 60000/60; (*Atemflussrate in ml pro Sekunde beim Einatmen*)
Flowout = 20000/60; (*beim Ausatmen*)
cAlv0 = 1.8*10^-6;
c = Table[UnitStep[i - imin]*cAlv0, i, 0, imax];
h = c;
cBlin = 1.8*10^-6;
c0240 = Table[ 18.4 - 0.314*Vmax/imax/1000*i, i, 0, imax]; (*Initialisierung*)
c0235 = Table[18.3 - 0.353*Vmax/imax/1000*i, i, 0, imax];
c0225 = Table[18.1 - 0.409*Vmax/imax/1000*i, i, 0, imax];
c0215 = Table[17.4 - 0.540*Vmax/imax/1000*i, i, 0, imax];
c0211 = Table[17.9 - 0.899*Vmax/imax/1000*i, i, 0, imax];
c027 = Table[ 17.4 - 0.918*Vmax/imax/1000*i - 0.154*(Vmax/imax/1000*i)^2, i, 0,
imax];
c024 = Table[ 17.3 - 1.360*Vmax/imax/1000*i - 0.205*(Vmax/imax/1000*i)^2, i, 0,
imax];

cBl40 = 0.0045* c0240/100/SHb02[alpha02*c0240/100*760, alphaC02*40]/ 218;
(*Initialisierung*)

```

```
cB135 = 0.0045*c0235/100/SHb02[alpha02*c0235/100*760, alphaC02*40]/218;
cB125 = 0.0045*c0225/100/SHb02[alpha02*c0225/100*760, alphaC02*40]/218;
cB115 = 0.0045*c0215/100/SHb02[alpha02*c0215/100*760, alphaC02*40]/218;
cB111 = 0.0045*c0211/100/SHb02[alpha02*c0211/100*760, alphaC02*40]/218;
cB17 = 0.0045*c027/100/SHb02[alpha02*c027/100*760, alphaC02*40]/218;
cB14 = 0.0045*c024/100/SHb02[alpha02*c024/100*760, alphaC02*40]/218;

Steps = imax - imin;
Time = N[Vmax/Flowin /Steps] ; (*Sekunden*)
DLtotal = 300; (*Lungendiffusionskapazität, ml pro Sekunde*)
DA = 0.1; (*Diffusionskapazität zwischen den Alveolen*)
DAA = 0.1;
For[i = 1, i <= Steps, i++,
  For[j = 2, j <= imax + 1, j++,
    h[[j]] = c[[j]] +
    If[j <= imax, DA*(c[[j - 1]] + c[[j + 1]] - 2*c[[j]]), 0] +
    If[j >= imax - i, DLtotal/(i + 1000)/Flowin*(cBlin - c[[j]]), 0];
    c = h]
  ];
inh = c>(*+0.3*10^-6*);

c = inh;
Flowout = 40000/60;
For[i = 1, i <= Steps, i++,
  For[j = 2, j <= imax + 1, j++,
    h[[j]] = c[[j]] +
    If[j <= imax, DA*(c[[j - 1]] + c[[j + 1]] - 2*c[[j]]), 0] +
    If[j >= imax - i, DLtotal/(i + 1000)/Flowout*(cB140[[j]] - c[[j]]), 0];
    c = h]
  ];
ListPlot[c, PlotRange -> 0, 3*10^-6];
c40 = c + 3*10^-7;
```

Nach der Berechnung der Exspirogramme werden diese in ASCII-Dateien abgespeichert.



## B.2. Fitprogramm für $^{14}\text{NO}/^{15}\text{NO}$ -Nachweis

### Benutzereingaben

Arbeitsverzeichnis bezeichnet das Verzeichnis, in dem sich die Hitran- und Rohdaten befinden und das Ergebnis gespeichert werden soll. HitranDatei14NO beinhaltet die HITRAN-Daten, wobei mit Frequenz die Mikrowellenfrequenz gemeint ist. Datendatei enthält die Rohdaten, Untergrunddatei eine Absorptionsmessung der leeren Zelle. Das Ergebnis wird in der Datei Auswertungsdatei abgespeichert. Die nach Frequenzen sortierten Rohdaten werden in der Datei SortierteRohdaten abgelegt.

```
Arbeitsverzeichnis = "D:/Documents/Fitprogramm/Online NO 9P9//";
HitranDatei14NO = "14 NO 1 ppm 40 mbar.dat";
HitranDatei15NO = "15 NO 1 ppb 40 mbar.dat";
Datendatei = "050121_Küvette_06.dat";
Untergrunddatei = "050121_Untergrund_01.dat";
Auswertungsdatei = "050121_Auswertung_06.dat";
SortierteRohdaten = "050121_RohSort_06.dat";
```

```
Zentralfrequenz = 1874.45165;
Seitenband = +1;
```

Die Zentralfrequenz des Laserübergangs und die Angabe des Seitenbandes (+1 für das obere, -1 für das untere Seitenband) wird benötigt, um die Mikrowellenfrequenzen in Wellenzahlen umzurechnen.

### Initialisierung

```
SetDirectory[Arbeitsverzeichnis];
<< Statistics`DataManipulation`
<< Statistics`DescriptiveStatistics`
<< Statistics`LinearRegression`
Hitran14NO = Import[HitranDatei14NO, ConversionOptions -> {"NumberPoint" -> ","}];
Hitran15NO = Import[HitranDatei15NO, ConversionOptions -> {"NumberPoint" -> ","}];
Inter14NO[f_] = Interpolation[Hitran14NO][f];
Inter15NO[f_] = Interpolation[Hitran15NO][f];
```

Hier wird das Arbeitsverzeichnis gesetzt, und Mathematica-Programmpakete zur Bearbeitung von Arrays, zur Statistik und zur linearen Regression geladen. Die HITRAN-Daten werden importiert und interpoliert.

## Rohdaten einlesen und bearbeiten

### Benutzereingaben

```
DatenStart = 13;
DatenStop = 0;
Zeitschritt = 0.5;
Totzeit = 10;
```

Der Import der Daten beginnt mit der Zeile `DatenStart` und endet `DatenStop` vor dem Ende der Datei. `Zeitschritt` gibt das Intervall an, in dem Datenpunkte aus den Rohdaten erzeugt werden sollen, `Totzeit` gibt an, von welchem Messzeitpunkt an das Programm mit der Auswertung beginnen soll. Dieser Wert muss so groß gewählt sein, dass auf jeder Frequenz vorher einmal die Absorption bestimmt wurde, da sonst keine Interpolation möglich ist.

### Bearbeitung der Untergrunddatei

```
Untergrund =
  Import[Untergrunddatei, ConversionOptions -> {"NumberPoint" -> ","}];
Untergrund = Take[Untergrund, { DatenStart, Length[Untergrund] - DatenStop } ];
UFrequenzen = Column[Untergrund, 2];
UFrequenztabelle = Union[UFrequenzen];
UAbsorption = Column[Untergrund, 7];

Mittel = Table[0, { i, 1, Length[UFrequenztabelle] } ];
Fehler = Mittel;
For[i = 1, i <= Length[UFrequenztabelle], i++,
  UAbs = { } ;
  For [j = 1, j <= Length[UFrequenzen], j++,
    If[UFrequenzen[[j]] == UFrequenztabelle[[i]],
      UAbs = Append[UAbs, UAbsorption[[j]]]]
  ];
  Mittel[[i]] = Mean[UAbs];
  Fehler[[i]] = Variance[UAbs]/Sqrt[Length[UAbs]]
];
```

Die Untergrunddatei wird importiert und die Frequenzen, auf denen gemessen wurde, ausgelesen und in `UFrequenztabelle` abgelegt. Über alle Messwerte bei einer Frequenz wird gemittelt und die Standardabweichung gebildet. Diese Werte werden im Array `Mittel`



bzw. Fehler abgelegt.

## Bearbeitung der Rohdaten

```

Rohdaten = Import[Datendatei, ConversionOptions -> {"NumberPoint> ", ""}];
Rohdaten = Take[Rohdaten, {DatenStart, Length[Rohdaten] - DatenStop}];
Zeit = Column[Rohdaten, 1];
Frequenzen = Column[Rohdaten, 2];
Absorption = Column[Rohdaten, 7];
Absorptionstabelle = Table[{Zeit[[i]], Absorption[[i]]}, {i, 1, Length[Zeit]};
Datenkomplett = Table[{Zeit[[i]], Frequenzen[[i]], Absorption[[i]]}, {i, 1,
Length[Zeit]};
Frequenztab = Union[Frequenzen];
Datensatz = {{}, {}, {}, {}, {} };
For[i = 1, i <= Length[Frequenztab], i++,
  Hilfe = {};
  Datensatz[[i]] = {};
  For[j = 1, j < Length[Datenkomplett], j++,
    If[Datenkomplett[[j, 2]] == Frequenztab[[i]],
      Hilfe = Append[Hilfe, Absorptionstabelle[[j]]]];
  ];
  Dateninterpol[t_] = Interpolation[Hilfe, InterpolationOrder -> 1][t];
  Datensatz[[i]] = Table[{Totzeit + i*Zeitschritt,
    Dateninterpol[Totzeit + i*Zeitschritt]},
    {i, 1, (Datenkomplett[[-1, 1]] - 1.5 * Totzeit)/Zeitschritt}
  ];
];

```

Zunächst werden aus dem kompletten Datensatz jeweils ein Datensatz pro gemessener Frequenz erstellt. Jeder dieser Datensätze wird interpoliert. Aus diesen interpolierten Datensätzen werden Datensätze mit Punkten bei identischen Zeitpunkten erstellt, so dass für jeden dieser Zeitpunkte ein komplettes Spektrum vorhanden ist.

```

Wellenzahlen = Seitenband*Frequenztab/29979.2458 + Zentralfrequenz;
Spektrum =
  Table[{Frequenztab[[j]], Datensatz[[j, i, 2]] - Mittel[[j]]},
    {i, 1, Length[Datensatz[[1]]}], {j, 1, Length[Wellenzahlen]};

```

Hier werden die Mikrowellenfrequenzen in die Wellenzahlen des Laserlichtes umgerechnet.

### Fitparameter bestimmen

```
FitParas = Table[0, {i, 1, Length[Datensatz[[1]]]}, {j, 1, 3}];
For[i = 1, i <= Length[Datensatz[[1]]], i++,
  FitParas[[i]] =
    Column[(ParameterTable /.
      Regress[Spektrum[[i]], {1, Inter14NO[f], Inter15NO[f]}, f])[[1]], 1]
];
Ergebnis = Table[{Datensatz[[1, i, 1]], FitParas[[i, 1]], FitParas[[i, 2]],
  FitParas[[i, 3]]}, {i, 1, Length[Datensatz[[1]]]}];
```

Zum Fitten wird die Funktion `Regress` benutzt. Diese erhält als Parameter die Spektren zu jedem Zeitschritt in der `For`-Schleife und die interpolierten Daten aus der HITRAN-Datenbank.

### Auswertung speichern

```
Export[Auswertungsdatei, Ergebnis];
Hilfsdaten = {Flatten[{"Zeit", Frequenztab}]};
For[i = 1, i <= Length[Datensatz[[1]]], i++,
  Hilfsdaten = Append[Hilfsdaten,
    Flatten[Append[{Datensatz[[1, i, 1]],
      Table[Datensatz[[j, i, 2]], {j, 1, Length[Frequenztab]}]]]
  ]
];
Export[SortierteRohdaten, Hilfsdaten];
```

Die fertige Auswertung wird in den eingangs spezifizierten Dateien abgespeichert.

## B.3. Berechnung von FAMOS-Signalen

### Definition des Arbeitsverzeichnisses

```
SetDirectory["D:/Documents/FAMOS-Simulation//"];
TargetPath="Ergebnisse/Voigt 2008-06-27//";
```



```
<<Statistics'DataManipulation' (*Hier steckt die Funktion Column[] drin *)
```

## Definitionen von Konstanten

```
h = 6.626069*10^-34; (*Planck Konstante*)
c = 2.997924*10^8; (* Lichtgeschwindigkeit *)
k = 1.3806505*10^-23; (* Boltzmann Konstante *)
M14 = 30.01; (* Masse von 14 NO in u*)
M15 = 31.01; (* Masse von 15 NO in u*)
R = 8.314472; (* allg. Gaskonstante *)
NA = 6.0221415*10^23; (* Avogadro-Konstante *)
m14 = M14*1.66056*10^-27; (* Masse von 14NO in kg *)
m15 = M15*1.66056*10^-27; (* Masse von 15NO in kg *)
ωres = 2*[Pi]*c/(5.4*10^-6); (* Laserfrequenz *)
T0 = 296; (* Temperatur *)

(* Spalteninhalte in der NO-Datei *)
Zentralfrequenz = 2;
Energie = 3;
Intensität = 4;
Drehimpuls = 5;
Zweig = 6;
Omega = 7;
Linienbreite = 10;
SymUnten = 9;
SymOben = 8;

μ = 4.6686*10^-5;
Druck = 40; (* Druck in mbar *)
Masse = M15;
T = 350;
```

## Definition allgemeiner Funktionen

### 3J-Symbole

```
DreiJ[VRÜ_, J_, p_, m_] := Which[
  N0tabelle[[VRÜ]][[Zweig]]==-1, (J-p*m-1)*(J-p*m)/(2J*(2J-1)*(2J+1)),
  N0tabelle[[VRÜ]][[Zweig]]==0, 2*(J-p*m)*(J+p*m+1)/(2J*(2J+1)*(2J+2)),
  N0tabelle[[VRÜ]][[Zweig]]==1, (J+p*m+1)*(J+p*m+2)/(2*(J+1)*(2J+1)*(2J+3))];
```

### Zeeman-Aufspaltung

```
 $\Delta\nu[B_, g1_, g2_, m1_, m2_] := (g1*m1 - g2*m2)*\mu*B;$ 
```

## Definition der Linienformen

```
AbsorptionGauss[\nu_, \nu0_, \gammaDoppler_] :=
  2*Exp[-(\nu - \nu0)^2/(\gammaDoppler/(2*Log[2]^(1/2)))^2]*(Log[2]/Pi)^(1/2)/\gammaDoppler;
```

```
AbsorptionLorentz[\nu_, \nu0_, \gammaDruck_] :=
  \gammaDruck/(2*Pi*((\gammaDruck/2)^2 + (\nu - \nu0)^2));
```

```
AbsorptionVoigt[\nu_, \nu0_, \gammaDruck_, \gammaDoppler_] :=
  NIntegrate[AbsorptionLorentz[\nu - \tau, \nu0, \gammaDruck] *
  AbsorptionGauss[\tau, 0, \gammaDoppler], {\tau, -\infty, \infty}];
```

```
DispersionLorentz[\nu_, \nu0_, \gammaDruck_] :=
  ((\nu-\nu0)/(Pi*((\gammaDruck/2)^2 + (\nu-\nu0)^2)));
```

```
DispersionVoigt[\nu_, \nu0_, \Delta\nu_, \gammaDruck_, \gammaDoppler_] :=
  NIntegrate[DispersionLorentz[\nu-\Delta\nu-\tau, \nu0, \gammaDruck] *
  AbsorptionGauss[\tau, 0, \gammaDoppler, {tau, -1, 1}, MaxRecursion -> 20];
```

## Definition der wirklich wichtigen Funktionen

```
g1[index_] :=
  If[N0tabelle[[index]][[Drehimpuls]] + 0.5 + N0tabelle[[index]][[Zweig]] > 21,
  0, gtabelle[[N0tabelle[[index]][[Drehimpuls]] + 0.5 +
```



```

    NOtabelle[[index]][[Zweig]]][[NOtabelle[[index]][[Omega]] 2 + 1
    + NOtabelle[[index]][[SymOben]]]]
];

```

```

g2[index_] :=
  If[NOtabelle[[index]][[Drehimpuls]] + 0.5 > 21, 0,
    gtabelle[[If[NOtabelle[[index]][[Drehimpuls]] + 0.5 > 21, 21,
      NOtabelle[[index]][[Drehimpuls]] + 0.5]]]
    [[NOtabelle[[index]][[Omega]] 2 + 1 + NOtabelle[[index]][[SymUnten]]]]
];

```

```

mjmin[index_, Δmj_] :=
  Which[Δmj == 1, -NOtabelle[[index]][[Drehimpuls]], Δmj == -1,
    Which[NOtabelle[[index]][[Zweig]] == -1,
      -NOtabelle[[index]][[Drehimpuls]] + 2,
      NOtabelle[[index]][[Zweig]] == 0, -NOtabelle[[index]][[Drehimpuls]] + 1,
      NOtabelle[[index]][[Zweig]] == 1, -NOtabelle[[index]][[Drehimpuls]]];];

```

```

mjmax[index_, Δmj_] := Which[Δmj == -1, NOtabelle[[index]][[Drehimpuls]],
  Δmj == 1,
  Which[NOtabelle[[index]][[Zweig]] == -1, NOtabelle[[index]][[Drehimpuls]] - 2,
    NOtabelle[[index]][[Zweig]] == 0, NOtabelle[[index]][[Drehimpuls]] - 1,
    NOtabelle[[index]][[Zweig]] == 1, NOtabelle[[index]][[Drehimpuls]]];];

```

```

VoigtProfil[ν_, Δν_, index_] :=
  Displineindex[ν - NOtabelle[[index]][[Zentralfrequenz]] + Δν];
Linie[ν_, B_, index_, Δmj_] :=
  Sum[mjmax[index, Δmj]
    Δmj* NOtabelle[[index]][[Intensität]]*
    DreiJ[index, NOtabelle[[index]][[Drehimpuls]], Δmj, mj]*
    Exp[NOtabelle[[index]][[Energie]]*c*100*h*(T - T0)/(k*T*T0)]*
    VoigtProfil[ν, Δν[B, g1[index], g2[index], mj + Δmj, mj], index];

```

```

Signal[ν_, Schritte_, B0_] :=
  Sum[m = 1 Schritte Sum[n = Startindex Endindex
    (Linie[ν, B0 * Cos[2*Pi*m/Schritte], n, 1] +
    Linie[ν, B0 * Cos[2*Pi*m/Schritte], n, -1])*Cos[2*Pi*m/Schritte];

```

```

ko = 5;

```

```
Konzentration = ko*10^17;
Steps = 1;
(*IndexTab = Table[i, i, 3982, 4117, 5]*) (*Alle 15(?)NO - Linien*)
(*IndexTab = 808, 146, 1944, 1932, 1913, 914, 1480, 1511, 1685, 153, 939,
  1379;*) (*Für Vergleich mit Messungen*)
(*IndexTab = 118;*)
IndexTab =
  Sort[{11, 21, 36, 46, 66, 91, 146, 186, 231, 331, 271, 1546, 361, 541,
    476, 446, 576, 661, 691, 911, 816, 786, 986, 981, 976, 966, 956, 1001,
    996, 1201, 1191, 1181, 1176, 1161, 1156, 1131, 1121, 1106, 1091,
    1086, 1081, 1066, 1061, 1041, 1031, 1011, 1206, 1211, 1216, 1221,
    1231, 1511, 1481, 1456, 1426, 1401, 1376, 1361, 1351, 1321, 1296,
    1246, 1561, 1531, 2066, 2056, 2041, 2031, 2016, 2006, 1996, 1981,
    1971, 1956, 1946, 1936, 1921, 1911, 1896, 1886, 1876, 1861, 1851,
    1836, 1826, 1816, 1801, 1791, 1776, 1766, 1756, 1741, 1731, 1716,
    1706, 1696, 1681, 1671, 1656, 1646, 1636, 1621, 1611, 1606, 1596,
    1586}];
BTab = {150};
DruckTab = {75};

NO14tabelle = Take[NOtabellebasis, 2067]; (* Nur 14NO *)
(*NO14tabelle = Take[NOtabellebasis, -400]; *) (*Nur 15 NO*)

frequenzen = Column[NO14tabelle, 2];
For[j = 1,
  j <= Length[IndexTab], j++, aktindex = IndexTab[[j]];
  For[d = 1, d <= Length[DruckTab], d++,
    Druck = DruckTab[[d]];
    NOtabelle = Extract[NO14tabelle,
      Position[frequenzen,
        _?(NO14tabelle[[aktindex]][[Zentralfrequenz]] - .2 < # <
          NO14tabelle[[aktindex]][[Zentralfrequenz]] + .2 &)]
    ]
  ];
Print["NOtabelle erstellt für Index" <> ToString[aktindex]];
For[i = 1,
  i <= Length[NOtabelle], i++,
```



```

Displiniei = Interpolation[
  Table[{f,DispersionVoigt[f, 0, 0, 2*NOtabelle[[i]][[Linienbreite]]*Druck/1013,
    NOtabelle[[i]][[Zentralfrequenz]]/c*Sqrt[8*k*T*Log[2]/m14]]
    (*(1 - NOtabelle[[i]][[Intensität]])*Konzentration*
  AbsorptionVoigt[f, 0, 2*NOtabelle[[i]][[Linienbreite]]*Druck/1013,
    NOtabelle[[i]][[Zentralfrequenz]]/c*Sqrt[8*k*T*Log[2]/m14]]*)} ,
  {f, - .5, .5, 0.001}]];
Print[ToString[Length[NOtabelle]] <> "Dispersionslinien für Druck " <>
  ToString[Druck] <> " erstellt, beginne Berechnung der FAMOS-Linie"]
];

Startindex = 1;
Endindex = Length[NOtabelle];
For[b = 1, b <= Length[BTab], b++, B = BTab[[b]];
  Export[TargetPath <> "Index " <> ToString[aktindex] <> " Druck " <>
    ToString[Druck] <> " Magnetfeld " <> ToString[B] <> " Temperatur " <>
    ToString[T] <> ".dat", Table[{f, Signal[f, Steps, B]},
  {f,NO14tabelle[[aktindex]][[Zentralfrequenz]] - .2,
    NO14tabelle[[aktindex]][[Zentralfrequenz]] + .2, 0.0005}]];
Print["Speichere in Datei " <> TargetPath <> "Index " <>
  ToString[aktindex] <> " Druck " <> ToString[Druck] <>
  " Magnetfeld " <> ToString[B] <> " Temperatur " <> ToString[T] <>
  ".dat"]
];

```

In der ersten dieser drei For-Schleifen werden die NO-Übergänge aus der Tabelle ausgewählt. Für jeden dieser Übergänge wird in der zweiten For-Schleife das Linienprofil berechnet, das in der Funktion `Linie[]` benötigt wird. Die letzte For-Schleife berechnet schließlich mit Hilfe der Funktion `Signal[]` innerhalb des vorgegebenen Intervalls um die Zentralfrequenz die FAMOS-Signale und legt das Ergebnis in einer ASCII-Datei ab.

# Literaturverzeichnis

- [All97] D. W. ALLAN, N. ASHBY UND C. C. HODGE, The Science of Timekeeping, *Hewlett Packard Application Note* **1289**, 56–71 (1997).
- [Alv93] K. ALVING, E. WEITZBERG UND J. M. LUNDBERG, Increased amounts of nitric oxide in exhaled air of asthmatics, *Eur Respir J* **6**, 1368–1370 (1993).
- [Alv94] K. ALVING, J. O. N. LUNDBERG, J. M. LUNDBERG, S. L. NORDVALL, S. RAK UND E. WEITZBERG, Nitric oxide in exhaled air: influence of inflammatory airway disease and smoking, *Am J Respir Crit Care Med* **149**, 199 (1994).
- [Arn21] H. R. ARNOLD, E. B. CARRIER, H. P. SMITH UND G. H. WHIPPLE, Blood volume studies, *Am J Physiol* **56**, 313–327 (1921).
- [Bas04] G. v. BASUM, Infrarot Cavity Leak-Out Spektroskopie: Höchstempfindliche Echtzeit Spurengasanalytik, Dissertation, *Universität Düsseldorf*, <http://diss.ub.uni-duesseldorf.de/ebib/diss/show?dissid=899> (2004).
- [Bec02] M. BECK, D. HOFSTETTER, T. AELLEN, J. FAIST, U. OESTERLE, M. ILEGEMS, E. GINI UND H. MELCHIOR, Continuous wave operation of a mid-infrared semiconductor laser at room temperature, *Science* **295**, 301 (2002).
- [Bie01] W. A. BIERNACKI, S. A. KHARITONOV UND P. J. BARNES, Exhaled carbon monoxide in patients with lower respiratory tract infection, *Respir. Med.* **95**, 1003–1005 (2001).
- [Bre03] C. BREHMER UND P. X. ITEN, Rapid determination of carboxyhemoglobin in blood by Oximeter, *Forensic Science International* **133**, 179–181 (2003).
- [Bur95] C. M. BURGE UND S. L. SKINNER, Determination of hemoglobin mass and blood volume with CO: evaluation and application of a method, *J. Appl. Physiol* **79**, 623–631 (1995).
- [Buu98] J. BUUS UND M. AMANN, *Tunable laser diodes*, Artech House, London (1998).
- [Che01] D. W. CHEN UND K. MASTERS, Continuous-wave 4.3  $\mu\text{m}$  intracavity difference frequency generation in an optical parametric oscillator, *Optics Letters* **26**, 25–27 (2001).
- [Cob65] R. F. COBURN, R. E. FORSTER UND P. B. KANE, Considerations of Physiological Variables That Determine Blood Carboxyhemoglobin Concentration in Man, *Journal of Clinical Investigation* **44**, 1899 (1965).
- [Dah02] H. DAHNKE, Hochempfindlicher Spurengasnachweis in der Atmosphäre und im menschlichen Atem mittels Infrarot-Cavity-Ring-Down-Spektroskopie, Dissertation, *Universität Düsseldorf*, <http://docserv.uni-duesseldorf.de/servlets/DocumentServlet?id=2187> (2002).



- [Das04] R. K. DASH UND J. B. BASSINGTHWAIGHTE, Blood HbO<sub>2</sub> and HbCO<sub>2</sub> Dissociation Curves at Varied O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, pH, 2,3-DPG and Temperature Levels, *Annals of Biomedical Engineering* **32**, 1676 (2004).
- [Day08] DAYLIGHT SOLUTIONS, Spezifikationen „Tunable mid-IR external-cavity CW-PLS LASERS“ (2008), <http://www.daylightsolutions.net/docs/dls-specsheet-CW-PLS.pdf>.
- [Dem00] W. DEMTRÖDER, Laserspektroskopie: Grundlagen und Techniken, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York 21ff (2000).
- [Dou12] C. G. DOUGLAS, J. S. HALDANE UND J. B. S. HALDANE, The laws of combination of haemoglobin with carbon monoxide and oxygen, *J Physiol* **44**, 275–304 (1912).
- [Eij07] H. M. v. EIJK, Y. C. LUIKING UND N. E. DEUTZ, Methods using stable isotopes to measure nitric oxide (NO) synthesis in the L-arginine/NO pathway in health and disease, *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **851**, 172–185 (2007).
- [Fri07] T. FRITSCH, P. HERING UND M. MÜRTZ, Infrared laser spectroscopy for online recording of exhaled carbon monoxide - a progress report, *Journal of Breath Research* **1**, (2007).
- [Fri08a] T. FRITSCH, P. BROUZOS, K. HEINRICH, M. KELM, T. RASSAF, P. HERING UND M. MÜRTZ, NO detection in biological samples: Differentiation of <sup>14</sup>NO and <sup>15</sup>NO using infrared laser spectroscopy, *Nitric Oxide* **19**, 50–56 (2008).
- [Fri08b] T. FRITSCH, M. HORSTJANN, D. HALMER, SABANA, P. HERING UND M. MÜRTZ, Magnetic Faraday modulation spectroscopy of the 1-0 band of <sup>14</sup>NO and <sup>15</sup>NO, *Appl. Phys. B*, im Druck (2008).
- [Fri08c] T. FRITSCH, M. VAN HERPEN, G. VON BASUM, P. HERING UND M. MÜRTZ, Is exhaled carbon monoxide level associated with blood glucose level? A comparison of two breath analyzing methods, *Journal of Biomedical Optics* **13**, (2008).
- [Gan03] H. GANSER, Einsatz eines Quantenkaskadenlasers zum hochempfindlichen Spurengasnachweis mittels IR-Laserspektroskopie, Doktorarbeit, *Heinrich Heine Universität Düsseldorf* (2003).
- [Gan04] H. GANSER, M. HORSTJANN, C. V. SUSCHEK, P. HERING UND M. MÜRTZ, Online Monitoring of biogenic nitric oxide with a QC laser-based Faraday modulation technique, *Appl. Phys. B* **78**, 513–517 (2004).
- [Gla02] M. T. GLADWIN, X. WANG, C. D. REITER, B. K. YANG, E. X. VIVAS, C. BONAVENTURA UND A. N. SCHECHTER, S-nitrosohemoglobin is unstable in the reductive erythrocyte environment and lacks O<sub>2</sub>/NO-linked allosteric function, *J. Biol. Chem.* **277**, 27,818–27,828 (2002).
- [Goe90] D. E. GOERINGER, W. B. WHITTEN UND J. M. RAMSEY, Resonance-Enhanced Multiphoton Ionization spectroscopy in an ion trap detector, *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes* **106**, 175–189 (1990).
- [Gor04] V. GORELOV, Theoretical value of Hüfner’s constant, *Anaesthesia* **59**, 97–98 (2004).
- [Hai03] S. HAIDAR, E. NIWA, K. MASUMOTO UND H. ITO, Temperature tuning of 5-12 μm by difference frequency mixing of OPO outputs in a AgGaS<sub>2</sub> crystal, *J. Phys. D: Appl. Phys.* **36**, 1071–1074 (2003).

- [Hak96] H. HAKEN UND H. C. WOLF, Atom- und Quantenphysik, Springer Verlag, Berlin 212ff (1996).
- [Hal97] J. HALDANE UND J. L. SMITH, The absorption of oxygen by the lungs, *J. Physiol.* **22**, 231 (1897).
- [Hal05] D. HALMER, G. VON BASUM, M. HORSTJANN, P. HERING UND M. MÜRTZ, Time resolved simultaneous detection of  $^{14}\text{NO}$  and  $^{15}\text{NO}$  via mid-infrared cavity leak-out spectroscopy, *Isotopes in Environmental and Health Studies* **41**, 303 (2005).
- [Hei07] K. HEINRICH. *Aufbau und Charakterisierung einer temperaturstabilen Cavity-Leak-Out Spektroskopiezelle*. Diplomarbeit, Heinrich Heine Universität Düsseldorf (2007).
- [Hel07] S. M. HELMKE UND DUNCAN, Measurement of the NO metabolites, nitrite and nitrate, in human biological fluids by GC-MS, *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **851**, 83–92 (2007).
- [Her80] W. HERRMANN, W. ROHRBECK UND W. URBAN, Line-Shape Analysis for Zeeman Modulation Spectroscopy, *Applied Physics* **22**, 71 (1980).
- [Her02] M. HERSCHEL, T. KARRISON, M. WEN, L. CALDARELLI UND B. BARON, Isoimmunization Is Unlikely to Be the Cause of Hemolysis in ABO-Incompatible but Direct Antiglobulin Test-Negative Neonates **110**, 127–130 (2002).
- [Hor98a] I. HORVATH, L. E. DONNELLY, A. KISS, P. PAREDI, S. A. KHARITONOV UND P. J. BARNES, Raised levels of exhaled carbon monoxide are associated with an increased expression of heme oxygenase-1 in airway macrophages in asthma: a new marker of oxidative stress, *Thorax* **53**, 668–672 (1998).
- [Hor98b] I. HORVATH, S. LOUKIDES, T. WODEHOUSE, S. A. KHARITONOV, P. J. COLE UND P. J. BARNES, Elevated levels of exhaled carbon monoxide in bronchiectasis: a new marker for oxidative stress, *Thorax* **53**, 867–870 (1998).
- [Hor05] M. HORSTJANN, Spektrale Eigenschaften des Quantenkaskadenlasers und seine Eignung für die hochauflösende Molekülspektroskopie, Doktorarbeit, *Heinrich Heine Universität Düsseldorf* (2005).
- [Hüt00] M. HÜTLER, R. BENEKE UND D. BÖNING, Determination of circulating haemoglobin mass and related quantities by using capillary blood, *Med Sci Sports Exerc* **32**, 1024–1027 (2000).
- [Hua06] K. T. HUANG, I. AZAROV, S. BASU, J. HUANG UND D. B. KUM-SHAPIRO, Lack of allosterically controlled intramolecular transfer of nitric oxide from the heme to cysteine in the beta subunit of hemoglobin, *Blood* **107**, 2602,2604 (2006).
- [Hun04] C. J. HUNTER, A. DEJAM, A. B. BLOOD, H. SHIELDS, D. B. KIM-SHAPIRO, R. F. MACHADO, S. TAREKEGN, N. MULLA, A. O. HOPPER, A. N. SCHECHTER, G. G. POWER UND M. T. GLADWIN, Inhaled nebulized nitrite is a hypoxia-sensitive NO-dependent selective pulmonary vasodilator, *Nat. Med.* **10**, 1122–1127 (2004).
- [Iff72] R. IFFLAND UND G. STICHT, Gaschromatographisches Verfahren zur Bestimmung des Kohlenmonoxidgehaltes im Blut, *Arch. Toxikol.* **29**, 325–330 (1972).



- [Jel07] W. JELKMANN, Novel erythropoietic agents: a threat to sportsmanship, *Medicina Sportiva* **11**, 32–42 (2007).
- [Kay99] T. KAYSER. *Aufbau eines Cavity-Leak-Out-Spektrometers im Wellenlängenbereich um 3  $\mu\text{m}$* . Diplomarbeit, Universität Bonn (1999).
- [Kha95] S. A. KHARITONOV, D. YATES UND P. J. BARNES, Increased nitric oxide in exhaled air of normal human subjects with upper respiratory tract infections, *Eur Respir J* **8**, 295–297 (1995).
- [Kha01] S. A. KHARITONOV UND P. J. BARNES, Exhaled markers of pulmonary disease, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* **163**, 1693–1722 (2001).
- [Kle03] P. KLEINBONGARD, A. DEJAM, T. LAUER, T. RASSAF, A. SCHINDLER, O. PICKER, T. SCHEEREN, A. GÖDEKE, J. SCHRADER, R. SCHULZ, G. HEUSCH, G. A. SCHAUB, N. S. BRYAN, M. FEELISH UND M. KELM, Plasma nitrite reflects constitutive nitric oxide synthase activity in mammals, *Free Radic. Biol. Med.* **35**, 790–796 (2003).
- [Kos08] A. KOSTEREV, G. WYSOCKI, Y. BAKHIRKIN, S. SO, E. LEWICKI, M. FRASER, F. TITTEL UND R. F. CURL, Application of quantum cascade lasers to trace gas analysis, *Appl. Phys. B* **90**, 165–176 (2008).
- [Lee94] P. S. LEE, R. M. SCHRECK, B. A. HARE UND J. J. MCGRATH, Biomedical applications of tunable diode laser spectrometry: correlation between breath carbon monoxide and low level blood carboxyhemoglobin saturation, *Ann. Biomed Eng* **22**, 120–125 (1994).
- [Lun96a] J. O. N. LUNDBERG, S. L. NORDVALL, E. WEITZBERG, H. KOLLBERG UND K. ALVING, Exhaled NO in pediatric asthma and cystic fibrosis, *Arch Dis Childhood* **75**, 323–326 (1996).
- [Lun96b] J. O. N. LUNDBERG, E. WEITZBERG, J. M. LUNDBERG UND K. ALVING, Nitric Oxide in exhaled air, *Eur Respir J* **9**, 2671–2680 (1996).
- [Lun05] J. O. LUNDBERG UND E. WEITZBERG, NO Generation From Nitrite and Its Role in Vascular Control, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **25**, 915–922 (2005).
- [McC07] M. R. MCCURDY, Y. A. BAKHIRINN, G. WYSOCKI UND F. K. TITTEL, Performance of an exhaled nitric oxide and carbon dioxide sensor using quantum cascade laser-based integrated cavity output spectroscopy, *J Biomed Optics* **12**, (2007).
- [McM06] J. B. MCMANUS, D. D. NELSON, S. C. HERNDON, J. H. SHORTER, M. S. ZAHNISER, S. BLASER, L. HVOZDARA, A. MULLER, M. GIOVANNINI UND J. FAIST, Comparison of cw and pulsed operation with a TE-cooled quantum cascade infrared laser for detection of nitric oxide at 1900  $\text{cm}^{-1}$ , *Appl. Phys. B* **85**, 235–241 (2006).
- [Moe06] B. W. M. MOESKOPS, H. NAUS, S. M. CRISTESCU UND F. J. M. HARREN, Quantum cascade laser-based carbon monoxide detection on a second time scale from human breath, *Applied Physics B-Lasers and Optics* **82**, 649–654 (2006).
- [Mon99] M. MONMA, M. YAMAYA, K. SEKIZAWA, K. IKEDA, N. SUZUKI, T. KIKUCHI, T. TAKASAKA UND H. SASAKI, Increased carbon monoxide in exhaled air of patients with seasonal allergic rhinitis, *Clin Exp Allergy* **29**, 1537–1541 (1999).

- [Mor01] Y. MORIMOTO, W. DURANTE, D. G. LANCASTER, J. KLATTENHOFF UND F. K. TITTEL, Real-time measurements of endogenous CO production from vascular cells using an ultrasensitive laser sensor, *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* **280**, H483–H488 (2001).
- [Mor05] D. MORSE UND A. M. K. CHOI, Heme oxygenase-1 - From bench to bedside, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* **172**, 660–670 (2005).
- [Mue02] M. MUERTZ, *Höchstempfindliche Laseranalytik von Spurengasen im menschlichen Atem und in atmosphärischer Luft*, Shaker, Aachen (2002).
- [Mur05] L. A. J. MUR, I. E. SANTOSA, L. J. J. LAARHOVEN, N. J. HOLTON, F. J. M. HARRÉN UND A. R. SMITH, Laser Photoacoustic Detection Allows in Planta Detection of Nitric Oxide in Tobacco following Challenge with Avirulent and Virulent *Pseudomonas syringae* Pathovars, *Plant Physiology* **138**, 1247–1258 (2005).
- [Nel02] D. D. NELSON, J. H. SHORTER, J. B. MCMANUS UND M. S. ZAHNISER, Sub-part-per-billion detection of nitric oxide in air using a thermoelectrically cooled mid-infrared quantum cascade laser spectrometer, *Appl. Phys. B* **2002**, 343–350 (2002).
- [Par99a] P. PAREDI, W. BIERNACKI, G. INVERNIZZI, S. A. KHARITONOV UND P. J. BARNES, Exhaled carbon monoxide levels elevated in diabetes and correlated with glucose concentration in blood: a new test for monitoring the disease?, *Chest* **116**, 1007–1011 (1999).
- [Par99b] P. PAREDI, P. L. SHAH UND P. E. A. MONTUSCHI, Increased carbon monoxide in exhaled air of patients with cystic fibrosis, *Thorax* **54**, 917–920 (1999).
- [Rei05] C. REINERS, Untersuchung der Nachweisgrenze eines IR-Laserspektrometers für die höchstempfindliche NO-Analytik, Staatsexamensarbeit, *Heinrich Heine Universität Düsseldorf* (2005).
- [Rot05] L. S. ROTHMAN, D. JACQUEMART, A. BARBE, D. C. BENNER, M. BIRK, L. R. BROWN, M. R. CARLEER, C. CHACKERIAN, K. CHANCE, L. H. COUDERT, V. DANA, V. M. DEVI, J. M. FLAUD, R. R. GAMACHE, A. GOLDMAN, J. M. HARTMANN, K. W. JUCKS, J. Y. MANDIN, S. T. MASSIE, A. PERRIN, C. P. RINSLAND, M. A. H. SMITH, R. TOLCHENOV, J. TENNYSON, R. A. TOTH, J. VANDER AUWERA, P. VARANASI UND G. WAGNER, The HITRAN molecular spectroscopic database, *Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer* **96**, 139 (2005).
- [Rub94] H. RUBBO, R. RADI, M. TRUJILLO, R. TELLERI, B. KALYANARAMAN, S. BARNES, R. KIRK UND B. A. FREEMAN, Nitric oxide regulation of superoxide and peroxynitrite dependent lipid peroxidation. Formation of novel nitrogen-containing oxidized lipid derivatives, *J. Biol. Chem.* **269**, 26,066–26,075 (1994).
- [Ryt04] S. W. RYTER UND L. E. OTTERBEIN, Carbon monoxide in biology and medicine, *Bioessays* **26**, 270–280 (2004).
- [Sch05] W. SCHMIDT UND N. PROMMER, The optimised CO-rebreathing method: a new tool to determine total haemoglobin mass routinely, *Eur J Appl Physiol* **95**, 486–495 (2005).
- [Sch06] P. SCHOBER, A. KOCH, Z. K. UND S. A. LOER, Kohlenmonoxid: toxisches Molekül mit antiinflammatorischen und zytoprotektiven Eigenschaften, *Anästhesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther* **41**, 1–10 (2006).



- [Sow08] M. SOWA. *Laserspektroskopische Messung von Kohlenmonoxid in menschlicher Atemluft*. Diplomarbeit, Heinrich Heine Universität Düsseldorf (2008).
- [Sus03] C. V. SUSCHEK, P. SCHROEDER, O. AUST, H. SIES, C. MAHOTKA, M. HORSTJANN, H. GANSER, M. MÜRTZ, P. HERING, O. SCHNORR, K.-D. KRÖNCKE UND V. KOLB-BACHOFEN, The presence of nitrite during UVA irradiation protects from apoptosis, *FASEB J.* **17**, 2342–2344 (2003).
- [Sus06] C. V. SUSCHEK, T. SCHEWE, H. SIES UND K.-D. KRÖNCKE, Nitrite, a naturally occurring precursor of nitric oxide that acts like a 'prodrug', *Biol. Chem.* **387**, 499–506 (2006).
- [Tam07] M. TAMMINGA. *Echtzeitmessung von Ethan im menschlichen Atem*. Diplomarbeit, Heinrich Heine Universität Düsseldorf (2007).
- [Tar01] M. M. TARPEY UND F. I., Methods of detection of vascular reactive species nitric oxide, superoxide, hydrogen peroxide, and peroxyxynitrite, *Circ. Res.* **89**, 224–236 (2001).
- [Tig08] TIGER OPTICS, <http://www.tigeroptics.com/app/tigeroptics/> (2008).
- [Tod02] M. TODD, R. PROVENCAL, T. OWANO, B. PALDUS, A. KACHANOV, K. VODOPYANOV, M. HUNTER, S. COY, J. STEINFELD UND J. ARNOLD, Application of mid-infrared cavity-ringdown spectroscopy to trace explosives vapor detection using a broadly tunable (6–8  $\mu\text{m}$ ) optical parametric oscillator, *Appl. Phys. B* **75**, 367–376 (2002).
- [Tsi94] D. TSIKAS, R. H. BOEGER, B.-B. S.M., F. M. GUTZKI UND J. C. FRÖHLICH, Quantification of nitrite and nitrate in human urine and plasma as pentafluorobenzyl derivatives by gas chromatography-mass spectrometry using their  $^{15}\text{N}$ -labeled analogs, *J. Chromatogr. B Biomed. Appl.* **661**, 185–191 (1994).
- [Tso00] N. M. TSOUKIAS, A. F. WILSON UND S. C. GEORGE, Effect of alveolar volume and sequential filling on the diffusing capacity of the lungs: I. theory, *Respir. Physiol* **120**, 231–249 (2000).
- [Uts06] H. UTSUMI, K. YAMADA, K. ICHIKAWA, K. SAKAI, Y. KINOSHITA, S. MATSUMOTO UND M. NAGAI, Simultaneous molecular imaging of redox reactions monitored by Overhauser-enhanced MRI with  $^{14}\text{N}$ - and  $^{15}\text{N}$ -labeled nitroxyl radicals, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 1463–1468 (2006).
- [Vas08] S. VASILYEV UND MITARBEITER, Tunable mid-IR CW narrowband laser source for molecular spectroscopy, Tagungsband der DPG Frühjahrstagung, S. 288 (2008).
- [Vod99] K. L. VODOPYANOV, J. P. MAFFETONE, I. ZWIEBACK UND W. RUDERMAN, AgGaS<sub>2</sub> optical parametric oscillator continuously tunable from 3.9 to 11.3  $\mu\text{m}$ , *Applied Physics Letters* **75**, 1204–1206 (1999).
- [Wev99] R. WEVER, P. BOER, M. HIJMERING, E. STROES, M. VERHAAR, J. KASTELEIN, K. VERSLUIS, H. v. RIJN, H. KOOMANS UND T. RABELINK, Nitric oxide production is reduced in patients with chronic renal failure, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **19**, 1168–1172 (1999).
- [Wid02] B. WIDDOP, Analysis of carbon monoxide, *Annals of Clinical Biochemistry* **39**, 378–391 (2002).

- [Wu05] L. WU UND R. WANG, Carbon Monoxide: Endogenous Production, Physiological Functions, and Pharmacological Applications, *Pharmacol Rev* **57**, 585–630 (2005).
- [Wys05a] G. WYSOCKI, R. F. CURL, F. TITTEL, R. MAULINI, J. M. BULLIARD UND J. FAIST, Widely tunable mode-hop free external cavity quantum cascade laser for high resolution spectroscopic applications, *Appl. Phys. B* **81**, 769–777 (2005).
- [Wys05b] G. WYSOCKI, A. A. KOSTEREV UND F. K. TITTEL, Spectroscopic trace-gas sensor with rapidly scanned wavelengths of a pulsed quantum cascade laser for in situ NO monitoring of industrial exhaust systems, *Appl. Phys. B* **80**, 617–625 (2005).
- [Yi06] J. YI, K. NAMJOU, Z. N. ZAHRAN, P. J. MCCANN UND G. B. RICHTER-ADDO, Specific detection of gaseous NO and  $^{15}\text{NO}$  in the headspace from liquid-phase reactions involving NO-generating organic, inorganic and biochemical samples using a mid-infrared laser, *Nitric Oxide* **15**, 154–162 (2006).
- [Zay97] K. ZAYATSU, K. SEKIZAWA, S. OKINAGA, M. YAMAYA UND H. SASAKI, Increased carbon monoxide in exhaled air of asthmatic patients, *Am J Respir Crit Care Med* **156**, 1140–1143 (1997).
- [Zet02] W. ZETTERQUIST, H. MARTEUS UND M. E. A. JOHANNESSON, Exhaled carbon monoxide is not elevated in patients with asthma or cystic fibrosis, *European Respiratory Journal* **20**, 92–99 (2002).
- [Zon07] J. ZONDY, F. BIELSA, A. DOUILLET, L. HILICO, O. ACEF, V. PETROV, A. YELISSEYEV, L. ISAENKO UND P. KRINITSIN, Frequency doubling of  $\text{CO}_2$  laser radiation at  $10.6\ \mu\text{m}$  in the highly nonlinear chalcopyrite  $\text{LiGaTe}_2$ , *Optics Letters* **32**, 1722–1724 (2007).
- [Zur08] B. ZUR, A. HORNUNG, J. BREUER, U. DOLL, C. BERNHARDT, M. LUDWIG UND B. STOFFEL-WAGNER, A Novel Hemoglobin, Bonn, Causes Falsely Decreased Oxygen Saturation Measurements in Pulse Oximetry, *Clinical Chemistry* **54**, 594 (2008).



# Danksagung

Ich möchte diese Dissertation abschließen, indem ich all denen danke, die zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben. Sie erfolgte im Rahmen eines Drittmittel-Projektes, das von der Deutschen Forschungs-Gemeinschaft gefördert wurde und für deren finanzielle Unterstützung ich mich bedanken möchte.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Peter Hering für die Möglichkeit, die Arbeit am Insitut für Lasermedizin anzufertigen und Prof. Karl Kleinermanns, der sich als Zweitgutachter der Arbeit zur Verfügung gestellt hat.

Prof. Manfred Mürtz möchte ich für die freundschaftliche Betreuung der Arbeit und zahlreiche wertvolle Diskussionen danken.

Meinen Kollegen Sven Thelen, Sabana und Jón Mattis Hoffmann danke ich für anregende Diskussionen und viele angenehme Stunden im Büro, Labor oder auf den verschiedenen Tagungen. Besonders bedanken möchte ich mich bei Kathrin Heinrich und Marcus Sowa für die freundschaftliche Zusammenarbeit am CALO-Spektrometer und für die Zeit, die sie beim Klettern, Schwimmen oder Laufen mit mir verbracht haben. Allen Kollegen möchte ich für die Bereitschaft danken, sich für die zahlreichen Experimente als Probanden zur Verfügung zu stellen.

Benedikt Scherger danke ich für die kritische Auseinandersetzung mit meiner Arbeit und viele hilfreiche Anregungen.

Dr. Petra Kleinbongard und Paris Brouzos aus der CardioBiotechGruppe (CBG) der Universitätsklinik Aachen sowie Dr. Christoph V. Suschek und Christian Opländer aus der Klinik für Plastische Chirurgie, Hand- und Verbrennungschirurgie der Universitätsklinik Aachen danke ich für die angenehmen und erfolgreichen Kooperationen und für die Möglichkeit, den ein oder anderen Blick über den Tellerrand der Physik werfen zu können.

Mein Dank gilt auch den Kollegen aus den Werkstätten und der Glasbläserei für die Versorgung mit guter „Hardware“ für die Experimente.

Neben den Menschen, die mein Leben im Labor oder Büro erleichtert und bereichert haben, gibt es noch viele, die im privaten Bereich zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben. Bei all meinen Freunden möchte ich mich für die unterschiedlichste Unterstützung bedanken. Sei es, dass sie mich auf andere Gedanken brachten, so dass ich später aus einem neuen Blickwinkel an die Arbeit herangehen konnte, sei es durch aufmunternde



Worte, dadurch, dass sie mir Arbeit in verschiedenen Bereichen abnahmen oder dadurch, dass sie Verständnis aufbrachten, wenn ich mal ein Wochenende durchgearbeitet habe.

Besondere Unterstützung habe ich durch meine Eltern in allen Phasen meines Studiums erfahren, wofür ich mich von Herzen bedanken möchte.

# Erklärung

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Dissertation eigenhändig und ohne unerlaubte Hilfen angefertigt und diese in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch keiner anderen Institution eingereicht zu haben.

Düsseldorf, den 11. September 2008

Thomas Fritsch

