

# 1 Einleitung

## 1.1 Einführung

Die expiratorische Atemluft des Menschen enthält, wie zahlreiche Untersuchungen zeigen, eine große Anzahl leichtflüchtiger, organischer Verbindungen im Spurenbereich. In Abhängigkeit der Probenahme- und Analysetechnik konnten zwischen 20-30 und mehreren tausend verschiedene Analyte nachgewiesen werden [1-6]. Die Verbindungen werden im Wesentlichen auf drei verschiedenen Eintragspfaden in die Atemluft eingebracht. Jeder Pfad ist im folgenden zu einer Gruppe zusammengefasst.

Bei der ersten Gruppe handelt es sich um exogene Substanzen bzw. deren Metabolite. Die Analyte werden mit der eingeatmeten Luft und durch den Konsum von Nahrungsmitteln und Genussmitteln aufgenommen oder durch andere Prozesse wie z.B. durch dermale Adsorption von Wirk- und Duftstoffen aus Medikamenten und Hygieneprodukten über den Blutkreislauf in die Atemluft eingebracht. Die zweite Gruppe von Substanzen stammt von Reaktionsabläufen im Mund-Rachen-Raum. Diese Abläufe wie z.B. Zersetzungsprozesse von Speiseresten in Zahnzwischenräumen und Stoffwechselprozesse der Bakterienflora sind als endogen einzustufen. Sie geben jedoch keine Informationen über Stoffwechseleränderungen, die außerhalb des Mund-Rachen-Raumes stattgefunden haben. Von besonderem Interesse ist die dritte Gruppe. Sie besteht aus leichtflüchtigen, endogenen Analyten, die durch Stoffwechselvorgänge oder Erkrankungen gebildet werden. Durch Gleichgewichtseinstellung zwischen den Medien Blut und Atemluft im menschlichen Organismus spiegelt die Atemluft sowohl normale biochemische Vorgänge als auch pathologische Anomalien wider [7, 8]. Sie ermöglicht einen nichtinvasiven Einblick in den Stoffwechsel und eröffnet damit neue diagnostische Anwendungsgebiete, beispielsweise im Bereich der Arbeitsmedizin für die Überprüfung der Chemikalienbelastung am Arbeitsplatz [9-11]. Auch für den Einsatz in der medizinischen Diagnostik ist die Analyse von Atemluft interessant. Ein denkbarer Anwendungsbereich liegt auf dem Gebiet von Lungenerkrankungen und von Erkrankungen der oberen Atemwege [12-14]. Vor dem Hintergrund stetig steigender Zahlen von Neuerkrankten bzw. an Lungenkrebs verstorbener Patienten, 380.000 Neuerkrankungen und 234.000 Todesfälle in Europa im Jahr 2004 [15], wird die Analyse von Atemluft, besonders für die Früherkennung, als Ergänzung zu bereits etablierten Verfahren wie Bronchoskopie, Röntgen-Diagnostik oder Computertomographie diskutiert. Die Probenahme ist nichtinvasiv, hat keine Nebenwirkungen für den Patienten und kann aus diesem Grund bei Säuglingen, alten und geschwächten Patienten gleichermaßen wie bei gesunden, kräftigen Patienten zum Einsatz kommen. Ferner hat eine wiederholte Beprobung keine negativen Effekte auf den Patienten. Außerdem ist die Probenahme bei den meisten Analysemethoden ortsunabhängig, d.h. sehr flexibel einsetzbar. Die Lagerung von Atemluftproben

ist, verglichen mit Blut- oder Plasmaproben, relativ einfach. Einschränkendes Kriterium ist lediglich die Leichtflüchtigkeit der Verbindungen. Daher ist eine Lagerung bei Raumtemperatur bzw. im Kühlschrank bei 4-7°C sinnvoll. Trotz dieser offensichtlichen Vorteile hat sich die Atemluftanalyse als diagnostisches Verfahren bisher nicht gegen etablierte, meist invasive Methoden durchgesetzt. Dies ist im Wesentlichen auf fünf verschiedene Gründe zurückzuführen.

Ein Grund ist, dass die Matrix Atemluft sehr komplex ist. Sie enthält zahlreiche Komponenten in sehr unterschiedlichen Konzentrationen. Die Hauptbestandteile Stickstoff, Sauerstoff, Kohlendioxid, Wasserdampf und Argon sind im Prozentbereich enthalten, Analyte wie Aceton, Kohlenmonoxid, Methan und Wasserstoff im ppm<sub>v</sub>-Bereich (parts per million) und zahlreiche andere Analyte wie Kohlenwasserstoffe, Oxidationsprodukte von Kohlenwasserstoffen, Schwefelverbindungen im ppb<sub>v</sub>-Bereich (parts per billion) [1, 16-18]. Diesen Konzentrationsunterschieden muss sowohl bei der Probenahme als auch bei der Analyse Rechnung getragen werden.

Der zweite Grund ist die Tatsache, dass einige als Marker geltende Analyte im „normalen“ Substanzspektrum der Atemluft ebenfalls zu finden sind. Sie unterscheiden sich lediglich durch ihre Konzentrationen bzw. daraus resultierende, veränderte Konzentrationsverhältnisse. Diese Analyte sind für eine rein qualitative Bewertung der Atemluft nicht geeignet.

Der dritte Grund und auch eine besondere Herausforderung bei der qualitativen wie quantitativen Analyse realer Atemluftproben ist die eingeschränkte Reproduzierbarkeit. Selbst wiederholte Beprobung eines Patienten kann, verursacht durch Matrix- und Stoffwechselprozesse, zu unterschiedlichen Ergebnissen führen und damit die Beobachtung einer Stoffwechselveränderung erschweren.

Der vierte Grund und bis jetzt größtes Problem ist, dass es, von wenigen Ausnahmen abgesehen, keine weltweit einheitliche Festlegung spezifischer Marker für die jeweilige Krankheit gibt bzw. dass die ermittelten Analytkonzentrationen in Abhängigkeit der Methoden so unterschiedlich sind, dass ein Hinweis aufgrund abnormaler Konzentrationen unmöglich erscheint.

Der fünfte Grund ist, dass hinreichende Grundlagenstudien zu Matrixeffekten in realen Atemluftproben fehlen. Diese wären maßgebend für die Charakterisierung einer gewöhnlichen, realen Atemluft. Sie bilden die Basis für eine Unterscheidung zwischen der Atemluft eines gesunden Probanden und der veränderten Atemluft eines kranken Probanden. Erst auf dieser Basis wäre die Klassifizierung eines Analyts als sogenannter Marker für eine bestimmte Krankheit, d.h. als Analyt der einen eindeutigen Hinweis auf eine krankhafte Veränderung gibt, überhaupt möglich.

Es gilt daher, Methoden bzw. Standardverfahren zu entwickeln, die in Probearbeitung (Vorbereitung des Patienten), Probenahme, Analyse und Auswertung vergleichbar sind. Diese machen jedoch nur dann Sinn, wenn es überhaupt

gelingt, detaillierte Kenntnisse über die „normale“ Atemluft eines gesunden Menschen zu gewinnen. Veränderungen der Atemluft durch äußere Einflüsse, Nahrungsaufnahme, Hygiene, etc. müssen dabei berücksichtigt werden. Es ist daher um so erstaunlicher, dass im Rahmen wissenschaftlicher Arbeiten bei der Suche nach Markern derartige Grundlagen bisher so wenig zur Kenntnis genommen wurden. Aus diesem Grund soll im Rahmen dieser Arbeit die Untersuchung möglicher Veränderungen der Atemluft durch gezielte Beeinflussung derselben vorgenommen werden.

## **1.2 Historische Entwicklung der Atemluftanalyse**

Die menschliche Atemluft wird seit Hippokrates' Zeiten (460-370 v.Chr.) als Diagnosematrix herangezogen. Im Zentrum der hippokratischen Ideale steht neben der Vermeidung unnötigen Leidens die ganzheitliche Behandlung eines Patienten. Dies wird an folgendem Zitat Hippokrates deutlich: „Wird das Zahnfleisch wieder gesund, verschwindet der Mundgeruch“ [19]. Zum einen wird die Diagnose von Halitosis (Mundgeruch) mittels der Diagnosematrix Atemluft gestellt, zum anderen wird nach der Ursache der Erkrankung, in diesem Fall Parodontopathien (Parodontalerkrankungen) gesucht. Durch regelmäßige Beobachtung und Dokumentierung des Krankheitsverlaufs waren die Ärzte im antiken Griechenland fähig, diabetische Ketoazidose anhand des süßlich, fruchtigen Acetongeruchs, Lebererkrankungen anhand des fischigen Geruchs, Nierenversagen anhand des Urin ähnlichen Geruchs und Lungenabszesse anhand des fauligen Geruchs der Atemluft zu diagnostizieren [20].

Bedeutende Fortschritte in der Entwicklung der Atemluftanalyse gelangen Antoine Laurent Lavoisier (1743-1794) in Zusammenarbeit mit Pierre Simon de Laplace (1749-1827) und Armand Séguin (1767-1835). Aufbauend auf kalorimetrischen Experimenten von Adair Crawford und Joseph Priestly aus dem Jahr 1777 gelang es Lavoisier und Laplace 1780, den Metabolismus des Meerschweinchens näher zu erklären. Sie stellten fest, dass in einem geschlossenen System Sauerstoff von einem Lebewesen verbraucht und im Körper unter Abgabe von Wärme zu Kohlendioxid umgesetzt wird. In weiterführenden Studien in Zusammenarbeit mit Séguin wurden zwei wichtige Komponenten der Physiologie, die externe Atmung und die interne Verbrennung, kombiniert. Es zeigte sich dabei, dass oxidative Prozesse, die mit Hilfe von Atemluftanalyse verfolgt werden konnten, sowohl durch Nahrungsaufnahme als auch durch die Umgebungstemperatur und durch körperliche Anstrengung beeinflusst werden [20-22].

Auf der Grundlage der Erkenntnisse von Lavoisier und seinen Zeitgenossen widmeten sich sowohl Justus von Liebig (1803-1873) als auch sein Schüler Wilhelm Henneberg (1825-1890) dem Studium der „Thierchemie“ bzw. der Tierernährungslehre. Sie stellten mit Hilfe metabolischer Untersuchungen, welche die

Atmung einschlossen, Normen für die Fütterung auf bzw. bilanzierten den geeigneten Energiegewinn, erreicht durch „innere Atmung“, d.h. Stoffwechselprozesse, für die spezifische Konstitution des tierischen Körpers [23].

Eins der ersten colorimetrischen Verfahren zur Atemluftanalyse im humanmedizinischen Bereich um 1800 ist auf A. Nebelthau zurückzuführen. An der Marburger Polyklinik etablierte er ein Verfahren zum Nachweis von Aceton in Atemluft als Nachweis für Diabetes Mellitus. Mittels einer alkalischen Iodfalle gelang ihm der Nachweis stark erhöhter Acetonkonzentration in der Atemluft, welche durch eine Stoffwechselveränderung für Diabetiker typisch ist [20].

Weitere colorimetrische Anwendungen fand die Atemluftanalyse 1874 unter Francis Edmund Anstie (1833-1874). Der britische Arzt benutzte eine saure Chromlösung, die sich in Gegenwart von Ethanol von rot-braun nach grün verfärbte, um den Metabolismus von Alkohol sowie dessen dosisabhängige Wirkweise als Medikament oder als Droge zu erforschen. Seine Forschung ist gleichzeitig der Ursprung moderner Atem-Alkohol-Tests, wie sie heute in weiterentwickelter Form von der Polizei eingesetzt werden [20, 24].

1971 leitete Linus Pauling (1901-1994) mit seinen Untersuchungen die moderne Atemluftanalyse ein. Er untersuchte nicht mehr ausschließlich Stoffwechselprodukte nach vorherigem Konsum von z.B. Alkohol oder Einatmen von gasförmigen Substanzen. Sein besonderes Interesse galt den Analyten, die unter normalen Umständen in der Atemluft zu finden sind. Außerdem machte er sich Gedanken über störende Matrixeffekte durch die Umgebungsluft sowie durch Stoffwechselprodukte bedingt durch Nahrungsaufnahme. Um diese Effekte zu minimieren, setzte er seine Probanden auf eine spezielle chemische Diät, die ausschließlich niedermolekulare Substanzen erzeugte, so dass die Nahrung im Magen in den Blutkreislauf adsorbiert wurde und die intestinale Flora durch den Nahrungsmangel verschwand. Die Standardabweichung der untersuchten Proben einer Person konnte auf diese Weise auf ca. 10 % herabgesetzt werden. Die Atemluft wurde in einer mit Trockeneis gefüllten Kühlfalle kondensiert, gaschromatographisch getrennt und mit Hilfe eines Flammenionisationsdetektors detektiert. Nach 10-15 Ausatmungen konnten auf diese Weise 250 unterschiedliche Analyte detektiert werden. Eine Identifizierung der Analyte war, bedingt durch niedrige Konzentrationen, teilweise schlechte Auftrennung der Analyte und den eingesetzten Detektor, damals noch nicht möglich [4].

### 1.3 Stand der Technik

Seit Pionierstudien von Pauling [4], Larrson [25], Chen [26], Cohen [27] und Phillips [28] und ihren Mitarbeitern konnte gerade in den letzten 15 Jahren weltweit ein reges Interesse an der Erforschung der Atemluft bzw. ihrer Bestandteile beobachtet werden [16]. Dabei ist das gemeinsame Ziel aller Forscher, Analytiker wie Mediziner, die menschliche Atemluft für medizinische und toxikologi-

sche Anwendungen zu nutzen und damit einen Beitrag zur nichtinvasiven Diagnostik zu liefern. Die Analysemethoden, die zu diesem Ziel führen sollen, sind vielfältig. Einige Methoden beschränken sich auf die Analyse weniger, speziell ausgewählter Analyte, wohingegen andere ein breites Substanzspektrum abzudecken versuchen.

Relativ weit verbreitet ist der Einsatz von Sensortechniken. Sie zeichnen sich durch ihre geringe Größe und daraus resultierende Flexibilität aus. Die jeweiligen Zielanalyte können selektiv und sensitiv im unteren bis mittleren ppb<sub>v</sub>-Bereich nachgewiesen werden. Damit eignen sie sich als Screening- und Monitoring-Methoden, nicht jedoch für die Analyse eines unbekannten, flexiblen Substanzspektrums. Eingesetzt wurden z.B. chemische Lumineszenz-Analysatoren zur Detektion von Stickoxiden [29-31]. Laserbasierte Sensoren sind in der Lage, Verbindungen wie Kohlenstoffoxidsulfid, Kohlendioxid, Wasser und Kohlenmonoxid nachzuweisen [32, 33]. Flexibler einsetzbar sind elektronische Nasen, die mit unterschiedlichsten Sensoren ausgestattet werden können. Di Natale et al. benutzten 2003 eine Kopplung aus 8 unterschiedlichen chemischen Sensorelementen auf der Basis von Metalloporphyrinen, um statistische Muster bei Lungenkrebspatienten herauszufinden [13].

Lasertechnik findet im Bereich der Atemluftanalyse nicht nur in Sensoren sondern auch als eigenständige Methode Einsatz, da die meisten niedermolekularen Substanzen wie Stickstoffmonoxid, Kohlenmonoxid und Ethan im mittleren Infrarotbereich charakteristische Absorptionsbanden zeigen. Für Analyte mit derartigen Eigenschaften ist dieser optische Nachweis im ppt<sub>v</sub>-Bereich spezifisch und sensitiv. Mütz et al. setzten *infrared cavity leak-out spectroscopy* (CARLOS) als on-line Verfahren zur Überprüfung des Ethangehaltes in Atemluft ein. Die Analyse der Daten erfolgte bei dieser Methode im Millisekundenbereich. Außerdem bietet sie die Möglichkeit einer unmittelbaren Korrelation der erhaltenen Ethanwerte mit simultan ermittelten Kohlendioxid- und Sauerstoffkonzentrationen in der ausgeatmeten Luft [34].

Die IR-Spektroskopie wurde im Bereich der Atemluftanalyse hauptsächlich zur Ermittlung des Alkoholgehalts eingesetzt. Aufgrund kurzer Analysezeiten und einer Messung ohne Probenvorbereitung ist diese Technik für schnelle Analysen geeignet. Zu diesem Zweck wurde z.B. ein tragbarer, niedrig auflösender FT-IR-Analysator für den speziellen Nachweis von Ethanol und Methanol in Atemluft entwickelt. Seine Nachweisgrenzen liegen mit 1,2 ppm<sub>v</sub> bzw. 1,3 ppm<sub>v</sub> in wässriger Matrix zwar relativ hoch, genügen jedoch klinischen Ansprüchen [35]. Nachteil dieser Methode ist, dass es bei Analyten ähnlicher Polarität und Masse im Absorptionsbereich zur Bandenüberlagerung kommen kann, die eine eindeutige Identifizierung und Quantifizierung unmöglich macht.

Ionenmobilitätsspektrometrie (IMS) wurde durch ihren Einsatz zur Kampfstoff- und Sprengstoffkontrolle, neuerdings aber auch für Prozesskontrolle und Drogenscreening bekannt [36-38]. In jüngster Zeit wurde diese Methode zuneh-

mend im Bereich biochemischer Anwendungen auch für die Atemluftanalyse eingesetzt. Das Prinzip der IMS ist die Auftrennung gasförmiger Gemische nach Ionisierung in Abhängigkeit der Driftgeschwindigkeit ihrer Bestandteile. Die Driftgeschwindigkeit ist von der Masse und der räumlichen Struktur des jeweiligen Ions abhängig. Durch vorgeschaltete Trennung der Analyte einer Probe auf einer temperierten Multikapillarsäule können Substanzen im unteren ppb<sub>v</sub>-Bereich nachgewiesen werden. Ionenmobilitätsspektrometer erlauben eine on-line Analyse ohne Probevorbereitung und sind durch ihre Größe und die Tatsache, dass Raumluft als Trägergas verwendet werden kann, flexibel einsetzbar. Für die Analyse unbekannter Proben ist die IMS jedoch zunächst nicht geeignet, da die Messdaten durch einen zeitlichen Signalvergleich nur ein Mapping, nicht aber eine direkte, eindeutige Identifizierung eines Analyts ermöglichen. Datenbanken zur Identifizierung unbekannter Verbindungen sind für die IMS bis dato nicht verfügbar. [39, 40].

Die Kopplung von chemischer Ionisierung und *fast flow* Technologie mit massenspektrometrischen Detektoren hat sich in den letzten Jahren in der Atemluftanalyse etabliert, wie der Einsatz von *proton transfer reaction mass spectrometry* (PTR-MS) und *selected ion flow tube mass spectrometry* (SIFT-MS) zeigt. Beide Methoden eignen sich zur on-line Analyse, haben Nachweisgrenzen im unteren ppb<sub>v</sub>-Bereich und zeichnen sich durch Analysezeiten im Millisekundenbereich aus. Das Funktionsprinzip beider Methoden ist ähnlich. In einer Ionenquelle werden H<sub>3</sub>O<sup>+</sup>-Ionen (bei PTR-MS) bzw. H<sub>3</sub>O<sup>+</sup>, NO<sup>+</sup> und O<sub>2</sub><sup>+</sup>-Ionen (bei SIFT-MS, Ionen speziell für Atemluftanalyse) generiert. Diese werden in einem schnell fließenden Trägergasstrom mit den Analyten der Atemluftprobe zu einer schnellen Reaktion gebracht. Die so gebildeten Produkt-Ionen können mittels Massenspektrometrie (MS) detektiert werden. Quantifizierung ist über spezielle Standardkalibriersubstanzen möglich oder, im Fall der SIFT-MS, über die Partialdrücke aller gebildeten Produkt-Ionen [41-43]. Beide Methoden ermöglichen die Analyse eines relativ breiten Substanzspektrums, wobei die PTR-MS nur für Analyte mit einer höheren Protonenaffinität als H<sub>3</sub>O<sup>+</sup>-Ionen geeignet ist. In beiden Methoden ist die Schwierigkeit bei der Auswertung die Unterscheidung bzw. die eindeutige Identifizierung gleicher Produkt-Ionen, welche aus unterschiedlichen Edukt-Ionen gebildet wurden. Bei SIFT-MS wird dieses Problem insofern vereinfacht, als dass es für ein Edukt-Ion mehrere Produkt-Ionen gibt, die zur Identifizierung herangezogen werden können. Eingesetzt wurden beide Methoden zur Untersuchung bzw. Charakterisierung der ausgeatmeten Luft gesunder Probanden [42-44]. Mit SIFT-MS wurden weiterhin z.B. Matrixeffekte wie Konsum von Alkohol [45] und Zigaretten [46] untersucht, aber auch klinische Studien über Patienten mit Nierenversagen durchgeführt [47, 48]. PTR-MS wurde wiederholt zur Charakterisierung des Abbauverhalten ausgesuchter Anästhetika im menschlichen Organismus eingesetzt [49, 50].

Seit Paulings ersten Untersuchungen ist die Analyse der Atemluft mittels gaschromatographischer Systeme mit Detektoren wie dem Flammenionisationsdetektor (FID), dem Photoionisationsdetektor (PID) und nicht zuletzt dem massenselektiven Detektor (MSD) und der Ionenfalle am weitesten verbreitet.

Da die zu erwartenden Analytkonzentrationen im Bereich von  $\text{ppb}_v$  bis  $\text{ppm}_v$  liegen, ist für die Analyse eine Voranreicherung der Probe notwendig. Diese kann durch physikalische Anreicherung in Kühlfallen [4, 51] und chemische oder adsorptive Bindung an spezielle Adsorbentien vorgenommen werden [51-54]. Die Adsorbentien sind als dünne Beschichtung in Kanistern oder als Film auf speziellen Fasern für die Festphasenmikroextraktion (SPME) aufgebracht. Außerdem werden sie in spezielle Probenahmeröhrchen gepackt, welche die Möglichkeit bieten, unterschiedliche Adsorbentien zu kombinieren und so die Adsorption eines breiteren Substanzspektrums ermöglichen. Während für den Einsatz von Kühlfallen ein größerer instrumenteller Aufwand betrieben werden muss, sind gerade adsorptive Methoden mit niedrigem technischen Aufwand einsetzbar. Gute Reproduzierbarkeit, hohe Flexibilität durch einfachen Transport und Lagerung von verschlossenen Proben sowie hohe Wirtschaftlichkeit durch Rekonditionierung zum wiederholten Einsatz der Adsorptionsmittel sind weitere Vorteile dieser Anreicherung bzw. Probenahme. Insbesondere für den klinischen Einsatz oder andere Arten von Felduntersuchungen, z.B. im Arbeitsschutz, ist die örtliche Trennung von Probenahme und Bestimmungsort von großer Bedeutung.

Nach Aufgabe der Probe über Injektorsysteme wie dem PTV-Injektor (*programmed temperature vaporizer*) [55, 56] oder Thermodesorption mit gleichzeitiger Cryofokussierung [2] werden die Analyte gaschromatographisch auf Kapillarsäulen getrennt. Dabei wurden bisher sowohl unpolare als auch polare Säulen, Dickfilmsäulen und PLOT-Säulen (*porous layer open tubular*) verwendet. Auch die Kopplung unterschiedlicher Säulen zur Trennung eines breiteren Substanzspektrums wurde durchgeführt [6]. Ergänzende Daten zu einigen Techniken der gaschromatographischen Analyse von Atemluftproben mit Angabe der jeweiligen Zielanalyte sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1 Probenvorbereitung und gaschromatographische Techniken unter Angabe der Zielanalyte

Analyt	Probenahme/ Anreicherung	Säule	Detektor	
Ethylen Methanol Aceton Ethanol Schwefelwas- serstoff Isopren	Adsorptionsröhr- chen mit Carboxen X, Carboxen 1018, Carboxen 1019	60 m <i>Rtx</i> 0,32 mm i.D. 5 µm F.D.	FID für KWs, PID für SKWs	[53]
Aceton bzw. Acetonoxim	SPME auf PDMS/ DVB-Faser, Derivati- sierung mit PFBHA	30 m <i>HP-5MS</i> 0,25 mm i.D. 0,25 µm F.D.	MSD	[57]
Aceton Isopren Methan Ethan	<i>membran extraction</i> <i>with sorbent interface</i> (MESI), dann Adsorption auf Tenax oder Carboxen	30 m <i>Rtx-VMS</i> 0,25 mm i.D. 1,4 µm F.D. 30 m <i>Aluminium-</i> <i>oxid PLOT</i> 0,32 mm i.D.	FID	[58]
Isopren	Adsorptionsröhr- chen mit Tenax TA, HayesepQ, Carbos- phere	80 mm 1,5 mm i.D. gepackte Säule mit 10 µm, Hypersil WP C <sub>8</sub> , DCQF-1	UVD	[59]
Benzol	Adsorptionsröhr- chen mit Tenax TA	60 m <i>DB-1</i> 0,53 mm i.D. 1,5 µm F.D.	FID PID	[10]
Pentan	Adsorptionsröhr- chen mit Tenax	30 m <i>Poraplot U</i> 0,32 mm i.D.	MSD	[60]
Methanthiol Dimethylsulfid Dimethyldisul- fid u.a.	<i>fused silica</i> beschichte- ter Probenahmekani- ster, dann dreistufige Cryofokussierung	60 m <i>HP-1</i> 0,32 mm i.D. 1 µm F.D.	MSD	[51]
Ethan Pentan Isopren	Adsorptionsröhr- chen mit Tenax TA, Carboxen 569, Carbo- xen 1000	5 m <i>CP-Wax 57 CB</i> 0,32 mm i.D. 1,2 µm F.D. 22 m <i>CP-SilicaPlot</i> 0,32 µm i.D. 4 µm F.D.	FID	[61]
i.D.	Säuleninnendurchmesser			
F.D.	Filmdicke der Säule			
KWs	Kohlenwasserstoffe			
SKWs	Schwefelkohlenwasserstoffe			

Als Detektoren wurden hauptsächlich FID oder MSD eingesetzt. Beide ermöglichen aufgrund hoher Empfindlichkeit den Nachweis organischer Verbindungen im unteren ppb<sub>v</sub>-Bereich, beim MSD teilweise sogar im ppt<sub>v</sub>-Bereich. Die Identifizierung einer Verbindung ist bei Verwendung des FID nur über die Retentionszeit möglich. Der MSD eignet sich hingegen für die empfindliche und spezifische Analyse unbekannter Realproben mit einem breiten Substanzspektrum. Die Analyse niedermolekularer, polarer, organischer Verbindungen wie z.B. Aldehyde oder Amine ist durch deren thermische Instabilität und hohe Polarität mitunter schwierig.

Wie die Beispiele in Tabelle 1 zeigen wurden gaschromatographische Techniken schon mehrfach im Bereich der Atemluftanalyse angewendet. Besonders intensiv auf dem Gebiet der GC/MS-Analyse von Atemluft betätigen sich die Gruppen um Michael Phillips in den USA und Jochen K. Schubert in Rostock. Phillips et al. etablierten ein Verfahren, das zur Bestimmung oxidativen Stresses einen dreidimensionalen Gradienten ermittelt, der das Verhältnis von C<sub>4</sub> bis C<sub>20</sub>-Alkanen und monomethylierten Alkanen veranschaulicht [2]. Das *breath methylated alkane contour* (BMAC) zeigt dabei sowohl das Verhältnis der genannten Substanzen untereinander an als auch ihre Herkunft aus exogenen bzw. endogenen Prozessen. Der Proband muss für diese Untersuchung 1 L Atemluft durch ein Mundstück in eine spezielle Atemluftsammelapparatur (*breath collection apparatus*, BCA) pusten. Zeitnah wird unter gleichen Bedingungen eine 1 L Raumluftprobe genommen, die den exogenen Anteil der Atemluft repräsentieren soll. Beide Proben werden adsorptiv gesammelt und mittels GC/MS-Technik analysiert [2]. Aufgrund der ausschließlichen Beobachtung von Substanzmustern bzw. von Unterschieden in Intensitätsverhältnissen verzichteten Phillips et al. auf eine Kalibrierung mit Standardsubstanzen. Es besteht bei dieser Methode jedoch die Gefahr, dass die Bezugnahme auf die aktuelle Raumluftzusammensetzung zu Fehlern führt. Dies wäre z.B. der Fall, wenn die Atemluft eines Probanden nicht mit der Umgebungsluft im Raum der Probenahme im Gleichgewicht steht. Dann könnten ungewollt endogen produzierte Analyte subtrahiert werden bzw. aus anderen Quellen exogen aufgenommene Analyte nicht subtrahiert werden. Bisher wurde die Methode nach Phillips in groß angelegten Studien bei gesunden Menschen und für die Ermittlung von Markern z.B. bei Brustkrebspatienten [62], bei Lungenkrebspatienten [63], bei Diabetikern [64], bei Herztransplantatierten [65], aber auch bei Schwangeren [66] eingesetzt. Tabelle 2 zeigt einige der so von Phillips et al. als Marker identifizierten Analyte.

Tabelle 2 Marker nach Phillips für ausgewählte Krankheitsbilder

Krankheit	Marker	
Brustkrebs	Nonan, 5-Methyltridecan, 3-Methylundecan, 6-Methylpentadecan, 2-Methylpropan, 3-Methylnonadecan, 4-Methyldodecan, 2-Methyloctan	[62]
Lungenkrebs	Butan, 3-Methyltridecan, 7-Methyltridecan, 4-Methyloctan, 3-Methylhexan, Heptan, 2-Methylhexan, Pentan, 5-Methyldecan	[63]
Herztransplantation	2-Methylpropan, 5-Methyloctadecan, 6-Methyloctadecan, 2-Methylheptadecan, Octan, 2-Methylheptan, 3-Methylundecan, 2-Methyloctadecan, 2-Methylhexadecan	[65]
Instabile Angina	4-Methyloctan, 4-Methyldecan, Hexan, 5-Methylpentadecan, 7-Methylhexadecan, 2-Methylpropan, Pentan, 2-Methylbutan	[67]
Schwangerschaft	Undecan, 6-Methyltridecan, 2-Methylpentan, 5-Methyltetradecan, 2-Methylnonan	[66]

Die SPME-Technik wurde von Schubert et al. zur Anreicherung von Analyten aus Atemluft und zur Headspaceanalyse von Blut verwendet [7, 55]. Die auf PDMS/Carboxen-Fasern absorbierten Proben wurden im Injektor desorbiert, gaschromatographisch getrennt und mittels MSD detektiert. Hauptsächliches Interesse galt dabei den Verbindungen Aceton, Isopren und n-Pentan. Die Kalibrierung erfolgte mit Hilfe von Gasstandards. Die verwendete Probenahme- und Analyse-methode diente bisher insbesondere zur Untersuchung des Gleichgewichtsverhältnisses gasförmiger Analyte in Blut und Atemluft [7, 55]. Der überwiegende Teil der Studien wurde an künstlich beatmeten Intensivpatienten durchgeführt. In diesem Fall wurde die Umgebungsluft durch das Beatmungssystem ausgeschlossen. Die Patienten befanden sich unter kontrollierten Bedingungen, was die Matrix erheblich vereinfachte. Allerdings stand dem ein hoher Grad an Medikation, sowie Blindwerte und Kondensationseffekte innerhalb des Beatmungssystems gegenüber. In Studien wurden z.B. Patienten mit Sepsis und septischem Schock, Patienten mit *systemic inflammatory reaction syndrome* (SIRS) und Patienten mit *acute respiratory distress syndrome* (ARDS) untersucht [68].

## 1.4 Zielsetzung

Im *ersten Teil* dieser Arbeit soll für die Matrix Atemluft ein geeignetes Probenahme- und Analyseverfahren entwickelt werden. Auf Basis vergleichender Studien der gegenwärtigen Forschung [1-18, 25-68] ist eine adsorptive Anreicherungsmethode aufgrund ihres niedrigen technischen Aufwands bei der Probenahme geeignet. Sie ist universell und unabhängig vom Ort der späteren Messung einsetzbar und kann daher auch in Felduntersuchungen oder im klinischen Bereich eingesetzt werden. Gepackte Adsorptionsröhrchen können selbst hergestellt werden, womit ihre Reinheit kontrollierbar ist und ihre Zusammensetzung variiert werden kann. Die Kombination verschiedener Adsorbentien ermöglicht die Anreicherung eines großen Substanzspektrums. Bei der Entwicklung einer geeigneten Probenahme soll der hohe Wasseranteil in der ausgeatmeten Luft berücksichtigt werden. Ferner gilt es, die Bestandteile der Matrix zu charakterisieren. In diesem Zusammenhang müssen unterschiedliche Konzepte zur Trocknung der Gasprobe untersucht und diskutiert sowie Möglichkeiten zur Minimierung des exogenen Anteils aufgezeigt werden. GC/MS-Systeme zeichnen sich durch hohe Reproduzierbarkeit und große Empfindlichkeit aus. Sie sind für den Nachweis und die Identifizierung von unbekannten Substanzen im Ultraspurenbereich bestens geeignet. Schonende Aufgabe der Probe unter Minimierung vorzeitiger Analytzerersetzung gewährleistet die Thermodesorption (TD). Zeitgleiche Cryofokussierung ermöglicht eine verlustfreie Aufgabe der gesamten Probe auf das GC/MS-System.

Vor dem Hintergrund dieser Ergebnisse wird ein chromatographisches Verfahren mit massenspezifischer Detektion in Kombination mit adsorptiver Anreicherung für die Probenahme und Analyse der Matrix Atemluft favorisiert. Das Verfahren soll eine möglichst vollständige Analyse und Charakterisierung der Atemluft ermöglichen, indem es nicht auf eine spezielle Substanzgruppe optimiert ist, sondern zur Analyse unterschiedlichster Verbindungen eingesetzt werden kann.

Im *zweiten Teil* dieser Arbeit soll die entwickelte Methode auf Standardproben, die Analyte der Atemluft enthalten, und auf reale Atemluftproben angewendet werden. Ziel ist eine möglichst vollständige Charakterisierung der ausgeatmeten Luft gesunder Probanden. Um Matrixbestandteile bzw. exogene Komponenten abschätzen zu können, sollen unterschiedliche Matrices wie z.B. Nahrungs- und Genussmittel sowie Hygieneprodukte und Medikamente dem Körper zugeführt und deren Metabolismus verfolgt werden. Diese, für die vollständige und korrekte Interpretation von Atemluftproben so entscheidenden Bestandteile, wurden bisher zwar häufig andiskutiert, jedoch nur ansatzweise weiter untersucht und berücksichtigt. Desweiteren soll eine Gruppe gesunder Personen, Raucher wie Nichtraucher, untersucht werden, um Ansätze für Unterscheidungsmerkmale wie auch Gemeinsamkeiten zu ermitteln. Abschließend soll die Eignung der Methode für zwei ausgewählte Krankheitsbilder getestet werden.

## 2 Ergebnisse und Diskussionen

Atemluft enthält eine große Menge Wasserdampf. Ihre relative Feuchte beträgt mehr als 95 %. Entsprechend sind in einem Liter vollständig gesättigten Gases bei Körpertemperatur ca. 40 mg Wasserdampf enthalten. (Die vollständige Sättigung eines Gases bei 40 °C entspricht 41,7 mg/L) [69].

Zahlreiche Analyte der Atemluft wie beispielsweise Alkohole, Ketone und Aldehyde sind mittelpolare bis polare Verbindungen. Als solche zeigen sie einen mittel bis stark hydrophilen Charakter. In Gegenwart von Wasser kommt es zur Einstellung eines Gleichgewichts zwischen Gasphase und wässriger Phase in Abhängigkeit der Polarität.

Berücksichtigt man diese Tatsache für die Probenahme und Analyse von Atemluft, so wird deutlich, dass jegliches Abkühlen der gasförmigen Probe unter die Körpertemperatur zum einen mit Kondensationseffekten und zum anderen mit der Einstellung eines zweiphasigen Gleichgewichtes verbunden ist.

Der Eintrag dieser Feuchtigkeit in das Messsystem kann zum Zufrieren der Kühlfalle und zu Verlust oder Diskriminierung der Probe führen. Außerdem sind Probleme bei der gaschromatographischen Trennung durch Verschiebung von Retentionszeiten, schnellere Aktivierung der analytischen Säule und Beeinträchtigung der massenspektrometrischen Detektion zu erwarten [3, 70].

Die Trocknung einer Probe, d.h. die Abtrennung des Atemkondensats, durch chemische oder physikalische Prozesse, kann jedoch einen deutlichen bis vollständigen Verlust hydrophiler Verbindungen hervorrufen.

### 2.1 Methodenentwicklung

#### 2.1.1 Auswahl des Adsorptionsmittels

Aufgrund der niedrigen Analytkonzentrationen in der Atemluft ist eine Anreicherung für einen empfindlichen und reproduzierbaren Nachweis notwendig. Diese muss aus funktionellen Gründen, z.B. späterer Einsatz im klinischen Bereich, mit möglichst geringem technischen Aufwand verbunden sein. Das heißt, die Geräte sollen einfach zu bedienen, mobil und transportabel sein und wenig Stellplatz in Anspruch nehmen. Diesen Anforderungen genügen insbesondere Probenahme- bzw. Anreicherungsverfahren, die auf dem Prinzip der Adsorption von gasförmigen Analyten (Adsorbaten) an festen Adsorptionsmitteln (Adsorbentien) bzw. auf dem Prinzip der Absorption von Absorbaten in flüssigen Absorbentien basieren. Dazu gehört beispielsweise die Absorption an beschichteten Fasern, wie sie bei der SPME zum Einsatz kommen, oder die Verwendung von Stahl- oder Glasröhrchen, die mit speziellen Adsorbentien gefüllt sind. Beide Probenahmetechniken sind grundsätzlich gut geeignet, da sie eine flexible, ortsunabhängige, einfache Probenahme ermöglichen und gleichzeitig

empfindlich und reproduzierbar sind. Die Proben können aufgrund der handlichen Probenahmetools, Faser oder Adsorptionsröhrchen, einfach transportiert und gelagert werden. Ein weiterer Vorteil beider Methoden ist die Möglichkeit einer einfachen Rekonditionierung des Adsorbens; bei der Faser im Injektorsystem des Gaschromatographen, beim Röhrchen im Thermodesorptionsofen oder in umgebauten GC-Öfen.

SPME-Fasern selektieren durch den Typ ihrer Beschichtung Verbindungen einer bestimmten Polarität. Variationen sind nur durch Verwendung einer anderen Beschichtung möglich. SPME-Fasern können aufgrund ihrer Kapazität nur ein begrenztes Analytvolumen absorbieren. Im Gegensatz dazu können die Packungen, d.h. die Adsorbentien, in Adsorptionsröhrchen mit relativ geringem präparativen Aufwand ausgetauscht und kombiniert werden. Die Verwendung von Röhrchen für einzelne Versuchsreihen, wie sie im Rahmen dieser Arbeit nötig waren, ist gegenüber SPME-Fasern außerdem ökonomischer, da etliche Fasern benötigt würden und sich der relativ hohe Anschaffungspreis erst bei einer routinemäßigen Anwendung rechnet. Für diese Arbeit wurde aufgrund der größeren Beladungskapazität und der höheren Flexibilität bei der Analyse eines breiten und variablen Substanzspektrums die Verwendung von Adsorptionsröhrchen gewählt.

An die Wahl der Adsorptionsmethode schloss sich die Auswahl eines geeigneten Adsorptionsmittels an. Dabei musste sowohl das breite Substanzspektrum als auch der hohe Wassergehalt der Atemluft berücksichtigt werden [6]. Diesen Kriterien entsprechen kohlenstoffhaltige Molekularsiebe, graphitisierte Kohlenstoffe (Carbon Blacks) und insbesondere poröse, organische Polymere [71].

Frühere Untersuchungen zeigten, dass die unpolaren, kohlenstoffhaltigen Molekularsiebe wie z.B. Carboxen für die Adsorption von C<sub>2</sub>- bis C<sub>5</sub>-Molekülen gut geeignet sind, jedoch ein erheblicher Anteil Wasser angereichert wird [70, 72]. Ferner wurde beobachtet, dass Analyte wie  $\alpha$ -Pinen und Sabinen sowie reaktive Verbindungen wie 1,3-Butadien und Isopren nicht reproduzierbar analysiert werden können [71]. Laut Herstellerangaben ist Carboxen bezüglich des Durchbruchverhaltens auch für die Analyse von Ethan, Propan, Ethanol, Propanal, 2-Butanon, Butanal, Aceton und 2-Methylpropanal, die alle die genannte Molekülgröße besitzen, ungeeignet [73].

Carbon Blacks wie z.B. Carbotrap sind unpolare Adsorbentien mit großer Hydrophobizität. Sie eignen sich daher besonders zur Anreicherung feuchter Proben. Das Spektrum geeigneter Adsorbate reicht von niedrig bis zu mittel siedenden, aliphatischen, cyclischen und aromatischen Verbindungen [71, 74]. Allerdings wurden für Substanzen wie  $\alpha$ -Pinen und polare Verbindungen wie Acrolein und Hexanal Analytverluste beobachtet [71].

Poröse, organische Polymere wie z.B. Tenax sind hochreine, sehr hydrophobe Adsorbentien, die sich durch eine hohe thermische Stabilität auszeichnen. Sie sind jedoch für leicht flüchtige, organische Verbindungen mit Molekülgrößen

kleiner  $C_4$  eher ungeeignet, können aber zur Minimierung von Durchbrucheffekten gut mit Carbon Blacks kombiniert werden [71].

Für die Eignungstests zur Adsorption von Atemluftkomponenten wurden Röhren mit den vorgestellten Adsorptionsmitteln auf drei unterschiedliche Weisen gepackt: a) 200 mg Tenax, b) 100 mg Tenax plus 100 mg Carboxen und c) 100 mg Tenax plus 100 mg Carbotrap. Alle Röhren wurden wie in Kap. 5.3.2 beschrieben präpariert und konditioniert. Anschließend wurde jedes Röhren mit der gleichen Standardgasprobe aus einer Testgasquelle (Herstellung der Standardgasproben wie in Kap. 5.2 beschrieben) beladen. Die Auswahl der Standards richtete sich nach bereits in der Atemluft detektierten Verbindungen.

Nach Analyse mittels GC/MS wurden die Peaks integriert und ein Vergleich der Peakflächen in Abhängigkeit des verwendeten Adsorptionsmaterials vorgenommen. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Abbildung 1 dargestellt.

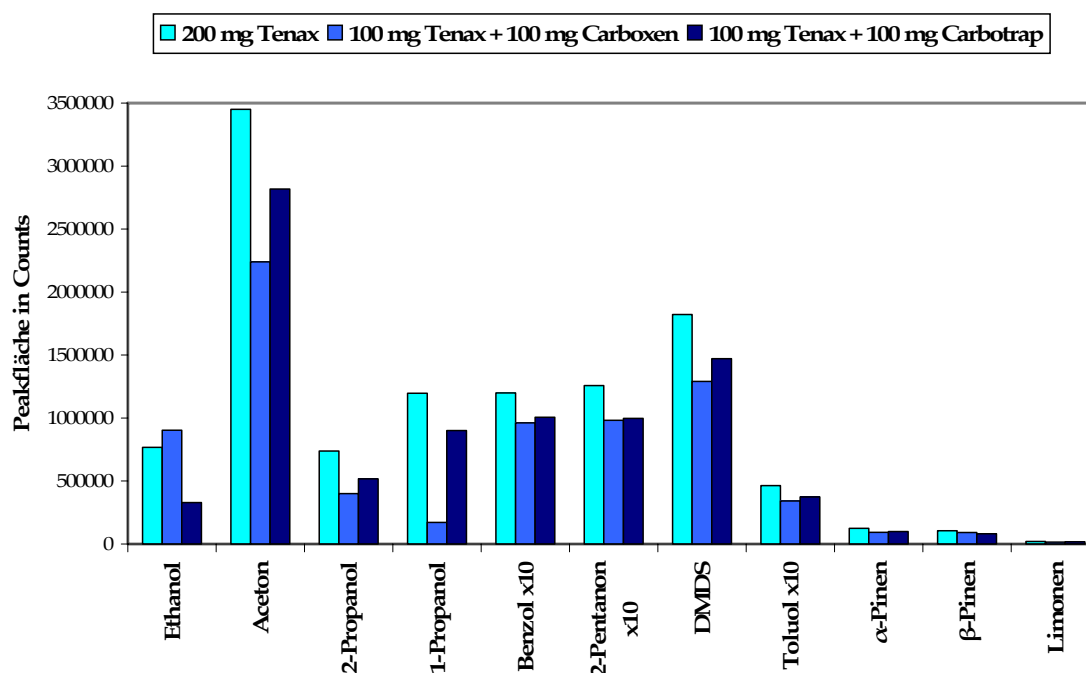


Abbildung 1 Adsorptionsfähigkeit von Standardgasproben an unterschiedliche Adsorbentien

Der direkte Vergleich aller drei Röhrenarten zeigt, dass nur für den Analyt Ethanol eine Tenax/Carboxen-Mischung die beste Wiederfindung ermöglicht. Für alle anderen Substanzen ist aufgrund der höchsten Peakflächen die alleinige Verwendung von Tenax geeigneter.

In einer weiteren Versuchsreihe wurden die unterschiedlichen Adsorbentien realen Probenahmebedingungen unterworfen. An jedes Adsorptionsmittel

wurde unter gleichen Bedingungen 1 L Atemluft desselben Probanden adsorbiert und mittels GC/MS analysiert. In diesem Fall wurde bei 8 ausgewählten Substanzen eine Integration der Peaks vorgenommen. Die Beurteilung der Adsorbentien auf dieser Basis ist in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3 Adsorptionsfähigkeit von Atemluftproben auf unterschiedlichen Adsorptionsröhrchen

Analyte	200 mg Tenax	100 mg Carbotrap + 100 mg Tenax	100 mg Carboxen + 100 mg Tenax
Ethanol	++	+	++
Aceton	+++	+	+
Isopren	+	+++	+
2-Propanol	++	+	++
1-Propanol	+++	+	+
Benzol	+	++	++
Toluol	+++	+	+
$\alpha$ -Pinen	++	++	+
+++	sehr gut geeignet		
++	gut geeignet		
+	geeignet		

Auch in diesem Fall zeigt die alleinige Verwendung von Tenax insgesamt die besten Resultate. Lediglich Isopren lässt sich auf einer Tenax/Carbotrap-Mischung besser anreichern. Deshalb wurden Röhrchen mit einer Packung von 200 mg Tenax für alle weiteren Analysen in dieser Arbeit eingesetzt.

### 2.1.2 Probenahmemethoden

Nach der Ermittlung eines geeigneten Adsorptionsmittels war die Entwicklung einer praktikablen und gleichzeitig effektiven Probenahmemethode notwendig. In der Literatur sind für adsorptive Probenahmetechniken zwei grundlegende Methoden beschrieben. Bei der einen Technik wird während der Atemluftabgabe direkt auf dem Adsorbens angereichert [2, 53, 56]. Bei der anderen Technik wird die Atemluft erst in einem speziellen, gasdichten Behältnis gesammelt. In einem zweiten Schritt wird dann die gesammelte Probe auf das Adsorbens überführt. Die Sammelbehälter sind überwiegend speziell vorbehandelte Stahlkaniister [51, 75, 76] oder Beutel aus inerten Materialien wie z.B. Tedlar-Beutel [6, 75]. Beide Arten von Sammelbehältern besitzen den Vorteil, dass sie eine inaktive Oberfläche haben, aus relativ stabilem Material bestehen, einfach in der Handhabung und nach Reinigung wiederverwendbar sind. Insbesondere Stahlkaniister sind jedoch aufgrund ihrer Größe und ihres Gewichts nicht so gut zu

transportieren und zu lagern. Außerdem ist bei beiden Arten von Sammelbehältern mit Kondensationseffekten an den Innenwandungen und in den Ventilen zu rechnen, wenn sie nicht auf Temperaturen nahe der Körpertemperatur, d.h. zwischen 35-40 °C, gebracht werden. Kondensation und gezielte Adsorption kommen als Möglichkeiten zur Entfernung des Wassers aus der Atemluftprobe in Frage.

Im Rahmen dieser Methodenentwicklung wurden zuerst 1 L-Tedlar-Beutel zur Probenahme getestet. Anfangs wurde direkt über das Einlassventil in den Beutel gepustet, was zu den erwarteten Kondensationseffekten an der Innenseite des Beutels führte. Nächste Versuche galten dem Ziel, den Beutel im Gasfluss wieder zu trocknen. Die Trocknung stellte sich als aufwendig und langwierig heraus, da das Ventil keine kontinuierliche Durchspülung des gesamten Beutelvolumens ermöglichte. Unabhängig von Memorieffekten, allein aufgrund der hohen Feuchtigkeit der Atemluft, wurde daher eine Trocknung der Atemluft vor Einlass in den Beutel angestrebt, um so eine bessere Reproduzierbarkeit zu gewährleisten und die Option einer späteren Reinigung und Wiederverwendung des Beutels offen zu halten.

Zur Trocknung der Atemluft wurden Trockenröhrchen (T-Röhrchen) eingesetzt (siehe Kap. 5.3.3). Das verwendete Molekularsieb eignet sich zur selektiven Abtrennung von Wasser und wird z.B. zur Trocknung von organischen Lösungsmitteln verwendet. Das T-Röhrchen wurde direkt über Swagelock-Verbindungen mit dem Ventil des Tedlar-Beutels verbunden. Die Probanden pusteten durch das T-Röhrchen in den Beutel. Unter diesen Bedingungen wurde im Beutel keine Kondensation festgestellt. Das T-Röhrchen wurde unmittelbar nach der Probenahme vom Beutel entfernt, um eine Gleichgewichtseinstellung zwischen Gasphase im Beutel und wässriger Phase im T-Röhrchen zu unterbinden. Daran anschließend wurde die Atemluft unter zeitlicher Kontrolle und bei konstantem Fluss von 200 mL/min mit Hilfe einer Membranpumpe aus dem Beutel über das Adsorbens gezogen.

Zunächst sollte eine Probserie mit verschiedenen Probanden einen Hinweis darauf geben, welche Analyte standardmäßig in der Matrix Atemluft vorkommen. Gleichzeitig sollte gezeigt werden, ob die Probenahme mit Tedlar-Beuteln grundsätzlich für die Analyse von Atemluftproben geeignet ist. Von 15 freiwilligen, als gesund eingestuften Probanden wurde die Atemluft untersucht. Fünf von ihnen waren Raucher. Die Probenahme fand immer innerhalb desselben Labors statt, d.h. die Umgebungsluft war stets vergleichbar. Die Probenahmebedingungen waren wie in Kap. 5.1 beschrieben. Bei den gesammelten Proben (durchschnittliches Volumen ca. 700 mL) war auffällig, dass Analyte wie Ethanol, Aceton, 2-Propanol, 1-Propanol, Benzol und  $\alpha$ -Pinen in allen Proben, andere wie 2-Butanon, Heptan und Trimethylhexan hingegen nur in einzelnen Proben nachgewiesen werden konnten. Bei der Analyse zeitnah gesammelter Raumluftproben konnten u.a. die Analyte Ethanol, 2-Propanol, Benzol und Heptan nach-

gewiesen werden. Jene Verbindungen kommen in sehr niedrigen Konzentrationen, die im allgemeinen deutlich unter den vorgeschriebenen Richtwerten liegen, in der Atmosphäre vor. Sie stammen hauptsächlich aus anthropogenen Quellen, d.h. sie werden direkt und indirekt durch den Menschen verursacht. Über die eingeatmete Luft gelangen sie wieder in den menschlichen Atemkreislauf.

Es wurde beobachtet, dass die Anzahl der Analyte in gleichbleibendem Probenahmevolumen von Proband zu Proband stark variieren kann. In einigen Proben wurden rund 20 Verbindungen analysiert, in anderen mehr als das Doppelte. Unter den gegebenen Bedingungen wurden Ethanol, Aceton, 2-Propanol, 1-Propanol, Hexan, Methylcyclopentan, Benzol, Heptan, 1-Methylthio-propan, Toluol, 2,4-Dimethylheptan, Tetrachlorethylen, Ethylbenzol, Xylol, N,N-Dimethylacetamid,  $\alpha$ -Pinen, Phenol und Limonen in den meisten Proben identifiziert. Diese Substanzen kommen somit offensichtlich in der Atemluft gesunder Menschen vor. Deshalb sind sie bestenfalls als quantitative Marker für Veränderungen des Stoffwechsels tauglich, es sei denn, ihr Fehlen hätte krankhafte Ursachen.

Um die Eignung einer Probenahme mit Tedlar-Beuteln zu testen, wurden reale Atemluftproben mit Blindproben der Beutel verglichen. Für die Ermittlung des Blindwertes eines Beutels wurde dieser mehrfach, diskontinuierlich mit Stickstoff gespült. Die letzte dieser Füllungen wurde analog zur Atemluft auf einem Adsorptionsröhrchen angereichert und analysiert. Die Chromatogramme in Abbildung 2 zeigen im oberen Teil die Zusammensetzung einer 0,7 L Atemluftprobe und darunter den Blindwert des Beutels mit Stickstofffüllung.

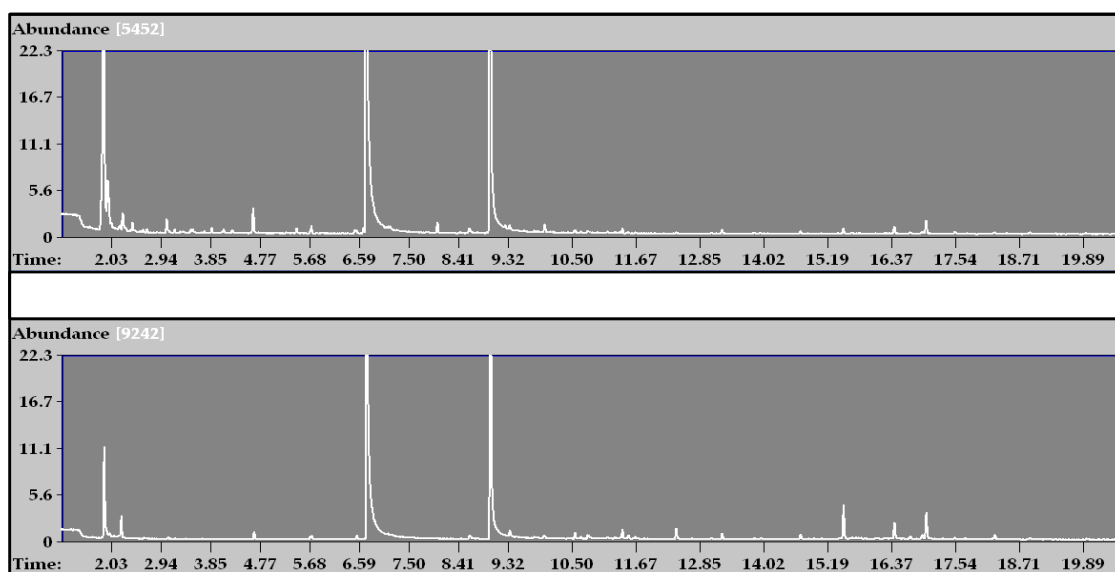


Abbildung 2 Vergleich einer Atemluftprobe (oben) mit dem Blindwert eines Tedlar-Beutels mit Stickstofffüllung (unten)

Ein Vergleich beider Proben ergab, dass insbesondere N,N-Dimethylacetamid und Phenol in sehr großen Mengen aus der Probenahmeeeinheit, d.h. Beutel, Ventil, O-Ring und Septum, freigesetzt werden. Eine Untersuchung der Signale mit kleineren Intensitäten verdeutlicht, dass neben den beiden Hauptanalyten N,N-Dimethylacetamid und Phenol noch zahlreiche andere Substanzen in geringeren Konzentrationen freigesetzt werden. Berücksichtigt man, dass die Blindwerte im Bereich der eigentlichen Zielanalyte, nämlich bei Retentionszeiten  $< 10$  min liegen, so ist ein Einsatz von Tedlar-Beuteln nur dann in Betracht zu ziehen, wenn sich deren Blindwertbeitrag deutlich erniedrigen lässt. Zu diesem Zweck wurden erneut Spülversuche mit neuen und mit bereits benutzten Beuteln vorgenommen. Die Beutel wurden zwischen 0 und 40 mal mit Stickstoff gespült. Jeweils die letzte Füllung wurde untersucht. Bei 5 Spülschritten wurde ein Rückgang des Blindwertes von N,N-Dimethylacetamid und Phenol um ca. 50 % für neue und um ca. 80 % für benutzte Beutel festgestellt. Nach 40 Spülgängen konnte eine Reduzierung um 80 % bzw. 95 % erreicht werden. Grundsätzlich lässt sich somit der Blindwerteintrag des Tedlar-Beutels durch 5-10 Spülgänge auf unter 10 % herabsetzen, wobei sich die Wiederverwendung der Beutel als vorteilhaft erwies. Wichtig für einen späteren Einsatz erschien eine Blindwertminimierung durch Ausschalten der Quelle für die störenden Analyte sowie das Lagerverhalten der Beutel. Berücksichtigt man, dass Tedlar-Folie laut Herstellerangaben keine flüchtigen, organischen Verbindungen freisetzen soll und dass für Teflon, das Material des Ventils, Ähnliches gilt, kam als Quelle der Verunreinigungen nur der O-Ring und das Septum des Ventils in Frage. Beide Bauteile wurden 30 min bei 75 °C ausgeheizt und nach Abkühlung wieder in das Ventil eingebaut. Anschließende Probenahme aus dem betreffenden Beutel zeigte, dass thermische Belastung nicht zu einer Reduzierung sondern sogar zu einer gesteigerten Freisetzung der diskutierten Analyte führt. Ähnliche Beobachtungen wurden auch für die Lagerfähigkeit gereinigter Beutel gemacht. Ein sauberer mit Stickstoff gefüllter Beutel wurde eine Woche lang bei Raumtemperatur liegen gelassen. Erst nach dieser Zeit wurde die Probe analysiert. Die verlängerte Lagerzeit führte zu einer Erhöhung der N,N-Dimethylacetamid- und der Phenolkonzentration um ca. 400 % im Vergleich zur Belastung eines gespülten Beutels.

Da die Blindwertbeiträge durch die Tedlar-Beutel erheblich waren und sich auch mit großem Aufwand nur anteilig beheben ließen und ferner das Risiko, Analyte durch Überlagerung mit Blindwertbestandteilen zu übersehen, nicht identifizieren zu können oder falsche Intensitätsverhältnisse zu ermitteln, zu groß war, kommt die Verwendung von Tedlar-Beuteln zur Probenahme nicht in Frage.

In weiteren Versuchen wurden zur Minimierung des Blindwerteintrags nur noch einstufige Probenahmemethoden, d.h. Probenahme und Anreicherung in einem Schritt, angewendet. Die Vortrocknung der Atemluft wurde im ersten Fall durch die Verwendung eines T-Röhrchens und im zweiten Fall durch einen zusätzlichen Kondensationsschritt realisiert.

Im ersten Fall wurde ein T-Röhrchen direkt mit dem Adsorptionsrohr verbunden. Der Proband musste bei geschlossenem Mund, ähnlich wie beim Trinken mit Strohalm, durch das T-Röhrchen auf das Adsorptionsröhrchen ausatmen. Aufgrund des hohen Fließwiderstands, der durch die Packung beider Röhrchen, besonders aber des Adsorptionsröhrchens, entsteht, ist es nicht möglich, selbstständig durch die Röhrchen zu pusten. Deshalb wurde die Probenahme durch eine Membranpumpe unterstützt. Die Flussrate der Pumpe wurde nach mehreren Tests auf 0,5 L/min festgesetzt. Dieser Fluss wurde von der Mehrzahl der Probanden als nicht unangenehm empfunden. Er gewährleistet außerdem eine relativ kurze Probenahmezeit für Volumina im 1 L-Bereich. Nach Literaturangaben liegt er außerdem für Tenax im Toleranzbereich, in dem das Durchbruchvolumen noch unabhängig vom Fluss bei der Probenahme ist [71, 77]. Messungen innerhalb dieses Bereiches garantieren somit die Vergleichbarkeit der Proben durch gleich bleibendes Adsorptionsverhalten.

Im zweiten Fall wurden die Proben durch Kondensation getrocknet. Dies geschah sowohl aktiv durch die Verwendung eines auf 10 °C temperierten Wasserbades als auch passiv durch den Temperaturgradienten, der sich zwischen ausgeatmeter Luft bei Körpertemperatur und Umgebungstemperatur einstellt. In 1 L Luft kann der relative Feuchtegehalt durch Kondensation von ca. 40 mg bei Körpertemperatur auf ca. 20 mg bei Raumtemperatur bzw. auf 9,4 mg bei 10 °C reduziert werden [69]. Differenzwägungen der im ersten Fall verwendeten T-Röhrchen ergaben eine Massenzunahme von durchschnittlich 30 mg/L Atemluft. Abbildung 3 stellt die Intensität einiger Analyte der Atemluft in Abhängigkeit der Trocknungsmethode dar.

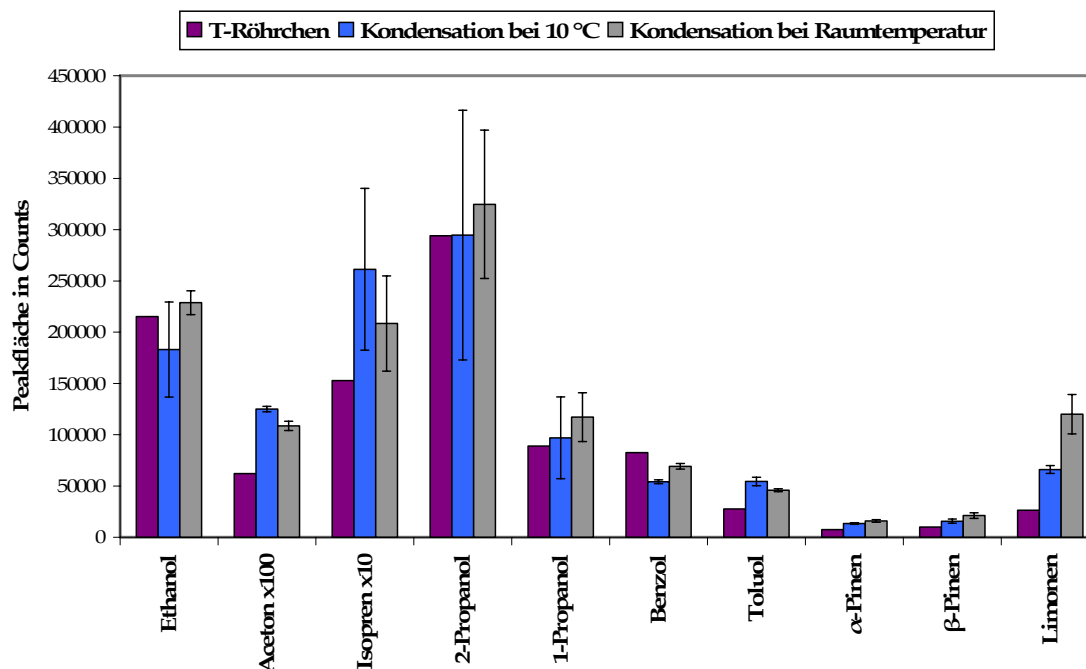


Abbildung 3 Vergleich unterschiedlicher Trocknungsmethoden für Atemluftproben

Bei den meisten untersuchten Analyten wurden durch passive Kondensation bei Raumtemperatur die größten Analytkonzentrationen auf dem Adsorbens gefunden. Für die Analyte Ethanol, 2-Propanol, 1-Propanol,  $\alpha$ -Pinen und  $\beta$ -Pinen wurden bei der Kondensation bei 10 °C und bei der Trocknung mittels T-Röhrchen sehr ähnliche Ergebnisse erhalten. Bei Aceton und Isopren hingegen wurden deutliche Konzentrationsunterschiede sichtbar. Beide Analyte scheinen sich bei der Abtrennung wässriger Matrix in Abhängigkeit des Verfahrens grundlegend anders zu verhalten. Dies lässt sich damit erklären, dass die Analyte zusammen mit dem Kondenswasser bzw. gelöst in diesem eine starke Bindung mit dem Molekularsieb eingehen und so auf diesem zurückgehalten werden. Im Gegensatz dazu sind die Analyte, die sich im Kondensat einer Kühlfalle befinden, nur einem dynamischen Gleichgewicht unterworfen. Sie sind zwar immer noch in der wässrigen Phase gelöst, werden jedoch kontinuierlich durch den Gastrom mitgerissen. Da in diesem Fall nur ein zweiphasiges Gleichgewicht zwischen flüssiger Phase und Gasphase, nicht aber ein quasi dreiphasiges Gleichgewicht zwischen Molekularsieb (fester Phase), flüssiger Phase und Gasphase, vorliegt, kommen geringere Substanzverluste durch adsorptive Vorgänge vor.

Um den Einfluss eines T-Röhrchens auf die Probenahme bewerten zu können, wurden unter gleichen Bedingungen 1,5 L Atemluftproben bei Probenahme mit

und ohne T-Röhrchen verglichen. Das T-Röhrchen wurde im Rahmen dieser Messreihe wie ein Adsorptionsröhrchen analysiert. Bei der Probenahme ohne Trocknung wurden die Atemluft über ein kurzes Teflon-Mundstück direkt auf das Adsorbens gezogen. Im Adsorptionsröhrchen konnte dann eine deutliche Kondensation beobachtet werden. Die Analyse dieses Röhrchens gewährleistete eine deutliche Minimierung von Probeverlusten, da das Kondensat im Desorptionsofen ebenfalls verdampft und zusammen mit den desorbierten Analyten untersucht wurde. Die zugehörigen Werte werden in Abbildung 4 gezeigt.

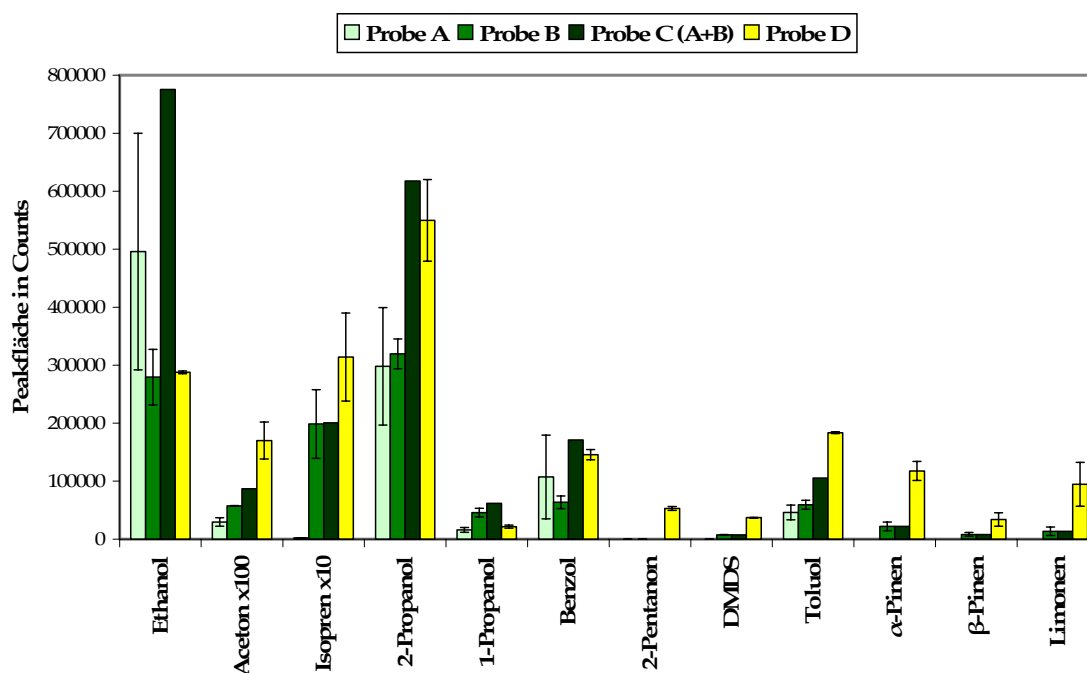


Abbildung 4 Vergleich einer Probenahme mit Trocknung (Probe C = Probe A(T-Röhrchen) + Probe B (Adsorbens)) und ohne Trocknung (Probe D)

Bei nicht getrockneten Proben kommt es zum Eintrag von ca. 10-20 mg Wasser in das TD/GC/MS-System. Der Vergleich einer getrockneten Probe C (bestehend aus T-Röhrchen (Probe A) und Adsorptionsrohr (Probe B)) mit einer nicht vorge-trockneten Probe D zeigt jedoch für 10 der 12 untersuchten Analyte deutlich höhere Konzentrationen in Probe D.

Die einzige Ausnahme bilden Ethanol und 1-Propanol. Für beide Analyte ist jedoch Tenax laut Herstellerangaben als Adsorbens nicht optimal geeignet (siehe Kap. 2.1.1). Entsprechend führte die Verwendung eines Molekularsiebs (im T-Röhrchen) für beide Substanzen zu einer Veränderung des Durchbruchverhaltens beim eigentlichen Adsorbens. Bei Aceton, Isopren, 2-Propanol, Benzol und Toluol, aber auch bei Ethanol und 1-Propanol wurden signifikante Konzentratio-

nen der Analyte auf dem T-Röhrchen analysiert, teilweise in ähnlichen Größenordnungen wie auf dem Adsorptionsröhrchen. Da jedoch die T-Röhrchen im Rahmen späterer Messungen gerade nicht analysiert werden sollten, bliebe dieser Anteil der Analyte unerfasst. In Kap. 2.1.5 wird die Möglichkeit einer halbquantitativen Auswertung vorgestellt, die eine Abschätzung der Gesamtkonzentration einer unbekannten Probe aufgrund der Analytkonzentration auf dem Adsorbens erlaubt. Letztendlich muss die Auswertung bei einer Probenahme mit T-Röhrchen jedoch eine Abschätzung bleiben. Neben dem Problem einer geeigneten Kalibrierung (Kap. 2.1.5) wurde beobachtet, dass die Summe aus der Beladung des T-Röhrchens und des Adsorptionsrohrs nicht der Analytkonzentration der Probe ohne Vortrocknung entsprach (siehe Abbildung 4). Durch die Verwendung des Molekularsiebs bei realen Atemluftproben kam es zu einem Analytverlust zwischen 6 % und 79 % im Vergleich zur Probenahme ohne Trocknung. Dieser kann darauf zurückgeführt werden, dass die Analyte unter normalen Desorptionsbedingungen bei einer maximalen Desorptionstemperatur von 200 °C nicht vom Molekularsieb desorbieren. Verluste in ähnlicher Größenordnung konnten auch bei Standardgasproben beobachtet werden (Kap. 2.1.5).

Insgesamt eignete sich eine Probenahme ohne jeglichen Trockenschritt am besten für die Matrix Atemluft, da so eine möglichst verlustfreie Überführung der Probe in das GC/MS-System gelang. Seitens der Analyse mittels GC/MS-Technik konnten, bedingt durch die vergleichsweise immer noch kleine Wassermenge, keine schwerwiegenden Nachteile durch die Feuchtigkeit der Proben beobachtet werden. Die Chromatogramme deuteten weder auf einen vollständigen Analytverlust noch auf Probleme bei der Probeaufnahme, d.h. Zufrieren der Kühlfalle, hin. Allein eine geringe Verschiebung der Signale zu höheren Retentionszeiten wurde beobachtet. Die Probenahme ohne Trocknung bewirkte für ein weites Substanzspektrum deutlich höhere Analytsignale und damit vergleichsweise geringe Analytverluste. Da das Ziel dieser Arbeit eine möglichst vollständige Charakterisierung der Atemluft ist, wurde eine Probenahmemethode favorisiert, die einer großen Zahl unterschiedlichster Verbindungen gerecht wird. Zu diesem Zweck musste auf die Optimierung der Methode für einzelne Analyte wie Ethanol und 1-Propanol verzichtet werden, um die Bedingungen für die breite Substanzpalette nicht zu verschlechtern. Nur so bleibt die universelle Einsetzbarkeit der Methode gegeben. Das schließt jedoch eine spätere Differenzierung und Optimierung für einzelne Analyte anhand gezielter Fragestellungen nicht aus.

Alle Proben, die für den folgenden Teil dieser Arbeit untersucht wurden, sind daher ohne vorherige Trocknung angereichert worden.

### **2.1.3 Probenahmevervolumen**

Neben der Technik der Probenahme hat das Probenahmevervolumen einen deutlichen Einfluss auf alle Analyseergebnisse. Es erklärt unter anderem die unterschiedliche Anzahl detektierter Analyte bei ähnlichen Probenahme- und

Analysentechniken. Einige Verfahren ließen die Detektion von deutlich weniger als hundert unterschiedlichen Verbindungen zu, andere wiederum von mehreren hundert Verbindungen. Diese Unterschiede sind zum Großteil auf die niedrige Konzentration vieler Analyte zurückzuführen. Lag in Einzelfällen die Masse einer Verbindung bei Anreicherung von 1 L Atemluft noch unterhalb der Nachweisgrenze, so war jene bei einem größeren Probenahmenvolumen möglicherweise überschritten. Das heißt, der betreffende Analyt war auch vorher schon in der Probe enthalten, konnte jedoch aufgrund der Arbeitsparameter nicht detektiert werden.

Für die Ermittlung eines geeigneten Probenahmenvolumens ergaben sich folgende Anforderungen: es musste ein Probenahmenvolumen ermittelt werden, das von einem Probanden in akzeptabler Zeit und ohne übermäßige Anstrengung abgegeben werden konnte, ferner sollte auf dieser Grundlage ein Volumen gefunden werden, das die Detektion einer möglichst großen Anzahl von Verbindungen erlaubt. Das niedrigste, untersuchte Probenahmenvolumen betrug 150 mL. In der entsprechenden Probe konnten jedoch neben den höher konzentrierten Analyten Aceton und Isopren nur Spuren von Ethanol, Benzol und Toluol identifiziert werden. Im Vergleich dazu wurde eine 5 L Probe untersucht. Die Probenahme dauerte in diesem Fall ca. 10 min. Sie wäre für einen geschwächten Menschen deutlich zu anstrengend gewesen. Durch die ungewohnte Atmung durch die Nase kann es bei langer Probenahmedauer leicht zu ungleichmäßigem Atmen, verbunden mit Atemnot und Überanstrengung, kommen. Das große Probenahmenvolumen ermöglichte dafür aber die Identifizierung einer Vielzahl unterschiedlicher Verbindungen wie z.B. Alkohole, gesättigte und ungesättigte Kohlenwasserstoffe, Schwefelverbindungen, Terpene, Aromate. Insgesamt ist ein Probenahmenvolumen von 5 L nicht optimal. In weiteren Untersuchungen wurde das Volumen auf 1 bzw. 2 L verringert. In beiden Fällen konnte die Mehrzahl der Verbindungen, die auch in der 5 L Probe enthalten waren, identifiziert werden. Die Probenahmezeit blieb mit 1 bis 2 min für alle Probanden akzeptabel. In strittigen Fällen ermöglichte ein Signalvergleich über die Retentionszeit die Identifizierung solcher Analyte, deren Konzentration in 1-2 L Proben nahe der Nachweisgrenze lag, in 5 L Proben jedoch eindeutig nachgewiesen werden konnten. Das Probenahmenvolumen für weitere Proben im Rahmen dieser Arbeit wurde aus oben genannten Gründen auf 1 L begrenzt.

#### **2.1.4 Messbedingungen für die TD/GC/MS**

Die Analyse der adsorptiv angereicherten Gasproben wurde mittels GC/MS durchgeführt. Als Injektorsystem diente ein Autosampler mit Thermodesorptionseinheit, der wiederum mit dem Kaltaufgabesystem (CIS) des Gaschromatographen verbunden war. Der Gaschromatograph war mit einem massenselektiven Quadrupol-Detektor verbunden.

Die Proben wurden mit Hilfe des Autosamplers in den Desorptionsofen eingebracht. Zeitgleich wurde das CIS des Gaschromatographen mit flüssigem Stick-

stoff auf  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gekühlt. Diese Temperatur hat sich in der Atmosphärenanalytik für das Auskondensieren leichtflüchtiger, organischer Verbindungen bewährt und diente daher hier als Anfangsbedingung. Messungen unter diesen Bedingungen zeigten jedoch den Verlust von Isopren, vermutlich durch unzureichendes Auskondensieren. Um diesen Vorgang zu untersuchen, wurde die Temperatur des CIS auf  $-150^{\circ}\text{C}$  erniedrigt. Dadurch gelang eine gute Wiederfindung des Isoprens, gleichzeitig wurde jedoch eine sehr große Mengen an Kohlendioxid gefunden. Um Störungen durch Kohlendioxid zu vermeiden, wurde die Temperatur des CIS daher auf  $-120\text{ }^{\circ}\text{C}$  erhöht. Diese Temperaturwahl ermöglichte eine optimale Probenaufgabe und die Generierung guter Chromatogramme. Störeffekte des Kohlendioxids durch Signalüberlagerung konnten nicht mehr beobachtet werden. Isopren zeigte auch bei dieser Temperatur eine gute Wiederfindung.

Insgesamt ist die Probenaufgabe mittels Thermodesorption (TD) mit anschließender Cryofokussierung im CIS für empfindliche Proben wie die Atemluft sehr geeignet. Die Desorption der Analyte erfolgt sehr schonend. Dadurch wird die thermische Zersetzung der Analyte weitgehend ausgeschlossen. Bei Temperaturen zwischen  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  und  $200\text{ }^{\circ}\text{C}$  wurden die Bestandteile der Atemluft langsam in der Reihenfolge ihrer Siedepunkte vom Adsorbens desorbiert und gelangten nacheinander in das CIS. Die Einstellung des CIS auf niedrige Temperaturen garantiert das Auskondensieren auch von sehr leichtflüchtigen Analyten. Während des gesamten Desorptionsvorgangs (genaues Programm in Tabelle 19) wurde der Großteil des Trägergasstromes nach Durchlaufen des CIS über ein Splitventil abgeführt, um den Eintrag eventuell nicht auskondensierter Verbindungen in das GC/MS-System zu minimieren und einen ausreichenden Fluss im GC/MS-System zu gewährleisten. Unmittelbar nach Beendigung des Desorptionsvorgangs bzw. mit Beginn der Analytaufgabe auf die GC-Säule wurde das Ventil wieder vollständig geschlossen. Schnelles Aufheizen des CIS, in  $1,5\text{ s}$  von  $-120\text{ }^{\circ}\text{C}$  auf  $200\text{ }^{\circ}\text{C}$ , ermöglichte eine vollständige, splitlose und punktförmige Aufgabe der Probe auf die GC-Säule.

Die gaschromatographische Trennung komplexer Substanzgemische mit Hilfe kapillarer Trennsäulen hat sich im Bereich der organischen Spurenanalytik bestens bewährt. Durch die Wahl geeigneter Säulen lassen sich heute selbst Analyte mit sehr ähnlicher Polarität und Siedepunkten gut trennen. Durch die kommerzielle Verfügbarkeit einer großen Anzahl unterschiedlichster Säulen, die sich in Länge, Durchmesser, Filmdicke und stationärer Phase unterscheiden, wird die Analyse eines breiten Substanzspektrums möglich. Die Atemluft enthält polare, mittelpolare und unpolare Analyte (siehe auch Kap. 2.1.2). Um den Polaritätsunterschieden gerecht zu werden, wurde eine unpolare und eine polare Kapillarsäule auf ihre Eignung für die Analyse von Atemluftproben untersucht.

Bei der ersten eingesetzten Säule handelte es sich um eine 30 m lange, relativ unpolare *HP-5MS* Säule mit einem Innendurchmesser von 0,25 mm und einer Filmdicke von 0,25  $\mu\text{m}$ . Unter Standardmessbedingungen (siehe auch Kap. 5.4.1) konnte mit dieser Säule für alle Analyte bei deren charakteristischen Masse/Ladungsverhältnissen ( $m/z$ ) im SIM-Modus (selected ion monitoring) eine hinreichende Basislinientrennung, eindeutige Identifizierung und gute Quantifizierung erreicht werden. Im Scan Modus wurde jedoch eine deutliche Signalüberlagerung von Substanzen ähnlicher Polarität und Masse beobachtet. Analyte im Retentionsbereich unter 3 min, d.h. in diesem Fall Ethanol, Aceton, Isopren, 2-Propanol und Dimethylsulfid (DMS), konnten nur schwer unterschieden werden. Eine Veränderung des Temperaturprogramms für den Säulenofen mit z.B. langsameren Aufheizraten verbesserten die Trennung nicht.

Zum Vergleich wurde eine längere (60 m), polare *SB-11* Säule mit einem Innendurchmesser von 0,25 mm und einer Filmdicke von 0,25  $\mu\text{m}$  auf ihre Eignung für die Analyse von Atemluftproben untersucht. Mit dieser Säule sollte eine optimale Auftrennung insbesondere polarer Verbindungen möglich sein. Die Untersuchung realer Proben zeigte, dass die Trennung für Aceton, Isopren und DMS aufgrund ihres chemischen Verhaltens auf der polaren Säule verbessert werden konnte. Bei Ethanol und 2-Propanol hingegen tauchten weiterhin deutliche Trennprobleme auf. Auch im SIM-Modus waren diese beiden Analyte nicht vollständig getrennt. Dadurch wird eine sichere qualitative und quantitative Analyse insbesondere für Ethanol erschwert, ja sogar unmöglich, da für diese Verbindung im Messbereich außer  $m/z$  45 kein weiteres charakteristisches Fragment zur Auswertung zur Verfügung steht. Abbildung 5 verdeutlicht die Trennprobleme beider Säulen im Vergleich. Der obere Chromatogrammausschnitt zeigt die Trennung einer Atemluftprobe auf der *HP-5MS* Säule.

Für jeden Analyt ist jeweils ein charakteristisches  $m/z$ -Verhältnis dargestellt:  $m/z$  45 für Ethanol und 2-Propanol,  $m/z$  58 für Aceton und  $m/z$  67 für Isopren. Im unteren Chromatogrammausschnitt ist die Trennung von 2-Propanol und Ethanol auf der *SB-11* Säule dargestellt. Zur Identifizierung von 2-Propanol wurde  $m/z$  59 herangezogen. Für Ethanol war keine weitere Auswertung möglich.

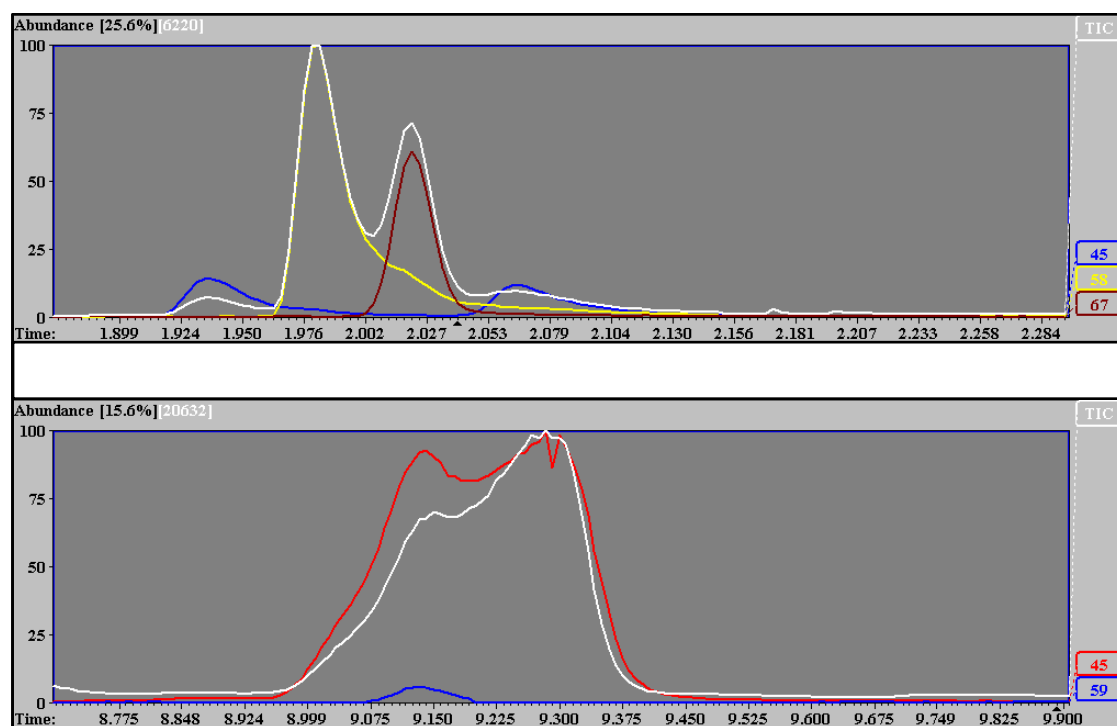


Abbildung 5 Trennschwierigkeiten von Atemluftproben auf unterschiedlichen Säulen: oben HP-5MS Säule; unten SB-11 Säule (Ethanol:  $m/z$  45; 2-Propanol:  $m/z$  45 und 59; Aceton:  $m/z$  58; Isopren:  $m/z$  67)

Für weitere Analysen im Rahmen dieser Arbeit wurde die nahezu unpolare HP-5MS Säule ausgewählt. Durch die kürzer Säulenlänge ist außerdem eine Verkürzung der Analysezeit bei vergleichbarer Trennleistung gegeben. Die Analyte der Atemluft wurden überwiegend in einem Zeitfenster zwischen 0 und 20 min detektiert. Von besondere Bedeutung für eine reproduzierbare, quantitative Aufgabe war dabei die splitlose Aufgabe vom CIS auf die GC-Säule. Das rund 30minütige Temperaturprogramm des Säulenofens wurde bewusst nicht gekürzt. Die verbleibenden 10 min nach Auftreten der letzten Verbindung dienten zur Analyse zusätzlicher, schwerer flüchtiger Substanzen und zur Konditionierung der Säule für die nächste Probe. Auf zusätzliche Konditionierung zwischen den Proben konnte verzichtet werden. Der Gesamtzeitaufwand für die Analyse einer Probe, inklusive Vorkühlung des CIS, betrug unter diesen Bedingungen ca. 1 Stunde.

Für eine nachweisstarke Detektion wurde ein Quadrupolmassenspektrometer verwendet. Die direkte Kopplung der analytischen Säule mit der Ionenquelle ermöglichte eine verlustfreie Überführung aller Substanzen und hohe Empfindlichkeit bei der anschließenden Detektion. Die Ionisierung erfolgte durch Elektronenstoß (EI) bei 70 eV. Alle Proben wurden im Scan Modus in einem  $m/z$ -Bereich von 35-300 amu gemessen. Dieser Bereich orientierte sich an der Mole-

külgröße bisher beschriebener Verbindungen und an Literaturangaben [51]. Als kleinstes zu detektierendes Masse/Ladungsverhältnis wurde  $m/z$  35 gewählt. Messungen unterhalb dieses Wertes waren schwierig, da die Signale aus Luft bei  $m/z$  28 und  $m/z$  32 zu deutlichen Störungen führen. Außerdem erschwerte der Wassergehalt der Proben eine gute, reproduzierbare Identifizierung aller anderen Analyte durch Signalüberlagerung im Bereich unter  $m/z$  18. Die Analyse ab  $m/z$  35 geht mit dem Informationsverlust bezüglich aller Analyte unter diesem Wert einher. Die Qualität der massenspektrometrischen Detektion aller anderen Verbindungen und deren Auswertung konnte auf diesem Weg jedoch optimiert werden. Ergänzende Daten zur gesamten TD/GC/MS-Methode, inklusive alle Temperaturprogramme, sind im Kap. 5.4.1 zusammengestellt.

### 2.1.5 Mögliche Quantifizierung

Neben einer qualitativen Auswertung der Zusammensetzung von Atemluft und einem Vergleich unterschiedlicher Intensitätsverhältnisse ihrer Inhaltsstoffe ist für viele Fragestellungen die quantitative Bestimmung der Kohlenwasserstoffkonzentrationen sinnvoll und hilfreich. Die Kalibrierung eines GC/MS-Systems wird mit Hilfe spezieller Referenzsubstanzen (Standards) durchgeführt. Diese sollen den Zielanalyten in chemischen wie physikalischen Eigenschaften möglichst ähnlich sein oder ihnen entsprechen. Über die Bestimmung der Retentionszeit sowie die Aufnahme eines substanzspezifischen Spektrums mit Hilfe der Massenspektrometrie wird eine eindeutige Identifizierung und eine quantitative Auswertung möglich. Für letztere werden die Intensitätsverhältnisse einer Referenzprobe mit bekannter Konzentration mit denen einer unbekannten Probe verglichen. Leichtflüchtige organische Verbindungen (VOCs) wurden bisher besonders eingehend in der Atmosphärenanalytik untersucht. Es bietet sich daher an, aufbauend auf den Erkenntnissen dieses Forschungsgebietes, eine Methodik für die Matrix Atemluft zu entwickeln, nicht zuletzt weil ein nicht unerheblicher Matrixbestandteil der Atemluft durch die eingeatmete Luft, d.h. die Umgebungsluft, geprägt ist.

Für die qualitative und quantitative Analyse von VOCs wurden bisher sowohl interne als auch externe Standards verwendet. Bei den internen Standards wurden überwiegend isotoopenmarkierte Verbindungen wie z.B.  $^{13}\text{C}$ -Verbindungen verwendet. Diese Verbindungen ermöglichen eine hohe Reproduzierbarkeit und Robustheit, sind jedoch in der Anschaffung sehr kostspielig. Theoretisch kann auch auf eine andere organische Verbindung zurückgegriffen werden, die die oben genannten Kriterien erfüllt und garantiert nicht in der Realprobe vorkommt. Für die Atemluft ist die Auswahl einer solchen Substanz eher schwierig, weil die Matrix selbst starken Schwankungen durch Nahrung, Lebensgewohnheiten, Umgebung, etc. unterworfen ist und damit den internen Standard möglicherweise selbst enthält. Ferner muss eine gesundheitliche Gefährdung der Probanden ausgeschlossen werden können, was die Zahl infrage kommender

Substanzen deutlich verringert. Eine gezielte Verabreichung wäre aufgrund des individuellen Stoffwechsels jedes Probanden außerdem sehr schwierig.

Externe Standards können vergleichsweise kostengünstig und einfach hergestellt werden. Die Probanden kommen mit diesen Standards durch deren externen Einsatz nicht in Berührung, was jegliche gesundheitliche Gefährdung ausschließt. Externe Standards wurden bisher hauptsächlich in Lösung hergestellt, d.h. die Analyte wurden in organischen Lösungsmitteln in unterschiedlichen Konzentrationen gelöst und diese Standardlösungen dann direkt auf das Adsorbens gegeben. Die Probe konnte anschließend genau wie eine gasförmige Probe untersucht werden [78, 79].

Andere Verfahren zur Herstellung externer Standards basieren auf dem Prinzip der Permeation durch eine Membran aus Kunststoff wie Polytetrafluorethylen (PTFE) oder fluoriertem Ethylenpropylen (FEP) [80] oder auf dem Prinzip der Diffusion durch Kapillaren [81-83]. Bei beiden Verfahren kommt es zu einem definierten Massentransport aus der flüssigen, organischen Verbindung in die umgebende Gasphase. In Abhängigkeit des Umgebungsdrucks, der Luftfeuchtigkeit, der Temperatur und der Membran bzw. der Kapillare können auf diese Weise definierte, gasförmige Multikomponenten-Standards im  $\text{ppm}_v$ - bis  $\text{ppt}_v$ -Bereich hergestellt werden. Den unterschiedlichen Dampfdrücken der Substanzen wird durch die Beschaffenheit der Membran bzw. durch die Ausmaße der Kapillare, d.h. Länge und Innendurchmesser, Rechnung getragen. Dadurch ist das Diffusionsverfahren deutlich flexibler und besser auf die Analyten abstimmbare als das Permeationsverfahren. Grundsätzlich wurde in internationalen Ringversuchen eine deutlich höhere Reproduzierbarkeit bei der Verwendung quantitativer, gasförmiger Standards für die Auswertung gasförmiger Proben festgestellt [84, 85].

In der vorliegenden Arbeit wurde das von Hoffmann [81] verwendete diffusionskontrollierte System, das auf eine Fragestellung aus dem Bereich der Atmosphärenchemie ausgelegt war, auf Atemluftproben angepasst. Die für die Herstellung der Gasstandards verwendete Testgasquelle ist in Abbildung 6 skizziert.

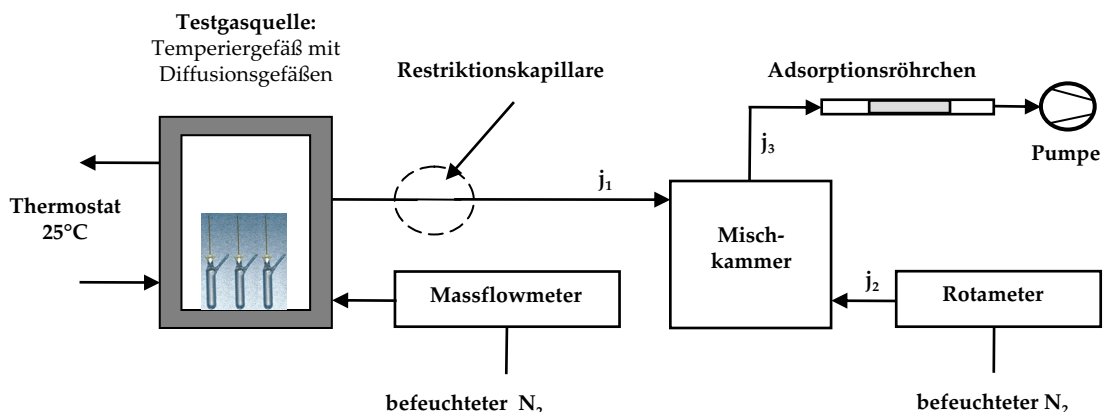


Abbildung 6 Schema der verwendeten Testgasquelle mit Mischeinheit ( $j_1$ : Fluss aus Testgasquelle;  $j_2$ : Verdünnungsfluss;  $j_3$ : Probenahmefluss)

Als Referenzsubstanzen wurden 12 unterschiedliche Verbindungen (siehe Tabelle 4) mit einem Reinheitsgrad größer als 97 % ausgewählt, die im Atem gesunder Probanden standardmäßig gefunden wurden. Gleichzeitig repräsentieren die Substanzen verschiedene Stoffgruppen wie Alkohole, Ketone, Aromate und ungesättigte Kohlenwasserstoffe und können somit zum abschätzenden Vergleich für das Verhalten anderer Vertreter dieser Gruppen herangezogen werden. Die Referenzsubstanzen wurden wie in Kap. 5.2 beschrieben in jeweils ein Diffusionsgefäß gefüllt. Alle Diffusionsgefäße wurden in ein gläsernes Temperiergefäß eingesetzt, das über die Wandungen auf 25°C erwärmt und mit Hilfe von Aluminiumfolie lichtundurchlässig gemacht wurde. Über der flüssigen Referenzsubstanz in den Diffusionsgefäßen bildet sich eine gesättigte Gasphase aus, die mit einem konstanten Massenfluss durch die Kapillare in die umgebende Stickstoffatmosphäre der Testgasquelle diffundiert. Die Stickstoffatmosphäre innerhalb der Testgasquelle wird durch einen kontinuierlichen Stickstofffluss  $j_1$  erzeugt. Dieser wird zunächst in einer Waschflasche angefeuchtet, mittels eines *Massflowmeters* eingestellt und dann in das Temperiergefäß geleitet. Dort treten die Referenzsubstanzen aus den Diffusionsgefäßen in den Stickstoff ein und werden mit diesem über eine Restriktionskapillare in die Mischkammer des Systems befördert. Als Restriktionskapillare wird eine unbeschichtete, *fused silica* Kapillare verwendet, die bei leichtem Überdruck innerhalb der Testgasquelle eine Rückdiffusion in dieselbe verhindern soll. In der 2 L Mischkammer kann nun mit Hilfe eines zweiten, variablen und ebenfalls angefeuchteten Stickstoffflusses  $j_2$  die Standardgasprobe aus der Testgasquelle auf die gewünschte Konzentration verdünnt werden. Nach Einstellung des Gleichgewichts zwischen den Gasströmen  $j_1$  und  $j_2$  kann über den

Probenahmefluss  $j_3$  eine Probe aus dem Gasgemisch der Mischkammer genommen werden.

Zur Quantifizierung der einzelnen Referenzsubstanzen wird jeweils wie folgt verfahren. Über die regelmäßige gravimetrische Kontrolle jedes Diffusionsgefäßes kann die Diffusionsrate  $r$  ermittelt werden. Dividiert man die Diffusionsrate nun durch den Gesamtvolumenstrom des Systems, d.h.  $j_1$  plus  $j_2$ , so erhält man die Konzentration des jeweiligen Analyts im Gasgemisch der Mischkammer. Multipliziert man diese Konzentration mit dem Probenahmefluss  $j_3$  und der Probenahmezeit, so erhält man die auf dem Adsorbens angereicherte Masse des Analyts für die jeweilige Probe. Möchte man diesen Wert lieber als Konzentration ausdrücken, so dividiert man ihn abschließend durch das Probenahmevolumen. Im Bereich der Atemluftanalyse werden Konzentrationen häufig als Volumenmischungsverhältnisse z.B. in ppt<sub>v</sub> angegeben. Zieht man diese Einheit vor, so muss die ermittelte absolute Menge des einzelnen Analyts in die entsprechende Stoffmenge umgerechnet werden. Im nächsten Schritt wird die Stoffmenge des gesamten Probenahmevolumens über das ideale Gasgesetz berechnet. Das relative Mischungsverhältnis erhält man, indem man den Quotienten aus der Stoffmenge des einzelnen Analyts und der Stoffmenge der gesamten Probe bildet.

Bei der Planung einer neuen Testgasquelle oder der Ergänzung einer bestehenden muss in Abhängigkeit des Dampfdrucks die Dimension der Kapillare der Diffusionsgefäße bzw. die daraus resultierende Diffusionsrate  $r$  abgeschätzt werden. Experimentell kann dies durch kontinuierliche gravimetrische Bestimmung des Massenverlustes über einen Zeitraum von mehreren Wochen geschehen. Bei Kenntnis des Dampfdrucks kann ein Vergleich zu schon bestehenden Diffusionsgefäßen vorgenommen werden. Die Daten der hier eingesetzten Diffusionsquellen sind in Tabelle 18 detailliert aufgeführt. Sind weder Erfahrungswerte noch Stoffdaten für den entsprechenden Analyt vorhanden, so kann die Diffusionsrate und damit auch die Dimensionierung der Kapillare mit Hilfe der folgenden Berechnung abgeschätzt werden.

Mit Hilfe des Siedepunktes und der Umgebungstemperatur kann der Dampfdruck  $D$  [atm] berechnet werden:

$$D = \exp \left\{ 19 \left( \frac{SP}{T_U} \right) + 8,5 \ln \left( \frac{SP}{T_U} \right) \right\} \quad 1$$

mit Siedepunkt ( $SP$ ) und Umgebungstemperatur ( $T_U$ ) in Kelvin.

Mit Hilfe dieser Stoffdaten kann, wenn der Diffusionskoeffizient  $D_0$  in  $\text{cm}^2/\text{s}$  und die Molmasse  $M$  in  $\text{g/mol}$  vorliegt, die Diffusionsrate  $r$  [ $\text{g/s}$ ] ermittelt werden [86]:

$$r = \left( \frac{2,3 \cdot D_0 \cdot M \cdot A \cdot p}{R \cdot T_T \cdot L} \right) \log \left( \frac{1}{1-D} \right) \quad 2$$

mit Diffusionsfläche der Kapillare ( $A$ ) in  $\text{cm}^2$ , Länge der Kapillare ( $L$ ) in  $\text{cm}$ , Temperatur der Testgasquelle ( $T_T$ ) in Kelvin, dem Normaldruck ( $p$ ) und der idealen Gaskonstante ( $R=82 \text{ cm}^3 \text{ atm/mol K}$ ).

Ist der Diffusionsquotient  $D_0$  nicht bekannt, so kann dieser z.B. nach Berechnungen von Fuller ermittelt werden [87]:

$$D_0 = \left( \frac{0,001 \cdot T_T^{1,75} \cdot \sqrt{MB}}{p \cdot (\sqrt[3]{MV} + \sqrt[3]{MD})^2} \right) \quad 3$$

dabei wird die Temperatur der Testgasquelle ( $T_T$ ) in Kelvin, der Molenbruch ( $MB$ ) für den Analyt sowie Stickstoff in  $\text{mol/g}$ , der Normaldruck ( $p$ ) in  $\text{atm}$  sowie das molare Diffusionsvolumen ( $MV$ ) in  $\text{cm}^3/\text{mol}$  (hier für Stickstoff) und die molare Dichte des Analyten ( $MD$ ) in  $\text{mol/cm}^3$  verwendet.

Auf diese Weise kann allein mit Hilfe des Siedepunktes und der Molmasse eines Analyts seine Diffusionsrate einfach und schnell abgeschätzt werden. Für unterschiedlichste Analyte wie aromatische Kohlenwasserstoffe, aliphatische Kohlenwasserstoffe, ungesättigte Kohlenwasserstoffe und halogenierte Verbindungen konnte eine gute Übereinstimmung experimentell ermittelter und wie oben berechneter Diffusionsraten gefunden werden. Für die Mehrzahl der Analyte lag die Abweichung beider Werte unter 10 %.

Konnte nach Inbetriebnahme der Testgasquelle mittels gravimetrischer Kontrolle nach einigen Tagen eine lineare Massenabnahme mit der Zeit beobachtet werden, so befand sich die Testgasquelle im Gleichgewicht und konnte für die Herstellung externer Standards eingesetzt werden. Zur Bestimmung von Kalibrierreihen wurden 8 bis 10 Proben mit unterschiedlichen Konzentrationen aus der Mischkammer entnommen. Die Proben wurden stets beginnend mit niedrigen Konzentrationen in aufsteigender Reihenfolge gezogen. Für bessere Vergleichbarkeit wurden alle Proben einer Kalibrierreihe an einem Tag gemessen. Die Daten einer Kalibrierung sind unter Berücksichtigung der für die Auswertung verwendeten Masse/Ladungsverhältnissen ( $m/z$ ) in Tabelle 4 aufgeführt.

Tabelle 4 Daten einer Kalibrierung mittels Testgasquelle

<b>Analyt</b>	<b><math>m/z</math></b>	<b>Steigung</b>	<b>Achsenabschnitt</b>	<b>Bestimmtheitsmaß</b>
Ethanol	45	0,41	-14623,29	0,994
Aceton	43	0,09	-3207,22	0,996
Aceton	58	0,16	1484,89	0,996
Isopren	53	0,10	2457,06	0,996
Isopren	67	0,05	1660,91	0,996
2-Propanol	45	0,05	8,85	0,998
1-Propanol	59	0,24	7572,01	0,998
Benzol	78	0,03	6477,00	0,996
2-Pentanon	43	0,05	18982,17	0,998
2-Pentanon	86	0,17	21656,24	0,997
DMDS	45	0,25	4543,36	0,994
DMDS	94	0,07	5252,06	0,986
Toluol	91	0,03	5415,36	0,993
$\alpha$ -Pinen	93	0,16	617,05	0,996
$\beta$ -Pinen	93	0,18	1214,85	0,976
Limonen	68	0,35	152,94	0,985

Mit Hilfe der Auswertungssoftware (siehe Kap. 5.4.1) werden die Peakflächen der Analyte bei charakteristischen Masse/Ladungsverhältnissen  $m/z$  integriert. Trägt man die erhaltenen Peakflächen gegen die zuvor berechneten absoluten Analytmengen bzw. Analytkonzentrationen auf, so ergibt sich für jeden Analyt in einem bestimmten Konzentrationsbereich ein individuelles, lineares Verhältnis zwischen beiden Parametern. Dieses ermöglicht die direkte Konzentrationsbestimmung einer unbekannten Probe über die Peakfläche des Analytsignals. Die linearen Bereiche, in denen diese Art der Kalibrierung mittels externer Standards verwendet werden kann, sind in Tabelle 5 aufgeführt.

Für die quantitative Auswertung von Atemluftproben, wenn sie mit einem T-Röhrchen genommen würden, ist die oben beschriebene Kalibrierung nicht geeignet. Die Probenahmebedingungen sind in diesem Fall nicht mehr vergleichbar. Die Probenahme aus der Testgasquelle muss daher ebenfalls unter Verwendung eines Molekularsiebs durchgeführt werden. Bei der Untersuchung so genommener Standardgasproben konnten unter Standardbedingungen auf dem Adsorptionsrohr nur Spuren von Toluol und größere Mengen Benzol nachgewiesen werden. Schon bei der Auswahl eines geeigneten Probenahmeverfahrens für Atemluft wurde ein deutlicher Analytverlust bei der Verwendung eines T-Röhrchens beobachtet. Es kam jedoch zur Anreicherung einiger Analyte auf dem Adsorbens. Diese Beobachtung legte nahe, dass die Konzentrationen der Analyte in der Atemluft soviel höher sind, dass die Adsorptionskapazität des Molekularsiebs überschritten wird und die Substanzen durch das Trockenmittel durchbrechen können. Außerdem sind die Bedingungen der Testgasquelle dem menschlichen Atem noch nicht ähnlich genug. Beim Ausatmen kommt es durch den Temperaturgradienten zwischen Raumluft und Atemluft zur Kondensation. Das gebildete Kondensat gelang durch den Gasstrom auf das Molekularsieb. Dort wird durch den Adsorptionsprozess eine deutliche Reaktionswärme freigesetzt. Messungen ergaben eine punktuelle Erwärmung um ca. 20 °C. Diese hat wahrscheinlich einen deutlichen Einfluss auf die Gleichgewichtseinstellung innerhalb des T-Röhrchens. Wasser kann durch eine so geringe Temperaturerhöhung nicht vom Molekularsieb entfernt werden. Nach Herstellerangaben werden zur Trocknung des Molekularsiebs Temperaturen zwischen 200 °C und 500 °C empfohlen. Leichtflüchtige organische Verbindungen hingegen werden offenbar, zumindest teilweise, wieder vom Molekularsieb desorbiert oder adsorbieren gar nicht erst. Dieser Vorgang findet in der Testgasquelle nicht statt. Da das gesamte System auf Raumtemperatur gehalten wird, kondensiert der Wasseranteil des Stickstoffs nicht aus. Entsprechend wird im T-Röhrchen keine Temperaturerhöhung festgestellt. Eine Anpassung der Testgasquelle und des zugehörigen Mischsystems an die Beschaffenheit einer Atemluftprobe ist mit einigen Schwierigkeiten verbunden. Bei Temperaturerhöhung der Testgasquelle würde die Lebensdauer der Diffusionsgefäße aufgrund der Flüchtigkeit ihrer Analyte stark verkürzt. Über die Testgasquelle hinaus müssten auch alle anderen Bestandteile des Aufbaus (siehe Abbildung 6) gleichmäßig temperiert sein, um eine Kondensation an kälteren Stellen zu vermeiden. Erst im Bereich des T-Röhrchens dürfte Raumtemperatur herrschen, um dort gezielte Kondensation zu bewirken.

Die Erstellung einer Kalibrierung bei Probenahme mit T-Röhrchen war unter gegebenen Bedingungen nur in einem deutlich höheren Massenbereich (1000 ng bis 1600 ng Analyt) möglich. Die Analytmasse der Proben war damit um mehr als 10 mal höher als bei der Probenahme ohne T-Röhrchen.

Der Vergleich der Probenahme mit und ohne T-Röhrchen wird am Beispiel des 1-Propanol in Abbildung 7 verdeutlicht. In der Graphik wurde eine Kalibrier-

reihe bei Probenahme mit T-Röhrchen (obere Gerade) und ohne T-Röhrchen (untere Gerade) aufgetragen.

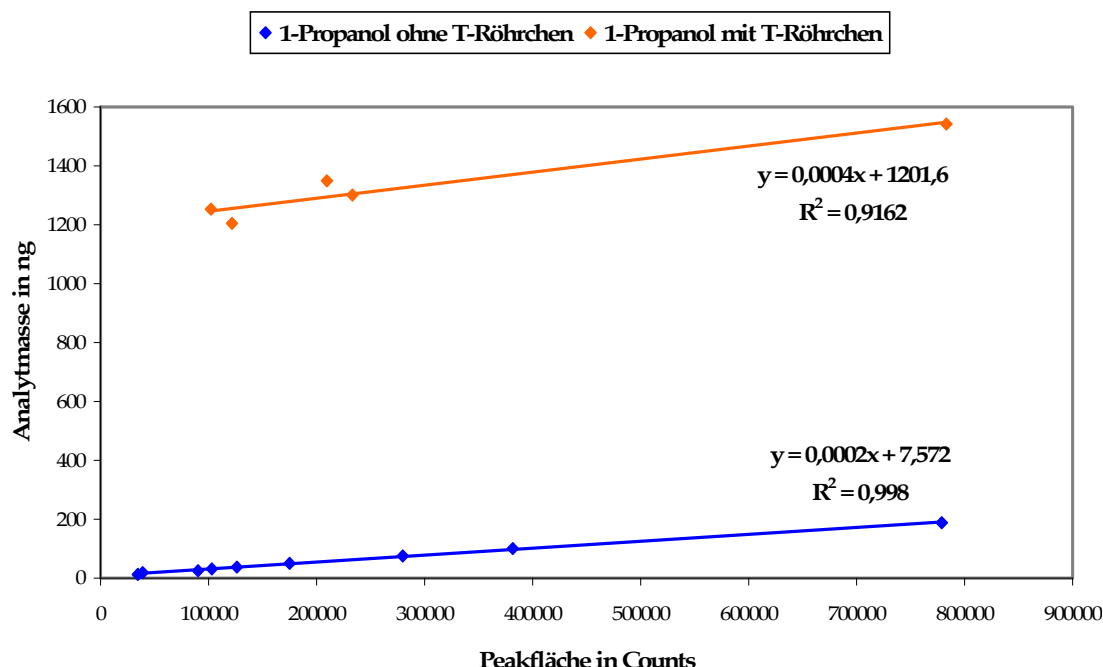


Abbildung 7 Vergleich einer Kalibrierreihe bei Probenahme mit T-Röhrchen (oben) und ohne T-Röhrchen (unten)

Der Verlauf der einzelnen Geraden zeigt, dass in beiden Fällen ein linearer Zusammenhang zwischen Konzentration und Peakfläche eines Analyts besteht. Bei der Verwendung eines T-Röhrchens schwanken die Werte jedoch mehr, d.h. die Kalibrierung ist ungenauer. Der parallele Verlauf beider Geraden deutet darauf hin, dass im betrachteten Bereich keine konzentrationsabhängigen Analytverluste vorkommen. Ein Vergleich der Peakflächen beider Geraden zeigt, dass diese in der gleichen Größenordnung liegen. Die Wiederfindungsrate bei Probenahme mit T-Röhrchen beträgt entsprechend unter 10 %, d.h. 90 % der Analyte gehen durch Adsorption auf einem trockenen T-Röhrchen verloren.

## 2.2 Nachweisgrenzen, linearer Bereich, Reproduzierbarkeit

Die Nachweisgrenzen (NWG) der entwickelten TD/GC/MS-Methode wurden mit Hilfe von Standardgasproben für alle Analyte der Testgasquelle bestimmt. Zur Bestimmung der Nachweisgrenze in der Chromatographie gilt ein Signal/Rausch-Verhältnis von 3:1. Die Messungen aller Proben wurden im *full scan mode* durchgeführt. Dieser Modus ermöglicht eine nachträgliche Absicherung der Identifizierung über den gesamten vermessenen Massenbereich. Diese nachträg-

liche Absicherung ist deshalb so wichtig, weil jede Probe nur einmal gemessen werden kann. Alle Informationen über eine Probe müssen später dieser Messung entnommen werden können. Die Nachweisgrenzen und linearen Bereiche beziehen sich auf die Absolutmengen auf dem Adsorbens (Tabelle 5).

Tabelle 5 Nachweisgrenze (NWG) mit relativer Standardabweichung (RSD) und linearer Bereich von Standardgasproben für Messung im Scan Modus

Analyt	NWG in ng	RSD in % (n=5)	linearer Bereich in ng
Ethanol	14	16	14 - 109
Aceton	7	13	10 - 103
Isopren	<< 19	28	19 - 96
2-Propanol	2	11	2 - 22
1-Propanol	13	7	13 - 188
Benzol	<< 14	9	14 - 206
2-Pentanon	19	6	19 - 289
DMDS	9	1*	9 - 36
Toluol	5	7	5 - 72
$\alpha$ -Pinen	2	18	2 - 11
$\beta$ -Pinen	3	9	3 - 13
Limonen	2	14	2 - 4
* bei Konzentration Faktor 40 höher als in anderen Proben			

Auf der Basis einer gesicherten Identifizierung der Analyte durch Messung im *full scan mode* können weitere Auswertungen im SIM-Modus vorgenommen werden. Dieser ist um den Faktor 10 bis 100 empfindlicher als der *full scan mode*. Dies bedeutet auch, dass alle oben aufgeführten Nachweisgrenzen im SIM-Modus oberhalb der Bestimmungsgrenze, d.h. oberhalb eines Signal/Rausch-Verhältnisses von 10:1, liegen. Somit ist auch die Möglichkeit einer quantitativen Auswertung im oben genannten linearen Bereich gegeben.

Die Reproduzierbarkeit von mehreren Proben eines Probanden ist schwer zu bestimmen, auch wenn man sich bemüht, die Probenahmebedingungen so ähnlich wie möglich zu halten. Ein selbsttätig atmender Proband ist nicht in der Lage, mehrfach hintereinander die gleiche Probe abzugeben. Für das Volumen von 1 L muss mehrmals durch die Nase ein und auf das Adsorbens ausgeatmet werden. Dabei ist sowohl die Zahl der Atemintervalle als auch die Tiefe der Atemzüge unterschiedlich. Außerdem können die Proben nur nacheinander genommen werden, was ebenfalls zu minimalen Unterschieden führen kann.

Insgesamt ist damit jede Probe einzigartig. Dadurch ist es schwierig, die Vergleichbarkeit der Methode für reale Proben zu bestimmen.

In Abbildung 8 ist eine Mehrfachbestimmung der Atemluft eines Probanden dargestellt. Die Proben wurden unmittelbar hintereinander unter vergleichbaren Bedingungen genommen, jeweils zwei mit und ohne T-Röhrchen. Die Abweichung der Konzentration lag für die ausgewählten Analyte in einem Bereich zwischen 1 % und 30 %. Für Limonen und  $\beta$ -Pinen kam eine Abweichung bis zu 50 % vor, die jedoch nicht verwunderlich ist, da die Konzentrationen nahe der Nachweisgrenze lagen. Damit liegt die Reproduzierbarkeit der Analyse von Atemluftproben in einem akzeptablen Rahmen. Die Probenahme- und Analysemethode ermöglicht also bei vergleichbaren Bedingungen einen guten Vergleich unterschiedlicher Proben.

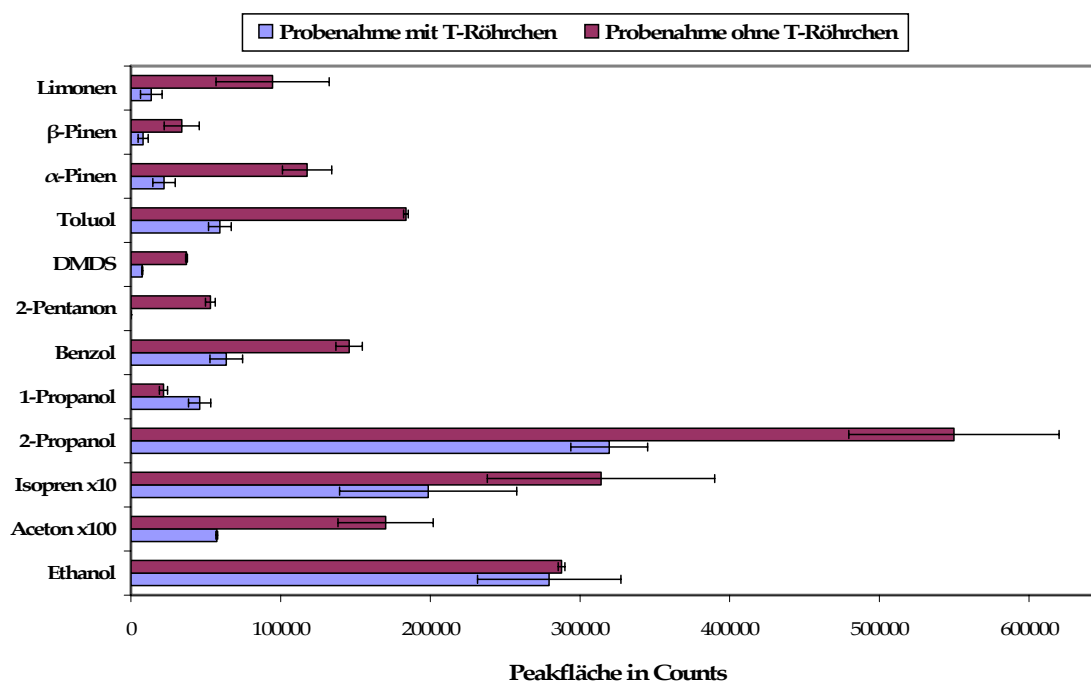


Abbildung 8 Standardabweichungen der Analyte bei Realproben

## 2.3 Applikation auf Realproben

### 2.3.1 Charakterisierung einer „gewöhnlichen“ Atemluft

Die entwickelte Methode wurde nun für die Untersuchung und Charakterisierung der Atemluft gesunder Probanden eingesetzt. In dem untersuchten Probenahmevolumen von 1 L wurden zahlreiche, unterschiedliche Analyte identifiziert. Abbildung 9 zeigt einen Ausschnitt aus dem unauffälligen Chromatogramm eines Nichtraucher. Bei den gewählten Analysebedingungen liegen alle Peaks im Bereich zwischen 1 min und 21 min. Sie unterscheiden sich deutlich in ihren Intensitäten.

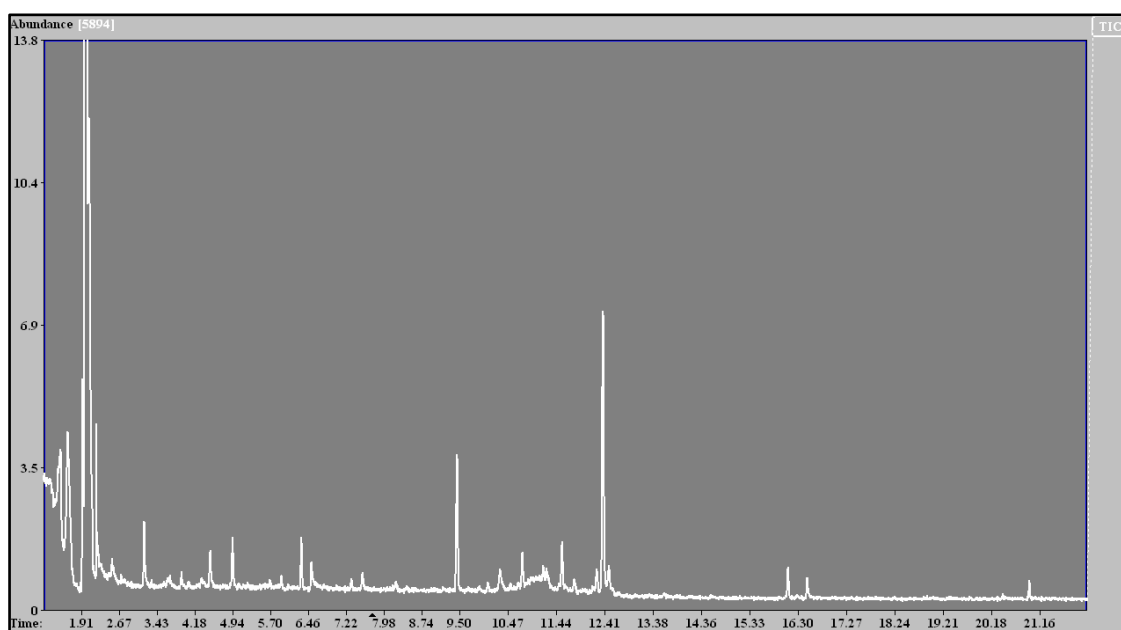


Abbildung 9 Chromatogrammausschnitt aus der 1 L Atemluftprobe eines Nichtrauchers

In der dargestellten Probe wurden 40 verschiedene Analyte identifiziert. Sie sind in Tabelle 6 zusammengefasst. Nur 10 dieser Verbindungen wurden auch in einer zeitnah genommenen Raumluftprobe gefunden. Ihre Konzentration in der Raumluft war teilweise deutlich kleiner als in der Atemluft, was den großen endogenen Anteil auch dieser Analyte bestätigt. Die anderen Verbindungen konnten in der Raumluft nicht gefunden werden, d.h. sie waren ausschließlich in der Atemluft des Probanden enthalten. Somit stammen mindestens 75 % der Verbindungen in der untersuchten Probe aus endogenen Quellen.

Tabelle 6 Analyte in 1 L Atemluft eines gesunden Probanden und Auftreten der Analyte in der Raumluft

RT in min	Analyt	Konzentration in ng/L	in RL
1,64	Kohlendioxid	n.q.	-
1,94	Ethanol	130	-
1,98	Aceton	520	x
2,02	Isopren	90	-
2,06	2-Propanol	23	Spuren
2,08	Dimethylsulfid	n.q.	-
2,30	1-Propanol	12	-
2,53	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> (Hexan oder Methylpentan)	n.q.	-
2,55	2-Butanon	n.q.	-
2,72	C <sub>5</sub> H <sub>5</sub> N (Pyridin)	n.q.	-
3,17	Benzol	9	x
3,23	3-Methylhexan	n.q.	x
3,64	Allylsulfid	n.q.	-
3,68	Heptan	n.q.	-
3,70	C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> OS (Methylthioacetat)	n.q.	-
3,93	1-Methylthiopropen	n.q.	-
4,06	Methylcyclohexan	n.q.	-
4,08	1-Methylthio-1-propen (E oder Z)	n.q.	-
4,33	1-Methylthio-1-propen (E oder Z)	n.q.	-
4,50	Dimethyldisulfid	n.q.	-
4,95	Toluol	7	x
5,70	Octan	n.q.	-
5,93	Tetrachlorethylen	n.q.	x
6,33	Hexamethylcyclotrisiloxan	n.q.	x
6,53	Fluortrimethylsilan	n.q.	-
7,33	Ethylbenzol	n.q.	x
7,55	Xylol	n.q.	x
8,23	Xylol	n.q.	x
9,46	$\alpha$ -Pinen	14	-
9,90	Camphen	n.q.	-
10,07	C <sub>9</sub> H <sub>12</sub> (Propylbenzol)	n.q.	-
RL	Raumluft		
n.q.	nicht quantifiziert		

Tabelle 6 Analyte in 1 L Atemluft eines gesunden Probanden und Auftreten der Analyte in der Raumluft

RT in min	Analyt	Konzentration in ng/L	in RL
10,32	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O (Acetophenon)	n.q.	-
10,77	β-Pinen	n.q.	-
11,19	C <sub>8</sub> H <sub>18</sub> (2,2,4-Trimethylpentan)	n.q.	-
11,25	Monoterpen	n.q.	-
11,57	Octamethylcyclotetrasiloxan	n.q.	-
11,81	3-Caren	n.q.	-
12,26	Cymol	n.q.	-
12,39	D-Limonen	30	-
12,51	Eucalyptol	n.q.	-
16,11	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>4</sub> Si <sub>3</sub>	n.q.	-
16,49	Menthol	n.q.	-
20,95	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> ((+)-Longifolen oder Caryophyllen)	n.q.	-
RL	Raumluft		
n.q.	nicht quantifiziert		

Bei den identifizierten Analyten handelt es sich um Alkohole, Ketone, Schwefelverbindungen, gesättigte und ungesättigte Aliphate, Aromate, Siloxane, Stickstoffverbindungen und zahlreiche Terpene. Die Siloxane wurden durch das Analysesystem selbst eingetragen. Sie sind in jeder Probe zu finden und werden daher im weiteren nicht mehr diskutiert. Auch auf Kohlendioxid wird später nicht mehr näher eingegangen. In jeder realen Atemluftprobe muss dieser Analyt natürlich enthalten sein. Er wird jedoch nur in minimalen Mengen angereichert.

Ausgeatmete Luft besteht, wie schon in Tabelle 6 gezeigt, aus zwei Anteilen. Der endogene Anteil enthält Analyte, die im Körper durch Stoffwechselprozesse gebildet und über ein Gleichgewicht zwischen Blut und Atmung in die ausgeatmete Luft gelangen, sowie Stoffwechselprodukte der natürlichen Mund- und Rachenbakterienflora. Der exogene Anteil wird maßgeblich durch die eingeatmete Luft und minimal durch das Probenahmesystem beeinflusst. Das heißt gleichzeitig, dass bei einer starken Belastung der eingeatmeten Raumluft auch in der ausgeatmeten Probe mit einem breiteren Substanzspektrum bzw. höheren Analytkonzentrationen zu rechnen ist. Da für die Charakterisierung der Atemluft jedoch nur körpereigene und nicht von außen zugefügte gasförmige Analyte interessieren, gilt es, eine Abschätzung über die Zusammensetzung und Größe des exogenen Anteils ausgeatmeter Luft zu treffen. Für diese Bilanz wurden in der Literatur zwei grundlegende Techniken verwendet [18]. Bei der einen wird

möglichst zeitnah zur Probenahme ein äquivalentes Volumen der Raumluft gesammelt und analysiert. Die Konzentration (hier Peakfläche) der Analyte in der Raumluftprobe wird dann von der jeweiligen Konzentration in der Atemluftprobe subtrahiert. Bei der anderen Technik wird durch künstliche Beatmung der exogene Teil präventiv ausgeschlossen. Der Proband muss in diesem Fall eine geschlossene Maske über der Nase tragen, durch die über ein Ventil ausgeatmet werden kann. Zur Beatmung wird hochreine, synthetische Luft verwendet, deren relative Feuchtigkeit auf ca. 50 % eingestellt ist. Die Maske wie auch der Luftbefeuchter sind in Abbildung 10 dargestellt. Bei beiden Techniken geht der Probenahme eine 15minütige Equilibrierzeit mit der Raumluft bzw. der synthetischen Luft voraus.

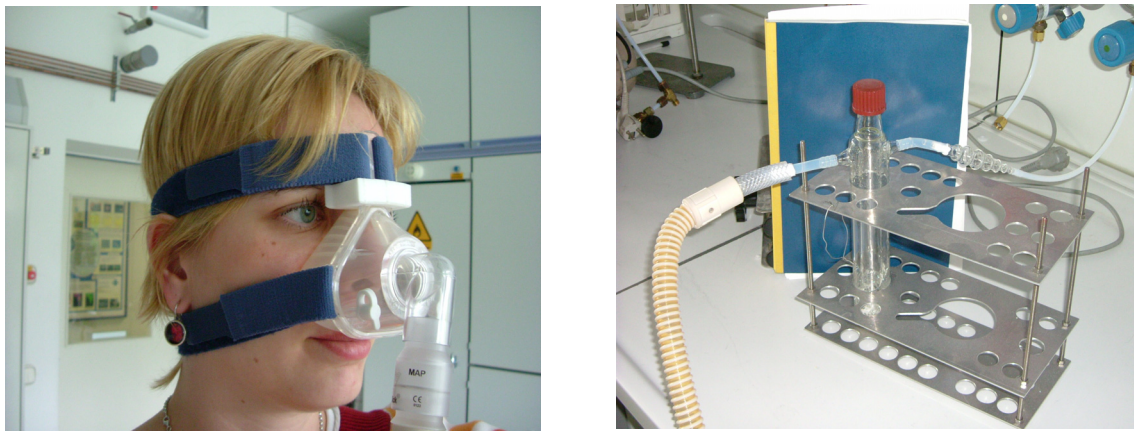


Abbildung 10 Probenahme mit Maske (links); Befeuchtungseinheit für synthetische Luft (rechts)

In Raumluft wie auch in Atemluft wurden 10 Analyte ausgewertet. Diese kommen standardmäßig in ausgeatmeter Luft vor. Sie liegen außerdem in einem Konzentrationsbereich, der gut ausgewertet werden kann. Abbildung 11 zeigt die Peakflächen der ausgewählten Analyte für beide Techniken zur Minimierung des Raumluftanteils in Atemluft. Dabei sind bei der Subtraktionstechnik der Raumluftanteil und die Atemluftprobe auch noch einzeln dargestellt. In der zur Abbildung gehörenden Tabelle 7 wird darüber hinaus der prozentuale Beitrag der Raumluft zur Atemluft explizit aufgeführt. Ferner werden die Ergebnisse der Subtraktionstechnik gleich 100 % gesetzt und mit denen der Maskentechnik verglichen.

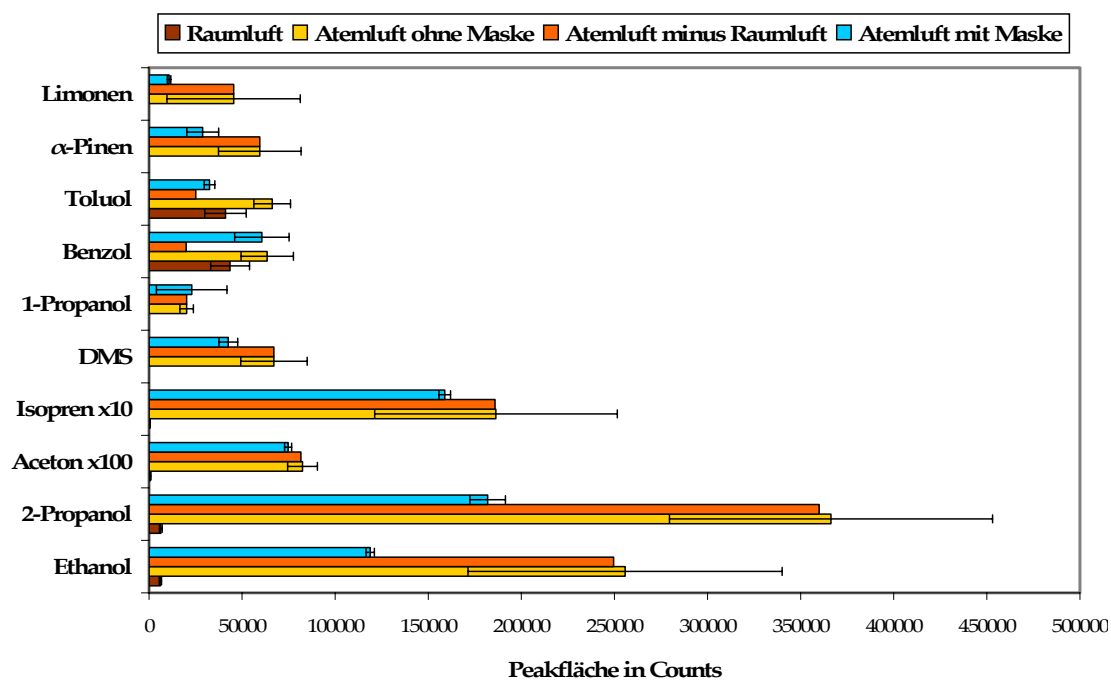


Abbildung 11 Raumluftanteil in ausgeatmeter Luft

Tabelle 7 Herkunft und Wiederfindung einiger Analyte der Atemluft

Analyt der Ausatemluft	Anteil in Raumluft in %	Anteil bei Beatmung mit synthetischer Luft in %
Ethanol	2	48
Aceton	2	92
Isopren	n.d.	51
2-Propanol	2	51
DMS	n.d.	63
1-Propanol	n.d.	114
Benzol	69	304
Toluol	62	129
α-Pinen	n.d.	48
Limonen	n.d.	24
n.d.	nicht detektierbar	

Abbildung 11 wie auch Tabelle 7 zeigen, dass mit Ausnahme von Benzol und Toluol alle Analyte zu sehr geringen Teilen in der Raumluft vorkommen. Ihr Anteil liegt zwischen 0 % und 2 % und ist damit kleiner als die natürliche Standardabweichung von Realproben. Benzol und Toluol sind im Vergleich zur Atemluft zu 60-70 % in Raumluft nachweisbar. Vergleicht man diese Ergebnisse mit den in Tabelle 6 ermittelten Konzentrationen, so liegen die Konzentrationen beider Analyte mit unter 5 ng/L in einem vergleichsweise niedrigen Bereich. Der direkte Vergleich der Subtraktions- und Masken-Technik zeigt, dass beide Verbindungen nicht allein aus der Raumluft stammen können. Werte von 304 % bzw. 129 % deuten auf einen Eintrag über das Beatmungssystem hin. Dies scheint auch für 1-Propanol zu gelten. Allerdings muss bei diesem Analyt zusätzlich berücksichtigt werden, dass die detektierten Peaks nahe der Bestimmungsgrenze lagen. Fehler durch das Integrieren der Peaks sind in diesem Fall weit eher zu erwarten als für Benzol und Toluol.

Allein die Wiederfindung von Aceton ist im Rahmen der Messgenauigkeit bei beiden Techniken vergleichbar. Ethanol, Isopren, 2-Propanol, Dimethylsulfid (DMS),  $\alpha$ -Pinen und Limonen werden bei der Beatmung mit synthetischer Luft zwischen 27 % und 76 % weniger nachgewiesen. Dieser Konzentrationsunterschied deutet darauf hin, dass die Intensität der ausgeatmeten Luft bei der Beatmung über die Maske deutlich niedriger ist. Die ungewohnte Atemtechnik erschwert ein gleichmäßiges und tiefes Ausatmen. Dadurch werden kleinere Anteile endexpiratorischer Luftschichten auf dem Adsorbens angereichert.

Zusammen mit der Tatsache, dass es zu einem Analyteintrag durch die synthetische Luft (auch in der Literatur bereits beschrieben [18]) bzw. durch die Beatmungsapparatur kommt, ist die Masken-Technik in der hier verwendeten Form nicht einsetzbar. Zudem würde die Praktikabilität dieser Technik durch ein aufwändiges Verfahren zur Reinigung und Desinfizierung der gesamten Beatmungsapparatur erschwert.

Bei Verwendung der Subtraktionsmethode für die hier ausgewerteten Analyte ist eine Korrektur durch den Raumluftanteil vernachlässigbar. Die Konzentrationen liegen im Rahmen der normalen Schwankungsbreite realer Atemluftproben. Eine Vernachlässigung des Raumluftanteils ist in diesem Fall grundsätzlich vertretbar, nicht zuletzt weil so der Analyseaufwand auf die Hälfte der Zeit (1 Stunde) begrenzt bleiben kann. Zur Überprüfung außergewöhnlicher Belastungen der Raumluft am Ort der Probenahme wurden regelmäßig Stichproben genommen. Ferner wurde während der Equilibrier- und Probenahmezeit auf stabile Bedingungen geachtet. Luftaustausch und Belastung der Raumluft wurde so weit wie möglich unterbunden.

Für eine genauere Charakterisierung der Atemluft eines gesunden Probanden folgten Versuche, in denen die Verhältnisse einzelner Analyte relativ zueinander untersucht werden sollten. Diese Intensitätsverhältnisse sind unabhängig von der Probenahme, d.h. sie sind relativ stabil. Als Analyte wurden die Standard-Verbindungen der Testgasquelle ausgewählt, allerdings mit Ausnahme von Dimethyldisulfid und Limonen. Die Analyte 1-Propanol, Benzol, Toluol und  $\alpha$ -Pinen spielen mit einem Anteil an der Gesamtbilanz von insgesamt weniger als 2 % eine eher untergeordnete Rolle.

Die in Abbildung 12 dargestellten Proben wurden an drei unterschiedlichen Tagen von demselben Probanden genommen. Die äußeren Bedingungen waren jeweils vergleichbar. Der einzige Unterschied war, dass drei Proben (Probe 1; 5; 6) ohne vorherige Nahrungsaufnahme, die anderen drei Proben (Probe 2; 3; 4) nach Nahrungsaufnahme (mindestens 1 Stunde vor der Probenahme) genommen wurden. Die zugehörigen prozentualen Angaben zu Abbildung 12 sind in Tabelle 8 zusammengefasst. Die Bilanz einer Probe, d.h. hier 100 %, bezieht sich dabei auf die Summe der einzelnen Peakflächen der 8 ausgewerteten Analyte.

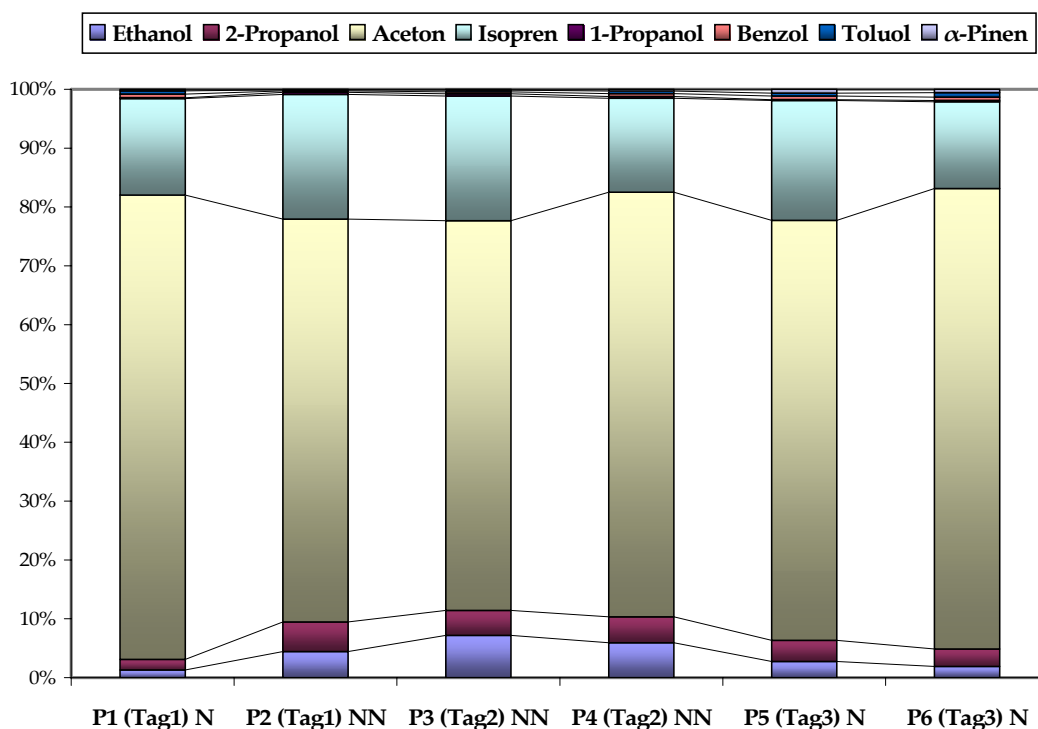


Abbildung 12 Analytverhältnisse verschiedener Proben P eines Probanden an drei Tagen (zwei Proben pro Tag); N=nüchtern; NN=nicht nüchtern

Tabelle 8 Prozentuale Intensitätsverhältnisse ausgesuchter Analyte in unterschiedlichen Proben eines Probanden (3 Probenahmetage)

Analyt	P 1, n in %	P 2, nn in %	P 3, nn in %	P 4, nn in %	P 5, n in %	P 6, n in %
Ethanol	1,31	4,42	7,18	5,92	2,73	1,91
2-Propanol	1,77	5,04	4,23	4,42	3,60	2,95
Aceton	78,93	68,47	66,24	72,17	71,39	78,27
Isopren	16,43	21,20	21,18	15,96	20,37	14,76
1-Propanol	0,12	0,35	0,38	0,30	0,13	0,21
Benzol	0,63	0,25	0,33	0,51	0,62	0,57
Toluol	0,53	0,18	0,31	0,40	0,50	0,77
$\alpha$ -Pinen	0,29	0,08	0,14	0,32	0,65	0,57
<b>P</b>	<b>Probe</b>					
<b>n</b>	<b>nüchtern</b>					
<b>nn</b>	<b>nicht nüchtern</b>					

Den größten Anteil an der Gesamtbilanz macht in allen Proben Aceton aus. Mit einer Variation der Werte zwischen 66,2 % und 78,9 % zeigt dieser Analyt zugleich die niedrigste Standardabweichung von 7 %. Die größten Unterschiede ergeben sich durch den Ernährungszustand vor der Probenahme. Maximale Werte wurden jeweils bei Probenahme des nüchternen Probanden (Probe 1; 6) gefunden. Besonders deutlich wird der Unterschied im Vergleich von Probe 1 mit Probe 2, die an einem Tag, also unter ansonsten vergleichbaren Bedingungen genommen wurden.

Den zweitgrößten Anteil macht Isopren aus. Mit Werten zwischen 16,0 % und 21,2 % liegt die Standardabweichung für diesen Analyten bei 16 %. Eine eindeutige Tendenz für die Wiederfindung in Abhängigkeit des Ernährungszustandes kann in diesem Fall nicht beobachtet werden. Sowohl bei einheitlichen als auch bei verschiedenen Bedingungen liegen beide Proben eines Tages in unterschiedlichen Wertebereichen.

Die gemittelten Anteile von 2-Propanol und Ethanol an der Gesamtbilanz liegen bei ca. 4 %. Für beide Verbindungen wird ein deutlicher Unterschied in Abhängigkeit der Nahrungsaufnahme offensichtlich. Dieser ist für Ethanol stärker ausgeprägt als für 2-Propanol, wie die Standardabweichung von 60 % gegenüber 32 % zeigt. Beide Verbindungen werden, unabhängig vom Tag der Probenahme, im nüchternen Zustand zu deutlich geringeren Teilen nachgewiesen. Insbesondere bei Ethanol sind jedoch auch bei gleichen Bedingungen, d.h. am gleichen Tag, noch deutliche Konzentrationsunterschiede von rund 20 % zu beobachten.

Die Analyte 1-Propanol, Benzol, Toluol und  $\alpha$ -Pinen zeigen aufgrund niedriger Konzentrationen, d.h. kleiner Beiträge zur Gesamtbilanz, relativ große Standardabweichungen von 32 % bis 67 %. 1-Propanol wird tendenziell in größeren Mengen nach Nahrungsaufnahme gefunden, die anderen drei Analyte ohne vorherige Nahrungsaufnahme.

Nach der Analyse verschiedener Proben eines gesunden Probanden wurde die Veränderung der Atemluft desselben Probanden im Verlauf eines Tages untersucht. Für eine gute Vergleichbarkeit wurden dieselben Analyte wie vorher ausgewertet. Auch das Vorgehen bei der Auswertung war analog zur vorherigen Versuchsreihe. Entsprechend wurde die Gesamtbilanz aller Analyte (100 %) durch die Summation aller Peakflächen erhalten. In der Probenahmezeit zwischen 8:35 Uhr und 17:00 Uhr wurden 10 Proben genommen. Die Mahlzeiten wurden zwischen 8:50 Uhr und 10:00 Uhr (Frühstück) und zwischen 12:00 Uhr und 13:00 Uhr (Mittagessen) eingenommen, dabei wurde eine Zeit von 45 min zwischen Nahrungsaufnahme und Probenahme eingehalten.

Die Analyte 1-Propanol, Benzol, Toluol und  $\alpha$ -Pinen tragen auch beim Tagesgang mit weniger als 2 % zum Intensitätsverhältnis bei. Sie sind somit in deutlich kleineren Konzentrationen in der ausgeatmeten Luft enthalten als die vier anderen Verbindungen. Die Standardabweichungen um einen über den ganzen Tag gemittelten Wert liegen bei 69 % (1-Propanol), 39 % (Benzol), 22 % (Toluol) und 64 % ( $\alpha$ -Pinen). Toluol zeigt in Anbetracht niedriger Konzentrationen erstaunlich niedrige Schwankungen.

Toluol und Benzol wurden morgens zu größeren Anteilen als nachmittags gefunden. Beide Analyte stammen, wie bereits früher festgestellt, zu großen Teilen aus exogenen Quellen. Sie können über die Umgebungsluft aufgenommen worden sein. Maximale Werte am Morgen und eine Abnahme im Verlauf des Tages sind Hinweis auf einen langsamen Abbau der Substanzen im Körper. Dieser ist nicht zwangsläufig kontinuierlich, da über die Raumluft wieder geringe Analytkonzentrationen eingeatmet werden können. Grundsätzlich sind höhere Werte am Morgen sinnvoll, da der Proband auf dem Weg zur Dienststelle bzw. Probenahme deutlich höheren anthropogenen und biogenen Belastungen ausgesetzt ist als später im Dienstgebäude.

Auch für  $\alpha$ -Pinen ist ein Eintrag über die Umgebungsluft in die Atemluft, insbesondere außerhalb geschlossener Räume, denkbar. Terpene wie  $\alpha$ -Pinen,  $\beta$ -Pinen und Limonen werden von vielen Pflanzen, Nadelhölzern und Blumen emittiert [88]. Im Rahmen atmosphärischer Fragestellungen wurde die Freisetzung dieser Substanzgruppe bereits untersucht und beschrieben [83, 89]. Insbesondere  $\alpha$ -Pinen konnte in vergleichsweise hohen Konzentrationen in der Luft nachgewiesen werden, besonders in der unmittelbaren Umgebung von Waldgebieten. Das erklärt, warum über die Atmung nur geringste Mengen anderer Vertreter dieser Substanzgruppe aufgenommen und nachgewiesen wurden.

Isopren zeigt von allen Verbindungen mit einer Standardabweichung von 13 % die geringsten Abweichungen von einem Tagesmittelwert (siehe Abbildung 13). Auch in der Bilanzierung verhält sich Isopren vergleichsweise konstant. Daraus folgt, dass sich diese Verbindung relativ unabhängig von äußeren Einflüssen verhält. Ähnliche Beobachtungen wurden für 2-Propanol gemacht. Die prozentualen Anteile variieren mit einer Standardabweichung von 25 % vom Tagesmittelwert. Maxima und Minima folgen keinem erkennbaren Muster. Beeinflussung der ausgeatmeten Luft durch Nahrungsaufnahme oder eingeatmete Luft kann nicht beobachtet werden.

Im Rahmen des relativen Vergleichs mit den anderen untersuchten Verbindungen zeigt Aceton die konstanteste Konzentration. Die Standardabweichung beträgt für den Tagesgang nur 9 %. Ein direkter Einfluss durch eingeatmete Luft kann nicht beobachtet werden. Dafür kommt es zu einem Einfluss durch den Ernährungszustand. Der in Abbildung 13 dargestellte Konzentrationsverlauf von Aceton (separate Achse beachten) zeigt Maxima direkt nach beiden Mahlzeiten. Diese sind durch Stoffwechselvorgänge zu erklären. Im Rahmen einer erhöhten Energieaufnahme durch Nahrung steigt der Stoffwechsel an. Aceton und andere Ketonkörper werden unter normalen Bedingungen täglich in Mengen von 10-30 g in der Leber gebildet. Sie dienen zur Regulierung der Oxidation des Acetyl-CoA in der Leber und als Energieversorger für das zentrale Nervensystem, die Muskeln, das Herz und die Nierenrinde [90]. Nahrungsaufnahme führt bei einem gesunden Metabolismus zur Freisetzung größerer Mengen von Ketonkörpern wie Aceton. Diese sind leicht wasserlöslich und somit unbeschränkt transportierbar. Sie werden über den Blutkreislauf transportiert und über die Atemluft und den Harn ausgeschieden.

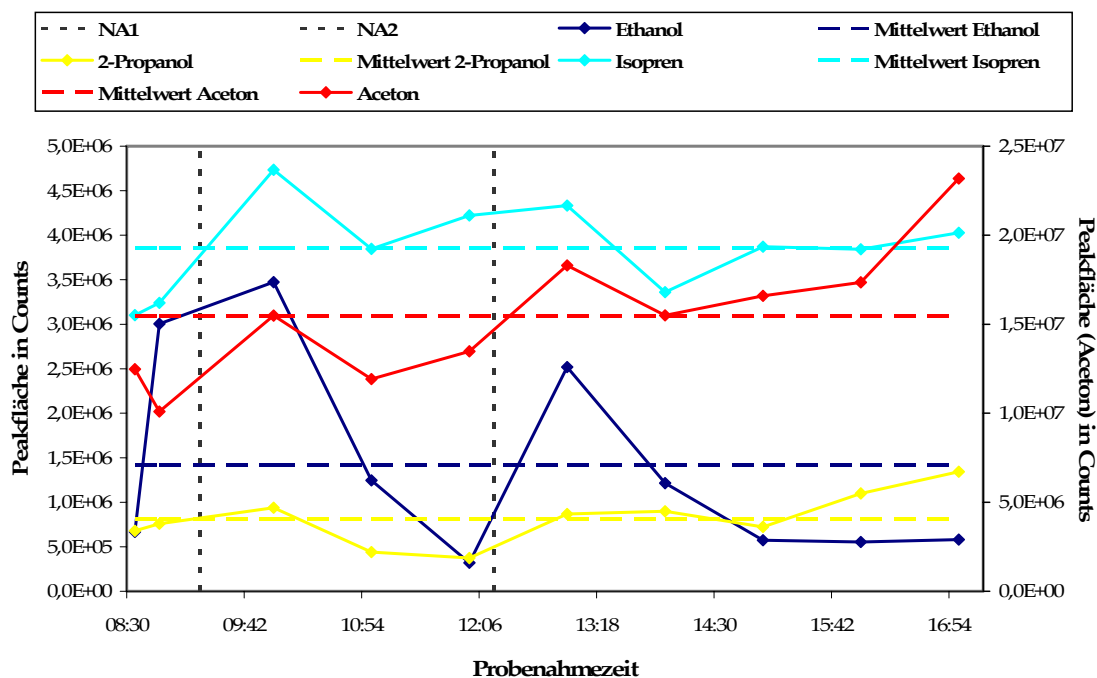


Abbildung 13 Konzentrationsverläufe ausgewählter Analyte im Verlauf eines Tages; NA=Nahrungsaufnahme

Auch im Vergleich der Intensitätsverhältnisse (Daten nicht gezeigt) zeigt Aceton deutliche Maxima. Diese liegen jedoch nicht direkt nach der Nahrungsaufnahme sondern bei Proben, die längere Zeit nach der letzten Nahrungsaufnahme genommen wurden. In diesem Fall war das morgens früh, ca. 10 Stunden nach der letzten Mahlzeit, und am späten Nachmittag, d.h. ca. 5 Stunden nach dem Mittagessen. Der Proband befand sich zu dieser Zeit in einem Hungerzustand. Dieser Zustand ist in der Literatur für Mäuse wie Menschen beschrieben [90-93]. Demnach kann es bei einem Mangel an Kohlenhydraten durch Hunger, Fasten oder auch durch Diabetes Mellitus zu einer Veränderung des Stoffwechsels kommen. In den genannten Fällen wird durch den Kohlenhydratmangel und den daraus resultierenden Glucosemangel eine vergleichsweise geringe Menge an Acetyl-CoA für den Citratcyclus bereitgestellt. Dieser Mangel wird durch die verstärkte Oxidation von Fettsäuren zu Acetyl-CoA ausgeglichen, die mit einer Ketonkörperbildung verbunden ist. In einem derart veränderten Stoffwechsel können über 100 g Ketonkörper gebildet werden. Durch Gleichgewichtseinstellung können entsprechend größere Mengen freigesetzt werden [90]. Der Analyt Aceton wird in einem späteren Kapitel weiter diskutiert.

Ethanol zeigt von allen untersuchten Verbindungen die größten Schwankungen. Dies gilt sowohl für die Abweichungen vom Tagesmittelwert (81 % Standardabweichung) als auch für die Intensitätsverhältnisse (82 % Standardabweichung).

Eine Beeinflussung des Ethanolgehalts der ausgeatmeten Luft durch eingeatmete Umgebungsluft kann nicht beobachtet werden. Eine Konzentrationsabnahme im Tagesverlauf wird nicht sichtbar. Die niedrigsten Ethanolwerte sind bei Proben, die lange nach der letzten Nahrungsaufnahme genommen wurden, sichtbar. Die Maxima können entsprechend bei Proben unmittelbar nach Nahrungsaufnahme beobachtet werden. Der sehr hohe Wert der 2. Probe (10 Uhr) lässt sich durch ein später noch diskutiertes Zusatzexperiment (Kap. 2.4.5) erklären. Insgesamt kann daher gefolgert werden, dass Nahrungsaufnahme zu einer erhöhten Produktion von Ethanol im Körper führt. Eine direkte Aufnahme über die konsumierte Nahrung oder Genussmittel kann dabei weitestgehend ausgeschlossen werden. Literaturangaben zufolge wird endogenes Ethanol wahrscheinlich von Darmbakterien produziert [17]. Diese zeigen nach Nahrungsaufnahme aufgrund des Verdauungsprozesses eine höhere Aktivität.

Die Charakterisierung der Atemluft eines einzelnen, gesunden Probanden ist für eine allgemein gültige Aussage zur Zusammensetzung und den zeitlichen Veränderungen der Atemluft nicht ausreichend. Für eine allgemein gültigere, genauere Charakterisierung folgte die Absicherung durch eine Kontrollgruppe.

### **2.3.2 Untersuchung einer Kontrollgruppe**

Zur Charakterisierung der „normalen“ Atemluft eines gesunden Probanden wurde eine Kontrollgruppe von 30 Personen untersucht. Alle Probanden waren nach eigenen Angaben gesund und nahmen keine Medikamente. Die Gruppe setzte sich aus 14 weiblichen Personen, davon 4 Raucherinnen und 16 männlichen Personen, davon 6 Raucher, zusammen. Das Durchschnittsalter lag bei den weiblichen Probanden bei  $34 \pm 11$  Jahren und bei den männlichen Probanden bei  $39 \pm 13$  Jahren. In Tabelle 9 ist die Verteilung der vorkommenden Analyte für die Gesamtheit der Gruppe dargestellt. Erst werden alle detektierten Analyte (aus allen Proben) aufgeführt, dann deren Vorkommen nach Geschlecht (W=weiblich; M=männlich) und Beitrag durch Raucher (WR bzw. MR) und in der letzten Spalte (GES) wird der Prozentsatz der Probanden (bezogen auf die gesamte Kontrollgruppe), bei denen die jeweilige Verbindung nachgewiesen werden konnte, dargestellt. Ergänzende Angaben über Alter und konkrete Analytverteilung können Tabelle 22 und Tabelle 23 im Anhang entnommen werden.

In der gesamten Kontrollgruppe wurden bei Probenahme von 1 L Atemluft 153 Verbindungen detektiert. Davon waren 9 Verbindungen, nämlich Ethanol, Aceton, Isopren, 2-Propanol, Dimethylsulfid (DMS), Benzol, Toluol,  $\alpha$ -Pinen und Limonen, in allen Proben enthalten. Sie sind somit als charakteristische Analyte „normaler“, ausgeatmeter Luft gesunder Probanden einzustufen. Weitere 8 Substanzen, nämlich 1-Propanol, Ethylbenzol, Xylol (2 Isomere), Ethylmethylbenzol,  $\beta$ -Pinen, Cymol und Eucalyptol, wurden in mehr als 70 % aller Proben gefunden. Auch diese Verbindungen sind somit in der Mehrzahl aller Proben zu

finden und können zu den charakteristischen Verbindungen in der Atemluft eines gesunden Probanden hinzugezählt werden. Insgesamt bilden damit die 17 oben genannten Verbindungen die Basis einer „gesunden“ Ausatemluft. Das heißt gleichzeitig aber auch, dass diese Analyte für die qualitative Detektion einer Abnormalität in ausgeatmeter Luft nicht zur Verfügung stehen. Möchte man mit ihrer Hilfe Unterschiede zwischen der Atemluft eines gesunden und eines kranken Probanden feststellen, so ist dies nur auf quantitativem Wege möglich. Und auch dann ist größte Vorsicht geboten, da einige Analyte (wie in Kap. 2.3.1 beschrieben) schon unter normalen Bedingungen im Verlauf eines Tages oder einer Probenahmeperiode deutlichen Schwankungen unterliegen.

Ein Vergleich der 17 charakteristischen Verbindungen mit der Anzahl zusätzlich auftretender Analyte zeigt, dass das Spektrum der Verbindungen stark variiert. Tabelle 9 verdeutlicht, dass viele Analyte nur in einzelnen Proben vorkommen. Sie erlauben somit keine statistische Aussage für die Gesamtheit der Kontrollgruppe oder bestimmter Untergruppen. Grundsätzlich haben sie jedoch das Potential, Veränderungen in der ausgeatmeten Luft anzuzeigen. Erst eine Verifizierung über eine größere Kontrollgruppe würde dann eine Zuordnung zu einer bestimmten Untergruppe (z.B. Alter, Geschlecht, körperlicher Zustand, etc.) erlauben.

Tabelle 9 Analyte einer Kontrollgruppe (n=30): nachgewiesen bei weiblichen ( $W_{\text{ges}}$ ) und männlichen ( $M_{\text{ges}}$ ) Probanden, davon Raucher (WR und MR) und Wiederfindung (GES) in der gesamten Kontrollgruppe

Analyt	$W_{\text{ges}}$	WR	$M_{\text{ges}}$	MR	GES in %
Oxalsäure	1	-	-	-	3
Butan	4	-	2	2	20
1-Buten	-	-	1	1	3
Acetaldehyd	-	-	2	2	7
Essigsäureanhydrid	1	1	-	-	3
2-Methylbutan	8	1	7	1	50
Ethanol	14	4	16	6	100
Aceton	14	4	16	6	100
Isopren	14	4	16	6	100
Isopropanol	14	4	16	6	100
$C_5H_{10}$	1	1	1	1	7
$C_6H_{14}O$ (1-Methoxypentan)	-	-	2	2	7
DMS	14	4	16	6	100
Methylacetat	1	1	7	-	27
$C_5H_6$ (1,3-Cyclopentadien)	3	3	5	5	27

Tabelle 9 Analyte einer Kontrollgruppe (n=30): nachgewiesen bei weiblichen ( $W_{ges}$ ) und männlichen ( $M_{ges}$ ) Probanden, davon Raucher (WR und MR) und Wiederfindung (GES) in der gesamten Kontrollgruppe

Analyt	$W_{ges}$	WR	$M_{ges}$	MR	GES in %
CS <sub>2</sub>	1	1	-	-	3
2-Methylpentan	-	-	1	-	3
1-Propanol	11	2	12	4	77
C <sub>3</sub> H <sub>4</sub> Cl <sub>2</sub>	1	-	-	-	3
C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> (1-Hexen)	-	-	1	1	3
2,3-Butandion	6	2	4	4	33
Hexan	-	-	2	1	7
Vinylacetat	-	-	2	-	7
C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>	1	-	-	-	3
2,2,3,3-Tetramethylbutan	-	-	1	1	3
2-Butanon	6	3	7	2	43
2-Methylfuran	3	3	5	5	27
C <sub>6</sub> H <sub>12</sub>	2	2	4	4	20
C <sub>5</sub> H <sub>6</sub> O (3-Methylfuran)	-	-	1	1	3
Chloroform	-	-	1	-	3
Ethylacetat	1	1	5	1	20
C <sub>6</sub> H <sub>12</sub>	-	-	1	1	3
Methylcyclopentan	-	-	5	1	17
C <sub>6</sub> H <sub>8</sub>	-	-	1	1	3
C <sub>6</sub> H <sub>10</sub>	-	-	3	3	10
C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>	1	-	-	-	3
C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> (Cyclohexadien)	3	3	1	1	13
C <sub>6</sub> H <sub>10</sub>	1	1	3	3	13
C <sub>6</sub> H <sub>8</sub>	-	-	5	5	17
C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> (Methylcyclopentadien)	4	4	4	4	27
C <sub>6</sub> H <sub>10</sub>	2	2	1	1	10
C <sub>6</sub> H <sub>8</sub>	1	1	-	-	3
C <sub>6</sub> H <sub>10</sub>	2	2	2	2	13
Cyclohexan	-	-	4	-	13
Benzol	14	4	16	6	100
2-Methylhexan	5	-	6	3	37
C <sub>6</sub> H <sub>8</sub>	2	2	1	1	10

Tabelle 9 Analyte einer Kontrollgruppe (n=30): nachgewiesen bei weiblichen ( $W_{\text{ges}}$ ) und männlichen ( $M_{\text{ges}}$ ) Probanden, davon Raucher (WR und MR) und Wiederfindung (GES) in der gesamten Kontrollgruppe

Analyt	$W_{\text{ges}}$	WR	$M_{\text{ges}}$	MR	GES in %
3-Methylhexan	2	1	6	3	27
Cyclohexen	1	1	-	-	3
2-Methyl-2-propenal	-	-	1	-	3
$C_7H_{14}$ (Dimethylcyclopentan)	-	-	2	2	7
$C_7H_{14}$ (Dimethylcyclopentan)	-	-	1	1	3
Heptanol	2	2	-	-	7
2-Pentanon	3	1	8	3	37
$C_4H_8S$	9	3	6	1	50
Heptan	6	3	13	5	63
$C_7H_{12}$	2	2	-	-	7
$C_7H_{14}$	2	2	-	-	7
2-Ethylfuran	1	1	-	-	3
2,5-Dimethylfuran	4	4	5	5	30
1-Methylthiopropen	8	1	10	3	60
$C_6H_{10}O$	-	-	1	1	3
Methylcyclohexan	1	-	7	2	27
1-Methylthio-1-propen	1	-	4	1	17
Propionsäure	-	-	1		3
Ethylcyclopentan	-	-	2	2	7
1-Methylthio-1-propen	5	1	6	1	37
$C_7H_{10}$	2	2	-	-	7
$C_8H_{18}$	1	-	-	-	3
DMDS	6	1	4	-	33
$C_7H_{10}$	1	1		-	3
$C_8H_{18}$	1	-	-	-	3
$C_7H_{10}$	1	1	-	-	3
$C_7H_{12}$	1	1	-	-	3
$C_7H_{10}$	1	1	-	-	3
$C_7H_{10}$	1	1	-	-	3
$C_7H_{10}$	1	1	-	-	3
2,5-Dimethylhexan	-	-	2	2	7
$C_8H_{18}$ (2-Methylheptan)	-	-	1	-	3
Toluol	14	4	16	6	100

Tabelle 9 Analyte einer Kontrollgruppe (n=30): nachgewiesen bei weiblichen ( $W_{ges}$ ) und männlichen ( $M_{ges}$ ) Probanden, davon Raucher (WR und MR) und Wiederfindung (GES) in der gesamten Kontrollgruppe

Analyt	$W_{ges}$	WR	$M_{ges}$	MR	GES in %
3-Methylheptan	-	-	2	1	7
Dimethylcyclohexan	-	-	4	3	13
Dimethylcyclohexan	-	-	4	3	13
Cyclohexanmethanol	-	-	1	1	3
$C_9H_{20}$	1	-	-	-	3
$C_8H_{16}$	1	1	2	2	10
$C_8H_{16}$ (Octen)	1	1	1	1	7
Paraldehyd	-	-	1	-	3
Dimethylcyclohexan	-	-	2	2	7
Octan	7	4	12	4	63
Dimethylcyclohexan	-	-	2	2	7
Tetrachlorethylen	5	1	8	1	43
$C_9H_{20}$	1	-	-	-	3
Essigsäurebutylester	-	-	2	2	7
2,3,4-Trimethylhexan	-	-	1	1	3
2-Methyloctan	-	-	1	1	3
Ethylcyclohexan	-	-	3	2	10
$C_9H_{20}$	-	-	1	1	3
1,1,3-Trimethylcyclohexan	-	-	2	1	7
$C_9H_{18}$	-	-	1	1	3
Trimethylcyclohexan	-	-	2	2	7
$C_9H_{18}$	-	-	1	1	3
Ethylbenzol	12	4	15	6	90
$C_9H_{20}$	-	-	1	1	3
Xylol	12	4	15	6	90
4-Heptanon	1	1	-	-	3
3-Buten-2-on	1	1	-	-	3
2-n-Butylfuran	1	1	-	-	3
$C_9H_{18}$	-	-	1	1	3
$C_4H_5NS$ (Allylisothiocyanat)	-	-	2	-	7
Styrol	3	3	-	-	10
Xylol	12	4	14	5	87
Nonan	3	1	10	2	43

Tabelle 9 Analyte einer Kontrollgruppe (n=30): nachgewiesen bei weiblichen ( $W_{\text{ges}}$ ) und männlichen ( $M_{\text{ges}}$ ) Probanden, davon Raucher (WR und MR) und Wiederfindung (GES) in der gesamten Kontrollgruppe

Analyt	$W_{\text{ges}}$	WR	$M_{\text{ges}}$	MR	GES in %
Bifuran	1	1	-	-	3
Tricyclen	-	-	1	-	3
$\alpha$ -Pinen	14	4	16	6	100
Camphen	1	1	3	1	13
Propylbenzol	1	1	4	-	17
$C_{10}H_{16}$ (Menthadien)	2	2	-	-	7
$C_9H_{12}$ (Ethylmethylbenzol)	12	4	10	2	73
$C_{10}H_{16}$ ( $\alpha$ -Phellandren)	1	1	-	-	3
$\beta$ -Pinen	13	3	16	5	97
Phenol	6	-	7	2	43
$C_{10}H_{16}$	-	-	1	1	3
$\beta$ -Myrcen	2	2	3	-	17
Trimethylbenzol	7	2	7	-	47
Carveol	1	1	-	-	3
3-Caren	1	1	6	1	23
Dichlorbenzol	-	-	2	1	7
$C_{10}H_{16}$	1	1	-	-	3
$C_{10}H_{16}$	1	1	-	-	3
$C_{10}H_{16}$ (Menthen)	1	1	-	-	3
Cymol	9	3	12	4	70
Limonen	14	4	16	6	100
2-Ethyl-1-hexanol	2	-	-	-	7
Sylvestren	1	1	-	-	3
Eucalyptol	11	3	16	6	90
Indan	-	-	1	-	3
$C_{10}H_{16}$	1	1	-	-	3
$C_{10}H_{16}$	1	1	-	-	3
$C_9H_{18}O$	1	-	-	-	3
$C_9H_{18}O$	1	-	-	-	3
$\gamma$ -Terpinen	2	1	5	1	23
Acetophenon	-	-	1	-	3
$C_{10}H_{12}$ (Dimethylstyrol)	-	-	1	1	3
$C_{11}H_{24}$ (Undecan)	1	1	-	-	3

Tabelle 9 Analyte einer Kontrollgruppe (n=30): nachgewiesen bei weiblichen ( $W_{ges}$ ) und männlichen ( $M_{ges}$ ) Probanden, davon Raucher (WR und MR) und Wiederfindung (GES) in der gesamten Kontrollgruppe

Analyt	$W_{ges}$	WR	$M_{ges}$	MR	GES in %
Nonanal	1	1	-	-	3
Menthon	1	-	1	-	7
Menthofuran	2	1	1	-	10
Menthol	4	2	5	-	30
Decanal	1	1	-	-	3
Caran	1	1	-	-	3
Caryophyllen	2	1	5	1	23

Bei einem Vergleich der Anzahl der Analyte pro Probe fällt die große Zahl unterschiedlicher Verbindungen in den Proben von Rauchern im Vergleich zu Nichtrauchern auf. Allein 80 der 153 Verbindungen wurden ausschließlich in Proben von Rauchern gefunden. Dabei ist anzumerken, dass keiner der Probanden in der Stunde unmittelbar vor der Probenahme geraucht hatte. Viele Verbindungen waren Strukturisomere, die nicht eindeutig durch das Massenspektrum, wohl aber über die Retentionszeit unterschieden werden konnten. Aus diesem Grund sind häufig nur die Summenformeln angegeben. Bei anderen Verbindungen musste auf die Angabe der genauen Position und räumlichen Anordnung funktioneller Gruppen verzichtet werden. Besonders häufig kommen Verbindungen mit einem  $C_6$ - bis  $C_9$ - Gerüst vor, von denen viele cyclisch aufgebaut sind. Auch zahlreiche Monoterpene ( $C_{10}H_{16}$ ) stammen offensichtlich aus dem Tabak bzw. seinen Stoffwechselprodukten. Nur wenige der bei Rauchern zusätzlich auftretenden Verbindungen sind bei nahezu allen Rauchern zu finden. Zu ihnen gehören  $C_5H_6$  (vermutlich Cyclopentadien), 2-Methylfuran,  $C_6H_8$  (vermutlich Methylcyclopentadien oder Cyclohexadien) und 2,5-Dimethylfuran. In vielen Proben der Raucher wurden außerdem  $C_6H_8$ ,  $C_6H_{10}$ ,  $C_6H_{12}$ , Styrol und Camphen gefunden. Bei der Analyse einer unbekannten Probe kann somit allein durch die Anzahl vorkommender Verbindungen ein Hinweis erhalten werden, ob es sich um einen Raucher oder einen Nichtraucher handelt. Enthält die Probe außerdem die oben aufgeführten Analyte, so kann dies als sicheres Zeichen für eine Raucherprobe gewertet werden. In Proben von Nichtrauchern konnten die für Tabakrauch charakteristischen Analyte nicht identifiziert werden. Die Verbindungen würden in diesem Fall eine Abnormalität der ausgeatmeten Luft aufzeigen können. Unmöglich wäre jedoch ein Hinweis auf Basis dieser Analyte, wenn der Nichtraucher unmittelbar vor der Probenahme Tabakrauch einatmen würde bzw. bei einem aktiven Raucher. In beiden Fällen wäre das Substanzspektrum durch die Art des Tabaks und die Intensität des Rauches starken Veränderungen unterworfen. Alle 80 zusätzlich bei Rauchern auftretenden Analyte

wären sowohl für eine qualitative als auch für eine quantitative Analyse von Veränderungen in der Atemluft nicht mehr geeignet.

Neben der Unterscheidung von Rauchern und Nichtrauchern sollte eine geschlechtsspezifische Abhängigkeit der gefundenen Analyte untersucht werden. Ein Vergleich der weiblichen mit der männlichen Gruppe zeigt jedoch keine signifikanten Unterschiede. Der Großteil jener Substanzen, die nur in einer der Gruppen vorkommen, ist auch im Hinblick auf die ganze Kontrollgruppe nur mit weniger als 10 % vertreten. Ihr Auftreten ist statistisch nicht abgesichert. Wäre dies der Fall, müsste der Anteil an der Gesamtbilanz bei mindestens 40-50 % liegen. Nur insgesamt 4 Verbindungen in der männlichen Gruppe haben in der Gesamtbilanz einen Anteil von mehr als 10 %. Sie besitzen eventuell das Potential für eine geschlechtsspezifische Unterscheidung, die jedoch mit Hilfe einer deutlich größeren Kontrollgruppe verifiziert werden müsste. Es handelt sich um die Analyte Methylcyclopentan (bei 31 % der Männer bzw. 17 % der Kontrollgruppe),  $C_6H_8$  (bei 31 % der Männer bzw. 17 % der Kontrollgruppe) und 2 Isomere des Dimethylcyclohexans (bei je 25 % der Männer bzw. 13 % der Kontrollgruppe). Dabei ist zu berücksichtigen, dass nur das Methylcyclopentan nicht nennenswert durch den Anteil der Raucher beeinflusst wird. Letztendlich ist mit der vorliegenden Datenmenge eine qualitative Unterscheidung beider geschlechtsspezifischer Gruppen nicht möglich. Gleiches gilt auch für das Alter der Probanden als Guppierungskriterium innerhalb der Kontrollgruppe. Signifikante qualitative Unterschiede zwischen jüngeren und älteren Probanden sind nicht zu beobachten. Genauere Untersuchungen der einzelnen Untergruppen sind nur quantitativ möglich.

Für die anschließenden quantitativen Untersuchungen der Kontrollgruppe wurden die Referenzsubstanzen aus der Testgasquelle ausgewertet. Anstelle von Dimethyldisulfid (DMDS) wurde jedoch Dimethylsulfid (DMS) analysiert, da dieser Analyt im Gegensatz zu Dimethyldisulfid in allen Proben enthalten war. Für die quantitative Auswertung wurden erneut die Peakflächen von 10 Verbindungen summiert und der prozentuale Anteil jedes Analyts bestimmt. Auf diese Weise können Intensitäts- bzw. Konzentrationsunterschiede der einzelnen Proben kompensiert werden. Durch diese Vorgehensweise sind die 30 Proben der Kontrollgruppe vergleichbar.

Die quantitative Auswertung wurde mit Hilfe eines zweiseitigen, homoskedatischen t-Tests (Student t-Test) unter Annahme gleicher Varianzen durchgeführt. Dieser Test erlaubt die Überprüfung der Gleichheit zweier Mittelwerte aus zwei unterschiedlichen Datensätzen. Dabei wird angenommen, dass die Mittelwerte beider Datensätze gleich sind. Für die Kontrollgruppe sind grundsätzlich drei unterschiedliche Gruppenvergleiche möglich: a) Vergleich von männlichen mit weiblichen Probanden, b) Vergleich von jüngeren (17-36 Jahre) mit älteren (37-57 Jahre) Probanden, c) Vergleich von Rauchern mit Nichtrauchern. Der menschl-

che Stoffwechsel ist sowohl vom Alter als auch von Geschlecht der Probanden weitestgehend unabhängig. Aus beiden Tatsachen resultiert die Annahme gleicher Varianz für die Auswertung der Proben. Ein zweiseitiger Test ist insofern sinnvoll, als dass Abweichungen von der Gleichheit in beide Richtungen erfolgen können. Für die Berechnung des t-Wertes wurden im Rahmen einer Microsoft-Excel-Auswertung folgende Formeln verwendet:

$$t = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{\sqrt{\frac{s_p^2}{n_1} + \frac{s_p^2}{n_2}}} \quad 4$$

mit  $\bar{x}_1$  und  $\bar{x}_2$  als Mittelwerte,  $n_1$  und  $n_2$  als Anzahl der Werte beider Gruppen und der gepoolten Varianz  $s_p^2$  für die gilt:

$$s_p = \frac{(n_1 - 1)(s_1^2) + (n_2 - 1)(s_2^2)}{n_1 + n_2 - 2} \quad 5$$

mit den empirischen Varianzen  $s_1^2$  und  $s_2^2$ .

Der berechnete t-Wert wurde im nächsten Schritt mit dem kritischen Wert der Student t-Verteilung  $t_\alpha$ -Wert verglichen. Dieser Tabellenwert ist abhängig von dem Freiheitsgrad  $f$  der Verteilung und der Irrtumswahrscheinlichkeit  $\alpha$ . Im Rahmen dieser Arbeit wurde für alle Tests eine Irrtumswahrscheinlichkeit von  $\alpha$  gleich 5 % gewählt. Für den Vergleich des Mittelwertes zweier Gruppen wurde eine Nullhypothese aufgestellt. Dies ist gleichbedeutend mit der Annahme der Gleichheit beider Mittelwerte. Eine Bestätigung oder Ablehnung dieser Hypothese erfolgt über den Vergleich zwischen t-Wert und tabellarischem  $t_\alpha$ -Wert oder über den Vergleich der ermittelten Wahrscheinlichkeit  $P$  mit der Irrtumswahrscheinlichkeit  $\alpha$ .  $P$  gibt das kleinste Niveau  $\alpha$  an, an dem eine Nullhypothese abgelehnt werden muss. Für die Bestätigung der Nullhypothese, d.h. in diesem Fall die Gleichheit der Mittelwerte, muss das Verhältnis t-Wert <  $t_\alpha$ -Wert bzw.  $P > \alpha$  gelten. Bei einem reziproken Verhältnis muss in beiden Fällen die Hypothese verworfen werden.

In den folgenden Tabellen wird die Gleichheit der Mittelwerte einer männlichen mit einer weiblichen Gruppe (Tabelle 10), einer Gruppe im Alter von 17-36 Jahren mit einer im Alter von 37-57 Jahren (Tabelle 11) und einer Gruppe von Nichtrauchern mit Rauchern (Tabelle 12) mit Hilfe des t-Tests überprüft. Die Größe der Kontrollgruppe musste auf 29 Probanden reduziert werden, da die quantitative Auswertung der Probe W13 eine unnatürlich hohe Konzentration an Terpenen zeigte. Ein Ausreißertest nach Grubbs bestätigte, dass für Limonen und  $\alpha$ -Pinen keine Gleichheit der Mittelwerte im Vergleich zu den übrigen Probanden

der Kontrollgruppe angenommen werden konnte. Durch Nachfrage wurde der Konsum eines Frucht-Lutschbonbons als Quelle für die Terpene ausgemacht.

Der Vergleich von Männern und Frauen wie auch von jüngeren und älteren Probanden führte bei keinem der Analyte zu einer Verwerfung der Nullhypothese. Die Gleichheit der jeweiligen Mittelwerte kann angenommen werden, da die Wahrscheinlichkeit P immer größer als die gewählte Irrtumswahrscheinlichkeit von  $\alpha = 0,05$  (5 %) und der berechnete t-Wert immer kleiner als der  $t_{\alpha}$ -Wert des zweiseitigen Tests war. Diese Tatsache belegt die Annahme, dass weder Geschlecht noch Alter der Probanden einen signifikanten Einfluss auf den Stoffwechsel der Probanden haben. Genauere Untersuchungen dieser Unterscheidungskriterien könnten nur mit einer wesentlich größeren Probandenzahl und extremeren Altersgruppen vorgenommen werden.

Tabelle 10 Vergleich einer männlichen (n=16) mit einer weiblichen Gruppe (n=13);  $t_{\alpha}$ -Wert = 2,05 ( $\alpha=5\%$ )

Analyt	$\bar{M}$ in %	$\bar{W}$ in %	Wahrscheinlichkeit P	t-Wert
Ethanol	2,88	3,09	0,86	0,18
2-Propanol	2,35	2,02	0,46	0,75
Aceton	67,50	67,22	0,96	0,05
Isopren	21,95	23,89	0,69	0,41
DMS	0,32	0,39	0,35	0,95
1-Propanol	0,59	0,43	0,60	0,52
Benzol	0,89	1,10	0,61	0,51
Toluol	1,30	1,48	0,74	0,34
$\alpha$ -Pinen	0,47	0,16	0,17	1,40
Limonen	1,76	0,21	0,07	1,88
$\bar{M}$	Mittelwert der Männer			
$\bar{W}$	Mittelwert der Frauen			

Tabelle 11 Vergleich der Altersgruppen 17-36 Jahre (n=15) mit der Altersgruppe 37-57 Jahre (n=14);  $t_{\alpha}$ -Wert = 2,05 ( $\alpha=5\%$ )

Analyt	17-36 Jahre in %	37-57 Jahre in %	Wahrschein- lichkeit P	t-Wert
Ethanol	3,75	2,14	0,16	1,43
2-Propanol	2,13	2,29	0,71	0,38
Aceton	65,31	69,58	0,41	0,84
Isopren	23,95	21,61	0,62	0,50
DMS	0,33	0,37	0,65	0,46
1-Propanol	0,54	0,50	0,91	0,11
Benzol	1,11	0,84	0,53	0,64
Toluol	1,31	1,45	0,80	0,25
$\alpha$ -Pinen	0,18	0,48	0,19	1,36
Limonen	1,38	0,72	0,45	0,76

Auch beim Vergleich der Nichtraucher mit den Rauchern (Tabelle 12) kann die Gleichheit der Mittelwerte für alle Analyte außer Benzol und Toluol angenommen werden. Das heißt, Ethanol, 2-Propanol, Aceton, Isopren, Dimethylsulfid (DMS), 1-Propanol,  $\alpha$ -Pinen und Limonen werden nicht durch den Konsum von Zigaretten aufgenommen oder abgebaut. Für Benzol und Toluol kann diese Feststellung nicht gemacht werden. Auch ohne den unmittelbaren Konsum einer Zigarette (letztes Rauchen lag bei allen Probanden mindestens 1 Stunde vor der Probenahme) muss für den Vergleich von Rauchern mit Nichtrauchern die Nullhypothese verworfen werden. Für beide Analyte ist die Wahrscheinlichkeit P, dass die Mittelwerte gleich sind, gleich Null (siehe Tabelle 12). Außerdem liegen beide t-Werte deutlich über dem  $t_{\alpha}$ -Wert. Somit ist der prozentuale Anteil an Benzol und Toluol in der ausgeatmeten Luft eines Raucher und eines Nichtrauchers signifikant unterschiedlich. Wie ein Vergleich der Mittelwerte beider Gruppen zeigt, ist bei Rauchern ca. die vierfache Menge Benzol und die dreifache Menge Toluol im Vergleich zu Nichtrauchern festzustellen. Dieses Verhältnis kann durch den zeitnahen Konsum einer Zigarette selbstverständlich deutlich erhöht werden.

Tabelle 12 Vergleich von Nichtrauchern (n=20) mit Rauchern (n=9);  $t_{\alpha}$ -Wert = 2,05 ( $\alpha=5\%$ )

Analyt	$\overline{\text{NR}}$ in %	$\overline{\text{R}}$ in %	Wahrscheinlichkeit P	t-Wert
Ethanol	2,62	3,74	0,37	0,90
2-Propanol	2,35	1,88	0,33	0,99
Aceton	67,13	67,91	0,89	0,14
Isopren	24,55	18,99	0,28	1,11
DMS	0,39	0,26	0,10	1,69
1-Propanol	0,58	0,40	0,59	0,54
Benzol	0,53	2,00	0,00	4,04
Toluol	0,87	2,50	0,00	3,28
$\alpha$ -Pinen	0,39	0,20	0,44	0,78
Limonen	0,59	2,12	0,10	1,71
$\overline{\text{NR}}$	Mittelwert der Nichtraucher			
$\overline{\text{R}}$	Mittelwert der Raucher			

Insgesamt kann für den Gruppenvergleich nach Geschlecht, Alter und Rauchverhalten festgestellt werden, dass sich die beiden ersten Gruppen nicht unterscheiden. Damit ist bei einer unbekannten Probe eine eindeutige Zuordnung von Alter und Geschlecht nicht möglich. Andererseits bedeutet dies aber auch, dass die Auswertung von Veränderungen in der Atemluft erheblich vereinfacht wird, da man das Alter und Geschlecht eines Probanden nicht berücksichtigen muss. Jede Atemluft kann somit mit der gesamten Kontrollgruppe verglichen werden. Bezogen auf die 10 Referenzsubstanzen ist eine Unterscheidung nur zwischen den Nichtrauchern und Rauchern möglich. Durch den Nachweis erhöhter Benzol- und Toluolkonzentrationen sowie einiger zusätzlicher Verbindungen wie 2-Methylfuran und 2,5-Dimethylfuran gelingt die Identifizierung und Klassifizierung einer Raucher-Probe als solcher mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 %.

## 2.4 Untersuchung von Matrixeffekten ausgeatmeter Luft

Im folgen Teil dieser Arbeit geht es um den stark variierenden exogenen Anteil der Atemluft. Durch eine gezielte Veränderung derselben sollen direkte Effekte und Langzeitwirkungen untersucht und beschrieben werden. Die Veränderung der Matrix wird durch Genussmittelkonsum (Tabak und Alkohol), Verwendung von Mundhygieneartikeln (Zahnpasten), Einwirkung von Medikamenten (Hals-schmerz- und Hustenmittel) sowie durch den Konsum ausgewählter Nahrungs-mittel (Gemüse, Obst, u.a.) herbeigeführt. Es gilt, Substanzen zu finden, deren Auftreten in einer unbekannten Probe einen eindeutigen Aufschluss über den Eintragspfad ermöglichen. Auch mögliche Störeffekte durch unvollständige chromatographische Trennung oder additives Verhalten sollen beobachtet werden. Zum Schluss kann ein Vergleich mit schon als Markern klassifizierten Ana-lyten Hinweis auf deren Stabilität und Eignung geben.

### 2.4.1 Einfluss von Zigarettenrauch

Die erste gezielte Veränderung der Atemluft wurde durch das Rauchen einer Zigarette hervorgerufen. Das gesamte Analytspektrum der ausgeatmeten Luft wurde unmittelbar vor und direkt nach dem Rauchen untersucht. Der Proband rauchte außerhalb des Probenahmeraums, so dass eine Beeinträchtigung der Raumluft ausgeschlossen werden konnte. Im Verlauf des Tages wurden weitere Proben desselben Probanden untersucht, der in dieser Zeit keine weiteren Ziga-retten konsumierte. Abbildung 14 zeigt die Atemluft des Probanden vor dem Rauchen (oben) und unmittelbar nach dem Rauchen (unten).

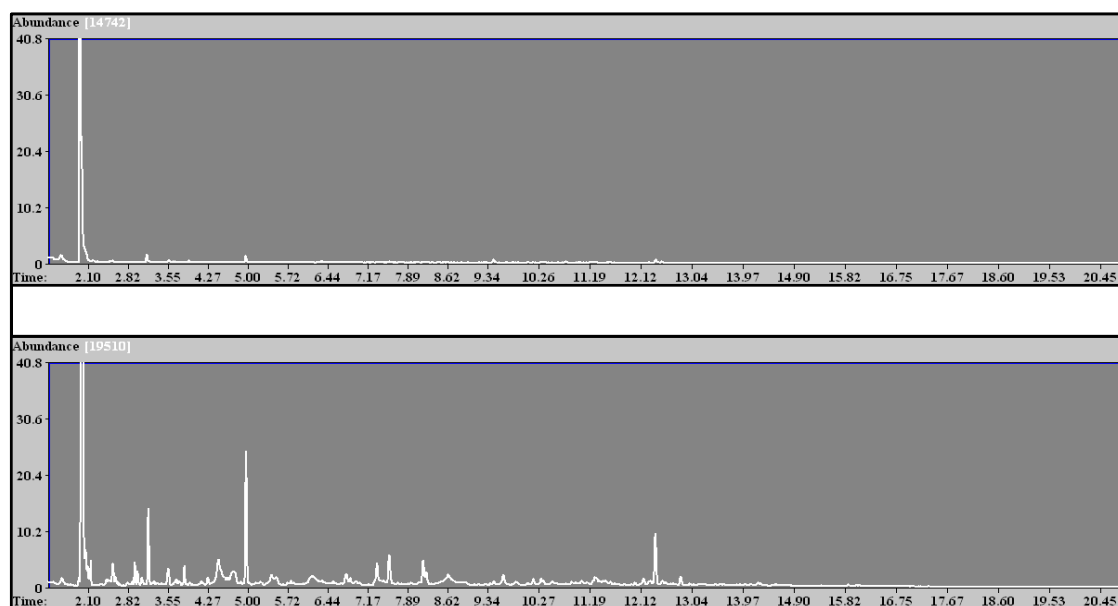


Abbildung 14 Atemluft eines Rauchers vor (oben) und nach (unten) dem Rauchen

Nach dem Rauchen wurden 44 zusätzliche Analyte identifiziert. Weitere 19 Analyte waren zwar in beiden Proben enthalten, nach dem Rauchen jedoch in deutlich höheren Konzentrationen. Zu diesen Analyten gehörten u.a. 2-Butanon, 2-Methylfuran,  $C_6H_8$ -Isomere, 2-Pentanon, 2,5-Dimethylfuran, Ethylbenzol, Xylole, Styrol, Ethylmethylbenzol, Trimethylbenzol, Cymol und Limonen. Besonders auffällig war die Konzentrationserhöhung bei Benzol und Toluol, die schon in Kap. 2.3.2 beobachtet wurde. Alle Verbindungen, die durch den Tabakrauch in die Atemluft eingetragen wurden sind in Tabelle 13 zusammengestellt.

In weiteren Versuchen wurden in einem Zeitraum von 5 Stunden 7 Proben desselben Rauchers genommen und analysiert. Die Bedingungen waren im gesamten Zeitraum der Probenahme vergleichbar. Einzige Veränderungen waren der Konsum einer Zigarette um 7:50 Uhr und die Einnahme eines Frühstücks um 8:45 Uhr. Da die Konzentrationen von Benzol und Toluol nach dem Rauchen besonders auffällig waren, wurde deren Abbauverhalten näher untersucht. Ergänzend wurde für 2-Methylfuran und 2,5-Dimethylfuran eine nähere Untersuchung des Abbauverhaltens vorgenommen. Die Konzentrationsverläufe aller vier Verbindungen sind durch Auftragung der jeweiligen Peakflächen über die Probenahmezeit in Abbildung 15 dargestellt.

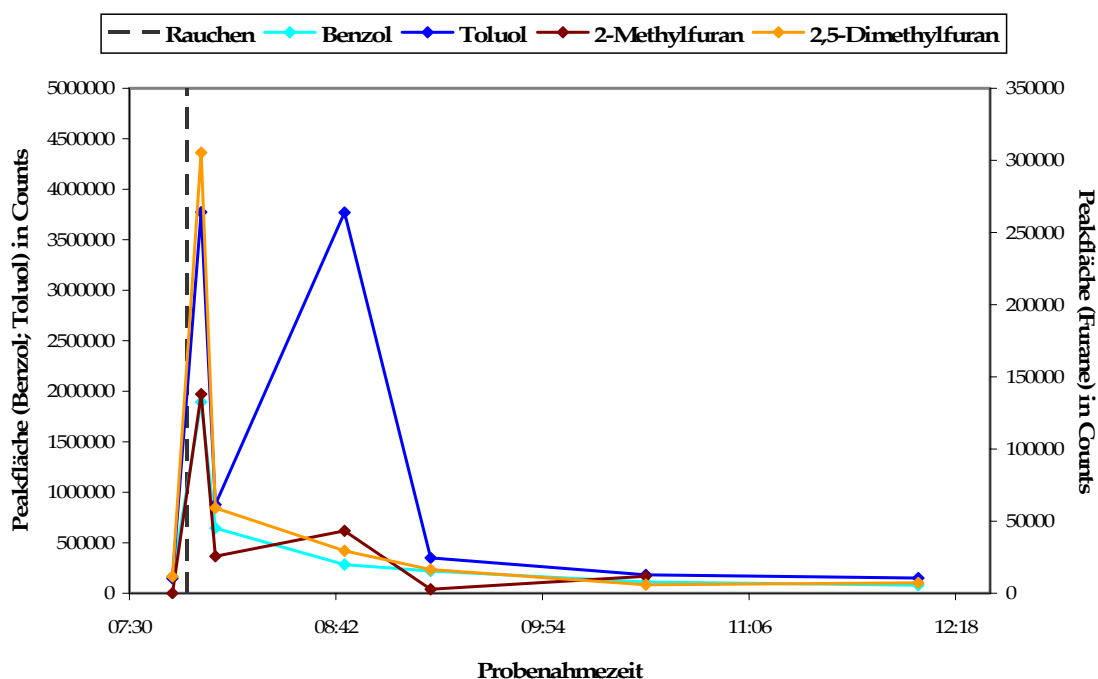


Abbildung 15 Abbau von Analyten aus Tabakrauch

Tabelle 13 Analyte aus Tabakrauch

RT in min	Analyt	B	RT in min	Analyt	B
1,72	Butan	-	6,16	Methylpyridin	-
1,84	Methylbuten (I)	-	6,55	Cresol	-
1,88	Methylbutan	-	6,78	2-Methylcyclopentanon	-
1,94	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub>	-	6,86	4-Methylpentannitril	-
1,99	Aceton	x	7,34	Ethylbenzol	x
2,00	Isopren	x	7,56	Xylol (I)	x
2,07	Methylbuten (I)	-	8,18	Styrol	x
2,11	Pentadien (I)	-	8,24	Xylol (I)	x
2,15	1,3-Cyclopentadien	-	8,63	2-Methylcyclopenten-1-on	-
2,43	Propylnitril	-	8,93	p-Pyridinaldehyd	-
2,55	2-Butanon	x	9,62	4-Decenal	-
2,60	2-Methylfuran	x	9,86	C <sub>8</sub> H <sub>14</sub>	-
2,65	Methylpentadien	-	10,09	Propylbenzol	-
2,91	C <sub>6</sub> H <sub>10</sub>	-	10,17	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> (Menthadien)	-
2,95	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub>	x	10,32	Ethylmethylbenzol (I)	x
3,00	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub>	x	10,36	Ethylmethylbenzol (I)	x
3,08	C <sub>6</sub> H <sub>10</sub>	-	10,53	Trimethylbenzol (I)	x
3,20	Benzol	x	10,87	Ethylmethylbenzol (I)	-
3,30	1,3-Cyclohexadien	-	10,95	Methylstyrol	-
3,44	Hexenolacetat	-	11,05	Benzonitril	-
3,55	2-Pentanon	x	11,13	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub>	-
3,71	3-Pentanon	-	11,17	C <sub>8</sub> H <sub>14</sub> O	-
3,86	2,5-Dimethylfuran	x	11,30	Trimethylbenzol (I)	-
4,16	2-Methylbutennitril	-	11,40	Benzofuran	-
4,27	3-Methylbutannitril	-	12,03	Terpinolen	-
4,47	1-Methylpyrrol	-	12,18	Cymol	x
4,65	2-Methyl-1,4-cyclohexadien	-	12,39	Limonen	x
4,74	Pyrrol	-	12,28	Indan	-
4,96	Toluol	x	12,85	Propynylbenzol	-
5,42	3-Hexanon	-	13,09	Ethylmethylbenzol (I)	-
5,53	2-Hexanon	-	15,88	3-Methylinden	-
5,78	2-Ethyl-5-methylfuran	-			
<b>B</b>	<b>Beitrag zu auch bei Nichtrauchern vorkommenden Analyten</b>				
<b>I</b>	<b>Isomer</b>				

Die Konzentrationsverläufe von Benzol und 2,5-Dimethylfuran sowie von Toluol und 2-Methylfuran (Abbildung 15) sind jeweils vergleichbar und werden deshalb zusammen diskutiert. Im Fall der ersten beiden Substanzen wurden nach dem Konsum der Zigarette deutlich höhere Analytkonzentrationen in der ausgeatmeten Luft gefunden. Schon ca. 10 min nach dem Rauchen ist die Konzentration wieder wesentlich niedriger. Der Ausgangswert wird nach kontinuierlicher Abnahme ungefähr 90 min nach dem Rauchen erreicht. Vergleichbare Abbauzeiten zwischen 60 min und 90 min für Benzol sind auch in der Literatur beschrieben [94]. 2,5-Dimethylfuran wurde zwar schon früher als Unterscheidungsmerkmal von Nichtrauchern und Raucher verwendet [95], sein Abbauverhalten wurde jedoch vernachlässigt. Im Vergleich zu Benzol ist 2,5-Dimethylfuran deutlich besser als Marker für Raucher geeignet, da Fehldeutungen und möglicher zusätzlicher Analyteintrag weniger wahrscheinlich sind.

Toluol und 2-Methylfuran verhalten sich in der Anfangsphase der Untersuchung analog zu den beiden anderen Verbindungen. Doch nach dem schnellen Konzentrationsabfall folgt ein erneuter Anstieg. Die Ausgangskonzentration wurde nach 5 Stunden wieder erreicht.

An anderer Stelle wurde der Einfluss des Rauchens auf Analyte wie Isopren, Aceton, Ammonium und Ethanol, die auch in der Atemluft eines Nichtrauchers vorkommen, untersucht [46]. In den hier vorliegenden Proben wurden die Konzentrationsverläufe der Verbindungen  $\alpha$ -Pinen, Limonen, Ethanol, 2-Propanol, Aceton und Isopren nach dem Rauchen betrachtet. Alle Analyte, außer Aceton und Isopren, zeigten lediglich eine minimale Konzentrationserhöhung durch den Zigarettenkonsum. Die Zunahme lag jedoch im Rahmen der normalen Schwankungen eines Tagesverlaufs und war damit nicht eindeutig auf das Rauchen zurückzuführen. Der Konzentrationsanstieg bei Aceton nach dem Rauchen war deutlich sichtbar, selbst nach Nahrungsaufnahme konnte das erste Maximum, welches unmittelbar nach dem Rauchen auftrat, nicht mehr erreicht werden. Auch die Höhe der Acetonkonzentration war deutlich größer als im „normalen“ Atem. Hohe Konzentrationen nach dem Rauchen wurden bisher mit einer Erhöhung der Lipidoxidation in Zusammenhang gebracht [46].

Isopren wurde nach dem Rauchen in stark erhöhten Konzentrationen gefunden. Die Konzentration nimmt jedoch kontinuierlich relativ schnell wieder ab und erreicht nach etwa einer Stunde ein neues minimales Niveau. Dieses liegt jedoch ca. 30 % über dem Ausgangswert. Rauchen führt also insgesamt zur Erhöhung der Isoprenkonzentration in der Atemluft. Vergleichbare Ergebnisse wurden auch mittels SIFT-MS gefunden [46]. Als Haupteintragspfad wird der Zigarettenrauch selbst gesehen. Ein weiterer Beitrag ist möglicherweise auf die Einwirkung des Zigarettenrauchs auf die Mevalonat-Reaktion zurückzuführen [46]. Geht man davon aus, dass Zigarettenrauch mehr als 4000 verschiedene organische und anorganische Verbindungen enthalten kann, so wird deutlich, dass bei entsprechend hohem Konsum sowohl die Anzahl als auch die Konzentration

der Analyte in der ausgeatmeten Luft erhöht ist. Sowohl qualitative als auch quantitative Veränderungen führen zu einer komplexeren Zusammensetzung der Matrix Atemluft, wodurch Unterschiede, die nicht auf den Zigarettenkonsum zurückzuführen sind, dann deutlich schwerer erkannt werden können. Selbst nach einer Zeit von 60-90 min, in der offensichtlich der Hauptanteil des Rauches wieder abgebaut bzw. ausgeschieden ist, enthält die Probe eines Rauchers noch einige zusätzliche Komponenten.

#### **2.4.2 Einfluss von Alkoholkonsum**

Die zweite gezielte Veränderung der Atemluft wurde durch den Konsum von Alkohol vorgenommen. Da Alkohol, insbesondere Ethanol, auch ohne unmittelbaren Konsum in der Atemluft detektiert werden kann, gilt es einen Vergleich zwischen endogen produziertem und exogen aufgenommenem Alkohol vorzunehmen. Von besonderer Bedeutung ist es dabei, die Zeitspanne nach dem Alkoholkonsum festzustellen, die benötigt wird, um den exogen aufgenommenen Anteil soweit abzubauen, dass dieser die Konzentration des endogenen Anteils nicht mehr signifikant beeinflusst.

In jeder bisher untersuchten Atemluftprobe konnte selbst bei völliger Alkoholabstinenz in den letzten 10 Stunden vor der Probenahme Alkohol, insbesondere Ethanol und 2-Propanol, in Konzentrationen von einigen ng/L (z.B. 130 ng/L Ethanol und 23 ng/L 2-Propanol; siehe Tabelle 6) nachgewiesen werden. In der Literatur sind Ethanolkonzentrationen zwischen 50 ng/L und 380 ng/L, d.h. im unteren bis mittleren ppb<sub>v</sub>-Bereich, beschrieben [17, 42, 44, 53, 96]. Auch hier stammt der Ethanolanteil der ausgeatmeten Luft ausschließlich aus endogenen Quellen. Der Mechanismus der endogenen Ethanolbildung ist zwar nicht vollständig bekannt, eine Produktion über Fermentationsprozesse in der Darmbakterienflora ist jedoch wahrscheinlich [17, 44]. Die Bildung von 2-Propanol geht wahrscheinlich auf eine enzymatische Reduktion von Aceton zurück [17]. Auch Methanol gilt, genau wie Ethanol, als Stoffwechselprodukt der Darmbakterien. Der nach dem Alkoholgenuss zu erwartende exogene Alkoholanteil ist im Vergleich zum endogenen Anteil relativ groß. Entsprechend weit verbreitet und gut bekannt sind Kontrollen des Atemalkoholgehalts im Bereich der Fahrtüchtigkeitskontrolle. In wissenschaftlichen Studien wurde neben dem Konsum alkoholischer Getränke oder alkoholhaltiger Speisen auch die Aufnahme von Alkohol durch reife Früchte untersucht [42, 44, 96].

Der Proband, der zwei Stunden vor der Probenahme die letzte Mahlzeit zu sich genommen hatte, nahm während der gesamten Probenahmeserie keine weitere Nahrung und keine Getränke zu sich. So konnte einerseits die endogene Ethanolkonzentration als konstant angesehen und andererseits die exogene Aufnahme weiteren Alkohols verhindert werden. Der Proband trank 20 mL 40%igen Grappa. Geht man davon aus, dass der absolute Alkoholanteil des Grappas ausschließlich aus Ethanol besteht, so wurden mit der konsumierten Menge 0,1 g Alkohol pro Kilogramm Körpergewicht vom Probanden aufgenom-

men. Zur Verminderung flüssiger Alkoholrückstände im Mund-Rachen-Raum wurden nach dem Alkohol 200 mL Wasser in kleinen Schlucken getrunken. Die Proben wurden unmittelbar vor dem Alkoholkonsum und fünfmal in den vier Stunden danach genommen und wie beschrieben analysiert. Die Abbildung 16 zeigt anhand der Peakflächen den Konzentrationsverlauf von Ethanol und 2-Propanol über den gesamten Probenahmezeitraum. Als charakteristische Masse/Ladungsverhältnisse wurden  $m/z$  45 für Ethanol und  $m/z$  45+59 für 2-Propanol gewählt. Der Alkoholkonsum fand direkt nach der 1. Probe, d.h. kurz nach 9:00 Uhr, statt.

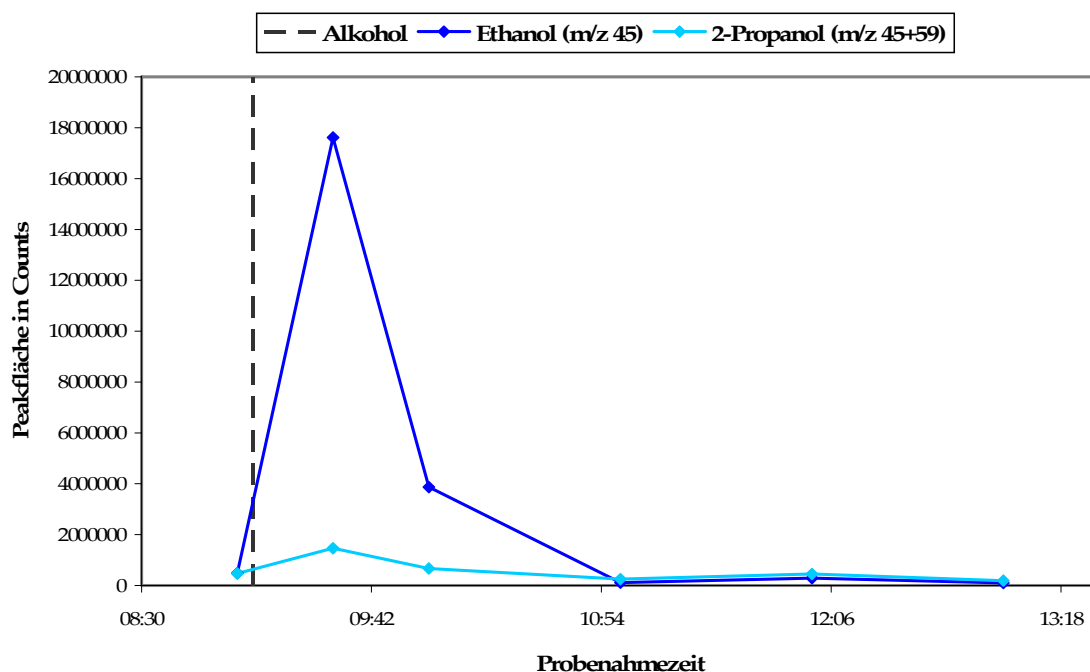


Abbildung 16 Abbau von Alkohol

Die Graphik zeigt einen sprunghaften Anstieg der Alkoholkonzentration innerhalb der ersten halben Stunde nach dem Konsum. Die Konzentration des Ethanols steigt dabei von 186 ng/L auf über 7000 ng/L, die des 2-Propanols von 23 ng/L auf 71 ng/L an. Der größte Anteil des exogenen Alkohols, ca. 80 %, ist bereits nach einer Stunde abgebaut. Die Ausgangskonzentrationen werden in diesem Fall nach 2 Stunden erreicht.

Der Mechanismus des Alkoholabbaus im menschlichen Körper ist gut bekannt. Das Ethanol wird zu einem Anteil von ca. 20 % durch die Magenschleimhaut und zu 80 % durch die Darmwand resorbiert [90, 97]. Die Verweildauer der Speisen im Magen beeinflusst somit die Resorptionsgeschwindigkeit. Leicht verdauliche Speisen erhöhen die Alkoholresorption, da die Resorption im Darm

schneller beginnen kann. Im vorliegenden Versuch sollte die Resorptionszeit entsprechend kurz sein, da als einzige Nahrung zwei Stunden vor der Probenahme ein „leichtes“ Frühstück gegessen wurde. Diese Vermutung konnte durch den schnellen Anstieg der Alkoholkonzentration in der ausgeatmeten Luft belegt werden. Der im Magen nicht umgesetzte Alkohol wird im Dünndarm resorbiert und gelangt über das Blut zur Leber. Da er dort nicht verwertet werden kann, wird er fast vollständig abgebaut. Dazu wird das aufgenommene Ethanol durch Alkoholdehydrogenase zu Ethanal dehydriert, welches dann wiederum sofort zu Acetat dehydriert und danach zu Acetyl-CoA aktiviert wird. Bei überdurchschnittlichem Alkoholkonsum verlangsamt sich dieser Stoffwechsel. Die Abbaurate des Alkohols ist unabhängig von der Konzentration im Blut. Ca. 0,1 g Ethanol pro Kilogramm Körpergewicht können in einer Stunde abgebaut werden [90]. Diese Menge entspricht der verabreichten Alkoholmenge und erklärt damit den Konzentrationsverlauf der Abbaukurve. Der aufgenommene Alkohol ist zum größten Teil nach einer Stunde abgebaut. Das im Abbauprozess gebildete Acetyl-CoA wird als Energieträger im Citratcyclus und in der Atmungskette verwendet. Steht genug Energie für diese Bereiche zur Verfügung, so dient das Acetyl-CoA zum Aufbau von Fettsäuren und Ketonkörpern. Übermäßiger oder chronischer Alkoholkonsum kann daher zur Ausbildung einer Fettleber und zu einer erhöhten Freisetzung von Aceton führen.

### **2.4.3 Einfluss von Mundhygieneartikeln**

Mundhygieneartikel wie Zahnpasten, Zahnpflegekaugummis, Mundspülungen oder Atemsprays werden zur Zahnpflege und zur Minimierung bakterieller Infektionen im Mund-Rachen-Raum verwendet, um einen angenehm frischen Atem zu bekommen. Dieses Aroma hat eine besondere Bedeutung, da zumindest der Gebrauch von Zahnpasta bei allen Probanden vorausgesetzt werden kann. Es gilt daher, den Einfluss zu bestimmen, den Mundhygieneartikel auf die Atemluft haben. Die Untersuchung beschränkte sich in diesem Fall auf den Einfluss von Zahnpasta. Da jedoch Aromen und Inhaltsstoffe in den meisten Mundhygieneartikel, soweit sie überhaupt deklariert werden, ähnlich sind, können die Ergebnisse auch als Hinweis auf die Analyte der anderen Mundhygieneartikel gesehen werden.

Zur Charakterisierung der Ingredienzien der Zahnpasten wurde von 4 Probanden jeweils eine Probe vor und eine Probe direkt nach dem Zähneputzen genommen. Dabei benutzten alle Probanden unterschiedliche Zahnpasten und hatten sich am Probenahmetag vorher noch nicht die Zähne geputzt. In Tabelle 14 sind 68 Verbindungen aufgeführt, die von den 4 Zahnpasten in der Atemluft identifiziert werden konnten.

Tabelle 14 Nachgewiesene Analyte in der Atemluft nach Verwendung verschiedener Zahnpasten; Analyte in Pfefferminzöl

RT in min	Analyt	ZP 1	ZP 2	ZP 3	ZP 4	PF
1,86	2-Methylbutan	-	-	-	x	-
2,80	2-Butanon	-	x	-	-	-
2,81	Methylglyoxal	-	x	-	-	-
2,81	Tetrahydrofuran	-	-	-	x	-
4,40	2-Methylbutanol	-	-	-	x	-
5,47	Dimethylsilandiol	-	x	-	-	-
6,07	Propenylglycol	-	x	-	-	-
7,34	3-Hexen-1-ol	x	-	-	-	-
7,57	Xylol	x	-	-	-	-
8,40	2,5-Diethyltetrahydrofuran	x	-	-	-	-
9,26	$\alpha$ -Thujen	-	-	x	x	-
9,46	$\alpha$ -Pinen	x	x	x	x	-
9,90	Camphen	x	-	x	x	-
10,68	$\beta$ -Phellandren	-	-	x	-	-
10,69	Monoterpen (Terpinolen)	x	-	-	-	-
10,76	$\beta$ -Pinen	x	x	x	x	-
11,00	Monoterpen oder C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> (Menthen)	x	x	x	x	-
11,26	$\beta$ -Myrcen	x	-	x	x	-
11,43	3-Octanol	x	-	x	x	-
11,63	1,3,8-Menthatrien	-	-	x	x	-
11,64	$\alpha$ -Phellandren	x	x	-	-	x
12,03	Cymol	x	-	x	x	-
12,29	Cymol	x	x	x	x	x
12,43	Limonen	x	x	x	x	x
12,53	Eucalyptol	x	x	x	x	x
12,70	Ocimen (cis oder trans)	x	-	x	x	-
13,10	Ocimen (cis oder trans)	x	-	x	x	-
13,32	$\gamma$ -Terpinen	-	-	-	x	x
13,32	Monoterpen (Terpinolen)	x	x	x	-	-
ZP1	blend-a-med					
ZP2	Eurodont					
ZP3	Theramed					
ZP4	Colgate					
PF	Pfefferminzöl					

Tabelle 14 Nachgewiesene Analyte in der Atemluft nach Verwendung verschiedener Zahnpasten; Analyte in Pfefferminzöl

RT in min	Analyt	ZP 1	ZP 2	ZP 3	ZP 4	PF
13,70	1-Octanol		x	-	-	-
14,22	2-Caren	x	-	x	-	x
14,22	Monoterpen (Terpinolen)	-	x	-	x	-
14,25	p- $\alpha$ -Dimethylstyrol	x	-	x	x	-
14,59	Monoterpen	x	-	x	x	-
14,70	2-Methylbutylesterbuttersäure	-	-	-	x	-
14,83	3-Methylbutylesterbuttersäure	-	-	-	x	-
15,27	3-Octanolacetat	-	-	-	x	-
15,40	1,3,5,5-Tetramethyl-1,3-cyclohexadien	-	-	-	x	-
15,86	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> (Isopulegol)	x	-	x	-	-
16,04	Menthon (cis oder trans)	-	x	x	x	-
16,12	p-Menthol	x	-	-	-	-
16,29	Menthofuran	x	-	x	-	-
16,30	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> (Citronellal)	-	x	-	-	-
16,33	Menthon (cis oder trans)	x	-	x	x	-
16,34	Isomenthol	x	-	-	-	-
16,54	Menthol (Isomere)	x	x	x	x	x
-16,63						
16,74	Monoterpen (cis Caran)	-	-	x	x	-
16,77	Isomenthol	x	-	-	x	-
16,87	p-Menth-3-en	-	-	x	-	-
16,89	C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O	x	-	-	-	-
16,91	Terpinol	-	x	-	-	-
16,93	Monoterpen	x	x	-	-	-
17,04	Dihydrocarvon	-	-	x	-	-
17,07	p-Allylanisol	x	-	-	-	-
17,32	n-Octylacetat	x	-	-	-	-
17,81	cis 3-Hexylvalerat	x	-	-	-	-
17,88	2-Menthen	x	-	-	-	-
17,92	Pulegon	x	-	-	x	-
ZP1	blend-a-med					
ZP2	Eurodont					
ZP3	Theramed					
ZP4	Colgate					
PF	Pfefferminzöl					

Tabelle 14 Nachgewiesene Analyte in der Atemluft nach Verwendung verschiedener Zahnpasten; Analyte in Pfefferminzöl

RT in min	Analyt	ZP 1	ZP 2	ZP 3	ZP 4	PF
18,00	(+)-Carvon	-	-	-	x	-
18,55	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> (Menthen)	-	-	x	-	-
18,56	Monoterpen	x	-	-	x	-
18,75	p-Propenylanisol	x	x	x	x	-
18,91	Mentholacetat	x	-	x	x	-
19,15	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> (Menthen)	x	-	-	x	-
19,22	5-Methyl-3(1-methylethyl)-trans-(-)-cyclohexen	x	-	-	-	-
20,43	Bourbonen	x	-	x	x	-
20,95	Longifolen	x	-	x	x	-
21,44	α-Caryophyllen	-	-	-	x	-
ZP1	blend-a-med					
ZP2	Eurodont					
ZP3	Theramed					
ZP4	Colgate					
PF	Pfefferminzöl					

Ein Vergleich mit den vom Hersteller benannten Inhaltsstoffen zeigte, mit Ausnahme des Analyts Limonen, keine weitere Übereinstimmung mit den Verbindungen aus Tabelle 14. Limonen wurde in Zahnpasta 1 und 3 explizit deklariert, aber auch nach Verwendung der beiden anderen Zahnpasten in der Atemluft gefunden. Alle anderen analysierten Inhalts- und Aromastoffe verbergen sich demnach unter der vom Hersteller gewählten Bezeichnung „Aroma“. Da die identifizierten Verbindungen überwiegend zur Gruppe der Monoterpene bzw. ihrer Oxidationsprodukte gehören, wurde zum direkten Vergleich eine Head-space-Probe von Pfefferminzöl (PF) untersucht. Dieses Öl ist natürlichen Ursprungs und wird vielfach als Heilmittel und Aromastoff verwendet. Eine Verwendung im Bereich der Mundhygiene erscheint daher naheliegend. In der letzten Spalte der Tabelle sind die Inhaltsstoffe einer Headspaceprobe des Pfefferminzöls aufgeführt. Auch hierbei wurden ausschließlich Monoterpene und ihre Oxidationsprodukte detektiert. Eine Identifizierung gelang für die Analyte α-Phellandren, Cymol, Limonen, Eucalyptol, γ-Terpinen, 2-Caren und Menthol. Bei den anderen Analyten handelt es sich überwiegend um C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>-Isomere, die weder über ihre Retentionszeit noch massenspektrometrisch eindeutig identifiziert werden konnten. Die große Übereinstimmung der Substanzspektren von Pfefferminzöl und Zahnpasta legt Pfefferminzöl als eine „Aroma“-Komponente in Zahnpasta nahe.

Neben Limonen wurden weitere 7 Verbindungen, nämlich  $\alpha$ -Pinen,  $\beta$ -Pinen, Menthen, Cymol, Eucalyptol, Menthol und p-Propenylanisol, in allen Proben nach dem Zähneputzen gefunden. Sie sind somit charakteristische Geruchsstoffe für Zahnpasta, die für einen nachhaltigen Einfluss auf die „Atemfrische“ eingesetzt werden. Ein Vergleich mit Probanden, die mindestens 2 Stunden vor der Probenahme ihre Zähne nicht geputzt und seither keine Nahrung zu sich genommen hatten, zeigt, dass Limonen,  $\alpha$ -Pinen,  $\beta$ -Pinen und Eucalyptol dennoch in mehr als 90 % aller Proben gefunden wurden. Durch den hier untersuchten Matrixeinfluss von Zahnpasta wird somit ein Eintragspfad dieser Analyte in die Atemluft nachgewiesen. Weitere Analyte, die in 3 von 4 Proben vorkamen, geben einen deutlichen Hinweis auf eine Veränderung der Atemluft durch den Gebrauch von Zahnpasta. Bei diesen Verbindungen handelt es sich um Camphen,  $\beta$ -Myrcen, 3-Octanol, 1,3,8-Menthatrien, Cymol, Ocimen (cis und trans), Terpinolen, p- $\alpha$ -Dimethylstyrol, Menthon (2 Isomere), Mentholacetat, Bourbonen und Longifolen. Beim Vergleich dieser Verbindungen mit den Analyten der Kontrollgruppe kann nur in Einzelfällen eine Übereinstimmung beobachtet werden. Dies bedeutet, dass ein großer Teil der aus Zahnpasta eingetragenen Analyte schon nach kurzer Zeit nicht mehr nachgewiesen werden kann. Die Analyte können, falls sie noch gefunden werden, somit Hinweis auf Mundhygieneartikel geben, nicht jedoch zur eindeutigen Identifizierung dieser Artikel dienen. Dafür kämen allenfalls  $\alpha$ -Pinen,  $\beta$ -Pinen, Limonen und Eucalyptol in Frage. Sie werden langsam abgebaut und sind in allen Proben enthalten. Da jedoch insbesondere für  $\alpha$ -Pinen und Limonen noch zahlreiche andere Eintragspfade außer den biogenen Quellen oder der direkten Aufnahme durch Nahrungsmittel bekannt sind, ist die Zahnpasta an dieser Stelle nur ein möglicher Eintragspfad in die Atemluft.

#### **2.4.4 Einfluss von Arzneimitteln für Atemwegserkrankungen**

Viele Arzneimittel zur Linderung von Atemwegs- und Erkältungskrankheiten basieren auf pflanzlichen Inhalts- und Wirkstoffen. Sie sind daher in Apotheken und Drogerien ohne ärztliche Verschreibung frei verkäuflich und werden häufig zur Eigentherapie verwendet. Die Wirkstoffe sind überwiegend stark aromatisch, wodurch Reizlinderung und freieres Atmen erreicht werden soll. In der ausgeatmeten Luft des Konsumenten kann man viele dieser natürlichen Aromastoffe wiederfinden. In den folgenden Versuchen wurde von verschiedenen Probanden eine Lutschtablette, ein Lakritz Hustenbonbon und Hustentropfen konsumiert. Die Probenahme erfolgte vor und direkt nach der Einnahme der Arzneimittel. Laut Herstellerangaben enthielt die Lutschtablette als Wirkstoff 1,4-Cetylpyridiniumchlorid und Pfefferminzöl, das Lakritzbonbon Aromen und Kräuterextrakte und die Tropfen Thymianflüssigextrakt, Primelwurzeltinktur, Eucalyptusöl und Menthol. In Tabelle 15 sind die exhalieren Verbindungen der drei Produkte gegenübergestellt. Ähnlich wie bei den Verbindungen aus den Zahnpasten (siehe Kap. 2.4.3) wurden für die Arzneimittel fast ausschließlich

Terpene und deren Oxidationsprodukte detektiert. Viele der Analyte kommen in zwei oder in allen drei konsumierten Mitteln vor. Als Quelle für Menthol, Menthon, Menthofuran und Eucalyptol kommt Pfefferminzöl in Frage. Durch Eucalyptusöl werden neben Eucalyptol auch  $\alpha$ -Pinen, Borneol, Carvon, Cymen und Limonen eingetragen. Weitere Mono- und Triterpene sind im Thymianextrakt enthalten.

Tabelle 15 Nachgewiesene Analyte in der Atemluft nach Einnahme von Arzneimitteln für Atemwegserkrankungen

RT in min	Lutschtablette	Lakritzbonbon	Tropfen
9,26	$\alpha$ -Pinen	$\alpha$ -Pinen	-
9,89	Camphen	Camphen	-
10,29	-	Benzaldehyd	-
10,76	$\beta$ -Pinen	$\beta$ -Pinen	-
11,24	C <sub>6</sub> H <sub>16</sub> ( $\beta$ -Myrcen)	C <sub>6</sub> H <sub>16</sub> ( $\beta$ -Myrcen)	-
11,39	3-Octanol	-	-
11,62	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> (1,3,8-Menthatrien)	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> (1,3,8-Menthatrien)	-
12,01	Cymol	-	-
12,25	Cymol	Cymol	Cymol
12,37	Limonen	Limonen	Limonen
12,46	Eucalyptol	Eucalyptol	Eucalyptol
12,68	Ocimen	-	-
13,31	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> (Terpinolen)	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> (Terpinolen)	-
14,22	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	-	-
14,23	-	Fenchon	Fenchon
14,23	Styrol	-	-
14,57	-	-	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O
15,81	-	-	Camphor
15,84	-	Isopulegol	-
16,04	Menthon	Menthon	-
16,26	Menthofuran	-	-
16,32	-	-	Borneol
16,29	Menthon	-	-
16,30	-	Isomenthol	-
16,50	Menthol	Menthol	Menthol
16,85	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> (Caran)	-	-
18,56	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> (Menthen)	-	-

Tabelle 15 Nachgewiesene Analyte in der Atemluft nach Einnahme von Arzneimitteln für Atemwegserkrankungen

RT in min	Lutschtablette	Lakritzbonbon	Tropfen
18,75	-	p-Propenylanisol	-
18,88	Caran	Caran	-
19,15	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> (Menthen)	-	-
20,95	Longifolen	-	-

Der Vergleich aller Arzneimittel zeigt einen deutlichen Eintrag von leichtflüchtigen Substanzen in die Atemluft. Außer  $\alpha$ -Pinen,  $\beta$ -Pinen, Limonen, Eucalyptol und Cymol wird jedoch der Großteil der Analyte relativ schnell wieder abgebaut. Das erklärt, warum die meisten der in Tabelle 15 aufgeführten Verbindungen bei den Probanden bereits nach einer Stunde nicht mehr detektiert werden konnten. Die komplexe und nicht immer gleiche Zusammensetzung pflanzlicher Öle sowie eine unzureichende Deklaration bei frei verkäuflichen Arzneimitteln, schränken deren Verwendung im Rahmen einer sinnvollen und reproduzierbaren Atemluftuntersuchung jedoch trotzdem ein. Da der Eintragspfad der Terpene und ihrer Oxidationsprodukte nicht eindeutig ist, müssen diese Verbindungen auch hierbei als Marker für endogene Veränderungen ausgeschlossen werden. Die exogenen Einträge in die Atemluft überwiegen deutlich, daher können die genannten Verbindungen bestenfalls Rückschlüsse auf die Aufnahme stark aromatisierter Mittel oder Nahrung erlauben, direkte Zuordnung ist auch hier nicht möglich.

#### 2.4.5 Einfluss ausgewählter Nahrungsmittel

Durch die Aufnahme von Nahrungsmitteln werden zahlreiche leichtflüchtige Verbindungen in die Atemluft eingebracht. Dies können Substanzen sein, die von der Nahrung selbst unverändert emittiert werden und daher auch in Head-spaceproben zu finden sind. Bei vielen Verbindungen handelt es sich jedoch um Metabolite von Inhaltsstoffen der aufgenommenen Nahrungsmittel, die über den Blutkreislauf transportiert und dabei in der Lunge anteilig in die Atemluft abgegeben werden. Die große Vielfalt der Nahrungspalette erschwert daher eine allgemein gültige, umfassende Charakterisierung aller Beeinflussungen der ausgeatmeten Luft. Da im Rahmen dieser Arbeit nur einige Lebensmittel untersucht werden konnten, wurden diejenigen ausgewählt, die aufgrund ihrer Geruchsinintensität einen charakteristischen Beitrag zur Atemluft erwarten ließen. Dazu gehören sowohl Gemüsesorten wie Knoblauch und Zwiebeln als auch Obstsorten wie Bananen und Erdbeeren. Natürlich besteht durch die entwickelte Methode jedoch jederzeit die Möglichkeit der Untersuchung weiterer Nahrungs- und Genussmittel. Bei allen untersuchten Nahrungsmitteln wurde eine Probe vor, eine Probe kurz nach dem Konsum und eine weitere Probe eine

Stunde später untersucht. Konnten die eingetragenen Analyte in dieser letzten Probe noch nachgewiesen werden, so wurde in weiteren Proben das Abbauverhalten dieser Analyte untersucht.

Zuerst wurden mit Knoblauch und Zwiebel zwei Vertreter der Alliumgewächse ausgewählt. Wie alle ihre Artverwandten zeichnen sich beide Gemüse durch ihren starken, charakteristischen Geruch aus, der beim Hacken, Schneiden und Kauen freigesetzt wird. Da dieser Geruch sehr intensiv ist und lange wahrgenommen werden kann, ist seine Zusammensetzung bzw. sein Abbauverhalten im Rahmen der Atemluftanalyse von großem Interesse. Der Mechanismus zur Bildung der für Alliumgewächse charakteristischen Aromen ist insbesondere für Knoblauch inzwischen gut bekannt [96, 98, 99]. So ist in den Mesophylzellen der Knoblauchzehe geruchloses Alliin und räumlich getrennt davon in den vaskulären Scheidebündelzelle das Enzym Alliinase enthalten. Kommen beide Stoffe durch Schneiden, Hacken oder sonstiges Zerkleinern des Gemüses in direkten Kontakt, so erfolgt eine unmittelbare Umsetzung zu Allicin. Dieses besitzt den typischen Knoblauchgeruch. In weiteren Reaktionen werden dann aus Allicin zahlreiche, stark riechende Organosulfide gebildet, die als Leitsubstanzen detektiert werden [98, 100].

In zwei Versuchsreihen an unterschiedlichen Probenahmetagen wurde von den Probanden eine Knoblauchzehe bzw. eine halbe Zwiebel konsumiert. Die Probenahme erfolgte unmittelbar vor und direkt nach dem Konsum der Nahrungsmittel. Zur weiteren Untersuchung des Abbauverhaltens der in die Atemluft eingetragenen Verbindungen wurden im Rahmen des Knoblauchabbaus über den Zeitraum von 8 Stunden jeweils eine Probe pro Stunde untersucht und eine weitere 24 Stunden nach dem Konsum. Der Metabolismus der Zwiebelinhaltsstoffe wurde ebenfalls stündlich untersucht. In Abbildung 17 ist das unterschiedliche Abbauverhalten für die Schwefelverbindungen Allylmethylsulfid und 1-Methylthiopropen des Knoblauchs dargestellt. Ferner kann der Graphik der Konzentrationsverlauf des Acetons (eigene Skalierung beachten) über die gesamte Probenahmezeit entnommen werden. Die beiden Schwefelverbindungen Allylmethylsulfid ( $m/z$  73+88) und 1-Methylthiopropen ( $m/z$  61+90) sind gleichzeitig Vertreter für 2 von 3 unterschiedlichen Gruppen, die sich aufgrund ihres Abbauverhaltens zusammenfassen lassen. Eine Gruppe von Analyten kann nur direkt nach dem Konsum von Knoblauch in der Atemluft festgestellt werden. Es handelt sich hierbei um Diallyltrisulfid, Diallyldisulfid, 1,3-Dithion, Dimethylthiophen, Allylthiol und 1-(1-Propenylthio)propan. Eine andere Gruppe von Substanzen zeigt einen nahezu vollständigen Abbau in 1-2 Stunden. Neben dem in Abbildung 17 dargestellten 1-Methylthiopropen gehören Diallylsulfid und 1-Methylthio-1-propen zu dieser Gruppe. Für die dritte Gruppe von Analyten ist eine relativ lange Verweilzeit in der Atemluft typisch. Allylmethylsulfid (siehe Abbildung 17) war auch nach 8 Stunden noch in deutlichen Mengen vorhanden und sogar nach 24 Stunden noch gut nachweisbar. Somit ist der typische Knoblauchgeruch, der auch lange nach dem Verzehr noch wahrgenom-

men werden kann, wahrscheinlich hauptsächlich auf Allylmethylsulfid zurückzuführen.

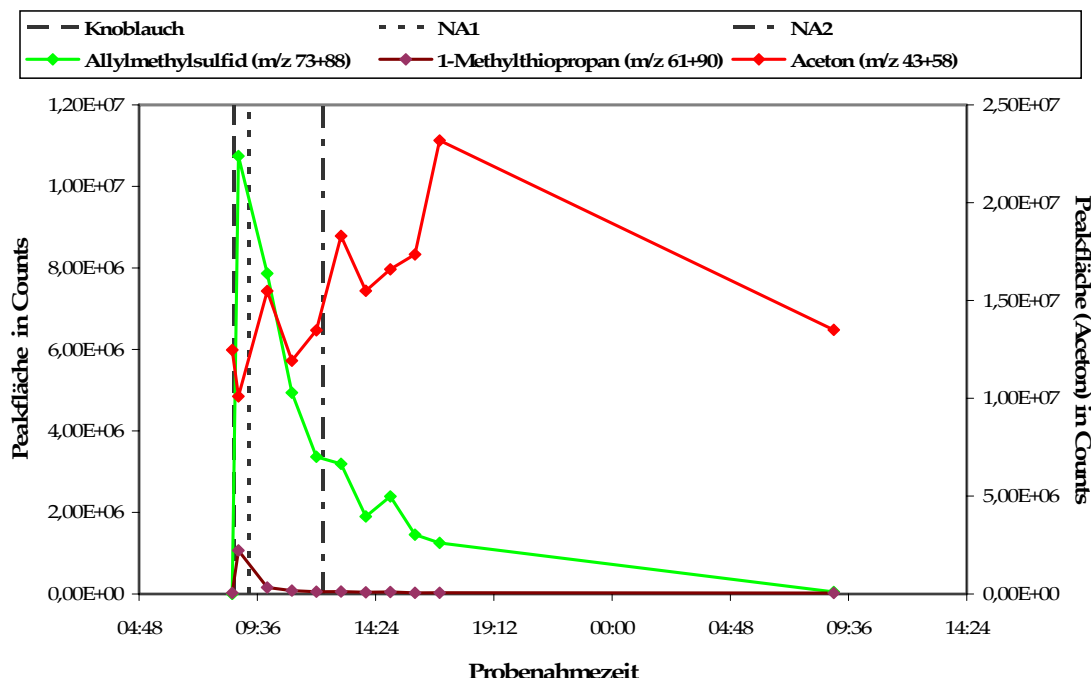


Abbildung 17 Abbau von Schwefelverbindungen aus Knoblauch und Verlauf der Acetonkonzentration in der Probenahmezeit (NA=Nahrungsaufnahme)

Der Konzentrationsverlauf des Acetons zeigt im Rahmen der Probenahmezeit keinen Abbau sondern eine deutliche Zunahme. Die Maxima bei der 3. und 6. Probe sind jeweils auf die Aufnahme von Nahrung (Frühstück und Mittagessen) zurückzuführen. Das absolute Maximum der Probenahmereihe liegt bei der letzten Probe des ersten Probenahmetages. Obwohl nur eine 5stündige Zeit ohne die Aufnahme von Nahrung vorangegangen war, liegt dieses Maximum deutlich über der Konzentration der ersten Probe, der eine ca. 10stündige Zeit ohne Nahrungsaufnahme während der Nacht vorangegangen war. Der Verlauf der Acetonwerte kann daher nicht auf den Hungerzustand des Probanden zurückgeführt werden. Auch eine diabetische Erkrankung war nicht bekannt. Als Mechanismus kommt somit eine Veränderung der endogenen Acetonproduktion, verursacht durch die Aufnahme von Knoblauch, in Frage. Diese Annahme wird durch Erkenntnisse anderer Gruppen gestärkt, die im Rahmen ihrer Untersuchungen von einer lipidsenkenden Wirkung des Knoblauchs und damit verbundener erhöhter Fettverbrennung, die mit verstärkter Bildung von Ketonkörper einher geht, ausgehen [96]. Die erhaltenen Ergebnisse sind vergleichbar mit den in der Literatur beschriebenen, in denen ebenfalls unterschiedliches Abbauverhalten beobachtet wurde [96, 101]. Eine eindeutige

Identifizierung des Knoblauchs, auch noch 24 Stunden nach dem Konsum, ist nur über den Analyt Allylmethylsulfid möglich, der sonst kein Bestandteil der Ausatemluft ist. Bei zeitnaher Probenahme kommen für eine weitere Charakterisierung ergänzend die Analyte der Gruppe mit 1-2stündigem Abbauverhalten in Frage.

Für die Untersuchung des Einflusses von Inhaltsstoffen der Zwiebel konnten ähnliche Beobachtungen wie für Knoblauch gemacht werden. Die maximale Abbauzeit war jedoch mit ca. 3 Stunden für den Hauptanalyt 1-Methylthiopropen deutlich kürzer. Alle anderen detektierten Analyte, 1-Propanthiol, 1-Methylthio-1-propen, Dipropylsulfid, Dimethylthiophen, Methylpropyldisulfid, Methyl-2-propenyldisulfid und Dipropyldisulfid, beeinflussen die Atemluft nur kurze Zeit nach der Aufnahme. Eine eindeutige Identifizierung über einen charakteristische Inhaltsstoff kann für die Zwiebel nicht vorgenommen werden. Letztendlich kann aber die Detektion einer großen Anzahl bzw. hoher Konzentrationen der für Knoblauch und Zwiebeln beschriebenen Verbindungen Hinweis auf den Konsum von Alliumgewächsen geben.

Nach der Untersuchung von Knoblauch und Zwiebeln wurden andere Nahrungsmittel, die ebenfalls durch ein starkes Aroma oder einen lang anhaltenden Geschmack auffallen, konsumiert und analysiert. Der Konsum zweier stark riechender Käsesorten, eines Limburgers und eines Harzers, zeigte, dass in diesem Fall Dimethyldisulfid (DMDS) als Hauptkomponente in die Atemluft eingetragen wurde und für den charakteristischen Geruch verantwortlich ist. Durch den Harzer Käse wurden ferner deutliche Mengen an Styrol und Limonen sowie Carvon und eine  $C_{10}H_{18}O$ -Verbindung in die Atemluft eingebracht. Neben Limonen, auf dessen Abbau später eingegangen wird, zeigte insbesondere DMDS ein auffälliges Abbauverhalten (siehe Abbildung 18). So steigt im Atem des Probanden nach dem Käsekonsum (zwischen Probe 1 und 2) die Konzentration von DMDS sprunghaft an. Innerhalb der nächsten Stunde kann ein nahezu vollständiger Rückgang beobachtet werden. Weitere Untersuchung des DMDS zeigt jedoch nicht ein Verbleiben auf niedrigem Niveau sondern einen erneuten Konzentrationsanstieg bis zu einem zweiten Maximum gegen 12:30 Uhr, d.h. 3,5 Stunden nach dem Konsum des Käses. Da im Verlauf der Messreihe DMDS weder durch Käse noch auf anderem Wege erneut aufgenommen wurde, muss der zweite Kurvenabschnitt auf endogen freigesetztes DMDS zurückgeführt werden. Die wahrscheinlichste Erklärung des Kurvenverlaufs ist, dass das Maximum an DMDS im ersten Teil ausschließlich auf den Memory-Effekt im Mund-Rachen-Raum zurückzuführen ist und erst im zweiten Teil die Stoffwechselprodukte des Magen-Darm-Traktes zu sehen sind. Diese Theorie erklärt die vergleichsweise hohen Konzentrationen beim ersten Maximum, die direkt eingetragen wurden, im Vergleich zu den deutlich niedrigeren Konzentrationen, die durch Gleichgewichtseinstellung zwischen Blut und Atemluft in der Lunge erreicht werden. Da DMDS auch in Proben der Kontrollgruppe gefunden wurde, kann diese Substanz allenfalls durch erhöhte Konzentration in der aus-

geatmeten Luft Hinweise auf den Konsum von Käse geben. Allgemein gibt DMDS einen sicheren Hinweis auf strengen, leicht unangenehmen Geruch. In dieser Eigenschaft kann es mit dem natürlichen Mundgeruch, der nachweislich durch Schwefelverbindungen hervorgerufen wird [102-104], in Verbindung gebracht werden. Leichtflüchtige organische Schwefelverbindungen wie z.B. Schwefelwasserstoff, Dimethylsulfid und auch DMDS sind dabei, wie in wissenschaftlichen Studien gezeigt werden konnte, hauptsächlich durch Parodontitis (Entzündung der Zahnwurzelhaut) und Zungenbelag bedingt [102, 105].

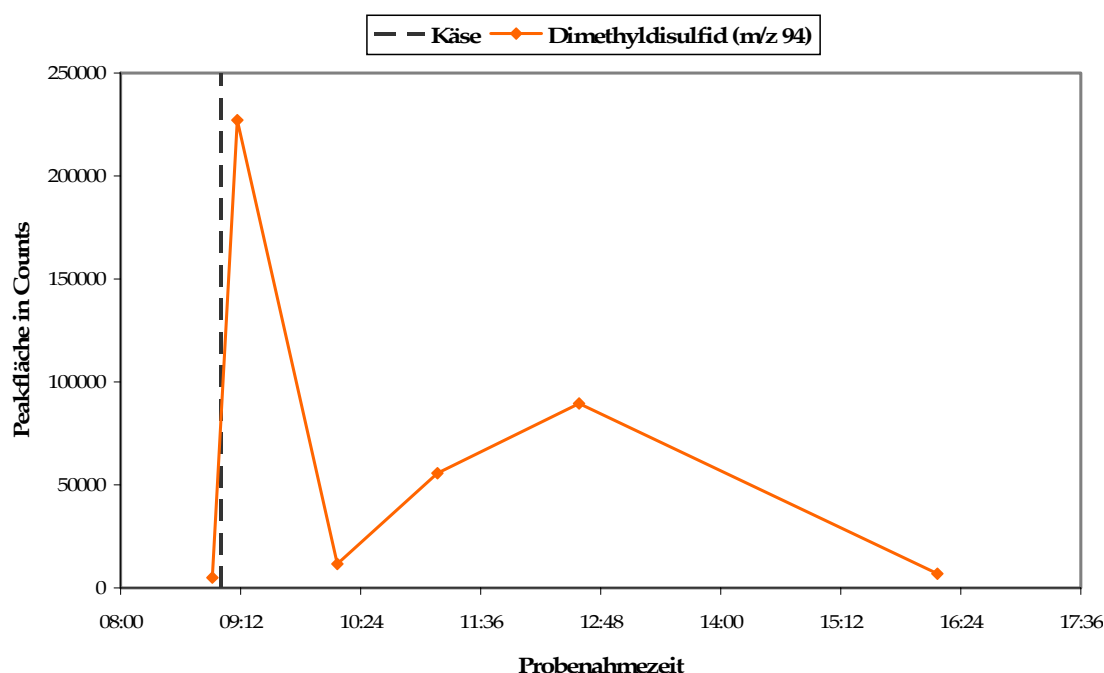


Abbildung 18 Abbau von DMDS in Atemluft nach Konsum von Käse

Die Atemluft wurde auch nach dem gezielten Konsum gebräuchlicher Mengen von geräuchertem Schinken, Rettich, Vollkornbrot mit Nussnugatcreme und Kaffee untersucht. Unter den entwickelten Messbedingungen zeigten diese Nahrungsmittel keine deutliche Veränderung der Atemluft.

Der Analyt Limonen wird aus vielen Quellen in die Atemluft eingetragen. Allein im Rahmen dieser Arbeit wurde er durch Zahnpasta, Arzneimittel und Nahrungsmittel eingebracht. Besonders nach dem Konsum von Orangensaft wurden erhöhte Limonenkonzentrationen festgestellt. Vielfach lag dabei das Trinken schon mehrere Stunden zurück. Dennoch konnten bei einigen Probanden, die angehalten waren, eine Stunde vor der Probenahme nichts mehr zu sich zu nehmen, noch deutlich erhöhte Konzentrationen festgestellt werden. Die Untersuchung eines Tagesganges zeigte, dass die Limonenkonzentration 2 Stunden nach

dem Konsum immer noch stark erhöht ist. Erst weitere 2 Stunden später sind wieder normale Konzentrationen erreicht. Aufgrund der vielen, unterschiedlichen Eintragspfade und des langsamen Abbauverhaltens ist Limonen als spezifischer Hinweis auf einen Störeffekt nicht geeignet.

In weiteren Versuchen wurden die flüchtigen Verbindungen von Bananen und Erdbeeren untersucht. Die Analyte beider Obstsorten konnten jedoch nur unmittelbar nach dem Konsum nachgewiesen werden und haben daher auf die Probe keinen Einfluss. In Tabelle 16 sind die typischen Analyte für beide Obstsorten aufgeführt. Bei beiden Früchten wurden überwiegend Ester gefunden, davon viele der Essigsäure. Eine Unterscheidung beider Früchte ist insofern schwierig, als dass viele Verbindungen in beiden Fällen vorkommen. Die in der Literatur [106] benannten Marker Isobutylacetat und Isopentylacetat für reife Bananen sowie Hexanal und 2-Hexenal für unreife Bananen kommen in beiden Früchten vor. Sie sind daher als Marker für eine Identifizierung oder Unterscheidung nicht geeignet.

Tabelle 16 Inhaltsstoffe aus Bananen und Erbeeren

RT in min	Bananen	Erdbeeren
1,74	-	Acetaldehyd
2,13	Methylacetat	Methylacetat
2,71	Ethylacetat	Ethylacetat
2,85	-	Methylpropylat
3,19	Butanol	-
3,21	-	Isopropylacetat
3,54	2-Pentanon	-
3,69	-	3-Pentanon
3,74	C <sub>5</sub> H <sub>12</sub> O	-
3,94	-	Ethylpropanoat
4,00	Propylacetat	Propylacetat
4,12	-	Methylbutanoat
4,35	3-Methyl-1-butanol	-
5,18	Isobutylacetat	Isobutylacetat
5,55	2-Hexanon	-
5,75	Hexanal	Hexanal
5,79	Buttersäureethylester	Buttersäureethylester
6,14	Butylacetat	Butylacetat
6,93	-	2-Butensäureethylester
7,07	-	Buttersäure-2-methylester
7,10	1-Methylbutylacetat	-

Tabelle 16 Inhaltsstoffe aus Bananen und Erdbeeren

RT in min	Bananen	Erdbeeren
7,15	2-Hexenal	2-Hexenal
7,61	Hexanol	-
7,84	Isopentylacetat	Isopentylacetat
7,89	-	2-Methylbutylacetat
8,24	2-Heptanon	-
8,96	Pentylacetat	-
9,21	-	Methylhexanoat
10,19	Buttersäureisobutylester	-
11,42	Buttersäurebutylester	-
11,50	-	Ethylhexanoat
11,96	Hexylacetat	Hexylacetat
12,01	-	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O
12,22	4-Hexen-1-ol-acetat	-
12,42	2-Ethylhexanol	-
12,66	-	C <sub>9</sub> H <sub>18</sub> O <sub>2</sub>
13,26	Buttersäure-3-methylbutylester	-
14,52	-	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O
14,75	Buttersäure-3-methyl-3-methylbutylester	-
16,90	Buttersäurehexylester	-
17,28	-	Essigsäureoctylester

### 2.4.6 Fazit für die Probenahme

Die Ergebnisse der unterschiedlichen, gezielten Veränderungen der ausgeatmeten Luft durch Konsum von Genussmitteln (Tabak, Alkohol), Verwendung von Hygieneartikeln (Zahnpasta), durch Einnahme von Arzneimitteln (hier für Atemwegserkrankungen) und durch den Konsum von Nahrungsmitteln (Alliumgewächse, Obst u.a.) führen zu folgenden Probenahmeveraussetzungen für eine sinnvolle, reproduzierbare diagnostische Anwendung der Atemluftanalyse:

- Unterlassung des Rauchens am Tag der Probenahme, mindestens aber in den 2 Stunden unmittelbar vor der Probenahme
- keine Aufnahme alkoholischer Getränke und Speisen, keine Verwendung alkoholhaltiger Hygieneartikel wie Atemsprays und Mundwasser und, soweit möglich, Verzicht auf alkoholhaltige Arzneimittel in einem Zeitraum von 1-2 Stunden vor der Probenahme
- keine Verwendung von Mundhygieneartikeln mindestens 1 Stunde vor der Probenahme
- Vermeidung jeglicher Arzneimittelaufnahme, soweit nicht unbedingt nötig, am Tag der Probenahme, insbesondere bei nicht explizit deklarierten, natürlichen Wirkstoffen
- Vermeidung des Konsums von Alliumgewächsen (24 Stunden vor der Probenahme), von aromatischen Käsesorten (am Tag der Probenahme) und von stark Limonen haltigen Nahrungsmitteln wie Orangensaft (4 Stunden vor der Probenahme)
- Vermeidung jeglicher Nahrungsaufnahme unmittelbar vor der Probenahme, zur Minimierung möglicher Matrixeinträge und erhöhter Speichelproduktion

Im Vorfeld jeder Probenahme gilt es ferner, besondere Essgewohnheiten (z.B. Diät, einseitige Ernährung) und Trinkgewohnheiten, sowie die Einnahme bestimmter Medikamente bzw. den allgemeinen Gesundheitszustand des Probanden zu klären. Der Proband ist für sein Essverhalten zu sensibilisieren und darüber aufzuklären, dass neben den oben aufgeführten Maßgaben die Aufnahme jeglicher stark aromatischer Nahrungsmittel am Tag der Probenahme vermieden werden muss.

### **2.4.7 Beobachtung der Atemluft bei zwei Krankheitsbildern**

Um die Anwendbarkeit der entwickelten Methode für medizinische Fragestellungen zu prüfen, wurden zwei unterschiedliche Krankheitsbilder, ein chronisches und ein nicht chronisches untersucht. Bei dem ersten handelt es sich um eine Diabetes Mellitus. Diese Erkrankung wird durch einen Insulinmangel hervorgerufen, der zu einer unvollständigen Metabolisierung der Glycose im Körper führt. Dadurch wird wiederum ein verstärkter Fettabbau hervorgerufen, der das Energiedefizit ausgleicht und gleichzeitig zu einer erhöhten Freisetzung von Ketonkörpern führt. Letztere, insbesondere Aceton, werden in erhöhten Konzentrationen im Harn und in der Atemluft der Erkrankten festgestellt. Neben Urin-Schnelltests wird daher verstärkt auch die Atemluftanalyse als Diagnoseverfahren mit Aceton als Marker diskutiert.

Mit der hier entwickelten Methode wurde die Atemluft eines Nicht-Diabetikers mit der eines Diabetikers im Verlauf einer Zeitspanne von 6 bzw. 7 Stunden verglichen. Von jedem Probanden wurden in dieser Zeit 8 Proben genommen und zeitnah zur Probenahme der Blutzuckerspiegel mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen Analysegerätes bestimmt. Die Konzentrationsverläufe und der Blutzuckergehalt sind für den Nicht-Diabetiker in Abbildung 19 und für den Diabetiker in Abbildung 20 dargestellt. Nahrungsaufnahme, beim Diabetiker verbunden mit Insulingabe, ist in den Abbildungen jeweils durch senkrechte Markierungen vermerkt. Zwischen Nahrungsaufnahme und Probenahme lagen bei allen Proben mehr als 30 min.

Der Blutzuckerspiegel des Nicht-Diabetikers lag im Tagesmittel bei einer Konzentration von 98 mg/dL, wobei die Extrema bei 64 mg/dL und 150 mg/dL lagen. Die verhältnismäßig hohen Konzentrationen der ersten beiden Proben sind auf den Hungerzustand des Probanden zurückzuführen, der auch durch den niedrigen Blutzuckergehalt belegt wird. Zu diesem Zeitpunkt lag ein Mangel an Kohlenhydraten im Körper vor. Die von Muskeln und Fettgewebe benötigte Energie wird zum Ausgleich dieses Mangels verstärkt durch Lipolyse bereitgestellt, mit der eine erhöhte Ketonkörperbildung einhergeht. Die Nahrungsaufnahmen um 8 Uhr und um 10 Uhr (fettarme und kohlenhydratreiche Nahrung) führten zu einem kurzfristigen Anstieg des Blutzuckers, d.h. es wurden deutliche Mengen an Kohlenhydraten aufgenommen und anschließend metabolisiert. Für die Energiebilanz bedeutet dieser Vorgang einen abnehmenden Beitrag durch Fettabbau, d.h. auch eine verringerte Acetonproduktion, bei zeitgleich steigendem Beitrag durch den Kohlehydrat- bzw. Glucosestoffwechsel. Nach dieser langsamen Abnahme des Acetongehalts in der Atemluft setzte ab ca. 12 Uhr wieder ein verstärkter Hungerzustand mit entsprechendem Fettsäureabbau ein. Die Acetonkonzentrationen stiegen im Rahmen dieses Prozesses bis zur Nahrungsaufnahme um 13 Uhr wieder deutlich an. In dieser letzten Probe der Reihe ist neben einem erhöhten Blutzuckerspiegel eine entsprechend niedrige Acetonkonzentration durch die Glucosezufuhr zu erwarten. Der reale Wert zeigt jedoch einen

erneuten Acetonanstieg. Dieser lässt sich erklären, wenn man ihn als Produkt zweier unterschiedlicher Stoffwechselvorgänge interpretiert. Er besteht zu einem Teil, der niedriger als in der vorangegangenen Probe sein sollte, aus dem durch Lipolyse hervorgerufenen „Hunger-Aceton“ und zu übrigen Teil aus dem im Rahmen des normalen Fettmetabolismus produzierten Aceton. Insgesamt kann für einen Nicht-Diabetiker niedriger Blutzucker, d.h. Glucosedefizit, mit erhöhter Lipolyse bzw. Acetonproduktion korreliert werden. Außerdem wird deutlich, dass der Blutzucker in Abhängigkeit der Glucoseaufnahme starken Schwankungen unterliegt. Diese sind auf die extrem schnelle Umsetzung des Zuckers durch das Insulin zurückzuführen. Literaturangaben zum Acetongehalt in Atemluft bei Menschen und Mäusen, die kohlehydratarm und fettreich ernährt wurden, belegen die hier vorgestellten Versuchsergebnisse [91-93].

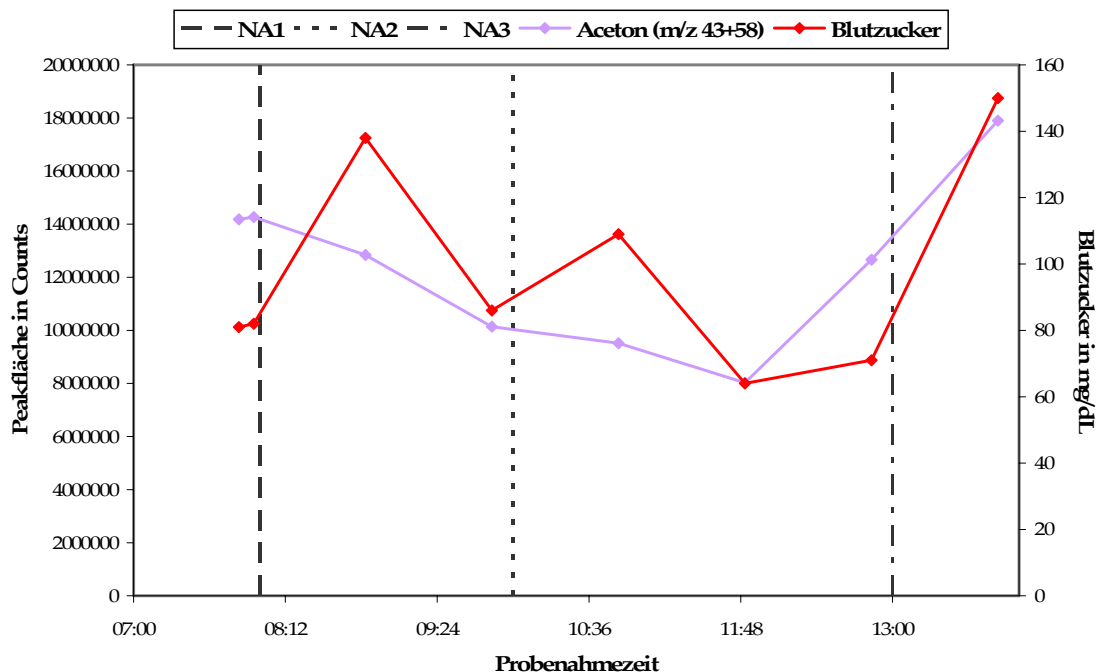


Abbildung 19 Verlauf der Acetonkonzentration in der Atemluft und Blutzuckerspiegel bei einem Nicht-Diabetiker (NA=Nahrungsaufnahme)

Der Blutzucker des Diabetikers lag trotz gezielter Insulingabe auf einem deutlich höheren Niveau als bei dem Nicht-Diabetiker. Es wurde ein Tagesmittelwert von 139 mg/dL festgestellt. Die Extrema lagen in diesem Fall bei 96 mg/dL und 177 mg/dL. Der Verlauf des Blutzuckers ist, unabhängig von seinem höheren Niveau, durch die Zuführung körperfremden Insulins mit dem eines Nicht-Diabetikers vergleichbar. Entsprechend ist bei Nahrungsaufnahme ein Anstieg der Glucosekonzentration im Blut zu beobachten. Ohne gezielte Insulingabe wäre letzterer deutlich höher. Dies ist auf die veränderten Stoffwechselvorgänge eines

Diabetikers zurückzuführen. Durch den Insulinmangel wird neben einer Verminderung des Glucoseabbaus im Blut auch dessen Transport, Aufnahme und Speicherung im Muskel- und Fettgewebe unterbunden. Stattdessen wird ähnlich wie im Hungerzustand die fehlende Energie durch Gluconeogenese, d.h. in diesem Fall hauptsächlich durch Lipolyse bei gleichzeitiger erhöhter Ketonkörperbildung, gewonnen. Gleichzeitig zum chronisch veränderten Stoffwechsel wird jedoch durch Gabe von Insulin der natürliche Stoffwechsel aktiviert. Dieses führt zu einer Überlagerung beider Effekte und wird durch deutliche Schwankungen der Acetonkonzentration sichtbar (siehe Abbildung 20). Eine Wichtung beider Effekte kann anhand der Messdaten nicht vorgenommen werden. Und auch eine eindeutige Korrelation zwischen Blutzucker und Acetonkonzentration ist durch die punktuelle Gabe des Insulins und der damit verbundenen Veränderung des diabetischen Stoffwechsels nicht möglich. Der Vergleich der Acetonkonzentrationen beider Probanden zeigt Werte in annähernd derselben Größenordnung, keinesfalls aber signifikant höhere Konzentrationen beim Diabetiker, eher beim Nicht-Diabetiker.

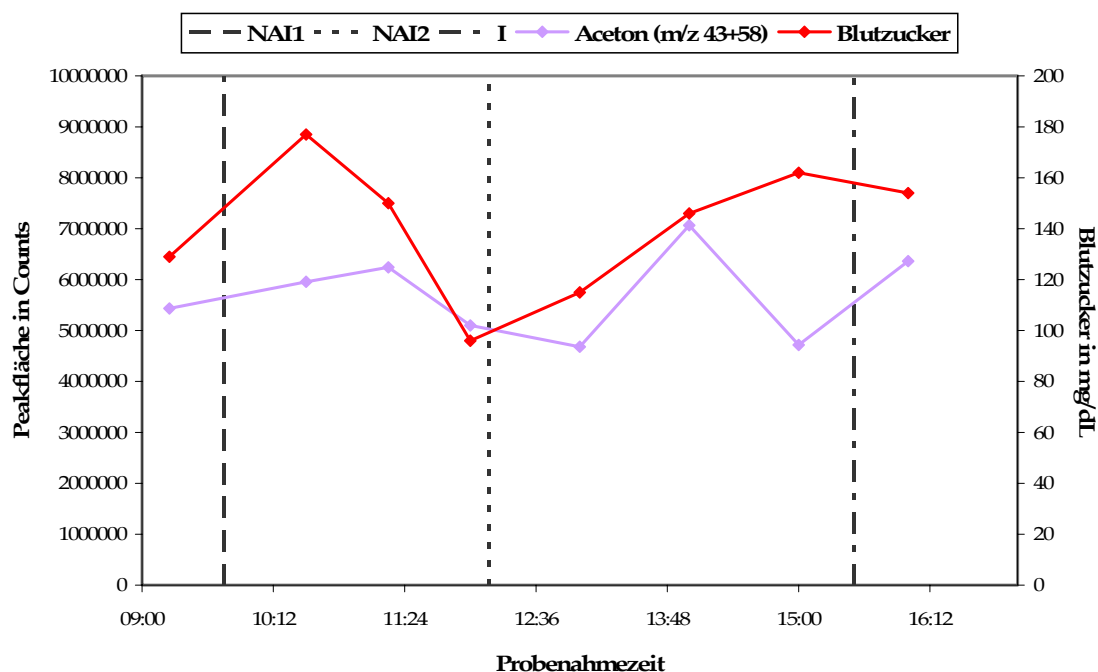


Abbildung 20 Verlauf der Acetonkonzentration in der Atemluft und Blutzuckerspiegel bei einem Diabetiker (NAI=Nahrungsaufnahme+Insulin; I=Insulin)

Beim zweiten Krankheitsbild handelte es sich um eine starke Erkältung, verbunden mit einer Entzündung im Halsbereich. Im Verlauf der Krankheit wurde von dem erkrankten Probanden jeden Morgen (Montag-Freitag) eine Atemluftprobe abgegeben. Der Ernährungszustand und die äußere Bedingungen waren an allen Tagen vergleichbar. Die Untersuchung der Proben zeigte besonders für Montag auffällig erhöhte Konzentrationen an Dimethylsulfid. Der in Abbildung 21 dargestellte Verlauf dieses Analyts korreliert mit dem Krankheitsverlauf, insbesondere der Entzündung im Halsbereich. Montags wird die maximale Konzentration der Woche beobachtet, die dienstags bereits abgenommen hat und sich zwischen Mittwoch und Freitag auf einem niedrigeren Niveau einstellt. Um zu sehen, ob die Dimethylsulfidkonzentrationen des erkrankten Probanden wirklich deutlich erhöht waren, wurde nach Gleichung 4 ein Student t-Test für die Peakfläche des Dimethylsulfids vorgenommen. In diesem wurde ein zweiseitiger Vergleich der Mittelwerte der Peakflächen des Dimethylsulfids mit denen einer Gruppe von 13 gesunden Probanden vorgenommen. Die Irrtumswahrscheinlichkeit  $\alpha$  wurde gleich 5 % gesetzt. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Tabelle 17 zusammengestellt. Demnach muss für die Peakfläche am Montag und auch am Dienstag eine Gleichheit mit dem Mittelwert der gesunden Gruppe ausgeschlossen werden. Wohingegen ab Mittwoch eine Gleichheit besteht. Die beiden ersten Werte geben damit Hinweise auf eine deutliche Veränderung der Atemluft über die normalen Schwankungen hinaus. Es kann an dieser Stelle, da es sich um die Untersuchung einer einzelnen Person mit diesem Krankheitsbild handelte, jedoch kein konkreter Marker z.B. hier für eine Entzündung im Halsbereich benannt werden. Um die eindeutige Korrelation zwischen dieser Entzündung und der erhöhten Dimethylsulfidkonzentration in der Atemluft bestimmen zu können, müssten mehrere Probanden mit der gleichen Erkrankung untersucht werden.

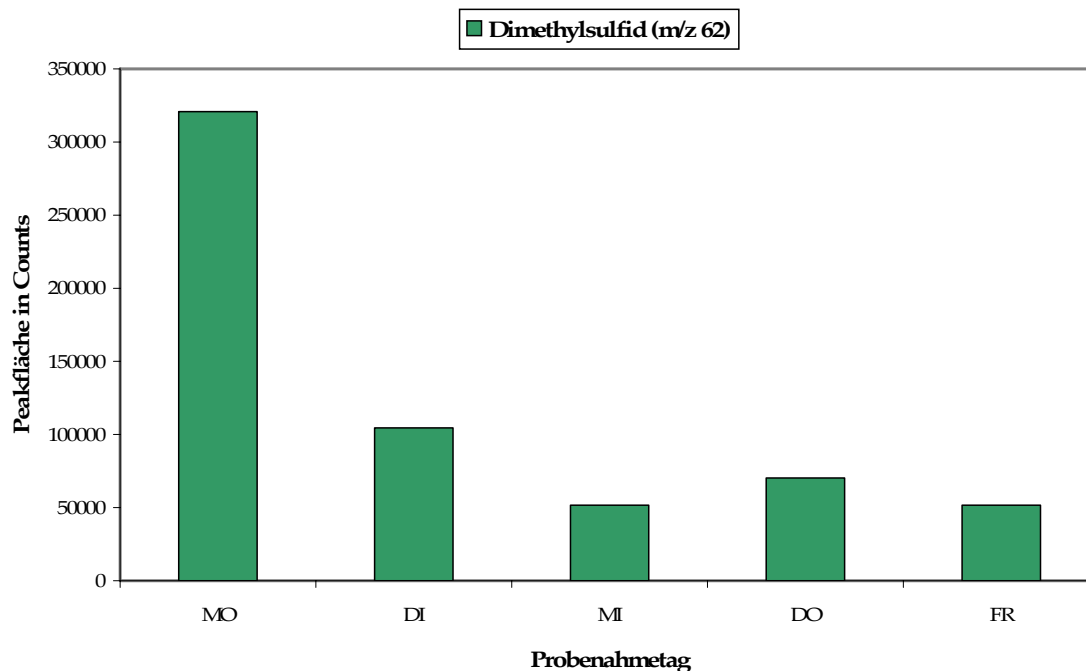


Abbildung 21 Dimethylsulfid im Verlauf einer Erkältungskrankheit mit Entzündung im Halsbereich

Tabelle 17 t-Test unter Annahme gleicher Varianzen für die Peakfläche des Dimethylsulfids im Verlauf der Erkältungskrankheit (Mo-Fr)

	MO	DI	MI	DO	FR
Mittelwert (n=13)	42361	42361	42361	42361	42361
t-Wert	12,38	2,76	0,42	1,24	0,42
$t_{\alpha}$ -Wert	2,18	2,18	2,18	2,18	2,18
Wahrscheinlichkeit P	0,00	0,02	0,68	0,24	0,69
Irrtumswahrscheinlichkeit $\alpha$	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05

Somit konnten mit der entwickelten Methode eindeutig Unterschiede in der Zusammensetzung der Atemluft erkrankter bzw. nicht erkrankter Probanden festgestellt werden. Es besteht damit das Potential zur Charakterisierung von Veränderungen der ausgeatmeten Luft bedingt durch krankhafte Veränderungen des Stoffwechsels. Steht darüber hinaus eine größere Gruppe von Patienten mit gleicher Erkrankung zur Verfügung, so ist die Bestimmung konkreter Marker-Substanzen für die jeweilige Krankheit denkbar.

### 3 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine zuverlässige, nachweisstarke, reproduzierbare Methode zur Probenahme und zur Analyse von humanen, expiratorischen Atemluftproben entwickelt. Für eine verlustarme und gleichzeitig reproduzierbare Probenahme war die Berücksichtigung des Anteils hydrophiler Analyte von besondere Bedeutung. Aus diesem Grund wurde der Eintrag geringer Mengen von Wasser in das Messsystem durch die Feuchtigkeit der Probe in Kauf genommen. So konnte der Verlust hydrophiler Analyte, der mit einer Trocknung einhergeht sowie durch Kondensationseffekte bedingt sein kann, minimiert werden. Durch die Wahl einer adsorptiven Probenahmetechnik unter Verwendung von Tenax, welches auch für feuchte Proben und für ein breites Analytspektrum gut geeignet ist, konnte eine technisch einfache, blindwertarme, ortsunabhängige, universell einsetzbare Probenahmetechnik entwickelt werden, bei der zudem die Proben gut transportiert und bis zur Messung verlustfrei gelagert werden können. Außerdem lassen sich die Adsorptionsröhrchen einfach regenerieren. In Räumen mit niedriger Luftbelastung kann auf eine Korrektur der Atemluftproben bezüglich der aktuellen Raumluftzusammensetzung und auf eine Beatmung der Probanden mit synthetischer Luft verzichtet werden. Der Einfluss der eingeatmeten Luft auf die Zusammensetzung der ausgeatmeten Luft lag deutlich unter der normalen Schwankung vergleichbarer Atemluftproben.

Durch die Verwendung von Thermodesorption gekoppelt mit Cryofokussierung gelang eine schonende, reproduzierbare Probenaufgabe sowie die Trennung und der Nachweis der Analyte mittels eines GC/MS-Systems, was insbesondere für die vielen niedermolekularen, leichtflüchtigen Verbindungen der Atemluft von entscheidender Bedeutung war. Durch Nachweisgrenzen im unteren ng/L bzw. ppb<sub>v</sub>-Bereich (Scan-Modus) konnten selbst Analyte im Ultraspurenbereich noch gut nachgewiesen werden. Der quantitative Nachweis ausgesuchter Standard-Verbindungen gelang durch die Modifizierung einer Testgasquelle, basierend auf dem Diffusionsprinzip. Auf diesem Weg war die Herstellung individueller, lange haltbarer Gasstandards möglich, die zudem relativ einfach an das Analytspektrum der Atemluft angepasst werden können.

Alle Probenahme- und Analysebedingungen wurden so gewählt, dass die möglichst vollständige, reproduzierbare und störungsfreie Auswertung eines breiten Substanzspektrums möglich ist. Auf eine Optimierung hinsichtlich einer speziellen Zielgruppe von Verbindungen z.B. nach Polarität, Masse oder Substanzgruppe wurde bewusst verzichtet. Solange keine einheitlichen, spezifischen Marker für ein Krankheitsbild bekannt sind, birgt eine vorzeitige Spezialisierung auf eine bestimmte Substanzgruppe das Risiko, wichtige Informationen oder sogar Marker bei der Analyse nicht zu erfassen. In diesem Zusammenhang ist die einseitige Blickrichtung auf z.B. ausschließlich aliphatische oder aus-

schließlich aromatische Marker unzureichend, nicht zuletzt, da Vertreter beider Gruppen auch in der Atemluft gesunder Probanden gefunden werden konnten.

Die Anwendung der entwickelten Methode zeigte beim Einsatz am Probanden eine ausgezeichnete Reproduzierbarkeit, Nachweisstärke und Eignung für ein sehr breites Substanzspektrum. Insgesamt konnten mehr als 150 verschiedene Analyte nachgewiesen werden, rund 50 % davon waren Raucher-typisch. Die Untersuchung von Nichtrauchern führte zum Nachweis von durchschnittlich 30-50 Verbindungen, von denen mehr als 75 % ausschließlich aus endogenen Quellen stammen, d.h. durch Stoffwechselprozesse bedingt sind. Die Analyte Ethanol, Aceton, Isopren, 2-Propanol, Dimethylsulfid, Benzol, Toluol,  $\alpha$ -Pinen und Limonen konnten in allen untersuchten Proben gefunden werden. 1-Propanol, Ethylbenzol, Xylol, Ethylmethylbenzol,  $\beta$ -Pinen, Cymol und Eucalyptol waren in mehr als 70 % aller Proben enthalten. Diese Verbindungen sind entsprechend für die ausgeatmete Luft eines gesunden Probanden normal. Ihre Verwendung als Marker für spezielle Ereignisse schließt sich für die qualitative Analyse aus, ist aber unter Umständen bei einer quantitativen Auswertung der Zielkomponenten möglich.

Mit Hilfe statistischer Untersuchungen konnte festgestellt werden, dass die Zusammensetzung der Atemluft - beschränkt auf ausgewählte Verbindungen - unabhängig von Geschlecht oder Alter der Probanden ist. Raucher hingegen konnten durch ein deutlich größeres Analytspektrum und durch die qualitativen Marker 2-Methylfuran und 2,5-Dimethylfuran sowie durch erhöhte Konzentrationen von Benzol und Toluol statistisch signifikant identifiziert werden.

Neben Tabak wurde der Einfluss von Alkoholkonsum, von Mundhygienartikeln (Zahnpasta), von Arzneimitteln gegen Atemwegserkrankungen sowie von ausgewählten Nahrungsmitteln (u.a. Knoblauch, Zwiebeln, Käse) auf die Atemluft untersucht. Durch die Zahnpasten und Arzneimittel wurden hauptsächlich Terpene und deren Oxidationsprodukte in die Atemluft eingetragen. Diese Komponenten stammen überwiegend aus Eucalyptusöl und Pfefferminzöl. Beide Öle werden wegen ihrer natürlichen, lang anhaltenden Aromen und wegen ihrer Wirkstoffe zur Reizlinderung in den Atemwegen eingesetzt. Die gefundenen Analyte sind 1-2 Stunden nach Aufnahme noch in der ausgeatmeten Luft. Sie geben Hinweise auf den Konsum bzw. Kontakt mit den beiden Ölen und können wegen der vielfältigen Anwendungsmöglichkeiten nicht als charakteristische Komponenten eines einzelnen Eintragspfades gelten. Auch für die Erkennung von stoffwechselbedingten Veränderungen der Atemluft eignen sich Terpene und deren Oxidationsprodukte damit nur sehr bedingt.

Alkoholkonsum beeinflusste die ausgeatmete Luft noch mindestens 1-2 Stunden nach der Aufnahme. Da jedoch neben beabsichtigter Aufnahme durch alkoholhaltige Getränke und Speisen auch vielfach Alkoholaufnahme durch reifes Obst, Medikamente, Atemsprays, Mundspülungen u.a. erfolgt, ist eine Verwendung von Ethanol als Marker für Veränderungen im Stoffwechsel ausgeschlossen.

---

Der Konsum von Alliumgewächsen wie Knoblauch und Zwiebeln, aber auch von stark riechendem Käse führt zu einem deutlichen Eintrag von organischen Schwefelverbindungen in die ausgeatmete Luft, der auch nach mehreren Stunden noch die Atemluftzusammensetzung beeinflusst. Als Aromastoff des Käses wurde Dimethyldisulfid identifiziert, für Alliumgewächse eine Vielzahl an Mono- bis Trisulfiden. Charakteristisch für Knoblauchkonsum ist Allylmethylsulfid.

Eine Vielzahl weiterer untersuchter Nahrungsmittel zeigte gar keine oder nach Ablauf einer Stunde bereits keine nachhaltige Wirkung auf die ausgeatmete Luft. Dennoch sollte mindestens 1 Stunde vor der Probenahme die Aufnahme jeglicher Nahrung, Getränke, Arzneimittel und aller Duftstoffe vermieden werden, um die Matrix für diagnostische Anwendungen möglichst einfach und überschaubar zu halten.

Durch die Untersuchung erster Krankheitsbilder, hier Diabetes Mellitus und Erkältungserkrankung, wird das diagnostische Potential der entwickelten Methode deutlich. Es ist möglich, selbst geringfügige Veränderungen der Zusammensetzung der Atemluft auszumachen. So konnte eindeutig die im Rahmen einer Erkältung erhöhte Dimethylsulfidkonzentration erkannt werden. Auch der durch Stoffwechselvorgänge veränderte Verlauf der Acetonkonzentration bei einem Diabetiker im Vergleich zu einem Nicht-Diabetiker wurde eindeutig gezeigt. Beide Analyte geben Hinweis auf das diagnostische Potential der Methode, können jedoch nicht als qualitative Marker für die jeweilige Krankheit benannt werden, da sie auch in der Atemluft gesunder Probanden vorkommen. Eine Anwendung als quantitativer Marker ist für das Dimethylsulfid möglich, für Aceton hingegen nicht. Die Acetonkonzentration der Atemluft unterliegt schon beim gesunden Probanden deutlichen Schwankungen. Sie wird in starkem Maße durch den Hungerzustand (zur Verfügung stehende Energie aus der letzten Mahlzeit), die Ernährungsweise (spezielle Diäten oder glucosearme und fettreiche Ernährung) und die Art der aufgenommenen Nahrung (lipidsenkende Nahrungsmittel wie Knoblauch) beeinflusst. Eine deutlich höhere Acetonkonzentration beim Diabetiker, die die Vernachlässigung der benannten Effekte erlauben würde, konnte im Rahmen der hier durchgeführten Einzelmessung nicht beobachtet werden.

## 4 Ausblick

Diese Arbeit hat neben der Methodenentwicklung auch die Einflüsse des täglichen Lebens auf die Zusammensetzung der Atemluft aufgezeigt. Das heißt, mit der Charakterisierung der Atemluft eines gesunden Menschen (Tabelle 6, Tabelle 9) wurden Analyte ermittelt, die für eine qualitative Betrachtungen von krankheitsbedingten Veränderungen nicht zur Verfügung stehen. Auch die in Tabelle 13 aufgeführten Analyte aus Zigarettenrauch, die Inhaltsstoffe von Zahnpasta (Tabelle 14) und die Inhalts- und Wirkstoffe unterschiedlicher Arzneimittel (Tabelle 15) sind als qualitative Marker nicht geeignet. Gleiches gilt für die organischen Schwefelverbindungen aus Alliumgewächsen und Käse, Terpene, insbesondere Limonen, aus Zitrusfrüchten und Fruchtsäften sowie Estern aus Obstsorten wie Bananen und Erdbeeren (Kap. 2.4.5). Wenn überhaupt, ist für die oben genannten Verbindungen lediglich der Einsatz als quantitativer Marker denkbar.

Die bisher erhaltenen Ergebnissen bei diagnostischer Fragestellung zeigen, dass mit der entwickelten Methode die Detektion selbst kleinster Mengen zusätzlich auftretender Verbindungen möglich ist. Ferner wird auf der Basis der über die Kontrollgruppe bestimmten Analytverhältnisse eine quantitative Veränderung im untersuchten Analytspektrum sichtbar. So könnte die Untersuchung der Atemluft mehrerer Patienten eines Krankheitsbildes zur Charakterisierung spezifischer Analyte oder auch Analytverhältnisse herangezogen werden und Hinweis auf eine bestimmte Krankheit geben. Neben der Entwicklung der Atemluftanalyse zu einem Screening-Verfahren ist die Etablierung zu einer eigenständigen Diagnosemethode erstrebenswert. Diese Methode bliebe nicht auf die Erkennung von Atemwegserkrankungen beschränkt sondern ermöglichte die Diagnose zahlreicher anderer Erkrankungen, durch die spezifische Analyte freigesetzt und über den Blutkreislauf in die Atemluft eingebracht werden. Ersten Hinweisen zufolge ist dies für Erkrankungen von Leber und Darm wahrscheinlich. Die Diagnose mittels der vorgestellten Methode besitzt dabei mehrere Vorteile gegenüber etablierten Verfahren. Neben einer relativ schnellen Analytik hat sie den unbedingten Vorteil, dass kein invasiver Eingriff erforderlich ist. Ein weiterer Vorteil ist, dass sie frei von jeglichen Nebenwirkungen ist und damit in kurzen Zeitabständen wiederholt werden kann und auch für schwache Probanden zumutbar ist. Außerdem ist die Probenahme unabhängig vom Ort der Analyse und technisch einfach durchzuführen, so dass sie auch von Pflegepersonal vorgenommen werden kann.

Darüber hinaus ist ein Einsatz der entwickelten Methode zur Verfolgung der Wirkweise von Medikamenten oder zur Früherkennung im Rahmen einer hausärztlichen Vorsorgeuntersuchung denkbar.

---

Insgesamt bietet diese Arbeit durch eine umfassende qualitative und quantitative Charakterisierung der Atemluft gesunder Probanden, unter Berücksichtigung unterschiedlichster Matrices, eine sichere Grundlage, die nun die gezielte Suche nach spezifischen Markern für Stoffwechselveränderungen und Krankheiten ermöglicht.

## 5 Material und Methoden

### 5.1 Probenahmebedingungen bei Probanden

Alle Probanden durften mindestens 1 Stunde vor der Probenahme nicht mehr essen, trinken und rauchen. Vor der Probenahme wurde eine 15minütige Equilibrierzeit mit der Raumluft am Ort der Probenahme eingehalten. Die Probenahme erfolgte durch ein Teflonmundstück unter Vermeidung von Speichereintrag. Sie wurde durch eine Membranpumpe mit einer Leistung von 0,5 mL/min unterstützt. Das Probenahmenvolumen betrug 1 L und wurde mit Hilfe einer Gasuhr kontrolliert. Der Proband atmete während der Probenahme durch die Nase. Im Fall einer Probenahme mit Atemmaske atmete der Proband angefeuchtete synthetische Luft ein. Der Gasfluss war auf ca. 4 L/min eingestellt. In einer Waschflasche wurde eine relative Luftfeuchtigkeit von ca. 50 % eingestellt. Es sollte tief ausgeatmet werden, um einen möglichst großen Anteil end-expiratorischen Atems zu sammeln.

Die Mundstücke wurden nach jeder Probenahme gründlich mit Leitungswasser gespült, mit entionisiertem Wasser abgespritzt und bei 120 °C im Trockenschrank sterilisiert. Die Messung der Proben erfolgte direkt oder nach Lagerung bei 7 °C.

### 5.2 Herstellung von externen Standards

Für die Herstellung externer Gasstandards wurden in Glasgefäße (Abbildung 22) mittels Zweikomponentenkleber eine *fused silica* Kapillare eingeklebt. Die jeweilige Länge der Kapillare kann Tabelle 18 entnommen werden. 200 mm entsprachen dem durch die Geometrie des temperierten Glasgefäßes gebotenen Maximum.

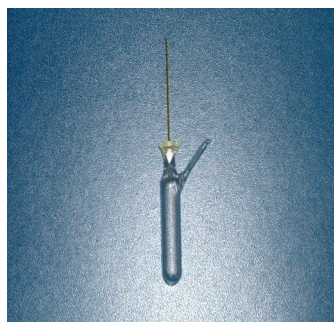


Abbildung 22 Diffusionsgefäß für einen Analyt der Testgasquelle

Die Diffusionsgefäße wurde über den Einfüllstutzen mit ca. 1,5 mL eines Analyts gefüllt und anschließend zugeschmolzen. Danach wurden alle gefüllten Diffusionsgefäße gewogen und in das auf 25 °C temperierte Glasgefäß eingesetzt. (Isopren wurde in einem auf 15 °C temperierten, separaten Glasgefäß aufbewahrt. Der Stickstoffstrom durch diese Quelle betrug 300 mL/min). Der Gasstrom  $j_1$  aus der Testgasquelle betrug konstant 120 mL/min. Der Verdünnungsstrom  $j_2$  wurde zwischen 3000 und 9000 mL/min eingestellt. Vor der Probenahme wurde eine 60minütige Equilibrierzeit eingehalten. Die Konzentration wurde über den Fluss  $j_3$  und die Zeit der Probenahme variiert. Der Fluss  $j_3$  war dabei variabel über einen Bereich von 15-200 mL/min mit einer Membranpumpe regulierbar.

Die gravimetrische Kontrolle des Masseverlustes der Diffusionsgefäße wurde über 12 Monate in Intervallen von 1 bis 2 Wochen bestimmt. Tabelle 18 zeigt die Kapillarlänge der Diffusionsgefäße, die Diffusionsrate  $r$  nebst zugehöriger relativer Standardabweichung der einzelnen Substanzen.

Tabelle 18 Diffusionsgefäße mit Diffusionsraten

<b>Analyt</b>	<b>Kapillarlänge in mm</b>	<b>Wägungen n=Anzahl</b>	<b>Diffusionsrate <math>r</math> in ng/min</b>	<b>RSD %</b>
Ethanol	120	30	1729	9
Aceton	200	37	842	12
Isopren	200	16	2270	66
2-Propanol	121	8	201	25
1-Propanol	120	26	1492	10
Benzol	200	33	1655	9
2-Pentanon	120	35	2392	4
DMDS	980	13	682	10
Toluol	120	32	596	9
$\alpha$ -Pinen	27	36	94	27
$\beta$ -Pinen	17	36	106	23
Limonen	21	34	36	52

### **5.3 Vorbereitung der Probenahmeeinheiten**

#### **5.3.1 Tedlar-Beutel**

1 L Tedlar-Beutel wurden, wie vom Hersteller empfohlen, vor dem ersten Gebrauch einmal mit Stickstoff gespült. Gebrauchte Beutel wurden unmittelbar vor Wiederverwendung 10mal diskontinuierlich mit Stickstoff gespült. Die Lagerung von Proben im Beutel ist nicht möglich.

#### **5.3.2 Adsorptionsröhrchen**

Die Glasröhrchen der Thermodesorptionseinheit wurden zur Minimierung aktiver Oberflächen durch Silanisierung deaktiviert. Die Silanisierung wurde folgendermaßen durchgeführt: Temperierung der Glasröhrchen auf 120 °C, 5minütiges Tauchbad in einer Lösung aus n-Hexan mit 5 % Dimethyldichlorsilan, Neutralisierung überschüssigen Dimethyldichlorsilans in Methanol, Trocknung bei 120 °C [81].

Die Adsorbentien Tenax, Carbotrap und Carboxen wurden nacheinander 18 h mit Methanol unter Rückfluß extrahiert. 200 mg Adsorbens wurden in die silanierten Glasröhrchen gepackt. Bei Kombination zweier Adsorbentien wurden diese zu gleichen Teilen verwendet. Die Positionierung erfolgte mittels Glaswolle. Die Verdichtung der Packung wurde durch Anlegen eines Wasserstrahlpumpenvakuums erreicht. Die Röhrchen wurden mit Swagelok-Ferrules versehen und 12 Stunden bei 200 °C unter kontinuierlicher Stickstoffspülung konditioniert. Benutzte Röhrchen, deren Probe bereits desorbiert wurde, können unter gleichen Bedingungen wieder gereinigt werden. In regelmäßigen Stichproben wurden mehrfach verwendete Röhrchen unter realen Messbedingungen auf Blindwerte kontrolliert.

#### **5.3.3 Vorbereitung der Trockenröhrchen**

Silanisierte Glasröhrchen mit einem Außendurchmesser von 6 mm wurden mit 0,6 g Molekularsieb mit einem Porendurchmesser von 3 Å gefüllt und durch Teflonringe fixiert. Konditionierung und Rekonditionierung wurden unter gleichen Bedingungen wie bei den Adsorptionsröhrchen (Kap. 5.3.2) durchgeführt.

### **5.4 Geräte und Methoden**

#### **5.4.1 TD/GC/MS-System**

Für einige Proben wurde ein Gaschromatograph vom Typ ITS 40 Magnum verwendet. Dieses System besteht aus einem GC der Fa. Varian und einer Ionenfalle der Fa. Finnigan. Durch Aufrüstung für MS/MS kann das System auch mit der Saturn-Software von Varian bedient werden. Der Großteil der Messungen wurde jedoch mit dem GC/MSD-System 5973 Network der Fa. Agilent Technologies durchgeführt, das aus einem Gaschromatographen vom Typ 6890N mit

Kaltaufgabesystem (CIS) und einem Quadrupolmassenspektrometer bestand. Als Probengeber wurde ein Thermodesorptionssystem-Autosampler (TDSA) der Firma Gerstel eingesetzt. Für die Auswertung der Chromatogramme wurde die Software *AMDIS 2.1* mit *NIST 2.0* (US Department of Commerce, Technology Administration, Gaithersburg, USA) und das Programm *Enhanced Chem Station G1701 DA*, Version D.00.00.38 (Agilent Technologies) verwendet. Weitere, detaillierte Informationen zu Methoden und Einstellungen können Tabelle 19 entnommen werden.

Tabelle 19 Methoden und Einstellungen

Methode / Einstellung	Modus	Parameter
Kapillarsäulen		<i>HP-5MS</i> : 30 m x 250 µm x 0,25 µm <i>SB-11</i> : 60 m x 250 µm x 0,25 µm
CS-fused-silica Säule		FS Methyl-Sil-desaktiviert; 530 µm Innendurchmesser
Trärgas		1,0 mL/min Helium 5.0
TP Thermodesorption		25 °C//30 °C/min//200 °C (3,4 min)
T Transferline (TDSA/CIS)		270 °C
T Cryotrap		-120 °C
TP Probenaufgabe (Cryotrap)	splitlos	-120 °C//30 s//250 °C (1,5 min)
TP GC		37 °C (2 min)//5 °C/min//100 °C// 10 °C/min//200 °C (5 min)
Rekonditionierung der Säule (Nacht)		CIS: 100 °C GC: 120 °C
T Transferline (GC/MSD)		230 °C
T Quelle		230 °C
Detektor		1482 V
Emissionsstrom		34,6 µA
Ionisierung	EI	70 eV
Scan Modus	full scan	35-300 amu
T	Temperatur	
TP	Temperaturprogramm	

### 5.4.2 Kleingeräte und Verbrauchsmaterialien

Tabelle 20 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Gerät	Angaben	Hersteller
Analysewaage	Micro MC 210P Max 210 g	Sartorius, Göttingen
Diffusionsgefäße	Spezialanfertigung	Glasbläser, Uni Dortmund
Gasuhr	F.Nr. 4132 (1986) Größe: G4/6 Volumen: 5 dm <sup>3</sup>	ELSTER Handel GmbH, Mainz
Glasröhrchen	Desorptionsrohr für GERSTEL TDS 2, ungefüllt	Gerstel, Mühlheim an der Ruhr
GC-Ofen	Sichromat 1, umgebaut zur Konditionierung von Röhrchen	Siemens, Karlsruhe
Membranpumpe	Type N 022 AN. 18 Nr. 630069 220 V; 50 Hz; 0,08 kW A: 0,75 L	
µL-Spritzen	10 µL; 100 µL; gasdicht	Hamilton Bona- duz AG, Bonaduz (CH)
Tedlar-Beutel	Probenahmebeutel, 1 L	Fa. Analyt- MTC, Müllheim
Teflon-Schläuche	unterschiedliche Innendurch- messer	CS-Chromato- graphie Service GmbH, Langerwehe
Schlauchverbindungen, Endkappen		Swagelock, Swisttal

## 5.5 Chemikalien und Lösungsmittel

Tabelle 21 Verwendete Chemikalien und Lösungsmittel

Substanz	CAS-Nr.	Reinheit	Hersteller
Aceton	67-64-1	> 99,8 % GC; mind. 99,5 %	Merck <sup>1</sup> ; Roth <sup>2</sup>
Benzol	71-43-2	mind. 99,7 %	Merck <sup>1</sup>
(+)-Camphen	79-92-5	95 % GC	Merck <sup>1</sup>
Carbotrap <sup>TM</sup> , 20/40 mesh			Supelco <sup>3</sup>
Carboxen <sup>TM</sup> 1000, 60/80 mesh			Supelco <sup>3</sup>
(+)-3-Caren	13466-78-9	95 %	Aldrich <sup>4</sup>
p-Cymol	99-87-6	99,5 % GC	Fluka <sup>4</sup>
Dichlordimethylsilan	75-78-5	> 98 % GC	Merck <sup>1</sup>
Dimethyldisulfid	624-92-0	98 %	Fluka <sup>4</sup>
Dimethylsulfid	75-18-3	97 %	Fluka <sup>4</sup>
Epoxidharzkleber, endfest 300 2-Komponenten			Uhu plus, Buhl
Ethanol	64-17-5	mind. 99,8 %	Merck Lichrosolv <sup>1</sup>
Heptanal	111-171-7	> 95 % GC	Fluka <sup>4</sup>
n-Hexan	110-54-3	suprasolv	Merck Suprasolv <sup>1</sup>
Hexanal	66-25-1	> 99,1 % GC	Fluka <sup>4</sup>
Isopren	78-79-5	> 98 % stabilisiert mit 0,01 % 4-tert.-Butylacetechol	Fluka <sup>4</sup>
(+)-Limonen	5989-27-5	> 98 % GC	Aldrich <sup>4</sup>
Menthol	1490-04-6	technisch	Apotheke, Herne
mind.	mindestens		
Merck/Chrompack <sup>1</sup>	Darmstadt		
Roth <sup>2</sup>	Karlsruhe		
Supelco <sup>3</sup>	Bellfonte (USA)		
Aldrich/Fluka <sup>4</sup>	Seelze		

Tabelle 21 Verwendete Chemikalien und Lösungsmittel

Substanz	CAS-Nr.	Reinheit	Hersteller
(-)-Menthon	14073-97-3	> 98 % GC	Fluka <sup>4</sup>
Methanol	67-56-1	> 99,9 % GC	Merck Lichrosolv <sup>1</sup>
Myrcen	123-35-3	technisch	Aldrich <sup>4</sup>
(trans-beta) Ocimen	13877-91-3	> 98 % GC	IFF, Hazlet (New Jersey)
n-Pentan	109-66-0	suprasolv	Merck Suprasolv <sup>1</sup>
2-Pentanon	107-87-9	> 99% GC	Merck <sup>1</sup>
(+) $\alpha$ -Pinen	7785-70-8	98 % GC	Aldrich <sup>4</sup>
(-) $\beta$ -Pinen	18172-67-3	> 99 % GC	Aldrich <sup>4</sup>
1-Propanol	71-23-8	mind. 99,5 % GC	Merck <sup>1</sup>
2-Propanol	67-63-0	über Molekularsieb, > 99,5% GC	Fluka <sup>4</sup>
(+)-Sabinen	2009-00-9	Rotichrom, Terpenstandard	Roth <sup>2</sup>
Tenax TA, 60/80 mesh			Chrompack <sup>1</sup>
$\gamma$ -Terpinen	99-85-4	95 %	Aldrich <sup>4</sup>
$\alpha$ -Terpineol	7785-53-7	GC-Standard	Merck <sup>1</sup>
Terpineol wasserfrei; Isomerengemisch	8006-39-1	purum	Fluka <sup>4</sup>
Toluol	108-88-3	99 % über Natrium	Aldrich <sup>4</sup>
<b>mind.</b>	<b>mindestens</b>		
<b>Merck/Chrompack<sup>1</sup></b>	<b>Darmstadt</b>		
<b>Roth<sup>2</sup></b>	<b>Karlsruhe</b>		
<b>Supelco<sup>3</sup></b>	<b>Bellfonte (USA)</b>		
<b>Aldrich/Fluka<sup>4</sup></b>	<b>Seelze</b>		

## 6 Anhang von Messdaten

Tabelle 22 Kontrollgruppe (weiblich)

Analyte	W 1	W 2	W 3	W 4	W 5	W 6	W 7	W 8	W 9	W 10	W 11	W 12	W 13	W 14
Alter	27	41	44	53	25	32	46	21	25	29	26	20	45	41
Raucher											R	R	R	R
Oxalsäure				x										
Butan			x	x	x		x							
Essigsäureanhydrid											x			
2-Methylbutan	x	x	x	x	x		x		x			x		
Ethanol	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Aceton	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Isopren	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
2-Propanol	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
C <sub>5</sub> H <sub>10</sub>														x
DMS	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
C <sub>5</sub> H <sub>6</sub> (1,3-Cyclopentadien)												x	x	x
Methylacetat														x
CS <sub>2</sub>											x			
1-Propanol		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x		x	
C <sub>3</sub> H <sub>4</sub> Cl <sub>2</sub>									x					
2,3-Butandion					x	x	x	x				x	x	
C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>		x												
2-Butanon				x		x	x				x	x	x	
2-Methylfuran											x	x	x	
C <sub>6</sub> H <sub>12</sub>												x	x	
Ethylacetat													x	
C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>		x												
C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> (Cyclohexadien)											x	x	x	
C <sub>6</sub> H <sub>10</sub>														x
C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> (Methylcyclopentadien)											x	x	x	x

Tabelle 22 Kontrollgruppe (weiblich)

Analyte	W 1	W 2	W 3	W 4	W 5	W 6	W 7	W 8	W 9	W 10	W 11	W 12	W 13	W 14
Alter	27	41	44	53	25	32	46	21	25	29	26	20	45	41
Raucher											R	R	R	R
C <sub>6</sub> H <sub>10</sub>												x		x
C <sub>6</sub> H <sub>8</sub>														x
C <sub>6</sub> H <sub>10</sub>												x		x
Benzol	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
2-Methylhexan	x		x		x		x	x						
C <sub>6</sub> H <sub>8</sub>												x		x
3-Methylhexan								x				x		
Cyclohexen												x		
Heptanol												x		x
2-Pentanon						x				x	x			
C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> S	x		x		x	x			x	x	x	x		x
Heptan			x		x				x		x	x		x
C <sub>7</sub> H <sub>12</sub>												x		x
C <sub>7</sub> H <sub>14</sub>												x		x
2-Ethylfuran											x			
2,5-Dimethyl- furan											x	x	x	x
1-Methylthio- propan	x		x		x	x		x	x	x	x			
Methylcyclohe- xan									x					
1-Methylthio-1- propen										x				
1-Methylthio-1- propen	x		x						x	x	x			
C <sub>7</sub> H <sub>10</sub>												x		x
C <sub>8</sub> H <sub>18</sub>									x					
DMDS	x		x		x		x			x				x
C <sub>7</sub> H <sub>10</sub>												x		
C <sub>8</sub> H <sub>18</sub>									x					
C <sub>7</sub> H <sub>10</sub>														x
C <sub>7</sub> H <sub>12</sub>														x
C <sub>7</sub> H <sub>10</sub>												x		

Tabelle 22 Kontrollgruppe (weiblich)

Analyte	W 1	W 2	W 3	W 4	W 5	W 6	W 7	W 8	W 9	W 10	W 11	W 12	W 13	W 14
Alter	27	41	44	53	25	32	46	21	25	29	26	20	45	41
Raucher											R	R	R	R
C <sub>7</sub> H <sub>10</sub>														x
C <sub>7</sub> H <sub>10</sub>														x
Toluol	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
C <sub>9</sub> H <sub>20</sub>									x					
C <sub>8</sub> H <sub>16</sub>												x		
C <sub>8</sub> H <sub>16</sub> (Octen)														x
Octan	x		x		x						x	x	x	x
Tetrachlorethy- len	x	x	x	x							x			
C <sub>9</sub> H <sub>20</sub>									x					
Ethylbenzol	x	x	x		x	x	x	x	x		x	x	x	x
Xylol	x	x	x		x	x	x	x	x		x	x	x	x
4-Heptanon											x			
3-Buten-2-on													x	
2-n-Butylfuran														x
Styrol											x	x		x
Xylol	x	x	x		x	x	x	x	x		x	x	x	x
C <sub>9</sub> H <sub>20</sub> (Nonan)					x		x					x		
Bifuran														x
α-Pinen	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Camphen													x	
Propylbenzol														x
C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> (Menthadien)												x		x
C <sub>9</sub> H <sub>12</sub> (Ethylmethyl- benzol)	x	x	x		x	x	x	x	x		x	x	x	x
C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> (α-Phellandren)												x		
β-Pinen	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
Phenol				x	x	x	x		x	x				
β-Myrcen													x	x

Tabelle 22 Kontrollgruppe (weiblich)

Analyte	W 1	W 2	W 3	W 4	W 5	W 6	W 7	W 8	W 9	W 10	W 11	W 12	W 13	W 14
Alter	27	41	44	53	25	32	46	21	25	29	26	20	45	41
Raucher											R	R	R	R
Trimethylben- zol	x	x	x		x	x					x			x
Carveol													x	
3-Caren												x		
C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>													x	
C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>														x
C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> (Methen)														x
Cymol			x		x		x	x	x	x	x		x	x
Limonen	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
2-Ethyl-1-hexa- nol	x				x									
Sylvestren														x
Eucalyptol	x	x	x		x		x	x	x	x	x	x		x
C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>													x	
C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>													x	
C <sub>9</sub> H <sub>18</sub> O								x						
C <sub>9</sub> H <sub>18</sub> O								x						
γ-Terpinen									x				x	
C <sub>11</sub> H <sub>24</sub> (Undecan)														x
Nonanal														x
Menthon									x					
Menthofuran									x		x			
Menthol		x							x		x		x	
Decanal														x
Caran													x	
Caryophyllen					x								x	

Tabelle 23 Kontrollgruppe (männlich)

Analyte	M 1	M 2	M 3	M 4	M 5	M 6	M 7	M 8	M 9	M 10	M 11	M 12	M 13	M 14	M 15	M 16
Alter	27	31	48	48	52	57	55	53	24	48	17	26	57	25	26	48
Raucher											R	R	R	R	R	R
Butan													x		x	
1-Buten													x			
Acetalde- hyd															x	x
2-Methyl- butan		x	x	x	x		x		x		x					
Ethanol	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Aceton	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Isopren	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
2-Propanol	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
C <sub>5</sub> H <sub>10</sub>															x	
C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> O (1-Methoxy- pentan)													x	x		
DMS	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Methyla- cetat	x	x		x		x	x		x	x						
C <sub>5</sub> H <sub>6</sub> (1,3-Cyclo- pentadien)												x	x	x	x	x
Cyclopen- ten			x	x												
2-Methyl- pentan			x													
1-Propanol	x	x		x	x	x	x	x	x		x	x	x			x
C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> (1- Hexen)												x				
2,3-Butan- dion												x		x	x	x
Hexan					x								x			
Vinylace- tat			x					x								

Tabelle 23 Kontrollgruppe (männlich)

Analyte	M 1	M 2	M 3	M 4	M 5	M 6	M 7	M 8	M 9	M 10	M 11	M 12	M 13	M 14	M 15	M 16
Alter	27	31	48	48	52	57	55	53	24	48	17	26	57	25	26	48
Raucher											R	R	R	R	R	R
2,2,3,3-Tetramethylbutan														x		
2-Butanon	x			x	x	x	x						x			x
2-Methylfuran												x	x	x	x	x
C <sub>6</sub> H <sub>12</sub>												x	x	x	x	
C <sub>5</sub> H <sub>6</sub> O (3-Methylfuran)												x				
Chloroform								x								
Ethylacetat			x	x	x		x									x
C <sub>6</sub> H <sub>12</sub>													x			
Methylcyclopentan			x	x	x		x				x					
C <sub>6</sub> H <sub>8</sub>												x				
C <sub>6</sub> H <sub>10</sub>												x	x			x
C <sub>6</sub> H <sub>8</sub>												x	x	x	x	x
C <sub>6</sub> H <sub>8</sub>													x	x	x	x
C <sub>6</sub> H <sub>10</sub>												x				
C <sub>6</sub> H <sub>10</sub>													x			x
Cyclohexan			x	x	x		x									
Benzol	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
2-Methylhexan	x				x		x				x				x	x
C <sub>6</sub> H <sub>8</sub>															x	
3-Methylhexan			x		x		x				x				x	x
C <sub>7</sub> H <sub>14</sub> (Dimethylcyclopentan)											x					

Tabelle 23 Kontrollgruppe (männlich)

Analyte	M 1	M 2	M 3	M 4	M 5	M 6	M 7	M 8	M 9	M 10	M 11	M 12	M 13	M 14	M 15	M 16
Alter	27	31	48	48	52	57	55	53	24	48	17	26	57	25	26	48
Raucher											R	R	R	R	R	R
2-Methyl- 2-propenal							x									
C <sub>7</sub> H <sub>14</sub> (Dimethyl- cyclopentan)											x	x				
C <sub>7</sub> H <sub>14</sub> (Dimethyl- cyclopentan)											x					
2-Pentan- on	x			x		x	x	x				x	x			x
C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> S	x		x	x					x	x						x
Heptan	x	x	x		x	x	x	x	x		x	x	x		x	x
2,5-Dime- thylfuran												x	x	x	x	x
1- Methylthi- opropan	x			x	x		x	x	x	x	x			x		x
C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O																x
Methyl- cyclohe- xan		x	x	x	x		x				x				x	
1- Methylthi- o-1-pro- pen	x					x				x	x					
Propi- onsäure			x													
Ethyl- cyclopentan															x	x
1- Methylthi- o-1-pro- pen	x			x	x		x			x	x					
DMDS						x		x	x	x						

Tabelle 23 Kontrollgruppe (männlich)

Analyte	M 1	M 2	M 3	M 4	M 5	M 6	M 7	M 8	M 9	M 10	M 11	M 12	M 13	M 14	M 15	M 16
Alter	27	31	48	48	52	57	55	53	24	48	17	26	57	25	26	48
Raucher											R	R	R	R	R	R
2,5-Dimethylhexan															x	x
C <sub>8</sub> H <sub>18</sub> (2-Methylheptan)	x															
Toluol	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
3-Methylheptan	x														x	
Dimethylcyclohexan	x										x				x	x
Dimethylcyclohexan															x	x
Cyclohexanmethanol																x
Ethylmethylcyclopentan															x	x
Ethylmethylcyclopentan															x	
Paraldehyd							x									
Dimethylcyclohexan															x	x
Octan	x		x	x	x	x	x	x	x		x		x		x	x
Dimethylcyclohexan															x	x
Tetrachlorethylen	x	x	x		x		x	x	x					x		
Essigsäurebutylester															x	x

Tabelle 23 Kontrollgruppe (männlich)

Analyte	M 1	M 2	M 3	M 4	M 5	M 6	M 7	M 8	M 9	M 10	M 11	M 12	M 13	M 14	M 15	M 16
Alter	27	31	48	48	52	57	55	53	24	48	17	26	57	25	26	48
Raucher											R	R	R	R	R	R
2,3,4-Tri- methylhe- xan																x
2-Methy- loctan																x
Ethyl- cyclohe- xan	x														x	x
C <sub>9</sub> H <sub>20</sub>																x
1,1,3-Tri- methyl- cyclohexa n	x															x
C <sub>9</sub> H <sub>18</sub>																x
Trimethyl- cyclohe- xan															x	x
C <sub>9</sub> H <sub>18</sub>																x
Ethylben- zol	x	x	x	x	x	x	x	x	x		x	x	x	x	x	x
C <sub>9</sub> H <sub>20</sub>																x
Xylol	x	x	x	x	x	x	x	x	x		x	x	x	x	x	x
C <sub>9</sub> H <sub>18</sub>																x
C <sub>4</sub> H <sub>5</sub> NS (Allylisot- hiocyanat)						x	x									
Xylol	x	x	x	x	x	x	x	x	x		x	x	x	x	x	
C <sub>9</sub> H <sub>20</sub> (Nonan)	x		x	x	x	x	x	x	x		x					x
Tricyclen				x												
α-Pinen	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Camphen				x	x											x
Propyl- benzol	x		x		x	x										

Tabelle 23 Kontrollgruppe (männlich)

Analyte	M 1	M 2	M 3	M 4	M 5	M 6	M 7	M 8	M 9	M 10	M 11	M 12	M 13	M 14	M 15	M 16
Alter	27	31	48	48	52	57	55	53	24	48	17	26	57	25	26	48
Raucher											R	R	R	R	R	R
C <sub>9</sub> H <sub>12</sub> (Ethylmethylbenzol)	x		x	x	x	x	x	x	x		x					x
β-Pinen	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Phenol	x				x	x	x	x			x	x				
C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>														x		
β-Myrcen		x		x						x						
Trimethylbenzol	x		x	x	x	x	x	x								
3-Caren			x	x	x			x	x					x		
Dichlorbenzol							x					x				
Cymol			x	x	x	x	x	x	x	x			x	x	x	x
Limonen	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Eucalyptol	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Indan			x													
γ-Terpinen			x	x					x	x						x
Acetophenon							x									
C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> (Dimethylstyrol)														x		
Menthon										x						
Menthofuran										x						
Menthol				x	x	x		x		x						
Caryophyllen		x		x					x	x					x	

## 7 Literatur

1. Fenske, J. D. & Paulson, S. E. Human Breath Emissions of VOCs. *J. Air Waste Manage. Assoc.* **49**, 594-598 (1999).
2. Phillips, M. et al. Variation in volatile organic compounds in the breath of normal humans. *J. Chromatogr. B* **729**, 75-88 (1999).
3. Cheng, W.-H. & Lee, W.-J. Technology Development in Breath Microanalysis for Clinical Diagnosis. *J. Lab. Clin. Med.* **133**, 218-228 (1999).
4. Pauling, L., Robinson, A. B., Teranishi, R. & Cary, P. Quantitative Analysis of Urine Vapor and Breath by Gas-Liquid Partition Chromatography. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **68**, 2374-2376 (1971).
5. Manolis, A. The Diagnostic Potential of Breath Analysis. *Clin. Chem.* **29**, 5-15 (1983).
6. Sanchez, J. M. & Sacks, R. D. GC Analysis of Human Breath with A Series-Coupled Column Ensemble and A Multibed Sorption Trap. *Anal. Chem.* **75**, 2231-2236 (2003).
7. Miekisch, W., Schubert, J. K., Vagts, D. A. & Geiger, K. Analysis of Volatile Disease Markers in Blood. *Clin. Chem.* **47**, 1053-1060 (2001).
8. Deng, C., Zhang, X. & Li, N. Investigation of volatile organic biomarkers in lung cancer blood using solid-phase microextraction and capillary gas-chromatography - mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* **808**, 269-277 (2004).
9. Sweet, N. D., Burroughs, G. E., Ewers, L. & Talaska, G. A Field Method for Near Real-Time Analysis of Perchloroethylene in End-Exhaled Breath. *Journal of Occupational and Environmental Hygiene* **1**, 515-520 (2004).
10. Egeghy, P. P., Nylander-French, L., Gwin, K. K., Hertz-Picciotto, I. & Rappaport, S. M. Self-collected Breath Sampling for Monitoring Low-level Benzene Exposures among Automobile Mechanics. *Ann. occup. Hyg.* **46**, 489-500 (2002).
11. Harrison, G. R., Critchley, A. D. J., Mayhew, C. A. & Thompson, J. M. Real-time breath monitoring of propofol and its volatile metabolites during surgery using novel mass spectrometric technique: a feasibility study. *Br J of Anaesth* **91**, 797-799 (2003).
12. Kharitonov, S. A. & Barnes, P. J. Biomarkers of some pulmonary diseases in exhaled breath. *Biomarkers* **7**, 1-32 (2002).
13. Di Natale, C. et al. Lung cancer identification by the analysis of breath by

- means of an array of non-selective gas sensors. *Biosensors and Bioelectronics* **18**, 1209-1218 (2003).
14. Phillips, M. et al. Volatile organic compounds in breath as markers of lung cancer: a cross-sectional study. *The Lancet* **353**, 1930-1933 (1999).
  15. Boyle, R. & Ferlay, J. Cancer incidence and mortality in Europe, 2004. *Ann Oncol* **16**, 481-488 (2005).
  16. Risby, T. H. in *Breath Analysis for Clinical Diagnosis and Therapeutic Monitoring* (eds. Amann, A. & Smith, D.) 251-265 (World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., Toh Tuck Link, 2005).
  17. Miekisch, W., Schubert, J. K. & Noeldge-Schomburg, G. F. E. Diagnostic potential of breath analysis - focus on volatile organic compounds. *Clinica Chimica Acta* **347**, 25-39 (2004).
  18. Phillips, M. in *Disease markers in exhaled breath* (eds. Marczin, N., Kharitonov, S. A., Yacoub, M. H. & Barnes, P. J.) 219-231 (Marcel Dekker, New York, 2002).
  19. [www.dr-stutz.ch/halithosis1.htm](http://www.dr-stutz.ch/halithosis1.htm), Seemann, R. Wenn Atem stinkt. (2000).
  20. Phillips, M. Breath Tests in Medicine. *Scientific American* **July**, 74-79 (1992).
  21. Lamprecht, I. Calorimetric and thermodynamics of living systems. *Thermochimica Acta* **405**, 1-13 (2003).
  22. <http://www.sportsci.org/news/history/lavoisier/lavoisier.html>, Katch, F. I., McArdle, W. D. & Katch, V. L. Antoine Laurent Lavoisier (1743-1794). (1998).
  23. Judel, K. *Justus von Liebig* (eds. Chemiker, G. D. & e.V., J.-L.-G. z. G. e.) (Gesellschaft Deutscher Chemiker, Justus-Liebig-Gesellschaft zu Gießen e.V., Gießen, 2003).
  24. Baldwin, A. D. Anstie's Alcohol Limit. *AJPH* **67**, 679-681 (1977).
  25. Jansson, B. O. & Larsson, B. T. Analysis of organic compounds in human breath by gas chromatography - mass spectrometry. *J Lab Clin Med* **74**, 961-966 (1969).
  26. Chen, S. & Zieve, L. Mercaptans and dimethylsulfide in the breath of patients with cirrhosis of the liver. Effect of feeding methionine. *J Lab Clin Med* **75**, 628-635 (1970).
  27. Riely, C. A., Cohen, G. & Liebermann, M. Ethane evolution: a new index of lipid peroxidation. *Science* **183**, 208-210 (1974).

- 
28. Danneker, J. R., Shaskan, E. G. & Phillips, M. A new highly sensitive assay for breath acetaldehyde: detection of endogenous levels in humans. *Anal Biochem* **114**, 1-7 (1981).
  29. Baraldi, E., Azzolin, N. M., Cracco, A. & Zacchello, F. Reference Values of Exhaled Nitric Oxide for Healthy Children 6-15 Years Old. *Pediatric Pulmonology* **27**, 54-58 (1999).
  30. Bartley, J., Fergusson, W., Moody, A., Wells, A. U. & Kolbe, J. Normal Adult Values, Diurnal Variation, and Repeatability of Nasal Nitric Oxide Measurement. *American Journal of Rhinology* **13**, 401-405 (1999).
  31. Ekroos, H., Tuominen, J. & Sovijärvi, A. R. A. Exhaled nitric oxide and its long-term variation in healthy non-smoking subjects. *Clinical Physiology* **20**, 434-439 (2000).
  32. Kosterev, A. & Tittel, F. Chemical Sensors Based on Quantum Cascade Lasers. *IEEE Journal of Quantum Electronics* **38**, 582-591 (2002).
  33. Wysocki, G. et al. Pulsed quantum cascade laser based sensor for trace-gas detection of carbonyl sulfide. *Applied Optics* **43**, 6040-6046 (2004).
  34. von Basum, G., Dahnke, H., Halmer, D., Hering, P. & Mürtz, M. Online recording of ethane traces in human breath via infrared laser spectroscopy. *J Appl Physiol* **95**, 2583-2590 (2003).
  35. Laakso, O. et al. The Use of Low-Resolution FT-IR Spectrometry for the Analysis of Alcohols in Breath. *J. Anal. Toxicol.* **24**, 250-256 (2000).
  36. Cohen, M. J., Wernlund, R. F. & Stimac, R. M. The ion mobility spectrometer for high explosive vapor detection. *J. Inst. Nuclear Materials Management* **XIII**, 220-240 (1984).
  37. Karasek, F. W. & Denney, D. W. Detection of 2,4,6-trinitrotoluene vapours in air using plasma chromatography. *J. Chromatogr.* **93**, 141-147 (1974).
  38. Karasek, F. W., Hill, H. H., Jr. & Kim, S. H. Plasma chromatography of heroin and cocaine with mass identified mobility spectra. *J. Chromatogr.* **117**, 327-336 (1976).
  39. Baumbach, J. I. Lungenkrebsfrüherkennung mittels Ionenbeweglichkeitspektrometrie. *Uni-Report* **33**, 44-48 (2001).
  40. Baumbach, J. I., Vautz, W., Ruzsányi, V. & Freitag, L. in *Breath Analysis for Clinical Diagnosis and Therapeutic Monitoring* (eds. Amann, A. & Smith, D.) 53-66 (World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., Toh Tuck Link, 2005).

41. Diskin, A. M., Spanel, P. & Smith, D. Increase of acetone and ammonia in urine headspace and breath during ovulation quantified using selected ion flow tube mass spectrometry. *Physiol. Meas.* **24**, 191-199 (2003).
42. Diskin, A. M., Spanel, P. & Smith, D. Time variation of ammonia, acetone, isoprene and ethanol in breath: a quantitative SIFT-MS study over 30 days. *Physiol. Meas.* **24**, 107-119 (2003).
43. Taucher, J. et al. Detection of Isoprene in Expired Air from Human Subjects Using Proton-transfer-reaction Mass Spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **11**, 1230-1234 (1997).
44. Lindinger, W., Taucher, J., Hansel, A. & Vogel, W. Endogenous Production of Methanol after the Consumption of Fruit. *Alcohol Clin Exp Res* **21**, 939-943 (1997).
45. Smith, D., Wang, T. & Spanel, P. On-line, simultaneous quantification of ethanol, some metabolites and water vapour in breath following the ingestion of alcohol. *Physiol. Meas.* **23**, 477-489 (2002).
46. Senthilmohan, S. T., McEwan, M. J., Wilson, P. F., Milligan, D. B. & Freeman, C. G. Real time analysis of breath volatiles using SIFT-MS in cigarette smoking. *Redox Report* **6**, 185-187 (2001).
47. Davies, S., Spanel, P. & Smith, D. A new 'online' method to measure increased exhaled isoprene in end-stage renal failure. *Nephrol Dial Transplant* **16**, 836-839 (2001).
48. Davies, S., Spanel, P. & Smith, D. Quantitative analysis of ammonia on the breath of patients in end-stage renal failure. *Kidney Int* **52**, 223-228 (1997).
49. Critchley, A. et al. The proton transfer reaction mass spectrometer and its use in medical science: application to drug assays and the monitoring of bacteria. *International Journal of Mass Spectrometry* **239**, 235-241 (2004).
50. Lirk, P., Bodrogi, F. & Rieder, J. Medical applications of proton transfer reaction-mass spectrometry: ambient air monitoring and breath analysis. *International Journal of Mass Spectrometry* **239**, 221-226 (2004).
51. Ochiai, N., Takino, M., Daishima, S. & Cardin, D. B. Analysis of volatile sulphur compounds in breath by gas chromatography-mass spectrometry using a three-stage cryogenic trapping preconcentration system. *J. Chrom. B.* **762**, 67-75 (2001).

- 
52. Phillips, M. Method for the Collection and Assay of Volatile Organic Compounds in Breath. *Anal. Biochem.* **247**, 272-278 (1997).
  53. Cope, K. A., Watson, M. T., Foster, W. M., Sehnert, S. S. & Risby, T. H. Effects of ventilation on the collection of exhaled breath in humans. (2004).
  54. Mueller, W., Schubert, J., Benzing, A. & Geiger, K. Method for analysis of exhaled air by microwave energy desorption coupled with gas chromatography-flame ionization detection-mass spectrometry. *J. Chrom. B.* **716**, 27-38 (1998).
  55. Schubert, J. K., Miekisch, W., Birken, T., Geiger, K. & Nöldge-Schomburg, G. F. E. Impact of inspired substance concentrations on the results of breath analysis in mechanically ventilated patients. *Biomarkers* **10**, 138-152 (2005).
  56. Grote, C. & Pawliszyn, J. Solid-Phase Microextraction for the Analysis of Human Breath. *Anal. Chem.* **69**, 587-596 (1997).
  57. Deng, C., Zhang, J., Yu, X., Zhang, W. & Zhang, X. Determination of acetone in human breath by gas chromatography- mass spectrometry and solid-phase microextraction with on-fiber derivatization. *J. Chrom. B.* **810**, 269-275 (2004).
  58. Yu, Y. & Pawliszyn, J. On-line monitoring of breath by membrane extraction with sorbent interface coupled with CO<sub>2</sub> sensor. *J. Chromatogr. A* **1056**, 35-41 (2004).
  59. Jones, A. W., Lagesson, V. & Tagesson, C. Determination of isoprene in human breath by thermal desorption gas chromatography with ultraviolet detection. *J. Chromatogr. B* **672**, 1-6 (1995).
  60. Cailleux, A. & Allain, P. Is Pentane a Normal Constituent of Human Breath? *Free Rad. Res. Comms.* **18**, 323-327 (1993).
  61. Lärstad, M., Loh, C., Ljungkvist, G., Olin, A.-C. & Torén, K. Determination of ethane, pentane and isoprene in exhaled air using a multi-bed adsorbent and end-cut gas-solid chromatography. *Analyst* **127**, 1440-1445 (2002).
  62. Phillips, M. et al. Volatile markers of breast cancer in the breath. *The Breast Journal* **9**, 184-191 (2003).

63. Phillips, M. et al. Detection of Lung Cancer With Volatile Markers in the Breath. *Chest* **123**, 2115-2123 (2003).
64. Phillips, M., Cataneo, R. N., Cheema, T. & Greenberg, J. Increased breath biomarkers of oxidative stress in diabetes mellitus. *Clin. Chim. Acta* **344**, 189-194 (2004).
65. Phillips, M. et al. Heart Allograft Rejection: Detection With Breath Alkanes in Low Levels ( the HARDBALL Study ). *J Heart Lung Transplant* **23**, 701-708 (2004).
66. Moretti, M., Phillips, M., Abouzeid, A., Cataneo, R. N. & Greenberg, J. Increased breath markers of oxidative stress in normal pregnancy and in preeclampsia. *Am. J. of Obstetrics and Gynecology* **190**, 1184-1190 (2004).
67. Phillips, M., Cataneo, R. N., Greenberg, J., Grodman, R. & Salazar, M. Breath Markers of Oxidative Stress in Patients with Unstable Angina. *Heart Dis* **5**, 95-99 (2003).
68. Scholpp, J., Schubert, J. K., Miekisch, W. & Geiger, K. Breath Markers and Soluble Lipid Peroxidation Markers in Critically ill Patients. *Clin Chem Lab Med* **40**, 587-594 (2002).
69. *Handbook of Chemistry and Physics* (ed. Weast, R. C.) (CRC Press, Boca Raton, 1982).
70. Gawlowski, J., Gierczak, T., Jezo, A. & Niedzielski, J. Adsorption of water vapour in the solid sorbents used for the sampling of volatile organic compounds. *Analyst* **124**, 1553-1558 (1999).
71. Dettmer, K. & Engewald, W. Adsorbent materials commonly used in air analysis for adsorptive enrichment and thermal desorption of volatile organic compounds. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **373**, 490-500 (2002).
72. Helmig, D. & Vierling, L. Water Adsorption Capacity of the Solid Adsorbents Tenax TA, Tenax GR, Carbotrap, Carbotrap C, Carbosieve SIII, and Carboxen 569 and Water Management Techniques for the Atmospheric Sampling of Volatile Organic Trace Gases. *Anal Chem* **67**, 4380-4386 (1995).
73. <http://www.sisweb.com/index/referenc/car569am.htm>, Scientific Instrument Services, Inc., Carboxen 569.

- 
74. <http://www.sisweb.com/index/referenc/carbotrm.htm>, Scientific Instrument Services, Inc., Carbotrap.
75. Di Francesco, F., Fuoco, R., Trivella, M. G. & Ceccarini, A. Breath analysis: trends in techniques and clinical applications. *Microchemical Journal* **79**, 405-410 (2005).
76. Lindstrom, A. B. & Pleil, J. D. A review of the USEPA's single breath canister (SBC) method for exhaled volatile biomarkers. *Biomarkers* **7**, 189-208 (2002).
77. Baya, M. P. & Siskos, P. A. Evaluation of Anasorb CMS and Comparison With Tenax TA for the Sampling of Volatile Organic Compounds in Indoor and Outdoor Air by Breakthrough Measurements. *Analyst* **121**, 303-307 (1996).
78. Gallagher, M. W. et al. Assessment of a relaxed eddy accumulation for measurements of fluxes of biogenic organic compounds: study over arable crops and mature beech forest. *Atmos Environ* **34**, 2887-2899 (2000).
79. Hakola, H., Laurila, T., Rinne, J. & Puhto, K. The ambient concentrations of biogenic hydrocarbons at a northern European, boreal site. *Atmos Environ* **34**, 4971-4982 (1994).
80. Ballesta, P. P., Baldan, A. & Cancelinha, J. Atmosphere generation system for the preparation of ambient air volatile organic compound standard mixture. *Anal Chem* **71**, 2241-2245 (1999).
81. Hoffmann, T. Entwicklung eines Verfahrens zur Messung luftgetragener biogener Kohlenwasserstoffe und seine Anwendung zur Untersuchung von Emission und Abbau von Terpenen in Waldbeständen (Dissertation, Universität Dortmund, 1992).
82. Possanzini, M., Di Palo, V., Brancaleoni, E., Frattoni, M. & Ciccioni, P. Dynamic system for the calibration of semi-volatile carbonyl compounds in air. *J. Chromatogr. A* **883**, 171-183 (2000).
83. Komenda, M., Schaub, A. & Koppmann, R. Description and characterization of an on-line system for long-term measurements of isoprene, methyl vinyl ketone, and methacrolein in ambient air. *J. Chromatogr. A* **995**, 185-201 (2003).
84. Apel, E. C. et al. The Nonmethane Hydrocarbon Intercomparison Experiment (NOMHICE): Task 3. *J. Geophys. Res.* **104**, 26069-26086 (1999).

85. Larsen, B. et al. Sampling and analysis of terpenes in air. an interlaboratory comparison. *Atmos Environ Suppl.* **1**, 35-49 (1997).
86. Gautrois, M. & Koppmann, R. Diffusion technique for the production of gas standards for atmospheric measurements. *J. Chromatogr. A* **848**, 239-249 (1999).
87. Fuller, E. N., Schettler, P. D. & Giddings, J. C. A new method for prediction of binary gas-phase diffusion coefficients. *Ind. Eng. Chem.* **58**, 19-27 (1966).
88. Breitmaier, E. *Terpene: Aromen, Düfte, Pharmaka, Pheromone* (Teubner-Studienbücher: Chemie, Leipzig, 1999).
89. Komenda, M., Parusel, E., Wedel, A. & Koppmann, R. Measurements of biogenic VOC emissions: sampling, analysis and calibration. *Atmos Environ* **35**, 2069-2080 (2001).
90. Schlieper, C. A. *Grundfragen der Ernährung* (Dr. Felix Büchner - Handwerk und Technik, Hamburg, 1992).
91. Smith, D., Spanel, P. & Davies, S. Trace gases in breath of healthy volunteers when fasting and after a protein-calorie meal: a preliminary study. *J Appl Physiol* **87**, 1584-1588 (1999).
92. Musa-Veloso, K., Likhodii, S. S. & Cunnane, S. C. Breath acetone is a reliable indicator of ketosis in adults consuming ketogenic meals. *Am J Clin Nutr* **76**, 65-70 (2002).
93. Likhodii, S. S., Musa, K. & Cunnane, S. C. Breath Acetone as a Measure of Systemic Ketosis Assesed in a Rat Model of Ketogenic Diet. *Clinical Chemistry* **48**, 115-120 (2002).
94. Jo, W.-K. & Pack, K.-W. Utilization of Breath Analysis for Exposure Estimates of Benzene Associated with Active Smoking. *Environmental Research Section A* **83**, 180-187 (2000).
95. Gordon, S. M. Identification of exposure markers in smokers' breath. *J. Chromatogr. A* **511**, 291-302 (1990).
96. Lindinger, W., Hansel, A. & Jordan, A. Proton-transfer-reaction mass spectrometry (PTR\_MS): on-line monitoring of volatile organic compounds at pptv levels. *Chemical Society Reviews* **27**, 347-354 (1998).
97. George, S. C., Babb, A. L. & Hlastala, M. P. Modeling the Concentration of Ethanol in the Exhaled Breath Following Pretest Breathing Maneuvers.

- 
- Annals of Biomedical Engineering* **23**, 48-60 (1995).
98. Block, E. et al. Allium chemistry: Natural abundance of organoselenium compounds from garlic, onion and related plants and in human garlic breath. *Pure & Appl. Chem.* **68**, 937-944 (1996).
99. Block, E., Naganathan, S., Putmann, D. & Zhao, S.-H. Organosulfur chemistry of garlic and onion: Recent results. *Pure & Appl. Chem.* **65**, 625-632 (1993).
100. Block, E. The organosulfur chemistry of the genus allium - implications for the organic chemistry of sulfur. *Angew. Chem.* **31**, 1135-1178 (1992).
101. Taucher, J., Hansel, A., Jordan, A. & Lindinger, W. Analysis of Compounds in Human Breath after Ingestion of Garlic Using Proton-Transfer-Reaction Mass Spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* **44**, 3778-3782 (1996).
102. Filippi, A. & Meyer, J. Halitosis - Ursachen, Diagnose, Therapie. *Schweiz Med Forum* **4**, 585-589 (2004).
103. Rosenberg, M. & McCulloch, C. A. Measurement of oral malodor: current methods and future prospects. *J Periodontol* **63**, 776-782 (1992).
104. Tonzetich, J. Production and origin of oral malodor: a review of mechanisms and methods of analysis. *J Periodontol* **48**, 13-20 (1977).
105. Miyazaki, H., Sakao, S., Katoh, Y. & Takehara, T. Correlation Between Volatile Sulphur Compounds and Certain Oral Health Measurements in the General Population. *J Periodontol* **66**, 679-684 (1995).
106. Mayr, D., Märk, T., Lindinger, W., Brevard, H. & Yeretdzian, C. Breath-by-breath analysis of banana aroma by proton transfer reaction mass spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry* **223-224**, 743-756 (2003).

## 8 Konferenzbeiträge und Veröffentlichungen

- Chen, H.; Grundmann, A.; Bandur, R.; Jakubowski, N.; Brandt, R.; Hoffmann, T.: *Determination of iodine species in the gaseous and particulate phase of the coastal atmosphere*, Jahresseminar des Graduiertenkollegs „Elementspeziation“ auf Burg Ebernburg in Bad Münster a.d. Nahe, 2005, angemeldeter Vortrag
- Grundmann, A.; Besche, S.; Bandur, R.; Nolte, J.; Baumbach, J.I.; Hoffmann, T.: *Determination of biomarkers in human breath by TD/GC/MS*, Anakon 2005, Regensburg, wiss. Poster
- Hartmann, M.; Zimmermann, D.; Grundmann, A.; Bandur, R.; Vautz, W.; Nolte, J.; Baumbach, J.I.: *Metabolomics of Colorectal Cancer - On the way to an improved diagnosis method based on mass and ion mobility spectrometry*, Anakon 2005, Regensburg, wiss. Poster
- Zimmermann, D.; Hartmann, M.; Bessenyei, S.; Grundmann, A.; Ruzsanyi, V.; Vautz, W.; Nolte, J.; Baumbach, J.I.: *Detection and quantification of microbial metabolites*, Anakon 2005, Regensburg, wiss. Poster
- Grundmann, A., Nolte, J.: *TD/GC/MS zur Atemluftanalyse*, Jahrestagung der DGMS 2005, Rostock, angemeldeter Vortrag
- Bessenyei, S.; Zimmermann, D.; Hartmann, M.; Grundmann, A.; Ruzsanyi, V.; Vautz, W.; Nolte, J.; Baumbach, J.I.: *Detection and quantification of microbial metabolites*, Jahrestagung der DGMS 2005, Rostock, wiss. Poster
- Nolte, J.; Baumbach, J.I.; Zimmermann, D.; Hartmann, M.; Grundmann, A.; Vautz, W.: *Metabolomics of colorectal cancer - on the way to an improved diagnosis method based on mass and ion mobility spectrometry*, Jahrestagung der DGMS 2005, Rostock, wiss. Poster
- Grundmann, A.; Besche, S.; Bandur, R.; Nolte, J.; Baumbach, J.I.: *In search of biomarkers for human breath by TD/GC/MS*, GDCh Doktoranden-Seminar, 2005, Kloster Banz, Bayreuth, angemeldeter Vortrag
- Andresen, J.A.; Grundmann, A.; Bester, K.: *Organophosphorus flame retardants and plasticisers in surface water*, Science of the Total Environment 332 (2004), 155-166
- Grundmann, A.; Fobbe, R.; Bandur, R.; Nolte, J.; Hoffmann, T.: *Analysis of VOCs in human breath by TDS/GC/MSD*, 6th Workshop on Biosensors and Bio-Analytical  $\mu$ Techniques in Environmental and Clinical Analysis, 2004, Rom, Italien, wiss. Poster
- Grundmann, A.; Besche, S.; Bandur, R.; Warnke, ; Hoffmann, T.: *Measurement of biogenous and anthropogenic VOCs as a possible source for the formation of secondary organic aerosols by TDS/GC/MS*, 6th Workshop on Biosensors and Bio-Analytical  $\mu$ Techniques in Environmental and Clinical Analysis, 2004, Rom, Italien, wiss. Poster

- 
- Grundmann, A.; Nolte, J.: *Breath analysis by on-line TDS/GC/MS*, Breath Gas Analysis for medical application, 2004, Dornbirn, Österreich, wiss. Poster
  - Hoffmann, T.; Warnke, J.; Bandur, R.; Grundmann, A.; Kühn, T.; Besche, S.; Papke, B.; Zelger, M.; Dlugi, R.: *Emission and Chemical Transformation of Biogenic Volatile Organic Compounds (ECHO): Field studies on the chemical characterisation of tropospheric organic aerosols*, AFO 2000 Final Symposium, 2004, Bad Tölz, wiss. Poster
  - Warnke, J.; Bandur, R.; Grundmann, A.; Kühn, T.; Hoffmann, T.: *Quantification of biogenic tracer compounds in organic aerosol particles in central Europe by LC/MS*, European Geosciences Union - 1st General Assembly, Nizza, France, wiss. Poster
  - Grundmann, A.; Ruzsanyi, V.; Baumbach, J.I.; Hoffmann, T.: *Entwicklung einer massenspektrometrischen online-Methode basierend auf chemischer Ionisation bei Atmosphärendruck zur Untersuchung von humaner Atemluft*, Jahrestagung der DGMS 2003, Münster, ausgezeichnet mit dem Jochen-Franzen-Preis 2003, wiss. Poster
  - Bester, K.; Grundmann, A.; Meyer, J.; Spiteller, M.: *Organophosphate plasticiser in surface water*, Jahrestagung der Wasserchemischen Gesellschaft 2003, Stade, wiss. Poster
  - Bester, K.; Grundmann, A.; Meyer, J.; Spiteller, M.: *Organophosphate flame retardants in surface waters*, SETAC-Europe, 2003, wiss. Poster
  - Grundmann, A., Bester, K., Spiteller, M.: *Precision and ruggedness of the quantification of Alkylphosphates in surface and sewage water*, Euroanalysis 12, 2002, Dortmund, wiss. Poster