

(19)



REPUBLIK  
ÖSTERREICH  
Patentamt

(10) Nummer:

**AT 409 554 B**

(12)

# PATENTCHRIFT

(21) Anmeldenummer: A 1402/99  
(22) Anmeldetag: 16.08.1999  
(42) Beginn der Patentdauer: 15.01.2002  
(45) Ausgabetag: 25.09.2002

(51) Int. Cl.<sup>7</sup>: **G01N 30/22**  
G01N 30/36, 30/64

(56) Entgegenhaltungen:

ACWORTH, IAN N.; BAILEY, BRUCE A.; MAHER, TIMOTHY J. "THE USE OF HPLC WITH ELECTROCHEMICAL DETECTION TO MONITOR REACTIVE OXYGEN AND NITROGEN SPECIES, MARKERS OF OXIDATIVE DAMAGE AND ANTIOXIDANTS: APPLICATION TO THE NEUROSCIENCES" PROG. HPLC-HPCE (1998), 7(NEUROCHEMICAL MARKERS OF DEGENERATIVE NERVOUS DISEASES AND DRUG ADDICTION), 3-56; ISSN 1385-4100.  
BAKER, JOHN O.; TUCKER, MELVIN P.; HIMMEL, MICHAEL E. "NOBLE, DIATOMIC AND ALIPHATIC GAS DETERMINATION BY AQUEOUS HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY" J. CHROMATOGR. (1985), 346, 93-109; ISSN 0021-9673.

(73) Patentinhaber:

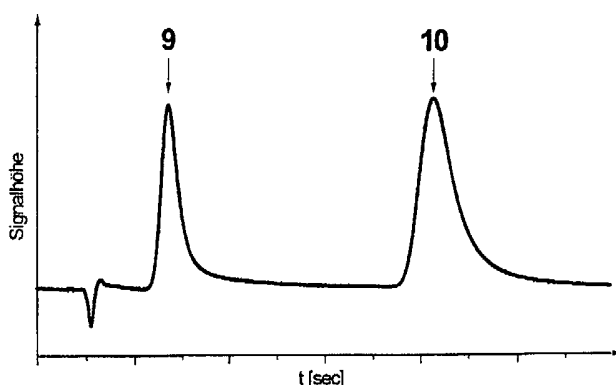
SEPPI THOMAS  
A-6020 INNSBRUCK, TIROL (AT).  
STUBAUER GOTTFRIED  
A-6020 INNSBRUCK, TIROL (AT).  
VÖLP MARKUS  
A-6020 INNSBRUCK, TIROL (AT).

(54) VERFAHREN ZUR GLEICHZEITIGEN CHROMATOGRAPHISCHEN QUANTITATIVEN ANALYSE VON ZWEI ODER MEHREREN GASEN

**AT 409 554 B**

(57) Verfahren zur gleichzeitigen chromatographischen quantitativen Analyse von zwei oder mehreren Gasen, bei dem in einer mobilen flüssigen Phase gelöste Gase einer Flüssigkeitschromatographie-Trennsäule (HPLC) mit anschließendem vorzugsweise elektrochemischen Detektor zugeführt werden. Der mobilen Phase wird zumindest ein Stoff zugegeben, der mit zumindest einem der zu bestimmenden gelösten Gasen eine Reaktion eingeht, sodaß das jeweilige Reaktionsprodukt in der HPLC-Trennsäule gegenüber dem bloßen in der mobilen Phase gelösten Gas eine erhöhte oder verringerte Wanderungsgeschwindigkeit aufweist.

**Fig. 3**



Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur gleichzeitigen chromatographischen quantitativen Analyse von zwei oder mehreren Gasen.

Elektroaktive Gase (mit Ausnahme der chemisch weitgehend inaktiven Inertgase) sind vor allem in der Umweltanalytik, technischen Prozessen, Medizin, ökologischen Stoffkreisläufen, Atmosphärenforschung und biologischen Systemen von entscheidender Bedeutung. Als Beispiele für solche elektroaktive Gase seien genannt: Sauerstoff ( $O_2$ ), Kohlenmonoxid (CO), oder Stickoxide wie Lachgas ( $N_2O$ ), Stickstoffmonoxid (NO), andere gasförmige Stickoxide, usw. Besonders die Entwicklung von präzisen Analysemethoden für Stickoxide ist in den letzten 10 Jahren durch das große wissenschaftliche Interesse an diesem Forschungsgebiet stark vorangetrieben worden: seit kurzem gibt es die Erkenntnis, daß z.B. Stickstoffmonoxid (NO) an zahlreichen biochemischen, physiologischen und pathologischen Prozessen beteiligt ist (z.B. Alzheimer und Parkinson, Bluthochdruck). 1998 wurde deshalb der Nobelpreises für Medizin und Physiologie an Wissenschaftler dieses Forschungsgebietes vergeben. An die Analysentechnik auf diesem Gebiet werden dabei höchste Anforderungen gestellt, da die zelluläre NO-Konzentrationen sehr niedrig ist ( $< 10 \text{ nM}$  -  $5 \text{ } \mu\text{M}$  NO) und die Probenmatrix meist sehr komplex ist (Zellsuspensionen, Blut- und Plasmaproben). Aufgrund der chemischen Reaktivität von NO ist nicht nur die Messung der freien NO-Konzentration von Bedeutung, sondern auch die gleichzeitige Bestimmung von Reaktions- und Abbauprodukten (z.B.  $N_2O$ ,  $NO_2^-$ ). Von besonderem Interesse ist darüberhinaus die gleichzeitige Messung von  $O_2$ , da einerseits NO direkt mit  $O_2$  reagiert und andererseits die zelluläre  $O_2$ -Konzentration durch NO-induzierte Hemmung der Atmungskette stark beeinflusst wird.

Die bis jetzt bekannten Verfahren zur Bestimmung von Gasen basieren auf unterschiedlichsten Meßprinzipien, wobei jeweils eine physikalisch-chemische Eigenschaft (dessen Oxidierbarkeit und Reduzierbarkeit, Paramagnetismus, Reaktivität mit Häm-Proteinen oder Lichtemission bei der Reaktion mit Ozon) zur Detektion genutzt wird. Diese hier angeführten Meßverfahren unterscheiden sich jeweils deutlich hinsichtlich Empfindlichkeit, Selektivität, Zeitverbrauch, Einfachheit und Kosten. Beispiele für solche, dem Stand der Technik entsprechende Verfahren sind:

	(Amperometrie)	ziert werden, wobei der resultierende Strom proportional zur Gaskonzentration ist (z. B. $O_2$ -Elektrode oder NO-Elektrode).
30	- <b>Elektronenspinresonanz</b> (EPR)	Die paramagnetische Eigenschaft von Gasen (z. B. $O_2$ und NO sind Radikale) wird zur Messung genutzt.
	- <b>Gaschromatographie</b> (GC/GC-MS)	Gasgemische können mit Gaschromatographie aufgetrennt und mit unterschiedlichen Detektoren quantifiziert werden
35	- <b>Chemilumineszenz</b>	Die Reaktion von NO mit Ozon führt zur Emission von Licht, dessen Intensität proportional zur NO-Konzentration ist
	- <b>Photometrie</b>	die hohe Affinität bestimmter Gase (z. B. NO, $O_2$ , CO) zu Häm-Proteinen (z. B. Hämoglobin) erlaubt eine photometrische Quantifizierung durch die Auswertung der charakteristischen spektroskopischen Veränderungen.

Gase unterscheiden sich nur geringfügig in ihren chemisch-physikalischen Eigenschaften. Ähnliche Molekulargewichte und Polaritäten, bzw. ein ähnliches Löslichkeits- und Diffusionsverhalten erschweren somit eine erfolgreiche chromatographische Trennung und anschließende Detektion. Aus diesem Grund wurde auch Flüssigkeitschromatographie als Trenn- und Analysenmethode für Gase bisher nicht in Betracht gezogen. Auch unter optimierten Bedingungen mit einer stark apolaren stationären Phase (Trennsäule) sind die Wanderungsgeschwindigkeiten von Gasen, beispielsweise jene von Stickstoffmonoxid 7 und Sauerstoff 8 so ähnlich, daß nur eine teilweise Trennung erreicht wird, weil aufgrund der sich stark überlappenden Signale beide gasförmige Komponenten nicht quantitativ bestimmt werden können.

Überraschenderweise hat sich herausgestellt, daß man mit Flüssigkeitschromatographie auch zwei oder mehrere Gas simultan quantitativ nachweisen kann. Die Erfindung besteht daher in einem Verfahren zur gleichzeitigen chromatographischen quantitativen Analyse von zwei oder mehreren Gasen, bei dem in einer mobilen flüssigen Phase gelöste Gase einer Flüssigkeitschromatographie-Trennsäule (HPLC) mit anschließendem vorzugsweise elektrochemischen Detektor zugeführt werden, wobei das erfindungsgemäße Verfahren dadurch gekennzeichnet ist, daß der

mobilen Phase zumindest ein Stoff zugegeben wird, der mit zumindest einem der zu bestimmenden gelösten Gasen eine Reaktion eingeht, sodaß das jeweilige Reaktionsprodukt in der HPLC-Trennsäule gegenüber dem bloßen in der mobilen Phase gelösten Gas eine erhöhte oder verringerte Wanderungsgeschwindigkeit aufweist.

Die Erfindung betrifft somit ein chromatographisches Analyseverfahren, wobei eine Trennung und eine anschließende hochempfindliche Bestimmung von vorzugsweise elektroaktiven Gasen erzielt wird. Dabei wird eine HPLC-Anlage mit einem Detektor, vorzugsweise einem elektrochemischen Detektor, kombiniert. Die Trennung wird vorteilhaft durch ein Verfahren erzielt, welches die geringen chemischen und physikalischen Unterschiede der Gase ausnützt, insbesondere die Fähigkeit mancher Gase unterschiedlich starke Komplexe mit Übergangsmetallen zu bilden, die der mobilen Phase des chromatographischen Systems zugegeben werden, wobei die Retentionszeit (Wanderungszeit) der Gase im chromatographischen System, das vorzugsweise mit einer apolaren HPLC-Trennsäule ausgestattet ist, variabel gesteuert werden kann.

Durch die Erfindung wird die Trennung als Voraussetzung für die anschließende simultane, empfindliche Detektion von Konzentrationen zweier oder mehrerer verschiedener, vorzugsweise elektroaktiver Gase in der selben Probe beliebiger Zusammensetzung (Flüssigkeiten, Festkörper, Gase und biologische Proben) in einem breiten Konzentrationsbereich ermöglicht, beispielsweise neben Sauerstoff (WO98/23939, wobei die dortige Anlage prinzipiell für das vorliegende Verfahren verwendbar ist) oder in Sauerstoff-freien Proben.

Das erfindungsgemäße Verfahren ermöglicht eine Empfindlichkeit und Meßgenauigkeit der Analyse, die je nach Gas im Vergleich zu den derzeit am Markt befindlichen Meßgeräten analog oder sogar besser ist. Zusätzlich zeichnet sich das Verfahren durch einige entscheidende Vorteile aus:

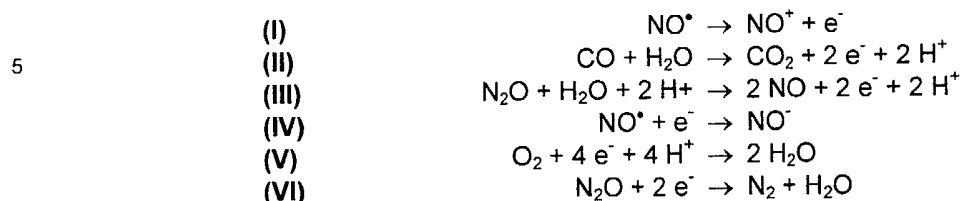
- neben einem Gas wie z.B. NO kann gleichzeitig ein zweites oder mehrere Gase wie z.B. N<sub>2</sub>O und/oder O<sub>2</sub> bestimmt werden. Gleichzeitig bedeutet: im selben Analysenschritt der selben Probennahme.
- eine hohe Selektivität (Unempfindlichkeit gegenüber Störkomponenten, die die Meßsignale beeinträchtigen können) wird durch die Kombination aus HPLC und der sehr selektiven elektrochemischen, vorzugsweise reduktiven Detektion auch in komplexen Proben erreicht.
- weitgehende Unempfindlichkeit gegenüber Temperaturschwankungen
- die Gase können sowohl in gasförmigen, als auch in flüssigen und festen Proben bestimmt werden.

Grundsätzlich basieren alle chromatographischen Trennungen auf einer unterschiedlichen Verteilung der zu bestimmenden Komponenten einer Probe zwischen einer mobilen Phase und einer stationären Phase (Trennsäule). Ist die mobile Phase eine Flüssigkeit (z. B. wässrige Lösung oder ein Gemisch aus wässrigen Lösungen und organischen Lösungsmittel), spricht man von Flüssigkeitschromatographie (LC, liquid chromatography, oder HPLC, high performance liquid chromatography). Der Aufbau eines üblicherweise verwendeten chromatographischen Meßsystems ist in Fig. 1 schematisch dargestellt. Die mobile Phase befindet sich in einem Reservoir 2, das zu Beginn mit Inertgas 1 gespült wird. Durch eine Pumpe 3 wird ein konstanter Fluß der mobilen Phase erzeugt. Über ein Injektionsventil 4 wird die Probe, welche die zu bestimmenden Komponenten enthält, in den chromatographischen Fluß eingebracht und durch die Trennsäule 5 zur Detektionseinheit 6 transportiert.

Unterschiede in den chemisch-physikalischen Eigenschaften der Probenkomponenten bedingen eine unterschiedlich starke Wechselwirkung mit der unbewegten stationären Phase, was eine unterschiedliche Wanderungsgeschwindigkeit und eine Auftrennung der Probenkomponenten bewirken kann. Ziel ist es, die zu bestimmenden Probenkomponenten vollständig in diskrete Banden (Peaks) aufzutrennen (Grundlinientrennung). Die Probenkomponenten werden anschließend an die Trennung an der Detektionseinheit sowohl qualitativ (aufgrund der spezifischen Wanderungszeit durch die Trennsäule) als auch quantitativ (über die Signalhöhe) bestimmt.

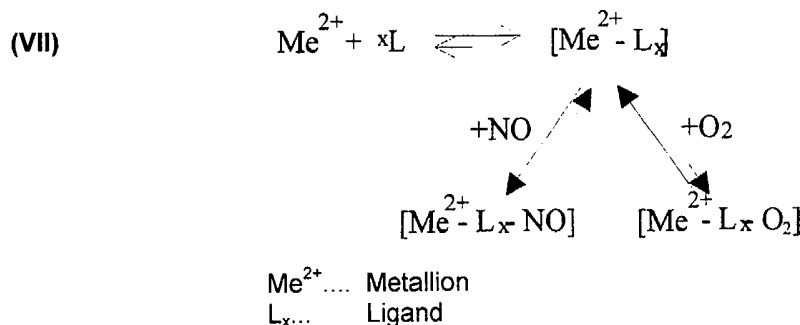
Die Detektion der Probenkomponenten in der Detektionseinheit kann auf verschiedenen Meßprinzipien beruhen, wobei die elektrochemische Detektion (EC) sich durch eine besonders hohe Sensitivität und Selektivität auszeichnet. Dieses Detektionsprinzip eignet sich besonders zur Detektion von Gasen, da einige reduzierbar und/oder oxidierbar sind. Zwischen zwei Elektroden wird ein Potential angelegt, sodaß passierende elektroaktive Komponenten entweder oxidiert (z.B. I -III)

oder reduziert (z.B. IV -VI) werden. Der resultierende Strom wird aufgezeichnet; er ist proportional zur Konzentration der Probenkomponente und dient damit zur Quantifizierung.



Bei Gasen, die aufgrund der erwähnten Ähnlichkeiten nur schwer trennbar sind, kann man bevorzugt vorsehen, daß der mobilen Phase zumindest ein Stoff zugegeben wird, der mit zumindest einem der zu bestimmenden gelösten Gasen selektiv eine Reaktion eingeht, sodaß das Reaktionsprodukt in der HPLC-Trennsäule gegenüber dem bloßen in der mobilen Phase gelösten Gas eine erhöhte oder verringerte Wanderungsgeschwindigkeit aufweist. Besonders kann man die unterschiedliche Affinität von Gasen zu Metallionen zur Trennung nutzen, um sie in einem Analyseschritt simultan quantitativ bestimmen zu können. Durch die Zugabe von Metallionen oder anderen Komplexbildnern zur mobilen Phase bilden in den chromatographischen Fluß injizierte Gase unterschiedlich starke Komplexe aus. Diese Komplexbildung ändert deutlich die chemisch-physikalischen Eigenschaften der Gase, was stärker ausgeprägte Unterschiede in der Verteilung der Gase zwischen der stationären (Trennsäule) und mobilen Phase zur Folge hat, wodurch eine deutlich verbesserte Auftrennung und Detektion der gasförmigen Komponenten einer Probe zur Folge hat.

Das Prinzip dieses erfinderischen Verfahrens wird anhand eines Beispiels, der Trennung und anschließenden simultanen Detektion der Gase NO und O<sub>2</sub>, näher erläutert. NO bildet mit verschiedenen Übergangsmetallen, beispielsweise zweiwertigen Eisenionen (Fe<sup>2+</sup>) und vor allem bei Anwesenheit von weiteren Komplexligenanden, beispielsweise Citrat, relativ starke ternäre Komplexe aus (VII):



Die Fähigkeit von O<sub>2</sub>, ähnliche Komplexe auszubilden, ist hingegen deutlich reduziert. Durch Zugabe von Fe<sup>2+</sup> Ionen und Citrat zur mobilen Phase wandert NO 9 aufgrund der Komplexbildung deutlich schneller durch die Trennsäule, während die Wanderungszeit von O<sub>2</sub> 10 unverändert bleibt (Fig. 3). Die Erklärung für die erhöhte Wanderungsgeschwindigkeit von NO bei Komplexbildung ist eine deutlich verringerte Interaktion des polaren Gas-Komplexes mit der apolaren stationären Phase (Trennsäule) im Vergleich zu freiem, unkomplexiertem NO. Das komplexierte NO-Gas wird folglich schneller im chromatographischen Fluß durch die Trennsäule transportiert, wodurch eine Trennung von anderen gasförmigen Komponenten, wie in diesem Fall O<sub>2</sub>, erzielt wird.

Durch gezielte Variation der Komplexstärke, die durch verschiedene Parameter eingestellt werden kann (Art und Konzentration des Metallions und/oder des Komplexligenanden, pH-Wert), wird allgemein die Wanderungsgeschwindigkeit von Gasen in einer HPLC-Trennsäule präzise steuerbar (Fig. 4). Durch dieses Verfahren wird somit nicht nur die Trennung von Matrixbestandteilen und Gasen, sondern erfindungsgemäß auch die Auftrennung von verschiedenen Gasen einer Probe in einem HPLC-System in diskrete, quantifizierbare Banden erzielt.

**PATENTANSPRÜCHE:**

1. Verfahren zur gleichzeitigen chromatographischen quantitativen Analyse von zwei oder mehreren Gasen, bei dem in einer mobilen flüssigen Phase gelöste Gase einer Flüssigkeitschromatographie-Trennsäule (HPLC) mit anschließendem vorzugsweise elektrochemischen Detektor zugeführt werden, dadurch gekennzeichnet, daß der mobilen Phase zu-  
 5 mindest ein Stoff zugegeben wird, der mit zumindest einem der zu bestimmenden gelösten Gasen eine Reaktion eingeht, sodaß das jeweilige Reaktionsprodukt in der HPLC-Trennsäule gegenüber dem bloßen in der mobilen Phase gelösten Gas eine erhöhte oder verringerte Wanderungsgeschwindigkeit aufweist.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der mobilen Phase Komplexbildner zugegeben werden.
3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß der beispielsweise einen Citratpuffer aufweisenden mobilen Phase selektive Komplexbildner, vorzugsweise Metallionen  
 15 zugegeben werden.
4. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß zweiwertige Eisenionen ( $\text{Fe}^{2+}$ ), insbesondere zur gleichzeitigen Analyse von NO und  $\text{O}_2$  der mobilen Phase zugegeben werden.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß eines der analysierten Gase Sauerstoff  $\text{O}_2$  ist.  
 20

**HIEZU 3 BLATT ZEICHNUNGEN**

25

30

35

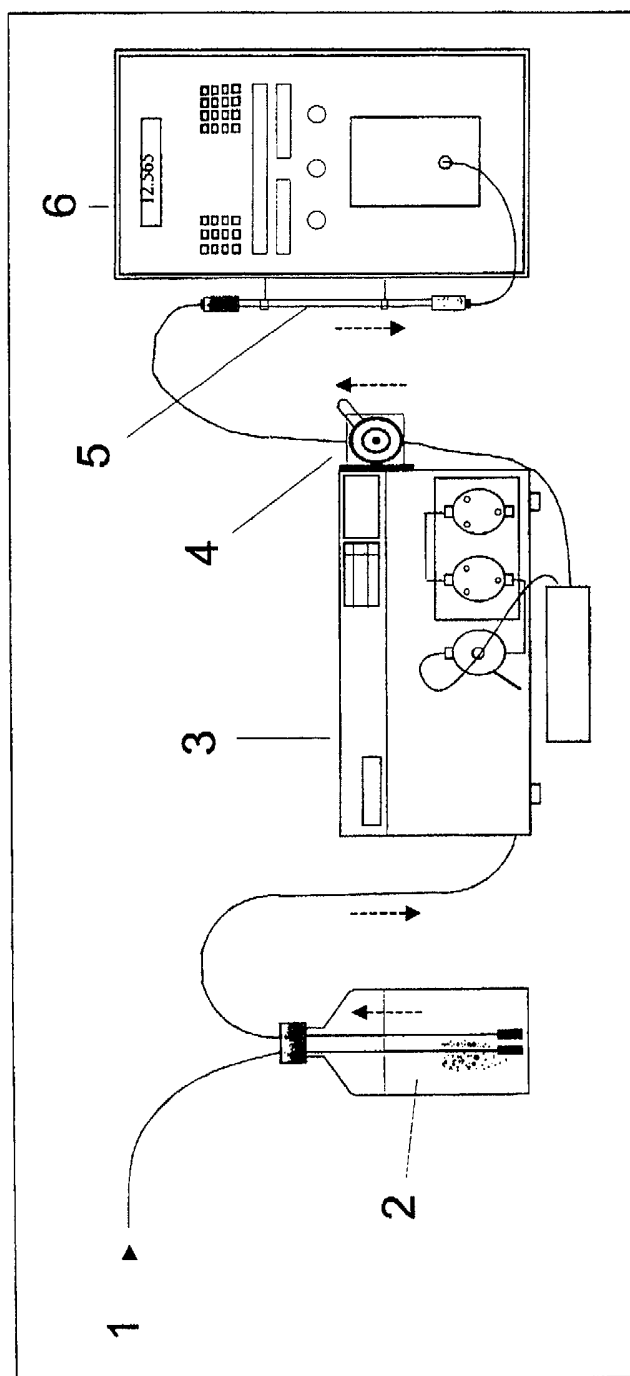
40

45

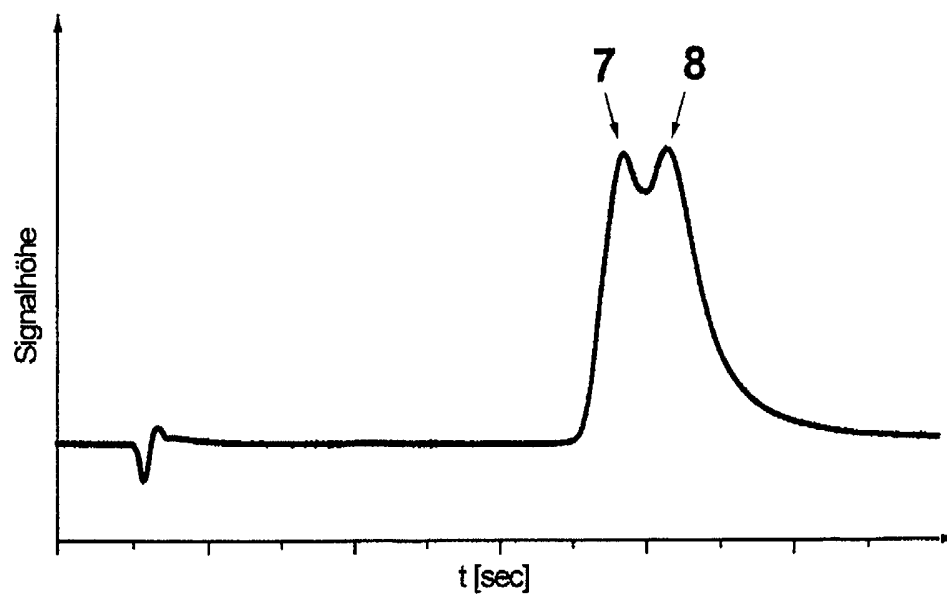
50

55

Fig. 1



**Fig. 2**



**Fig. 3**

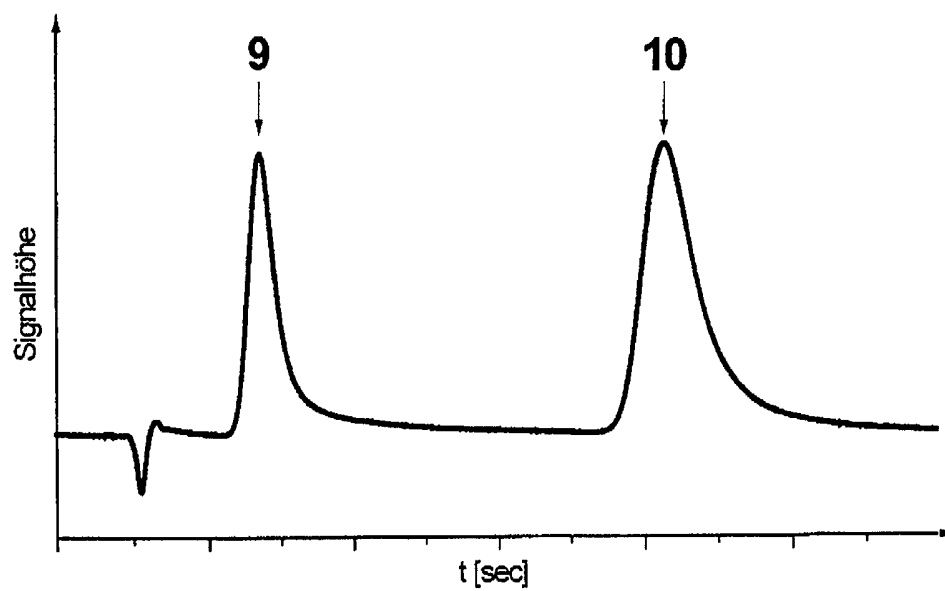


Fig. 4

