

Auf Spurensuche im Atem

Höchstempfindliche Infrarot-Laserspektroskopie findet Biomarker in der Atemluft.

Manfred Mürtz und Peter Hering

Atemanalysen gewähren – ähnlich wie Bluttests – Einblicke in den menschlichen Stoffwechsel. Der Mensch atmet hunderte von Substanzen aus, die meisten allerdings nur in äußerst geringen Spuren. Einige erlauben Aussagen über den Stoffwechsel oder geben Aufschluss über Krankheiten. Die Infrarot-Laserspektroskopie spürt Spurengase im Atem auf und eröffnet zahlreiche Möglichkeiten der Anwendung im Klinikalltag oder in der biomedizinischen Forschung.

Atemtests sind in der Medizin lange bekannt. Seit den Zeiten von Hippokrates weiß man, dass ein charakteristischer Mundgeruch bestimmte Krankheiten begleitet. Beispiele sind der Azetongeruch bei fortgeschrittener Zuckerkrankheit und der übel nach Schwefelverbindungen riechende Atem bei Stoffwechselstörungen der Leber. Die neuzeitliche Atemanalytik begann mit den Arbeiten von Lavoisier und Laplace, die 1784 das Kohlendioxid in der Atemluft von Meerschweinchen entdeckten. Im 20. Jahrhundert setzte Nobelpreisträger Linus Pauling auf diesem Gebiet einen Meilenstein: Er blies seinen Atem durch eine gekühlte Röhre und analysierte die derart ausgefrorenen Bestandteile mittels eines Gaschromatographen. Dabei entdeckte er, dass in einer durchschnittlichen Atemprobe neben den bekannten Hauptbestandteilen auch verschiedene organische Verbindungen in sehr geringen Konzentrationen vorkommen. Viele flüchtige organische Verbindungen (Volatile Organic Compounds, VOCs), die im Blut gelöst sind, gelangen über die Lunge in die Atemluft und werden so ausgeschieden. Mehrere hundert VOCs und einige anorganische Verbindungen, die unser Organismus bildet, wurden bereits im Atem identifiziert [1]. Die meisten davon liegen nur in pikomolaren (10^{-12} mol/l) bis nanomolaren (10^{-9} mol/l) Konzentrationen vor.

Die Analyse von Stoffwechselprodukten im Atem könnte ein neues diagnostisches Fenster in der klinischen Medizin öffnen. Mit Atemtests lassen sich auf unblutige Weise verschiedene Stoffwechselfparameter eines Patienten erfassen [2, 3]. Allerdings ist es nach wie vor ein ungelöstes Problem, Spurengase in dieser geringen Konzentration quantitativ zu analysieren. Die klassischen Methoden, um Spurengase zu identifizieren und zu quantifizieren, wie Gaschromatographie und Massenspektrometrie, sind oft nicht empfindlich genug und eignen sich daher nur begrenzt für die



dipa/picture alliance

Atemanalytik. Hier versprechen Laser Abhilfe, die sich bereits in vielen Bereichen der Lebenswissenschaften etabliert haben, vor allem in der biomedizinischen Forschung und der klinischen Medizin. Meist handelt es sich dabei um bildgebende Verfahren (z. B. optische Kohärenztomographie und Holographie) oder um therapeutische Anwendungen. Letztere nutzen die thermische oder abtragende Wirkung der Laserstrahlung in Gewebe aus (z. B. LITT und LASIK) [4]. Im letzten Jahrzehnt befasste sich eine zunehmende Zahl von Arbeiten mit dem empfindlichen Nachweis von biogenen Spurengasen durch moderne abstimmbare Lasersysteme. Ein Forschungsschwerpunkt besteht darin, flüchtige Biomarker im Atem zu untersuchen. Biomarker sind all jene Substanzen, die Rückschlüsse auf biologische Prozesse zulassen oder Informationen über Stoffwechselforgänge liefern.

Der Atemtest bei der Polizeikontrolle entlarvt schnell, ob der Fahrer alkoholisiert ist.

KOMPAKT

- Mittels Laserspektroskopie lassen sich flüchtige Biomarker im Atem beobachten, die neue Einblicke in den menschlichen Stoffwechsel erlauben.
- Die Laseranalytik bietet teilweise konkurrenzlose Empfindlichkeit und Geschwindigkeit. Sie erlaubt es, Spurengaskonzentrationen im sub-ppb-Bereich in Sekundenschnelle quantitativ zu analysieren.
- Potenzielle Anwendungen von Echtzeit-Atemtests in der Medizin sind die nicht-invasive Diagnostik und die Therapiekontrolle.

Prof. Dr. Manfred Mürtz und Prof. Dr. Peter Hering, Institut für Lasermedizin, Universität Düsseldorf, 40225 Düsseldorf

Dieser Artikel stellt lasergestützte optische Methoden vor, die quantitative Analysen von Spurengasen mit unübertroffener Empfindlichkeit, Spezifität und Geschwindigkeit ermöglichen: Konzentrationen bis hinunter in den ppt-Bereich (parts per trillion, 10^{-12}) lassen sich während eines Atemzugs messen.

Spuren in der Luft

Neben den Hauptbestandteilen Stickstoff (75 %), Sauerstoff (16 %) und Wasser (4 %) enthält menschliche Atemluft eine Reihe flüchtiger Substanzen, die beim Stoffwechsel im Organismus entstehen (endogene Substanzen, Tab. 1). In der Lunge gelangen diese vom Blut über die alveolar-kapilläre Membran in die Atemluft, wo man sie nachweisen kann. Auch die Schleimhäute der Atemwege und die Mundflora produzieren Verbindungen, die in die Atemluft gelangen.

Das wichtigste Stoffwechselprodukt im Atem ist Kohlendioxid (CO_2), das etwa vier Prozent des ausgeatmeten Volumens ausmacht. Obwohl CO_2 kein Biomarker ist, spielt es eine wichtige Rolle für verschiedene ^{13}C - oder ^{14}C -Atemtests, bei denen Isotopologe von CO_2 als Biomarker dienen (Infokasten „Isotopologe als Biomarker“). Ein bekanntes Beispiel aus dem Klinikalltag ist die Untersuchung auf eine *Helicobacter pylori*-Infektion der Magenschleimhaut [5]. Bisher war zur Diagnose eine Magenspiegelung notwendig.

Darüber hinaus finden sich viele weitere Stoffwechselprodukte im Atem, deren Konzentrationen überwiegend im niedrigen ppb-Bereich (parts per billion, 10^{-9}) liegen. Einige dieser flüchtigen organischen Verbindungen gelangen mit der eingeatmeten Luft oder mit der Nahrung (z. B. durch Alkoholgenuss) in den Körper (exogene Substanzen). Solche Verbindungen im Atem weisen zwar nicht auf eine Erkrankung hin, sie ermöglichen es aber, noch Tage später nachzuweisen, dass eine Person Umgang mit bestimmten Verbindungen hatte bzw. Schadstoffen ausgesetzt war. Dies ist

Spurengas	Konzentration im Atem
Methan (CH_4)	1 – 10 ppm
Ethan (C_2H_6)	0 – 2 ppb
Pentan (C_5H_{12})	0 – 2 ppb
Stickstoffmonoxid (NO)	5 – 20 ppb
Kohlenmonoxid (CO)	1 – 5 ppm
Carbonylsulfid (OCS)	0,5 – 10 ppb
Azetaldehyd (CH_3CHO)	1 – 10 ppb
Isopren (C_5H_8)	50 – 200 ppb
Ammoniak (NH_3)	0,5 – 2 ppm
Azeton ($(\text{CH}_3)_2\text{CO}$)	0,5 – 1 ppm

Table 1 Wichtige endogene Spurengase und ihre typische Konzentration im Atem eines gesunden Menschen.

z. B. in der Sportmedizin von Belang, wenn es darum geht, Dopingsubstanzen nachzuweisen.

Seit einigen Jahren wird untersucht, welche Spurenbestandteile des Atems als Biomarker für Stoffwechselstörungen und Erkrankungen in Frage kommen [6]. Bisher haben es aber nur wenige Atemtests in die klinische Praxis geschafft. Das liegt vor allem daran, dass es nach wie vor große Schwierigkeiten bereitet, die äußerst geringen Spurengaskonzentrationen zuverlässig zu analysieren. Daher fehlt es an klinischen Studien, die eine Voraussetzung für die Zulassung medizinischer Tests sind. Darüber hinaus ist bei den meisten Spurenbestandteilen kaum etwas über die zugehörigen Stoffwechselprozesse bekannt. Nur bei wenigen Substanzen im Atem gibt es genaue Erkenntnisse über Ursprung und Bedeutung: z. B. bei Stickstoffmonoxid (NO), bei Kohlenmonoxid (CO) und bei einigen leichten Kohlenwasserstoffen wie Ethan oder Pentan. Entsprechende Atemtests, die diese Verbindungen nachweisen, sind bereits verfügbar oder in der Entwicklung.

Der am besten untersuchte Biomarker im Atem ist das NO-Molekül. Bis vor zwanzig Jahren war von NO meist die Rede, wenn es um Luftverschmutzung durch Kraftwerke und Verbrennungsmotoren ging. Inzwischen weiß man, dass NO in vielen Teilen des mensch-

ISOTOPOLOGE ALS BIOMARKER

Isotopologe sind Moleküle mit gleicher chemischer Zusammensetzung, die sich nur in der Isotopenzusammensetzung unterscheiden, also ungleiche Molekülmasse besitzen. Die Markierung von molekularen Verbindungen mit seltenen Isotopen ermöglicht es, Stoffwechselreaktionen dieser Verbindungen zu verfolgen und Aussagen über Reaktionswege und Umsatzraten zu treffen. Oft verwendet man Radioisotope, um die Vorläufersubstanz, die dem Patienten verabreicht wird, zu markieren. Das ist allerdings mit Strahlenbelastungen verbunden. Die Infrarotspektroskopie bietet dagegen die Möglichkeit, stabile Isotope zu verfolgen. Sind die interessierenden Moleküle damit markiert, führt dies zu Isotopieverschiebungen der Spektral-

linien im IR-Absorptionsspektrum. ^{15}N ist ein stabiles Isotop, das sich z. B. zur Markierung von Arginin, einer Vorläufersubstanz von NO, eignet. Das im Atem vorliegende ^{15}NO lässt sich per IR-Laserspektroskopie analysieren. Zurzeit befassen sich Forschungsarbeiten an der Uni Düsseldorf mit dem Nachweis von ^{15}NO im Atem sowie in Blutproben [12].

Das Konzept von Isotopen-Atemtests lässt sich gut am Beispiel des C^{13} -Tests zur Diagnose einer *Helicobacter pylori*-Infektion erklären: Zu Beginn schluckt der Patient eine Harnstofftablette, die mit ^{13}C -Kohlenstoff markiert ist. Während einer Wartezeit von mindestens zehn Minuten erreicht der Harnstoff die Magenschleimhaut. Falls *Helicobacter pylori* vorhanden ist,

zersetzt das Bakterium mittels eines Enzyms (Urease) den markierten Harnstoff in dann ebenfalls markiertes Kohlendioxid, das in die Blutbahn diffundiert und über die Lunge abgeatmet wird. Ist hingegen kein *H. pylori* vorhanden, wird der unzersetzte Harnstoff von der Schleimhaut aufgenommen und über die Niere ausgeschieden. Für die infrarotspektroskopische Analyse sind ein oder zwei Atemproben erforderlich. Der normale $^{13}\text{CO}_2$ -Gehalt lässt sich spektroskopisch leicht nachweisen. Beim Atemtest von *H. pylori*-infizierten Patienten verschiebt sich das Verhältnis von $^{13}\text{CO}_2$ zu $^{12}\text{CO}_2$ geringfügig. Diese Verschiebung ist gut messbar und reicht aus, um infizierte und gesunde Personen zuverlässig zu unterscheiden.

lichen Organismus entsteht und dort eine wichtige Rolle als Signalmolekül, z. B. im Herz-Kreislauf-System, spielt. Der NO-Gehalt im Atem eines gesunden Menschen liegt bei etwa 10 ppb. Das Stickstoffmonoxid stammt insbesondere aus den Schleimhäuten, welche die Atemwege auskleiden. Da der NO-Gehalt bei entzündlichen Atemwegserkrankungen wie Asthma deutlich erhöht ist, eignet sich ein NO-Atemtest dazu, Entzündungsparameter bei Asthmapatienten zu überwachen.

Auch Kohlenmonoxid ist primär als hochgiftiger Bestandteil von Abgasen bekannt. Jedoch hat man vor über 30 Jahren herausgefunden, dass sich CO im normalen Stoffwechsel beim Abbau roter Blutkörperchen (Hämolyse) in Milz und Leber bildet. CO ist ein Nebenprodukt der oxidativen Spaltung des Hämoglobins, das dabei zu Biliverdin und anschließend zu Bilirubin umgewandelt wird. Durchschnittlich finden sich rund 2 ppm CO im Atem eines gesunden Menschen.

Von den zahlreichen im Atem gefundenen Kohlenwasserstoffen sind die Alkane Ethan (C_2H_6) und Pentan (C_5H_{12}) diejenigen, deren Rolle am umfangreichsten untersucht wurde. Beide Alkane sind Endprodukte des oxidativen Abbaus mehrfach ungesättigter Fettsäuren (Lipidperoxidation). Dieser Abbau betrifft vor allem die Lipide in den Zellmembranen, die durch freie Radikale oxidiert und geschädigt werden können. Während der Lipidperoxidation von Omega-3- und Omega-6-Fettsäuren entsteht Ethan bzw. Pentan, das anschließend über die Lunge entweicht. Wenn die Schädigung durch freie Radikale im Organismus überhand nimmt, spricht man von oxidativem Stress. Dieser ist eine Begleiterscheinung von vielen Erkrankungen, z. B. von Diabetes mellitus, rheumatoider Arthritis und chronisch obstruktiver Lungenerkrankung. Da die Lipidperoxidation die einzige Quelle für Ethan und Pentan ist, gelten diese Verbindungen als wichtige Indikatoren für oxidativen Stress. Die Messung dieser Biomarker erlaubt es daher, diese Stoffwechselstörung früh zu erkennen.

Luftige Messungen mit Lasern

Für den schnellen und empfindlichen Nachweis relevanter Spurengaskonzentrationen im Atem kommen nur wenige Analysemethoden in Frage. Routineverfahren wie Gaschromatographie oder Massenspektrometrie eignen sich zwar grundsätzlich, erreichen aber die notwendige Empfindlichkeit oft nur durch vorherige Aufkonzentration mehrerer Atemproben. In einigen Fällen, z. B. bei Ethan, ist selbst dann nur mit erheblichem Aufwand ein Nachweis im ppb-Bereich möglich. Optische Methoden bieten sich besonders dort an, wo sehr hohe Empfindlichkeit und Zeitauflösung gefragt sind [7]. Viele Spurengase weisen einen charakteristischen spektralen Fingerabdruck auf, anhand dessen sie sich z. B. mittels Absorptionsspektroskopie identifizieren lassen. Dazu leitet man die Atemprobe in eine Küvette, wo man die wellenlängenabhängige Absorption eines Laserstrahls misst (Abb. 1). Hierfür eignet sich besonders der mittlere infrarote

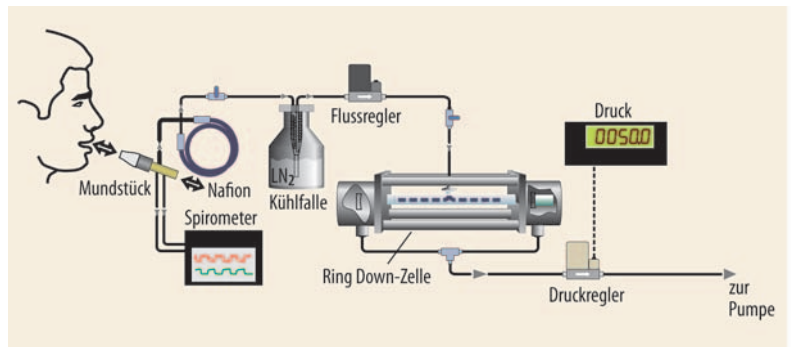


Abb. 1 Beim Online-Atemtest wird die Atemprobe im Nafionschlauch getrocknet. Die Kühlfalle entfernt störende Verbindungen (z. B. CO_2), deren Spektren interferieren würden. Das Spirometer zeichnet Atemfluss und CO_2 -Konzentration auf. Die Regelschleife hält den Druck in der Messzelle, die ständig von Atemgas durchströmt wird, konstant auf typisch 50 mbar.

Wellenlängenbereich zwischen 3 und 10 μm , weil dort die stark absorbierenden Fundamental-Schwingungsbanden der meisten Moleküle liegen (Abb. 2).

Im vergangenen Jahrzehnt wurde die Leistungsfähigkeit der Infrarot-Laserspektroskopie erheblich verbessert. So entwickelten sich z. B. die photoakustische Spektroskopie (PAS) und die Cavity Ring Down-Spektroskopie (CRDS) zu Verfahren mit ultra-hoher Empfindlichkeit, die einen Nachweis im unteren ppt-Bereich erlauben [7, 8]. Die Laserquellen beeinflussen ganz entscheidend, wie leistungsfähig Laserspektrometer sind und wie sie sich handhaben lassen. Neben neuen Spektroskopietechniken gab es wichtige Fortschritte bei der Lasertechnologie, die dazu geführt haben, dass inzwischen kleine und leistungsfähige Festkörperlasersysteme mit hervorragenden spektralen Eigenschaften für den mittleren Infrarotbereich zur Verfügung stehen. Die aussichtsreichsten Kandidaten für die Infrarot-Laseranalytik sind Quantenkaskadenlaser (QCL) oder Strahlungsquellen, die auf nichtlinearer Frequenzkonversion beruhen [9]. QCLs sind Halbleiterlaser für Wellenlängen im mittleren und fernen Infrarot; QCLs mit räumlich verteilter Rückkopplung (distributed-feedback) für den Bereich um 5 μm emittieren einzelmodig einige Milliwatt. Anders als bei Dio-

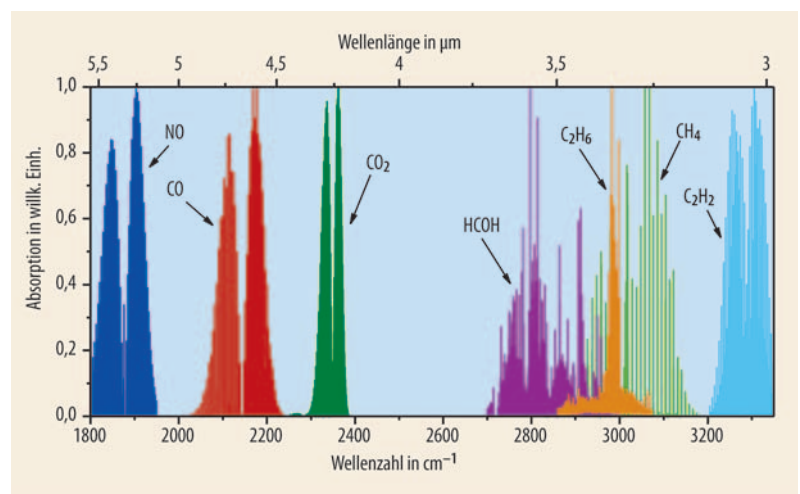


Abb. 2 Im mittleren Infrarotbereich zeigen Moleküle sehr charakteristische Absorptionsspektren, anhand derer sie sich eindeutig identifizieren lassen. Die Spektren wurden berechnet und anschließend normiert.

1) Weit verbreitet für den Bereich bis 5 μm ist PPLN; um im Bereich oberhalb von 5 μm Quasiphasenanpassung zu erreichen, muss man zu anderen Kristallen greifen, z. B. zu „orientation-patterned“ Galliumarsenid (OP-GaAs).

2) Hiervon leitet sich der Name der Methode ab, denn „Ring-down“ bezeichnet das Abklingen des Laserpulses im Resonator.

denlasern entsteht beim QCL die Laserstrahlung durch Intersubband-Übergänge von Elektronen innerhalb des Leitungsbands. Im Vergleich zu Diodenlasern für den gleichen Spektralbereich bieten QCLs den Vorteil, dass sie sich nahe bei Zimmertemperatur betreiben lassen und eine höhere optische Ausgangsleistung liefern.

Ein anderer Weg ins mittlere Infrarot führt über die nichtlineare Optik: So sind die Differenzfrequenz-erzeugung (DFG, Abb. 3a) und die optisch parametrische Oszillation (OPO) in der Lage, mittels Nahinfrarotlasern kohärente Strahlung im mittleren Infrarot zu erzeugen. Zur Frequenzkonversion eignen sich Kristalle mit möglichst hoher nichtlinearer optischer Suszeptibilität zweiter Ordnung, die Dreiwellen-Mischprozesse ermöglichen. Periodisch gepolte Kristalle (Quasiphasenanpassung) erlauben eine einfache und effiziente Phasenanpassung der beteiligten Wellen.¹⁾

Die hier genannten IR-Quellen zeichnen sich dadurch aus, dass sie Laserstrahlung mit hoher räumlicher und spektraler Reinheit erzeugen, deren Wellenlänge sich gut abstimmen lässt. Daher eignen sie sich gut für die hochauflösende Molekülspektroskopie. Die spektrale Linienbreite liegt in der Größenordnung von einigen Megahertz, womit Single-Mode-Abstimmbereiche von mehreren Gigahertz zu erzielen sind.

Auf den ersten Blick ähnelt die Analyse von biologischen oder medizinischen Gasproben der Analyse der atmosphärischen Luft. Jedoch gibt es einige entscheidende Unterschiede: So ist es viel komplizierter, eine reproduzierbare Atemprobe aufzunehmen, als

eine Luftprobe aus der Atmosphäre zu sammeln. Die Konzentration von Spurengasen in der Atemprobe hängt von vielen äußeren Parametern, wie der Atemfrequenz, Atemflussrate usw. ab, außerdem ändert sich die Konzentration recht schnell beim Ausatmen.

Ein wesentlicher Vorteil der laserspektroskopischen Analyse ist ihre „Online“-Fähigkeit [10]. Hier ist damit gemeint, dass die Atemluft während der Ausatmung in Echtzeit analysiert wird. Bei „Offline“-Verfahren hingegen sammelt man die Luft eines oder mehrerer Atemzüge zunächst in einem Beutel oder in einer Adsorptionsfalle zur Präkonzentration. Dabei tauchen mitunter Probleme auf, so kann die Atemprobe während der Lagerung kontaminiert werden, auch sind Atemproben bei unterschiedlichen Atemfrequenzen oder -flussraten schwierig zu reproduzieren. Online-Verfahren liefern Informationen über die Atemgaskonzentrationen in den verschiedenen Phasen der Ausatmung, wohingegen „Offline-Methoden“ meist über eine komplette Ausatmung integrieren und daher Totraumluft (aus den oberen Atemwegen) und Alveolarluft (aus der Lunge) schwierig zu trennen sind.

Spuren(gasen) auf der Spur

Die Grundlage für die Absorptionsspektroskopie ist das Lambert-Beer-Gesetz. Es besagt, dass die Intensität von Licht, das ein Medium mit dem Absorptionskoeffizienten α und der Länge l durchquert hat,

CAVITY RING DOWN-SPEKTROSKOPIE

Eine Alternative zu Vielfachreflexionszellen sind Ring Down-Zellen (Abb. ii a). Ursprünglich zur Bestimmung der Reflexionskoeffizienten von Resonatorspiegeln entwickelt, kommen sie heute oft bei der höchstempfindlichen Spektroskopie zum Einsatz. Der Absorptionsweg verlängert sich hierbei durch zwei Spiegel, die einen optischen Resonator (cavity) bilden. Ein Cavity Ring Down-Spektrometer besteht meist aus einem abstimmbaren, gepulsten Laser, einer Ring Down-Zelle und einem Photodetektor. Um die Absorption zu bestimmen, misst man die Abklingzeit des im Resonator zirkulierenden Laserpulses hinter dem Austrittsspiegel.²⁾ Die Einhüllende $I(t)$ folgt einem exponentiellen Abfall: $I(t) = I(t=0) \exp(-t/\tau)$ (Abb. ii b). Die Abkling- bzw. Ring Down-Zeit τ ist die Zeit, nach der die Pulsenergie auf den Wert $1/e$ ihres Anfangswerts abgefallen ist. Je stärker die Gasprobe absorbiert, desto kürzer ist die Abklingzeit. Der Absorptionskoeffizient errechnet sich aus: $\alpha = 1/c (1/\tau - 1/\tau_0)$, wobei τ_0 die Abklingzeit der leeren Zelle ist. Bei hochwertigen Spiegeln mit einer Reflektivität von $R = 99,98\%$ beträgt die Abklingzeit einer leeren, ein Meter langen Zelle rund $20\ \mu\text{s}$. Mithilfe bekannter Linienstärken (z. B. aus HITRAN entnommen) lässt sich dann der Absorptionskoeffizient in die zugehörige Konzentration umrechnen.

Neben gepulsten Lasern eignen sich auch Dauerstrichlaser, mit denen man die Ring Down-Zelle resonant anregen kann (Abb. ii a). Durch konstruktive Überlagerungen baut sich eine stehende Welle in der Ring Down-Zelle auf, sodass wesentlich mehr Licht für die Messung hinter der Zelle zur Verfügung steht. Nach Erreichen des stationären Zustands wird der Laserstrahl – etwa mithilfe eines schnellen optischen Schalters – unterbrochen. Das an-

schließende exponentielle Abklingen des Stehwellenfeldes wird wieder hinter dem Austrittsspiegel aufgezeichnet (Abb. ii c). Da die Messung bei unterbrochenem Laserstrahl erfolgt, ist diese Art der Spektroskopie unabhängig vom Laseramplitudenrauschen. Allerdings sind für eine effiziente, resonante Anregung wegen der hohen Resonatorgüte Laserquellen mit entsprechend geringer Linienbreite erforderlich ($<100\ \text{kHz}$).

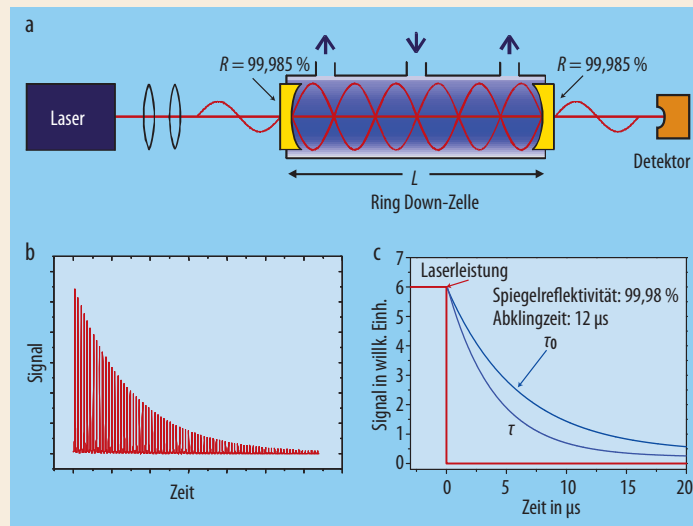


Abb. ii Mittels eines Dauerstrichlasers lässt sich die Ring Down-Zelle resonant anregen (a). Das Ring Down-Signal klingt sowohl im gepulsten (b) als auch im kontinuierlichen Betrieb (c) exponentiell ab.

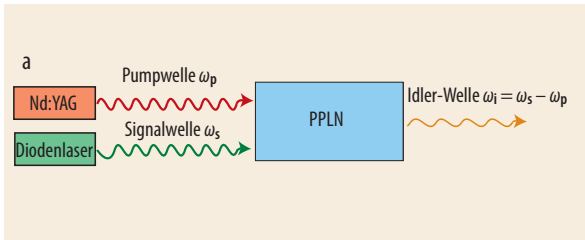
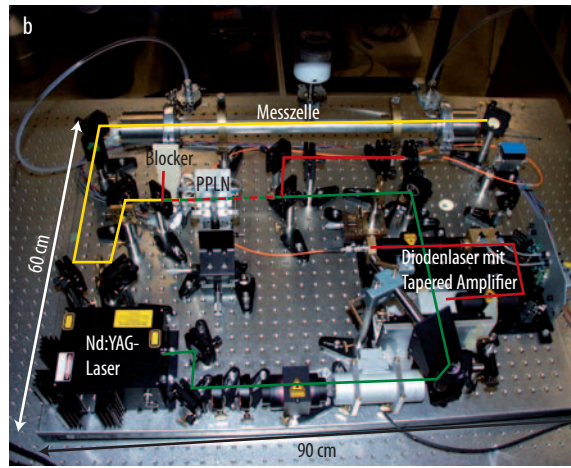


Abb. 3 Als Strahlungsquelle im Infraroten dient ein Differenzfrequenzlaser, der aus einem Nd:YAG- und einem Diodenlaser besteht. Beide Laserwellen werden in einem Kristall aus periodisch gepoltem Lithiumniobat (PPLN) gemischt und bilden die Idler-Welle, die für die Absorptionsmessungen zum Einsatz kommt (a). Der Aufbau nimmt derzeit noch zu viel Platz ein, um das Experiment im Klinikalltag etablieren zu können (b).



gegeben ist durch $I = I_0 e^{-\alpha l}$, wobei I_0 und I die Intensitäten vor bzw. hinter dem Medium sind. Typische IR-Absorptionskoeffizienten molekularer Spurengase, die im ppb-Konzentrationsbereich vorliegen, betragen $\alpha = 10^{-9}/\text{cm}$ oder darunter. Um eine hohe Nachweisempfindlichkeit zu erreichen, muss die Weglänge l , auf der das Licht mit dem Absorber wechselwirkt, möglichst groß sein. Die meisten Absorptionsspektrometer benutzen eine Vielfachreflexionszelle, bei der der Laserstrahl bis zu 100-mal durch die Atemprobe kreuzt.

Eine besondere Variante der Laserabsorptionsspektroskopie mit großer Weglänge ist die Cavity Ring Down-Spektroskopie (CRDS, Infokasten) [8]. Diese in den letzten 15 Jahren entwickelte Technik hat die Empfindlichkeit der klassischen Absorptionsspektroskopie wesentlich verbessert. Als Absorptionszelle dient hierbei ein optischer Resonator, zwischen dessen Spiegeln sich die Gasprobe befindet. Diese Anordnung ist zum einen viel kompakter als gewöhnliche Vielfachreflexionszellen. Zum anderen ermöglicht sie sehr lange Weglängen von bis zu 100 km, sodass sich die Empfindlichkeit dieses Verfahrens deutlich erhöht. So lassen sich mit der CRDS Absorptionen bis hinunter zu $10^{-11}/\text{cm}$ nachweisen – das entspricht Molekülkonzentrationen im ppt-Bereich. Zudem erlaubt die CRDS eine sehr hohe spektrale Auflösung, besonders beim Einsatz von Dauerstrichlasern. Dies ist für die IR-Analytik wichtig, um eng benachbarte Vibrations-Rotationslinien verschiedener Moleküle zu unterscheiden. Diese Eigenschaften machen die CRDS zu einer hervorragenden Methode für die Spurengasanalytik des menschlichen Atems.

Eine Online-Analyse, welche die Konzentration eines Spurengases im Atem über die Zeit darstellt, erfordert mehrere Messschritte: Die Laserwellenlänge regt eine bestimmte Absorptionslinie des zu untersuchenden Spurengases an. Die Absorption misst man einige hundertmal pro Sekunde, indem man das einfallende Laserlicht kurz unterbricht und das Abklingen des in der Spektroskopiezelle gespeicherten Lichts aufzeichnet. Aus jeder Abklingkurve wird die Abklingzeit bestimmt und daraus die Absorption zu diesem Zeitpunkt berechnet. Diese lässt sich in die zugehörige Gaskonzentration umrechnen und über die Zeitachse auftragen. Die hohe Geschwindigkeit der Ring-Down-Messungen erlaubt es, die Konzentration

des Spurengases in Echtzeit und atemzug aufgelöst am PC-Monitor zu betrachten. Da das Atemgas die Messzelle ständig durchströmt, kann man so den Zeitverlauf der Spurengaskonzentration des Atems aufzeichnen.

Unsere Gruppe hat erstmals gezeigt, dass mittels CRDS eine Online-Analyse von Ethan im menschlichen Atem bis hinunter in den sub-ppb-Bereich mit einer Zeitauflösung von besser als 800 ms möglich ist [11]. Ein Teil der ausgeatmeten Luft wird dazu in eine Ring-Down-Absorptionszelle geleitet (Abb. 1). Die Messung erfolgt bei Unterdruck, um die Druckverbreiterung der Spektrallinien gering zu halten und um so zu verhindern, dass die Linien verschiedener Substanzen überlappen. Eine Regelung sorgt dafür, dass der Druck in der Zelle konstant bleibt, denn mit dem Druck würde sich auch die Dichte ändern, was man fälschlicherweise als Änderung der Konzentration im Atem interpretieren würde. Ethan zeigt ein charakteristisches Absorptionsspektrum im Wellenlängenbereich um $3,3 \mu\text{m}$ (vgl. Abb. 2). Als Strahlungsquelle in diesem Spektralbereich dient ein Differenzfrequenzlaser, bestehend aus einem Nd:YAG-Laser, einem Diodenlaser und einem PPLN-Kristall zur Mischung (Abb. 3).

Da bei einem gesunden Probanden kein Ethan im Atem zu erwarten ist, haben wir ihn zur Demonstrati-

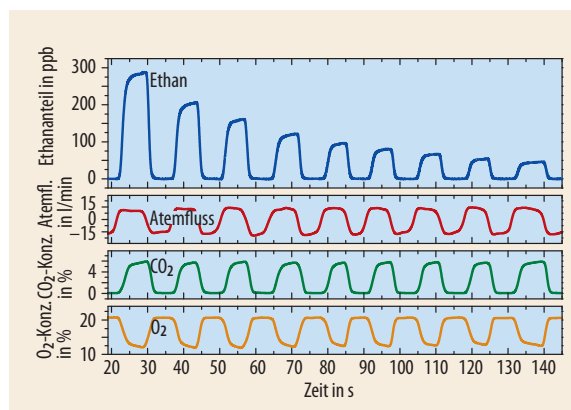


Abb. 4 Online-Messungen von Ethan, Atemfluss, CO_2 , O_2 (von oben nach unten). Die Konzentration des künstlich zugegebenen Ethans verringert sich in den ersten zwei Minuten etwa um den Faktor sechs, während bei Sauerstoff und Kohlendioxid natürlich kein Unterschied zu bemerken ist. Der Ethangehalt der Umgebungsluft lag hier im unteren ppb-Bereich und wurde von der ausgeatmeten Ethankonzentration abgezogen.

on vor der Messung 1 ppm Ethan in synthetischer Luft für etwa fünf Minuten einatmen lassen. Dadurch reichert sich geringfügig Ethan im Körper des Probanden an (Abb. 4). Kein anderes Verfahren ist derzeit in der Lage, Ethan in solch geringen Konzentrationen und mit solch hoher Zeitauflösung im Atem zu analysieren.

Ein Ziel dieser Arbeiten war es, den Verlauf der Ethankonzentration während eines einzelnen Atemzuges zu verfolgen. Üblicherweise wird dazu in einem sog. Expirogramm die gemessene Konzentration gegen das ausgeatmete Volumen aufgetragen (Abb. 5a). Die Expirogramme für Ethan zeigen einen ähnlichen Verlauf wie die für CO₂. Die Luft zu Beginn der Ausatmung stammt aus den oberen Atemwegen (Mund, Rachenraum, Luftröhre und Bronchien), wo kein Gas zwischen Blut und Luft ausgetauscht wird (Phase I, Totraumvolumen). In Phase II steigt die Konzentration schnell an, bis gegen Ende des Atemzuges ein Plateau erreicht wird (Phase III). In diesem letzten Teil entweicht die alveolare Luft, in der ein enger Gasaustausch mit dem Blut stattgefunden hat. Die beobachtete Steigung erlaubt es, auf die Kinetik des alveolar-kapillären Gasaustauschs zu schließen. Die Messung über einen längeren Zeitraum offenbart die Kinetik des Auswaschvorgangs, bei dem das Ethan über die Atmung den Organismus verlässt (Abb. 5b). Das künstlich verabreichte Ethan wird in den Organismus des Probanden eingewaschen, d. h. in verschiedenen Bereichen des menschlichen Körpers gelöst.

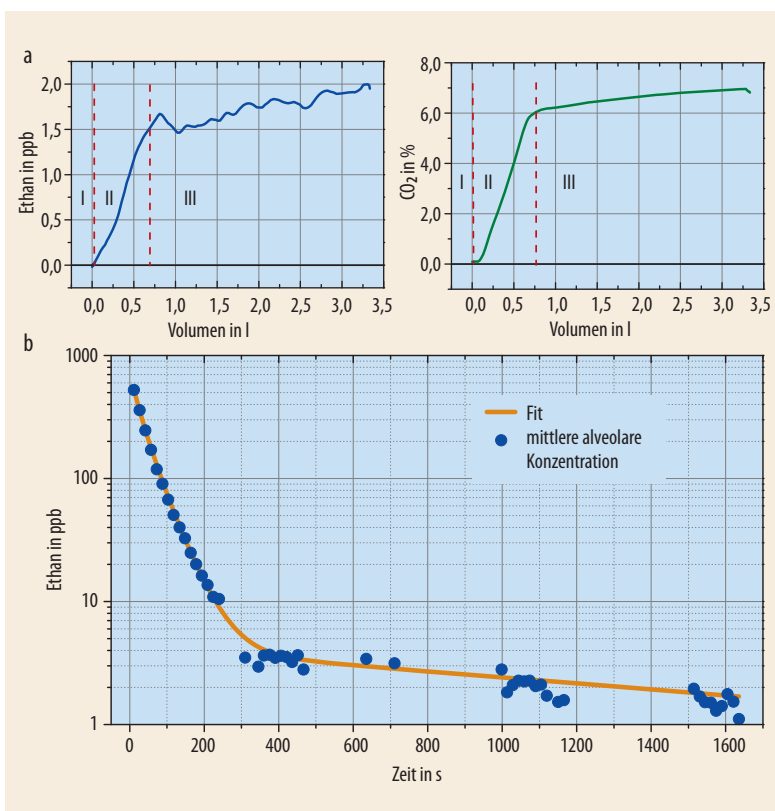


Abb. 5 Die Expirogramme von Ethan und CO₂ zeigen, wie sich die Konzentration beider Gase während eines Atemzuges verändert (a). Über einen längeren Zeitraum wird Ethan beim Atmen ausgewaschen (b). Die Kurve verläuft entlang

dreier Exponentialfunktionen, die an die Messdaten angefitzt wurden. Die Zeitkonstanten, die sich dabei ergeben, spiegeln die Auswaschzeiten von Lunge (24 s), Blutkreislauf (55 s) und gut durchblutetem Gewebe (1800 s) wider.

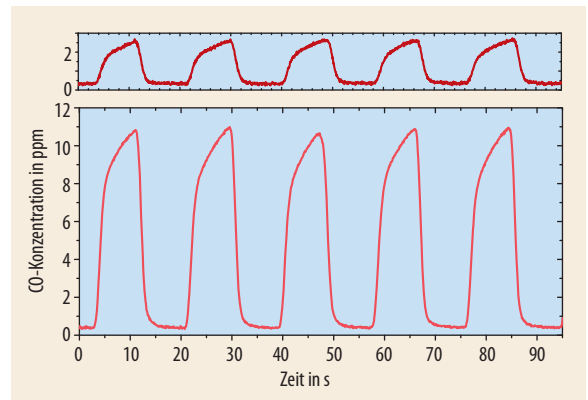


Abb. 6 Beim Raucher (unten) ist der Kohlenmonoxidgehalt im Atem gegenüber dem Nichtraucher (oben) deutlich erhöht – auch noch einige Stunden nach der letzten Zigarette.

Ausgeatmet wird es anschließend in erster Näherung genau so, als ob das Ethan während eines natürlichen Stoffwechselprozesses entstanden wäre. An einem Expirogramm lässt sich leicht ablesen, wie viele Bereiche des Organismus am Auswaschvorgang beteiligt sind – beim Ethan sind es mindestens drei. Außerdem lernt man daraus, in welchem Zeitfenster das Ethan, das sich im Organismus gebildet hat, im Atem sichtbar ist. Das ist bei jedem Biomarker anders und hängt u. a. von der Löslichkeit der Verbindung und vom Diffusionskoeffizienten der Lunge für die jeweilige Substanz ab.

Vom Giftgas zum Biomarker

Die Laserspektroskopische Online-Analyse erlaubt es, den CO-Gehalt des Atems mit einzigartiger Empfindlichkeit und Genauigkeit zu verfolgen (Abb. 6). Der Vergleich der Atemkurven von Raucher und Nichtraucher offenbart, dass der CO-Wert des Rauchers im Mittel viermal größer ist als der des Nichtrauchers – obwohl die letzte Zigarette bei der Messung schon drei Stunden zurück lag. Dies liegt daran, dass das mit dem Zigarettenrauch inhalierte CO durch Bindung an Hämoglobin im Körper gespeichert wird. Hämoglobin (Hb), der rote Blutfarbstoff, ist der wichtigste Sauerstoffträger im Körper. Da Kohlenmonoxid eine sehr große Affinität zu Hämoglobin aufweist (über 200-mal größer als Sauerstoff), verdrängt es den Sauerstoff, und es wird Carboxyhämoglobin (COHb) gebildet. Mit einer Halbwertszeit von rund vier Stunden wird das CO ausgeatmet. Selbst 24 Stunden nach dem Rauchen einer Zigarette ist im Atem noch eine erhöhte CO-Konzentration nachweisbar. Deshalb ermöglichen es die CO-Atemwerte, das Rauchverhalten von Patienten zu kontrollieren.

In der Sportmedizin können CO-Messungen der Atemluft dazu dienen, die Hämoglobin-Gesamtmasse eines Sportlers zu bestimmen. Im Durchschnitt hat ein Mensch davon 800 g zur Verfügung. Zur illegalen Leistungssteigerung in Ausdauersportarten, z. B. im Radsport, werden vor Wettkämpfen Eigenblutkonserven infundiert. Dadurch erhöht sich die Hämoglobin-Gesamtmasse (tHb) und damit die Sauerstofftransportkapazität. Der einzige Weg, um Eigenblutdoping

zu entlarven, besteht darin, den tHb-Wert eines Leistungssportlers regelmäßig zu kontrollieren. Ändert dieser sich plötzlich, weist dies auf Eigenblutdoping hin. Das Prinzip der tHb-Messung besteht darin, eine genau definierte Anzahl Hb-Moleküle zu markieren und anschließend das Verhältnis von markierten zu unmarkierten Hb-Molekülen zu messen. Wegen der großen Affinität zu Hämoglobin eignet sich Kohlenmonoxid als Markermolekül. Durch Inhalation einer bestimmten, ungefährlichen Menge CO vergrößert sich der Anteil des im Blut mit CO belegten Carboxyhämoglobins. In sehr guter Näherung kann man davon ausgehen, dass die gesamte zugeführte Menge an Kohlenmonoxid an das Hämoglobin gebunden wird. Während der CO-Inhalation misst man sehr genau die ein- und ausgeatmete Menge von CO. Daraus lässt sich ableiten, wie viele CO-Moleküle im Körper der Testperson verblieben sind und wie hoch demnach der COHb-Wert ist. Der relative Anteil der so markierten Hämoglobin-Moleküle, also das Verhältnis COHb/Hb, gibt Aufschluss über das Gesamthämoglobin. Laufende Forschungsarbeiten an der Universität Düsseldorf beschäftigen sich damit, dieses Verhältnis durch einen CO-Atemtest möglichst präzise zu bestimmen.

Der Weg in den Klinikalltag

Die medizinische Atemanalytik ist ein reizvolles, aufstrebendes Forschungsgebiet an der Schnittstelle zwischen Naturwissenschaften und Medizin. Die Herausforderungen sind jedoch vielfältig. Wegen der winzigen Konzentrationen der meisten ausgeatmeten Stoffwechselprodukte ist der quantitative Nachweis methodisch und technisch sehr anspruchsvoll. Auch sind viele der zugrunde liegenden biochemischen Pfade noch unklar.

Die Analyse von Atemgasproben mittels optischer Methoden bietet die Möglichkeit, flüchtige Biomarker mit teils konkurrenzloser Empfindlichkeit und Geschwindigkeit zu bestimmen und eröffnet damit den Zugang zu völlig neuen Daten. So ist die Laserabsorptionsspektroskopie zurzeit der einzige Weg, um Ethan in Sekundenschnelle während der Ausatmung mit pikomolarer Empfindlichkeit zu messen.

Kompakt- und Hochleistungslaserquellen für das Infrarotgebiet und ultraempfindliche Laserspektroskopie-Methoden entwickeln sich schnell weiter. In jüngster Zeit gab es vielversprechende Versuche am JILA in Boulder, die Ring-Down-Techniken mit einem optischen Frequenzkamm zu kombinieren. Die weitere Entwicklung in Richtung kompakter, zuverlässiger und kostengünstiger IR-Quellen könnte schon bald die erforderlichen optischen Komponenten bereitstellen, um die daraus aufgebauten Analysatoren in langfristigen klinischen Studien evaluieren zu können.

Das Anwendungspotenzial der Echtzeit-Atemanalytik in der klinischen Medizin und in der biomedizinischen Forschung ist gewaltig. Die möglichen Anwendungen von Atemtests überspannen weite Bereiche, angefangen vom ambulanten Infektionsnachweis über

die Überwachung von Intensivpatienten bis hin zur Überführung von Dopingsündern. Denkbar ist z. B. die Überwachung von Sepsis-gefährdeten Intensivpatienten. Diese Patienten laufen ständig Gefahr, dass im Rahmen einer generalisierten Entzündung des Organismus mehrere Organe versagen. Diese Situation ließe sich mithilfe der laserspektroskopischen Ethan-Analyse im Atem frühzeitig genug erkennen, um rechtzeitig Gegenmaßnahmen einzuleiten. Eine andere Vision beinhaltet, dass Patienten eines Tages ihre Atemwerte zu Hause selbst kontrollieren, etwa um zu optimieren, wie viele Medikamente sie einnehmen müssen. Allerdings ist dafür noch ein erheblicher Aufwand an Forschungs- und Entwicklungsarbeiten notwendig, um geeignete tragbare, kostengünstige Analysegeräte zu realisieren.

*

Unser Dank geht an alle Mitarbeiter, die wesentlich zu den hier vorgestellten Arbeiten beigetragen haben. Die Forschungsarbeiten werden von der Deutschen Forschungsgemeinschaft gefördert.

Literatur

- [1] M. Phillips, Scientific American, Juli 1992, S. 74
- [2] N. Marczin und M. H. Yacoub (Hrsg.), Disease Markers in Breath, IOS Press, Amsterdam (2002)
- [3] A. Amann und D. Smith (Hrsg.), Breath analysis for clinical diagnosis and therapeutic monitoring, World Scientific, Singapur (2005)
- [4] A. Roggan, J. Beuthan, S. Schründer und G. Müller, Physikalische Blätter, März 1999, S. 25
- [5] S. Koletzko, M. Haisch, T. Seeboth, B. Braden, K. Hengels, B. Koletzko und P. Hering, Lancet 345, 961 (1995)
- [6] S. A. Kharitonov und P. J. Barnes, Am. J. Respir. Crit. Care Med. 163, 1693 (2001)
- [7] P. Hering, J. P. Lay und S. Stry (Hrsg.), Lasers in environmental and life sciences, Springer, Berlin (2004)
- [8] K. W. Busch und M. A. Busch (Hrsg.), Cavity Ring-Down Spectroscopy, Oxford University Press, Washington DC (1999)
- [9] M. Ebrahim-Zadeh und I. T. Sorokina (Hrsg.), Mid-infrared coherent sources and applications, Springer, Berlin (2008)
- [10] M. Mürtz, D. Halmer, M. Horstjann, S. Thelen und P. Hering, Spectrochimica Acta A 63, 963 (2006)
- [11] D. Halmer, G. von Basum, P. Hering und M. Mürtz, Appl. Phys. B 85, 437 (2006)
- [12] T. Fritsch, P. Brouzos, K. Heinrich, M. Kelm, T. Rassaf, P. Hering, P. Kleinbongard und M. Mürtz, Nitric Oxide 19, 50 (2008)

DIE AUTOREN

Manfred Mürtz (FV Quantenoptik) hat an der Uni Bonn Physik studiert und 1993 promoviert. Nach einer PostDoc-Zeit in Bonn und einem Forschungsjahr als DFG-Stipendiat am National Institute for Standards and Technology in Boulder (USA) wechselte er an die Uni Düsseldorf, wo er sich 2002 habilitierte. Seitdem leitet er dort die Arbeitsgruppe Infrarot-Laserspektroskopie. Seine Forschungsschwerpunkte sind neue Laserspektroskopiemethoden und ihre Anwendung für die biomedizinische Spurengasanalyse. **Peter Hering** hat Physik und Mathematik in Freiburg, Bristol und Kaiserslautern studiert und bei Wolfgang Demtröder und Klaas Bergmann promoviert. Anschließend forschte er bei Bob Curl in Houston (Texas) sowie zwölf Jahre lang in Garching. Seit 1991 ist er Professor am Institut für Lasermedizin an der Uni Düsseldorf. Schwerpunkt seiner Forschung sind neue Methoden des analytischen, diagnostischen und therapeutischen Einsatzes des Lasers in Medizin, Umwelt und Life Science.

