

# Sensor zur Echtzeitüberwachung des Sauerstoffgehalts der Atemluft mittels Fluoreszenzlöschung

*Mahmoud El-Safoury<sup>1,\*</sup>, Martin Dold<sup>1</sup>, Hendrik Bremer<sup>1</sup>, Christian Weber<sup>1,2</sup>, Nick Layer<sup>1</sup>, Jürgen Wöllenstein<sup>1,2</sup>*

<sup>1</sup>*Fraunhofer-Institut für Physikalische Messtechnik IPM, Georges-Köhler-Allee 301, 79110 Freiburg, Deutschland*

<sup>2</sup>*Institut für Mikrosystemtechnik – IMTEK, Professur für Gassensoren, Universität Freiburg, Georges-Köhler-Allee 101, 79110 Freiburg, Deutschland*

\* Korrespondenz an: mahmoud.el-safoury@ipm.fraunhofer.de

## Zusammenfassung

Die Atemgasanalyse hat zum Ziel über die Messung von Marker-Substanzen Rückschlüsse auf den klinischen Zustand eines Patienten zu ziehen. In diesem Artikel wird ein Sauerstoff-Sensor präsentiert, der mittels Fluoreszenzlöschung den Sauerstoffgehalt atemzugsaufgelöst in der ausgeatmeten Luft zuverlässig überwachen kann. Dafür wurden in einem ersten Schritt verschiedene Fluorophor-Varianten und -Komplexe mit einem Spektrofluorometer untersucht und anschließend mit einem Laboraufbau evaluiert. Dazu gehörten eine Pyren-Variante und ein Ruthenium(II)-Komplex. Als aussichtsreichster Kandidat erwies sich bei den Messungen das Fluorophor Pyren. Deshalb wurde Pyren in eine Ethylcellulose-Matrix eingebettet und die Änderung des Fluoreszenz-Signals bei variierenden Sauerstoff-Konzentrationen gemessen. Weiterhin wurden die Pyren-Varianten DPB (1-decyl-4-(1-pyrenyl)butanoat) und PBA (1-Pyrenbuttersäure) untersucht. Pyren, eingebettet in eine Ethylcellulose-Matrix, zeigte die höchste Signaländerung bei Sauerstoffbeaufschlagung. Die Messungen zeigten außerdem, dass sich die Signaldrift durch abnehmende Pyren-Konzentrationen und niedrigen Ethylcellulose-Anteile deutlich reduziert. Gasmessungen im Labor über fünf Stunden mit dem entwickelten optischen Laboraufbau und verschiedenen Sauerstoff-Konzentrationsstufen ergaben, dass 0,5 vol.-% Sauerstoff zuverlässig aufgelöst werden können.

**Keywords:** Fluoreszenzlöschung, Gassensor, Sauerstoff (O<sub>2</sub>), miniaturisiert, LED.

## Motivation & Einführung

In den letzten Jahren, vor allem während der ersten Phase der COVID-19-Pandemie, ist die Zahl der Patienten, die künstlich beatmet werden müssen, weltweit stark angestiegen. Die Lungenfunktion kann durch die Bestimmung der Sauerstoffkonzentration im Blut überwacht werden, was Rückschlüsse auf die Effizienz des Sauerstofftransports und die Funktionsweise des Stoffwechsels im Körper zulässt. Während der mechanischen Beatmung eines Patienten ist eine präzise und langfristige Überwachung der Sauerstoff-Konzentration im Blut erforderlich, um eine korrekte Sauerstoffversorgung sicherzustellen. Die herkömmliche Blut-Gasanalyse stellt eine invasive und dadurch für den Patienten eher unangenehme Prozedur dar. Außerdem kann die Blutgasanalyse nicht kontinuierlich durchgeführt werden, wodurch eine zuverlässige Überwachung des Patienten-Zustands nicht möglich ist. Mittels Pulsoxymetern lässt sich die Sauerstoffsättigung des Hämoglobins zwar nicht-invasiv und über längere Zeiträume

ermitteln, jedoch ist diese Methode ungenau und unzuverlässig. Da ein Pulsoxymeter lediglich die Sauerstoffsättigung, also den Anteil des mit Sauerstoff beladenen Hämoglobins im Verhältnis zum Gesamthämoglobin misst und nicht die arterielle Sauerstoffkonzentration, ist eine alternative, zuverlässige und nicht-invasive Messmethode dringend erforderlich [1]. Den Sauerstoffgehalt in der ausgeatmeten Luft zu messen, stellt eine solche alternative Methode dar, um den arteriellen Sauerstoffgehalt im Blut nicht-invasiv und akkurat zu ermitteln und überwachen. Eine vielversprechende Messmethode, die über viele Jahre in der Biochemie und -physik Anwendung fand, ist die Fluoreszenz-Spektroskopie. Diese wird schon in Feldern wie der klinischen Chemie, der DNA-Sequenzierung und der genetischen Analyse erfolgreich eingesetzt [2]. Bei der Messung von Sauerstoff in Flüssigkeiten, kommt die Fluoreszenzlöschung seit vielen Jahren in der Industrie zum Einsatz. Der Sensor *Oxymax COS61D* von der Firma

Endress + Hauser AG wird zur Detektion von gelöstem Sauerstoff ( $O_2$ ) in Wasser eingesetzt. Neuerdings treibt die Forschung den Einsatz von Fluoreszenzlöschung zur Detektion von gasförmigem Sauerstoff voran, wobei diese Technik hier erstmals für die medizinische Anwendung in der Atemgasanalyse adaptiert wird. [3].

### Grundlagen der $O_2$ -Fluoreszenzlöschung

Wird ein Fluorophor mit einem spezifischen kurzwelligem Licht beleuchtet, emittiert diese Substanz aufgrund der Stokes-Verschiebung energieärmeres Licht [2]. Das emittierte Licht wird Lumineszenz genannt und entsteht durch elektronische Energieniveau-Übergänge von einem energetisch angeregten Zustand zum energetischen Grundzustand. Es gibt zwei Formen der Lumineszenz: die Fluoreszenz und die Phosphoreszenz. Die typische Lebensdauer bei der Fluoreszenz liegt bei etwa 10 ns, wobei die Lebensdauern bei der Phosphoreszenz im Bereich von Millisekunden bis hin zu Sekunden (manchmal auch länger) liegen [2].

Fluorophore werden üblicherweise in Matrix-Materialien eingebettet und als Schicht auf einem Substrat eingesetzt. Kommt die fluoreszierende Schicht in Kontakt mit einem weiteren Molekül, auch Quencher genannt, wird die emittierte Lichtintensität reduziert (siehe Abb. 1). Dieses Phänomen wird Kollisions-Quenching genannt und ist ein nicht-chemischer Prozess, bei dem eine Energieübertragung vom Fluorophor zum Quencher-Molekül stattfindet. Ein Molekül, das bei den meisten Fluorophoren eine Fluoreszenz-Löschung verursacht, ist  $O_2$ . Neben der kollisionsbedingten Fluoreszenz-Löschung kann das  $O_2$ -Molekül in die Matrix zu den tief in der Schicht eingebetteten Fluorophoren diffundieren [4].

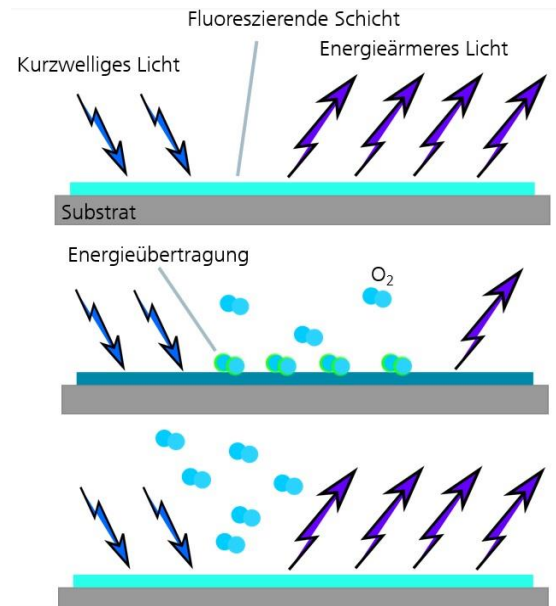


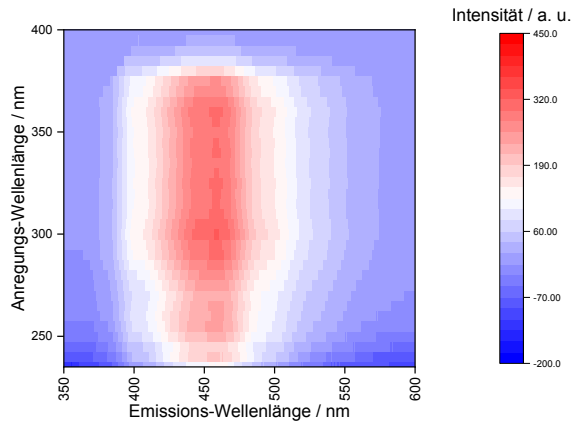
Abb. 1: Schematische Darstellung der Fluoreszenzlöschung durch Sauerstoff ( $O_2$ ). (Oben) Kurzwelliges Licht lässt ein Fluorophor, das in eine Matrix integriert ist, fluoreszieren. Das emittierte Licht der Schicht ist energieärmer als das anregende Licht. (Mitte). Ist  $O_2$  anwesend, kommt es zu Energieübertragung vom Fluorophor auf die  $O_2$ -Moleküle, dadurch nimmt die emittierte Lichtintensität ab. (Unten) Desorbieren die  $O_2$ -Moleküle von der Fluorophor-Schicht, nimmt die emittierte Lichtintensität wieder zu.

### Fluorophor-Messungen am Spektrofluorometer

Als mögliche Fluorophore untersuchten wir Pyren- und Ruthenium(II)-Komplexe [4, 5]. Beide Komplexe wurden am Spektrofluorometer *Jasco FP-8500* vermessen. Quarzglas-Substrate wurden für die Messungen am Spektrofluorometer mit den jeweiligen Fluorophor-Komplexen beschichtet. Die Proben wurden im Messgerät platziert und durch unterschiedliche Wellenlängen angeregt. Die Wellenlänge und Intensität des dabei entstehenden, fluoreszierenden Lichts wird mittels des Spektrofluorometers detektiert und als Heatmap ausgewertet. Darin werden die Anregungs-Wellenlängen, die jeweilig detektierten Emissions-Wellenlängen und die Signalintensität dargestellt.

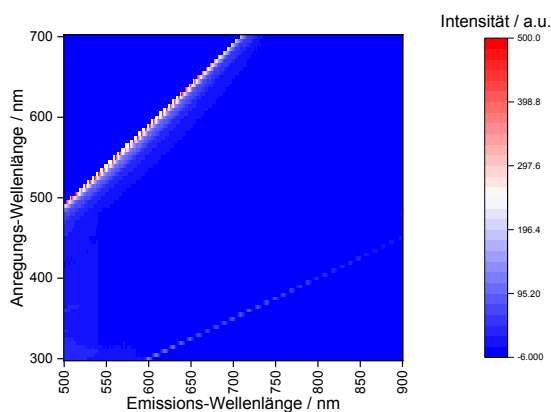
Wie Abb. 2 zu entnehmen ist, wurde der Pyren-Komplex bei einem Wellenlängen-Bereich zwischen ca. 230 und 400 nm angeregt. Es ist zu erkennen, dass der betrachtete Komplex mit Wellenlängen

zwischen 250 und 370 nm angeregt werden kann und Emissions-Wellenlängen zwischen 400 und 500 nm zu erwarten sind.



**Abb. 2:** Heatmap der Spektrofluorometer-Messungen des Pyren-Komplexes. Der rot gekennzeichnete Bereich stellt den Anregungs- und Emissions-Wellenlängenbereich mit höchster Signalintensität dar.

In Abb. 3 ist die äquivalente Spektrofluorometer-Messung des Ruthenium(II)-Komplexes dargestellt. Die untersuchte Ruthenium-Schicht wurde bei Wellenlängen zwischen 300 und 700 nm angeregt und die Emissions-Wellenlängen zwischen 500 und 900 nm erfasst. Es ist der Heatmap zu entnehmen, dass eine erhöhte Signalintensität in einem sehr kleinen Wellenlängenbereich im sichtbaren Bereich erzielt werden kann. Eine Anregung im UV-Bereich weist schwache Signalintensitäten auf.



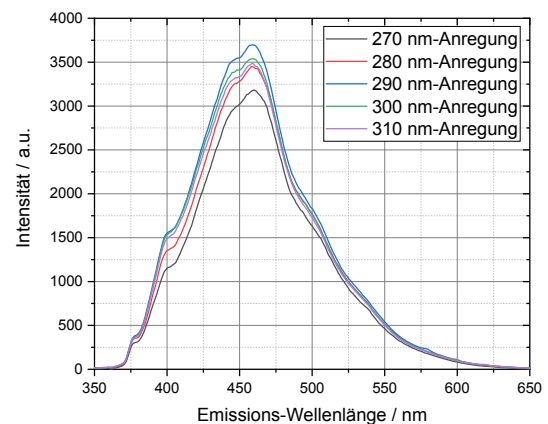
**Abb. 3:** Heatmap der Spektrofluorometer-Messungen des Ruthenium(II)-Komplexes. Der rot gekennzeichnete Bereich stellt den Anregungs- und Emissions-Wellenlängenbereich mit höchster Signalintensität dar.

Weiter wurde die Emissions-Intensität der beiden betrachteten Schichten bei unterschiedlichen Anregungs-Wellenlängen im UV-Bereich gemessen. Der Vorteil einer Anregung mit kurzwelligeren Lichtquellen ist die höhere Anregungsenergie und das daraus resultierende höhere Fluoreszenzsignal, was für hochempfindliche Sensoren essenziell ist.

Der Pyren-Komplex wurde mit Wellenlängen von 270 bis 310 nm in 10 nm-Schritten angeregt und das entsprechende spektrale Verhalten des fluoreszierten Lichts gemessen. Eine Anregung mit 290 nm weist die höchste Emissions-Intensität auf, während die Anregungs-Wellenlänge von 270 nm die niedrigste Intensität aufgewiesen hat, was mit dem Ergebnis in Abb. 2 übereinstimmt.

Die Ruthenium(II)-Komplex-Probe wurde im Wellenlängenbereich zwischen 345 bis 360 nm in 5 nm-Schritten angeregt. Die entstehenden Emissions-Spektren (siehe Abb. 5) weisen bei allen vier Wellenlängen um den Faktor 100 schwächere Intensitäten auf, was bei einem Vergleich der Intensitätswerte in Abb. 4 und 5 ersichtlich wird.

Basierend auf den eindeutigeren Ergebnissen mit Pyren wurden die Experimente mit dem Pyren-Komplex fortgeführt.



**Abb. 4:** Emissionsspektren und -intensitäten des Pyren-Komplexes bei Anregungs-Wellenlängen zwischen 270 und 310 nm in 10 nm-Schritten.

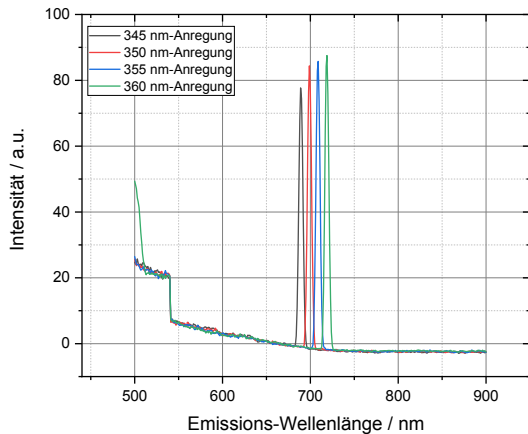


Abb. 5: Emissionsspektren und -intensitäten des Ruthenium(II)-Komplexes bei Anregungs-Wellenlängen zwischen 345 und 360 nm in 5 nm-Variationen.

### Laboraufbau des Sensors

Für die ersten Gasmessungen wurde ein Laboraufbau gefertigt (siehe Abb. 6). Dieser bestand aus einer LED-Platine, auf die eine kommerzielle LED mit einer Peak-Wellenlänge von 340 nm gelötet wurde. Das LED-Licht wird über eine Saphir-Linse auf eine mit dem Pyren-Komplex beschichtete Aluminium-Probe fokussiert. Das emittierte Licht der Fluorophor-Schicht wird über eine zweite Saphir-Linse auf die aktive Fläche eines Photodetektors fokussiert. Der Photodetektor befindet sich auf einer Platine, die das generierte Signal vorverstärkt. An der Oberfläche der Aluminium-Probe wird zusätzlich das LED-Licht reflektiert, was zu einem unerwünschten Signal führen würde und daher durch einen optischen Filter zwischen der Saphir-Linse und dem Detektor entfernt wird. Die Aluminium-Probe ist zylindrisch und kann durch eine äußere Öffnung im Gehäuse des Aufbaus in das Gasvolumen eingebracht und über eine Schraube befestigt werden. Über zwei Festo-Verbindungen kann über 6 mm-Gasschläuche das Gasvolumen innerhalb des Aufbaus mit der Test-Gasmischung befüllt werden. Eine der Festo-Verbindungen dient als Gaseinlass und die zweite als Gasauslass.

Über ein externes Evaluation-Board werden der LED-Strom und die Modulationsfrequenz eingestellt sowie das Signal des Photodetektors verarbeitet und ausgewertet.

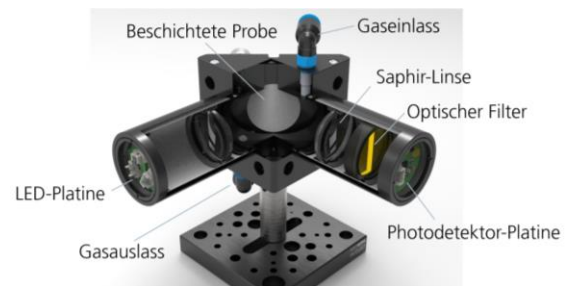


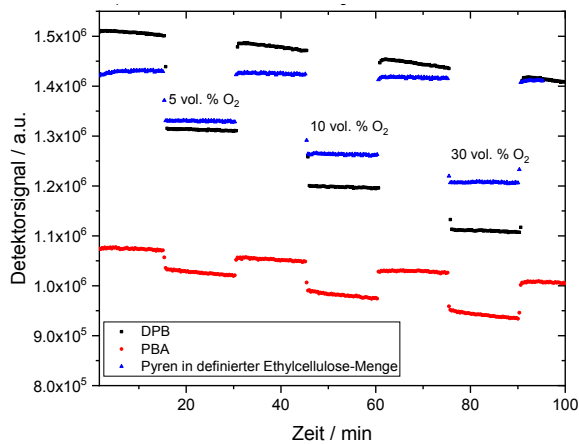
Abb. 6: 3D-Querschnitt des Laboraufbaus mit den jeweiligen Komponenten des Messsystems.

### Messergebnisse des Laboraufbaus

Um unterschiedliche Gaskonzentrationsstufen einstellen zu können, wurden Massedurchflussregler der Firma Bronkhorst, die auf die Gase Stickstoff ( $N_2$ ) und  $O_2$  kalibriert wurden, eingesetzt. Darüber konnten unterschiedliche Gasmischungs-Verhältnisse präzise eingestellt und gemessen werden.

Folgende drei Pyren-Varianten wurden im ersten Schritt mittels des Laboraufbaus (Abb. 6) untersucht: DPB (1-decyl-4-(1-pyrenyl)butanoat), PBA (1-Pyrenbutersäure) und Pyren in Ethylcellulose (Pyren wird in eine Ethylcellulose-Lösung gegeben und anschließend auf dem Substrat getrocknet). Alle Schichten werden in einem festen und trockenen Zustand vermessen. Die Untersuchungen erfolgten bei drei  $O_2$ -Konzentrationsstufen (5, 10 und 15 vol. %  $O_2$  in trockenem  $N_2$ ). Zwischen den jeweiligen  $O_2$ -Konzentrationsstufen wurde mit 100 vol. % trockenem  $N_2$  gespült. Jede Konzentrationsstufe wurde 15 Minuten eingestellt und die Messungen erfolgten bei einem Gesamtfluss von 200 ml/min. Die gemessenen Detektorwerte wurden von dem Evaluation-Board sekundlich abgetastet.

Abb. 7 kann entnommen werden, dass alle untersuchten Pyren-Varianten den Sauerstoff detektieren konnten. DPB weist die stärkste Signaländerung auf, wobei Pyren, das in Ethylcellulose gemischt wurde, die niedrigste Drift aufweist.

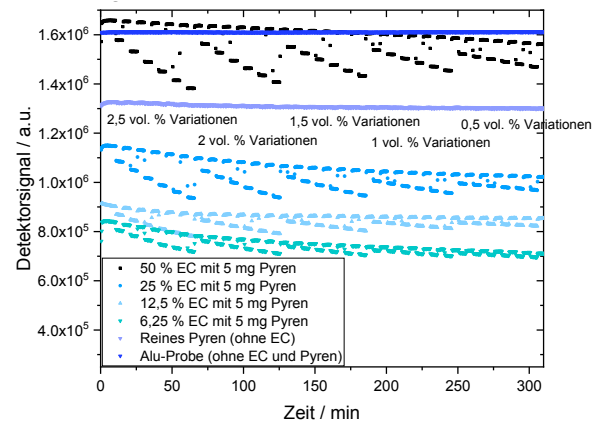


**Abb. 7:** Detektorsignal bei drei unterschiedlichen Pyren-Varianten bei 5 vol. % O<sub>2</sub>-Konzentrations-Variationen. Für die Messungen wurde ein optischer Filter mit einer Cut-Off-Wellenlänge von 400 nm verwendet.

Nachdem Pyren in Ethylcellulose (EC) eine stabile Signalentwicklung aufgewiesen hat, wurde im nächsten Schritt das Mengenverhältnis von Pyren zu Ethylcellulose variiert. Es wurden 5 mg Pyren in Ethylcellulose-Lösungen zwischen 0 und 50 % der ursprünglichen Ethylcellulose-Konzentration aus Abb. 7 gemischt und anschließend als dünne Schicht auf die Alu-Probe pipettiert und getrocknet. 0 % Ethylcellulose entspricht dem reinen Fluorophor auf der Alu-Probe. Als Nullmessung wurde zusätzlich eine unbeschichtete Alu-Probe vermessen. Die 5 mg Pyren wurden in eine 50-, 25-, 12,5- und 6,25-prozentige Ethylcellulose-Lösung gemischt. Dabei wurden bei den Gasmessungen, ausgehend von 3 vol. % O<sub>2</sub>, 2,5, 2, 1,5, 1 und 0,5 vol. % O<sub>2</sub>-Konzentrationsstufen eingestellt und jeweils vermessen. Jede Konzentrationsstufe wurde 5 Minuten eingestellt und anschließend jeweils für weitere 5 Minuten mit 100 vol. % N<sub>2</sub> gespült. Die Datenerfassung fand über die gesamte Messdauer von ca. 5 Stunden sekundlich statt. Mit abnehmender EC-Konzentration und gleicher Pyren-Konzentration nimmt sowohl die Drift als auch die Höhe der Signaländerung ab (Abb. 8).

Die Alu-Referenzprobe zeigt, wie erwartet, ein stabiles und drifffreies Nullsignal ohne Signaländerungen. Die Probe mit dem reinen Pyren ohne EC-Matrix weist eine minimale Drift und insignifikant kleine Signaländerungen auf, wodurch deutlich wird, dass eine Matrix

zum Einbetten des Fluorophors notwendig ist. Bei einem Vergleich der Schicht mit 12,5 % und 6,25 % Ethylcellulose ist zu erkennen, dass 12,5 % EC über die Messdauer eine kleinere Drift aufweist, was möglicherweise ein Indikator ist, dass es ein optimales Verhältnis zwischen Pyren und EC gibt.



**Abb. 8:** Detektorsignal bei verschiedenen Ethylcellulose-Lösungsmengen. Die Prozent-Angaben der Ethylcellulose beziehen sich auf die ursprünglich definierte EC-Menge in Abb. 7, die als 100 % betrachtet wird. Die EC-Konzentration in der Lösung wurde bei gleichbleibender Pyren-Menge reduziert. Die jeweiligen Messreihen drifteten unterschiedlich über die gesamte Messdauer.

Als Nächstes wurde die Menge an Ethylcellulose gleich gehalten und die Konzentration des Pyrens in der Matrix variiert. Dadurch kann der Einfluss des Fluorophors auf das emittierte Licht und somit die Stabilität des Detektorsignals überprüft werden. Die betrachteten Pyren-Konzentrationen zwischen 0 und 2,5 mg wurden in 12,5 %ige Ethylcellulose gemischt, auf die Alu-Proben pipettiert und anschließend getrocknet. Analog zu dem vorherigen Experiment wurden bei den Gasmessungen, ausgehend von 3 vol. % O<sub>2</sub>, 2,5, 2, 1,5, 1 und 0,5 vol. % O<sub>2</sub>-Konzentrationsstufen eingestellt und jeweils vermessen. Auch hier wurde jede Konzentrationsstufe 5 Minuten eingestellt und anschließend jeweils für weitere 5 Minuten mit 100 vol. % N<sub>2</sub> gespült. Die Datenerfassung fand über die gesamte Messdauer von ca. 5 Stunden sekundlich statt. In die 12,5%ige Ethylcellulose-Lösungen wurden jeweils 0, 0,1, 0,25, 0,5, 1,0, 2,5 mg Pyren gemischt. Eine Schicht mit 0 mg des Pyrens bedeutet, dass die betrachtete Schicht nur aus dem Matrix-

Material Ethylcellulose besteht. Um das Driftverhalten der einzelnen Schichten in direkte Relation zueinander zu setzen, wurden die normierten Werte der detektierten Signale in Abb. 9 dargestellt. Ein Unterschied im Driftverhalten ist eindeutig erkennbar. Die Probe, auf der eine reine Matrix-Schicht (0,0 mg Pyren) aufgebracht wurde, weist ein durchgehend stabiles Signalverhalten ohne Drift auf. Mit zunehmender Pyren-Menge in der Ethylcellulose-Matrix nimmt einerseits der Signalhub bei Anwesenheit von O<sub>2</sub> und andererseits auch die Drift des Gesamtsignals über die Dauer der Messung deutlich zu.

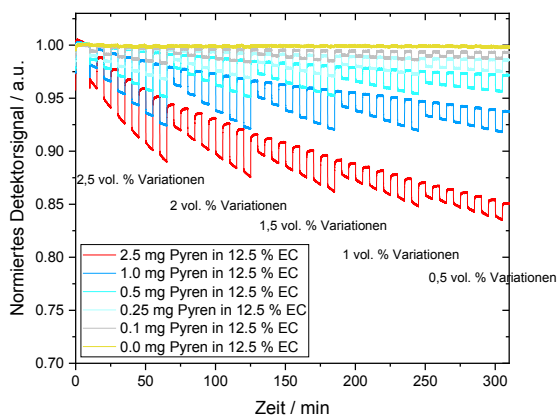


Abb. 9: Detektorsignal bei unterschiedlichen Pyren-Konzentrationen in einer 12,5 %igen EC-Lösung. Die Prozent-Angabe der Ethylcellulose bezieht sich auf die ursprünglich definierte EC-Menge in Abb. 7, die als 100 % betrachtet wird. Mit zunehmender Pyren-Menge in der Matrix nehmen das detektierte Signal und die Drift zu.

### Zusammenfassung und Ausblick

Es wurden ein Pyren- und ein Ruthenium(II)-Komplex als mögliche Fluorophore mit einem Spektrofluorometer untersucht. Der Pyren-Komplex weist sehr geeignete spektrale Eigenschaften auf und wurde im nächsten Schritt anhand von O<sub>2</sub>-Gasmessungen auf Eignung als Quencher untersucht. Dafür wurde ein Laboraufbau entwickelt, der aus einer UV-LED, einem Photodetektor, einem Gasvolumen mit integrierter Probenhalterung und einer Auswerteelektronik besteht. Erste Labormessungen konnten erfolgreich durchgeführt werden. Dabei wurde die sensorischen Eigenschaften von unterschiedlichen Fluorophor-Konzentrationen und -Matrixmaterialien untersucht. Es konnten

0,5 vol. % O<sub>2</sub>-Konzentrationschritte mit dem Laboraufbau zuverlässig aufgelöst werden. Als Matrix-Material ist Ethylcellulose gut handhabbar und weist auch das stabilste Signalverhalten auf. Das Verhältnis zwischen der Pyren-Konzentration zur Menge der Ethylcellulose-Lösung erwies sich als signifikant. Mit abnehmender EC-Menge und gleichbleibender Pyren-Konzentration, nimmt der Signalhub und die Drift ab. Andererseits nimmt die Drift bei gleichbleibender EC-Menge und zunehmender Pyren-Konzentration zu. In den nächsten Schritten wird das Fluorophor in unterschiedliche Matrix-Materialien eingebettet und weiter untersucht. Außerdem soll der Laboraufbau miniaturisiert und für den Einsatz in Standard-T-Konnektoren für Beatmungsschläuche und -masken ausgelegt werden, was zukünftige Tests im klinischen Umfeld ermöglichen soll.

### Literaturnachweis

- [1] L. Ulrich, D. Stolecki, *Georg Thieme Verlag* 3 (2015), doi: 10.1055/b-003-124667
- [2] J. R. Lakowicz, *Springer New York* 2 (1999); doi: 10.1007/978-1-4757-3061-6
- [3] Y.-H. Cheng, A. Belyaev, M.-L. Ho, I. Koshevoy, P.-T. Chou, *Physical Chemistry Chemical Physics* 22, 27144-27156 (2020); doi: 10.1039/D0CP05182A
- [4] S. A. Ruetten, J. K. Thomas, *The Journal of Physical Chemistry B* 103, 1278-1286 (1999); doi: 10.1021/jp983313d
- [5] J. N. Demas, D. Diemente, E. W. Harris, *Journal of the American Chemical Society* 95, 6864-6865 (1973); doi: 10.1021/ja00801a073