



HEINRICH HEINE
UNIVERSITÄT DÜSSELDORF

Isotopologenselektiver Nachweis von Spurengasen im mittleren Infrarot mittels Cavity-Leak-Out-Spektroskopie

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

Marcus Sowa

aus Leverkusen

Düsseldorf

im Oktober 2011

Aus dem Institut für Lasermedizin
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

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

Tag der mündlichen Prüfung: 28.11.2011

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

Kurzfassung

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der isotopologenselektiven und höchstsensitiven Kohlenmonoxidanalyse der menschlichen Atemluft mittels der Cavity-Leak-Out-Spektroskopie (CALOS).

Hierfür wurden Optimierungsarbeiten am Spektrometer durchgeführt. Durch eine Erhöhung der Laserleistung konnte die zur ^{13}CO -Analyse verwendete Absorptionslinie gewechselt werden, so dass bei gleichbleibendem minimalen Detektionslimit der Dynamikbereich des Systems vervierfacht werden konnte. Eine weitere Vervierfachung des Dynamikbereichs durch eine, auf hohe Flüsse optimierte Druckregelung der Nachweiszelle, bietet vielfältige Einsatzmöglichkeiten für Messungen verhältnismäßig hoher Konzentrationen.

Die Entwicklung einer neuen, auf kompakten Peltier-Elementen basierenden Temperaturstabilisierung der Nachweiszelle, ermöglicht eine Temperaturstabilität von $0,01^\circ\text{C}$ über einen Zeitraum von mehr als 5,5 Tagen. Durch diese neue Temperaturstabilisierung ließ sich auch die Langzeitstabilität des Spektrometers um nochmals ca. 30 % verbessern.

Die Fähigkeit des Spektrometers, isotopologenselektive Messungen durchzuführen, wurde für die Weiterentwicklung einer nicht-invasiven Methode zur Bestimmung der Hämoglobingesamtmasse genutzt. Durch die Verwendung des seltenen ^{13}CO -Isotopologs wurde die zur Messung notwendige Menge des einzuatmenden CO im Vergleich zu anderen Forschungsarbeiten auf 1/100 reduziert. Das hier verabreichte ^{13}CO -Volumen von 1 ml pro Messung ist für Menschen absolut ungefährlich. Die neue Methode wurde hinsichtlich der Reproduzierbarkeit der Daten und in Bezug auf die Detektierbarkeit von induzierten Schwankungen der Hämoglobingesamtmasse positiv evaluiert. Die hier durch eine normale Blutspende hervorgerufene Änderung der Hämoglobingesamtmasse, entspricht der Variation wie sie bei ausdauerleistungssteigerndem Blutdoping zu erwarten ist. Ein Eigenblutdopingnachweis wäre mit dieser nicht-invasiven Methode somit möglich.

Des Weiteren wurde eine Evaluierung der Eignung von CO als Markermolekül durchgeführt. Die hohe Sensitivität und Kalibrationsfreiheit der Cavity-Leak-Out-Spektroskopie ermöglichte hier erstmals eine Langzeitanalyse des CO-Basislevels in der Ausatemluft. Die Ergebnisse einer ebenfalls durchgeführten Studie zu induzierten Änderungen der CO-Ausatemkonzentration, die durch Sport hervorgerufen wurden, sind in Hinblick auf die Genauigkeit mit anderen Systemen bisher nicht erreicht worden. Die aus beiden Messreihen gewonnenen Erkenntnisse lassen sich für zukünftige CO-Atemgasuntersuchungen einsetzen, um Fehlinterpretationen der Ergebnisse zu vermeiden.

Abstract

This thesis deals with the isotopologue and high sensitive carbon monoxide detection of human exhalation air by means of the Cavity Leak-Out Spectroscopy (CALOS). First the spectrometer was optimised. The absorption band the ^{13}CO -analysis is performed on could be substituted due to increased laser output power. The newly utilized absorption band quadrupled the dynamic range of the system without altering the minimal detection limit. A new pressure control system optimised to high gas flows allows to further quadruple the dynamic range. This huge improvement of the dynamic range provides various applications for measuring comparatively high concentrations.

A new temperature stabilization of the measurement cavity based on compact Peltier elements was developed. This new stabilization allows for a temperature precision of $\pm 0.01^\circ\text{C}$ over a period of more than 5.5 days. By that, the long-term stability of the system was further increased by approximately 30%.

The system's ability to perform isotopologue selective measurements was used for the development of a non-invasive method to determine the total hemoglobin mass. By using the rare ^{13}CO -isotopologue, the amount of CO the test person had to inhale was reduced to approximately 1/100 of the CO amount used by other research groups. The amount of CO used in this work is absolutely harmless for humans. The applied volume per measurement was 1 ml. The new method was positively evaluated regarding the reproducibility of the data and regarding induced variations of the total hemoglobin mass. The induced variation in the total hemoglobin mass originated from a normal blood donation. The amount corresponds to the variation as it can be expected when performing blood doping for endurance enhancing purposes. This means that the detection of homologous blood doping is possible with this non-invasive method.

A further aspect of this thesis was the evaluation of the suitability to utilize CO as a marker molecule. For the first time, a long term analysis of the CO basis-level in the exhaled air could be performed. This was possible due to the properties of the Cavity Leak-Out Spectroscopy, namely the high sensitivity and the calibration free measurement technique. The precision of the results of a second study scrutinizing the changes in the exhaled CO concentration due to sports has not been matched yet by other research groups. Both studies have revealed remarkable results which can be used for future CO breath analysis studies in order to prevent misinterpretation of the data.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Grundlagen	3
2.1	Spurengase	3
2.2	Kohlenmonoxid	6
2.2.1	Endogenes Kohlenmonoxid	6
2.3	Hämoglobin	7
2.3.1	Hämoglobin-Grundlagen	7
2.3.2	Sauerstoff- / CO-Transport durch Hämoglobin	9
2.4	Änderungen der Hämoglobingesamtmasse	12
2.4.1	tHb-Erhöhung	12
2.4.2	tHb-Verringerung	14
2.5	Bestimmung der Hämoglobingesamtmasse	15
2.6	Laserabsorptionsspektroskopie	17
2.7	Cavity-Leak-Out-Spektroskopie (CALOS)	20
2.8	Zusammenfassung	24
3	Optimierung des Cavity-Leak-Out-Spektrometers	27
3.1	Der CO-Laser	27
3.1.1	Erzeugung kontinuierlich durchstimmbarer Seitenbänder	29
3.1.2	Optimierung der Laserleistung	30
3.2	Das Spektrometer	31
3.2.1	Der optische Aufbau	31
3.2.2	Der elektronische Aufbau	34
3.2.3	Das Gassystem	36
3.3	Linienauswahl	39
3.4	Transportable Temperaturstabilisierung der Messzelle	42
3.4.1	Die bisherige Temperaturstabilisierung	43



3.4.2	Aufbau der neuen Temperaturstabilisierung	45
3.4.3	Charakterisierung der neuen Stabilisierung	47
3.5	Dynamikbereich des Spektrometers	52
3.5.1	Unteres Detektionslimit	52
3.5.2	Oberes Detektionslimit	54
3.5.3	Erweiterung des Dynamikbereichs durch eine neue Druckregelung	55
3.6	Zusammenfassung	56
4	tHb-Bestimmung	59
4.1	$^{13}\text{COHb}$ -Messung	60
4.2	^{13}CO -Atmung	62
4.2.1	Alte Methode	63
4.2.2	Neue Methode	64
4.3	$V_{13\text{CO}}$ -Bestimmung	66
4.3.1	Online-Messung der nicht aufgenommenen ^{13}CO -Menge	67
4.4	tHb-Langzeitmessungen	68
4.5	Überprüfung der Empfindlichkeit der tHb-Bestimmung anhand von Blutspenden	72
4.6	Zusammenfassung	78
5	Evaluierung der Eignung von CO als Markermolekül	81
5.1	Langzeitmessungen	81
5.1.1	Messmethoden und Messverfahren	82
5.1.2	Ergebnisse und Diskussion	83
5.2	Einfluss körperlicher Anstrengung auf die CO-Konzentration	87
5.2.1	Messmethoden und Messverfahren	88
5.2.2	Ergebnisse und Diskussion	89
5.3	Zusammenfassung	92
6	Zusammenfassung und Ausblick	95
	Abbildungsverzeichnis	97
	Literaturverzeichnis	99

1 Einleitung

Die Spurengasanalytik bietet in der Medizin die Möglichkeit zur nicht-invasiven Diagnostik durch Analyse der Atemluft. Aktuelle Forschungsprojekte beschäftigen sich mit der Untersuchung von sogenannten Biomarkern in der Atemluft. Hierbei handelt es sich um Moleküle, deren Konzentration sich beispielsweise bedingt durch eine Krankheit ändert. Das Ziel der Forschung ist es Biomarker zu finden, durch die eine Krankheit eindeutig nachgewiesen werden kann. Ein Beispiel für einen solchen Einsatz ist das Messen der NO-Ausatemkonzentration um Asthma zu diagnostizieren. Bei einer Asthma-Erkrankung ist die NO-Konzentration in der Atemluft deutlich erhöht [Kha01].

Ein solcher eindeutiger Zusammenhang zwischen einem einzelnen Biomarker und einer Krankheit ist bereits für verschiedene Krankheiten bekannt. Im Falle einer Krebsdiagnostik setzen Forschungsgruppen jedoch auf die Analyse ganzer Gruppen von Molekülen. Die Analyse der Konzentrationen solcher Molekülmatrizen soll Aufschluss über eine mögliche Erkrankung und den Krankheitsstatus der Patienten bringen [Pen10, Pat11, Shu11].

Eine weitere Einsatzmöglichkeit der Spurengasanalyse findet sich in der Markierung von Molekülen mit seltenen Isotopen. Der Einsatz von ^{13}C -markierter Urease für die Untersuchung einer Helicobacter Pylori-Infektion [Kol95] ist aus dem klinischen Alltag nicht mehr wegzudenken.

Neben den biomedizinischen Aspekten steht auf der technischen Seite die Entwicklung von Analysegeräten und -methoden, die eine exakte und zuverlässige Spurengasuntersuchung ermöglichen. Dabei bietet sich die Laserabsorptionsspektroskopie als hochsensitive und auch isotopologenselektive Methode zur Spurengasanalyse an.

Das in dieser Arbeit verwendete und optimierte Cavity-Leak-Out-Spektrometer setzt zur Erhöhung der optischen Weglänge, die ein Maß für die Sensitivität ist, einen optischen Resonator ein. Das Messsignal ergibt sich aus dem exponentiellen Abfall des Detektorsignals nach Abschalten des Lasers. Durch das Messen der

intensitätsunabhängigen Abklingzeit, bietet diese Methode einige Vorteile gegenüber intensitätsabhängigen Messungen. So haben beispielsweise Schwankungen der Laserintensität bei der Cavity-Leak-Out-Spektroskopie keinen Einfluss auf die Messung der Gaskonzentration. Aus dem Vergleich der Abklingzeit einer mit absorbierendem Gas gefüllten Zelle und einer leeren Zelle, lässt sich der Absorptionskoeffizient bestimmen. Mit Hilfe von tabellierten, molekülspezifischen Absorptionsstärken kann dann die jeweilige Gaskonzentration errechnet werden.

Während dieser Arbeit wurde das Cavity-Leak-Out-Spektrometer für die Atemgasanalyse optimiert und isotopologenselektive ^{13}CO -Messungen durchgeführt.

Kapitel zwei behandelt die nötigen biomedizinischen und physikalischen Grundlagen. Dabei wird zunächst auf den Themenbereich der Spurengase und insbesondere auf die Bedeutung von Kohlenmonoxid im menschlichen Körper eingegangen. Die Beschreibung und die physiologische Bedeutung von Hämoglobin bilden die Grundlagen für das vierte Kapitel. Des Weiteren werden im zweiten Kapitel die Absorptionsspektroskopie und ihre Weiterentwicklung, nämlich die hier verwendete Cavity-Leak-Out-Spektroskopie, erläutert.

Das dritte Kapitel beschreibt den Aufbau und die im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten Optimierungsarbeiten am Spektroskopiesystem.

Im vierten Kapitel wird die Weiterentwicklung einer nicht-invasiven Methode zur Bestimmung der Hämoglobingesamtmasse mittels einer ^{13}CO -Atemanalyse beschrieben. Verschiedene Messreihen, die die hervorragenden Leistungen dieser Methode zeigen, werden hier ebenfalls präsentiert.

Die Evaluierung der Eignung von CO als Markermolekül für medizinische Untersuchungen wird im fünften Kapitel erläutert. Die dort gesammelten Erkenntnisse bieten einige Aspekte, die bei zukünftigen CO-Atemanalysen beachtet werden sollten.

Das letzte Kapitel fasst die Ergebnisse dieser Arbeit zusammen und gibt einen Ausblick über mögliche Weiterentwicklungen der hier präsentierten Methoden.

2 Grundlagen

2.1 Spurengase

Mit dem Begriff „Spurengas“ werden im Allgemeinen Gase sehr kleiner Konzentration bezeichnet. Die typischen Größenordnungen in denen Spurengase auftreten, reichen vom parts per million- ($\text{ppm} = 10^{-6}$), über den parts per billion- ($\text{ppb} = 10^{-9}$), bis zum parts per trillion-Bereich ($\text{ppt} = 10^{-12}$). In der Spurengasanalytik werden die Konzentrationsangaben in der Regel auf Volumenanteile bezogen, was auch für die vorliegende Arbeit gilt. Insofern ist im Folgenden $1 \text{ ppm} = 1 \text{ ppm}_V$.

Dass Spurengase trotz ihrer geringen Konzentrationen eine wichtige Rolle spielen, zeigt z.B. der Treibhauseffekt. In der Atmosphäre treten neben Wasser bzw. Wasserdampf, welches die stärkste Auswirkung auf die Erderwärmung hat, auch die Spurengase Kohlendioxid (CO_2) und Methan (CH_4) auf. Diese beiden Gase, deren Konzentration auch durch menschliche Einflüsse bestimmt wird, z.B. durch Verbrennen fossiler Brennstoffe (CO_2) bzw. durch intensive Land- und Viehwirtschaft (CH_4), haben einen großen Anteil am Treibhauseffekt [The11].

Auch in der Medizin spielen Spurengase eine wichtige Rolle. Der 1998 verliehene Nobelpreis für Medizin für die Entdeckung der Funktion von NO als Signalmolekül im kardiovaskulären System zeigt den Stellenwert, den Spurengase einnehmen [Nob11]. Insbesondere die Atemanalytik kann sich einer Vielzahl dieser Spurengase zur Analytik und Forschung bedienen. Dies liegt daran, dass in der menschlichen Ausatemluft neben den Hauptbestandteilen Stickstoff (73 %), Sauerstoff (15 %), Wasserdampf (6 %) und Kohlendioxid (5 %) über 1000 weitere flüchtige Verbindungen in Spurengaskonzentrationen auftreten [Phi99]. Ursprung dieser Spurengase sind zum einen die über die Inspirationsluft oder Nahrung aufgenommenen Stoffe und zum anderen Stoffwechselprodukte im menschlichen Körper, wobei diese über die Lunge und die Schleimhäute in die Ausatemluft gelangen. Diese beiden Quellen werden als exogen (von außen eindringend) und endogen (im Körper entstehend) bezeichnet.

Als Begründer der modernen Atemgasanalytik wird Linus Pauling angesehen, der



Molekül	Konzentration	physiologische Symptome
Aceton ($\text{OC}(\text{CH}_3)_2$)	ppm	Lungenkrebs, kongestive Herzinsuffizienz, Schlaganfall
Ammoniak (NH_3)	ppb	Asthma, Nierenkrankheiten
Carbonylsulfid (OCS)	ppb	Leberkrankheiten
Ethan (C_2H_6)	ppb	oxidativer Stress, Lipidperoxidation, Vitamin E Defizienz bei Kindern
Ethylen (C_2H_4)	ppb	Lipidperoxidation, UV-Schädigung der Haut
Isopren (C_5H_8)	ppb	Blut-Cholesterin
Kohlenstoffdisulfid (CS_2)	ppb	Schizophrenie, Herz- und Arterienkrankungen
Kohlenstoffmonoxid (CO)	ppm	oxidativer Stress, Entzündungen der Atemwege, Anämie
Methan (CH_4)	ppm	Verdauungsprobleme
Methanethiol (CH_3SH)	ppb	Halitosis
Methanol (CH_3OH)	ppb	Metabolismus von Früchten, Störung des Nervensystems
Methylamine (CH_3NH_2)	ppb	Metabolismus von Proteinen
Pentan (C_5H_{12})	ppb	Lipidperoxidation, Leberkrankheiten, Schizophrenie, rheumatische Arthritis
Stickstoffmonoxid (NO)	ppb	Asthma, Bronchitis, Lungenkrankheiten
Wasserstoff (H_2)	ppm	Indigestion bei Säuglingen, Darmerkrankungen

Tabelle 2.1: Biomarker und ihre zugeordneten pathophysiologischen Veränderungen. Entnommen aus [Wan09, Ris06].

1971 mittels Gaschromatographie 250 verschiedene Substanzen in der Expirationsluft unterscheiden konnte [Pau71].

Anhand der Konzentrationen bzw. der Konzentrationsunterschiede im Vergleich zu einem Normallevel, können einige Moleküle als sogenannte Biomarker dienen. Diese Biomarker lassen sich unter anderem dazu nutzen, den Krankheitsstatus oder auch den Behandlungsstatus bei bestimmten Krankheiten nachzuweisen. In Tabelle 2.1 sind einige Biomarker und ihre zugeordneten pathophysiologischen Veränderungen aufgeführt.

Die Atemdiagnostik als nicht-invasive Methode konnte sich im klinischen Alltag

bisher nicht gegen die Analyse von Blut- oder Urinproben durchsetzen. Dies scheint auf den ersten Blick erstaunlich, wenn man sowohl die vielen möglichen Anwendungsfelder, als auch die Simplizität der Probenentnahme berücksichtigt. Betrachtet man allerdings die Komplexität der meisten Atemanalysegeräte, so wird schnell die Hauptproblematik offensichtlich. Um sich in Arztpraxen und Kliniken gegenüber den konventionellen Geräten bzw. Methoden durchsetzen zu können, müssten die Atemanalysegeräte leicht zu bedienen, kompakt und kostengünstig sein. Viele Gasanalysegeräte bedürfen allerdings besonders geschulten technischen Personals für die Bedienung und die Ergebnisauswertung.

Des Weiteren gilt es, die Probenentnahme zu standardisieren. So können sich z.B. unterschiedliche Atemflüsse bereits deutlich auf die gemessene Konzentration auswirken. Ebenso kann es bei einigen Molekülen einen Unterschied machen, ob die Gasprobe aus dem Mund oder der Nase entnommen wird. Als Beispiel sei hier NO aufgeführt, das zum großen Teil über die oberen Atemwege in die Ausatemluft gelangt und über die Nase gemessen eine höhere Konzentration aufweist, als bei der Messung aus dem Mundraum [Kha01].

Für den späteren Einsatz eines Atemanalysegerätes ist die Anamnese ein weiterer wichtiger Faktor. So haben z.B. Raucher eine erhöhte Konzentration an CO und an verschiedenen Kohlenwasserstoffen in der Ausatemluft im Vergleich zu Nichtrauchern [Uet10, Alo10].

Schließlich müssen noch die technischen Anforderungen an das Messgerät beachtet werden. Zunächst muss die Empfindlichkeit ausreichend groß und ein akzeptables Signal-Rausch-Verhältnis gewährleistet sein. Insbesondere für Online-Analysen, wie sie hier präsentiert werden, ist eine hohe Zeitauflösung (< 1 s) unabdingbar. Des Weiteren ist eine querempfindlichkeitsfreie Messung sicher zu stellen, so dass die Messergebnisse zu keinen Fehlinterpretationen führen können [Fri08b].

Trotz dieser hohen Anforderungen an die Messsysteme, haben sich bereits verschiedene Atemtests etabliert, wie z.B. die CO-Analyse bei Neugeborenen zur Untersuchung auf Gelbsucht, die Messung des Ethanolgehalts zur Bestimmung des Blutethanolgehalts und der Glukosetoleranztest mit einer Wasserstoffmessung aus der Atemluft. CO₂-Messungen finden Anwendung in der Capnographie; die isotoposelektive ¹³CO₂-Messung dient zur Detektion des Helicobacter Pylori und die NO-Analyse gibt Aufschluss über den Status und Fortschritt bei Asthmakranken [Ris06].



2.2 Kohlenmonoxid

Kohlenmonoxid ist ein geruchloses, geschmackloses und farbloses Gas. Es ist für Menschen bereits in Konzentrationen von wenigen Prozent innerhalb von Minuten tödlich [Bou67]. Der Grund für diese hohe Toxizität ist die 200–300 mal höhere Bindungsaffinität des CO gegenüber dem Sauerstoff am Hämoglobin. Bereits kleine CO-Konzentrationen verdrängen den Sauerstoff, der am Hämoglobin gebunden ist, womit die Sauerstofftransportfunktion des Hämoglobins vermindert wird. Außerdem wird durch das Vorhandensein von CO im Blut die Sauerstoffbindungskurve derart verändert, dass die Sauerstoffversorgung negativ beeinflusst wird [Dau11, Mad00].

Kohlenmonoxid entsteht hauptsächlich bei der unvollständigen Verbrennung von organischen Materialien, wie z.B. Holz, Kohle oder Kohlenwasserstoffe. Autoabgase enthalten ca. 5–20 % Kohlenmonoxid [Dau11], weshalb in Garagen und Autowerkstätten stets auf eine gute Frischluftversorgung zu achten ist, um einer CO-Vergiftung vorzubeugen.

2.2.1 Endogenes Kohlenmonoxid

In der Ausatemluft eines gesunden, nichtrauchenden Menschen können ca. 1–4 ppm CO nachgewiesen werden. Dieses CO entsteht zum größten Teil beim Hämabbau, der durch das Enzym Hämoxxygenase (HO-1) induziert wird [Ten69, Ryt06a]. 85 % des freigesetzten CO entstammen dem Hämoglobin und 15 % dem Myoglobin. Beide Proteine sind hauptverantwortlich für die Sauerstoffversorgung im menschlichen Körper, wobei Hämoglobin im Blut und Myoglobin im Muskelgewebe vorkommt. Neben dem Sauerstofftransport dienen diese Proteine zugleich dem CO-Transport im Körper. Auch hier übernimmt Hämoglobin den Hauptteil des Transports, ca. 85 % des Kohlenmonoxids sind intravaskulär am Hämoglobin gebunden, während nur 1 % des im Körper enthaltenen Kohlenmonoxids physikalisch in Körperflüssigkeiten gelöst ist [Kha01]. Ein CO-transportierendes Hämoglobinmolekül wird als Carboxyhämoglobin (COHb) bezeichnet. Die endogene CO-Produktion führt zu COHb-Konzentrationen von ca. 0,5 % bei Nichtrauchern und bis zu 3 % bei Rauchern [Dau11].

Zahlreiche Studien untersuchen den möglichen Einsatz von CO als Marker für verschiedene Krankheiten. So wurden beispielsweise erhöhte CO-Ausatemkonzentrationen bei Patienten gemessen, die an Asthma [Par99, Ant07], Mukoviszidose [Ant00] und Atemwegsentzündungen [Yam98, Yas02, Ryt07] erkrankt waren. Des Weiteren wird der mögliche Einsatz von CO auf Grund sei-

nes entzündungshemmenden Effekts, unter anderem bei Organtransplantationen und Entzündungen der Lunge [Ryt06b, Mit10] untersucht.

Eine mögliche Markerfunktion von Kohlenmonoxid wird auch in Verbindung mit oxidativem Stress untersucht. Oxidativer Stress beschreibt einen Ungleichgewichtszustand zwischen oxidierenden und antioxidierenden Teilchen im Körper. Dieser Zustand kann durch viele unterschiedliche Faktoren, wie z.B. Hitze, einen septischen Schock, oder sogar intensive körperliche Anstrengung hervorgerufen werden [Wys05, Tho05]. Weiterhin treten auch viele Krankheiten in Verbindung mit oxidativem Stress auf, so z.B. Arteriosklerose, Parkinson, Alzheimer und verschiedene Entzündungen der Atemwege [Bab08, Sch07, Ser09, Beh99, Ryt07]. Der Zusammenhang zwischen CO und oxidativem Stress besteht im HO-1 Enzym. Dieses Enzym wird als Marker für oxidativen Stress gesehen. Auf Grund der oben genannten Verbindung zwischen HO-1 und der endogenen CO-Produktion gilt auch CO als möglicher Marker für oxidativen Stress.

2.3 Hämoglobin

Wie schon unter 2.2.1 kurz beschrieben, ist Blut ein wichtiger Faktor für den Gas-transport und die CO-Produktion im menschlichen Körper. In diesem Abschnitt werden die für diese Arbeit nötigen Grundlagen des Blutes, genauer des Hämoglobins, erläutert. Weiterhin werden die Transporteigenschaften des Hämoglobins für CO und O₂ beschrieben und die wichtigsten Ursachen aufgeführt, die eine Änderung der Hämoglobingestamtmasse zur Folge haben.

2.3.1 Hämoglobin–Grundlagen

Bei erwachsenen Menschen beträgt das Blutvolumen ca. 70 ml/kg und macht damit ca. 6–8 % des Körpergewichts aus. Blut besteht zu ca. 58 % aus Blutplasma und zu ca. 42 % aus festen Bestandteilen [Mic11]. Das Verhältnis zwischen dem festen, zellulären Anteil und dem Plasma wird als Hämatokritwert bezeichnet, welcher zwischen einzelnen Individuen stark variieren kann. Bei Männern liegt der Hämatokritwert bei 40–52 % und bei Frauen bei 36–46 % [Beu03]. Bei einem gesunden Menschen besteht der zelluläre Teil des Blutes zu ca. 96 % aus den Erythrozyten, den roten Blutkörperchen, deren Hauptaufgabe der Transport der wichtigen Blutgase Sauerstoff (O₂) und Kohlendioxid (CO₂) ist. Zu diesem Zweck

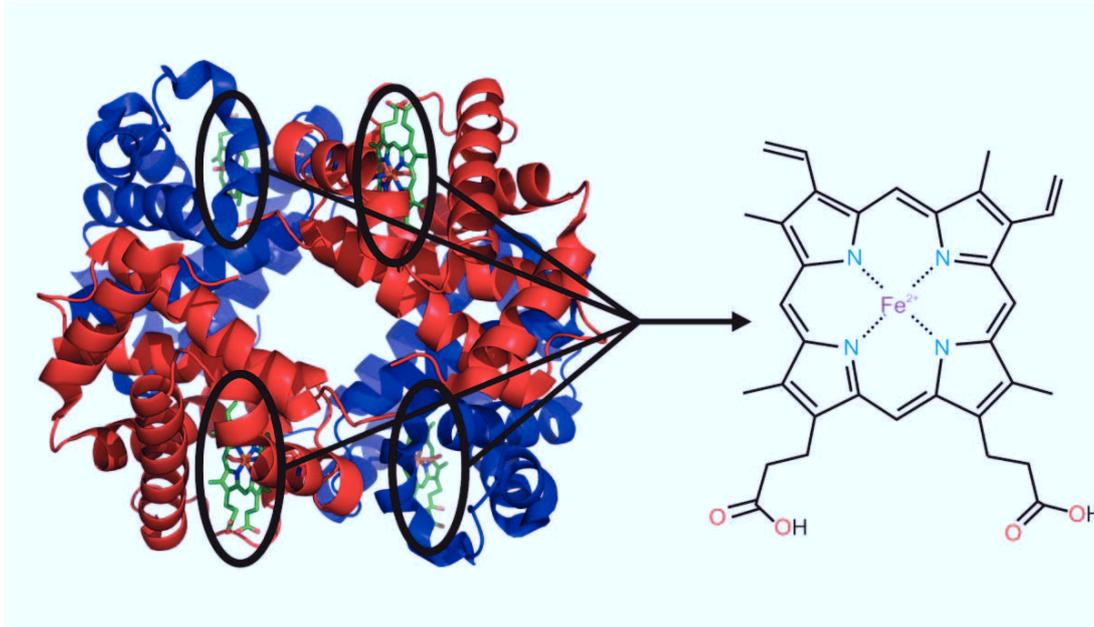


Abbildung 2.1: Hämoglobin und Häm. Auf der linken Seite ist die Darstellung eines Hämoglobinmoleküls zu sehen (*Quelle:* [Hae11]). Die chemische Struktur der markierten Häm-Moleküle ist auf der rechten Seite dargestellt (*Quelle:* eigene Darstellung in Anlehnung an [Hem11]). Das zentrale Eisenion (Fe^{2+}) bildet die Bindungsstelle für Sauerstoff und Kohlenmonoxid.

besitzen die Erythrozyten den roten Blutfarbstoff Hämoglobin, das ca. 36% der Erythrozytenmasse ausmacht [Sch98].

Das Hämoglobinmolekül besteht aus vier Aminosäureketten, den Globinen, die mit je einem Häm-Molekül ausgestattet sind. Abbildung 2.1 zeigt eine graphische Darstellung eines Hämoglobinmoleküls und der Strukturformel der Hämabbausteine. Die Bindung von Sauerstoff und Kohlenmonoxid erfolgt koordinativ am zentralen Eisenkation (Fe^{2+}) des Häms. Entsprechend des gebundenen Moleküls lautet die Bezeichnung Oxy- (O_2Hb) bzw. Carboxyhämoglobin (COHb). Die hohe Bindungsfähigkeit von Sauerstoff am Hämoglobin wird bei einem Vergleich der maximalen Sauerstoffkapazität zum Blutplasma deutlich. Während Blutplasma nur rund 0,005 ml/g O_2 in physikalisch gelöster Form enthalten kann, so sind es bei Hämoglobin rund 1,34 ml/g [Sch98]. Diese Bindungskapazität wird als Hüfner-Zahl bezeichnet.

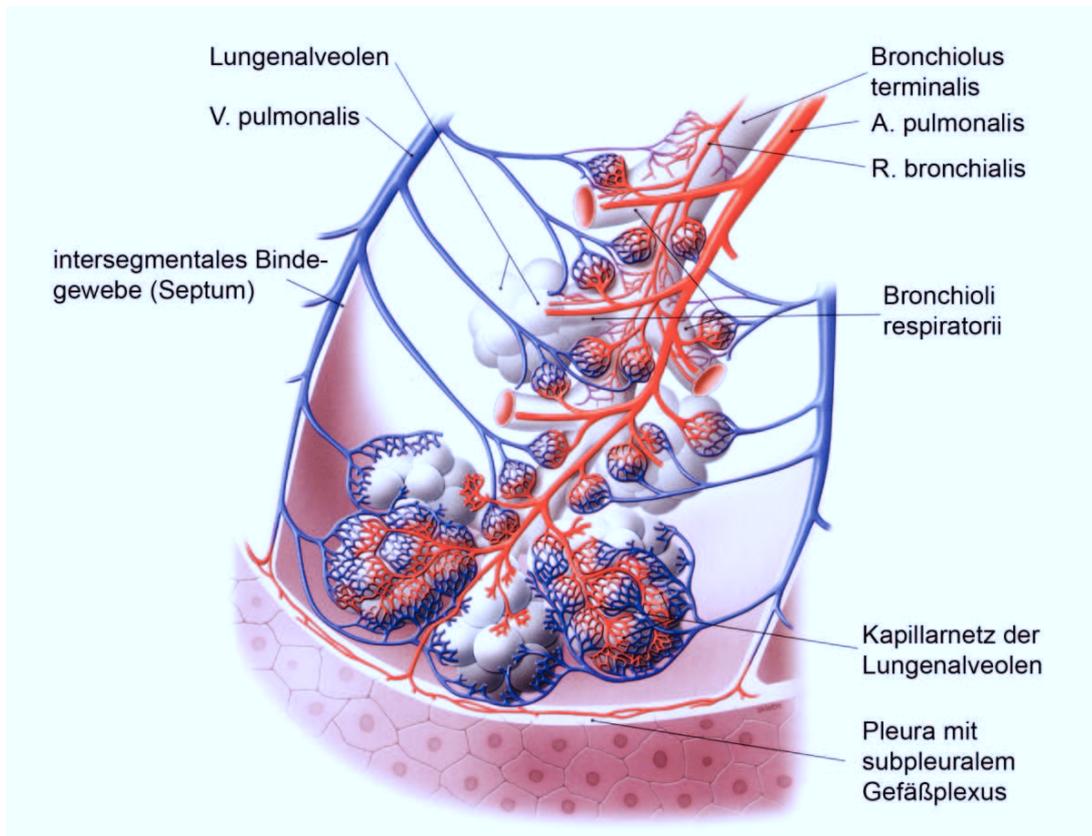


Abbildung 2.2: Skizze zum Aufbau der Gefäßsysteme in der Lunge. Es sind die Lungenbläschen (Alveolen) und die sie umgebenden Kapillarnetze, die dem Gasaustausch dienen, zu sehen. *Quelle:*[Pau10, S. 38]

2.3.2 Sauerstoff- / CO-Transport durch Hämoglobin

Die Lunge ist das zentrale Organ im menschlichen Körper, das für den Gasaustausch verantwortlich ist. Dort diffundieren in den Alveolen die Gasmoleküle über eine Membran in das Blut und umgekehrt. Abbildung 2.2 stellt eine Skizze zum Aufbau der Alveolen und die umschließenden Blutgefäße dar. Wie zu sehen ist, sind die Alveolen von Arterien und Venen umgeben. Das bedeutet, dass dort einerseits das Blut mit Sauerstoff angereichert wird, aber auch, dass Gase wie CO und CO₂ auf diesem Weg in die Ausatemluft gelangen können.

Für den Gastransport im Körper sind die bereits angesprochenen Proteine Hämoglobin und Myoglobin verantwortlich. Sie sind perfekt für den Sauerstofftransport im Körper geeignet. Die wichtigsten hierfür nötigen Faktoren lassen sich unter den folgenden vier Punkten zusammenfassen [Dic83]:

1. Das Transportmolekül (Hämoglobin) besitzt in Bereichen hoher Sauerstoffkon-



zentrationen (Lunge) eine hohe und in sauerstoffarmen Bereichen (Muskeln) eine verringerte Sauerstoffbindungsaffinität.

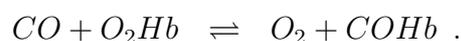
2. Das Speichermolekül (Myoglobin) hat bei niedrigen Sauerstoffkonzentrationen eine höhere Sauerstoffaffinität als Hämoglobin. Dies gewährleistet die Sauerstoffversorgung im Muskelgewebe.
3. Hämoglobin ist in der Lage das Abfallprodukt Kohlenmonoxid zur Lunge zu transportieren, wo es ausgeschieden werden kann.
4. Die Sauerstofffreisetzung vom Hämoglobin ist im aktiven Muskel, wo sich Milchsäure und Kohlensäure bilden, begünstigt. Auf diese Art gelangt der Sauerstoff vermehrt dorthin, wo er benötigt wird und nicht in ruhende Muskeln, die weniger Sauerstoff bedürfen.

Die Punkte 1, 2 und 4 lassen sich durch Sauerstoffbindungskurven illustrieren. Abbildung 2.3 zeigt die Standard-O₂-Bindungskurven für Myoglobin und Hämoglobin. Das Hämoglobin wird demnach in der Lunge bei einem angenommenen Sauerstoffpartialdruck von 140 mbar zu 98 % gesättigt, während der Sauerstoffpartialdruck in venösem Blut bei schwerer Arbeit auf 20 mbar absinkt [Sch03]. Dies hat zu Folge, dass Hämoglobin in arbeitenden Muskeln den Großteil des gebundenen Sauerstoffs an das Myoglobin abgibt. Die sigmoidale Form der Sauerstoffbindungskurve ergibt sich aus der vierfachen Sauerstoffbindung an das Hämoglobin mit den vier Übergangszuständen:



Die damit zusammenhängenden Gleichgewichtskonstanten, die von links nach rechts zunehmen, bewirken außerdem, dass das Hämoglobin mit steigender Anzahl an gebundenen O₂-Molekülen eine stärkere Affinität zur Bindung des nächsten O₂-Moleküls entwickelt. Andersherum bedeutet es auch, dass sobald das erste O₂-Molekül abgegeben wird, die nächsten sich noch leichter und schneller vom Hämoglobin lösen können.

Wie schon in Kapitel 2.2.1 erwähnt, erfolgt auch der CO-Transport im Körper durch Hämoglobin. Carboxyhämoglobin entsteht vereinfacht betrachtet bei folgender Gleichgewichtsreaktion:



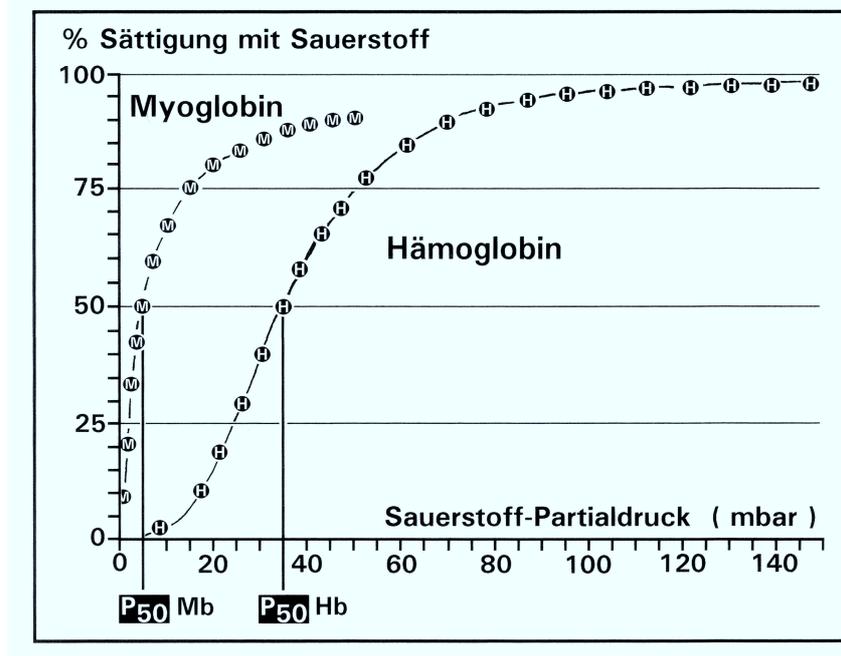


Abbildung 2.3: Standard-Sauerstoffbindungskurven für Myoglobin und Hämoglobin. Diese Darstellung erlaubt es, die Sauerstoffsättigung von Myoglobin und Hämoglobin bei gegebenem Sauerstoffpartialdruck abzulesen. So beträgt z.B. die Sauerstoffsättigung von Hämoglobin in der Lunge bei einem Sauerstoffpartialdruck von 140 mbar der Alveolarluft ca. 98 %. Die sigmoide Form der Hämoglobinkurve ergibt sich aus den vier Sauerstoffbindungen des Hämoglobins und den damit zusammenhängenden Gleichgewichtskonstanten. *Quelle:*[Sch03, S. 44]

Betrachtet man das dazugehörige Massenwirkungsgesetz, so erhält man die Konzentration von Carboxyhämoglobin [COHb] in Abhängigkeit der Partialdrücke von CO (pCO) und O_2 (pO_2), sowie der Oxyhämoglobinkonzentration [Wor04]:

$$[COHb] = M \cdot \frac{pCO[O_2Hb]}{pO_2} . \quad (2.1)$$

Dabei ist M eine Konstante, die als Haldane Faktor bezeichnet wird und die relative Affinität von Hämoglobin für Kohlenmonoxid gegenüber Sauerstoff angibt.

Coburn, Forster und Kane veröffentlichten bereits 1965 einen Artikel, der die detaillierten Zusammenhänge zwischen [COHb], den Partialdrücken von O_2 und CO in den Alveolen, sowie der Lungenventilation wiedergibt [Cob65].



2.4 Änderungen der Hämoglobingesamtmasse

Im Allgemeinen ist die Hämoglobingesamtmasse bei erwachsenen Menschen relativ konstant. Es gibt allerdings verschiedene Ursachen, die eine Änderung der Hämoglobingesamtmasse hervorrufen können. Man unterscheidet hierbei zwischen zwei Fällen, die im Folgenden behandelt werden. Der erste Fall bezieht sich auf Ursachen, die eine Erhöhung der Hämoglobingesamtmasse bewirken. Im zweiten Fall wird die Verringerung der Hämoglobingesamtmasse erläutert.

2.4.1 tHb-Erhöhung

Durch gezieltes Ausdauertraining, oder durch Höhenttraining in Höhen von 2000–2500 Metern lässt sich die Hämoglobingesamtmasse erhöhen. Die als optimal angesehenen Zeitspanne für ein effektives Höhenttraining wird bei 4–6 Wochen angenommen [Jan03]. Allerdings ist die Zunahme der Hämoglobingesamtmasse selbst beim Höhenttraining mit nur 1 % pro Woche relativ langsam.

Neben diesen legalen Methoden gibt es noch weitere Möglichkeiten, die Sauerstofftransportfähigkeit im Körper zu verbessern. Im Bereich des Sports wird dabei von Doping gesprochen. Auf Grund der Vielzahl der Dopingmethoden werden hier die für diese Arbeit relevanten Methoden beschrieben.

Für eine Erhöhung der Ausdauerleistung wird die Zahl der Erythrozyten und somit die Hämoglobingesamtmasse erhöht. Eine Möglichkeit dies zu tun, ist die Verwendung des Hormons Erythropoetin (EPO). EPO regt die Produktion der roten Blutkörperchen an und wurde ursprünglich für Patienten entwickelt, die an Blutarmut (Anämie) leiden. Die ersten EPO-Produkte wurden ab 1985 für den therapeutischen Einsatz genutzt [Ker02]. 1998 geriet EPO im Rahmen des großen Tour de France-Skandals ins Rampenlicht der öffentlichen Wahrnehmung. Es wurden verschiedene Methoden zum Nachweis von EPO entwickelt. Jedoch kamen die ersten direkten Nachweismethoden erst zu den Olympischen Spielen in Salt Lake City 2002 zum Einsatz.

Die indirekte Methode beruht auf der Messung des Hämatokritwertes. Die Grenzwerte liegen im Radsport bei 50 % bei Männern und bei 47 % bei Frauen. Allerdings gibt es Sportler, die auf Grund ihres hohen, natürlichen Hämatokritwertes von diesen Grenzwerten ausgeschlossen sind. Darüber hinaus ist zu beachten, dass es sich bei diesen Blutuntersuchungen um keinen Dopingnachweis handelt, sondern um

eine medizinische Untersuchung des Sportlers zu seinem eigenem Schutz [Jan03]. Der Missbrauch von EPO, aber auch Blutdoping im Allgemeinen, kann zu einer starken Bluteindickung, einhergehend mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit von Thrombosen, Herzinfarkten oder Herzinsuffizienz, führen [Fei08].

Eine weitere Möglichkeit der Ausdauerleistungsverbesserung ist das Blutdoping. Dabei wird die Hämoglobinmenge durch eine Bluttransfusion erhöht. Man unterscheidet dabei zwischen Fremdblut- und Eigenblutdoping.

Beim Fremdblutdoping wird Blut von anderen Personen mit gleicher Blutgruppe verwendet. Bei der Transfusion können sowohl Vollblut als auch die zuvor extrahierten und aufbereiteten Erythrozyten verwendet werden. Für eine signifikante Steigerung der Ausdauerleistung muss die Menge an Erythrozyten bzw. Hämoglobin mindestens um 5% erhöht werden [Cla10]. Seit 2004 ist der Nachweis von Fremdblutdoping über einen Antigennachweis möglich. Einer der bekanntesten überführten Sportler im Bereich Doping mit Fremdblut ist der kasachische Radrennfahrer Alexander Winokurow [Spi11].

Für das Eigenblutdoping existiert bis heute kein zugelassenes Nachweisverfahren. Die Vorgehensweise beim Eigenblutdoping ist wie folgt:

Der Sportler lässt sich zunächst bis zu einem Liter Blut entnehmen. Das entnommene Blut wird in der Regel zentrifugiert und die abgetrennten Blutzellen mit einem Stabilisator versetzt und gekühlt. Diese recht aufwendige Prozedur erlaubt eine schadensfreie Aufbewahrung über einen Zeitraum von mehr als zwei Jahren [Meu07]. Der Zeitpunkt der „Blutspende“ muss mindestens einige Wochen vor der geplanten Aktivität erfolgen. Der Grund hierfür ist, dass der Körper ca. 4–6 Wochen benötigt, um den Blutverlust durch Erythrozytenneubildung auszugleichen. Die lange Lagerungsmöglichkeit erlaubt somit einen gezielten und effektiven Einsatz für die Reinfusion. Die Reinfusion erfolgt kurz vor dem sportlichen Ereignis, um eine maximale Effektivität zu erzielen. Entsprechend der entnommenen Blutmengen ist nach der Reinfusion mit einem Anstieg der Hämoglobinmasse zu rechnen, der 10% und mehr erreichen kann. Der positive Einfluss auf die Ausdauerleistung kann entsprechend der Lebensdauer der Erythrozyten mehrere Wochen anhalten. Einige Studien, die die Auswirkungen von Blutdoping untersuchten, sind in [Cla10] zusammengefasst.

Die Gefahren des Blutdopings wurden bereits im obigen Abschnitt angesprochen. Hinzu kommen noch die Gefahren, die durch unsaubere Transfusionen bedingt



sind. Dazu gehören die Möglichkeiten des septischen Schocks und der Infizierung mit Keimen oder Viren. Bedenklich ist auch die Anzahl der ungeklärten Todesfälle vieler Radrennsportler. Bei jungen Hochleistungssportlern ist eine Anhäufung von Herzversagen recht verdächtig [Meu07].

Um diesen großen Gefahren, die mit dem Doping einhergehen, vorzubeugen, wäre ein Blutdopingnachweis sehr nützlich. Die oben angesprochene indirekte Methode der Hämatokritbestimmung mit den entsprechenden Grenzwerten ist nicht befriedigend. Zum einen kann es, bedingt durch einen natürlicherweise erhöhten Hämatokritwert zu Fehldiagnosen kommen. Zum anderen sind längst Möglichkeiten bekannt, den Hämatokritwert kurzzeitig um ein paar Prozent zu senken. Bereits die Einnahme von 1 l isotonischer Flüssigkeit lässt den Hämatokritwert um ca. 3 % sinken [Cla10]. Einfache Infusionen haben, durch ihren direkten Einfluss auf das Plasmavolumen, ebenfalls einen stark senkenden Effekt auf den Hämatokritwert.

Eine Nachweismethode, die die oben genannten Einflussfaktoren vermeidet, ist die Messung der Hämoglobingestammtheit, die unabhängig vom Plasmavolumen ist.

2.4.2 tHb-Verringerung

Die Verringerung der Hämoglobingestammtheit wird in der medizinischen Fachsprache als Anämie bezeichnet. Die Ursachen für eine Anämie sind sehr vielfältig. Sie reichen vom einfachen Eisenmangel, welcher für die Neuproduktion von Erythrozyten benötigt wird, über Krankheiten, die die Bildung gesunder Erythrozyten behindern (z.B. Sichelzellenanämie), bis zu Blutungen, die sowohl innerer als auch äußerer Art sein können. Für einen detaillierteren Einblick für die möglichen Gründe einer Anämie sei auf weiterführende Literatur, wie z.B. [The02, Beu03, Mic11] verwiesen. Als Anhaltspunkt für eine Anämie dient in der Regel die Hämoglobinkonzentration. Die Grenzwerte liegen bei Frauen bei unter 11,5 g/dl und bei Männern bei unter 13,5 g/dl [Beu03]. Wird eine Hämoglobinkonzentration unter diesen Werten gemessen, so kann von einer Anämie gesprochen werden. Allerdings ist zu beachten, dass eine akute Anämie auch bei Personen mit einer Hämoglobinkonzentration von 14,0 g/dl vorliegen kann, wenn diese beispielsweise in der davorliegenden Woche noch 15,5 g/dl betrug [Beu03].

Außerdem ist der Konzentrationswert des Hämoglobins, wie auch der Hämatokritwert, abhängig vom Plasmavolumen im Blut. Das heißt, dass eine die Anämie begleitende Dehydrierung die Diagnose erschweren kann. Ebenso ließe

sich mit dieser Methode ein starker Blutverlust nur verspätet nachweisen, da sowohl das Hämoglobin als auch das Plasma dabei verloren gehen und die Hb-Konzentration nur schwach oder gar nicht beeinflusst werden würde.

Diese Punkte zeigen auf, dass auch im klinischen Alltag eine Messung der Hämoglobingesamtmasse von großem Vorteil ist.

2.5 Bestimmung der Hämoglobingesamtmasse

Für die Bestimmung des Blutvolumens bieten sich sogenannte Tracerdilutionsmethoden an. Dabei werden die zu bestimmenden Teilchen, im Falle des Bluts die Erythrozyten bzw. das Hämoglobin markiert. Aus dem Konzentrationsunterschied vor und nach der Markierung und mit der bekannten Menge der Markersubstanz lässt sich die gesuchte Größe bestimmen. In der Medizin wird dieses Verfahren bereits genutzt, allerdings sind die bisher verwendeten Markersubstanzen, wie z.B. das in der Standardmethode eingesetzte ^{51}Cr radioaktiv und somit für einen wiederholten Gebrauch bei Menschen nicht geeignet [Bur95]. Außerdem sind die Tracermethoden mit einem enormen technischen Aufwand verbunden [Ort01] und es lässt sich mit den Tracern nur das Volumen der roten Blutkörperchen bestimmen, das nicht zwangsläufig exakte Rückschlüsse auf die Hämoglobingesamtmasse erlaubt.

Eine gute Möglichkeit der Messung der Hämoglobingesamtmasse ergibt sich aus der Verwendung von Kohlenmonoxid. Die sehr guten Bindungseigenschaften des CO am Hämoglobin wurden bereits in 2.2 und 2.3.2 beschrieben. Die ersten Untersuchungen mit CO als Markersubstanz fanden bereits vor fast 130 Jahren durch M. Grehant und E. Quinquard statt, wurden aber mangels einer zuverlässigen COHb-Messung zunächst nicht weiter verfolgt [Bur95]. 1995 stellten C. M. Burge und S. L. Skinner eine auf CO als Marker basierende Methode zur Bestimmung der Hämoglobingesamtmasse vor. Dieses Prinzip wurde von W. Schmidt und seinen Mitarbeitern weiter verbessert [Sch05, Pro08] und wie folgt eingesetzt:

Zuerst werden bei den Probanden die COHb-Konzentrationen mittels kommerziell erhältlicher Blutanalysegeräte bestimmt. Danach atmet der Proband eine auf sein Körpergewicht abgestimmte Menge CO ein. Die Werte liegen hier bei 1,0 ml/kg für männliche und 0,8 ml/kg für weibliche Athleten. Die CO-Atmung erfolgt über ein sogenanntes „rebreathing-System“, bei dem die Ausatemluft mit Sauerstoff angereichert und das Kohlendioxid entfernt wird. Die so aufbereitete Atemluft wird dem Probanden über ein insgesamt abgeschlossenes System wieder zugeführt. Durch die-



ses System wird erreicht, dass möglichst viel des verabreichten CO vom Körper des Probanden aufgenommen wird. Eine Analyse der im „rebreathing-System“ verbliebenen Menge an CO erlaubt die Quantifizierung der tatsächlich aufgenommenen CO-Menge. Die Hämoglobingesamtmasse lässt sich mithilfe der aufgenommenen CO-Menge (V_{CO}) und der Carboxyhämoglobinkonzentrationen ($[COHb]_{v/n}$) berechnen. Die Carboxyhämoglobinkonzentrationen vor und nach der CO-Atmung ergeben sich aus:

$$[COHb]_v = \frac{m_{COHb_v}}{tHb} , \quad [COHb]_n = \frac{m_{COHb_n}}{tHb} = \frac{m_{COHb_v} + m_{COHb_z}}{tHb} . \quad (2.2)$$

Dabei entspricht m_{COHb_z} der Masse des durch die CO-Atmung gebildeten Carboxyhämoglobins. Aus der Differenz der Carboxyhämoglobinwerte folgt:

$$\begin{aligned} \Delta COHb &= [COHb]_n - [COHb]_v \\ &= \frac{m_{COHb_v} + m_{COHb_z} - m_{COHb_v}}{tHb} = \frac{m_{COHb_z}}{tHb} . \end{aligned} \quad (2.3)$$

Mit Hilfe der Hüfner-Zahl (1,306 ml/g – unter physiologischen Bedingungen [Gor04]) lässt sich m_{COHb_z} aus dem aufgenommenen CO-Volumen berechnen und man erhält für tHb :

$$tHb = V_{CO} \cdot (\Delta COHb \cdot 1,306)^{-1} . \quad (2.4)$$

Gemäß Gleichung 2.4 lässt sich die Bestimmung der Hämoglobingesamtmasse auf die Messgrößen V_{CO} und $[COHb]$ reduzieren. Wie oben bereits erwähnt, erfolgt die Messung von $[COHb]$ mit kommerziell erhältlichen Geräten. Diese sind jedoch nicht in der Lage isotopologenselektiv zu messen und ihre geringe Genauigkeit bedingt die bei Schmidt et al. relativ hohen CO-Mengen. Diese hohen Dosen sind in mehrerer Hinsicht problematisch. Erstens überschreiten die verwendeten CO-Mengen, wenn auch nur für eine kurze Zeit, die internationalen Richtlinien [Wor04]. Zweitens wird aktuell diskutiert, ob man von Hochleistungssportlern erwarten kann, dass sie sich für eine Dopingkontrolle eine potentiell gefährliche Menge einer giftigen Substanz verabreichen lassen sollen [Sch10, Dam10]. Weiterhin lassen die hohen CO-Konzentrationen keine Wiederholung des oben beschriebenen Tests zu, wenn der Proband beispielsweise wegen Schwindel, Übelkeit oder Claustrophobie den „rebreathing-Test“ abbrechen muss [Dam10]. Diese Aspekte lassen eine Verbesserungsnotwendigkeit deutlich erkennen.

Durch die Verwendung des seltenen ^{13}CO -Isotopologs lässt sich, bei entsprechender

Nachweismethode, die benötigte Menge an CO drastisch reduzieren. Dadurch ist die Verabreichung, selbst unter wiederholter Anwendung, absolut ungefährlich. Der Verzicht auf ein „rebreathing-System“ würde ebenfalls mehr Sicherheit für die einzelnen Messungen und eine Zeitersparnis bei der CO-Verabreichung bedeuten. Die Verwendung einer reinen Atemgasanalyse zur Bestimmung der Carboxyhämoglobinkonzentrationen würde die Invasivität der Messung noch weiter verringern.

Torgny Sjöstrand veröffentlichte bereits 1948 in einem Artikel seine Idee einer auf einer reinen Atemmessung basierenden COHb-Analyse [Sjö48]. Die dort vorgestellte Methode wurde allerdings nicht allgemein akzeptiert, da die Ergebnisse starken Schwankungen unterlagen [Bur95]. Sjöstrands Apparatur bestand ebenfalls aus einem „rebreathing-System“, jedoch waren die damaligen technischen Mittel zur CO-Analyse sehr fehleranfällig. Des Weiteren benutzte er bei seinen Berechnungen einige aus heutiger Sicht nicht mehr zutreffende Vereinfachungen und Annahmen.

Die folgenden Daten geben die Größenordnung für die zu erwartende Hämoglobingesamtmasse an:

Ein erwachsener Mensch weist ein Blutvolumen auf, welches ca. 6–8% seines Körpergewichts entspricht. Die Hämoglobinkonzentration liegt bei 12–16 g/dl bei Frauen und 14–18 g/dl bei Männern [The02]. Diese relativ großen Bereiche lassen sich unter anderem durch unterschiedliche Konstitutionen und Trainingszustände erklären. Für einen erwachsenen Menschen mit 75 kg Körpergewicht ergibt sich im Mittel eine Hämoglobingesamtmasse von ca. 840 g.

2.6 Laserabsorptionsspektroskopie

Die lineare Laserabsorptionsspektroskopie ist die einfachste Form der Absorptionsspektroskopie. Dabei wird das Laserlicht durch die nachzuweisenden Moleküle absorbiert. Die Konzentration der Moleküle ergibt sich aus der Stärke der Absorption, d.h. aus der Abschwächung der transmittierten Laserleistung. Aus der Frequenz des absorbierten Lichts lässt sich auf die Molekülart schließen. Insbesondere bietet der mittlere Infrarot(IR)-Bereich die Möglichkeit zahlreiche Moleküle zu unterscheiden. In diesem Wellenlängenbereich, der zwischen 2 μm und 10 μm liegt, weisen viele Spurengasmoleküle charakteristische Absorptionslinien auf, die auch als spektroskopischer Fingerabdruck bezeichnet werden. Abbildung 2.4 zeigt die Absorpti-

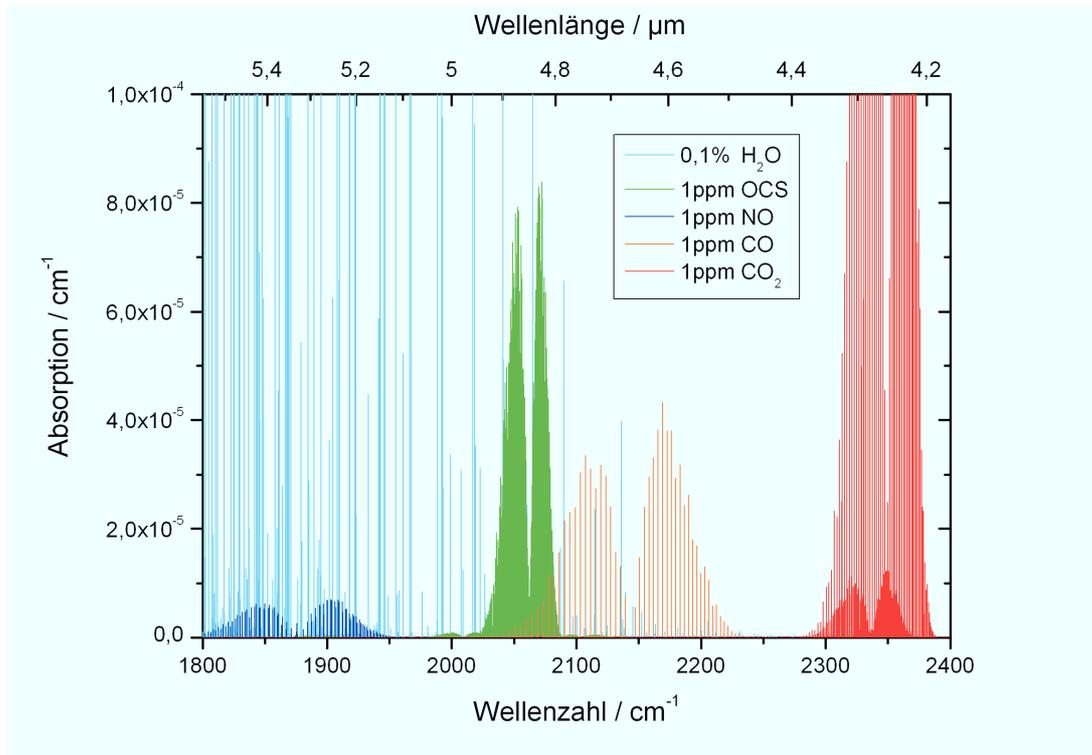


Abbildung 2.4: Absorptionsspektren im Wellenlängenbereich um 5 μm von CO, CO₂, H₂O, NO und OCS bei $p = 50$ mbar und $T = 296$ K.

onslinien einiger Moleküle in dem für diese Arbeit relevanten Wellenlängenbereich um 5 μm . Diese IR-Absorptionsspektren ergeben sich im elektronischen Grundzustand eines Moleküls aus elektromagnetischen Übergängen zwischen verschiedenen Vibrations-Rotations-Zuständen. Die einzelnen Vibrations-Rotations-Zustände sind von den Bindungsverhältnissen im Molekül abhängig. Daraus folgt, dass die Stärke und die Wellenlänge der einzelnen Absorptionsbanden molekülspezifisch sind. Diesem Umstand ist es zu verdanken, dass eine isotopologenselektive Messung möglich ist, da die verschiedenen Massen zweier ansonsten identischer Moleküle in unterschiedliche Schwingungsfrequenzen und entsprechend andere IR-Absorptionsspektren resultiert. Am Beispiel der Absorptionslinien von ¹²CO und ¹³CO lässt sich die Isotopologenselektivität in Abbildung 2.5 erkennen.

Für den Aufbau eines Absorptionsspektroskopiesystems wird im Prinzip nur eine Messzelle, in der sich das zu untersuchende Gas befindet, ein Laser und ein Photodetektor benötigt. Die Zelle muss sich dabei im Strahlweg zwischen Laser und Detektor befinden. Die Intensität, die der Detektor aufnimmt, entspricht der durch die Messzelle transmittierten Leistung des Lasers. Sofern die Bedingung $\lambda_{\text{Laser}} = \lambda_{\text{Absorptionslinie}}$

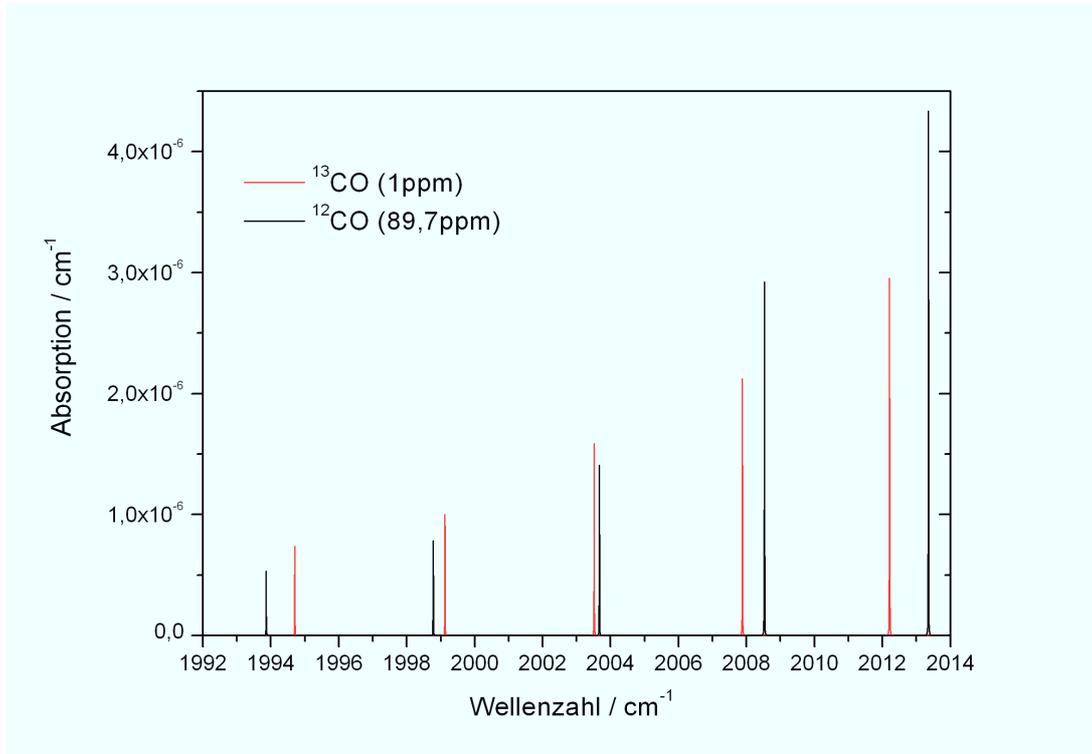


Abbildung 2.5: Absorptionsspektren von ^{12}CO und ^{13}CO im Wellenlängenbereich um $5\ \mu\text{m}$ bei $p = 50\ \text{mbar}$ und $T = 296\ \text{K}$. Die aufgetragenen Konzentrationen entsprechen dem natürlichen Isotopologenverhältnis von ^{12}CO zu ^{13}CO .

erfüllt ist, kommt es zur Absorption des einfallenden Laserstrahls durch die Moleküle in der Messzelle. Der Einsatz von kontinuierlich abstimmbaren Lasern ermöglicht die Untersuchung verschiedener Moleküle bzw. verschiedener Absorptionslinien, ohne den Laser auswechseln zu müssen.

Die transmittierte Intensität $I(\lambda)$ folgt dem Lambert-Beerschen Gesetz:

$$I(\lambda) = I_0(\lambda)e^{-\alpha(\lambda)\cdot L} \quad . \quad (2.5)$$

$I_0(\lambda)$ bezeichnet die einfallende Laserintensität; L die Absorptionsweglänge, welche in der Regel der Länge der Zelle gleicht und $\alpha(\lambda)$ den wellenlängenabhängigen Absorptionskoeffizienten. Die Linienprofile der Spektrallinien unterliegen verschiedenen Verbreiterungsprozessen, die hauptsächlich vom Druck und der Temperatur in der Nachweiszelle abhängig sind. In einem Druckbereich zwischen $10\ \text{mbar}$ und $100\ \text{mbar}$ folgt das Linienprofil einem Voigtprofil, welches einer Faltung aus einem Gauß- und einem Lorentzprofil folgt. Der genannte Druckbereich ist für die Spurengasanalyse



ideal geeignet, da sich hier ein sehr guter Kompromiss zwischen der Empfindlichkeit und ausreichend schmaler Linienbreite findet. Die schmale Linienbreite ist essentiell für eine gute Differenzierung der Spektrallinien. Die Breite des Voigtprofils ($\Delta\nu_{Voigt}$) beträgt:

$$\Delta\nu_{Voigt} = \sqrt{\Delta\nu_{Lorentz}^2 + \Delta\nu_{Doppler}^2} . \quad (2.6)$$

Dabei entspricht die Dopplerverbreiterung ($\Delta\nu_{Doppler}$) hauptsächlich Temperaturverbreiterungsprozessen, die bei Drücken von unter 10 mbar dominierend sind:

$$\Delta\nu_{Doppler} = \frac{\nu_0}{c} \sqrt{\frac{8kT \cdot \ln 2}{M}} . \quad (2.7)$$

ν_0 ist hierbei die Mittenfrequenz der Spektrallinie; c die Lichtgeschwindigkeit; k die Boltzmannkonstante, T die Temperatur und M die Molekülmasse. Bei Druckbereichen größer als 100 mbar ist die Druckverbreiterung dominant, die durch ein Lorentzprofil der Breite $\Delta\nu_{Lorentz}$ charakterisiert werden kann:

$$\Delta\nu_{Lorentz} = 2\gamma p . \quad (2.8)$$

Wie zu sehen ist, ist die Verbreiterung der Spektrallinie in diesem Fall nur vom Druck p und dem Druckverbreiterungskoeffizienten γ abhängig.

Die Spektrallinien vieler Moleküle sind hinsichtlich der Wellenlänge und der Liniestärken tabelliert und in Datenbanken wie z.B. HITRAN [HIT11, Rot09] zu finden. Mit Hilfe von Simulationsprogrammen wie SpectralCalc [Spe11] oder dem für diese Arbeit verwendeten SPECTMASTER [Las04], können aus diesen Daten die Spektrallinien druck- und temperaturspezifisch berechnet werden.

2.7 Cavity-Leak-Out-Spektroskopie (CALOS)

Die lineare Absorptionsspektroskopie, wie sie oben beschrieben wurde, hat einige Schwächen. Der direkte Zusammenhang zwischen der transmittierten Laserintensität und dem Absorptionskoeffizienten (siehe Gleichung 2.5) bedeutet, dass jegliche Intensitätsschwankungen des Lasers zu Fehlern in der Auswertung der Messdaten führen. Eine weitere Schwäche ist das Detektionslimit. Wegen der Linearität zwischen dem Absorptionskoeffizienten und der Absorptionsweglänge ist der kleinste messbare Absorptionskoeffizient limitiert durch die maximale Weglänge, die das Licht in der Messzelle zurücklegen kann. Selbst mit aufwendig konstruierten Vielfachreflexionszellen,

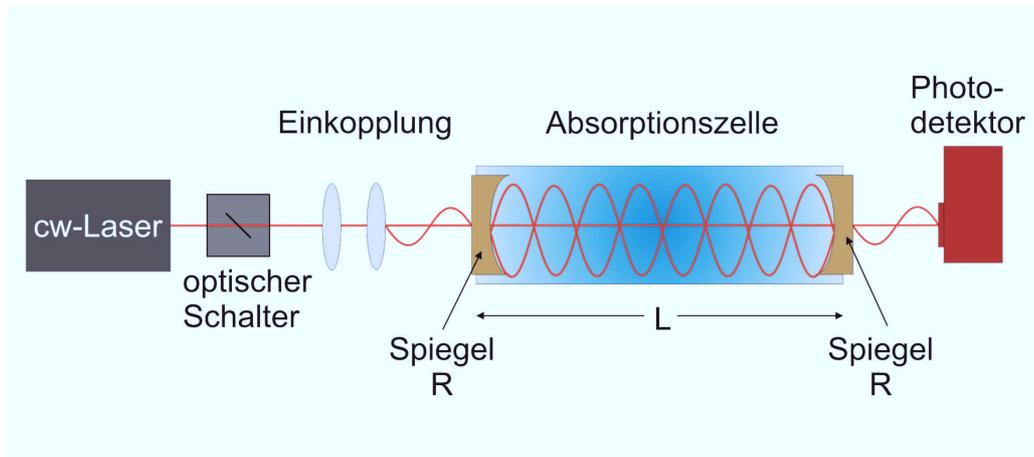


Abbildung 2.6: Prinzip der Cavity-Leak-Out-Spektroskopie. Ein cw-Laser wird zunächst resonant in eine high-finesse Cavity eingekoppelt. Wird am Detektor ein vorher festgelegter Schwellenwert erreicht, so wird der Laser mithilfe eines optischen Schalters unterbrochen. Das durch die Zelle transmittierte Abklingssignal wird vom Detektor aufgenommen und an den Messrechner geleitet. Die Konzentration des Probegases wird aus den Abklingzeiten einer leeren und der mit dem Probegas befüllten Zelle bestimmt.

wie den White- oder Herriott-Zellen, ist nur ein Absorptionskoeffizient im Bereich von 10^{-6} cm^{-1} zu erreichen. Für den Einsatz in der Spurengasanalytik im ppb-Bereich muss das Messsystem aber in der Lage sein, Absorptionskoeffizienten von 10^{-7} cm^{-1} bis 10^{-11} cm^{-1} zu detektieren.

Eine Weiterentwicklung der Absorptionsspektroskopie wurde 1988 von O’Keefe präsentiert [O’K88]. Dieses als „Cavity Ring-Down Spectroscopy“ (CRDS) bezeichnete Prinzip beruht auf der Verwendung eines optischen Resonators (Cavity) zur Erhöhung der Wechselwirkungsstrecke innerhalb der Messzelle. Dieser aus mindestens zwei hochreflektierenden Spiegeln bestehende Resonator ermöglicht eine effektive Weglänge von mehreren Kilometern, ohne die Dimension des Aufbaus bzw. der Zelle zu vergrößern. Ein weiterer Vorteil ist die intensitätsunabhängige Bestimmung der Absorptionskoeffizienten über eine Zeitmessung. Die ersten CRDS-Systeme basierten auf gepulsten Laserquellen. Erst 1997 stellte Daniele Romanini ein CRDS-System vor, das eine cw-Laserquelle nutzte [Rom97]. Am Institut für Lasermedizin der Universität Düsseldorf wurden verschiedene auf diesem Prinzip basierende Systeme im mittleren Infrarot bei ca. $3 \mu\text{m}$ und $5 \mu\text{m}$ entwickelt. Zur Unterscheidung zu den gepulsten Systemen wurde für die cw-CRDS der Begriff **Cavity-Leak-Out-Spektroskopie (CALOS)** eingeführt [Mür99].

In Abbildung 2.6 wird das Prinzip der Cavity-Leak-Out-Spektroskopie skizziert. Ein



cw-Laser wird resonant in die Cavity eingekoppelt, so dass die Eigenschwingungen (Moden) des Resonators angeregt werden. Die Frequenzen ν_n der Grund- bzw. TEM₀₀-Moden ergeben sich aus der Geometrie des Resonators:

$$\nu_n = n \cdot \frac{c}{2L}, \quad n \in \mathbb{N}. \quad (2.9)$$

Die relativ schmale spektrale Breite $\Delta\nu_C$ der Resonator-Moden, im verwendeten Aufbau ca. 20 kHz, bewirkt, dass nur der Teil der eingestrahnten Leistung resonant eingekoppelt werden kann, dessen Frequenz sich innerhalb von $\Delta\nu_C$ befindet. Dieser Sachverhalt bedingt das hohe Auflösungsvermögen der Cavity-Leak-Out-Spektroskopie. Durch die Anregung der Grundmode kommt es zu konstruktiver Interferenz und somit zu einer Resonanzüberhöhung der Strahlungsleistung innerhalb der Nachweiszelle. Das Ansteigen der Leistung wird auch als „power build-up“ bezeichnet, das durch einen oberen Grenzwert limitiert ist. Für die transmittierte Leistung I_{trans} gilt dann:

$$I_{trans} = \rho I_{in} \frac{T^2}{(1 - R)^2}. \quad (2.10)$$

ρ entspricht der Einkopplungseffizienz der eingestrahnten Intensität I_{in} in die Zelle. T und R geben die Transmissions- bzw. Reflektionswerte der Resonator-Spiegel wieder. Aus Gleichung 2.10 folgt, dass im Idealfall die transmittierte Leistung gleich der eingestrahnten Leistung sein kann. Im experimentellen Einsatz ist eine solch hohe Effizienz allerdings nicht zu erreichen. Hauptgrund hierfür ist die Einkopplungseffizienz. In der Regel ist die Breite der Laserlinie größer als die des Resonators. Dies führt dazu, dass nicht die gesamte Strahlung effektiv eingekoppelt werden kann und $\rho < 1$ ist. Ein weiterer Faktor der im Realfall auftritt, sind Absorptionsverluste A an den Spiegeln. Für die Transmission im experimentellen Einsatz gilt somit nicht $T = 1 - R$, sondern $T = 1 - R - A$. Das hat zur Folge, dass auch der Bruch aus Gleichung 2.10 kleiner 1 ist.

Im Folgenden wird anhand eines Beispiels verdeutlicht, wie groß die reale Transmission werden kann:

Bei dem verwendeten Spektrometer, betrieben auf dem 4P11 Laserübergang, beträgt die einfallende Intensität ca. 360 μW . Nimmt man nun die zertifizierte Reflektivität der Spiegel von 99,98% [Fri08a] an und vernachlässigt alle weiteren Verluste durch Absorption, so ergibt sich ohne Interferenz in der Zelle eine maximale transmittierte Intensität von $I_{trans} \approx 1,44 \cdot 10^{-5} \mu\text{W}$ mit $I_{trans} = I_0 \cdot (1 - R)^2$. Tatsächlich beträgt die transmittierte Leistung aber ca. 11,2 μW , was in etwa 3,1% der einfallenden

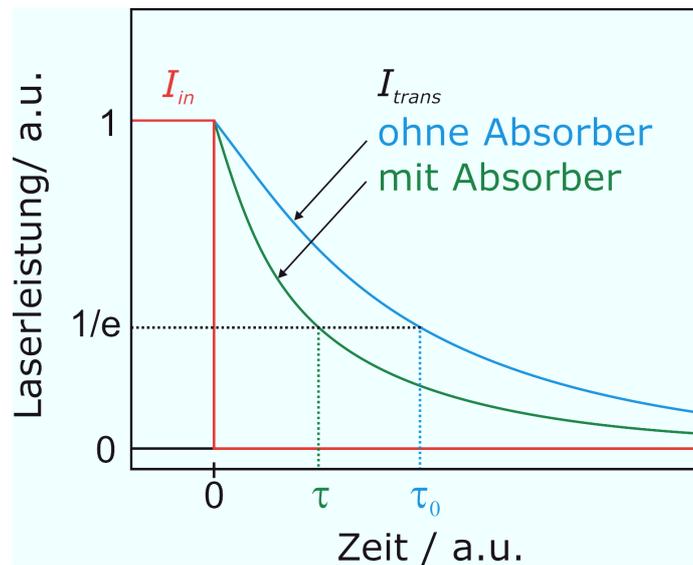


Abbildung 2.7: Abklingensignale eines CALO-Spektrometers. Sobald der Laser abgeschaltet wird, kommt es zu einem exponentiellen Abfall der transmittierten Intensität. Die Abklingzeiten τ_0 und τ sind charakteristisch für eine leere bzw. eine mit absorbierendem Gas gefüllte Zelle.

den Leistung entspricht. Daraus folgt eine Resonanzüberhöhung im Resonator, die einer Intra-Cavity-Leistung von 56 mW gleich kommt.

Um ein Messsignal zu erhalten, wird der Laser abgeschaltet, sobald ein vorher eingestellter Schwellenwert am Detektor erreicht wird. Dadurch wird der Resonator nicht weiter gepumpt und es kommt zu einem exponentiellen Abfall des transmittierten Signals $I(t)$:

$$I(t) = I_0 e^{-\beta t} \quad (2.11)$$

Die charakteristische Größe dieser Funktion ist die Abklingzeit τ , die die Zeit angibt, nach der das Signal auf den $1/e$ -Teil des Startwertes abgefallen ist. Für eine Zelle, die mit nicht absorbierendem Gas gefüllt ist, wird diese Zeit mit τ_0 bezeichnet. Ein absorbierendes Gas innerhalb der Messzelle bewirkt einen schnelleren Abfall der transmittierten Leistung und führt damit zu einer kleineren Abklingzeit τ im Vergleich zu τ_0 . Abbildung 2.7 verdeutlicht dies graphisch.

Aus dem Vergleich der beiden Abklingzeiten lässt sich der Absorptionskoeffizient α des Probgases bestimmen. Dazu wird zunächst der Intensitätsverlauf ($I(n)$) für n -Umläufe im Resonator betrachtet. Bei einer Spiegelreflektivität von R fällt die



Intensität im Resonator um den Faktor R^2 ab. Für $I(n)$ gilt dann:

$$I(n) = I_0 R^{2n} = I_0 e^{2n \ln R} \approx I_0 e^{2n(R-1)} . \quad (2.12)$$

Die Näherung gilt für $R \approx 1$, was bei hochreflektierenden Spiegeln, wie sie in optischen Resonatoren dieser Art verwendet werden, der Fall ist. In einer mit absorbierendem Gas gefüllten Zelle verringert sich die Intensität entlang der Absorptionslänge z zusätzlich um den Faktor $e^{-\alpha z}$ [Dem03]. Zusammen mit der Umlaufzeit $t_u = \frac{2L}{c}$ ergibt sich aus den Gleichungen 2.11 und 2.12:

$$I(n \cdot t_u) = I_0 e^{-\beta \frac{2nL}{c}} = I_0 e^{2n(R-1) - \alpha 2nL} \quad (2.13)$$

$$\Rightarrow \beta = c \cdot \frac{(1-R)}{L} + \alpha \cdot c . \quad (2.14)$$

Aus der Definition der Abklingzeit τ folgt weiterhin:

$$e^{-1} = e^{-\beta \tau} = e^{-(c \cdot \frac{1-R}{L} + \alpha \cdot c) \cdot \tau} . \quad (2.15)$$

Daraus folgt für die Abklingzeit τ_0 einer leeren Zelle, also $\alpha = 0$:

$$\tau_0 = \frac{1}{c} \cdot \frac{L}{1-R} . \quad (2.16)$$

Nun lässt sich Gleichung 2.15 nach α umstellen:

$$\alpha = \frac{1}{c} \left(\frac{1}{\tau} - \frac{1}{\tau_0} \right) . \quad (2.17)$$

Dies zeigt, dass es mittels der Cavity-Leak-Out-Spektroskopie möglich ist, den Absorptionskoeffizienten einer Gasprobe intensitätsunabhängig über eine Zeitmessung zu bestimmen. Die Gaskonzentration kann dann aus α in Verbindung mit den in 2.6 genannten Datenbanken und Simulationsprogrammen errechnet werden.

2.8 Zusammenfassung

Im vorliegendem Kapitel wurde zunächst eine Einführung in den Forschungsbereich der Spurengase gegeben. Das Hauptaugenmerk lag auf dem hohen Stellenwert und dem großen Potential der Spurengasanalytik im Bereich der Medizin. Der Schwerpunkt dieser Arbeit liegt auf dem Kohlenmonoxid. Dieses wurde hinsichtlich seiner

physiologischen Bedeutung und seines großen Leistungsvermögens als Markermolekül in Verbindung mit schweren Krankheiten wie Alzheimer, Parkinson, Asthma etc. beschrieben. Die geringen Konzentrationen im Bereich weniger ppm, in denen CO in der Ausatemluft vorkommt, verdeutlichen, dass für den erforderlichen Nachweis eine hochsensitive Methode benötigt wird.

Das Transportmittel für die Atemgase, wie CO und O₂, ist das Hämoglobin. Unter 2.3 wurden zunächst die grundlegenden Eigenschaften des Hämoglobins im menschlichen Körper dargestellt.

Im Folgenden wurde gezeigt, dass es bis heute keine zufriedenstellende bzw. anerkannte Technik gibt, die Hämoglobingesamtmasse zu bestimmen. Eine solche Technik könnte unter anderem zu einem eindeutigen Nachweis von Blutverlust (Anämie) aber auch von künstlich herbeigeführten Erhöhungen der Hämoglobingesamtmasse, wie sie beim Blutdoping auftreten, führen.

Über die Atemgastransporteigenschaften des Hämoglobins und der starken Bindungsaffinität zu CO lässt sich eine Methode zur Bestimmung der Hämoglobingesamtmasse entwickeln. Die ersten, wegen der Verwendung relativ großer Mengen an CO umstrittenen Techniken, wurden vorgestellt.

Über einen isotopologenselektiven Nachweis, lässt sich die zu verwendende CO-Menge drastisch reduzieren, so dass mit absolut ungefährlichen Dosen gearbeitet werden kann. Die Messung auf einer reinen Atemgasanalyse basieren zu lassen, macht sie zudem zu einer nicht-invasiven Messung. Die dafür notwendige Methode der Laserabsorptionsspektroskopie und insbesondere der, in dieser Arbeit verwendeten Cavity-Leak-Out-Spektroskopie, wurde am Ende des Kapitels beschrieben.

Die hohe Sensitivität und Selektivität von CALOS, machen es zu einem idealen Instrument für die isotopologenselektive Atemgasanalytik.

3 Optimierung des Cavity-Leak-Out-Spektrometers

In diesem Kapitel wird das Spektrometer beschrieben. Es werden sowohl der optische und der elektronische Aufbau als auch das dazugehörige Gassystem erläutert. Dabei werden die, im Rahmen dieser Dissertation, durchgeführten Optimierungsarbeiten vorgestellt und evaluiert. Diese beziehen sich auf die Optimierung der Leistung des CO-Gaslasers und der sich daraus ergebenden Linienauswahl zur Spektroskopie. Des Weiteren wird eine neue Temperaturstabilisierung vorgestellt, die sich auf Grund ihrer Kompaktheit und ihrer Leistung auch für ein transportables System eignet. Hierbei werden die Vorteile, die diese Stabilisierung für das vorhandene System mit sich bringt, diskutiert. Der letzte Teil des Kapitels beschreibt den Dynamikbereich, d.h. den Messbereich bezogen auf das untere und das obere Detektionslimit, und die durch die vorher aufgezeigten Techniken erreichten Verbesserungen. Die Charakterisierung einer neuen Druckregelung, die für eine deutlich höhere messbare Konzentration sorgt, schließt dieses Kapitel.

3.1 Der CO-Laser

Der für diese Arbeit verwendete Laser ist ein CO-Laser. Es handelt sich dabei um einen linienweise abstimmbaren Molekülgaslaser, der im Wellenlängenbereich zwischen $4,75\ \mu\text{m}$ und $6\ \mu\text{m}$ emittiert. Die Strahlungsleistung des Lasers ist stark davon abhängig auf welcher Laserlinie er betrieben wird und kann zwischen wenigen mW und über 600 mW liegen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Emissionsleistung des CO-Lasers durch eine optimierte Justierung verbessert. Mit einer Linienbreite von nur 50 kHz und einem nahezu gaußförmigen Strahlprofil ist dieser Laser sehr gut für den Einsatz in einem Cavity-Leak-Out-Spektrometer geeignet [Mür02].

Abbildung 3.1 zeigt den skizzierten Aufbau des Lasers und der Laserstabilisierung. Die Resonatorlänge beträgt ca. 2 m, was in einem sehr guten Strahlprofil mit

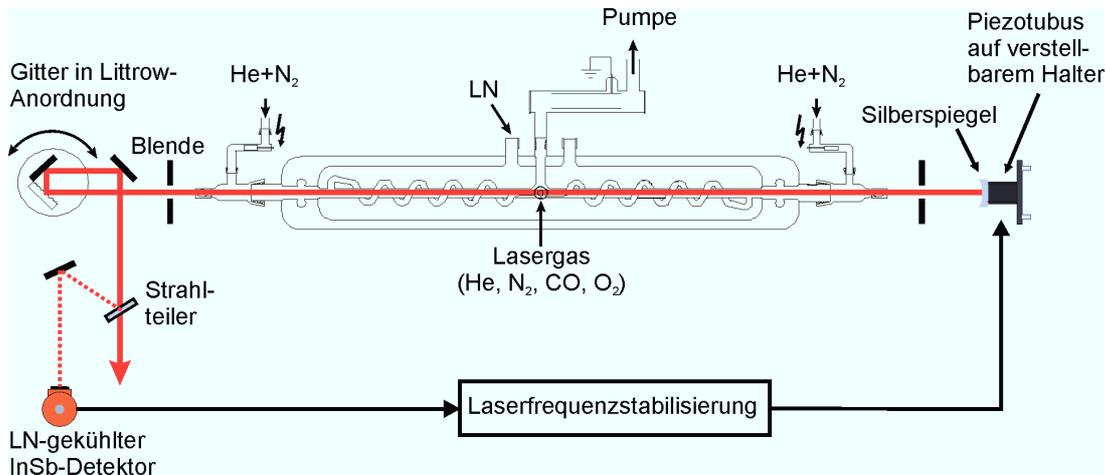


Abbildung 3.1: Aufbau des verwendeten CO-Lasers. Der Resonator wird auf der linken Seite durch ein Gitter in Littrow-Anordnung und auf der rechten Seite durch einen konkaven Silberspiegel ($R = 5\text{ m}$) begrenzt. Der Spiegel ist auf einem Piezotubus montiert, der zur Anpassung der Resonatorlänge dient. Das Lasergas befindet sich in einem Glasrohrsystem, welches von einem mit Flüssigstickstoff (LN) gekühlten Glasdewar umgeben ist. Das Laserlicht wird am Gitter ausgekoppelt und in einen Hauptstrahl und einen Nebenstrahl (ca. 10 % der Leistung) aufgeteilt. Der Nebenstrahl wird zur Frequenzstabilisierung des Lasers verwendet.

$M^2 \approx 1$ resultiert. Der Resonator wird auf der einen Seite durch ein Beugungsgitter (320 Linien/mm) in Littrow-Anordnung und auf der anderen Seite durch einen konkaven Silberspiegel ($R = 5\text{ m}$) begrenzt. Die Linienauswahl erfolgt über die Stellung des Gitters im Resonator. Auf diese Weise lassen sich insgesamt ca. 100 Linien und somit 100 verschiedene Frequenzen auswählen, die sich allerdings nicht alle für den Betrieb des Spektrometers eignen. Der Grund hierfür sind die großen Unterschiede in der Emissionsleistung der verschiedenen Laserlinien.

Die Auskoppung der Laserstrahlung erfolgt auf der Seite des Gitters. Hier wird ein Teil der Strahlung zurück in den Resonator reflektiert und die nullte Ordnung ausgekoppelt. Ein Strahlteiler bewirkt eine Aufspaltung von ca. 90:10. Der Großteil der Leistung steht somit dem eigentlichen Experiment zur Verfügung, während der kleinere Teil zur Stabilisierung des Lasers verwendet wird.

Die Stabilisierung des Lasers auf das Leistungsmaximum der ausgewählten Laserlinie erfolgt über eine 1f-Lock-In-Technik. Der Silberspiegel ist auf einem Piezotubus befestigt, mit dessen Hilfe die Resonatorlänge entsprechend der Lock-In-Stabilisierung angepasst werden kann. Der Piezotubus befindet sich in einem verstellbaren Halter, der zur Justierung der Lasers dient.

Das Lasergas wird durch Flüssigstickstoff (LN) auf ca. 77 K gekühlt, um die gewünschten Laserübergänge zu erreichen. Das Gasgemisch setzt sich zusammen aus dem aktiven Medium CO; dem Helium, das zur weiteren Kühlung dient; dem Stickstoff, das als Pumpmedium eingesetzt wird und Luft. Für eine Anregung der unteren Schwingungsniveaus der CO-Moleküle wird eine Gasentladung bei 10 kV mit einem Entladungsstrom von ca. 10 mA betrieben.

3.1.1 Erzeugung kontinuierlich durchstimmbarer Seitenbänder

Die Molekülspektroskopie ermöglicht unter anderem, die Absorption auf dem Absorptionsmaximum zu vermessen oder die gesamte Absorptionslinie zu scannen. In beiden Fällen ist es erforderlich, die Frequenz des Messlasers exakt auf die gewünschte Wellenlänge einstellen zu können. Da der CO-Laser lediglich linienweise abstimmbaar ist, wäre man hier auf eine zufällige Koinzidenz von Laserlinie und Absorptionslinie angewiesen. Der kontinuierliche Scan einer Absorptionslinie wäre nicht möglich. Aus diesem Grund werden dem Laserstrahl mithilfe eines elektrooptischen Modulators (EOM) kontinuierlich durchstimmbare Seitenbänder aufgeprägt [Mür02].

Bei dem EOM handelt es sich um einen Cadmiumtellurid-(CdTe)Kristall, der sich in einem rechteckigen Mikrowellenhohlleiter befindet. Mit einem Mikrowellengenerator (R&S[®] SMP02, Rhode und Schwarz) in Kombination mit einem Mikrowellenverstärker (8020H15F-000, Hughes) lässt sich ein elektrisches Feld an den Kristall anlegen. Durch einen linearen optischen Effekt ändern sich die Brechungsindizes entlang der Hauptachse des Kristalls. Durchläuft der Laserstrahl mit einer passenden Polarisation den Kristall, so erfährt er durch eine periodische Modulation des angelegten elektrischen Feldes eine Phasenmodulation. Diese führt zu zwei Seitenbändern mit den Frequenzen $\nu_{\text{Laser}} \pm \nu_{\text{Mikrowelle}}$. Die Polarisation des Hauptstrahls ist gegenüber der Polarisation der Seitenbänder um 90° gedreht.

Dieses System ist so angepasst, dass die Mikrowellenfrequenzen zwischen 8 und 18 GHz gewählt werden können. Betrachtet man allerdings das Verstärkungsprofil in Abbildung 3.2, so fällt auf, dass eine optimale Seitenbanderzeugung nur bei ca. 10 GHz und im Bereich zwischen 11 und 14 GHz möglich ist. Die Leistung der Seitenbänder liegt im Bereich mehrerer hundert μW . Das Profil wurde in einer im Rahmen dieser Dissertation betreuten Bachelorarbeit erstellt.

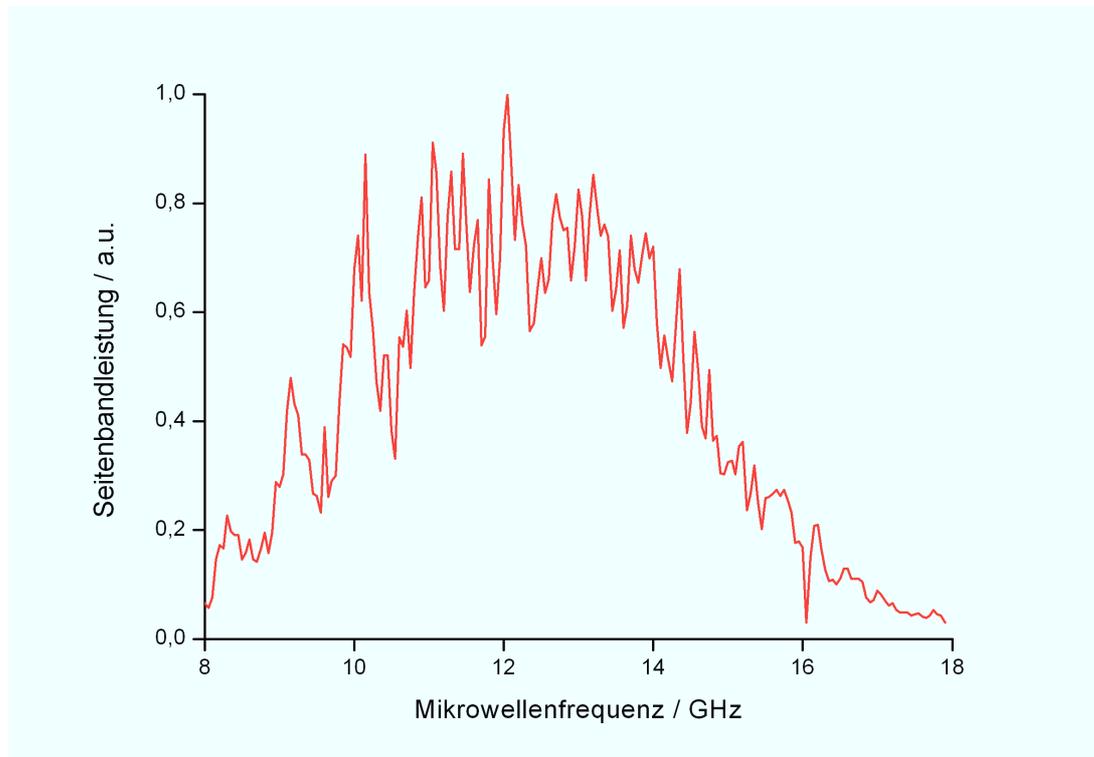


Abbildung 3.2: Verstärkungsprofil der Seitenbänderzeugung.

3.1.2 Optimierung der Laserleistung

Die effektiv nutzbare Seitenbandleistung ist abhängig von mehreren Faktoren, wie z.B. von dem oben bereits erwähnten Verstärkungsprofil der Seitenbänderzeugung, das stark frequenzabhängig ist. Ein weiteres Kriterium ist natürlich die Leistung des Hauptlaserstrahls. Je höher die Leistung des Hauptstrahls, desto höher auch die Seitenbandleistung.

In der Dissertation von Heinrich [Hei10] ist das Emissionsspektrum des CO-Lasers mit einer maximalen Intensität von ca. 600 mW angegeben. Im Vergleich zu den Vorgängerarbeiten, zuletzt der von Fritsch [Fri08a] war hier eine deutliche Leistungssteigerung zu verzeichnen. Diese wurde durch eine Nachjustierung des Laserresonators erreicht.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit musste der Piezotubus am CO-Laser auf Grund eines Defekts getauscht werden. Im Zuge dessen wurde auch der Silberspiegel erneuert und der CO-Laserresonator neu eingestellt. Bis zu diesem Zeitpunkt wurde die Justierung nur mithilfe eines analogen Leistungsmessgeräts durchgeführt. Wegen der Trägheit der Anzeige und der messbereichsbedingten Ungenauigkeit war eine Fein-

einstellung damit nicht möglich.

Für die Neujustierung wurde zunächst ein He-Ne-Pilotlaser über den Auskoppelspiegel des CO-Lasers in den Resonator eingekoppelt. Damit ließ sich der Silberspiegel so ausrichten, dass der Pilotstrahl deckungsgleich mit seinem Rückreflex gebracht wurde. Anstatt für die darauf folgende Feinjustierung das analoge Messgerät zu verwenden, wurde der zur Laserfrequenzstabilisierung gedachte InSb-Detektor benutzt. Hierfür wurde der Strahl durch ein zusätzlich eingebrachtes Chopper-Rad so unterbrochen, dass das Detektorsignal einem deutlichen Rechtecksignal entsprach. Der große Vorteil des LN-gekühlten Detektors ist dessen hohe Reaktionsgeschwindigkeit bezüglich Leistungsänderungen und die Möglichkeit zur vollen Ausnutzung des Anzeigebereichs des angeschlossenen Oszilloskops. Dies erlaubt selbst kleinste Änderungen der Leistung noch gut aufzulösen. Die Leistung der einzelnen Übergänge wurde wieder mit dem analogen Messgerät gemessen. Durch diesen Aufbau ließ sich die Leistung des CO-Lasers im Maximum nochmals um ca. 46 % auf ca. 880 mW verbessern. Die Leistungssteigerung insbesondere auf der 4P11 Laserlinie führt zu einer deutlichen Verbesserung des Dynamikbereichs des Spektrometers, wie in Abschnitt 3.5 gezeigt wird. Abbildung 3.3 zeigt das nach der Neujustierung erreichte Emissionsspektrum des CO-Lasers, welches in einer im Rahmen dieser Dissertation betreuten Masterarbeit erstellt wurde.

3.2 Das Spektrometer

Der Aufbau des Cavity-Leak-Out-Spektrometers lässt sich in drei Bereiche aufteilen. Der erste Teil beschreibt den optischen Aufbau des Systems, mit den wichtigsten optischen Elementen. Der zweite Bereich wird aus dem zugehörigen elektronischen Aufbau gebildet, in dem die Messwertaufnahme und die Stabilisierung der Nachweiszelle dargestellt werden. Im letzten Punkt wird das zugehörige Gassystem behandelt, das für den Gasfluss und die Druckkontrolle in der Nachweiszelle sorgt.

3.2.1 Der optische Aufbau

Abbildung 3.4 zeigt den Strahlverlauf des verwendeten Aufbaus. Der aus dem CO-Laserresonator ausgekoppelte Strahl durchläuft zunächst einen Strahlteiler, der ca. 10 % der Leistung zum Detektor D1 leitet. Der Detektor wird für die Stabilisierung auf das Leistungsmaximum des Lasers und für die Laserjustierung verwendet. Der

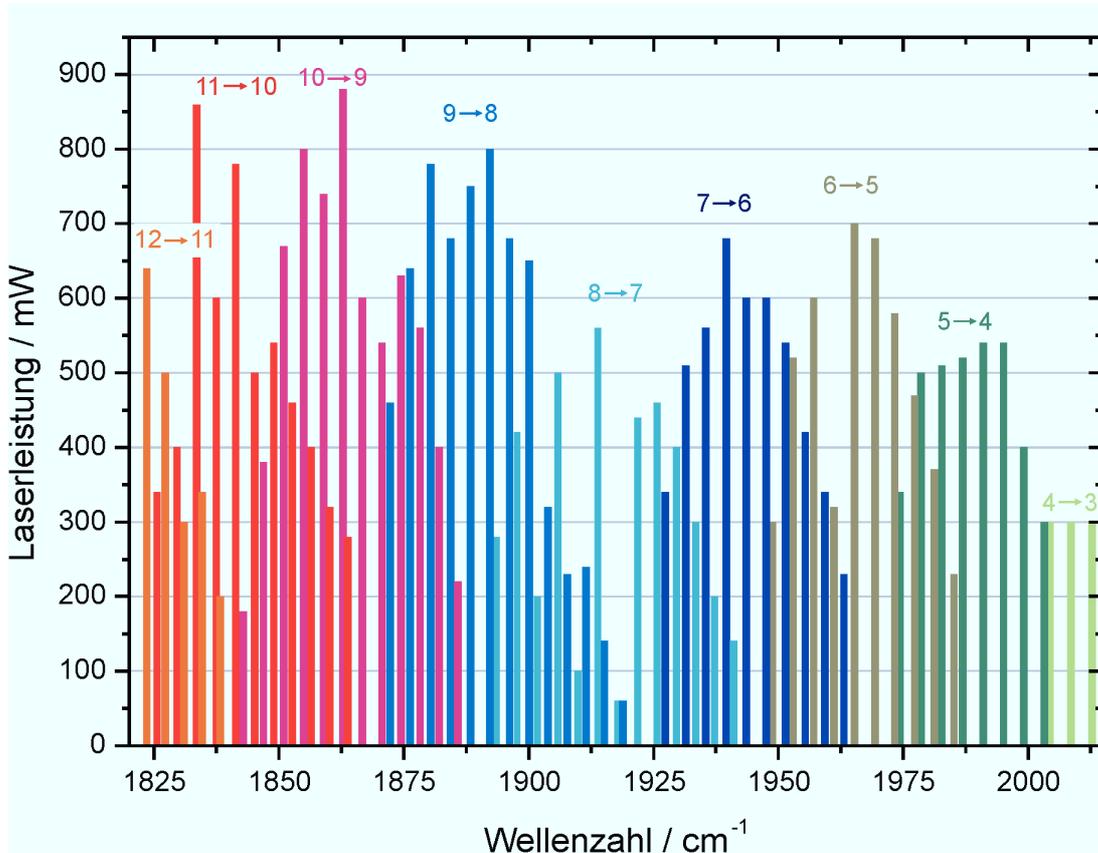


Abbildung 3.3: Emissionsspektrum des CO-Lasers nach der Neujustierung des Laserresonators. Zur besseren Übersicht wurden die Laserlinien einer Rotationsbande farblich einheitlich dargestellt und nur die Übergänge aufgeführt, deren Leistung für die Verwendung im Cavity-Leak-Out-System ausreichend sind.

Hauptteil der Laserstrahlung wird über zwei sphärische Spiegel ($R = 5\text{ m}$ und $R = 1\text{ m}$) in den EOM fokussiert. Die Fokussierung gewährleistet eine optimale Effizienz der Seitenbänderzeugung. Der Polarisator vor dem EOM sorgt für die korrekte Polarisation des Lichts, so dass dem Hauptstrahl zwei Seitenbänder aufgeprägt werden. Bei einer Laserleistung von 100 mW und einer Mikrowellenleistung von 20 W beträgt die Leistung der Seitenbänder ca. $100\text{ }\mu\text{W}$ [Mür02].

Der dem EOM nachgeschaltete Analysator trennt den Trägerstrahl von den zu ihm orthogonal polarisierten Seitenbändern. Auf diese Weise wird der nicht modulierte Anteil des Hauptstrahls vom restlichen Strahlweg ausgekoppelt. Eine weitere Aufgabe des EOM ist seine Funktion als schneller optischer Schalter zum Unterbrechen des Strahls, sobald die durch die Zelle transmittierte Leistung einen voreingestellten Schwellenwert erreicht. Nähere Details hierzu werden in 3.2.2 beschrieben.

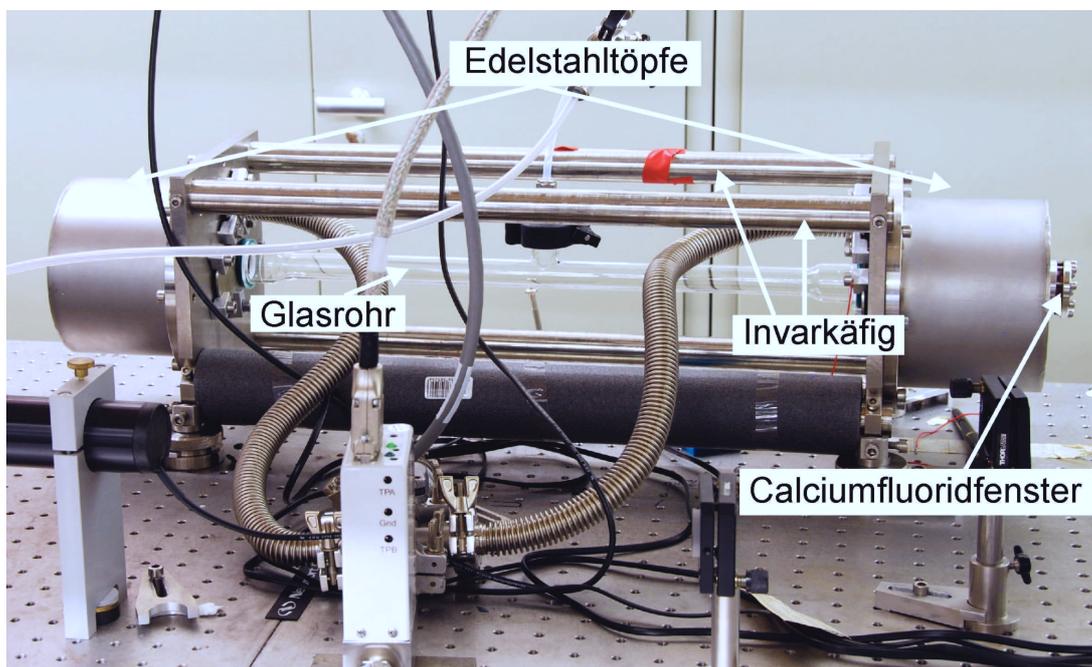


Abbildung 3.5: Die Nachweiszelle. Die von außen sichtbaren Elemente der Nachweiszelle sind markiert. Das Invargerüst hat wegen seines geringen thermischen Ausdehnungskoeffizienten einen positiven Einfluss auf die Temperaturstabilität der Messzelle. Das Probegas wird über einen Schlauch, der in der Mitte des Glasrohrs angebracht ist, in die Messzelle geleitet und über die Wellschläuche abgesaugt.

krümmte, dem Resonatorinneren zugewandte hochreflektierende Seite, weist einen Krümmungsradius von $R = 6 \text{ m}$ auf. Der Einkoppelspiegel ist auf einem Piezotubus (HPSt 150-3, Piezomechanik) montiert. Damit kann die Länge des Resonators angepasst werden. Zwei auf den Endplatten montierte Edelstahlöpfe dienen dem gasdichten Abschluss. In diese sind für $5 \mu\text{m}$ antireflexbeschichtete Calciumfluoridfenster eingebracht, durch welche der Laserstrahl ein- bzw. ausgekoppelt wird. Zur besseren Veranschaulichung zeigt Abbildung 3.5 ein Foto der Nachweiszelle. Weitere Details zur Nachweiszelle sind in [Hei07] und [Fri08a] geschildert.

Nach dem Verlassen der Nachweiszelle wird der Laserstrahl mittels eines toroidalen Spiegels auf den Detektor D2 fokussiert.

3.2.2 Der elektronische Aufbau

Der im Folgenden beschriebene elektronische Aufbau, siehe Abbildung 3.6, bezieht sich auf die Messwertaufnahme und die Stabilisierung der Nachweiszelle. Die aufgeführten Daten gelten für eine nicht thermisch isolierte bzw. stabilisierte Zelle.

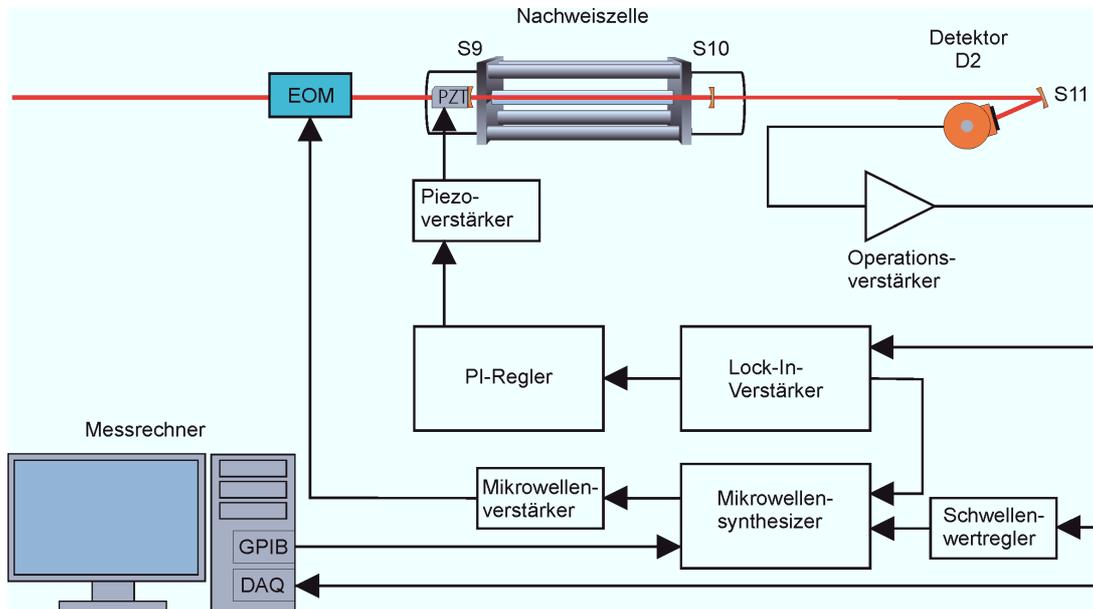


Abbildung 3.6: Der elektronische Aufbau. Das durch die Zelle transmittierte Signal wird vom Detektor aufgenommen und anschließend verstärkt. Der Lock-In-Verstärker gibt ein Modulationssignal an den Mikrowellengenerator weiter, durch das die Seitenbänder moduliert werden. Aus der Phasendifferenz zum ursprünglichen Signal wird ein Fehler-signal berechnet, was zur Längenkorrektur der Zelle über den Piezo genutzt wird. Der Schwellenwertregler dient zum Einstellen des Grenzwertes, bei dem der Laser bzw. die Seitenbänder durch den Mikrowellengenerator kurzzeitig abgeschaltet werden. Das dadurch entstehende Abklingsignal wird von einer DAQ-Karte im Messrechner registriert und zur Berechnung des Absorptionskoeffizienten verwendet.

Die Stabilisierung der Nachweiszelle auf die Laserfrequenz erfolgt mittels der 1f-Lock-In-Technik. Hierfür werden die Seitenbänder mit einer Frequenz von 540 Hz und einer Modulationstiefe von 1,8 MHz über den Mikrowellengenerator moduliert. Die Modulationsfrequenz wird am Lock-In-Verstärker eingestellt. Diese Modulation sorgt dafür, dass die Laserfrequenz über die Resonanzfrequenz der Cavity gefahren wird. Als Resultat ist die Laserfrequenz während einer Modulationsperiode zweimal mit der Resonanzfrequenz identisch. Während dieser Koinzidenz wird durch konstruktive Interferenz ein Lichtfeld in der Zelle aufgebaut und die vom Detektor D2 aufgenommene Transmission steigt. Das Detektorsignal wird verstärkt und an den Lock-In-Verstärker, einen Schwellenwertregler und den Messrechner geleitet. Der Lock-In-Verstärker vergleicht die Phasendifferenz zwischen dem Detektorsignal und dem von ihm generierten Referenzsignal. Eine Phasendifferenzänderung wird z.B. durch eine Verschiebung der Resonatorfrequenz verursacht. Die Ursache dafür können unter anderem thermisch bedingte Längenänderungen des Resonators sein.



Das vom Lock-In-Verstärker ausgegebene und weiter verstärkte Regelsignal wird dem Piezotubus in der Nachweiszelle zugeführt, was in einer Änderung der Resonatorlänge resultiert, so dass der Laser weiterhin optimal, d.h. mittig über die Resonatorfrequenz moduliert wird.

Mit dem oben erwähnten Schwellenwertregler lässt sich die Schwelle einstellen, bei der der Laser abgeschaltet wird, wodurch das für die Messung wichtige Abklingsignal entsteht. Wenn die transmittierte Intensität die am Regler eingestellte Schwelle erreicht, wird ein Puls an den Mikrowellengenerator gesendet, der die Seitenbänder stark abschwächt. Die Abschwächung ist so hoch, dass sie einer Unterbrechung der Seitenbandstrahlung gleichkommt.

Die Abklingsignale werden mit einer DAQ-Karte (Compuscope CS 12100, GageScope) vom Messrechner aufgenommen und durch ein LabView-Programm aufgezeichnet. Des Weiteren erlaubt eine entsprechende Schnittstelle am Messrechner (GPIB, National Instruments) die Steuerung der Mikrowellenfrequenz und somit der Wellenlänge der Seitenbänder. Ein spezieller Fit-Algorithmus bestimmt die Abklingzeiten τ des exponentiellen Abfalls durch lineare Regression. Ein Korrekturterm reduziert den daraus resultierenden systematischen Fehler [Hal04]. Die Berechnung des Absorptionskoeffizienten aus den Abklingzeiten τ und τ_0 erfolgt in Echtzeit, entsprechend wird auf dem Monitor die Absorption gegen die Zeit direkt aufgetragen. Diese Vorgehensweise ermöglicht, die gemessene Konzentration auch schon während der laufenden Messung zu bestimmen.

3.2.3 Das Gassystem

Das Gassystem gewährleistet einen konstanten Druck in der Messzelle. Darüber hinaus kann auch der Gasfluss durch die Zelle kontrolliert und reguliert werden.

Der konstante Druck in der Zelle wird benötigt, um hochpräzise und hochauflösende Spektroskopiemessungen durchführen zu können. Wie schon in Abschnitt 2.6 gezeigt, ist die Absorption der Moleküle vom Druck abhängig. Das bedeutet, dass Druckschwankungen zu einer Veränderung der Absorptionsstärke und der Linienbreite führen.

Ein regelbarer und konstanter Gasfluss ist unabdingbar, um statt Konzentrationen die Gesamtmenge einer Molekülsorte zu bestimmen. Des Weiteren wird dadurch eine sehr gute Reproduzierbarkeit der Messungen ermöglicht.

Abbildung 3.7 zeigt eine Skizze des für diese Arbeit verwendeten Gassystems. Die zu vermessende Gasprobe wird zunächst durch einen Nafionschlauch geleitet. Bei Nafion

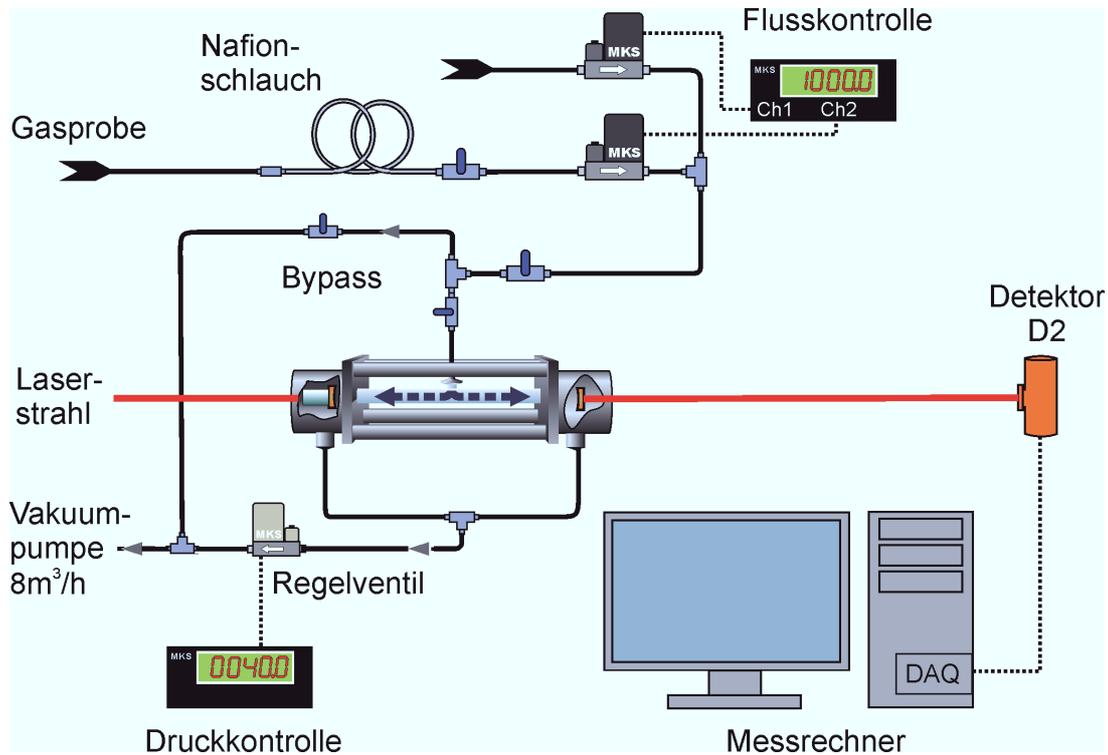


Abbildung 3.7: Das Gassystem. Die Gasprobe wird zunächst durch einen Nafionschlauch dehydriert. Die Massenflussregler ermöglichen einen konstanten und kontrollierten Gasfluss durch die Messzelle. Über zwei an den Endtöpfen der Messzelle angebrachte Schläuche wird das Gas wieder abgepumpt. Die Druckregelung, die zwischen Zelle und Vakuumpumpe eingesetzt ist, sorgt für einen konstanten und regelbaren Druck in der Messzelle.

handelt es sich um ein synthetisches Polymer, das Ende der 1960er von W. Grot bei der Modifizierung von Teflon entdeckt wurde. Die Membraneigenschaften zeichnen sich durch eine hohe Permeabilität und Selektivität für Wasser aus [Per11]. Der im Aufbau verwendete Membranschlauch befindet sich in einem weiteren Schlauch, der von Luft gegenläufig zur Gasprobe durchspült wird. Auf Grund des Partialdruckunterschieds diffundiert das Wasser aus dem inneren Schlauch in den äußeren Schlauch und wird so größtenteils aus der Gasprobe entfernt. Wasser kann, gerade im mittleren IR-Bereich, zu ungewollten Querempfindlichkeiten führen, die die Messergebnisse verfälschen würden, so dass eine effektive Reduzierung des Wassergehalts in der Gasprobe sehr wichtig ist. Während einer im Rahmen dieser Arbeit betreuten Masterarbeit wurde die Effizienz des Nafionschlauchs bestimmt, wobei die ursprüngliche Stickstoffspülung [vB04] durch eine kostengünstigere Raumluftspülung ersetzt wurde. Abbildung 3.8 stellt die entsprechenden Ergebnisse dar.

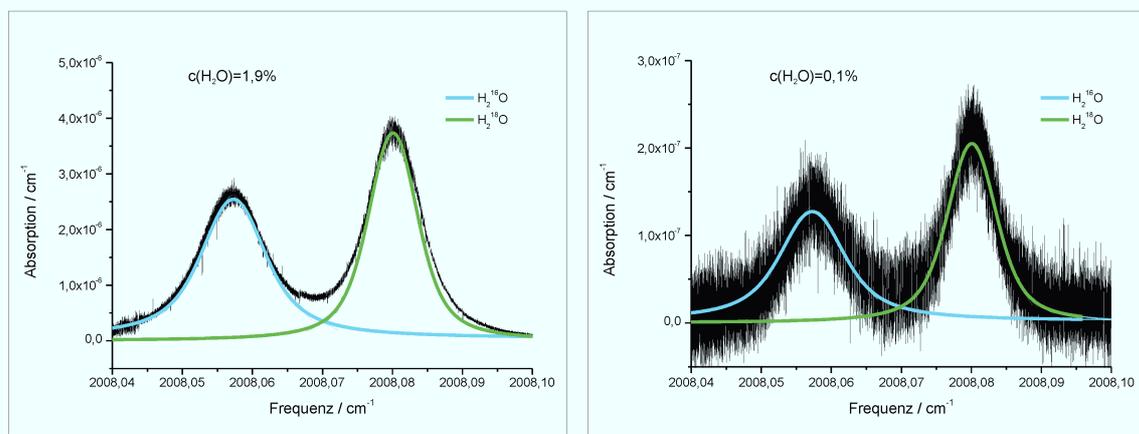


Abbildung 3.8: Dehydrierung der Gasprobe durch einen Nafionschlauch. Die Graphen stellen zwei Linienscans über das H_2^{16}O und das H_2^{18}O Isotopolog von Wasser dar. Über einen entsprechenden Fit der theoretischen Absorptionskurve lässt sich die Konzentration bestimmen. Links ist die Wasserkonzentration einer bei Raumtemperatur mit Wasser gesättigten Probe zu sehen, während rechts ein Nafionschlauch zur Dehydrierung eingesetzt wurde. Wie zu sehen ist, sorgt die Verwendung des Nafionschlauchs für eine deutlich reduzierte Wasserkonzentration in der Gasprobe.

Der Gasfluss durch die Messzelle wird durch den folgenden Massenflussregler (Typ 1179B, MKS) kontrolliert und reguliert. Der zweite Massenflussregler erlaubt die Beimischung eines zweiten Gases. Diese Konstruktion kann beispielsweise auch dazu genutzt werden, den Dynamikbereich der Absorptionsmessung zu erhöhen, der ansonsten durch die verwendete Absorptionslinie und die optischen Cavity-Eigenschaften limitiert ist.

Ein an der Zelle vorbeiführender Bypass ermöglicht eine langsame Einleitung des Gases in die Zelle, um plötzlichen starken Druckschwankungen vorzubeugen. Diese könnten den empfindlichen optischen Aufbau in der Zelle derart beeinflussen, dass es zu einer Dejustierung der Resonator-Spiegel kommen könnte. Das Gas wird über eine Öffnung in der Mitte des Glasrohrs eingelassen und über zwei Wellschläuche an den Endtöpfen abgesaugt. Für einen konstanten und im Bereich zwischen 2,7 mbar und 133 mbar regelbaren Druck wird ein Regelventil (Type 640, MKS) mit passender Kontrolleinheit verwendet. Das Regelventil befindet sich zwischen der Messzelle und einer Drehschieberpumpe (Trivac D8B, Leybold), die für den nötigen Unterdruck sorgt.

Mit diesem Aufbau lässt sich bei einem für eine Atemmessung typischen Druck von 40 mbar ein maximaler Fluss von 1100 sccm durch die Messzelle bewerkstelligen. Um

den Vorteil eines schnellen Gasaustauschs zu nutzen, liegt der typische Fluss bei Atemmessungen bei 1000 sccm. Eine Verdünnung der Gasprobe mit dem Ziel den Dynamikbereich zu erhöhen ist somit nicht möglich.

3.3 Linienauswahl

Allgemein gilt es bei der Linienauswahl zur spektroskopischen Echtzeit-Messung eines Moleküls mehrere Punkte zu beachten:

Erstens sollten die Linienstärken möglichst groß sein, um eine bestmögliche Sensitivität zu erlangen.

Zweitens sollte durch die Linienwahl eine querempfindlichkeitsfreie Messung gewährleistet sein. Das heißt, die zu untersuchende Absorptionslinie sollte nicht von Absorptionslinien anderer Moleküle überlagert werden. Das Spektrometer ist lediglich in der Lage, die Summe der Absorptionen bei einer Frequenz zu messen. Folglich wäre bei einer Überlagerung mehrerer Absorptionslinien die Selektivität der Messung nicht mehr möglich. Bei der Untersuchung von Atemluft sollte auch immer die mögliche Querempfindlichkeit zu Wasser und Kohlendioxid (CO_2) untersucht werden. Beide Moleküle kommen im Atem vor und besitzen starke Absorptionsbanden im mittleren Infrarotbereich.

Das Wasser in der Atemluft lässt sich mittels eines in Abschnitt 3.2.3 beschriebenen Nafionschlauchs größtenteils entfernen. Die Filterung von Kohlendioxid, das einen Anteil von ca. 5 % in der Ausatemluft ausmacht, gestaltet sich allerdings problematischer. Eine Kühlfalle, bei der das Probegas soweit abgekühlt wird, dass das Kohlendioxid kondensiert, empfiehlt sich nicht bei einer Online-Atemmessung. Zum einen würde die Kühlfalle die Zeitauflösung des Systems negativ beeinflussen. Zum anderen bestünde die Gefahr, dass die Kühlfalle während der Messung zufrieren könnte, wodurch der Gasfluss zur Messzelle gestoppt werden würde. Im schlimmsten Fall könnte es hier zu plötzlichen Druckschwankungen im System kommen, die die Justierung der Optiken beeinträchtigen könnte.

Daraus folgt für die Wahl der zu messenden Absorptionslinie, dass sie keinen oder nur einen sehr geringen Überlapp zu einer Absorptionslinie von CO_2 aufweisen darf. Der dritte Punkt, den es zu beachten gilt, ist die Frequenz der Absorptionslinie. Da der CO-Laser nur linienweise abstimbar ist, stehen nur einzelne spektrale Fenster mit einer Breite zwischen 8 und 18 GHz um die Laserlinien zur Verfügung. Folglich müssen die Absorptionslinien der zu untersuchenden Moleküle in diesen Fenstern



liegen. Außerdem ist noch die Laserintensität der jeweiligen Übergänge zu beachten. Eine zu geringe Intensität resultiert einerseits in einer schlechten Stabilität des Systems. Andererseits können höhere Konzentrationen in der Messzelle dazu führen, dass die Zelle „blind“ wird, also keine Leistung mehr an den Detektor gelangt, die eine Bestimmung der Abklingzeit ermöglicht.

Die Messungen dieser Arbeit beschränken sich auf das seltene ^{13}CO -Isotopolog. Unter Beachtung der oben genannten Punkte fallen drei Laserlinien auf, die mit Hilfe der Seitenbänderzeugung Spektralbereiche abdecken, die zur Untersuchung von ^{13}CO dienen können. Es handelt sich dabei um den 3P13, den 4P9 und den 4P11 Laserübergang. Abbildung 3.9 zeigt die mit den drei genannten Laserlinien spektroskopierbaren ^{13}CO -Absorptionslinien. Die aufgetragene ^{13}CO -Konzentration von 1 ppm entspricht in etwa der zu erwartenden Konzentration in der Ausatemluft, wie sie nach einer CO-Atmung vorkommt. Zur Überprüfung von möglichen Querempfindlichkeiten sind die Absorptionslinien von CO_2 und Wasser ebenfalls aufgetragen. Die zur Simulation verwendeten Konzentrationen (Wasser = 0,1 % und CO_2 = 5 %) entsprechen ebenfalls den bei einer Atemanalyse zu erwartenden Werten. Allerdings wurde bei der Wasserkonzentration die Verwendung des Nafionschlauchs vorausgesetzt.

Es ist deutlich zu erkennen, dass die 3P13 und die 4P11 Linien, auf Grund des Nichtvorhandenseins von Querempfindlichkeiten, sehr gut für die Atemanalyse eingesetzt werden können.

Der Überlapp mit der CO_2 Absorptionslinie verhindert einen sinnvollen Einsatz des 4P9 Laserübergangs, da hier eine Kühlfalle verwendet werden müsste, die die oben genannten Nachteile mit sich bringen würde.

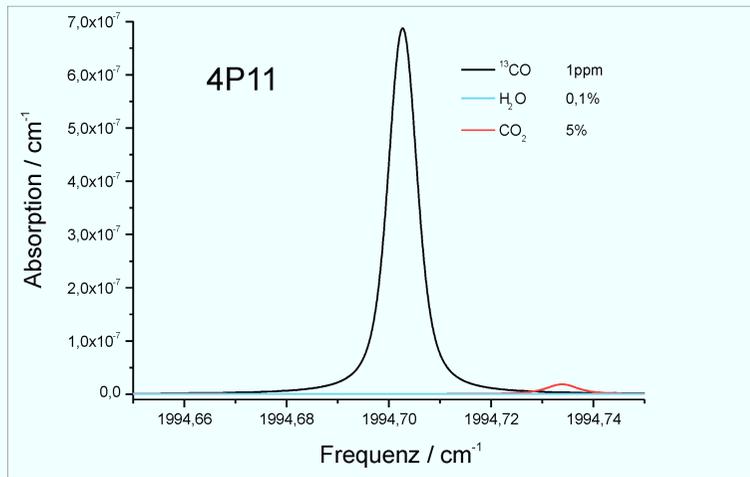
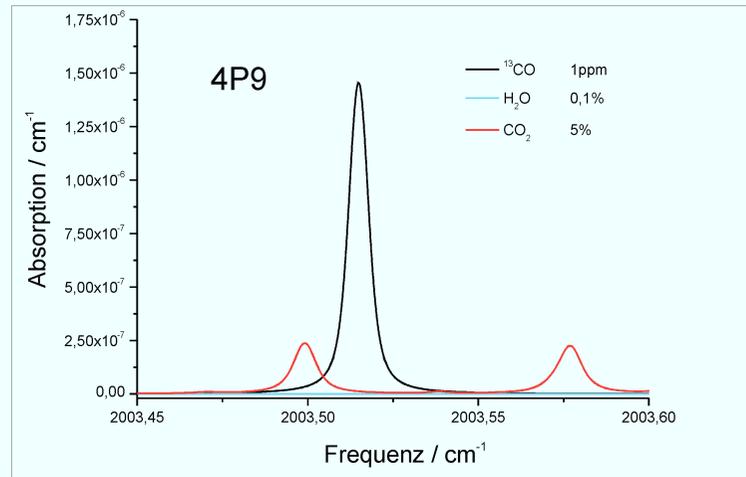
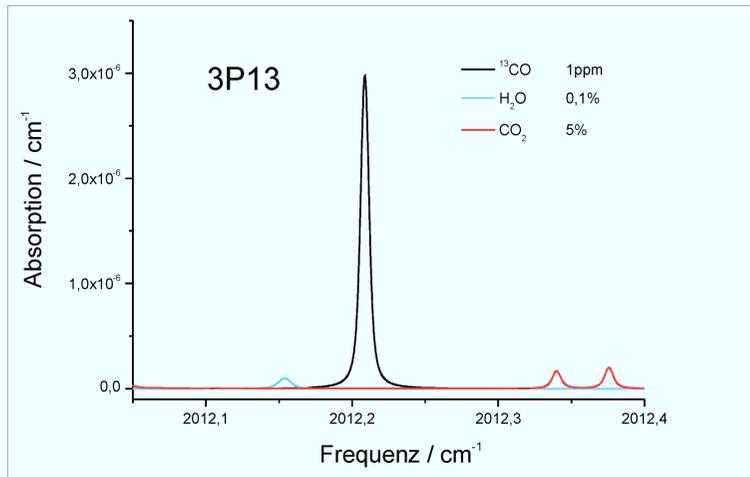


Abbildung 3.9: Linienauswahl zur ¹³CO Untersuchung (p = 40 mbar und T = 296 K). Dargestellt sind die mit den drei Laserlinien 3P13, 4P9 und 4P11 spektroskopierbaren ¹³CO-Absorptionslinien mit einer Konzentration von 1 ppm. Die Absorptionslinien von CO₂ wurden mit 5% aufgetragen, was der in der Ausatemluft vorhandenen Konzentration entspricht. Für die dargestellte Wasserabsorption wurde bereits die Verwendung des Nafionschlauchs mit einbezogen.



3.4 Transportable Temperaturstabilisierung der Messzelle

In der Dissertation von Heinrich [Hei10] wurden die Fehlerquellen des CALO-Spektrometers detailliert analysiert. Als eine der Hauptfehlerquellen wurden hierbei Temperaturvariationen an der Messzelle festgestellt. Trotz des geringen thermischen Ausdehnungskoeffizienten von Invar ($< 2 \cdot 10^{-6} \text{ K}^{-1}$) haben die damit verbundenen Längenänderungen der Zelle Einfluss auf die Stabilisierung des Resonators und die Datenaufnahmerate des Systems.

Die Datenaufnahmerate ist abhängig von der Modulationsfrequenz, mit der der Laser über die Resonanzlinie moduliert wird. Die Modulationstiefe muss dabei groß genug sein, so dass sich, selbst bei Änderungen der Resonanzfrequenz, die Laser- und die Resonanzlinie zweimal pro Periode überlagern. Schwankungen der Resonanzlinie durch temperaturbedingte Längenänderungen der Nachweiszelle bedürfen folglich höherer Modulationstiefen, die bei gleicher Modulationsfrequenz zu einer kürzeren Resonanzzeit und damit auch zu einem schlechteren Signal führen.

Den relativ langsamen thermisch verursachten Längenänderungen kann mit der Piezostabilisierung der Messzelle entgegengewirkt werden. Allerdings geht dies zu Lasten der Stabilität des Systems. Wird die Resonanzfrequenz der Zelle nämlich soweit verändert, dass sie während einer Modulationsperiode der Laserfrequenz mit dieser nicht mehr koinzident ist, so wird die Datenaufnahme gestoppt, bis das System per Hand wieder im stabilisierten Zustand „gelocked“ wird.

Ein weiteres Problem ist die Abhängigkeit der Absorptionsstärke von Temperaturänderungen. Eine Temperaturschwankung um $\pm 1^\circ\text{C}$ kann dabei zu Änderungen der Absorptionsstärke und damit zu einem Messfehler von $\pm 1,5\%$ führen. Abbildung 3.10 zeigt beispielhaft Temperaturschwankungen im Labor innerhalb von zwei Tagen. Um diese Komplikationen zu vermeiden, wurde eine Temperaturstabilisierung der Messzelle vorgeschlagen.

In den folgenden Abschnitten wird zunächst die von Heinrich gebaute Temperaturstabilisierung kurz vorgestellt und anschließend wird eine, im Rahmen dieser Arbeit, neu entwickelte und verbesserte Methode beschrieben.

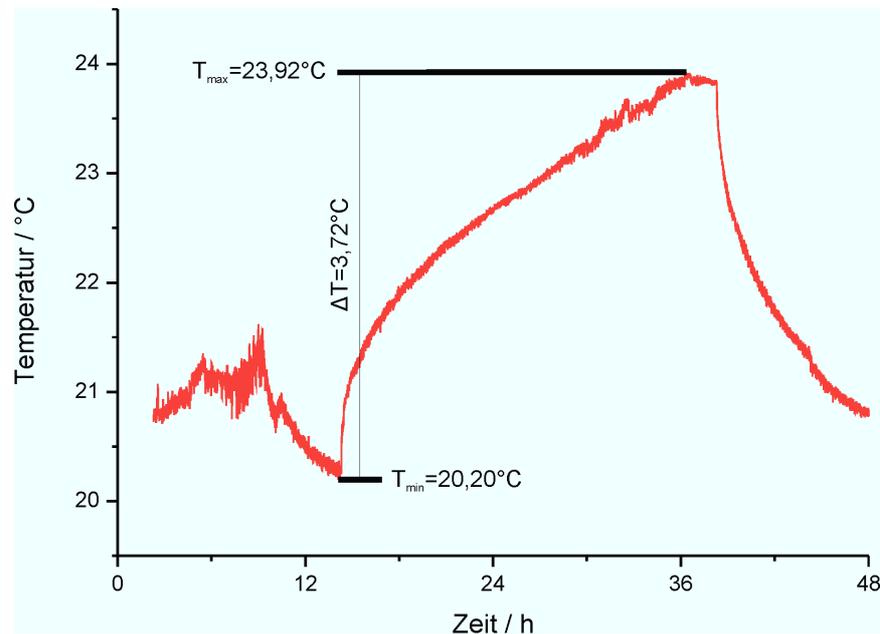


Abbildung 3.10: Temperaturschwankungen im Labor in einem Zeitraum von zwei Tagen.

3.4.1 Die bisherige Temperaturstabilisierung

Die von Heinrich entwickelte Temperaturstabilisierung ist in Abbildung 3.11 skizziert. Hierbei wurde um die Nachweiszelle eine mit Styropor umkleidete Plexiglashaube, in der sich eine Kühle Schlange befindet, aufgebaut. Die daran angeschlossene Wasserkühlung (FL300, Julabo) kann über ein LabView-Programm gesteuert werden. Zwei Lüfter unterhalb der Messzelle wälzen die Luft innerhalb der Haube um und sorgen damit für eine Verringerung des Temperaturgradienten. Die Plexiglashaube ist auf mehreren Metallstützen aufgebockt und soll, durch die damit entstehenden Öffnungen, der Wärmeabfuhr dienen.

Mit diesem Aufbau und einer aktiven Nachregulierung der Wasserkühlung wurde eine Temperaturstabilität von $\pm 0,15^{\circ}\text{C}$ über einen Zeitraum von > 3 Stunden gemessen.

Auf Grund der technisch aufwendigen und unhandlichen Wasserkühlung ist dieses System für einen angestrebten Feldeinsatz eines kompakten Spektrometers nicht geeignet. Alleine das Julabo Kühlgerät hat mit seinen Abmessungen von 25 x 50 x 60 cm die Ausmaße eines großen Desktop-PCs. Der für die aktive Steuerung des Kühlgeräts notwendige Computer erhöht das nötige Raumvolumen noch weiter. Die Kombination aus langen flexiblen Schläuchen und Metallrohren führt dazu, dass

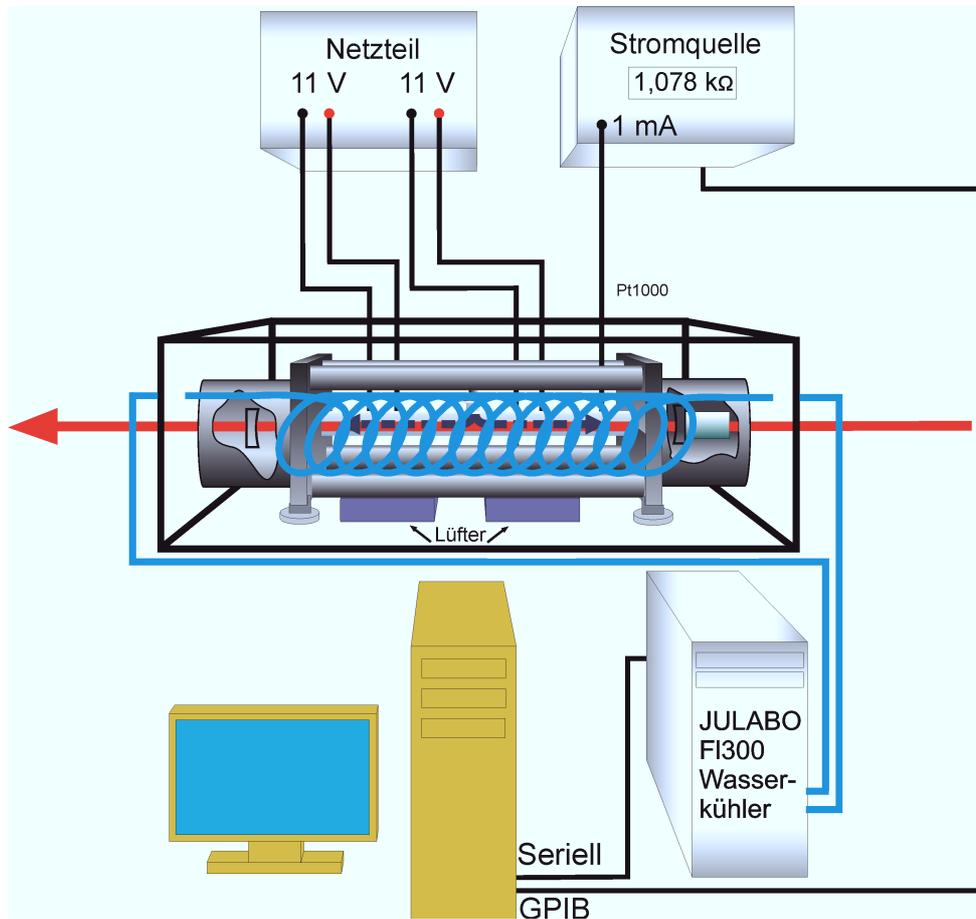


Abbildung 3.11: Aufbau der bisherigen Temperaturstabilisierung aus [Hei10]. Innerhalb einer um die Nachweiszelle aufgebauten Plexiglashaube befindet sich eine Kühlschlange, welche an eine Wasserkühlung angeschlossen ist. Diese kann von einem LabView-Programm so gesteuert werden, dass die Temperatur unter der Haube relativ konstant bleibt. Die Lüfter unterhalb der Nachweiszelle dienen der Umwälzung der Luft und somit einer Verringerung des Temperaturgradienten.

ein längerer unbeaufsichtigter Betrieb mit der Wasserkühlung höchst kritisch ist. Die Gefahr von auslaufender Flüssigkeit im Bereich höchstempfindlicher Elektronik ist beträchtlich.

Eine weitere Schwäche dieser Haube sind die großen Öffnungen, die einen ständigen Austausch der Luft unter der Haube gewährleisten. Durch diesen Austausch wird auch der Einfluss von Temperaturschwankungen außerhalb der Abdeckung auf den Bereich innerhalb der Abdeckung stark erhöht.

Das in den folgenden Abschnitten präsentierte System weist deutliche Verbesserungen hinsichtlich der oben genannten Schwächen auf.

3.4.2 Aufbau der neuen Temperaturstabilisierung

Für den Aufbau einer neuen und transportablen Temperaturstabilisierung wurde auf eine Wasserkühlung verzichtet. Statt dessen wurde ein leistungsstarkes Peltier-Element als Temperaturregulator eingesetzt. Das Peltier-Kühlgerät PK 150 der Firma Rübsamen & Herr hat eine Kühlleistung von 150 W und arbeitet in einem Temperaturbereich zwischen -10 und +60°C. Weitere technische Details zu diesem Kühlgerät können dem Datenblatt [Rub11] entnommen werden.

Peltier-Kühlelemente haben sich durch ihre kompakten Ausmaße in vielen Bereichen bewährt. So werden sie bereits erfolgreich z.B. zur Kühlung von Quantenkaskadenlasern (QCL) oder zur Temperaturregulierung hochempfindlicher Elektronik in Schaltschränken eingesetzt. Peltier-Elemente sind thermoelektrische Bauelemente. Das Funktionsprinzip beruht auf dem thermoelektrischen Effekt, der am Kontakt zwischen zwei unterschiedlich dotierten Halbleitern auftritt, wenn ein Strom durch diese Kontaktstelle fließt. Es kommt zu einem Temperaturgradienten, so dass sich die eine Seite der Kontaktstelle erwärmt, während die andere abgekühlt wird. Leitet man die entstehende Wärme mit Hilfe von Kühlkörpern ab, so sinkt die Temperatur auf der gekühlten Seite noch weiter ab. Abgesehen von Lüftern, die für eine effektive Umwälzung der Luft und einen schnellen Abtransport der Wärme sorgen, kommen Peltier-Elemente ganz ohne bewegliche Teile aus. Die Temperaturdifferenz zwischen den beiden Halbleitern, kann durch den Stromfluss genau eingestellt werden. Somit lässt sich zum einen eine sehr exakte Temperatureinstellung erreichen und zum anderen kann durch die kurzen Signal- und Reaktionswege sehr schnell Änderungen entgegengesteuert werden. Dies ermöglicht die Zieltemperatur, selbst bei plötzlichen Schwankungen durch äußere Einflüsse, konstant zu halten.

Voraussetzung für eine schnelle und exakte Regelung ist eine präzise Stromregulierung. Mit dem PRG RS H 400 der Firma Peltron wurde ein speziell auf das Peltier-Kühlelement abgestimmtes Regelgerät eingesetzt, das eine Regelgenauigkeit von < 0,1°C aufweist. Das Regelgerät hat zwei Betriebsmodi. Der erste erlaubt eine Steuerung über eine RS 232-Schnittstelle, während der zweite Modus die Steuerung lokal, direkt über die Tasten am Gerät ermöglicht. Damit entfällt in dieser Betriebsart die Notwendigkeit eines PCs mit entsprechender Schnittstelle.

Die Peltier-Einheit ist in einem die Zelle umgebenden Plexiglasgehäuse montiert. Abbildung 3.12 zeigt den skizzierten Aufbau der neuen Temperaturstabilisierung. Das Gehäuse ist aus drei Teilen aufgebaut. Die Frontplatte, in der das Peltier-Element verschraubt ist, wird an zwei Eckstücken mit Schrauben befestigt. Ein Vorteil dieser

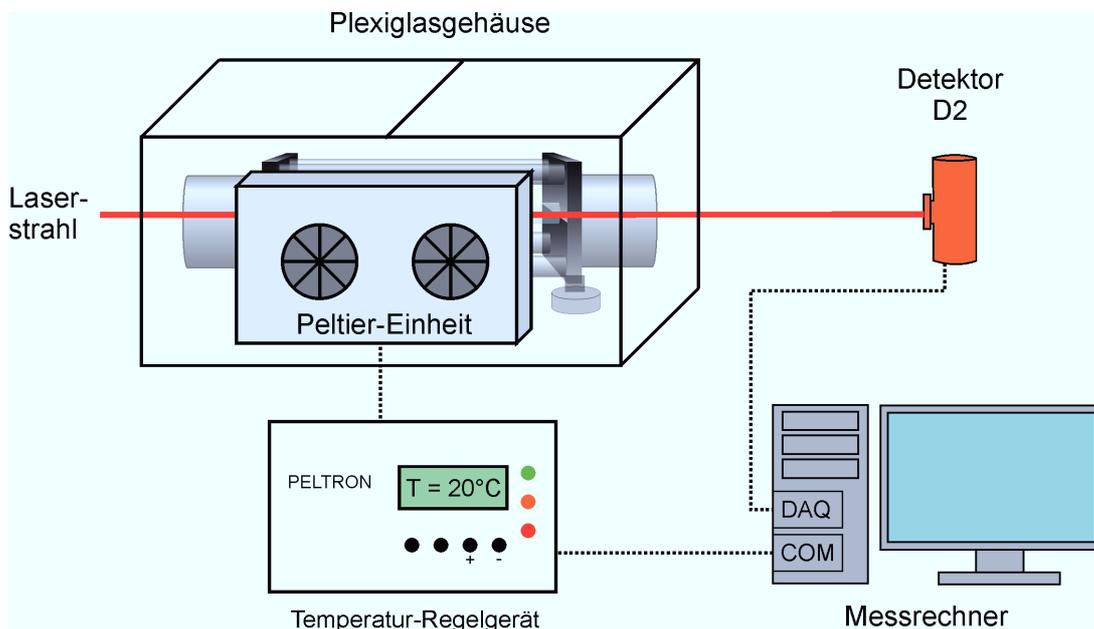


Abbildung 3.12: Aufbau der neuen Temperaturstabilisierung. Die um die Nachweiszelle aufgebaute Plexiglashaube besteht aus drei Teilen. Die Frontplatte mit dem Peltier-Kühlelement ist mit zwei Eckteilen verschraubt. Die Temperaturregelung erfolgt über ein separates Steuergerät. Sowohl an der Innen- als auch an der Außenseite des Peltier-Elements sind drehzahlsteuerbare Lüfter angebracht, die für eine optimale Verteilung der Luft innerhalb der Haube und für eine effektive Abführung der Wärme des Kühlkörpers außerhalb der Haube sorgen.

Konstruktion ist, dass man das Gehäuse leicht aufbauen kann, da man mit den zwei Eckstücken sehr gut um die Schläuche und vor allem um die Messzelle manövrieren kann. Die Gefahr gegen die Zelle zu stoßen und so die Zelle zu dejustieren ist gering. Bei dem Entwurf des Plexiglasgehäuses wurde darauf geachtet, die Öffnungen für die Schläuche und den Laser möglichst klein zu halten, um den Innenraum der Haube thermisch möglichst gut gegen die Raumluft zu isolieren. Auf Grund des hohen Gewichts des Peltier-Elements von über 7 kg weist die Haube eine sehr hohe Standfestigkeit auf. Sowohl auf der Innen-, als auch auf der Außenseite der Peltier-Einheit sind drehzahlsteuerbare Lüfter angebracht. Sie sorgen zum einen für eine optimale Verteilung der Luft innerhalb der Haube und somit für eine Verringerung des Temperaturgradienten. Zum anderen wird die Abwärme auf der Warmseite des Peltier-Elements optimal abgeführt, was der Genauigkeit und der Geschwindigkeit der Temperaturregelung entgegenkommt. In Abbildung 3.13 ist die Peltier-Einheit detailliert abgebildet.

Für eine bessere thermische Isolierung wird die Haube mit speziell angepassten

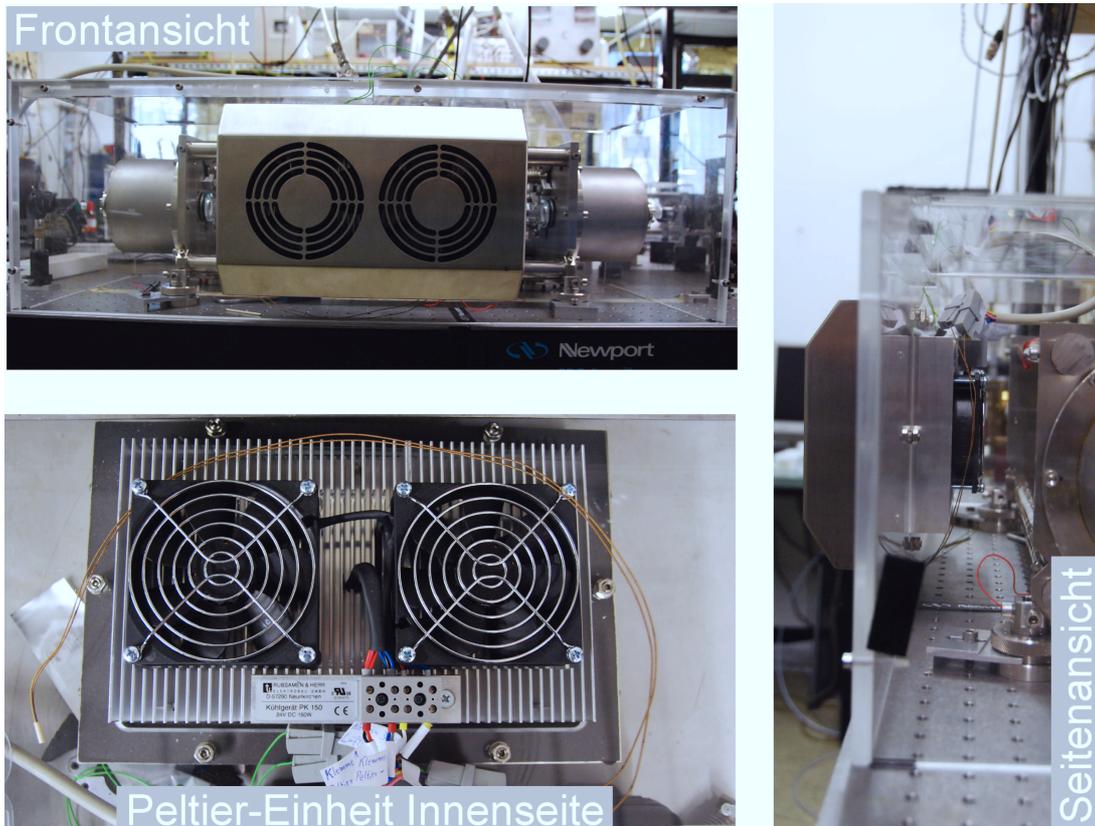


Abbildung 3.13: Detailaufnahme der Peltier-Einheit. In der Front- und in der Innenansicht sind die großen Lüfter zu erkennen, die für die Energieabfuhr aus dem Kühlelement verantwortlich sind. Die Seitenansicht verdeutlicht die Kompaktheit des neuen Systems.

Platten aus AF/Armaflex [Arm11] umkleidet. Die sehr geringe Wärmeleitfähigkeit ($\lambda_{0^\circ\text{C}} \leq 0,033 \text{ W}/(\text{m}\cdot\text{K})$) und die einfache Bearbeitungsmöglichkeit machen dieses Material zu einem optimalen Isolierungsmaterial. Ein einfaches Klettbandsystem ermöglicht eine schnelle und problemlose (De-)Montage der Isolierung.

3.4.3 Charakterisierung der neuen Stabilisierung

Eine Temperaturstabilisierung lässt sich durch unterschiedliche Eigenschaften charakterisieren. Die wichtigste Kenngröße ist die Präzision der Stabilisierung. Ein weiterer wichtiger Punkt ist der Zeitraum, über den die gleichbleibende Temperatur gewährleistet werden kann. Des Weiteren ist der Arbeitsbereich, also der Temperaturbereich auf den stabilisiert werden kann, von großem Interesse.

Um die Ergebnisse mit der vorherigen Temperaturstabilisierung vergleichen zu können, wurde der Temperatursensor an der gleichen Stelle an einem der Invar-

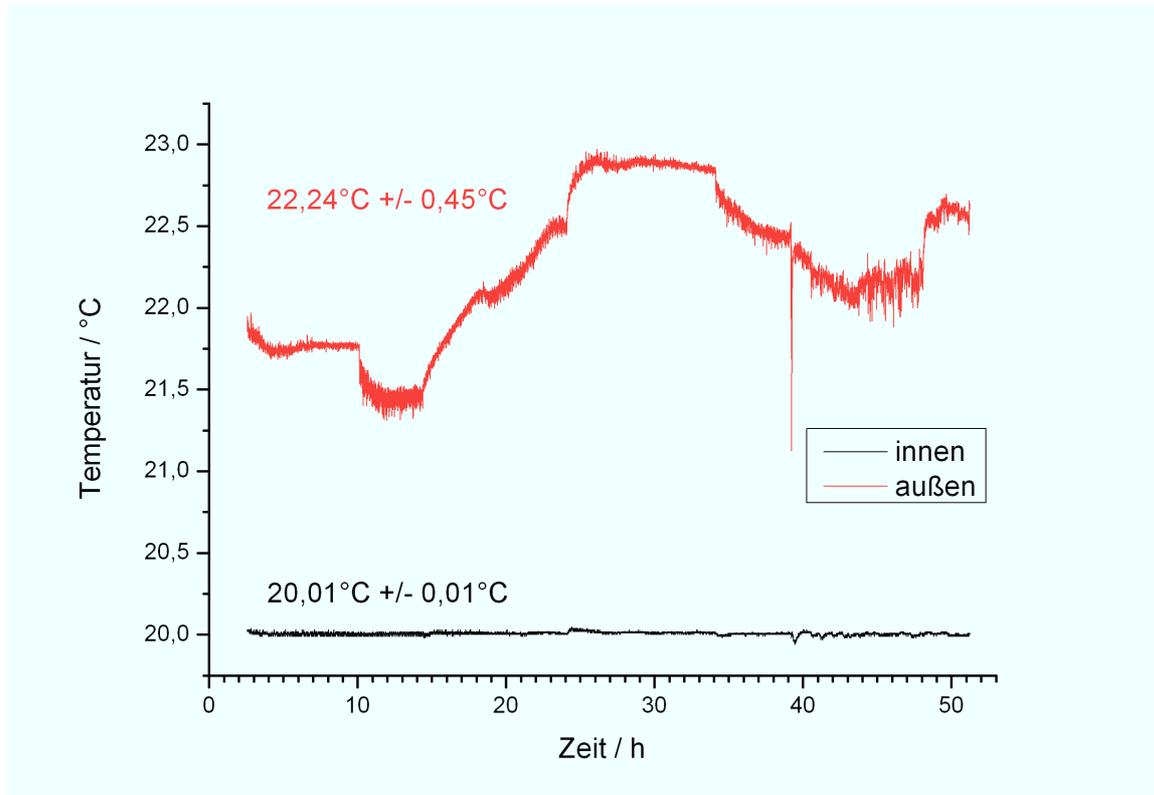


Abbildung 3.14: Temperaturverlauf mit der neuen Stabilisierung bei einer Regeltemperatur von 20°C. Die Standardabweichung über ca. 50 h beträgt 0,01°C und ist somit im Vergleich zur alten Stabilisierung um einen Faktor 15 verbessert worden. Der plötzliche Einbruch der Raumtemperatur bei ca. 40 h resultiert aus der Befüllung des Lasers mit flüssigem Stickstoff.

Stäbe angebracht wie im alten System. Alle Messungen wurden über mehrere Stunden bzw. Tage durchgeführt.

Abbildung 3.14 stellt den Temperaturverlauf innerhalb und außerhalb der Zelle für eine Regeltemperatur von 20°C dar. Die Messung umfasste einen Zeitraum > 50 h. Der plötzliche Einbruch in der Raumtemperatur bei ca. 40 h resultiert aus der Befüllung des Lasers mit flüssigen Stickstoff. Auch im Bereich unter dem Plexiglasgehäuse lässt sich zu diesem Zeitpunkt ein kleiner Dip im Graphen erkennen. Dieser, sehr viel kleinere Abfall in der Temperatur, spricht für die ausgezeichnete thermische Isolierung der Haube. Die Standardabweichung von nur 0,01°C zeigt die exzellente Qualität der Stabilisierung. Die Standardabweichung konnte hier im Vergleich zum alten System um einen Faktor 15 verbessert werden.

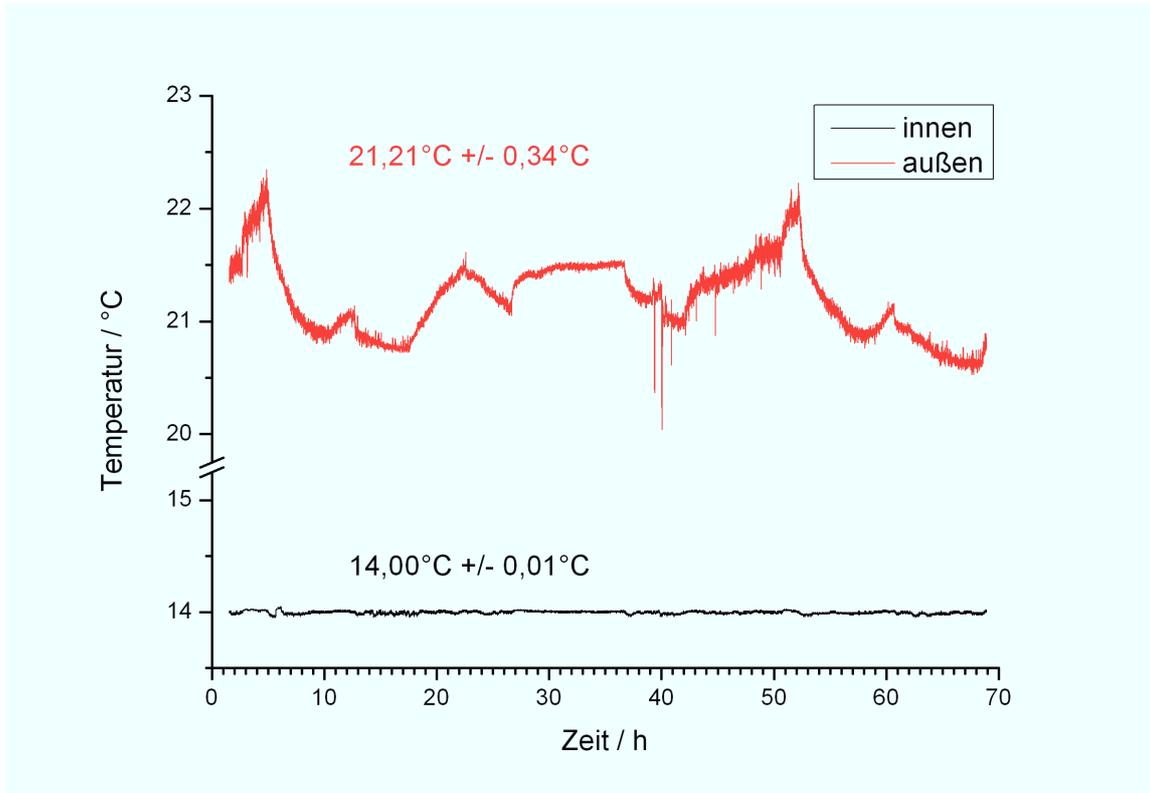


Abbildung 3.15: Temperaturverlauf mit der neuen Stabilisierung bei einer Regeltemperatur von 14°C.

Der Regelbereich wurde experimentell zwischen 14°C und 36°C bestimmt, siehe Abbildung 3.15 und 3.16. Wobei diese Grenzen nicht die Leistungsgrenzen des Peltier-Elements darstellen. Vielmehr lässt sich bei diesen Temperaturen das Spektroskopiesystem ideal einsetzen. Der obere Grenzwert von 36°C entspricht annähernd der Temperatur der Ausatemluft und würde sich somit ideal für Experimente eignen, bei denen die zu untersuchende Atemprobe keinen thermischen Schwankungen unterliegen sollte. Im Falle der CO-Analyse ist ein solcher Aufwand allerdings nicht erforderlich. Der untere Grenzwert ergibt sich aus einem Kondensationsproblem bei tieferen Temperaturen. Bereits bei ca. 12°C Regeltemperatur kam es nach ca. 2h zu einer starken Bildung von Kondensationswasser. Abbildung 3.17 zeigt den Temperaturverlauf dieser Messung. Trotz alledem zeigt die Temperaturregelung selbst in diesem Temperaturbereich bei ca. 9,5°C unter der Raumtemperatur noch eine bemerkenswerte Stabilität von $\pm 0,02^\circ\text{C}$. Durch einen effektiven Luftentfeuchter innerhalb des Plexglasgehäuses ließe sich die Regelung folglich auch bei diesen niedrigen Temperaturen sehr gut einsetzen.

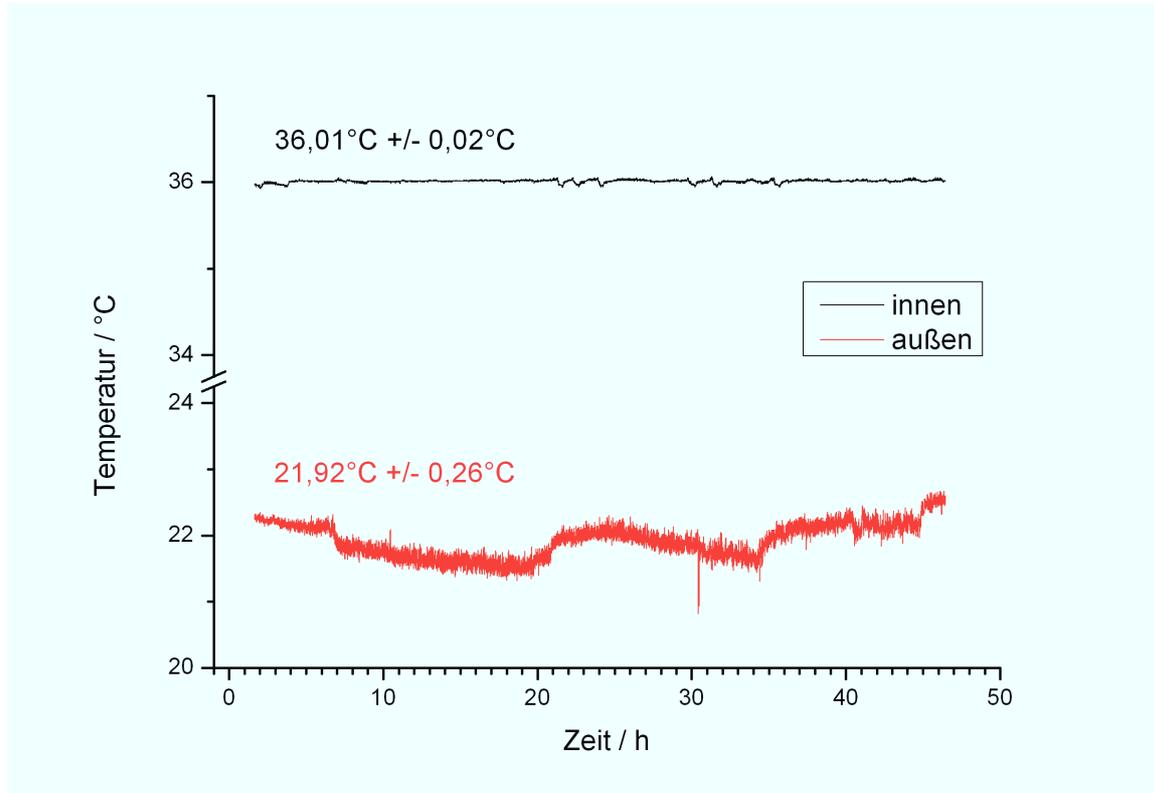


Abbildung 3.16: Temperaturverlauf mit der neuen Stabilisierung bei einer Regeltemperatur von 36°C.

Bezogen auf die Dauer über die eine Temperatur konstant gehalten werden kann, haben die obigen Ergebnisse bereits gezeigt, dass es ohne Weiteres möglich ist, die Temperatur über viele Stunden hinweg konstant zu halten. Dies ist unter anderem dann notwendig, wenn Versuchsreihen lange dauern oder aber wenn an verschiedenen Tagen Messungen durchgeführt werden sollen. Einerseits wird durch die konstante Temperatur eine erhöhte Vergleichbarkeit der Messungen ermöglicht. Andererseits wird durch das thermische Entkoppeln der Messzelle verhindert, dass diese sich durch die Temperaturschwankungen im Labor über mehrere Tage hinweg dejustiert. In Abbildung 3.18 ist eine Messung über 5,5 Tage hinweg dargestellt. Trotz der überaus großen Schwankungen der Raumtemperatur von fast 4°C konnte die Temperatur innerhalb des Plexiglasgehäuses auf $\pm 0,01^\circ\text{C}$ konstant gehalten werden. Die eingestellte Temperatur von 16°C wurde gewählt, um zu zeigen, dass die Regelung auch bei relativ großen Temperaturunterschieden zur Umgebungsluft sehr gut funktioniert.

Die obigen Ergebnisse zeugen von einer überragenden Qualität der neuen Tempera-

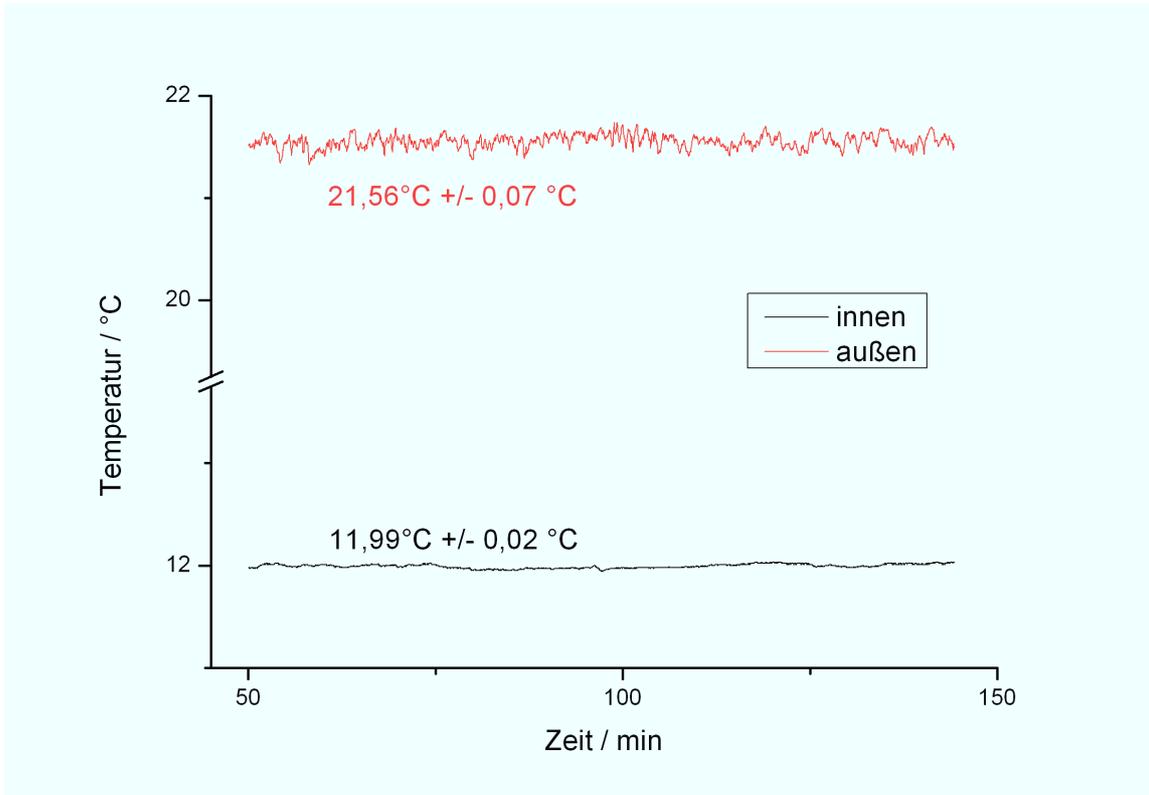


Abbildung 3.17: Temperaturverlauf mit der neuen Stabilisierung bei einer Regeltemperatur von 12°C. Der Versuch wurde nach gut 2 Stunden abgebrochen, da es zu einer starken Bildung von Kondensationswasser unter der Plexiglashaube kam. Die geringe Standardabweichung von 0,02°C zeigt aber auch hier die außerordentliche Qualität der neuen Stabilisierung.

turstabilisierung, was die Genauigkeit, den Regelbereich und auch die Betriebsdauer angeht.

Mit diesem kompakten System ist eine transportable Temperaturstabilisierung für Nachweiszellen entwickelt worden, die selbst den Ansprüchen für einen Feldeinsatz gerecht werden würde. Für einen solchen ist es besonders wichtig die Temperatur um die Nachweiszelle herum möglichst gut von der Umgebungstemperatur zu entkoppeln. Die oben gezeigten großen Temperaturdifferenzen zwischen Raum- und Regeltemperatur zeigen, dass dieses System den Ansprüchen absolut gewachsen ist.

Die Genauigkeit der neuen Temperaturstabilisierung führt außerdem zu einer weiteren Verringerung des Fehlers bei der Konzentrationsbestimmung. Geht man von der in den obigen Messreihen maximalen Temperaturschwankung von $\pm 0,02^\circ\text{C}$ aus, so entspricht dies einem Fehler von $\pm 0,04\%$ des Messwertes beim P25-Übergang von ^{13}CO .

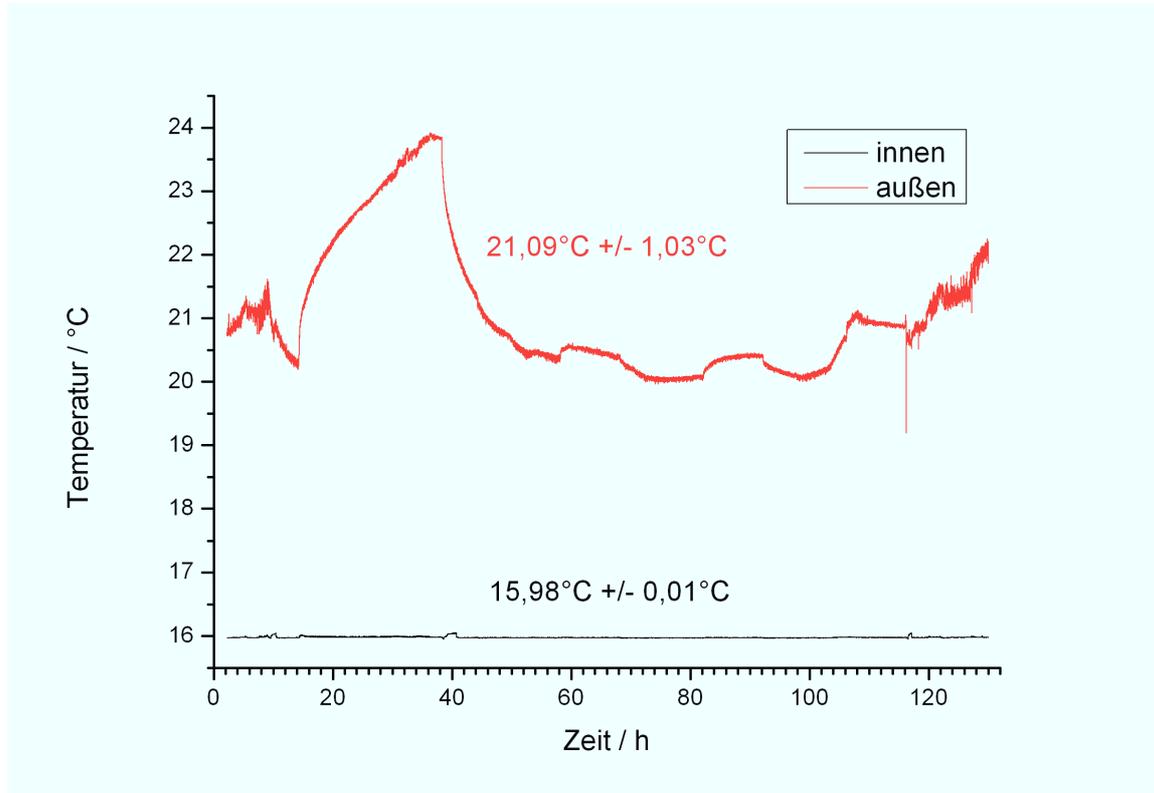


Abbildung 3.18: Langzeitstabilität der neuen Stabilisierung bei einer Regeltemperatur von 16°C.

3.5 Dynamikbereich des Spektrometers

Der Dynamikbereich des Spektrometers ist sowohl durch ein unteres als auch durch ein oberes Detektionslimit gekennzeichnet. Das untere Detektionslimit gibt die kleinste noch messbare Konzentration an, während das obere die höchste noch fehlerfrei messbare Konzentration bezeichnet. Im Folgenden wird das System hinsichtlich beider Grenzwerte bezogen auf CO-Messungen charakterisiert.

3.5.1 Unteres Detektionslimit

Das untere Detektionslimit in Bezug auf die Konzentrationsbestimmung ist von verschiedenen Faktoren abhängig. Die Stärke der detektierten Absorptionslinie hat einen direkten Einfluss auf die Nachweisgrenze. Im Allgemeinen wird deshalb der kleinste detektierbare Absorptionskoeffizient als Nachweisgrenze angegeben und dann in die entsprechende Konzentration umgerechnet. Auf diese Weise können unterschiedliche Systeme durch den Absorptionskoeffizienten verglichen werden. Die Verwendung der

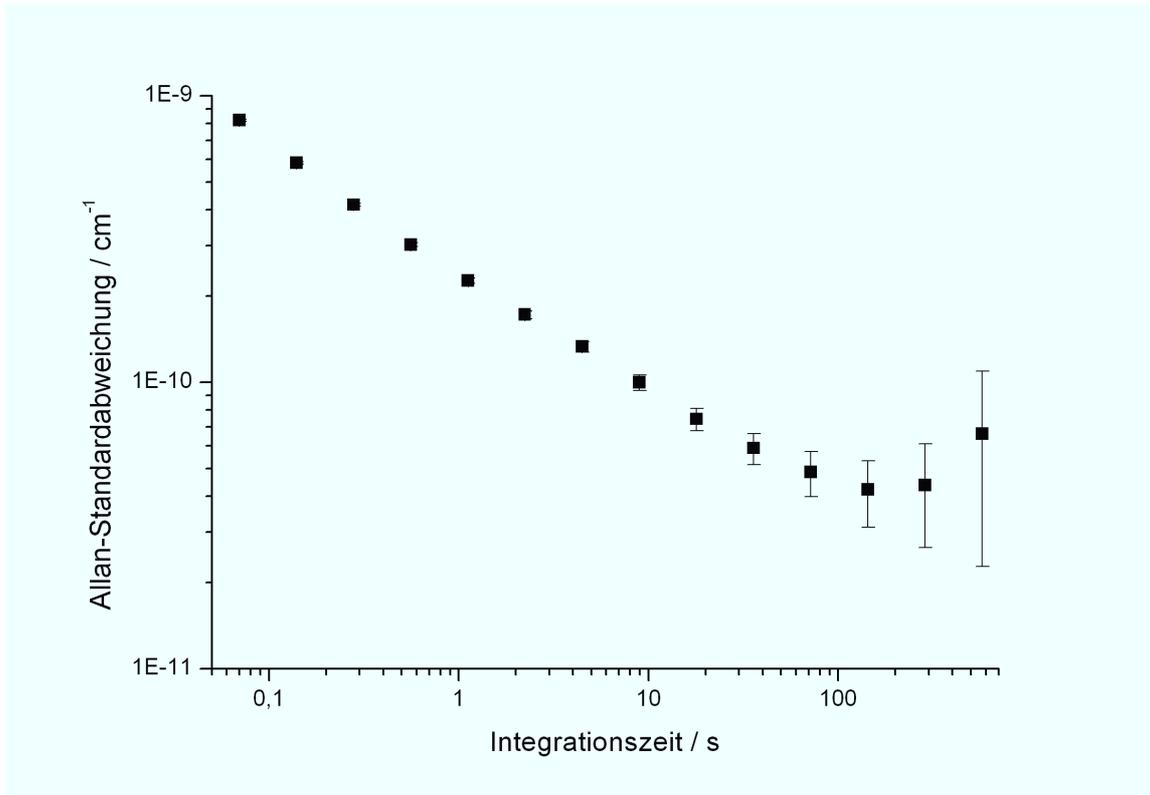


Abbildung 3.19: Allan-Varianz-Messung mit Temperaturstabilisierung (20°C) auf der 4P11 Laserlinie.

Allan-Varianz-Bestimmung hat sich als die Standardmethode zur Bestimmung der Nachweisgrenze im Bereich der Laserabsorptionsspektroskopie bewährt. Neben der absoluten Nachweisgrenze gibt sie auch die nötige bzw. optimale Mittelungszeit an. Für ein optimales Detektionslimit ist die Stabilität des Systems entscheidend. Ein zu hohes Rauschen oder ein Drift der Messdaten wirkt sich negativ aus. Mit der in Abschnitt 3.4.2 vorgestellten neuen Temperaturstabilisierung und der in Abschnitt 3.1.2 präsentierten Erhöhung der Laserleistung konnten diese Faktoren deutlich reduziert werden.

Abbildung 3.19 zeigt das Ergebnis einer Allan-Varianz-Messung bei der 4P11 Laserlinie für den P25-Übergang von ¹³CO. Die optimale Integrationszeit liegt hier bei 143 s wobei ein minimaler rauschäquivalenter Absorptionskoeffizient von $4,22 \cdot 10^{-11} \text{ cm}^{-1}$ nachgewiesen werden kann. Dies entspricht einer Nachweisgrenze von 0,066 ppb für ¹³CO. Selbst bei einer für die Atem- bzw. Onlinediagnostik relevanten Integrationszeit von 1 s sind noch Absorptionen bis hinab zu $2,27 \cdot 10^{-10} \text{ cm}^{-1}$ detektierbar. Daraus ergibt sich eine Nachweisgrenze von ca. $0,36 \text{ ppb} \cdot \text{Hz}^{-1/2}$. Ein solches Limit war früher



nur auf dem P21-Übergang von ^{13}CO zu erreichen [Fri08a], der mehr als 4-mal so stark ist, wie der hier verwendete P25-Übergang.

Die Verwendung der P25-Linie hat den Vorteil, dass die am Detektor ankommende Laserintensität deutlich höher ist, als die bei der P21-Linie. Der Vorteil äußert sich dabei in einem größeren Dynamikbereich, der sich durch eine höhere maximal messbare Konzentration ergibt.

3.5.2 Oberes Detektionslimit

Das obere Detektionslimit ist insbesondere dann von Interesse, wenn verhältnismäßig hohe Konzentrationen gemessen werden sollen. Dies kann beispielsweise bei Messungen, in denen die Ausatemkonzentration des zu untersuchenden Moleküls künstlich erhöht wird, der Fall sein. Beispiele für solche Messungen sind in Kapitel 4 aufgeführt.

Der obere Grenzwert ergibt sich spätestens dann, wenn die am Detektor ankommende Laserleistung nicht mehr den eingestellten Schwellenwert erreicht, der das Abschalten der Seitenbänder auslöst. Dies geschieht, wenn die Absorption in der Messzelle, z.B. auf Grund sehr hoher Konzentrationen, so groß ist, dass die Zelle „blind“ wird. In der Dissertation von Heinrich [Hei10] wurde allerdings gezeigt, dass auf Grund von Bandbreiteneffekten der Detektor-Verstärker-Kombination und auf Grund des Fit-Algorithmus bereits bei Abklingzeiten mit $\tau < 10 \mu\text{s}$ eine Abweichung zwischen Messwert und tatsächlicher Konzentration mit abnehmendem τ zunimmt. Unter Verwendung von Gleichung 2.17 und der Kenntnis um die Abklingzeit τ_0 bei der verwendeten Laserlinie lässt sich für jede Laserlinie das entsprechende obere Detektionslimit ermitteln. Für die 3P13 Laserlinie liegt das obere Limit demnach bei $\alpha_{max} = 2,325 \cdot 10^{-6} \text{cm}^{-1}$. Umgerechnet auf den bei dieser Linie detektierbaren P21-Übergang von ^{13}CO gleicht dies etwa 0,79 ppm.

Eine Möglichkeit, die maximal messbare Konzentration zu erhöhen, ist das Wechseln auf eine schwächere Absorptionslinie, da hier bei gleichem α_{max} eine höhere Konzentration gemessen wird. Dabei ist zu beachten, dass auf diese Weise in der Regel auch das untere Detektionslimit abnimmt. Durch die bereits erwähnten Verbesserungen am System, insbesondere die Laserleistung betreffend, konnte jedoch die Performance für die 4P11 Laserlinie deutlich verbessert werden. Das untere Detektionslimit bei dabei verwendetem P25-Übergang von ^{13}CO gleicht in etwa dem vom P21-Übergang, der von der 3P13 Laserlinie erreicht wird. Wegen des im vorherigen Abschnitts bereits angesprochenen Unterschieds in der Linienstärke zwischen beiden Übergängen

ist das obere Detektionslimit auf dem P25-Übergang mit 3,66 ppm deutlich höher. Somit ist es nun möglich, sowohl kleinste Konzentrationen im ppb-Bereich als auch Konzentrationen bis 3,66 ppm ohne einen umständlichen und zeitraubenden Wechsel der Laserfrequenz zu messen.

Sollte es aber nötig sein, diesen Grenzwert noch weiter zu erhöhen, so muss die Konzentration des Probegases, z.B. durch Verdünnen mit Stickstoff, reduziert werden.

3.5.3 Erweiterung des Dynamikbereichs durch eine neue Druckregelung

In dem das Gassystem beschreibenden Abschnitt 3.2.3 wird ein maximal regelbarer Fluss von 1100 sccm bei einem Zellendruck von 40 mbar festgestellt. Bei Atemmessungen wird in der Regel mit einem Gasfluss von 1000 sccm gearbeitet, um eine Zeitauflösung < 1 s zu gewährleisten. Es ist offensichtlich, dass mit dem bisherigen Gassystem keine entscheidende Verdünnung des Probegases möglich ist, ohne Einbußen in Bezug auf die Zeitauflösung hinnehmen zu müssen. Der limitierende Punkt im Gassystem ist die Druckregelung und die Förderleistung der Vakuumpumpe.

Der Austausch der Drehschieberpumpe (Trivac D8B, Leybold) mit einer doppelt so starken Pumpe (Trivac D16B, Leybold) zeigte keinen positiven Einfluss. Der Grund hierfür ist in dem kleinen Ventilquerschnitt des Druckregelventils zu finden. Selbst bei komplett geöffnetem Ventil ist kein höherer Fluss als 1100 sccm bei einem stabilen Druck von 40 mbar möglich.

Der Austausch der Druckregelung durch ein Ventil (253B-1-40-1, MKS) mit einem Innendurchmesser von 32 mm und einem passenden Baratron (722B12MGA2FC, MKS) erlaubt bei ansonsten gleich gebliebenen Gaszuleitungen mit den entsprechenden Gasflussreglern (Typ 1179B53, MKS) einen maximalen Durchfluss von 4000 sccm. Abbildung 3.20 zeigt ein Foto der entscheidenden Komponenten. Mit Hilfe dieser Druckregelung lässt sich bei der Verwendung der gleichen Absorptionslinie die maximal messbare Konzentration durch Verdünnung nochmals vervierfachen. Somit ist eine maximale ^{13}CO -Konzentration von fast 15 ppm im Atemgasbetrieb messbar. Dies ist absolut ausreichend um selbst stark mit ^{13}CO angereicherte Atemluft noch zu diagnostizieren.

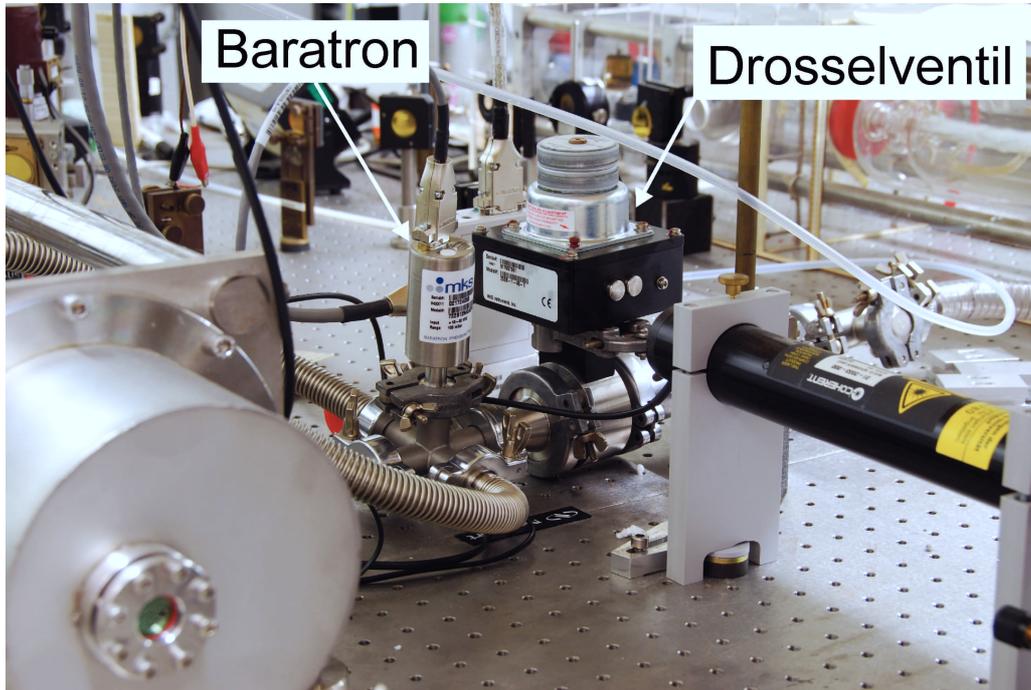


Abbildung 3.20: Foto der zentralen Elemente der neuen Druckregelung. Der maximale Durchfluss durch die Messzelle bei einem Druck von 40 mbar ließ sich durch die neuen Elemente von vorher 1100 sccm auf 4000 sccm erhöhen.

3.6 Zusammenfassung

In diesem Kapitel wurden die grundlegenden Elemente und Aufbauten des Spektrometers beschrieben.

Zu Beginn des Kapitels wurde der CO-Gaslaser vorgestellt. Dabei wurden die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Optimierungsarbeiten bezogen auf die Laserleistung präsentiert. Im Vergleich zu den letzten Optimierungen des CO-Lasers konnte durch eine verbesserte Justierung über ein neues Detektorsystem die maximale Ausgangsleistung um ca. 46 % erhöht werden. Die daraus resultierenden Leistungsänderungen der verschiedenen Emissionslinien ergaben die Möglichkeit auf dem P25-Übergang von ^{13}CO Messungen mit einer Genauigkeit durchzuführen, die früher nur auf dem mehr als 4-mal so starken P21-Übergang möglich waren. Die Verwendung des schwächeren Übergangs ging zusätzlich mit einer Erhöhung der maximal messbaren Konzentration einher, so dass der Dynamikbereich des Systems vervierfacht werden konnte.

Eine ebenfalls vorgestellte neue Druckregelung, erlaubt für die Atemmessung eine weitere Erhöhung des oberen Grenzwertes um einen Faktor von 4, ohne Einbußen in

Bezug auf die Zeitauflösung hinnehmen zu müssen.

Durch eine neue Temperaturstabilisierung ließ sich die Performance des Systems vor allem in Bezug auf das untere Detektionslimit deutlich verbessern. Mit einer Integrationszeit von 143 s lassen sich damit ^{13}CO -Konzentrationen bis zu 0,066 ppb nachweisen. Diese neue Stabilisierung erlaubt eine konstante Temperatur in der Umgebung der Nachweiszelle mit einer maximalen Genauigkeit von $\pm 0,01^\circ\text{C}$ zu halten.

Durch den neuen kompakten Aufbau und den relativ großen Arbeitsbereich zwischen 14°C und 36°C eröffnen sich viele Einsatzmöglichkeiten, unter anderem auch außerhalb klimatisierter Labore. Die bemerkenswerte Langzeitstabilität des neuen Systems erlaubt es Messreihen über mehrere Tage hinweg durchführen zu können, ohne dass die Zelle durch Temperaturschwankungen beeinflusst wird. Bei einer Regeltemperatur von 16°C konnte eine Stabilität von $\pm 0,01^\circ\text{C}$ über 5,5 Tage aufrechterhalten werden.

Durch die erhöhte Temperaturstabilität reduziert sich der temperaturbedingte Fehler bei der Konzentrationsbestimmung auf nur noch $\pm 0,04\%$ des Messwertes.

4 tHb-Bestimmung

In Abschnitt 2.5 wurden bereits einige Grundlagen zur Bestimmung der Hämoglobingesamtmasse mittels einer CO-Analyse erläutert. Die aktuellen Forschungsstudien, die in dem Abschnitt vorgestellt wurden, verwendeten natürliches CO als Markermolekül. Wie bereits erläutert wurde, bringen die Methoden auf Grund der hohen Mengen an verwendetem CO einige Nachteile mit sich.

In diesem Kapitel wird eine Methode vorgestellt, die ebenfalls CO als Markermolekül zur tHb-Bestimmung einsetzt; hier wird jedoch das seltene ^{13}CO -Isotopolog verwendet. Der Anteil von ^{13}CO beträgt in der natürlichen CO-Zusammensetzung lediglich 1,1 %. Der enorme Vorteil liegt darin, dass bereits kleinste Mengen an eingeatmeten ^{13}CO ausreichen, um relativ große Änderungen der ^{13}CO -Ausatemkonzentration und der $^{13}\text{COHb}$ -Konzentration zu bewirken. Die Bestimmung von tHb mit ^{13}CO erfolgt analog zu Gleichung 2.4 mit:

$$tHb = V_{13CO} \cdot (\Delta^{13COHb} \cdot 1,306)^{-1} . \quad (4.1)$$

Die in diesem Kapitel beschriebenen Methoden zur Bestimmung der Hämoglobingesamtmasse mittels ^{13}CO lassen sich in folgende Schritte zusammenfassen:

1. $^{13}\text{COHb}$ -Bestimmung aus der Atemluft
2. ^{13}CO -Einatmung
3. Bestimmung der aufgenommenen ^{13}CO -Menge (V_{13CO})
4. $^{13}\text{COHb}$ -Bestimmung aus der Atemluft nach der CO-Atmung
5. Berechnen von tHb

Im Folgenden werden diese einzelnen Schritte und ihre Durchführung erläutert. Zum letzten Punkt werden Messreihen präsentiert, die die Leistung der hier entwickelten Methoden bezüglich Reproduzierbarkeit und Genauigkeit evaluieren.

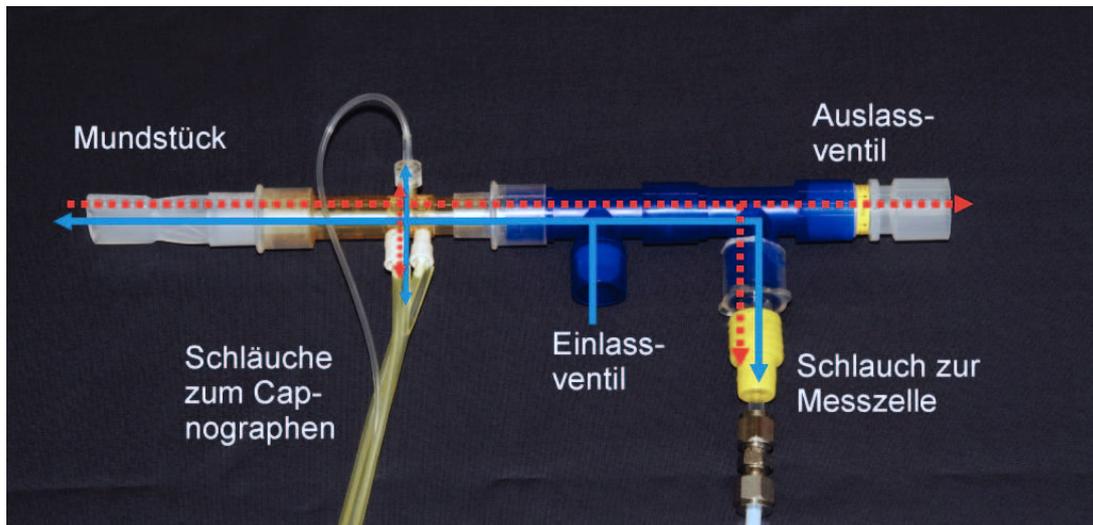


Abbildung 4.1: Mundstück zur Online-Atemmessung. Die Pfeile verdeutlichen den Weg der Gasprobe. Der angeschlossene Capnograph (Capnomac Ultima, Datex Ohmeda) übermittelt den Atemfluss, die O_2 - und die CO_2 -Konzentration an den Messrechner.

4.1 $^{13}\text{COHb}$ -Messung

Die $^{13}\text{COHb}$ -Bestimmung folgt aus der Haldane-Gleichung 2.1 durch die Messung der ^{13}CO -Ausatemkonzentration und der entsprechenden O_2 -Konzentration. Die Messungen der CO -Konzentrationen werden mit dem CALOS-System auf der 4P11 Laserlinie bei einem Druck von 40 mbar in der Messzelle und einem Fluss von 1000 sccm durchgeführt. Der Aufbau des Gassystems entspricht der Darstellung in Abbildung 3.7. Zur Atemgasmessung wird ein Mundstück verwendet, wie es in Abbildung 4.1 zu sehen ist. Das Mundstück ist zum einen über einen Nafionschlauch mit der Messzelle und zum anderen mit einem Capnographen verbunden. Der Capnograph (Capnomac Ultima, Datex Ohmeda) dient zur Messung des Atemflusses, der O_2 - und der CO_2 -Konzentration. Die Daten werden an den Messrechner übertragen und in der Datei mit den Daten der CALOS-Messung gespeichert.

Um die O_2 - und ^{13}CO -Konzentrationen in der Ausatemluft der Testpersonen festzustellen, müssen die Probanden durch das Mundstück atmen. Die Haldane-Gleichung gilt nur für einen Gleichgewichtszustand im Alveolenbereich bei dem die Gaskonzentrationen nahezu unverändert bleiben. Dieser Zustand wird bei einer normalen Atmung nicht erreicht. Aus diesem Grund wurde eine Atemdirektive eingeführt, so dass am Ende eines jeden solchen Ausatemprozesses der beschriebene Gleichgewichtszustand erreicht wird. Die feste Atemdirektive bietet den weiteren Vorteil, dass die

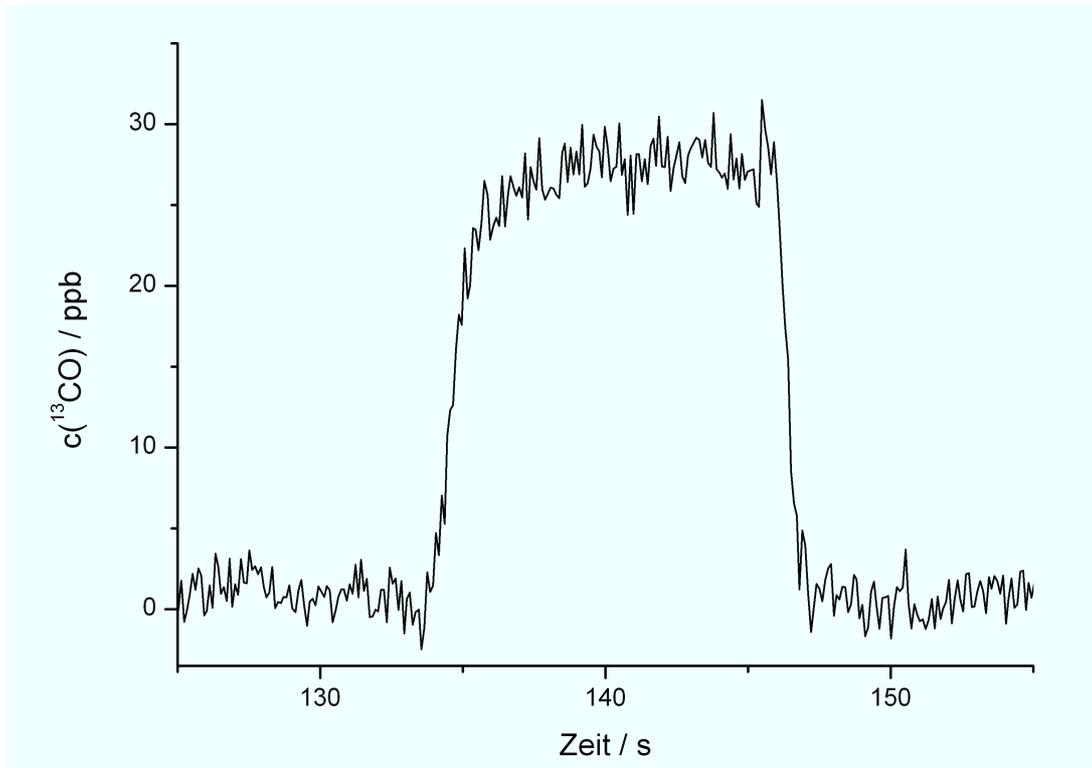


Abbildung 4.2: Beispiel einer CO-Ausatemkurve unter Anwendung der Atemdirektive: Einatmen; 15 s Luft anhalten; Ausatmen mit einem Atemfluss von 20 l/min.

Messdaten gut reproduzierbar sind und Unterschiede zwischen verschiedenen Testpersonen durch individuelle Ausatemmuster minimiert werden. Die Atemdirektive lautet wie folgt:

1. Einatmen durch das Mundstück
2. 15 s Luft anhalten
3. Ausatmen mit einem Atemfluss (\dot{V}) von 20 l/min.

Die Probanden können den Atemfluss selber am Computermonitor beobachten und dementsprechend auch gut regulieren. Die durch die Atemdirektive erreichten CO-Exhalationskurven weisen relativ lange Alveolarplateaus auf, wie in Abbildung 4.2 zu sehen ist. Das langgezogene Alveolarplateau ist erstens ein Zeichen dafür, dass die Alveolen der Ursprung des Kohlenmonoxids sind und zweitens ist die nahezu gleichbleibende CO-Konzentration ein Zeichen für ein stabiles Gleichgewicht des Gasaustauschs.

Da es relativ schwierig ist, einen konstanten Atemfluss zu halten, kommt es hier zu



Schwankungen. Der gewählte Atemfluss von 20 l/min erlaubt dabei Abweichungen von bis zu +3 l/min und bis zu -7 l/min ohne die CO-Konzentration signifikant zu ändern. Der Artikel von Fritsch [Fri07] zeigt, dass für Atemflüsse zwischen 13 l/min und 23 l/min die maximale CO-Konzentration nahezu gleich ist.

Die Berechnung der $^{13}\text{COHb}$ -Konzentration erfolgt mit dem in [Fri08a] vorgestellten LabView-Programm. Mit diesem Programm werden zunächst die Datensätze (^{13}CO , CO_2 , O_2 und \dot{V}) der einzelnen Atemzüge extrahiert. Die durch die unterschiedlichen Gastransportwege bedingte zeitliche Verschiebung der Daten wird per Hand korrigiert. Die $^{13}\text{COHb}$ -Berechnung erfolgt mit der Haldane Gleichung aus der Mittelung über den letzten Teil des ^{13}CO - und O_2 -Alveolarplateaus.

In der vorliegenden Arbeit werden zur Verbesserung der Reproduzierbarkeit die ^{13}CO -Maximalkonzentrationen und nicht die Mittelung über einen Anteil der CO-Kurve zur Berechnung verwendet. Dies hängt damit zusammen, dass die zeitlich verschobenen Datensätze (^{13}CO , CO_2 , O_2 und \dot{V}) nicht immer gleich zueinander angepasst werden können. Ein weiterer Faktor ist die unterschiedliche Form und Länge der Exhalationskurven von verschiedenen Probanden. Die rauschbereinigte ^{13}CO -Maximalkonzentration stellt hier eine weitaus unabhängige Größe dar.

Um den Einfluss durch Unterschiede zwischen einzelnen Exhalationen auf die $^{13}\text{COHb}$ -Konzentration zu minimieren, werden 6–8 Atemzüge aufgenommen und gemittelt.

4.2 ^{13}CO -Atmung

Die CO-Atmung ist ein zentraler Punkt der tHb-Bestimmung. Zum einen wirken sich Fehler im $V_{13\text{CO}}$ stark auf den zu berechnenden tHb-Wert aus, zum anderen spielt die Handhabung der CO-Verabreichung eine wichtige Rolle. Je nach Verabreichungsart kann die CO-Atmung nur wenige Sekunden oder aber einige Minuten dauern. Im Folgenden werden zwei verschiedene Varianten präsentiert. Die erste, als alte Methode bezeichnet, wurde während der, dieser Arbeit vorausgehenden, Diplomarbeit [Sow08] entwickelt und evaluiert. Die zweite Methode beschreibt eine Weiterentwicklung, die zum einen die Dauer der Messung reduziert und zum anderen die Fehleranfälligkeit herabsetzt.

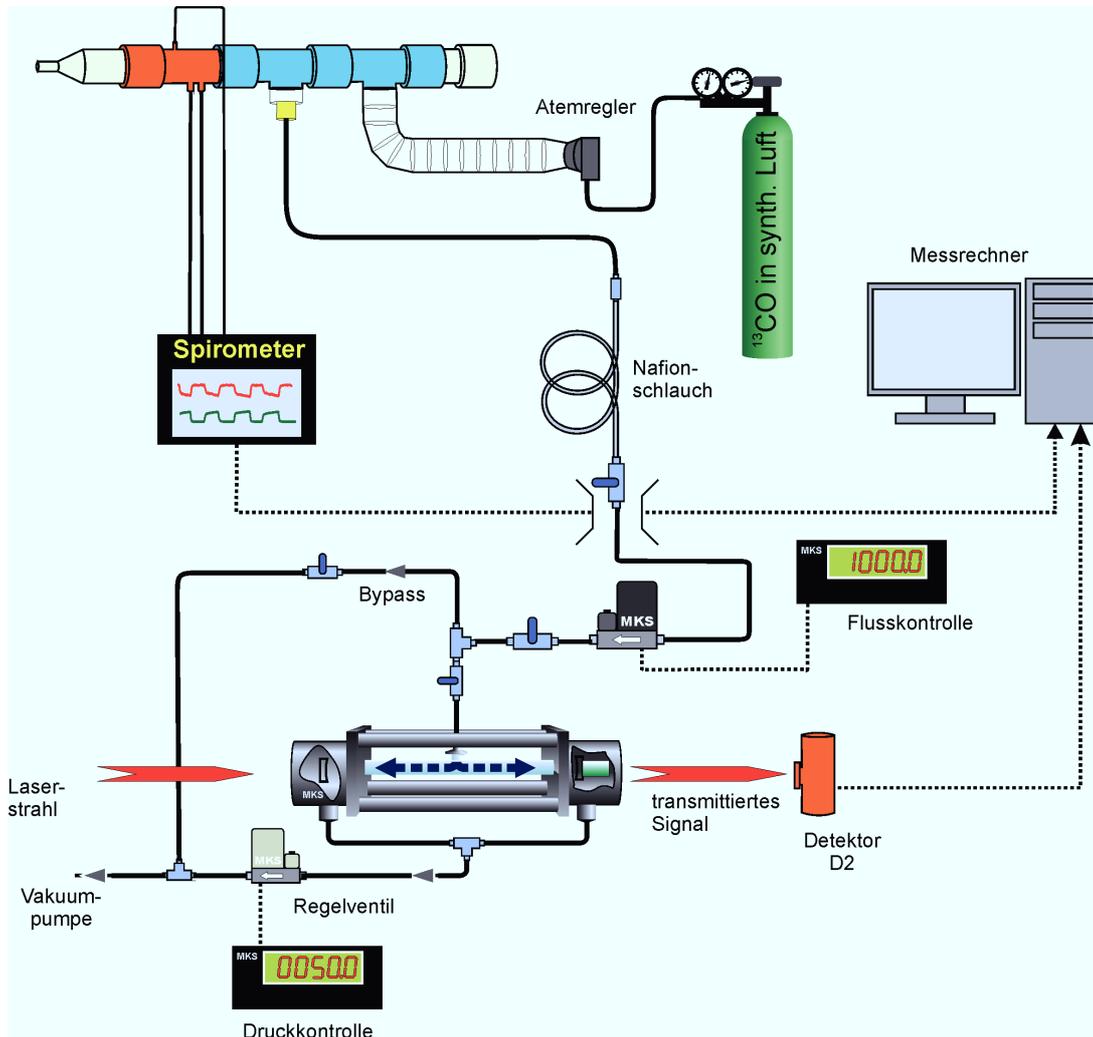


Abbildung 4.3: Skizze des Versuchsaufbaus zur ^{13}CO -Atmung aus der Gasflasche. Die CO -Atmung erfolgt aus der Gasflasche (16 ppm ^{13}CO in synthetischer Luft) über einen Zeitraum von 15 min.

4.2.1 Alte Methode

Die alte Methode sah eine kontinuierliche CO -Atmung von ^{13}CO mit einer Konzentration von ca. 16 ppm in synthetischer Luft über einen Zeitraum von 15 min vor. In Abbildung 4.3 ist der zu dieser CO -Atmung eingesetzte Versuchsaufbau skizziert. Die Dauer der Messung betrug ca. 30 min pro tHb-Bestimmung. Die lang andauernde CO -Atmung hat viele Nachteile. Zum einen ist das Atmen über den Atemregler sehr anstrengend, so dass sich mit der Dauer der CO -Atmung die Atem-Parameter der Probanden ändern. Zum anderen ist die Luft aus der Druckflasche sehr trocken, was zu einer weiteren Unannehmlichkeit für den Probanden führt.



Ein weiterer sehr wichtiger Punkt, der gegen die lange CO-Atmung aus der Gasflasche spricht, ist, dass eine Messreihe verworfen werden muss, wenn die CO-Atmung, beispielsweise durch Unwohlsein, Husten etc. des Probanden, abgebrochen wird. Auf Grund der ^{13}CO -Endkonzentrationen in der Ausatemluft von $> 0,6$ ppm war eine wiederholte Messung mit dem damaligen System nicht möglich, da der obere Dynamikbereich dabei überschritten wurde.

4.2.2 Neue Methode

In der Dissertation von Fritsch [Fri08a] wurde eine CO-Atmung vorgestellt, bei der ein kleiner CO-Bolus über eine Spritze der Einatemluft zugeführt wird. Diese Methode wurde hier aufgegriffen und verbessert.

In der Dissertation von Fritsch wurde eine 500 μl Spritze verwendet, die mit ^{13}CO gefüllt war. Das ^{13}CO wurde einem Schlauchsystem entnommen, das mit reinem ^{13}CO in Überdruck gefüllt war. Das CO wurde dann während einer einzelnen Einatmung dem Probanden durch ein Mundstück, wie in Abbildung 4.4 zu sehen, verabreicht. Die in der Dissertation berichteten Ergebnisse stimmten mit den theoretisch zu erwartenden tHb-Werten überein. Jedoch zeigte sich im Rahmen der vorliegenden Dissertation, dass einige Fehlerquellen dazu führten, dass wiederholte Messungen nicht gut reproduzierbar waren und die Abweichungen zwischen den Daten relativ groß waren.

Der erste Schritt beim Finden und Eliminieren der Fehlerquellen war die Untersuchung der Spritzen hinsichtlich der Handhabung und Reproduzierbarkeit der verabreichten CO-Mengen. Dazu wurden gasdichte Spritzen der Firma Hamilton unterschiedlicher Größe mit 16 ppm ^{13}CO gefüllt und durch ein Septum in das Schlauchsystem des CALOS-Systems zugeführt. Pro Spritze wurden 10 Messungen durchgeführt. Die hier verglichenen 0,5 ml, 1 ml, 2,5 ml und 5 ml fassenden Spritzen wiesen dabei unterschiedlich hohe Standardabweichungen auf:

Spritzengröße / ml	Standardabweichung / %
0,5	4,7
1	1,6
2,5	1,7
5	0,3

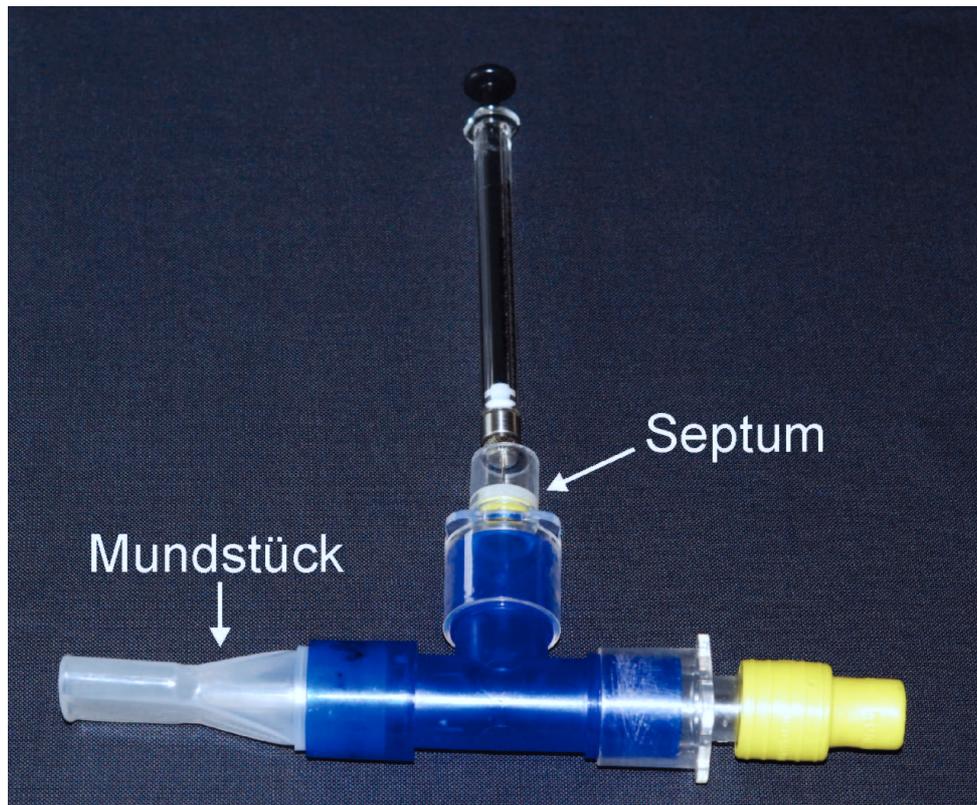


Abbildung 4.4: Mundstück für die Verabreichung von ^{13}CO aus einer Spritze. Das gelbe Endstück verringert den Durchmesser und verlängert durch den erhöhten Widerstand die Einatemdauer. Der Proband atmet tief ein und während des Einatmens wird der CO-Bolus verabreicht. Danach hält der Proband für mindestens 30s die Luft an.

Die relativ hohe Standardabweichung bei der 0,5 ml Spritze lässt sich auf einen Fehler bzw. Defekt der Spritze zurückführen, der möglicherweise mit eine Ursache der oben beschriebenen Abweichungen war. Für die folgenden Messungen wurden die 1 ml und die 2,5 ml Spritzen verwendet. Die Verabreichung von 5 ml ^{13}CO ließ die CO-Ausatembkonzentration der Probanden so stark ansteigen, dass auch hier eine mehrfache Wiederholung der Messung nicht möglich war.

Als weitere mögliche Fehlerquelle zeigte sich das in Abbildung 4.4 dargestellte Mundstück zur ^{13}CO -Inhalation. Wurde die Spritze soweit wie möglich durch das Septum gestochen, so war die Öffnung der Spritze nicht vollständig im Strömungsbereich der Einatmung. Um dem Abhilfe zu schaffen wurden einige Millimeter von dem blauen Kunststoff im Septumbereich entfernt, so dass die Spritzenöffnung nun mitten in den Strömungsbereich geführt werden konnte.

Des Weiteren wurde das ^{13}CO zur Kostenersparnis in einen Folienbeutel gefüllt und



anschließend durch ein Septum in die Spritzen aufgezogen. Bei dem oben erwähnten Schlauchsystem musste dieses vor jeder CO-Entnahme evakuiert und dann wieder neu befüllt werden. Auf diese Weise wurde pro CO-Dosis ein Mehrfaches des benötigten CO-Volumens vernichtet. Der Vorteil bei Verwendung des Folienbeutels liegt darin, dass das im Beutel abgefüllte CO-Volumen nahezu komplett für weitere CO-Atmungen eingesetzt werden kann. Die Verluste beim Befüllen des Folienbeutels entsprechen in etwa dem Verlust an CO bei einer Spritzenbefüllung aus dem Schlauchsystem.

4.3 V_{13CO} -Bestimmung

Neben der CO-Verabreichungsform spielt auch die Aufnahme vom Körper eine bedeutende Rolle in Bezug auf die Bestimmung des effektiven V_{13CO} . Um diese Größe genau zu quantifizieren, wird die Ausatemluft des ersten Ausatemzugs nach der CO-Atmung in einem Gasbeutel (Tedlar-Beutel bzw. Folienbeutel, SKC) gesammelt und anschließend vermessen. Die ^{13}CO -Konzentration in dem Gasbeutel ist so groß, dass die Gasprobe verdünnt werden muss, um das obere Detektionslimit des CALOS-Systems nicht zu überschreiten. Dafür wird der Beutel mit CO-freier Luft aufgefüllt und über den Nafionschlauch an einen der Massenflussregler angeschlossen. Über den zweiten Massenflussregler wird ebenfalls CO-freie Luft in die Messzelle geleitet. Ein Fluss von 500 sccm pro Massenflussregler hat sich hierbei als ideal erwiesen. Ein beispielhaftes Messsignal ist in Abbildung 4.5 zu sehen. Die Länge des Signals ergibt sich aus der Zeit, die benötigt wird, bis der Gasbeutel leer ist. Aus der Fläche unterhalb des Graphen und dem Fluss durch die Zelle lässt sich die Menge an ^{13}CO , die nicht vom Körper absorbiert wurde, berechnen. Zieht man dieses Volumen vom verabreichten Spritzen-Volumen ab, so erhält man das vom Körper aufgenommene ^{13}CO -Volumen (V_{13CO}):

$$V_{13CO} = V_{Spritze} - V_{Beutel} = V_{Spritze} - \left(\int c(^{13}CO) dt \cdot \dot{V}_{Zelle} \right) . \quad (4.2)$$

Die Auswertung von 413 solcher Beutelmessungen bei 8 verschiedenen Probanden ergab, dass bis zu 8,8 % des verabreichten ^{13}CO -Volumens nicht aufgenommen wurden. Die Mittelwerte pro Testperson lagen zwischen 1,4 % und 4,5 %. Wegen des linearen Zusammenhangs zwischen tHb und V_{13CO} würde sich der Fehler im gleichen Maße in der Bestimmung der Hämoglobing Gesamtmasse widerspiegeln. Dies zeigt, dass bei

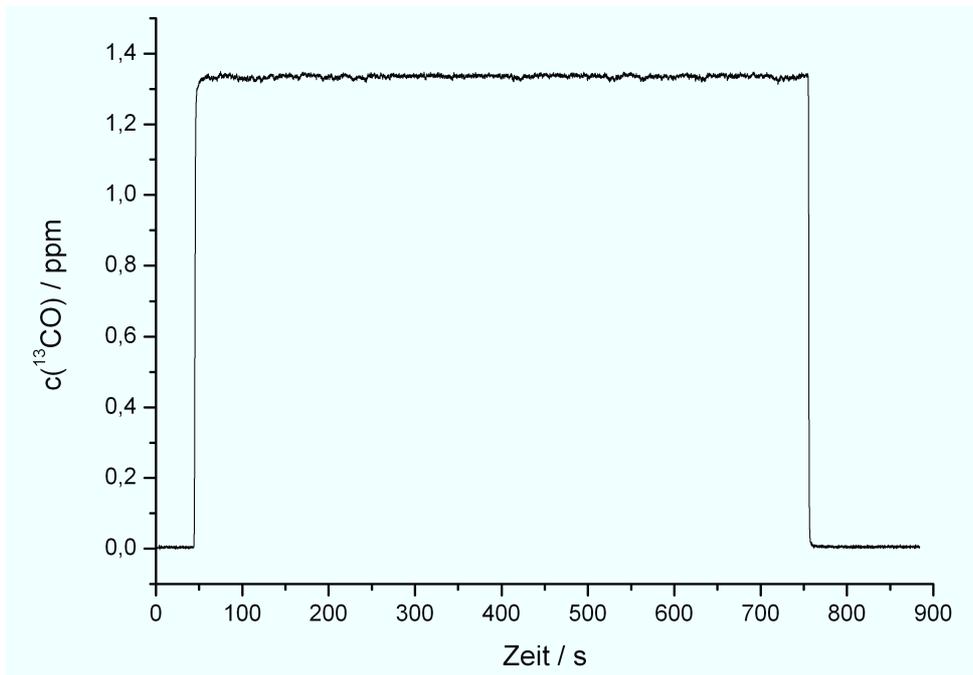


Abbildung 4.5: Vermessen des vom Körper nicht aufgenommenen ^{13}CO . Nach der CO-Atmung wird die Ausatemluft der ersten Ausatmung in einem Gasbeutel gesammelt, verdünnt und anschließend mit dem CALOS-System bei einem konstanten Fluss vermessen. Aus der Konzentration, dem Gasfluss und der Zeit, die benötigt wird, bis der Beutel leer ist, lässt sich die absolute ^{13}CO -Menge im Beutel bestimmen. In diesem Beispiel sind es 15,8 ml ^{13}CO .

der Verabreichung eines CO-Bolus die vom Körper nicht absorbierte CO-Menge mit einkalkuliert werden muss.

4.3.1 Online-Messung der nicht aufgenommenen ^{13}CO -Menge

Die in Abschnitt 3.5.3 beschriebenen Änderungen des Gassystems und den dadurch erhöhten Dynamikbereich, ermöglichen eine direkte Online-Messung des nicht aufgenommenen ^{13}CO . Eine Verdünnung der Ausatemluft führt dazu, dass die ausgeatmete ^{13}CO -Konzentration direkt nach der CO-Atmung das obere Detektionslimit des CALOS-Systems nicht erreicht. Abbildung 4.6 zeigt eine Beispielmessung, bei der der Atemluft, die mit 1000 sccm in die Zelle geleitet wird, CO-freies Gas mit einem Fluss von 3000 sccm zugeleitet wird. Während dieser Messung wurde ununterbrochen durch das Mundstück geatmet.

Das nicht aufgenommene ^{13}CO -Volumen (V_{13COex}) lässt sich aus dem ersten Peak

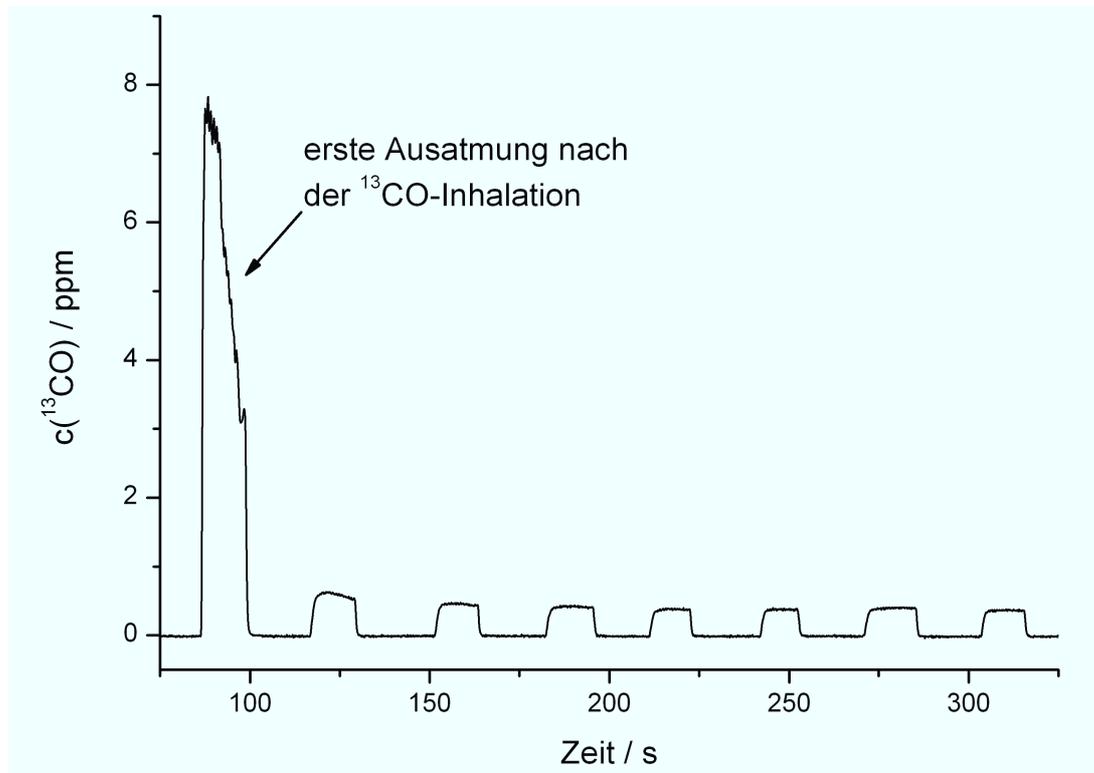


Abbildung 4.6: Online-Messung des vom Körper nicht aufgenommenen ^{13}CO durch Verdünnung der Atemgasprobe. Dem 1000 sccm Fluss des Atemgases wurden 3000 sccm CO -freies Gas zugeleitet. Das nicht aufgenommene ^{13}CO -Volumen lässt sich aus dem ersten Peak und den zugehörigen Daten des Atemflusses berechnen.

und den zugehörigen Daten des Atemflusses (\dot{V}_{Atem}) mit

$$V_{^{13}\text{CO}ex} = \int c(^{13}\text{CO}) \cdot \dot{V}_{Atem} dt \quad (4.3)$$

berechnen. Die Messung zeigt weiterhin, dass für die Bestimmung des bei der CO -Inhalation nicht aufgenommenen ^{13}CO -Volumens nur die erste Exhalation nach der CO -Atmung relevant ist, da die zweite Exhalation nur noch eine, im Vergleich zu den folgenden Atemzügen, vernachlässigbar erhöhte ^{13}CO -Konzentration aufweist.

4.4 tHb-Langzeitmessungen

Ein besonderer Vorteil der oben beschriebenen CO -Atmung ist, dass sie wiederholt durchgeführt werden kann, ohne dass das obere Detektionslimit des Systems durch die

CO-Ausatemkonzentration erreicht wird. Für die hier präsentierten tHb-Messreihen wurden pro Messung drei tHb-Werte nach folgendem Muster bestimmt:

1. Messen des ^{13}CO -Basislevels \Rightarrow $^{13}\text{COHb}$ -Basiskonzentration ($^{13}\text{COHb}_{(1)}$)
2. ^{13}CO -Atmung und Bestimmung von $V_{^{13}\text{CO}}$
3. Messen der daraus resultierenden ^{13}CO -Atemkonzentration \Rightarrow $^{13}\text{COHb}_{(2)}$
4. Berechnen von $\text{tHb}_{(1)}$
5. ^{13}CO -Atmung und Bestimmung von $V_{^{13}\text{CO}}$
6. Messen der daraus resultierenden ^{13}CO -Atemkonzentration \Rightarrow $^{13}\text{COHb}_{(3)}$
7. Berechnen von $\text{tHb}_{(2)}$
8. ^{13}CO -Atmung und Bestimmung von $V_{^{13}\text{CO}}$
9. Messen der daraus resultierenden ^{13}CO -Atemkonzentration \Rightarrow $^{13}\text{COHb}_{(4)}$
10. Berechnen von $\text{tHb}_{(3)}$

Auf diese Weise können Messfehler, die beispielsweise durch Probleme bei der CO-Atmung hervorgerufen werden können, herausgefiltert werden.

Zur Evaluierung der hier entwickelten tHb-Bestimmung mittels einer ^{13}CO -Bolus-Atmung wurden drei Messreihen über einen Zeitraum > 3 Monate durchgeführt. Wie in den Abbildungen 4.7, 4.8 und 4.9 zu sehen ist, weisen die aufgenommenen Daten eine relativ geringe Standardabweichung auf. In der ersten Messreihe wurde zunächst ein ^{13}CO -Bolus in Höhe von 2,5 ml pro CO-Atmung verwendet, der allerdings im Vergleich zum 1 ml Bolus keinen in den Messwerten erkennbaren Vorteil aufwies. Alle weiteren Messungen wurden mit einem verabreichten ^{13}CO -Volumen von 1 ml durchgeführt. Die x-Achse bezeichnet die Anzahl der Tage zwischen der ersten Messung und dem jeweiligen neuen Messpunkt. Auf der y-Achse sind die entsprechend der Gleichung 4.1 ermittelten Werte für die Hämoglobingesamtmasse aufgetragen. Die rote Linie markiert den jeweiligen Mittelwert der Messdaten. Die Standardabweichung ist durch die Fehlerbalken an den Messpunkten symbolisiert. Die Messwerte entsprechen den zu erwartenden Größen der Hämoglobingesamtmasse unter Verwendung der in 2.5 präsentierten Näherungen für das Blutvolumen und den im Rahmen einer Blutuntersuchung ermittelten Hämoglobinkonzentrationen:



Proband #	tHb _{theo} / g	tHb _{gem} / g
1	989,5	1010,1 ± 5,9 %
2	786,4	797,4 ± 3,8 %
3	1021,4	953,9 ± 3,5 %

Tabelle 4.1: Theoretische tHb-Werte und Ergebnisse der tHb-Langzeitmessung.

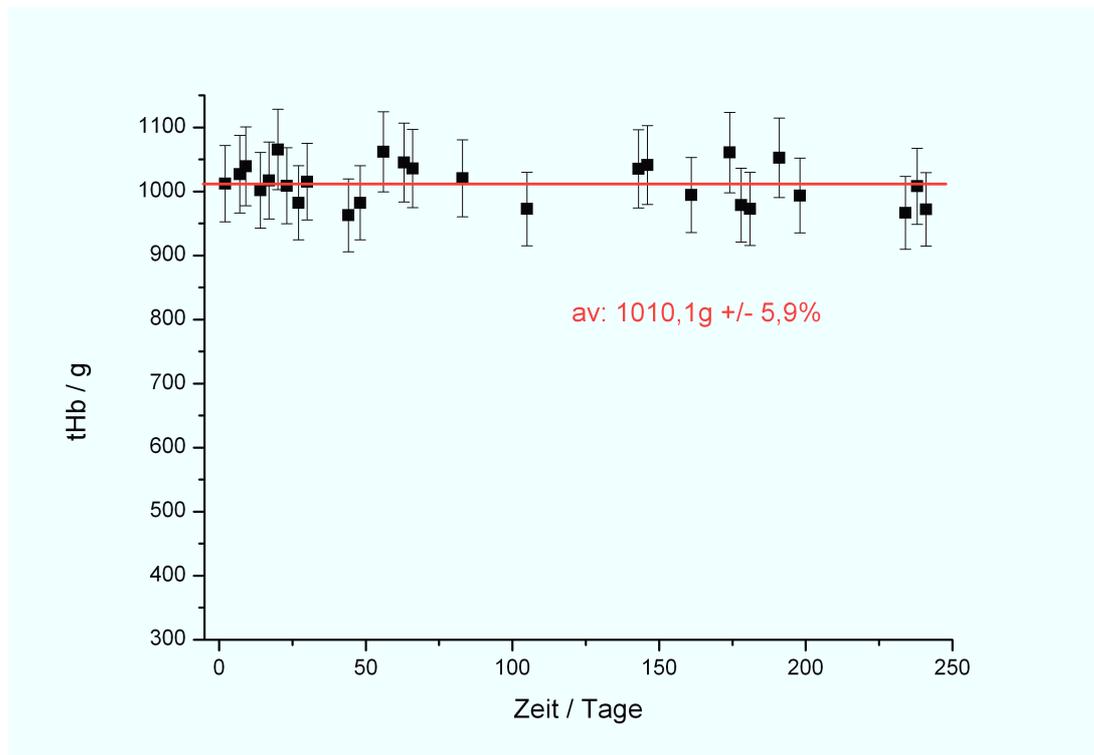


Abbildung 4.7: tHb-Langzeitmessung von Proband 1.

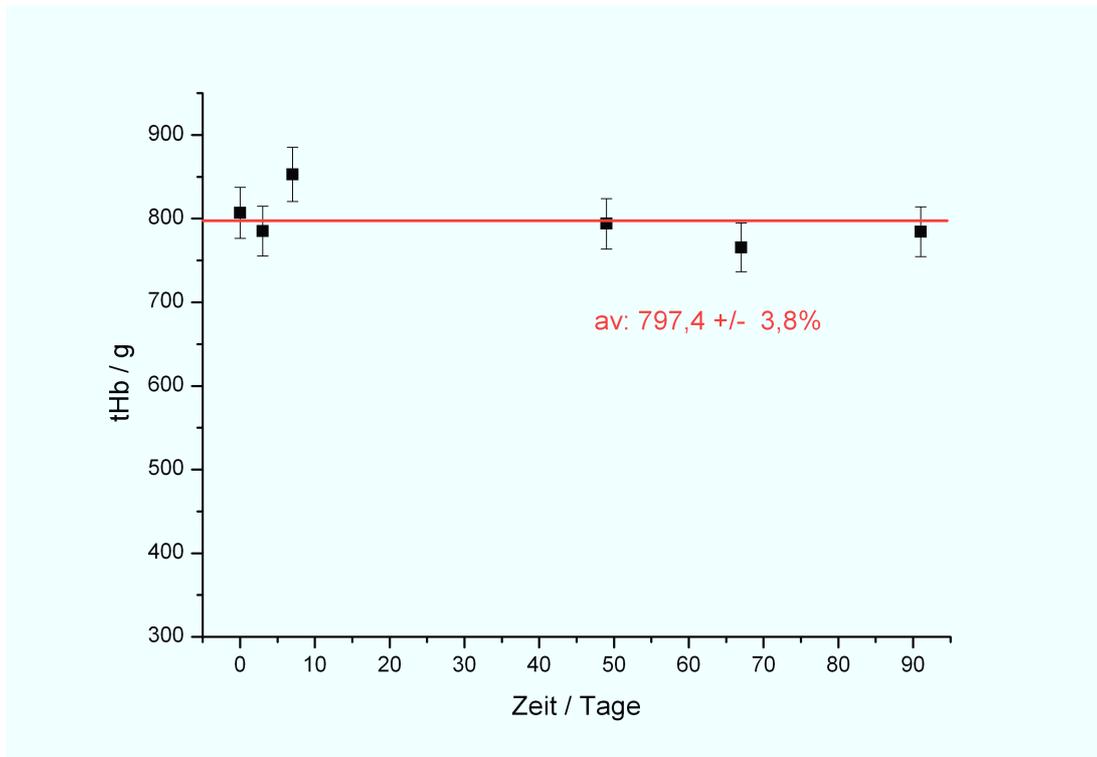


Abbildung 4.8: tHb-Langzeitmessung von Proband 2.

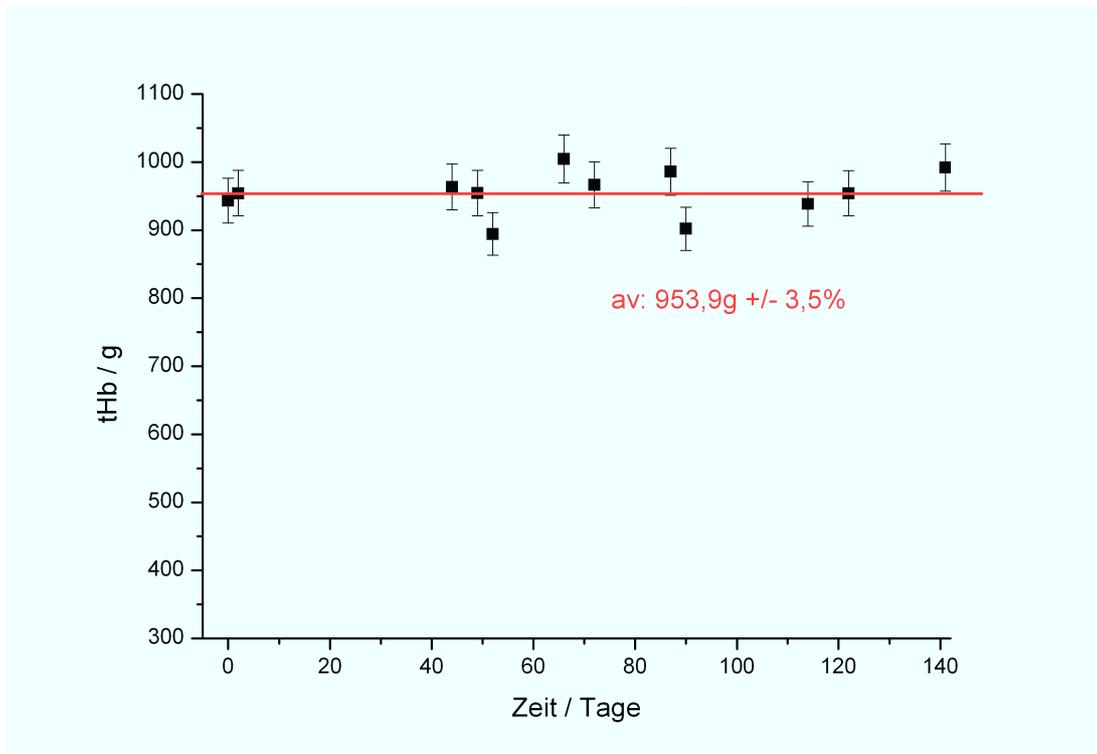


Abbildung 4.9: tHb-Langzeitmessung von Proband 3.



4.5 Überprüfung der Empfindlichkeit der tHb-Bestimmung anhand von Blutspenden

Die Langzeitmessungen des vorherigen Abschnitts zeigen, dass die weiterentwickelte Methode zur Messung der Hämoglobinesamtmasse dazu geeignet ist, reproduzierbare Ergebnisse zu liefern. Der nächste Schritt ist die Evaluierung der Methode hinsichtlich der Empfindlichkeit auf induzierte Veränderungen der Hämoglobinesamtmasse. Wie in Abschnitt 2.4 erläutert, gibt es eine Vielzahl von Möglichkeiten die Hämoglobinesamtmasse zu ändern. Das Hauptziel bei der Entwicklung von Methoden zur tHb-Bestimmung ist der Nachweis von Blutdoping. Die durch Blutdoping erreichte Erhöhung der Hämoglobinesamtmasse beträgt $> 10\%$. Daraus folgt, dass eine erfolgreiche tHb-Messmethode in der Lage sein muss tHb-Änderungen von 10% zu detektieren.

Die Probanden, die sich für die Messungen dieser Dissertation zu Verfügung stellten, sollten nicht durch mögliche Nebenwirkungen von Bluttransfusionen gefährdet werden. Aus diesem Grunde wurde eine Blutspende als induzierende Änderung der Hämoglobinesamtmasse gewählt. Die Blutspenden wurden in der Blutspendezentrale des Universitätsklinikums Düsseldorf von dem dortigen Personal durchgeführt und das entnommene Blut, wie bei allgemeinen Blutspenden verarbeitet und verwendet. Die extrahierte Blutmenge betrug jeweils ca. 550 ml und entspricht damit der Blutmenge, die durch eine Blutkonserve bei Blutdoping verabreicht wird.

Vor jeder Blutspende wurden bei den Probanden, wie im vorherigen Abschnitt beschrieben, mindestens vier tHb-Messpunkte über einen Zeitraum von wenigstens zwei Wochen aufgenommen. Aus diesen Daten wurde der Mittelwert gebildet, der als Referenzwert zu den, nach der Blutspende durchgeführten Messungen, dienen sollte.

In den folgenden Abbildungen sind die Referenzwerte der 10 Messreihen jeweils durch eine rote Linie gekennzeichnet, die den Bereich bis zum Tag der Blutspende markiert. In allen Fällen ist ein deutlicher Abfall der tHb-Werte, zum Zeitpunkt der Blutspende zu erkennen. Dies zeigt, dass die hier entwickelte tHb-Messmethode die Detektion von induzierten Änderungen der Hämoglobinesamtmasse ermöglicht. Die dabei verwendeten ^{13}CO -Mengen von maximal 3 ml pro Messtag sind absolut ungefährlich und die gesamte Messung ist nicht-invasiv. Durch die Verwendung des CO-Bolus für die CO-Atmung konnte die Messdauer für die Probanden im Vergleich zu der in Abschnitt 4.2.1 beschriebenen CO-Atmung auf ein Drittel der Zeit reduziert werden.

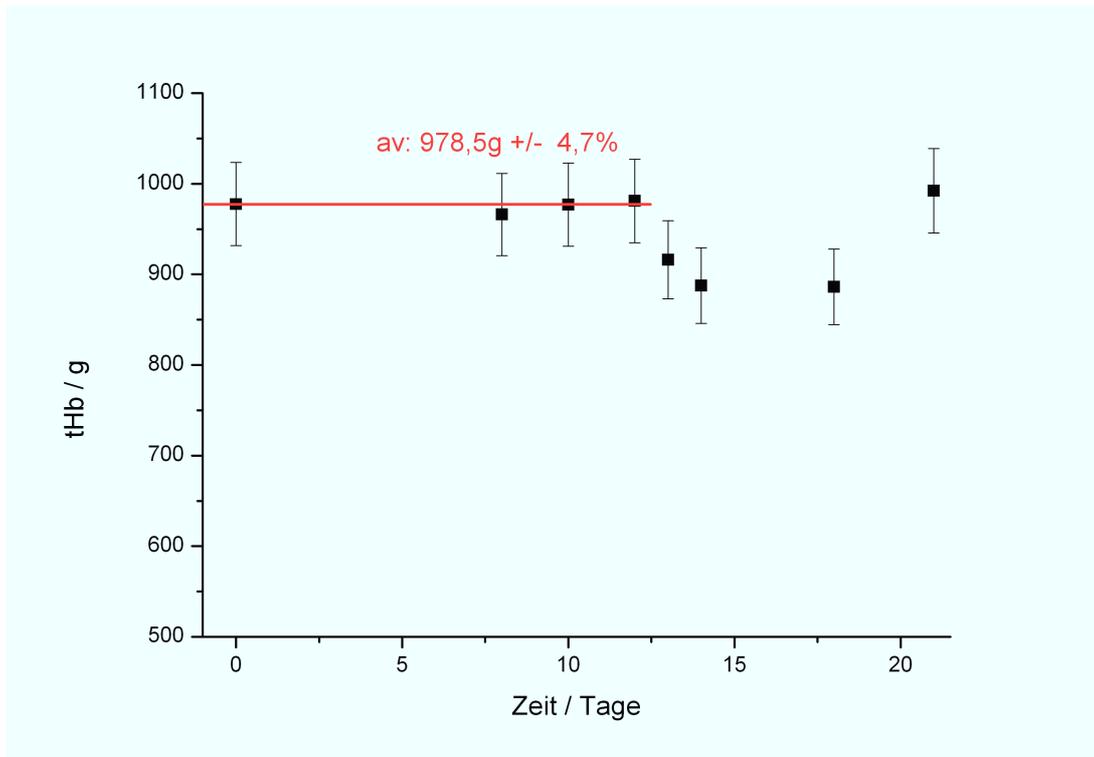


Abbildung 4.10: Blutspende mit tHb-Bestimmung Messreihe 1.

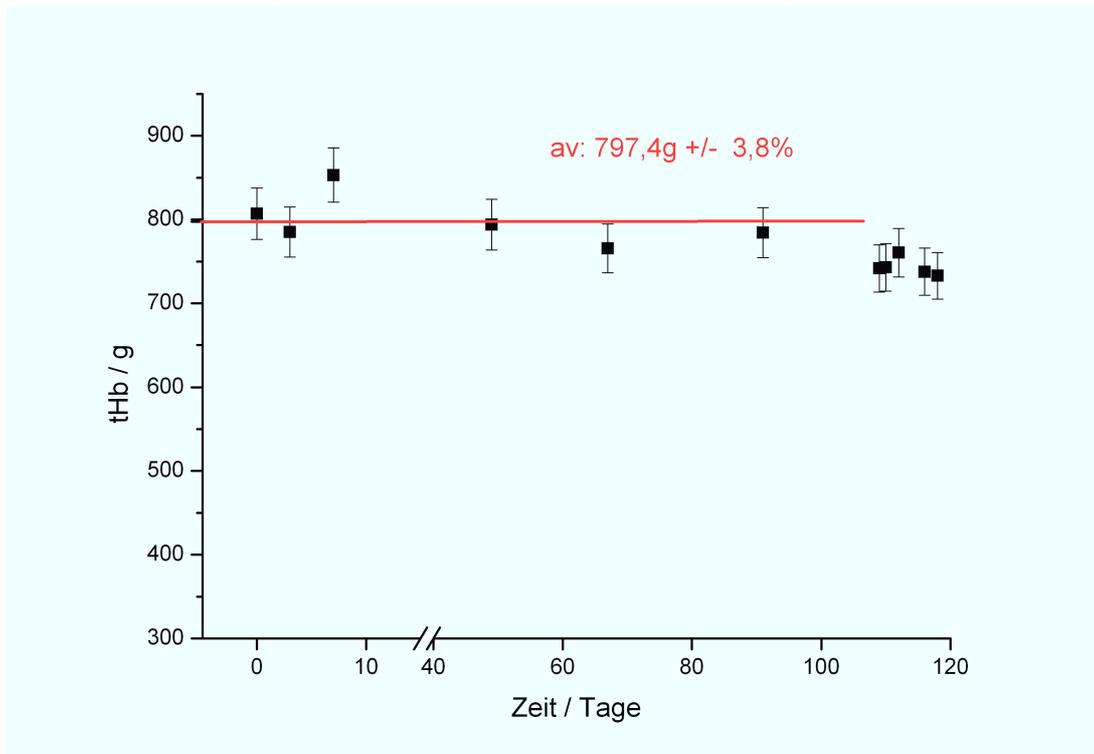


Abbildung 4.11: Blutspende mit tHb-Bestimmung Messreihe 2.

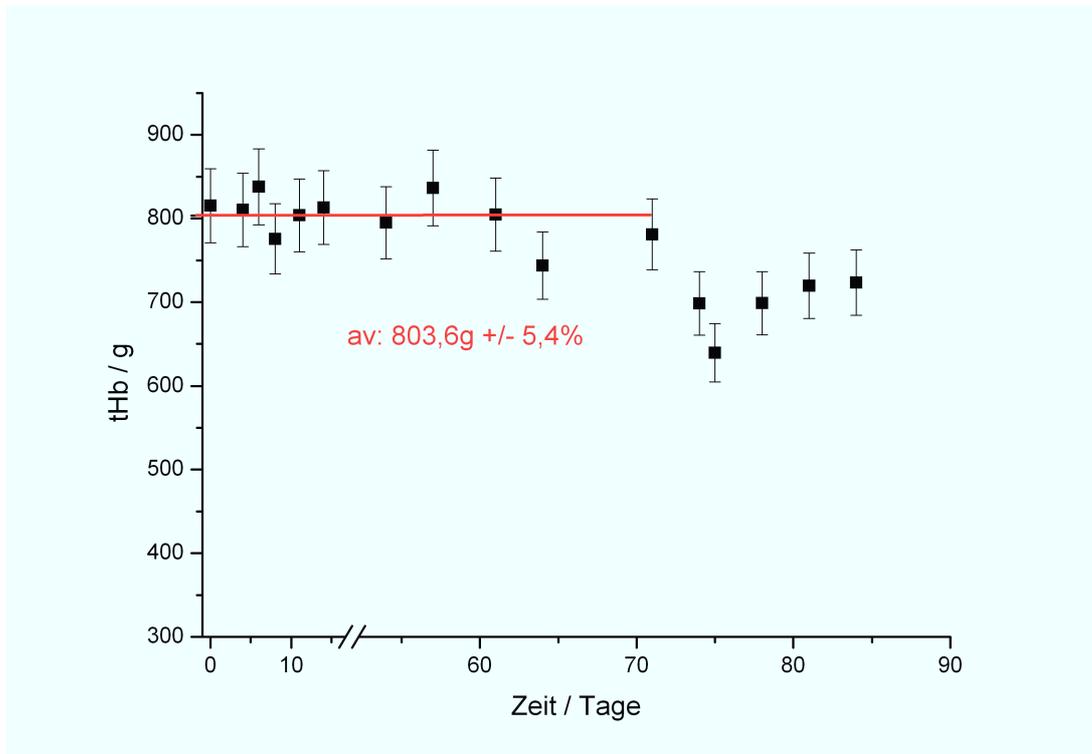


Abbildung 4.12: Blutspende mit tHb-Bestimmung Messreihe 3.

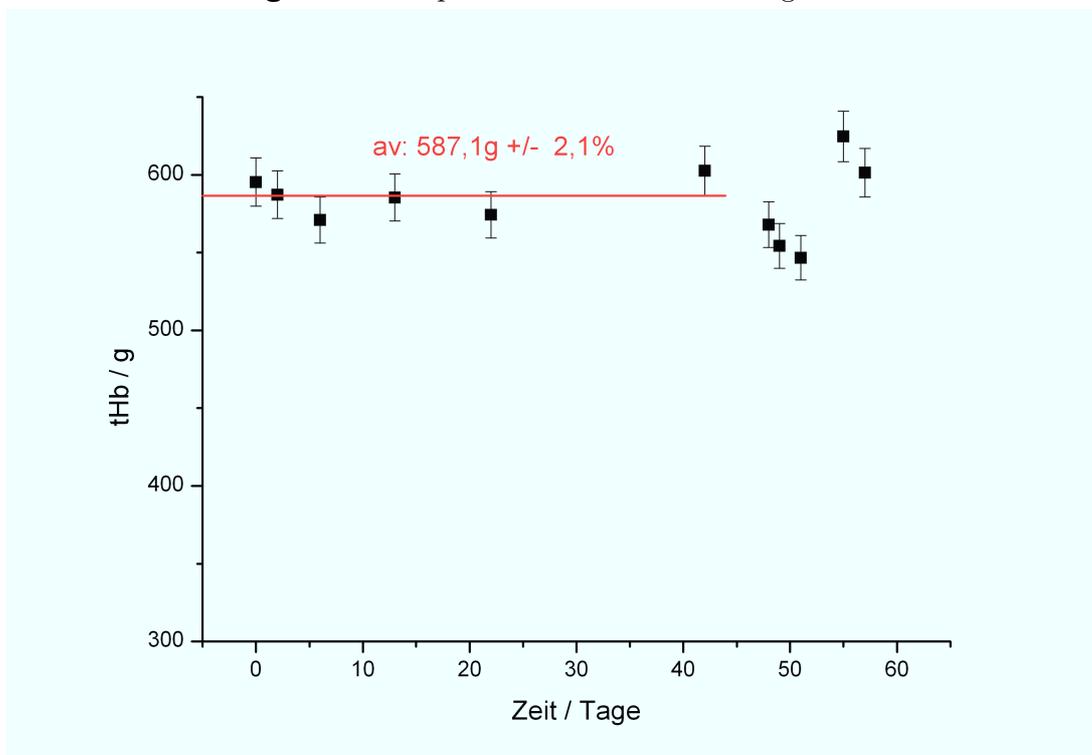


Abbildung 4.13: Blutspende mit tHb-Bestimmung Messreihe 4.

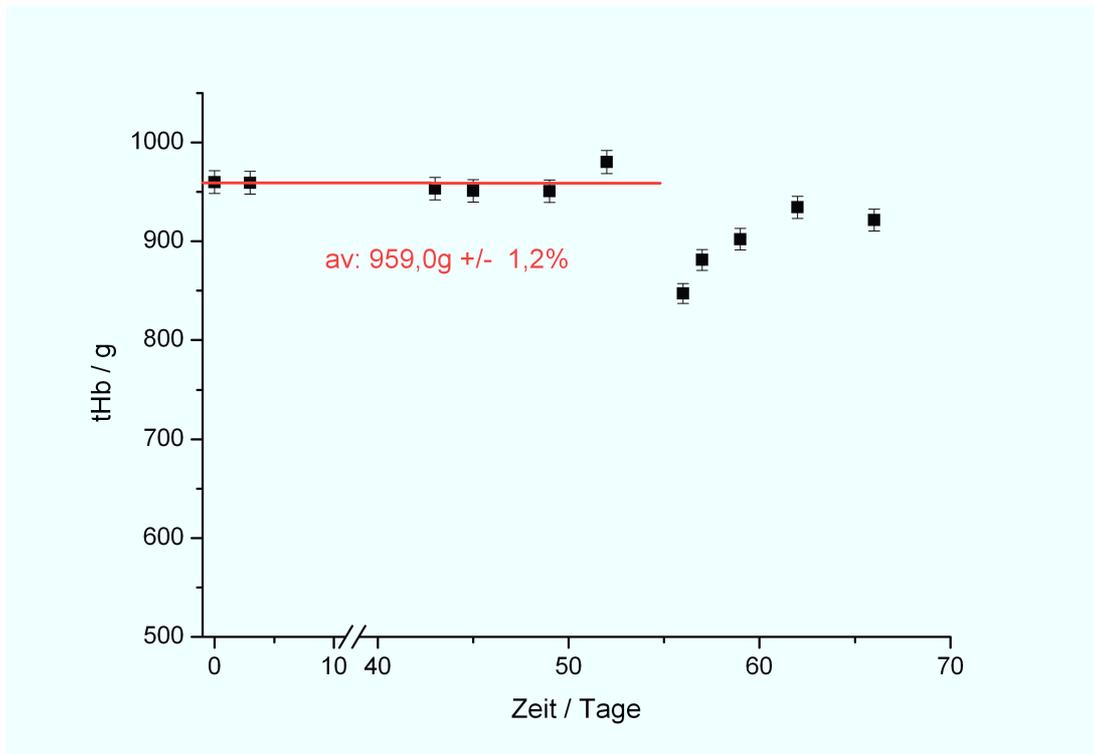


Abbildung 4.14: Blutspende mit tHb-Bestimmung Messreihe 5.

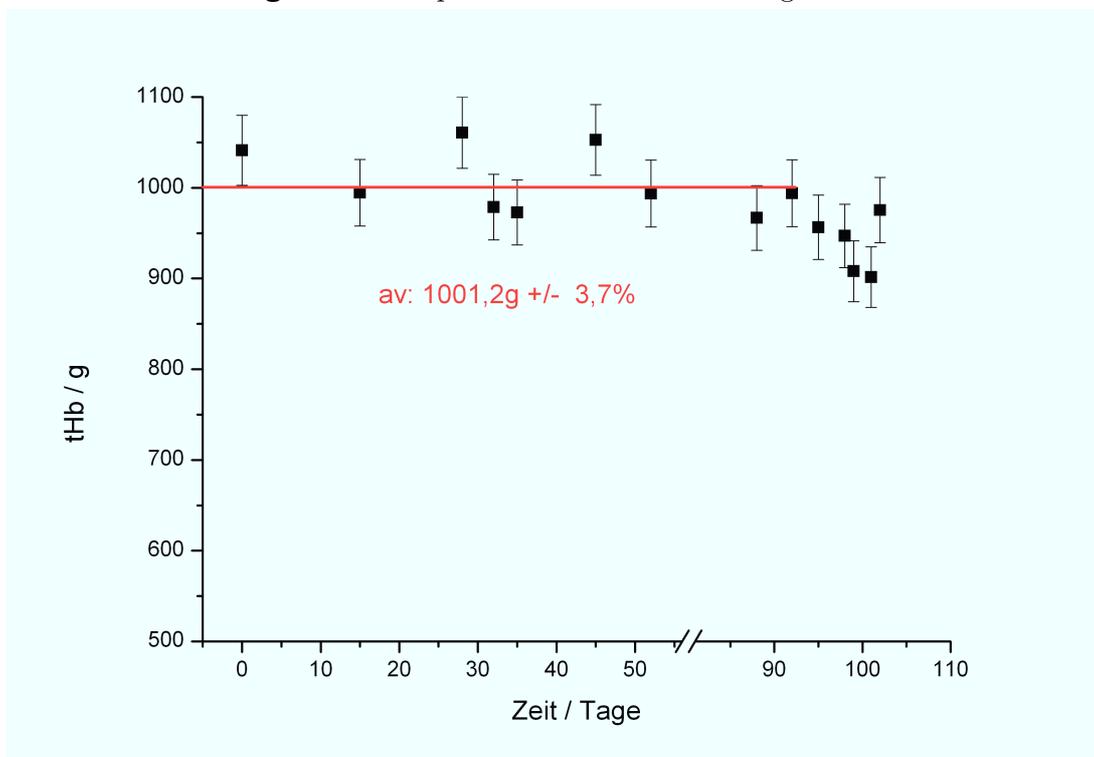


Abbildung 4.15: Blutspende mit tHb-Bestimmung Messreihe 6.

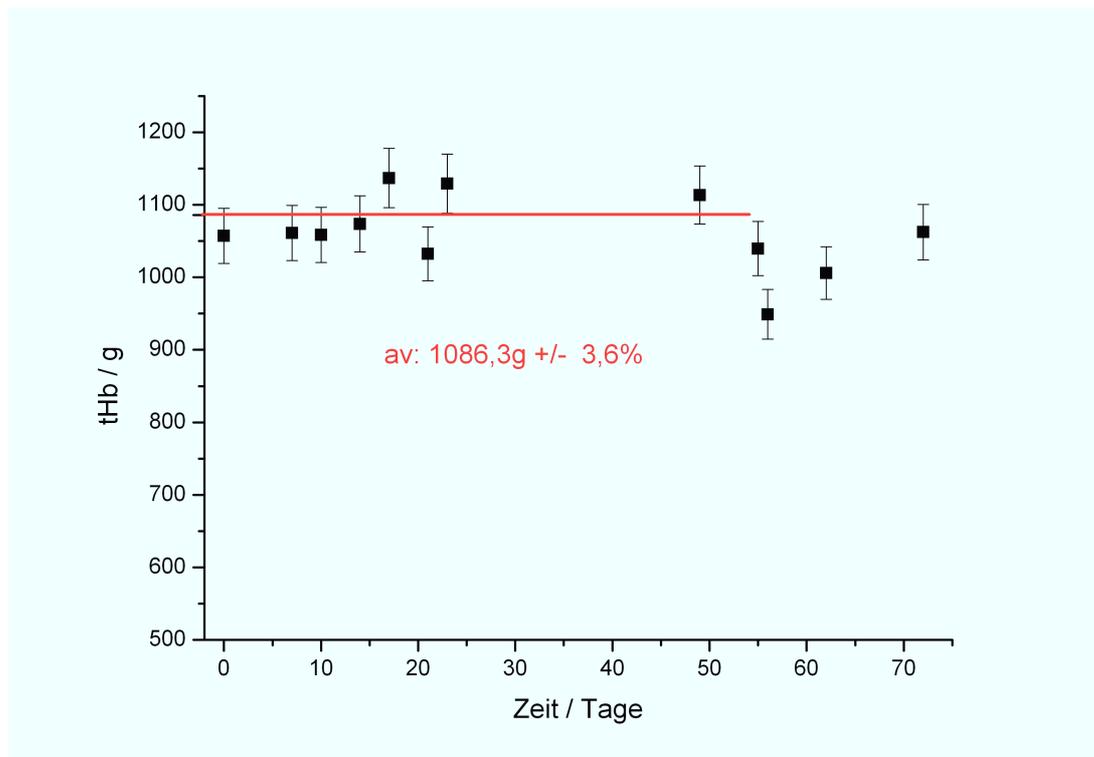


Abbildung 4.16: Blutspende mit tHb-Bestimmung Messreihe 7.

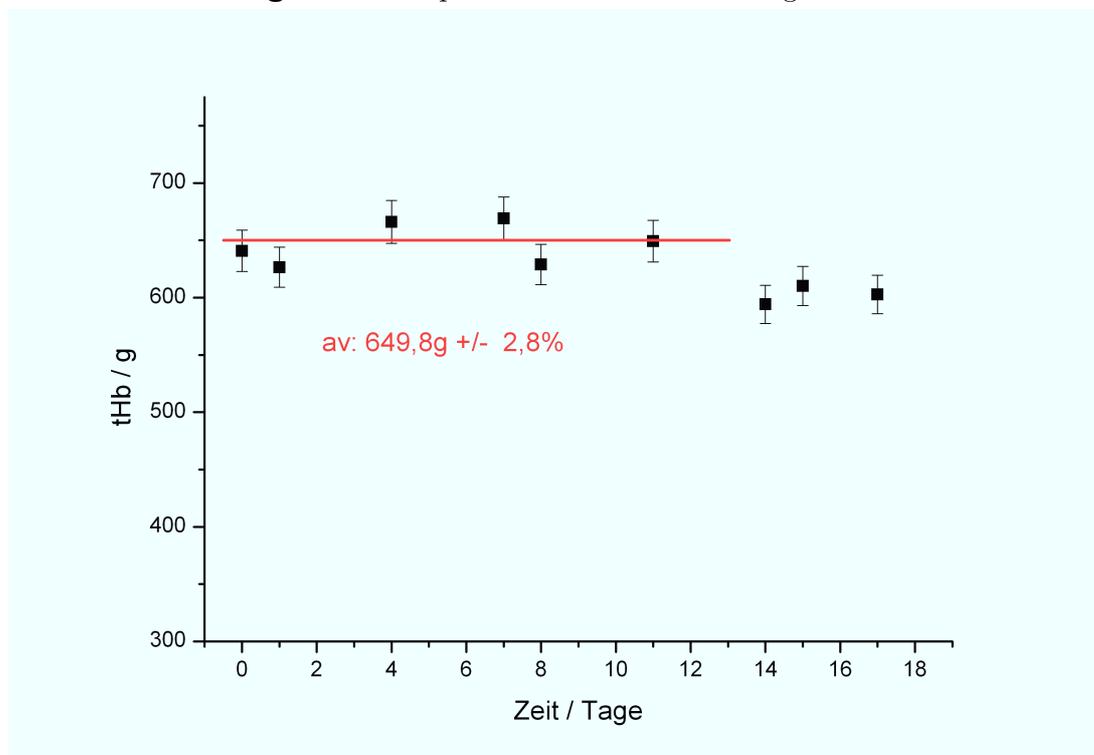


Abbildung 4.17: Blutspende mit tHb-Bestimmung Messreihe 8.

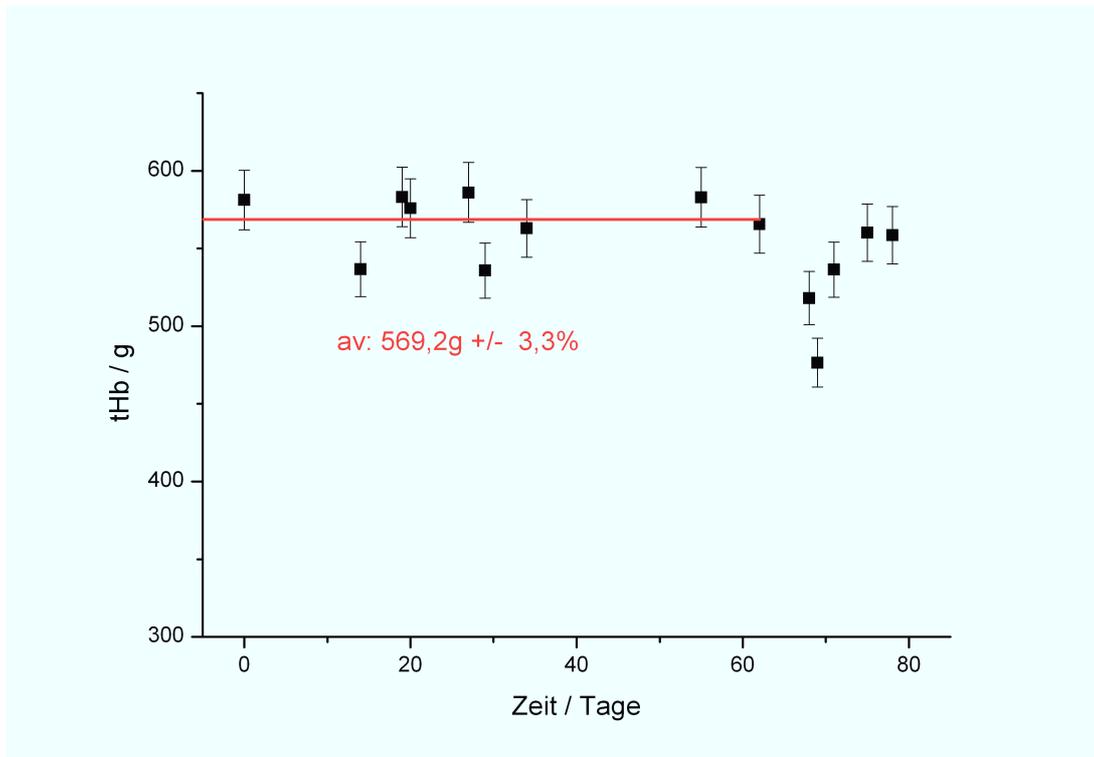


Abbildung 4.18: Blutspende mit tHb-Bestimmung Messreihe 9.

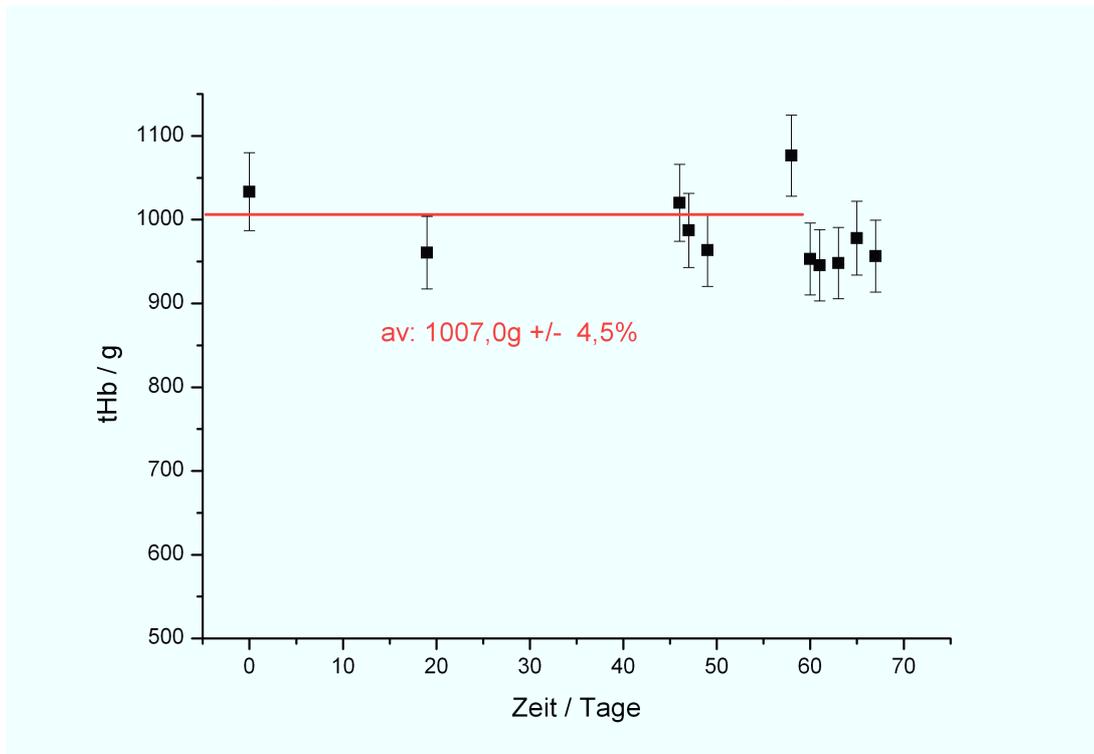


Abbildung 4.19: Blutspende mit tHb-Bestimmung Messreihe 10.



4.6 Zusammenfassung

Dieses Kapitel beschreibt die Weiterentwicklung und Evaluierung einer nicht-invasiven Methode zur Bestimmung der Hämoglobingestamtmasse mittels einer isotopologenselektiven ^{13}CO -Atemmessung. Dabei wurden zunächst die für die Messung nötigen Einzelschritte beschrieben.

Im Rahmen der $^{13}\text{COHb}$ -Bestimmung wurde die Auswertesoftware so geändert, dass die Ergebnisse im Vergleich zu der Vorgängerarbeit besser reproduzierbar sind.

Die CO-Atmung wurde von einer kontinuierlichen Einatmung von 16 ppm über einen Zeitraum von 15 min auf die Verabreichung eines CO-Bolus umgestellt. Das dafür verwendete Mundstück wurde so angepasst, dass die Nadel der zur Verabreichung verwendeten Spritze ideal eingesetzt werden konnte.

Der Vorteil dieses neuen Systems in Bezug auf die Vorgängerarbeiten ist, dass zum einen die Messzeit für die Probanden deutlich reduziert werden konnte und dass drei tHb-Bestimmungen hintereinander durchgeführt werden konnten, ohne dass das obere Detektionslimit des CALOS-Systems erreicht wurde.

Der letzte Punkt ist unter anderem auch den Verbesserungen der Laserleistung, die in Abschnitt 3.1 erläutert wurden, zu verdanken.

Des Weiteren wurde die Notwendigkeit zur Bestimmung des bei der CO-Atmung vom Körper nicht aufgenommenen ^{13}CO ($V_{13\text{CO}ex}$) gezeigt. Durch die in Abschnitt 3.5.3 beschriebene Erweiterung des Dynamikbereichs des CALOS-Systems konnte gezeigt werden, dass für die Messung von $V_{13\text{CO}ex}$ nur die erste Exhalation nach der CO-Atmung relevant ist. Der Umbau des Gassystems erlaubt weiterhin eine deutliche Verkürzung der Messzeit im Vergleich zu den beschriebenen Beutelmessungen. Die Zeit lässt sich von ca. 8 min - 16 min auf die Dauer einer Ausatmung, d.h. auf ca. 30 s reduzieren.

Die Reproduzierbarkeit der tHb-Messdaten wurde anhand von drei Langzeitmessungen über einen Zeitraum > 3 Monate nachgewiesen. Die Messdaten stimmen dabei sehr gut mit medizinisch anerkannten Näherungen zur Abschätzung der Hämoglobingestamtmasse überein.

Im letzten Abschnitt wurde überprüft, inwieweit es möglich ist, mit der Messmethode induzierte Änderungen der Hämoglobingestammtheit zu detektieren. Zur Änderung der Hämoglobingestammtheit ließen sich die Probanden im Rahmen einer Blutspende ca. 550 ml Blut entnehmen. Die dabei entnommene Hämoglobinmenge entspricht in etwa der im Rahmen von Blutdoping, für eine relevante Steigerung der Ausdauerleistung, mindestens zugeführten Menge an Hämoglobin. Die Ergebnisse zeigen, dass sich in allen 10 Messreihen die tHb-Daten zum Zeitpunkt der Blutspende und auch noch einige Tage danach deutlich von den zuvor aufgenommenen Referenzwerten unterscheiden.

Die in dieser Arbeit entwickelte Messmethode zur Bestimmung der Hämoglobingestammtheit hat im Vergleich zu den in [Bur95, Sch05, Pro08] vorgestellten Methoden deutliche Vorteile. Erstens konnte die verabreichte CO-Menge auf 1 ml und damit im Vergleich auf nahezu 1/100 reduziert werden. Diese Menge ist für Menschen absolut ungefährlich und wirft keine Diskussionen zu Risiken für die Probanden auf, wie sie bei den anderen Methoden aufgekommen sind [Sch10, Dam10]. Zweitens wird in den hier präsentierten Messungen auf eine Blutprobe verzichtet, was dazu führt, dass diese Methode gänzlich nicht-invasiv ist.

5 Evaluierung der Eignung von CO als Markermolekül

In diesem Kapitel sollen die Möglichkeiten und die Beschränkungen gezeigt werden, die die Verwendung von endogenem Kohlenmonoxid als Markersubstanz mit sich bringt. Das Kapitel ist in zwei Teile aufgeteilt.

Im ersten Teil wird die CO-Ausatemkonzentration über einen Zeitraum größer als 24 Wochen untersucht. Diese Langzeitmessung soll Aufschluss über die Schwankungen des CO-Basislevels geben, ohne dieses aktiv bzw. absichtlich zu beeinflussen. Die Ergebnisse dieser Untersuchung reflektieren natürliche und damit unvermeidbare Änderungen in der CO-Konzentration. Die Erkenntnisse hieraus sind von besonderem Interesse, wenn endogenes CO als Markermolekül verwendet werden soll.

Der zweite Teil dieses Kapitels behandelt induzierte, also absichtlich herbeigeführte Änderungen der CO-Ausatemkonzentration. Es wird dabei untersucht, inwieweit es möglich ist, oxidativen Stress, der durch intensive körperliche Anstrengung hervorgerufen wurde, nachzuweisen. Diese kurzzeitigen Änderungen geben auch Aufschluss über die Beeinflussbarkeit der CO-Konzentration.

5.1 Langzeitmessungen

In diesem Abschnitt wird die Untersuchung des CO-Basislevels über einen Zeitraum von mehreren Monaten beschrieben. Das CO-Basislevel kennzeichnet hierbei die Konzentration an CO in der Ausatemluft, die nicht durch eine CO-Einatmung oder andere Faktoren absichtlich verändert wurde. Das Ziel dieser Untersuchung ist herauszufinden, inwieweit die CO-Konzentration bei gesunden Erwachsenen schwankt. Die Ergebnisse können unter anderem dafür dienen, zukünftige Messungen, die sich auf die endogene CO-Produktion berufen, besser zu planen und zu evaluieren.

Viele Forscher bedienen sich gerade in medizinisch fokussierten Arbeiten einfacher elektrochemischer CO Sensoren [Par02], z.B. der Firma Bedfont [Par99, Yam98,



Yas02]. Hierbei ist zu beachten, dass selbst das aktuelle Modell, der Micro⁺ Smokerlyzer, lediglich eine Genauigkeit von ± 2 ppm hat [Bed11]. Des Weiteren können die Querempfindlichkeiten dieses Geräts zu Wasserstoff zu Fehlinterpretationen der Messergebnisse führen [Fri08b].

Die Cavity-Leak-Out-Spektroskopie eignet sich durch die querempfindlichkeitsfreien und hochsensitiven Messungen viel besser als die oben beschriebenen elektrochemischen Sensoren. Die Fähigkeit zur Echtzeitanalyse, die atemzugs aufgelöste Messungen ermöglicht, macht dieses System auch gegenüber der Gaschromatografie überlegen.

5.1.1 Messmethoden und Messverfahren

Es wurden zwei Messreihen durchgeführt. Die Messungen der ersten Messreihe erfolgten auf dem P21-Übergang von ^{13}CO bei $2012,2\text{ cm}^{-1}$. Hierfür wurde die 3P13 Laserlinie verwendet. Die Seitenbänder wurden mit einer Frequenz von 15736 MHz aufgeprägt, so dass mit einem Seitenband auf dem Maximum des gewünschten Übergangs gemessen werden konnte. Die zweite Messreihe wurde nach der Neujustierung des Lasers auf dem P25-Übergang von ^{13}CO bei $1994,7\text{ cm}^{-1}$ analog zu Kapitel 4 auf der 4P11 Linie durchgeführt. Nach der in Abschnitt 3.1.2 beschriebenen Optimierung konnten das Signal-zu-Rausch-Verhältnis und die Stabilität des Systems hier so weit verbessert werden, dass der P25-Übergang dem P21-Übergang vorzuziehen war.

Obwohl sich die Messungen, die in diesem Kapitel beschrieben werden, auf das CO-Basislevel beziehen und keine CO-Anreicherung notwendig war, wurde das seltenere ^{13}CO -Isotopolog zum Messen verwendet. Dies lässt sich durch die Fähigkeit des Systems erklären, dieses Isotopolog mit einem Detektionslimit von ca. $0,36\text{ ppb}\cdot\text{Hz}^{-1/2}$ zu messen. Die Stabilität des Systems ist auf den oben genannten Übergängen auch viel höher als auf den mit dem CO-Laser erreichbaren ^{12}CO -Übergängen.

Für die CO-Messungen wurde auf das bereits beschriebene Mundstück zurückgegriffen. Der mit dem Mundstück verbundene Capnograph gibt auch hier die Option, den Atemfluss zu messen. Dieser wird wiederum graphisch auf dem Bildschirm des Messrechners dargestellt, so dass die Probanden in der Lage sind ihren Atemfluss zu kontrollieren. Um reproduzierbare und vergleichbare Daten aufzunehmen, sollten die Probanden in dieser Messreihe der bereits in Kapitel 4 beschriebenen Atemdirektive folgen: einatmen, 15s die Luft anhalten und schließlich mit einem möglichst konstanten Atemfluss von 20l/min ausatmen.

Die Werte für das jeweilige CO-Basislevel wurden aus den Maxima der CO-

Exhalationskurven ermittelt. Pro Datenpunkt wurde über 6–8 Atemzyklen gemittelt. Die Auswertung erfolgte mit einem speziellen LabView-Programm, OriginPro 8G und Microsoft Excel.

Das Spektrometer wurde bei einem Gasfluss von 1000 sccm und einem Druck von 40 mbar betrieben.

Die Probanden waren im Zeitraum der Messung zwischen 27 und 30 Jahre alt. Der folgenden Tabelle 5.1 lassen sich Geschlecht, Alter und Body-Mass-Index der einzelnen Probanden entnehmen.

Proband	Geschlecht	Alter / Jahren	Body-Mass-Index / kg/m ²
1	w	27	20,0
2	m	30	22,4
3	m	27	24,6
4	m	25	26,9
5	m	28	26,0

Tabelle 5.1: Übersicht über die Probanden der Langzeitmessungen

Alle Probanden waren Nichtraucher, gesund und in guter körperlicher Verfassung. In der ersten Messreihe wurden bei den ersten drei Probanden die CO-Basislevel an verschiedenen Tagen über einen Zeitraum von ca. 24 Wochen aufgenommen. Die zweite Messreihe deckte bei dem vierten Probanden einen Zeitraum von ca. 9 Monaten und über 13 Monate bei dem fünften Probanden ab.

Jeder Datenpunkt der Auswertung ergibt sich aus der Mittelung der maximalen CO-Konzentration über 6–8 Atemzyklen. In der ersten Messreihe wurden so pro Proband 13–18 Datenpunkte aufgenommen. Für den vierten Probanden wurden 18 Datensätze ausgewertet. Die Messreihe des fünften Probanden umfasst 46 Datensätze. Die Messungen der ersten Messreihe wurden jeweils zwischen 14 Uhr und 16 Uhr, nach dem Mittagessen aufgenommen. In der zweiten Messreihe wurde auf die zeitliche Beschränkung der Messung verzichtet, um eventuelle Abweichungen zur ersten Reihe evaluieren zu können.

5.1.2 Ergebnisse und Diskussion

Abbildung 5.1 zeigt die Ergebnisse der ersten Messreihe. Die x-Werte geben die Anzahl an Tagen an, die zwischen der ersten Messung und den jeweils folgenden

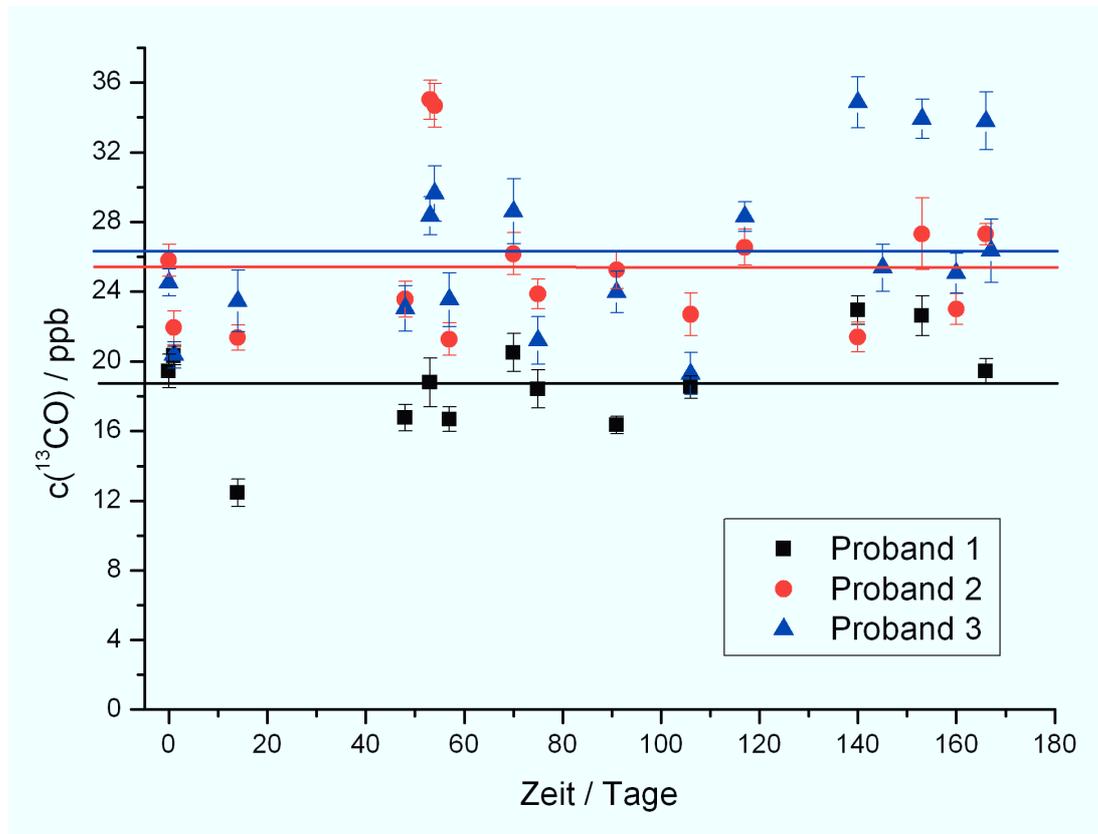


Abbildung 5.1: Ergebnisse der ersten Messreihe der Langzeitmessung des CO-Basislevels.

Die x-Achse zeigt die Tage, die zwischen der ersten und den folgenden Messungen vergangen sind. Die Werte der y-Achse geben die ^{13}CO -Konzentration an, die sich aus der Mittelung der Maximalwerte von 6–8 CO-Exhalationen ergeben. Die jeweiligen Standardabweichungen sind durch Fehlerbalken dargestellt. Die Schwankungen der Datenpunkte um das jeweils berechnete Gesamtmittel sind sehr hoch. Sie liegen zwischen 14,9 % und 17,5 %. Die Unterschiede zwischen den Minima und Maxima betragen bis zu 84,2 %.

Messungen vergangen sind. Die y-Koordinaten spiegeln die berechneten Datenpunkte zum CO-Basislevel wider. Aus den dabei bestimmten Standardabweichungen folgen die eingezeichneten Fehlerbalken.

Zunächst fällt auf, dass die Probandin im Mittel ein niedrigeres Basislevel aufweist, als die beiden männlichen Testpersonen. Die Mittelwerte betragen 18,7 ppb für die Probandin 1 und 25,4 ppb bzw. 26,3 ppb für die Probanden 2 und 3.

Weiterhin ist die große Streuung der Messwerte auffällig. Die Standardabweichungen über die Datenpunkte der gesamten Messreihe liegen zwischen 14,9 % und 17,5 %. Die Maximalkonzentrationen können dabei sogar um bis zu 84,2 % von den Minimalkonzentrationen abweichen. Betrachtet man die Standardabweichungen der einzelnen Messpunkte, so fällt auf, dass diese erfreulich klein sind. Die maximale

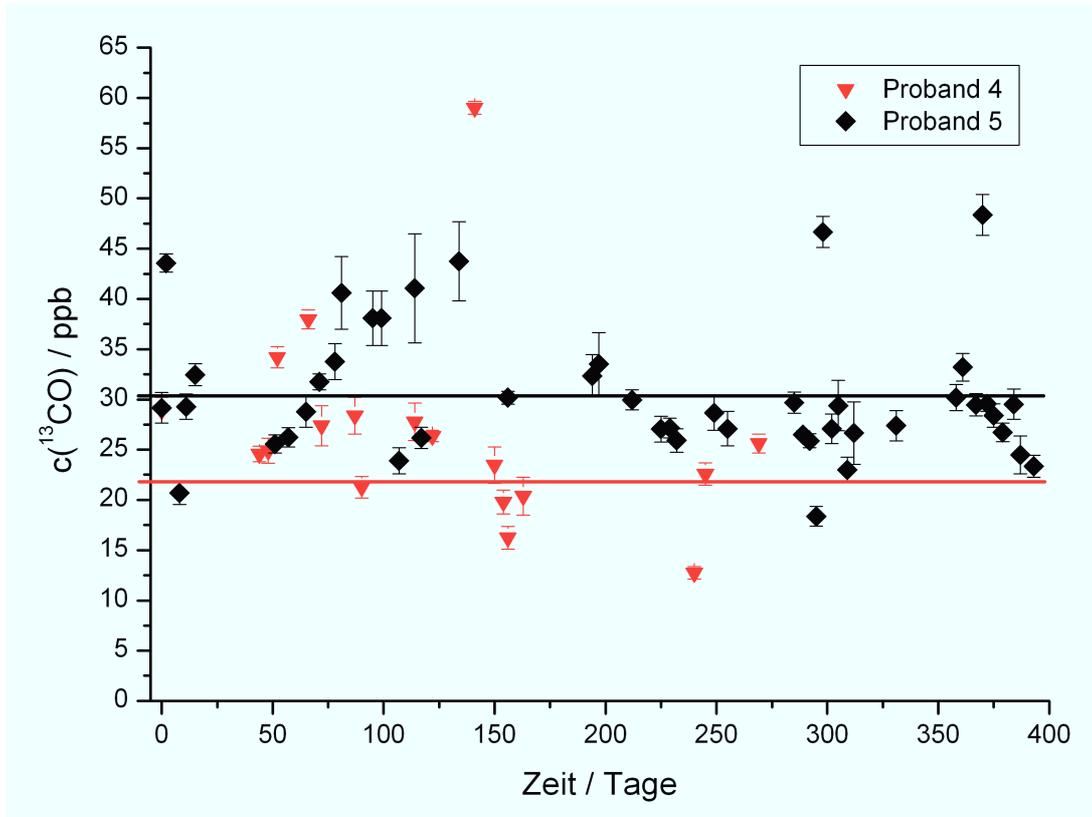


Abbildung 5.2: Ergebnisse der zweiten Messreihe der Langzeitmessung des CO-Basislevels. Die x-Achse zeigt die Tage, die zwischen der ersten und den folgenden Messungen vergangen sind. Die Werte der y-Achse geben die ^{13}CO -Konzentration an, die sich aus der Mittelung der Maximalwerte von 6–8 CO-Exhalationen ergeben. Die jeweiligen Standardabweichungen sind durch Fehlerbalken dargestellt. Die Schwankungen der Datenpunkte um das jeweils berechnete Gesamtmittel sind hier noch höher als bei der ersten Messreihe. Sie liegen bei 37,3 % bei Proband 4 und 21,6 % bei Proband 5. Die Unterschiede zwischen den Minima und Maxima betragen bei Proband 4 ca. 465 % und bei Proband 5 ca. 263 %.

Abweichung liegt bei ca. 7,5 % des Messwertes bei Tespersion 2. Im Mittel liegt sie aber bei unter 5,1 %. Dies ist auf die gute Reproduzierbarkeit der Messungen durch die vorgestellte Atemdirektive zurückzuführen.

Die Ergebnisse der zweiten Messreihe zeigen noch größere Abweichungen, sowohl was die Standardabweichung über die gesamte Reihe, als auch was die maximale Abweichung zwischen den Minimal- und den Maximalkonzentrationen angeht. Abbildung 5.2 stellt die Ergebnisse dieser Messreihe graphisch dar. Die Mittelwerte liegen in etwa im gleichen Bereich wie die der ersten Messreihe. Für Proband 4 ergibt



Proband	$\bar{\varnothing}^{13}\text{CO}$ / ppb	Standard- abweichung	$^{13}\text{CO}_{Min}$ / ppb	$^{13}\text{CO}_{Max}$ / ppb
1	18,7	14,9 %	12,5	22,9
2	25,4	16,6 %	21,3	35,0
3	26,3	17,5 %	19,3	34,9
4	26,8	37,3 %	12,7	59,0
5	30,4	21,6 %	18,4	48,4

Tabelle 5.2: Zusammenfassung der Ergebnisse der CO-Langzeitmessung

sich ein Mittel von $26,8 \text{ ppb} \pm 37,3 \%$ und für die 5. Testperson $30,4 \text{ ppb} \pm 21,6 \%$. Die maximalen Abweichungen betragen hier sogar 465% für die 4. bzw. 263% für die 5. Testperson. Die Standardabweichungen der Einzelmesswerte sind auch hier sehr niedrig, mit einem Mittel von $4,5 \%$ bei Proband 4 und $5,3 \%$ bei Proband 5. Allerdings ist die maximale Abweichung bei letzterem mit $13,2 \%$ etwas höher.

Tabelle 5.2 fasst die Ergebnisse beider Messreihen nochmals zusammen.

Der Messfehler des CALO-Spektrometers liegt bei ca. 3% . Das bedeutet, dass die oben angesprochenen großen Abweichungen von einem Messtag auf den anderen nicht durch Systemfehler, sondern durch natürliche Schwankungen bedingt sind. Eine mögliche Erklärung für einen Teil der Differenzen könnte die Einatmung von exogenem Kohlenmonoxid sein, wie er z.B. in Abgasen auf dem Weg zur Arbeit vorkommen kann. Weiterhin sind die Fehlerbalken der einzelnen Datenpunkte hauptsächlich biologischen Ursachen zuzuschreiben. Eine absolut identische Wiederholung der Atmung ist nicht möglich. Der Einatemfluss und vor allem die Einatemtiefe können mit dem vorhandenen Capnographen nicht ausreichend kontrolliert werden. Des Weiteren bedarf es einiger Übung, um die Atemflüsse möglichst exakt zu kontrollieren. Schließlich darf auch der Stressfaktor, den eine solche Messung auf die Testpersonen hat, nicht außer Acht gelassen werden. Die physiologischen Faktoren, wie Puls oder Blutdruck konnten im Rahmen dieser, hauptsächlich auf die Physik fokussierten Messreihe, nicht miteinkalkuliert werden. Dennoch ist hier nochmals anzumerken, dass es nicht nötig ist dies zu tun, da die verwendete Atemdirektive eine absolut ausreichende Reproduzierbarkeit der Atemzüge ermöglicht.

Ein Indiz für weitere noch unbekanntere Einflussfaktoren auf die CO-Konzentration

gibt der Vergleich der ersten mit der zweiten Messreihe. Alleine der Freiheitsgrad der Zeit, bei der die Messungen durchgeführt wurden, führte zu einem beachtlichen Anwachsen der Messwertstreuung. Um ein möglichst konstantes Basislevel aufzunehmen, ist folglich zu empfehlen, die Zahl der Freiheitsgrade (z.B. Uhrzeit, vor dem Essen / nach dem Essen) zu minimieren.

Die Ergebnisse der in diesem Abschnitt präsentierten Messungen zeigen, wie wichtig es ist, die CO-Konzentrationen mit größter Sorgfalt zu untersuchen. Eine Untersuchung, die sich nur auf einen sehr kurzen Zeitraum beschränkt, könnte sehr leicht zu falschen Schlussfolgerungen führen. Die hier präsentierten Messungen der CO-Ausatemkonzentration über einen langen Zeitraum verdeutlichen, wie schwierig es sein kann, beispielsweise durch oxidativen Stress induzierte Schwankungen von unvermeidbaren natürlichen Variationen zu unterscheiden. Ein Abfall der CO-Konzentration, wie er in Abschnitt 5.2 beschrieben wird, würde nicht als induzierte Änderung erkannt werden, wenn das CO-Basislevel nicht am selben Tag vor der eigentlichen Messung aufgenommen werden würde. Die unterschiedliche CO-Konzentration würde höchstwahrscheinlich fälschlicher Weise als natürliche Schwankung betrachtet werden, wie sie auch bei der Messreihe des CO-Basislevels aufgetreten sind.

5.2 Einfluss körperlicher Anstrengung auf die CO-Konzentration

In diesem Kapitel wird der Einfluss von intensiver körperlicher Betätigung auf die CO-Ausatemkonzentration untersucht.

Einige Forschungsgruppen beschäftigen sich mit dem Thema von oxidativem Stress, der durch intensives körperliches Training hervorgerufen wird [Wys05, Tho05, Dek06, Cas06]. Die Ergebnisse sind zum Teil kontrovers, allerdings zeigen sich in der Mehrheit der Studien eindeutige Hinweise auf einen erhöhten oxidativen Stressstatus in Verbindung mit größerer körperlicher Anstrengung, wie sie beim Radfahren, Rudern etc. auftreten.

Oxidativer Stress äußert sich in einer erhöhten HO-1-Aktivität. Diese ist für den Hauptteil der endogenen CO-Produktion verantwortlich. Somit ist auch auf einen Zusammenhang zwischen oxidativem Stress und der CO-Ausatemkonzentration zu schließen.



Wyse et al. versuchten in ihrer Studie [Wys05] eine Korrelation zwischen der sportlichen Betätigung und der ausgeatmeten CO-Konzentration festzustellen. Die Testsubjekte dabei waren Hunde, Pferde und Menschen. Für die Messung der CO-Konzentrationen verwendeten sie einen kommerziell erhältlichen elektrochemischen CO-Analysator (MicroLyser, Bedfont Scientific). Der Messbereich dieses Geräts lag bei 1–500 ppm und hatte eine Sensitivität von 1 ppm. Die gemessenen CO-Level bewegten sich in dieser Studie in Bereichen von 1–3 ppm. Die festgestellten Schwankungen lagen in einem Bereich von 1 ppm. Angesichts der technischen Daten des verwendeten Analysators zeigt sich, dass dieser für diese Messung nicht sensitiv genug war, um qualifizierte Aussagen über Änderungen der CO-Ausatemkonzentrationen zu treffen.

Der Einsatz der hochsensitiven Cavity-Leak-Out-Spektroskopie soll in diesem Bereich eindeutige Aussagen über eventuelle Änderungen der CO-Konzentration durch intensive körperliche Anstrengung ermöglichen.

5.2.1 Messmethoden und Messverfahren

Die Messungen dieser Studie wurden mit 10 Probanden durchgeführt. Sie waren Nichtraucher, zum Zeitpunkt der Messungen gesund und in einem guten körperlichen Zustand. Die folgende Tabelle 5.3 fasst die wichtigsten Daten wie Alter, Geschlecht und Body-Mass-Index der Teilnehmer zusammen:

Proband	Geschlecht	Alter / Jahren	Größe / cm	Gewicht / kg	Body-Mass-Index / kg/m ²
1	w	25	159	45	17,8
2	w	19	175	54	17,6
3	w	27	170	58	20,1
4	m	24	178	56	17,7
5	m	28	178	115	36,3
6	m	24	171	74	25,3
7	m	23	176	60	19,4
8	m	25	190	90	24,9
9	m	27	189	88	24,6
10	m	30	179	72	22,5

Tabelle 5.3: Übersicht über die Probanden der Sportmessung

Im ersten Teil der Messung wurde von jedem Probanden das CO-Basislevel als Startkonzentration aufgenommen. Dazu wurden, wie in Abschnitt 5.1.1 erläutert, 6–8 CO-Exhalationskurven aufgenommen. Die Werte der einzelnen Atemzüge wurden gemittelt und die Standardabweichung berechnet.

Nachdem die CO-Basislevel aufgenommen waren, führten die Probanden jeweils ein 30-minütiges Training auf einem Fahrradergometer durch. Dabei sollte die Pulsfrequenz 150–160 Schläge/min betragen. Das Training in diesem Pulsbereich führte bei allen Probanden zu einer starken Erschöpfung, wie es auch in den Studien von Wyse und Dekany [Wys05, Dek06] der Fall war.

Nach einer Erholungsphase von ca. 5 min, in der sich die Atmung und die Herzschlagfrequenz der Probanden soweit beruhigt hatten, dass sie die Atemdirektive wieder einhalten konnten, wurden erneut die CO-Ausatemkonzentrationen bestimmt.

5.2.2 Ergebnisse und Diskussion

Die Ergebnisse dieser Messreihe sind der Übersicht halber auf zwei Graphen in Abbildung 5.3 aufgeteilt. Der obere Graph zeigt die Ergebnisse für die weiblichen Probanden (Probanden 1–3), der untere Graph stellt die Ergebnisse der 7 männlichen Probanden dar. Bei allen Probanden ist nach der körperlichen Anstrengung eine deutliche Reduktion der CO-Ausatemkonzentration im Vergleich zu dem vorher aufgenommenen CO-Basislevel zu erkennen. Dieser Abfall beträgt zwischen 9,5 % und 23,3 % mit einem Mittel von 17,7 %. Die Höhe der Reduktion scheint in keinerlei Korrelation mit dem Geschlecht, dem Körpergewicht oder dem Fitnesszustand zu stehen. Allerdings zeigen die CO-Basislevel eine Tendenz zu kleineren Werten bei den weiblichen Testpersonen. Die Konzentrationen schwanken hier zwischen 16 ppb und 20 ppb mit einem Mittel von 17,5 ppb. Bei den männlichen Probanden variieren die CO-Konzentrationen zwischen 21 ppb und 34 ppb mit einem Durchschnitt von 27,5 ppb. Weitere Zusammenhänge zwischen Körpergewicht oder Fitnesszustand können nicht festgestellt werden. Dies führt zu der Schlussfolgerung, dass das generell niedrigere Körpergewicht bei Frauen keine entscheidene Erklärung für den Unterschied zwischen den CO-Basiswerten von Frauen und Männern sein kann. Tabelle 5.4 gibt einen Überblick über die Einzelergebnisse.

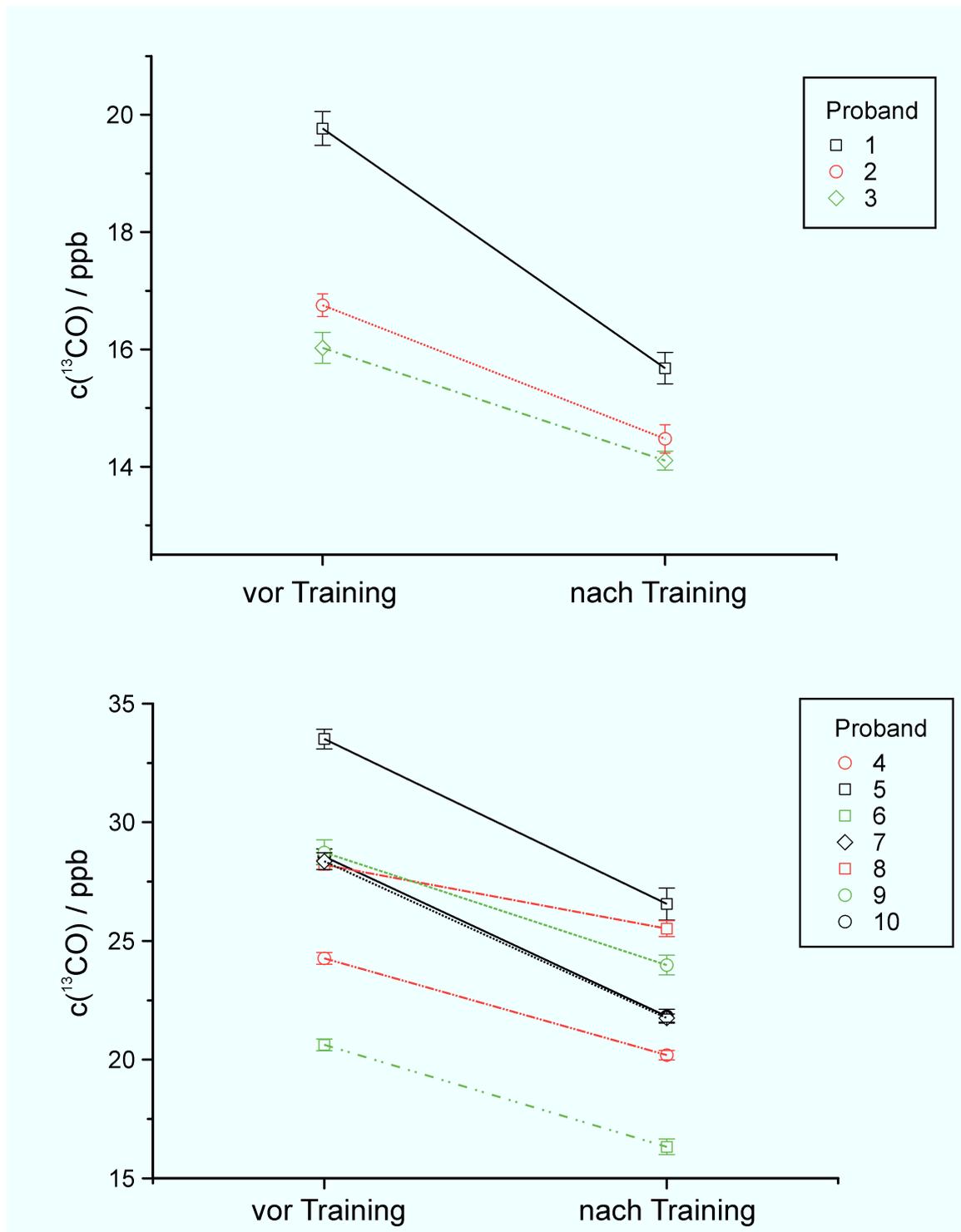


Abbildung 5.3: Ergebnisse zum Einfluss körperlicher Anstrengung auf die CO-Konzentration. Der obere Graph zeigt die Ergebnisse für die weiblichen, der untere Graph für die männlichen Probanden. In allen Fällen ist ein eindeutiger Abfall der CO-Konzentration zu beobachten. Die Differenzen betragen zwischen 9,5 % und 23,3 %.

Proband	CO-Konzentration				Differenz
	vor Sport / ppb	Stabw.	nach Sport / ppb	Stabw.	
1	19,8	4,1 %	15,7	4,8 %	20,7 %
2	16,8	3,5 %	14,5	4,7 %	13,6 %
3	16,0	4,7 %	14,1	3,2 %	12,0 %
4	24,3	3,0 %	20,2	2,8 %	16,8 %
5	33,5	3,9 %	26,6	7,7 %	20,7 %
6	20,6	3,4 %	16,3	5,3 %	20,8 %
7	28,4	3,5 %	21,8	2,3 %	23,3 %
8	28,2	2,2 %	25,5	3,9 %	9,5 %
9	28,7	6,1 %	24,0	5,5 %	16,5 %
10	28,6	0,4 %	21,8	4,2 %	23,2 %

Tabelle 5.4: Zusammenfassung der Ergebnisse der CO-Sportmessung

Die Reduktion der CO-Konzentration lässt auf eine Art Auswaschprozess aus dem Körper schließen. Die Ursache hierfür ist wahrscheinlich die erhöhte Herz- und Atemfrequenz während der Fahrradergometer-Phase und dem damit veränderten Metabolismus. Daraus folgt, dass eine erhöhte CO-Produktion, z.B. auf Grund oxidativen Stresses, nicht in den Daten zu erkennen ist, da der Auswaschprozess kleinere Änderungen deutlich überdeckt.

Als Schlussfolgerung ergibt sich für Studien, die eine Verbindung zwischen exogenen Stimulanzen und der ausgeatmeten CO-Konzentration untersuchen, dass die Probanden in den Stunden vor der Messung keine große körperlichen Anstrengungen vollzogen haben sollten. Abbildung 5.4 zeigt den Verlauf der CO-Konzentration während der Regenerationsphase nach einer wie oben beschriebenen Sportmessung. Selbst nach 5 h Ruhe hat die CO-Konzentration nicht das ursprüngliche Basislevel erreicht. Eine Erklärung für dieses Verhalten könnte ein erhöhtes CO-Basislevel sein, wie es etwa durch das Einatmen von CO aus der Umwelt, z.B. Autoabgase, hervorgerufen wird. Nach dem Auswaschprozess sorgt die endogene CO-Produktion für eine Regulierung der CO-Ausatemkonzentration auf ein Gleichgewichtsniveau. Dieses neue Niveau ist dann, wegen mangelnder äußerer Einflüsse, niedriger als das Ursprungslevel.

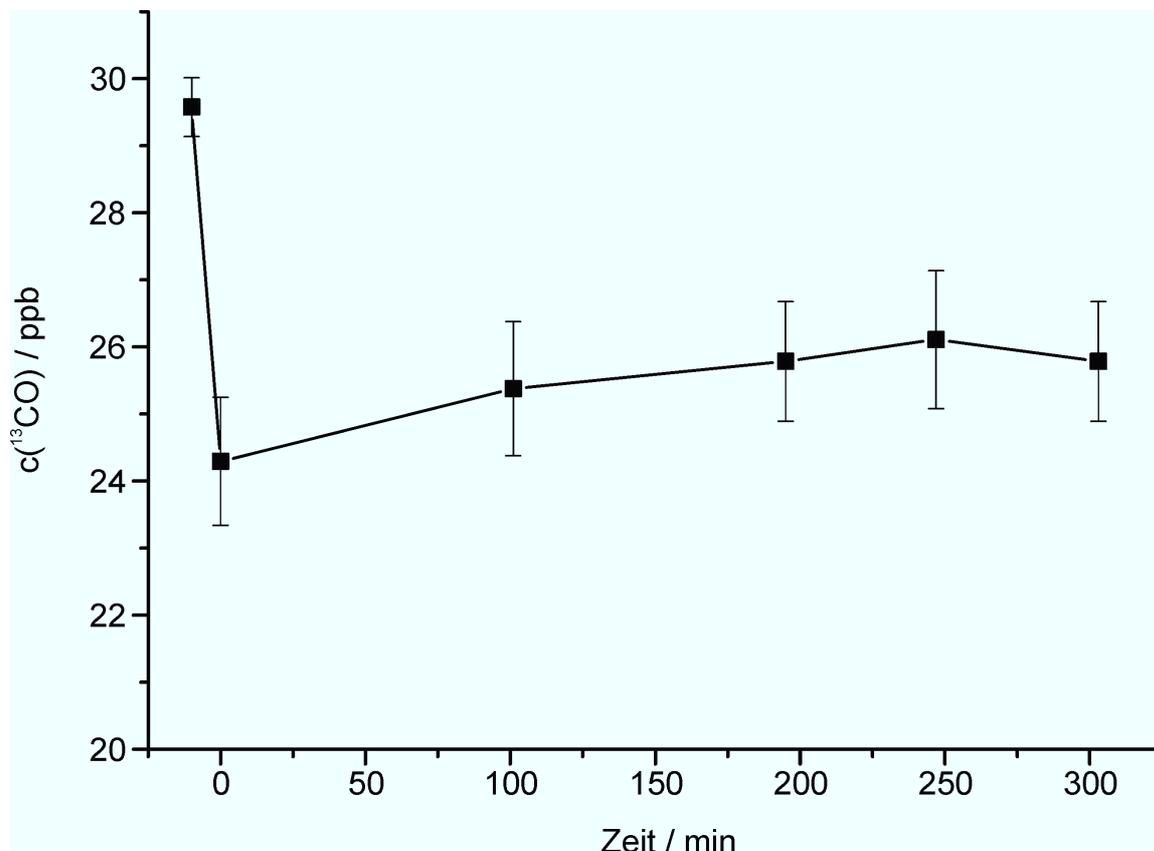


Abbildung 5.4: CO-Konzentrationsregeneration nach einer Sportmessung. Die ersten zwei Punkte zeigen den Abfall der CO-Konzentration durch die Sportmessung. Die Null der Zeitachse beschreibt den ersten Messpunkt nach dem Training. Nach einer Erholungszeit von 5 Stunden hat die CO-Konzentration nicht die ursprüngliche Höhe erreicht, sondern liegt noch etwa 12,8 % darunter.

5.3 Zusammenfassung

Der erste Teil dieses Kapitels beschäftigt sich mit einer Untersuchung des CO-Basislevels über einen langen Zeitraum (> 24 Wochen). Dabei wurden enorme Schwankungen der CO-Konzentrationen zwischen den einzelnen Messtagen festgestellt. Die Anzahl der Freiheitsgrade, z.B. Uhrzeit, Nahrungsaufnahme etc. während einer Messreihe hatte hier einen großen Einfluss auf die mittleren Abweichungen der einzelnen Datenpunkte vom Durchschnittswert. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die Messungen für eine reproduzierbare Bestimmung des CO-Basislevels zur möglichst gleichen Zeit und unter gleichen Bedingungen durchgeführt werden sollten. Der zweite Teil dieses Kapitels zeigt dann, dass auch körperliche Anstrengung einen großen Einfluss auf die CO-Ausatemkonzentration haben kann.

Aus den großen Abweichungen von den Durchschnittswerten über mehrere Messtage gesehen, ergibt sich auch, dass für eine Untersuchung von äußeren Einflüssen, das CO-Level am selben Tag noch vor der Stimulierung gemessen werden sollte, um qualifizierte Aussagen über die Einflussfaktoren treffen zu können.

Die im zweiten Teil dieses Kapitels präsentierte Sportmessung demonstriert zum einen, dass eine durch oxidativen Stress erhöhte CO-Konzentration nicht festgestellt werden konnte, da ein Auswaschprozess, vermutlich durch erhöhte Herz- und Atemfrequenz bedingt, für eine deutliche Reduktion der CO-Ausatemkonzentration sorgte. Zum anderen konnten für diese Versuchsreihe bereits die Erkenntnisse der Langzeitmessungen genutzt werden. Nur die Konzentrationsbestimmung unmittelbar vor der sportlichen Tätigkeit ermöglichte eine Quantifizierung der Differenz. Ohne diese vorherige Messung wären die Änderungen der CO-Konzentrationen, trotz einer mittleren Änderung von 17,7%, nicht von natürlichen Schwankungen des CO-Basislevels zu unterscheiden.

Zusammengefasst konnte mit den hier präsentierten Messreihen gezeigt werden, dass das CALOS-System durch seine hohe Sensitivität und Selektivität dazu geeignet ist, Änderungen in der CO-Ausatemkonzentration nachzuweisen. Ein solcher Nachweis war mit anderen Systemen bisher nicht möglich. In diesem Zusammenhang wurde dargelegt, dass induzierte CO-Konzentrationsänderungen nur identifiziert und quantifiziert werden können, wenn sie entweder einem Vielfachen des Basislevels entsprechen oder wenn das Basislevel unmittelbar vor der Stimulierung gemessen wird. Eine Messung des Basislevels hat sich hier als unabdingbar erwiesen.

Die Ergebnisse aus diesem Kapitel wurden im Rahmen eines Artikels im Journal of Breath Research veröffentlicht [Sow10].

6 Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein im 5 μm -Bereich betriebenes Cavity-Leak-Out-Spektrometer optimiert und für isotopologenselektive CO-Messungen eingesetzt.

Durch eine optimierte Justierung des für das Spektrometer verwendeten CO-Gaslasers konnte eine Erhöhung der Laserleistung von über 46 % erzielt werden. Die neuen Laserparameter bewirkten eine deutliche Verbesserung des Dynamikbereichs. Das Detektionslimit auf dem P25- ^{13}CO -Übergang konnte mit dem P21- ^{13}CO -Übergang, der 4-mal so stark ist, egalisiert werden. Der Unterschied in der Linienstärke führt dazu, dass das obere Detektionslimit um den gleichen Faktor erhöht und somit der Dynamikbereich vervierfacht wurde.

Die Änderung der Druckregelung für die Nachweiszelle erlaubt eine weitere Vervielfachung des Dynamikbereichs zu hohen Gaskonzentrationen hin, indem die Option zur Gasverdünnung bei gleichbleibender Zeitauflösung gegeben wurde.

Die Erhöhung des Dynamikbereichs konnte erfolgreich für die ^{13}CO -Atemgasmessungen zur Bestimmung der Hämoglobingesamtmasse genutzt werden.

Die Entwicklung einer kompakten und leistungsstarken, auf Peltier-Elementen basierenden, Temperaturstabilisierung der Nachweiszelle ermöglicht einen Einsatz der Nachweiszelle selbst außerhalb einer Laborumgebung. Im Vergleich zu dem Vorgängermodell konnte die Temperaturstabilität um einen Faktor > 10 auf $\pm 0,01^\circ\text{C}$ verbessert werden. Diese Genauigkeit konnte über einen Zeitraum von über 5,5 Tagen aufrechterhalten werden. Die Langzeitstabilität des Spektrometers konnte damit nochmals um 30 % auf 143 s erhöht werden.

Die Weiterentwicklung einer nicht-invasiven Methode zur Bestimmung der Hämoglobingesamtmasse mittels einer isotopologenselektiven ^{13}CO -Atemanalyse weist gegenüber anderen Systemen, die nur auf natürlichem CO basieren [Bur95, Sch05, Pro08], deutliche Vorteile aus. Zum einen konnte die hier ver-

wendete CO-Menge um einen Faktor von ca. 100 auf 1 ml pro Messung reduziert werden. Diese Menge ist für Menschen absolut ungefährlich und kann auch für häufige Messungen bedenkenlos eingesetzt werden. Zum anderen erlaubt diese Vorgehensweise, auf eine Blutanalyse komplett zu verzichten, so dass die hier präsentierte nicht-invasive Methode auch für die Probanden wesentlich angenehmer ist.

Drei Langzeitmessungen über einen Zeitraum von >3 Monaten bewiesen die sehr gute Reproduzierbarkeit der tHb-Messdaten und die Übereinstimmung mit medizinisch anerkannten Abschätzungen zur Hämoglobing Gesamtmasse.

Eine abschließende Untersuchung der Methode hinsichtlich der Detektierbarkeit von induzierten Schwankungen der Hämoglobing Gesamtmasse durch eine Blutspende zeigte in allen 10 Messreihen einen eindeutigen Unterschied zu vorher aufgenommenen Referenzdaten. Damit zeigt sich, dass die am Institut für Lasermedizin entwickelte tHb-Messmethode zum eindeutigen Nachweis von Eigenblutdoping geeignet ist.

Die hohe Sensitivität und Kalibrationsfreiheit der Cavity-Leak-Out-Spektroskopie ermöglichte hier erstmals eine Langzeitanalyse des CO-Basislevels in der Ausatemluft. Die Evaluierung dieser Langzeitmessung ergab, dass das CO-Basislevel sehr starken Schwankungen unterliegt. Daraus lässt sich schließen, dass einzelne CO-Konzentrationswerte nicht aussagekräftig sind, um etwaige Markereigenschaften des CO zu untersuchen. Die Ergebnisse einer ebenfalls durchgeführten Studie zu induzierten Änderungen der CO-Ausatemkonzentration, die durch Sport hervorgerufen wurden, sind in Hinblick auf die Genauigkeit mit anderen Systemen bisher nicht erreicht worden. Die aus beiden Messreihen gewonnenen Erkenntnisse lassen sich für zukünftige CO-Atemgasuntersuchungen einsetzen, um Fehlinterpretationen der Ergebnisse zu vermeiden.

Die präsentierten Ergebnisse für höchst sensitive und isotopologenselektive ^{13}CO -Spurengasmessungen zeigen das große Potential der Cavity-Leak-Out-Spektroskopie. Durch den Einsatz kompakter Quantenkaskadenlaser (QCL) ließe sich der gesamte Aufbau soweit komprimieren, dass ein transportables System möglich wäre. Die hier entwickelte Temperaturstabilisierung der Messzelle ist bereits für einen transportablen Einsatz konzipiert. Allerdings sind die Anforderungen an die Laserquelle bezüglich der Strahlqualität und Frequenzstabilität so hoch, dass aktuelle QCL mit Emissionslinien im $5\ \mu\text{m}$ -Bereich diesen Ansprüchen noch nicht genügen.

Abbildungsverzeichnis

2.1	Hämoglobin und Häm.	8
2.2	Skizze zum Aufbau der Gefäßsysteme in der Lunge.	9
2.3	Standard-Sauerstoffbindungskurven für Myoglobin und Hämoglobin. .	11
2.4	Absorptionsspektren im Wellenlängenbereich um $5\ \mu\text{m}$ von CO , CO_2 , H_2O , NO und OCS bei $p = 50\ \text{mbar}$ und $T = 296\ \text{K}$	18
2.5	Absorptionsspektren von ^{12}CO und ^{13}CO im Wellenlängenbereich um $5\ \mu\text{m}$ bei $p = 50\ \text{mbar}$ und $T = 296\ \text{K}$	19
2.6	Prinzip der Cavity-Leak-Out-Spektroskopie.	21
2.7	Abklingsignale eines CALO-Spektrometers.	23
3.1	Aufbau des verwendeten CO -Lasers.	28
3.2	Verstärkungsprofil der Seitenbanderzeugung.	30
3.3	Emissionsspektrum des CO -Lasers nach der Neujustierung des Laser- resonators.	32
3.4	Optischer Aufbau des Cavity-Leak-Out-Spektrometers.	33
3.5	Die Nachweiszelle.	34
3.6	Der elektronische Aufbau.	35
3.7	Das Gassystem.	37
3.8	Dehydrierung der Gasprobe durch einen Nafionschlauch.	38
3.9	Linienauswahl zur ^{13}CO Untersuchung.	41
3.10	Temperaturschwankungen im Labor in einem Zeitraum von zwei Tagen.	43
3.11	Aufbau der bisherigen Temperaturstabilisierung.	44
3.12	Aufbau der neuen Temperaturstabilisierung.	46
3.13	Detailaufnahme der Peltier-Einheit.	47
3.14	Temperaturverlauf mit der neuen Stabilisierung bei einer Regeltempe- ratur von 20°C	48
3.15	Temperaturverlauf mit der neuen Stabilisierung bei einer Regeltempe- ratur von 14°C	49



3.16	Temperaturverlauf mit der neuen Stabilisierung bei einer Regeltemperatur von 36°C.	50
3.17	Temperaturverlauf mit der neuen Stabilisierung bei einer Regeltemperatur von 12°C.	51
3.18	Langzeitstabilität der neuen Stabilisierung bei einer Regeltemperatur von 16°C.	52
3.19	Allan-Varianz-Messung mit Temperaturstabilisierung (20°C) auf der 4P11 Laserlinie.	53
3.20	Foto der zentralen Elemente der neuen Druckregelung.	56
4.1	Mundstück zur Online-Atemmessung.	60
4.2	Beispiel einer CO-Ausatemkurve unter Anwendung der Atemdirektive.	61
4.3	Skizze des Versuchsaufbaus zur ¹³ CO-Atmung aus der Gasflasche.	63
4.4	Mundstück für die Verabreichung von ¹³ CO-Atmung aus einer Spritze.	65
4.5	Vermessen des vom Körper nicht aufgenommenen ¹³ CO.	67
4.6	Online-Messung des vom Körper nicht aufgenommenen ¹³ CO.	68
4.7	tHb-Langzeitmessung von Proband 1.	70
4.8	tHb-Langzeitmessung von Proband 2.	71
4.9	tHb-Langzeitmessung von Proband 3.	71
4.10	Blutspende mit tHb-Bestimmung Messreihe 1.	73
4.11	Blutspende mit tHb-Bestimmung Messreihe 2.	73
4.12	Blutspende mit tHb-Bestimmung Messreihe 3.	74
4.13	Blutspende mit tHb-Bestimmung Messreihe 4.	74
4.14	Blutspende mit tHb-Bestimmung Messreihe 5.	75
4.15	Blutspende mit tHb-Bestimmung Messreihe 6.	75
4.16	Blutspende mit tHb-Bestimmung Messreihe 7.	76
4.17	Blutspende mit tHb-Bestimmung Messreihe 8.	76
4.18	Blutspende mit tHb-Bestimmung Messreihe 9.	77
4.19	Blutspende mit tHb-Bestimmung Messreihe 10.	77
5.1	Ergebnisse der 1. Messreihe der Langzeitmessung des CO-Basislevels.	84
5.2	Ergebnisse der 2. Messreihe der Langzeitmessung des CO-Basislevels.	85
5.3	Ergebnisse zum Einfluss körperlicher Anstrengung auf die CO-Konzentration.	90
5.4	CO-Konzentrationsregeneration nach einer Sportmessung.	92

Literaturverzeichnis

- [Alo10] M. ALONSO, M. CASTELLANOS und J. SANCHEZ. *Evaluation of potential breath biomarkers for active smoking: assessment of smoking habits*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, **396** (8): 2987–2995 (2010).
- [Ant00] J. D. ANTUNI, S. A. KHARITONOV, D. HUGHES, M. E. HODSON und P. J. BARNES. *Increase in exhaled carbon monoxide during exacerbations of cystic fibrosis*. Thorax, **55** (2): 138–142 (2000).
- [Ant07] B. ANTUS und I. HORVATH. *Exhaled nitric oxide and carbon monoxide in respiratory diseases*. Journal of Breath Research, **1** (2) (2007). doi: 10.1088/1752-7155/1/2/024002.
- [Arm11] ARMACELL GMBH. *AF/Armaflex* (Zugriff: 19.09.2011). URL [http://www.armacell.de/www/armacell/ACwwwAttach.nsf/ansFiles/AFArmaflexProductRangeDE.pdf/\\$FILE/AFArmaflexProductRangeDE.pdf](http://www.armacell.de/www/armacell/ACwwwAttach.nsf/ansFiles/AFArmaflexProductRangeDE.pdf/$FILE/AFArmaflexProductRangeDE.pdf).
- [Bab08] E. BABUSIKOVA, M. JESENAK, P. DURDIK, D. DOBROTA und P. BANOVICIN. *Exhaled Carbon Monoxide As A New Marker of Respiratory Diseases in Children*. Journal of Physiology and Pharmacology, **59** (9–17) (2008).
- [Bed11] BEDFONT SCIENTIFIC LTD. *Bedfont Smokerlyzer* (Zugriff: 08.09.2011). URL http://www.bedfont.com/downloads/pico+/Smokerlyzer_catalogue.pdf.
- [Beh99] C. BEHL. *Alzheimer's disease and oxidative stress: Implications for novel therapeutic approaches*. Progress in Neurobiology, **57** (3): 301–323 (1999).
- [Beu03] G. BEUTEL, G. HEIL und A. GANSER. *Anämie auf einen Blick*. Blackwell Verlag (2003).



- [Bou67] H. BOUR und I. M. LEDINGHAM. *Carbon Monoxide Poisoning*, Band 24 von *Progress in Brain Research*. Elsevier Science Ltd (1967). Kapitel 1.
- [Bur95] C. M. BURGE und S. L. SKINNER. *Determination of Hemoglobin Mass and Blood-Volume with CO - Evaluation and Application of a Method*. *Journal of Applied Physiology*, **79** (2): 623–631 (1995).
- [Cas06] N. CASES, A. SUREDA und I. E. A. MAESTRE. *Response of antioxidant defences to oxidative stress induced by prolonged exercise: antioxidant enzyme gene expression in lymphocytes*. *European Journal of Applied Physiology*, **98** (3): 263–269 (2006).
- [Cla10] D. CLASING, Herausgeber. *Doping und seine Wirkstoffe. Verbotene Arzneimittel im Sport*. Spitta Verlag GmbH & Co. KG Balingen, 2. Auflage (2010). Kapitel: Dopingmittel.
- [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** (11): 1899pp (1965).
- [Dam10] R. DAMSGAARD. *Comment on -The hybrid algorithm (Hbmr) to fight against blood doping in sports- by F. Sanchis-Gomar et al*. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports*, **20** (6): 792–793 (2010).
- [Dau11] M. DAUNDERER. *Klinische Toxikologie – Kohlenmonoxid* (Zugriff: 18.06.2011). URL <http://www.toxcenter.de/stoff-infos/k/kohlenmonoxid.pdf>.
- [Dek06] M. DEKANY, V. NEMESKERI, I. GYORE, I. HARBULA, J. MALOMSOKI und J. PUCSOK. *Antioxidant status of interval-trained athletes in various sports*. *International Journal of Sports Medicine*, **27** (2): 112–116 (2006).
- [Dem03] W. DEMTRÖDER. *Laser Spectroscopy - Basic Concepts and Instrumentation*. Springer Verlag Berlin Heidelberg, 3. Auflage (2003). Kapitel: 6.2.3 Cavity Ring-Down Spectroscopy.
- [Dic83] R. E. DICKERSON und I. GEIS. *Hemoglobin: structure, function, evolution, and pathology*. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. (1983). Kapitel 2.1.

- [Fei08] K. FEIDEN und H. BLASIUS. *Doping im Sport. Wer–Womit–Warum*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, 2. Auflage (2008). Kapitel: 2 Doping-Mittel und Doping-Methoden; 6 Bekämpfung des Dopings.
- [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** (1) (2007). doi:10.1088/1752-7155/1/1/014002.
- [Fri08a] T. FRITSCH. *Infrarot Laserspektroskopie zum hochempfindlichen Nachweis von CO und NO in biomedizinischen Anwendungen*. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (2008).
- [Fri08b] 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** (3) (2008). doi:10.1117/1.2937215.
- [Gor04] V. GORELOV. *Theoretical value of Hufner’s constant*. Anaesthesia, **59** (1): 97–98 (2004).
- [Hae11] *Haemoglobin* (Zugriff: 31.07.2011). URL <http://www.personal.psu.edu/amd16/images/Haemoglobin.png>.
- [Hal04] D. HALMER, G. VON BASUM, P. HERING und M. MÜRTZ. *Fast exponential fitting algorithm for real-time instrumental use*. Review of Scientific Instruments, **75** (6): 2187–2191 (2004).
- [Hei07] K. HEINRICH. *Aufbau und Charakterisierung einer temperaturstabilen Cavity-Leak-Out Spektroskopiezelle*. Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (2007).
- [Hei10] K. HEINRICH. *Infrarot-Laserspektroskopie für den hochempfindlichen, isotopologenselektiven Nachweis von Spurengasen*. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (2010).
- [Hem11] *Haem b* (Zugriff: 31.07.2011). URL http://metallo.scripps.edu/PROMISE/haemb_x.gif.
- [HIT11] *The HITRAN Database* (Zugriff: 19.08.2011). URL <http://www.cfa.harvard.edu/HITRAN/>.



- [Jan03] P. G. J. M. JANSSEN. *Ausdauertraining. Trainingssteuerung über die Herzfrequenz- und Milchsäurebestimmung*. Spitta Verlag GmbH & Co. KG Balingen, 3. Auflage (2003). Kapitel: Das Sauerstofftransportvermögen des Blutes.
- [Ker02] J. KERN. *Das Dopingproblem. Wirkung und Nebenwirkungen von Doping-substanzen im Kraft- und Ausdauersport*. Verlag Wilhelm Maudrich Wien (2002). Kapitel: Erythropoetin (EPO).
- [Kha01] S. A. KHARITONOV und P. J. BARNES. *Exhaled markers of pulmonary disease*. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, **163** (7): 1693–1722 (2001).
- [Kol95] S. KOLETZKO, M. HAISCH, I. SEEBOTH, B. BRADEN, K. HENGELS, B. KOLETZKO und P. HERING. *Isotope-Selective Nondispersive Infrared Spectrometry for Detection of Helicobacter-Pylori Infection with C-13-Urea Breath Test*. Lancet, **345** (8955): 961–962 (1995).
- [Las04] G. LASCHINSKI. *SpectMaster version 0.9, free software* (2004).
- [Mad00] B. MADEA und B. BRINKMANN. *Handbuch gerichtliche Medizin*, Band 2. Springer (2000). Kapitel 1.7.2.3 Kohlenmonoxid.
- [Meu07] R. MEUTGENS, Herausgeber. *Doping im Radsport*. Delius Klasing Verlag Bielefeld (2007). Kapitel: Bloodwork orange-oder: Mancher hat's im Blut; Ungeklärte Todesfälle im Radsport.
- [Mic11] M. MICHL. *Hämatologie*. Urban & Fischer München, 2. Auflage (2011). Kapitel: Grundlagen; Anämien.
- [Mit10] L. A. MITCHELL, M. M. CHANNELL, C. M. ROYER, S. W. RYTER, A. M. K. CHOI und J. D. McDONALD. *Evaluation of inhaled carbon monoxide as an anti-inflammatory therapy in a nonhuman primate model of lung inflammation*. American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology, **299** (6): L891–L897 (2010).
- [Mür99] M. MÜRTZ, B. FRECH und W. URBAN. *High-resolution cavity leak-out absorption spectroscopy in the 10- μ m region*. Applied Physics B-Lasers and Optics, **68** (2): 243–249 (1999).

- [Mür02] M. MÜRTZ. *Höchstempfindliche Laseranalytik von Spurengasen im menschlichen Atem und in atmosphärischer Luft*. Shaker Verlag Aachen (2002).
- [Nob11] *The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1998* (Zugriff: 12.06.2011). URL http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1998/.
- [O’K88] A. O’KEEFE und D. A. G. DEACON. *Cavity Ring-Down Optical Spectrometer for Absorption-Measurements Using Pulsed Laser Sources*. Review of Scientific Instruments, **59** (12): 2544–2551 (1988).
- [Ort01] V. H. ORTH, M. REHM, M. HALLER, M. THIEL und U. FINSTERER. *Die Messung des Blutvolumens—aktueller Stand*. Der Anaesthesist, **50** (8): 562–568 (2001).
- [Par99] P. PAREDI, M. J. LECKIE, I. HORVATH, L. ALLEGRA, S. A. KHARITONOV und P. J. BARNES. *Changes in exhaled carbon monoxide and nitric oxide levels following allergen challenge in patients with asthma*. European Respiratory Journal, **13** (1): 48–52 (1999).
- [Par02] P. PAREDI, S. A. KHARITONOV und P. J. BARNES. *Analysis of expired air for oxidation products*. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, **166** (12): S31–S37 (2002).
- [Pat11] S. G. PATTERSON, C. W. BAYER und R. J. E. A. HENDRY. *Breath Analysis by Mass Spectrometry: A New Tool for Breast Cancer Detection?* American Surgeon, **77** (6): 747–751 (2011).
- [Pau71] L. PAULING, A. B. ROBINSON, R. TERANISH und P. CARY. *Quantitative Analysis of Urine Vapor and Breath by Gas-Liquid Partition Chromatography*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, **68** (10): 2374–2376 (1971).
- [Pau10] F. PAULSEN und J. WASCHKE. *Sobotta - Atlas der Anatomie des Menschen - Innere Organe*. Urban & Fischer München, 23. Auflage (2010).
- [Pen10] G. PENG, M. HAKIM und Y. Y. E. A. BROZA. *Detection of lung, breast, colorectal, and prostate cancers from exhaled breath using a single array of nanosensors*. British Journal of Cancer, **103** (4): 542–551 (2010).



- [Per11] PERMA PURE LLC. *Nafion: Physical and Chemical Properties* (Zugriff: 01.09.2011). URL <http://www.permapure.com/tech-notes/key-concepts/nafion-physical-and-chemical-properties/>.
- [Phi99] M. PHILLIPS, J. HERRERA, S. KRISHNAN, M. ZAIN, J. GREENBERG und R. N. CATANEO. *Variation in volatile organic compounds in the breath of normal humans*. *Journal of Chromatography B*, **729** (1-2): 75–88 (1999).
- [Pro08] N. PROMMER, P. E. SOTTAS, C. SCHOCH, Y. O. SCHUMACHER und W. SCHMIDT. *Total Hemoglobin Mass-A New Parameter to Detect Blood Doping?* *Medicine and Science in Sports and Exercise*, **40** (12): 2112–2118 (2008).
- [Ris06] T. H. RISBY und S. F. SOLGA. *Current status of clinical breath analysis*. *Applied Physics B-Lasers and Optics*, **85** (2-3): 421–426 (2006).
- [Rom97] D. ROMANINI, A. A. KACHANOV, N. SADEGHI und F. STOECKEL. *CW cavity ring down spectroscopy*. *Chemical Physics Letters*, **264** (3-4): 316–322 (1997).
- [Rot09] L. S. ROTHMAN, I. E. GORDON, A. BARBE ET AL. *The HITRAN 2008 molecular spectroscopic database*. *Journal of Quantitative Spectroscopy & Radiative Transfer*, **110** (9-10): 533–572 (2009).
- [Rub11] *Datenblatt zu PK 150* (Zugriff: 15.09.2011). URL http://www.ruebsamen-und-herr.de/PDF/PK150_RH.pdf.
- [Ryt06a] S. W. RYTER, J. ALAM und A. M. K. CHOI. *Heme oxygenase-1/carbon monoxide: From basic science to therapeutic applications*. *Physiological Reviews*, **86** (2): 583–650 (2006).
- [Ryt06b] S. W. RYTER und A. M. K. CHOI. *Therapeutic applications of carbon monoxide in lung disease*. *Current Opinion in Pharmacology*, **6** (3): 257–262 (2006).
- [Ryt07] S. W. RYTER und J. M. SETHI. *Exhaled carbon monoxide as a biomarker of inflammatory lung disease*. *Journal of Breath Research*, **1** (2) (2007). doi:10.1088/1752-7155/1/2/026004.

- [Sch98] J. S. SCHWEGLER. *Der Mensch - Anatomie und Physiologie*. Georg Thieme Verlag Stuttgart, 2. Auflage (1998). Kapitel 4.
- [Sch03] R. SCHOLZ. *Kapitel 5: Häm und Hämoglobin, Kapitel 6 Eisen und Eisenstoffwechsel*, Band 5/6 von *Medizinische Biochemie*. W. Zuckschwerdt Verlag München (2003). Kapitel 5.
- [Sch05] W. SCHMIDT und N. PROMMER. *The optimised CO-rebreathing method: a new tool to determine total haemoglobin mass routinely*. European Journal of Applied Physiology, **95** (5-6): 486–495 (2005).
- [Sch07] E. SCHLEICHER und U. FRIESS. *Oxidative stress, AGE, and atherosclerosis*. Kidney International, **72** (S17–S26) (2007).
- [Sch10] Y. O. SCHUMACHER und T. POTTGIESSER. *Comment on -The hybrid algorithm (Hbmr) to fight against blood doping in sports- by F. Sanchis-Gomar et al*. Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports, **20** (6): 791–791 (2010).
- [Ser09] J. A. SERRA, R. O. DOMINGUEZ, E. R. MARSCHOFF, E. M. GUARESCHI, A. L. FAMULARI und A. BOVERIS. *Systemic Oxidative Stress Associated with the Neurological Diseases of Aging*. Neurochemical Research, **34** (12): 2122–2132 (2009).
- [Shu11] G. SHUSTER, Z. GALLIMIDI und A. H. E. A. REISS. *Classification of breast cancer precursors through exhaled breath*. Breast Cancer Research and Treatment, **126** (3): 791–796 (2011).
- [Sjö48] T. SJÖSTRAND. *A Method for the Determination of Carboxy-Haemoglobin Concentrations by Analysis of the Alveolar Air*. Acta Physiologica Scandinavica, **16** (2-3): 201–210 (1948).
- [Sow08] M. SOWA. *Laserspektroskopische Messung von Kohlenmonoxid in menschlicher Atemluft*. Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (2008).
- [Sow10] M. SOWA, M. MÜRTZ und P. HERING. *Mid-infrared laser spectroscopy for online analysis of exhaled CO*. Journal of Breath Research, **4** (4) (2010). doi:10.1088/1752-7155/4/4/047101.



- [Spe11] *SpectralCalc.com – High-resolution spectral modeling* (Zugriff: 19.08.2011). URL <http://www.spectralcalc.com/info/about.php>.
- [Spi11] *Tour de France. Blutdoping bei Winokurov - Astana steigt aus* (Zugriff: 13.08.2011). URL <http://www.spiegel.de/sport/sonst/0,1518,496298,00.html>.
- [Ten69] R. TENHUNEN, H. S. MARVER und R. SCHMID. *Microsomal Heme Oxygenase - Characterization of Enzyme*. *Journal of Biological Chemistry*, **244** (23): 6388–6394 (1969).
- [The02] H. THEML, H. DIEM und T. HAFERLACH. *Taschenatlas der Hämatologie. Mikroskopische und klinische Diagnostik für die Praxis*. Georg Thieme Verlag Stuttgart, 5. Auflage (2002).
- [The11] THE NATIONAL ACADEMIES. *Understanding and Responding to Climate Change - Highlights of National Academies Reports* (2008 (Zugriff: 03.06.2011)). URL http://dels.nas.edu/resources/static-assets/materials-based-on-reports/booklets/climate_change_2008_final.pdf.
- [Tho05] D. THOMPSON, S. BASU-MODAK, M. GORDON, S. POORE, D. MARKOVITCH und R. M. TYRRELL. *Exercise-induced expression of heme oxygenase-1 in human lymphocytes*. *Free Radical Research*, **39** (1): 63–69 (2005).
- [Uet10] I. UETA, Y. SAITO, K. TERAOKA, T. MIURA und K. JINNO. *Determination of Volatile Organic Compounds for a Systematic Evaluation of Third-Hand Smoking*. *Analytical Sciences*, **26** (5): 569–574 (2010).
- [vB04] G. VON BASUM. *Infrarot-Cavity-Leak-Out-Spektroskopie: Höchstempfindliche Echtzeit Spurengasanalytik*. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (2004).
- [Wan09] C. WANG und P. SAHAY. *Breath Analysis Using Laser Spectroscopic Techniques: Breath Biomarkers, Spectral Fingerprints, and Detection Limits*. *Sensors*, **9** (10): 8230–8262 (2009).
- [Wor04] WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Environmental Health Criteria 213 - Carbon Monoxide, Vol. II. 2nd edition* (2004).

- [Wys05] C. WYSE, A. CATHCART und R. E. A. SUTHERLAND. *Effect of maximal dynamic exercise on exhaled ethane and carbon monoxide levels in human, equine, and canine athletes*. *Comparative Biochemistry and Physiology A-Molecular & Integrative Physiology*, **141** (2): 239–246 (2005).
- [Yam98] M. YAMAYA, K. SEKIZAWA, S. ISHIZUKA, M. MONMA, K. MIZUTA und H. SASAKI. *Increased carbon monoxide in exhaled air of subjects with upper respiratory tract infections*. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, **158** (1): 311–314 (1998).
- [Yas02] H. YASUDA, M. YAMAYA, M. YANAI, T. OHRUI und H. SASAKI. *Increased blood carboxyhaemoglobin concentrations in inflammatory pulmonary diseases*. *Thorax*, **57** (9): 779–783 (2002).

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mir bei der Erstellung dieser Arbeit zur Seite standen.

Vielen Dank an Herrn Professor Dr. Peter Hering, der mir ermöglichte meine Promotion am Institut für Lasermedizin durchzuführen und mich während dieser Zeit konstruktiv begleitete. Bei Herrn Professor Hering bedanke ich mich auch dafür, dass ich durch ihn die Gelegenheit bekam, meine Arbeit auf verschiedenen internationalen Tagungen präsentieren zu dürfen.

Herrn Professor Dr. Karl Kleinermanns danke ich dafür, sich als Koreferent dieser Arbeit zur Verfügung gestellt zu haben.

Herrn Professor Dr. Manfred Mürtz danke ich für die Unterstützung und Ratschläge, die er mir im Laufe der Promotionszeit zukommen ließ.

Für die Mithilfe bei meiner Arbeit und auch für die Gestaltung erheiternder Pausen möchte ich mich bei Kathrin Heinrich, Markus Böning, Philipp Seidel, Lars Czerwinski, Dennis Quest und Philipp Naumann bedanken.

Ein besonderer Dank geht an alle meine Probanden, die für meine Arbeit im wahrsten Sinne des Wortes ihr Blut und ihren Schweiß ließen. Um die versprochene Anonymität aufrechtzuerhalten, erwähne ich hier niemanden namentlich, aber ihr wisst ja, wer gemeint ist.

Den Mitarbeitern der Werkstatt der Lasermedizin gilt mein Dank hinsichtlich der Planungshilfen und der schnellen Umsetzungen meiner Aufträge.

Ebenso danke ich Frau Dr. Anja Vervoorts für ihre Hilfsbereitschaft mich bei biologischen und „reinigungstechnischen“ Fragen zu unterstützen.

Vielen Dank auch an Victoria und alle meine Freunde, die mich stets seelisch und moralisch aufbauten.

Ein ganz herzliches Dankeschön gilt meinen Eltern, die mir erst das Studium ermöglichten und mich auch im Laufe meiner Promotion immer unterstützten und anspornten.

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, 19.10.2011

Marcus Sowa

