



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 10 2004 035 916 B4** 2007.10.18

(12)

Patentschrift

(21) Aktenzeichen: **10 2004 035 916.4**
(22) Anmeldetag: **23.07.2004**
(43) Offenlegungstag: **16.03.2006**
(45) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung: **18.10.2007**

(51) Int Cl.⁸: **G01N 21/64** (2006.01)
G01N 33/58 (2006.01)
A61K 51/00 (2006.01)

Innerhalb von drei Monaten nach Veröffentlichung der Patenterteilung kann nach § 59 Patentgesetz gegen das Patent Einspruch erhoben werden. Der Einspruch ist schriftlich zu erklären und zu begründen. Innerhalb der Einspruchsfrist ist eine Einspruchsgebühr in Höhe von 200 Euro zu entrichten (§ 6 Patentkostengesetz in Verbindung mit der Anlage zu § 2 Abs. 2 Patentkostengesetz).

(73) Patentinhaber:
Prof. Dr. Karl-Heinz Gericke
Technische Universität Braunschweig Institut für
Physikalische und Theoretische Chemie, 38106
Braunschweig, DE

(72) Erfinder:
Baars-Hibbe, Lutz, 38116 Braunschweig, DE;
Gericke, Karl-Heinz, Prof. Dr., 38122
Braunschweig, DE; Lauenstein, Jörg, 38165
Lehre, DE

(56) Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht
gezogene Druckschriften:
DE 197 19 098 C1
DE 40 12 454 C1
DE 21 27 994 C
DE 195 38 431 A1

US 44 62 686 A
US 46 84 805
US 34 47 876
EP 11 67 949 A1
SANDHOLM, S. (u.a.): Recent and future improve-
ments in two-photon-laser-induced fluorescence
NO
measurement capabilities. In: Journal of
Geophysical Research 1997, Vol. 102, No. D23, S. 28,651-
28,661.;
MÜRTZ P. (u.a.): LMR spectroscopy: a new
sensitive
method for on-line recording of nitric oxide in
breath. In: Journal of Applied Physiology. 1999,
Vol. 86, No. 3, S. 1075-1080;

(54) Bezeichnung: **Verfahren zur isotopenselektiven Bestimmung von Stickstoffmonoxid-Konzentrationen**

(57) Hauptanspruch: Verfahren zur isotopenselektiven Bestimmung von Stickstoffmonoxid-Konzentrationen in Atemluft, menschlichen Ausscheidungen, tierischen Ausscheidungen, oder Ausgasungen von Pflanzen und von Böden durch 1-Photonenlaserinduzierte Fluoreszenz, indem man mittels einer UV-Lichtquelle mit durchstimmbarer Wellenlänge, die Licht einer Wellenlänge erzeugt, welches ¹⁵NO elektronisch anregt, dieses Licht auf eine zu untersuchende gasförmige Probe einstrahlt, welche aus Atemluft, menschlichen Ausscheidungen, tierischen Ausscheidungen, oder Ausgasungen von Pflanzen und von Böden stammt, und das vom elektronisch angeregten ¹⁵NO emittierte Fluoreszenzlicht mit einem Lichtdetektor nachweist.

Beschreibung

[0001] Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum isotopenselektiven Nachweis von Stickstoffmonoxid (NO) in beliebigen Gasgemischen, insbesondere in der menschlichen Atemluft.

[0002] Die Messung von Stickstoffmonoxid-Konzentrationen ist hauptsächlich in atmosphärischer Luft, Atemluft und in Verbrennungsabgasen erforderlich. Je nach Anwendungsbereich ergeben sich so unterschiedliche Anforderungen an die Messmethode. So gibt es gemäß <http://www.ionicsinstruments.com> kommerziell erhältliche Vorrichtungen, die NO bis zu einer Konzentration von einigen ppb (parts per billion, ein Teilchen in einer Milliarde Teilchen) selektiv nachweisen können. Diese Vorrichtungen sind teilweise transportabel und ihr Messverfahren beruht auf der Detektion von Licht, welches bei der chemischen Reaktion von NO mit Ozon entsteht (Chemilumineszenz). Eine isotopenselektive Auflösung der NO-Konzentration ist physikalisch ausgeschlossen.

[0003] Neben dieser kommerziell nutzbaren Methode werden heutzutage hauptsächlich spektroskopische Methoden zur Bestimmung von NO-Konzentrationen herangezogen.

[0004] In der UV-Absorptionsspektroskopie (UVAS) und der IR-Absorptionsspektroskopie (IRAS) bestrahlt man die Gasprobe mit Licht und misst die Transmission. IRAS wird in Nelson et al.; Appl. Phys. B; 75; 343-350; 2002 offenbart. Beide Verfahren sind in Ihrem apparativen Aufbau sehr ähnlich, jedoch ist die Wellenlänge des eingestrahlt Lichts unterschiedlich. Nah mit der IRAS verwandt sind die Cavity Ring Down Spektroskopie (CRDS), die Cavity Leak Out Spektroskopie (CaLOS) und die Laser Magnetic Resonance Spektroskopie (LMRS). LMRS wird in Mürtz et al.; Amer. Phys. Soc.; 1075-1080; 1999 offenbart. CRDS und CaLOS beruhen auf der Abklingkurve von Licht, die hinter zwei planparallelen teildurchlässigen Spiegeln beobachtet werden kann. Die zu untersuchende Probe liegt dabei zwischen den Spiegeln und anhand der Form der Abklingkurve können Rückschlüsse auf die Absorption der Probe gezogen werden. Der Unterschied von CRDS zu CaLOS liegt nur in der Benutzung von gepulstem Licht im Falle von CRDS gegenüber der Verwendung von kontinuierlichen Lichtquellen bei der CaLOS. Bei LMRS hingegen liegt um die Probe ein variables Magnetfeld, wodurch ein Rotationsspektrum bei konstanter Wellenlänge aufgenommen werden kann.

[0005] Bei der Laserinduzierten Fluoreszenz regt man NO mit Licht abstimmbarer Wellenlänge an und misst die resultierende Fluoreszenz. Das Verfahren ist isotopenselektiv. Dabei lassen sich unter anderem die Anzahl der absorbierten Photonen (Ein-Photonen-LIF und Zwei-Photonen-LIF) variieren, wobei die Anregung von NO mit einem Photon bessere Quantenausbeuten und damit eine erhöhte Empfindlichkeit liefert. Zwei-Photonen-LIF wird in Sandholm et al; J. Geophys. Res.; 102; 28651-28661; 1997 offenbart.

[0006] Absorbiert NO bei der Anregung mit Licht so viele Photonen, dass es ionisiert wird, spricht man von resonant erhöhter Multiphotonen-Ionisation (REMPI). Die durch Photoionisation erhaltenen Ionen können dann in einem Flugzeit-Massenspektrometer nachgewiesen werden. Auch dieses Verfahren ist isotopenselektiv, es wird in Lee et al.; Amer. Inst. of Phys; 2891-2897; 1997 offenbart.

[0007] Bei der gekoppelten Gaschromatographie-Quadrupolmassenspektrometrie (GCQMS) wird die Probe erst gaschromatographisch grob aufgetrennt, um dann NO in einem Quadrupolmassenspektrometer nachzuweisen. Das Verfahren ist isotopenselektiv, und wird in Sich et al; Rapid Comm. in Mass Spec.; 13; 1325-1328; 1999 offenbart.

[0008] DE 197 19 098 C1 offenbart ein Verfahren zur Bestimmung der ¹⁵NO-Konzentration in der menschlichen Atemluft unter Anwendung der Gaschromatographie-Quadrupolmassenspektrometrie-Kopplung (GC-QMS). Nachteilig hierbei ist, dass es wegen der mangelnden Empfindlichkeit von GC-QMS nicht möglich ist, ¹⁵NO in der Atemluft direkt nachzuweisen. Das Stickstoffmonoxid muss durch Kryotrapping aufkonzentriert werden, damit es nachweisbar wird. Weiterhin ist GC-QMS deutlich langsamer als LIF, was durch das Kryotrapping noch verstärkt wird, so dass eine Echtzeitbestimmung der ¹⁵NO-Konzentration nicht möglich ist.

[0009] US 44 62 686 A offenbart ein Verfahren zur laserunterstützten Isotopen-Detektion und Konzentrationsmessung (LIDAM). Das verwendete Laser-Medium ist dabei mit der zu untersuchenden Probe identisch. Ein NO-Laser existiert derzeit nicht, wodurch die Methode zur Isotopen-Detektion und Konzentrationsmessung von NO nicht geeignet ist. Zudem werden bei der LIDAM lediglich rovintronische Zustände des Probegases angeregt, dessen Infrarotfluoreszenz deutlich weniger empfindlich ist als UV-VIS-Fluoreszenzmessungen.

[0010] Die Detektionsgrenzen (LOD) aller genannten Nachweismethoden sind in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Übersicht über NO-Nachweisverfahren

Verfahren	LOD	isotopenselektiv
Chemilumineszenz	< 1 ppb	nein
UVAS	ppm-Bereich	ja
IRAS	< 1 ppb	ja
CRDS		ja
CaLOS		ja
LMRS	1 ppb	ja
1-Photonen LIF	< 1 ppt	ja
2-Photonen-LIF	20 ppt	ja
REMPI	16 ppt	ja
GCQMS	50 ppb	ja

*Bei einer Integrationszeit von 1 s

[0011] Es gibt Verfahren, mit denen sich NO indirekt nachweisen lässt. Dabei muss NO zuerst zu Stickstoff oder zu Stickstoffdioxid umgewandelt werden, damit diese Moleküle dann nachgewiesen werden können. In Empfindlichkeit, Selektivität und Messgenauigkeit reichen diese Methoden bei weitem nicht an die oben beschriebenen direkten Messverfahren für NO heran.

[0012] Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, ein Verfahren zu schaffen zur isotopenselektiven Bestimmung von Stickstoffmonoxid-Konzentrationen mit hoher Selektivität und hoher Sensitivität.

[0013] Die gestellte Aufgabe wird durch ein Verfahren nach Anspruch 1 gelöst.

[0014] Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur isotopenselektiven Bestimmung von Stickstoffmonoxid-Konzentrationen in Atemluft, menschlichen Ausscheidungen, tierischen Ausscheidungen, oder Ausgasungen von Pflanzen und von Böden, indem man mittels einer UV-Lichtquelle, die Licht einer Wellenlänge erzeugt, welches ^{15}NO elektronisch anregt, dieses Licht auf eine zu untersuchende gasförmige Probe einstrahlt, welche aus Atemluft, menschlichen Ausscheidungen, tierischen Ausscheidungen, oder Ausgasungen von Pflanzen und von Böden stammt, und das vom elektronisch angeregten ^{15}NO emittierte Fluoreszenzlicht mit einem Lichtdetektor nachweist.

[0015] Des Weiteren wird die Verwendung einer Vorrichtung zur isotopenselektiven Bestimmung von Stickstoffmonoxid-Konzentrationen beansprucht, umfassend eine UV-Lichtquelle, die Licht einer Wellenlänge emittiert, welches ^{15}NO elektronisch anregt, und einem Lichtdetektor, der das vom elektronisch angeregten ^{15}NO emittierte Fluoreszenzlicht nachweist, zur Messung von Konzentrationen an ^{15}NO aus der Atemluft, allgemeiner menschlicher Ausscheidungen, tierischer Ausscheidungen, oder Ausgasungen von Pflanzen und von Böden.

[0016] Es wird vorzugsweise das Prinzip der Laserinduzierten Fluoreszenz (1-Photonen-LIF) genutzt, mit dem theoretisch eine Konzentration von 0,01 ppt nachgewiesen werden kann. Experimentell konnte eine Konzentration unterhalb von 1 ppt nachgewiesen werden.

[0017] Die erfindungsgemäße Vorrichtung umfasst vorzugsweise eine Lichtquelle mit durchstimmbarer Wellenlänge. Insbesondere sind Farbstofflaser, deren Emission einer Frequenzvervielfachung unterzogen wird, bevorzugt. Die Frequenz- oder Wellenlängenverteilung (Linienbreite) ihres Lichts sollte möglichst klein, im allgemeinen kleiner als $0,2 \text{ cm}^{-1}$ sein.

[0018] NO absorbiert unter anderem Licht im Wellenlängenbereich von 224,2 bis 227,1 nm. Da die Absorptionsbanden von ^{15}NO gegenüber denen von ^{14}NO leicht rotverschoben sind, ist es möglich, beide Isotopomere

durch Intensitätsbestimmung der rotationsaufgelösten elektronischen Spektren direkt nebeneinander nachzuweisen, sofern die Lichtquelle Licht einer hinreichend kleinen Wellenlängenverteilung emittiert. Die Intensität des ^{14}NO -Spektrums ist aufgrund der natürlichen Isotopenhäufigkeit etwa 270 mal größer als die des ^{15}NO -Spektrums. Dadurch ist es nur bei bestimmten Wellenlängen möglich, die Spektrallinien von ^{15}NO aufzunehmen, nämlich dort, wo die ^{15}NO -Signale nicht von den ^{14}NO -Signalen überlagert werden. Dies erfordert die schmale Linienbreite der anregenden Lichtquelle und eine hohe Empfindlichkeit der Apparatur, denn bei einem natürlichem ^{14}NO -Anteil von ca. 10 ppb in der menschlichen Atemluft liegt der dementsprechende ^{15}NO -Anteil bei 37 ppt. Das Prinzip der Laserinduzierten Fluoreszenz vereinigt hierbei die nötige Selektivität mit der hohen Sensitivität, was zu sehr genauen ^{14}NO bzw. ^{15}NO Konzentrationsmessungen führt.

[0019] Ein isotopenselektiver Nachweis mit dieser Genauigkeit eröffnet neue Möglichkeiten zur Aufklärung der Stickstoff-Kreisläufe in der Natur. Hierzu können mit ^{15}N angereicherte Stickstoffverbindungen, sogenannte Precursoren, eingesetzt werden, die in Stoffwechselfvorgängen verarbeitet werden. Diese Precursoren werden von dem jeweiligen biologischen System in den Stoffwechselfvorgängen zu ^{15}NO umgewandelt, dessen Konzentration mit dem erfindungsgemäßen Verfahren ohne Beeinträchtigung durch ^{14}NO gemessen wird. Dieses Verfahren ist nicht-invasiv und birgt keine Gesundheitsgefährdung, da ^{15}N nicht radioaktiv ist und sich im chemischen Verhalten nicht von ^{14}N unterscheidet. Ein für die Anwendung beim Menschen geeigneter Precursor ist beispielsweise die Aminosäure L-Arginin, die täglich mit der Nahrung aufgenommen wird. Die zeitabhängige Detektion des ^{15}NO in der Atemluft erlaubt die Aufklärung der Dynamik physiologischer Prozesse, wobei auch pathologische Veränderungen feststellbar sind. Analoge Verfahren sind auch bei Tieren möglich. Zur Untersuchung von Pflanzen und Böden können ^{15}NO -markierte Dünger eingesetzt werden.

[0020] Die Konzentrationsmessung findet in einer Messzelle statt, durch die die zu vermessende Probe strömt. Das Detektionssystem, das die rotverschobene Fluoreszenz des NO aufnimmt, ist vorzugsweise ein Photovervielfacher, aber auch Photodioden können bei ausreichender Empfindlichkeit verwendet werden.

[0021] Das Verfahren erlaubt ein schnelles Aufnehmen der Daten, so dass eine Echtzeit-Aufzeichnung der NO-Konzentration möglich ist. Voraussetzung hierfür ist wiederum die hohe Empfindlichkeit, da die Nachweisgrenze bei mangelnder Empfindlichkeit zwar durch Integration herabgesetzt werden kann, damit aber automatisch die Zeitauflösung schlechter wird.

Patentansprüche

1. Verfahren zur isotopenselektiven Bestimmung von Stickstoffmonoxid-Konzentrationen in Atemluft, menschlichen Ausscheidungen, tierischen Ausscheidungen, oder Ausgasungen von Pflanzen und von Böden durch 1-Photonenlaserinduzierte Fluoreszenz, indem man mittels einer UV-Lichtquelle mit durchstimmbarer Wellenlänge, die Licht einer Wellenlänge erzeugt, welches ^{15}NO elektronisch anregt, dieses Licht auf eine zu untersuchende gasförmige Probe einstrahlt, welche aus Atemluft, menschlichen Ausscheidungen, tierischen Ausscheidungen, oder Ausgasungen von Pflanzen und von Böden stammt, und das vom elektronisch angeregten ^{15}NO emittierte Fluoreszenzlicht mit einem Lichtdetektor nachweist.

2. Verwendung einer Vorrichtung zur isotopenselektiven Bestimmung von Stickstoffmonoxid-Konzentrationen, umfassend eine UV-Lichtquelle mit durchstimmbarer Wellenlänge, die Licht einer Wellenlänge emittiert, welches ^{15}NO elektronisch anregt, und einem Lichtdetektor, der das vom elektronisch angeregten ^{15}NO emittierte Fluoreszenzlicht nachweist, zur Messung von Konzentrationen an ^{15}NO durch 1-Photonen-laserinduzierte Fluoreszenz aus der Atemluft, allgemeiner menschlicher Ausscheidungen, tierischer Ausscheidungen, oder Ausgasungen von Pflanzen und von Böden.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen