

SMR: 1133/15

**WINTER COLLEGE ON
SPECTROSCOPY AND APPLICATIONS**

(8 - 26 February 1999)

"Medical Applications of Spectroscopy"

3. Isotope Selective Breath Analysis
Nondispersive Methods with Medical Applications

presented by:

Peter HERING

Institut für Lasermedizin der Universität Düsseldorf
D-40225 Düsseldorf
Germany

<http://wwwilm.uni-duesseldorf.de>



These are preliminary lecture notes, intended only for distribution to participants.

strada costiera, 11 - 34014 trieste italy - tel. +39 040 2240111 fax +39 040 224163 - sci_info@ictp.trieste.it - www.ictp.trieste.it

Institut für Lasermedizin
Universität Düsseldorf

Stable Isotopes in
Biomedicine, Environment
and Engineering

Laser Isotope Separation
 ^{13}C , ^{12}C , (^{28}Si)

precise determination
of $^{13}\text{CO}_2 / ^{12}\text{CO}_2$ ratio

clinical and
environmental application

Kg-Standard
mono-isotopic
layers

NDIR
CRDS

Helicobacter pylori
liver function
amino acid metabolism

$^{13}\text{CO}_2 / ^{12}\text{CO}_2$ atmospheric
concentration
waste incineration

Carbon

Nuclide	Abundance	Weight	Spin	Half-Life	Decay	Modes
C11	0 %	11.	1.5	20.3 m	β^+	
C12	98.892 %	12.	0			Stable
C13	1.108 %	13.0034	0.5	/		Stable
C14	0 %	14.0032	0	5730 y	β^-	
C15	0 %	15.	0.5	/ 2.45s	β^-	

¹³C in Biomedicine

¹³C as a marker:

- stable isotope, non radioactive
 - carbon is part of all biochemical compounds
-

- Diagnosis of :
- bacterial infections
 - metabolic diseases
 - organ function diseases
 - NMR imaging
-

¹³C-breath tests

- administration of a ¹³C-labeled substrate
 - decomposition of the substrate depending on the condition of health
 - added ¹³C can be detected as increase of ¹³CO₂ in expired breath
 - time course of the isotope ratio in breath allows diagnosis about the condition of health
- ⇒ simple to operate
non invasive (harmless)
-

barrier so far for wide spread use

- too expensive isotope separation techniques
(low temperature distillation)
 - too expensive or not available substrates
 - too expensive and too demanding analysis
(isotope ratio mass spectrometry)
-

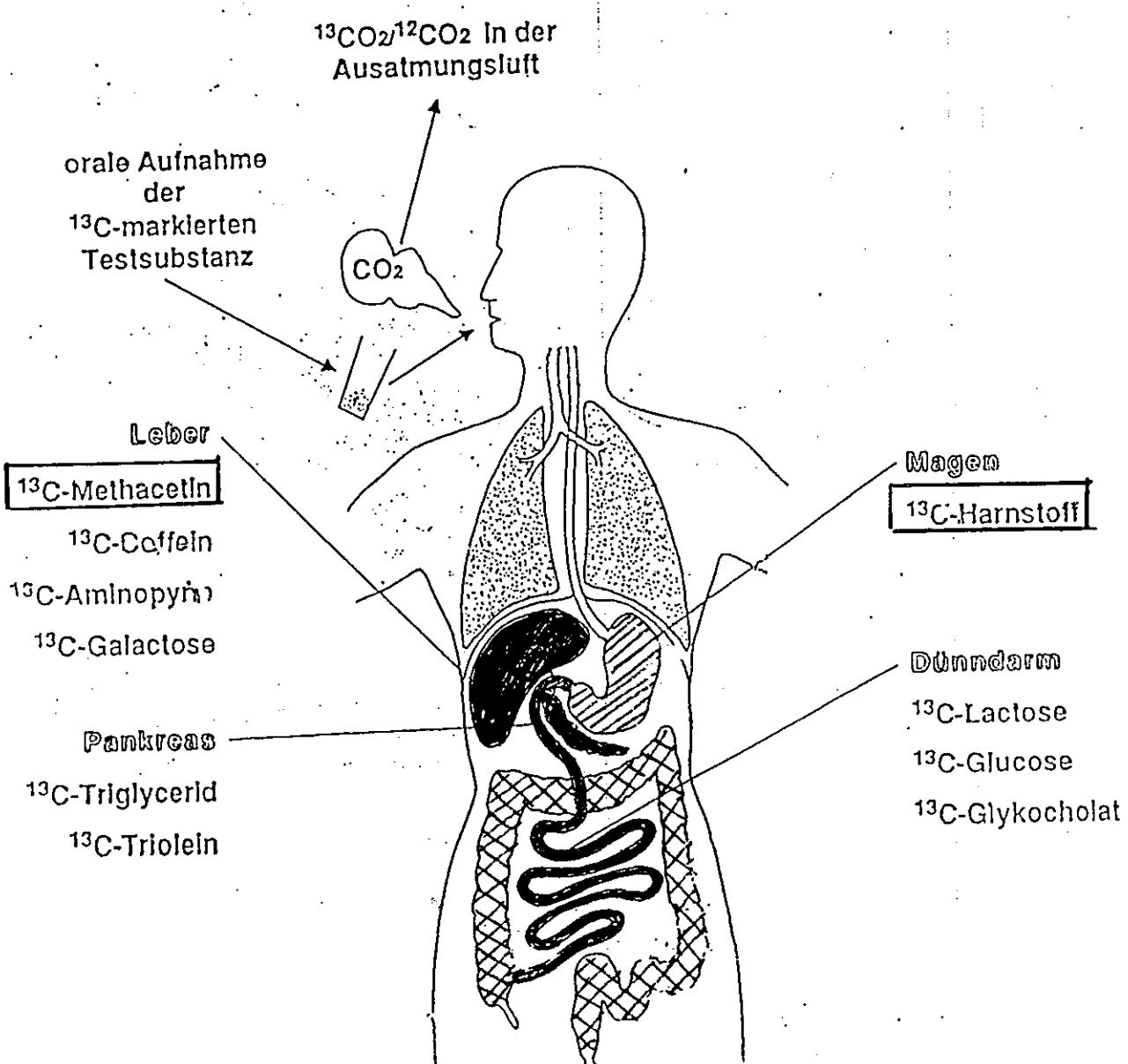
ADVANTAGES OF $^{13}\text{CO}_2$ -BREATH TEST FOR CLINICAL APPLICATIONS

- easy access to universal metabolic end product (CO_2)
- specificity depends on substrate only
- only prerequisite: biochemical reaction under consideration must be the rate limiting step

DISADVANTAGES OF ^{13}C -LABELLING IN GENERAL

- natural background of ^{13}C is high (~1.1%)
- natural background fluctuates (1.060-1.115%)

13C-markierte Substanzen in der Medizin



Malabsorption

¹³C-Glucose
¹³C-Glykocholat
¹³C-Caselin

Maldigestion

¹³C-Lactose
¹³C-Stärke
¹³C-Triolein

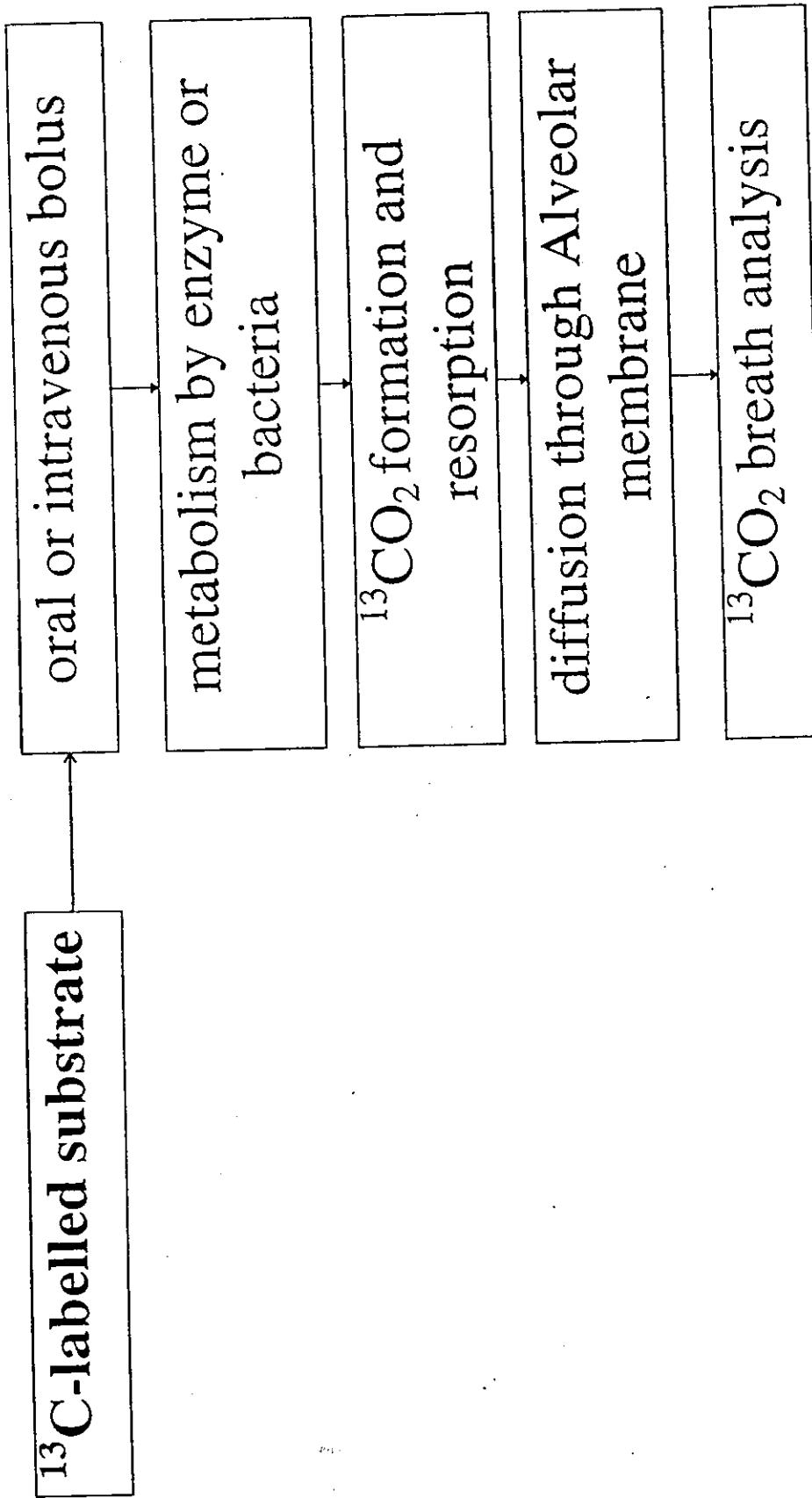
Enzymmangel-
zustände

¹³C-Phenylalanin
¹³C-Fructose

Oxidation

¹³C-Glucose
¹³C-Leucin

principle of $^{13}\text{CO}_2$ breath test



Demands for a $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$ Breath Analyser

CO_2 -concentration in expired breath:

$$2.5\text{--}4.5 \text{ Vol\%} \equiv 6.5\text{--}12 \cdot 10^{17} / \text{cm}^3$$

ratio of $^{13}\text{CO}_2$ to $^{12}\text{CO}_2$:

1.07-1.11 % (depending on the individual nutrition)

a change of 0.5 % of the isotope ratio must be detected

example:

typical breath sample: 3.100 Vol% $^{12}\text{CO}_2$

isotope ratio 1.095 % ($\delta^{13}\text{C} = -25.5 \text{ \textperthousand}$) $\Rightarrow 339.45 \text{ ppm } ^{13}\text{CO}_2$

rise of the ratio of 1 %:

isotope ratio 1.096 % ($\delta^{13}\text{C} = -24.5 \text{ \textperthousand}$) $\Rightarrow 339.98 \text{ ppm } ^{13}\text{CO}_2$

\Rightarrow accuracy:

$^{13}\text{CO}_2 : \pm 0.1 \text{ ppm} \equiv \pm 6.5 \cdot 10^{12} / \text{cm}^3$

$^{12}\text{CO}_2 : \pm 10 \text{ ppm} \equiv \pm 6.5 \cdot 10^{14} / \text{cm}^3$

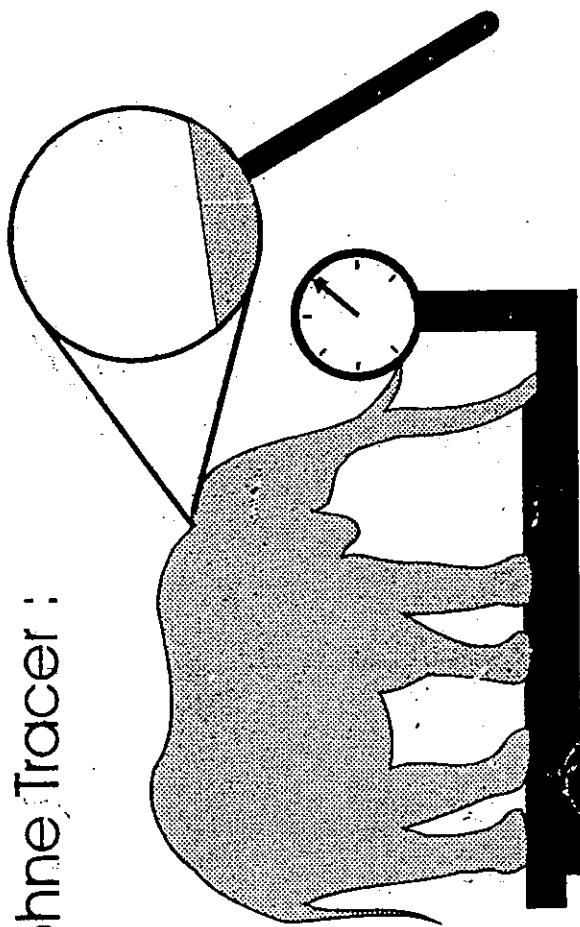
definition of the $\delta^{13}\text{C}$ -value :

$$\delta^{13}\text{C} := \left(\frac{R_s}{R_r} - 1 \right) \cdot 1000 \cdot \%$$

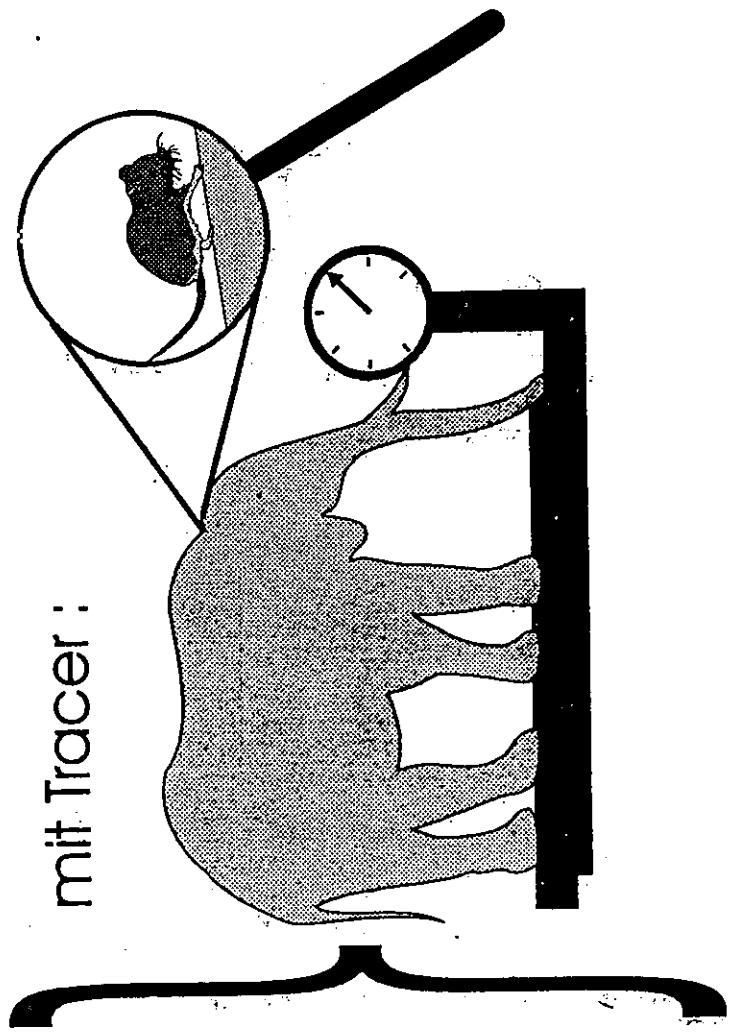
(R_s, R_r : isotope ratios of sample and reference)

Zur Auflösung bei der Atemgasanalyse

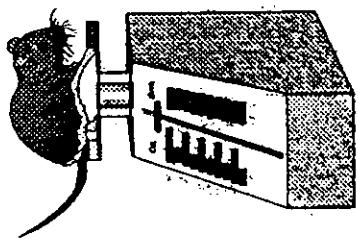
ohne Tracer:



mit Tracer:



Beitrag des Tracers:



Isotope Selective Measurements

Standard Method:

- Isotope Ratio Mass Spectrometry (IRMS)
(sector field instruments necessary)

IR Methods:

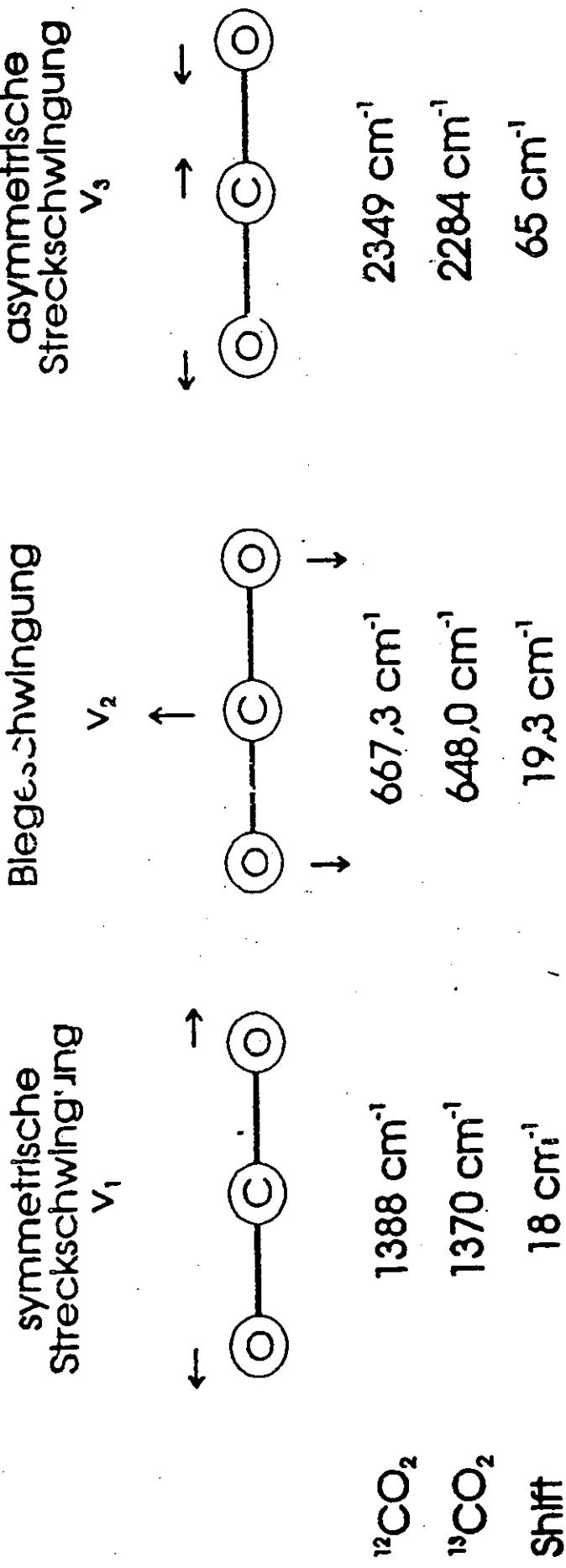
- Tuneable IR-Diode Laser Spectroscopy (TDLS)
- Nondispersive IR Spectroscopy (NDIRS)
- FTIR

in literature mentioned:

- heterodyne spectroscopy
- conventional grating spectroscopy
- optogalvanic spectroscopy
- resonant acousto-optic spectroscopy

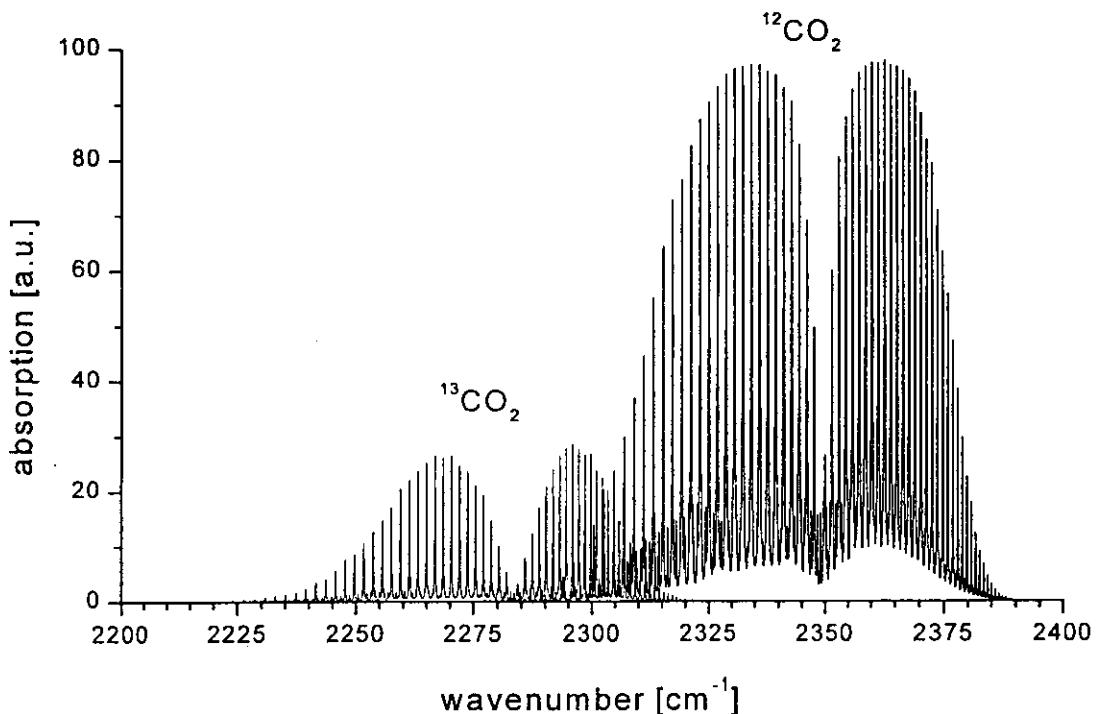
Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy:

- real time NMR-Imaging



die drei Grundschatzschwingungsmoden von CO_2 sowie deren Isotopieeffekt

Asymmetric stretch mode of $^{13}\text{CO}_2$ and $^{12}\text{CO}_2$

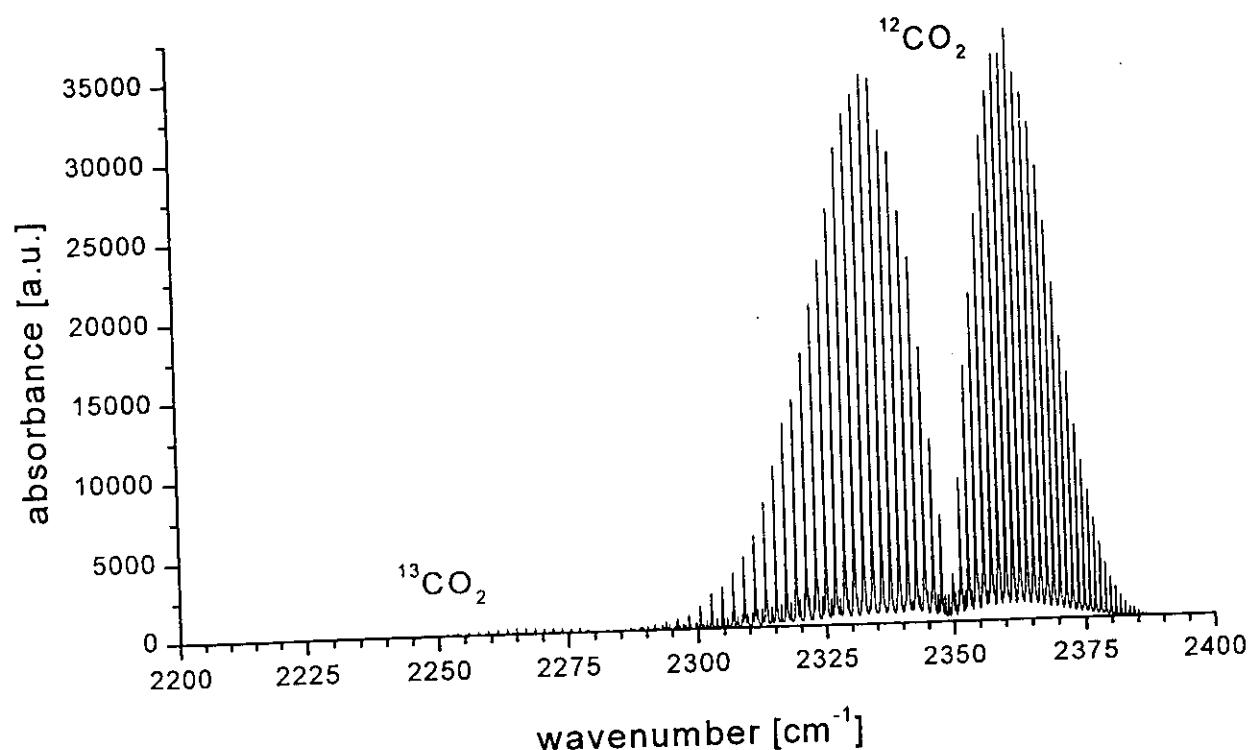


Spectra are separated by the isotope shift → NDIRS

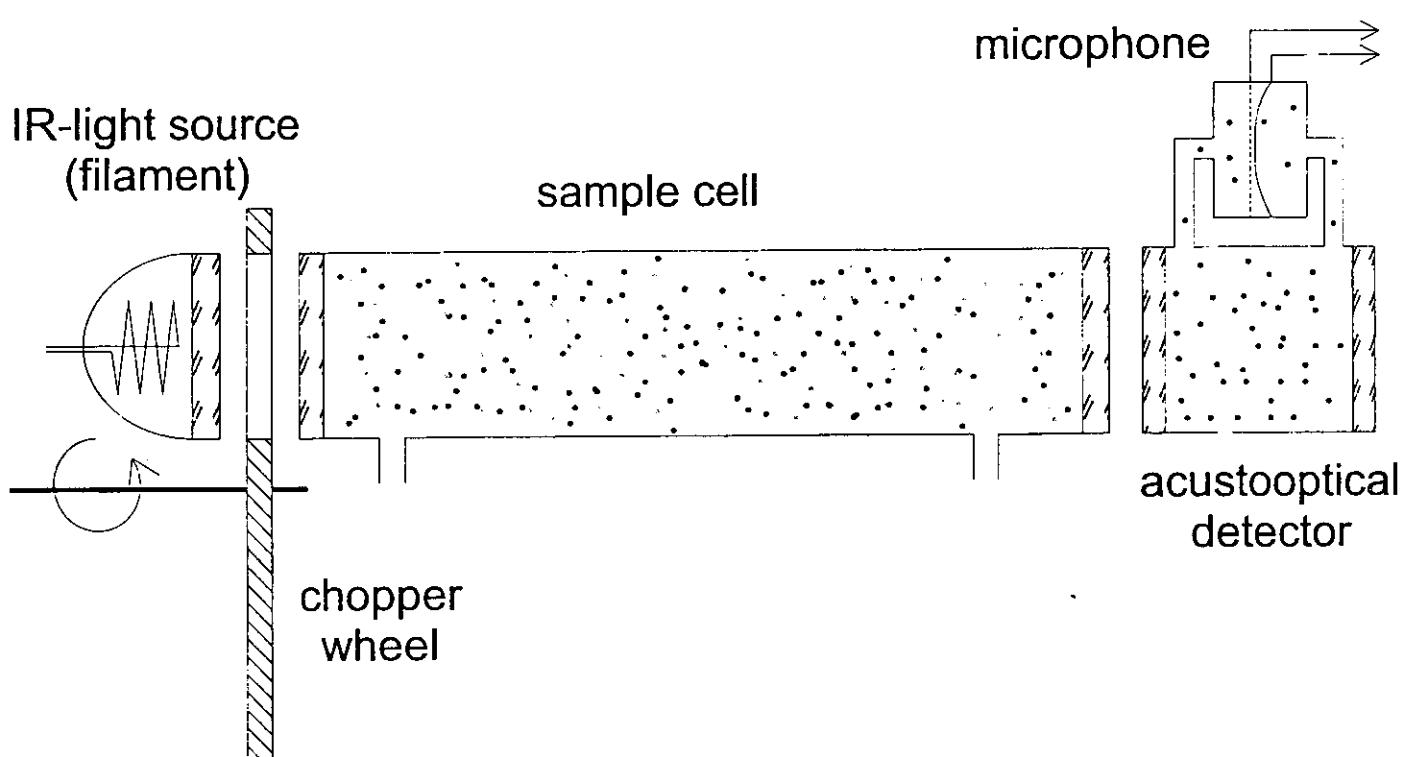
Problems:

- Overlap of absorption spectra of $^{13}\text{CO}_2$ and $^{12}\text{CO}_2$ (cross interference)
- Overlap of absorption spectra of CO₂ and H₂O (foreign gas interference)

Asymmetric stretch mode of
 $^{13}\text{CO}_2$ and $^{12}\text{CO}_2$
Natural isotope ratio (1 : 90)



Nondispersive Infrared Spectrometer NDIRS

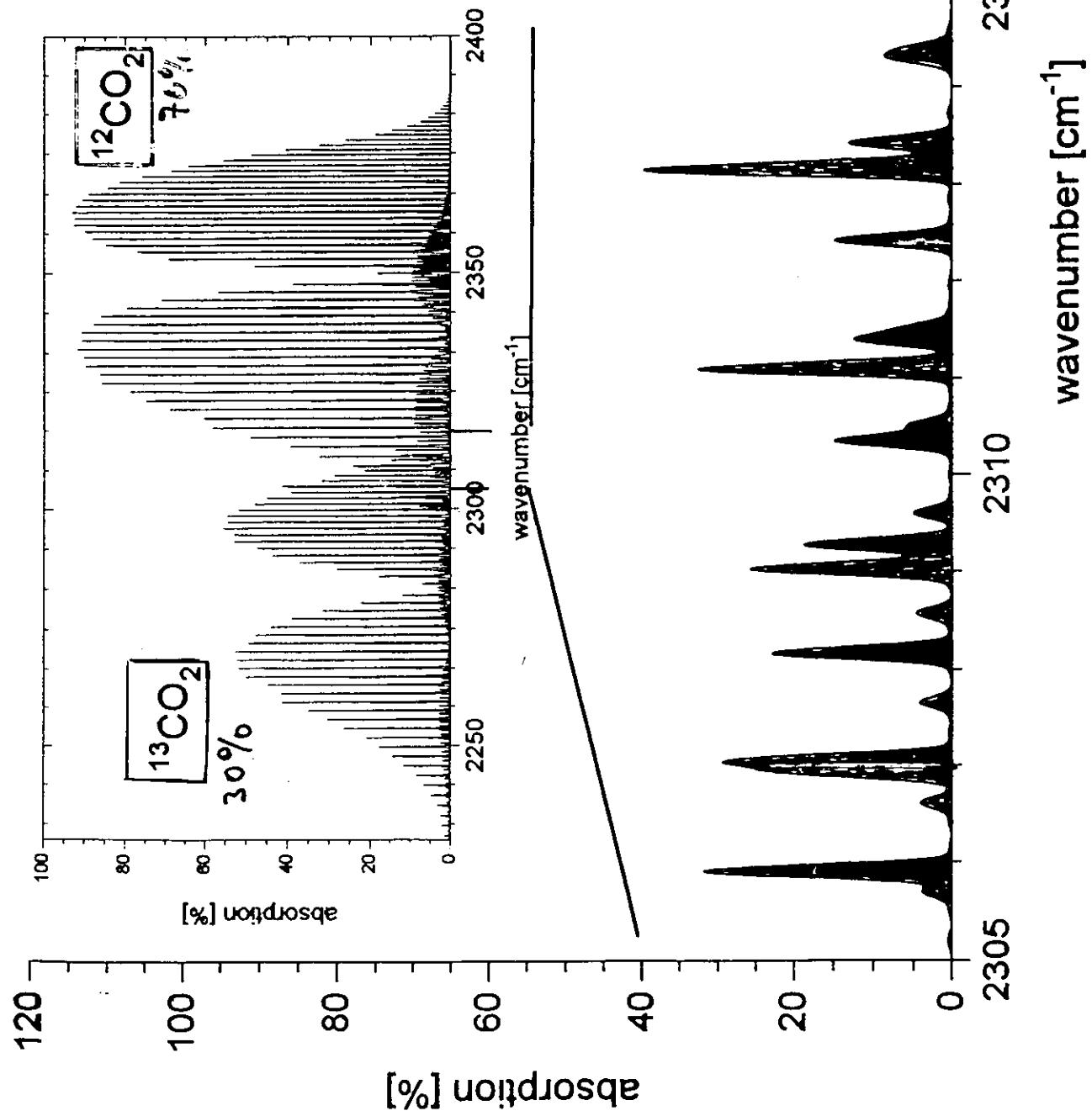


Applications for NDIRS:

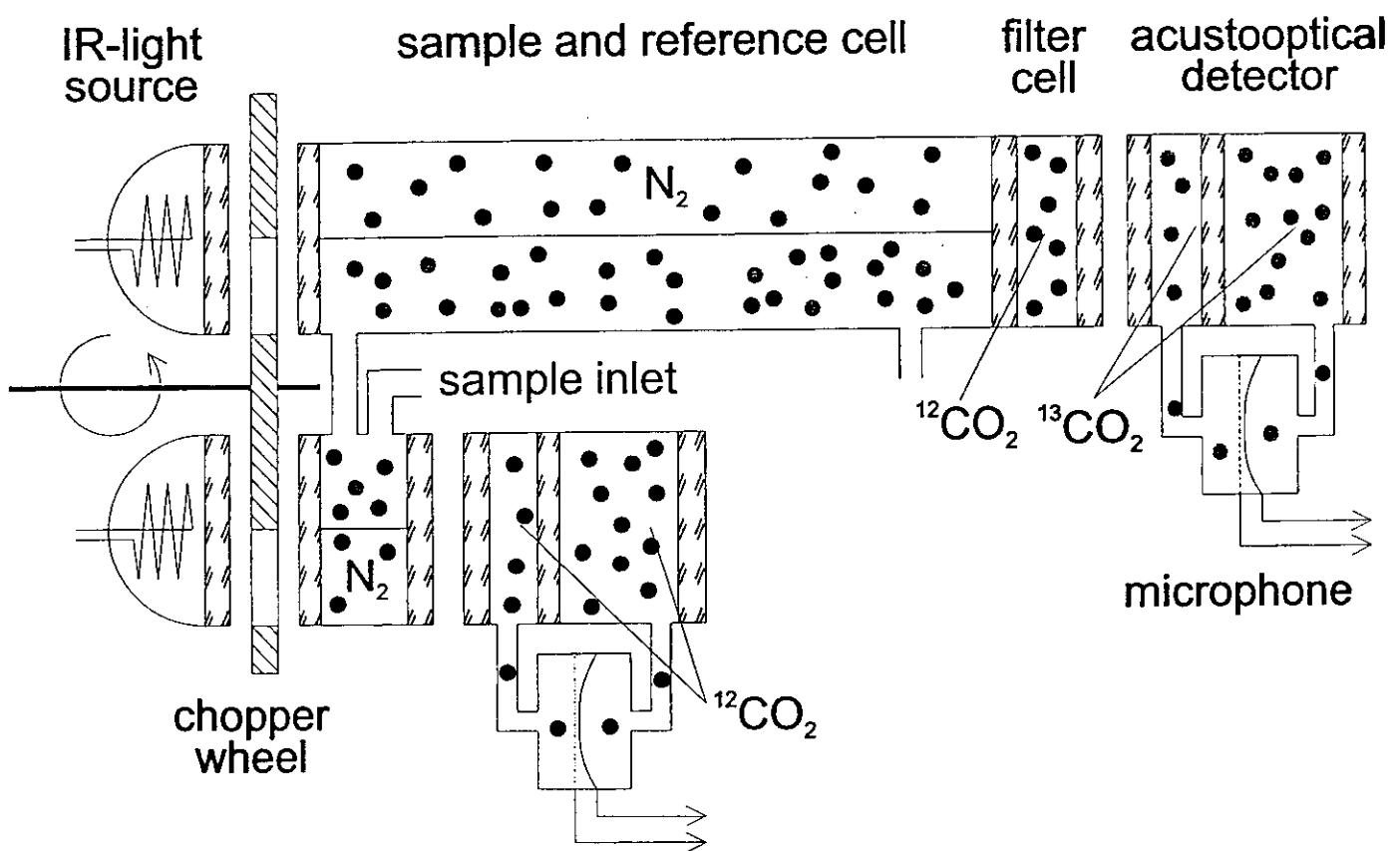
gas analysis for industrial processes

analysis of the $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$ -ratio in the
human breath better than 0.07 %
(e.g. $300.0 \text{ ppm} \pm 0.1 \text{ ppm } ^{13}\text{CO}_2$)

Absorption Spectrum of CO_2

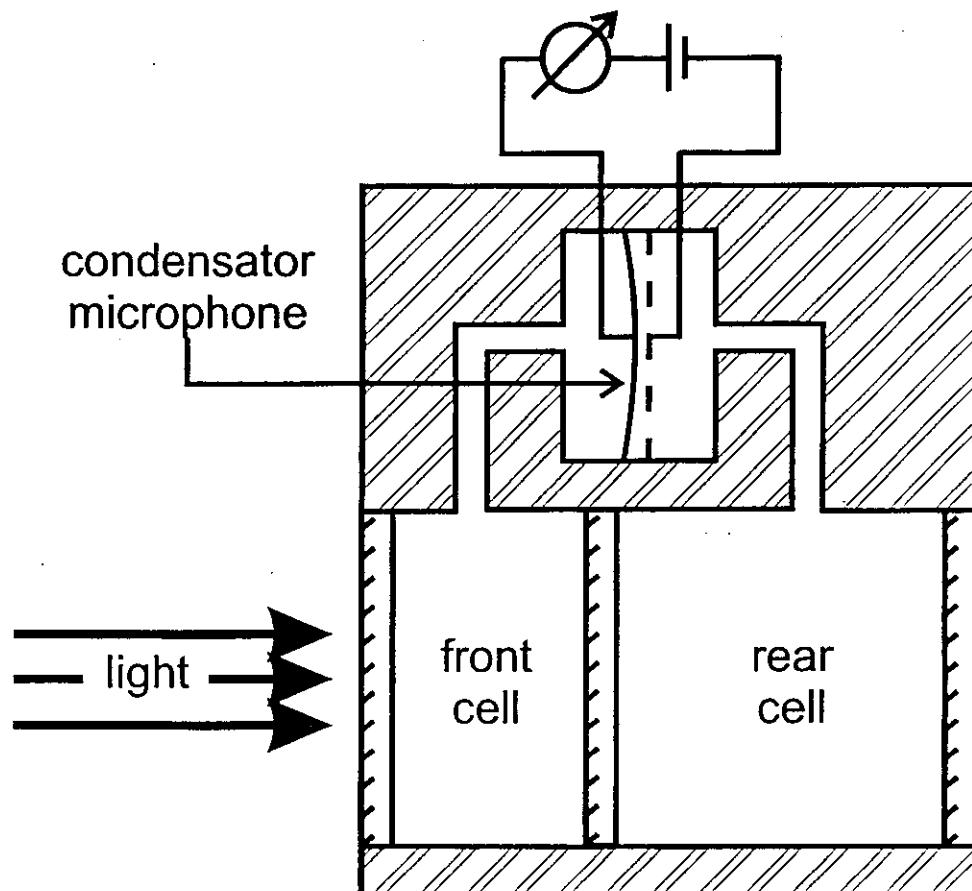


Setup of the nondispersive infrared spectrometer for selective measurement of isotope concentrations



Measurement of $^{13}\text{CO}_2 / ^{12}\text{CO}_2$ ratio better than 0.07 %

Acustooptical double cell detector (Lehrer and Luft type)



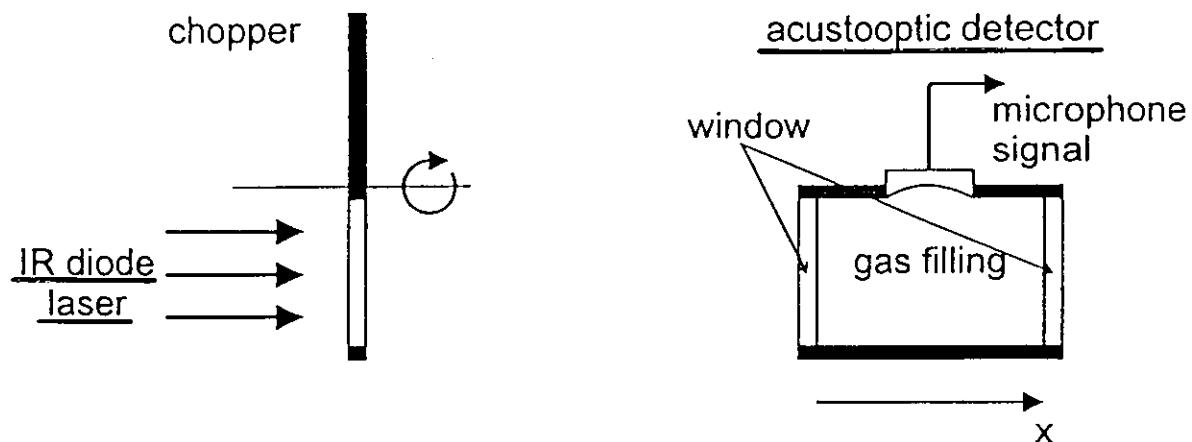
Lambert Beer's law:

strong absorption: all energy is absorbed in the front cell
→ positive microphone signal

weak absorption: more energy is absorbed in the rear cell
→ negative microphone signal

Model of acoustooptic Detectors

scheme of acoustooptic detector:

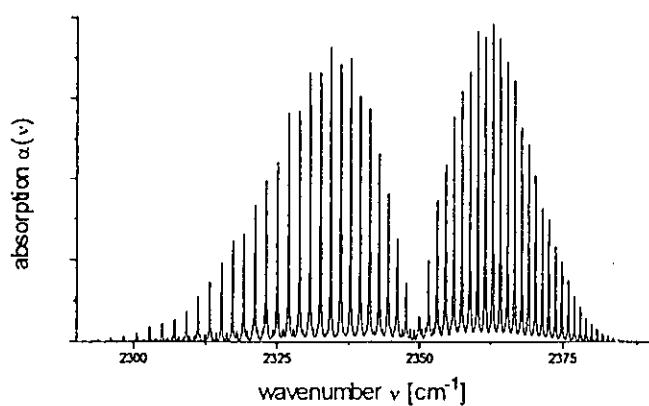


model:

absorption of

gas filling $\alpha(\nu)$:

(MOLSPEC)

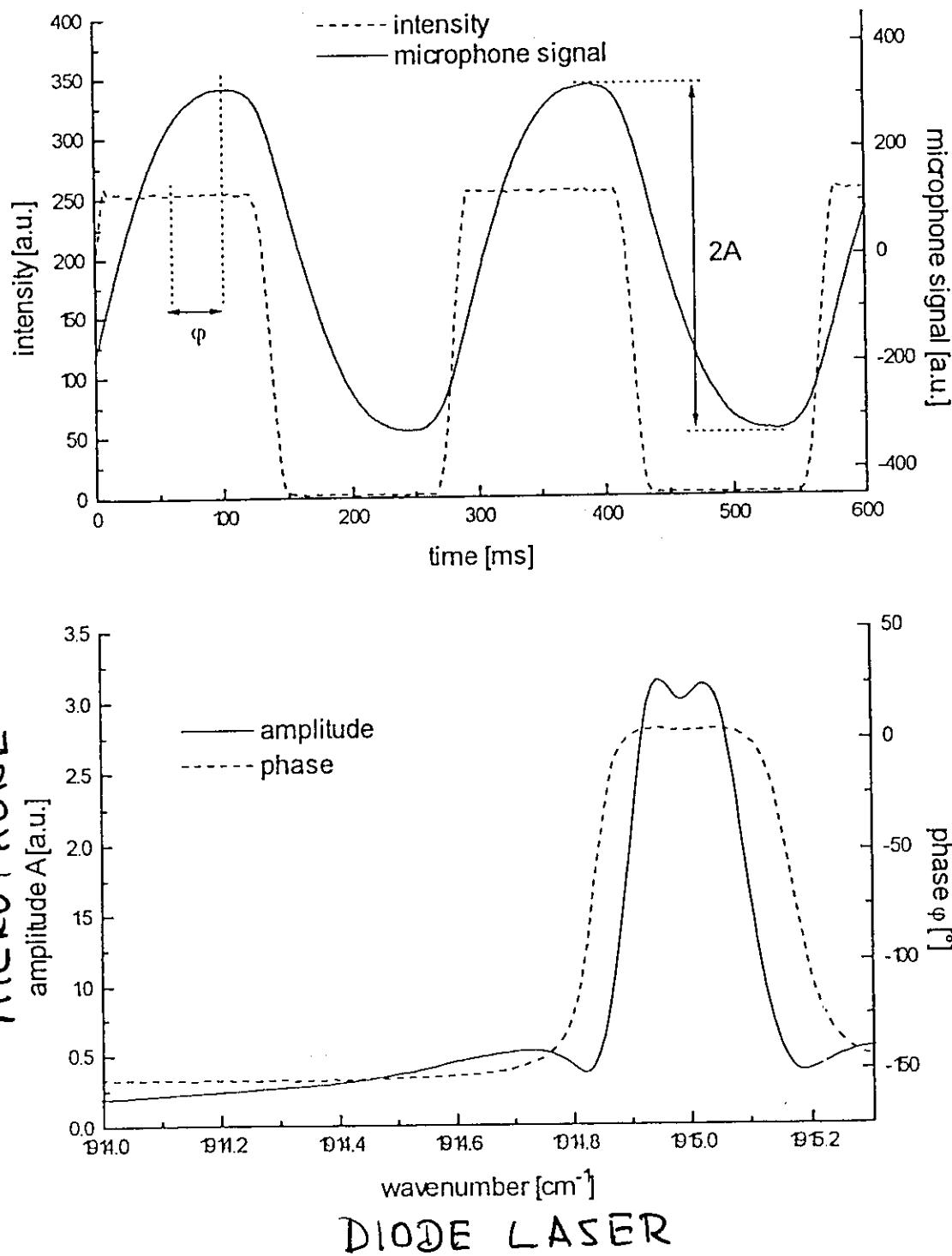


heat conduction: $\dot{T} - \kappa \Delta T = e^{-\alpha(\nu)} \cos \omega t$

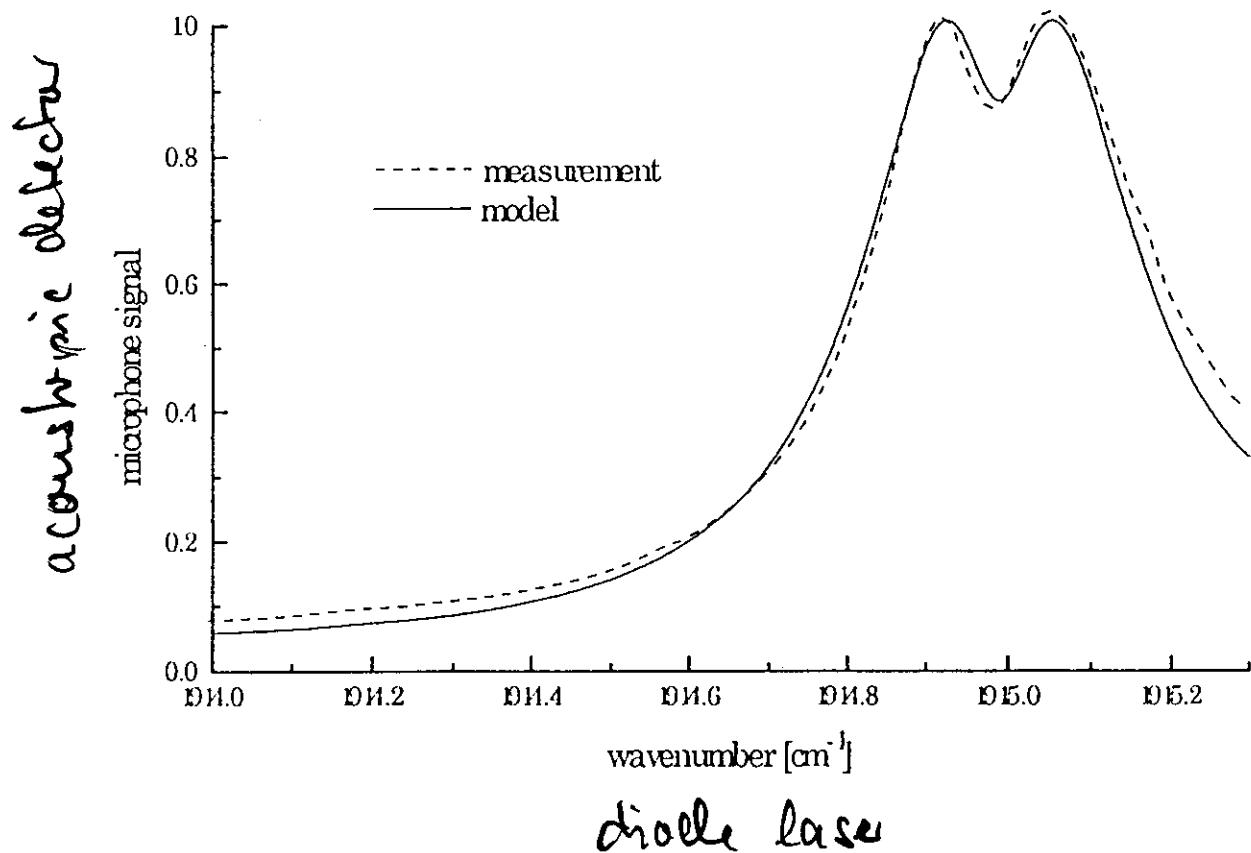
constraints: $\dot{T} = 0$ on windows

calculation: $T(x,t) \Rightarrow$ microphone signal

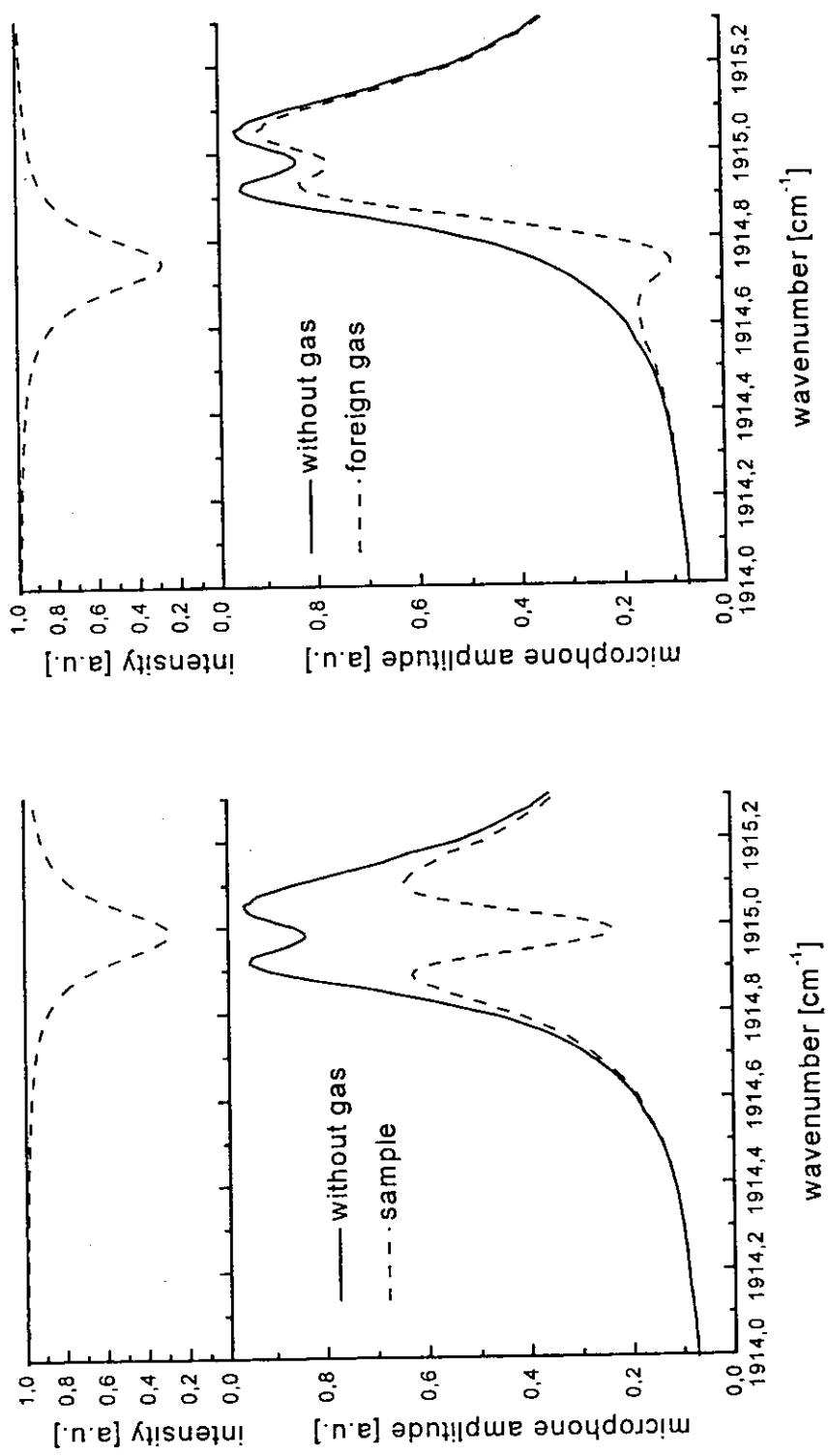
Amplitude and Phase of the acoustooptic Detector Signal



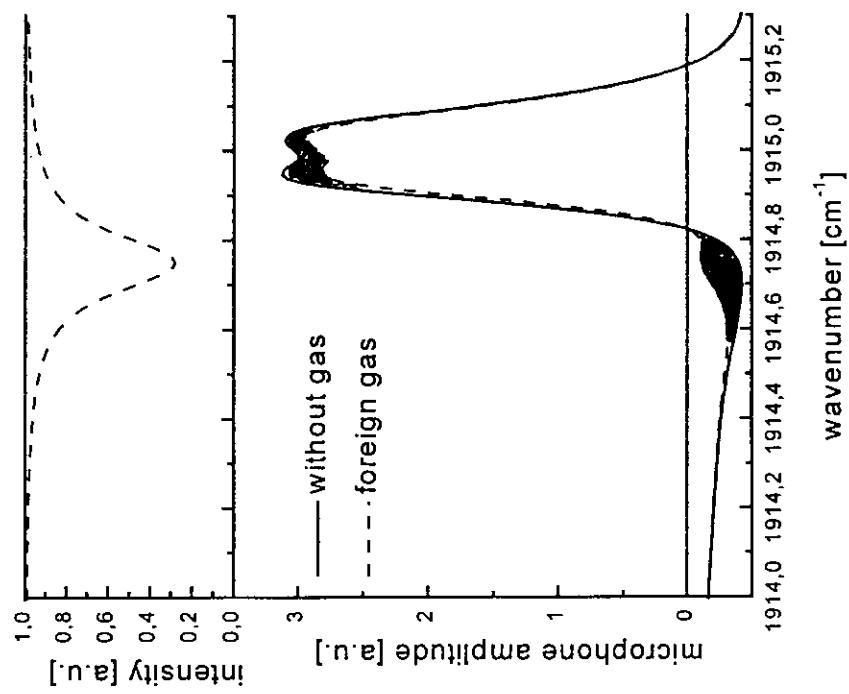
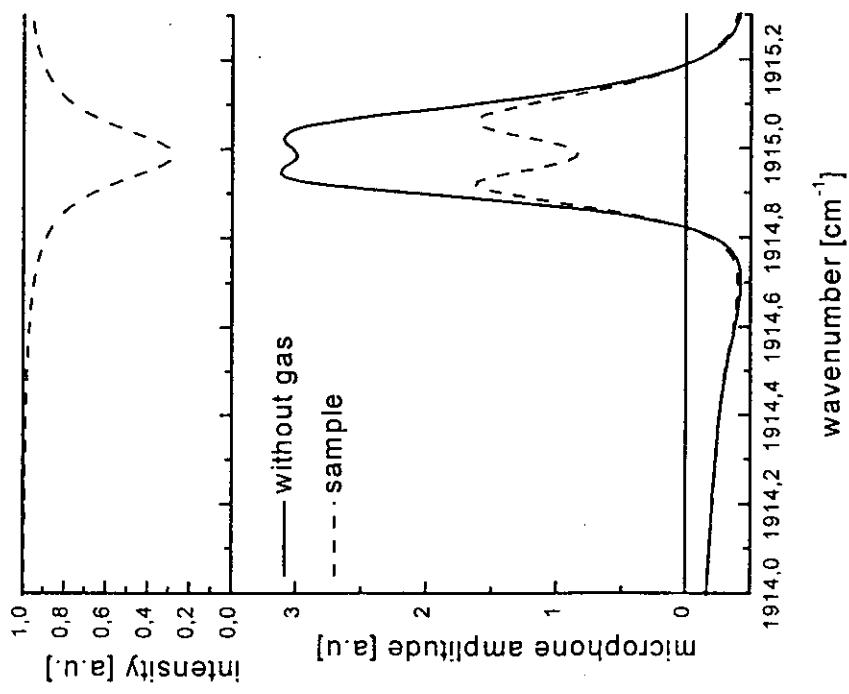
Model of acoustooptic Detectors



Sample and foreign gas characteristics of the single cell detector



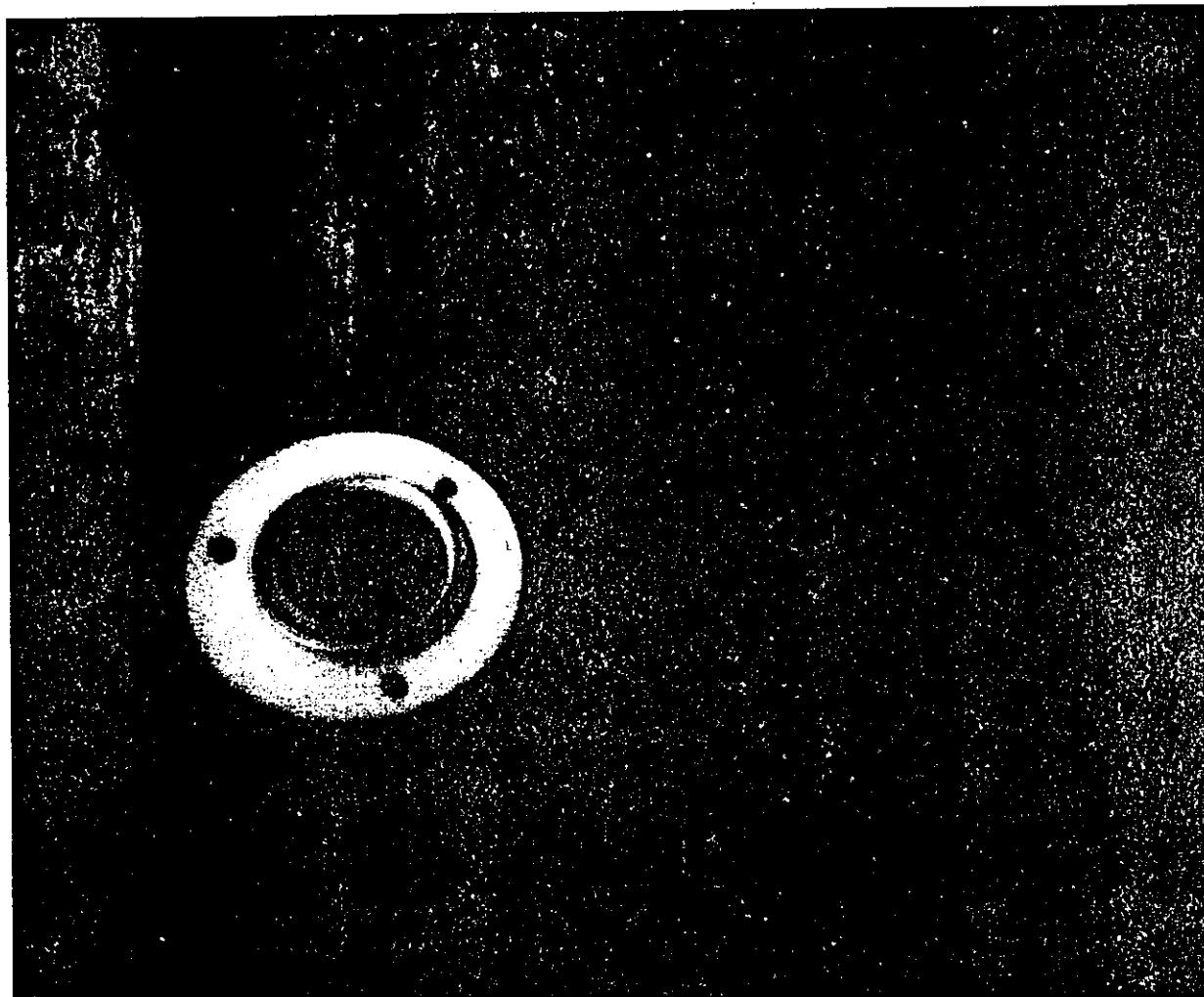
Sample and foreign gas characteristics of the double cell detector

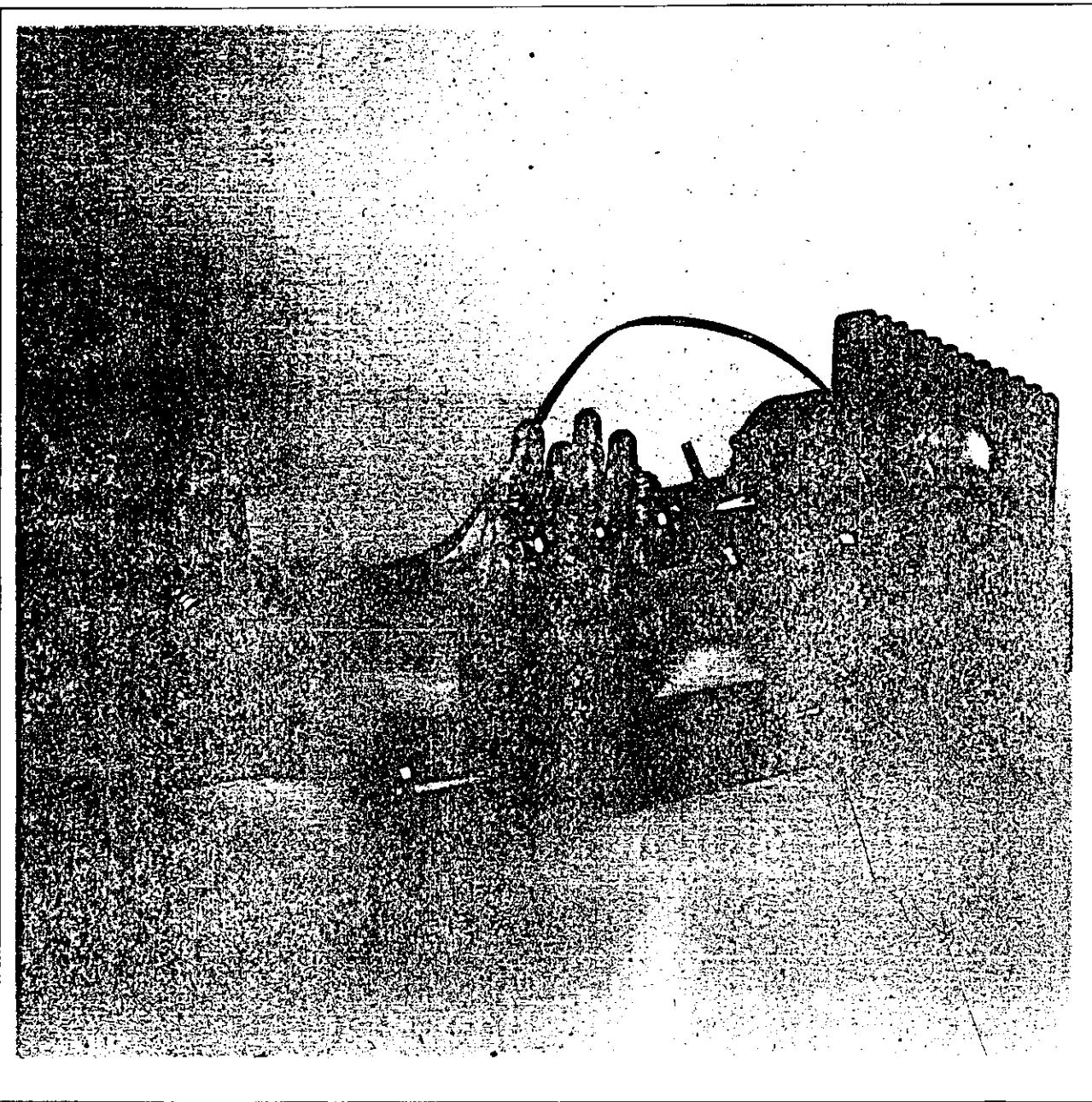


sensitivity of the acousto-optical detector (Lehrer and Luft type)

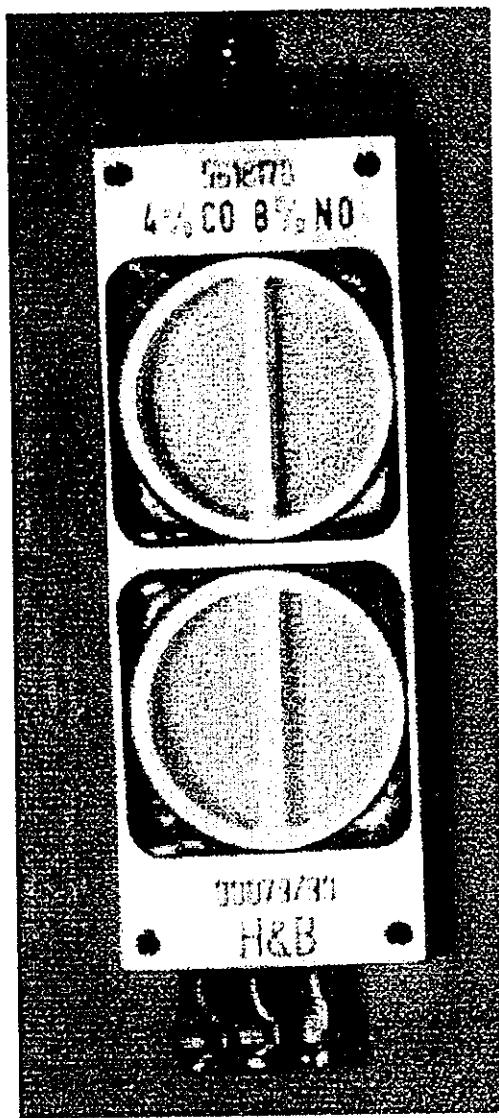
1 ppm change of $^{13}\text{CO}_2$ in sample cell causes:

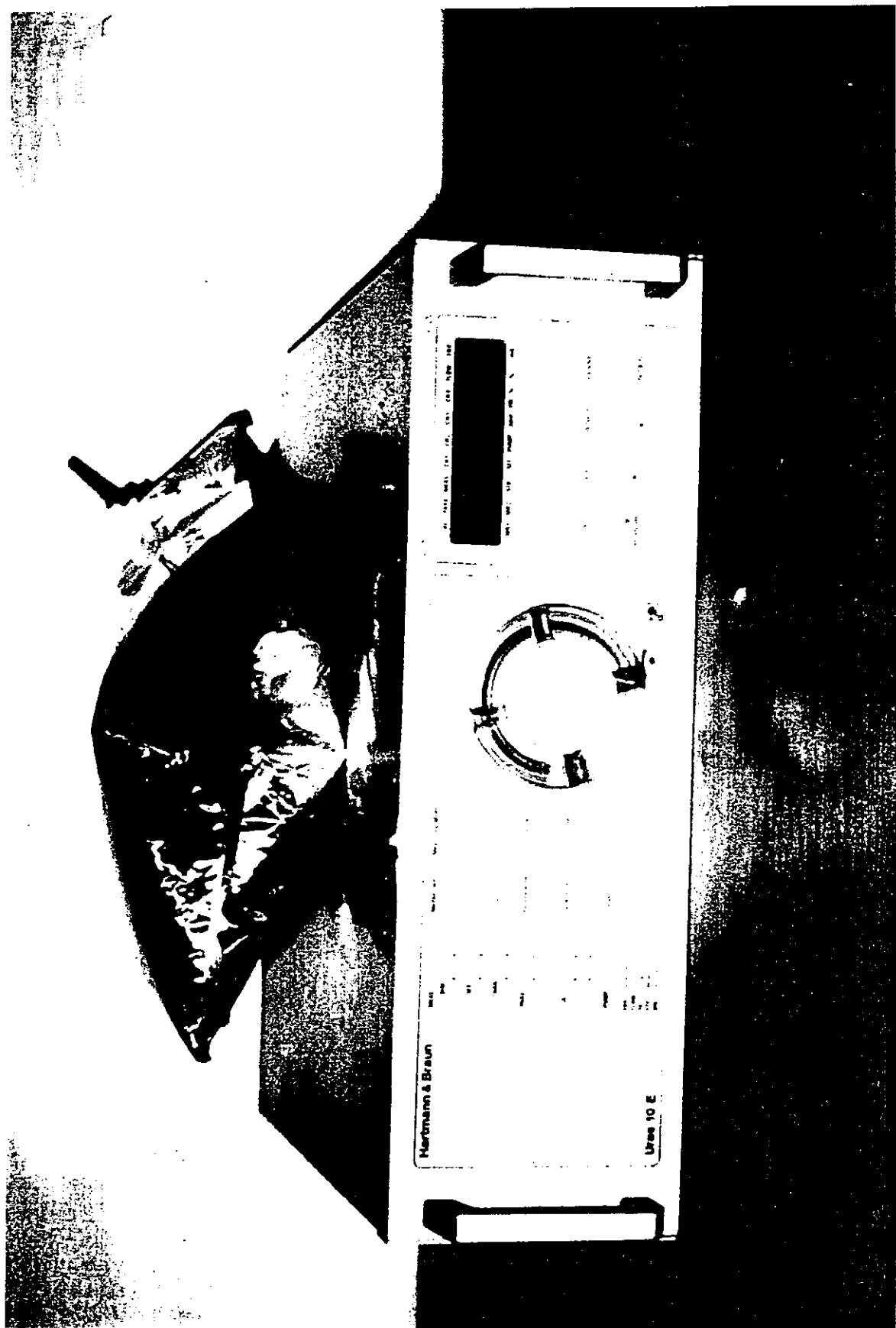
pressure difference ΔP :	3×10^{-5}	nbar !
capacity difference ΔC :	10^{-5}	pF
temperature difference ΔT :	10^{-6}	$^{\circ}\text{K}$!
membrane amplitude ΔH :	10^{-5}	$\mu\text{m} (= 0.1 \text{ Angström} !)$



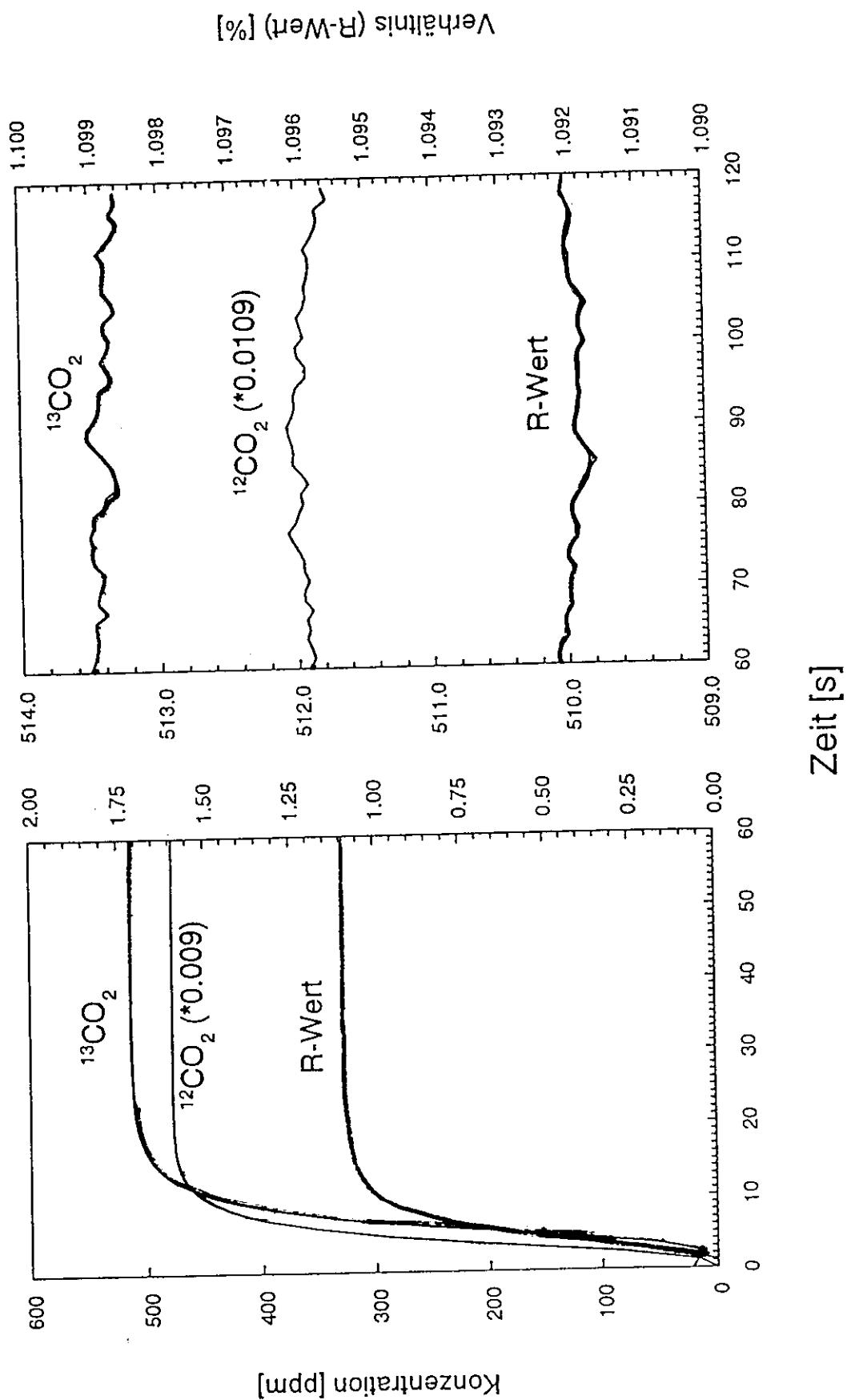


Kalibrierküvette

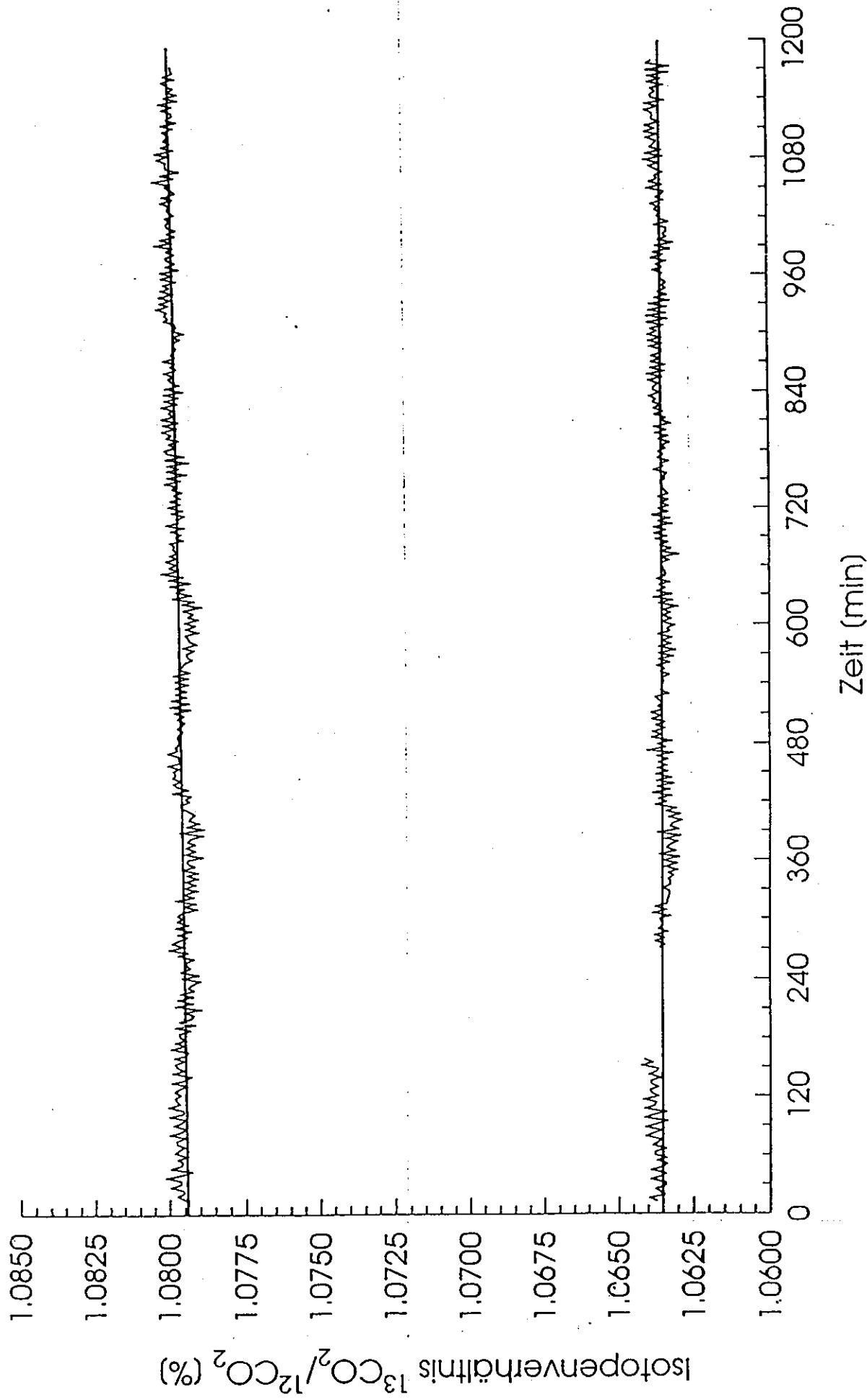




Zeitverhalten bei der NDIR-Spektroskopie

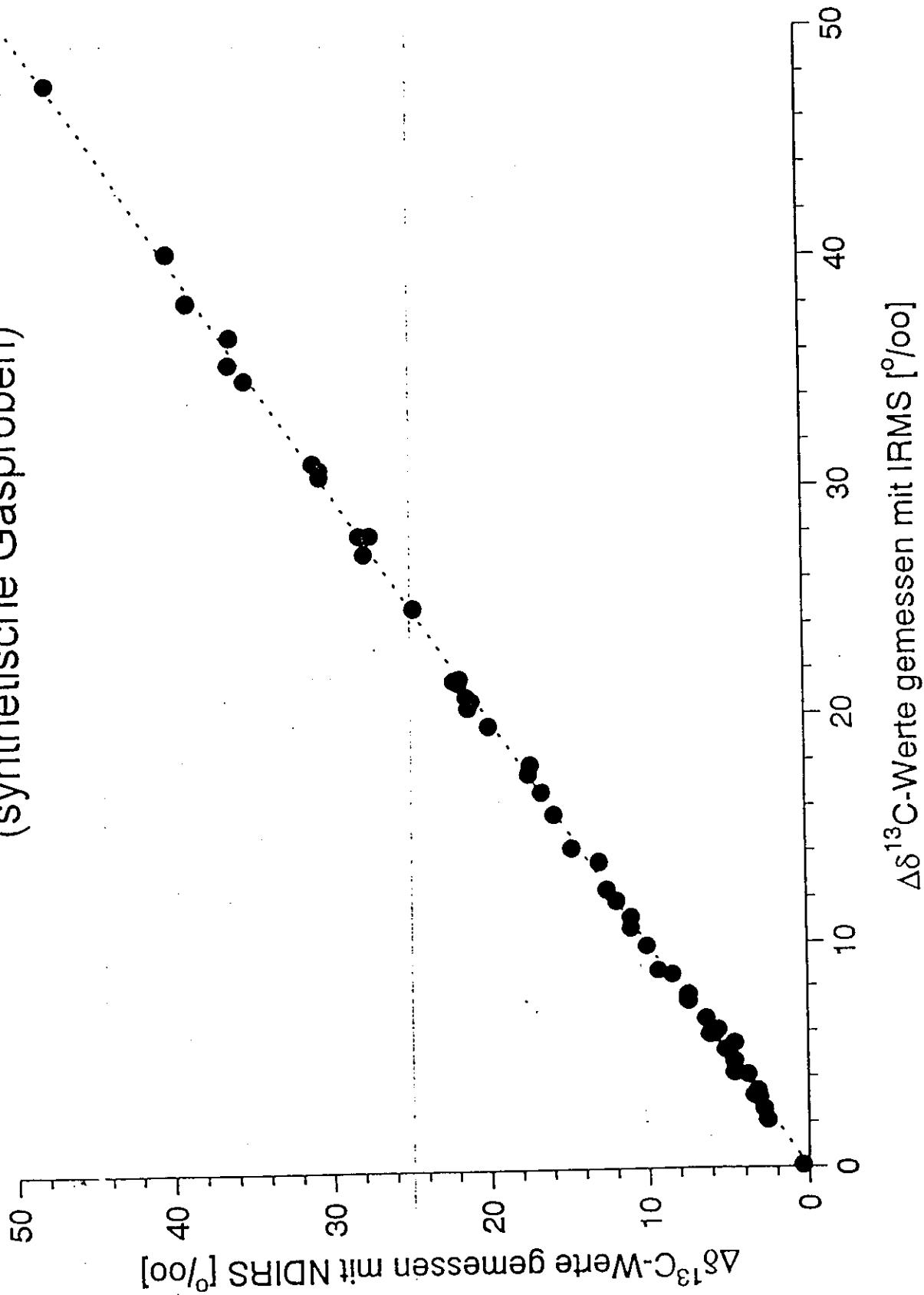


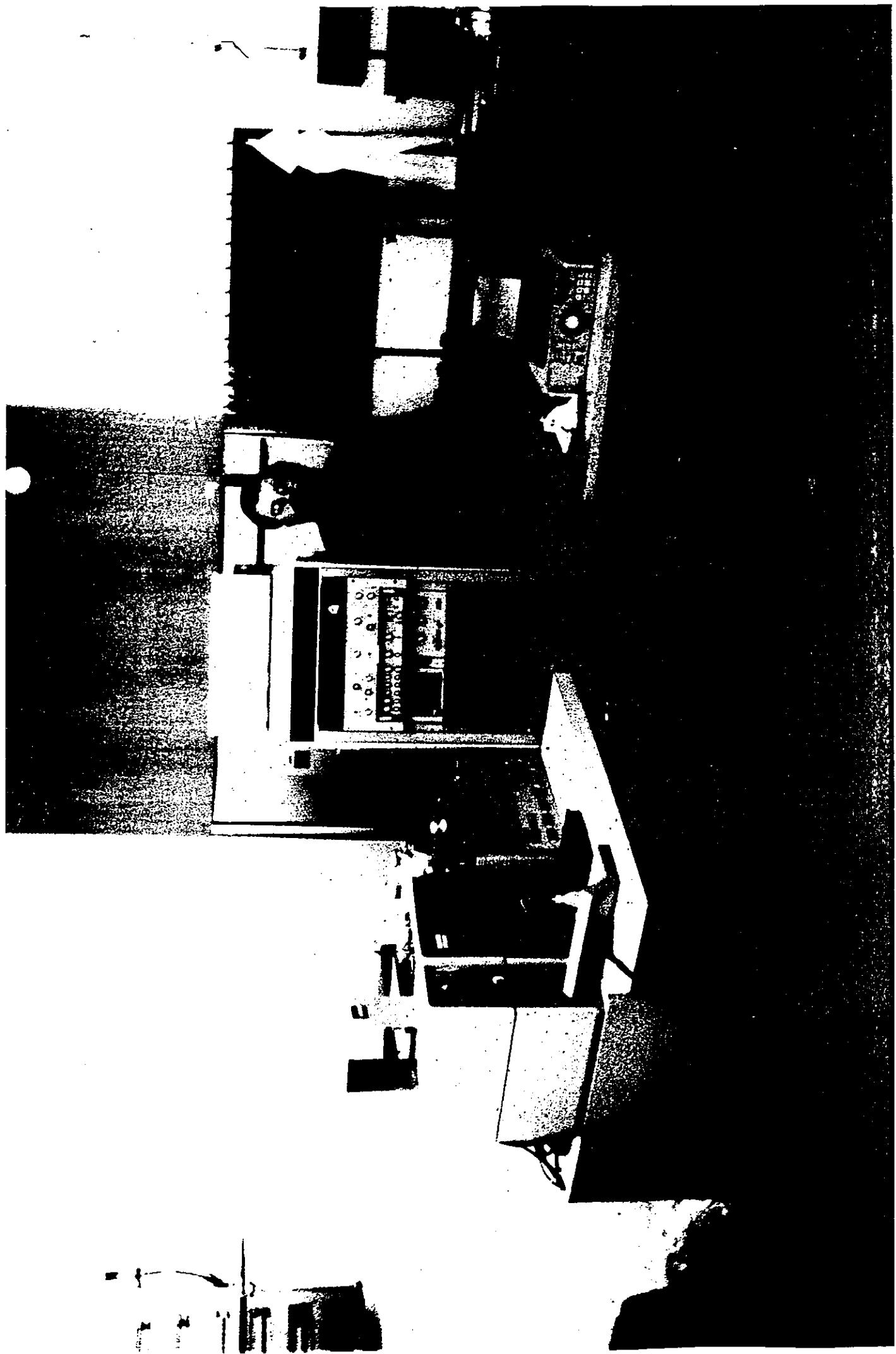
Reproduzierbarkeit der NDIR-Messungen



Vergleich von IRMS und NDIR

(synthetische Gasproben)





The Bacteria *Helicobacter pylori*

generation of medical students learned:

stress causes high acid level in stomach, followed by :

chronic gastritis and ulcer

since 1910 dogma of Dr. Karl Schwartz:

"No acid, no ulcer"

medication with histamine 2-receptor (H_2) blocker

since a few years:

bacteria *Helicobacter pylori* causes in 80% gastritis, ulcer
and even stomach cancer

in 1994 the World Health Organisation declares H. pylory a
class 1 carcinogen (highest risk cancer causing agent)

only 15 % of infected persons develop symptoms:

⇒ virulent and non-virulent microbes (diverse at genetic
level)

already in 1874 Dr. Böttcher found *H.p* in the stomach
nobody believed these results

1982 Warren and Marshall (Australia) rediscovered Hp

How can H. pylory survive stomach acid?

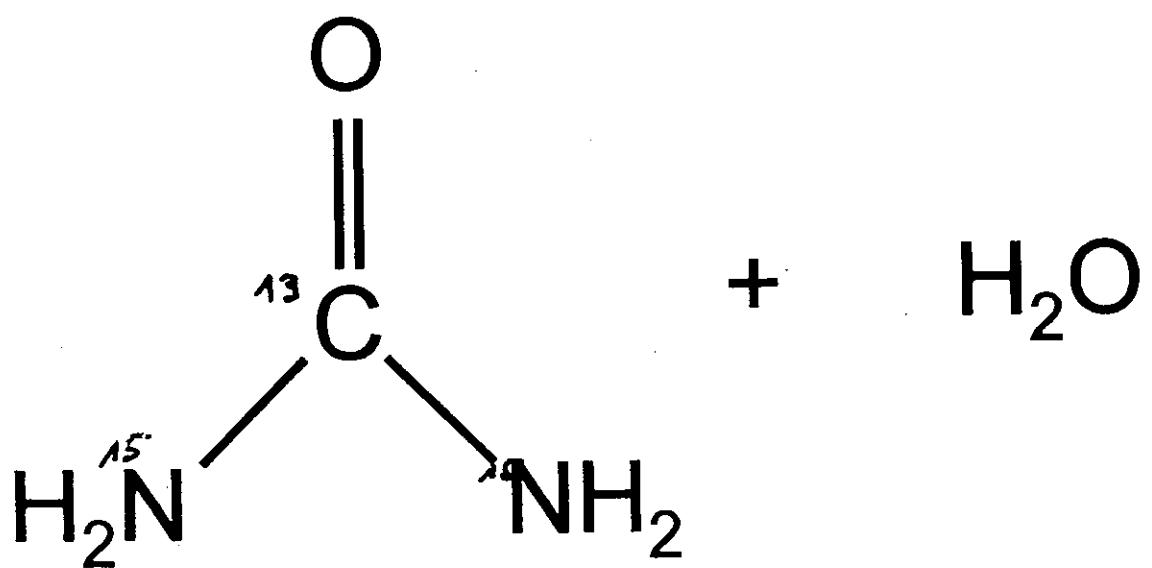
Scientific American, February 1996, p 92

www.helico.com

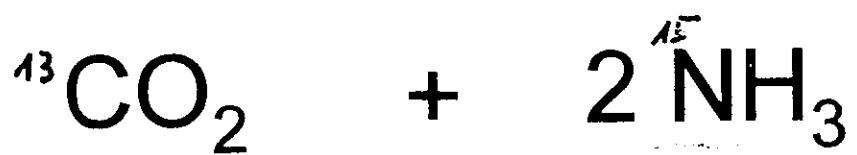
Helicobacter pylori



Quelle: research 8, Das Bayer-Forschungsmagazin



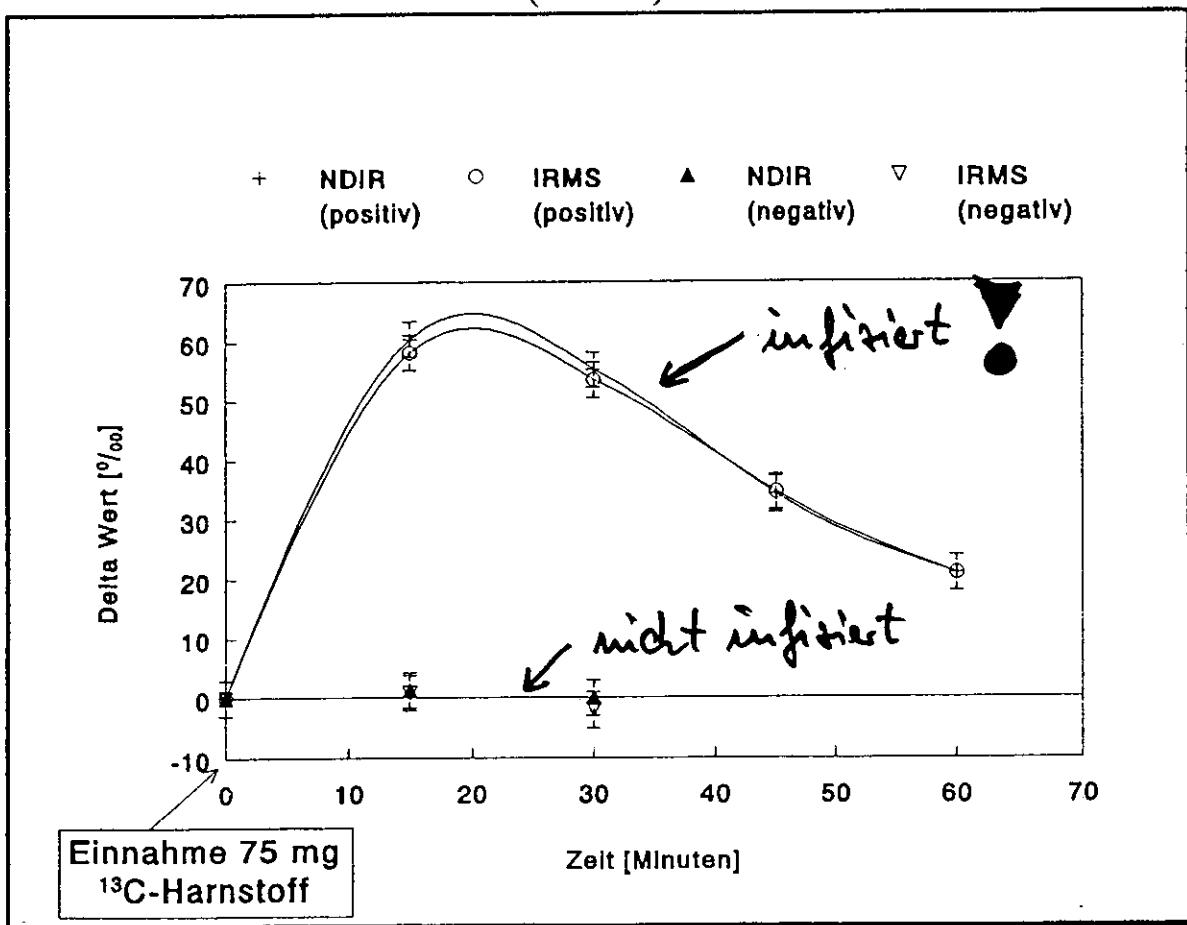
↓
*helicobacter
pylori*



$^{13}\text{CO}_2$ - Atemtest mit nichtdispersiver Infrarot Spektroskopie (NDIR)

erste Ergebnisse mit Helicobakter pylori positiven und negativen Patienten

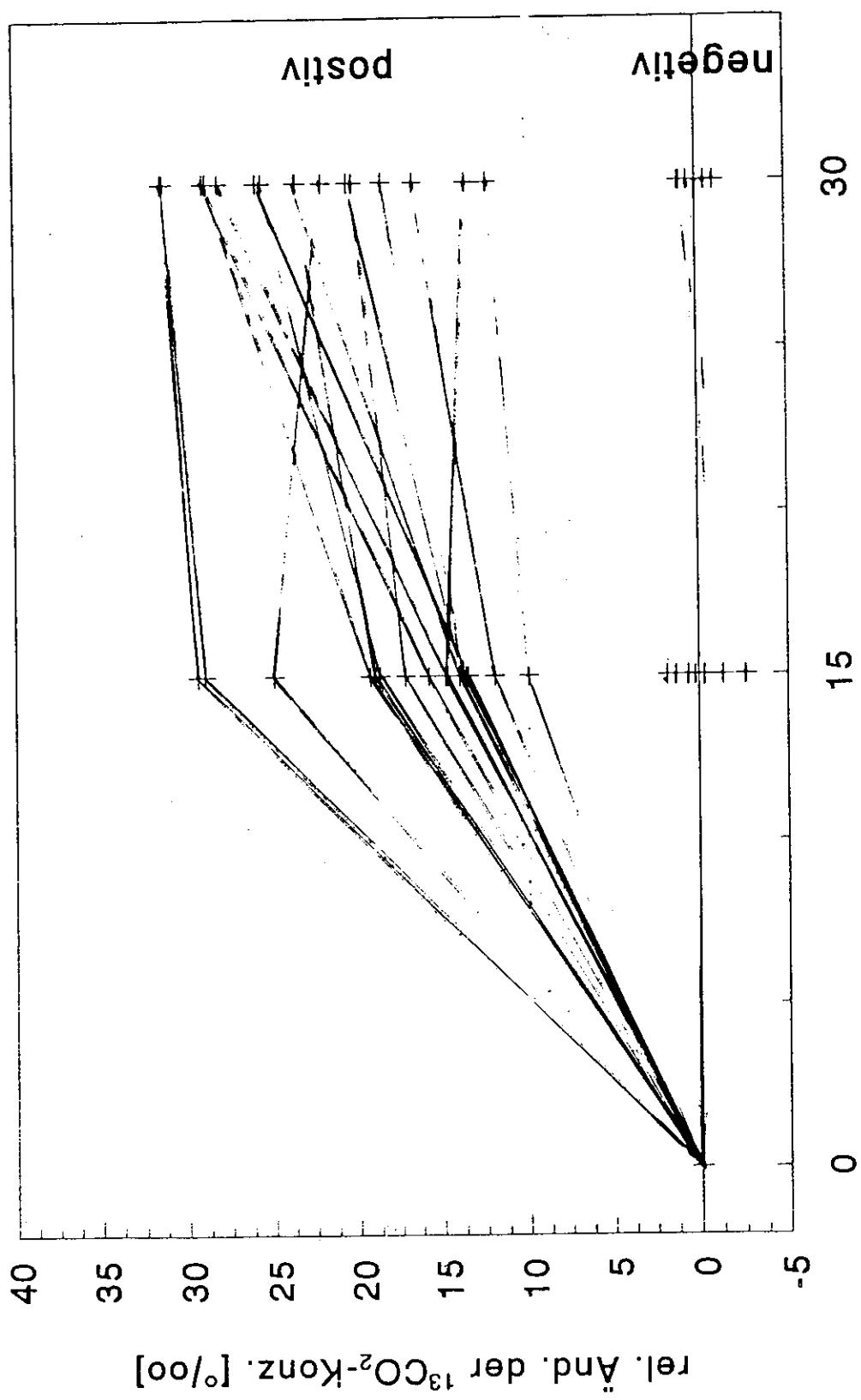
Vergleich mit spezieller "Isotope Ratio Mass Spectrometry" (IRMS)



Definition des Delta-Wertes:

$$\text{DELTA} = \left\{ \frac{\left(\frac{^{13}\text{CO}_2}{^{12}\text{CO}_2} \right)_{\text{Messung}} - 1}{\left(\frac{^{13}\text{CO}_2}{^{12}\text{CO}_2} \right)_{\text{Referenz}}} \right\} \cdot 1000$$

Atemtest mit ^{13}C -Harnstoff zum Nachweis von Helicobacter pylori im Magen



gesamt: 70 Tests
positiv : 19 Tests
negativ: 51 Tests

Zeit [min]

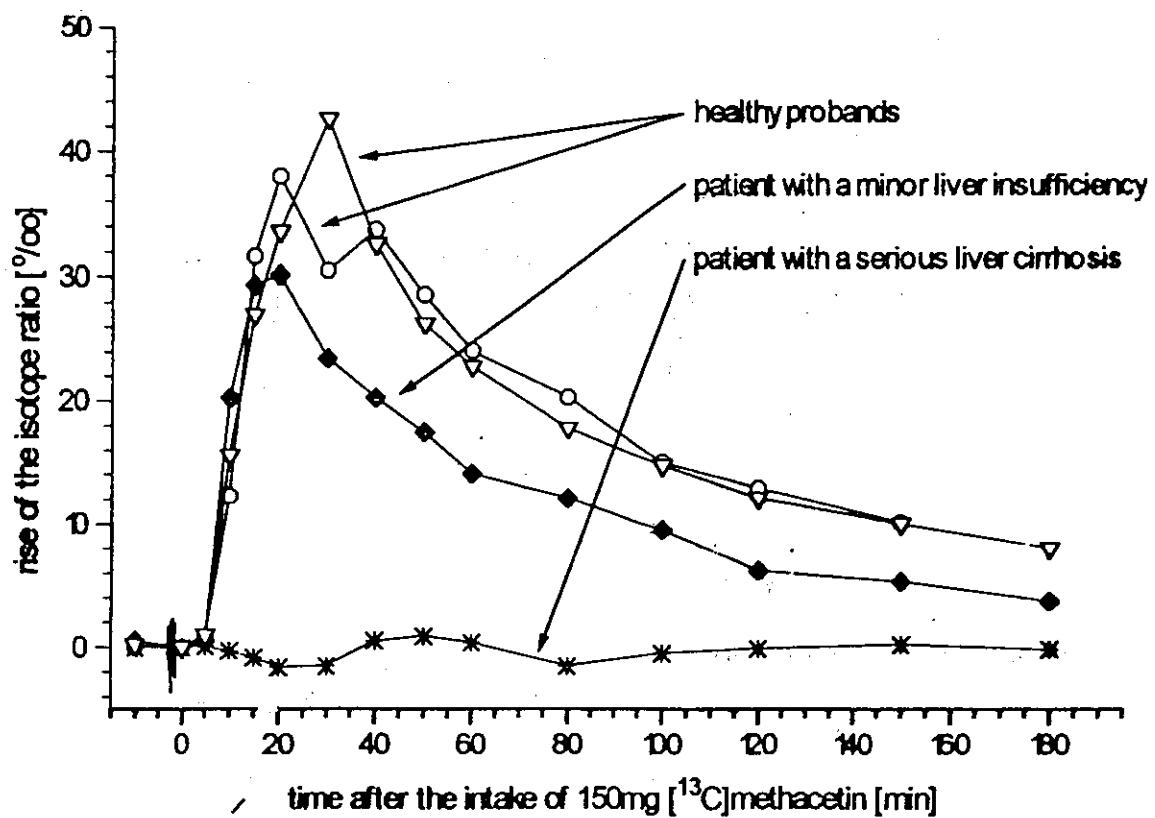
nach Einnahme von 75mg [^{13}C]-Harnstoff

Liver Function Test with [¹³C]Methacetin

Methacetin is only reduced in the liver \Rightarrow specific substrate for the liver function

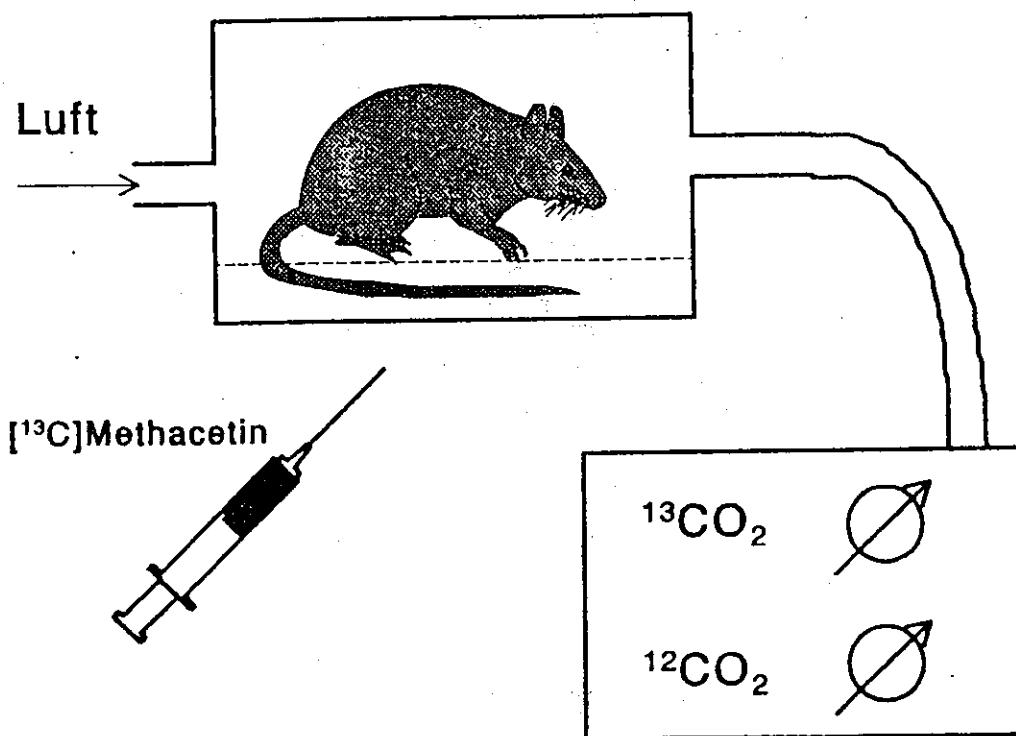
applications:

- diagnosis of liver diseases
- control after liver transplantations
- control of liver function of intensive care patients



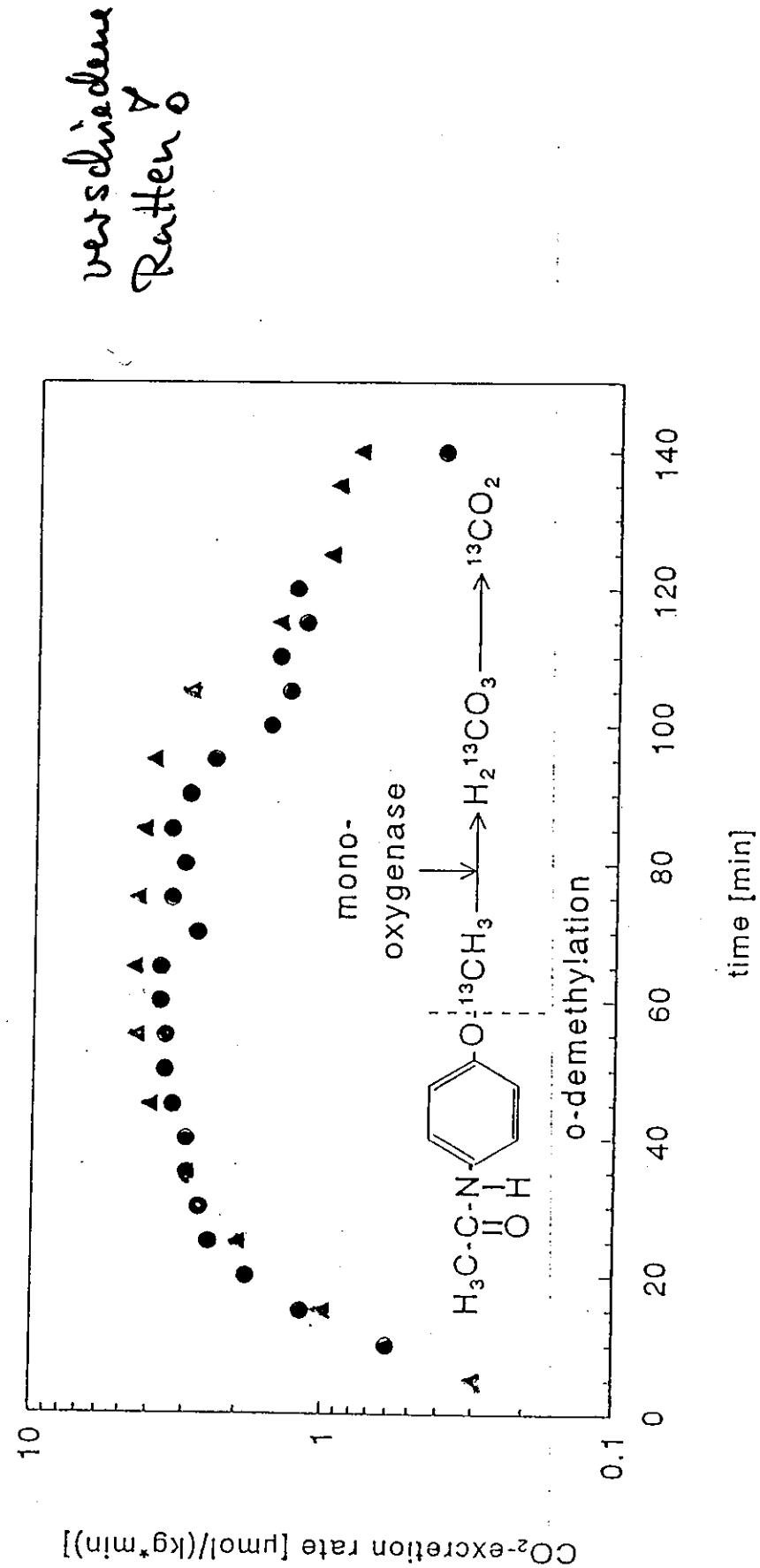
^{13}C -Einsatz in der pharmakologischen Forschung

Zur Ermittlung pharmakokinetischer Daten werden häufig ^{14}C -markierte Prüfsubstanzen eingesetzt. Um die Probleme im Umgang mit radioaktiven Materialien zu umgehen, besteht der Wunsch, nach Möglichkeit kalte Isotope als Marker zu nutzen.



Methacetine catabolism of rats
dose: 0.3mmol methacetine/kg (bolus)

● [¹³C]methacetine ▲ [¹⁴C]methacetine



Mitarbeiter Institut für Lasermedizin:

M. Ivanenko *$^{13}C - ^{12}C$ Laser-Isotopentrennung*
J. Göthel *Hartgewebe Ablation*
T. Mitra, H. Handreck, O. Kuhne

G. Laschinski, C. Hoheisel *NDIR*
M. Haisch
B. Schommartz *Dioidenlaser - Spektroskopie*

Sandra Klein *Flüssigkeitslichtwellenleiter*
J. Meister
J. Bongartz, R. Jung, S. Diemer, Maren Stanislawski

S. Willmann, A. Terenji, H. Busse *LITT*
H.J. Schwarzmaier
I.V. Yaroslavsky, A.N. Yaroslavsky
T. Goldbach, T. Kahn

wissenschaftl./technische Kooperationen (NDIR):

W. Fuß: **Max-Planck Institut für Quantenoptik, Garching**
K.L. Kompa
W. Fabinski: **Hartmann & Braun, Frankfurt**
G. Wagner: **WATV, Worpsswede**

medizinische Kooperationen (NDIR):

P. Schadewaldt: **Diabetes Forschungsinstitut, Düsseldorf**
H. Brösicke: **Kinderklinik der FU Berlin, Berlin**
B. Braden, **Gastroenterologie, Universitätsklinikum**
W.F. Caspary: **Frankfurt**
S. Koletzko: **Kinderpoliklinik der LMU München**
C. Steffen: **Institut für Arzneimittel des
Bundesgesundheitsamtes, Berlin**

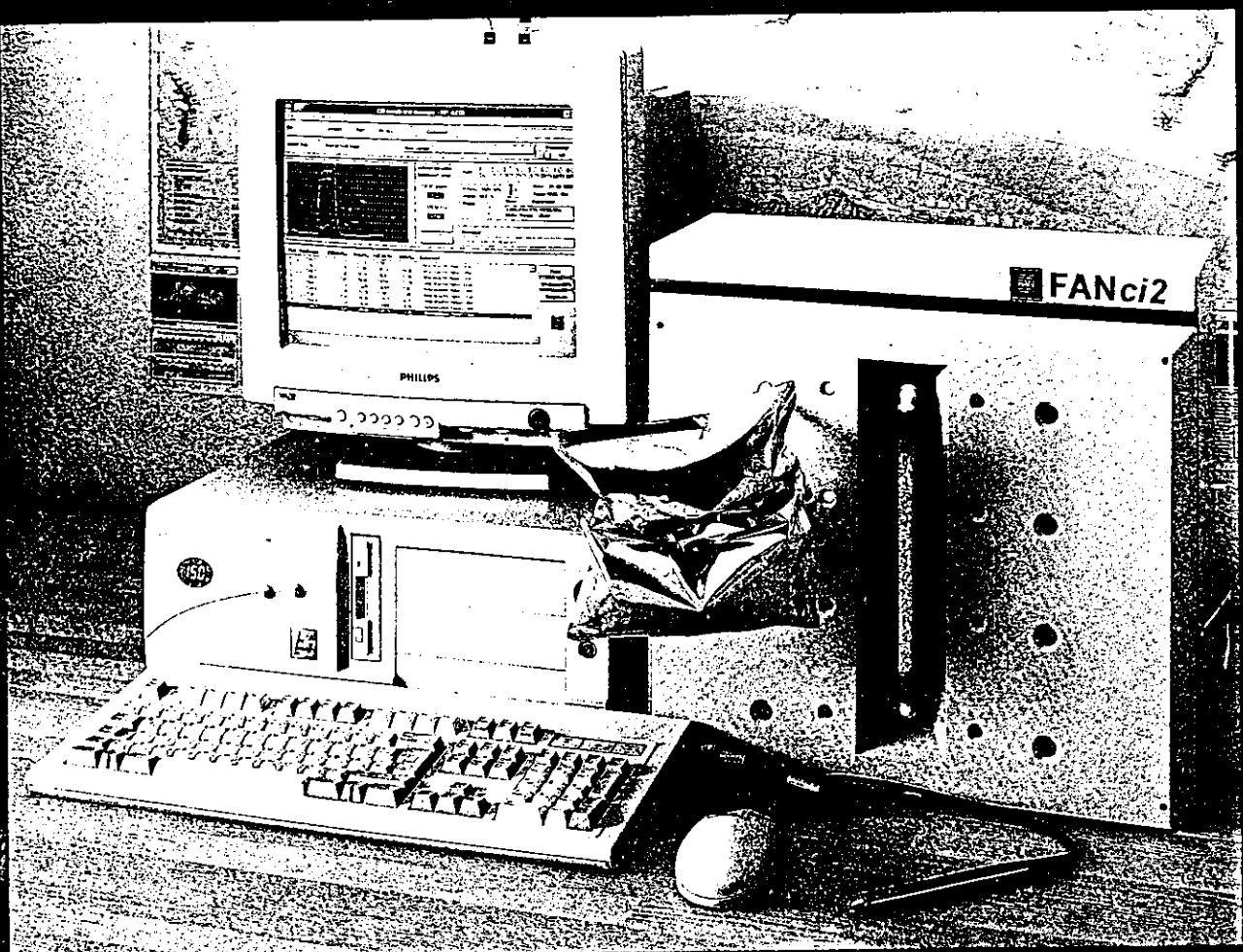
Spectroscopy of turbid media



H. Busse ¹
P. Hering ¹
H.-J. Schwarzmaier ²
A. Terenji ¹
S. Willmann ¹
A.N. Yaroslavsky ¹
I.V. Yaroslavsky ¹

¹ Laser Medicine Dept., Düsseldorf University

² Applied Information Technology, GMD, St. Augustin



13/12

FANci2

CO₂-Atemtestgerät



®

<http://www.fan-gmbh.de>



Das Unternehmen

Die Firma Fischer ANalysen Instrumente GmbH wurde im Mai 1991 gegründet. Sie ging durch 'management buy out' aus der Akademie der Wissenschaften hervor. Ihr Geschäftszweck ist die Entwicklung, Produktion und der Vertrieb von computergesteuerten Analysensystemen sowie der peripher notwendigen Zusatzgeräte.

Das kompetente Team aus Wissenschaftlern, Ingenieuren und Technikern garantiert durch jahrelange Erfahrung und qualifiziertes Fachwissen, verbunden mit modernster Technik und Organisation, intelligente Lösungen auf dem Gebiet der Analysenmeßtechnik.

Qualität, Zuverlässigkeit und innovative Produktideen sind Grundlagen unserer Unternehmensphilosophie.



Fischer ANalysen Instrumente GmbH
Brahestraße 27 • D- 04347 Leipzig
phone: +49-341-24450-0 • Fax: +49-341-24450-22
e - mail: [FAN.com @ t-online.de](mailto:FAN.com@t-online.de)

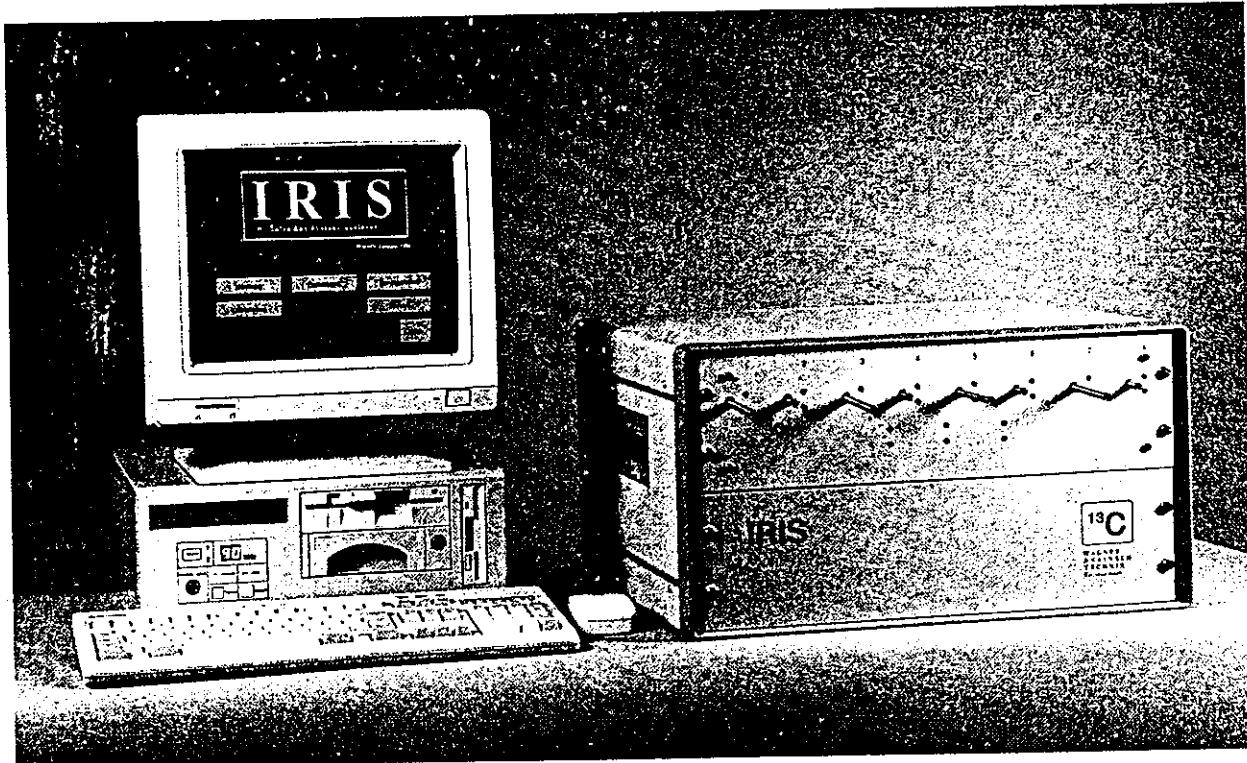
13C

¹³C - Stabilisotopen-Diagnostik

Organfunktion, Substrateinbau, metabolische Funktion oder Fehlfunktion und bakterielle (Über-)Besiedlung manifestieren sich bei Einsatz ¹³C-markierter Substrate am ¹³C/¹²C-Stabilisotopenverhältnis im CO₂ des Atemgases.

Stabile Isotope (¹³C, ¹⁵N, ¹⁸O ...) sind ein sicheres Medium für nichtinvasive Diagnostik. In natürlicher Abundanz sind sie sowieso ein Teil unserer elementaren Existenz. Sie sind nicht radioaktiv und daher ohne Bedenken auch an Kleinstkindern und Schwangeren einsetzbar.

IRIS® - Infra Rot ISotopen Analysator



Der IRIS®-Analysator bestimmt die ¹³C-Stabilisotopen-Konzentration am abgeatmeten Kohlendioxid nach entsprechender Substrateinnahme. Sein Analysenergebnis ist die schnelle und präzise Antwort auf die diagnostische Fragestellung.

IRIS® , das komfortable Werkzeug für die ^{13}C -Stabilisotopen-Diagnose:

Nicht-invasive ^{13}C -Stabilisotopen-Atemtests bewähren sich bereits in der Gastroenterologie sowie in der Stoffwechselkontrolle bei Fragestellungen der Anaesthese- und Intensivmedizin:

- o Harnstoff-Atemtest - Bestimmung des Helicobacter pylori - Status, Diagnose und Therapiekontrolle.
- o Triglyceride-Atemtest - Test der Pankreas-Funktion über die Lipase-Enzymfunktion
- o Lactose-Atemtest - Bestimmung der Lactase-Aktivität mit natürl. markierter Maisstärke.
- o Octanonsäure- und Acetat-Atemtests - Bestimmung der mittleren Magenentleerungszeit für feste, halbfeste und flüssige Nahrungsmittel.
- o Methacetin/Aminopyrin-Atemtest - Prüfung der Leberfunktion.
- o Xylose-Atemtest - Nachweis bakterieller Überwucherung des Dünndarms.
- o Glucose-Atemtest - Bestimmung Monosaccharid-Malabsorption.
- o Triolein/Holein-Test - Diagnose von Fett-Malabsorption.
- o Glycocholsäure-Test - Verfolgung der Gallensäure-Zirkulation.
- o Leucine-Atemtest - Beurteilung d. Aminosäure-Metabolismus.

Der Harnstoff-Atemtest ist der patientenfreundliche „Goldstandard“ in der Helicobacter-pylory-Diagnostik. Die anderen ^{13}C -Atemtests sind für ihre diagnostische Aussage gesichert:

Fordern Sie unsere Literatur - Datenblätter an.

IRIS® - Sichere Technik, einfache Bedienung, Ergebnisse sofort!

- Der Stabilisotopen-Analysator vergleicht die $^{13}\text{CO}_2$ - und $^{12}\text{CO}_2$ -Konzentration in zwei mit derselben Atemprobe beschickten IR-Zellen mit einer Sicherheit von besser 0.3 delta-Promille.
- Die Messung erfolgt direkt an Atemluft aus dem Atembeutel. Vorherige Abtrennung des Wassers oder Isolierung des Kohlendioxyds ist nicht erforderlich.
- Die Atembeutel von handlicher Größe (250 mm Länge, 125 mm Durchmesser) sind lagerfähig. Das Probenvolumen eines Beutels reicht für zwei Messungen.
- An den IRIS®-Autosampler können acht Proben gleichzeitig angeschlossen werden, die in automatischer Folge im 2-Minuten-Takt gemessen werden.
- Ein IBM-kompatibler Rechner mit 80486-Prozessor und Peripherie (VGA-Farbmonitor, Harddisk, Drucker und Maus) mit WINDOWS®- Bedienoberfläche steuert den Probenwechsel, erfaßt die Meßdaten und liefert das Analysenprotokoll.
- Platz- und Leistungsbedarf des IRIS-Analysators: 500 mm breit, 400 mm tief, 300 mm hoch. Zusätzlich ist Platz für den IBM-kompat. Rechner erforderlich.
Elektroanschluß 115 oder 230 V, 500 W.
Gewicht ca. 15 kg.

IRIS®, das höchst erfolgreiche Ergebnis der Zusammenarbeit von Physik ^{x)}, Medizin ^{xx)} und Industrie in der Entwicklung ^{x)}, Erprobung ^{xx)} und Umsetzung zum Produkt.

^{x)} Prof. Dr. Peter Hering, Dr. Michael Haisch

Institut für LASER-Medizin der Universität Düsseldorf, Universitätsstraße 1, D-40001 Düsseldorf.

^{xx)} Braden B., Haisch M., Duan L. P., Lembeck B., Caspary W.F. and Hering P.:

Clinically feasible stable isotope technique at a reasonable price: analysis of $^{13}\text{CO}_2$ / $^{12}\text{CO}_2$ -abundance in breath samples with a new isotope selective nondispersive infrared spectrometer.

Z. Gastroenterol. 1994; 32: 675-678

^{xx)} Koletzko S., Haisch M., Seeboth I., Braden B., Hengels K., Koletzko B., Hering P.:

Isotope-selective non-dispersive infrared spectrometry for detection of Helicobacter pylori infection with ^{13}C -urea breath test. Lancet 1995; 345: 961-62

