

Untersuchung über die Anwendungsmöglichkeit
der Mikrowellen- und Infrarotspektroskopie
für die Registrierung von Stoffwechsellvor-
gängen in biologischen Systemen

Investigations of the Metabolism in Biolo-
gical Systems Using Microwave and Infrared
Spectroscopy

W. v. Casimir, O. Gehre, N. Kaiser, F. Keil-
mann, K. Plank⁺, W. Schneider und R. Zerull⁺

IPP 3/93

Mai 1969

I N S T I T U T F Ü R P L A S M A P H Y S I K
G A R C H I N G B E I M Ü N C H E N

INSTITUT FÜR PLASMAPHYSIK

GARCHING BEI MÜNCHEN

Untersuchung über die Anwendungsmöglichkeit
der Mikrowellen- und Infrarotspektroskopie
für die Registrierung von Stoffwechsellvor-
gängen in biologischen Systemen

Investigations of the Metabolism in Biolo-
gical Systems Using Microwave and Infrared
Spectroscopy

W. v. Casimir, O. Gehre, N. Kaiser, F. Keil-
mann, K. Plank⁺, W. Schneider und R. Zerull⁺

IPP 3/93

Mai 1969

+) als Gäste der Ruhr-Universität Bochum

Die nachstehende Arbeit wurde im Rahmen des Vertrages zwischen dem Institut für Plasmaphysik GmbH und der Europäischen Atomgemeinschaft über die Zusammenarbeit auf dem Gebiete der Plasmaphysik durchgeführt.

IPP 3/93 W. v. Casimir
O. Gehre
N. Kaiser
F. Keilmann
K. Plank
W. Schneider
R. Zerull

Investigations of the Metabolism
in Biological Systems Using
Microwave and Infrared Spectros-
copy.

May 1969

(in German)

Abstract

The study is an attempt to improve the investigation of the kinetic of chemical reactions by a spectroscopic method yielding both qualitative and quantitative information on the reaction agents as well as on any short-time intermediates involved. For this purpose it is intended to record the intra-molecular resonances of the reaction agents in rapid succession over a wide frequency band. It is shown that even more information can be obtained by measuring simultaneously the attenuation and phase shift, particularly with several resonances superposed. A basic circuit for a measuring apparatus with wide band tuning, giving simultaneous attenuation and phase display is described. It is used for detecting resonances. In addition, the basic circuit of a single-frequency measuring bridge with a highly sensitive detector is described. This bridge also allows changes in magnitude and phase of individual resonances with time to be followed very closely. Both circuits were developed first in the microwave range and can be adapted for the optical and infrared ranges with appropriate components. Examples such as cis-trans isomerization of dichlorethylene and oxidation and deoxidation of haemoglobin in aqueous solution are used to show that measuring the phase shift or simultaneously measuring the attenuation and phase may yield more information. With the tunable measuring apparatus it was possible to record the water dispersion, attenuation, and phase shift in the 3-cm band. The experiment demonstrated that, in principle, these spectroscopic methods can also be used in the frequency range of intra-molecular resonances for measuring specimens in aqueous solution (experiment in-vivo).

Inhaltsverzeichnis

Seite

<u>A) Fragestellung</u>	1
<u>B) Geräteentwicklung und Messergebnisse</u>	4
<u>I. Messplatz mit fester Frequenz von 3 cm</u>	4
a) Aufbau	4
b) Messergebnisse	7
1.) Cis-trans-Isomerie Dichloräthylen	7
2.) Oxygenierung und Desoxygenierung von Hämoglobin	12
<u>II. Wobbelmessplatz im 3 cm-Band</u>	15
a) Aufbau	15
b) Messergebnisse	17
<u>III. Streustrahlungsversuche im 8 mm-Band</u>	19
a) Aufbau	19
b) Messergebnisse	21
<u>C) Zusammenfassung</u>	22
<u>Literatur</u>	24

A) Fragestellung

Biologischer Stoffwechsel ist gleichbedeutend mit molekularen Umbauvorgängen. Daraus ergibt sich die theoretische Möglichkeit der Registrierung des Stoffwechsels durch die Aufzeichnung von Molekularresonanzen und deren Veränderung im Verlauf von Stoffwechselfvorgängen. Falls eine derartige Registrierung durchführbar ist, ergibt sich daraus die Möglichkeit, den Schritt von der chemischen Analyse nach Entnahme einer Probenmenge zur Messung am lebenden Objekt unter physiologischen Bedingungen, also den in-vivo-Versuch, auszuführen /1/. Als geeignete Versuchsobjekte bieten sich dabei zunächst z.B. Bakterienkulturen, Gewebsaufschwemmungen oder auch ein extrakorporaler Kreislauf durch eine entsprechende Messküvette an. Falls ausserdem noch die Möglichkeit besteht, eine rasche oder gleichzeitige Übersicht der Änderungen durch Beobachtung in einem Frequenzband (Auffindung und Verlagerung von Resonanzstellen) zu erhalten, wird die Registrierung kurzzeitiger Stoffwechselzwischenprodukte durchführbar, die z.B. durch eine chemische Analyse im in-vitro-Versuch nicht nachweisbar sind. Die Molekularresonanzen, die für diese Messungen in Frage kommen, liegen im Bereich des nahen und fernen Infrarot bis zu den Mikrowellen. Abb. 1 zeigt einige derartige Resonanzen und den Übergang zum dielektrischen Verhalten bei längeren Wellenlängen an einer reinen Flüssigkeit /2/.

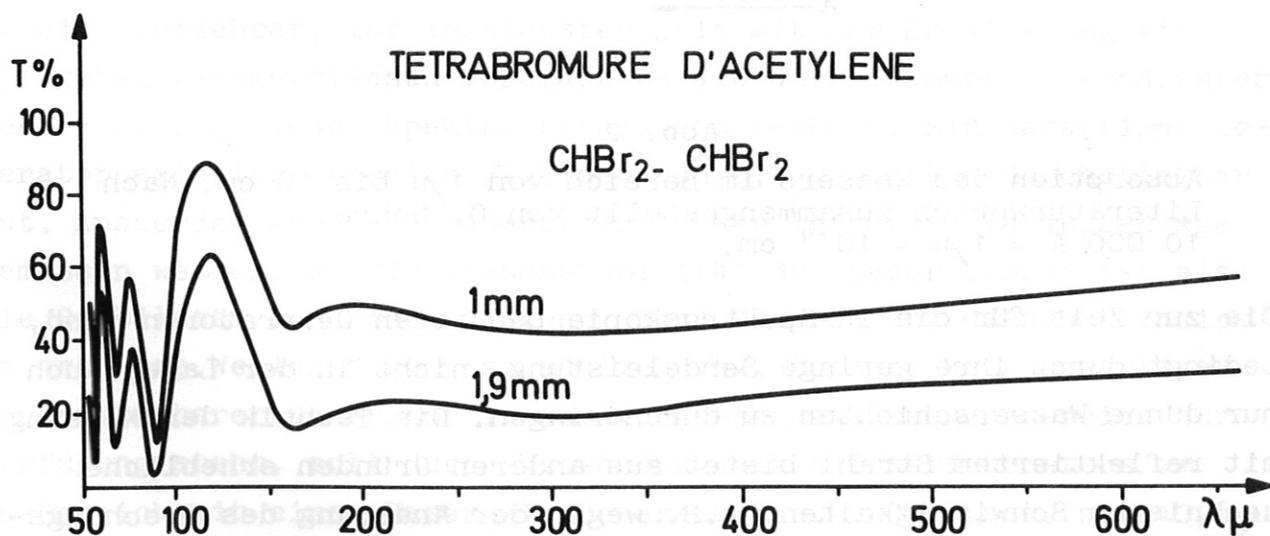


Abb. 1

Ein Beispiel des Übergangsbereiches von innermolekularen Resonanzen zum dielektrischen Verhalten einer reinen Flüssigkeit /2/. Parameter ist die durchstrahlte Schichtdicke.

Mit den zur Zeit vorhandenen Geräten ist es nicht möglich, die vorgesehenen Untersuchungen in den interessierenden Wellenlängenbereichen

durchzuführen, da die Eigenabsorption des Wassers in diesem Bereich sehr gross ist, und das Wasser ein wesentlicher und bei in-vivo-Versuchen nicht zu umgehender Bestandteil aller biologischen Objekte ist (Abb. 2).

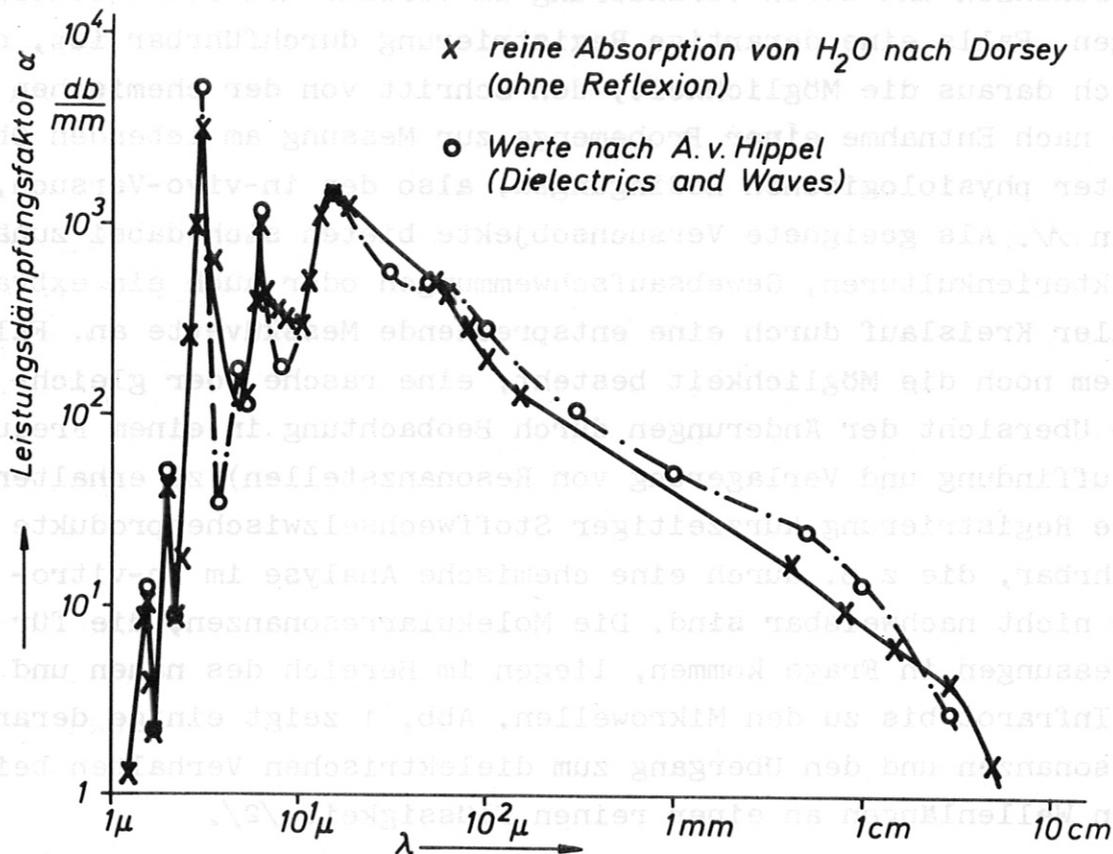


Abb. 2

Absorption des Wassers im Bereich von 1μ bis 10 cm . Nach Literaturwerten zusammengestellt von O. Gehre.
 $10\,000 \text{ \AA} = 1 \mu = 10^{-4} \text{ cm}$.

Die zur Zeit für die IR-Spektroskopie benutzten Generatoren sind, bedingt durch ihre geringe Sendeleistung, nicht in der Lage, auch nur dünne Wasserschichten zu durchdringen. Die Technik der Messung mit reflektiertem Strahl bietet aus anderen Gründen erhebliche technische Schwierigkeiten, z.B. wegen der Änderung des Brechungsindex beim Ablauf einer Reaktion. Ausserdem schliesst Wasser die Verwendung von Kochsalzoptiken und Küvettenfenstern aus Kochsalz aus. Diese Faktoren haben W. Brügel dazu veranlasst, das Wasser als "Todfeind" der Infrarotspektroskopie zu bezeichnen /3/.

Die gewünschten Generatoren sollten also eine ausreichende Leistung zur Messung auch wässriger Lösungen besitzen. Einige 100 mW dürften genügen, da die vorhandenen Detektoren über hohe Empfindlichkeit verfügen. In dem für die Untersuchungen vorgesehenen Wellenlängenbereich ist bei den Durchstrahlungsversuchen eine Verminderung der Schichtdicke auf 1/100 Millimeter vorgesehen. Dadurch werden auf der Basis der Literaturwerte (Abb. 2) sowohl noch gut annehmbare Dämpfungswerte (maximal 50 db), als auch für biologische Versuche noch verwendbare Schichtdicken erzielt.

Sehr hindernd für die Untersuchung reaktionskinetischer Vorgänge auch an nicht wasserhaltigen Flüssigkeiten ist es im allgemeinen, dass die üblichen Infrarotspektrographen nur langsam über ein breites Frequenzband durchgestimmt werden können. Die Zeit für die Aufnahme eines Spektrogrammes liegt in der Grösse von Minuten. Daher ist es mit diesen Geräten nicht möglich, schnell ablaufende Vorgänge zu registrieren.

Ideal wäre es, im Wellenlängenbereich von etwa $0,5 \mu$ bis etwa 150μ eine Generator-Detektor Anordnung zu haben, deren Generator monochromatisches kohärentes Licht erzeugt und die mindestens über eine Oktave rasch durchstimmbare ist.

Soweit übersehbar, ist in nächster Zeit mit der Entwicklung eines optischen parametrischen Verstärkers als durchstimmbarer kohärenter Generator für diesen Spektralbereich zu rechnen. Ein derartiger Generator existiert bereits /4/, der von $0,4 \mu$ bis 4μ durchstimmbare ist. Ausserdem kann bei Dauerstrichlasern leichter die Phasenlage gemessen werden, da die Phasenstabilität der Laser besser ist als die Stabilität der Sendeleistung. Eine Übertragung dieses Prinzips in grössere Wellenlängen ist möglich /5/. Solange kein derartiger durchstimmbarer Generator in dem vorgesehenen Frequenzbereich zur Verfügung steht, soll durch Verwendung eines Interferometers im IR-Bereich mit einem Laser als Generator (z.B. CO_2 -Laser mit $10,6 \mu$ Wellenlänge) gemessen werden. Dieses Interferometer wird nach der gleichen Prinzipschaltung wie die in Abb. 3 dargestellte Mikrowellenbrücke aufgebaut. Durch gleichzeitige Registrierung von Dämpfung und Phase wird erwartet, dass man eine, die Messfrequenz durchlaufende Resonanz eindeutig registrieren kann. Dass es vorteilhaft ist, Phase und Dämpfung gleichzeitig zu messen, glauben wir auf den folgenden Seiten an Beispielen zeigen zu können.

Zweckmässig wäre auch die Durchführung informierender Messungen mit dem bestehenden Gerät für den Wellenlängenbereich von $0,4 \mu$ bis 4μ .

B) Geräteentwicklung und Messergebnisse /6/

I. Messplatz mit fester Wellenlänge von 3 cm

a) Aufbau

Als mit der Bearbeitung der vorliegenden Fragestellung begonnen wurde, war es nicht möglich, einen Laser zu verwenden oder an einen derartigen durchstimmbaren Generator zu denken. Ausserdem war noch nicht bekannt, wie weit die Molekülresonanzen vom Infrarot her gesehen vor allem bei grossen Molekülen in den langwelligen Bereich hineinreichen. Da damals nur im Mikrowellenbereich Generatoren mit ausreichender Leistung zur Verfügung standen, wurde zunächst in diesem Wellenlängenbereich mit den Messungen begonnen. Ausserdem wurden damals laufend neue Elektronenröhren mit immer höheren Frequenzen gebaut, so dass die Aussicht bestand, mit dieser Technik in den Infrarotbereich vordringen zu können. Da vor allem im 3 cm-Band relativ preiswerte Bauteile im Handel erhältlich waren und ausserdem die Küvettenfenster sowie deren Ausfräsungen im Hohlleiter etc. keine grossen Probleme aufwerfen, wurde zunächst in diesem Wellenlängenbereich mit den Messungen begonnen. Dabei wurde von vornherein besonderer Wert darauf gelegt, Prinzipschaltungen zu entwickeln, die im infraroten Spektralbereich verwendbar sind.

Speziell für diese Versuche wurde von B. O'Brien eine Mikrowellenmessbrücke im 3 cm-Band mit hochempfindlichem Detektor gebaut, die die in Abb. 3 gezeigte Prinzipschaltung hat /7/. Der Vorzug dieser Schaltung für die vorgesehenen Untersuchungen besteht darin, dass gleichzeitig Phase und Dämpfung in Abhängigkeit von der Zeit gemessen werden können und der Detektor eine sehr hohe Empfindlichkeit aufweist. Die Messung der Phasenlage ist wichtig, da sich bei den durchgeführten Versuchen herausgestellt hat, dass die Phase oft signifikantere Messwerte zeigt als die Dämpfung. Die hohe Empfindlichkeit ist vor allem für biologische Messungen von Bedeutung, da es sich bei diesen Versuchen meist um sehr kleine Änderungen der Konzentration und damit auch der Messwerte handelt. Die theoretisch erreichbare Empfindlichkeit ist - 115 db, die in der vorliegenden

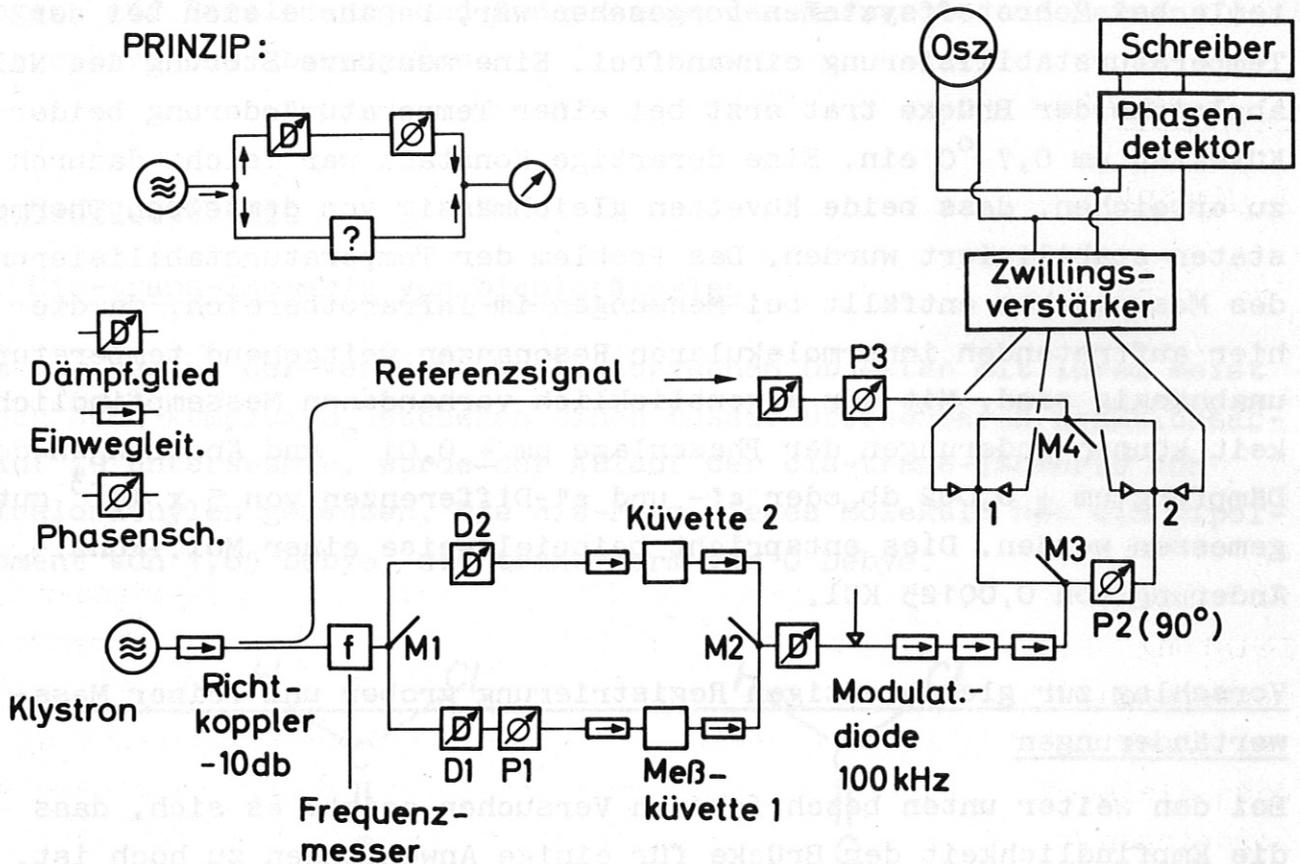


Abb. 3

Einzelfrequenzmessplatz im 3 cm-Band. Prinzipschaltbild.

Messanordnung praktisch erreichte - 100 db. Bei der Brückenmethode handelt es sich um eine Nullwertmethode, die es einmal erlaubt, die durch das Messobjekt verursachte absolute Grösse der Dämpfung und Phasenverschiebung festzustellen und die es ausserdem ermöglicht, kleine Änderungen dieser Werte, die z.B. durch den Ablauf einer chemischen Reaktion in der Messküvette verursacht sind, kontinuierlich aufzuzeichnen.

Da bei den 3 cm Wellen das Dispersionsverhalten der interessierenden Messobjekte temperaturabhängig ist, ist die Temperaturstabilisierung von grosser Bedeutung. Die Küvettentemperatur wurde durch einen Thermostaten geregelt, der mit einem Brückenprinzip ohne Kontaktthermometer arbeitet und kurzzeitig auf $\pm 0,003$ °C genau stabilisiert. Um den Nullabgleich auch über lange Zeiträume konstant halten zu können, wurde eine mit der Messküvette identische Vergleichsküvette parallel zur Messküvette in die Brücke eingebaut. Dieser Einbau einer Ver-

gleichsküvette, der schon für die spätere Berücksichtigung störender Anteile des Messobjekts, z.B. des Lösungsmittels, oder einzelner Anteile bei Mehrstoffsystemen vorgesehen war, bewährte sich bei der Temperaturstabilisierung einwandfrei. Eine messbare Störung des Nullabgleichs der Brücke trat erst bei einer Temperaturänderung beider Küvetten um $0,7^{\circ}\text{C}$ ein. Eine derartige Konstanz war leicht dadurch zu erreichen, dass beide Küvetten gleichmässig von demselben Thermostaten stabilisiert wurden. Das Problem der Temperaturstabilisierung des Messobjekts entfällt bei Messungen im Infrarotbereich, da die hier auftretenden innermolekularen Resonanzen weitgehend temperaturunabhängig sind. Mit der augenblicklich vorhandenen Messempfindlichkeit können Änderungen der Phasenlage um $\pm 0,01^{\circ}$ und Änderungen der Dämpfung um $\pm 0,002$ db oder ϵ' - und ϵ'' -Differenzen von 5×10^{-3} gut gemessen werden. Dies entspricht beispielsweise einer Mol.-Konz.-Änderung von $0,00125$ KCl.

Vorschlag zur gleichzeitigen Registrierung grober und feiner Messwertänderungen

Bei den weiter unten beschriebenen Versuchen zeigte es sich, dass die Empfindlichkeit der Brücke für einige Anwendungen zu hoch ist. Die groben Änderungen der Messwerte mussten laufend ausbalanciert werden, so dass kleine, schnelle Änderungen keine Aussicht mehr hatten, registriert zu werden. Um eine gleichzeitige Registrierung der groben und der feinen Messwertänderungen zu ermöglichen, ist beabsichtigt, zwei z.B. elektronisch steuerbare Kompensationsglieder (Dämpfungsglied und Phasenschieber) in die Brücke einzubauen. Diese werden dadurch gesteuert, dass ein kleiner Teil der Signale von Phase und Dämpfung ausgekoppelt wird, welche über ein träges Steuersystem die Brücke wieder balancieren. Diese Kompensation kann wie in der IR-Technik geeicht und als langsame Änderung aufgezeichnet werden.

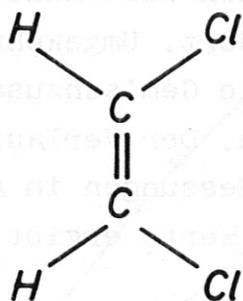
Nach dem gleichen Schaltprinzip wie der beschriebene 3 cm-Messplatz mit fester Frequenz wurde auch noch ein 8 mm und ein 4 mm Messplatz aufgebaut. Es zeigte sich jedoch, dass bei diesen Wellenlängen bereits erhebliche Störungen z.B. durch die Fenster der Messküvette und die für deren Befestigung benötigte Ausfräsungen verursacht werden. Auch wird die Genauigkeit der Bauelemente wegen der schwieriger zu verarbeitenden kleineren Abmessungen immer kritischer. Aus

diesen Gründen wurde von der Anwendung noch kürzerer Wellenlängen unter Verwendung der Hohlleitertechnik Abstand genommen und vorgezogen, auf Bauelemente und Generatoren des Infrarot- und fernen Infrarotbereichs überzugehen.

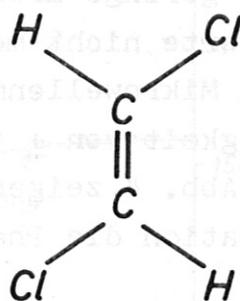
b) Messergebnisse

1. Cis-trans-Isomerie von Dichloräthylen

Um vor Beginn der Versuche an biologischen Objekten mit ihrem meist doch sehr komplexen Geschehen einen besser übersehbaren Reaktionsablauf zu untersuchen, wurde der Ablauf der cis-trans-Isomerie von Dichloräthylen gemessen. Die cis-Form dieses Moleküls hat ein Dipolmoment von 1,85 Debye, die trans-Form von 0 Debye.



Cis-Dichloräthylen
1.85 Debye



Trans-Dichloräthylen
0 Debye

Zur Durchführung dieser Reaktion wurde UV-Licht eingestrahlt. Unter UV-Bestrahlung konnte weder die cis- noch die trans-Form des reinen Dichloräthylens messbar umgewandelt werden. Durch den Zusatz geringer Brommengen (bis zu 1 % mit maximaler Umwandlungsrate bei 0,25 %) konnte jedoch die Umlagerung ausgelöst werden. Chlor und Jod zeigten diesen Effekt nicht.

Zur Gewinnung einer Eichkurve wurde zunächst eine Mischungsreihe von cis- und trans-Dichloräthylen, die beide als Reinsubstanzen erhältlich sind, mit der Mikrowellenapparatur nach Phase und Dämpfung gemessen (Abb. 4 ausgezogene Kurven).

Anschliessend wurde sowohl cis- als auch trans-Dichloräthylen nach Zusatz von Brom mit UV-Licht der Wellenlänge 3300 Å bestrahlt. Der Ablauf des jeweiligen Umwandlungsprozesses konnte mit der Mikrowellenapparatur durch kontinuierliche Beobachtung der Phasenverschiebung und Dämpfung verfolgt werden. Nach verschiedenen langen Belichtungszeiten wurden Proben entnommen. Durch Messung am Gaschromatographen gelang die Konzentrationsbestimmung der jeweiligen Anteile von cis- und trans-Dichloräthylen mit einem Messfehler von etwa 2 %. Da der Ablauf einer Dunkelreaktion, also einer Reaktion ohne Bestrahlung, vorher ausgeschlossen werden konnte (siehe Abb. 5 und 6), war es möglich, die ermittelten Konzentrationen den Mikrowellenmesswerten nach Phasenverschiebung und Dämpfung zuzuordnen (Messpunkte der Abb. 4).

Aus der guten Übereinstimmung der Messpunkte mit der Eichkurve geht hervor, dass der geringe Bromzusatz bei den bestrahlten Flüssigkeiten die Messwerte nicht messbar verändert. Umgekehrt ist es jetzt möglich, aus den Mikrowellenmesswerten die Gemischzusammensetzung mit einer Genauigkeit von ± 1 % anzugeben. Der Verlauf der Phase und der Dämpfung in Abb. 4 zeigen, dass bei Messungen in Abhängigkeit von der Konzentration die Phase genauere Werte ergibt.

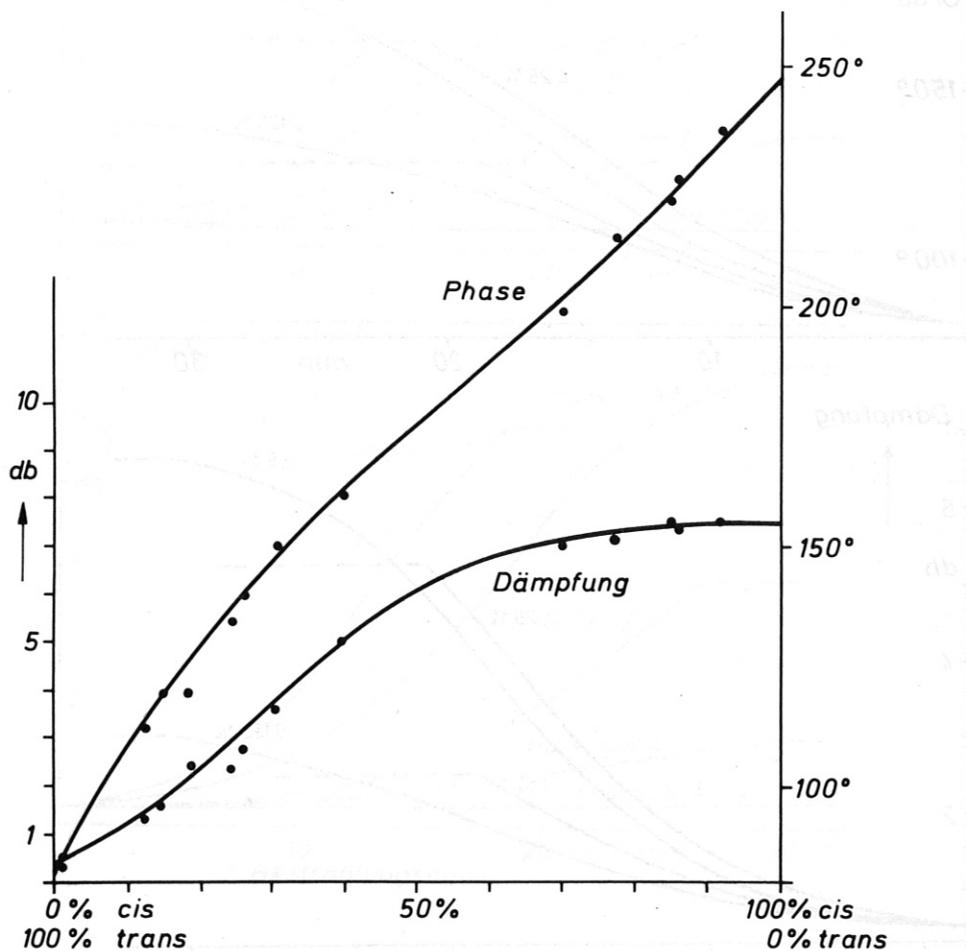


Abb. 4

Dämpfung und Phasenverschiebung der 3 cm Mikrowellen bei Durchstrahlung einer Schichtdicke von 9,5 mm Dichloräthylen

Ausgezogene Kurven: Verdünnungsreihe reiner, nicht sensibilisierter Gemische.

Messpunkte: Mit Brom sensibilisierte und durch UV-Bestrahlung erhaltene Gemische (3300 Å). Konzentrationsfeststellung der Anteile durch Gaschromatographie.

Die Abb. 5 zeigt die Abhängigkeit der Umwandlungsreaktion des trans-dichloräthylens von der Zeit nach Dämpfung und Phase, mit der Bromkonzentration als Parameter, bei konstanter Bestrahlungswellenlänge von 3300 Å.

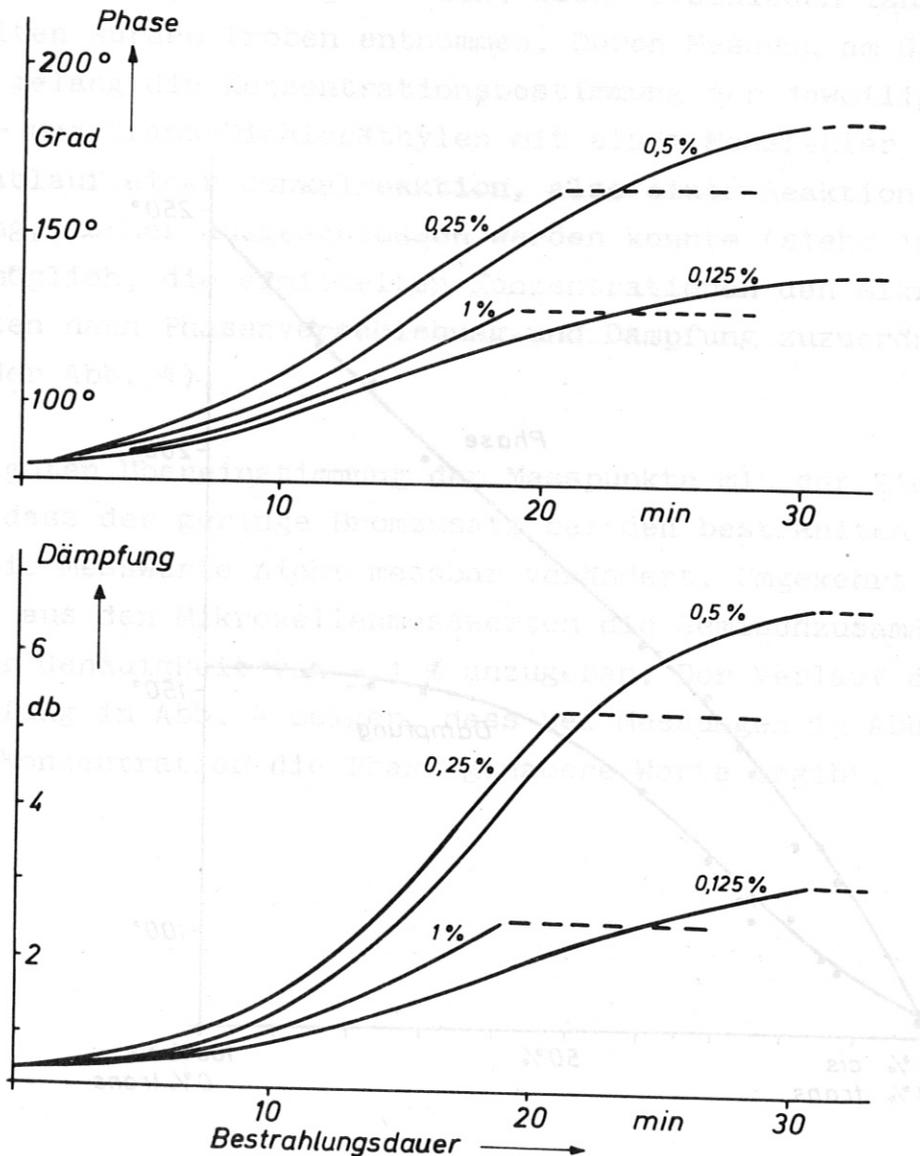


Abb. 5

Anderung der Mikrowellenmesswerte bei Bestrahlung von trans-Dichloräthylen.

Parameter: Volumenkonzentration des Bromzusatzes

Schichtdicke: 9,5 mm

Messwellenlänge: 3 cm

Bestrahlungswellenlänge: 3300 Å

Am Ende der ausgezogenen Kurven wurde die Bestrahlung abgeschaltet. Es erfolgt keine weitere Reaktion (gestrichelte Linie).

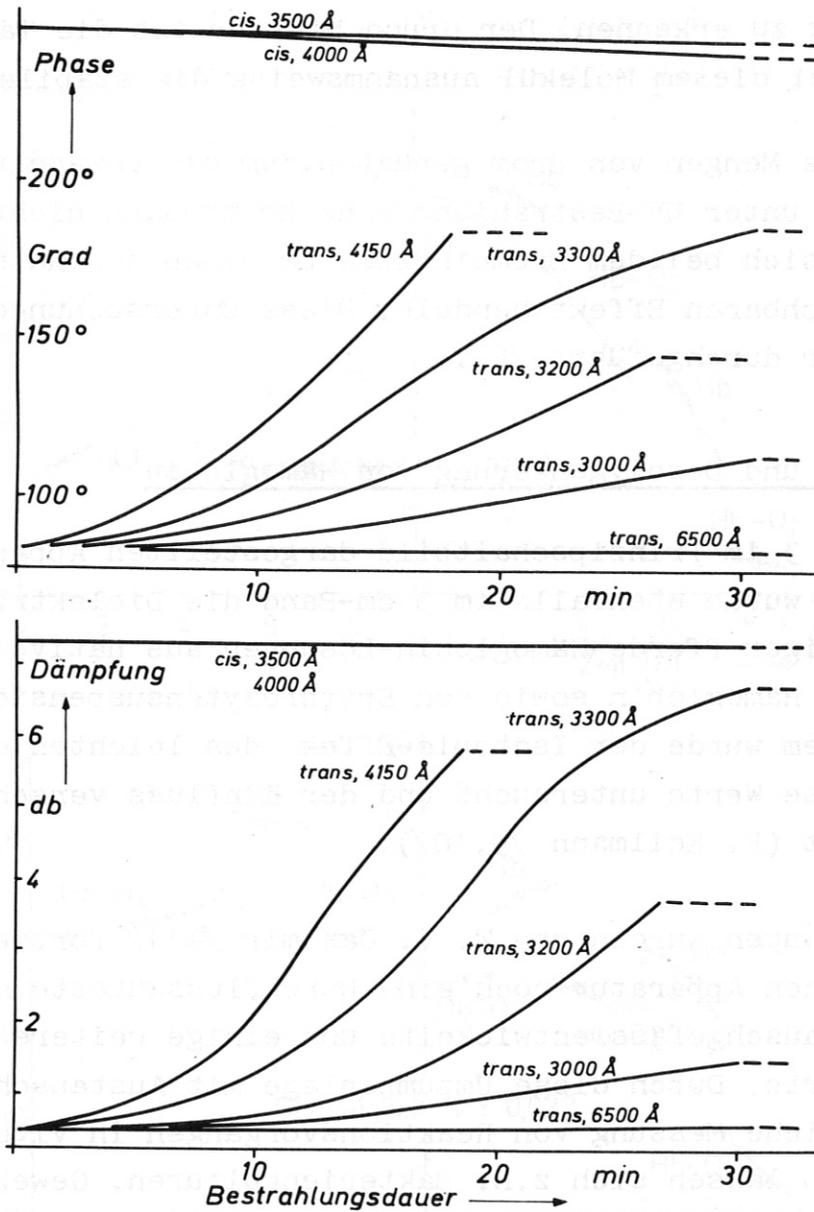


Abb. 6

Änderung der Mikrowellenmesswerte bei Bestrahlung von cis- und trans-Dichloräthylen bei einer Brom-Konzentration von 0,5 Vol.%.
Parameter: Einstrahlungswellenlänge, allerdings nicht auf gleiche Einstrahlungsenergie bezogen.

Gestrichelt: keine Bestrahlung

Schichtdicke: 9,5 mm

Messwellenlänge: 3 cm

In der Abb. 6 ist die Abhängigkeit der Umwandlungsreaktion des trans- und cis-Dichloräthylens von der Zeit mit der Einstrahlungswellenlänge als Parameter dargestellt. Die Brom-Konzentration bei allen Lösungen betrug 0,5 Vol.%. Deutlich ist der wesentlich langsamere Ver-

lauf der Umwandlung der cis- in die trans-Form gegenüber dem umgekehrten Vorgang zu erkennen. Der Grund hierfür ist die Tatsache, dass die cis-Form bei diesem Molekül ausnahmsweise die stabilere ist.

Da schon geringe Mengen von Brom genügten, um die Umwandlungsreaktion auszulösen, die unter UV-Bestrahlung ohne Bromzusatz nicht messbar war, dürfte es sich bei dem Bromeinfluss um einen der Katalysatorenwirkung vergleichbaren Effekt handeln. Diese Untersuchungen wurden von W. Schneider durchgeführt /8/.

2. Oxygenierung und Desoxygenierung von Hämoglobin⁺

Mit der in Abb. 3 im Prinzipschaltbild dargestellten Apparatur mit fester Frequenz wurde ebenfalls im 3 cm-Band die Dielektrizitätskonstante wässriger Pferde-Hämoglobin-Lösungen aus nativem und lyophilisiertem Hämoglobin sowie von Erythrozytensuspensionen gemessen. Ausserdem wurde der Isotopie-Effekt des leichten und schweren Wassers auf diese Werte untersucht und der Einfluss verschiedener Puffer ermittelt (F. Keilmann /9,10/).

Diese Untersuchungen wurden von W. v. Casimir /9,11/ fortgesetzt, der zu der vorhandenen Apparatur noch eine Durchflussküvette mit Umpumpanlage und Austauschgefäss entwickelte und einige weitere Verbesserungen durchführte. Durch diese Umpumpanlage mit Austauschgefäss soll die kontinuierliche Messung von Reaktionsvorgängen in vivo ermöglicht werden. So lassen sich z.B. Bakterienkulturen, Gewebeschwemmungen oder ein extrakorporaler Kreislauf auf diese Weise durch die Messküvette pumpen. Ausserdem können in dem Austausch- oder Reaktionsgefäss Manipulierungen vorgenommen werden, wie in diesem Falle die Oxygenierung bzw. Desoxygenierung von Hämoglobin.

Mit dem durch das Austauschgefäss verbesserten Messplatz mit fester Frequenz im 3 cm-Band wurden die Messwertunterschiede der Dämpfung und der Phasenlage zwischen oxygeniertem und desoxygeniertem Hämoglobin gemessen, die in Abb. 7 am Beispiel zweier Messreihen dargestellt sind.

⁺) Referiert in der Zeitschrift "Nature":

"A Ghost Laid", Vol. 222, 119, April 12, 1969.

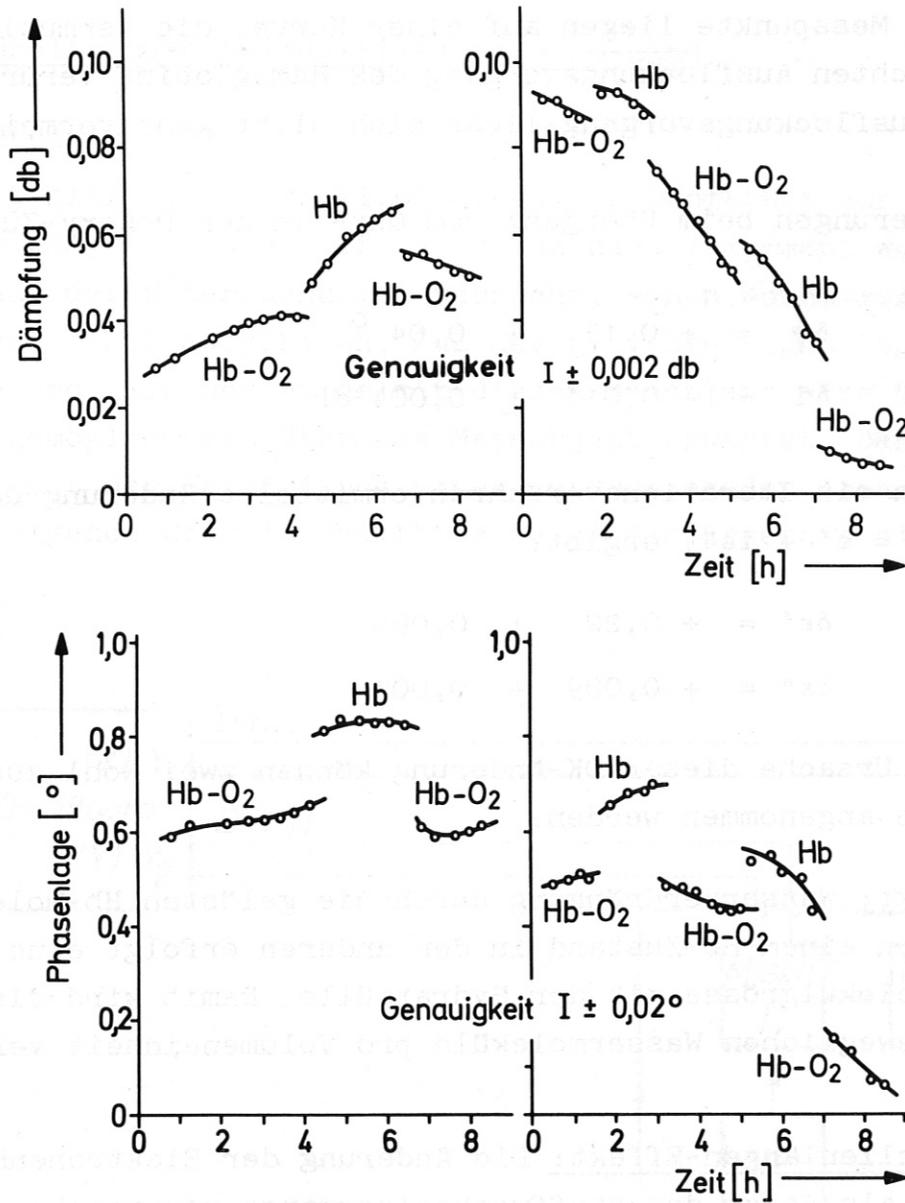


Abb. 7

Messwerte von oxygeniertem und desoxygeniertem Hämoglobin. Zwei Versuchsreihen. Dämpfungsänderung oberes Bild, Phasenänderung unteres Bild. Hb-Konzentration 107 g/l. Schichtdicke 10 mm. Messwellenlänge $\sim 3 \text{ cm}$. Temperatur $4,0^\circ \text{C}$. Die Absolutwerte sind nicht massgebend, sondern die relativen Änderungen. Diese Messwertsprünge zwischen oxygeniertem und desoxygeniertem Hämoglobin sind vor allem bei der Phasenlage deutlich zu erkennen. Der Gang der einzelnen Messpunkte des gleichen Beladungszustandes sind vermutlich durch einen leichten Ausflockungsvorgang des Hämoglobins verursacht, der sich trotz sorgfältigster Präparation nicht ganz vermeiden liess.

Die Messwertsprünge zwischen dem oxygenierten bzw. desoxygenierten Zustand des Hämoglobins sind sowohl bei der Phasenlage als auch bei der Dämpfung gut erkennbar. Die Phasenlage zeigt die Sprünge jedoch deutlicher. Die Messpunkte liegen auf einer Kurve, die vermutlich durch einen leichten Ausflockungsvorgang des Hämoglobins verursacht wurde. Dieser Ausflockungsvorgang liess sich nicht ganz vermeiden.

Die Messwertänderungen beim Übergang vom Oxy- in den Desoxy-Zustand betragen

$$\delta\varphi = + 0,17 \pm 0,04^\circ$$

$$\delta d = + 0,011 \pm 0,004 \text{ db}$$

Die daraus durch ein Iterationsverfahren ermittelte Änderung der komplexen DK ($\epsilon = \epsilon' + i\epsilon''$) ergibt:

$$\delta\epsilon' = + 0,22 \pm 0,005$$

$$\delta\epsilon'' = + 0,009 \pm 0,003$$

Zur Deutung der Ursache dieser DK-Änderung können zwei wohl zusammenwirkende Effekte angenommen werden:

a) Volumen-Effekt: Wasserverdrängung durch die gelösten Hb-Moleküle. Beim Übergang von einem Hb-Zustand in den anderen erfolgt eine Änderung der Hb-Molekülgrösse mit der Hydrathülle. Damit wird die Anzahl der frei beweglichen Wassermoleküle pro Volumeneinheit verändert.

b) Relaxationswellenlängen-Effekt: Die Änderung der Elektronenhülle des Hb-Moleküls als Folge des Stoffwechselforgangs verursache eine Änderung der Relaxationswellenlänge.

Die Schwierigkeit bei der Interpretation der gemessenen Dk-Änderungen in Zwei- und Mehrstoffsystemen entsteht dadurch, dass bei diesen Messungen im langwelligen Bereich Schwingungen der gesamten Moleküle angeregt werden, die sich bei Flüssigkeiten über ein sehr breites Frequenzband erstrecken. Die Überlagerungen der Absorptionen mehrerer Molekülarten ergeben dann Messwertunterschiede, die entweder nicht mehr messbar sind oder den einzelnen Molekültypen nicht mehr zugeordnet werden können. Im Gegensatz dazu werden bei kurzen Wellenlängen die innermolekularen Resonanzen angeregt, die auch bei Flüssigkeiten schmalbandige Absorptionen verursachen, wie Abb. 1

schon zeigte. Die Zuordnung ist daher wesentlich einfacher und die Gefahr des Verschmierens geringer.

II. Breitbandwobbelmessplatz im 3 cm-Band

a) Aufbau

Um dem Ziel der Entwicklung eines Spektrometers zur Auffindung und Verfolgung der Molekularresonanzen näherzukommen, wurde im weiteren Verlauf der Untersuchungen versucht, einen Wobbelmessplatz mit grossem Wobbelhub aufzubauen. Aus der gleichzeitigen Registrierung von Phase und Dämpfung wurde mit diesem Messplatz eine Verbesserung der Aussagemöglichkeit über das Messobjekt erwartet. Daher wurde O. Gehre mit der Entwicklung einer entsprechenden Apparatur beauftragt. Das folgende Prinzipschaltbild zeigt das Ergebnis dieser Entwicklung /12/:

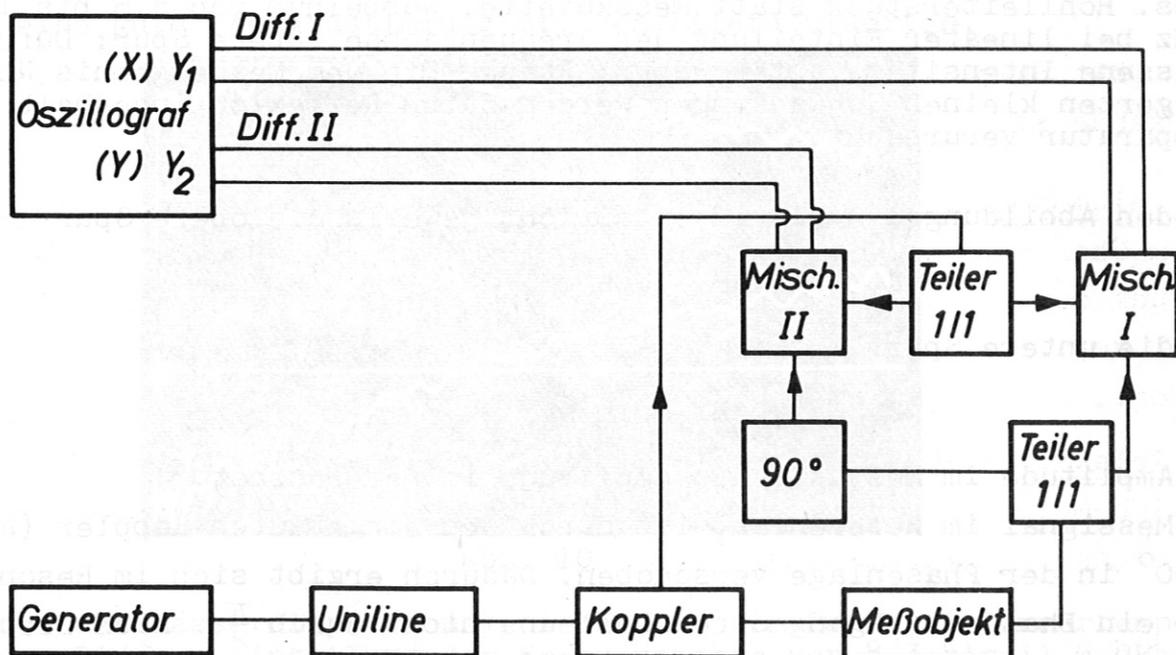


Abb. 8

Wobbelmessplatz. Prinzipschaltbild. Durchstimmbar von 8,0 bis 12,0 GHz mit einer Wobelfrequenz bis zu 100 Hz.

Da die Bauteile wie beim Messplatz mit fester Frequenz leichter zu beschaffen waren, wurde auch dieser Messplatz im 3 cm-Band gebaut. Dieser Messplatz lässt sich mit einer Wobelfrequenz von bis zu 100 Hz über das gesamte Band von 8,0 bis 12,0 GHz durchstimmen. Auf einem Zweistrahloszillogoskop können Phase und Dämpfung aufgezeichnet

werden. Wegen der Frequenzabhängigkeit der Mikrowelleneigenschaften der meisten Bauelemente war die Entwicklung dieses Messplatzes mit erheblichen Schwierigkeiten verbunden. Wesentlich ist an dem Messplatz, dass beide Brückzweige elektrisch gleich lang sein müssen. Dadurch erhält man bei der Leerwertanzeige für die Phase über das ganze Band einen Nullwert, während die empfangene Leistung mit einem festen Wert angezeigt wird (s. Abb. 9).

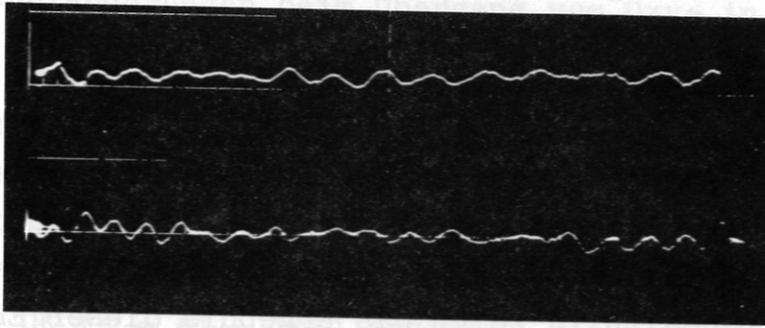


Abb. 9

Die Abbildung zeigt, wie gut der Abgleich über das ganze Frequenzband bei leerer Küvette gelungen ist. Leerwert des Wobbelmessplatzes. Hohlleiterstück statt Messküvette. Wobbelhub von 8,5 bis 11,5 GHz bei linearer Einteilung der Frequenzachse. Obere Spur: Durchgelassene Intensität, untere Spur: Phase. Die dem Messergebnis überlagerten kleinen Schwankungen werden durch Reflexion innerhalb der Apparatur verursacht.

Auf den Abbildungen 9 bis 12 entspricht jeweils die obere Spur

$$J_I = 4 AB \cdot \cos \varphi \quad 1.$$

und die untere Spur

$$J_{II} = 4 AB \cdot \sin \varphi \quad 2.$$

A = Amplitude im Messast; B = Amplitude im Referenzast.

Das Messsignal im Referenzast ist durch den eingebauten Koppler (Abb.8) um 90° in der Phasenlage verschoben. Dadurch ergibt sich im Resonanzfall ein Phasendurchgang durch Null und nicht durch $\frac{\pi}{2}$. Nach Gleichung 1. und 2. lässt sich die Änderung der Phasenlage wie folgt berechnen:

$$\operatorname{Tg} \varphi = \frac{J_{II}}{J_I} \quad 3.$$

und die Amplitude nach Dämpfung durch das Messobjekt

$$A = \frac{1}{4B} \sqrt{J_I^2 + J_{II}^2} \quad 4.$$

Da vor allem die Nulldurchgänge der Phase von Bedeutung sind, wird vereinfachend die untere Spur der Phase und die obere der Dämpfung zugeordnet. /12/

Die Anzeigeempfindlichkeit dieses Messplatzes ist nicht so gross wie die des Messplatzes mit fester Frequenz; sie liegt in der Grösse einiger Prozent der einfallenden Intensität. Dieser Messplatz ist bei den entsprechenden Wellenlängen zur Auffindung der Resonanzen vorgesehen, der Einzelfrequenzmessplatz mit fester Empfindlichkeit zur Verfolgung der einzelnen Resonanzen mit hoher Empfindlichkeit in Abhängigkeit von der Zeit. Für die mit dem Wobbelmessplatz festgestellten charakteristischen Molekularresonanzen muss dann eine entsprechende Apparatur mit fester Einzelfrequenz und hoher Empfindlichkeit gebaut werden.

b) Messergebnisse

Da der Messplatz im Bereich des Wasserdispersionsgebietes arbeitet, wurde versucht, den aus der Literatur bekannten Anstieg der Dämpfung in Richtung höherer Frequenzen darzustellen. Abb. 10 zeigt das Ergebnis. Die aus diesem Messergebnis berechneten dielektrischen Werte ergaben eine gute Übereinstimmung mit den Literaturwerten.

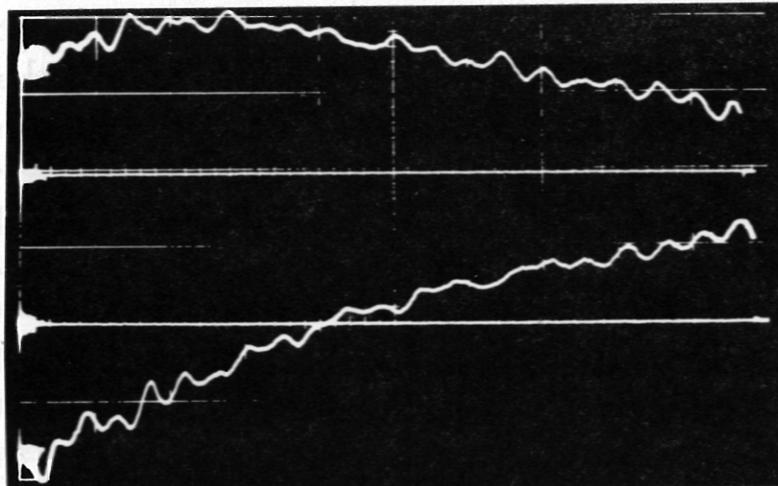


Abb. 10

Flanke des Wasserdispersionsgebietes im 3 cm-Band bei Zimmertemperatur. Lineare Einteilung der Frequenzachse von 8,3 bis 11,5 GHz. Dicke der Wasserschicht 4 mm. Die dem Messergebnis überlagerten kleinen Schwankungen werden von Reflexionen innerhalb der Apparatur verursacht. An der oberen Spur ist die Zunahme der Dämpfung bei höheren Frequenzen deutlich erkennbar. Die untere Spur zeigt die Änderung der Phasenlage.

Um zu ermitteln, wie mit dieser Apparatur Resonanzen registriert werden können, deren Darstellung und Untersuchung in biologischen Objekten das Ziel dieser Arbeit ist, wurde ein verstimmbarer Resonator parallel anstelle der Messküvette in den Brückenzweig eingebracht.

Abb. 11 zeigt Resonanzen, die auf diese Weise erzeugt wurden.

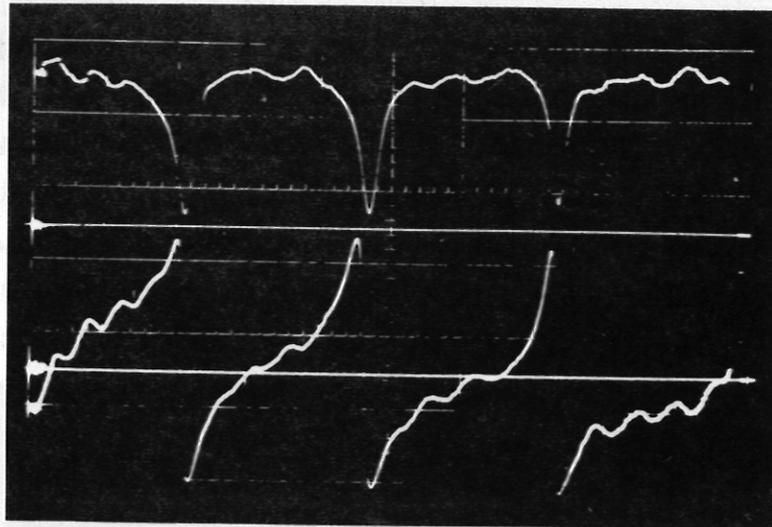


Abb. 11

Durch einen parallel geschalteten Hohlraumresonator erzeugte Resonanzen. Obere Spur: Absorption der Leistung wie z.B. bei der IR-Spektroskopie. Untere Spur: Phasenlage. Deutlich ist der Wendepunkt der Phasenlage im Maximum der Absorption erkennbar.

Vor allem bei Gemischen aus mehreren Substanzen oder bei der in biologischen Objekten vorhandenen Vielzahl von Substanzen wird eine Verbesserung der Aussagemöglichkeit durch die gleichzeitige Darstellung von Phase und Dämpfung bzw. durch die alleinige Darstellung der Phase erwartet, da die exakte Festlegung des Wendepunktes der Phase im Frequenzband vor allem bei der Überlagerung mehrerer Absorptionen leichter durchführbar erscheint, als die Festlegung des Maximums einer Absorption. Ein deutliches Beispiel hierfür zeigt Abb. 12:

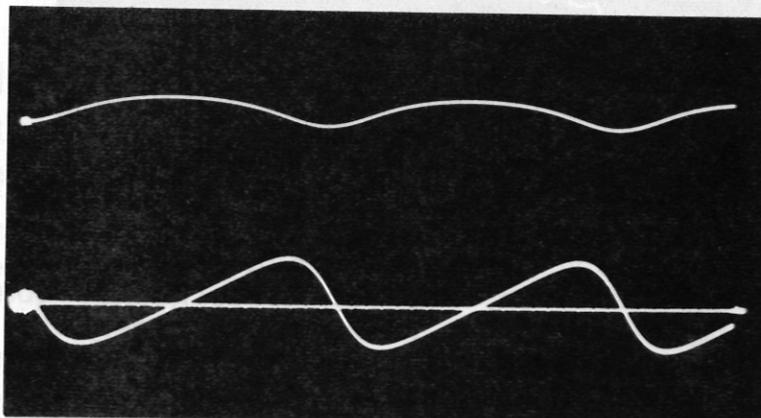


Abb. 12

Breite Darstellung von zwei Resonanzen durch Verwendung einer Verzögerungsleitung als Resonator. Aufzeichnung beider Spuren mit gleicher Anzeigeempfindlichkeit. Obere Spur: Dämpfung, untere Spur: Phasenlage. Es ist deutlich erkennbar, dass der Wendepunkt der Phase besser feststellbar ist als das Maximum der Absorption.

III. Streustrahlungsversuche im 8 mm-Band

Die zu untersuchenden biologischen Objekte bestehen meist aus Zellen mit Zellenmembran, Zellinhalt und Zellumgebung. Es ist beabsichtigt, die molekularen Eigenschaften dieser Objekte und deren Änderungen bei Stoffwechselfvorgängen, nicht aber die Zellform zu erfassen. Um zu klären, ob und inwieweit die Messungen durch die Zellform und deren Änderungen gestört werden können, werden zur Zeit Streustrahlungsmessungen durchgeführt. Durch eine persönliche Mitteilung von H.P. Schwan /13/ ist bekannt, dass überraschenderweise bei langen Wellenlängen bis herunter zur 10 cm Wellenlänge die Zellstruktur biologischer Objekte eine Rolle spielt. Bei kürzeren Wellenlängen bilden biologische Objekte, wie Blut oder Bakterienkulturen ein quasi-homogenes Objekt. Es ist noch unbekannt, bis zu wie kurzen Wellenlängen diese günstige Eigenschaft erhalten bleibt. Da zu erwarten ist, dass Beugungs- und Streuungseffekte auftreten, sobald die zur Untersuchung benützte Wellenlänge in die Grössenordnung der Zellengrösse des Messobjekts kommt, wurde in Zusammenarbeit mit der Ruhr-Universität Bochum, Bereich extraterrestrische Physik, ein Streuexperiment aufgebaut. Die extraterrestrische Physik interessiert sich im Zusammenhang mit der Untersuchung des Zodiakallichtes für die Streueigenschaften regelmässig und unregelmässig geformter Körper mit verschiedenen Brechungsindices. Diese Arbeit wurde von R. Zerull und K. Plank durchgeführt.

Beim Zodiakallicht handelt es sich um Streuung von sichtbarem Licht (Wellenlänge $5 \cdot 10^{-5}$ cm) an Teilchen von 10^{-5} bis 10^{-3} cm Durchmesser. Diese interplanetaren Teilchen sind teils regelmässig, teils unregelmässig geformt und bilden auch Teilchenhaufen, die sogenannten "fluffy particles", deren optische Eigenschaften denen von Zellhaufen ähnlich sein dürften.

a) Aufbau

Für die Versuche wird eine Wellenlänge von 8 mm benutzt, da mit dieser Wellenlänge die Fernfeldbedingungen im Labor noch gut realisierbar ist. Da ausserdem für die Streueigenschaften der Parameter Objektumfang zu Wellenlänge massgebend ist, konnte eine Wellenlänge von 8 mm benutzt werden. Das Schaltbild der für die Messungen benutzten Apparatur zeigt Abb. 13.

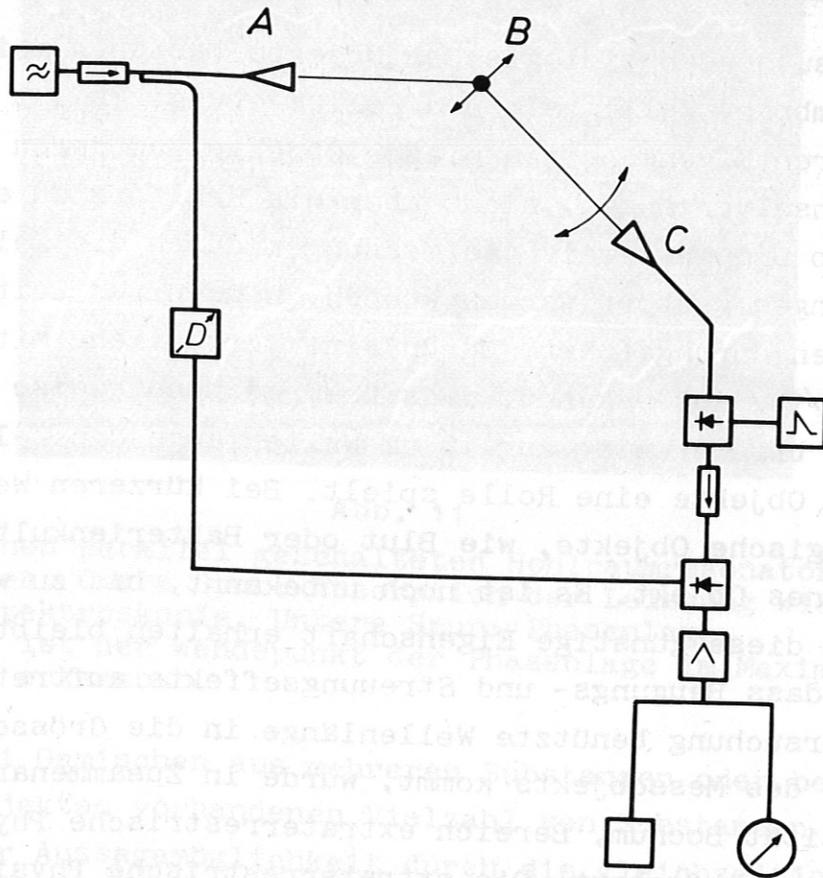


Abb. 13

Geräteaufbau zur Messung der Streustrahlung von Probekörpern. Sendeantenne A. Das Empfangshorn C kann um 360° um eine Achse gedreht werden, in deren Verlängerung der Probekörper B befestigt ist. Zur Eliminierung störender Reflexionen wird der Probekörper bewegungsmoduliert.

Zunächst wird die Streuung an jeweils einer dielektrischen Kugel mit verschiedenen Durchmessern gemessen, die in der Grössenordnung der Untersuchungswellenlänge liegen. Zur Eliminierung störender Streustrahlung z.B. von den Wänden, wird das an einem dünnen dielektrischen Faden hängende Messobjekt bewegungsmoduliert. Das Messobjekt befindet sich im Fernfeld der Sendeantenne. Die Empfangsantenne ist um eine Achse drehbar, in deren Verlängerung sich das Messobjekt in der Ebene der beiden Hörner befindet. Die Streuwerte werden in Abhängigkeit vom Streuwinkel gemessen.

b) Messergebnisse

Die bisher registrierten ersten Messergebnisse zeigten gute Übereinstimmung mit der Mie'schen Theorie, die das Streuverhalten von Kugeln und unendlich langen Zylindern behandelt (Abb. 14):

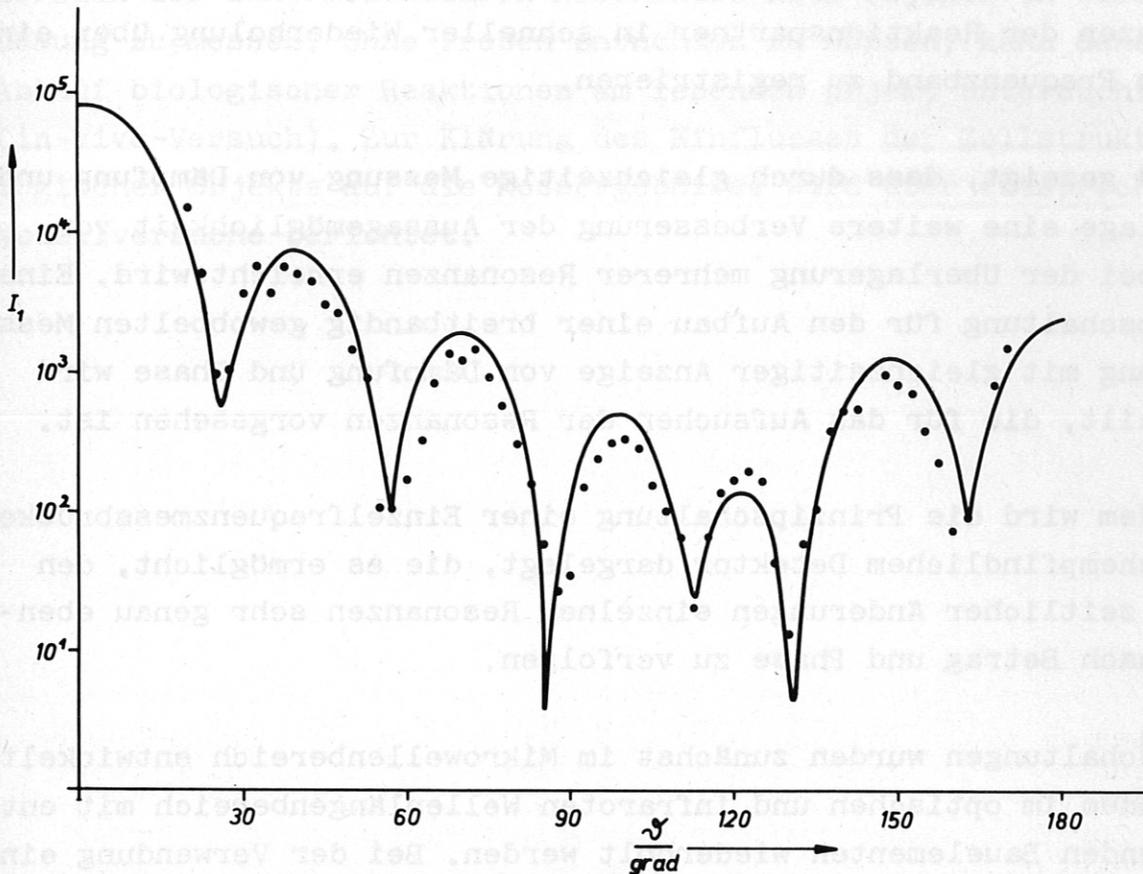


Abb. 14

Streuwerte einer dielektrischen Kugel. Intensität in Abhängigkeit vom Streuwinkel. 0° bedeutet, dass Sende- und Empfangsantenne sich gegenüberstehen.

Messfrequenz im 8 mm-Band. Kugeldurchmesser = 16,75 mm,

Brechungsindex der Kugel $n = 1,5$.

Die nach der Theorie berechnete Kurve ist durchgezogen.

C) Zusammenfassung

Es wird versucht, die Untersuchung der Kinetik chemischer Reaktionen durch die Anwendung eines spektroskopischen Verfahrens zu verbessern, das sowohl eine qualitative als auch eine quantitative Aussage über die Reaktionspartner sowie eventuelle kurzzeitige Zwischenprodukte ermöglicht. Zu diesem Zweck ist beabsichtigt, die innermolekularen Resonanzen der Reaktionspartner in schneller Wiederholung über ein breites Frequenzband zu registrieren.

Es wird gezeigt, dass durch gleichzeitige Messung von Dämpfung und Phasenlage eine weitere Verbesserung der Aussagemöglichkeit vor allem bei der Überlagerung mehrerer Resonanzen erreicht wird. Eine Prinzipschaltung für den Aufbau einer breitbandig gewobbelten Messanordnung mit gleichzeitiger Anzeige von Dämpfung und Phase wird mitgeteilt, die für das Aufsuchen der Resonanzen vorgesehen ist.

Ausserdem wird die Prinzipschaltung einer Einzelfrequenzmessbrücke mit hochempfindlichem Detektor dargelegt, die es ermöglicht, den Ablauf zeitlicher Änderungen einzelner Resonanzen sehr genau ebenfalls nach Betrag und Phase zu verfolgen.

Beide Schaltungen wurden zunächst im Mikrowellenbereich entwickelt und können im optischen und infraroten Wellenlängenbereich mit entsprechenden Bauelementen wiederholt werden. Bei der Verwendung eines Dauerstrichlasers als Generator in diesen Wellenlängenbereichen ist die Messung der Phasenlage leichter durchführbar, da die Phasenlage des Lasers besser stabil gehalten werden kann als seine Sendeleistung. An Beispielen, wie der cis-trans-Isomerisierung von Dichloräthylen und der Oxygenierung sowie Desoxygenierung von Hämoglobin in wässriger Lösung wird gezeigt, dass die Messung der Phasenlage bzw. die gleichzeitige Messung von Dämpfung und Phase eine Verbesserung der Aussagemöglichkeit ergeben kann. Mit dem Wobbelmessplatz konnte die Flanke der Wasserdispersion im 3 cm-Band nach Dämpfung und Phase registriert werden.

Die Ergebnisse der kontinuierlichen Verfolgung des Reaktionsablaufs der cis-trans-Isomerisierung von Dichloräthylen mit dem Einzelfrequenzmessplatz werden mitgeteilt. Bei diesem Vorgang wirken geringe Mengen von Brom als Katalysator. Chlor und Jod zeigen diesen Effekt nicht.

Ebenso werden die am gleichen Messplatz registrierten Ergebnisse der Oxygenierung und Desoxygenierung von Hämoglobin in wässriger Lösung diskutiert.

Es konnte geklärt werden, dass grundsätzlich die Möglichkeit besteht, mit den vorgesehenen spektroskopischen Methoden im Frequenzbereich der innermolekularen Resonanzen auch Objekte in wässriger Lösung zu messen. Ohne Proben entnehmen zu müssen, kann daher der Ablauf biologischer Reaktionen am lebenden Objekt untersucht werden (in-vivo-Versuch). Zur Klärung des Einflusses der Zellstruktur biologischer Objekte auf die Messergebnisse wird über entsprechende Modellversuche berichtet.

Literatur

- 1 Kaiser N., Laborberichte Max-Planck-Institut für Physik und Astrophysik (1961 - 1965)
Laborberichte Institut für Plasmaphysik (1965 - 1969)
- 2 Chanal M.M.D. et al., Le Journal de Physique 28, 165 (1967)
- 3 Brügel W., Einführung in die Ultrarotspektroskopie, Steinkopf Verl., 3. Auflage, S. 255 (1962)
- 4 Electronics 41,8, 52, 15. April 1968
- 5 Gürs K., persönliche Mitteilungen, Battelle-Institut, Frankfurt
- 6 Kaiser N., Proc. "Colloquium of the Biological Fluids", Mai 1968, Brügge, Belgien
- 7 O'Brien B.B., IEEE Transactions on Instrumentation and Measurement, Vol. IM-16, No. 2, 124 (1967)
- 8 Schneider W., Diplomarbeit Universität München, Januar 1968
- 9 Casimir W. von, Kaiser N., Keilmann F., Mayer A. und Vogel H., Dielectric Properties of Oxyhemoglobin and Deoxyhemoglobin in Aqueous Solution at Microwave Frequencies, Biopolymers 6, 1705 (1968)
- 10 Keilmann F., Diplomarbeit TH München, Dezember 1966
- 11 Casimir W. von, Laborbericht IPP Garching 3/66, Januar 1968
- 12 Gehre O., Laborbericht IPP Garching 3/61, Oktober 1967
- 13 Schwan H.P., private Mitteilung