

**Entwicklung neuer Nachsäulenreaktionssysteme
zur UV/VIS-Detektion von Hydroperoxiden
in der HPLC**

Vom Fachbereich Chemie der Bergischen Universität-Gesamthochschule Wuppertal
zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften

- Dr. rer. nat. -

genehmigte

Dissertation

von

Axel Boddenberg

aus Wermelskirchen

Wuppertal 1998

Die vorliegende Arbeit entstand auf Anregung und unter Betreuung von

Herrn Prof. Dr. Siegmur Gäb

an der Bergischen Universität-Gesamthochschule Wuppertal im Fachbereich Chemie,
Arbeitsgruppe Analytische Chemie

in der Zeit von Juli 1994 bis August 1998

Danksagung

Für die interessante Themenstellung, die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe sowie die stetige Diskussionsbereitschaft danke ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. S. Gäb.

Für die Übernahme des Korreferats möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. K. H. Becker recht herzlich bedanken.

Herrn J. Luderich und den Mitarbeitern der Glasbläserei danke ich für die Anfertigung zahlreicher Glasgeräte, insbesondere für die unermüdliche Herstellung von Sammelwendeln.

Herrn Axel Brakelmann und Herrn Heiko Wieck sowie den weiteren Mitarbeitern der Feinmechanischen Werkstatt danke ich für die Hilfe bei der Umsetzung zahlreicher technischen Ideen.

Frau Ilka Möller danke ich für die Aufnahme der NMR-Spektren.

Herrn Volker Fahrney danke ich für die kompetente Unterstützung bei elektronischen Fragen.

Herrn Dr. Walter V. Turner sowie Herrn Dipl.-Chem. Christoph Waller danke ich für die stete Diskussionsbereitschaft, sowie für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Otto Schrems, den Mitarbeitern am Alfred-Wegener-Institut für Polar- und Meeresforschung, insbesondere Herrn Dr. Rolf Weller sowie der Besatzung des Forschungsschiffes „Polarstern“ danke ich für die Ermöglichung der interessanten und ergebnisreichen Polarsternexpedition ANT XIV/1.

Für die finanzielle Unterstützung meiner Arbeiten danke ich der DFG, dem BMBF, dem AWI und der DBU.

Ein besonderer Dank gilt allen meinen Kolleginnen und Kollegen, die durch das gute Arbeitsklima in der Analytischen Chemie dafür sorgten, daß die Zeit nicht nur durch viel Arbeit sondern auch viel Freude geprägt wurde.

Christiane,

Isabella

und

meinen Eltern

I. Abstract

New HPLC methods were developed for the determination of hydroperoxides. The selectivity and sensitivity of these methods are based substantially upon the use of non-enzymatic reaction systems for post-column derivatisation.

Numerous preliminary experiments were carried out to determine the suitability for HPLC-post-column-derivatisation systems of various reactions that lead to chemiluminescence or to substances that can be detected fluorimetrically or photometrically. There was no improvement in fluorescence detection when, in the well-known post-column reaction of hydroperoxides and p-hydroxyphenyl acetic acid (PES), the catalyst horseradish peroxidase (HRP) was replaced by metal salts or metal-salt complexes (e.g. Fe(III) triethylene tetramine). Promising results were, however, obtained in the hematin/luminol chemiluminescence and Fe(II)/N,N-dialkyl-p-phenylene diamine UV/VIS systems.

Extensive work was necessary to optimise these detection systems for sensitive HPLC analysis of atmospherically relevant hydroperoxides such as H₂O₂ and hydroxymethyl (HMHP), methyl (MHP) and ethyl hydroperoxides (EHP). The sensitivity of the chemiluminescence system for H₂O₂ turned out to be greatly different from that for organic hydroperoxides, so that the usefulness of this system for simultaneous analyses was quite limited.

With UV/VIS HPLC systems based on the Fe(II)-catalysed oxidation of N,N-dimethyl (DMPD) or N,N-diethyl-p-phenylene diamine (DEPD), detection limits of 0.04 µmol/l for H₂O₂ and 0,2 µmol/l for HMHP, MHP and EHP could be achieved. These correspond to those of the frequently used HRP/PES-fluorescence HPLC and suffice for the determination of atmospheric hydroperoxides that have been transferred into the liquid phase (e.g. by cryosampling). The coefficients of variation of this procedure, significantly under 10 %, meet the requirements of a trace-analysis procedure.

To determine the scope of the new DMPD and DEPD UV/VIS HPLC systems, n-alkyl, secondary and tertiary alkyl, arylalkyl and alkoxyalkyl hydroperoxides were examined. The high efficiency of the new systems was displayed when their performance characteristics were compared with those of the FOX (ferrous oxidation in xylenol orange) UV/VIS, the HRP/PES and the micropoxidase-11 (MP-11)/PES fluorescence HPLCs. The HRP/PES HPLC gives approximately the same detection limits of 0.2 to 0.7 µmol/l (C₄ - C₁₄) for the n-alkyl hydroperoxides, but the steric limitations of the enzyme lead to clear disadvantages for secondary and tertiary hydroperoxides with this system: while 2-propyl, 2-butyl and 3-pentyl hydroperoxides can still be determined in the µmolar range, tert-butyl, cyclo-hexenyl, tetralin and cumene hydroperoxides can not be detected at all. Although the replacement of HRP by MP-11 removes the steric limitations, the detection limits of this latter fluorescence system are two orders of magnitude above those of the DMPD and DEPD UV/VIS HPLC systems. Comparable results were obtained for the alkoxyalkyl hydroperoxides examined. The new systems are superior to the fluorescence HPLC system in that they allow the determination of peroxides as well as hydroperoxides. Thus a detection limit of 0.25 µmol/l was obtained for benzoyl peroxide.

The DMPD UV/VIS HPLC was also subjected to practical comparison with the analytical systems of other research groups. In an intercalibration undertaken before the field campaign BERLIOZ (Berlin ozone experiment), there was considerable agreement among the groups with both a test gas and outside air. The suitability of the new HPLC method for field studies was further proven in the course of the Polarstern expedition ANT XIV/1. Since cryosampling, frequently used for hydroperoxide analysis, gives insufficient time resolution, an automatic peroxide analyser on the basis of on-line coupling of a stripping coil with the HPLC was designed and constructed. Further applications of the new UV/VIS methods were pointed up by the determination of the peroxide content both in solvents (i. a. diethyl ether, tetrahydrofuran) and in a skin salve.

II Abkürzungsverzeichnis

BG	Bestimmungsgrenze
BHMP	Bis(hydroxymethyl)peroxid
BHT	2,6-Di-tert-butyl-4-methylphenol
BuOMHP	Butoxymethylhydroperoxid
cd	capto dativ
DEPD	N,N-Diethyl-p-phenylendiamin
DMPD	N,N-Dimethyl-p-phenylendiamin
EG	Erfassungsgrenze
EHP	Ethylhydroperoxid
EOEHP	1-Ethoxyethylhydroperoxid
EOMHP	Ethoxymethylhydroperoxid
FE	Flächeneinheiten
FIA	Fließinjektionsanalyse
FOX	ferrous oxidation in xylenol orange
HEHP	Hydroxyethylhydroperoxid
HM-(t-BuO)MP	Hydroxymethyl-tert-butoxymethylperoxid
HMHP	Hydroxymethylhydroperoxid
HP	Hydroperoxid
HPHP	1-Hydroxypropylhydroperoxid
HPLC	High-Performance-Liquid-Chromatographie
HRP	Meerrettichperoxidase
HVA	Homovanillinsäure
MeOH	Methanol
MHP	Methylhydroperoxid
MOMHP	Methoxymethylhydroperoxid
MP	Mikroperoxidase
NSD	Nachsäulenderivatisierung
NWG	Nachweisgrenze
PES	p-Hydroxyphenyllessigsäure
PrOMHP	Propoxymethylhydroperoxid
QDI	Chinondiimin
SQDI	Semichinondiimin
TCPO	2,4,6-Trichlorphenyloxalat
TDLAS	tunable diode laser absorption spectroscopy
THF-HP	2-Hydroperoxytetrahydrofuran
TMPD	N,N,N',N'-Tetramethyl-p-phenylendiamin
VSA	Verfahrensstandardabweichung
VVK	Verfahrensvariationskoeffizient
WEDD	Wet Effusion Denuder

Inhaltsverzeichnis

I Abstract

II Abkürzungsverzeichnis

1	Einleitung und Aufgabenstellung	1
1.1	Einleitung	1
1.2	Aufgabenstellung	3
2	Allgemeiner Teil	4
2.1	Vorkommen von Hydroperoxiden	4
2.1.1	Hydroperoxide in Lösungsmitteln	4
2.1.2	Hydroperoxide in der Atmosphäre	4
2.1.2.1	Photochemische Quellen	5
2.1.2.2	Hydroperoxide aus der Ozonreaktion	7
2.1.2.3	Hydroperoxide aus der Verbrennung von Biomasse	10
2.1.2.4	Senken atmosphärischer Hydroperoxide	12
2.2	Schadwirkung von Hydroperoxiden	13
2.2.1	Schädigung des menschlichen Organismus	13
2.2.2	Schädigung von Pflanzen	13
2.3	Bestimmung von Hydroperoxiden	15
2.3.1	Probenahme von Hydroperoxiden in Luft	15
2.3.2	Bestimmungsmethoden	17
2.3.2.1	Fluoreszenz- und Chemilumineszenzmethoden	17
2.3.2.2	Gaschromatographische Methoden	22
3	Ergebnisse und Diskussion	23
3.1	Synthese der untersuchten Hydroperoxide	23
3.1.1	Alkylhydroperoxide	23
3.1.2	HMHP-Lösungen	24

3.1.3	Alkoxyethylhydroperoxide	25
3.1.3.1	1-Ethoxyethylhydroperoxid und 2-Hydroperoxytetrahydrofuran	29
3.1.4	Tetralin-, 1-Phenylethylhydroperoxid und 2-Hydroperoxytetrahydrofuran	29
3.2	HPLC-Methodenentwicklung	32
3.2.1	Voruntersuchungen	33
3.2.1.1	Fluoreszenzdetektion der Hydroperoxide über die Oxidation von p-Hydroxyphenylelessigsäure und Homovanillinsäure	34
3.2.1.2	Fluoreszenzdetektion der Hydroperoxide über die Oxidation von Benzoesäure	39
3.2.1.3	Fluoreszenzdetektion der Hydroperoxide über die Oxidation von 2-Hydroxynaphthaldehyd-thiosemicarbazon	41
3.2.1.4	UV/VIS-Detektion über den Eisen(III)-Xylenorange-Komplex	42
3.2.1.5	UV/VIS-Detektion von Hydroperoxiden über die Eisen(II)-katalysierte Oxidation von substituierten Phenylendiaminen	44
3.2.1.6	Chemilumineszenzdetektion über die Luminol/Hematin-Reaktion	48
3.2.1.7	Beurteilung der Vorversuche	51
3.2.2	Optimierung der ausgewählten HPLC-Methoden	54
3.2.2.1	UV/VIS-HPLC-Detektion mit N,N- disubstituierten p-Phenylendiaminen	54
3.2.2.2	Luminol/Hematin-Chemilumineszenz-HPLC	64
3.2.3	Messung von Standardlösungen mit den verschiedenen HPLC-Systemen	68
3.2.3.1	Atmosphärisch relevante Hydroperoxide	69
3.2.3.2	Beurteilung der Leistungsfähigkeit der eingesetzten HPLC-Systeme	76
3.2.3.3	n-Alkylhydroperoxide (C ₅ - C ₁₈)	78
3.2.3.4	Verzweigte Alkyl- und Arylalkylhydroperoxide	82
3.2.3.5	Alkoxyalkylhydroperoxide	85
3.2.3.6	Benzoylperoxid	89
3.2.4	Untersuchung der Querempfindlichkeit des neuen DMPD-UV/VIS-HPLC-Systems	90
3.2.5	Herstellung von Hydroperoxid-Prüfgasen	92
3.2.6	Aufbau eines automatisierten HPLC-Systems zur quasi-kontinuierlichen Messung atmosphärischer Hydroperoxide	95
3.3	Interkalibrierung und Anwendung der neuen Verfahren	99
3.3.1	Interkalibrierung von Hydroperoxid-Meßverfahren	100
3.3.2	Die Polarsternexpedition ANT XIV/1 1996	107
3.3.2.1	Messung von Luftproben	109
3.3.2.2	Messung von Regenproben	114

3.3.3	Abgasmessungen	117
3.3.4	Abgasstaub des Wuppertaler Kiesberg-Tunnels	119
3.3.5	Bestimmung des Hydroperoxidgehaltes von Lösungsmitteln	121
3.3.6	Bestimmung des Benzoylperoxidgehaltes einer Hautreinigungssalbe	122
4	Experimenteller Teil	124
4.1	Chemikalien	124
4.2	Verwendete Geräte und Methoden	126
4.3	Aufbau der HPLC-Systeme	127
4.4	Prüfgaserzeugung	133
4.5	Kryosampling	134
4.6	Schiffsregenmesser	135
4.7	Berechnung der atmosphärischen H₂O₂-Konzentrationen	135
4.8	Berechnung der statistischen Kenngrößen	136
4.9	Darstellung der Hydroperoxide	137
4.9.1	Vorsichtsmaßnahmen	137
4.9.2	Alkylhydroperoxide	137
4.9.3	Hydroxymethylhydroperoxid (HMHP)	138
4.9.4	Alkoxyethylhydroperoxide	138
4.9.5	1-Ethoxyethylhydroperoxid	140
4.9.6	2-Hydroperoxytetrahydrofuran	140
4.9.7	Tetralinhydroperoxid	141
4.9.8	1-Phenylethylhydroperoxid	142
4.10	Synthese von Reagenzien und Stammlösungen zur HPLC-Nachsäulenreaktion	142
4.10.1	p-Chlorbenzoldiazoniumfluoroborat	142
4.10.2	2-Hydroxy-1-naphthaldehydthiosemicarbazon	143
4.10.3	Ansetzen der Chemilumineszenz-Reagenzienlösung	143

5	Zusammenfassung	144
6	Anhang	146
6.1	Abbildungsverzeichnis	172
6.1.1	Abbildungsverzeichnis Anhang	174
6.2	Tabellenverzeichnis	176
6.3	Reaktionsschemata	177
7	Literaturverzeichnis	179

1 Einleitung und Aufgabenstellung

1.1 Einleitung

Durch die Emission von biogenen Kohlenwasserstoffen, Lösungsmitteln, Chemikalien und Verbrennungsprodukten aus Industrie und Verkehr gelangen zahlreiche organische Verbindungen in die Atmosphäre, wo sie durch komplexe luftchemische Reaktionen umgesetzt werden. Bei diesen Reaktionen können zahlreiche reaktive und stabile Spurenstoffe (z. B. OH, RO, H₂O₂, ROOH Carbonylverbindungen, Stickoxide) entstehen. Aufgrund ihrer großen Bedeutung für die Luftchemie sind die Hydroperoxide (H₂O₂ und ROOH) in den letzten Jahren verstärkt in den Blickpunkt des wissenschaftlichen Interesses gerückt (Gunz und Hoffmann, 1990). Die bei photochemischen Modellrechnungen angenommene Existenz der Hydroperoxide sowohl in der belasteten als auch in der unbelasteten Atmosphäre (Logan et al., 1981; Rohde et al., 1981; Schiavone und Gradel, 1981; Thompson und Cicerone, 1982; Calvert und Stockwell, 1983; Hov, 1983; Kleinman, 1986; Jungfeng et al., 1987) konnte durch Untersuchungen von Umgebungsluft in unterschiedlichen geographischen Gebieten belegt werden (z. B. Hellpointner und Gäb, 1989; Heikes, 1992; Fels und Junkermann, 1994; de Serves, 1994; Slemr und Tremmel, 1994; Lee et al., 1995; Watanabe et al., 1995; Jackson und Hewitt, 1996; Staffelbach et al., 1996; Sauer et al., 1997). In einigen dieser Untersuchungen ließen sich neben Wasserstoffperoxid (H₂O₂) auch verschiedene organische Hydroperoxide (ROOH) nachweisen (z. B. Hellpointner und Gäb, 1989; Staffelbach et al., 1996).

In zahlreichen Arbeiten der vergangenen Jahre wurden nicht nur Bildung und Vorkommen der Hydroperoxide, sondern auch ihre Bedeutung für umweltchemische Prozesse und ihre Wirkung auf die Biosphäre untersucht. Die wichtigsten Quellen der atmosphärischen Hydroperoxide sind demnach die OH-Radikal-induzierte Oxidation von Kohlenwasserstoffen und Kohlenmonoxid (Gunz und Hoffmann, 1990; Sakugawa et al., 1990) sowie die Reaktion von Ozon mit ungesättigten Kohlenwasserstoffen (z. B. Ethen, Isopren und Terpenen) (Gäb et al., 1985; Becker et al., 1990; Hewitt und Kok, 1991). Während bis 1990 keine Erkenntnisse über die direkte Emission von Hydroperoxiden vorlagen (Sakugawa et al., 1990), zeigen neuere Untersuchungen,

daß Wasserstoffperoxid und Methylhydroperoxid bei der Biomassenverbrennung entstehen und als „direkte“ Emittenten auftreten können (Lee et al., 1997, 1998).

Die aus Verbrennungsprozessen oder photochemisch gebildeten Hydroperoxide sind an zahlreichen Oxidationen und Umwandlungen von Spurenstoffen in der Atmosphäre beteiligt. In der kondensierten Phase (Wolken, Regen und Nebel) wirkt Wasserstoffperoxid bei $\text{pH} < 5$ als effektivstes Oxidationsmittel für die Reaktion von SO_2 zu H_2SO_4 und leistet somit einen erheblichen Beitrag zum „sauren Regen“, der als eine der möglichen Ursachen für das „Waldsterben“ angesehen wird (z. B. Penkett et al., 1979; Dasgupta, 1980; Möller, 1980; Sakugawa et al., 1990). Neben der indirekten Pflanzenschädigung über die Schwefel(IV)-Oxidation gibt es Untersuchungen, die auf eine direkte Schädigung von Pflanzen durch Hydroperoxide hinweisen (Masuch et al., 1985, 1986, 1989; Stärk und Stauff, 1986a; Gaeffney et al., 1987; Möller, 1989; Kettrup et al., 1991). Die bisher nur wenigen Untersuchungen über die Wirkung von Hydroperoxiden auf den menschlichen Organismus haben gezeigt, daß Hydroperoxide durchaus auch Körper und Gesundheit schädigen können (Sobels, 1956; Fischer, 1989; Stenton et al., 1989; Bundesarbeitsblatt, 1992).

Die oben genannten Prozesse zur Bildung von Hydroperoxiden, aber auch deren Wirkung auf die Umwelt werden unter Berücksichtigung eines erwarteten Anstiegs der atmosphärischen Hydroperoxidkonzentrationen zunehmend interessanter. Unter Berücksichtigung des derzeitigen Anstiegs von Spurenstoffen wie z. B. CH_4 , CO , und NO und den damit einhergehenden Änderungen der atmosphärischen OH -, HO_2 - und O_3 -Konzentrationen wird anhand von Modellrechnungen eine Verdoppelung des troposphärischen H_2O_2 im Zeitraum von 1980 bis 2030 erwartet (Thompson et al., 1989).

Zur Verifizierung und Angleichung solcher Modellrechnungen sind umfangreiche und verlässliche Daten erforderlich, die nur mit gesicherten Meßmethoden gewonnen werden können. Derzeit wird zur Bestimmung von Hydroperoxiden in Luft überwiegend ein von Lazrus et al., 1986 entwickeltes Zweikanal-Fließinjektions-Verfahren eingesetzt, mit welchem sich H_2O_2 und die Summe organischer Hydroperoxide bestimmen lassen. Für weitergehende Untersuchungen, die neben der Konzentrationsbestimmung auch die Speziation der Hydroperoxide erfordern, wird häufig ein von Hellpointner und Gäb (1989) beschriebenes HPLC-System mit Nachsäulen-

derivatisierung verwendet. Nachteil beider Systeme, die zum Nachweis die enzymkatalysierte Reaktion der Hydroperoxide mit p-Hydroxyphenylessigsäure (PES) ausnutzen, ist die unzureichende Empfindlichkeit gegenüber sterisch anspruchsvolleren Hydroperoxiden (z. B. tert-Butylhydroperoxid).

1.2 Aufgabenstellung

Im Rahmen dieser Arbeit sollte ein HPLC-Nachsäulenreaktionssystem entwickelt werden, welches u. a. die Analyse atmosphärenchemisch relevanter Hydroperoxide wie z. B. Wasserstoffperoxid (H_2O_2), Hydroxymethylhydroperoxid (HMHP), Methylhydroperoxid (MHP) und Ethylhydroperoxid (EHP) ermöglicht. Neben Modifikationen, die in den Systemen von Lazrus bzw. Hellpointner und Gäb eingesetzten enzymatischen Reaktion, sollten auch mögliche nichtenzymatische Reaktionssysteme erarbeitet werden. Um nicht nur gleichwertige, sondern auch leistungsfähigere HPLC-Verfahren zu entwickeln, sollten diese, im Gegensatz zu den bisherigen Verfahren, in der Lage sein, auch sterisch anspruchsvolle Hydroperoxide (z. B. tert-Butylhydroperoxid) mit ausreichender Empfindlichkeit zu bestimmen. Die Leistungsfähigkeit dieser Systeme sollte anhand wichtiger chromatographischer Kenngrößen (z. B. Nachweis- und Bestimmungsgrenze) beurteilt werden. Zur Erprobung der neuen HPLC-Methoden sollten vergleichende Messungen durchgeführt werden. Dafür wurde neben Prüfgasuntersuchungen auch die Untersuchung atmosphärischer Proben im Rahmen einer Polarsternexpedition geplant. Die mit dem Kryosampling gewonnenen Erfahrungen während dieser Meßkampagne bildeten die Grundlagen für den automatisierten Betrieb eines Luftprobensammlers in Verbindung mit der HPLC.

2 Allgemeiner Teil

2.1 Vorkommen von Hydroperoxiden

2.1.1 Hydroperoxide in Lösungsmitteln

Bereits seit Beginn des vorigen Jahrhunderts ist bekannt, daß sich durch Oxidationsprozesse in bestimmten Lösungsmitteln, insbesondere Ethern (z. B. Diethylether, Tetrahydrofuran), sehr leicht Hydroperoxide bilden, deren destillative Anreicherung und unsachgemäße Behandlung zu schweren Unfällen führen kann (Schär, 1887; Cleve, 1891; Neander, 1902). Die Bildung dieser Hydroperoxide erfolgt über einen Radikalmechanismus. Um das in der Regel unerwünschte Vorkommen von Hydroperoxiden und weiteren Oxidationsprodukten (z. B. Aldehyde, Ketone, Säuren) zu verhindern, werden die Lösungsmittel entweder unter besonderen Vorsichtsmaßnahmen wie z. B. Aufgabe von Schutzgas gelagert, oder mit Radikalfängern, z. B. 2,6-Di-tert-butyl-4-methylphenol (BHT), stabilisiert.

2.1.2 Hydroperoxide in der Atmosphäre

Obwohl Wasserstoffperoxid und organische Hydroperoxide seit langer Zeit im Interesse der Wissenschaft stehen, wurden bis auf wenige Ausnahmen (Weinstein-Lloyd, 1996; Lee et al., 1997, 1998) bisher keine nennenswerten biogenen oder anthropogenen Emissionen dieser Verbindungen beobachtet (Sakugawa et al., 1990). Auch unter Berücksichtigung dieser neuen, noch wenig untersuchten Erkenntnisse kann das ubiquitäre Vorhandensein der Hydroperoxide in der Atmosphäre nahezu ausschließlich auf photochemische Prozesse zurückgeführt werden (Hewitt und Kok, 1991). Bei Simulationsexperimenten in Smogkammern ließen sich die Prozesse, die zur Bildung von Hydroperoxiden führen, weitgehend aufklären. Während der wichtigste Vertreter der Hydroperoxide, das Wasserstoffperoxid, überwiegend durch Selbstreaktion von Hydroperoxyradikalen entsteht, werden organische Hydroperoxide sowohl bei dem OH-induzierten Abbau von Kohlenwasserstoffen, als auch bei der Gasphasenozonolyse ungesättigter Verbindungen gebildet (Hanst und Gay, 1983;

Hellpointner und Gäb, 1989; Becker et al., 1990, 1991; Sakugawa et al., 1990; Penkett et al., 1995). Umfangreiche Computersimulationen sowie die bei Feldmessungen erhaltenen Ergebnisse zeigen, daß die Bildung von Wasserstoffperoxid durch Spurenstoffe wie O₃, NO_x, VOC und CO sowie meteorologische Parameter (z. B. Strahlung, Temperatur und Luftfeuchtigkeit) beeinflusst wird (Sakugawa et al., 1990; Penkett et al., 1995). Da die Hydroperoxide sowohl eine Senke als auch ein Reservoir für Radikale wie z. B. OH, HO₂ und RO₂ darstellen, kann ihre Konzentration als Indikator für die Oxidationskapazität der Atmosphäre betrachtet werden (Logan et al., 1981; Heikes, 1991; Kleinman, 1991; Jacob 1995).

2.1.2.1 Photochemische Quellen

Das wohl wichtigste Teilchen im Selbstreinigungsprozeß der Troposphäre ist das Hydroxyl-Radikal. Voraussetzung für seine Bildung ist die Photolyse von Ozon bei Wellenlängen < 310 nm, wobei O(¹D) entsteht [1]. Stoßprozesse mit unreaktiven Molekülen (z. B. N₂), mindern die Konzentration an O(¹D) stark [2], dennoch ergeben sich durch Reaktion mit Wasser ausreichende Mengen an OH-Radikalen [3].



Bei der Reaktion von Hydroxyl-Radikalen mit Kohlenmonoxid entstehen Wasserstoff-Atome [4], die mit molekularem Sauerstoff und einem Stoßpartner Hydroperoxyl-Radikale bilden [5].



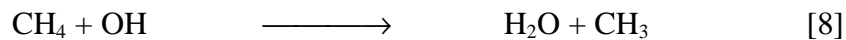
Durch die Reaktion von zwei Hydroperoxylradikalen bildet sich schließlich Wasserstoffperoxid [6], welches im komplexen HO_x-Kreislauf sowohl eine Senke als auch eine Quelle für OH- bzw. HO₂-Radikale darstellen kann.



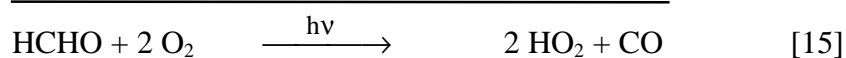
Die Vorgänge zur Bildung organischer Hydroperoxide aus Alkylperoxyl- und Hydroperoxylradikalen umfassen Reaktionen [1] bis [5] und [7].



Die dabei umgesetzten Alkylperoxyl-Radikale sind Intermediate des OH-induzierten Abbaus von Kohlenwasserstoffen [8, 9]. Das Methylperoxyl-Radikal, welches zur Bildung des einfachsten organischen Hydroperoxides, dem Methylhydroperoxid, führt, stammt überwiegend aus der atmosphärischen Methanoxidation.



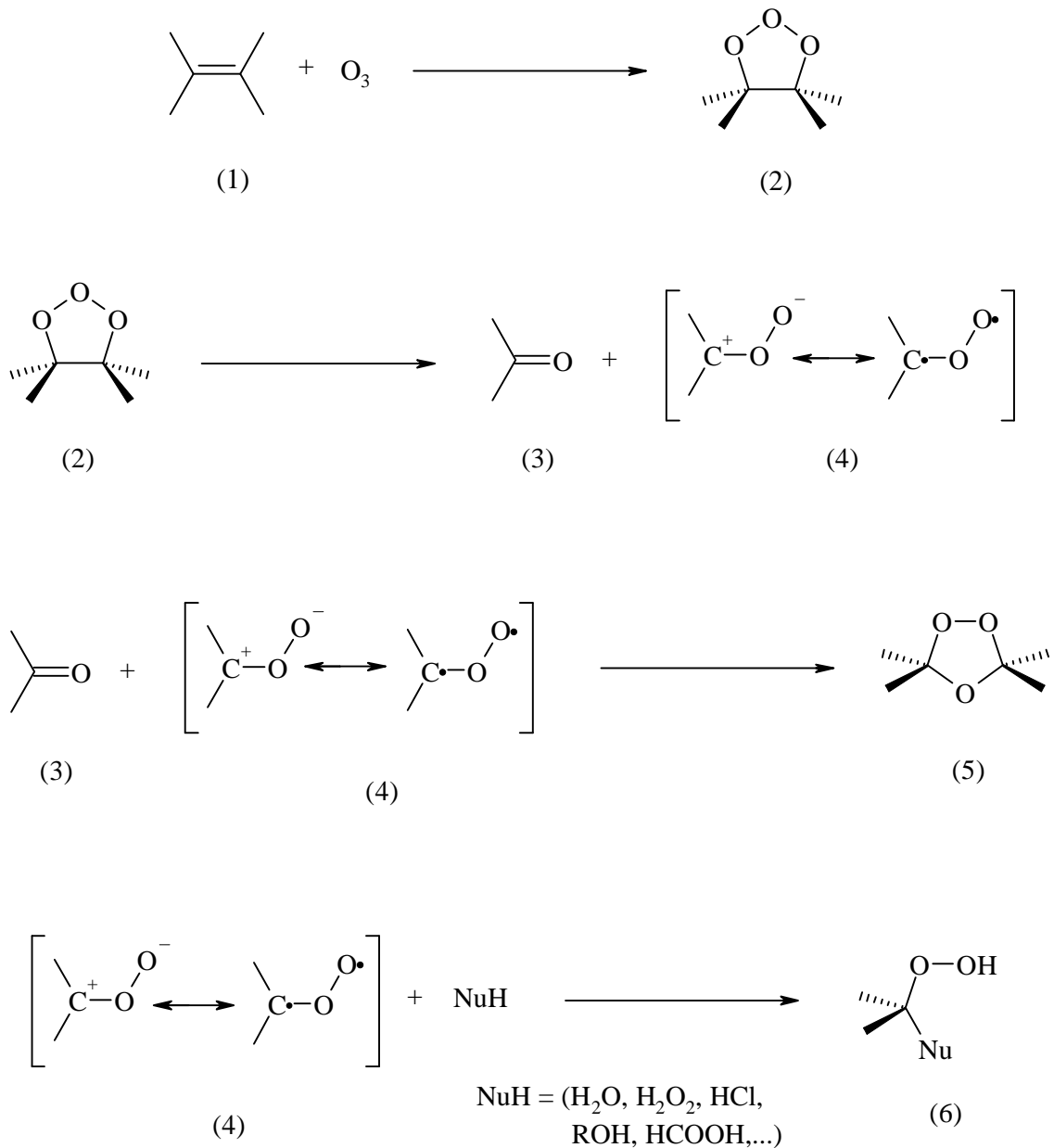
Eine weitere wichtige Quelle für H_2O_2 stellt die Photolyse von Aldehyden (z. B. Formaldehyd) [11,13] und die nachfolgende Reaktion der entstandenen H- und HCO-Radikale mit Sauerstoff dar (z. B. Bufalini et al., 1972; Cocks und Fletcher, 1982).



2.1.2.2 Hydroperoxide aus der Ozonreaktion

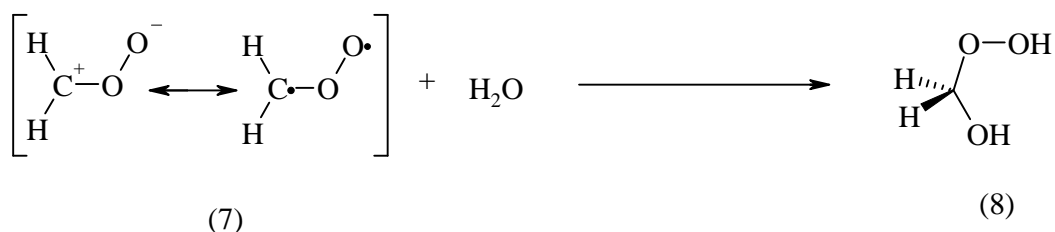
In Untersuchungen der vergangenen Jahre hat sich gezeigt, daß auch bei der Reaktion von Ozon mit Olefinen peroxidische Verbindungen entstehen (Gäb et al., 1985; Becker et al., 1990, 1991; Hewitt und Kok, 1991; Ross und de Serves, 1991; Neeb et al., 1997; Wolff et al., 1997). Der überwiegende Teil ungesättigter Kohlenwasserstoffe gelangt durch biogene Emissionen in die Atmosphäre. In Abhängigkeit von der Pflanzenart und den meteorologischen Bedingungen betragen die Isopren- und Terpenemissionen der Pflanzen etwa 0.5 bis $20 \mu\text{g g}^{-1} \text{h}^{-1}$, wodurch sich eine globale Emission von $3.5 \cdot 10^{14}$ bis $4.8 \cdot 10^{14} \text{ g(C)/a}$ ergibt (Rasmussen, 1972; Zimmermann et al., 1978; Graedel, 1979; Isodorow et al., 1985). Neuere Untersuchungen weisen jedoch darauf hin, daß solche Zahlen mit einer hohen Unsicherheit behaftet sind. Danach beträgt der für Sonnenblumen hochgerechnete Wert von etwa $1 \cdot 10^{12}$ bis $7 \cdot 10^{12} \text{ g(C)/a}$ nur ein Hunderstel der in früheren Arbeiten abgeschätzten Emission (Schuh, 1996).

Bei der Ozonolyse handelt es sich um eine häufig untersuchte, aber immer noch nicht vollständig aufgeklärte Reaktion. Entscheidende Beiträge zur mechanistischen Aufklärung lieferte Criegee, der den nach ihm benannten Dreistufenmechanismus postulierte (Criegee, 1975). Erst kürzlich durchgeführte Arbeiten zeigen, daß der von Criegee für die flüssige Phase vorgeschlagene Mechanismus auch auf die Gasphase übertragbar ist (Neeb et al., 1997; Thomas, 1997; Wolff et al., 1997, 1998). Im ersten Schritt bildet sich durch 1,3-dipolare Addition von Ozon an das Olefin (1) ein Primärozonid (1,2,3-Trioxolan) (2). Danach erfolgt im Zuge einer [2+3]-Cycloreversion der Zerfall des Primärozonides in eine Carbonylverbindung (3) und ein reaktives Carbonyloxid (4). Während in inerten Lösungsmitteln durch 1,3-dipolare Addition des Carbonyloxids an die Carbonylverbindung ein Sekundärozonid (1,2,4-Trioxolan) (5) entsteht, werden in Anwesenheit von Nucleophilen α -hetero-substituierte Alkylhydroperoxide (6) gebildet (Reaktionsschema 1).



Reaktionsschema 1: Ozonolyse ungesättigter Kohlenwasserstoffe

Da die Produkte (6) auch bei der Gasphasenozonolyse von Olefinen mit zugesetzten nucleophilen Abfängern nachgewiesen wurden, können für die Gasphase analoge Mechanismen angenommen werden (Neeb et al., 1997; Wolff et al., 1997, 1998). So ist beispielsweise die Bildung des in Luft nachgewiesenen HMHP (8) aus Wasserdampf und Peroxymethylen (7) denkbar (Reaktionsschema 2).



Reaktionsschema 2: Bildung von HMHP aus Wasser und dem Criegee-Intermediat

Obwohl diese Möglichkeit der HMHP-Bildung sowohl hier, wie auch an anderer Stelle häufig angeführt wird, ist sie sehr kritisch zu betrachten (Neeb et al., 1997; Wolff et al., 1997). So fällt bei den Untersuchungen von Wolff et al. (1997) auf, daß bei der Gasphasenozonolyse von Ethen in Gegenwart von H_2O lediglich $1.3 \pm 0.6 \%$ HMHP neben $2.4 \pm 1.3 \%$ H_2O_2 , $29 \pm 13 \%$ HCHO und $40 \pm 13 \%$ HCOOH gebildet werden, während bei der Verwendung von Methanol als Abfänger bis zu $46 \pm 12 \%$ des erwarteten Methoxymethylhydroperoxides entstehen. Erklärt wird dieser Effekt durch die im Vergleich zum H_2O größere Nucleophilie des Methanols (Wolff, 1998). Die Ergebnisse dieser Untersuchungen stimmen mit denen früherer Arbeiten überein, in welchen bei der Ozonolyse von Terpenen in Gegenwart von H_2O ebenfalls kleine H_2O_2 -Ausbeuten erhalten wurden (Becker et al., 1990, 1991; Brockmann, 1993). Die dabei beobachtete Zunahme an H_2O_2 mit steigendem H_2O -Partialdruck wird der direkten Reaktion des Criegee-Biradikals ($\text{R}^1\text{R}^2\text{COO}$) mit H_2O zugeschrieben. Danach bildet sich zunächst ein Komplex der Art $\text{R}^1\text{R}^2\text{COO} \cdot \text{H}_2\text{O}$, welcher in die entsprechende Carbonylverbindung ($\text{R}^1\text{R}^2\text{CO}$) und H_2O_2 zerfällt. Denkbar ist auch die Umlagerung in ein angeregtes Hydroperoxid. Im Falle des einfachsten Criegee-Biradikals (7) bildet sich das „heiße“ HMHP (8), woraus dann, analog zur Flüssigphasenchemie H_2CO und H_2O_2 entstehen [17] (Yamamoto et al., 1979).

Im Gegensatz zu älteren Arbeiten (Gäb et al., 1985; Martinez et al., 1981), bei denen Formaldehyd und Wasserstoffperoxid als Zersetzungsprodukte des HMHP angenommen wurden [16], zeigt eine neuere Smogkammer-Untersuchung, daß zwischen der Abnahme von HMHP sowie der Bildung von H_2O_2 und Formaldehyd kein Zusammenhang besteht (Neeb et al., 1997). Stattdessen wurde bei diesen Untersuchungen beobachtet, daß HMHP mit einer vom Volumen/Oberflächen-Verhältnis

des Reaktors abhängigen Geschwindigkeit zu Ameisensäure und Wasser zerfällt [17] (Neeb et al., 1997).



Aufgrund dieser Ergebnisse muß davon ausgegangen werden, daß es sich bei Reaktion [16] um eine Wandreaktion handelt und HMHP in der Atmosphäre eine längere Lebensdauer als in Smogkammerexperimenten besitzt. Als mögliche, atmosphärisch relevante Zerfallsreaktion von HMHP wird daher die photolytische Spaltung der Peroxidbindung [18] in Analogie zur Zersetzung von H_2O_2 oder MHP und die Bildung von Ameisensäure über die Reaktion [19] angenommen (Vaghjinani und Ravishankara, 1989; Neeb et al., 1997).



2.1.2.3 Hydroperoxide aus der Verbrennung von Biomasse

Obwohl schon in den 90er Jahren durchgeführte Untersuchungen Hinweise auf Hydroperoxide in Schwebstaubextrakten sowie in Ruß und Abgasen aus Verbrennungsprozessen zeigten, wurden kaum weitere Anstrengungen unternommen, um diese Ergebnisse durch die Speziation einzelner hydroperoxidischer Verbindungen abzusichern (Stärk und Stauff, 1986b; Stärk et al., 1986c; Esser und Klockow, 1994). Da in diesen Emissionen höhermolekulare Hydroperoxide, die aufgrund ihres geringen Dampfdruckes keine direkte Rolle für die Atmosphärenchemie spielen, vermutet wurden, konnten die oben beschriebenen photochemischen Prozesse als einzige Quelle für das Vorkommen von Hydroperoxiden in der Atmosphäre angesehen werden (Sakugawa et al., 1990). Die während des North Atlantic Regional Experiment (NARE) 1993 gemessenen höchsten Hydroperoxid-Konzentrationen (10 ppb H_2O_2 neben 17 ppb NO_y und 145 ppb O_3) in anthropogen belasteter Luftmasse sowie neuere Untersuchungen der Biomassenverbrennung zeigen allerdings, daß H_2O_2 und

organische Hydroperoxide wahrscheinlich auch direkt emittiert werden (Weinstein-Lloyd et al., 1996; Lee et al., 1997; 1998). Bei Verbrennungsprozessen können folgende Reaktionen zur Bildung von Hydroperoxiden führen (Lee et al., 1997):



Der Ablauf dieser Reaktionen wird von der Temperatur beeinflusst. So kann bei Temperaturen von über 200 °C durch die Reaktion [29] mehr organisches Hydroperoxid umgesetzt werden, als durch die Reaktion [27] und [28] gebildet wird. Daneben entstehen mit steigender Temperatur zunehmend mehr Hydroperoxyradikale [23], die über die Reaktionen [24] und [6] die H₂O₂-Menge erhöhen. Steigt die Temperatur auf über 500 °C, so kann durch die Reaktion von Formaldehyd mit Hydroperoxyradikalen [25] weiteres H₂O₂ entstehen. Die insgesamt bevorzugte Bildung von H₂O₂ gegenüber organischen Peroxiden konnte bei der Verbrennung von Biomasse sowohl im Feldexperiment als auch bei, im Freien durchgeführten Feuerexperimenten unter kontrollierten Bedingungen nachgewiesen werden (Lee et al., 1997, 1998).

2.1.2.4 Senken atmosphärischer Hydroperoxide

Neben der photolytischen Spaltung der Peroxidbindung [18, 32] und der Reaktion von H_2O_2 mit OH-Radikalen [33] stellt die feuchte und nasse Deposition die wichtigste Senke für hydrophile Hydroperoxide dar (Logan et al., 1981).



Die Effizienz der feuchten bzw. nassen Deposition ist in entscheidendem Maße von der Wasserlöslichkeit der Hydroperoxide abhängig. Ihre Konzentration in der wäßrigen Phase läßt sich bei Kenntnis der Henry-Konstanten über das Henry'sche Gesetz [34] berechnen. Die Henry-Konstanten einiger in der Umwelt nachgewiesener Hydroperoxide sind in Tabelle 1 aufgeführt.

$$[\text{RO}_2\text{H}]_{(\text{aq})} = K_h * P_{(\text{RO}_2\text{H})} \quad [34]$$

mit $[\text{RO}_2\text{H}]_{(\text{aq})}$ = Konzentration Hydroperoxid in der flüssigen Phase

K_h = Henry-Konstante

$P_{(\text{RO}_2\text{H})}$ = Partialdruck des Hydroperoxides

Hydroperoxid	K_h (M atm ⁻¹)
H_2O_2	$(8.33 \pm 0.38) * 10^4$
CH_3OOH	311 ± 14
HOCH_2OOH	$(1.67 \pm 0.35) * 10^6$
$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OOH}$	336 ± 20

Tabelle 1: Henry-Konstanten verschiedener Hydroperoxide (O'Sullivan et al., 1996)

Aufgrund großer Henry-Konstanten ist die Möglichkeit einer effektiven feuchten Deposition für HMHP und H_2O_2 gegeben. Dagegen dürfte die Deposition der n-Alkylhydroperoxide infolge ihrer um drei Größenordnungen kleineren Henry-Konstanten mit deutlich geringerer Effizienz erfolgen. Bestätigt wird diese Annahme durch Messungen der Hydroperoxidkonzentration in Regenwasser: Während bei

diesen Messungen H_2O_2 in Konzentrationen bis zu $110 \mu\text{mol/l}$ gefunden wurde, lagen die MHP-Konzentrationen meist unterhalb von $1 \mu\text{mol/l}$ (Hellpointner und Gäb, 1989; Hewitt und Kok, 1991).

2.2 Schädigung von Hydroperoxiden

Neben den zahlreichen Untersuchungen der Prozesse, die das ubiquitäre Vorkommen der Hydroperoxide erklären, steht die Frage nach der Wirkung der Hydroperoxide auf die belebte Umwelt im wissenschaftlichen Interesse. Während die Zahl der Untersuchungen über die direkte und indirekte Wirkung von Hydroperoxiden auf Pflanzen zugenommen hat, gibt es nur wenig Kenntnisse über die Wirkung von Hydroperoxiden auf den menschlichen Organismus (Masuch et al., 1985, 1986, 1989; Kettrup et al., 1991).

2.2.1 Schädigung des menschlichen Organismus

Die Wirkung der Hydroperoxide und Peroxide auf Haut und Schleimhäute ist sehr unterschiedlich. So können einige dieser Verbindungen in kleinsten Mengen oder in starker Verdünnung noch zu tiefgreifenden Hautnekrosen und Cornealnekrosen führen (Bundesarbeitsblatt, 1992). Neben einer möglichen Kontaktsensibilisierung einzelner Peroxide, z. B. Dibenzoylperoxid, zeigte sich, daß das in PVC-Kabeln enthaltene Dicumylperoxid zu einem berufsbedingten Asthma führen kann (Stenton et al., 1989). Bei in vitro-Untersuchungen organischer Peroxide, u. a. BHMP, ließ sich eine mutagene Wirkung erkennen; in Tierexperimenten führten sowohl einige Peroxide wie auch Cumolhydroperoxid zur Bildung von Tumoren (Sobels, 1956; Bundesarbeitsblatt, 1991).

2.2.2 Schädigung von Pflanzen

Anfang der 80er Jahre wurde in Deutschland der Begriff „Neuartige Waldschäden“ geprägt. Seitdem veröffentlichte Berichte über den Waldzustand in Deutschland lassen keine wesentliche Besserung erkennen; so wies 1996 jeder fünfte Baum deutliche

Schäden (25% Laub- oder Nadelverlust) auf. Betroffen sind insbesondere Tannen, Fichten, Buchen und Eichen (Presse- und Informationsamt der Bundesregierung, 1996). Obwohl die Ursache der Waldschäden auch heute noch nicht vollständig geklärt ist, wird davon ausgegangen, daß die Luftverschmutzung erheblich zu diesem Phänomen beiträgt. Zu Beginn der 80er Jahre wurden sowohl der „saure Regen“ und die damit einhergehende Versauerung der Böden, als auch eine direkte Schädigung der Pflanzen durch Ozon als Ursachen der Baumschäden diskutiert (Krause et al., 1983, 1985; Ulrich, 1983). Trotz der anfänglichen Plausibilität dieser Annahmen zeigte sich, daß es durchaus Gegenargumente gibt; so wurde z. B. in den Niederlanden trotz höherer Ozonkonzentrationen kein derartiges Phänomen beobachtet. Nicht zuletzt aus diesem Grunde vermutet man, daß weitere in der Atmosphäre vorkommende Oxidantien in Verbindung mit meteorologischen Gegebenheiten, insbesondere Regen und Nebel, als mögliche Ursache der lokalen Schäden in Frage kommen (Masuch et al., 1985). In der kondensierten Phase ist Wasserstoffperoxid bei $\text{pH} < 5$ das effektivste Oxidationsmittel für SO_2 und trägt somit über die entstehende H_2SO_4 zur Säurebildung in Regen- und Nebeltröpfchen bei (z. B. Penkett et al., 1979; Dasgupta, 1980; Möller, 1980; Sakugawa et al., 1990). Neben diesem indirekten Beitrag können Wasserstoffperoxid und organische Hydroperoxide auch auf direktem Wege zur Schädigung von Pflanzen führen. Bei Labor-Untersuchungen über die Wirkung von wasserstoffperoxidhaltigem saurem Nebel auf junge Fichten und Buchen zeigten diese erhebliche histologische Veränderungen an Nadeln bzw. Blättern. Die beobachteten Zellveränderungen wurden als Anzeichen von Wasserstreß (erniedrigter Wassergehalt, Vermehrung der Stomata und Einlagerung von Öltröpfchen in die oberen Epidermiszellen) gesehen und gingen einher mit einer reduzierten Photosyntheseleistung der Pflanzen (Masuch et al., 1985, 1986, 1989; Kettrup et al., 1991). Neben der schädigenden Wirkung des H_2O_2 in der wäßrigen Phase (Regen, Nebel, Wolken) werden sowohl der Einfluß von gasförmigem H_2O_2 während Trockenperioden, die aus der Ozonolyse von Terpenen stammenden Hydroperoxide, sowie die Anreicherung hochmolekularer Peroxide auf den Pflanzen als weiterer Beitrag zum Waldsterben diskutiert (z. B. Stärk und Stauff, 1986a; Möller, 1989).

2.3 Bestimmung von Hydroperoxiden

Die intensive Erforschung der Hydroperoxide sowohl in den photochemischen Prozessen der Atmosphäre als auch bei auftretenden Umweltschäden (z. B. dem Waldsterben) erfordert eine exakte Kenntnis der einzelnen beteiligten Spezies und ihrer Konzentrationen. Diese kann nur über geeignete analytische Meßverfahren und deren Einsatz bei Feldmessungen und Laborexperimenten erreicht werden. Zu diesem Zwecke wurde in den letzten Jahren eine Vielzahl verschiedenster Analysenverfahren zur Bestimmung von Hydroperoxiden entwickelt (Gunz und Hoffmann, 1990; Sakugawa et al., 1990). Aufgrund der thermischen Instabilität und der sehr guten Wasserlöslichkeit der meisten Hydroperoxide werden überwiegend Verfahren der Fließinjektionsanalyse (FIA) und High-Performance-Liquid-Chromatography (HPLC) in Verbindung mit optischer Detektion eingesetzt. Während die Untersuchung wäßriger Proben (z. B. Regen) keine besondere Probenahmetechnik erfordert, müssen die gasförmigen Hydroperoxide zunächst durch geeignete Sammelverfahren der naßchemischen Analyse zugänglich gemacht werden.

2.3.1 Probenahme von Hydroperoxiden in Luft

Die wohl einfachste Möglichkeit, gasförmige Hydroperoxide in die flüssige Phase zu überführen, findet bei Kondensationssammlern Anwendung (Farmer und Dawson, 1982; Deforest et al., 1997). Diese Sammler werden in der Regel als Passivsammler eingesetzt und erfordern somit keinen größeren apparativen Aufwand, sind preiswert und einfach zu handhaben. An gekühlten Flächen scheidet sich der in der Luft enthaltene Wasserdampf ab und tropft in dafür vorgesehene Behälter; wasserlösliche Verbindungen wie z. B. die Hydroperoxide sind im Kondensat enthalten. Obwohl die durch Kondensationsprobenahme erhaltenen H_2O_2 -Gasphasenkonzentrationen sehr gute Übereinstimmung mit den Meßwerten anderer Probenahmeverfahren zeigten (Abweichung <10%), konnte sich dieses Verfahren nicht durchsetzen (Deforest et al., 1997). Weitere Verfahren zur Sammlung atmosphärischer Spurenstoffe, welche die Luft mit wäßrigen Pufferlösungen unter Verwendung eines Nebulizers oder eines „Wet-Effluent-Diffusion-Denuders“ (WEDD) auswaschen, wurden bei bisherigen Hydroperoxiduntersuchungen nur selten eingesetzt (Cofer et al., 1985; Cofer und Edahl, 1986; Vecera und Dasgupta, 1991). Während die aus dem WEDD erhaltenen

Proben in zehnminütigem Abstand untersucht werden können, ist mittels Nebulizer-technik eine Anreicherungszeit von etwa einer Stunde notwendig (Staffelbach et al., 1995; Sauer et al., 1997).

Die häufiger verwendeten Verfahren lassen sich in Stripvorgänge mit wäßrigen Lösungen und das Kryosampling unterteilen. Probenahmeverfahren mit Impinger-Sammelgefäßen, bei welchen die Luft durch wäßrige Lösungen gesaugt wird, ergaben in Anwesenheit von Ozon stets zu hohe H_2O_2 -Konzentrationen. Es konnte gezeigt werden, daß sich bei 60 ppbv Ozon die gemessene H_2O_2 -Gasphasenkonzentration um etwa 0.6 - 1.2 ppbv erhöht (Heikes, 1982, 1984; Zika und Saltzman, 1982; Yoshizumi et al., 1984; Sakugawa und Kaplan, 1987). Im Bereich der online-Analyse gasförmiger Hydroperoxide mittels FIA hat sich der Einsatz einer Sammelwendel (stripping coil) bewährt (Lazrus et al., 1986). Zur Probenahme wird eine wäßrige Strip-Lösung im Gleichstrom mit der zu beprobenden Luft über eine Glaswendel gefördert. Dabei gehen die hydrophilen Hydroperoxide in die wäßrige Phase über und können so direkt der FIA zugeführt werden. Ein Vorteil dieser Methode liegt zum einen im kontinuierlichen Probenahmebetrieb und zum anderen im wesentlich geringeren Artefakt- H_2O_2 (0.01 - 0.03 ppbv H_2O_2 bei 40 - 100 ppbv O_3). Aufgrund der geringen Sammeleffizienz der wäßrigen Sammelverfahren für Alkylhydroperoxide wird bei HPLC-Untersuchungen, die der Speziation einzelner Hydroperoxide dienen, häufig das Kryosampling bei Temperaturen $\leq -78^\circ\text{C}$ eingesetzt (Hellpointner und Gäb, 1989; Hewitt und Kok, 1991; Campos und Kok, 1996). Im Vergleich zu den anderen Probenahmeverfahren ist das Kryosampling arbeitsintensiv und erfordert eine gewissenhafte Aufarbeitung der Proben. Um eine 100 %ige Sammeleffizienz für MHP zu erreichen ist eine Probenahmetemperatur von -75°C erforderlich (Campos und Kok, 1996). Auch beim Kryosampling kann in der Luft vorhandenes Ozon zur Bildung von Artefakt- H_2O_2 führen; dieses ist bei einer Sammeltemperatur von -78°C vernachlässigbar, kann aber bei tieferen Temperaturen (-117°C bzw. -186°C) bis zu 1 ppb betragen. Weiterführende Untersuchungen haben gezeigt, daß sich bei Anwesenheit von Ozon und ungesättigten Kohlenwasserstoffen (z. B. Ethen oder Isopren) auch Artefakt-HMHP bilden kann, dessen Menge ebenfalls mit sinkender Sammeltemperatur zunimmt. Unter diesen Bedingungen wurde jedoch kein Artefakte-MHP beobachtet (Staffelbach et al., 1995, 1996). Aufgrund des fehlenden Nachweises

von HMHP in Gebieten mit geringen Alkenkonzentrationen (z. B. Mauna Loa, Hawaii) und eines den reaktiven Kohlenwasserstoffen (z. B. Isopren) entsprechenden Vertikalprofils von HMHP vermuten Staffelbach et al. (1995), daß bei vielen, vielleicht allen bisher durchgeführten Untersuchungen Artefakt-HMHP gemessen wurde (Neftel, 1997). Obwohl die Messung mit wäßrigen Striptechniken (Sammelwendel, WEDD, Nebulizer) in Verbindung mit der HPLC diese Vermutung zu bestätigen scheint, spricht der Nachweis von HMHP (0.3 - 0.8 $\mu\text{mol/l}$) in Regenwasserproben dagegen (Hellpointner und Gäb, 1989; Sauer et al., 1996, 1997; Neftel, 1997). Neben der Artefaktbildung durch Ozon kann mit der Kühlfalle gesammeltes SO_2 zu einer Erniedrigung der H_2O_2 -Konzentration führen: 3 - 13 ppbv SO_2 verursachen einen 20-65 %igen H_2O_2 -Verlust (Campos und Kok, 1996). Bei der Wahl eines der oben beschriebenen Probenahmeverfahren ist es daher notwendig, nicht nur die Sammeleffizienzen (Tabelle 2) sondern auch mögliche Artefakte zu berücksichtigen und diese entweder durch gleichzeitige Messung der verursachenden Substanzen zu quantifizieren oder durch geeignete Maßnahmen (z. B. korrekte Sammeltemperatur) auszuschließen.

Hydroperoxid	Impinger [%] ^a	Nebulizer [%] ^b	WEDD [%] ^c	Stripping-coil [%] ^{d,e,f}	Kühlfalle bei -45°C [%] ^g	Kühlfalle bei -60 bis -90°C [%] ^{h,i,j}
H_2O_2	>99	95	100	≥98	95	>97-100
HMHP	-	-	100	100	-	-
MHP	-	75	60	59-80	-	>97-100
EHP	-	-	-	77	-	-

^a Sakugawa und Kaplan, 1987; ^b Sauer et al., 1997; ^c Staffelbach et al., 1995; ^d Lazrus et al., 1986; ^e Lee et al., 1995; ^f Großmann und Sauer, 1997; ^g Jacob et al., 1986; ^h Campos und Kok, 1996; ⁱ Fels und Junkermann, 1994; ^j Hellpointner und Gäb, 1989

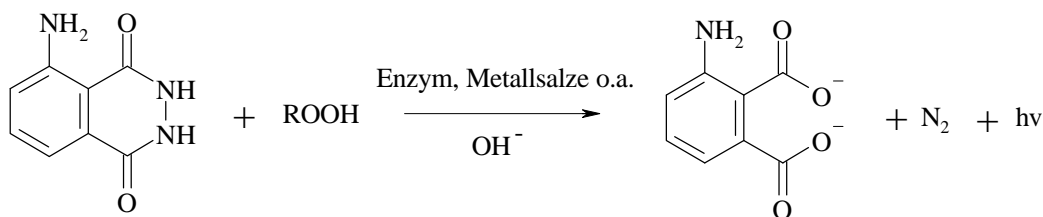
Tabelle 2: Sammeleffizienz [%] einiger ausgewählter Hydroperoxide mit verschiedenen Probenahmeverfahren

2.3.2 Bestimmungsmethoden

2.3.2.1 Fluoreszenz- und Chemilumineszenzmethoden

Für die Untersuchung von atmosphärischen Hydroperoxiden, insbesondere für H_2O_2 , wurden in den vergangenen Jahren neben wenigen spektroskopischen Methoden wie

TDLAS (tunable diode laser absorption spectroscopy) und FTIR zahlreiche naßchemische Methoden entwickelt (Hanst et al., 1982; Slemr et al., 1986; Becker et al., 1989; Gunz und Hoffman, 1990). Die naßchemischen Methoden, die teilweise auch für die Analyse organischer Hydroperoxide in wäßrigen oder organischen Lösungen eingesetzt werden, beruhen häufig auf der Fluoreszenz- oder Chemilumineszenzmessung. Daneben gibt es aber auch Verfahren mit elektrochemischer oder photometrischer Detektion (Albrecht, 1928; Gupta, 1973; Pilz und Johann, 1974; Burdo und Seitz, 1975; Deelder et al., 1976; Michaels und Hunt, 1978; Kricka und Thorpe, 1983; Funk und Baker, 1985; Lazrus et al., 1985; Kieber und Helz, 1986; Hartkamp und Bachhausen, 1987; Kok et al., 1988; Tanner und Kelly, 1988; Fujita et al., 1994, Klassen et al., 1994). Die eingesetzten Chemilumineszenz-Reaktionssysteme basieren gewöhnlich auf der Umsetzung der Hydroperoxide mit Luminol (5-Amino-1,2,3,4-tetrahydrophthalazin-1,4-dion) (Reaktionsschema 3) oder Bis-(2,4,6-trichlorphenyl)-oxalat (TCPO) (Reaktionsschema 4). Die Chemilumineszenz wird beobachtet, wenn bei einer chemischen Reaktion eine Substanz im elektronisch angeregten Zustand entsteht. Bei der Rückkehr in den elektronischen Grundzustand werden, wie im Falle von Luminol Lichtquanten ausgesandt. Bei der TCPO-Chemilumineszenz wird durch den Zerfall des energiereichen Intermediates 1,2-Dioxetandion Anregungsenergie auf ein Fluorophor übertragen, dessen Fluoreszenz gemessen wird (Seitz, 1981).



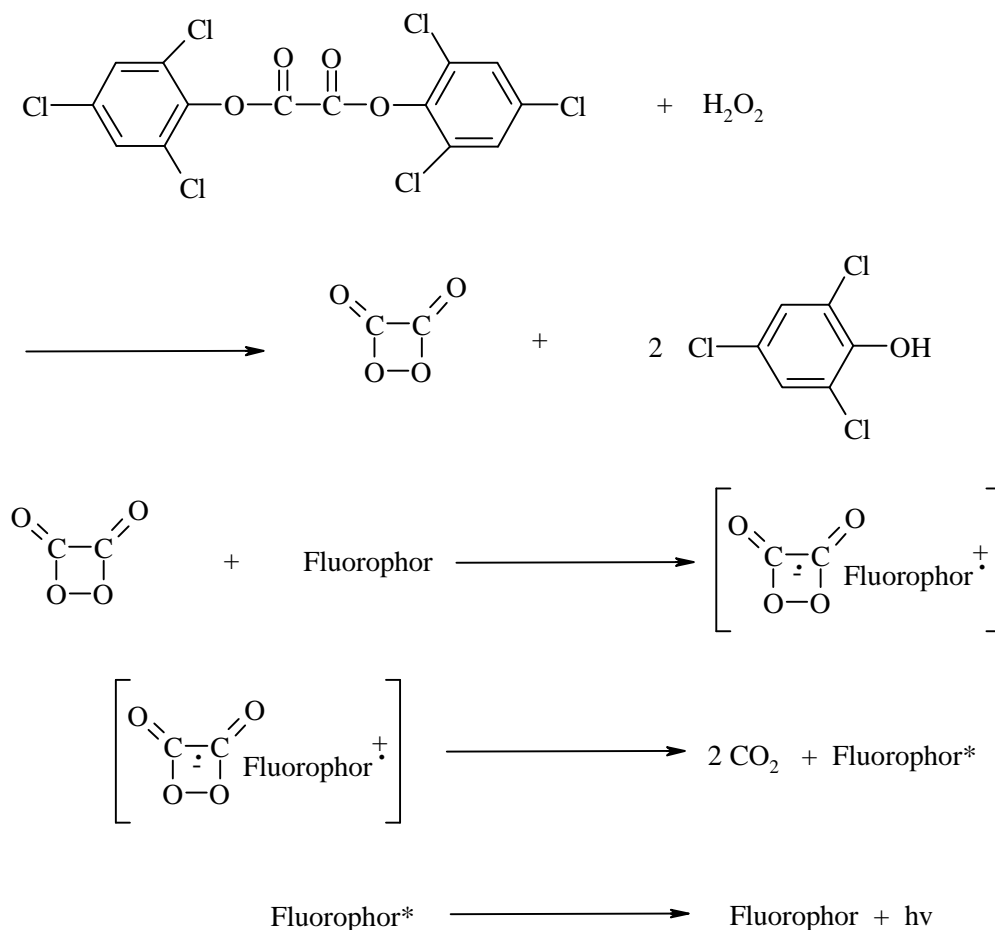
Reaktionsschema 3: Luminol-Chemilumineszenzreaktion

Die Luminol-Chemilumineszenzreaktion erfordert zur Reaktion mit H_2O_2 und organischen Peroxiden einen Katalysator oder Co-Oxidantien. Dazu werden neben Metallionen und Metallkomplexen (z. B. Fe(II) , Co(II) , Cu(II) , Fe(CN)_6^{3-}) auch Enzyme oder Enzym-ähnliche Substanzen (z. B. Meerrettichperoxidase, Mikro-

peroxidase, Hematin) eingesetzt (Kricka und Thorpe, 1983). Die Verwendung von organischen Reagenzien (z. B. Halomethane, Nitrotoluole, substituierte Benzoldiazoniumfluorborate) als Katalysatoren hat sich dagegen nicht durchgesetzt (Yurow und Sass, 1976). Zur Detektion können Fluoreszenzdetektoren, besser aber spezielle Chemilumineszenzdetektoren verwendet werden. Trotz hoher Empfindlichkeit und niedriger Nachweisgrenzen ist die Chemilumineszenz eine eher uneffektive Reaktion. Die mit 5 % höchsten Chemilumineszenzausbeuten lassen sich mit Luminol in Dimethylsulfoxid erreichen, in wäßriger Lösung betragen sie dagegen nur bis zu 1.5 %. Die Chemilumineszenzausbeute wird neben dem Solvens in starkem Maße von der Position und den Substituenten der Aminogruppe beeinflusst. So zeigte sich, daß Isoluminol (6-Amino-1,2,3,4-tetrahydrophthalazin-1,4-dion) nur etwa 5 - 10 % der Chemilumineszenz des Isomeren Luminol erreicht; andererseits besitzt N,N-Diethylisoluminol die gleiche Effektivität wie Luminol (Schroeder und Yeager, 1978). Darüber hinaus wird die Luminol-Chemilumineszenzreaktion in Verbindung mit der HPLC bzw. FIA zur Untersuchung lipophiler Hydroperoxide (z. B. aus der Lipidperoxidation) und zur indirekten Bestimmung von Glucose oder Aminosäuren (Messung des durch Oxidasen gebildeten H_2O_2) eingesetzt (Auses et al., 1975; Kok et al., 1978; MacDonald und Nieman, 1985; Bächman et al., 1992; Takayama et al., 1992; Matthäus et al., 1994; Lebedeva und Ugarova, 1995).

Im Gegensatz zur Luminol-Chemilumineszenz, mit der sich H_2O_2 und organische Hydroperoxide detektieren lassen, ist die Peroxyoxalat-Chemilumineszenz mit Bis-(2,4,6-trichlorphenyl)-oxalat (TCPO) (Reaktionsschema 4) auf die Bestimmung von H_2O_2 beschränkt. Im Verlauf der Reaktion, die keine katalysierenden Substanzen benötigt, bildet sich aus H_2O_2 , TCPO und dem zugesetzten Fluorophor (i. d. R. Perylen) ein energiereiches 1,2-Dioxetandion-Fluorophor-Intermediat. Die chemische Anregung erfolgt durch einen Elektronenübergang vom Intermediat zurück zum Fluorophor, welches dadurch in den angeregten Singulett-Zustand überführt wird. Bei der Rückkehr in den Grundzustand wird die überschüssige Energie in Form von Lichtquanten emittiert (Kwakman und Brinkman, 1992). Bei Untersuchungen der TCPO-Chemilumineszenz zur Bestimmung von H_2O_2 in Außenluft und Niederschlägen zeigte sich, daß Eisen(II) in Verbindung mit gelöstem Sauerstoff die Anwesenheit von H_2O_2 vortäuschen kann (Jacob et al., 1987). Die Selektivität des Systems bzgl. H_2O_2 wurde

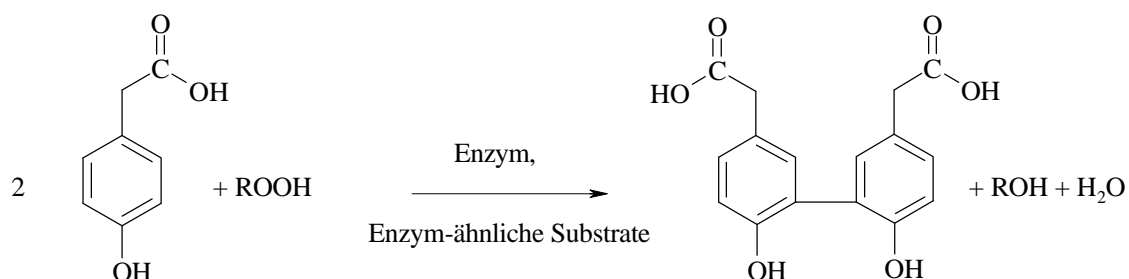
durch Zugabe unterschiedlicher Mengen MHP untersucht. Bei hohen MHP-Konzentrationen ($> 10^{-5}$ mol/l) liegt dessen Response etwa um einen Faktor 60 bis 100 unter dem entsprechender H_2O_2 -Lösungen; bei niedrigen MHP-Konzentrationen resultieren daher, wenn überhaupt nur sehr kleine Signale im Bereich der Nachweisgrenze (Beltz et al., 1987; Jacob et al., 1987).



Reaktionsschema 4: TCPO-Chemilumineszenz

Die zur fluorimetrischen Bestimmung der Hydroperoxide eingesetzten Reaktionen von Phenylessigsäurederivaten, z. B. Homovanillinsäure (HVA), p-Hydroxyphenyl-essigsäure (PES), wurde schon 1968 von Guilbault zur Untersuchung von Peroxidasen verwendet, aber erst 1985 als hervorragendes Reaktionssystem für die Bestimmung von H_2O_2 und organischen Hydroperoxiden genutzt (Guilbault et al., 1968a, b; Lazrus, 1985; Hellpointner und Gäb, 1989; Hewitt und Kok, 1991; Kurth et

al., 1991; Kok et al., 1995). Bei der enzymkatalysierten Reaktion von H_2O_2 und organischen Peroxiden mit den wenig fluoreszierenden Phenyllessigsäurederivaten kommt es zur Bildung eines fluoreszenzaktiven „Dimers“ (Reaktionsschema 5).



Reaktionsschema 5: Enzymkatalysierte Umsetzung von Hydroperoxiden und p-Hydroxyphenyllessigsäure

Systematische Untersuchungen mit verschiedenen substituierten Benzoesäure- und Phenyllessigsäurederivaten haben gezeigt, daß bei Verwendung von p-Hydroxyphenyllessigsäure (PES) die höchsten Fluoreszenzausbeuten erreicht werden (Guilbault et al., 1968b). Aufgrund der vielfältigen Nutzung der Reaktion mit den verschiedensten analytischen Techniken (Photometer-Fluorimetrie, FIA und HPLC) wurden im Rahmen der Verfahrensoptimierung zahlreiche Änderungen des Reaktionssystems durchgeführt. Als organische Substrate wurden überwiegend PES und HVA verwendet, die Katalyse der Reaktion erfolgte sowohl mit Meerrettichperoxidase als auch mit Mikroperoxidase, Hemin, organischen Manganverbindungen und einem Triethylentetramineisen(II)-Komplex (Lazrus et al, 1985, 1986; Ebermann und Couperous, 1987; Ci und Wang, 1990a-c; Genfa und Dasgupta, 1992; Kurth, 1992). Trotz dieser Variationen am Reaktionssystem wurde die mit HRP katalysierte Reaktion von Hydroperoxiden und p-Hydroxyphenyllessigsäure am häufigsten in Hydroperoxid-messenden Verfahren eingesetzt (Gunz und Hoffmann, 1990).

Photometrisch nutzbare Reaktionen wie die Peroxidase-katalysierte Oxidation von N,N-Diethyl-1,4-phenylendiamin bzw. die Bildung von stark farbigen Eisen(III)-Xylenolorange-Komplexen wurden bisher nur selten angewendet (Gupta, 1973; Peinado et al., 1986; Lee et al., 1990, 1994; Wagner et al., 1990; Weinstein-Lloyd, 1995).

2.3.2.2 *Gaschromatographische Methoden*

Obwohl es sich bei den Hydroperoxiden meist um thermisch instabile Substanzen handelt, werden schon lange gaschromatographische Untersuchungsmethoden zur Identifizierung und Quantifizierung eingesetzt (z. B. Bukata et al., 1963; Anthoni et al., 1986; Bächmann et al., 1992; Reddy et al., 1992). Bis auf wenige Ausnahmen berücksichtigen bisherige Arbeiten meist nur die thermisch stabileren Verbindungen wie tert-Butylhydroperoxid oder die Hydroperoxide der Fettsäuremethylester, die durch Überführung in Trimethylsilyl- oder Methylether-Derivate zusätzlich stabilisiert werden. Die gaschromatographische Analyse kleinerer, instabiler Hydroperoxide (Alkoxyalkylhydroperoxide, Arylalkylhydroperoxide) ist auf wenige Arbeiten beschränkt (Stenberg et al., 1970; Stanescu et al., 1982; Anthoni et al., 1986; Boddenberg, 1994; Mühle, 1998). Bei der unselektiven Detektion mittels FID zeigt sich ein gewisser Vorteil dadurch, daß z. B. bei Kammeruntersuchungen neben den Hydroperoxiden auch weitere Oxidationsprodukte (Alkohole, Aldehyde oder Ketone) erfaßt werden können. Aufgrund fehlender Anreicherungsverfahren und der Instabilität der Hydroperoxide wird die Gaschromatographie wohl auch in Zukunft nur eine untergeordnete Rolle bei der Analyse von Hydroperoxiden spielen.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Synthese der untersuchten Hydroperoxide

Da nur wenige der in dieser Arbeit verwendeten Hydroperoxide über den Chemikalienhandel erhältlich sind, wurden diese Verbindungen nach verschiedenen, z. T. bekannten Methoden synthetisiert, aufgereinigt und charakterisiert. Die reinen Hydroperoxide sind bei Lagertemperaturen von 4 °C (Alkylhydroperoxide) bzw. -18 °C (Alkoxyalkylhydroperoxide) über lange Zeit stabil.

3.1.1 Alkylhydroperoxide

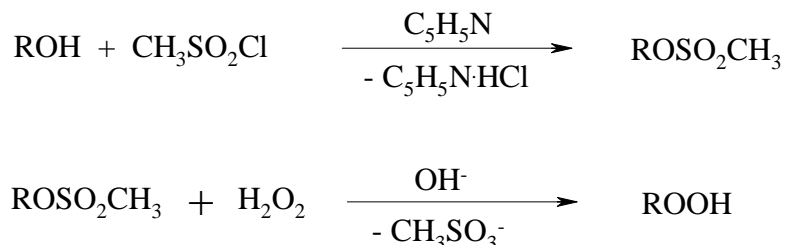
Für die Synthese von Methylhydroperoxid und Ethylhydroperoxid eignet sich die Umsetzung von Dimethyl- bzw. Diethylsulfat mit Wasserstoffperoxid in Anwesenheit von Kaliumhydroxid (Reaktionsschema 6). In dieser stark alkalischen Lösung kommt es zur Bildung von HO_2^- , welches durch nucleophilen Angriff an die Alkylgruppe des eingesetzten Alkylsulfats das entsprechende Alkylhydroperoxid freisetzt. Im Anschluß an die Reaktion wird das in Wasser schlechter lösliche Alkylhydroperoxid durch Stickstoff ausgetrieben und in einer Kühlfalle ($T = 0\text{ °C}$) kondensiert (Rieche und Hitz, 1929).



Reaktionsschema 6: Synthese von Methyl- und Ethylhydroperoxid aus Alkylsulfaten

Weitere unverzweigte und verzweigte Alkylhydroperoxide lassen sich nach einer Methode von Williams und Mosher (1954a und b) aus den entsprechenden primären oder sekundären Alkoholen herstellen (Reaktionsschema 7). Durch Umsetzung des Alkohols mit Methylsulfonylchlorid entsteht ein Methansulfonsäurealkylester, welcher

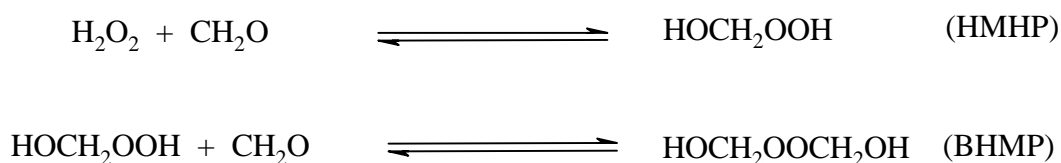
nach Isolierung und anschließender Umsetzung mit Wasserstoffperoxid in stark alkalischer Lösung das gewünschte Alkylhydroperoxid liefert.



Reaktionsschema 7: Synthese von Alkylhydroperoxiden

3.1.2 HMHP-Lösungen

Hydroxymethylhydroperoxid (HMHP) läßt sich auf einfache Art und Weise durch die Reaktion von H_2O_2 mit CH_2O in alkalischer Lösung herstellen. Als Nebenprodukt der Reaktion entsteht aus HMHP und überschüssigem Formaldehyd Bis(hydroxymethyl)peroxid (BHMP) (Reaktionsschema 8).



Reaktionsschema 8: Synthese von HMHP

Aufgrund der bekannten Instabilität von HMHP und der damit verbundenen hohen Explosionsgefahr wurde auf Versuche zur Anreicherung oder Isolierung verzichtet. Zur Untersuchung des zeitlichen Verlaufs der HMHP-Bildung wurde das enzymatische HPLC-System (Fluoreszenz-HPLC-System I), welches auch die Detektion von BHMP ermöglicht, eingesetzt. Die Messungen zeigten, daß die Reaktionslösung schon nach weniger als 10 min etwa 40% der HMHP-Endkonzentration besitzt und die H_2O_2 -Konzentration in gleichem Maße abnimmt (Abbildung 1). Erst nach etwa 12 min bildet sich das unerwünschte BHMP. Da nach kurzer Reaktionszeit (≤ 10 min) keine nennenswerte Bildung von BHMP beobachtet werden konnte, ist es möglich,

aus der Abnahme der H_2O_2 -Konzentration den Response-Faktor für HMHP zu bestimmen. Dabei wird angenommen, daß H_2O_2 sich vollständig zu HMHP umsetzt. Der ermittelte Response-Faktor ($\text{FE}_{\text{H}_2\text{O}_2} / \text{FE}_{\text{HMHP}}$) von 2.1 kann dann zur genauen HMHP-Konzentrationsbestimmung genutzt werden, ohne, daß es der sehr gefährlichen Isolierung der Reinsubstanz bedarf.

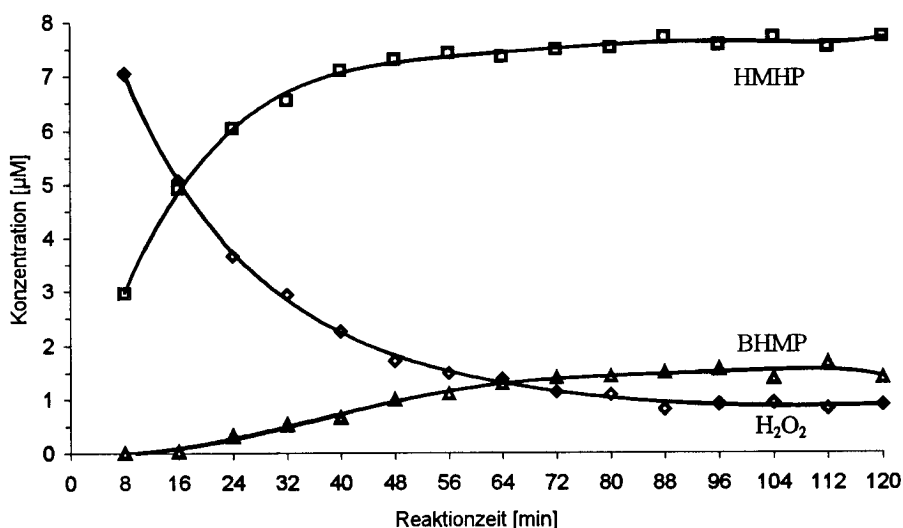
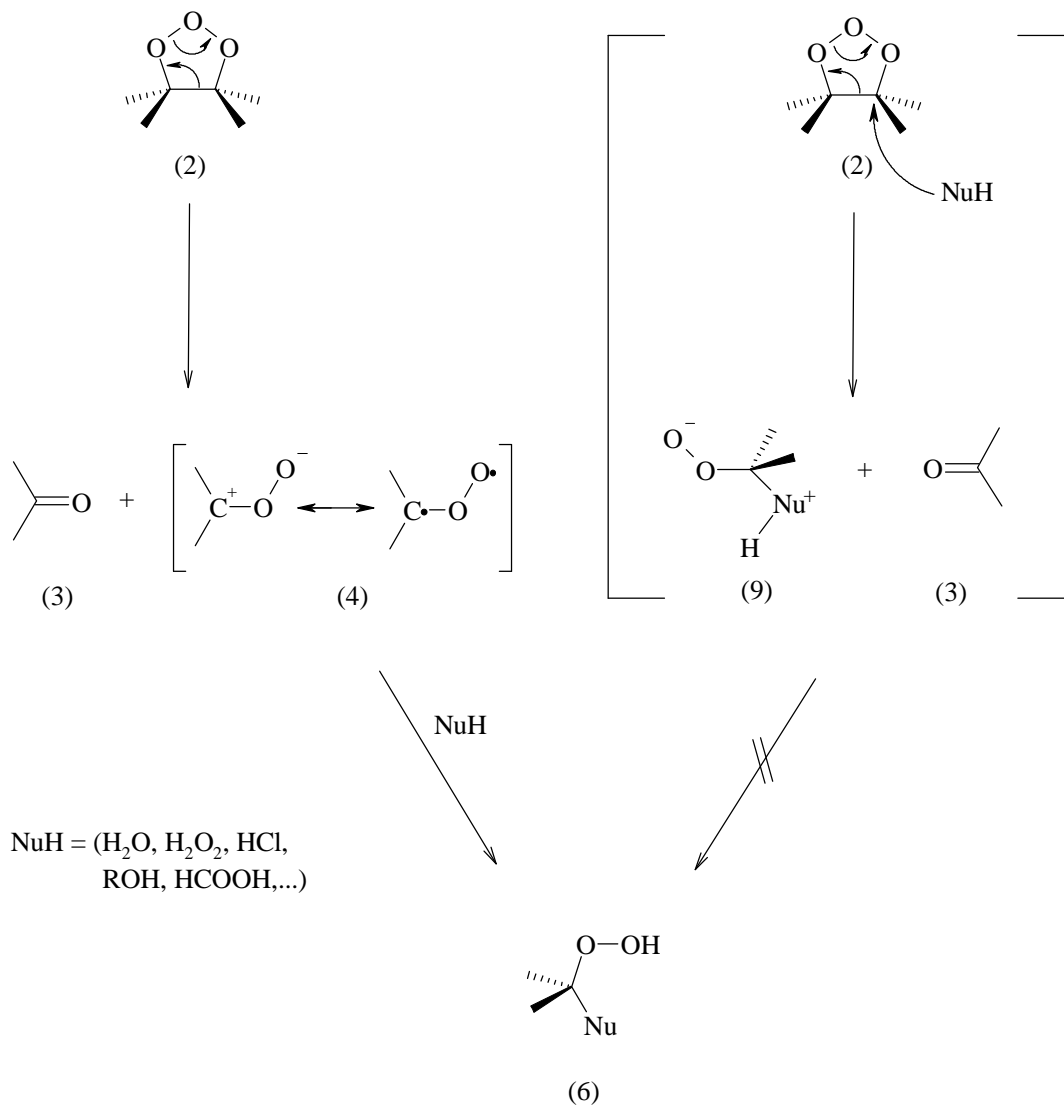


Abbildung 1: Zeitlicher Verlauf der Konzentrationen von H_2O_2 , HMHP und BHMP in der Reaktionsmischung

3.1.3 Alkoxyethylhydroperoxide

Ether (z. B. tert-Butylmethylether, Diethoxymethan) werden heute in Mischungsverhältnissen bis zu 25 % als Kraftstoffzusatz verwendet. Sowohl durch photochemische Oxidation von Emissionen (z. B. aus Umfüllvorgängen) als auch durch Verbrennung in Motoren können daraus möglicherweise Etherhydroperoxide (Alkoxyalkylhydroperoxide) entstehen. Zur systematischen HPLC-Untersuchung dieser Substanzklasse wurden in dieser Arbeit die homologen n-Alkoxyethylhydroperoxide (Methoxy- bis n-Butoxy-, sowie 2-Propoxy- und tert-Butoxyethylhydroperoxid) durch Ozonolyse von Olefinen in Gegenwart der entsprechenden Alkohole synthetisiert.

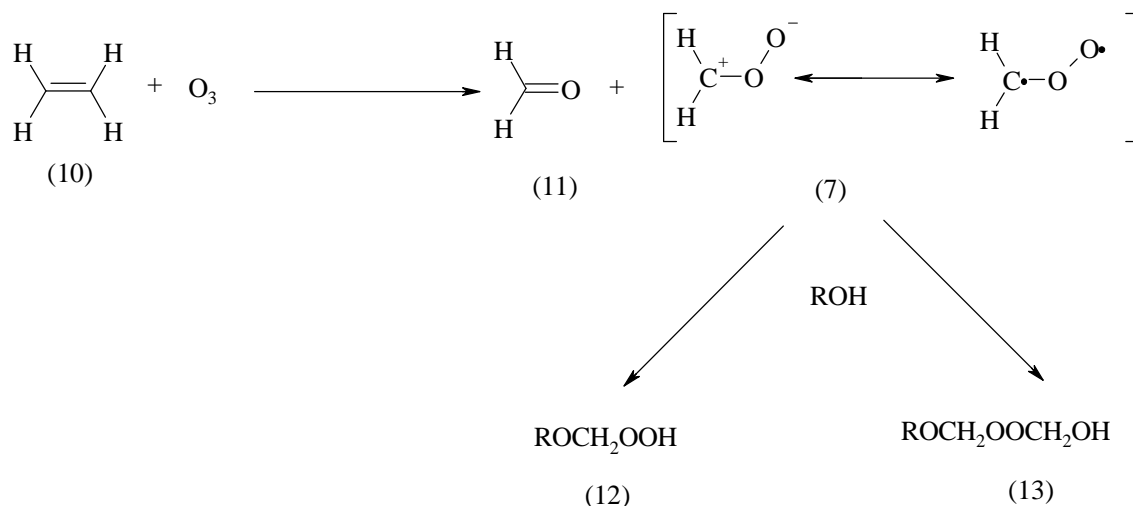
Bekanntlich entsteht bei der Ozonolyse von ungesättigten Kohlenwasserstoffen zunächst ein Primärozonid (1,2,3-Trioxolan), welches im weiteren Verlauf der Reaktion durch eine [2+3]-Cycloreversion in eine Carbonylverbindung und das reaktive Carbonyloxid (Criegee-Intermediat) zerfällt. Während sich in inerten Lösungsmitteln aus beiden Bruchstücken das Sekundärozonid (1,2,4-Trioxolan) bilden kann, entsteht in Gegenwart von Nucleophilen ein α -hetero-substituiertes Alkylhydroperoxid (Reaktionsschema 1, S. 8) (Bailey, 1978). Die Bildung der α -hetero-substituierten Alkylhydroperoxide (6) kann dabei theoretisch sowohl durch einen Angriff des Nucleophils (NuH) an das Primärozonid (2) wie auch an das Carbonyloxid (4) erfolgen (Reaktionsschema 9).



Reaktionsschema 9: Reaktionsverlauf zur Bildung α -hetero-substituierter Alkylhydroperoxide

Untersuchungen zeigten, daß bei der Ozonolyse von *trans*-1,2-Di-*tert*-butylethylen in methanolischer Lösung das entsprechende Methoxyalkylhydroperoxid (1-Methoxy-2,2-dimethyl-propylhydroperoxid) entsteht. Dagegen bewirkt die Zugabe von Methanol zu einer Lösung des entsprechenden Primärozonides (4,5-Di-*tert*-butyl-1,2,3-trioxolan) erst oberhalb der Zersetzungstemperatur eine Änderung des NMR-Spektrums. Aufgrund dieser Ergebnisse kann die Bildung der α -hetero-substituierten Alkylhydroperoxide über das Criegee-Intermediat (4) als wahrscheinlicher Mechanismus angesehen werden (Bailey, 1978).

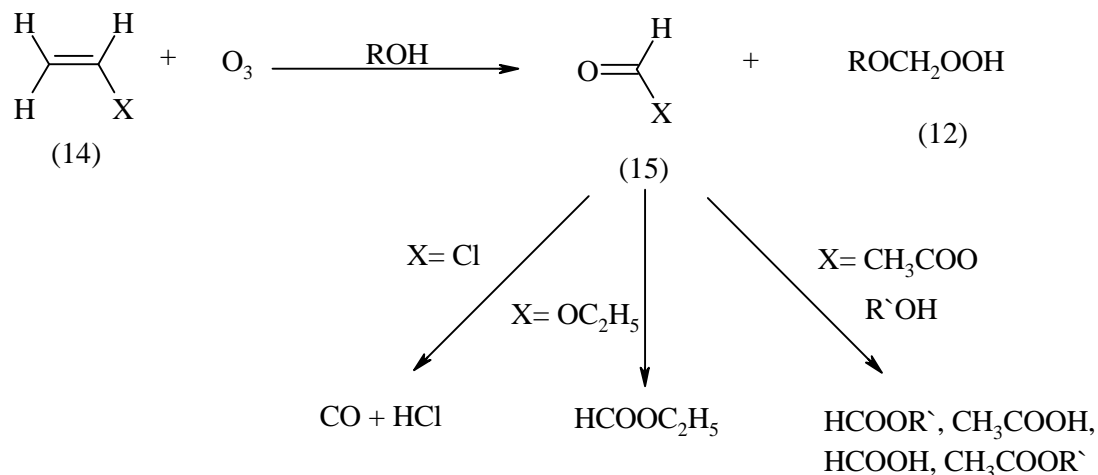
Durch die Verwendung unterschiedlich substituierter Olefine läßt sich die Spaltungsrichtung, aber auch die Art und somit die Reaktivität der entstehenden Carbonylverbindung beeinflussen. Zur Darstellung der Alkoxyethylhydroperoxide (12) kann z. B. Ethen (10) eingesetzt werden, was sich bei den Synthesen jedoch nicht bewährt hat. Zum einen ist Ethen vergleichsweise schwierig zu handhaben und zum anderen entsteht bei der Ozonolyse neben dem gewünschten CH_2OO die gleiche Menge an Formaldehyd (11), wodurch Hydroxymethylalkoxyethylperoxide (13) gebildet werden (Reaktionsschema 10) (Boddenberg, 1994).



Reaktionsschema 10: Bildung von Hydroxymethylalkoxyethylperoxiden bei der Ozonolyse von Ethen in alkoholischer Lösung

Um die Bildung dieser unerwünschten Nebenprodukte zu verhindern, können anstelle von Ethen Vinylchlorid oder, der einfacheren Handhabung wegen, Vinylacetat sowie

Alkylvinylether eingesetzt werden. Bei diesen Verbindungen erniedrigt sich aufgrund der geringeren Elektronendichte an der Doppelbindung zwar die Reaktionsgeschwindigkeit, es entstehen aber weniger reaktive Carbonylverbindungen, so daß die Bildung von Hydroxymethylalkoxymethylperoxiden (13) weitgehend verhindert wird (Meister et al., 1983; Boddenberg, 1994). Bei der Ozonolyse von Vinylchlorid in alkoholischer Lösung entstehen neben dem Alkoxymethylhydroperoxid Kohlenmonoxid und Chlorwasserstoff, während aus Ethylvinylether Ethylformiat und aus Vinylacetat, über das gemischte Anhydrid, Carbonsäure und Carbonsäureester (Reaktionsschema 11) gebildet werden.



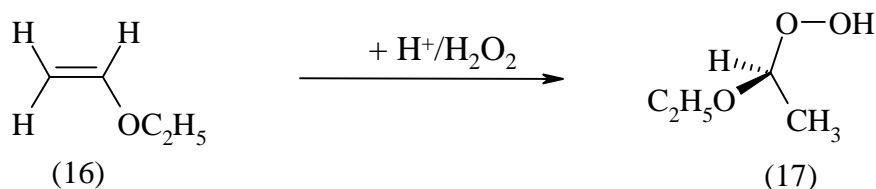
Reaktionsschema 11: Ozonolyse von substituierten Olefinen

Während die Ozonolyse von Ethylvinylether bei $-78\text{ }^\circ\text{C}$ in Gegenwart einfacher primärer und sekundärer Alkohole die entsprechenden Alkoxymethylhydroperoxide (Methoxy-, Ethoxy-, Propoxy-, 2-Propoxy-, n-Butoxymethylhydroperoxid) in ausreichender Reinheit lieferte, entstand in Gegenwart von tert-Butanol ein Gemisch von tert-Butoxymethylhydroperoxid und Hydroxymethyl-tert-butoxymethylperoxid im Verhältnis 1:1. Weitere Ozonolyseversuche zeigten, daß sich das Verhältnis der beiden Verbindungen zueinander in Abhängigkeit von der Reaktionstemperatur ändert. So konnte durch Anheben der Reaktionstemperatur auf $-20\text{ }^\circ\text{C}$ das Verhältnis von tert-Butoxymethylhydroperoxid zu Hydroxymethyl-tert-butoxymethylperoxid auf 5.3:1 erhöht werden.

3.1.3.1 1-Ethoxyethylhydroperoxid und 2-Hydroperoxytetrahydrofuran

Als weitere interessante Beispiele für α -Alkoxyalkylhydroperoxide wurden 1-Ethoxyethylhydroperoxid und 2-Hydroperoxytetrahydrofuran synthetisiert. Diese Hydroperoxide lassen sich verhältnismäßig einfach durch die weiter unten beschriebene Autoxidation der Ether, aber auch durch säurekatalysierte Addition von Wasserstoffperoxid an Vorstufen mit aktivierter Doppelbindung erhalten.

Die nucleophile Addition von Wasserstoffperoxid an Ethylvinylether ist eine elegante und einfache Synthese zur Herstellung von 1-Ethoxyethylhydroperoxid (Reaktionsschema 12) (Milas et al., 1954). Allerdings zeigten sowohl die früheren Untersuchungen als auch die in dieser Arbeit durchgeführten Synthesen, daß diese Darstellungsmöglichkeit nicht für alle Hydroperoxide geeignet ist.

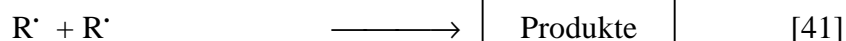
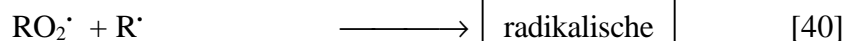
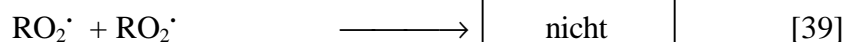
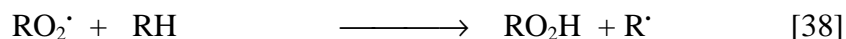
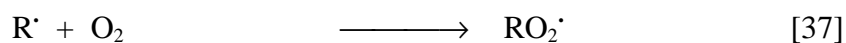
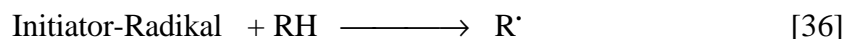
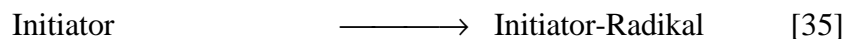


Reaktionsschema 12: Darstellung von 1-Ethoxyethylhydroperoxid durch Addition von H_2O_2 an Ethylvinylether

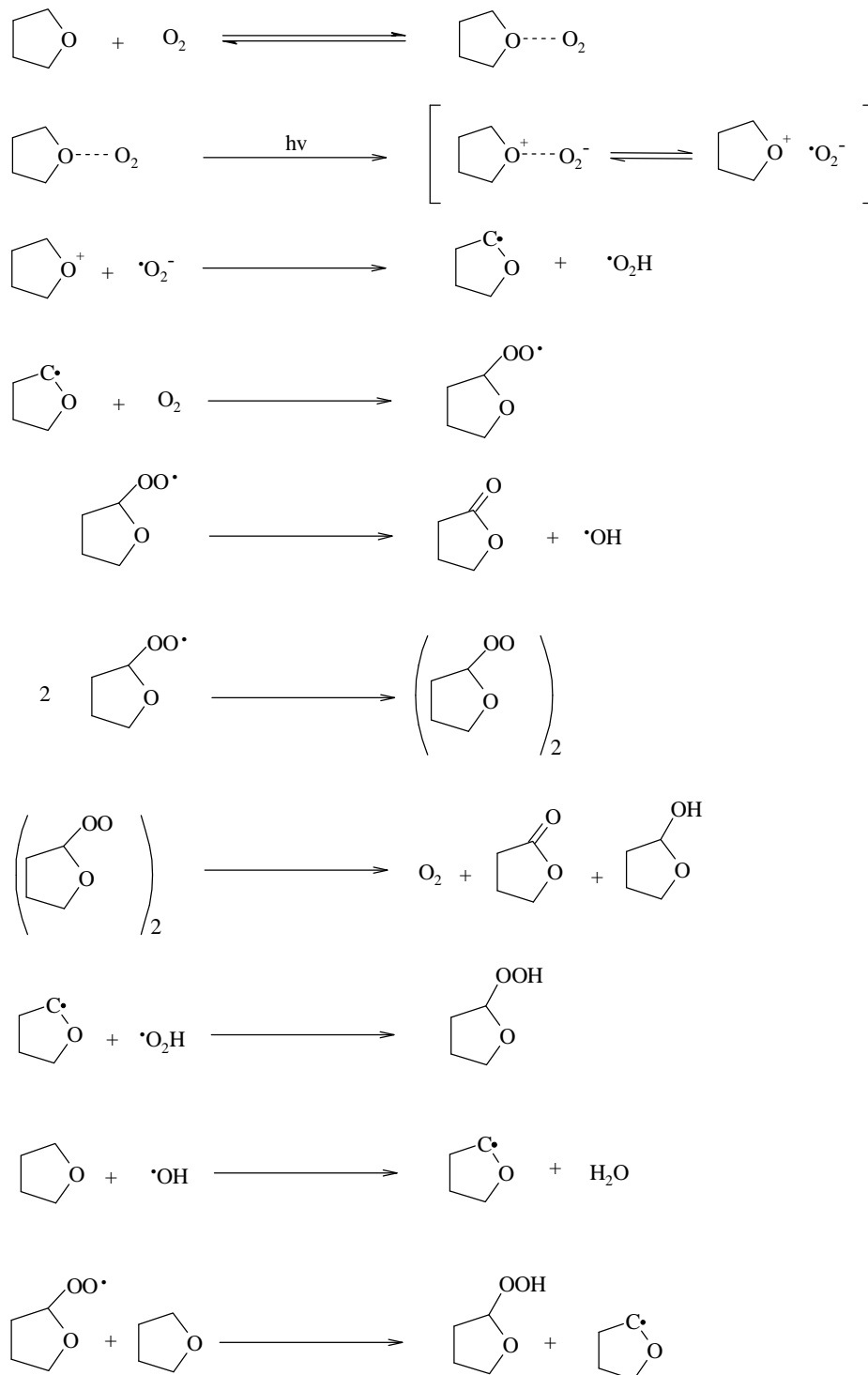
So konnte das 1-Ethoxyethylhydroperoxid mit einer Ausbeute von 23% und einer Reinheit von 93% leicht dargestellt werden, während sich durch die Addition von H_2O_2 an 2,3-Dihydrofuran das gewünschte 2-Hydroperoxytetrahydrofuran nur mit 3 %iger Ausbeute und einer Reinheit von 50 % isolieren ließ. Für letztere Verbindung wurde daher die alternative Darstellung durch Autoxidation von Tetrahydrofuran gewählt.

3.1.4 Tetralin-, 1-Phenylethylhydroperoxid und 2-Hydroperoxytetrahydrofuran

Die von einigen Lösungsmitteln, insbesondere von Ethern, bekannte Neigung zur Autoxidation kann zur einfachen Synthese von Hydroperoxiden genutzt werden. Die Autoxidation erfolgt bekanntlich über einen Radikal-Ketten-Mechanismus mit Kettenstart [35, 36], Kettenwachstum [37, 38] und Kettenabbruch [39-41].



Obwohl die Tendenz der Kohlenwasserstoffe zur Bildung von Hydroperoxiden wesentlich geringer ist als die der Ether, läßt sich die Oxidation einiger Kohlenwasserstoffe (z. B. Tetralin, Cumol, Anthracen, Ethylbenzol) zur Darstellung der entsprechenden Hydroperoxide nutzen. Allerdings sind die Ausbeuten beim Durchleiten von Sauerstoff durch Lösungen der Reinsubstanzen bei erhöhter Temperatur nur in einigen Fällen ausreichend hoch. Zur Erhöhung des Umsatzes können die für den Kettenstart notwendigen Radikale auch durch Bestrahlung oder Zugabe von Photosensibilisatoren bzw. Radikalbildnern (z. B. Fe-Salze, Benzophenon, Benzoylperoxid, 1,1'-Azobis-cyclohexanarbonitril) erzeugt werden (Schenk et al., 1963; Stec und Kulicki, 1992). Im Gegensatz zu den Kohlenwasserstoffen lassen sich viele Ether sehr leicht oxidieren, so daß auf die Zugabe von Radikalbildnern verzichtet werden kann und diese nach der Reaktion nicht mühsam entfernt werden müssen. Die zum Teil hochexplosiven Etherhydroperoxide sind hauptsächlich durch zahlreiche beim Einengen verursachte Unfälle sehr früh in das Interesse der Wissenschaft gerückt. Um die Mechanismen zur Bildung der Hydroperoxide und ihre Struktur aufzuklären, wurde die Autoxidation gründlich untersucht. Der zur Bildung des 2-Hydroperoxytetrahydrofurans vorgeschlagene Mechanismus geht von einem charge-transfer-Komplex aus THF und Sauerstoff aus, der nach Einwirkung von Licht die nötigen Radikale liefert (Reaktionsschema 13) (Stenberg et al., 1970).



Reaktionsschema 13: Mechanismus der Oxidation von Tetrahydrofuran

Die Autoxidation von Kohlenwasserstoffen bzw. Ethern wurde im Rahmen dieser Arbeit zur Darstellung von Tetralinhydroperoxid, 1-Phenylethylhydroperoxid und 2-Hydroperoxytetrahydrofuran genutzt.

3.2 HPLC-Methodenentwicklung

Im Kapitel 2.3.2 wurden bereits einige Reaktionssysteme beschrieben, die sich jedoch meist auf die Bestimmung von H_2O_2 und einigen reaktiven organischen Hydroperoxiden beschränken. Die Mehrzahl dieser Systeme findet in „Küvettenmethoden“ Anwendung, d.h. die Probe wird mit den Reagenzien versetzt und nach einer gewissen Reaktionszeit, die bis zu einigen Stunden betragen kann, photometrisch vermessen. Bei diesen Methoden muß im Gegensatz zu FIA- oder HPLC-Derivatisierungs- bzw. Reaktionsmethoden kein besonderer Anspruch an die Reaktionszeit gestellt werden. Es erscheint deshalb nicht verwunderlich, daß bisher nur wenige dieser Reaktionssysteme auf die FIA bzw. HPLC übertragen wurden. Andererseits liefern die beschriebenen Küvettenmethoden oft schon wichtige Daten über Mechanismus und Geschwindigkeit einer Reaktion und können somit als Grundlage für die Entwicklung neuer HPLC-Verfahren herangezogen werden.

Für die selektive und empfindliche Bestimmung von Hydroperoxiden mit nicht-enzymatischen HPLC-Nachsäulenreaktionssystemen müssen die in Frage kommenden Reaktionssysteme einige grundlegende Voraussetzungen erfüllen. Zunächst ist es erforderlich, daß die Hydroperoxide mit den eingesetzten Reagenzien zu Produkten umgesetzt werden, die mit den in der HPLC-Analytik gebräuchlichen Detektoren erfaßt werden können.. Diese Mindestanforderung an das Reaktionssystem wird durch das HPLC-System erweitert. Bei HPLC-Trennungen sind Kapillardurchmesser und Kapillarlänge zwischen Säule und Detektor möglichst klein zu halten, um Diffusionsvorgänge in diesem Bereich zu minimieren (Deelder et al., 1978). Sowohl sehr lange, großvolumige Kapillaren als auch Totvolumina durch nicht optimal geschaffene Verbindungen begünstigen die Peakverbreiterung, können die Trennung zunichte machen und verhindern somit die Speziation einzelner Komponenten. Bei der Verwendung von Nachsäulenderivatisierungs- oder Nachsäulenreaktions-Systemen ist jedoch aufgrund einer in der Regel erforderlichen Mindestreaktionszeit ein Nachsäulen-Reaktor notwendig. Im einfachsten Fall handelt es sich dabei um eine normale HPLC-Kapillare. In typischerweise verwendeten Reaktionskapillaren (ID = 0.13 - 0.78 mm und Längen bis zu 10 m) ergeben sich für die Substanzen relativ kurze

Aufenthaltszeiten, so daß die Nachsäulenreaktion möglichst rasch ablaufen muß (Abbildung 2).

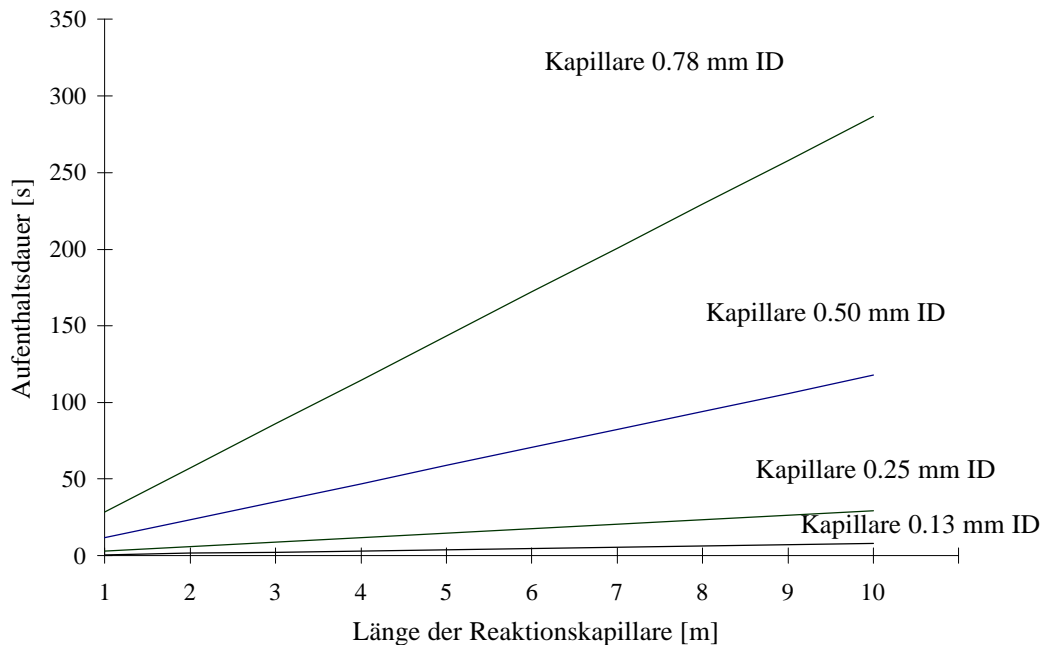


Abbildung 2: Aufenthaltsdauer einer Substanz im HPLC-Nachsäulenreaktionssystem in Abhängigkeit von Durchmesser und Länge der Reaktionskapillare (Fluß = 1 ml/min)

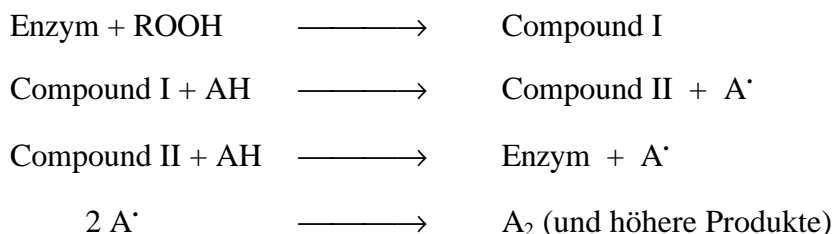
3.2.1 Voruntersuchungen

In den Voruntersuchungen sollte geklärt werden, welche Reagenzien sich aufgrund ihrer ausreichend schnellen Reaktion mit Hydroperoxiden für den Einsatz als Nachsäulenderivatisierungs-Reagenz eignen. Neben zahlreichen „Reagenzlastests“ wurden einige aussichtsreiche Reaktionen mit dem Fluoreszenz-HPLC-System II (Abbildung 49, S. 130) untersucht. Für die Untersuchungen mittels UV/VIS-Detektion wurde mit Ausnahme des Detektors das gleiche HPLC-System verwendet. Im Gegensatz zu diesen beiden Versuchsaufbauten wurde bei den Voruntersuchungen zu Chemilumineszenzreaktionen mit einem Chemilumineszenz-Detektor (S. 132) gearbeitet und wegen der schnellen Reaktions- und Chemilumineszenzabklingzeiten auf die Reaktionskapillare verzichtet. Um die Voruntersuchungen möglichst effektiv und ver-

gleichbar durchzuführen, wurden in der Regel Verdünnungen einer 100 mM H₂O₂-Lösung benutzt. Dabei wurde unterstellt, daß H₂O₂ im Vergleich zu den organischen Hydroperoxiden eine höhere Oxidationskraft besitzt. Konnte durch die Injektion der verdünnten H₂O₂-Lösungen ein ausreichender Response beobachtet werden, so wurden z. T. auch abschätzende Messungen mit einigen organischen Hydroperoxiden durchgeführt.

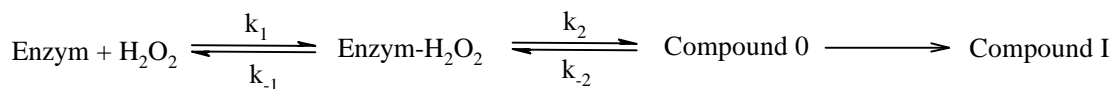
3.2.1.1 Fluoreszenzdetektion der Hydroperoxide über die Oxidation von *p*-Hydroxyphenyllessigsäure und Homovanillinsäure

Bei den bisher eingesetzten HPLC-Verfahren zur Bestimmung von hydrophilen Hydroperoxiden hat sich in erster Linie die enzymatische Oxidation von *p*-Hydroxyphenyllessigsäure (HRP/PES-System) als Nachsäulenderivatisierungsreaktion durchgesetzt (Reaktionsschema 5, S.21) (Hellpointner und Gäb, 1989; Kurth et al., 1991; Hewitt und Kok, 1991; Kok et al., 1995; Heinmöller et al., 1998). Für die Katalyse der Reaktion wird in der Regel Meerrettichperoxidase (HRP) oder Mikroperoxidase-11 (MP-11) eingesetzt (Lazrus, 1985; Kurth, 1992; Heinmöller, 1997; Heinmöller et al., 1998). Schon in den 50er Jahren wurde ein Mehrstufenmechanismus (Reaktionsschema 14) vorgeschlagen, in dessen ersten Schritt die Hydroperoxide und HRP das fälschlicherweise oft als Komplex bezeichnete Intermediat Compound I bilden (Chance, 1952; Theorell et al., 1952; Marklund, 1971; Dunford und Stillmann, 1976). Tatsächlich handelt es sich bei Compound I und auch der im zweiten Schritt gebildeten Compound II um Zwischenstufen mit zweifach bzw. einfach oxidiertem Zentrum (Schonbaum und Lo, 1972; Frew und Jones, 1984).



Reaktionsschema 14: Mechanismus der enzymatischen Umsetzung von Hydroperoxiden

Neuere Untersuchungen des H_2O_2 /Enzym-Mechanismus zeigen, daß die Bildung von Compound I wahrscheinlich über eine bzw. zwei weitere Zwischenstufen erfolgt. Aufgrund der Ergebnisse von spektroskopischen und kinetischen Messungen postulieren Baek und van Wart, daß sich zunächst ein Komplex aus Enzym und Hydroperoxid bildet, der mit einer oxidierten Form des Enzyms (Compound 0) im Gleichgewicht steht und erst dann in Compound I übergeht (Reaktionsschema 15). Obwohl die gemessenen Daten den postulierten Mechanismus nicht ausschließen, weisen die Autoren selbstkritisch auf die geringe Wahrscheinlichkeit einer reversiblen Oxidation hin und erwägen die Möglichkeit weiterer, bisher nicht bekannter Mechanismen (Baek und van Wart, 1989).



Reaktionsschema 15: Zwischenstufen bei der Bildung von Compound I

Die Meerrettichperoxidase besitzt als prosthetische Gruppe das Ferriprotoporphyrin IX (Dunford und Stillman, 1976). Die häufig angenommene Anlagerung von H_2O ist in Abbildung 3 dargestellt (Frew und Jones, 1984).

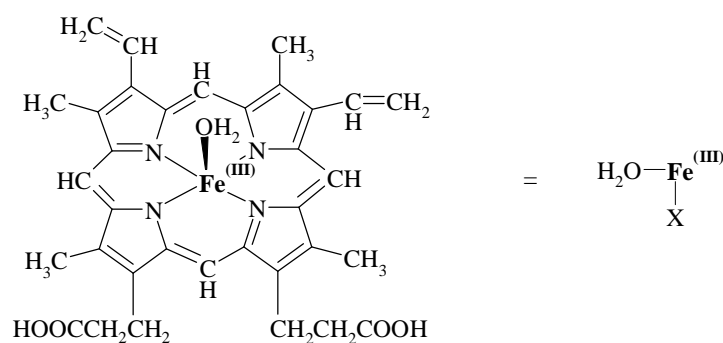
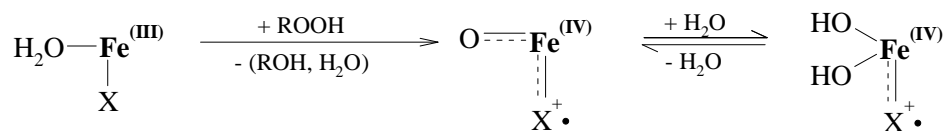


Abbildung 3: Struktur des Ferriprotoporphyrins IX

Durch die Oxidation des nativen Enzyms bildet sich aus dem Fe^{III} -Porphyrinderivat formal eine Fe^{V} -Verbindung. Spektroskopische Messungen haben jedoch gezeigt, daß es sich bei der grünen Compound I um ein sechsfach-kordiniertes Fe^{IV} -Porphyrin- π -

Radikalkation handelt. Bei der Bildung dieses Fe^{IV} -Porphyrin- π -Radikalkation abstrahiert demnach sowohl das Porphyringerüst als auch das Eisenatom ein Elektron (Reaktionsschema 16) (Schonbaum und Lo, 1971; Wang et al., 1991).



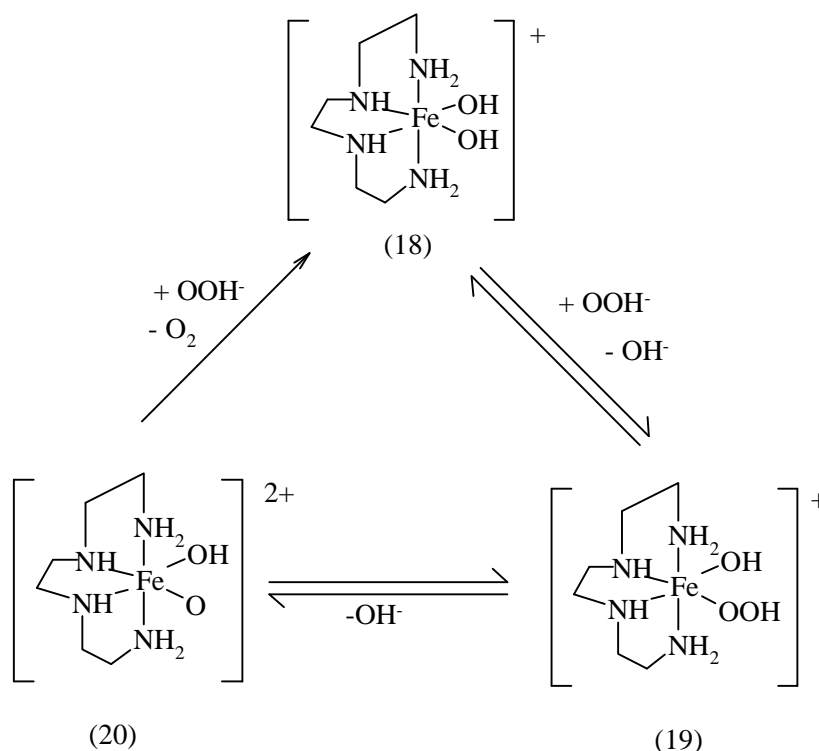
Reaktionsschema 16: Bildung des Fe^{IV} -Porphyrin- ρ -Radikalkations bei der Reaktion von Hydroperoxiden mit Enzymen

Durch die Donorsubstanz (AH, Reaktionsschema 14) erfolgt unter Beteiligung des Proteingerüsts die Ladungsneutralisation des Fe^{IV} -Porphyrin- π -Radikalkations unter Bildung des roten Intermediates Compound II, welches durch Reaktion mit einem weiteren Donormolekül wieder das native Enzym bildet (Roberts et al., 1981; Hashimoto et al., 1986; Oertling und Babcock, 1988; Wang et al., 1991). Die Donorsubstanzen, bei denen es sich meist um Phenole oder aromatische Amine handelt, werden unter gleichzeitiger Abgabe eines Protons oxidiert (Job und Dunford, 1976). Die dabei entstehenden Radikale führen, in Abhängigkeit von ihrer Art, Reaktionszeit und Konzentration, zur Bildung von Dimeren oder höheren Produkten, die zum Teil isoliert und spektroskopisch untersucht wurden (Gross und Sizer, 1959; Corrodi und Werdinius, 1965; Potter et al., 1985). Da sich die Fluoreszenz des Dimeren und die des eingesetzten Reagenzes stark unterscheiden, können die mit Meerrettichperoxidase katalysierten Oxidationen von phenolischen Substraten als fluorimetrisches Reaktionssystem eingesetzt werden. Frühere Untersuchungen zeigten jedoch, daß die obige Reaktion nicht zur Detektion sterisch anspruchsvoller Hydroperoxide (z. B. tert-Butylhydroperoxid) geeignet ist (Kurth, 1992). Die fehlende Reaktivität der Meerrettichperoxidase gegenüber diesen Hydroperoxiden ist wahrscheinlich auf die Tertiärstruktur des Enzyms sowie einen „ligand-access-channel“, der die Erreichbarkeit des aktiven Zentrums steuert, zurückzuführen (Welinder, 1985).

Da sich mit dem Meerrettichperoxidase/p-Hydroxyphenylelessigsäure-Reaktionssystem bisher schon gute Ergebnisse bei der Bestimmung von H_2O_2 erreichen ließen, war es

naheliegender, die Oxidation von p-Hydroxyphenyllessigsäure unter Verwendung weiterer Katalysatoren zu testen, um somit auch die Detektion von sekundären oder tertiären Hydroperoxiden zu ermöglichen. Als Katalysatoren kamen dabei neben weiteren Enzymen wie Cytochrom c auch Metallsalze und Substanzen mit einer den Enzymen entsprechenden Aktivität wie z. B. Eisenkomplexe, Hämatin und Mikroperoxidasen in Frage. Diese Substanzen können zum Teil ebenso wie Peroxidasen hochvalente Eisen-Oxo-Komplexe bilden, die den Intermediaten Compound I bzw. II ähneln und werden beispielsweise bei der Analyse von Hydroperoxiden über die Luminol-Chemilumineszenz-Messung verwendet (z. B. Burdo und Seitz, 1975; Miyazawa et al., 1987a, b; Osman et al., 1996; Matthäus et al., 1994). Bei vorangegangenen Untersuchungen mit p-Hydroxyphenyllessigsäure, in welchen Meerrettichperoxidase durch das Häminundecapeptid Mikroperoxidase (MP-11) ersetzt wurde, ließen sich auch Hydroperoxide beliebiger Konstitution umsetzen (Kurth, 1992; Heinmöller, 1997; Heinmöller et al., 1998). Ein entscheidender Nachteil der dabei verwendeten MP-11 gegenüber der Meerrettichperoxidase ist jedoch die um zwei Größenordnungen geringere katalytische Aktivität, die zu einer Erhöhung der Nachweisgrenzen für alle Hydroperoxide führt (Palès et al., 1955; Kurth et al., 1992). So liegen die mit MP-11 erreichbaren Nachweisgrenzen für die sekundären Alkylhydroperoxide 2-Butyl- und 3-Pentylhydroperoxid bei 13.8 bzw. 17.7 $\mu\text{mol/l}$ und somit etwa um Faktor 1.5 über den mit Meerrettichperoxidase erreichten Nachweisgrenzen (9.5 bzw. 12.3 $\mu\text{mol/l}$) (Heinmöller, 1997). Im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Vorversuche, bei denen im Fluoreszenz-HPLC-System I die Meerrettichperoxidase durch gleiche Mengen Co^{2+} , $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, Hemin, Hämatin oder Cytochrom c ersetzt wurde, ergaben mit H_2O_2 -Lösungen (Konzentration $\geq 1 \text{ mmol/l}$) keine oder nur sehr kleine Signale. Als weiteres wurde versucht, die Reaktion durch einen Eisen(III)-triethylentetramin-Komplex (TETA-Fe^{3+}) zu katalysieren. Während erste Untersuchungen (Wang, 1955a) lediglich zeigten, daß dieser Komplex ebenso wie Katalase in kurzer Zeit erhebliche Mengen H_2O_2 zu zersetzen vermag, beobachteten Ebermann und Couperus (1987) eine starke Peroxidaseaktivität, die sie zum Nachweis von H_2O_2 , tert-Butyl- und Linolensäurehydroperoxid mit Homovanillinsäure nutzten. Der Mechanismus der Katalase-ähnlichen Aktivität kann analog dem der enzymatischen Katalyse über mehrere Zwischenstufen beschrieben werden

(Reaktionsschema 17). In alkalischer Lösung liegt ein oktaedrischer (TETA)- $\text{Fe}(\text{OH})_2^+$ -Komplex (18) vor, der mit H_2O_2 einen instabilen $(\text{TETA})\text{Fe}(\text{OOH})(\text{OH})^+$ -Komplex (19) bildet, welcher sich durch die Spaltung der O-OH-Bindung und Bildung einer stabileren Fe-O-Bindung zu (20) stabilisiert. Durch Reaktion des Komplexes (20) mit weiterem H_2O_2 entsteht neben O_2 der ursprüngliche $(\text{TETA})\text{Fe}(\text{OH})_2^+$ -Komplex (Wang, 1955b; Jarnagin und Wang, 1958).



Reaktionsschema 17: Mechanismus der H_2O_2 -Zersetzung des TETA-Fe^{3+} -Komplexes

In ersten Untersuchungen wurden entsprechend der Küvettenmethode von Ebermann und Couperous (1987) Lösungen von 16 bis 80 mg Homovanillinsäure bzw. p-Hydroxyphenylelessigsäure in Boratpuffer pH 9.8 mit unterschiedlichen Mengen einer TETA-Fe^{3+} -Stammlösung versetzt und am Fluoreszenz-HPLC-System II als Reagenzienlösung verwendet. Selbst bei Temperaturerhöhung der Nachsäulenreaktionskapillare auf 65 °C ergab die Injektion von H_2O_2 -Stammlösungen bis zu Konzentrationen von 100 mmol/l keine Signale. Die Diskrepanz zwischen der fehlenden Empfindlichkeit des HPLC-Systems gegenüber der von Ebermann und Couperous (1987) erreichten läßt sich mit den unterschiedlichen Reaktionszeiten

erklären. Während durch die im Fluoreszenz-HPLC-System II verwendeten Reaktionskapillaren ($L = 4 \text{ m}$, $ID = 0.25 \text{ mm}$) bei einem Eluenten- und Reagenzienfluß von insgesamt 1 ml/min eine Reaktionszeit von nur 11.8 s zur Verfügung steht, kann bei der „Küvettenmethode“ eine Reaktionszeit von $\geq 8 \text{ min}$ genutzt werden, die, wie die kinetische Messung der Reaktion zeigt, auch notwendig ist (Abbildung 4). Von weiteren Versuchen mit Kapillaren größeren Innendurchmessers wurde aufgrund der zu erwartenden Peakverbreiterung und der schon von Ebermann und Couperous (1987) beschriebenen schlechteren Empfindlichkeit für die organischen Hydroperoxide abgesehen.

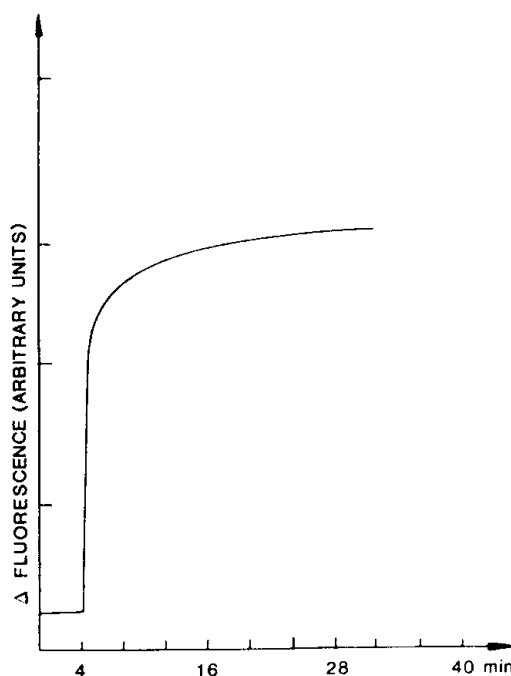
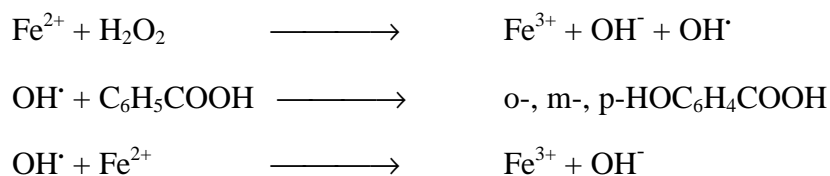


Abbildung 4: Zeitverlauf der Fluoreszenz im HVA/TETA- Fe^{3+} -System nach Zugabe von H_2O_2 (10^{-2} M) (Ebermann und Couperous, 1987)

3.2.1.2 Fluoreszenzdetektion der Hydroperoxide über die Oxidation von Benzoessäure

Obwohl die HRP/PES-Reaktion in Methoden zur Bestimmung atmosphärischer Hydroperoxide häufig angewandt wurde und bei zahlreichen Untersuchungen gute Ergebnisse lieferte, wird schon seit längerer Zeit versucht, einfachere Methoden mit nichtenzymatischen Reaktionssystemen zu entwickeln. Aufgrund der theoretischen

und meßtechnischen Gegebenheiten ist die Fluoreszenzdetektion in der Regel empfindlicher als die UV/VIS-Detektion. Als nichtenzymatisches FIA-Reaktionssystem zur Bestimmung von H_2O_2 wurde in einigen Arbeiten die Eisen(II)-katalysierte Oxidation von Benzoesäure eingesetzt (Lee et al., 1990, 1994; Weinstein-Lloyd und Lee, 1995). Die dabei gebildeten Hydroxybenzoesäuren lassen sich mittels Fluoreszenzdetektion nachweisen. Dem Reaktionssystem liegt die schon lange bekannte Fenton-Reaktion zugrunde, bei der durch H_2O_2 und Eisen(II)ionen OH-Radikale gebildet werden, die schließlich zur Hydroxylierung der Benzoesäure führen (Reaktionsschema 18) (Fenton, 1894; Walling, 1974; Prousek, 1995).



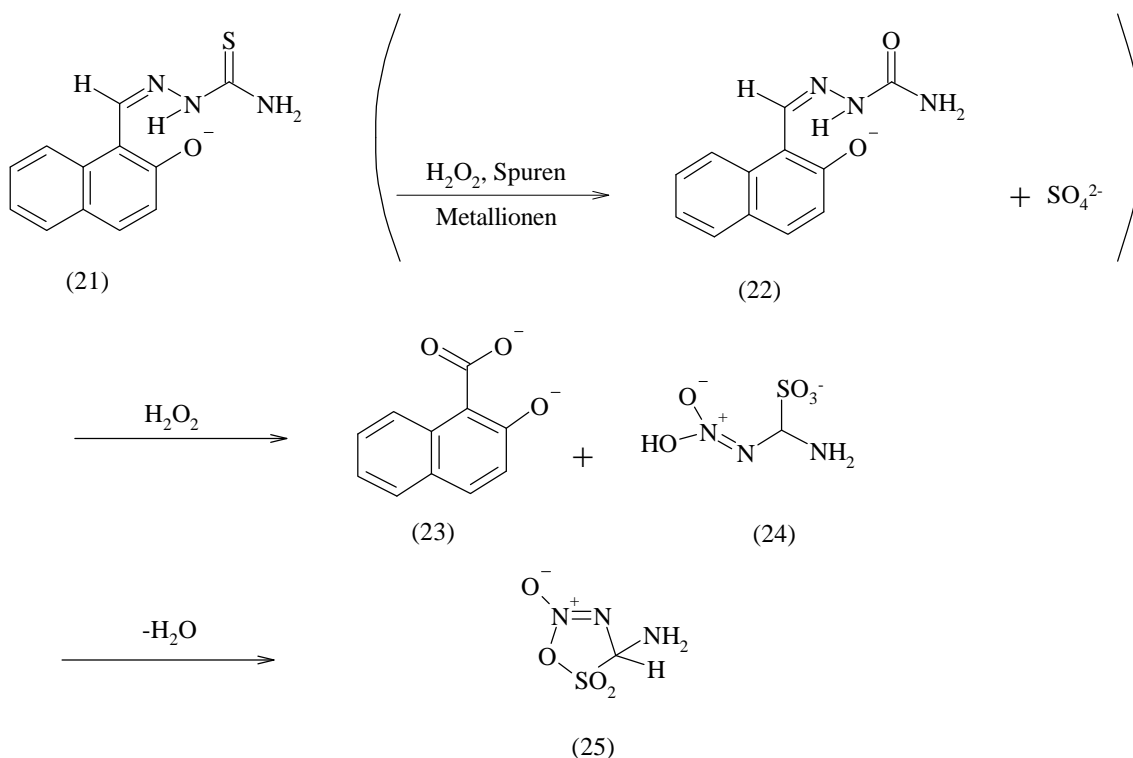
Reaktionsschema 18: Die Fenton-Benzoesäurereaktion

Bei der Reaktion bilden sich alle drei Isomeren der Hydroxybenzoesäure. Die Fluoreszenz der Isomeren unterscheidet sich jedoch sehr stark; so ist das p-Isomer nicht fluoreszenzaktiv, das o-Isomer fluoresziert bereits bei einem pH-Wert von 5.5, während das m-Isomer erst bei einem pH-Wert von 12 eine Fluoreszenz zeigt (Thommes und Leininger, 1958). Erste Versuche, die Fenton-Benzoesäurereaktion als Nachsäulenreaktion in der HPLC einzusetzen, schienen zumindest für die Bestimmung von H_2O_2 vielversprechend. Die Injektionen 10 $\mu\text{molarer}$ Wasserstoffperoxidlösung erzeugten in etwa gleich hohe Signale wie im Fluoreszenz-HPLC-System mit HRP/PES. Allerdings verstopften aufgrund des in alkalischer Lösung ausfallenden Eisen(III)hydroxides sowohl die Meßzelle als auch die Kapillaren, so daß das Meßsystem in der Regel nicht mehr als fünf Injektionen überstand. Sowohl dieses Problem, das auch mit dem FIA-Gerät auftrat, als auch das Quenchen der Fluoreszenz durch Eisen(III) bewegten Lee et al. dazu, die Fluoreszenz bei niedrigen pH-Werten durch Komplexierung der Hydroxybenzoesäuren mit Aluminium(III) zu erhöhen (Caponis, 1992; Lee et al., 1994). Obwohl die Schwierigkeiten damit hätten beseitigt werden können, wurde wegen der schlechteren Empfindlichkeit gegenüber organischen

Hydroperoxiden, MHP erzeugt lediglich 20 % des H_2O_2 -Signals, von weiteren Versuchen mit diesem Reaktionssystem abgesehen (Lee et al., 1994).

3.2.1.3 *Fluoreszenzdetektion der Hydroperoxide über die Oxidation von 2-Hydroxynaphthaldehyd-thiosemicarbazon*

Eine weitere nichtenzymatische Reaktion zur Bestimmung von H_2O_2 in Kaffee, Tee und Milch ist die Mangan(II)-katalysierte Oxidation von 2-Hydroxynaphthaldehyd-thiosemicarbazon (Peinado et al., 1986). Ähnlich wie viele andere Methoden, die heute zur Bestimmung von Hydroperoxiden dienen, wurde diese ursprünglich zur Analyse von Metallionen genutzt (Moreno et al., 1983; Pèrez-Bendito et al., 1984). So konnten mit dem oben genannten sowie weiteren Thiosemicarbazonen (z. B. 2-Hydroxybenzaldehyd-thiosemicarbazon) neben Mangan- auch Eisen- und Osmium-Ionen in Konzentrationen bis zu 10^{-7} mol/l bestimmt werden (Guzman et al., 1976; Moreno et al., 1984). Die Untersuchung der Fe(II)-katalysierten Oxidation von 2-Hydroxybenzaldehyd-thiosemicarbazon, bei ausreichend hohen H_2O_2 -Konzentrationen (1 mg/ml), zeigte, daß sich nach hydrolytischer Spaltung der C=N-Bindung neben dem Dianion der Hydroxybenzoesäure über das Thiosemicarbazon-S,S,S-trioxid das stark fluoreszierende ($\lambda_{\text{ex}} = 365$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 440$ nm) 2-N-Oxid des 4-Amino-5,5-dioxo-1,5-oxathia-4-hydro-2,3-diazols (25) bildet. Demgegenüber ergaben die Untersuchungen, daß in Gegenwart von Spuren an H_2O_2 als stabile Zwischenstufe lediglich das ebenfalls fluoreszierende ($\lambda_{\text{ex}} = 365$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 440$ nm) 2-Hydroxybenzoesäure-semicarbazon entsteht (Moreno et al., 1983). Während sich die Bildung des Thiosemicarbazon-S,S,S-trioxids mit früheren Untersuchungen von Walter und Rohloff (1975) deckt, erscheint das von Moreno et al. als Zwischenstufe gefundene 2-Hydroxybenzoesäure-semicarbazon bzw. dessen oxidative Reaktion mit SO_4^{2-} unter Bildung des Thiosemicarbazon-S,S,S-trioxids als eher fragwürdig (Hoggarth, 1951; Walter und Rohloff, 1975, 1977a-c; Moreno et al., 1983). Der entsprechende Mechanismus für das in den Vorversuchen eingesetzte 2-Hydroxynaphthaldehyd-thiosemicarbazon (21) ist im Reaktionsschema 19 dargestellt.



Reaktionsschema 19: Mangan(II)-katalysierte Oxidation von 2-Hydroxynaphthaldehyd-thiosemicarbazon

Das für die Reaktion notwendige 2-Hydroxynaphthaldehyd-thiosemicarbazon wurde in dieser Arbeit in Anlehnung an die Methode von Sah und Daniels (1950) als Reinsubstanz dargestellt und als methanolische Reagenzienlösung in der HPLC eingesetzt. Mit einer den Bedingungen von Peinado entsprechenden Nachsäulen-Reagenzienlösung führten Injektion von 20 μl 100 μM H_2O_2 -Lösung zu Signalen, die um den Faktor drei über der aus dem Signal/Rauschverhältnis abschätzbaren Nachweisgrenze lagen. Diese relativ geringe Empfindlichkeit zeigte sich auch gegenüber einfachen Alkylhydroperoxiden wie MHP und EHP.

3.2.1.4 UV/VIS-Detektion über den Eisen(III)-Xylenorange-Komplex

Neben Variationen am HRP/PES-Reaktionssystem und Versuchen, die Fenton-Benzoesäure-Reaktion oder die Mangan(II)-katalysierte Oxidation von 2-Hydroxynaphthaldehyd-thiosemicarbazon als fluorimetrische Nachsäulenreaktionssysteme in der

HPLC einzusetzen, wurden im Rahmen dieser Arbeit auch UV/VIS-Systeme auf ihre Eignung zur empfindlichen Detektion von Hydroperoxiden untersucht. Eine Möglichkeit, chromophore Substanzen zu erzeugen, beruht auf der Oxidation von Eisen(II) zu Eisen(III) und der Bildung eines farbigen Fe(III)-Xylenolorange-Komplexes (Abbildung 5). Das Reaktionssystem wurde in früheren Untersuchungen als „Küvettenmethode“ zum Nachweis von H₂O₂, Hydroperoxiden und Peroxiden in bestrahlten Lösungen und in neuerer Zeit auch als sogenannter FOX-Test (ferrous oxidation in xylenol orange) zur Summenbestimmung von Lipidhydroperoxiden eingesetzt (Gupta, 1973; Michaels und Hunt, 1978; Jiang et al., 1991, 1992; Nourooz-Zadeh et al., 1994, 1995; Heinmöller, 1997).

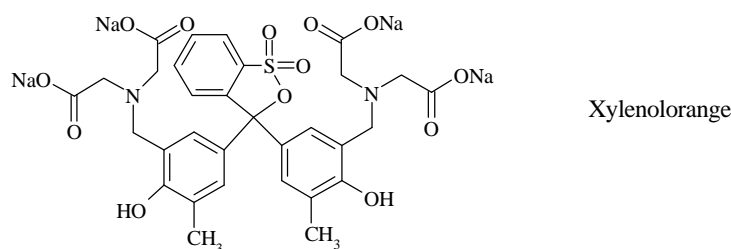
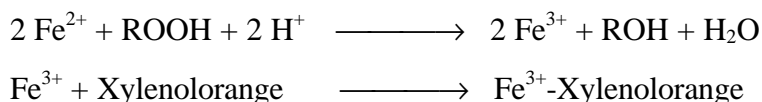


Abbildung 5: UV/VIS-Detektion von Hydroperoxiden durch Bildung des farbigen Eisen(III)-Xylenolorange-Komplexes

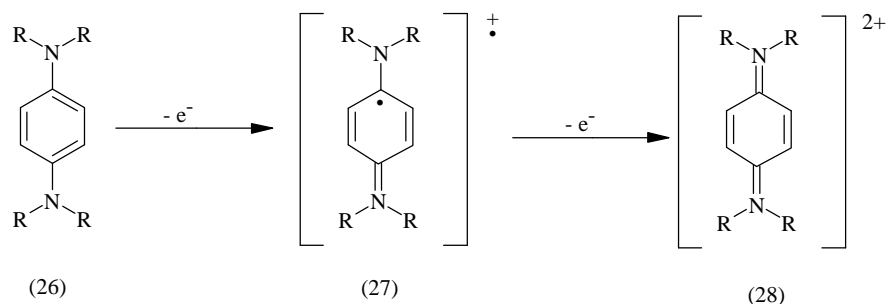
Im Gegensatz zu den katalytischen Verfahren dient Eisen(II) hierbei nicht als Katalysator, sondern als Reagenz, welches nach Oxidation durch Hydroperoxide als Eisen(III)-Xylenolorange-Komplex detektiert wird.

Interessanterweise wurde diese Reaktion schon 1990 als HPLC-Nachsäulenreaktion zur Bestimmung von Thymidinhydroperoxiden, die bei der OH-induzierten Oxidation von DNA entstehen, eingesetzt (Wagner et al., 1990). Vorversuche mit dem von Wagner beschriebenen System zeigten sehr gute Ergebnisse; bei weiteren Untersuchungen konnte Heinmöller (1997) mit einem leicht modifizierten System lipophile Alkylhydroperoxide und Lipidhydroperoxide bestimmen. Die dabei erhaltenen Nachweisgrenzen lagen mit 1.24 µmol/l für C₁₄H₂₉OOH und 4.78 µmol/l für C₁₈H₃₇OOH

nur um den Faktor vier über den mit Meerrettichperoxidase erreichten Nachweisgrenzen (Heinmöller, 1997).

3.2.1.5 UV/VIS-Detektion von Hydroperoxiden über die Eisen(II)-katalysierte Oxidation von substituierten Phenylendiaminen

Als ein aussichtsreiches Nachsäulenreaktionssystem zur UV/VIS-Detektion von Hydroperoxiden wurde die Eisen(II)-katalysierte Oxidation von para-substituierten Phenylendiaminen untersucht. Durch die Oxidation entstehen intensiv farbige Verbindungen, die aufgrund dieser Eigenschaft schon früh im Interesse der Wissenschaft standen. Obwohl die aus N,N-Dimethyl-p-phenylendiamin (DMPD) und N,N-Diethyl-p-phenylendiamin (DEPD) entstehenden Intermediate, die nach ihrem Entdecker auch als „Wursters Rot“ bzw. „Wursters Blau“ benannt wurden, schon 1879 als Salze isoliert werden konnten, erkannte man die Radikalnatur dieser Spezies erst ein halbes Jahrhundert später (Wurster und Sendtner, 1879; Weitz, 1925; Michaelis, 1939; Nickel, 1978; Viehe et al., 1979). Durch intensive Forschung über die Oxidation der para-substituierten Phenylendiamine (26) weiß man heute, daß bei Abgabe eines Elektrons die sogenannten Semichinondiimine (27) entstehen. Bei diesen Verbindungen handelt es sich um persistente Radikalkationen, deren außerordentlich große Lebensdauer auf einen capto-dativen Substituenteneffekt zurückzuführen ist. Die Stabilisierung der Radikale erfolgt dabei sowohl durch die Elektronenakzeptorgruppe (cpto) $^+NR_2$ als auch durch den als Elektronendonator (dato) wirkenden NR_2 -Substituenten und wird zusätzlich durch die Delokalisierung in das aromatische System verstärkt (Viehe et al., 1979).



Reaktionsschema 20: Oxidation von substituierten para-Phenylendiaminen

Aus den im sichtbaren Bereich stark absorbierenden Semichinondiiminien entstehen bei weiterer Oxidation Chinondiimine (28). Da diese, ebenso wie die eingesetzten Phenylendiamine keine Absorption im sichtbaren Bereich besitzen (Abbildung 6), muß für den Nachweis von Oxidantien (hier: H_2O_2 , ROOH, ROOR) eine ausreichende Menge an Phenylendiamin vorgelegt werden. Unter diesen Bedingungen entsteht eine unvollständig oxidierte Lösung, in der alle drei Verbindungen nebeneinander vorliegen. Durch die Synproportionierung von Phenylendiamin und Chinondiimin kann weiteres Semichinondiimin gebildet werden (Michaelis und Hill, 1933).

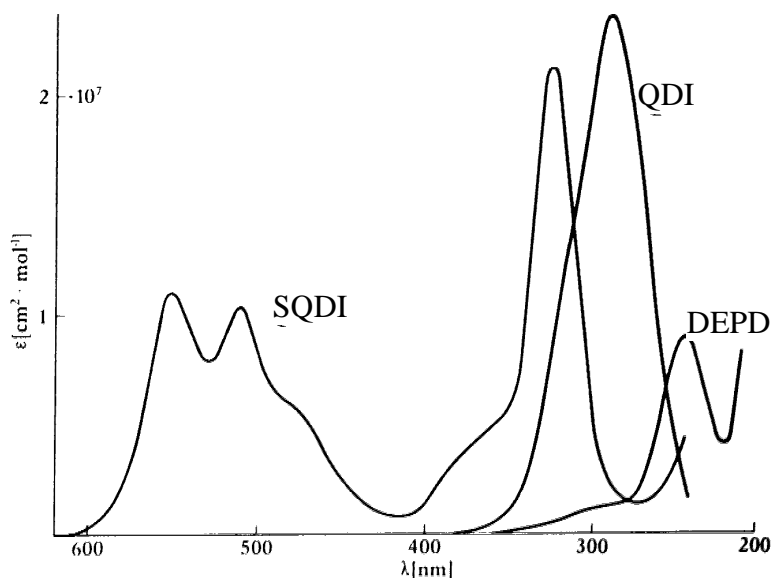


Abbildung 6: Absorptionsspektren von *N,N*-Diethyl-*p*-phenylendiamin (DEPD), seinem durch Oxidation gebildeten Semichinondiimin (SQDI) und Chinondiimin (QDI) (Nickel, 1978)

In der Analytik wird die Oxidation von *N,N*-Diethyl-*p*-phenylendiamin schon viele Jahre zur Bestimmung von freiem und gebundenem Chlor im Trinkwasser benutzt (Palin, 1957; Deutsche Einheitsverfahren, 1984). Daß sich die Reaktion auch zur Detektion anderer oxidierender Substanzen eignet, wurde schon in den frühen 60er Jahren entdeckt. So nutzte Dugan (1961) die Reaktion einer wäßrig/methanolischen Lösung von *N,N*-Dimethyl-*p*-phenylendiammoniumsulfat zur photometrischen Analyse von Lauroyl- und Benzoylperoxid. Weiterhin ermöglichte dieses Reagenz die Detektion von zahlreichen organischen Peroxiden und Hydroperoxiden sowie den

einfachen und schnellen Nachweis von Peroxidspuren in Ethern (Dugan, 1961; Dugan und O'Neill, 1963). Ferner wurden Lösungen von N,N-Dimethyl-p-phenylendiammoniumdihydrochlorid als empfindliches Sprühreagenz in der Dünnschichtchromatographie von Hydroperoxiden eingesetzt (Knappe und Peteri, 1962; Smith und Hill, 1972; Esser und Klockow, 1994; Miyazawa et al., 1995). In den späten 80er Jahren wurde die Oxidation von p-Phenylendiamin und substituierten p-Phenylendiaminen bei weiteren spurenanalytischen Verfahren verwendet. So läßt sich beispielsweise Formaldehyd aufgrund seiner katalytischen Wirkung auf die Oxidation von H₂O₂-haltigen p-Phenylendiamin- und N-Methyl-substituierten-p-phenylendiaminlösungen bestimmen (Evmiridis et al., 1987, 1990). Desweiteren konnte H₂O₂ in wäßrigen Lösungen durch die mit Meerrettichperoxidase katalysierte Oxidation von N,N-Diethyl-p-phenylendiamin mit einer Nachweisgrenze von 0.2 bis 0.3 µg/l bestimmt werden (Bader et al., 1988; Schick et al., 1997). Ebenso wie Meerrettichperoxidase vermögen auch Metallionen die Oxidation von Phenylendiaminlösungen zu katalysieren. Obwohl diese Wirkung schon lange bekannt ist und sowohl Hirayama et al. (1988) als auch Kolotyrykina et al. (1995) mit wasserstoffperoxidhaltigen N,N-Dialkyl-p-phenylendiamin-Lösungen niedrige Eisen(III)-Konzentrationen mit einer Nachweisgrenze von bis zu 40 ng/l bestimmen konnten, wurde dieser zur Verfärbung der Reagenzienlösung führende und daher unerwünschte Effekt bisher nur selten zur Steigerung der Nachweisempfindlichkeit von Hydroperoxidmessungen ausgenutzt (Heitkamp et al., 1995; Mori et al., 1997).

Zur Abschätzung, ob die Oxidation von substituierten para-Phenylendiaminen mit Hydroperoxiden ausreichend schnell erfolgt und als HPLC-Nachsäulenreaktion eingesetzt werden kann, wurden zwei DMPD-Lösungen hergestellt. Lösung I enthielt 0.5 g DMPD und 0.1 g (NH₄)₂Fe(SO₄)₂·6H₂O in 250 ml 0.08 %iger H₂SO₄, Lösung II wurde ohne (NH₄)₂Fe(SO₄)₂ angesetzt. Nach Zugabe von 100 µl 1 mM H₂O₂-Lösung zu je 4 ml der Reagenzienlösungen wurde die Änderung der Extinktion photometrisch vermessen. Die erhaltenen Extinktions/Zeitverläufe zeigten, daß die Reaktion von H₂O₂ mit DMPD in Anwesenheit von Fe(II) schon nach wenigen Sekunden abgeschlossen ist, während die Extinktion der Reaktionslösung ohne Fe(II)-Zusatz über mehr als 20 Minuten nur sehr langsam anstieg (Abbildung 7).

Weitere photometrische Untersuchungen von H_2O_2 , tert-Butylhydroperoxid, Fettsäure- und Fettsäuremethylesterhydroperoxiden mit einer methanolischen N,N,N',N'-Tetramethyl-p-phenylendiamin-Lösung ergaben mit und ohne $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$ entsprechende zeitliche Verläufe der Extinktion. Die mit diesem Verfahren erreichten Nachweisgrenzen entsprechen denen der FOX-Methode (für die obigen Hydroperoxide 6.0 - 10.7 $\mu\text{mol/l}$) und liegen deutlich unter denen der I_3^- -Methode (20.9 - 25.0 $\mu\text{mol/l}$) (vgl. Heitkamp et al., 1995).

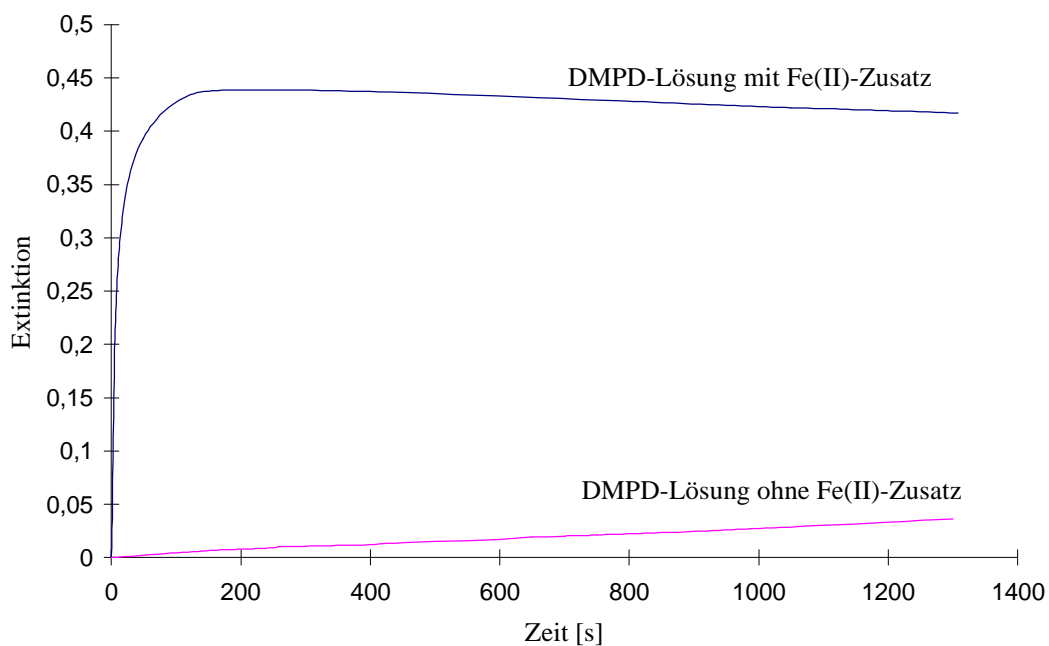


Abbildung 7: Änderung der Extinktion ($\lambda = 553 \text{ nm}$) einer DMPD-Lösung mit und ohne $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$ nach Zugabe von 100 μl 1 mM H_2O_2 -Lösung

Bei Verwendung der oben beschriebenen DMPD-Lösung ohne $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$ als HPLC-Nachsäulenreagenz (UV/VIS-HPLC-System I) zeigten Injektionen von 20 μl einer 1 mM H_2O_2 -Lösung deutliche Signale (Abbildung 8). Dieses in bezug auf die durchgeführten photometrischen Messungen unerwartete Ergebnis ist wahrscheinlich auf eine Katalyse an der Oberfläche der HPLC-Kapillaren oder durch gelöste Fe(II)/(III)-Ionen zurückzuführen. Nach Zugabe von $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$ zur Reagenzienlösung stieg das Grundrauschen leicht an; die bei erneuter Injektion erhaltenen Signale führten zur Überschreitung des Detektor-Meßbereichs (Abbildung 8). In

weiteren Untersuchungen mit 10 μM H_2O_2 - bzw. tert-Butylhydroperoxid-Lösungen wurden Signal/Rauschverhältnisse erhalten, die für das optimierte HPLC-System Nachweisgrenzen $< 1\mu\text{mol/l}$ erwarten ließen.

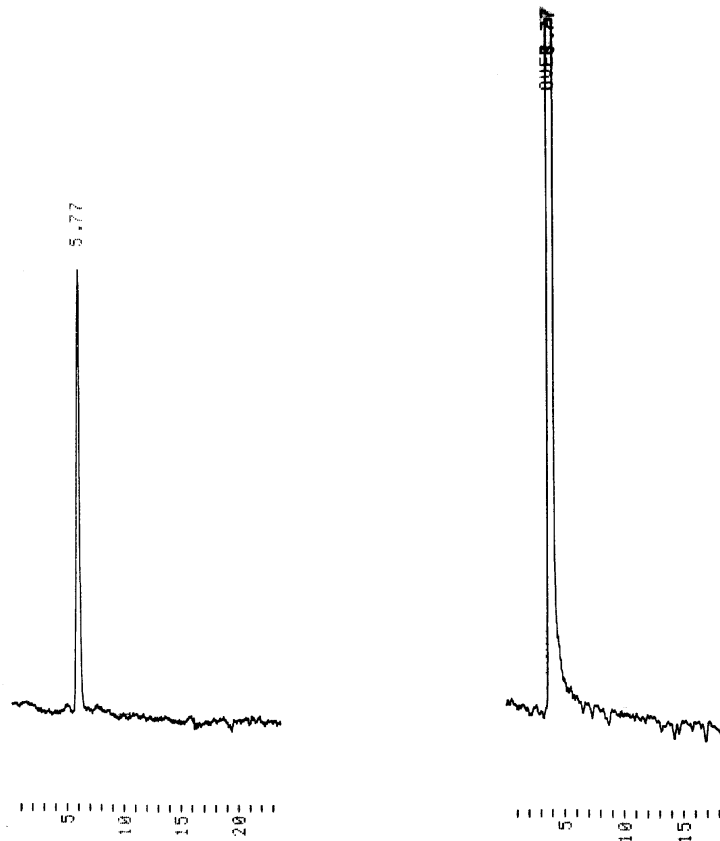


Abbildung 8: Vergleich der Signalintensitäten bei Verwendung einer *N,N*-Dimethyl-*p*-phenylendiaminlösung zur Nachsäulenreaktion (links ohne, rechts mit Fe(II) -Zusatz, Injektion 20 μl 1 mM H_2O_2 , identische Verstärkung)

3.2.1.6 Chemilumineszenzdetektion über die Luminol/Hematin-Reaktion

Aufgrund ihrer hohen Empfindlichkeit und Selektivität werden in der Hydroperoxidanalytik häufig Luminol- oder TCPO- Chemilumineszenz-Methoden eingesetzt. Da die in dieser Arbeit zu entwickelnden HPLC-Nachsäulenreaktions-Systeme auch die empfindliche Bestimmung von sterisch anspruchsvollen, organischen Hydroperoxiden ermöglichen sollten, konnte die auf H_2O_2 beschränkte TCPO-Chemilumineszenz-Reaktion (Reaktionsschema 4, S. 20) nicht eingesetzt werden. Weitere Einschrän-

kungen der zu untersuchenden Reagenzien ergaben sich durch frühere Arbeiten (Schroeder und Yeager, 1978), in denen Luminol (5-Amino-1,2,3,4-tetrahydrophthalazin-1,4-dion) unter gleichen Bedingungen eine zehn- bis zwanzigfach höhere Chemilumineszenzausbeute als sein Isomer Isoluminol (6-Amino-1,2,3,4-tetrahydrophthalazin-1,4-dion) zeigte. Aus diesen Gründen kam als Chemilumineszenzreagenz lediglich Luminol in Frage, welches mit einem effektiven Katalysator maximale Empfindlichkeit bei der Bestimmung von Hydroperoxiden zeigen sollte. Während bei den fluorimetrischen Verfahren überwiegend Meerrettich- oder Mikroperoxidase als Katalysator verwendet wird, findet bei den Chemilumineszenzverfahren eine große Zahl von Katalysatoren Anwendung (Lazrus, 1985, 1986; Kurth, 1992; Heinmöller, 1997). So wurde die Hydroperoxid/Luminol-Reaktion in zahlreichen Arbeiten mit Cytochrom c, Hematin, Metallionen, Metallkomplexen und organischen Substraten (z. B. Halomethane, Benzoldiazoniumfluoroborate) katalysiert (z. B. Burdo und Seitz, 1975; Yurow und Sass, 1976; Kricka und Thorpe, 1983; Kawasaki et al., 1985; Miyazawa et al., 1987a, b, 1995; Matthäus et al., 1994, 1995; Lebedeva und Ugarova, 1995; Heinmöller, 1997).

Bei den Voruntersuchungen dieser Arbeit kamen Co(II), Hematin und Cytochrom c als Katalysatoren in alkalisch gepufferter Lösung (20 mM Boratpuffer, pH 12.0) zum Einsatz. Erste HPLC-Untersuchungen erfolgten mit einer Luminol/Hematin-Reagenzienlösung (0.4 mM Luminol, 2 μ M Hematin bei pH 12.0) unter Verwendung eines Shodex CL 2-Chemilumineszenz-Detektors. Neben einem starken Untergrundrauschen des Systems ergaben die untersuchten Standards von H₂O₂, Cumolhydroperoxid, Linolsäurehydroperoxid, tert-Butylhydroperoxid, Di-tert-butylperoxid und Benzoylperoxid Signale mit deutlich unterschiedlicher Intensität. Während sich für Di-tert-butylperoxid aus dem Signal/Rauschverhältnis eine Nachweisgrenze von lediglich 10 mmol/l abschätzen ließ, ergaben 1 μ M Lösungen von Benzoylperoxid Signale, die deutlich über der Nachweisgrenze lagen. Für die organischen Hydroperoxide konnten Nachweisgrenzen von 15 μ mol/l (Cumolhydroperoxid), 5 μ mol/l (tert-Butylhydroperoxid), < 1 μ mol/l (Linolsäurehydroperoxid) und < 0.5 μ mol/l (Tetralinhydroperoxid) abgeschätzt werden. Obwohl für 10 μ M H₂O₂-Lösungen noch große Signale (350 000 FE) erhalten wurden, ließen die stark abnehmenden Signalintensitäten verdünnter Lösungen nur Nachweisgrenzen von wenig unter 1 μ mol/l

erwarten. In weiteren Voruntersuchungen, bei denen 10 mg/l Cytochrom c zur Katalyse eingesetzt wurden, zeigten die bei der Injektion von 10 μM H_2O_2 -Lösung erhaltenen Signale in etwa identische Flächen (440 000 FE) und Signal/Rauschverhältnisse wie bei der Hematinkatalyse, so daß ähnliche Nachweisgrenzen angenommen werden konnten. Im Gegensatz zu den Messungen mit Hematin/HRP-Katalyse war dieses System gegenüber den organischen Hydroperoxiden jedoch wesentlich unempfindlicher, so daß für Tetralinhydroperoxid eine Nachweisgrenze von etwa 7 $\mu\text{mol/l}$ zu erwarten war (Abbildung 9).

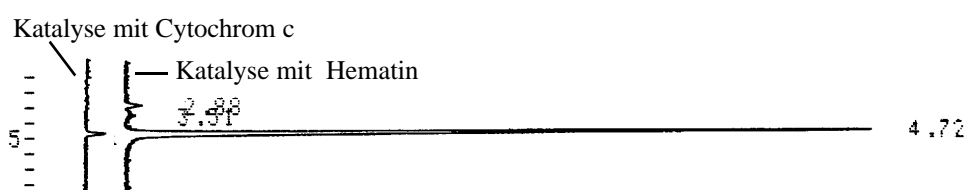


Abbildung 9: Chromatogramme einer 7.5 μM Tetralinhydroperoxid-Lösung bei Katalyse mit Cytochrom c bzw. Hematin (isokratisch $\text{MeOH/verd. H}_3\text{PO}_4$ (v:v) 80:20, das Chromatogramm der Cytochrom c-Katalyse ist um den Faktor 2 verstärkt)

Auch mit einer 0.4 mM Luminol-Lösung, die als Katalysator 0.1 mol/l $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$ enthielt, konnten für H_2O_2 in etwa gleiche Nachweisgrenzen wie bei den mit Cytochrom c und Hematin katalysierten Reaktionssystemen abgeschätzt werden. Für Tetralinhydroperoxid war dagegen nur eine Nachweisgrenze von etwa 3 $\mu\text{mol/l}$ zu erwarten. Im Gegensatz zu Hematin/HRP bzw. Cytochrom c, die im Alkalischen sehr gut löslich sind, bildet sich in der $\text{Co}(\text{II})$ -haltigen Lösung schwerlösliches $\text{Co}(\text{OH})_2$, welches sich vor die Ansaugfritte der HPLC-Pumpe setzte und dort eine sichtbare Chemilumineszenz verursachte. Versuche, eine leicht saure $\text{Co}(\text{II})$ -Lösung über eine zweite Reagenzienpumpe zu dosieren, zeigten ebenso wie die von Gandelmann und Birks (1982) zur Bestimmung von Alkoholen und Aldehyden beschriebene Zugabe des $\text{Co}(\text{II})$ zum Eluenten nur geringe Empfindlichkeit bei hohem Untergrundrauschen. Aufgrund früherer Arbeiten, bei denen die Lichtausbeute der Luminol/Peroxid-Reaktion durch organische Verbindungen wie Diazoniumsalze oder Halonitromethane um ein Vielfaches gesteigert werden konnte, wurden weitere Vorversuche mit p-Chlorbenzoldiazoniumfluoroborat durchgeführt; diese versprachen eine weitere

Empfindlichkeitssteigerung. (Yurow und Sass, 1977). Die Messungen mit dem aus Chloranilin, Tetrafluoroborsäure und Natriumnitrit synthetisierten Chlorbenzoldiazoniumfluoroborat erfolgten ebenso wie die der Hematin-Katalyse mit einer 0.4 mM Lösung von Luminol in 20 mM Boratpuffer (pH 12) unter Verwendung des Chemilumineszenz-HPLC-Systems. Im Gegensatz zu den oben beschriebenen Untersuchungen wurde jedoch nur Tetralinhydroperoxid (75 $\mu\text{mol/l}$) untersucht. Die Zugabe von 0.6 bis 64 mg/l p-Chlorbenzoldiazoniumfluoroborat zur Luminollösung bewirkte keine Erhöhung der Chemilumineszenzsignale. Versuche, in welchen das p-Chlorbenzoldiazoniumfluoroborat zu der obigen Hematin/Luminol-Reagenzienlösung gegeben wurde (0.3 bis 64 mg/l), führten zu einer starken Reduzierung der Signale.

3.2.1.7 Beurteilung der Vorversuche

Neben den detailliert beschriebenen Vorversuchen wurden noch zahlreiche Reaktionen wie z. B. die Fe(II)-katalysierte Umsetzung von H_2O_2 mit Chlorpromazin in „Reagenzglas-tests“ untersucht (vgl. Takashi et al., 1994). Sowohl durch diese einfachen Tests als auch durch die mit den nicht optimierten HPLC-Systemen durchgeführten Voruntersuchungen sollte die Anzahl möglicher Nachsäulenreaktionssysteme eingeschränkt werden. Es zeigte sich sehr schnell, daß die zur FIA- und HPLC-Bestimmung atmosphärischer Hydroperoxide häufig eingesetzte HRP/PES-Derivatisierungsreaktion sehr leistungsfähig ist. Der Anwendungsbereich dieser Reaktion läßt sich aber auch durch „neue“ Katalysatoren nicht auf sterisch anspruchsvolle Hydroperoxide erweitern. So konnten die mit HRP erhaltenen Nachweisgrenzen von 2-Butyl- und 3-Pentylhydroperoxid (9.5 bzw. 12.3 $\mu\text{mol/l}$) bei Verwendung von Mikroperoxidase (MP-11) nicht erreicht werden (Heinmöller, 1997). Bei Versuchen, die Meerrettichperoxidase durch äquivalente Mengen Co(II), $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, Hemin, Hematin, Cytochrom c oder TETA- Fe^{3+} zu ersetzen, wurden mit H_2O_2 -Lösungen (≥ 1 mmol/l bzw. bis zu ≥ 100 mmol/l bei PES/TETA- Fe^{3+}) keine oder nur sehr kleine HPLC-Signale erhalten, so daß diese Reagenzien zur empfindlichen Nachsäulenderivatisierung ausgeschlossen werden konnten. Ein Hauptgrund für das geringe Nachweisvermögen dieser in „Küvettenmethoden“ z. T. sehr empfind-

lichen Reaktionssysteme liegt sehr wahrscheinlich in den vergleichsweise kurzen Reaktionszeiten, die für die HPLC-Nachsäulenreaktion zur Verfügung stehen (Ebermann und Couperus, 1987). Eine wesentliche Erhöhung der Reaktionszeiten durch die Verlängerung der Reaktionskapillaren erscheint wenig sinnvoll, da dies Einfluß auf die Peakbreite und somit auf die Auflösung nehmen würde. Gerade im Bereich der atmosphärisch relevanten Hydroperoxide könnte so die ohnehin schwierige Trennung von H_2O_2 und HMHP verhindert werden.

Das vielversprechende Reaktionssystem Benzoessäure/Fe(II), welches von Lee und Weinstein-Lloyd erfolgreich in der Fließinjektionsanalyse zur Bestimmung von H_2O_2 eingesetzt wurde, konnte nicht auf die HPLC übertragen werden. Dies lag insbesondere daran, daß die Reagenzienlösung zur Erhöhung der Fluoreszenzausbeute alkalisiert werden muß (Lee et al., 1990, Weinstein-Lloyd und Lee, 1995). Dabei ausfallendes Eisenhydroxid verstopfte schon nach kurzer Zeit Kapillaren und Detektorzelle. Von der Möglichkeit die Fluoreszenz durch Komplexierung mit Al^{3+} zu erhöhen wurde abgesehen, da organische Hydroperoxide, wie z. B. Methylhydroperoxid bei diesem Verfahren lediglich 20 % des H_2O_2 -Response lieferten (Lee et al., 1994).

Die schon bei der Bestimmung von H_2O_2 in Kaffee, Tee und Milch eingesetzte Mangan(II)-katalysierte Oxidation des nicht kommerziell erhältlichen 2-Hydroxynaphthaldehyd-thiosemicarbazons mit anschließender fluorimetrischer Detektion des gebildeten 2-N-Oxids des 4-Amino-5,5-dioxo-1,5-oxathia-4-hydro-2,3-diazols zeigte bei den hier durchgeführten Untersuchungen eine zu geringe Empfindlichkeit (Peinado et al., 1986). Anhand der Signal/Rauschverhältnisse wurden für die HPLC Nachweisgrenzen $\geq 30 \mu\text{mol/l}$ abgeschätzt. Die vielversprechenden Vorversuche mit der als FOX-Test (ferrous oxidation of xylene orange) bekannten Reaktion von Hydroperoxiden und Fe(II)/Xylenolorange zeigten in nachfolgenden HPLC-Untersuchungen von Heinmöller ausreichend kleine Nachweisgrenzen für organische Hydroperoxide, die ungeachtet der weniger empfindlichen UV/VIS-Detektion nur um den Faktor vier über denen des enzymatischen HRP/PES-Fluoreszenz-Systems lagen (Heinmöller, 1997). Da somit neben der von Wagner et al. (1990) durchgeführten HPLC-Bestimmung von Thymidinhydroperoxiden auch Ergebnisse hinsichtlich der Bestim-

mung von Alkylhydroperoxiden vorlagen, wurde auf weitere Untersuchungen mit diesem NSD-Reaktionssystem verzichtet (Heinmöller, 1997).

Die Verwendung von Lösungen substituierter Phenylendiamine, die schon seit den frühen 60er Jahren als empfindliche Nachweisreagenzien für organische Hydroperoxide eingesetzt wurden, schienen für eine HPLC-Nachsäulenreaktion äußerst interessant (Dugan 1961; Knappe und Peteri, 1962; Miyazawa et al., 1995). Aufgrund von Arbeiten, in welchen mit einer H_2O_2 -haltigen N,N-Dialkyl-p-phenylendiamin-Lösung auch niedrige Fe(III)-Konzentrationen nachgewiesen werden konnten, war anzunehmen, daß die Verwendung von Metallionen eine gute Möglichkeit zur Steigerung der Nachweisempfindlichkeit des Systems darstellt (Hirayama et al., 1988). Die in den Vorversuchen mit einem nicht optimierten HPLC-UV/VIS-System abgeschätzten Nachweisgrenzen von $< 1 \mu\text{mol/l}$ für H_2O_2 und tert-Butylhydroperoxid ließen weitere Arbeiten sehr erfolgversprechend erscheinen.

Zur Abrundung der Vorversuche, aber auch für einen späteren Vergleich der Systeme, wurde die Chemilumineszenzdetektion mit Luminol untersucht. Als mögliche Katalysatoren dieser Reaktion wurden neben Peroxidase auch Cytochrom c, Hematin sowie Metallsalze eingesetzt. Da bei der Katalyse mit Co(II)-Salzen schwerlösliches $\text{Co}(\text{OH})_2$ ausfiel und neben einer Verstopfung der Ansaugfritte auch zu einer sichtbaren Chemilumineszenz führte, welche mit der Zersetzung der Reagenzienlösung einherging, wurde dieses System nicht weiter untersucht. Vorausgegangene Untersuchungen, in denen die Chemilumineszenzreaktion mit Cytochrom c und Hematin katalysiert wurde, ließen für H_2O_2 in etwa identische Nachweisgrenzen von weniger als $1 \mu\text{mol/l}$ erwarten. Da aus der Untersuchung mit einer Hematin/Luminol-Reagenzienlösung im Vergleich zu den Messungen mit Cytochrom c eine niedrigere Nachweisgrenze für die organischen Hydroperoxide zu erwarten war, sollte diese Chemilumineszenzreaktion weiter untersucht werden.

Insgesamt lieferten die Voruntersuchungen Aufschluß über die Empfindlichkeit und das zu erwartende Nachweisvermögen der verschiedenen Reaktionssysteme. Der empfindlichste Nachweis von H_2O_2 und organischen Hydroperoxiden gelang durch die Verwendung eines Phenylendiamin/Fe(II)-UV/VIS-Reaktionssystems und eines Luminol/Hematin-Chemilumineszenz-Reaktionssystems, so daß diese beiden Systeme für die folgenden Optimierungen ausgewählt wurden.

3.2.2 Optimierung der ausgewählten HPLC-Methoden

Aufbauend auf den Ergebnissen der intensiven Voruntersuchungen sollten weiterführende Arbeiten zur Nachsäulenreaktion mit Luminol/Hematin und N,N-substituierten Phenylendiaminen klären, inwieweit die abgeschätzten Nachweisgrenzen erreicht bzw. durch die Optimierung der Systeme zu verbessern sind. Bei der Ausarbeitung eines HPLC-Systems mit Nachsäulenderivatisierung (NSD) müssen neben der Art der Trennsäulen zahlreiche weitere Parameter wie z. B. die Reagenzienkonzentrationen, die Reagenzienflüsse, die Dimensionen und Temperatur der Reaktionskapillare sowie die Meßzelle, Anregungs- und/oder Detektionswellenlängen und weitere Einstellungen des Detektors optimiert werden. Da sich in früheren Arbeiten durch die Verwendung von RP-ODS-Säulen und wäßriger (H_3PO_4 , pH 3.5) bzw. methanolisch/wäßriger Eluenten gute Ergebnisse erzielen ließen, wurde dieses Trennsystem auch für die hier durchgeführten Arbeiten übernommen (z. B. Hellpointner und Gäb, 1989; Kok et al., 1995; Heinmöller, 1997; Heinmöller et al., 1998).

In Realproben liegen H_2O_2 als auch organische Hydroperoxide häufig nebeneinander vor. Daher sollten die neuen HPLC-NSD-Systeme simultane Bestimmungen mit ausreichender Empfindlichkeit ermöglichen. Wegen der primär beabsichtigten Messung atmosphärischer Proben wurde die Optimierung meist auf H_2O_2 beschränkt.

3.2.2.1 UV/VIS-HPLC-Detektion mit N,N-disubstituierten p-Phenylendiaminen

Die Optimierung der UV/VIS-HPLC-Detektion erforderte weitere vorbereitende Untersuchungen. Insbesondere mußte geklärt werden, ob die Reagenzienlösung über einen längeren Zeitraum ausreichend stabil ist. Zu Beginn der Arbeiten mit dem einfachsten disubstituierten Vertreter der p-Phenylendiamine, dem N,N-Dimethyl-p-phenylendiamin, fiel insbesondere die verhältnismäßig schnelle Verfärbung der Reagenzienlösung auf. Variationen in der Reihenfolge der Reagenzienzugabe zeigten einen enormen Einfluß auf diese unerwünschte Eigenschaft, die zu hohem Untergrund und starker Drift führte. Der Grund für diese Instabilität lag ganz offensichtlich an der Oxidation von Fe(II) durch Luftsauerstoff. Durch vorhergehendes Entgasen des verwendeten Wassers mit Helium sowie dessen Ansäuerung (pH 1.8) vor der Zugabe

des $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$ und anschließende Aufbewahrung unter Kühlung, konnte die schnelle Verfärbung der Lösung verhindert werden.

Da die Trennung der höheren Alkylhydroperoxide einen Eluenten mit hohem organischen Anteil erfordert und das Mischen des Eluates mit einer rein wäßrigen Reagenzienlösung u. U. zu Problemen führen kann, wurde der Einfluß organischer Lösungsmittel auf die Stabilität der N,N-Dimethyl-p-phenylendiamin-Reagenzienlösung untersucht. Dazu wurden Lösungen mit unterschiedlichen Methanol/ H_2O - bzw. Acetonitril/ H_2O -Mischungsverhältnissen und einer für die HPLC noch nicht optimierten Konzentration von 3 g/l DMPD, 0.2 g/l $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ und 12.2 mmol/l H_2SO_4 angesetzt und mit fortschreitender Zeit (Lagerung bei Raumtemperatur) photometrisch vermessen (Abbildung 10).

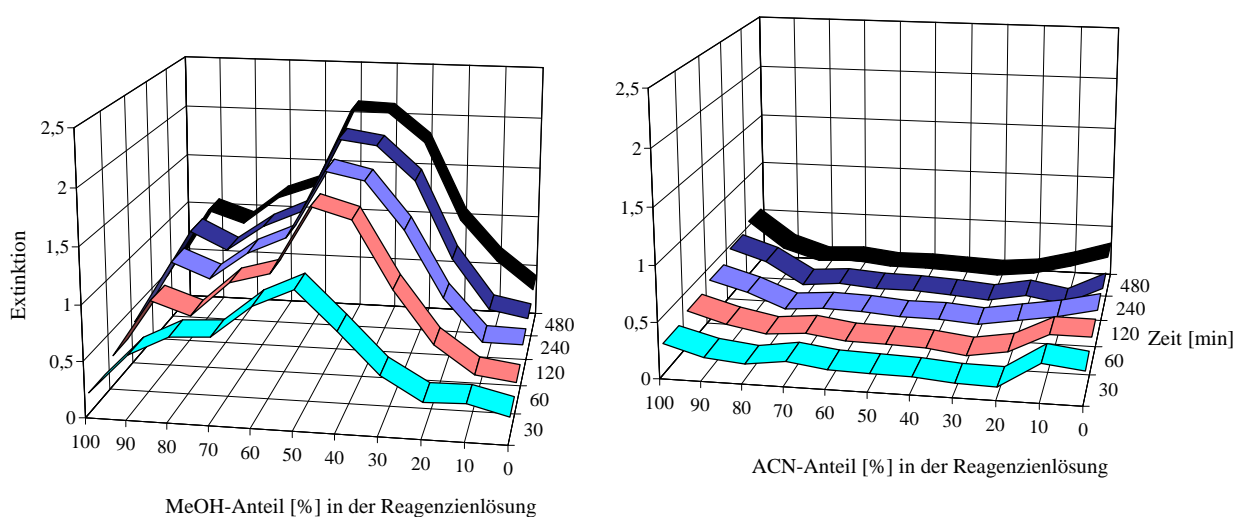


Abbildung 10: Stabilität der ungekühlten DMPD-Reagenzienlösung bei Verwendung verschiedener Lösungsmittelgemische

Bei diesen Untersuchungen zeigte sich, daß insbesondere die Verwendung von methanolisch/wäßrigen Reagenzienlösungen zu einer mit der Zeit zunehmenden Verfärbung und den oben schon beschriebenen Problemen führte. Warum gerade ein Mischungsverhältnis von 50:50 (v:v) eine sehr intensive Färbung der Reagenzienlösung verursachte, konnte nicht geklärt werden. Bei einer möglichen Anwendung des Nachsäulenreaktionssystems zur Bestimmung lipophiler Hydroperoxide ist zu bedenken, daß durch den hohen wäßrigen Anteil in der Reagenzienlösung diese Substanzen nicht

vollständig in Lösung gehalten werden (siehe auch Heinmöller, 1997). Da dies durch einen ausreichenden organischen Anteil in der Reagenzienlösung verhindert werden kann, wurde im weiteren der Einfluß des organischen Lösungsmittels auf die Signalgröße untersucht. Bei der HPLC-Bestimmung einer 10 µM H₂O₂-Lösung mit methanolisch/wäßrigen Reagenzienlösungen, konnte keine Abhängigkeit der Signalgrößen vom organischen Anteil festgestellt werden (Abbildung 11). Ob sich der organische Anteil im Reagenz nachteilig auf die Empfindlichkeit oder die Nachweisgrenze auswirkt konnte an dieser Stelle nicht geklärt werden und bleibt weiteren Untersuchungen vorbehalten.

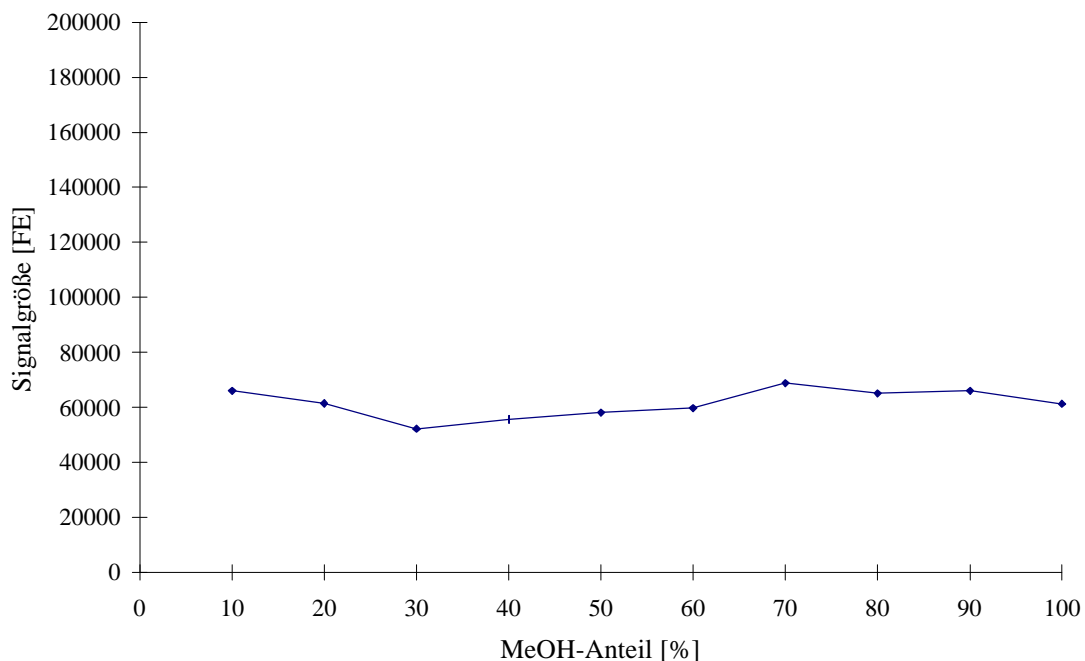


Abbildung 11: Einfluß des MeOH-Anteils der Reagenzienlösung auf die Signalgröße (UV/VIS-HPLC-System I, Reagenzienlösung: 755 mg DMPD und 50 mg (NH₄)₂Fe(SO₄)₂·6H₂O/250 ml 7.8 mM H₂SO₄)

Trotz der guten Stabilität der acetonitrilischen Reagenzienlösung sollte diese nicht unbedingt eingesetzt werden. Wie nachfolgende Beispiele zeigen, können sich dadurch die Nachweisgrenzen verschlechtern (vgl. Tabelle 13, S. 81). Da zudem Kostennachteile und Gesundheitsrisiken gegen die Verwendung dieser Lösungen sprachen, wurde schließlich mit rein wässrigen Reagenzienlösungen gearbeitet, zumal sich die geringe Verfärbung durch Kühlen auf 4 °C weiter minimieren ließ. Im

weiteren Verlauf dieser Untersuchungen konnte festgestellt werden, daß der Einsatz der wäßrigen Reagenzienlösung selbst bei Gradientenelutionen mit einem Methanolanteil des Eluenten bis zu 98 % keine Probleme verursacht.

Die Optimierung der Reagenzienzusammensetzung erfolgte bei einer festen Konfiguration der HPLC (u. a. Injektionsvolumen, Reagenzien- und Eluentenfluß, Länge und Temperatur der Reaktionskapillare). Bei konstanter $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ -Konzentration von 750 mg/250 ml wurde die DMPD-Konzentration variiert. Injektionen von 20 µl einer 10 µM H_2O_2 -Lösung ergaben maximale Signalgrößen bei einer DMPD-Konzentration von 500 mg/250 ml (Abbildung 12). Die nachfolgende Optimierung der $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ -Konzentration bei konstanter DMPD-Konzentration zeigte das Signalmaximum bei etwa 350 mg/250 ml (Abbildung 12). Die an verschiedenen Tagen mit frisch angesetzten H_2O_2 -Standards gemessenen Abhängigkeiten der Signalgröße von der $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ - bzw. DMPD-Konzentration waren ähnlich.

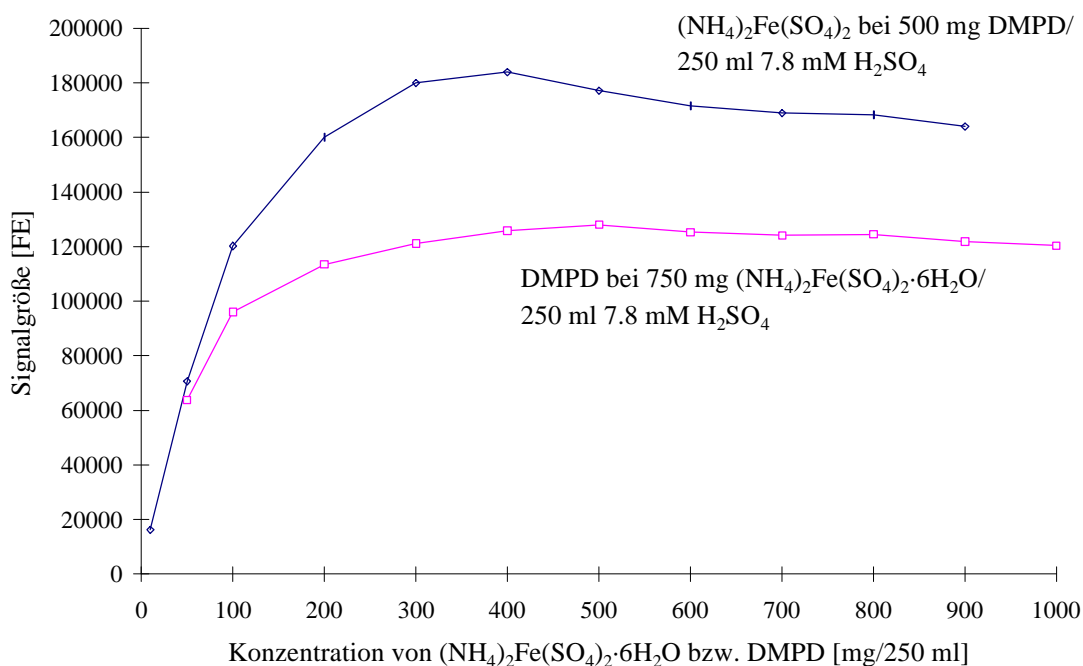


Abbildung 12: Optimierung der DMPD-Reagenzienlösung (UV/VIS-HPLC-System I, Injektion: 20 µl 10 mM H_2O_2 , Fluß: Eluent/Reagenz je 0.5 ml/min)

So nahm die Signalintensität mit zunehmender Reagenzienkonzentration bis zu einem Maximum schnell zu; danach führte die Erhöhung der Reagenzienkonzentrationen

lediglich zu einer geringen Abnahme der Signalintensität. Dieser Verlauf legt den Schluß nahe, daß selbst bei den relativ geringen Probenkonzentrationen (20 µl einer 10 µM H₂O₂-Lösung entsprechen 6.8 ng) genügend Reagenz zur Verfügung gestellt werden muß, um eine ausreichende und schnelle Umsetzung zu gewährleisten.

Im weiteren Verlauf der Untersuchungen sollte insbesondere geklärt werden, welchen Einfluß die Länge der Reaktionskapillare auf Signalgröße und -breite hat. Dazu wurde eine zu Beginn 10 m lange Kapillare (ID 0.25 mm) nach 5-maliger Injektion einer 10 µM H₂O₂ Lösung um je einen Meter verkürzt. Wie Abbildung 13 zeigt, konnte die maximale Signalgröße mit einer 8 m langen Kapillare erreicht werden.

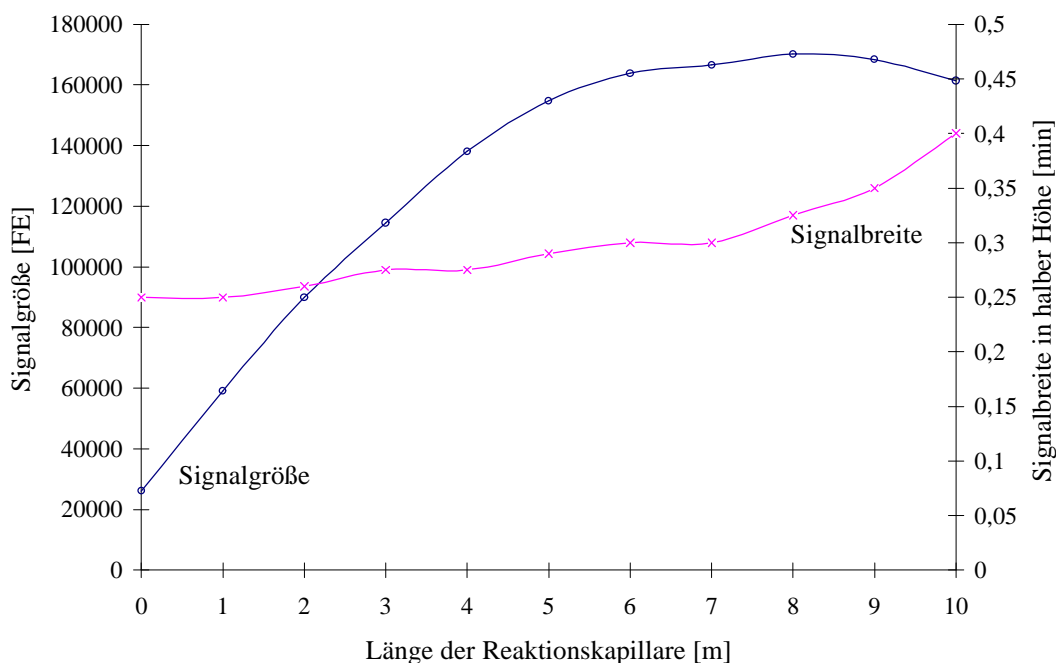


Abbildung 13: Einfluß der Länge der Reaktionskapillare auf Signalgröße und -breite (UV/VIS-HPLC-System I mit optimierter Reagenzienlösung, Injektion: 20 µl 10 µM H₂O₂, Fluß: Eluent/Reagenz je 0.5 ml/min)

Da sich mit der Länge der Kapillare jedoch auch das Totvolumen nach der Säule ändert, und dies zu Problemen bei der Trennung nahe beieinander liegender Signale führen kann, wurde bei diesen Versuchen zusätzlich die Signalbreite in halber Höhe bestimmt. Diese ebenfalls in Abbildung 13 dargestellte Größe zeigt sehr anschaulich, daß eine 10 m lange Reaktionskapillare eine Verbreiterung des H₂O₂-Peaks von 60 %

zur Folge hat. Auffällig ist jedoch, daß die Peakverbreiterung erst ab einer Kapillarenlänge von 8 m verhältnismäßig stark ansteigt. Danach ist die Festlegung auf eine 7 m lange Reaktionskapillare ein guter Kompromiß zwischen maximaler Signalgröße und minimaler Peakverbreiterung.

Aufgrund der weiter unten beschriebenen Ergebnisse über den Einfluß der Geometrie von Reaktionskapillaren (3.2.3.1, S. 69) wurden für das UV/VIS-HPLC-System gewickelte Kapillaren mit einem Wicklungsdurchmesser von 3 cm eingesetzt.

Neben Länge und Geometrie der Reaktionskapillare kann auch deren Temperatur die Signalgröße beeinflussen. Bei den Messungen zeigte sich, daß ein maximales Signal bei 20 bis 30 °C erreicht werden kann (Abbildung 14). Sowohl die Erniedrigung als auch die Erhöhung der Temperatur verursachte eine in etwa gleich starke Abnahme der Signalintensität. Da die maximale Signalgröße bei Raumtemperatur lag und sich in diesem Bereich bei leichten Temperaturschwankungen nur geringe Änderungen der Signalgröße ergaben, wurde auf eine Temperierung der Reaktionskapillare verzichtet.

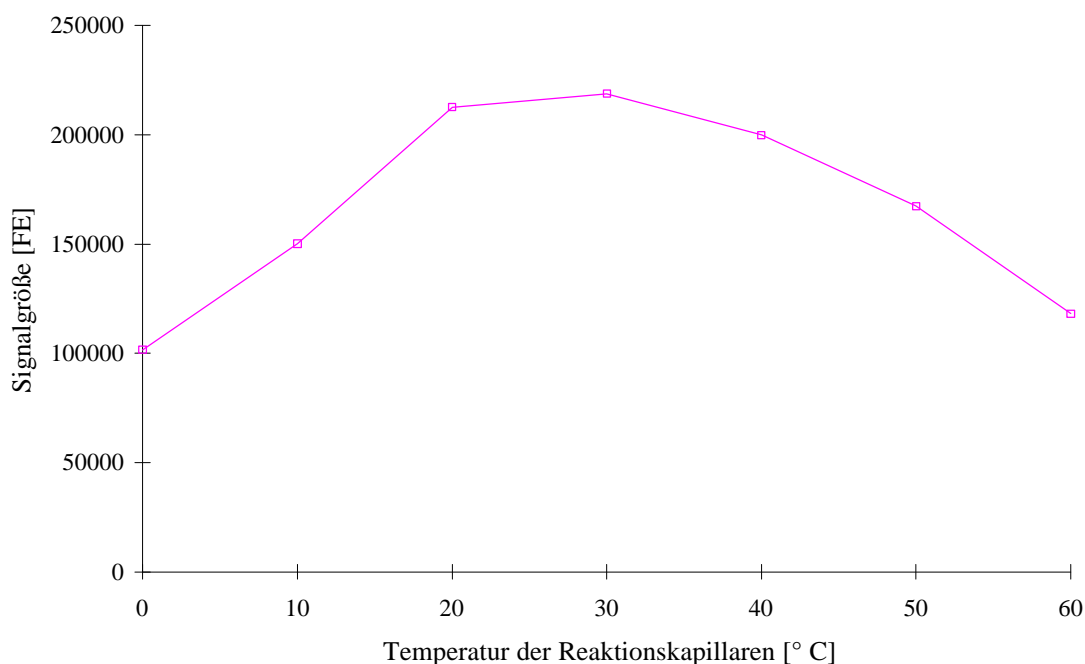


Abbildung 14: Einfluß der Temperatur auf die Signalgröße (UV/VIS-HPLC-System I mit optimierter Kapillarlänge und Reagenzienlösung, Injektion: 20 µl 10 µM H₂O₂, Fluß: Eluent/Reagenz je 0.5 ml/min)

Nach der Optimierung von Reagenzienlösung, Länge und Temperatur der Reaktionskapillare sollte in einer weiteren Untersuchung geklärt werden, welchen Einfluß der Reagenzienfluß auf die Signalgröße hat. Die dazu notwendigen Messungen wurden mit dem UV/VIS-HPLC-System II durchgeführt. Bei dieser Untersuchung zeigte sich der erwartete Verlauf (Abbildung 15), in welchem die Reduzierung des Eluentenflusses zu einer Erhöhung der Signale führt.

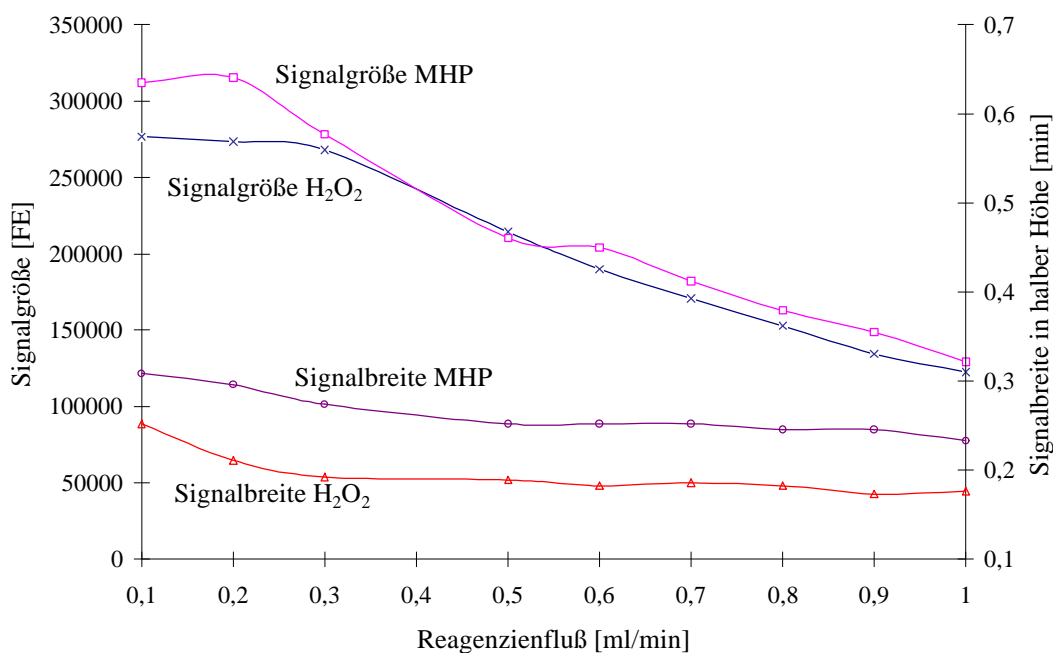
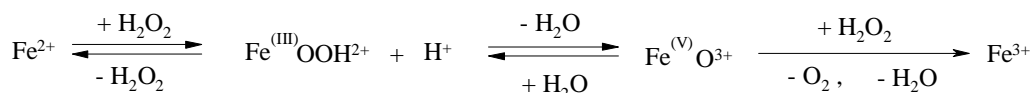


Abbildung 15: Einfluß des Reagenzienflusses auf Signalgröße und -breite (UV/VIS-HPLC-System II mit optimierter Kapillarlänge und Reagenzienlösung, Injektion: 20 µl 10 µM H₂O₂, 10,1 µM MHP, Fluß: Eluent/Reagenz je 0,5 ml/min)

Dieser Zusammenhang ist durchaus verständlich, da mit abnehmendem Fluß die Reaktionszeit verlängert wird. Ebenso wie die Verlängerung der Kapillare (Abbildung 13; Seite 58) führt auch die Flußreduzierung zu einer Peakverbreiterung. Auffällig ist, daß die Peakbreite sowohl unterhalb eines Reagenzienflusses von 0,3 ml/min als auch bei Kapillarlängen über 8 m stärker ansteigt (Abbildung 13, Abbildung 15). Die gleichzeitige Messung der Signalgröße und der Peakbreite von H₂O₂ und MHP zeigte einen nahezu identischen Verlauf. Überraschend war jedoch das für MHP erhaltene größere Signal bei kleinen Reagenzienflüssen. Eine mögliche Erklärung dafür könnte

die Fe(III)-katalysierte Zersetzung von H_2O_2 sein. Unter den üblichen Reaktionsbedingungen wird, wie weiter unten gezeigt, nur ein Teil des H_2O_2 umgesetzt, der aber mit der Zeit ansteigen sollte. Liegen jedoch durch Oxidation von Fe(II) relativ hohe Konzentrationen an Fe(III) vor, so kann aus überschüssigem H_2O_2 nach dem Kremer-Stein-Mechanismus (Reaktionsschema 21) Sauerstoff freigesetzt werden (Holleman und Wiberg, 1985).



Reaktionsschema 21: Kremer-Stein-Mechanismus der Fe(III)-katalysierten Zersetzung von H_2O_2

In diesem Fall müßte, wie in den Abbildung 13 (S. 58) und 15 (S. 60) zu sehen, die lineare Funktion abknicken. Unter der Voraussetzung, daß MHP weniger reaktiv ist, folglich im Vergleich zu H_2O_2 bei gleicher Aufenthaltsdauer in der Kapillare weniger Fe(III) vorliegt und ebenfalls katalytisch zersetzt wird, wäre dieser Effekt für MHP erst bei kleineren Flußraten zu erwarten. Sowohl das Abknicken der linearen MHP-Funktion als auch die dadurch im Vergleich zu H_2O_2 höheren Signale bei kleinerem Fluß scheinen diese Vermutung zu bestätigen. Eine weitere Erklärung für das Abknicken der Funktionen kann über die Oxidation des farbigen Semichinondiimins (SQDI) zum farblosen Chinondiimin (QDI) erfolgen (Reaktionsschema 20, S. 44). So können beispielsweise bei einem Oxidantien [Ox]/[DEPD]-Verhältnis von 1:2 neben etwa 50 % SQDI auch 30 % QDI entstehen. Bei [Ox]/[DEPD]-Verhältnissen größer 1:2 nimmt der Anteil des farbigen SQDI ab, während der des farblosen QDI zunimmt (Nickel, 1978). Allerdings sprechen durchaus auch Argumente gegen diese Erklärung, da sowohl das [Ox]/[DMPD]-Verhältnis als auch die Fe(III)-Konzentration nicht nur mit der Aufenthaltsdauer in der Reaktionskapillare, sondern auch mit steigender Hydroperoxid-Konzentration zunehmen. Demnach wäre bereits bei höheren H_2O_2 -Konzentrationen von etwa $30 \mu\text{mol/l}$ ein Abflachen der Kalibrierfunktion zu erwarten, tatsächlich tritt dieser Effekt jedoch erst bei Konzentrationen $> 100 \mu\text{mol/l}$ auf (Abbildung 16).

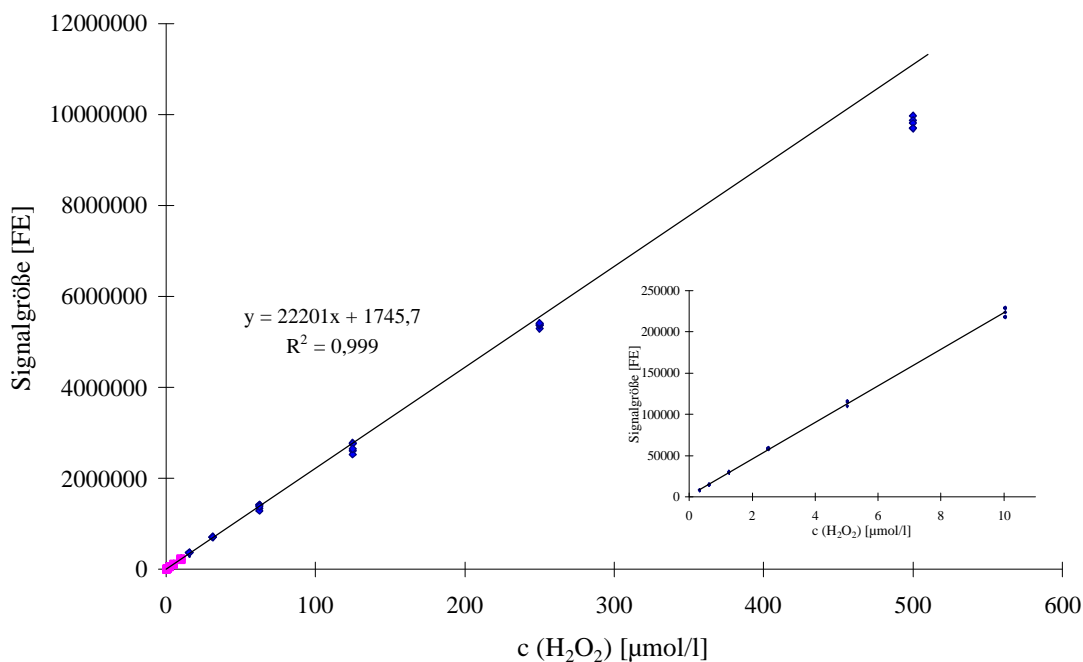


Abbildung 16: Kalibriergerade für H_2O_2 (DMPD-UV/VIS-HPLC-System II, linearer Fit von 0-10.0 $\mu\text{mol/l}$, Funktion verlängert bis zu 550 $\mu\text{mol/l}$)

Obwohl der auf 0.3 ml/min reduzierte Fluß des Nachsäulenreagenzes für H_2O_2 und MHP zu Signalerhöhungen von 25 % bzw. 32 % bei nahezu gleichbleibender Peakbreite führte, wurde der in den vorangegangenen Messungen eingestellte Fluß von 0.5 ml/min beibehalten; ausschlaggebend dafür war letztendlich die schon bei Flüssen unterhalb 0.5 ml/min beginnende Verbreiterung des MHP-Peaks.

Da sich das UV/VIS-Reaktionssystem mit DMPD auch zum empfindlichen Nachweis von Fe(III) eignet, wurde im folgenden untersucht, ob die Messung einer Fe(III)-Lösung Rückschlüsse auf die Umsetzung des H_2O_2 zuläßt (Hirayama und Unohara, 1988). Bei ersten Messungen erzeugten die in das UV/VIS-HPLC-System II injizierten Fe(III)-Lösungen mit Konzentrationen bis zu 100 μM kein Signal. Die anschließenden Injektionen einer 10 μM H_2O_2 -Lösung ergaben nur sehr kleine Signale, die erst nach langem Spülen der Säule wieder in den Bereich der für diese Konzentration bekannten Signalgröße gelangten. Möglicherweise kann dieses Verhalten auf eine langsame Elution der Fe(III)-Ionen zurückgeführt werden, durch die H_2O_2 auf der Säule zersetzt wird. Erst durch den Ausbau der HPLC-Säule und die direkte Injektion in das nun nicht mehr trennende System konnten auch für Fe(III)-

Lösungen auswertbare Signale erhalten werden. Aus der Stöchiometrie der $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe(II)}$ -Redoxreaktion, bei welcher 1 Molekül H_2O_2 zwei Fe(III) -Ionen erzeugt, war zu erwarten, daß sich die Signalgrößen gleich konzentrierter Lösungen von Fe(III) und H_2O_2 um den Faktor 2 unterscheiden. Die in Abbildung 17 dargestellten Verläufe unter optimierten HPLC-Bedingungen (aber ohne Säule) lassen jedoch nur sehr geringe Unterschiede in den Signalgrößen erkennen.

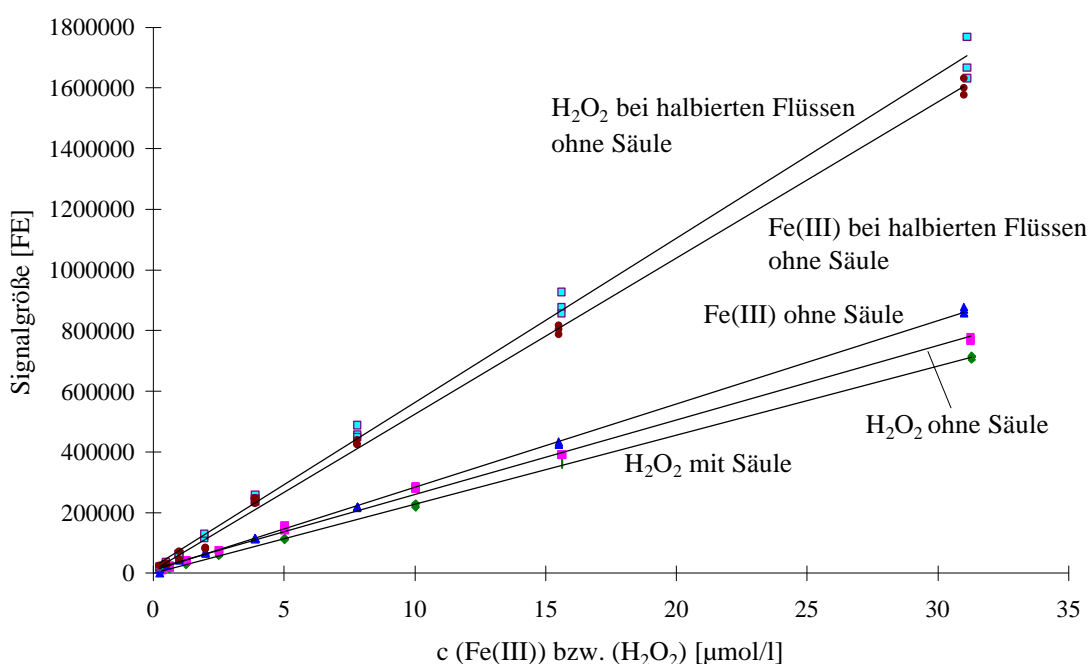


Abbildung 17: Signalgröße als Funktion der Fe(III) - und H_2O_2 -Konzentration unter verschiedenen Bedingungen (DMPD-UV/VIS-HPLC-System II, mit und ohne Säule, teilweise bei halbierten Eluenten- und Reagenzienflüssen)

Entgegen der Erwartung erzeugten H_2O_2 -Lösungen sogar etwas kleinere Signale als die entsprechend konzentrierten Fe(III) -Lösungen. Erst nach Halbierung von Eluenten- und Reagenzienfluß und damit einhergehende Verlängerung der Reaktionszeit ergaben sich für H_2O_2 -Lösungen etwas größere Signale als für die entsprechenden Fe(III) -Lösungen. Diese Untersuchungen belegen, daß in der relativ kurzen Reaktionszeit keine vollständige Umsetzung des H_2O_2 stattfinden kann.

Alle oben beschriebenen Voruntersuchungen und Optimierungen an den UV/VIS-Systemen wurden ebenso wie frühere „Küvettenmessungen“ bei Wellenlängen von 553 bzw. 551 nm durchgeführt, obwohl die gebildeten Semichinondiimine bei etwa 330 nm eine wesentlich stärkere Absorption zeigen (Abbildung 6, S. 45) (Nickel, 1978; Bader et al., 1988; Hirayama und Unohara, 1988). Die Gründe für die Messung bei dieser Wellenlänge lagen zum einen darin, daß bei kleineren Wellenlängen ein Verlust an Selektivität zu erwarten war. Zum anderen zeigte die Untersuchung einer Mischung von Arylalkylhydroperoxiden mittels Gradientenelution bei der Wellenlänge von 330 nm eine starke Drift der Basislinie (Abbildung 18).

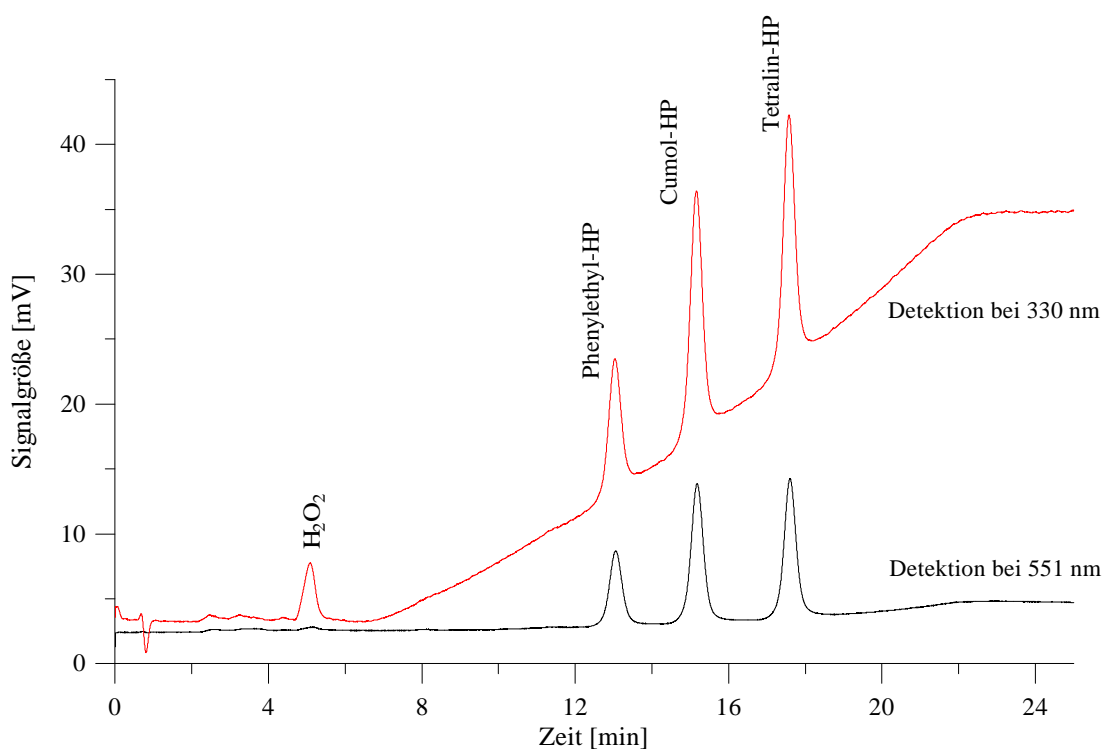


Abbildung 18: Messung einiger aromatischer Hydroperoxide bei verschiedenen Detektionswellenlängen (Gradientenelution: MeOH/verd. H₃PO₄ 0-15 min von 50 auf 80 % MeOH, anschließend isokratisch mit 80 % MeOH, DEPD-UV/VIS-HPLC-System II)

3.2.2.2 Luminol/Hematin-Chemilumineszenz-HPLC

Für die Optimierung der Luminol/Hematin-Chemilumineszenz-HPLC wurden zunächst, wie beim UV/VIS-HPLC-System mit Phenylendiaminen, weitere Voruntersuchungen durchgeführt. Sowohl diese Voruntersuchungen als auch die anschließenden

den Optimierungen erfolgten mit einer 20µl-Probenschleife und 10 µM H₂O₂-Lösung. Da die Chemilumineszenz nach Vermischen der Reagenzien sehr schnell bis zu einem Maximum ansteigt und danach exponentiell abnimmt, muß der Bereich, in welchem die Reagenzien zusammengeführt werden, möglichst nahe an oder idealerweise sogar in der Detektor-Meßzelle liegen (Seitz, 1981; Matthäus et al., 1994).

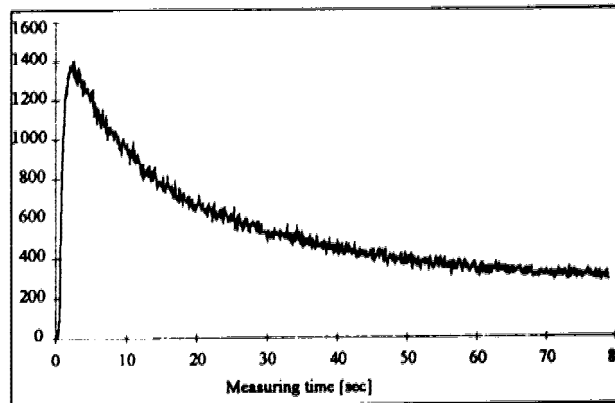


Abbildung 19: Zeitabhängigkeit der Luminol/Hemin-Chemilumineszenz mit Lipidhydroperoxiden (Matthäus et al., 1994)

Versuche mit dem Jasco CL-825 Chemilumineszenzdetektor bestätigten diese Aussage. So konnten durch Verkürzen einer zwischen Detektor und Mischzelle installierten 1 m langen Kapillare (ID 0.25 mm) die Signalintensitäten von H₂O₂ um ca. 60 % und die von MHP um etwa 50 % erhöht werden (Abbildung 20). Durch den Einbau der Mischzelle (HPLC-Kreuz-Verbinder) in den Detektor und die damit verbundene Verkürzung des Misch-/Meßzellen-Abstandes um weitere 8 cm konnte die Signalgröße nochmals gesteigert werden.

Neben dieser baulichen Veränderung am Detektor ließ sich durch Erhöhung der Eluenten- und Reagenzien-Flußraten die Zeit zwischen Misch- und Meßzelle verringern, was zu einer weiteren Steigerung der Signalintensität führte (vgl. Bostick und Hercules, 1975).

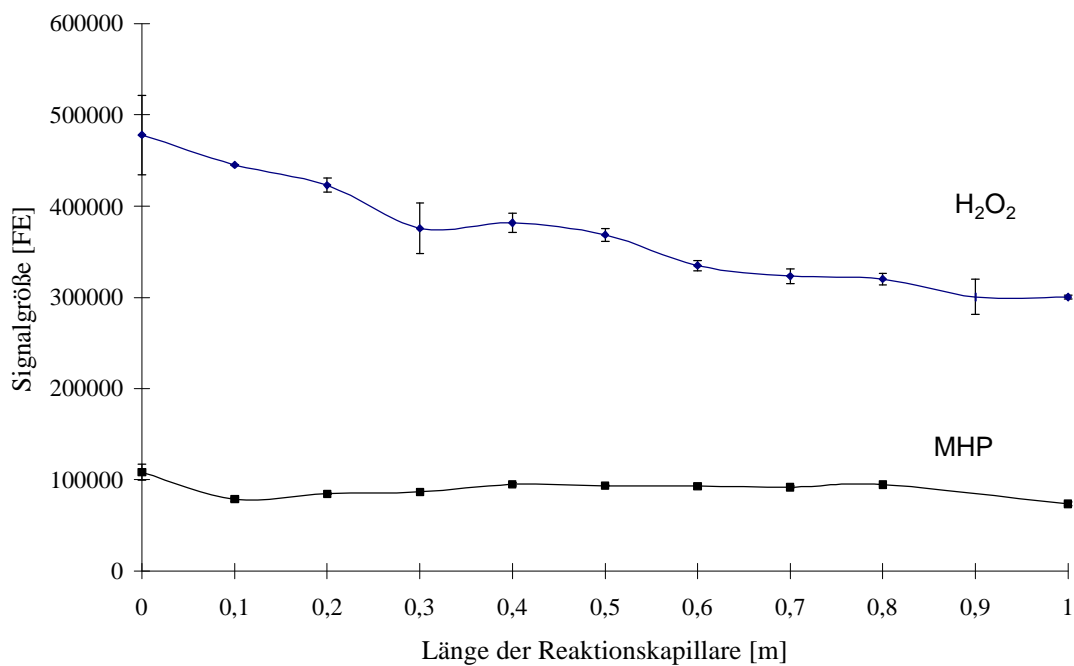


Abbildung 20: Einfluß der Kapillarlänge auf die Signalgröße (je 4 Injektionen, Detektor-Verstärkung für beide HP identisch, 0 cm entspricht dem Originaldetektoranschluß)

Als optimale Flußraten, bei denen sowohl die Trennung von H₂O₂ und HMHP als auch ein vertretbarer Reagenzienverbrauch erreicht wurden, erwiesen sich 0.7 ml/min für den Eluenten und 1.0 ml/min für die Reagenzienlösung. Zur Optimierung der Chemilumineszenz-Reaktion wurde zunächst bei konstanter Hematin-Konzentration die optimale Luminol-Konzentration bestimmt. Die nachfolgende Variation der Hematin-Konzentration bei konstanter Luminol-Konzentration ergab eine maximale Signalgröße bei 1.0 bis 2.4 mg/l. In Abbildung 21 ist die Abhängigkeit der Signalgröße von der Hematin- und Luminol-Konzentration dargestellt. Im Gegensatz zur UV/VIS-Detektion mit der DMPD-Reagenzienlösung führte die Erhöhung der Reagenzienkonzentrationen zu einem starken Intensitätsverlust der Signale. Für diese Abnahme der Signalgröße sind möglicherweise Quenchprozesse verantwortlich. Die optimalen Reagenzienkonzentrationen betragen für Luminol 32 mg/l und für Hematin 1.6 mg/l.

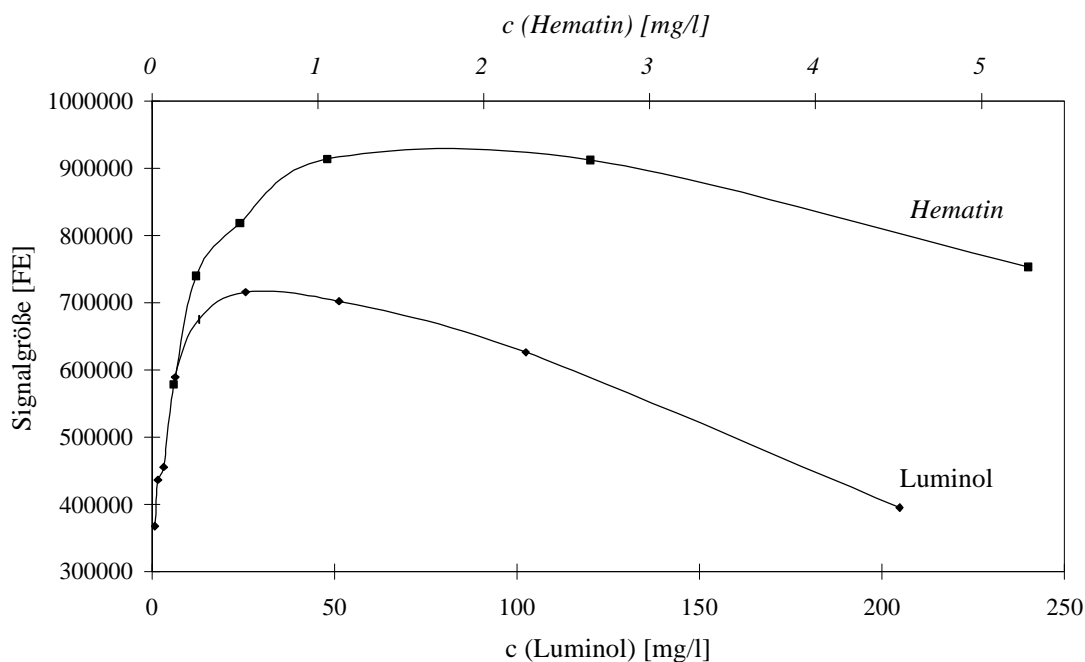


Abbildung 21: Einfluß der Hematin- und Luminolkonzentration in der Reagenzienlösung auf die Signalgröße einer $10 \mu\text{M}$ H_2O_2 -Lösung

Neben den Reagenzienkonzentrationen kann der pH-Wert einen entscheidenden Einfluß auf die Intensität der Chemilumineszenz ausüben. Bei den hier durchgeführten Untersuchungen mit einer 20 mM Borat/NaOH gepufferten Reagenzienlösung ergab sich die maximale Signalintensität bei einem pH-Wert von 13 (Abbildung 22). Aufgrund der niedrigen H_3PO_4 -Konzentration im Eluenten (pH 3.5) und der hohen NaOH-Konzentration im Reagenz sind pH-Wert der Reagenzienlösung und der Reaktionslösung identisch. Dieser relativ hohe pH-Wert liegt damit etwas über den Werten vergleichbarer Arbeiten. So wurde bei Untersuchungen der $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ -katalysierten Luminol/ H_2O_2 -Reaktion der optimale pH-Wert mit 10.6 bestimmt; bei der Co(II)-katalysierten Luminol/ H_2O_2 -Reaktion wurde ein optimaler pH-Wert von 10.9 bzw. 11.7 ermittelt (Bostick und Hercules, 1975; Burdo und Seitz, 1975; Yan und Worsfold, 1990). Weitere Arbeiten, in denen Carbonsäuren über die Vorsäulenderivatisierung mit N-(4-Aminobutyl)-N-ethylisoluminol und nachfolgender $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ -katalysierten Chemilumineszenz des Carbonsäureamids bestimmt wurden, ergaben die maximale Chemilumineszenzintensität bei einer NaOH-Konzentration im Reagenz von 2.6 mol/l (Kawasaki et al., 1985). Sowohl die eigenen Untersuchungen

als auch die der Arbeiten anderer zeigen, daß eine maximale Chemilumineszenzintensität nur im stark Alkalischen erreicht werden kann. Die großen Unterschiede der Signalintensitäten bei nur geringen Abweichungen vom optimalen pH-Wert (Abbildung 22) entsprechen den Ergebnissen früherer Untersuchungen (Bostick und Hercules, 1975; Burdo und Seitz, 1975; Kawasaki et al., 1985). Die unterschiedlichen pH-Optima der Reagenzien- bzw. Reaktionslösung in den veröffentlichten Arbeiten sind offensichtlich in hohem Maße von der Art und Konzentration der Katalysatoren sowie des verwendeten Luminolderivates abhängig.

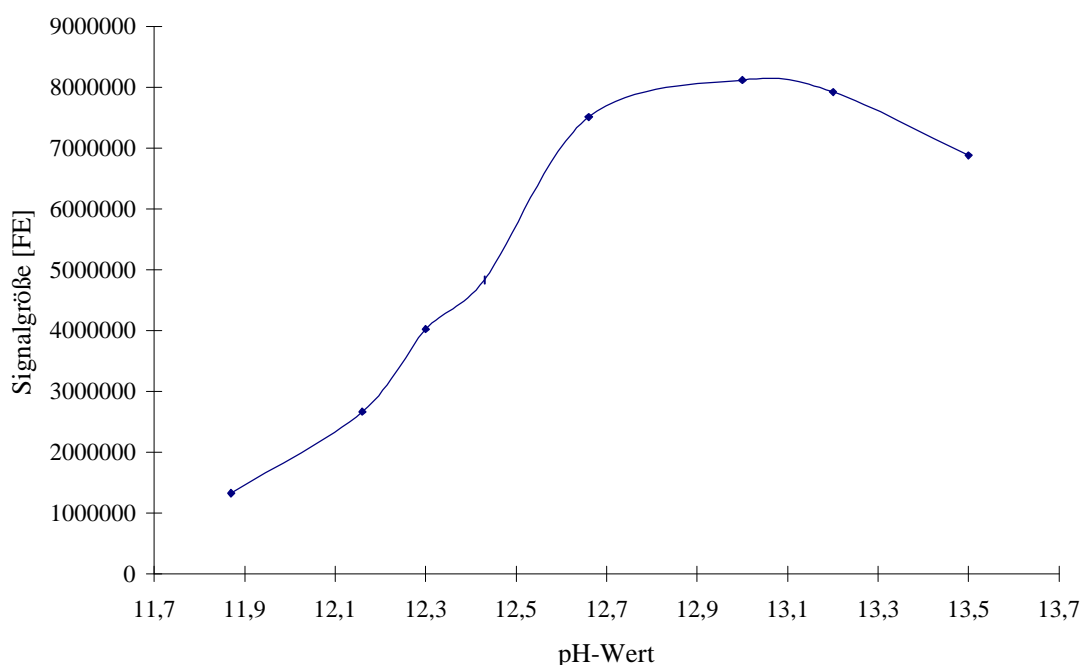


Abbildung 22: Einfluß des pH-Wertes der Luminol/Hematin-Reagenzienlösung auf die Signalgröße

3.2.3 Messung von Standardlösungen mit den verschiedenen HPLC-Systemen

Um die Anwendungsbreite und Qualität der neuen Methoden zu untersuchen, wurden im weiteren Verlauf der Arbeit zahlreiche Messungen mit H_2O_2 und einfachen, aber auch sterisch anspruchsvollen, organischen Hydroperoxiden (Alkyl-, Arylalkyl- und Alkoxyalkylhydroperoxiden) durchgeführt. Aus diesen Messungen wurden Kalibrierfunktionen erstellt und statistische Kenngrößen wie Verfahrensstandardabweichung

(VSA) und Verfahrensvariationskoeffizient (VVK) gewonnen. Die Nachweisgrenze wurde nach der Kalibriergeradenmethode der DIN 32 645 durch die Messung von Standardlösungen, welche die berechnete Nachweisgrenze maximal um eine Größenordnung übersteigen, bestimmt. Zum Vergleich der neuen Reaktionssysteme mit einer Modifikation (Fluoreszenz-HPLC-System II) des HPLC-Systems von Hellpointner und Gäb (1989) bzw. Kurth (1992) (Fluoreszenz-HPLC-System I) wurden auch für dieses System statistische Kenngrößen bestimmt.

Die Konzentrationen der zur Bestimmung der Kalibrierfunktionen verwendeten Standards betragen max. 10 - 20 $\mu\text{mol/l}$. Dieser Konzentrationsbereich wurde gewählt, da die neuen Systeme primär zur Analyse atmosphärischer Spurenstoffe eingesetzt werden sollen und sich mit den häufig verwendeten Probenahmeverfahren (Kryosampling, Sammelwendel) durch Anreicherung nur Konzentrationen bis zu etwa 5 $\mu\text{mol/l}$ erreichen lassen.

3.2.3.1 Atmosphärisch relevante Hydroperoxide

Fluoreszenz-HPLC-System II

Obwohl sich das von Hellpointner und Gäb (1989) entwickelte und später von Kurth (1992) veränderte HPLC-System (Fluoreszenz-HPLC-System I) sehr gut bewährt hat, wurden im Arbeitskreis weitere Modifikationen vorgenommen. So wurde das ursprüngliche 3-Pumpen-System zu einem 2-Pumpen-System ohne Reaktionsschleifen-temperierung umgebaut. Bei diesem System steht dem Vorteil der geringeren Kosten ein erheblicher Nachteil gegenüber, den Kurth schon am ursprünglichen Fluoreszenz-HPLC-System I erkannte. Die eingesetzte Reagenzienlösung des 3-Pumpen-Systems enthielt, ähnlich wie die des 2-Pumpen-Systems, sowohl das Enzym (HRP) als auch das Substrat (PES) in einer Lösung. Bei längerem Gebrauch dieser Lösung wurde ein Anstieg der Basislinie und eine Zunahme des Grundrauschens beobachtet. Da dieses Problem zumindest bei den eigenen Arbeiten erst nach deutlich mehr als 10 Stunden auftrat, wurde das System soweit möglich auch weiterhin eingesetzt (z. B. Polarsternfahrt). Bei der Bestimmung von H_2O_2 wurde gleichzeitig auch ein möglicher Einfluß der Reaktionskapillaren-Geometrie untersucht. Bei parallelen Messungen mit zwei Reaktionskapillaren gleicher Länge und gleichen Innendurchmessers, aber mit

unterschiedlichem Wicklungsdurchmesser bestätigten sich die von Heinmöller (1997) für Lipidhydroperoxide beschriebenen Ergebnisse (Tabelle 3). Danach lassen sich durch eng gewickelte und nach Möglichkeit auch den Drehsinn wechselnde Kapillaren schmalere und auch größere Signale erhalten.

Substanz	Steigung	Achsenabschnitt	Korrelationskoeffizient	VSA [$\mu\text{mol/l}$]	VVK [%]	NWG [$\mu\text{mol/l}$]	EG [$\mu\text{mol/l}$]	BG [$\mu\text{mol/l}$]
$\text{H}_2\text{O}_2^{\text{a}}$	290085	-20392	0.996	0.026	7.3	0.05	0.10	0.14
$\text{H}_2\text{O}_2^{\text{b}}$	241641	13145	0.998	0.058	9.4	0.06	0.12	0.17

Reaktionskapillare: ^aWicklungsdurchmesser ca 1 cm

^bWicklungsdurchmesser ca. 14 cm

Tabelle 3: Verfahrenskenngrößen bei der Bestimmung von H_2O_2 mit unterschiedlicher Geometrie der Reaktionskapillaren (Fluoreszenz-HPLC-System II)

Chemilumineszenz-HPLC-System

Mit dem optimierten Chemilumineszenz-HPLC-System wurden nur die atmosphärisch interessanten Hydroperoxide H_2O_2 , MHP und EHP gemessen. Dabei ließen sich die in Tabelle 4 aufgeführten Nachweisgrenzen erreichen. Auffällig ist die vergleichsweise geringe Steigung der H_2O_2 -Kalibrierfunktion, die jedoch nicht auf die geringere Empfindlichkeit des Hydroperoxides, sondern vielmehr auf die notwendige Einstellung des Detektors zurückzuführen ist.

Substanz	Steigung	Achsenabschnitt	Korrelationskoeffizient	VSA [$\mu\text{mol/l}$]	VVK [%]	NWG [$\mu\text{mol/l}$]	EG [$\mu\text{mol/l}$]	BG [$\mu\text{mol/l}$]
$\text{H}_2\text{O}_2^{\text{a}}$	87712	9238	0.996	0.32	11.2	0.09	0.18	0.40
MHP ^b	245983	28072	0.998	0.19	5.6	0.11	0.22	0.50
EHP ^b	195113	-27405	0.998	0.16	23.3	0.21	0.43	0.84

^a Detektorempfindlichkeit (Gain) 1; ^b Detektorempfindlichkeit (Gain) 10

Tabelle 4: Verfahrenskenngrößen der Analyse atmosphärischer Hydroperoxide (Chemilumineszenz-HPLC-System)

Aufgrund der unverhältnismäßig hohen Empfindlichkeit für H_2O_2 mußte der Detektor auf eine geringe Verstärkung (Gain 1) eingestellt werden, da ansonsten schon bei kleinen Konzentrationen eine Überschreitung des Meßbereichs zu beobachten war.

Bei dieser Einstellung waren die Signale des MHP erheblich (ca. Faktor 5) kleiner als die des H_2O_2 , so daß der Meßbereich um den Faktor 10 bzw. 100 verstärkt werden mußte. Die gewünschte Verstärkung konnte zwar während der laufenden Analyse eingestellt werden, dies hatte aber zur Folge, daß bis zu einer Minute danach keine Detektion möglich war (Anhang 2). Bei Messungen von Realproben würde dieses Verhalten zu einem Verlust an Information führen. Da die Luminol-Chemilumineszenz mit verschiedensten Katalysatoren häufig mit Erfolg zur Bestimmung von lipophilen Hydroperoxiden in komplexer Matrix (z. B. Blutplasma) eingesetzt wurde, dürfte mit der Kopplung von Hämatin-Katalyse und HPLC ein weiteres leistungsfähiges Analysensystem für diese Substanzklasse zur Verfügung stehen. Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelten HPLC-Methoden sollen jedoch primär dazu dienen, atmosphärische Proben bzw. Proben aus Smogkammern zu bestimmen, in welchen meist hohe H_2O_2 -Konzentrationen neben geringen Konzentrationen von HMHP, MHP und EHP vorkommen, so daß das Chemilumineszenz-HPLC-System aufgrund der oben beschriebenen Probleme nicht weiter untersucht wurde.

Phenylendiamin-UV/VIS-HPLC-Systeme

Die Standardlösungen für die Messungen mit dem neuen DMPD-UV/VIS-HPLC-System enthielten H_2O_2 ($t_r = 4.6\text{min}$), HMHP (5.4 min), MHP (7.4 min) und EHP (14.8 min) (Abbildung 23). Aufgrund unterschiedlicher Qualität oder Zustand der Säulen können die angegebenen Retentionszeiten jedoch leicht variieren. Die Kalibrierfunktionen und statistischen Kenngrößen des DMPD-UV/VIS-HPLC-Systems sind in Tabelle 5 aufgeführt. Mit Ausnahme von HMHP zeigten die untersuchten Hydroperoxide im Konzentrationsbereich bis $10\ \mu\text{mol/l}$ in etwa gleiche Empfindlichkeit.

Substanz	Steigung	Achsenabschnitt	Korrelationskoeffizient	VSA [$\mu\text{mol/l}$]	VVK [%]	NWG [$\mu\text{mol/l}$]	EG [$\mu\text{mol/l}$]	BG [$\mu\text{mol/l}$]
H_2O_2	23478	570	1.000	0.058	3.2	0.07	0.14	0.19
HMHP	18418	-893	0.999	0.068	5.3	0.11	0.22	0.30
MHP	23128	-581	1.000	0.100	4.4	0.19	0.38	0.52
EHP	23170	837	0.998	0.179	7.7	0.26	0.52	0.72

Tabelle 5: Verfahrenskenngrößen der Analyse atmosphärenchemisch relevanter Hydroperoxide (DMPD-UV/VIS-HPLC-System II)

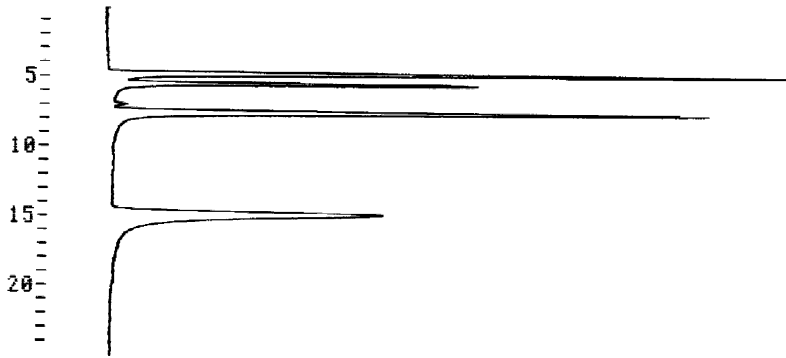


Abbildung 23: Chromatogramm einer Standardlösung (ca. $5 \mu\text{M}$ je Komponente) atmosphärischer Hydroperoxide (H_2O_2 , HMHP, MHP, EHP), Messung mit dem DMPD-UV/VIS-HPLC-System I

Für eine weitergehende Prüfung der Linearität wurde der Responsefaktor der Hydroperoxide bei verschiedenen Konzentrationen bestimmt. Die Responsefaktoren wurden als Quotienten der gemittelten Signalgröße und der Konzentration berechnet und in Abbildung 24 gegen die Konzentration aufgetragen (vgl. Heinmöller, 1997). Der lineare Bereich der Responsefaktoren erstreckt sich von etwa 1 bis mindestens $10 \mu\text{mol/l}$.

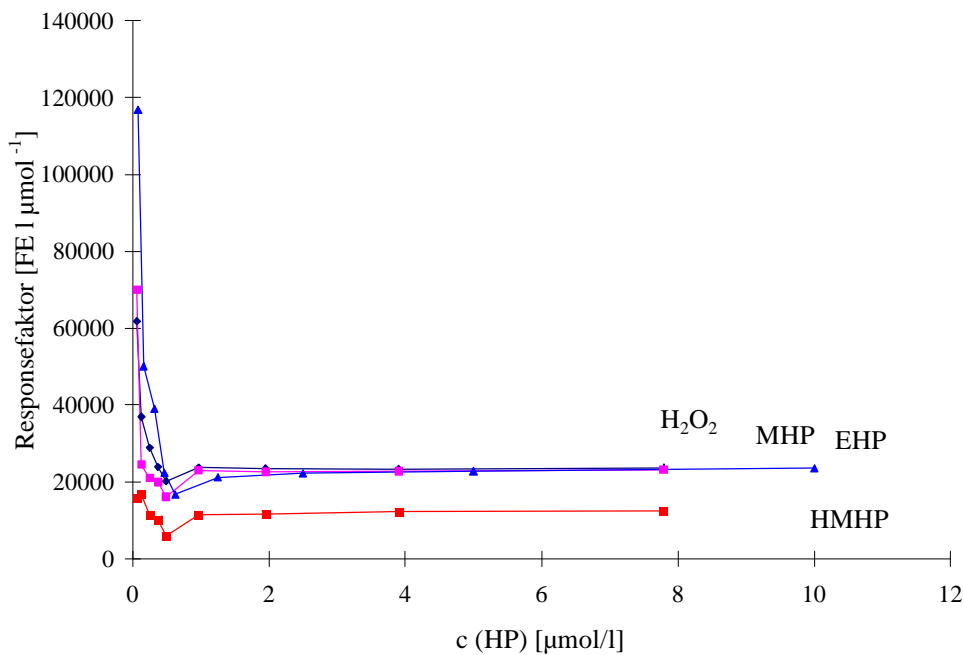


Abbildung 24: Ermittlung des linearen Bereichs bei der Messung atmosphärischer Hydroperoxide (DMPD-UV/VIS-HPLC-System II)

Für Messungen der atmosphärischen Hydroperoxide (z. B. bei Meßkampagnen) kann es aufgrund fehlender oder ungenügend reiner Hydroperoxidstandards sinnvoll sein, die Systeme nur auf H_2O_2 zu kalibrieren. Die Konzentration der anderen Hydroperoxide kann dann über einen auf H_2O_2 normierten Responsefaktor (Methodenfaktor) [42] bestimmt werden (z. B. Gottwald, 1993).

$$F_{\text{Methode}} = \frac{c(\text{HP}) \cdot S(H_2O_2)}{c(H_2O_2) \cdot S(\text{HP})} \quad [42]$$

mit $c(\text{HP})$ = Konzentration Hydroperoxid (z. B. MHP, EHP)
 S = Signalgröße [FE]

Da sich auch weitere substituierte para-Phenylendiamine zur empfindlichen Detektion von Hydroperoxiden einsetzen lassen, wurden H_2O_2 , MHP und EHP ebenfalls mit dem DEPD-UV/VIS-HPLC-System II untersucht. Neben den Messungen der Absorption im sichtbaren Bereich ($\lambda = 551 \text{ nm}$), wurden die H_2O_2 -Standards zusätzlich bei einer Wellenlänge von 330 nm vermessen. Aufgrund des höheren Extinktionskoeffizienten bei dieser Wellenlänge (Abbildung 6, S. 45) sollten eine höhere Empfindlichkeit und eine niedrigere Nachweisgrenze erreicht werden. Es zeigte sich jedoch, daß trotz der höheren Empfindlichkeit (Steigung der Kalibriergeraden) (siehe auch Abbildung 18, S. 64) keine Verbesserung der Nachweisgrenze möglich war.

Substanz	Steigung	Achsenabschnitt	Korrelationskoeffizient	VSA [$\mu\text{mol/l}$]	VVK [%]	NWG [$\mu\text{mol/l}$]	EG [$\mu\text{mol/l}$]	BG [$\mu\text{mol/l}$]
$H_2O_2^a$	13431	2216	0.999	0.136	5.5	0.04	0.08	0.11
$H_2O_2^b$	28014	-840	0.998	0.184	10.8	0.17	0.34	0.47
MHP ^a	10493	804	0.998	0.203	8.2	0.19	0.38	0.52
EHP ^a	9466	-2024	0.995	0.342	7.7	0.28	0.56	0.77

^a Detektionswellenlänge 551 nm; ^b Detektionswellenlänge 330 nm

Tabelle 6: Verfahrenskenngrößen atmosphärenchemisch relevanter Hydroperoxide (DEPD-UV/VIS-HPLC-System II)

Dieser zunächst widersprüchlich erscheinende Befund läßt sich damit erklären, daß die bei der Kalibrierung (Anhang 5, S. 148) erhaltenen Meßwerte bei $\lambda = 330 \text{ nm}$ eine deutlich größere Standardabweichung aufweisen. Da die Standardabweichung bei der

Berechnung der Nachweisgrenze nach DIN 32 645 berücksichtigt wird, bewirkt die höhere Empfindlichkeit in diesem Fall keine Verbesserung der Nachweisgrenze. Die Responsefaktoren für das DEPD-System sind oberhalb einer Konzentration von 2 $\mu\text{mol/l}$ konstant (Abbildung 25). Gegenüber dem DMPD-System beginnt damit der lineare Bereich erst bei um den Faktor zwei höheren Konzentrationen.

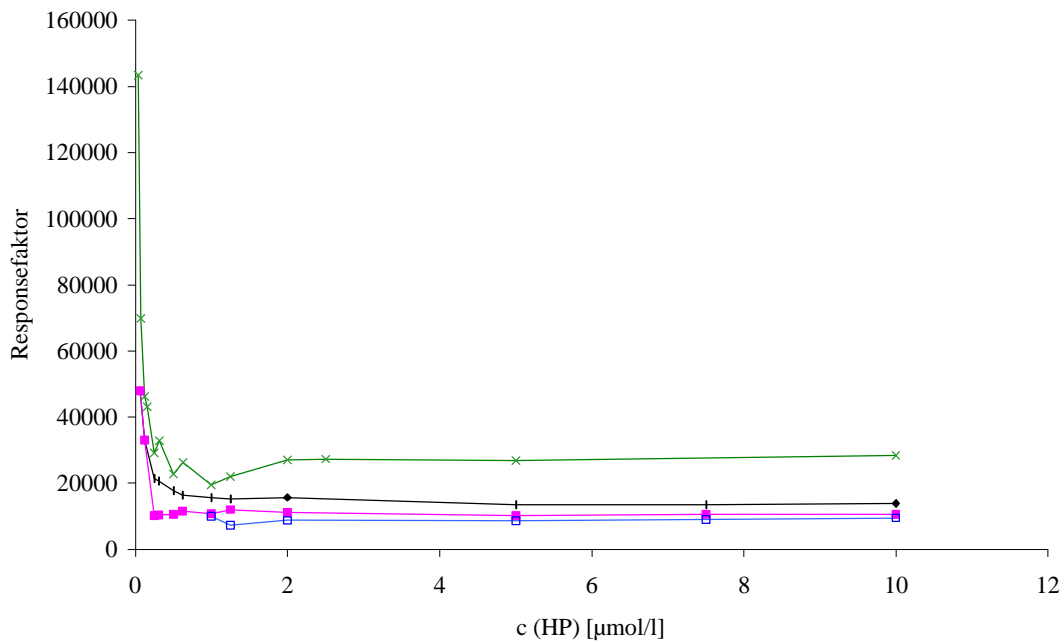


Abbildung 25: Ermittlung des linearen Bereichs bei der Messung atmosphärischer Hydroperoxide (DEPD-UV/VIS-HPLC-System II)

Bei weiteren Messungen von H_2O_2 und MHP wurde anstelle der Eisenkatalyse die Möglichkeit der Katalyse mit Meerrettichperoxidase (HRP) untersucht. Dieses System wurde mit einer HRP-Konzentration von 1 mg/l und einer DMPD-Konzentration von 10 mg/l in der Reaktionslösung bereits von Bader et al. (1988) als „Küvettenmethode“ zur empfindlichen Bestimmung von H_2O_2 eingesetzt. Im Vergleich dazu wurden die Konzentrationen in der HPLC-Reagenzienlösung so gewählt, daß sich nach Verdünnung mit dem Eluat HRP- bzw. DMPD-Konzentrationen von 5 und 1000 mg/l ergaben. Die mit diesem HPLC-System erhaltenen Kenngrößen sind in Tabelle 7 aufgeführt.

Substanz	Steigung	Achsen- abschnitt	Korrelations -koeffizient	VSA [μmol/l]	VVK [%]	NWG [μmol/l]	EG [μmol/l]	BG [μmol/l]
H ₂ O ₂	42.8	-567	0.996	30.3	10.1	36	71	98
MHP	93.4	25.4	0.983	137	14.4	197	394	542

Tabelle 7: Verfahrenskenngrößen atmosphärenchemisch relevanter Hydroperoxide (DMPD/HRP-UV/VIS-HPLC-System II)

Im Gegensatz zu den vorhergehenden Messungen (Fe(II)-katalysierte Oxidation von DMPD bzw. DEPD) konnten mit diesem Reaktionssystem nur vergleichsweise hohe Nachweisgrenzen erreicht werden. Auffällig ist zudem, dass sich für MHP trotz nahezu doppelter Empfindlichkeit (Steigung der Kalibriergeraden) um den Faktor vier höhere Nachweisgrenzen ergaben. Dies lässt sich jedoch, wie schon weiter oben beschrieben durch die größere Streuung der Meßwerte erklären.

Verwendung von narrow-bore Säulen

In den letzten Jahren haben verbesserte Herstellungsverfahren dazu geführt, daß neben den traditionell eingesetzten wide-bore HPLC-Säulen mit Innendurchmessern von 4.0 bis 4.6 mm auch Säulen mit 1.0 und 2.0 mm Innendurchmesser eingesetzt werden. Diese als micro-bore bzw. narrow-bore bezeichneten Säulen erreichen hohe Bodenzahlen und erlauben die Trennung komplizierter Gemische bei niedrigem Fluß. Aufgrund des niedrigen Flusses erhöht sich die Probensubstanzkonzentration, woraus sich höhere Signale und eine größere Empfindlichkeit des Systems ergeben. Ein großer umwelt- und kostenrelevanter Vorteil besteht bei diesen Systemen in der beträchtlichen Einsparung von Lösungsmittel. Sollen Applikationen von einer wide-bore auf eine narrow- oder micro-bore Säule übertragen werden, so kann der auf diesen Säulen benötigte Fluß nach folgender Gleichung berechnet werden:

$$Flu\beta_n = \frac{Flu\beta_w \cdot ID_n^2}{ID_w^2} \quad [43]$$

mit: $Flu\beta_n$ = Fluß der narrow- oder micro-bore Säule

$Flu\beta_w$ = Fluß der wide-bore Säule

ID_n = Innendurchmesser der narrow- oder micro-bore Säule

ID_w = Innendurchmesser der wide-bore Säule

Durch die Verwendung einer 2 mm narrow-bore Säule anstelle der bisher eingesetzten 4 mm wide-bore Säulen konnte der Eluentenfluß von 0.5 ml/min auf 0.125 ml/min reduziert werden. Zur weiteren Anpassung des Systems wurde die 7 m lange Reaktionskapillare mit einem Innendurchmesser von 0.25 mm durch eine 4 m lange Kapillare mit einem Innendurchmesser von 0.13 mm ersetzt. Die mit diesem System erhaltenen Kenngrößen sind in Tabelle 8 zusammengefaßt.

Substanz	Steigung	Achsenabschnitt	Korrelationskoeffizient	VSA [µmol/l]	VVK [%]	NWG [µmol/l]	EG [µmol/l]	BG [µmol/l]
H ₂ O ₂	25772	2234	0.999	0.16	5.2	0.15	0.30	0.41
MHP	19653	1180	1.000	0.10	1.5	0.09	0.18	0.25
EHP	25980	-1309	0.999	0.09	3.5	0.09	0.18	0.25

Tabelle 8: Verfahrenskenngrößen verschiedener atmosphärenchemisch relevanter Hydroperoxide (DMPD-UV/VIS-HPLC-System II, narrow-bore Säule Merck 2 mm ID)

Da sich durch die Verwendung der narrow-bore Säule keine signifikanten Vorteile hinsichtlich Empfindlichkeit und Nachweisvermögen ergaben, wurden wegen der höheren Verfügbarkeit der Säulen und einer gewünschten Vergleichsmöglichkeit mit früheren Arbeiten im weiteren Verlauf 4 mm wide-bore Säulen eingesetzt.

3.2.3.2 Beurteilung der Leistungsfähigkeit der eingesetzten HPLC-Systeme

Um die Leistungsfähigkeit der verschiedenen HPLC Systeme bei der Untersuchung von Standardlösungen atmosphärischer Hydroperoxide möglichst objektiv zu beurteilen, ist es sinnvoll die Verfahrenskenngrößen heranzuziehen. Als Kriterium für Empfindlichkeit und Genauigkeit der Systeme sind daher Nachweisgrenze (NWG) und Verfahrensvariationskoeffizient (VVK) von besonderer Bedeutung. Beim Vergleich der in Tabelle 9 aufgeführten NWG ist zu beachten, daß für das HRP/PES-Fluoreszenz-Verfahren in der Literatur die Methode zur Bestimmung der NWG nicht explizit angegeben wurde. Die NWG für H₂O₂ bei Hellpointner und Gäb (1989) sowie bei Kurth (1992) beruhen auf dem 3 σ -Konzept und wurden aufgrund gleicher Responsefaktoren auf MHP, HMHP und EHP übertragen (Turner, 1998). Dennoch

zeigt der Vergleich sehr deutlich, daß sich mit den neu entwickelten Chemilumineszenz-, DMPD- und DEPD-UV/VIS-HPLC-Systemen für H₂O₂ und die untersuchten organischen Hydroperoxide Nachweisgrenzen in der Größenordnung des bisher häufig angewendeten HRP/PES-Fluoreszenz-Systems erreichen lassen. Allerdings fallen die besonders hohen Nachweisgrenzen des mit HRP katalysierten DMPD-Systems auf, die vermutlich nicht nur auf die fehlende Optimierung dieses Systems zurückzuführen sind.

Substanz	HRP/PES-Fluoreszenz-HPLC NWG [$\mu\text{mol/l}$]	Luminol/Hematin-Chemilumineszenz-HPLC NWG [$\mu\text{mol/l}$]	DMPD/HRP-UV/VIS-HPLC ^f NWG [$\mu\text{mol/l}$]	DMPD-UV/VIS-HPLC NWG [$\mu\text{mol/l}$]	DEPD-UV/VIS-HPLC NWG [$\mu\text{mol/l}$]
H ₂ O ₂	0.05 ^a (0.07) ^b	0.09 ^d	98	0.07	0.04 (0.17) ^g
HMHP	0.05 ^c (0.07) ^b	-	-	0.11	-
MHP	0.05 ^c (0.07) ^b	0.11 ^e	542	0.19	0.19
EHP	0.05 ^c (0.07) ^b	0.21 ^e	-	0.26	0.28

^a Fluoreszenz-HPLC-System I; ^b Hellpointner und Gáb, 1989 (nicht detailliert angegeben, vor allem HMHP fraglich!); ^c Kurth, 1992 (nicht detailliert angegeben, vor allem HMHP fraglich!); ^d Bei Detektorempfindlichkeit (Gain) 1, bei bis zu (Gain) 100 wahrscheinlich deutlich niedriger; ^e bei Detektorempfindlichkeit (Gain) 10; ^f nicht optimiertes System; ^g Detektionswellenlänge 330 nm; - nicht bestimmt

Tabelle 9: Vergleich der Nachweisgrenzen bei der HPLC-Bestimmung verschiedener atmosphärisch relevanter Hydroperoxide

Da in den Publikationen (Hellpointner und Gáb, 1989; Kurth, 1992) keine Angaben über die erreichten Verfahrensvariationskoeffizienten vorlagen, konnten nur die im Rahmen dieser Arbeit ermittelten Kenngrößen miteinander verglichen werden. Insgesamt liegen die in Tabelle 10 aufgeführten Werte der DMPD- und DEPD-UV/VIS-Systeme deutlich unter 10 %, so daß die Genauigkeit dieser Systeme der des HRP/PES-Fluoreszenz-Systems entspricht. Auffällig sind allerdings die hohen Verfahrensvariationskoeffizienten des Luminol/Hematin-Chemilumineszenz-Systems, deren Ursache wahrscheinlich in der hohen Empfindlichkeit, dem relativ starken Untergrundrauschen und der damit verbundenen schlechten Peakauswertung zu suchen sind. Am Beispiel von H₂O₂ wird deutlich, daß es zugunsten einer höheren Genauigkeit sinnvoll ist, bei der Bestimmung von Hydroperoxiden mit den neuen UV/VIS-HPLC-Systemen bei einer Wellenlänge von 553 nm zu detektieren.

Substanz	HRP/PES-Fluoreszenz-HPLC VVK [%]	Luminol/Hematin-Chemilumineszenz-HPLC VVK [%]	DMPD/HRP-UV/VIS-HPLC ^c VVK [%]	DMPD-UV/VIS-HPLC VVK [%]	DEPD-UV/VIS-HPLC VVK [%]
H ₂ O ₂	7.3 ^a	11.2	10.1	3.2	5.5 (10.8) ^b
HMHP	-	-	-	5.3	-
MHP	-	5.6	14.4	4.4	8.2
EHP	-	23.3	-	7.7	7.7

^a Fluoreszenz-HPLC-System I; ^b Detektionswellenlänge 330 nm; ^c nicht optimiertes System - nicht bestimmt

Tabelle 10: Vergleich der Verfahrensvariationskoeffizienten bei der HPLC-Bestimmung verschiedener atmosphärisch relevanter Hydroperoxide

3.2.3.3 n-Alkylhydroperoxide (C₅ - C₁₈)

Da in einer früheren, im Arbeitskreis durchgeführten Arbeit (Heinmöller, 1997) chromatographische Kenngrößen für einige verzweigte und unverzweigte Alkylhydro-

n-Alkylhydroperoxid	Retentionszeit [min]			
	isokratisch ^a			Gradient ^b MeOH/ verd. H ₃ PO ₄ (v:v)
	CH ₃ CN/ verd. H ₃ PO ₄ (v:v)	MeOH/ verd. H ₃ PO ₄ (v:v)	MeOH/ verd. H ₃ PO ₄ (v:v)	
	70:30	90:10	95:5	
C ₄ H ₉ OOH	8.7	5.64	-	-
C ₅ H ₁₁ OOH	-	-	-	6.3
C ₆ H ₁₃ OOH	-	-	-	7.1
C ₈ H ₁₇ OOH	11.85	7.94	-	9.6
C ₁₀ H ₂₁ OOH	-	-	-	12.9
C ₁₂ H ₂₅ OOH	30.80	22.06	13.52	17.1
C ₁₄ H ₂₉ OOH	-	40.68	19.67	24.7
C ₁₆ H ₃₃ OOH	-	81.31	30.40	34.6
C ₁₈ H ₃₇ OOH	-	-	49.02	51.8

^a Säule: ODS-Hypersil (Shandon), 250 x 4.6 mm, 5 µm (Heinmöller, 1997)

^b Säule: Merck LiChrospher[®] 100 RP-18, 250 x 4 mm, 5 µm, Gradient: MeOH/verd. H₃PO₄ 0-6.5 min von 85 auf 95 % MeOH, 6.5-15 min, isokratisch 95 % MeOH, 15-20 min von 95 auf 98 % MeOH, anschließend isokratisch 98 % MeOH

- nicht bestimmt

Tabelle 11: Retentionszeiten einiger n-Alkylhydroperoxide bei verschiedenen Elutionsbedingungen

peroxide bei Verwendung der HRP und MP-11/PES-Fluoreszenz-HPLC-Systeme bestimmt wurden, lag es nahe diese Substanzen auch mit den neuen UV/VIS-HPLC-Systemen zu untersuchen. Dazu mußte vorab eine Optimierung bzw. Anpassung des Trennproblems an die geänderten Bedingungen der nichtenzymatischen HPLC erfolgen. In Tabelle 11 sind die Retentionszeiten einiger n-Alkylhydroperoxide bei isokratischer Elution und Gradientenelution angegeben. Mit dem verwendeten Gradientenprogramm war es möglich, die n-Alkylhydroperoxide mit 5 bis 18 C-Atomen in 52 min auf einer RP-18 Säule aufzutrennen (Abbildung 26). Im Gradientenprogramm wurde der Methanolanteil von anfangs 85 % innerhalb von 6.5 Minuten linear auf 95 % erhöht und 8.5 min bei dieser Zusammensetzung gehalten. Durch diese Einstellung konnten die kleineren n-Alkylhydroperoxide noch gut voneinander getrennt werden. Um auch eine möglichst schnelle Elution der höheren n-Alkylhydroperoxide zu gewährleisten, wurde der Methanolanteil nach einer Analysenzeit von 15 min innerhalb von 5 min linear auf 98 % erhöht.

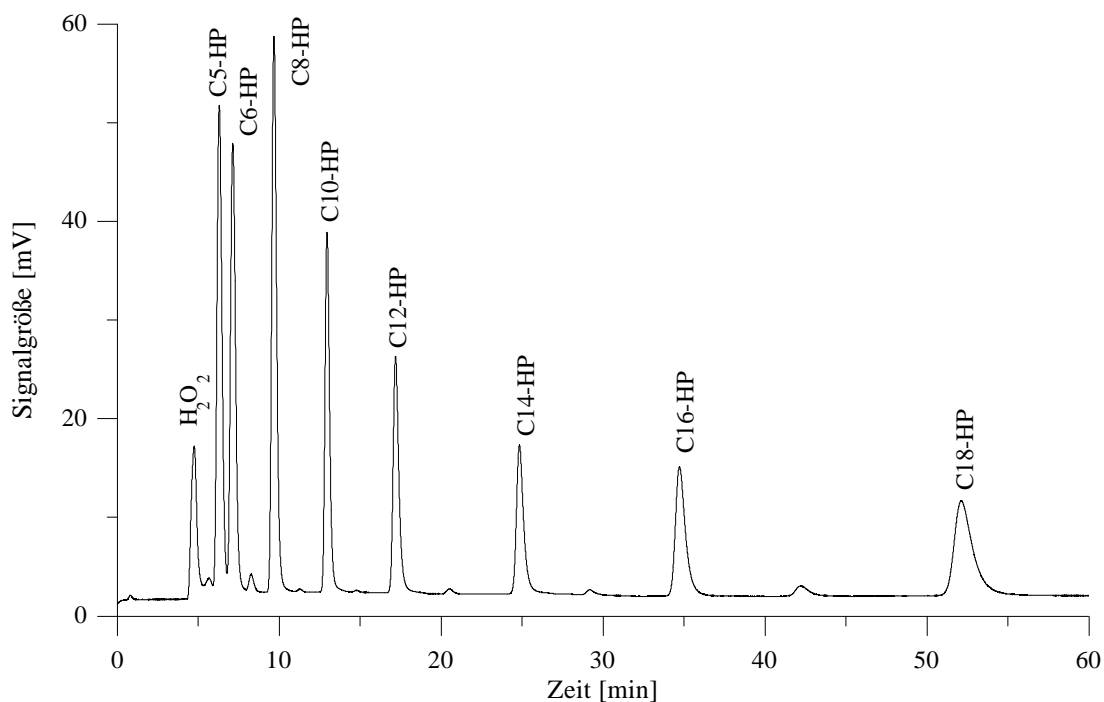


Abbildung 26: Trennung der n-Alkylhydroperoxide (C₅ - C₁₈) mittels Gradientenelution an RP 18, 250 x 4.0 mm (Gradientenelution: MeOH/verd. H₃PO₄ 0-6.5 min von 85 auf 95 % MeOH, 6.5-15 min isokratisch 95 % MeOH, 15-20 min von 95 auf 98 % MeOH, anschließend isokratisch 98 % MeOH)

Unter diesen Bedingungen wurden durch Mehrfachinjektion verschieden konzentrierter n-Alkylhydroperoxidmischungen die Kalibrierfunktionen erstellt und die Nachweisgrenzen bestimmt. Die Kenngrößen der Kalibrierfunktionen sowie die berechneten Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenzen sind in Tabelle 12 zusammengefaßt.

n-Alkylhydroperoxid	Steigung	Achsenabschnitt	Korrelationskoeffizient	VSA [$\mu\text{mol/l}$]	VVK [%]	NWG [$\mu\text{mol/l}$]	EG [$\mu\text{mol/l}$]	BG [$\mu\text{mol/l}$]
$\text{C}_5\text{H}_{11}\text{OOH}$	19307	5410	0.998	0.10	6.6	0.17	0.33	0.47
$\text{C}_6\text{H}_{13}\text{OOH}$	15285	5334	0.999	0.50	7.1	0.40	0.80	1.10
$\text{C}_8\text{H}_{17}\text{OOH}$	18740	3988	0.994	0.26	20.8	0.42	0.83	1.16
$\text{C}_{10}\text{H}_{21}\text{OOH}$	10794	2327	0.986	0.29	17.6	0.46	0.92	1.27
$\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{OOH}$	28594	286	0.995	0.08	8.5	0.12	0.24	0.33
$\text{C}_{14}\text{H}_{29}\text{OOH}$	5602	1590	0.998	0.77	11.8	0.67	1.34	1.86
$\text{C}_{16}\text{H}_{33}\text{OOH}$	6091	4097	0.996	1.30	15.3	1.84	3.68	4.51
$\text{C}_{18}\text{H}_{37}\text{OOH}$	1893	464	0.982	7.62	28.7	4.56	9.12	12.54

Tabelle 12: Verfahrenskenngrößen der n-Alkylhydroperoxide ($\text{C}_5 - \text{C}_{18}$)(DMPD-UV/VIS-HPLC-System II, Gradientenelution: MeOH/verd. H_3PO_4 0-6.5 min von 85 auf 95 % MeOH, 6.5-15 min isokratisch 95 % MeOH, 15-20 min von 95 auf 98 % MeOH, anschließend isokratisch 98 % MeOH)

Diese Kenngrößen machen deutlich, daß die Empfindlichkeit des Systems mit zunehmender C-Zahl der n-Alkylhydroperoxide abnimmt. In gleichem Maße nimmt die Nachweisgrenze mit steigender C-Zahl zu. Eine Ausnahme bildet das n-Dodecylhydroperoxid ($\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{OOH}$). Der Vergleich der Nachweisgrenzen mit denen bekannter Systeme (HRP/PES-Fluoreszenz- und FOX-UV/VIS-HPLC-System, Tabelle 13) zeigt die hohe Leistungsfähigkeit des neuen DMPD-UV/VIS-HPLC-Systems. So liegen die Nachweisgrenzen mit $0.17 \mu\text{mol/l}$ für das $\text{C}_5\text{H}_{11}\text{OOH}$ und $0.67 \mu\text{mol/l}$ für das $\text{C}_{14}\text{H}_{29}\text{OOH}$ deutlich niedriger als die mit dem FOX-UV/VIS-HPLC-System erreichten. Im Vergleich mit dem HRP/PES-System sind für die n-Alkylhydroperoxide bis C_{12} niedrigere Nachweisgrenzen möglich. Erst für die höheren n-Alkylhydroperoxide ($\text{C}_{14} - \text{C}_{18}$) liegen die Nachweisgrenzen des DMPD-UV/VIS-HPLC-Systems etwa um den Faktor vier darüber. Wird bei dem Vergleich zusätzlich der apparative Aufbau der Systeme, insbesondere der im allgemeinen geringere Response des UV/VIS-Detektors gegenüber dem Fluoreszenz-Detektor berücksichtigt, lassen sich

die mit dem DMPD-Reaktionssystem erreichten Nachweisgrenzen erst richtig einordnen.

n-Alkylhydroperoxid	HRP/PES-Fluoreszenz-HPLC ^a		FOX-HPLC ^a	DMPD-UV/VIS-HPLC ^b
	CH ₃ CN-Gradient NWG [μmol/l]	MeOH Gradient NWG [μmol/l]	MeOH Gradient NWG [μmol/l]	MeOH-Gradient NWG [μmol/l]
C ₅ H ₁₁ OOH	-	-	-	0.17
C ₆ H ₁₃ OOH	2.43	0.32	3.50	0.40
C ₈ H ₁₇ OOH	4.06	0.68	1.48	0.42
C ₁₀ H ₂₁ OOH	3.09	0.56	1.83	0.46
C ₁₂ H ₂₅ OOH	1.99	0.23	1.71	0.12
C ₁₄ H ₂₉ OOH	1.93	0.38	3.42	0.67
C ₁₆ H ₃₃ OOH	1.07	0.44	4.78	1.84
C ₁₈ H ₃₇ OOH	2.66	1.14	4.49	4.56

^a Heinmöller, 1997; ^b diese Arbeit

Tabelle 13: Nachweisgrenzen der n-Alkylhydroperoxide (C₅ - C₁₈) mit verschiedenen HPLC-Systemen

Zur Ermittlung des linearen Bereiches der DMPD-UV-VIS-Methode wurden in gleicher Weise wie für die hydrophilen Hydroperoxide auch für die n-Alkylhydroperoxide Responsefaktoren bestimmt. Abbildung 27 zeigt, daß diese im Konzentrationsbereich von etwa 5 μmol/l bis 60 μmol/l annähernd konstant sind.

Frühere Untersuchungen mit dem HRP/PES-Fluoreszenz-HPLC-System ergaben entsprechende Ergebnisse. Auch damals stellte sich ein konstanter Responsefaktor erst oberhalb von 5 μmol/l ein (Heinmöller, 1997). Allerdings sind die absoluten Responsefaktoren aufgrund der unterschiedlichen Reaktionssysteme und Detektionsverfahren nicht direkt vergleichbar. Im Gegensatz zu den hier erhaltenen Ergebnissen (Abbildung 27) ergab sich für die Responsefaktoren des HRP/PES-Systems bei einer Konzentration von 10 μmol/l die Reihenfolge C₈ > C₁₀ > C₁₂ ≅ C₆ > C₁₆ > C₁₈ > C₁₄-HP (Heinmöller, 1997).

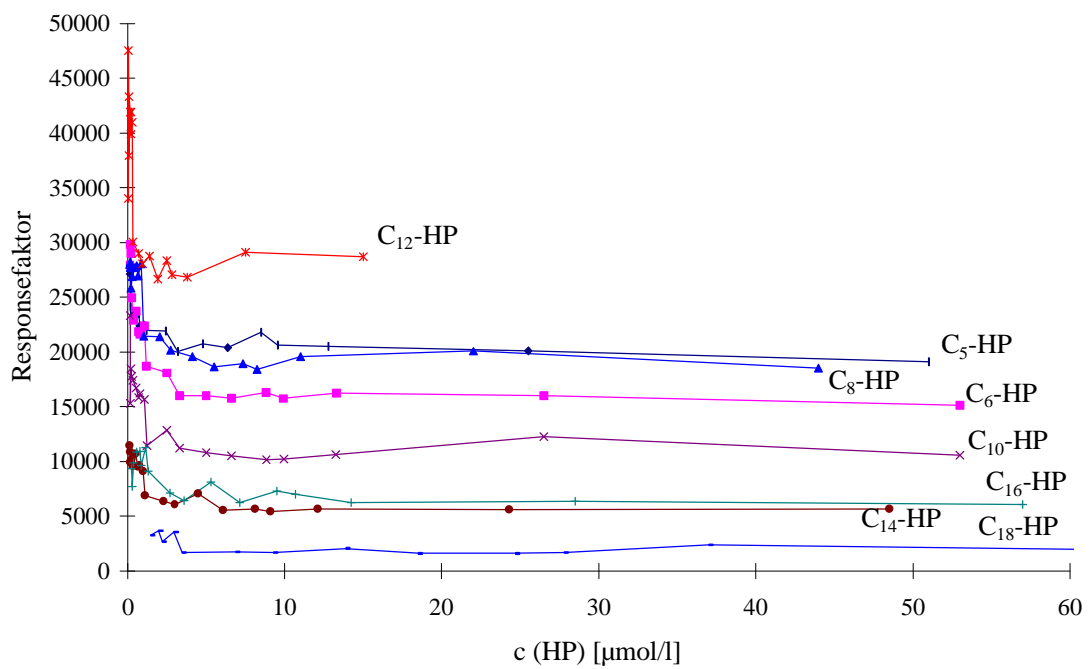


Abbildung 27: Ermittlung des linearen Bereiches bei der Messung der *n*-Alkylhydroperoxide (C₅ - C₁₈, DMPD-UV/VIS-HPLC-System II)

3.2.3.4 Verzweigte Alkyl- und Arylalkylhydroperoxide

Neben den *n*-Alkylhydroperoxiden waren die verzweigten Alkylhydroperoxide von besonderem Interesse, da diese mit den bisher eingesetzten enzymatischen Systemen

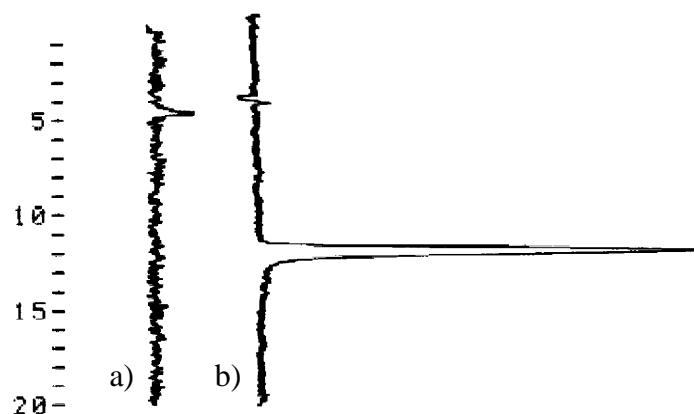


Abbildung 28: Vergleich der Chromatogramme einer 8 µM Lösung von *tert*-Butylhydroperoxid (a: HRP/PES-Fluoreszenz-HPLC-System II, b: DMPD-UV/VIS-HPLC-System I, Elution: isokratisch MeOH/verd. H₃PO₄ 40:60 (v:v))

nicht, oder nur mit sehr geringer Empfindlichkeit detektiert werden konnten (Kurth, 1992; Heinmöller, 1997). Ebenso wie bei den Untersuchungen von Kurth, (1992) ergab die Injektion von tert-Butylhydroperoxid-Standards in das HRP/PES-Fluoreszenz-HPLC-System bis zu Konzentrationen von 100 mmol/l keine Signale, während das neue nichtenzymatische UV/VIS-HPLC-Reaktionssystem die empfindliche Detektion dieses Hydroperoxids ermöglichte (Abbildung 28).

Zur Ermittlung der chromatographischen Kenngrößen der Analyse von verzweigten Alkyl- und Arylalkylhydroperoxiden mit dem DMPD-UV/VIS-HPLC-System wurde ein Gradientenprogramm, welches die gleichzeitige Bestimmung aller untersuchten Hydroperoxide ermöglichen sollte, ausgearbeitet. Die Elution erfolgte mit einem MeOH/verd. H₃PO₄-Gradienten, bei dem das Mischungsverhältnis von anfangs 50 % MeOH innerhalb von 15 min linear auf 80 % MeOH erhöht wurde. Danach wurde isokratisch mit 80 % MeOH eluiert. Mit diesem Programm konnten die untersuchten

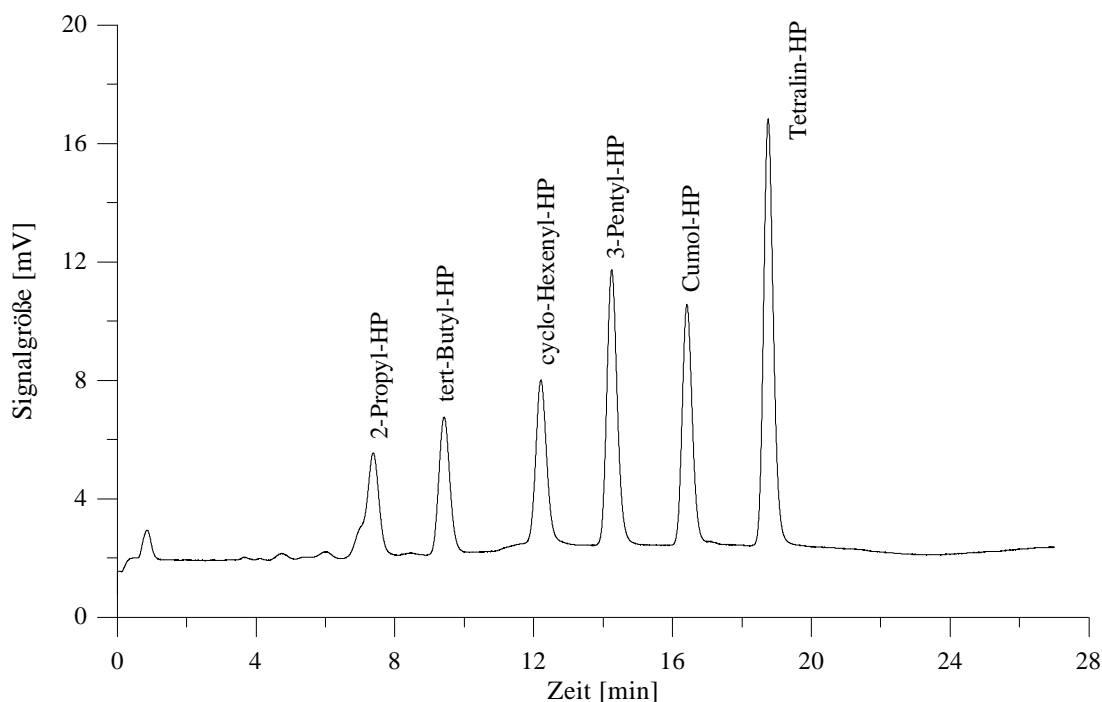


Abbildung 29: Trennung einiger sekundärer und tertiärer Alkyl- und Arylalkylhydroperoxide mittels Gradientenelution (DMPD-UV/VIS-HPLC-System II, Gradienten-elution: MeOH/verd. H₃PO₄ 0-15 min von 50 auf 80 % MeOH, anschließend isokratisch 80 % MeOH)

Hydroperoxide bis auf 3-Pentyl- und 1-Phenylethylhydroperoxid innerhalb von 20 min getrennt werden (Abbildung 29, Anhang 10). 1-Phenylethylhydroperoxid wurde daher nicht im gemischten Standard (Abbildung 29), sondern separat als Mischung mit Cumol- und Tetralin-Hydroperoxid vermessen (Anhang 9).

Zur Charakterisierung der Leistungsfähigkeit des UV/VIS-HPLC-Systems wurden ebenso wie bei den vorhergehenden Messungen die chromatographischen Kenngrößen mit Hilfe von Standardgemischen bestimmt. Die mit den DMPD- und DEPD-UV/VIS-HPLC-Systemen ermittelten Kenngrößen der Kalibrierfunktionen sowie die berechneten Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenzen sind den Tabellen Anhang 11 und 12 zu entnehmen. Bei den Untersuchungen ergaben sich für fast alle untersuchten Hydroperoxide sehr niedrige Nachweisgrenzen, mit Werten von 0.04 bis 0.28 $\mu\text{mol/l}$ für das DMPD- und 0.07 bis 0.42 $\mu\text{mol/l}$ für das DEPD-UV/VIS-HPLC-System. Für das cyclo-Hexenyl-Hydroperoxid ließen sich dagegen nur um ein bis zwei Größenordnungen höhere Nachweisgrenzen erreichen. Diese unerwartet hohen Werte sind aufgrund der Strukturverwandtschaft zum Tetralinhydroperoxid zunächst nicht zu erklären. Gegen einen möglichen systematischen Fehler, wie z. B. fehlerhafte Konzentrationen der Hydroperoxidstandards spricht sowohl die unabhängige iodometrische Konzentrationbestimmung der Hydroperoxidstammlösung als auch die um den Faktor zehn bis dreißig geringere Steigung der Kalibrierfunktion.

Die in Tabelle 14 dargestellten, mit verschiedenen HPLC-Detektionsmethoden erhaltenen Nachweisgrenzen für verzweigte Alkyl- bzw. Arylalkylhydroperoxide zeigen sehr eindrucksvoll die wesentlich höhere Leistungsfähigkeit der neuen UV/VIS-HPLC-Systeme gegenüber den bekannten Fluoreszenz-HPLC-Systemen. So konnten mit den neuen Systemen Nachweisgrenzen erreicht werden, die bis zu einem Faktor 100 unter denen der enzymatischen Fluoreszenzsysteme liegen. Ebenso gelang die Detektion des cyclo-Hexenyl-Hydroperoxids und die des β -Pinenhydroperoxids im $\mu\text{molaren}$ Konzentrationsbereich. Im Gegensatz zu den enzymatischen Reaktionssystemen, deren Leistungsfähigkeit durch die fehlende Empfindlichkeit gegenüber sterisch anspruchsvolleren Hydroperoxiden begrenzt wird, ermöglicht das nicht-enzymatische UV/VIS-HPLC-System auch für diese Verbindungen Nachweisgrenzen wie für die n-Alkylhydroperoxide.

Hydroperoxid	HRP/PES- Fluoreszenz-HPLC NWG [$\mu\text{mol/l}$]	MP-11/PES- Fluoreszenz-HPLC NWG [$\mu\text{mol/l}$]	DMPD-UV/VIS- HPLC NWG [$\mu\text{mol/l}$]	DEPD-UV/VIS- HPLC NWG [$\mu\text{mol/l}$]
2-Propyl-HP	nachweisbar, ^a	-	0.28	0.42
2-Butyl-HP	9.5 ^b / n. n. ^a	13.83 ^b	-	-
tert-Butyl-HP	n. n. ^a	-	0.10	0.33
cyclo-Hexenyl-HP	n. n. ^b	n. n. ^b	3.5	3.7
3-Pentyl-HP	12.33 ^b	17.73 ^b	0.18	0.42
Cumol-HP	n. n. ^a	6.8 ^d	0.10	0.17
Tetralin-HP	n. n. ^f	6.3 ^d	0.04	0.07
1-Phenylethyl-HP	-	-	0.19	0.09
2-Hydroxy- 1-phenylethyl-HP	<10 ^{cd}	0.5 ^{cd}	-	-
β -Pinen-HP	n. n. ^b	n. n. ^b	$\cong 100^e$	-

^a Kurth, 1992 ^b Heinmöller, 1997; ^c Schmitz, 1994; ^d NWG: 3 s-Konzept (Kaiser und Specker, 1955) ^e abgeschätzt aus dem Signal einer 800 μM Lösung; ^f diese Arbeit; n. n. nicht nachweisbar (bei untersuchten Konzentrationen bis zu 10 mmol/l^a, 1 mmol/l^b, 75 $\mu\text{mol/l}$ ^f); - keine Angabe bzw. nicht bestimmt

Tabelle 14: Vergleich der Nachweisgrenzen einiger sekundärer und tertiärer Alkyl- bzw. Arylalkylhydroperoxide

3.2.3.5 Alkoxyalkylhydroperoxide

Zur weiteren Untersuchung des UV/VIS-HPLC-Systems wurden verschiedene Alkoxyalkylhydroperoxide eingesetzt, die u. a. bei der Oxidation von Ethern entstehen können. Da Ether in zunehmendem Maße als Kraftstoffzusätze in Mischungsverhältnissen bis zu 15 % je Einzelkomponente (z. B. tert-Butylmethylether) verwendet werden, ist ihre Emission, aber auch daraus gebildeter Alkoxyalkylhydroperoxide, nicht auszuschließen (Shell Technischer Dienst, 1994). Die chromatographische Untersuchung erfolgte mit einer homologen Reihe von Alkoxy-methylhydroperoxiden (Methoxy- bis Butoxymethylhydroperoxid) sowie den am Alkoxyrest verzweigten Analogen iso-Propoxy- und tert-Butoxymethylhydroperoxid. Bei isokratischer Elution mit Methanol/Wasser-Gemischen nimmt die Retentionszeit mit steigender C-Zahl der Alkoxy-Substituenten zu, die Alkoxy-methylhydroperoxide mit verzweigtem Substituenten eluieren vor ihren unverzweigten Isomeren. Mit zunehm-

endem Methanolanteil verläuft die Elution schneller, bei mehr als 60 % Methanol ist jedoch keine Trennung der Hydroperoxide möglich (Abbildung 30, Anhang 19).

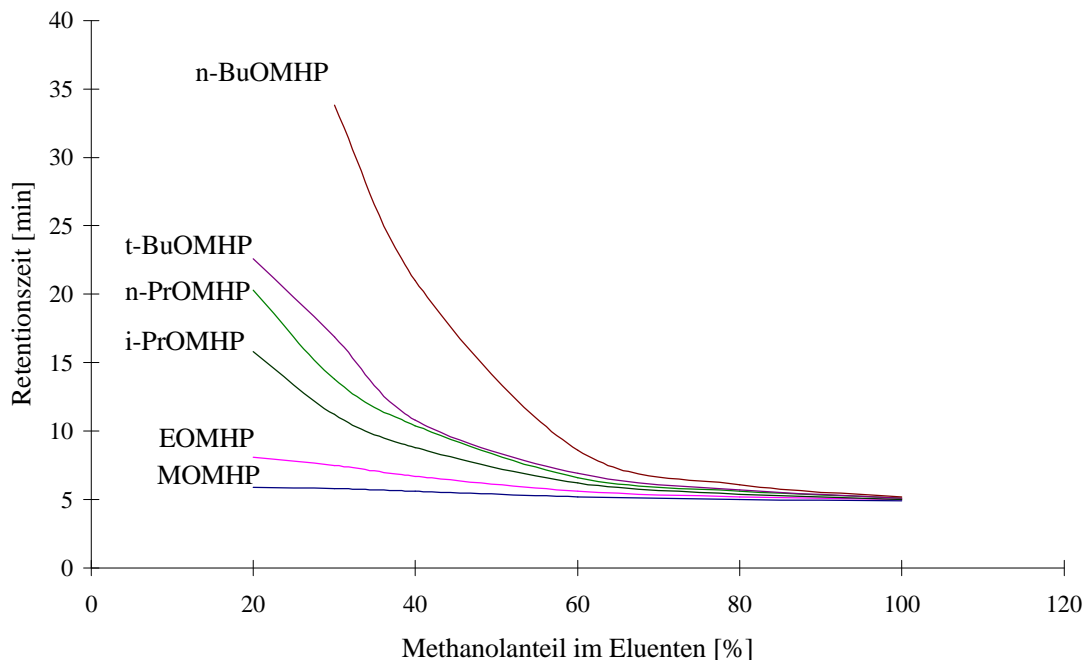


Abbildung 30: Änderung der Retentionszeiten einiger Alkoxyethylhydroperoxide bei isokratischer Elution mit MeOH/verd. H_3PO_4

Zur Trennung der Hydroperoxide in einem Lauf wurde ein Gradientenprogramm entwickelt. Nach 10 min isokratischer Elution wird der Methanolanteil innerhalb von 8 min linear von 30 % auf 60 % erhöht und bis zum Ende des Laufes bei diesem Mischungsverhältnis gehalten. Mit diesem Gradienten wird, wie in Abbildung 31 dargestellt, für alle untersuchten Alkoxyethylhydroperoxide eine Basislinientrennung erreicht. Der vordere Bereich des Signals des n-Propoxyethylhydroperoxides wurde durch die Elution einer unbekanntem Verbindung, vermutlich eines Hydroxyethylalkoxyethylperoxids, überlagert. Solche Additionsprodukte von Formaldehyd und Hydroperoxid traten als Verunreinigungen in den synthetisierten Standards auf und können, wie das Hydroxyethyl-tert-butoxyethylperoxid (HM-(t-BuO)MP) zeigt, durchaus detektiert werden (Abbildung 31).

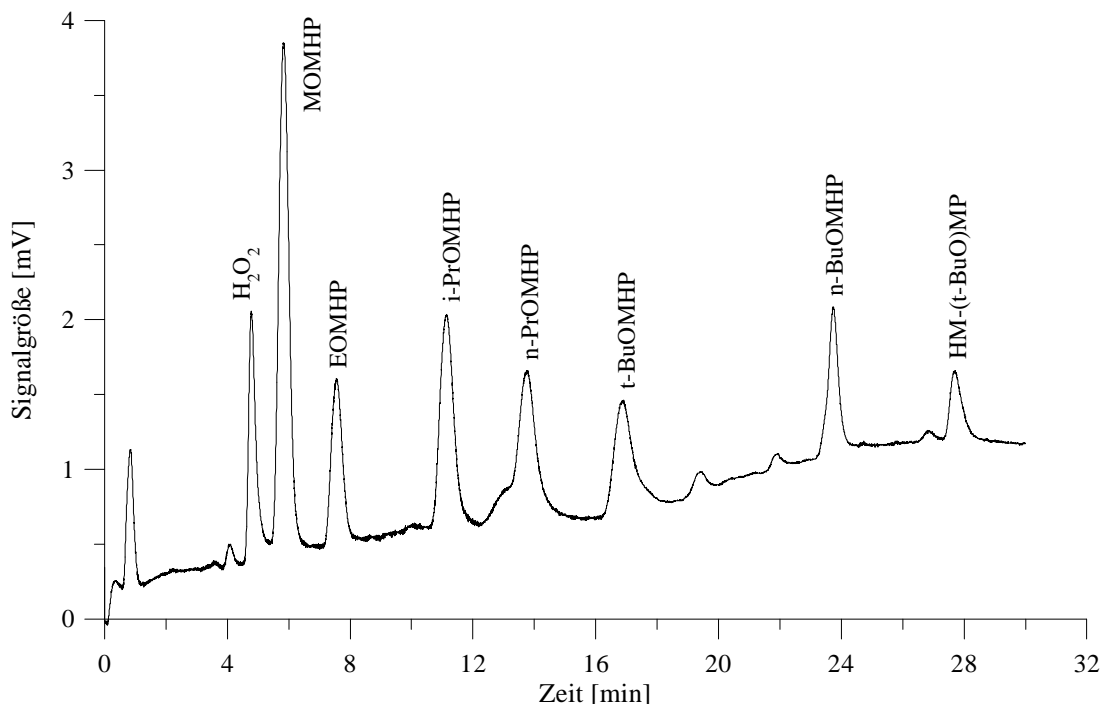


Abbildung 31: Trennung einiger Alkoxymethylhydroperoxide mittels Gradientenelution (Säule: RP-18, 250 x 4.0 mm; Gradientenelution: MeOH/verd. H_3PO_4 (v:v) 0-10 min isokratisch 30 % MeOH, 10-18 min von 30 auf 60 % MeOH, anschließend isokratisch 60 % MeOH)

Die chromatographischen Kenngrößen der Alkoxymethylhydroperoxide wurden sowohl unter isokratischen Elutionsbedingungen als auch bei Gradientenelution bestimmt. Während bei isokratischer Elution Nachweisgrenzen bestimmt werden konnten, die in etwa denen der unverzweigten und verzweigten Alkylhydroperoxide entsprachen, lagen diese bei Gradientenelution eines gemischten Standards etwa um den Faktor zwei höher (Anhang 21 und 23). Neben höheren Nachweisgrenzen ergaben sich bei Gradientenelution zudem geringere Empfindlichkeiten. Während sich die höheren Nachweisgrenzen über größere Standardabweichungen, verursacht durch die geringere Integrationsgenauigkeit infolge der breiteren Signale und des stärkeren Rauschens erklären lassen, kann dies nicht zur Erklärung des Empfindlichkeitsverlustes beitragen. Der Rückgang der Empfindlichkeit muß jedoch nicht zwangsläufig mit den chromatographischen Bedingungen zusammenhängen, sondern kann auch durch eine Veränderung der Standardlösung hervorgerufen werden. Dies scheint umso mehr wahrscheinlich, da sowohl in dieser als auch in einer früheren Arbeit gezeigt werden konnte, daß schon die in Lösung befindlichen Einkomponenten-

standards der Alkoxyalkylhydroperoxide zur Zersetzung neigen (Boddenberg, 1994). Neben den chromatographischen Kenngrößen der Alkoxymethylhydroperoxide wurden auch die Kenngrößen der bei der Oxidation von Diethylether und Tetrahydrofuran entstehenden Alkoxyalkylhydroperoxide bestimmt. Für beide Verbindungen ließen sich bei isokratischer Elution mit Methanol/verd. H₃PO₄ 45:55 (v:v) Nachweisgrenzen von 0.03 bzw. 0.04 µmol/l erreichen (Anhang 25). Die Substanzen eluierten unter den angegebenen chromatographischen Bedingungen nach 6.3 (THF-HP) bzw. 7.6 min (EOEHP). Beim Vergleich der mittels UV/VIS- bzw. HRP/PES-Fluoreszenz-HPLC erhaltenen Ergebnisse zeigten sich für das neue System zum Teil erheblich bessere Nachweisgrenzen. Bei der Beurteilung der Daten ist allerdings zu beachten, daß die Elution der Alkoxyalkylhydroperoxide im HRP/PES-System mit Wasser erfolgte (Boddenberg, 1994). Daher sind nur die Daten des Methoxymethylhydroperoxids (in beiden Fällen rein wäßrige Elution) gut vergleichbar, während die für das HRP/PES-System angegebenen Nachweisgrenzen von Ethoxymethyl- und 1-Ethoxyethylhydroperoxid durch Elution mit einem organischen Laufmittel verbessert werden könnten. Andererseits ist zu bedenken, daß die nach dem 3σ-Konzept (Kaiser und Specker, 1955) bestimmten Nachweisgrenzen in der Regel deutlich unter denen der DIN liegen.

Hydroperoxid	HRP/PES-Fluoreszenz-HPLC isokratisch ^a NWG [µmol/l]	DMPD-UV/VIS-HPLC Gradient NWG [µmol/l]	DEPD-UV/VIS-HPLC isokratisch NWG [µmol/l]
MOMHP	(0.7)	0.95	0.11
EOMHP	(2.1)	0.74	0.07
i-PrOMHP	-	1.4	0.10
n-PrOMHP	-	3.8 (0.5)	0.40
tert-BuOMHP	-	9.8 (2)	1.0
n-BuOMHP	-	16 (2)	0.46
EOEHP	(2.1)	-	0.06
THF-HP	-	-	0.04

^a Boddenberg, 1994, Elution mit 100 % verd. H₃PO₄, Werte in Klammern NWG nach dem 3σ-Konzept (Kaiser und Specker, 1955)

Tabelle 15: Vergleich der erreichbaren Nachweisgrenzen für einige Alkoxyalkylhydroperoxide mit verschiedenen HPLC-Systemen

3.2.3.6 Benzoylperoxid

Eine weitere Meßreihe mit dem DMPD-UV/VIS-HPLC-System sollte klären, inwieweit dieses auch bei der Bestimmung von Peroxiden eingesetzt werden kann. Als Standardsubstanz wurde Benzoylperoxid, welches z. B. in der Pharmazie und Polymerchemie Verwendung findet, gewählt. Das mit 25 % Wasser versetzte, käufliche Benzoylperoxid wurde in Methanol/verd. H_3PO_4 80:20 (v:v) gelöst und zur Herstellung unterschiedlich konzentrierter Standardlösungen verdünnt. Bei isokratischer Elution mit Methanol/verd. H_3PO_4 90:10 (v:v) ergab sich an einer RP-18-Standardssäule eine Retentionszeit von 9.3 min. Bei einem akzeptablem Verfahrensvariationskoeffizienten von 8.8 % ließ sich eine Nachweisgrenze von 0.25 $\mu\text{mol/l}$ erreichen. Diese liegt zwar etwa um den Faktor 4 über der von H_2O_2 , allerdings immer noch im Bereich der für die unverzweigten und verzweigten Alkylhydroperoxide bestimmten Nachweisgrenzen. Da Diacylperoxide wie das Benzoylperoxid sehr leicht in Radikale zerfallen können und daher häufig als Initiatoren radikalischer Reaktionen eingesetzt werden, sind die hier für das Benzoylperoxid gefundenen Ergebnisse sicher nicht auf Dialkylhydroperoxide übertragbar. In einer neueren Arbeit über die „hochempfindliche spektrophotometrische Bestimmung von Benzoylperoxid“ wird dieses in einem „Küvettenverfahren“ mit N,N,N',N'-Tetramethyl-p-phenylen-diamin (TMPD) unter Ce(IV)-Katalyse bestimmt (Mori et al., 1997). Da unter den Bedingungen dieser Untersuchungen etwas höhere Extinktionen als mit den in dieser Arbeit verwendeten Reagenzien DMPD und Fe(II) gemessen wurden, können die hier erreichten Nachweisgrenzen vielleicht noch verbessert werden. Aus zwei Gründen sollte dieses System jedoch sehr kritisch betrachtet werden. Zum einen bewirkt die Zugabe von H_2O_2 im 10 fachen Molverhältnis keine Erhöhung des Signals, zum anderen wird für das Küvettensystem mit TMPD leider keine konkrete Nachweisgrenze, sondern eine um den Faktor fünfzig bessere Nachweisempfindlichkeit gegenüber einem früher beschriebenen N-Ethyl-2-naphthylamin-Reaktionssystem angegeben (Mori et al., 1995, 1997). Da auch in dieser Arbeit die Angabe von Empfindlichkeit und Nachweisgrenze fehlt, ist ein gewünschter Vergleich, über welchen evtl. eine Abschätzung der Empfindlichkeitssteigerung möglich wäre, nicht durchführbar (Mori et al., 1995).

3.2.4 Untersuchung der Querempfindlichkeit des neuen DMPD-UV/VIS-HPLC-Systems

Obwohl bei der HPLC-Analyse mittels Nachsäulenderivatisierung durch die chromatographische Trennung der Komponenten und die spezifische Reaktion eine hohe Selektivität erreichbar ist, können Querempfindlichkeiten nicht ausgeschlossen werden. So kann bei der Koelution von Hydroperoxid und störender Substanz sowohl eine Signalerhöhung als auch eine Signalerniedrigung eintreten. Werden Hydroperoxide und störende Substanzen an der HPLC-Säule ausreichend getrennt, läßt sich die störende Substanz durch ein positives oder negatives Signal identifizieren. Während negative Signale problemlos als Querempfindlichkeit erkennbar sind, führen positive Signale sehr leicht zur Vortäuschung von Hydroperoxiden und damit zu einer Verwechslung. So können beispielsweise bei der HRP/PES-Fluoreszenz-HPLC fluoreszierende Verbindungen fälschlicherweise ein Hydroperoxid anzeigen. Treten bei der Untersuchung einer Probe unbekannte Signale auf, sollte sowohl bei Fluoreszenz- als auch bei der UV/VIS-Detektion die Probe nochmals ohne Reagenzien untersucht werden. Um vergleichbare Retentionszeiten zu erhalten, kann über die Reagenzienpumpen Lösungsmittel zugegeben werden.

Da die substituierten Phenylendiamine mit vielen oxidierenden Substanzen (z. B. O_3 , Cl_2 , Metallsalzen) reagieren können, ist für die Nachsäulenderivatisierung mit dem Fe(II)/DMPD-Reagenz eine vergleichsweise geringe Selektivität zu erwarten (Palin, 1957; Nickel, 1978; Schick et al., 1997). Neben den oxidierenden Substanzen können auch im sichtbaren Bereich bei 553 nm absorbierende Verbindungen Signale erzeugen. Aufgrund der möglichen Detektion von Formaldehyd mit einer H_2O_2 -haltigen DMPD-Reagenzienlösung ist bei der Koelution von H_2O_2 mit Aldehyden eine Querempfindlichkeit gegenüber diesen nicht auszuschließen (Evmiridis et al., 1990). Zur Beurteilung einer möglichen Querempfindlichkeit wurden unterschiedlich konzentrierte Lösungen potentiell störender Substanzen mit dem HPLC-System untersucht. Da die Fe(II)-katalysierte Oxidation der Phenylendiamine durch Hydroperoxide sehr wahrscheinlich über einen Fe(II)/Fe(III)-Zyklus erfolgt, wurde erwartet, daß Fe(III)-Lösungen zu hohen Querempfindlichkeiten führen. Allerdings zeigten die schon in 3.2.2.1 beschriebenen Untersuchungen keine Signale für Fe(III)-Lösungen bis zu den dort gemessenen Konzentrationen von 100 $\mu\text{mol/l}$. Während ohne HPLC-Säule

Fe(III)-Konzentrationen $< 0.25 \mu\text{mol/l}$ bestimmt werden konnten (3.2.2.1), traten mit eingebauter Säule erst bei Konzentrationen von $> 400 \mu\text{mol/l}$ Signale auf. Bei diesen Untersuchungen eluierte Fe(III) mit einer Retentionszeit von 4.0 min vor H_2O_2 (4.7 min); erst ab Fe(III)-Konzentrationen von 4 mmol/l konnte dieses nicht mehr von H_2O_2 getrennt werden. Somit ist selbst bei der Untersuchung von Regenwasser, in welchem Fe(III)-Konzentrationen von 0.6 -1.4 $\mu\text{mol/l}$ vorliegen können, nicht mit Störungen der Hydroperoxidanalyse zu rechnen (Pehkonen et al., 1992). Neben Fe(III) wurden die in Tabelle 16 aufgeführten organischen Substanzen sowie O_3 und HNO_3 auf eine mögliche Querempfindlichkeit hin untersucht. Um eine Elution der organischen Komponenten zu gewährleisten, wurde sowohl mit verd. H_3PO_4 als auch mit Laufmittelgemischen der Zusammensetzung MeOH/verd. H_3PO_4 50:50 (v:v) eluiert. Außer O_3 , HCOOH und HNO_3 zeigte keine der, bis zur angegebenen Konzentration untersuchten Substanzen ein Signal (Tabelle 16).

Verbindung	maximal untersuchte Konzentration [mmol/l]	Response ab einer Konzentration von [$\mu\text{mol/l}$]
Fe (III)	4	400
O_3	≈ 4.2	- ^a
HCHO	3.1	-
CH_3CHO	1.2	-
$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CHO}$	1.3	-
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_2\text{CHO}$	1.8	-
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3\text{CHO}$	0.4	-
$\text{C}_6\text{H}_5\text{CHO}$	0.8	-
OHCCHO	1.9	-
HCOOH	4.1	70
HNO_3	5.8	80

- keine Querempfindlichkeit bis zur maximal untersuchten Konzentration nachgewiesen; ^a siehe Text bzgl. der H_2O_2 -Signale

Tabelle 16: Untersuchung der Querempfindlichkeit (DMPD-UV/VIS-HPLC)

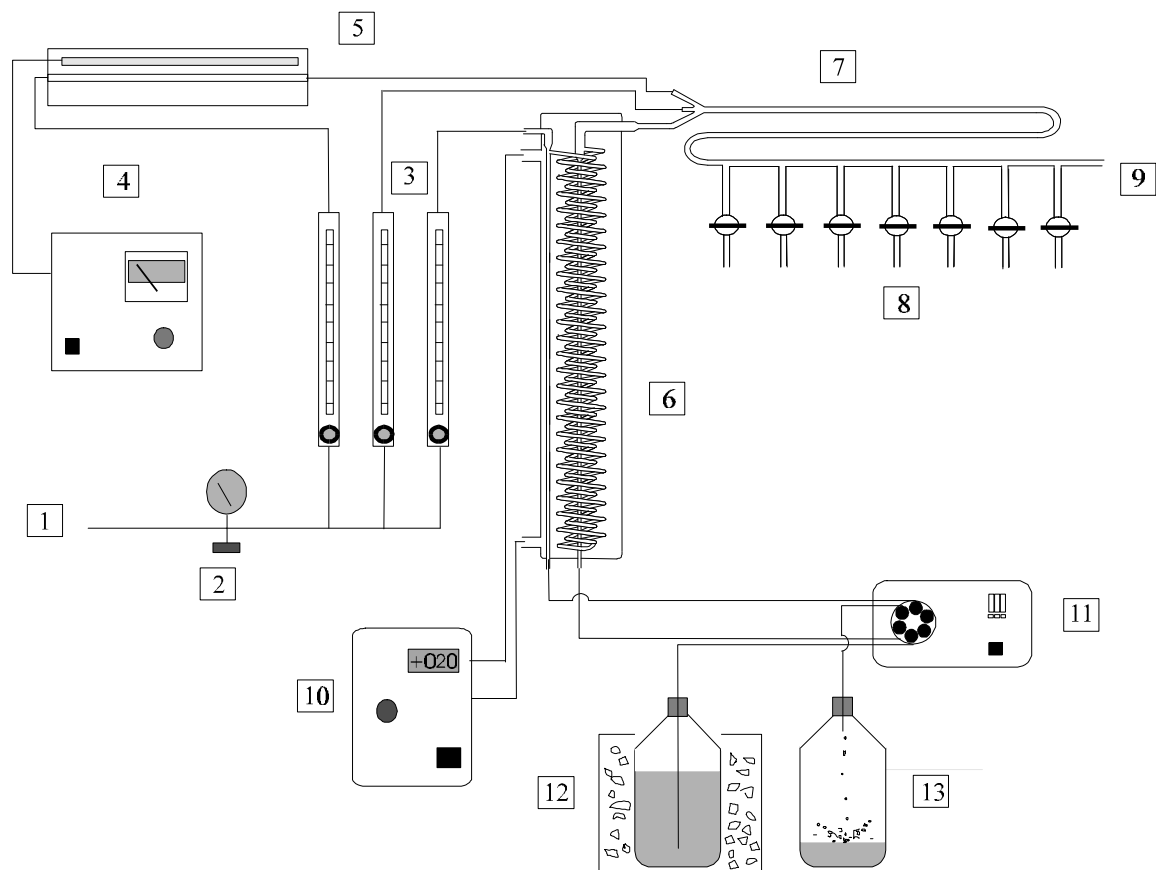
Zur Bestimmung einer möglichen Querempfindlichkeit gegenüber Ozon wurden verschiedene Gasvolumina mit einem Gehalt von 1 g/l O_3 in 10 ml tridestilliertes Wasser eingeleitet. Da nach dem Einleiten des Ozons alle untersuchten Lösungen

H₂O₂ enthielten, wurde dessen Konzentration parallel mit dem HRP/PES-Fluoreszenz-HPLC-System gemessen. Dabei ergaben sich identische H₂O₂-Konzentrationen der Lösungen. Unter der Annahme, daß das enzymatische System keine Querempfindlichkeit gegenüber O₃ zeigt, konnte so eine durch mögliche Koelution auftretende Querempfindlichkeit ausgeschlossen werden. Im Gegensatz dazu führte die Injektion der HCOOH- und HNO₃-Lösungen ab Konzentrationen von 70 bzw. 80 µmol/l zu unerwarteten Signalen bei Retentionszeiten von 6.0 bzw. 4.9 min. Insbesondere die mit Nitraten beobachtete Querempfindlichkeit sollte bei der Untersuchung von atmosphärischen Wasserproben (Regen-, Nebel-, Schnee- und Wolkenwasser) sehr gründlich berücksichtigt werden, da in diesen Proben NO₃⁻-Konzentrationen bis zu 10 mmol möglich sind (Graedel und Crutzen, 1994). Neben diesen beiden Substanzen können auch Peroxide eine Querempfindlichkeit verursachen. Da es allerdings vorstellbar ist, zukünftig mit nur einem Analysensystem Hydroperoxide und Peroxide zu bestimmen, sind „Querempfindlichkeiten“ gegenüber diesen Substanzen erwünscht (Hong, 1997). Bei weiter unten beschriebenen Untersuchungen der Abgase eines Notstromaggregats (3.3.3) und eines Abgasstaub-Extrakts aus dem Wuppertaler Kiesbergtunnel (3.3.4) zeigte sich zudem, daß trotz der Vielzahl organischer Verbindungen in diesen Proben keine übermäßigen Störungen der UV/VIS-HPLC auftraten. Die gleichzeitige Untersuchung dieser Proben mit dem Fluoreszenz-HPLC-System II führte zu vergleichsweise starken Störungen. So konnten alle im enzymatischen System auftretenden Signale auch bei der Messung ohne Reagenzien detektiert werden (Anhang 52), während die mit dem nicht-enzymatischen System detektierten Verbindungen bei der Messung ohne Reagenz kein Signal ergaben (Anhang 51). Anhand der durchgeführten Untersuchungen kann das DMPD-UV/VIS-HPLC-System daher als sehr selektives System zur Bestimmung von Hydroperoxiden angesehen werden.

3.2.5 Herstellung von Hydroperoxid-Prüfgasen

Neben den Messungen von Hydroperoxid-Standardlösungen wurden im weiteren Verlauf dieser Arbeit auch Interkalibrierungen bzw. Freilandmessungen an Luftproben durchgeführt. Die Herstellung der dafür notwendigen Hydroperoxid-Prüfgase erfolgte

mit einer Prüfgasapparatur, die einer Modifikation der von Hartkamp und Bachhausen (1987) beschriebenen Apparatur zur kontinuierlichen dynamischen Erzeugung von H_2O_2 -Prüfgasen entspricht (Abbildung 32). Entgegen der ursprünglichen Arbeitsweise mit konzentrierten Hydroperoxid-Striplösungen und Hydroperoxidlösungsüberschuß (Hartkamp und Bachhausen, 1987), arbeitet die hier eingesetzte Modifikation mit vollständiger Verdampfung verdünnter Striplösungen. Auf diese Weise lassen sich sehr konstante H_2O_2 -, MHP- und EHP-Prüfgaskonzentrationen erzeugen.



- | | | |
|---------------------------------|---|------------------------------|
| 1. Grundgas-Eingang | 6. Wendelreaktor ($T = 20\text{ °C}$) | 11. Schlauchpumpe |
| 2. Druckminderer | 7. Gasmischstrecke | 12. Hydroperoxid Strip- |
| 3. Schwebekörperdurchflußregler | 8. Prüfgasentnahme | Lösung ($T = 0\text{ °C}$) |
| 4. Hochspannungsquelle | 9. Prüfgasüberschuß | 13. Abfallbehälter |
| 5. Ozongenerator | 10. Thermostat | |

Abbildung 32: Schematischer Aufbau der Ozon- und Hydroperoxidprüfgasapparatur

Da die Gasvolumenflüsse, das über die Wendel gehende „Grundgas“ und das zur Verdünnung verwendete „Mischgas“, sowie die Konzentration und Fluß der Strip-

lösung bekannt waren, konnte über diese Größen die Gasphasenkonzentration des Hydroperoxids berechnet werden. Tabelle 17 zeigt die berechneten und an verschiedenen Tagen gemessenen Prüfgaskonzentrationen für einen Stripplösungs-Fluß von 0.108 ml/min sowie Grundgas- bzw. Mischgasflüsse von 9.85 bzw. 15.25 l/min.

Konzentration der Stripplösung c (HP) [µmol/l]	Prüfgaskonzentration			
	berechnet c (HP) [pptv]	c (H ₂ O ₂) [pptv]	gemessen c (MHP) [pptv]	c (EHP) [pptv]
0.83	80	-	67 ± 16	-
0.98	95	-	-	100 ± 11
1.39	134	-	148 ± 13	-
1.4	135	-	142 ± 2	-
1.64	158	-	-	180 ± 8
1.94	187	-	180 ± 12	-
2.29	221	-	-	222 ± 5
2.77	267	-	262 ± 14	-
2.82	272	-	264 ± 18	-
3.27	315	-	-	311 ± 14
3.32	320	-	320 ± 16	-
3.92	378	-	-	398 ± 9
4.00	386	333 ± 11	-	-
4.43	427	-	388 ± 57	-
5.23	504	-	-	449 ± 54
6.00	579	448 ± 54	-	-
8.00	772	564 ± 26	-	-
9.95	960	625 ± 43	-	-
11.9	1145	800 ± 60	-	-
14.5	1402	997 ± 30	-	-
16	1541	1026 ± 53	-	-
20	1929	1449 ± 125	-	-

Tabelle 17: Berechnete und gemessene Hydroperoxid-Prüfgaskonzentrationen (Stripplösungsfluß: 0.108 ml/min, Grundgas 9.85 l/min, Mischgas 15.25 l/min, Kryosampling, DMPD-UV/VIS-HPLC-System I, jeweils Mittelwert aus 3-6 Messungen)

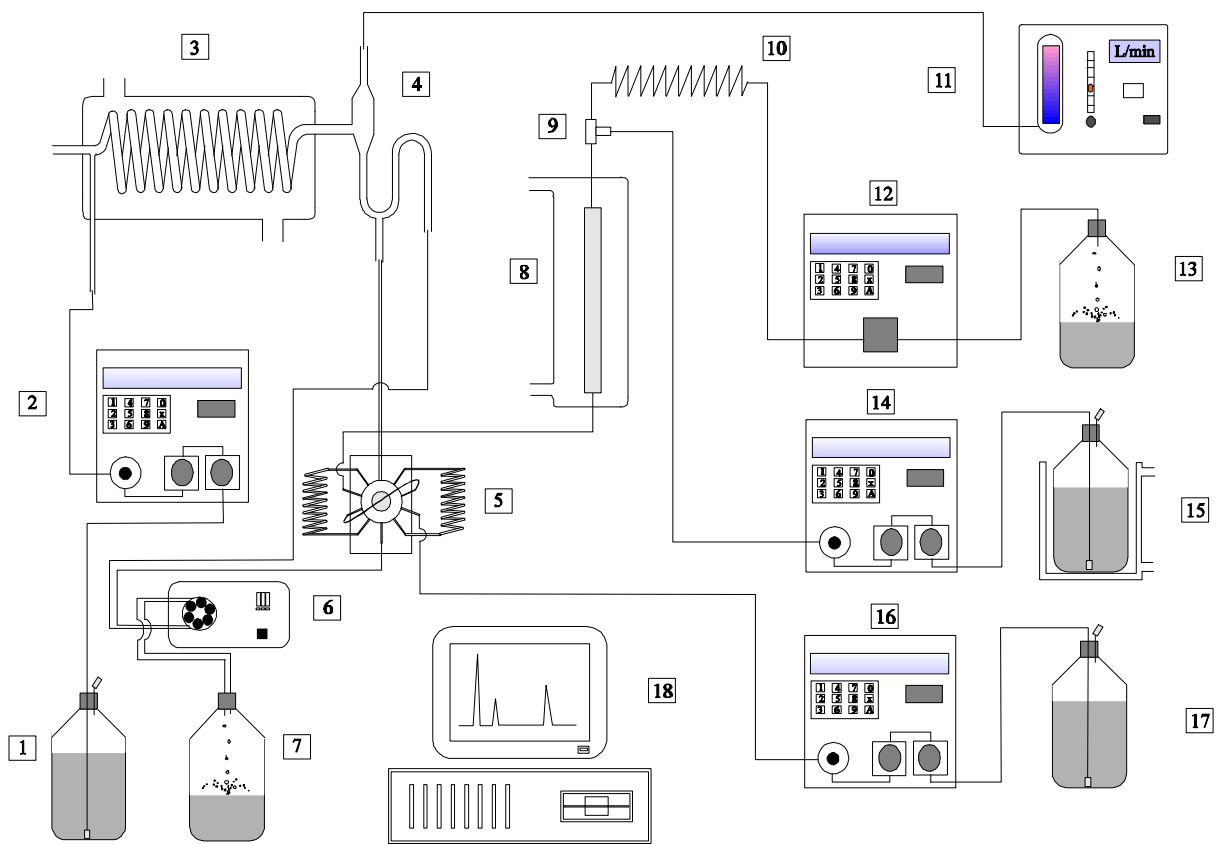
Die Gegenüberstellung der gemessenen und berechneten Hydroperoxid-Prüfgaskonzentrationen zeigt insbesondere für H_2O_2 größere Abweichungen. So wurden durchschnittlich nur etwa 75 % der berechneten H_2O_2 -Prüfgaskonzentrationen wiedergefunden, während die Differenz zwischen gemessenen und berechneten Prüfgaskonzentrationen der organischen Hydroperoxide (MHP und EHP) im Rahmen der durch die Messung bestimmten Fehler liegt. Bei H_2O_2 -Prüfgasmessungen an einer vergleichbaren Apparatur (Striplösungsfluß 0.078 ml/min, Grundgas 7.3 l/min, kein Mischgas) wurden im Unterschied zu den hier gefundenen 70-80 % lediglich 50 % der berechneten H_2O_2 -Prüfgaskonzentration bestimmt (Ligon, 1997).

Die Ergebnisse des Kryosamplings und anschließender HPLC-Analyse mit Fluoreszenz- bzw. UV/VIS-Detektion wurden durch Messungen mittels Gasprobeninjektoren und direkter Umsetzung des H_2O_2 mit geeigneten Reagenzien (KI, FOX, Vanadat-Lösungen) sowie nachfolgende photometrische Auswertung bestätigt (Ligon, 1997). Aufgrund dieser Übereinstimmung kann davon ausgegangen werden, daß das H_2O_2 teilweise in der Prüfgasapparatur zersetzt wird. Als Folge des relativ geringen Striplösungsflusses, des großen Volumens (ca. 3.9 ml) und der sich daraus für die Lösung ergebenden Verweildauer von etwa 36 min in der ungekühlten bzw. auf 20 °C temperierten Zuleitung, scheint die Zersetzung des H_2O_2 in der wäßrigen Phase ebenso wahrscheinlich wie eine mögliche, von Ligon (1997) für HMHP postulierte Zersetzung in der Gasphase.

3.2.6 Aufbau eines automatisierten HPLC-Systems zur quasi-kontinuierlichen Messung atmosphärischer Hydroperoxide

Da die im Bereich der Hydroperoxidanalytik häufig eingesetzten, kontinuierlich messenden Geräte aufgrund einer fehlenden chromatographischen Trennung nicht die benötigte Selektivität gegenüber einzelnen Spezies (H_2O_2 und ROOH) besitzen, wurden im Rahmen dieser Arbeit die Grundlagen für die Entwicklung eines automatisierten HPLC-Systems geschaffen. Im Gegensatz zu dem von Lazrus et al. (1986) entwickelten FIA-System, mit dem die Hydroperoxide nach Überführung in die wäßrige Phase mittels einer Zweikanaltechnik und nachfolgender Chemometrie (s. S. 101) bestimmt werden, ist mit einem HPLC-System die direkte Analyse der

einzelnen Komponenten möglich. Die derzeit von vielen Arbeitsgruppen angewandten Meßverfahren zur Analyse einzelner Hydroperoxide bestehen aus einer Kombination von Kryosampling (Hellpointner und Gäb 1989, Campos und Kok 1996) oder Scrubber- bzw. Nebulizer-Sampling (Jackson und Hewitt, 1996; Sauer et al., 1997) und anschließender HPLC-Analyse. Diese Verfahren genügen zwar den Anforderungen bezüglich Selektivität und Empfindlichkeit, haben aber den Nachteil, daß ohne entsprechenden Aufwand nur Datensätze mit geringer Zeitauflösung erhalten werden. Durch die Kopplung einer kontinuierlich betriebenen Sammelwendel mit einer



- | | | |
|--------------------------------------|---|---------------------|
| 1. Striplösung | 7. Abfallbehälter | 13. Abfallbehälter |
| 2. Striplösungspumpe | 8. Trennsäule (T= 4°C) | 14. Reagenzienpumpe |
| 3. Sammelwendel (T= 4 °C) | 9. Mischzelle (T-Stück) | 15. Reagenz |
| 4. Luftabscheider | 10. Reaktionskapillare | 16. Eluentenpumpe |
| 5. Mehrwegeventil
(Probenaufgabe) | 11. Flügelradpumpe mit
Durchflußregelung | 17. Eluent |
| 6. Schlauchpumpe | 12. Fluoreszenzdetektor | 18. Datenerfassung |

Abbildung 33: Automatisches, kontinuierlich arbeitendes 2-Pumpen-Fluoreszenz-HPLC-System zur Bestimmung von Hydroperoxiden

HPLC-Anlage sollen diese Nachteile beseitigt werden. Wie in der Abbildung 33 dargestellt, wurde zu diesem Zweck ein dem Fluoreszenz-HPLC-System II entsprechender Aufbau mit einer Sammelwendel und einem automatischen 10-Wege-2-Port-HPLC-Ventil erweitert. Über die elektronische Kopplung des Injektionsventils an die HPLC-Steuerungs- und Datenaufnahmeeinheit war es möglich, die mittels einer Schlauchpumpe kontinuierlich durch die Probenschleife geförderte Striplösung nach Beendigung eines jeden HPLC-Chromatogrammes erneut zu injizieren.

In ersten Untersuchungen sollte geklärt werden, ob dieses System, insbesondere die Sammelwendel und der Luftabscheider, über einen längeren Zeitraum mit ausreichender Stabilität betrieben werden können. Für die Messung wurde mit der in Abbildung 32, S. 93 dargestellten Prüfgasapparatur eine konstante Hydroperoxidkonzentration von 200 pptv H_2O_2 , 240 pptv MHP und 320 pptv EHP erzeugt.

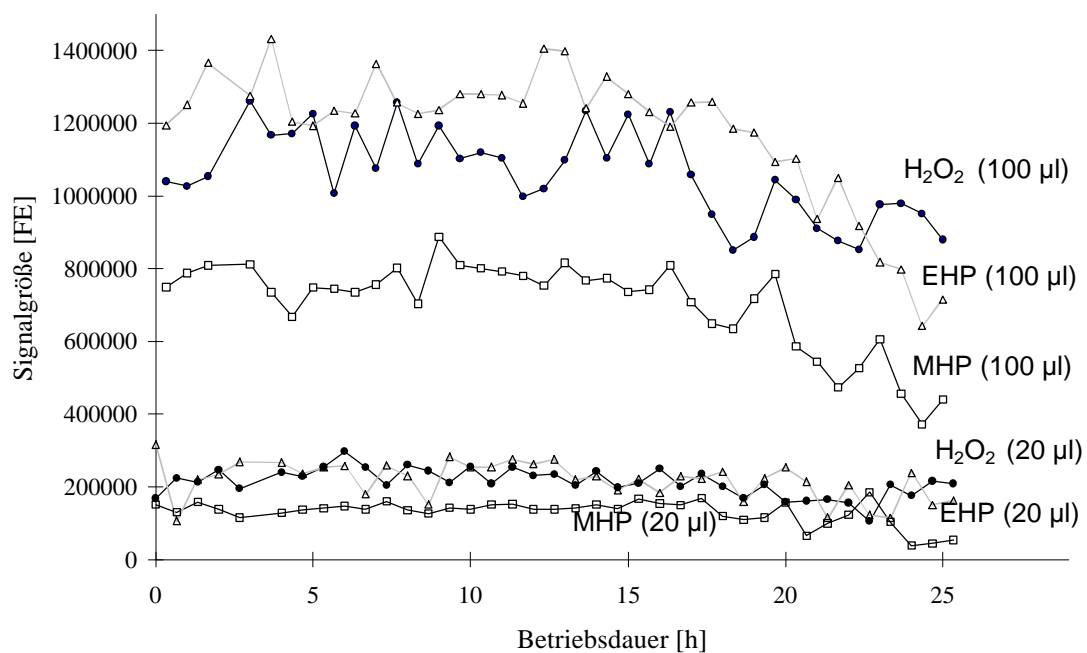


Abbildung 34: Langzeitmessung eines Hydroperoxid-Prüfgases mit dem automatisierten HPLC-System (Injektionsvolumen abwechselnd 100 bzw. 20 µl)

Die Probenahme erfolgte mit einer auf 4 °C gekühlten Sammelwendel bei einem Probevolumen- und Striplösungsfluß von 2000 bzw. 0.4 ml/min. Die diskontinuierliche Injektion der Proben erfolgte in einem durch die Retentionszeit des EHP vor-

gegebenen, 20 minütigem Abstand mit jeweils wechselndem Injektionsvolumen von 100 bzw. 20 µl. Da es primär um die Langzeitstabilität ging, wurde weder eine Kalibration noch eine Bestimmung der Wiederfindung berücksichtigt. Der in Abbildung 34 dargestellte Verlauf zeigt die Änderung der H₂O₂-, MHP- und EHP-Signalgrößen mit zunehmender Betriebsdauer des HPLC-Systems.

Wie die statistische Auswertung der Messung über den Zeitraum von 25 h zeigte, konnten mit diesem noch nicht optimierten HPLC-System trotz des deutlichen Signalarückgangs nach 15 Stunden Meßwerte mit einer maximalen Standardabweichung von 25 % erhalten werden (Tabelle 18). Werden bei der Beurteilung dieses Wertes die fehlende Optimierung der Sammelwendel und geringe Schwankungen der Prüfgaskonzentration berücksichtigt, kann die Messung dennoch als erfolversprechend gewertet werden. Wie weitere Untersuchungen zeigten, ist die in Abbildung 34 gezeigte Abnahme der Signalgröße in erster Linie auf eine gealterte HPLC-Reagenzienlösung zurückzuführen.

	H ₂ O ₂	MHP	EHP	H ₂ O ₂	MHP	EHP
Probenvolumen [µl]	100	100	100	20	20	20
Anzahl der Meßwerte	37	37	37	38	38	38
Mittelwert [FE]	1062196	703404	1177929	213193	130462	217821
Standardabweichung [FE]	120558	123173	189059	37620	33133	52077
Standardabweichung %	11	18	16	18	25	24

Tabelle 18: Statistische Daten der Langzeitmessung mit dem automatisierten HPLC-System

Durch weitere Versuche sollte für die Sammelwendel ein optimiertes Verhältnis von Probenvolumen- zu Striplösungsfluß gefunden werden. Bei diesen Untersuchungen zeigte sich, daß die Qualität der Sammelwendel einen signifikanten Einfluß auf die Reproduzierbarkeit der Meßergebnisse hat. So müssen insbesondere die flüssigkeitsführenden Glasteile der Sammelwendel glatte Übergänge aufweisen. Ist dies nicht gewährleistet, kann es zur Bildung von Tropfen kommen, in welchen die Hydroperoxide stärker angereichert werden. Dadurch werden die Hydroperoxidkonzentration in der restlichen Sammelflüssigkeit minimiert. Durch Abreißen und Injektion dieser Tropfen kann es zeitweise zu erhöhten und schwankenden Meß-

werten kommen. Zur Optimierung der Sammelwendel war es notwendig einen Kompromiß zwischen Anreicherung und Wiederfindung einzugehen. So konnten mit niedrigen Probevolumen- und hohen Striplösungsflüssen (z. B. 1 l/min Probe und 0.4 ml/min Striplösung; Anreicherungsfaktor 2500) Wiederfindungen von 100 % für H₂O₂ erreicht werden. Wurde dagegen mit hohem Probevolumen- und niedrigem Striplösungsfluß gearbeitet (z. B. 4 l/min Probe und 0.1 ml/min Striplösung), stieg die Signalgröße infolge des höheren Anreicherungsfaktors (40 000) zwar an, aber die Wiederfindung für H₂O₂ sank auf 50 bis 60 %. Die bei dieser Einstellung um den Faktor zwei geringere Wiederfindung wird durch die um den Faktor sechzehn höhere Anreicherung überkompensiert. Dies führt selbst bei geringen Gasphasenkonzentrationen der Hydroperoxide (unterer ppt-Bereich) zu gut auswertbaren Signalen. Aus den bisherigen Messungen konnte jedoch noch keine Entscheidung getroffen werden, welche Parameter für zukünftige Messungen anzuwenden sind. So muß insbesondere geklärt werden, ob die Wiederfindung der Hydroperoxide bei den jeweiligen Einstellungen konzentrationsunabhängig ist. Da die Weiterentwicklung des automatisierten HPLC-Systems zukünftig, im Rahmen eines Projektes der Deutschen Bundesstiftung Umwelt gefördert wird, wurde vorerst auf eine weitere Optimierung des hier verwendeten Systems verzichtet. Die bisher gewonnenen Ergebnisse werden innerhalb einer Kooperation in den Bau einer miniaturisierten, automatisierten HPLC-Anlage einfließen, für die im Vergleich zum hier verwendeten Versuchsaufbau eine kompaktere Bauform vorgesehen ist. Durch die weitgehende Automatisierung sollen Aufbauzeiten während Meßkampagnen minimiert und durchgängige Meßwerte mit hoher Zeitauflösung erhalten werden.

3.3 Interkalibrierung und Anwendung der neuen Verfahren

Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelten HPLC-Methoden zur Bestimmung von Hydroperoxiden wurden mit bekannten hydroperoxidmessenden Analysenverfahren verglichen. Neben Messungen an einer Prüfgasapparatur wurden auch atmosphärische Luftproben untersucht. Wie schon weiter oben aufgeführt, ist die Bestimmung des atmosphärischen Hydroperoxidgehaltes von besonderem Interesse. Primär wurde die Anwendung auf die bereits nachgewiesenen Hydroperoxide (H₂O₂, HMHP, MHP und EHP) beschränkt. Aus zeitlichen Gründen wurden bislang nur wenige Luftproben der

urbanen Atmosphäre untersucht. Der Schwerpunkt der bisherigen Anwendung lag, bedingt durch die Polarsternexpedition ANT XIV/1, auf der Messung mariner Luftproben.

3.3.1 Interkalibrierung von Hydroperoxid-Meßverfahren

Im Zuge der für das Feldexperiment BERLIOZ (Berlin-Ozon-Experiment) im Juli/August 1998 notwendigen Qualitätssicherung der Meßdaten wurde vom 25. bis 28.08.1997 eine Interkalibrierung aller beteiligten hydroperoxidmessenden Verfahren durchgeführt. An dieser in Wuppertal durchgeführten Vergleichsmessung nahmen folgende Arbeitsgruppen teil:

- BTU Cottbus, AG Prof. Möller
- IFU Garmisch-Patenkirchen, AG Dr. Slemr
- MPI Mainz, AG Dr. Moortgat
- ZUF Frankfurt, AG Prof. Jaeschke
- BUGH Wuppertal, AG Prof. Gäb

Bei dieser Messung analysierten sowohl das MPI als auch die BUGH die Hydroperoxide mittels HPLC, während von den Mitarbeitern der BTU und des IFU ein käuflicher Continuous-Flow-Hydroperoxid-Analysator der Fa. Aero-Laser, Garmisch-Patenkirchen (AL 1002 H₂O₂-Analysator) und vom ZUF ein Eigenbau-Chemilumineszenz-H₂O₂-Analysator eingesetzt wurden. Obwohl das MPI und die BUGH-Wuppertal zur Analyse der Hydroperoxide die HPLC einsetzten, wurden verschiedene Probenahmeverfahren gewählt. Während das MPI die Proben mit einer auf 5 °C gekühlten Sammelwendel in die flüssige Phase überführte (Neeb et al., 1997), wurde von der BUGH das Kryosampling bei -78 °C (Abbildung 51, S. 134) eingesetzt. Beide Verfahren wurden diskontinuierlich mit einer Zeitauflösung von 5 - 20 (MPI) bzw. 40 (BUGH) min betrieben. Zur HPLC-Analyse der Hydroperoxide benutzte das MPI eine Form des von Hellpointner und Gäb (1989) beschriebenen HRP/PES-Fluoreszenz-HPLC-Systems (Neeb, 1997). Von der BUGH-Wuppertal wurden neben dem Fluoreszenz-HPLC-System II die im Rahmen dieser Arbeit entwickelten DMPD-UV/VIS-Systeme I und II eingesetzt.

Die vom IFU und der BTU eingesetzten, käuflichen Continuous-Flow-Hydroperoxid-Analysatoren arbeiten nach dem von Lazrus beschriebenen Verfahren (Lazrus et al., 1986). Bei diesem Verfahren werden die Hydroperoxide mit einer verdünnten H_3PO_4 -Lösung über eine untemperierte Sammelwendel aus der Umgebungsluft extrahiert. Durch Zugabe einer HRP/PES-Reagenzienlösung zur Analytlösung kann in einem Kanal des Gerätes die Summe aller extrahierbaren Hydroperoxide bestimmt werden; in einem zweiten Kanal wird vor der Zugabe der HRP-PES-Reagenzienlösung eine wässrige Katalaselösung zugesetzt. Diese führt im günstigsten Fall zur vollständigen Zersetzung des in der Probe enthaltenen H_2O_2 , ohne die Konzentration organischer Hydroperoxide zu beeinträchtigen. Über den zweiten Kanal läßt sich somit der Gehalt an organischen Hydroperoxiden ermitteln. Durch Subtraktion der organischen Hydroperoxide von der Gesamthydroperoxid-Konzentration ergibt sich somit die Konzentration an Wasserstoffperoxid. Dieses Verfahren ermöglicht zwar keine Speziation der organischen Hydroperoxide, der große Vorteil ist jedoch die kontinuierliche Messung der Hydroperoxidkonzentration. Da für die Messung der organischen Hydroperoxide mit diesem Verfahren keine Kalibrierung durchgeführt wurde, diese zudem nur möglich ist, wenn lediglich ein organisches Hydroperoxid vorliegt oder die Konzentration der einzelnen organischen Hydroperoxide bekannt ist, wurden von der BTU keine Daten für organische Hydroperoxide angegeben. Den vom IFU angegebenen Werten für organische Hydroperoxide liegt ebenfalls keine Kalibrierung zugrunde, sie sind somit nur als grobe Orientierung anzusehen. Während das HPLC-System des MPI, eines der BUGH-HPLC-Systeme sowie die Aero-Laser-Geräte die enzymatische HRP/PES-Reaktion zur Analyse der Hydroperoxide anwenden, wurde vom ZUF ein H_2O_2 -selektives TCPO (Bis-(2,4,6-trichlorphenyl)-oxalat)-Chemilumineszenzverfahren eingesetzt (Beltz et al., 1987). Vor Beginn der Prüfgas- und Umgebungsluftmessungen wurden von allen Arbeitsgruppen H_2O_2 -Standards vermessen. Von einem Mitarbeiter der analytischen Chemie, der die H_2O_2 -Standards herstellte, wurde allen teilnehmenden Arbeitsgruppen nur die ungefähre Konzentration von 0 bis 2 $\mu\text{mol/l}$ mitgeteilt. Die tatsächlichen Konzentrationen wurden erst nach Abschluß der Messung bekanntgegeben. Die Ergebnisse dieser Messungen, welche das geforderte Qualitätsziel von $\pm 20\%$ erfüllten, sind in Tabelle 19 dargestellt.

vorgegebene Konzentration [$\mu\text{mol/l}$]	gemessene Konzentration				
	IFU [$\mu\text{mol/l}$]	BTU [$\mu\text{mol/l}$]	ZUF [$\mu\text{mol/l}$]	MPI [$\mu\text{mol/l}$]	BUGH DMPD-UV/VIS- HPLC-System II [$\mu\text{mol/l}$]
0.09	0.11	0.11	0.09	0.07	0.08
0.47	0.55	0.53	0.49	0.48	0.42
0.75	0.88	0.83	0.67	0.84	0.72
0.93	1.08	1.03	0.83	1.01	0.86

Tabelle 19: Messung wässriger H_2O_2 -Standards

Im weiteren Verlauf der Interkalibrierung wurden mit der in Abbildung 32 dargestellten Prüfgasapparatur Prüfgase unterschiedlicher Konzentration und Zusammensetzung hergestellt und gemessen. Die Ergebnisse der H_2O_2 -Messungen sind in Tabelle 20 aufgeführt.

	Berechnet [pptv]	IFU [pptv]	BTU [pptv]	ZUF [pptv]	MPI [pptv]	BUGH ^a [pptv]	BUGH ^b [pptv]	BUGH ^c [pptv]
Anzahl Messungen	<i>d</i>	42	18	-	6	4	4	4
Mittelwert [pptv]		512	362	-	436	512	575	556
Standardabw. [pptv]		70	42	-	49	38	48	42
Standardabw. [%]		14	12	-	11	7	8	8
Δ zum Mittelwert [%]		4.0	-27	-	-11.4	4.0	16.8	13.0
Anzahl Messungen	<i>1081</i>	36	15 ^e	10	7	3	2	3
Mittelwert [pptv]		1056	980	738	876	1169	1214	997
Standardabw. [pptv]		19	50	-83	88	125	134	31
Standardabw. [%]		2	5	11	10	11	11	3
Δ zum ber. Wert [%]		-2.3	-9.3	-32	-19	8.1	12.3	-7.8
Anzahl Messungen	<i>1420</i>	25	19	27	20	2	-	-
Mittelwert [pptv]		1275	1043	940	1226	1359	-	-
Standardabw. [pptv]		322	263	83	226	42	-	-
Standardabw. [%]		25	25	9	18	3	-	-
Δ zum ber. Wert [%]		-10	-27	-34	-14	-4.3	-	-

^a DMPD-UV/VIS-HPLC-System I, ^b DMPD-UV/VIS-HPLC-System II, ^c Fluoreszenz-HPLC-System II,
^d aufgrund einer zu hohen Flußrate der Stripplösung erfolgte keine vollständige Überführung in die Gasphase, ^e ein Meßwert < NWG
 - Ausfall der Meßsysteme

Tabelle 20: H_2O_2 -Prüfgasmessungen mit verschiedenen Analyseverfahren

Im Gegensatz zu den vorangegangenen Arbeiten mit der Prüfgasapparatur, vgl. Tabelle 18, bei welchen 70 - 80 % der berechneten H₂O₂-Konzentrationen gefunden wurden, ergab sich durch die verschiedenen, bei der Interkalibrierung eingesetzten Geräte eine etwas größere Streuung der Wiederfindung. So konnten 68 (ZUF) bis 121 % (BUGH) der berechneten H₂O₂-Konzentration gemessen werden. Insgesamt zeigte sich jedoch, daß die gefundenen Konzentrationen weitgehend innerhalb des geforderten Qualitätsziels von 20 % lagen. Da in atmosphärischen Proben meist auch organische Hydroperoxide vorhanden sind, wurden im Rahmen der Interkalibrierung teilweise gemischte Prüfgas verwendet. Während bei der in Tabelle 20 aufgeführten dritten Meßreihe (1420 pptv) ein reines H₂O₂-Prüfgas vorlag, enthielt die erste Meßreihe zusätzlich MHP und die zweite Meßreihe neben 1081 pptv H₂O₂ auch 211 pptv MHP und maximal 305 pptv HMHP. Die Ergebnisse für MHP und HMHP sind in Tabelle 21 und 22 aufgeführt.

	Berechnet [pptv]	IFU [pptv]	BTU ^a [pptv]	ZUF ^b [pptv]	MPI [pptv]	BUGH ^c [pptv]	BUGH ^d [pptv]	BUGH ^e [pptv]
Anzahl Messungen	<i>f</i>	42			6	4	4	4
Mittelwert [pptv]		154 ^g			624	772	871	823
Standardabw. [pptv]		12			25	45	54	28
Standardabw. [%]		8			4	6	6	3
Δ zum Mittelwert [%]					-19.2	-0.1	12.8	6.5
Anzahl Messungen	211				6 ⁱ	3	2	3
Mittelwert [pptv]		^h			189	227	216	251
Standardabw. [pptv]					115	19	6	18
Standardabw. [%]					61	8	3	7
Δ zum ber. Wert [%]					-10	7.6	2.3	19

^a aufgrund fehlender Kalibrierung keine Angabe organischer HP; ^b TCPO-Chemilumineszenz nicht zur Messung organischer HP geeignet; ^c DMPD-UV/VIS-HPLC-System I, ^d DMPD-UV/VIS-HPLC-System II, ^e Fluoreszenz-HPLC-System II, ^f Aufgrund einer zu hohen Flußrate der Stripplösung erfolgte keine vollständige Überführung in die Gasphase, ^g Kalibrierung nicht berücksichtigt, siehe Text, ^h da MHP neben HMHP keine Angabe möglich, ⁱ eine Messung < NWG,

Tabelle 21: MHP-Prüfgasmessungen

Der Vergleich der HPLC-Messungen von MHP zeigte Abweichungen vom berechneten bzw. Mittelwert von weniger als 20 %. Auffällig ist jedoch die verhältnismäßig hohe Standardabweichung der MPI-Meßwerte bei der zweiten Messung in Tabelle 21.

Der Vergleich der verschiedenen BUGH-Systeme läßt innerhalb der geringen Datendichte für MHP keine systematische Abweichung eines Systems erkennen.

Im Gegensatz zu den gut übereinstimmenden Messungen von H₂O₂ und MHP zeigten sich bei der Messung von HMHP wesentlich höhere Standardabweichungen und Differenzen zum Mittelwert aller HPLC-Analysen. Sowohl für die starke Streuung der HMHP-Werte innerhalb einer Messreihe mit einem bestimmten System, als auch für die Abweichungen der Ergebnisse (68 - 248 pptv) mit den eingesetzten Analyseverfahren sind Erklärungen erforderlich. Diese richten sich zum einen auf das Trennsystem. So eluiert das HMHP meist auf dem Tailing des H₂O₂, das heißt die Trennung der beiden Signale und damit auch die Güte der Integration wird weitgehend von der Qualität der Säule bestimmt. Bei den eingesetzten Prüfgaskonzentrationen, die realen atmosphärischen Konzentrationen entsprechen, wird die Trennung von HMHP zusätzlich durch die, im Vergleich hohe Konzentration von H₂O₂ erschwert.

	Berechnet [pptv]	IFU [pptv]	BTU ^a [pptv]	ZUF ^b [pptv]	MPI [pptv]	BUGH ^c [pptv]	BUGH ^d [pptv]	BUGH ^e [pptv]
Anzahl Messungen	305 ^f				6 ^h	3	2	3
Mittelwert [pptv]		g			69	146	78	248
Standardabw. [pptv]					10	52	16	15
Standardabw. [%]					14	36	20	6
Δ zum Mittelwert [%]					-49	7.9	-42	83

^a aufgrund fehlender Kalibrierung keine Angabe organischer HP; ^b TCPO-Chemilumineszenz nicht zur Messung organischer HP geeignet; ^c DMPD-UV/VIS-HPLC-System I, ^d DMPD-UV/VIS-HPLC-System II, ^e Fluoreszenz-HPLC-System II, ^f maximal mögliche Konzentration, tatsächlicher Wert aufgrund von Zersetzung wahrscheinlich wesentlich geringer (Ligon, 1997), ^g da MHP neben HMHP keine Angabe möglich, ^h eine Messung < NWG

Tabelle 22: HMHP-Prüfgasmessungen

Zum Abschluß der Interkalibrierung wurde eine Außenluftmessung durchgeführt. Die Ansaugung der Luft erfolgte über ein Glasverteilungsstück und einen 4 m langen Teflonschlauch mit einem Innendurchmesser von 10 mm. Durch den Anschluß aller oben beschriebenen Analysensysteme sowie eines Ozonmeßgerätes konnte die Entnahme identischer Luftproben gewährleistet werden. Das durch alle Systeme erzeugte Ansaugvolumen betrug etwa 12 l/min. Die gemessenen Tagesgänge sind in

Abbildung 35 dargestellt. Bei der Außenluftmessung zeigten die H_2O_2 -Meßwerte aller Arbeitsgruppen einen ähnlichen Verlauf. Während sich zu Beginn der Messung bis etwa 12.30 noch relativ große Unterschiede bei den Meßwerten von IFU, BTU und ZUF zeigten, lagen die Meßwerte fast aller Arbeitsgruppen in der Zeit von 12.30 bis etwa 14.10 sehr dicht zusammen (Streuung ca. $\pm 20\%$). Auffällig waren die vergleichsweise geringen Meßwerte des MPI sowie der ab etwa 13.50 beginnende Anstieg der ZUF-Meßwerte und der ab 15.00 beginnende Anstieg der mit den UV/VIS-Systemen gemessenen BUGH-Werte. Als Folge davon ergab sich am Nachmittag eine relativ starke Diskrepanz zwischen den Meßwerten der enzymatischen (IFU, BTU, MPI, BUGH) und der nichtenzymatischen Systeme (ZUF, BUGH).

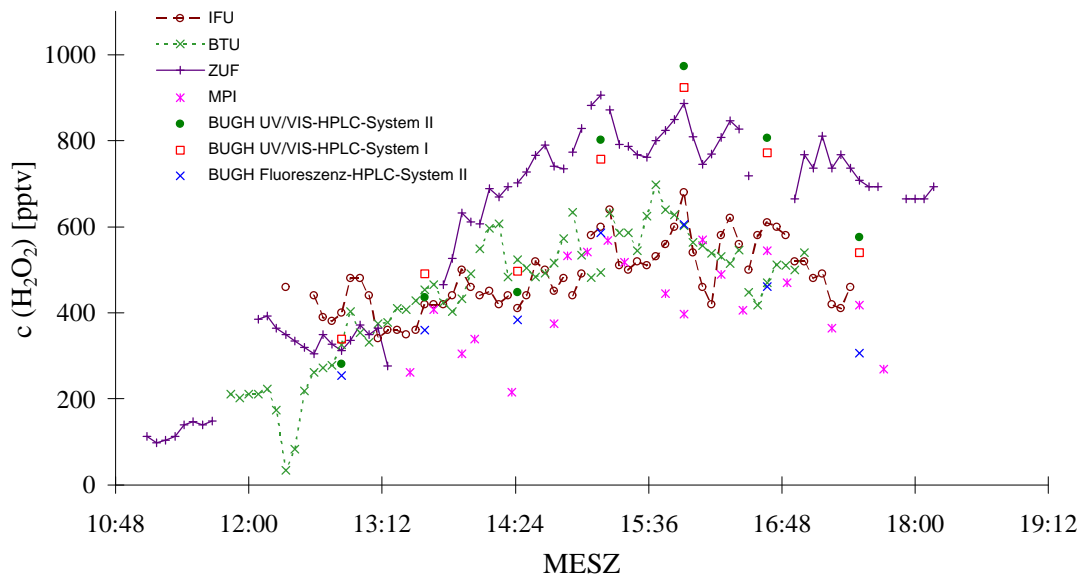


Abbildung 35: H_2O_2 -Messungen in Außenluft (Messort: BUGH-Wuppertal Gebäude H, Südseite, 27.08.1997)

Da die ebenfalls aufgezeichneten Ozonkonzentrationen während der Messdauer keine Auffälligkeiten zeigten, dürfte der Unterschied nicht aus einem Ozonartefakt resultieren. Bei den enzymatischen Analysenverfahren, die alle auf der HRP/PES-Reaktion basieren, wird eine Störung für wenig wahrscheinlich gehalten. Eine solche wäre bei den HPLC-Verfahren, läßt man die Probenahme außer acht, durch Substanzen mit gleichem Elutionsverhalten wie H_2O_2 denkbar. Ebenso unwahrscheinlich scheint allerdings auch eine entsprechende Beeinflussung der unter-

schiedlichen nichtenzymatischen Verfahren zu sein (Continuous-Flow-Chemilumineszenz und DMPD-UV/VIS-HPLC).

Dem vom IFU, MPI und der BUGH-Wuppertal gemessenen und in Abbildung 36 dargestellten Tagesgang von MHP bzw. der Summe organischer Hydroperoxide liegt ein deutlich geringeres Konzentrationsniveau zugrunde (100 - 200 pptv). Wie schon weiter oben erklärt konnten die Werte des IFU aufgrund einer fehlenden Kalibration nur für die Beurteilung eines Trends herangezogen werden. Während sowohl diese Werte als auch die Meßwerte der drei BUGH-Systeme relativ konstante Konzentrationen zeigt, wiesen die Meßwerte des MPI sehr starke Schwankungen auf. Neben dem auffällig hohen Meßwert gegen 15.20 lagen die Konzentrationen von siebzehn weiteren, im unten angegebenen Zeitraum erfolgten Messungen unterhalb der Nachweisgrenze.

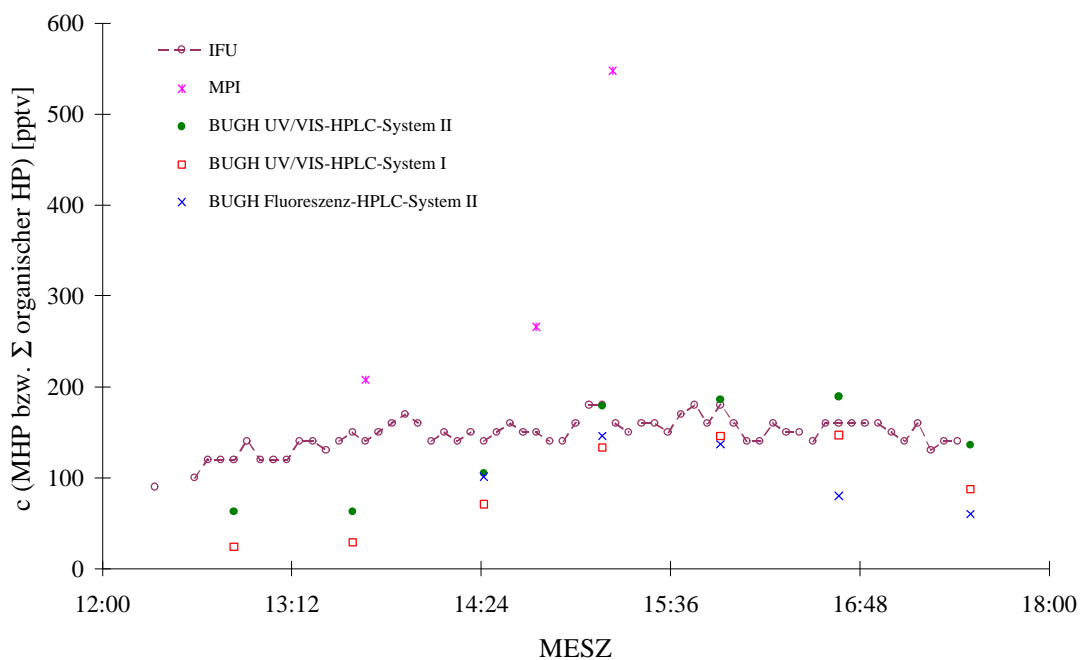


Abbildung 36: Messung von MHP bzw. der Summe organischer Hydroperoxide in Außenluft (Meßort: BUGH-Wuppertal Gebäude H, Südseite, 27.08.1997)

Insgesamt sind die Ergebnisse der Interkalibrierung als positiv anzusehen. Für alle drei eingesetzten HPLC-Systeme der BUGH-Wuppertal ergab sich ein übereinstimmendes Bild. Die Messung von Prüfgasen zeigte eine gute Übereinstimmung aller eingesetzten

Analysenverfahren und bestätigte die Anwendbarkeit des neuen nichtenzymatischen DMPD-UV/VIS-HPLC-Systems. Offengelegte Differenzen bei den Außenluftmessungen befinden sich im Bereich früherer Vergleichsmessungen, die von anderen Arbeitsgruppen durchgeführt wurden (Kleindienst et al., 1988; Staffelbach et al., 1996).

3.3.2 Die Polarsternexpedition ANT XIV/1 1996

Weitere Untersuchungen, in welchen das neue DMPD-UV/VIS-HPLC-System zur Bestimmung atmosphärischer Hydroperoxide getestet werden sollte, erfolgten im Rahmen der Polarsternexpedition ANT XIV/1. Während dieser 14. Fahrt des Forschungsschiffs „Polarstern“ in die Antarktis wurde innerhalb des ersten Fahrtabschnittes die atmosphärenchemische Meßkampagne „ALBATROSS“ (AIR CHEMISTRY AND LIDAR STDIES ABOVE THE ATLANTIC OCEAN RELATED TO OZONE AND OTHER TROPOSPHERIC AND STRATOSPHERIC SPECIES) durchgeführt. An dieser umfangreichen Meßkampagne waren insgesamt 15 Arbeitsgruppen aus Deutschland, Frankreich und Griechenland beteiligt. 45 Wissenschaftler bestimmten neben meteorologischen Parametern (z. B. Niederschlag, solare Strahlung, vertikales Aerosolprofil) auch die meridionale Verteilung zahlreicher Spurenstoffe (u. a. O₃, OH, H₂O₂, HCHO, NO, NO₂, RO₂, DMS, PAN, PCB, Hg). Die atmosphärischen Untersuchungen sollten einen wichtigen Beitrag zum internationalen Projekt NARE (North Atlantic Regional Experiment) sowie zum EU-Forschungsprojekt MARATHON (Marine Atmosphere Oxidation Capacity Experiment) liefern. Die Ziele der auf diesem Fahrtabschnitt durchgeführten NARE-Kampagne waren u. a. die Charakterisierung und Bestimmung des Oxidationspotentials der Atmosphäre über dem Atlantik, ein besseres Verständnis über Transport und atmosphärenchemische Umwandlung der Abluftfahne des amerikanischen Kontinents sowie die Abschätzung des Imports von Spurenstoffen in den Bereich der europäischen Atmosphäre (FS Polarstern, 1996). Die Fahrt der Polarstern begann am 5. Oktober 1996 in Bremerhaven mit nordwestlichem Kurs, nach Umquerung von Island führte die Expedition

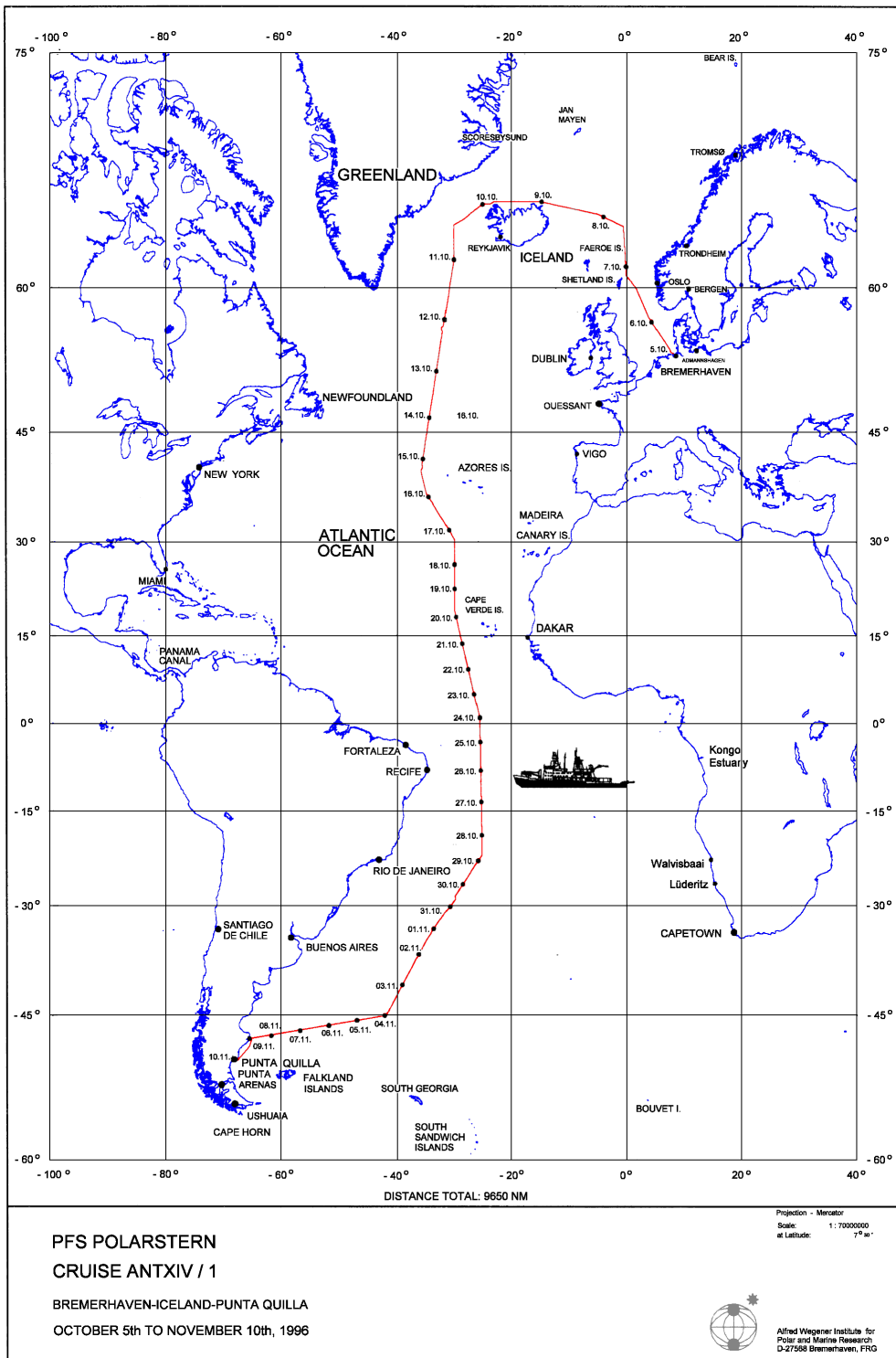


Abbildung 37: Fahrtroute der Polarstern während der Expedition ANT XIV/1

auf einer Nord-Süd-Traverse vom nördlichen Polarkreis entlang des 30. Längengrades bis ca. 50 °S Breite, wo am 10. November 1996 der argentinische Zielhafen Punta Quilla erreicht wurde (Abbildung 37).

3.3.2.1 Messung von Luftproben

Während dieser Fahrt wurden die atmosphärischen Konzentrationen von H_2O_2 und organischen Hydroperoxiden mit verschiedenen Verfahren bestimmt. Sowohl das Alfred-Wegener-Institut für Polar- und Meeresforschung (AWI), Bremerhaven als auch das Fraunhofer Institut für Atmosphärische Umweltforschung (IFU), Garmisch-Partenkirchen setzten für ihre Hydroperoxidmessungen einen käuflichen (Aero-Laser, Garmisch-Partenkirchen AL 1002 H_2O_2 -Analysator) bzw. einen Eigenbau Continuous-Flow-Hydroperoxid-Analysator ein. Die Arbeitsweise dieser Geräte ist unter 3.3.1 beschrieben. Die eigenen Messungen der atmosphärischen Hydroperoxidkonzentration während der Polarsternexpedition ANT XIV/1 erfolgte mittels Kryosampling und anschließender HPLC-Analyse. Dazu wurden durch die im experimentellen Teil beschriebenen Kühlfallen bei -80 °C innerhalb von 60 min Luftvolumina von 120 l gesaugt und ausgefroren. Aufgrund der ausreichend hohen Luftfeuchte konnte die nach dem Auftauen erhaltene Lösung ohne weitere Verdünnung mit den auf H_2O_2 und MHP kalibrierten HPLC-Systemen (Fluoreszenz-HPLC-System II, UV/VIS-HPLC-System I, Chemilumineszenz-HPLC-System) analysiert werden. Um eine höhere Ergebnissicherheit zu erreichen, wurde jede Probe zweimal gemessen. Im Gegensatz zu der im Labor möglichen Wägung der ausgefrorenen Lösung konnte deren Menge während der Polarsternfahrt nur über Luftfeuchte, Temperatur und Probevolumen berechnet werden. Bedingt durch die arbeitsintensive Probenahme, die Dauer der anschließenden chromatographischen Trennung der Hydroperoxide und die fehlende Automatisierung ließen sich mit diesem diskontinuierlichen Verfahren nur durchschnittlich 12 Proben pro Tag analysieren. Die Probenahme erfolgte leider nicht, wie es wünschenswert gewesen wäre, über eine gemeinsame Ansaugleitung, sondern an verschiedenen Stellen des Schiffes. Der Hydroperoxid-Analysator des AWI befand sich in einem Meßcontainer auf dem niedrigeren Vorschiff. Aufgrund der über dem Container befindlichen Verladekräne der Polarstern erfolgte die Ansaugung über eine

etwa fünf Meter lange Teflonleitung aus Richtung Steuerbord. Die Kryosamplungsapparatur der BUGH-Wuppertal befand sich, untergebracht in einer Zarges-Box, in der Mitte des Peildecks mit Ansaugung aus Fahrtrichtung. Die Analyse der ausgefrorenen Proben wurde unter Deck in den Laboratorien der Polarstern durchgeführt. Der Hydroperoxid-Analysator des IFU war in einem Container auf der Backbordseite des Peildecks untergebracht; die Ansaugung erfolgte durch einen etwa 10 m langen Teflonschlauch über einen an der Backbordseite angebrachten Ausleger, an welchem sich auch die Ansaugleitung der CO-Messung (Forschungszentrum Jülich) befand. Aufgrund der vom IFU noch nicht ausgewerteten Meßergebnisse konnten die im Rahmen dieser Arbeit mittels Kryosamplung/HPLC erhaltenen Meßwerte nur mit denen des AWI verglichen werden. Der in Abbildung 38 dargestellte meridionale Verlauf der H_2O_2 -Konzentration, gemessen nach den oben beschriebenen Verfahren und bei unterschiedlicher Positionierung der Ansaugleitungen, zeigt eine erstaunlich gute Übereinstimmung.

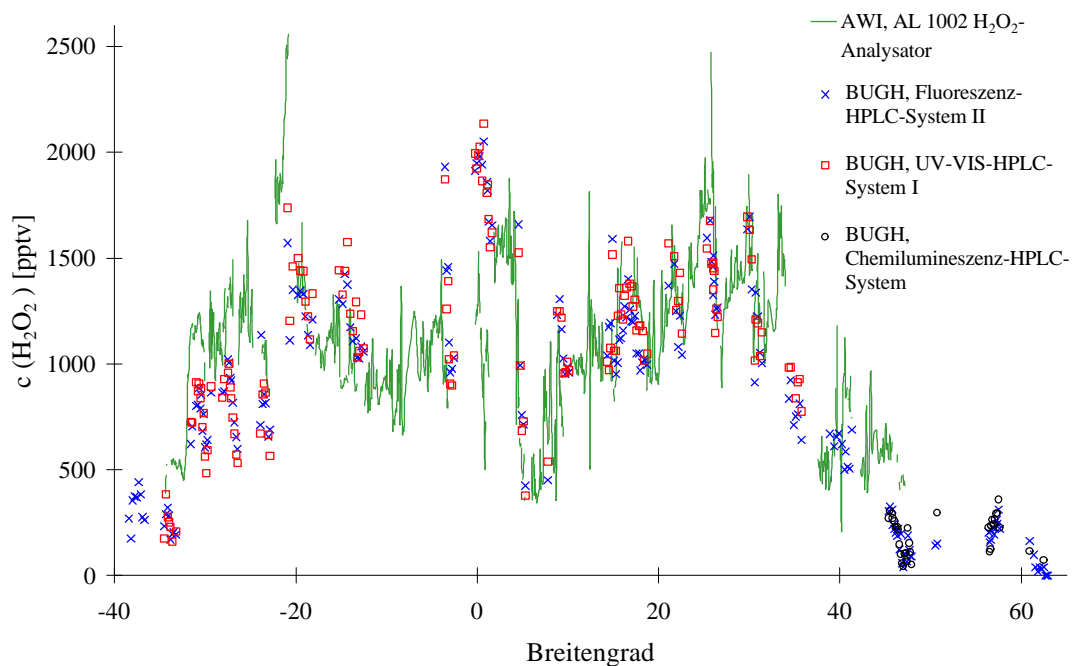


Abbildung 38: Meridionaler Verlauf der atmosphärischen H_2O_2 -Konzentration während der Polarsternexpedition ANT XIV/1

Bei einer früheren Messung (Polarsternexpedition ANT X/8 von Ushuia, Argentinien nach Bremerhaven) nahmen die H_2O_2 -Konzentrationen der höheren nördlichen und südlichen Breiten von etwa 200 - 300 pptv zum Äquator hin auf 2500 pptv zu. Im Unterschied dazu wurden bei dieser Expedition die mit etwa 2500 pptv höchsten H_2O_2 -Konzentrationen bei etwa 20 °N und 20 °S beobachtet, während die Konzentration am Äquator nur etwa 2000 pptv betrug (Weller et al., 1998). Die starke Abnahme der H_2O_2 -Konzentration in der innertropischen Konvergenzzone (ITCZ) bei 5 - 8 °N läßt sich mit den dort herrschenden meteorologischen Gegebenheiten erklären. Innerhalb dieser durch niedrigen Luftdruck, schweren Niederschlag und Gewitter gekennzeichneten Zone werden H_2O_2 und andere wasserlösliche Spurenstoffe aus der Atmosphäre ausgewaschen.

Im Gegensatz zur guten Übereinstimmung der H_2O_2 -Meßwerte beider Arbeitsgruppen zeigen die Meßwerte der organischen Hydroperoxide große Abweichungen (Abbildung 39). Zudem fallen die wesentlich größeren Schwankungen der mittels HPLC gemessenen MHP-Meßwerte auf.

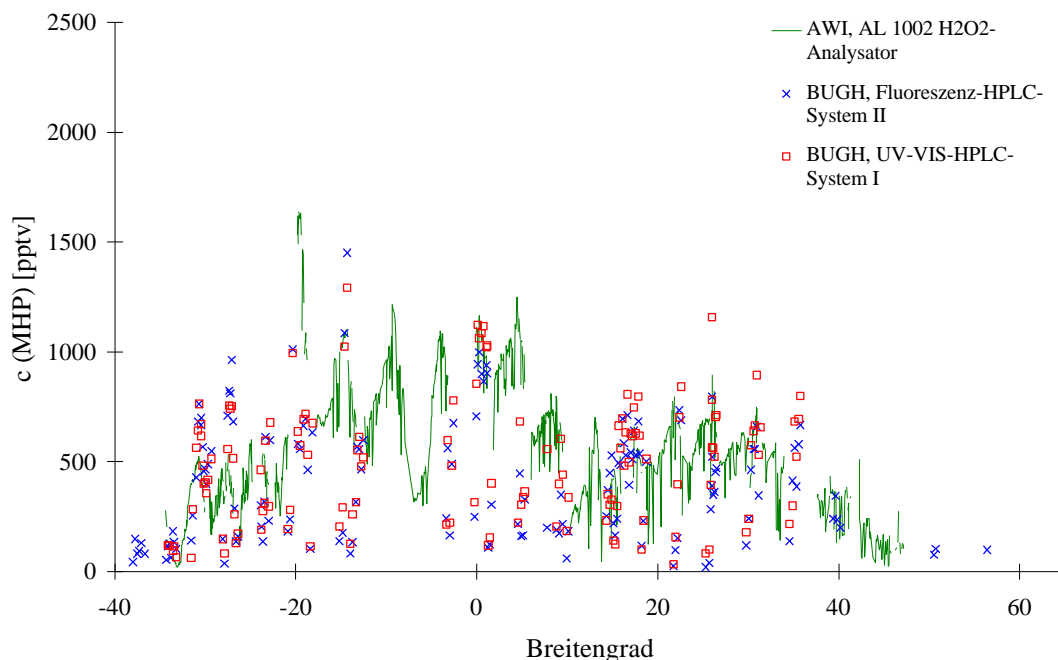


Abbildung 39: Meridionaler Verlauf der atmosphärischen MHP-Konzentration während der Polarsternexpedition ANT XIV/1

Die sich daraus ergebende Frage, ob die Abweichungen zwischen beiden Systemen evtl. eine Folge der unzureichenden Zerstörung von H_2O_2 mit Katalase im H_2O_2 -Analysator des AWI und der sich daraus ergebenden höheren Werte für organische Hydroperoxide sind, ließ sich nicht vollständig klären. Während der in Abbildung 40 dargestellte meridionale Verlauf der Gesamt-Hydroperoxidkonzentration die Vermutung nahelegt, daß durch die Differenzierung von organischem Hydroperoxid und Gesamthydroperoxid mittels Katalase ein Fehler entsteht, konnte ein solcher aus verschiedenen Gründen weitgehend ausgeschlossen werden.

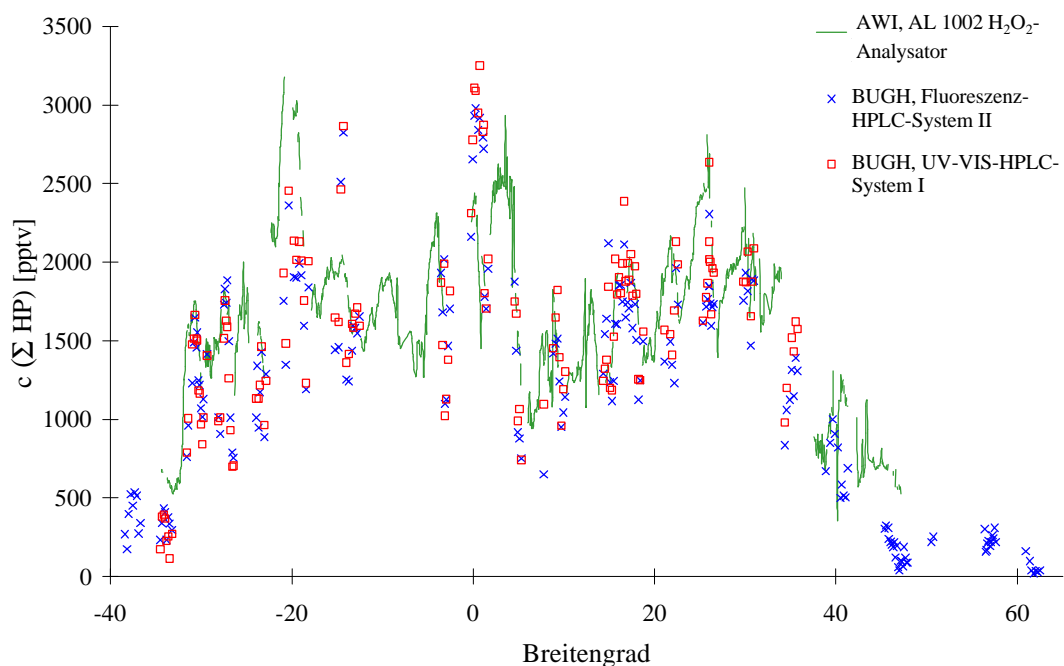


Abbildung 40: Meridionaler Verlauf der atmosphärischen Gesamt-Hydroperoxid-Konzentration während der Polarsternexpedition ANT XIV/1

So wurde mit Hilfe der HPLC-Methoden in den marinen Luftmassen nur MHP als organisches Hydroperoxid nachgewiesen. Da der Continuous-Flow-Hydroperoxid-Analysator des AWI auf MHP kalibriert war und die eingestellte, unvollständige Zerstörung des H_2O_2 mit Katalase durch einen Korrekturfaktor berücksichtigt wurde, sollten überwiegend korrekte Meßwerte erhalten worden sein. Obwohl während der Kryosampling/HPLC-Messungen wegen eines defekten Kryostaten zeitweise auf die Kühlung mit einer Stickstoff/Ethanol-Mischung ($-80\text{ }^\circ\text{C}$) umgestellt wurde, kann

auch dies als Grund für die Meßwertunterschiede und -schwankungen ausgeschlossen werden. Bei dieser Behelfskühlung erfolgte die Kontrolle der Temperatur, ebenso wie beim Einsatz des Kryostaten, mit einem Minimum/Maximum-Thermometer. Entsprechende Diskrepanzen wurden bereits bei früheren Messkampagnen beobachtet, z. B. im Rahmen des Mauna Loa Observatory Photochemistry Experiment 2, und sollten in zukünftigen Arbeiten untersucht werden (Staffelbach et al., 1996).

Da die Analyse der mittels Kryosampling erhaltenen wässrigen Lösungen sowohl mit dem Fluoreszenz-HPLC-System II, als auch mit dem DMPD-UV/VIS-HPLC-System I erfolgte, konnte ein Vergleich beider Systeme durchgeführt werden. Zur Prüfung der Übereinstimmung wurden die Meßwerte, wie in Abbildung 41 dargestellt, gegeneinander aufgetragen.

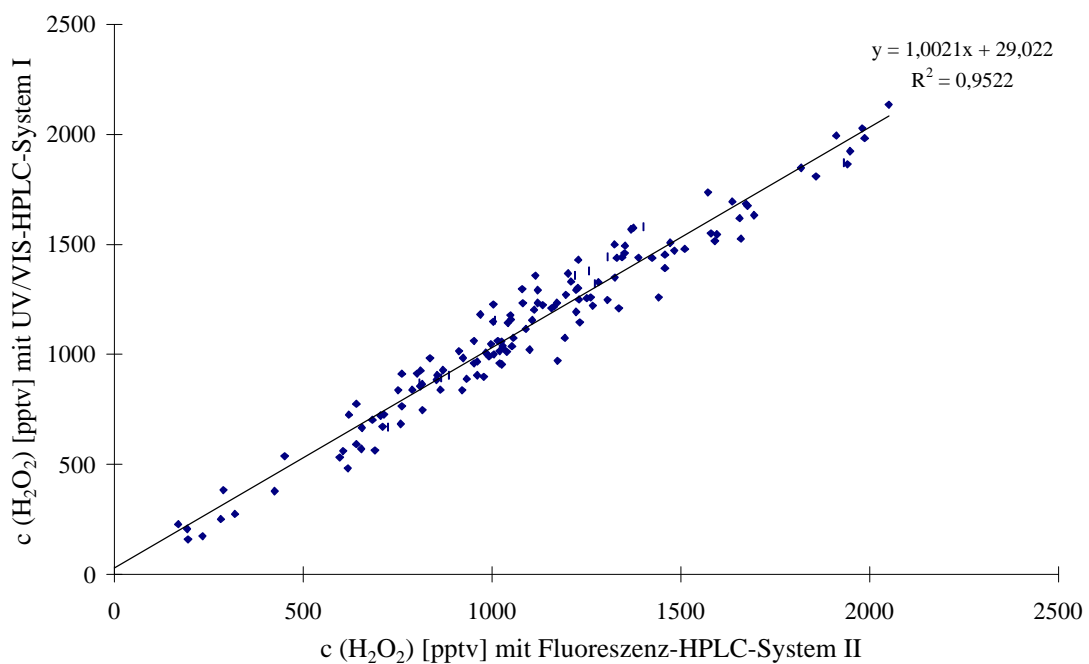


Abbildung 41: Vergleich der mit dem UV/VIS-HPLC-System I und dem Fluoreszenz-HPLC-System II gemessenen H_2O_2 -Konzentrationen

Sowohl der direkte Vergleich der einzelnen H_2O_2 -Meßwerte als auch die geringe Streuung der Werte um die in Abbildung 41 erhaltene Gerade (Steigung 1.00) zeigt, daß die mit beiden Systemen erhaltenen H_2O_2 -Meßwerte innerhalb ihrer Fehlergrenzen identische Ergebnisse liefern. Dieser ebenfalls für die MHP-Meßwerte durch-

geführte und in Abbildung 42 dargestellte Vergleich brachte trotz etwas größerer Differenzen ein analoges Ergebnis.

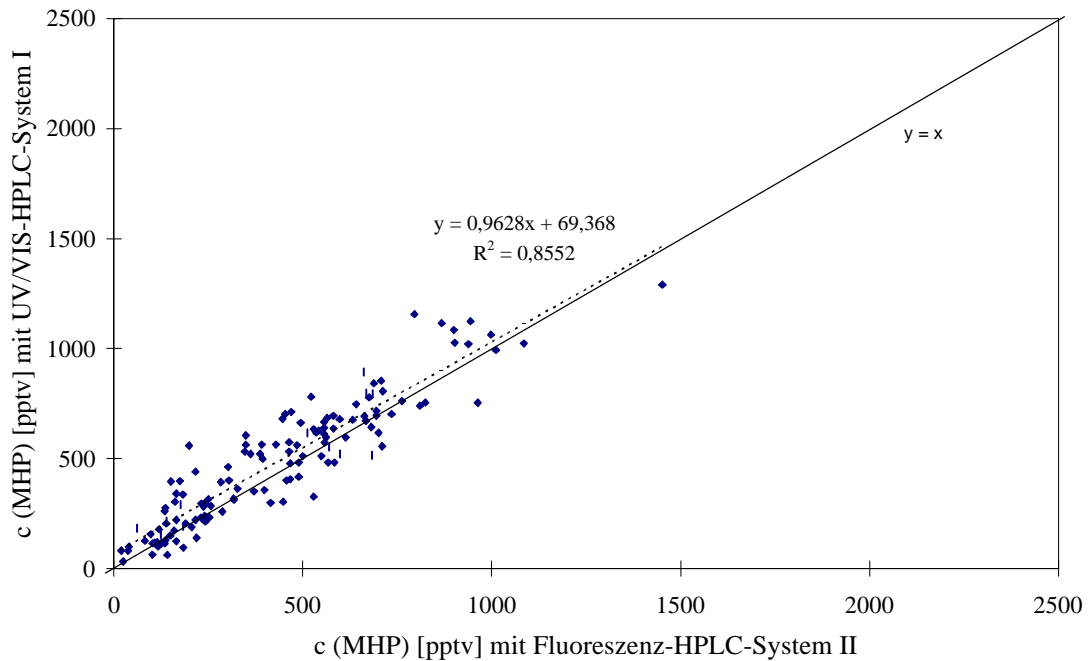


Abbildung 42: Vergleich der mit dem DMPD-UV/VIS-HPLC-System I und dem Fluoreszenz-HPLC-System II gemessenen MHP-Konzentrationen während der Polarsternexpedition ANT XIV/I

Damit liegen ausreichende experimentelle Befunde vor, nach denen das neue DMPD-UV/VIS-HPLC-System bei Messungen mariner Luftproben ebensogut eingesetzt werden kann wie das enzymatische HPLC-System.

3.3.2.2 Messung von Regenproben

Während der starken Niederschläge im Bereich der innertropischen Konvergenzzone wurde die Hydroperoxidkonzentration in Regenwasser bestimmt. Die auf einem Schiff durch starke horizontale Drift erschwerte Probenahme von Regen erfolgte mit einem vom Institut für Meereskunde der Universität Kiel entwickelten Schiffsregenschüssel nach Prof. Hasse. Zur Sammlung der Regenproben in Duran-Glasflaschen wurden an die Abflüsse des in Abbildung 52, S. 135 dargestellten Gerätes etwa 1.5 m lange PE-

Schläuche angeschlossen. Da der Schiffsmessgerät an den mit Regenwasser in Berührung kommenden Stellen aus Edelstahl bestand und eine Zersetzung von Hydroperoxiden als wahrscheinlich erschien, wurde zunächst die Wiederfindung durch Auftropfen von 50 ml einer 10 und einer 1 μM H_2O_2 -Lösung bestimmt. Die dabei erhaltenen Ergebnisse von 97-99 % widersprachen dieser Vermutung, so daß eine mögliche Hydroperoxidzersetzung durch die Probenahme vernachlässigt werden konnte.

Die Meßwerte, deren Häufigkeit innerhalb der innertropischen Konvergenzzone am größten war, zeigten maximale Konzentrationen von etwa 1600 $\mu\text{g/l}$ (47 $\mu\text{mol/l}$) H_2O_2 am 26.10.96 in Äquatornähe (Abbildung 43, siehe auch Abbildung 37, S. 108). Interessant waren zudem die vom 30.10. bis 01.11.1996 erhaltenen Ergebnisse. In dieser Zeit durchfuhr die Polarstern ein mehrere Tage altes Regengebiet. Während am Rand des Regengebietes (30.10.96) noch verhältnismäßig hohe H_2O_2 -Konzentrationen bestimmt werden konnten, nahmen diese danach infolge der permanenten Auswaschung und fehlenden Produktion von H_2O_2 stark ab.

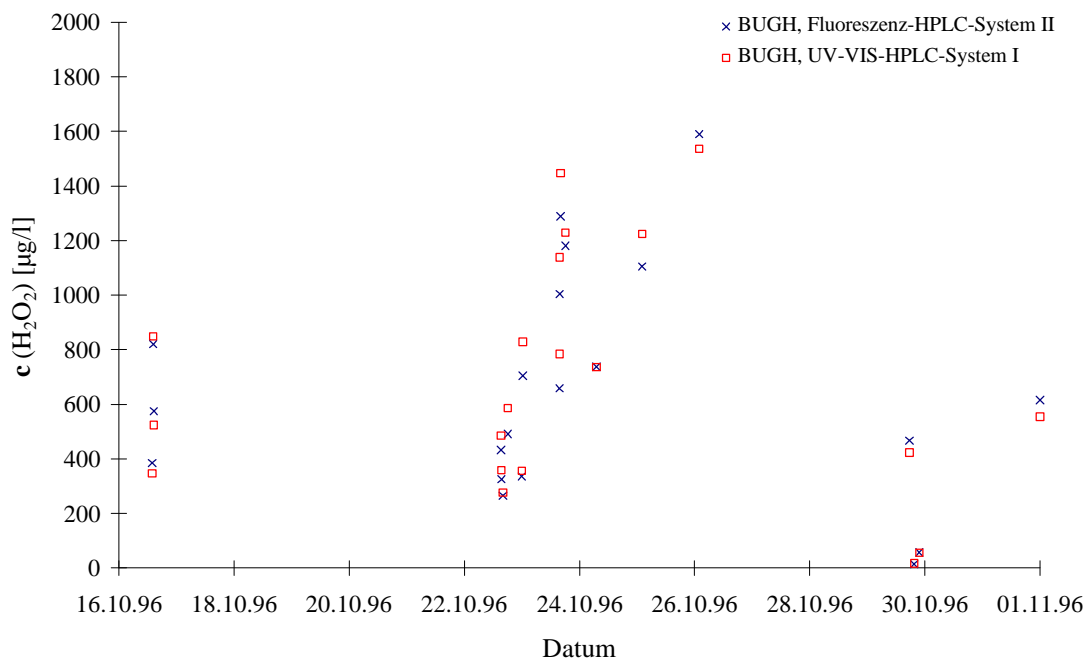


Abbildung 43: H_2O_2 -Konzentration in Regenwasser während der Polarsternexpedition ANT XIV/1

Im Gegensatz zu den relativ hohen H_2O_2 -Konzentrationen wurden, wenn überhaupt, nur sehr geringe MHP-Konzentrationen im Regenwasser bestimmt (Abbildung 44). Bei um den Faktor zwei niedrigeren Gasphasenkonzentrationen von MHP gegenüber H_2O_2 lassen sich die um den Faktor fünfzig niedrigeren MHP-Konzentrationen im Regenwasser nur über die wesentlich geringere Henry-Konstante des organischen Hydroperoxids erklären.

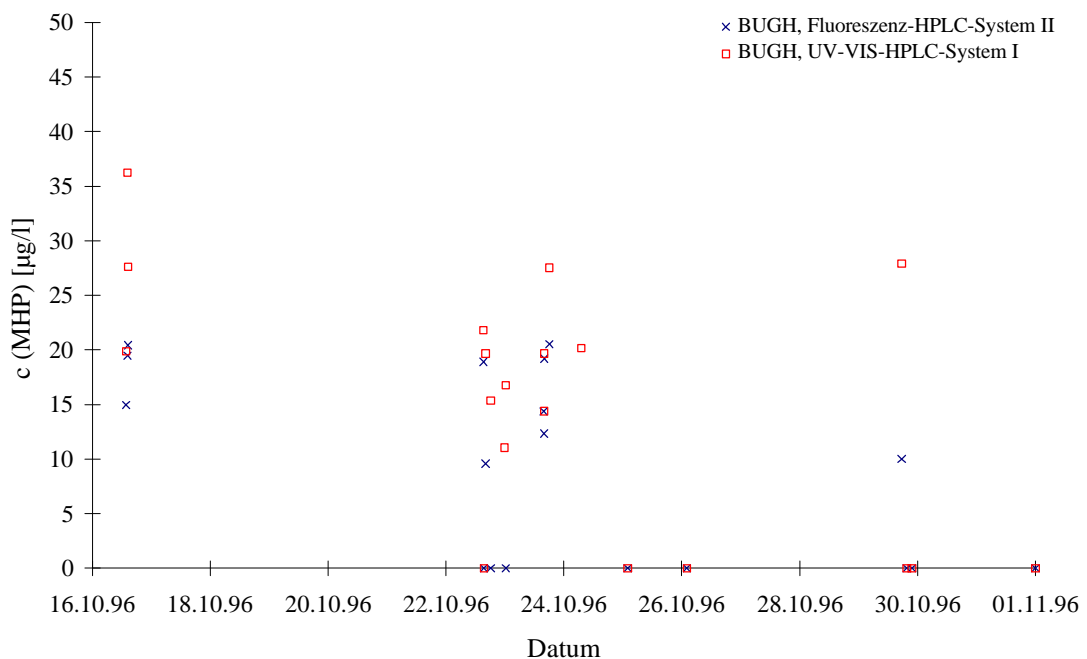


Abbildung 44: MHP-Konzentration in Regenwasser während der Polarsternexpedition ANT XIV/I

Ebenso wie bei den Messungen der Gasphasenkonzentration wurde auch hier ein Vergleich der eingesetzten HPLC-Systeme durchgeführt (Abbildung 45). Insgesamt ergaben sich dabei sowohl für die H_2O_2 -Meßwerte als auch für die MHP-Meßwerte den Gasphasenmessungen analoge Ergebnisse. So zeigten die mit beiden HPLC-Systemen erhaltenen Meßwerte der H_2O_2 -Bestimmung nur geringe Differenzen, was sich in der geringen Streuung der Werte um die Gerade mit der Steigung 1.05 widerspiegelt.

Für die MHP-Meßwerte wurde dagegen eine deutlich größere Differenz festgestellt, wobei sich mit dem UV/VIS-HPLC-System immer etwas höhere Werte als mit dem Fluoreszenz-HPLC-System ergaben. Da die Konzentrationen von 10 bis 35 $\mu\text{g/l}$ (0.2

bis 0.8 $\mu\text{mol/l}$) im Bereich der Nachweisgrenze des Fluoreszenz-HPLC-Systems lagen, ist die Abweichung jedoch verständlich.

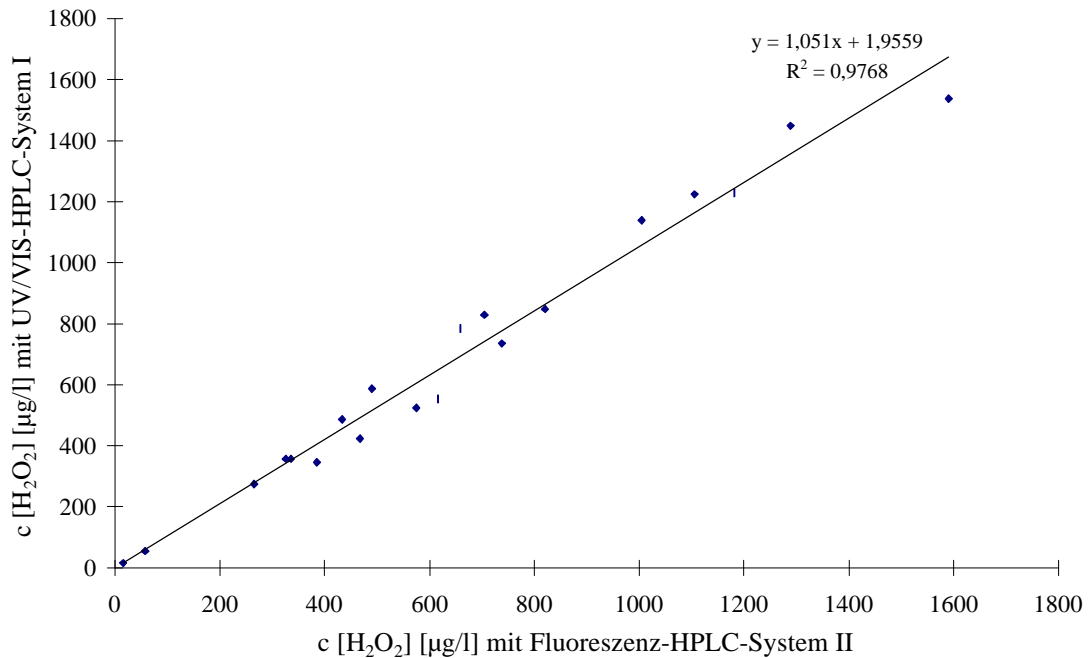


Abbildung 45: Vergleich der mit dem UV/VIS-HPLC-System I und dem Fluoreszenz-HPLC-System II gemessenen H_2O_2 -Konzentrationen in Regenwasser während der Polarsternexpedition ANT XIV/1

3.3.3 Abgasmessungen

Untersuchungen der Abgase eines Notstromaggregats (Honda EM 600 Portable Generator) sollten klären, ob bei der Kraftstoffverwertung mit Verbrennungsmotoren ebenso wie bei der Verbrennung von Biomasse durch offene Feuer (Lee et al., 1997, 1998) Hydroperoxide entstehen können. Für diese Messungen wurde das Notstromaggregat ohne Last betrieben und zur Probenahme das Kryosampling eingesetzt. Der Abstand zwischen Kühlfalleneinlaß und Auspuff des Notstromaggregats betrug etwa 5 cm, in einer weiteren Untersuchung 1 m. Bei der Probenahme im Abstand von 1 m vom Auspuff konnten die Kühlfallen mit Fritte eingesetzt werden. Da es bei der Kryoprobeahme in unmittelbarer Nähe des Auspuffs mit den für die Luftprobenahme routinemäßig verwendeten Kühlfallen zu einer Verstopfung der Fritte kam, wurden zwei hintereinander geschaltete Kühlfallen ohne Fritte

verwendet. Bei einem Luftvolumen von 120 l mit einem Luftvolumenfluß von 3 l/min wurden in der ersten Kühlfalle etwa 1.1 g und in der hinteren Kühlfalle etwa 0.3 g Kondensat gesammelt. Nach Vereinigung der Kondensate wurden diese mit einem isokratischen Eluenten (MeOH/verd. H_3PO_4 40:60 (v:v)) am Fluoreszenz-HPLC-System II und am DMPD-UV/VIS-HPLC-System I untersucht. Die erhaltenen Chromatogramme weisen Signale mit ähnlichen Retentionszeiten, allerdings in stark unterschiedlichen Intensitätsverhältnissen auf (Abbildung 46).

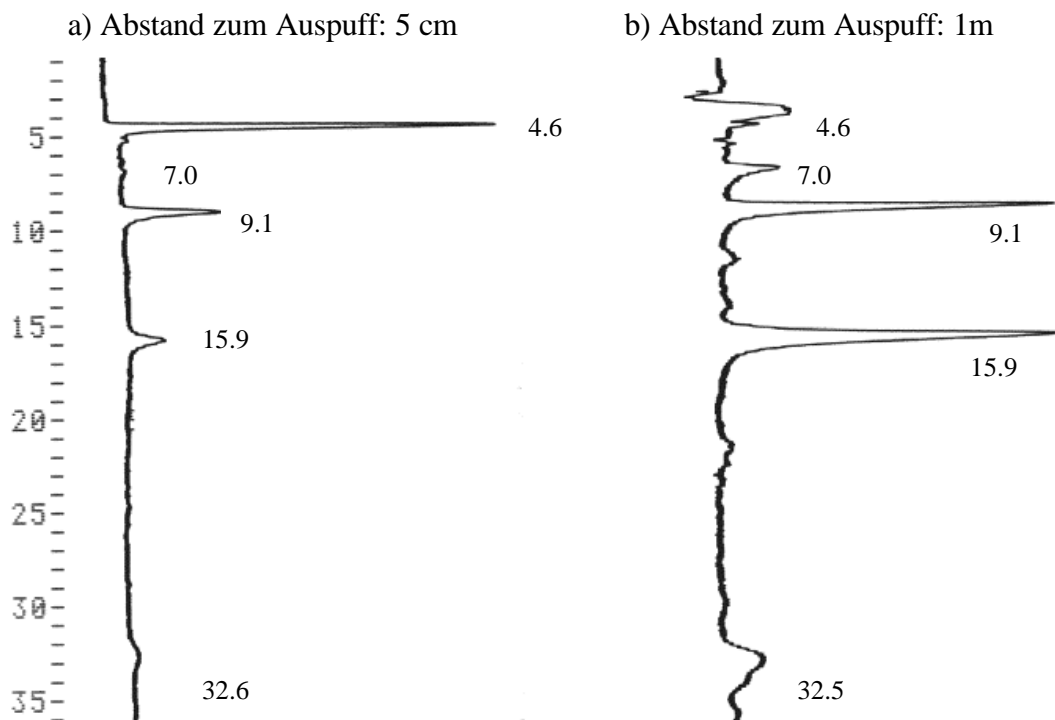


Abbildung 46: Chromatogramme der Abgase eines Notstromaggregats, Probenahme bei 5 cm und 1 m Entfernung vom Auspuff (DMPD-UV/VIS-HPLC)

Während es sich bei der nach 4.6 min eluierenden Substanz (Chromatogramm a) eindeutig um H_2O_2 handelt, können die nach 7.0, 9.1, 15.9 und 32.6 min eluierenden Substanzen beider Chromatogramme nicht zugeordnet werden. Weitergehende Untersuchungen deuten jedoch darauf hin, daß es sich um oxidierende Substanzen handelt. Zur Klärung der Identität könnten insbesondere HPLC/MS-Messungen beitragen. Die in größerer Entfernung (1 m) vom Auspuff entnommene Probe wurde gleichzeitig mit dem Fluoreszenz-HPLC-System untersucht. Im Unterschied zu den Signalen der mit der UV/VIS-HPLC gemessenen Probe zeigte das Chromatogramm der Fluoreszenz-

HPLC bei verhältnismäßig stark rauschender Basislinie vier kleinere Signale im Bereich von 3.4 bis etwa 20 min, sowie ein stark verbreitertes größeres Signal bei etwa 30 min. Im Gegensatz zu den Messungen mit dem UV/VIS-HPLC-System wurde hier keine Untersuchung zum Ausschluß fluoreszierender Substanzen (Messung ohne Reagenz) durchgeführt. Aufgrund der Ergebnisse aus dem folgenden Kapitel 3.3.4 sollte jedoch auch hier von einer Interferenz fluoreszierender Substanzen ausgegangen werden.

Die Untersuchung der Abgasproben hat gezeigt, daß sich bei Verbrennungsprozessen in Motoren durchaus Hydroperoxide bilden können. Obwohl nur H₂O₂ eindeutig identifiziert wurde, kann nicht ausgeschlossen werden, daß die in den Proben nachgewiesenen oxidierenden Substanzen Hydroperoxide sind. Dies unterstützt vorläufige Ergebnisse von Stärk et al. (1986c), nach denen die basenkatalysierte Chemilumineszenz von Verbrennungsabgasen auf das Vorkommen von Peroxiden in Verbrennungsabgasen hinweist. Mit dem neuen UV/VIS-HPLC-System und geeigneten Vergleichssubstanzen sowie detaillierten HPLC/MS-Untersuchungen sind durchaus weitere Möglichkeiten gegeben, diese bisher nicht geklärten Aspekte erfolgreich zu bearbeiten.

3.3.4 Abgasstaub des Wuppertaler Kiesberg-Tunnels

Im Gegensatz zu den recht instabilen, flüchtigen Hydroperoxiden (z. B. H₂O₂, HMHP und MHP) besitzen höhere Hydroperoxide, wie z. B. Tetralinhydroperoxid, welches durch Autoxidation bei 75 °C darstellbar ist, eine ausreichende Stabilität. Angeregt durch Arbeiten, bei denen aufgrund verschiedener Meßergebnisse Hydroperoxide in Dieselruß und Schwebstaubextrakten vermutet wurden (Stärk und Stauff, 1986a; Esser und Klockow, 1994), sollten auch mit dem neuen UV/VIS-HPLC-System Abgasstaubproben untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden von den mit lackierten Metallprofilen ausgestaffierten Seitenwänden des Wuppertaler Kiesberg-Tunnels Staubproben entnommen. Zur Untersuchung wurden etwa 200 mg Staub mit 3 ml Methanol aufgeschlämmt, im Ultraschallbad behandelt und zentrifugiert. Vom klaren, stark gelb gefärbten Überstand wurden je 20 µl in das DMPD-UV/VIS-HPLC-System I sowie in das Fluoreszenz-HPLC-System II injiziert. Bei isokratischer Elution mit MeOH/verd. H₃PO₄ 40:60 (v:v) zeigten sich im Chromatogramm der

nichtenzymatischen UV/VIS-HPLC drei Signale mit Retentionszeiten von 4.3, 25.6 und 29.2 min (Anhang 51). Im Gegensatz zu den beiden Signalen höherer Retentionszeit, die nur wenig oberhalb der Nachweisgrenze liegen, entspricht das Signal bei 4.3 min in etwa der Konzentration einer 10 μM H_2O_2 -Lösung. Die Messung der Probe ohne Zugabe der Reagenzienlösung lieferte jedoch kein Signal. Zur weiteren Untersuchung wurde die Probe mit Wasser (verd. H_3PO_4) eluiert. Während das Signal bei 4.3 min (organische Elution) leicht angetrennt wurde, reichte die Elutionskraft nicht aus, um stärker retardierte Substanzen von der Säule zu spülen. Für die eluierenden Verbindungen ergaben sich Retentionszeiten von 4.4 bzw. 4.7 min. Obwohl die Retentionszeit von 4.7 min durchaus auf H_2O_2 hindeutet, kann seine Anwesenheit aufgrund der bekannten Instabilität mit hoher Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden. Da Eisen oberhalb einer Konzentration von 400 $\mu\text{mol/l}$ zu Signalen bei etwa 4.0 min führt, wurde der Eisengehalt des methanolischen Staubextraktes durch Atomabsorptionsspektroskopie bestimmt. Bei der gefundenen Konzentration von 0.26 mg/l (4.6 $\mu\text{mol/l}$) Fe sind jedoch keine Störungen zu erwarten (vgl. Kapitel 3.2.4, s. S. 90). Allerdings sollte durchaus beachtet werden, daß auch weitere Metallionen wie z. B. Cu, Al, Ag (Mori et al., 1997), vielleicht aber auch im Abgasstaub zu erwartende Pb- und Pt-Verbindungen mit substituierten Phenylendiaminen reagieren können. Gegenüber den Untersuchungen des Abgasstaubes mit der UV/VIS-HPLC zeigten sich in den Chromatogrammen der Fluoreszenz-HPLC deutlich mehr Signale bei kleineren Retentionszeiten (Anhang 52). Die ohne Reagenz durchgeführte Messung ergab, daß es sich bei allen auftretenden Signalen um fluoreszierende Verbindungen handelte. Allerdings zeigte das Signal bei 4.4 min bei der Messung ohne Reagenzienzugabe eine deutlich geringere Intensität. Die rein wäßrige Elution führte zu einer etwas besseren Trennung der Signale, die sich zu etwas kleineren Retentionszeiten verschoben. Dieses Verhalten ist für hydrophile Substanzen zu erwarten. Die durchgeführten Messungen konnten nicht eindeutig das Vorhandensein von Hydroperoxiden in Abgasstaub klären. Allerdings zeigte sich auch bei diesen Untersuchungen, daß das UV/VIS-HPLC-System bei komplexen Proben durchaus weniger störanfällig ist als das enzymatische Fluoreszenz-HPLC-System.

3.3.5 Bestimmung des Hydroperoxidgehaltes von Lösungsmitteln

Wie schon weiter oben erwähnt, neigen insbesondere die häufig als Lösungsmittel eingesetzten Äther zur Autoxidation, wobei unter anderem gefährliche Hydroperoxide entstehen können. Neben der Konzentration von 1-Ethoxyethylhydroperoxid in Diethylether wurde im Rahmen dieser Arbeit auch der 2-Hydroperoxytetrahydrofuran-gehalt verschiedener Tetrahydrofuranlösungen bestimmt. Dazu wurden je 20 µl des Lösungsmittels direkt in das HPLC-System injiziert und unter isokratischen Bedingungen (MeOH/verd. H₃PO₄ 45:55 (v:v)) getrennt. Da die Chromatogramme neben den erwarteten Hydroperoxiden keine weiteren Signale zeigten, wurde auf eine Abbildung verzichtet. Bei Hydroperoxidkonzentrationen größer als 10 µmol/l wurde das Lösungsmittel mit Methanol verdünnt bzw. in diesem aufgenommen und die Probe erneut gemessen. Einige der untersuchten Lösungsmittel enthielten bemerkenswert hohe Hydroperoxidmengen (Tabelle 23).

Lösungsmittel	Alter	Stabilisiert mit	c (HP) [µmol/l]	w (HP) bestimmt	w (HP) max., Herstellerangabe
Diethylether, Uvasol (Merck 1.00930)	Neubestellung	2 % Ethanol	394	0.0059	0.0005
Diethylether (Merck 1.0092)	Neubestellung	10 ppm BHT	< 0.04	< 6*10 ⁻⁷	< 0.000 03
Diethylether (Merck 8.2270)	Neubestellung	7 ppm BHT	0.8	0.000 01	< 0.000 03
Tetrahydrofuran LiChrosolv® Flasche a (Merck 8101)	etwa 2 Jahre, geöffnet	-	4631	0.054	-
Tetrahydrofuran LiChrosolv® Flasche b (Merck 8101)	etwa 2 Jahre, ungeöffnet	-	2896	0.034	-
Tetrahydrofuran p.a. Flasche 1 (Merck 1.09731)	etwa 2 Jahre, geöffnet	250 ppm BHT	600	0.007	< 0.005

Tabelle 23: Hydroperoxidkonzentration verschiedener organischer Lösungsmittel (DMPD-UV/VIS-HPLC-System II)

Die Untersuchung zeigte, daß mit dem UV/VIS-HPLC-System eine schnelle und einfache Bestimmung der Hydroperoxidkonzentration organischer Lösungsmittel möglich ist. So könnte dieses System zum Beispiel als automatisierte Variante zur

Produktüberwachung von hydroperoxidbildenden Lösungsmitteln eingesetzt werden und die immer noch häufig angewandte, arbeitsintensive und weniger empfindliche jodometrische Titration ersetzen.

3.3.6 Bestimmung des Benzoylperoxidgehaltes einer Hautreinigungssalbe

Als ein weiteres Anwendungsbeispiel zur Produktkontrolle dient die Untersuchung des Benzoylperoxidgehaltes einer Akne-Salbe (Sannoxit Gel 2.5, Fa. Basotherm, Biberach) mit dem DEPD-UV/VIS-HPLC-System II. Zunächst wurde die Kalibrierfunktion mit Benzoylperoxid-Standardlösungen (0.5 - 15 $\mu\text{mol/l}$) erstellt.

Danach wurden zur Bestimmung des Benzoylperoxidgehaltes etwa 150 mg der Salbe in einen 50 ml Meßkolben genau abgewogen und nach Zugabe von etwa 40 ml Methanol bzw. Acetonitril im Ultraschallbad gelöst. Nach Auffüllen mit dem entsprechenden Lösungsmittel wurde 1:5 verdünnt, von dieser Lösung wurden 20 μl in die HPLC injiziert und mit MeOH/verd. H_3PO_4 90:10 (v:v) eluiert (Abbildung 47).

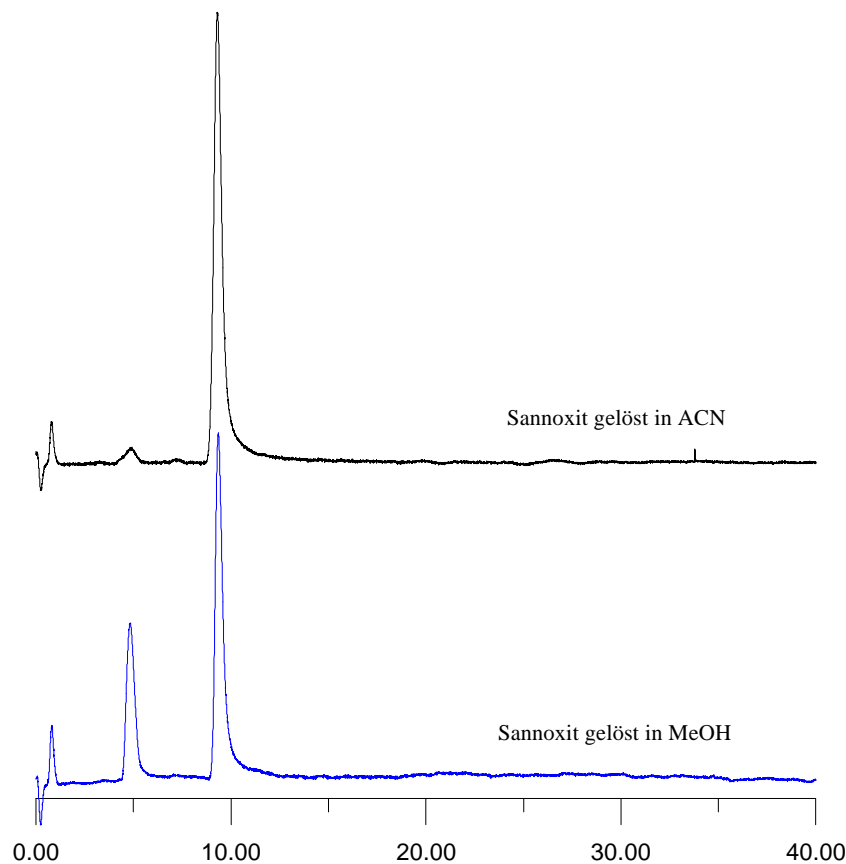


Abbildung 47: Chromatogramme der acetonitrilischen und methanolischen Sannoxit-Extrakte (DEPD-UV/VIS-HPLC-System II)

Bei den in Methanol gelösten Proben zeigte sich neben unerwarteten H₂O₂-Signalen (Abbildung 47), daß der Benzoylperoxidgehalt von der ersten bis zur dritten Injektion einer Probe um etwa 10 % abnahm. Im Gegensatz zu den in Methanol gelösten Proben konnte diese Zersetzung weder bei den in Acetonitril gelösten Proben, noch bei methanolischen Standardlösungen von Benzoylperoxid beobachtet werden. Ob dieser Effekt auf gelöste Nebenbestandteile der Salbe zurückzuführen ist, konnte an dieser Stelle nicht geklärt werden.

Unter Verwendung von Acetonitril als Lösungsmittel konnte für die Salbe ein Gehalt von 2.52 ± 0.09 % ($n = 5$) bestimmt werden. Dieser Wert entspricht sehr gut dem vom Hersteller angegebenen Gehalt an Benzoylperoxid von 2.5 %. Auch hier zeigte sich trotz der komplexeren Matrix der Probe die gute Anwendbarkeit des UV/VIS-HPLC-Systems zur Bestimmung von Peroxiden.

4 Experimenteller Teil

4.1 Chemikalien

Acetonitril, LiChrosolv [®] , gradient grade	Merck, Darmstadt
Ammoniumeisen(II)-sulfat-Hexahydrat	Merck, Darmstadt
Benzoessäure, p.a.	Merck, Darmstadt
Benzoylperoxid (mit 25 % H ₂ O)	Merck, Darmstadt
tert-Butanol, p.a.	Merck, Darmstadt
tert-Butylhydroperoxid (70 %ige Lösung in Wasser)	Merck, Darmstadt
Di-tert-Butylperoxid	Peroxidchemie, München
p-Chloranilin	Merck, Darmstadt
Chlorpromazinhydrochlorid	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Cobalt(II)-nitrat-Hexahydrat, p.a.	Merck, Darmstadt
Cumolhydroperoxid, (80 %ige Lösung in Cumol)	Merck, Darmstadt
Cytochrom c	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Deuteriochloroform , für die NMR, min. 99 %	Merck, Darmstadt
N,N-Diethyl-1,4-phenylendiammoniumchlorid	Merck, Darmstadt
2,3-Dihydrofuran	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
<i>di</i> -Kaliumhydrogenphosphat-Trihydrat, p.a.	Merck, Darmstadt
N,N-Dimethyl-1,4-phenylendiammoniumdichlorid	Merck, Darmstadt
Eisen(III)-chlorid-Hexahydrat	Merck, Darmstadt
Eisen-Standardlösung, 1g Fe/l	Merck, Darmstadt
Essigsäure, 100 %	Merck, Darmstadt
Ethanol, p.a	Merck, Darmstadt

Ethylbenzol	Merck, Darmstadt
Ethylendiaminteraessigsäure Dinatriumsalz (Titriplex [®] III), EDTA, p.a.	Merck, Darmstadt
Ethylvinylether	Merck, Darmstadt
Hemin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Homovanillinsäure	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
2-Hydroxy-1-naphthaldehyd	Merck, Darmstadt
2-Hydroxyphenylessigsäure	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
p-Hydroxyphenylessigsäure	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Kaliumdihydrogenphosphat p.a.	Merck, Darmstadt
Kaliumiodid, p.a	Merck, Darmstadt
Luminol (5-Amino-1,2,3,4-tetrahydro- phthalazin-1,4-dion)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Methanol, LiChrosolv [®] , gradient grade	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid, Plätzchen, p.a.	Merck, Darmstadt
Natriumthiosulfat Titrisol [®] (0.1 M)	Merck, Darmstadt
Paraformaldehyd (Polyoxymethylen)	Merck, Darmstadt
Peroxidase (aus Meerrettich) 10 000 U/Glas	Merck, Darmstadt
Pyridin-4-carbonsäure (Isonicotinsäure)	Merck, Darmstadt
Schwefelsäure 95-97 %, p.a.	Merck, Darmstadt
Tetrafluoroborsäure, ~50 %	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Tetrafluoroborsäure, 54 %ige Lösung in Diethylether	Merck, Darmstadt
1,2,3,4-Tetrahydronaphthalin (Tetralin)	Merck, Darmstadt

N,N,N',N'-Tetramethyl-1,4-phenyldiammoniumdichlorid	Merck, Darmstadt
Thiosemicarbazid	Merck, Darmstadt
Triethylentetramin	Merck, Darmstadt
1,3,5-Trioxan (meta-Formaldehyd)	Merck, Darmstadt
Vinylacetat	Merck, Darmstadt
Wasserstoffperoxid, min. 30 %, p.a. Perhydrol [®]	Merck, Darmstadt
Xylenolorange-Tetranatriumsalz	Merck, Darmstadt

4.2 Verwendete Geräte und Methoden

Ozongenerator:

Fischer Labor und Verfahrenstechnik GmbH, Modell 502

Ozonmeßgerät:

Thermo-Environmental Instruments Inc., Modell TE 49

Kernresonanzspektroskopie (NMR):

Bruker AC 250

¹H-NMR 250 MHz

¹³C-NMR 62.9 MHz

Bruker ARX 400

¹H-NMR 400 MHz

¹³C-NMR 100.6 MHz

GC-MS-Kopplung:

Hewlett Packard MSD 5970 mit GC 5890 und FID

Säule: HP Pona 25 m, ID 0.25 mm, Film 0.2 µm

Massenspektrometrie:

Varian MAT 311 A, Sektorfeldgerät

Elementaranalyse:

Perkin Elmer Mikroelementar Analysator 240 B

Photometrie:

Hitachi Zweikanal-Photometer Model 100-60

Atomabsorptions-Spektroskopie

Perkin Elmer, Atom Absorption Spectrometer 1100 B

Titration der Hydroperoxide:

Zur Titration der Hydroperoxide wurden 20-60 mg der entsprechenden Substanz in einem mit Stickstoff gespülten 100-ml-Erlenmeyerkolben mit Schliff eingewogen und durch Zugabe von 20 ml entgastem Eisessig gelöst. Nach Zugabe von 2 ml einer gesättigten Kaliumjodidlösung wurde die Lösung 30 min im Dunkeln aufbewahrt und anschließend mit 0,01 molarer Natriumthiosulfatlösung nach farblos titriert (*Jander, 1973*).

4.3 Aufbau der HPLC-Systeme

Für die HPLC-Untersuchungen wurden verschiedene Gerätekombinationen verwendet. Der Grundaufbau der HPLC-Systeme bestand aus einer Eluentenpumpe, einem Autosampler oder manuellen HPLC-Injektionsventil, einer RP-Säule, ein bis zwei Nachsäulenreagenzienpumpen, Reaktionsschlangen, einem Detektor und Integrator oder Computer zur Datenerfassung. Die im folgenden beschriebenen Systeme zeigen die optimierten Einstellungen für die wäßrige Elution zur Bestimmung hydrophiler Hydroperoxide; die für die lipophile Hydroperoxide verwendete Gradientenelution ist in den entsprechenden Kapiteln dieser Substanzen beschrieben.

Fluoreszenz-HPLC-System I:

Eluentenpumpe:	Merck Hitachi 655 A-11
Eluent:	pH 3.5 (H ₃ PO ₄), Fluß 0.5 ml/min
Injektionsventil:	Rheodyne 7125 mit 20 µl Probenschleife
Säule:	Merck, LiChrospher [®] 100 RP-18, 250/4 mm, 5 µm
Reagenzienpumpe 1, 2:	Applied Biosystem 400 Solvent Delivery System
Reagenz 1:	4 mg p-Hydroxyphenylelessigsäure in 250 ml 0.01 M K ₂ HPO ₄ , pH 8.80

	Fluß 0.2 ml/min
Reagenz 2:	10 mg Meerrettichperoxidase in 250 ml H ₂ O
	Fluß 0.3 ml/min
Reaktionsschlange:	je 2 m Edelstahlkapillare 1/16" AD, 0.25 mm ID
Detektor:	Hewlett Packard HP 1046 A, Programmable Fluorescence Detector $\lambda_{\text{Ex}} = 295 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{Em}} = 415 \text{ nm}$
Datenerfassung:	Merck Hitachi D 2500 Chromato-Integrator

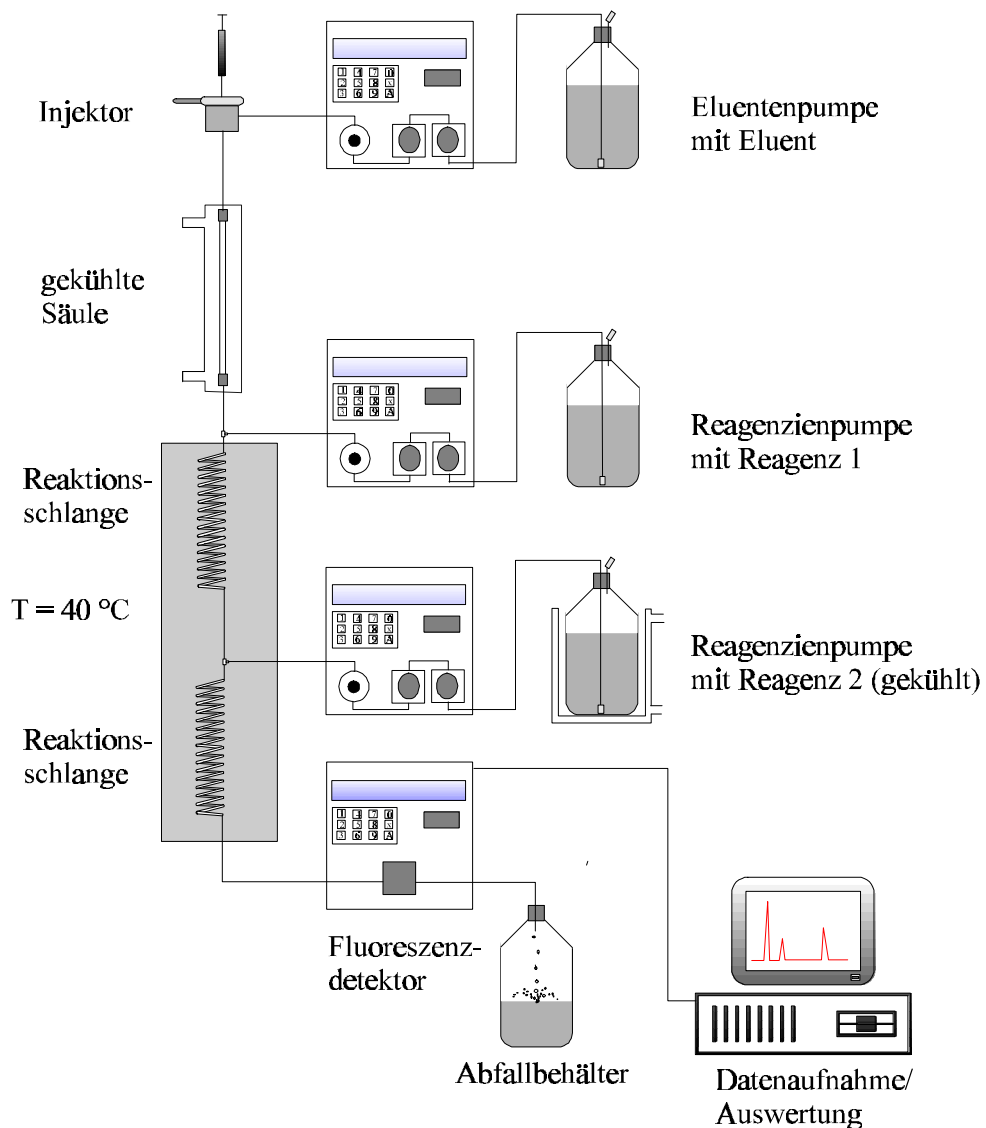


Abbildung 48: Fluoreszenz-HPLC-System I, 3-Pumpen-HPLC-System zur Bestimmung von Hydroperoxiden

Fluoreszenz-HPLC-System II:

Eluentenpumpe:	Merck Hitachi 655 A-11 A
Eluent:	pH 3.5 (H ₃ PO ₄), Fluß 0.5 ml/min
Injektionsventil:	Rheodyne 7125 mit 20 µl Probenschleife
Säule:	Merck, LiChrospher [®] 100 RP-18, 250x4 mm, 5 µm
Reagenzienpumpe:	Applied Biosystem 400 Solvent Delivery System
Reagenz:	20 mg Meerrettichperoxidase und 8 mg p-Hydroxyphenylelessigsäure in 500 ml 0.01 M K ₂ HPO ₄ , pH 8.80 Fluß 0.5 ml/min
Reaktionsschlange:	4 m Edelstahlkapillare 1/16“ AD, 0.25 mm ID
Detektor:	Hewlett Packard HP 1046 A, Programmable Fluorescence Detector $\lambda_{\text{Ex}} = 295 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{Em}} = 415 \text{ nm}$
Datenerfassung:	Merck Hitachi D 2500 Chromato-Integrator

UV/VIS-HPLC-System I:

Eluentenpumpe:	Merck Hitachi 655 A-11
Eluent:	pH 3.5 (H ₃ PO ₄), Fluß 0.5 ml/min
Injektionsventil:	Rheodyne 9125-PEEK, mit 20 µl Probenschleife
Säule:	Merck, LiChrospher [®] 100 RP-18, 250x4 mm, 5 µm
Reagenzienpumpe:	Applied Biosystem 400 Solvent Delivery System
Reagenz:	<u>DMPD</u> 500 mg N,N-Dimethyl-1,4-phenylendiammoniumdichlorid und 350 mg Ammoniumeisen(II)sulfat in 250 ml 7.8 mM H ₂ SO ₄ , Fluß 0.5 ml/min <i>alternativ</i> <u>DEPD</u> 625 mg N,N-Diethyl-1,4-phenylendiammoniumsulfat und 350 mg Ammoniumeisen(II)-sulfat-Hexahydrat in 250 ml 7.8 mM H ₂ SO ₄ , Fluß 0.5 ml/min
Reaktionsschlange:	7 m Edelstahlkapillare 1/16“ AD, 0.25 mm ID
Detektor:	Shimadzu SPD-6AV

Datenerfassung: UV/VIS Spectrometric Detector, $\lambda = 553$ (551) nm
Merck Hitachi D 2000 Chromato-Integrator

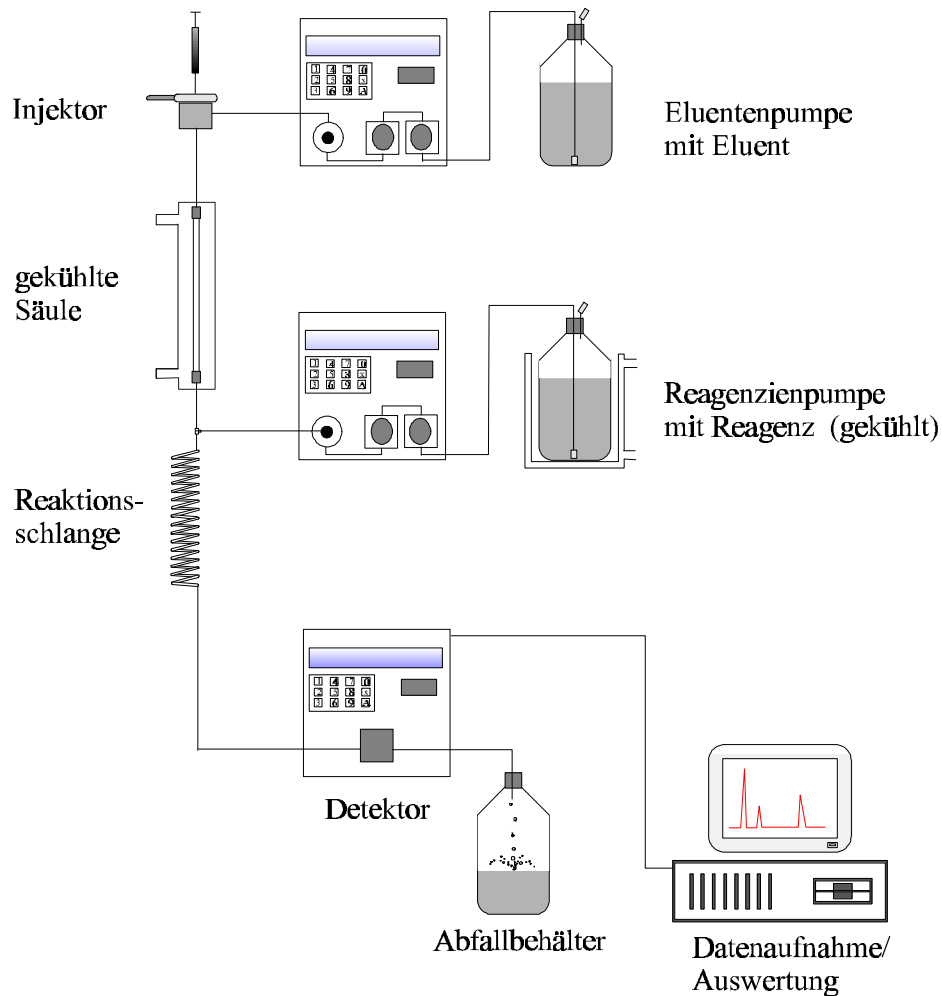


Abbildung 49: Fluoreszenz-HPLC-System II sowie UV/VIS-HPLC-Systeme I und II
(2-Pumpen-HPLC-System zur Bestimmung von Hydroperoxiden)

UV/VIS-HPLC-System II:

Eluentenpumpe: Waters alliance[®] 2690 Separation Module
mit He-Entgaser

Eluent: pH 3.5 (H₃PO₄), Fluß 0.5 ml/min

Autosampler: Waters alliance[®] 2690 Separation Module,
Probenschleife 100 µl, Injektionsvolumen variabel,
in der Regel 20 µl

Säule: Merck, LiChrospher[®] 100 RP-18, 250x4 mm, 5µm

Reagenzienpumpe:	Merck Hitachi L-6000 A
Reagenz:	<u>DMPD</u> 500 mg N,N-Dimethyl-1,4-phenylendiammoniumdi- chlorid und 350 mg Ammoniumeisen(II)sulfat in 250 ml 7.8 mM H ₂ SO ₄ , Fluß 0.5 ml/min <i>alternativ DMPD/HRP</i> 500 mg N,N-Diethyl-1,4-phenylendiammoniumsulfat und 250 mg Meerrettichperoxidase (HRP) in 250 ml H ₂ O , Fluß 0.5 ml/min <i>alternativ DEPD</i> 625 mg N,N-Diethyl-1,4-phenylendiammoniumsulfat und 350 mg Ammoniumeisen(II)-sulfat-Hexahydrat in 250 ml 7.8 mM H ₂ SO ₄ , Fluß 0.5 ml/min
Reaktionsschlange:	7 m Edelstahlkapillare 1/16“ AD, 0.25 mm ID
Detektor:	Merck Hitachi L-7420 UV/VIS Detector, $\lambda = 553$ (551) nm
Datenerfassung:	Waters SAT/IN-Module, Digital Celebris ^{FP} 590 Millenium 2.15

Chemilumineszenz-HPLC-System:

Eluentenpumpe:	Waters alliance [®] 2690 Separation Module mit He-Entgaser
Eluent:	pH 3.5 (H ₃ PO ₄), Fluß 0.5 ml/min
Autosampler:	Waters alliance [®] 2690 Separation Module, Probenschleife 100 µl, Injektionsvolumen 20 µl
Säule:	Merck, LiChrospher [®] 100 RP-18, 250x4 mm, 5 µm
Mischkammer:	HPLC-Kreuz-Verbinder
Reagenzienpumpe:	Merck Hitachi L-6000 A Pump
Reagenz:	16 mg 3-Aminophthalhydrazid (Luminol) und 0.8 mg Hematin in 500 ml 20 mM Na ₂ B ₄ O ₇ /NaOH pH 12, Fluß 1.0 ml/min
Detektor:	Jasco CL-825 Intelligent CL Detector

Programmierung: 0-5.8 min Gain 1

5.8-20 min Gain 10

Datenerfassung:

Waters SAT/IN-Module, Digital Celebris^{FP} 590

Millenium 2.15

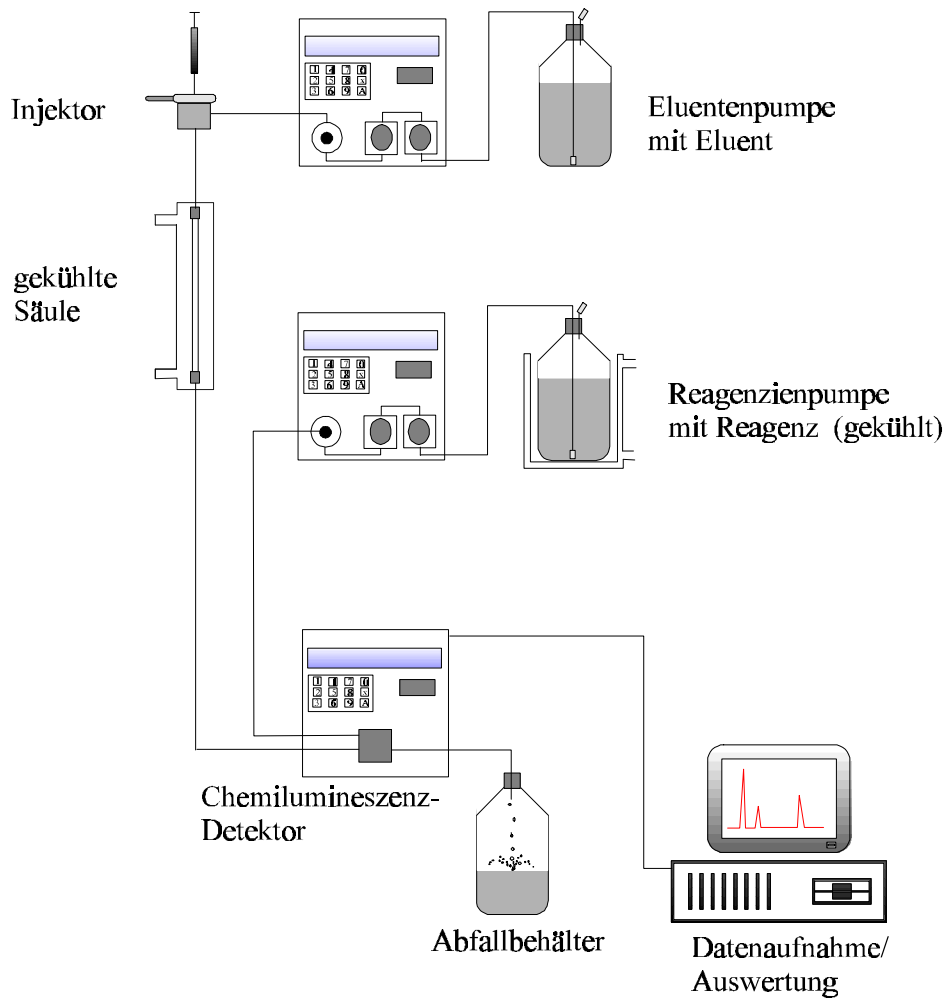


Abbildung 50: Chemilumineszenz-HPLC-System, 2-Pumpen-HPLC-System zur Bestimmung von Hydroperoxiden

Automatisches Fluoreszenz-System (Abbildung 33, S.96):

Sammelwendel: 1.2 m Glaskapillare 2 mm ID, gekühlt auf 4 °C

Pumpe für Striplösung: Merck L-6000 A Pump

Striplösung: pH 3.5 (H₃PO₄), Fluß 0.4 ml/min

Schlauchpumpe: Ismatec Instruments MV-MS3

Flügelradpumpe mit Durchflußregelung:	Eigenbau in Zusammenarbeit mit der Fa. QUMA, Wuppertal, zeitweise zusätzliche Luftmengenmessung mit 5-l-Gasuhr, nasse Ausführung, Ritter-Kunststoffwerk
Eluentenpumpe:	Merck L-6200 A Intelligent Pump
Eluent:	pH 3.5 (H ₃ PO ₄), Fluß 0.5 ml/min
Injektor:	Vici, elektrisches 10-Port-2-Positionen-Ventil, EC10UW 2 PEEK-Probenschleifen zu je 100 µl, Ansteuerung über Software und Eigenbau-Zeitverzögerungselektronik
Säule:	Merck, LiChrospher® 100 RP-18, 250x4 mm, 5 µm
Reagenzienpumpe:	Merck L-6000 A Pump
Reagenz1:	4 mg p-Hydroxyphenylelessigsäure und 10 mg Meerrettichperoxidase in 250 ml 0.01 M K ₂ HPO ₄ , pH 8.80, Fluß 0.5 ml/min
Reaktionsschlange:	4 m Edelstahlkapillare 1/16“ AD, 0.25 mm ID
Detektor:	Fluorescence Detector Merck Hitachi F 1080 $\lambda_{\text{Ex}} = 295 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{Em}} = 415 \text{ nm}$
Datenerfassung:	Merck Hitachi D-6000 Interface Merck Hitachi Model D-6000 Chromatography Data Station Software HPLC Manager Version 2

4.4 Prüfgaserzeugung

Prüfgasapparatur (Abbildung 32, S. 93):

Schwebekörperdurchfluß-

regler: Krohne, 50 - 1000 NI/h

Ozongenerator: Ströhlein, IR-01, Lampengehäuse

Grüntzel, Karlsruhe 253,7 nm Hg-Dampflampe

100 mA/500 V

Hochspannungsquelle:	Grüntzel, Karlsruhe, 80-250 mA, 2000 V Sekundär
Wendel:	Eigenbau, 52 Wendeln, 4 mm ID
Wendel-Thermostat:	Lauda, MGW C6
Schlauchpumpe:	Ismatec Instruments MV-MS3

4.5 Kryosampling

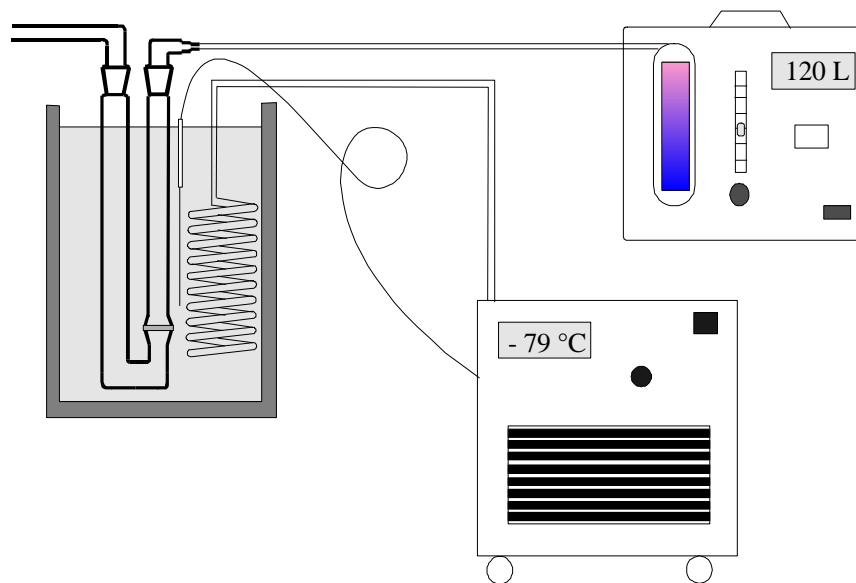


Abbildung 51: Kryosamplingaufbau mit Eintauchkühler und Luftsammelpumpe

Kryoprobeahme:

Eintauchkühler:	Julabo FT 901 während der Polarsternfahrt ANT XIV-1 Neslab, Imersion Cooler
Luftsammelpumpe:	Desaga GS 312, 3 l/min, 120 l
Kühlfallenbehälter:	Edelstahldewar, ID 200 mm
Kühlmedium:	Ethanol, T = -79°C
Kühlfalle:	Ansaugrohr ID 12 mm, Länge 100 mm-90°-60 mm mit NS 19 Kern, alternativ Kugelschliff /NS19 (Kern), U-Rohr, 2 x Hülse NS 19, Länge je Schenkel 250 mm, ID Kondensationsrohr 24 mm, Glasfritte Porengröße 2, ID Absaugrohr 16 mm, NS 19 (Kern)/Schlaucholive

4.6 Schiffsregennmesser

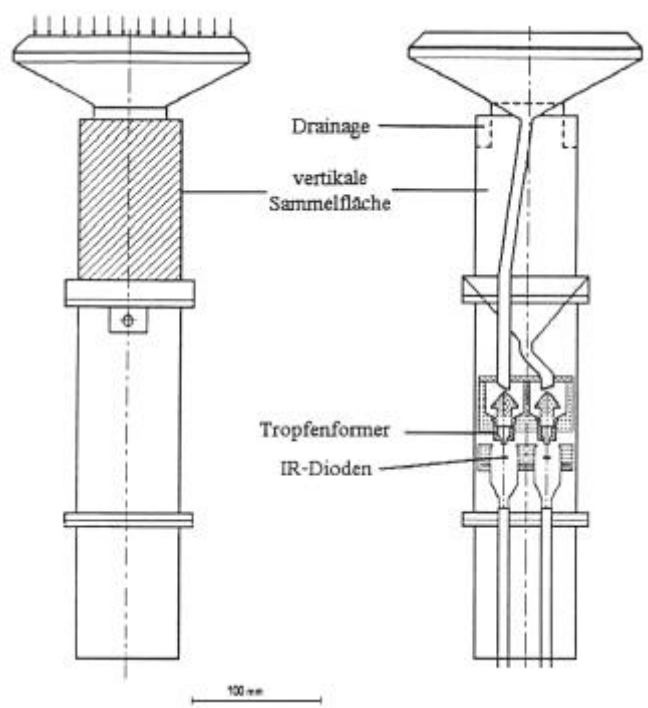


Abbildung 52: Schiffsregennmesser nach Prof. Hasse (mit freundlicher Genehmigung von Dr. M. Großklaus, Institut für Meereskunde der Universität Kiel)

4.7 Berechnung der atmosphärischen H_2O_2 -Konzentrationen

Die Berechnung der atmosphärischen Hydroperoxidkonzentration ($c(\text{HP})[\text{pptv}]$) erfolgte beim Kryosampling nach folgender Gleichung:

$$c(\text{HP})[\text{pptv}] = \frac{b \cdot (a+z) \cdot V_0 \cdot 1000}{V_N}$$

mit $b = c(\text{HP})$ der wässrigen Probe [$\mu\text{mol/l}$]
 $a =$ ausgefrorenes Wasser [$\text{g} \cong \text{ml}$]
 $z =$ zur Probe gegebenes Wasser [ml]
 $V_0 =$ Normvolumen 22,41 [l/mol]
 $V_N =$ Norm-Probevolumen [N_1]

wobei

$$V_N [N_l] = \frac{V_P \cdot p_P \cdot T_0}{T_P \cdot P_0}$$

mit V_P = Probevolumen [l]
 p_P = Luftdruck während der Probenahme [hPa]
 T_0 = 273.15 [K]
 T_P = Temperatur während der Probenahme [K]
 P_0 = 1013 [hPa]

Da das ausgefrorene Wasser während der Polarsternexpedition ANT XIV/1 nicht durch Auswiegen bestimmt werden konnte, wurde die bei der Probenahme ausgefrorene Menge Wasserdampf aus der gemessenen Luftfeuchte berechnet. Die Auftragung des log Wassergehaltes [$\log \text{ g/m}^3$] gegen 1/Temperatur (1/K) (Anhang 30, S. 160) folgt der Funktion (Handbook of chemistry and physics, 1995/1996)

$$\log H_2O [g / m^3] = 2187.8 \cdot \frac{1}{T_P} + 8.7$$

Daraus konnte die Menge an ausgefrorenem Wasser wie folgt berechnet werden:

$$a[g] = \frac{F_{rel} \cdot V_P \cdot 10^{\left(\frac{-2187.8}{T_P} + 8.7\right)}}{10^{-5}}$$

mit F_{rel} = relative Luftfeuchte [%]
 V_P = V_P = Probevolumen [l]
 T_P = Temperatur während der Probenahme [K]

4.8 Berechnung der statistischen Kenngrößen

Die statistischen Kenngrößen, wie Nachweisgrenze, Erfassungsgrenze und Bestimmungsgrenze der HPLC-Verfahren wurden nach der indirekten Kalibriergeradenmethode der DIN 32 645, 1994 bestimmt. Dazu wurden verschiedene Analytkonzentrationen mit einer maximal um eine Zehnerpotenz höheren Konzentration wie die der Nachweisgrenze jeweils mindestens dreimal gemessen.

Die Verfahrensstandardabweichung S_{x_0} (VSA) wurde ebenfalls nach DIN 32 645 bestimmt, während für die Bestimmung des Verfahrensvariationskoeffizienten V_{x_0}

(VVK), welcher der relativen Verfahrensstandardabweichung entspricht, folgende von Funk et al., 1992 beschriebene Gleichung benutzt wurde.

$$V_{x0} = \frac{S_{x0} \cdot 100 \%}{\bar{x}}$$

mit S_{x0} = Verfahrensstandardabweichung
 \bar{x} = Arithmetisches Mittel der Konzentrationen aller Kalibrierproben

4.9 Darstellung der Hydroperoxide

4.9.1 Vorsichtsmaßnahmen

Bei den organischen Hydroperoxiden handelt es sich häufig um sehr instabile Verbindungen, die durch mechanische, thermische oder katalytische Einflüsse zur Explosion gebracht werden können. Das Gefährdungspotential ist neben der Art der Substituenten an der Peroxy-Gruppe weitgehend vom Gehalt des aktiven Sauerstoffs in der Verbindung abhängig. Nach Dankowski und Prescher (1988) gelten Peroxide mit einem Gehalt von mehr als 5 % Peroxidsauerstoff als potentiell explosionsgefährlich. Eigene Erfahrungen und Hinweise auf artverwandte Verbindungen zeigen, daß die Explosionsgefahr vieler, in dieser Arbeit eingesetzter Hydroperoxide aufgrund ihres Peroxidsauerstoffgehaltes von 11- 50 % als sehr hoch einzuschätzen ist (Meister et al., 1983; Gäb und Turner, 1985; Wojciechowski et al. 1990). Daher sollten alle Arbeiten mit reinen Hydroperoxiden oder konzentrierten Lösungen der Hydroperoxide nur mit kleinen Mengen, hinter einer Sicherheitsscheibe, bei Kühlung der Substanzen, Verwendung sauberer Geräte und Benutzung von Lederhandschuhen erfolgen, um die von einer möglichen Explosion ausgehenden Gefahren zu mindern.

4.9.2 Alkylhydroperoxide

Die in dieser Arbeit untersuchten n- und verzweigten Alkylhydroperoxide wurden nach der Methode von Williams und Mosher (1954a und b) z. T. durch Herrn Dr. W. V. Turner synthetisiert.

4.9.3 Hydroxymethylhydroperoxid (HMHP)

Zur Synthese von Hydroxymethylhydroperoxid (HMHP) wurden in einem 250 ml Meßkolben 100 ml einer 10 mM H₂O₂-Lösung und 2,5 ml einer 0.1 M NaOH vorgelegt und nach Zugabe von 280 mg Paraformaldehyd mit dest. Wasser aufgefüllt. Durch etwa fünf minütige Behandlung im Ultraschallbad (T = 40 °C) entstand eine klare Lösung. Da sich erst nach etwa 80 min eine konstante HMHP-Konzentration einstellte, wurden frühestens nach dieser Zeit 2.5 ml der alkalischen Lösung in einen 500 ml Meßkolben überführt und dieser nach Zugabe von 0.5 ml 0.5 M H₂SO₄ aufgefüllt. Die Konzentration an HMHP in dieser Lösung betrug etwa 14.6 µM neben 2.8 µM H₂O₂ und 2.6 µM BHMP (O`Sullivan et al., 1996).

4.9.4 Alkoxymethylhydroperoxide

Zur Synthese der Alkoxymethylhydroperoxide wurden Lösungen von 2 g Vinylacetat (0.02 mol) in 35 ml Dichlormethan und 10 ml des entsprechenden Alkohols bei -78°C (Synthese von tert-Butoxymethylhydroperoxid bei -20 °C) bis zur Blaufärbung der Lösung ozonisiert. Durch Einleiten von Stickstoff wurde überschüssiges Ozon ausgetrieben. Nach erwärmen auf etwa 10 °C konnten die leichtflüchtigen Komponenten und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt werden. Der klare, farblose Rückstand wurde durch Kurzwegdestillation bei Raumtemperatur bis max. 40 °C und 0.2 mbar gereinigt (Boddenberg, 1994). Die Charakterisierung der Substanzen erfolgte durch NMR-Spektroskopie und GC/MS-Spektrometrie. Die angegebene Reinheit (%) resultiert aus den ¹H-NMR-Spektren bzw. der gaschromatographischen Untersuchung.

Methoxymethylhydroperoxid (Reinheit: NMR, 91%, GC, 100 %)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 3.47 (s, 3H, CH₃O), 4.94 (s, 2H, OCH₂OO), 9.70 (s, br, 1H, OOH)

¹³C-NMR (100.6 MHz, CDCl₃): δ = 56.15 (CH₃O), 100.38 (OCH₂OO)

Ethoxymethylhydroperoxid (Reinheit: NMR, 90%, GC, 89 %)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 1.20$ (t, $J = 7.1$ Hz, 3H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$), 3.68 (q, $J = 7.1$, 2H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$), 4.95 (s, 2H, OCH_2OO), 9.89 (s, br, 1H, OOH)

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.6 MHz, CDCl_3): $\delta = 14.60$ ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$), 64.60 ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$), 98.94 (OCH_2OO)

n-Propoxymethylhydroperoxid (Reinheit: NMR, 90%, GC, 96 %)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 0.90$ (t, $J = 7.4$ Hz, 3H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 1.61 (septett, $J = 7.1$ Hz 2H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 3.59 (t, $J = 6.9$ Hz, 2H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 4.97 (s, 2H, OCH_2OO), 9.80 (s, br, 1H, OOH)

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.6 MHz, CDCl_3): $\delta = 10.10$ ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 22.54 ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 70.94 ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 99.29 (OCH_2OO)

2-Propoxymethylhydroperoxid (Reinheit: NMR, 91%, GC, 82 %)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 1.22$ (d, $J = 6.2$ Hz, 3H, $(\text{CH}_3)_2\text{CHO}$), 3.95 (septett $J = 6.2$ Hz, 2H, $(\text{CH}_3)_2\text{CHO}$), 5.03 (s, 2H, OCH_2OO), 9.40 (s, br, 1H, OOH)

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.6 MHz, CDCl_3): $\delta = 22.38$ [$(\text{CH}_3)_2\text{CHO}$], 71.09 [$(\text{CH}_3)_2\text{CHO}$], 97.63 (OCH_2OO)

n-Butoxymethylhydroperoxid (Reinheit: NMR, 80%, GC, 89 %)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 0.92$ (t, $J = 7.4$ Hz, 3H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 1.38 (sextett, $J = 7.4$ Hz t, 2H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 1.59 (m, 2H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 3.65 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 4.99 (s, 2H, OCH_2OO), 9.50 (s, br, 1H, OOH)

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.6 MHz, CDCl_3): $\delta = 13.59$ ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 19.01 ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 31.46 ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 69.11 ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 99.40 (OCH_2OO)

tert-Butoxymethylhydroperoxid (Reinheit: NMR, 74%, GC, 70 %)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 1.32$ (s, 9H, $(\text{CH}_3)_3\text{CO}$), 5.15 (s, 2H, OCH_2OO), 9.40 (s, br, 1H, OOH)

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.6 MHz, CDCl_3): $\delta = 28.35$ ($(\text{CH}_3)_3\text{CO}$), 77.31 ($(\text{CH}_3)_3\text{CO}$), 94.00 (OCH_2OO)

4.9.5 1-Ethoxyethylhydroperoxid

Zu einer auf 0 °C gekühlten Lösung aus 10 g 48 %iger Wasserstoffperoxidlösung (0.14 mol) und 0.4 ml konz. Schwefelsäure wurden unter Rühren innerhalb von 2 h 7 g Vinylacetat (0.1 mol) zugetropft. Nach einer weiteren Stunde (Nachrühren) wurden 50 ml einer gesättigten Ammoniumsulfatlösung zugegeben und die Lösung dreimal mit je 70 ml Diethylether extrahiert. Zur Reinigung des organischen Extraktes wurde anschließend dreimal mit jeweils 100 ml gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung geschüttelt, mit Wasser gewaschen und bei -10°C über Magnesiumsulfat getrocknet. Nach der Filtration wurde die Lösung bei 0.3 mbar und 20 °C destilliert. Das Destillat wurde in zwei hintereinandergeschalteten Kühlfallen (0 °C, -178°C) aufgefangen. 1-Ethoxyethylhydroperoxid kondensierte dabei in der auf 0 °C gekühlten Kühlfalle. Die weitere Reinigung erfolgte durch Kurzwegdestillation bei 0.3 mbar. Die Ausbeute des Produktes betrug 23 % (Reinheit 93 %).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 1.27 (t, J = 7.1 Hz, 3H, CH₃CH₂O), 1.38 (d, J = 5.4 Hz, 3H, CH₃CH(OO)O), 3.65 (dq, J = 9.7, 7.1 Hz, 1H, CH₃CH₂O), 3.87 (dq, J = 9.7, 7.1 Hz, 1H, CH₃CH₂O), 5.04 (q, J = 5.5 Hz, 1H, CH₃CH(OO)O), 8.70 (s, br, 1H, OOH)

¹³C-NMR (100.6 MHz, CDCl₃): δ = 15.21 (CH₃CH₂O), 17.86 (CH₃CH(OO)O), 63.91 (CH₃CH₂O), 104.21 (CH₃CH(OO)O)

4.9.6 2-Hydroperoxytetrahydrofuran

a) Das 2-Hydroperoxytetrahydrofuran kann ebenso wie das 1-Ethoxyethylhydroperoxid durch die säurekatalysierte Addition von H₂O₂ an das entsprechende Olefin hergestellt werden. Entsprechend der obigen Synthesebeschreibung wurden 7.0 g (0.1 mol) 2,3-Dihydrofuran mit 10 g 48 %igem Wasserstoffperoxid umgesetzt und aufgearbeitet. Die Ausbeute des öligen Produktes betrug 3 % (Reinheit 50 %).

b) Aufgrund der geringen Ausbeute und unzureichenden Reinheit wurde die Oxidation einer Tetrahydrofuranlösung als weitere Synthesemöglichkeit für 2-Hydroperoxytetrahydrofuran genutzt. Dazu wurden 700 ml destilliertes Tetrahydrofuran (Stabilisatorfrei) in einem 1-l-Dreihalskolben mit Kühler vorgelegt. Über einen Zeitraum von 168 h wurde bei 50 °C ein leichter Sauerstoffstrom eingeleitet. Durch Einengen von 50 ml der Lösung am Rotationsverdampfer und anschließender Kurzwegdestillation konnten 1.95 g (4.3 %) 2-Hydroperoxytetrahydrofuran (Reinheit 96 %) isoliert werden. Durch Verwendung eines Sensibilisators (z. B. Benzophenon) und Belichtung des Ansatzes kann die Ausbeute auf über 30 % gesteigert werden (Schenck et al., 1962). Durch eine neuere Arbeit über IR-, Raman- und NMR-Spektren des Tetrahydrofuranhydroperoxides wurde die korrekte Identifizierung der Substanz bestätigt (Boddenberg, 1994; Shurell und Southby, 1997).

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ = 1.7-2.1 (m, 4H, OCH₂CH₂CH₂CH(OOH)), 3.9 (m, 2H, OCH₂CH₂), 5.57 (dd, J = 5.9 Hz, 1H, CH₂CH(OOH)), 9.55 (s, br, 1H, OOH)
¹³C-NMR (100.6 MHz, CDCl₃): δ = 23.80 (OCH₂CH₂CH₂CH(OOH)), 29.0 (OCH₂CH₂CH₂CH(OOH)), 67.6 (OCH₂CH₂), 107.8 (CH₂CH(OOH))

4.9.7 Tetralinhydroperoxid

In einen 100 ml Dreihalskolben mit Kühler und Gaseinleitungskapillare wurden 25 g Tetralin vorgelegt und im Ölbad auf 75 °C erwärmt. Bei dieser Temperatur wurde unter Rühren 44 h Sauerstoff durch die Flüssigkeit geleitet. Das nicht oxidierte Tetralin wurde bei 50-60 °C und 2*10⁻¹ bis 5*10⁻² mbar abdestilliert. Aus der Hexanlösung des Rückstandes kristallisierte bei -20 °C reines Hydroperoxid (≥ 98 %) als nadelförmige Substanz (Hock und Susemihl, 1933). Die Ausbeute betrug 2.7 g (11 %).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 1.78-2.9 (m, 6H, CH(OOH)CH₂CH₂CH₂-Ar), 5.09 (t, J = 4.2 Hz, 1H, Ar-CH(OOH)CH₂), 7.17-7.31 (m, 4H, Aromat) 7.83 (s, 1H, OOH)

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.6 MHz, CDCl_3): δ = 18.38 ($\text{CH}(\text{OOH})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-Ar}$), 26.73 ($\text{CH}(\text{OOH})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-Ar}$), 29.20 ($\text{CH}(\text{OOH})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-Ar}$), 80.99 ($\text{Ar-CH}(\text{OOH})\text{CH}_2$), 125.85-132.75 (5 C, Aromat), 139.01 ($\text{Ar-CH}(\text{OOH})\text{CH}_2$),

4.9.8 1-Phenylethylhydroperoxid

Zur Darstellung des 1-Phenylethylhydroperoxides wurden 100 ml Ethylbenzol in einem 250-ml-Zweihalskolben mit Rückflußkühler und Gaseinleitungskapillare vorgelegt. Unter Rühren wurde bei Siedetemperatur (136 °C) über 4 Stunden ein leichter Sauerstoffstrom durchgeleitet; 30 ml der oxidierten Lösung wurden am Rotationsverdampfer eingengt und anschließend über Kurzwegdestillation gereinigt (vgl. z. B. Dixon und Schuster, 1981). Erhalten wurden 1.8 g (6.9 %) 1-Phenylethylhydroperoxid mit einer Reinheit von ≥ 91 %.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ = 1.53 (d, J = 6.6 Hz, 3H, $\text{Ar-CH}(\text{OOH})\text{CH}_3$), 5.12 (q, J = 6.6 Hz, 1H, $\text{Ar-CH}(\text{OOH})\text{CH}_3$), 7.36-7.44 (m, 5H, Aromat) 7.87 (s, 1H, OOH)

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.6 MHz, CDCl_3): δ = 20.03 ($\text{Ar-CH}(\text{OOH})\text{CH}_3$), 83.75 ($\text{Ar-CH}(\text{OOH})\text{CH}_3$), 126.5-128.64 (5 C, Aromat), 141.41 ($\text{Ar-CH}(\text{OOH})\text{CH}_3$)

4.10 Synthese von Reagenzien und Stammlösungen zur HPLC-Nachsäulenreaktion

4.10.1 p-Chlorbenzoldiazoniumfluoroborat

Zur Synthese von p-Chlorbenzoldiazoniumfluoroborate wurden 15.9 g (0.12 mol) p-Chloranilin und 55 ml (0.4 mol) 54 %ige Tetrafluoroborsäure im Becherglas vorgelegt. Unter Rühren und Kühlung im Eisbad wurde langsam eine Lösung von 8.5 g Natriumnitrit in 17 ml Wasser zugetropft und anschließend 1 h nachgerührt. Der kristalline Rückstand wurde über eine Glasfritte (G2) abgesaugt und nach Waschen mit wenig Wasser, Ethanol und Diethylether im Vakuum getrocknet (vgl. Starkey, 1943).

Elementaranalyse:

	Soll	Ist
C	31.82	31.61
H	1.77	1.87
N	12.37	12.44

4.10.2 2-Hydroxy-1-naphthaldehyd-thiosemicarbazon

In einem 125 ml Erlenmeyerkolben wurden 0.9 g (0.01 mol) Thiosemicarbazid, 30 ml Wasser und 2 ml Eisessig erwärmt, bis eine klare Lösung entstand. Nach leichtem Abkühlen wurde dieses Reagenz zu einer Lösung von 1.72 g (0.01 mol) 2-Hydroxy-1-naphthaldehyd in 25 ml Ethanol gegeben und unter starkem Rühren 15 min zum Sieden erhitzt. Durch Umkristallisation aus Ethanol/Wasser 60:40 konnte das nahezu weiße 2-Hydroxy-1-naphthaldehyd-thiosemicarbazon isoliert werden (Sah und Daniels, 1950).

Elementaranalyse:

	Soll	Ist
C	58.78	58.11
H	4.49	4.61
N	17.14	17.10

4.10.3 Ansetzen der Chemilumineszenz-Reagenzienlösung

Pufferlösung: 7.62 g $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ wurden in etwa 950 ml Tridest gelöst und durch Zugabe von NaOH und auffüllen auf 1000 ml auf einen pH-Wert von 13 eingestellt.

Stammlösungen:

4 mg/ml 3-Aminophthalhydrazid in 20 mM Boratpuffer pH 13

0.4 mg/ml Hematin in 20 mM Boratpuffer pH 13

Reagenzienlösung:

Zum Herstellen der Reagenzienlösung wurden 8 ml der Luminolstammlösung und 4 ml der Hematinstammlösung auf 1000 ml mit 20 mM Boratpuffer pH 13 aufgefüllt.

5 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden neue HPLC-Methoden zur Bestimmung von Hydroperoxiden entwickelt, deren Selektivität und Nachweisvermögen wesentlich auf dem Einsatz nichtenzymatischer Reaktionssysteme bei der Nachsäulenderivatisierung (NSD) beruhen.

Zahlreiche Vorversuche lieferten Aufschluß über die Eignung von Chemilumineszenzreaktionen sowie Reaktionen, bei denen fluorimetrisch oder photometrisch detektierbare Substanzen entstehen, in HPLC-NSD-Systemen. So ergaben sich keine Vorteile hinsichtlich der Fluoreszenzdetektion, wenn in der bekannten Nachsäulenreaktion von Hydroperoxiden und p-Hydroxyphenylelessigsäure (PES) die katalytisch wirksame Meerrettichperoxidase (HRP) durch Metallsalze oder Metallsalzkomplexe (z. B. Fe(III)-Triethyltetramin) ersetzt wurde. Dagegen wurden bei den Hematin/Luminol-Chemilumineszenz- und Fe(II)/N,N-Dialkyl-p-phenylendiamin-UV/VIS-Messungen aussichtsreiche Ergebnisse erhalten. Um diese Detektionssysteme zur empfindlichen HPLC-Analyse von atmosphärisch relevanten Hydroperoxiden wie H₂O₂, Hydroxymethylhydroperoxid (HMHP), Methylhydroperoxid (MHP) und Ethylhydroperoxid (EHP) einsetzen zu können, waren umfangreiche Optimierungsarbeiten erforderlich. In deren Verlauf zeigte sich, daß das Chemilumineszenzsystem aufgrund großer Unterschiede in der Empfindlichkeit für H₂O₂ einerseits und organischen Hydroperoxiden andererseits nur eingeschränkt zu simultanen Bestimmungen verwendbar ist.

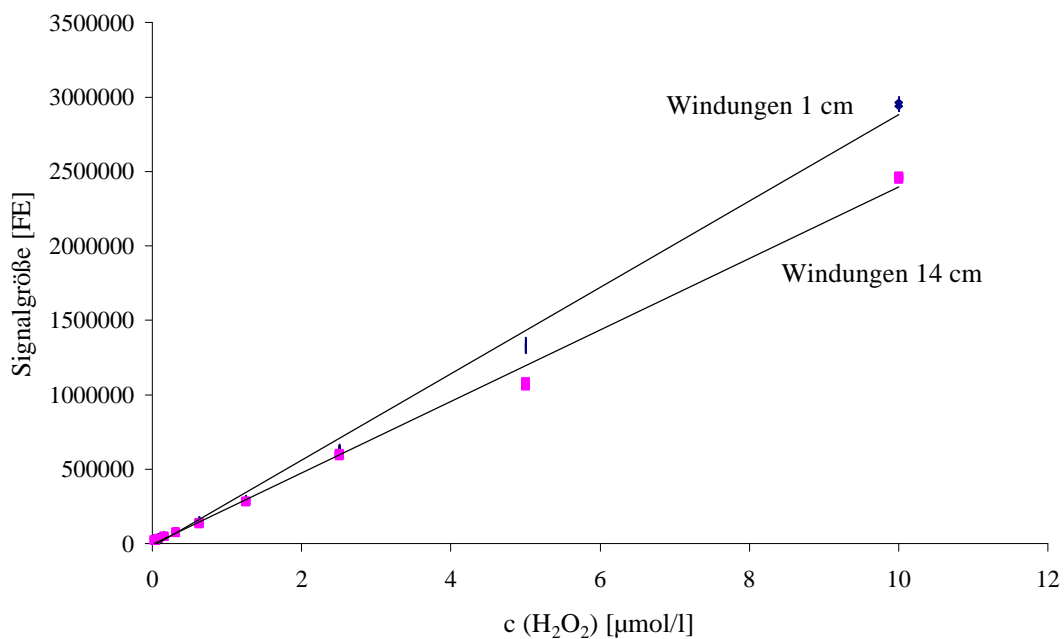
Mit den auf der Fe(II)-katalysierten Oxidation von N,N-Dimethyl (DMPD)- bzw. N,N-Diethyl-p-phenylendiamin (DEPD) basierenden UV/VIS-HPLC-Systemen konnten Nachweisgrenzen von 0.04 µmol/l für H₂O₂ und 0.2 µmol/l für HMHP, MHP und EHP erreicht werden. Diese entsprechen denen der häufig verwendeten HRP/PES-Fluoreszenz-HPLC und sind zur Bestimmung atmosphärischer Hydroperoxide nach Überführung in die flüssige Phase (z. B. Kryosampling) ausreichend. Die Verfahrensvariationskoeffizienten (VVK) von deutlich unter 10 % genügen den Anforderungen an ein spurenanalytisches Verfahren.

Um die Anwendungsbreite der neuen DMPD- und DEPD-UV/VIS-HPLC zu überprüfen, wurden n-Alkyl-, sekundäre und tertiäre Alkyl-, Arylalkyl- und Alkoxyalkyl-

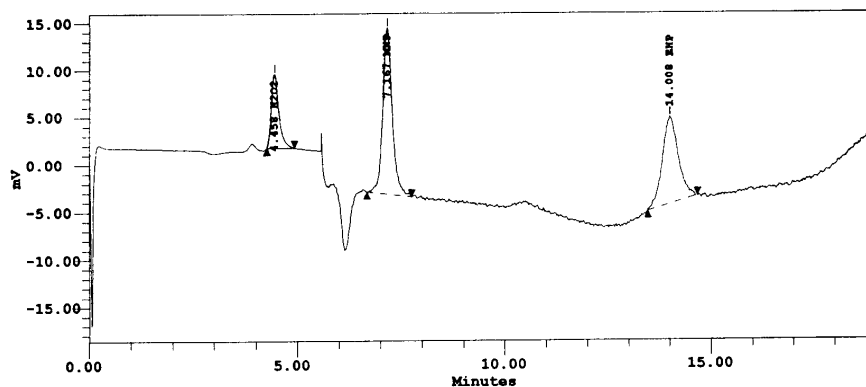
hydroperoxide untersucht. Beim Vergleich der Verfahrenskenngrößen mit denen der FOX (ferrous oxidation in xylene orange)-UV/VIS-HPLC, der HRP/PES- und der Mikroperoxidase-11 (MP-11)/PES-Fluoreszenz-HPLC konnte die hohe Leistungsfähigkeit der neuen Systeme herausgestellt werden. Zwar ergeben sich für die n-Alkylhydroperoxide mittels HRP/PES-HPLC annähernd gleiche Nachweisgrenzen von 0.2 bis 0.7 $\mu\text{mol/l}$ ($\text{C}_4\text{-C}_{14}$), doch müssen für sekundäre und tertiäre Hydroperoxide aufgrund sterischer Beschränkungen des Enzyms deutliche Nachteile in Kauf genommen werden. Während 2-Propyl-, 2-Butyl- und 3-Pentylhydroperoxid noch im $\mu\text{molaren}$ Konzentrationsbereich bestimmt werden können, sind tert-Butyl-, cyclo-Hexenyl-, Tetralin- und Cumolhydroperoxid nicht nachweisbar. Obwohl der Ersatz von HRP durch MP-11 die sterischen Beschränkungen aufhebt, liegen die mit diesem Fluoreszenzsystem erreichten Nachweisgrenzen ein bis zwei Größenordnungen über denen der DMPD- und DEPD-UV/VIS-HPLC. Entsprechende Ergebnisse wurden für die untersuchten Alkoxyalkylhydroperoxide erhalten. Gegenüber der Fluoreszenz-HPLC ergibt sich zudem der Vorteil, daß nicht nur Hydroperoxide, sondern auch Peroxide bestimmt werden können. So wurde bei der Untersuchung von Benzoylperoxid eine Nachweisgrenze von 0.25 $\mu\text{mol/l}$ erhalten.

Zur Erprobung der DMPD-UV/VIS-HPLC wurden Vergleichsmessungen mit anderen Analysensystemen durchgeführt. Bei einer als Vorbereitung auf die Feldmeßkampagne BERLIOZ (Berlin-Ozon-Experiment) dienenden Interkalibrierung ließ sich sowohl an einer Prüfgasquelle als auch bei Messungen von Außenluft ein beachtliches Maß an Übereinstimmung erzielen. Darüber hinaus konnte die Eignung der neuen HPLC-Methode zu Feldmessungen bei der Polarsternexpedition ANT XIV/1 unter Beweis gestellt werden. Da das zur Hydroperoxidanalyse häufig eingesetzte Kryosampling Meßwerte mit nur ungenügender Zeitauflösung liefert, wurden Arbeiten zum Bau eines automatischen Peroxidanalysators auf der Grundlage der on-line Kopplung einer Sammelwendel mit der HPLC begonnen. Untersuchungen des Peroxidgehaltes in Lösungsmitteln (u. a. Diethylether, Tetrahydrofuran) sowie in einer Hautsalbe zeigen weitere Anwendungsbereiche der neuen UV/VIS-Methoden auf.

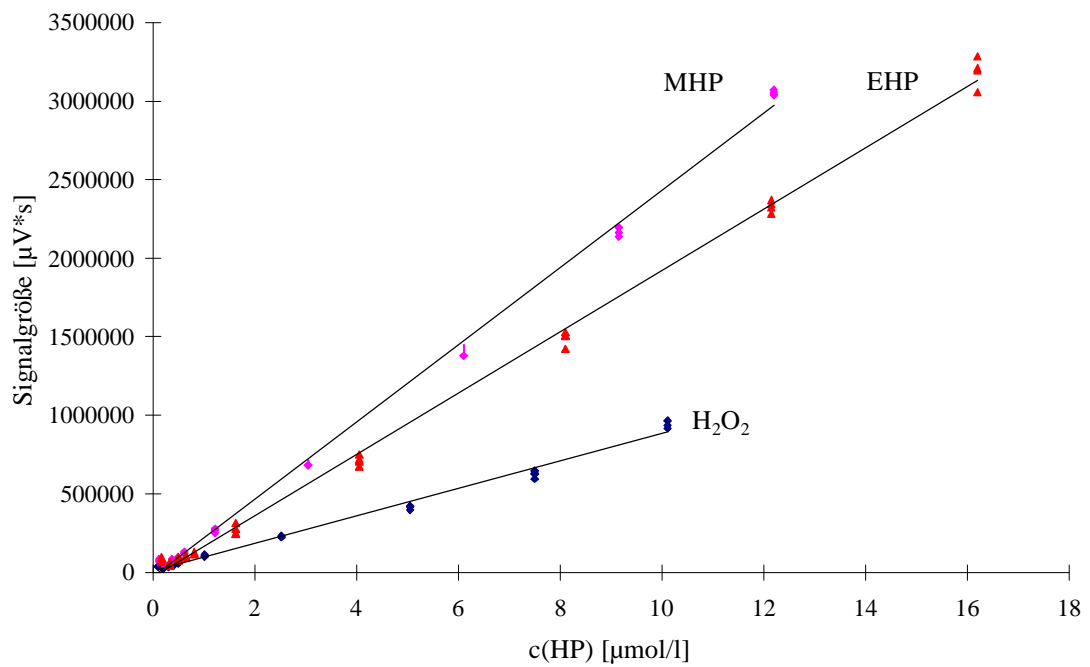
6 Anhang



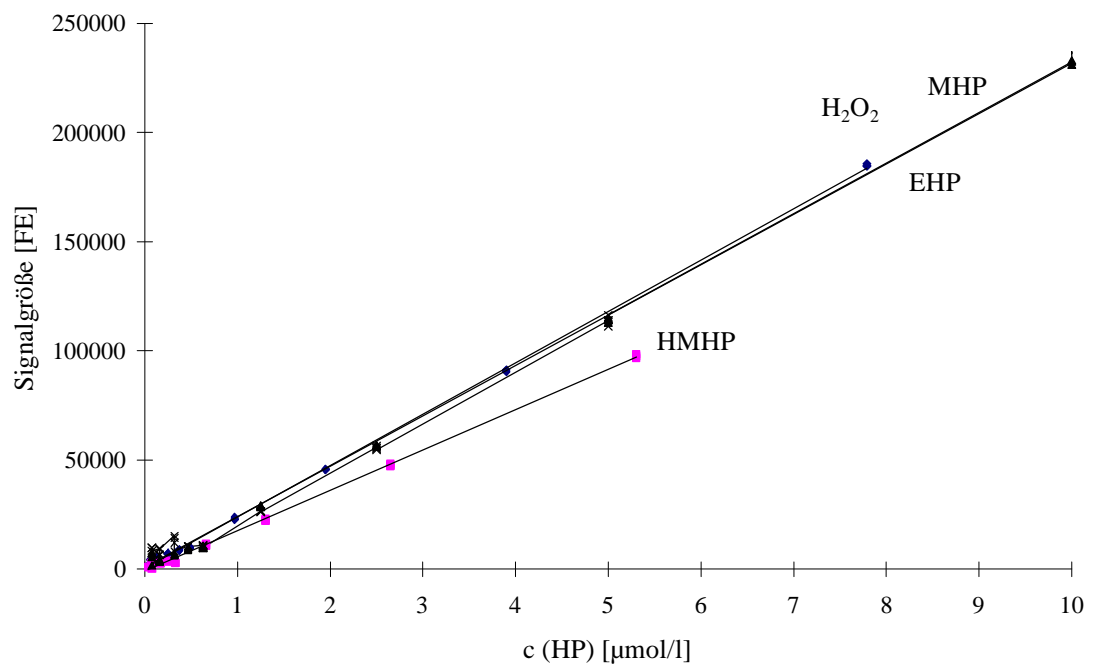
Anhang 1: Kalibrierfunktionen für H_2O_2 bei verschiedenen unterschiedlichen Wicklungsdurchmessern der Reaktionskapillaren (Fluoreszenz-HPLC-System II)



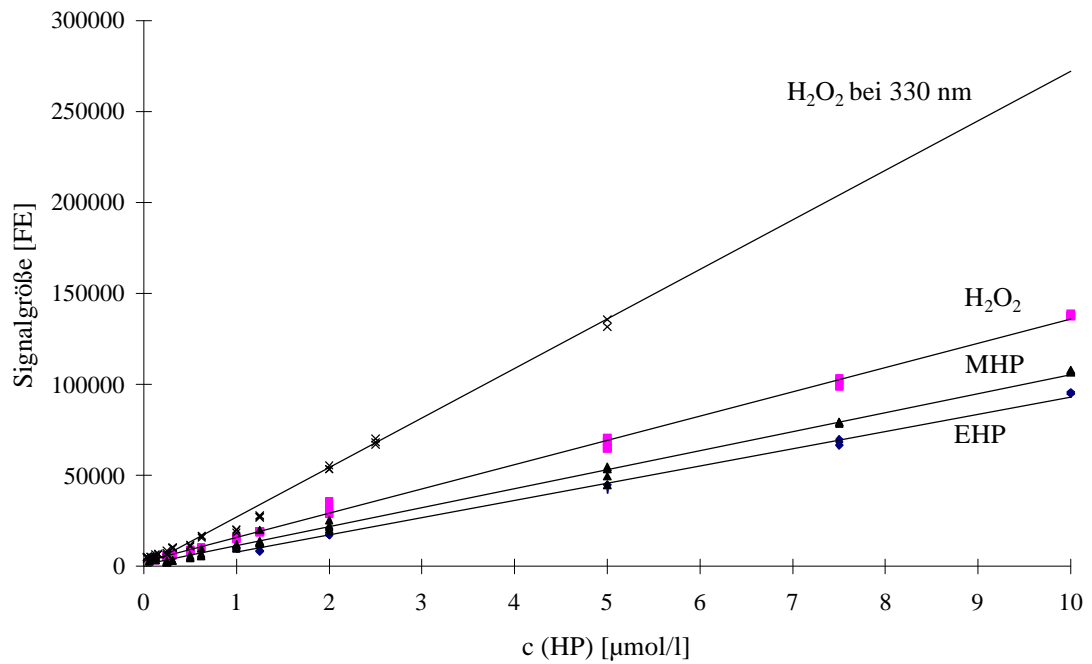
Anhang 2: Messung von atmosphärischen Hydroperoxiden mit dem Chemilumineszenz-HPLC-System



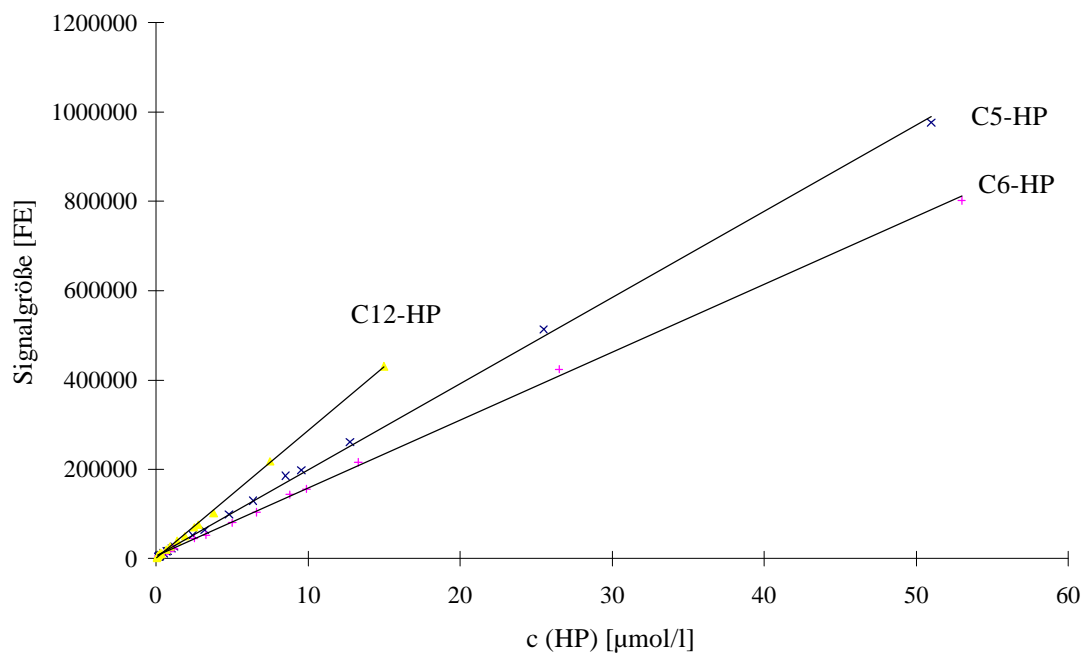
Anhang 3: Kalibriergeraden atmosphärischer Hydroperoxide (Chemilumineszenz-HPLC-System)



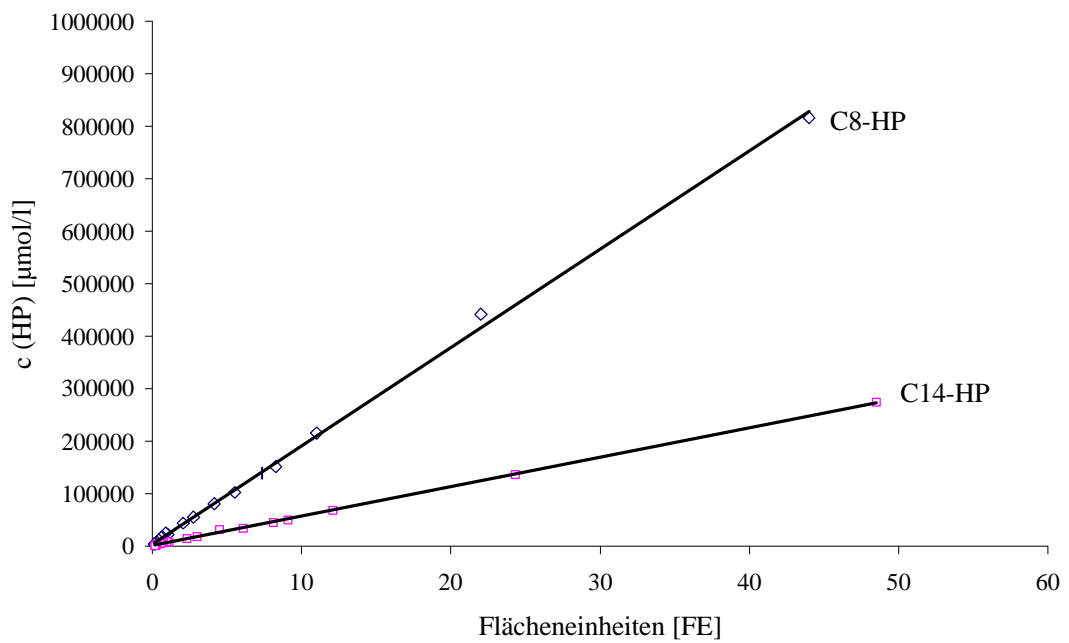
Anhang 4: Kalibriergeraden atmosphärischer Hydroperoxide (DMPD-UV/VIS-HPLC-System II)



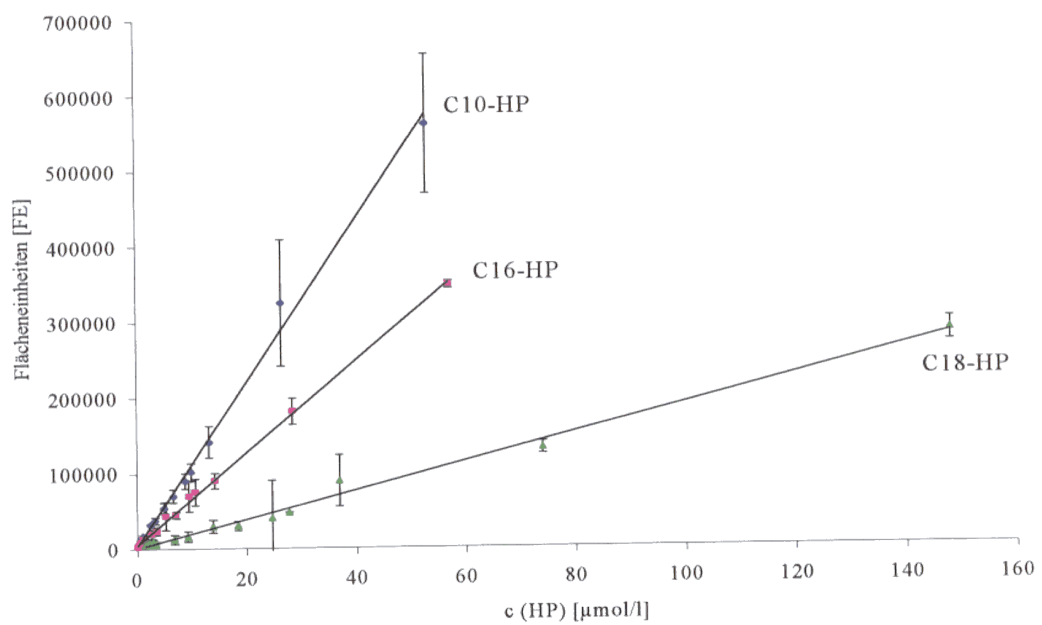
Anhang 5: Kalibriergeraden atmosphärischer Hydroperoxide (DEPD-UV/VIS-HPLC-System II)



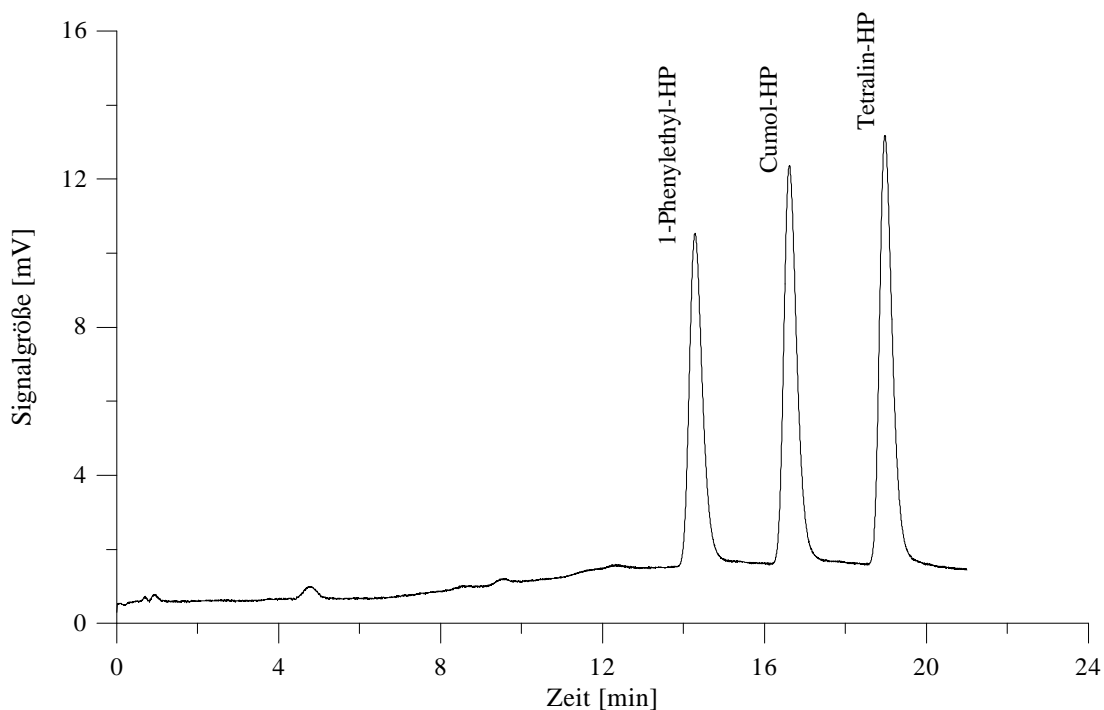
Anhang 6: Kalibriergeraden der n-Alkylhydroperoxide (C_5 , C_6 und C_{12})



Anhang 7: Kalibriergeraden der n-Alkylhydroperoxide (C₈ und C₁₄)



Anhang 8: Kalibriergeraden der n-Alkylhydroperoxide (C₁₀, C₁₆ und C₁₈)



Anhang 9: Trennung einiger sekundärer und tertiärer Arylalkylhydroperoxide mittels Gradientenelution (DMPD-UV/VIS-HPLC-System II, Gradientenelution: MeOH/verd. H_3PO_4 0-15 min von 50 auf 80 % MeOH, anschließend isokratisch 80 % MeOH)

Hydroperoxid	Retentionszeit [min]
2-Propyl-HP	7.3
tert-Butyl-HP	9.4
cyclo-Hexenyl-HP	12.2
3-Pentyl-HP	14.2
1-Phenylethyl-HP	14.3
Cumol-HP	16.4
Tetralin-HP	18.8

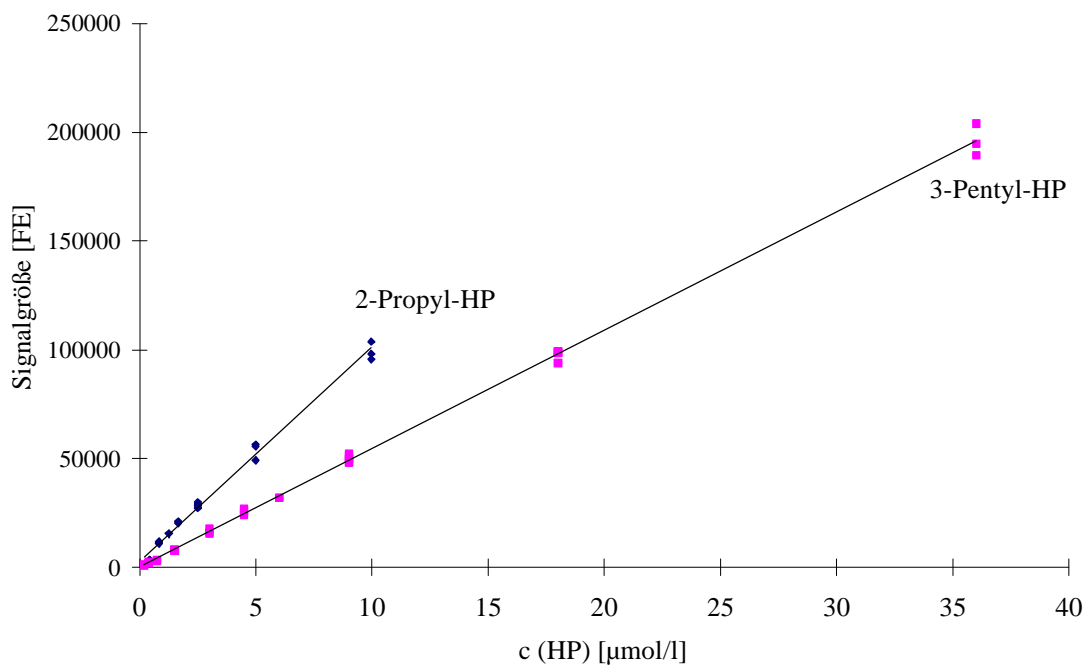
Anhang 10: Retentionszeiten der verzweigten Alkyl- und Arylalkylhydroperoxide (DMPD-UV/VIS-HPLC-System II, Gradientenelution: MeOH/verd. H_3PO_4 0-15 min von 50 auf 80 % MeOH, anschließend isokratisch 80 % MeOH)

Hydroperoxid	Steigung	Achsen- abschnitt	Korrelations- koeffizient	VSA [$\mu\text{mol/l}$]	VVK [%]	NWG [$\mu\text{mol/l}$]	EG [$\mu\text{mol/l}$]	BG [$\mu\text{mol/l}$]
2-Propyl-HP	9853	2662	0.996	0.28	9.2	0.28	0.56	0.77
tert-Butyl-HP	10273	187	0.998	0.18	6.6	0.10	0.20	0.28
cyclo- Hexenyl-HP	895	2953	0.997	3.04	9.2	3.5	7.0	9.6
3-Pentyl-HP	5446	84	0.999	0.43	5.1	0.18	0.36	0.50
2-Phenyl- ethyl-HP	20658	647	0.995	0.36	10.3	0.19	0.38	0.52
Cumol-HP	16348	280	0.999	0.15	6.6	0.10	0.20	0.28
Tetralin-HP	27983	930	1.000	0.09	3.9	0.04	0.08	0.22

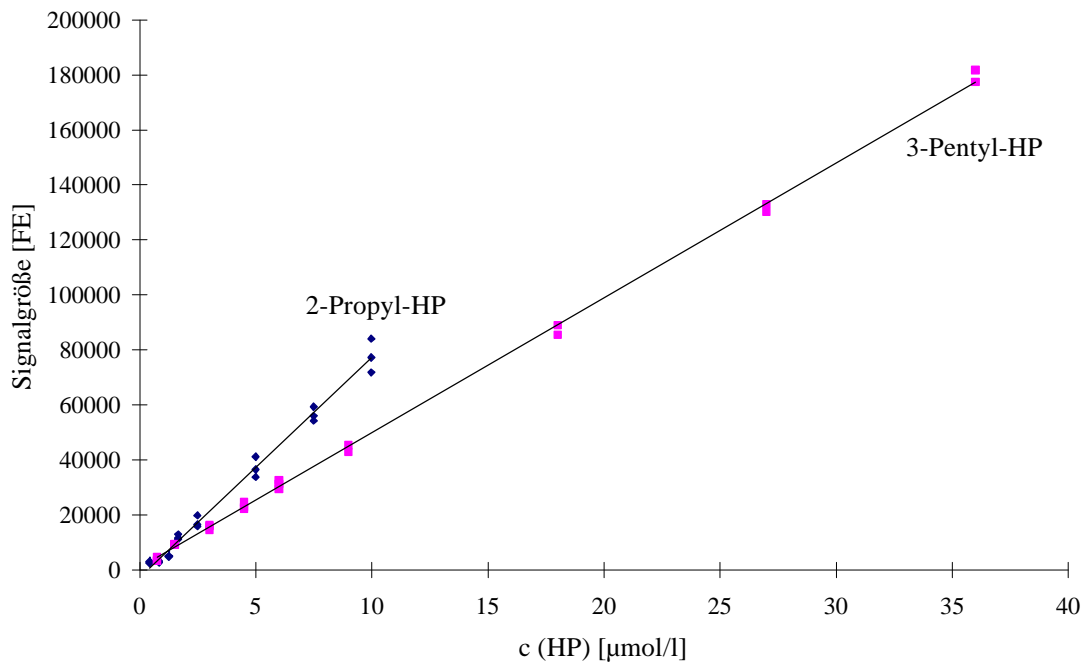
Anhang 11: Verfahrenskenngrößen der Analyse verzweigter Alkyl- und Arylalkylhydroperoxide (DMPD-UV/VIS-HPLC-System II, Gradientenelution: MeOH/verd. H_3PO_4 0-15 min von 50 auf 80 % MeOH, anschließend isokratisch 80 % MeOH)

Hydroperoxid	Steigung	Achsen- abschnitt	Korrelations- koeffizient	VSA [$\mu\text{mol/l}$]	VVK [%]	NWG [$\mu\text{mol/l}$]	EG [$\mu\text{mol/l}$]	BG [$\mu\text{mol/l}$]
2-Propyl-HP	7987	-2650	0.995	0.35	9.5	0.42	0.84	1.16
tert-Butyl-HP	8727	155	0.995	0.34	9.3	0.33	0.66	0.91
cyclo- Hexenyl-HP	837	309	0.999	2.03	3.7	3.7	7.4	10.0
3-Pentyl-HP	4908	818	1.000	0.36	3.6	0.42	0.84	1.16
2-Phenyl- ethyl-HP	19032	-1063	0.999	0.12	4.6	0.09	0.18	0.25
Cumol-HP	15847	242	0.996	0.30	9.3	0.17	0.34	0.47
Tetralin-HP	24998	406	0.999	0.12	3.6	0.07	0.14	0.19

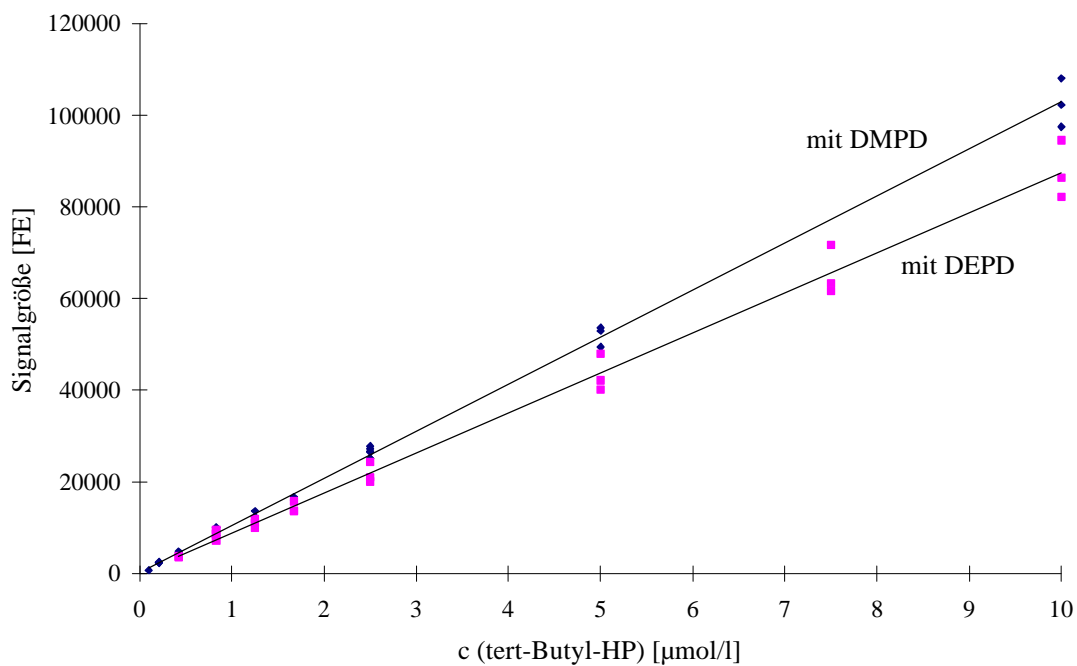
Anhang 12: Verfahrenskenngrößen der Analyse verzweigter Alkyl- und Arylalkylhydroperoxide (DEPD-UV/VIS-HPLC-System II, Gradientenelution: MeOH/verd. H_3PO_4 0-15 min von 50 auf 80 % MeOH, anschließend isokratisch 80 % MeOH)



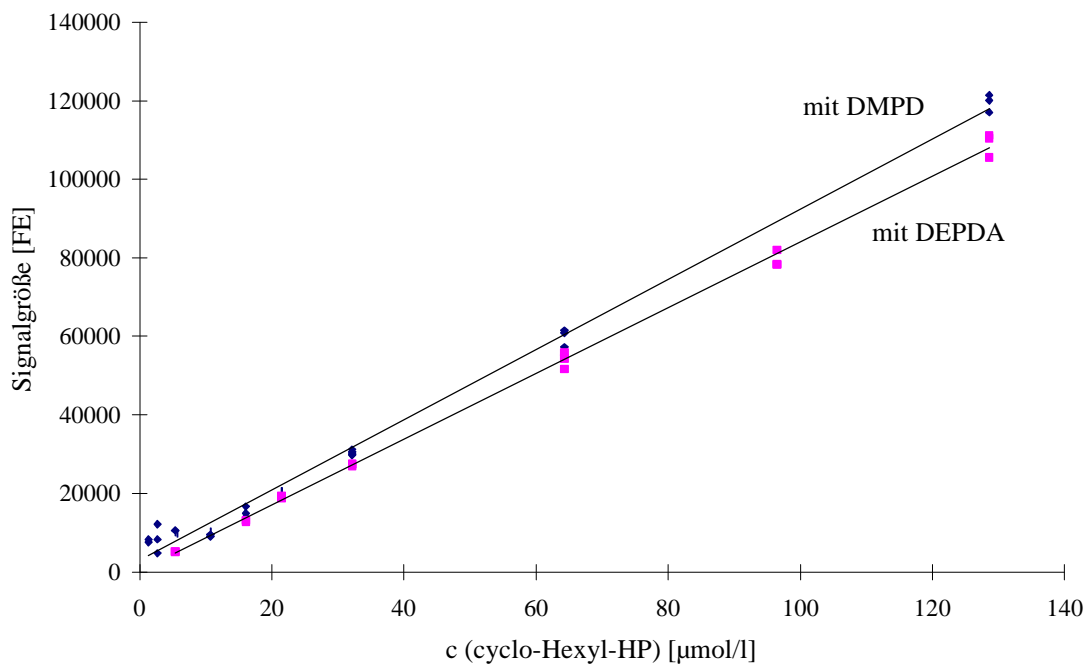
Anhang 13: Kalibriergeraden des 2-Propyl- und 3-Pentylhydroperoxids (DMPD-UV/VIS-HPLC-System II)



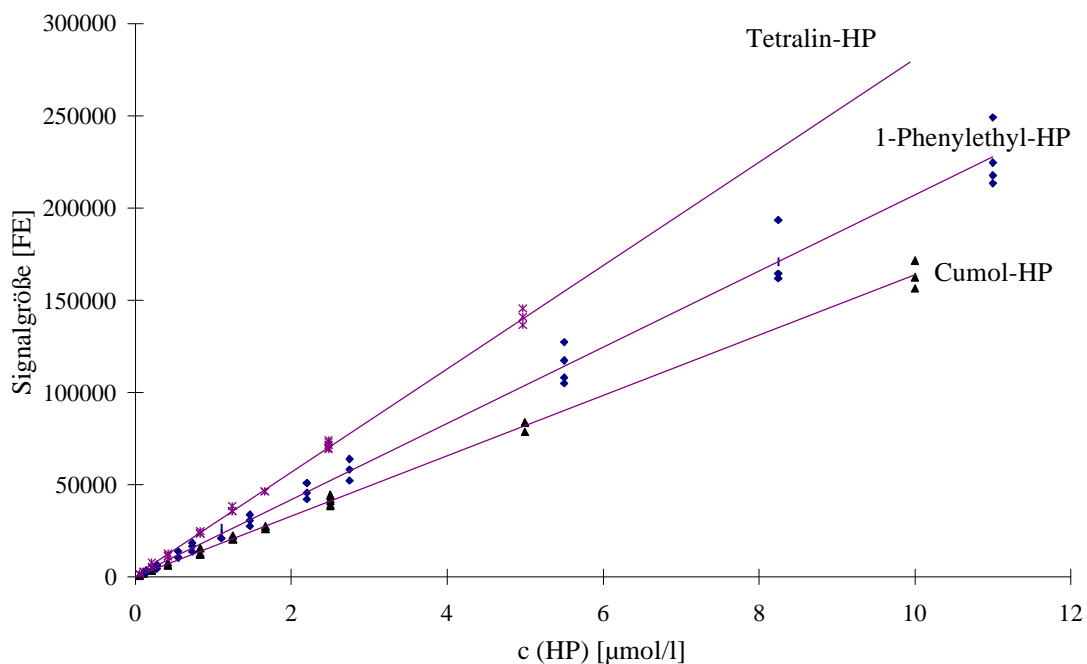
Anhang 14: Kalibriergeraden des 2-Propyl- und 3-Pentylhydroperoxids (DEPD-UV/VIS-HPLC-System II)



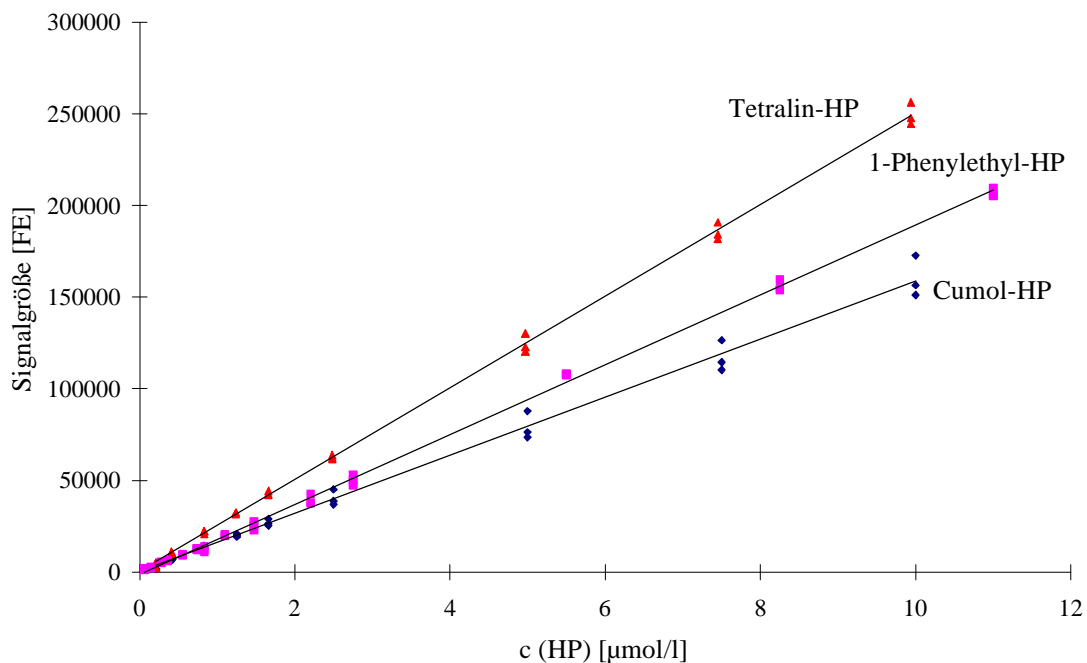
Anhang 15: Kalibriergeraden des tert-Butylhydroperoxids (DMPD-UV/VIS-HPLC-System II, DEPDA-UV/VIS-HPLC-System II)



Anhang 16: Kalibriergeraden des cyclo-Hexenylhydroperoxids (DMPD-UV/VIS-HPLC-System II, DEPDA-UV/VIS-HPLC-System II)



Anhang 17: Kalibriergeraden des Tetralin-, 1-Phenylethyl- und Cumolhydroperoxids (DMPD-UV/VIS-HPLC-System II)

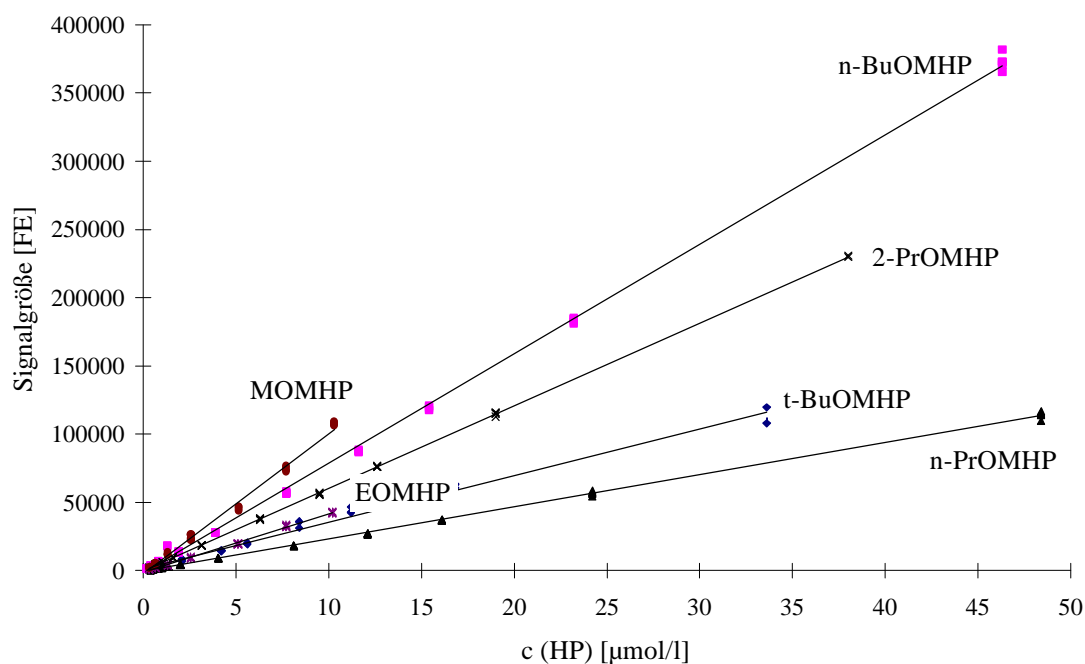


Anhang 18: Kalibriergeraden des Tetralin-, 1-Phenylethyl- und Cumolhydroperoxids (DEPD-UV/VIS-HPLC-System II)

Hydroperoxid	Retentionszeit [min]						Gradient ^a
	bei Elution mit MeOH/verd. H ₃ PO ₄ isokratisch (v:v)						
	100:0	80:20	60:40	40:60	30:70	20:80	
MOMHP	4.9	5.0	5.2	5.6	5.8	5.9	5.8
EOMHP	5.0	5.2	5.6	6.7	7.5	8.1	7.5
iso-PrOMHP	5.0	5.4	6.2	8.8	11.2	15.8	11.1
n-PrOMHP	5.1	5.6	6.6	10.4	13.8	20.3	13.7
tert-BuOMHP	5.1	5.7	6.9	10.8	16.9	22.6	16.8
n-BuOMHP	5.2	6.2	8.6	21.0	33.8	-	23.7

^a Gradient: MeOH/verd. H₃PO₄ 0-10 min isokratisch 30 % MeOH, 10-18 min von 30 auf 60 % MeOH, anschließend isokratisch 60 % MeOH

Anhang 19: Retentionszeiten einiger Alkoxyethylhydroperoxide bei isokratischer Elution und Gradienten-Elution mit MeOH/verd. H₃PO₄



Anhang 20: Kalibriergeraden der Alkoxyethylhydroperoxide (Messung der Einzelsubstanzen mit dem DMPD-UV/VIS-HPLC-System II)

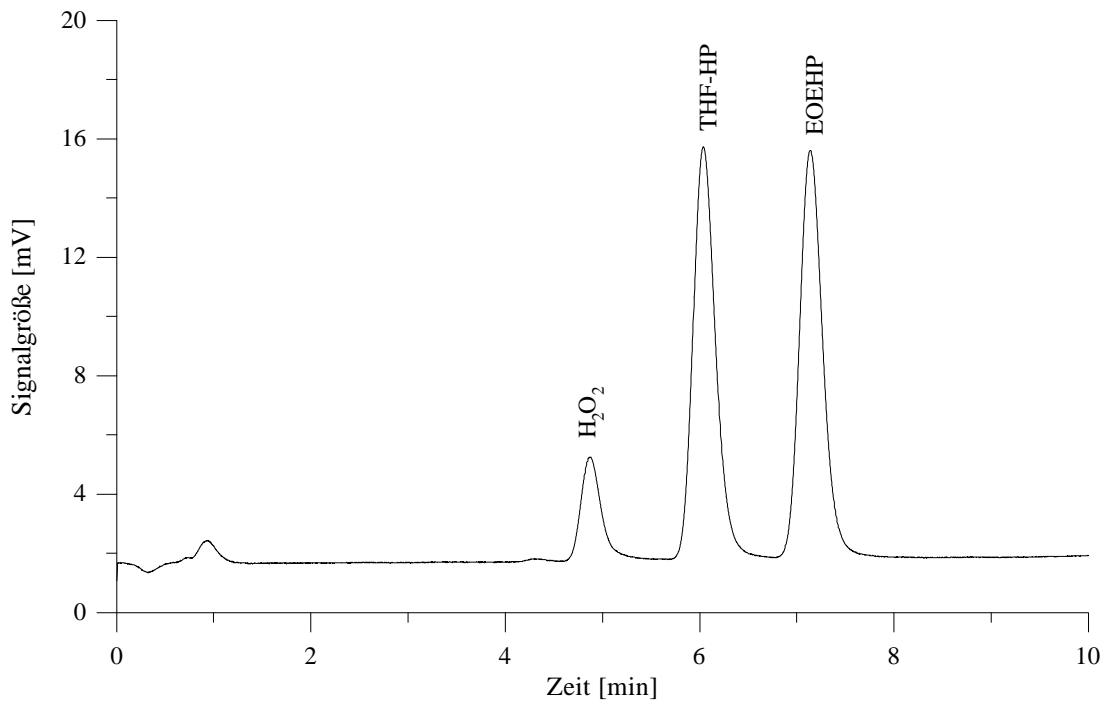
Substanz	Elution (MeOH/ verd. H ₃ PO ₄) [%]	Retentions- zeit [min]	Steigung	Achsen- abschnitt	Korrelations- koeffizient	VSA [μmol/l]	VVK [%]	NWG [μmol/l]
MOMHP	0:100	11.7	10288	-2369	0.997	0.30	7.53	0.11
EOMHP	40:60	6.8	4266	-1093	0.999	0.19	4.70	0.07
i-PrOMHP	40:60	8.9	6058	-407	1.000	0.17	2.26	0.10
n-PrOMHP	40:60	10.5	2364	-540	1.000	0.40	4.07	0.11
tert-BuOMHP	30:70	16.9	3409	1520	0.995	1.00	12.31	0.53
n-BuOMHP	80:20	6.1	8015	-1360	0.999	0.46	4.37	0.27

Anhang 21: Verfahrenskenngrößen verschiedener Alkoxyethylhydroperoxide (DMPD-UV/VIS-HPLC-System II, isokratische Elution (v:v) wie angegeben)

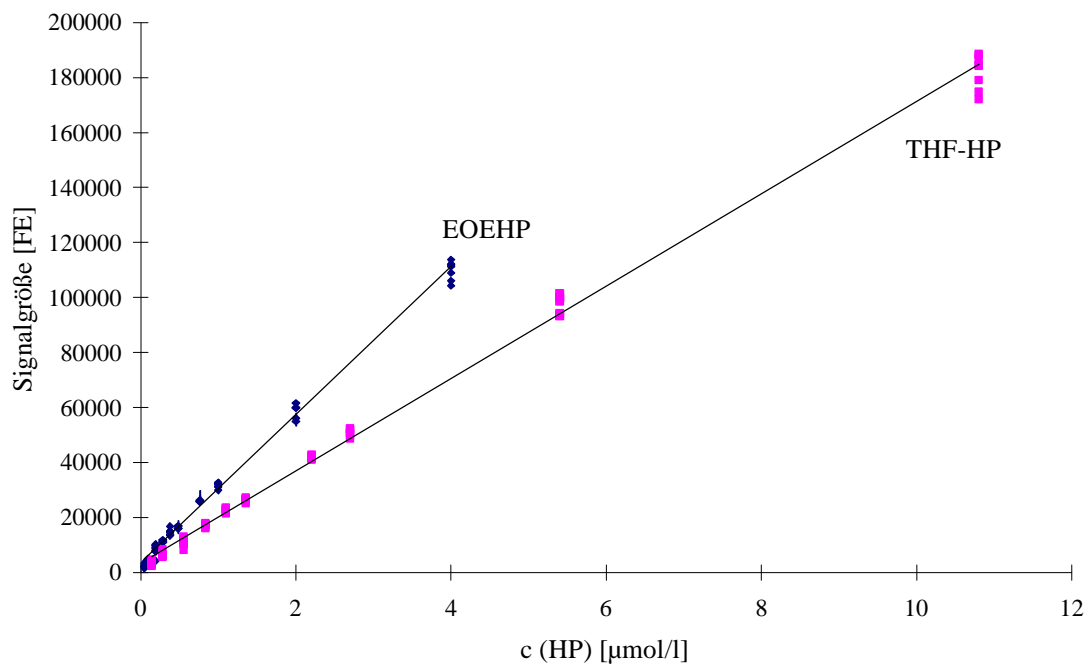
Substanz	Steigung	Achsen- abschnitt	Korrelations- koeffizient	VSA [μmol/l]	VVK [%]	NWG [μmol/l]	EG [μmol/l]	BG [μmol/l]
MOMHP	4254	-558	0.995	0.61	11.7	0.95	1.90	2.6
EOMHP	2239	-697	0.987	0.44	12.8	0.74	1.58	2.0
i-PrOMHP	2535	836	0.971	0.8	19.6	1.4	2.8	3.9
n-PrOMHP	1632	-8755	0.799	2.2	64.4	3.8 (0.5)	7.7	10.5
tert-BuOMHP	-	-	0.585	-	-	9.8 (2)	-	-
n-BuOMHP	-	-	0.388	-	-	16 (2)	-	-

Werte in Klammern entsprechen NWG nach dem 3S-Konzept (Kaiser und Specker, 1955)

Anhang 22: Verfahrenskenngrößen verschiedener Alkoxyethylhydroperoxide durch die Messung eines gemischten Standards (DMPD-UV/VIS-HPLC-System II, Gradientenelution: MeOH/verd. H₃PO₄ (v:v) 0-10 min isokratisch 30 % MeOH, 10-18 min von 30 auf 60 % MeOH, anschließend isokratisch 60 % MeOH)



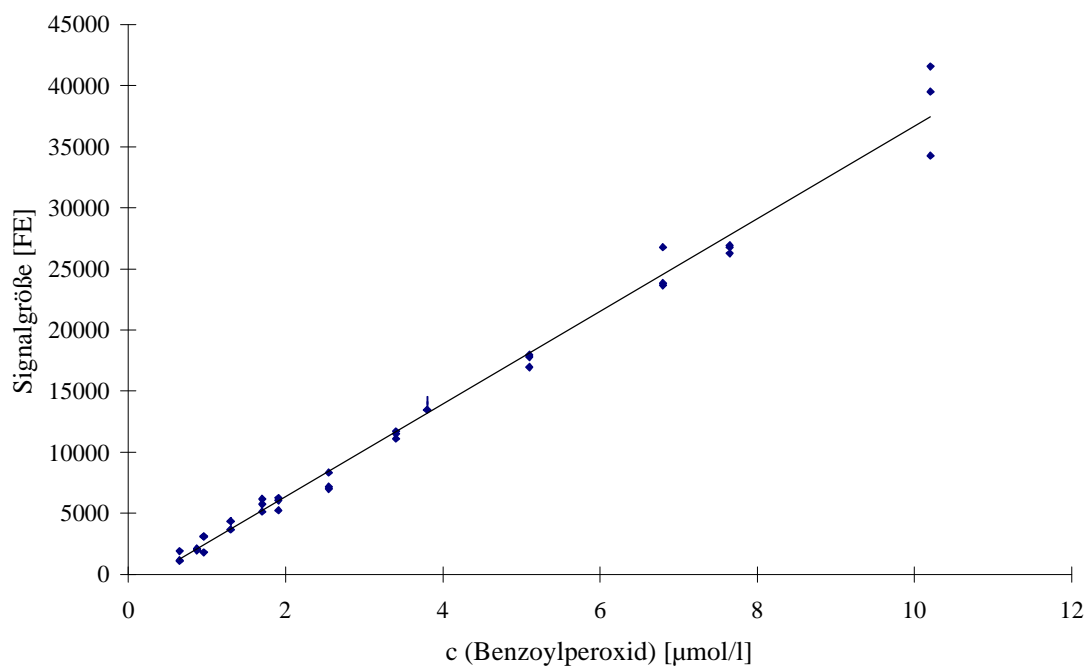
Anhang 23: Trennung von THF und EOHP mittels Gradientenelution (MeOH/verd. H_3PO_4 0-15 min von 50 auf 80 % MeOH)



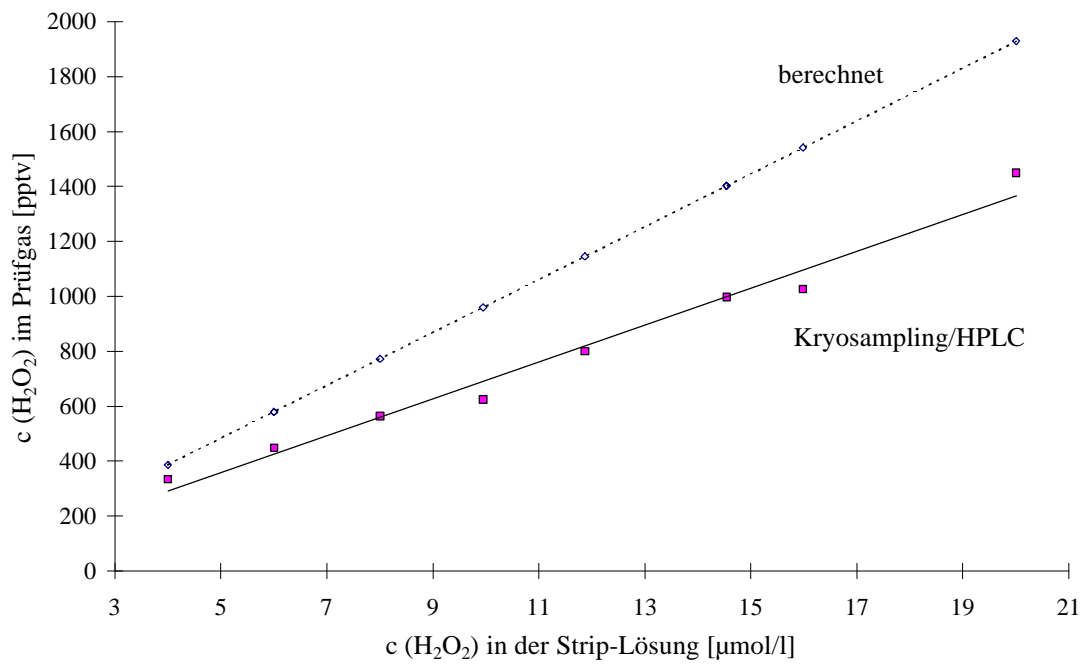
Anhang 24: Kalibriergeraden von EOHP und THF-HP (DMPD-UV/VIS-HPLC-System II)

Substanz	Steigung	Achsen- abschnitt	Korrelations- koeffizient	VSA [$\mu\text{mol/l}$]	VVK [%]	NWG [$\mu\text{mol/l}$]	EG [$\mu\text{mol/l}$]	BG [$\mu\text{mol/l}$]
EOEHP	26916	3473	0.998	0.08	8.16	0.03	0.06	0.08
THF-HP	16798	3463	0.998	0.18	7.04	0.04	0.08	0.11

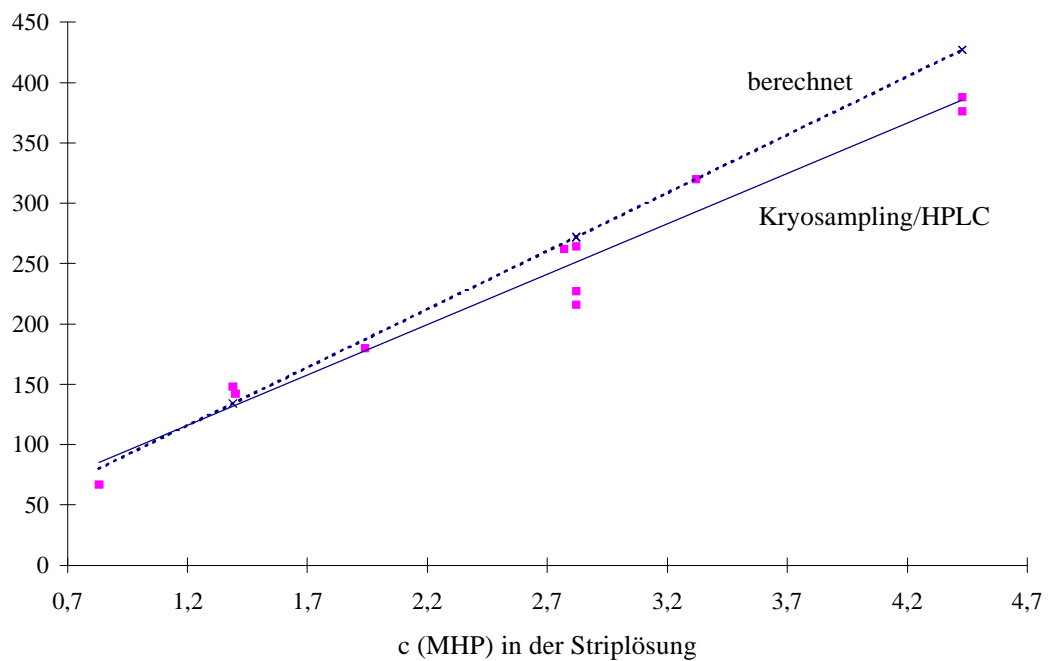
Anhang 25: Verfahrenskenngrößen verschiedener Alkoxyalkylhydroperoxide (DMPD-UV/VIS-HPLC-System II, isokratische Elution: MeOH/verd. H_3PO_4 45:55 (v:v))



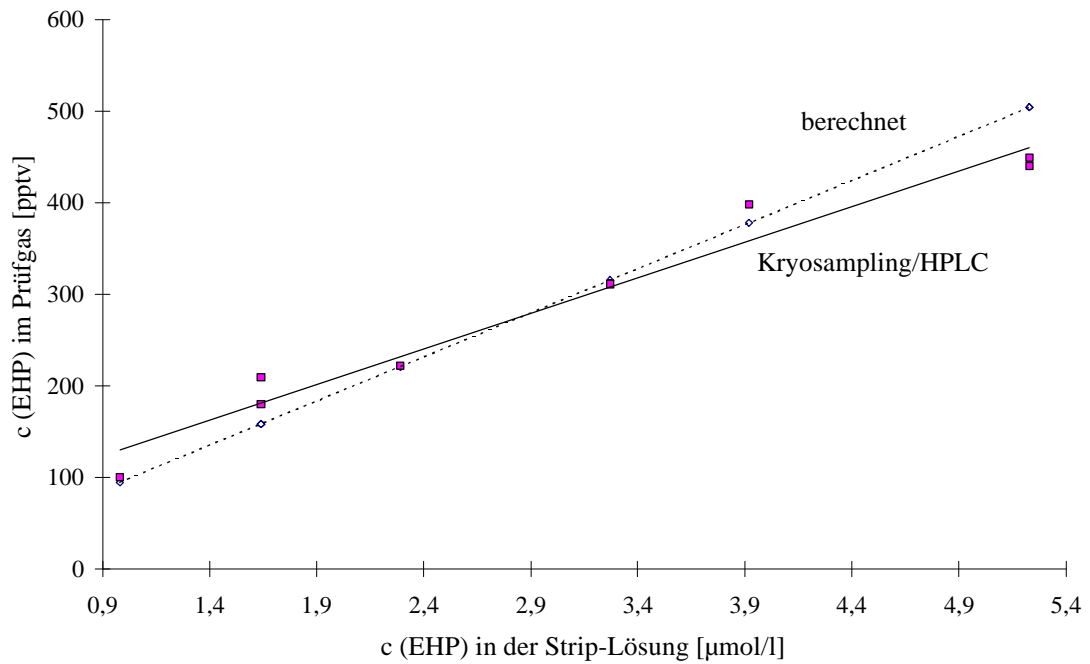
Anhang 26: Kalibriergerade für die Bestimmung von Benzoylperoxid (DMPD-UV/VIS- HPLC-System II)



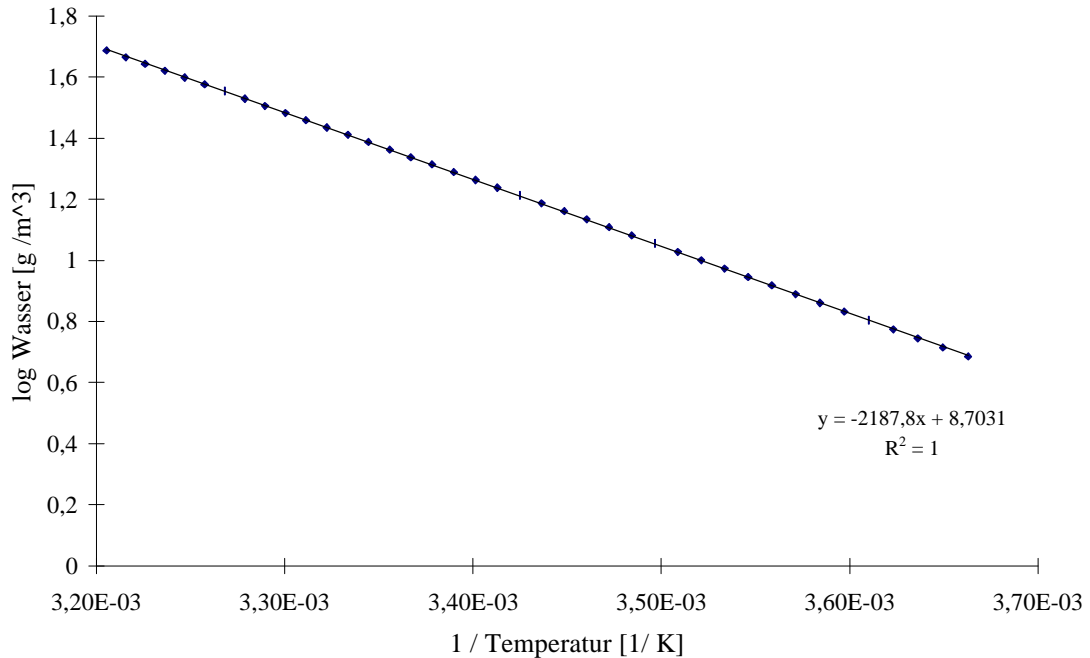
Anhang 27: H₂O₂-Kalibrierfunktion der Prüfgasapparatur



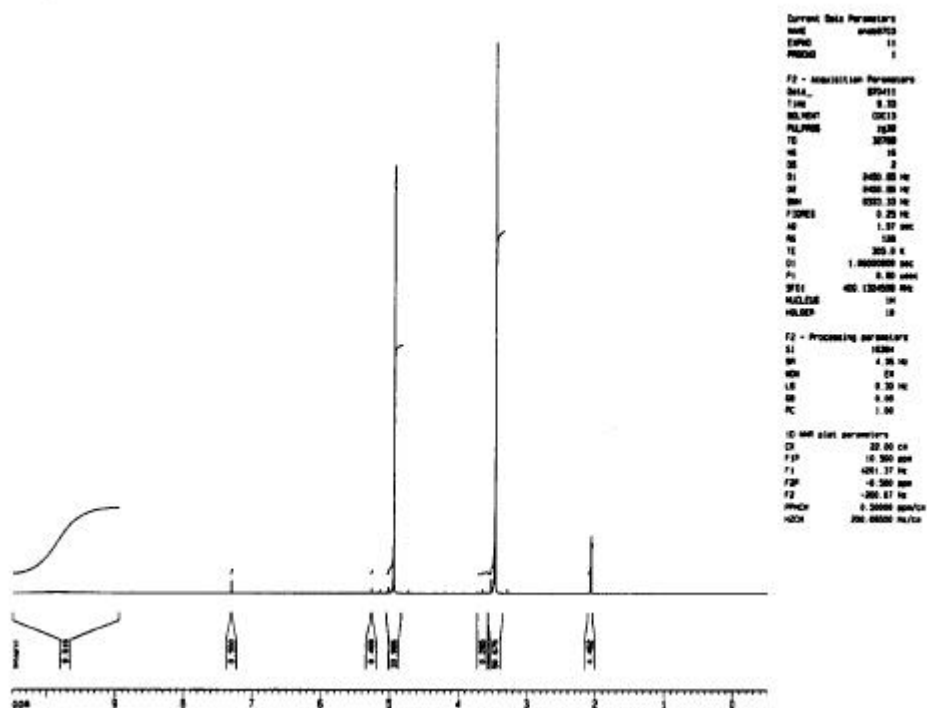
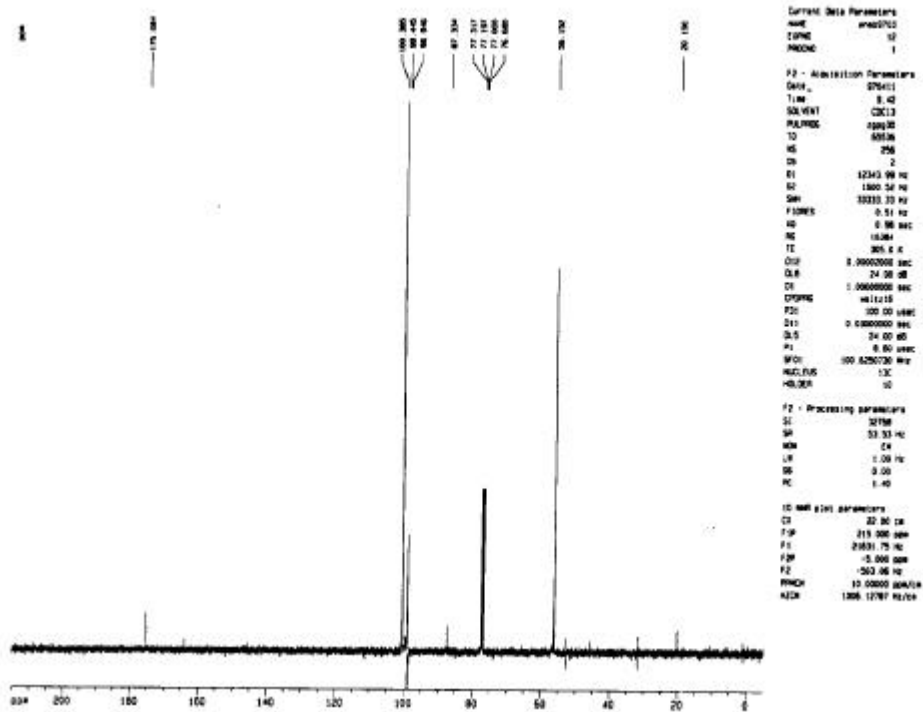
Anhang 28: MHP-Kalibrierfunktion der Prüfgasapparatur

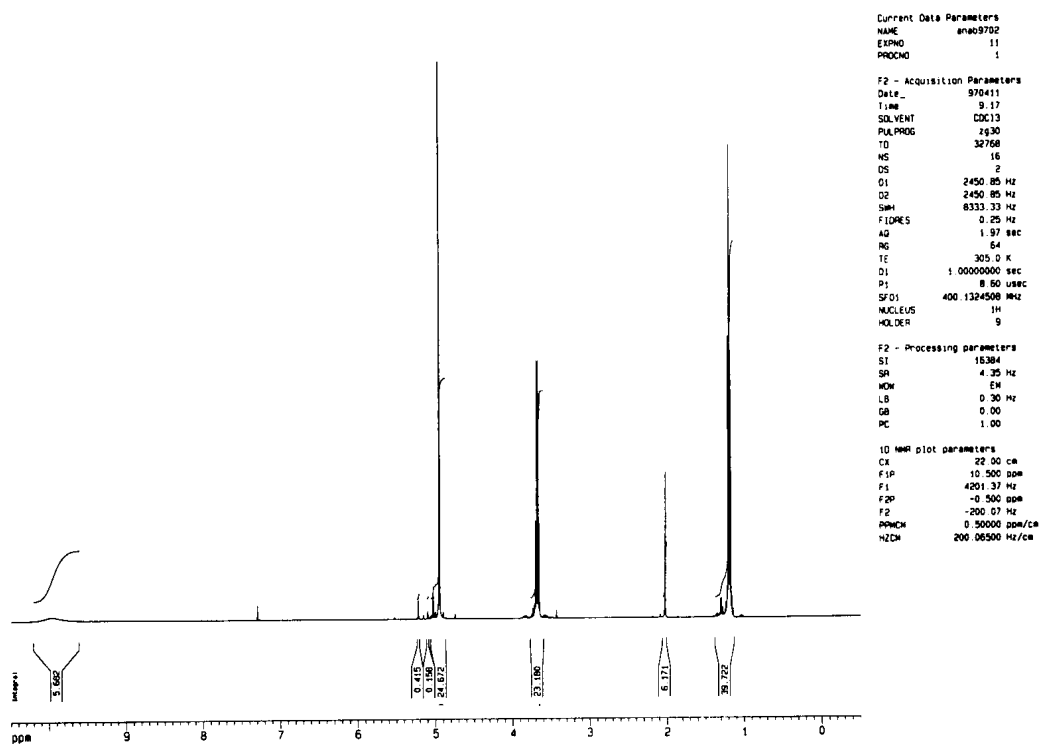
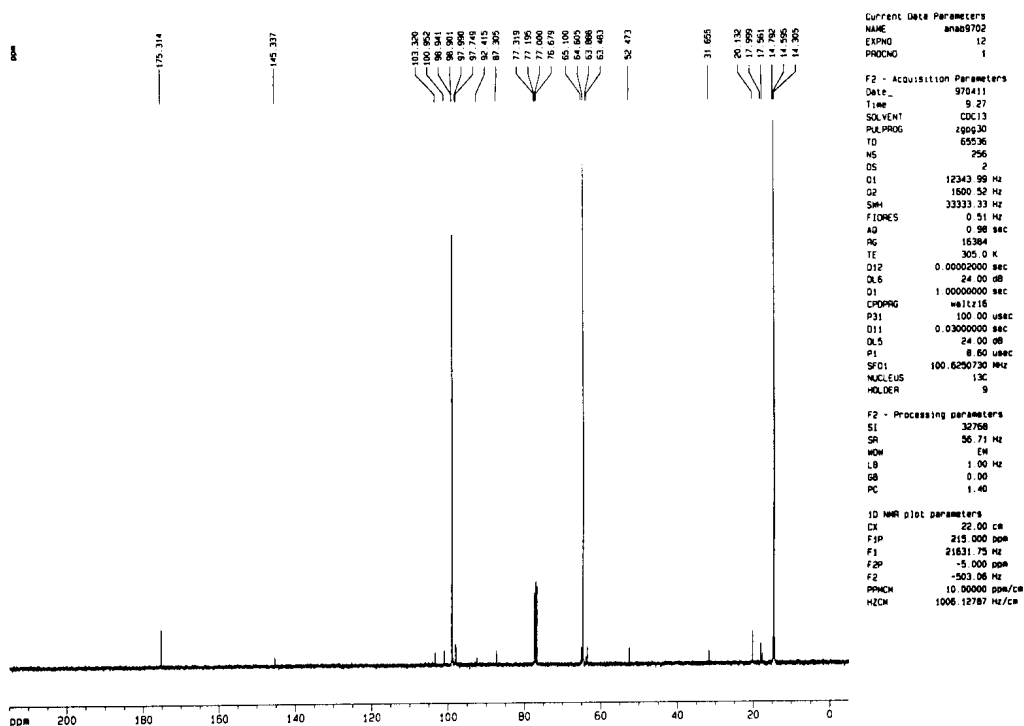


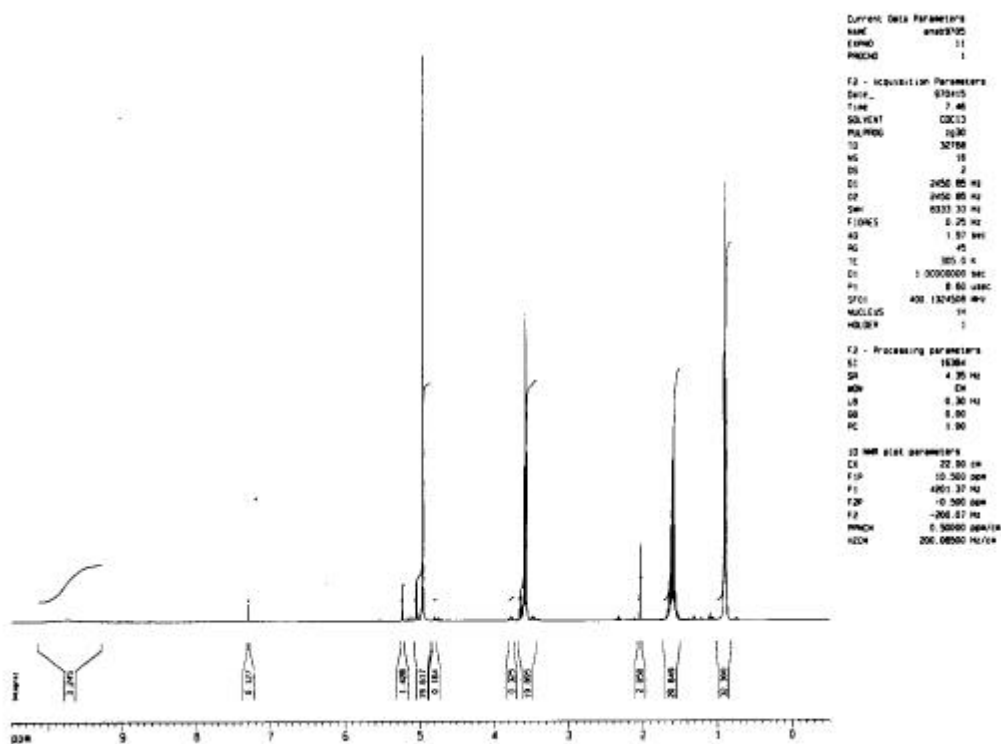
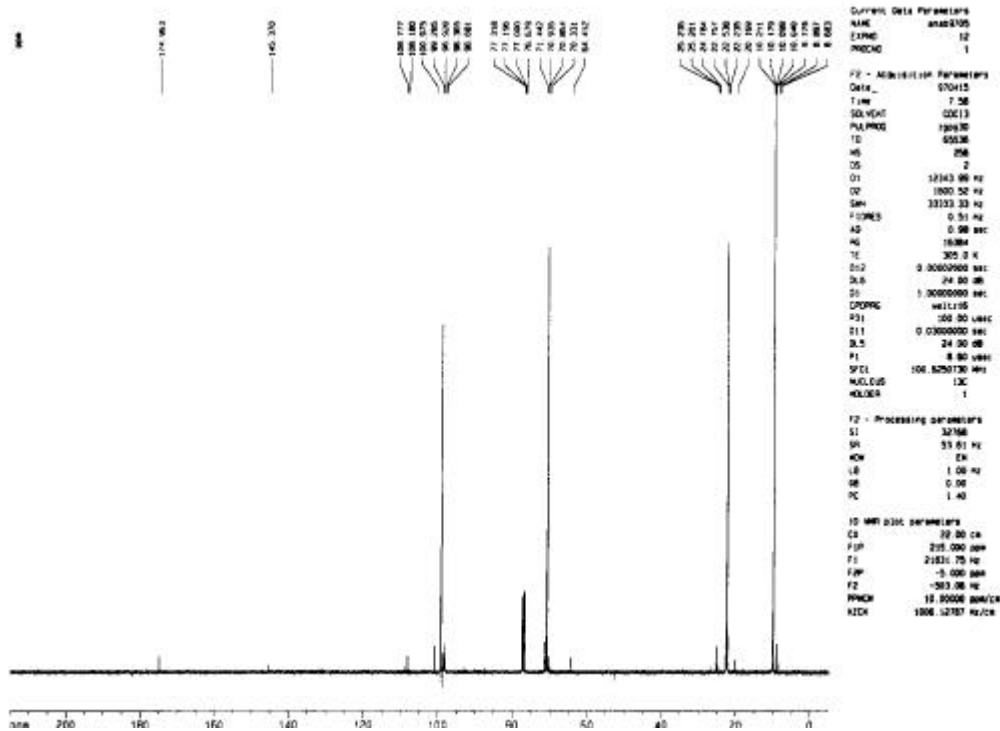
Anhang 29: EHP-Kalibrierfunktion der Prüfgasapparatur

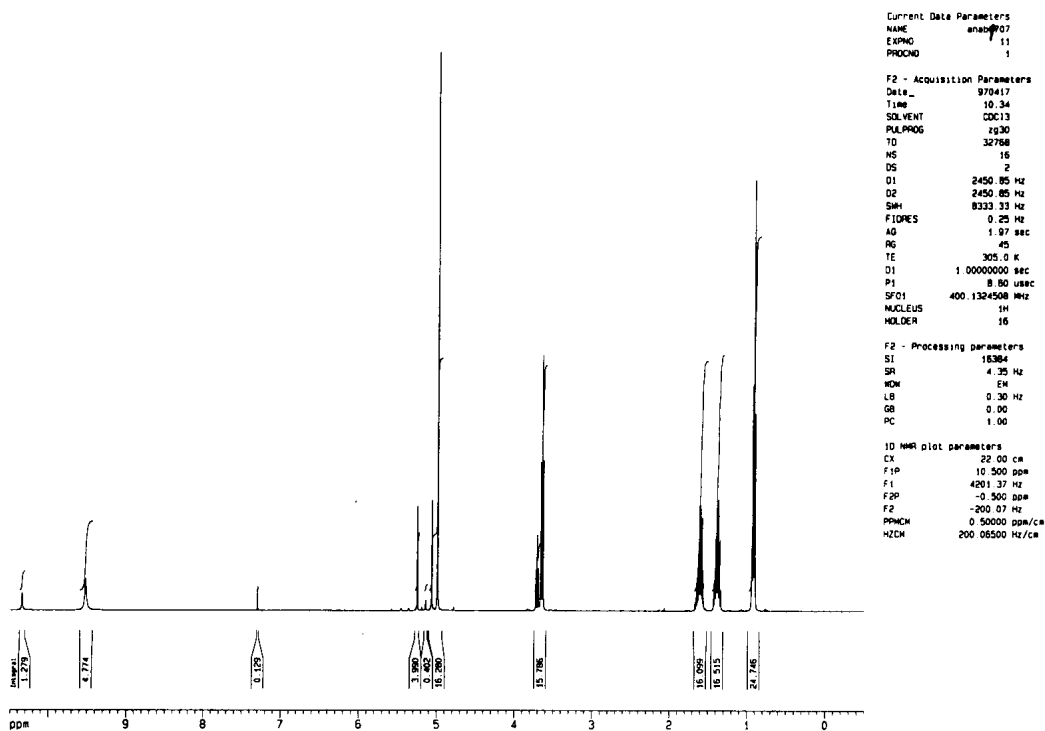
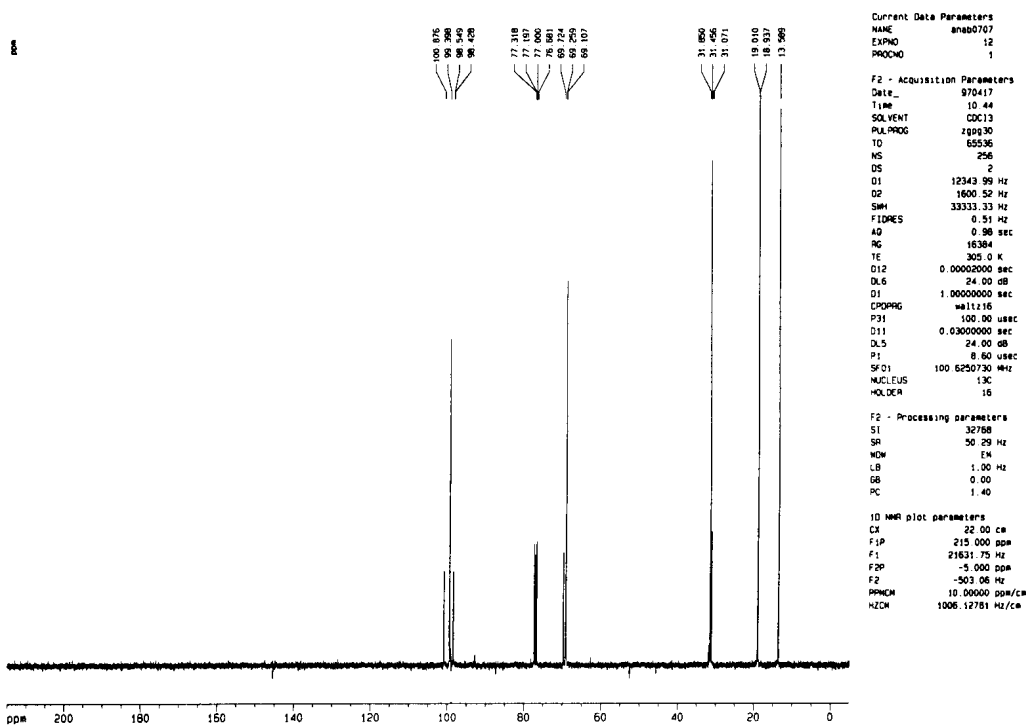


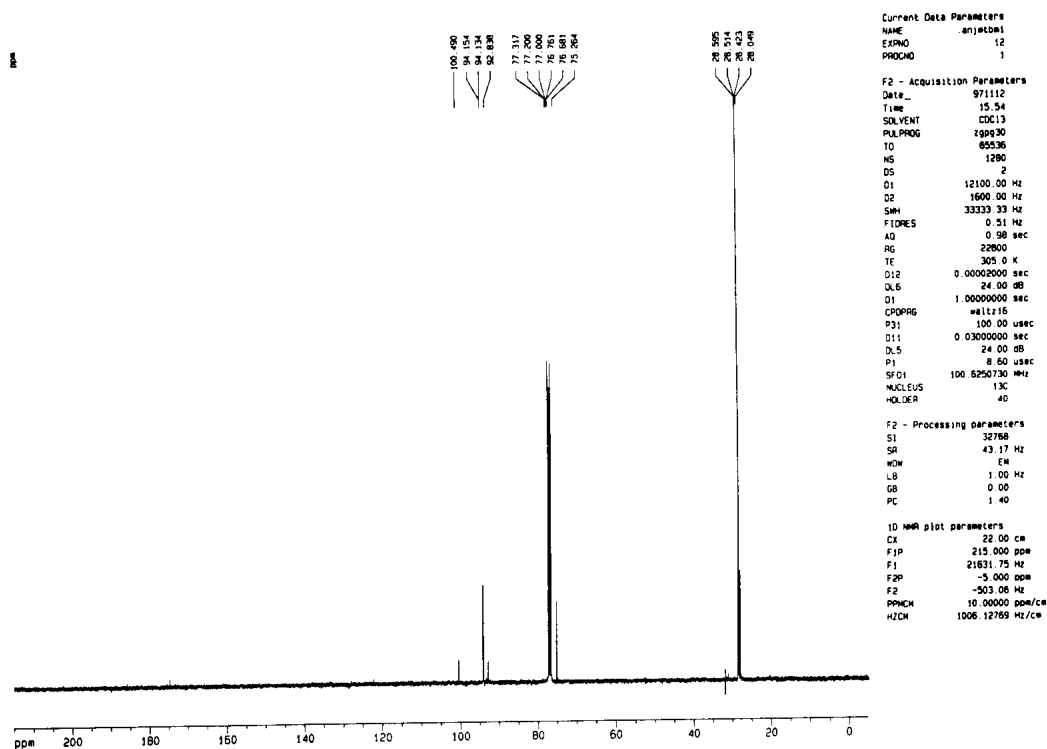
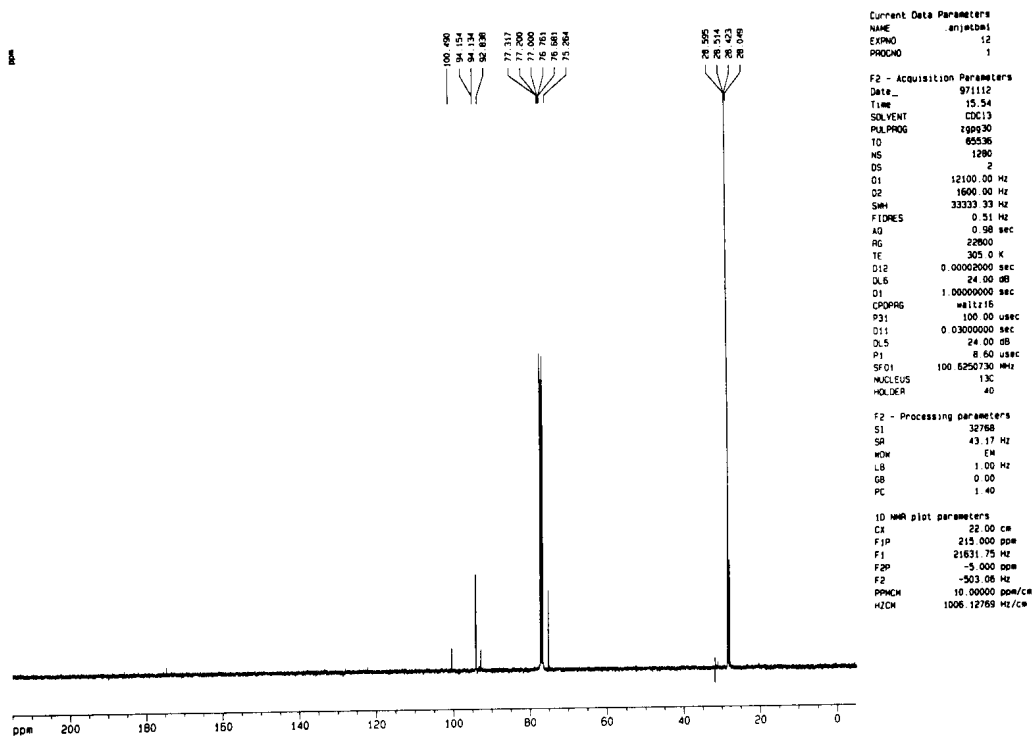
Anhang 30: H₂O-Gehalt in Luft, Funktion berechnet aus Literaturdaten (Handbook of chemistry and physics, 1995/1996)

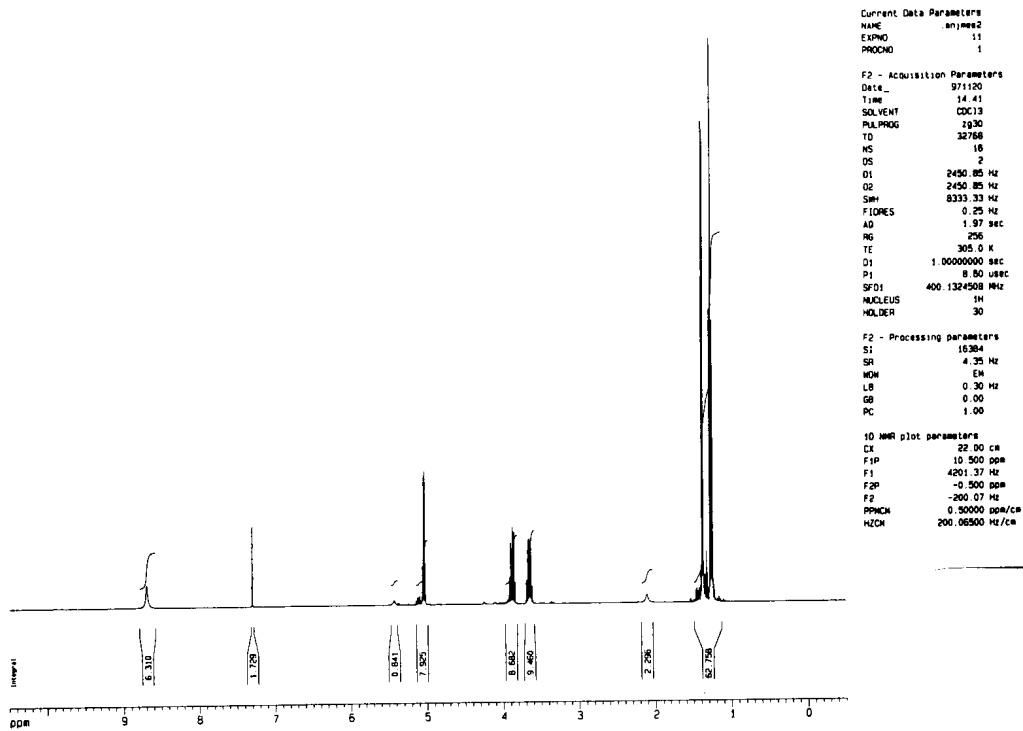
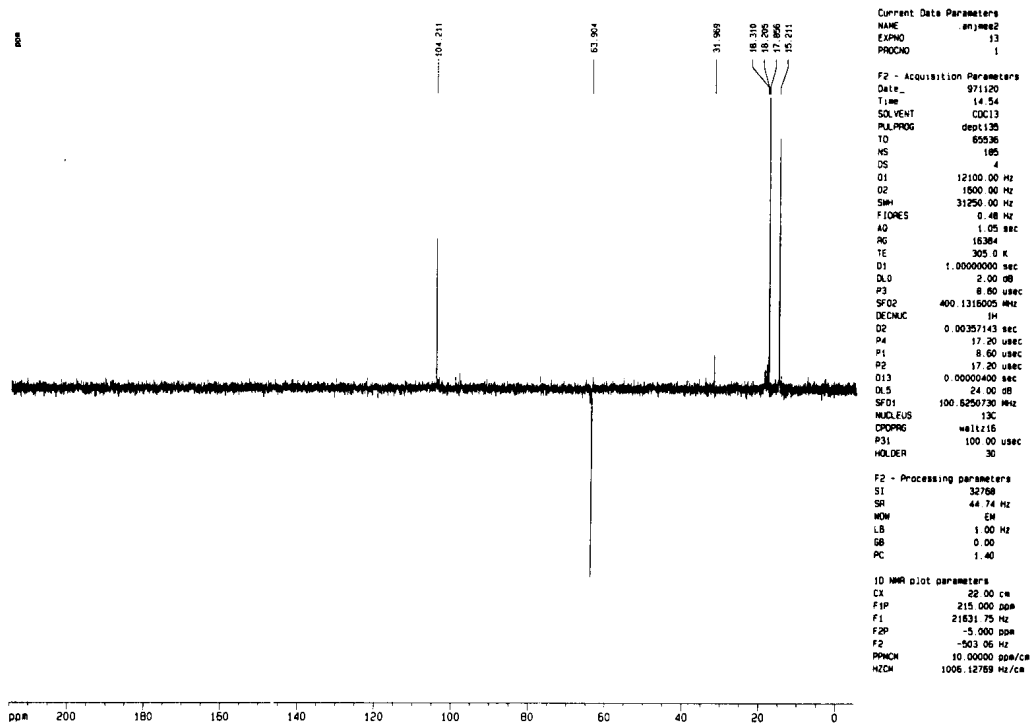
Anhang 31: ^1H -NMR des MethoxymethylhydroperoxidsAnhang 32: ^{13}C -NMR des Methoxymethylhydroperoxids

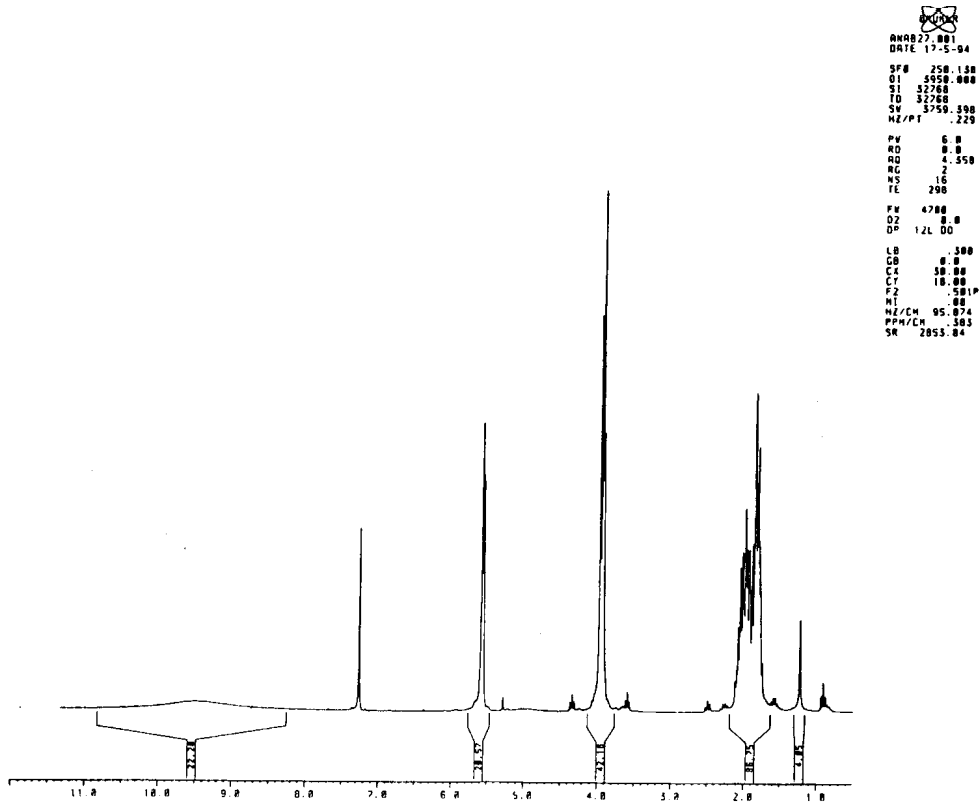
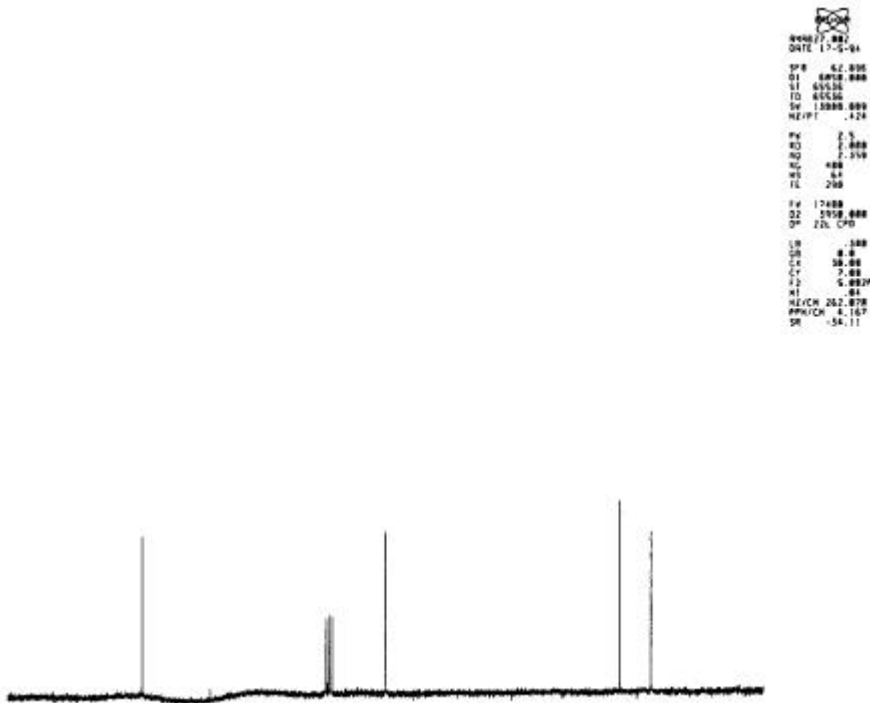
Anhang 33: ¹H-NMR des EthoxymethylhydroperoxidsAnhang 34: ¹³C-NMR des Ethoxymethylhydroperoxids

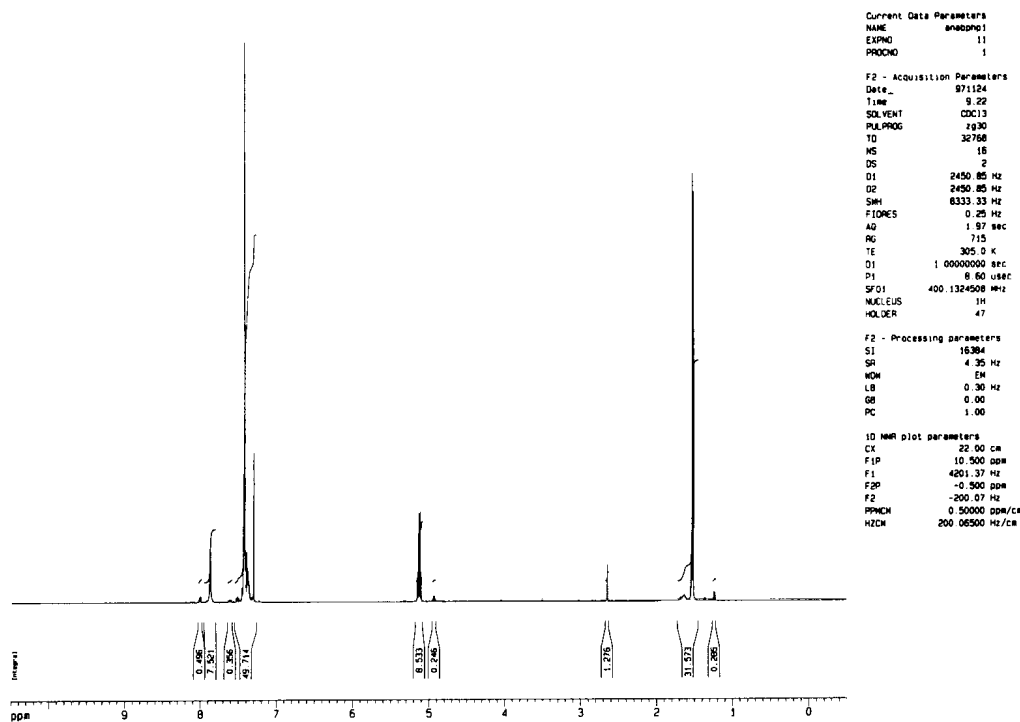
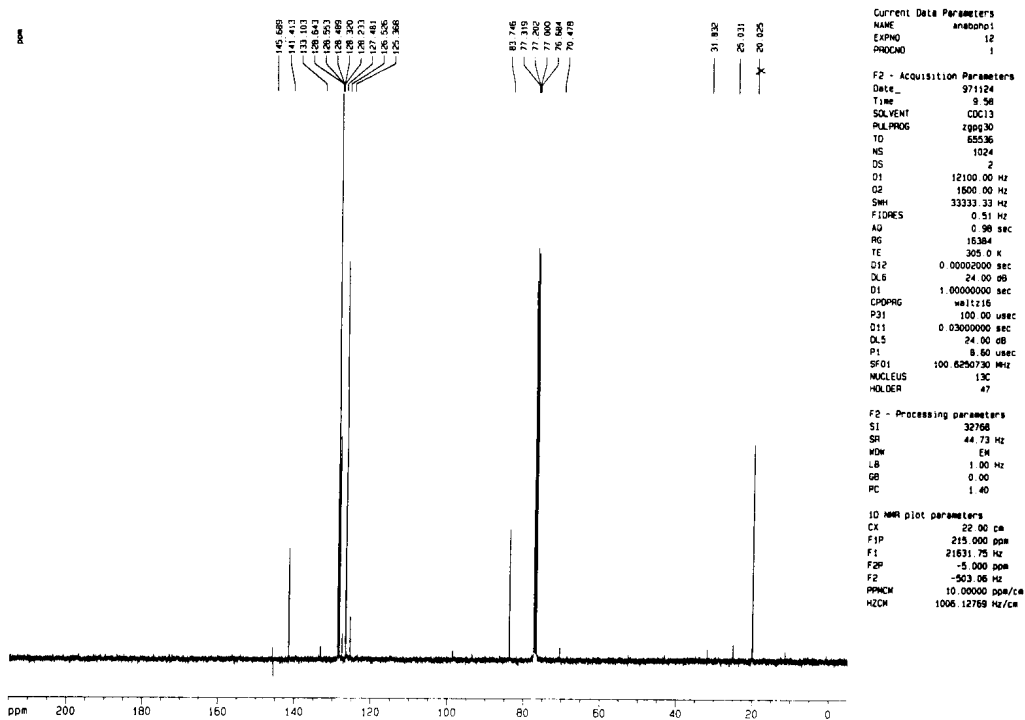
Anhang 35: $^1\text{H-NMR}$ des *n*-PropoxymethylhydroperoxidsAnhang 36: $^{13}\text{C-NMR}$ des *n*-Propoxymethylhydroperoxids

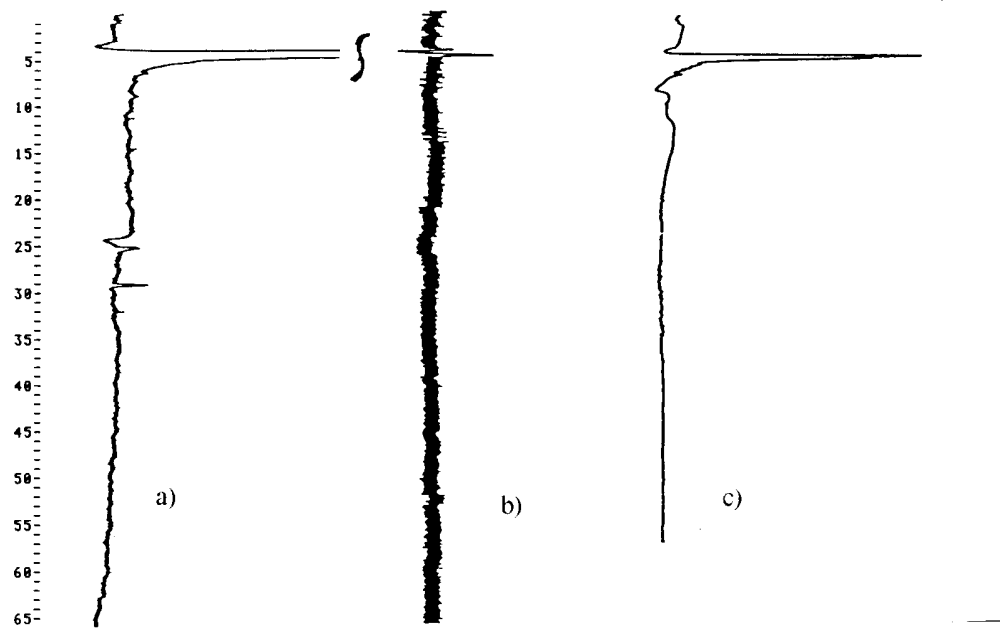
Anhang 39: $^1\text{H-NMR}$ des *n*-ButoxymethylhydroperoxidsAnhang 40: $^{13}\text{C-NMR}$ des *n*-Butoxymethylhydroperoxids

Anhang 41: ^1H -NMR des *tert*-ButoxymethylhydroperoxidsAnhang 42: ^{13}C -NMR des *tert*-Butoxymethylhydroperoxids

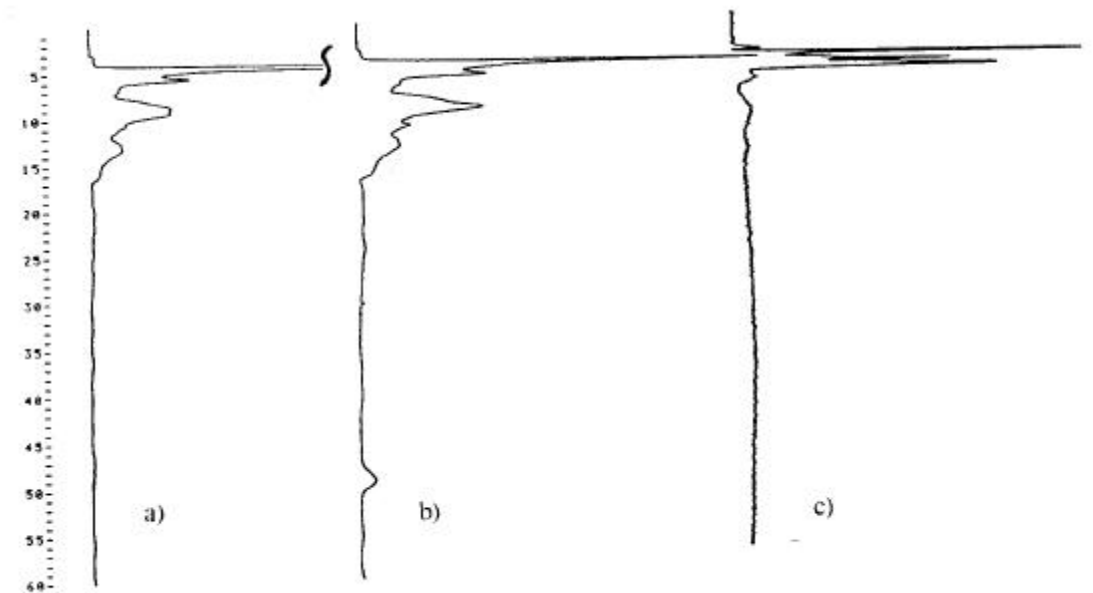
Anhang 43: ¹H-NMR des 1-EthoxyethylhydroperoxidsAnhang 44: ¹³C-NMR des 1-Ethoxyethylhydroperoxids

Anhang 45: ^1H -NMR des 2-HydroperoxytetrahydrofuransAnhang 46: ^{13}C -NMR des 2-Hydroperoxytetrahydrofurans

Anhang 49: ¹H-NMR des 1-PhenylethylhydroperoxidsAnhang 50: ¹³C-NMR des 1-Phenylethylhydroperoxids



Anhang 51: Chromatogramme eines Staubextraktes aus dem Wuppertaler Kiesbergtunnel (DMPD-UV/VIS-HPLC-System I, a) bei isokratischer Elution mit MeOH/verd. H_3PO_4 40:60(v:v), b) wie a, jedoch ohne Regaenz



gemessen c) bei isokratischer Elution mit verd. H_3PO_4)

Anhang 52: Chromatogramme eines Staubextraktes aus dem Wuppertaler Kiesbergtunnel (Fluoreszenz-HPLC-System II, a) bei isokratischer Elution mit MeOH/verd. H_3PO_4 40:60 (v:v), b) wie a, jedoch ohne Regaenz gemessen c) bei isokratischer Elution mit verd. H_3PO_4

6.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Zeitlicher Verlauf der Konzentrationen von H ₂ O ₂ , HMHP und BHMP in der Reaktionsmischung	25
Abbildung 2: Aufenthaltsdauer einer Substanz im HPLC-Nachsäulenreaktionssystem in Abhängigkeit von Durchmesser und Länge der Reaktionskapillare (Fluß = 1 ml/min)	33
Abbildung 3: Struktur des Ferriprotoporphyrins IX	35
Abbildung 4: Zeitverlauf der Fluoreszenz im HVA/TETA-Fe ³⁺ -System nach Zugabe von H ₂ O ₂ (10 ⁻² M)(Ebermann und Couperous, 1987)	39
Abbildung 5: UV/VIS-Detektion von Hydroperoxiden durch Bildung des farbigen Eisen(III)-Xylenolorange-Komplexes	43
Abbildung 6: Absorptionsspektren von N,N-Diethyl-p-phenylendiamin (DEPD), seinem durch Oxidation gebildeten Semichinondiimin (SQDI) und Chinondiimin (QDI) (Nickel, 1978)	45
Abbildung 7: Änderung der Extinktion ($\lambda = 553$ nm) einer DMPD-Lösung mit und ohne (NH ₄) ₂ Fe(SO ₄) ₂ nach Zugabe von 100 μ l 1 mM H ₂ O ₂ -Lösung	47
Abbildung 8: Vergleich der Signalintensitäten bei Verwendung einer N,N-Dimethyl-p-phenylendiaminlösung zur Nachsäulenreaktion (links ohne, rechts mit Fe(II)-Zusatz, Injektion 20 μ l 1 mM H ₂ O ₂ , identische Verstärkung)	48
Abbildung 9: Chromatogramme einer 7.5 μ M Tetralinhydroperoxid-Lösung bei Katalyse mit Cytochrom c bzw. Hematin (isokratisch MeOH/verd. H ₃ PO ₄ (v:v) 80:20, das Chromatogramm der Cytochrom c-Katalyse ist um den Faktor 2 verstärkt)	50
Abbildung 10: Stabilität der ungekühlten DMPD-Reagenzienlösung bei Verwendung verschiedener Lösungsmittelgemische	55
Abbildung 11: Einfluß des MeOH-Anteils der Reagenzienlösung auf die Signalgröße (UV/VIS-HPLC-System I, Reagenzienlösung: 755 mg DMPD und 50 mg (NH ₄) ₂ Fe(SO ₄) ₂ ·6H ₂ O/250 ml 7.8 mM H ₂ SO ₄)	56
Abbildung 12: Optimierung der DMPD-Reagenzienlösung (UV/VIS-HPLC-System I, Injektion: 20 μ l 10 mM H ₂ O ₂ , Fluß: Eluent/Reagenz je 0.5 ml/min)	57
Abbildung 13: Einfluß der Länge der Reaktionskapillare auf Signalgröße und -breite (UV/VIS-HPLC-System I mit optimierter Reagenzienlösung, Injektion: 20 μ l 10 μ M H ₂ O ₂ , Fluß: Eluent/Reagenz je 0.5 ml/min)	58
Abbildung 14: Einfluß der Temperatur auf die Signalgröße (UV/VIS-HPLC-System I mit optimierter Kapillarlänge und Reagenzienlösung, Injektion: 20 μ l 10 μ M H ₂ O ₂ , Fluß: Eluent/Reagenz je 0.5 ml/min)	59
Abbildung 15: Einfluß des Reagenzienflusses auf Signalgröße und -breite (UV/VIS-HPLC-System II mit optimierter Kapillarlänge und Reagenzienlösung, Injektion: 20 μ l 10 μ M H ₂ O ₂ , 10.1 μ M MHP, Fluß: Eluent/Reagenz je 0.5 ml/min)	60
Abbildung 16: Kalibriergerade für H ₂ O ₂ (DMPD-UV/VIS-HPLC-System II, linearer Fit von 0-10.0 μ mol/l, Funktion verlängert bis zu 550 μ mol/l)	62
Abbildung 17: Signalgröße als Funktion der Fe(III)- und H ₂ O ₂ -Konzentration unter verschiedenen Bedingungen (DMPD-UV/VIS-HPLC-System II, mit und ohne Säule, teilweise bei halbierten Eluenten- und Reagenzienflüssen)	63
Abbildung 18: Messung einiger aromatischer Hydroperoxide bei verschiedenen Detektionswellenlängen (Gradientenelution: MeOH/verd. H ₃ PO ₄ 0-15 min von 50 auf 80 % MeOH, anschließend isokratisch mit 80 % MeOH, DEP-UV/VIS-HPLC-System II)	64

Abbildung 19: Zeitabhängigkeit der Luminol/Hemin-Chemilumineszenz mit Lipidhydroperoxiden (Matthäus et al., 1994)	65
Abbildung 20: Einfluß der Kapillarlänge auf die Signalgröße (je 4 Injektionen, Detektor-Verstärkung für beide HP identisch, 0 cm entspricht dem Originaldetektoranschluß)	66
Abbildung 21: Einfluß der Hematin- und Luminolkonzentration in der Reagenzienlösung auf die Signalgröße einer 10 µM H ₂ O ₂ -Lösung	67
Abbildung 22: Einfluß des pH-Wertes der Luminol/Hematin-Reagenzienlösung auf die Signalgröße	68
Abbildung 23: Chromatogramm einer Standardlösung (ca. 5 µM je Komponente) atmosphärischer Hydroperoxide (H ₂ O ₂ , HMHP, MHP, EHP), Messung mit dem DMPD-UV/VIS-HPLC-System I	72
Abbildung 24: Ermittlung des linearen Bereichs bei der Messung atmosphärischer Hydroperoxide (DMPD-UV/VIS-HPLC-System II)	72
Abbildung 25: Ermittlung des linearen Bereichs bei der Messung atmosphärischer Hydroperoxide (DEPD-UV/VIS-HPLC-System II)	74
Abbildung 26: Trennung der n-Alkylhydroperoxide (C ₅ - C ₁₈) mittels Gradientenelution an RP 18, 250 x 4.0 mm (Gradientenelution: MeOH/verd. H ₃ PO ₄ 0-6.5 min von 85 auf 95 % MeOH, 6.5-15 min isokratisch 95 % MeOH, 15-20 min von 95 auf 98 % MeOH, anschließend isokratisch 98 % MeOH)	79
Abbildung 27: Ermittlung des linearen Bereiches bei der Messung der n-Alkylhydroperoxide (C ₅ - C ₁₈ , DMPD-UV/VIS-HPLC-System II)	82
Abbildung 28: Vergleich der Chromatogramme einer 8 µM Lösung von tert-Butylhydroperoxid (a: HRP/PES-Fluoreszenz-HPLC-System II, b: DMPD-UV/VIS-HPLC-System I, Elution: isokratisch MeOH/ verd. H ₃ PO ₄ 40:60 (v:v))	82
Abbildung 29: Trennung einiger sekundärer und tertiärer Alkyl- und Arylalkylhydroperoxide mittels Gradientenelution (DMPD-UV/VIS-HPLC-System II, Gradientenelution: MeOH/verd. H ₃ PO ₄ 0-15 min von 50 auf 80 % MeOH, anschließend isokratisch 80 % MeOH)	83
Abbildung 30: Änderung der Retentionszeiten einiger Alkoxyethylhydroperoxide bei isokratischer Elution mit MeOH/verd. H ₃ PO ₄	86
Abbildung 31: Trennung einiger Alkoxyethylhydroperoxide mittels Gradientenelution (Säule: RP-18, 250 x 4.0 mm; Gradientenelution: MeOH/ verd. H ₃ PO ₄ (v:v) 0-10 min isokratisch 30 % MeOH, 10-18 min von 30 auf 60 % MeOH, anschließend isokratisch 60 % MeOH)	87
Abbildung 32: Schematischer Aufbau der Ozon- und Hydroperoxidprüfgasapparatur	93
Abbildung 33: Automatisches, kontinuierlich arbeitendes 2-Pumpen-Fluoreszenz-HPLC-System zur Bestimmung von Hydroperoxiden	96
Abbildung 34: Langzeitmessung eines Hydroperoxid-Prüfgases mit dem automatisierten HPLC-System (Injektionsvolumen abwechselnd 100 bzw. 20 µl)	97
Abbildung 35: H ₂ O ₂ -Messungen in Außenluft (Meßort: BUGH-Wuppertal Gebäude H, Südseite, 27.08.1997)	105
Abbildung 36: Messung von MHP bzw. der Summe organischer Hydroperoxide in Außenluft (Meßort: BUGH-Wuppertal Gebäude H, Südseite, 27.08.1997)	106
Abbildung 37: Fahrtroute der Polarstern während der Expedition ANT XIV/1	108
Abbildung 38: Meridionaler Verlauf der atmosphärischen H ₂ O ₂ -Konzentration während der Polarsternexpedition ANT XIV/1	110

Abbildung 39: Meridionaler Verlauf der atmosphärischen MHP-Konzentration während der Polarsternexpedition ANT XIV/1	111
Abbildung 40: Meridionaler Verlauf der atmosphärischen Gesamt-Hydroperoxid-Konzentration während der Polarsternexpedition ANT XIV/1	112
Abbildung 41: Vergleich der mit dem UV/VIS-HPLC-System I und dem Fluoreszenz-HPLC-System II gemessenen H ₂ O ₂ -Konzentrationen	113
Abbildung 42: Vergleich der mit dem DMPD-UV/VIS-HPLC-System I und dem Fluoreszenz-HPLC-System II gemessenen MHP-Konzentrationen während der Polarsternexpedition ANT XIV/1	114
Abbildung 43: H ₂ O ₂ -Konzentration in Regenwasser während der Polarsternexpedition ANT XIV/1	115
Abbildung 44: MHP-Konzentration in Regenwasser während der Polarsternexpedition ANT XIV/1	116
Abbildung 45: Vergleich der mit dem UV/VIS-HPLC-System I und dem Fluoreszenz-HPLC-System II gemessenen H ₂ O ₂ -Konzentrationen in Regenwasser während der Polarsternexpedition ANT XIV/1	117
Abbildung 46: Chromatogramme der Abgase eines Notstromaggregats, Probenahme bei 5 cm und 1 m Entfernung vom Auspuff (DMPD-UV/VIS-HPLC)	118
Abbildung 47: Chromatogramme der acetonitrilischen und methanolischen Sannoxit-Extrakte (DEPD-UV/VIS-HPLC-System II)	122
Abbildung 48: Fluoreszenz-HPLC-System I, 3-Pumpen-HPLC-System zur Bestimmung von Hydroperoxiden	128
Abbildung 49: Fluoreszenz-HPLC-System II sowie UV/VIS-HPLC-Systeme I und II (2-Pumpen-HPLC-System zur Bestimmung von Hydroperoxiden)	130
Abbildung 50: Chemilumineszenz-HPLC-System, 2-Pumpen-HPLC-System zur Bestimmung von Hydroperoxiden	132
Abbildung 51: Kryosamplingaufbau mit Eintauchkühler und Luftsammelpumpe	134
Abbildung 52: Schiffsregenmesser nach Prof. Hasse (mit freundlicher Genehmigung von Dr. M. Großklaus, Institut für Meereskunde der Universität Kiel)	135

6.1.1 Abbildungsverzeichnis Anhang

Anhang 1: Kalibrierfunktionen für H ₂ O ₂ bei verschiedenen unterschiedlichen Wicklungsdurchmessern der Reaktionskapillaren (Fluoreszenz-HPLC-System II)	146
Anhang 2: Messung von atmosphärischen Hydroperoxiden mit dem Chemilumineszenz-HPLC-System	146
Anhang 3: Kalibriergeraden atmosphärischer Hydroperoxide (Chemilumineszenz-HPLC-System)	147
Anhang 4: Kalibriergeraden atmosphärischer Hydroperoxide (DMPD-UV/VIS-HPLC-System II)	147
Anhang 5: Kalibriergeraden atmosphärischer Hydroperoxide (DEPD-UV/VIS-HPLC-System II)	148
Anhang 6: Kalibriergeraden der n-Alkylhydroperoxide (C ₅ , C ₆ und C ₁₂)	148
Anhang 7: Kalibriergeraden der n-Alkylhydroperoxide (C ₈ und C ₁₄)	149
Anhang 8: Kalibriergeraden der n-Alkylhydroperoxide (C ₁₀ , C ₁₆ und C ₁₈)	149

Anhang 9: Trennung einiger sekundärer und tertiärer Arylalkylhydroperoxide mittels Gradientenelution (DMPD-UV/VIS-HPLC-System II, Gradientenelution: MeOH/verd. H ₃ PO ₄ 0-15 min von 50 auf 80 % MeOH, anschließend isokratisch 80 % MeOH)	150
Anhang 10: Retentionszeiten der verzweigten Alkyl- und Arylalkylhydroperoxide (DMPD-UV/VIS-HPLC-System II, Gradientenelution: MeOH/verd. H ₃ PO ₄ 0-15 min von 50 auf 80 % MeOH, anschließend isokratisch 80 % MeOH)	150
Anhang 11: Verfahrenskenngrößen der Analyse verzweigter Alkyl- und Arylalkylhydroperoxide (DMPD-UV/VIS-HPLC-System II, Gradientenelution: MeOH/verd. H ₃ PO ₄ 0-15 min von 50 auf 80 % MeOH, anschließend isokratisch 80 % MeOH)	151
Anhang 12: Verfahrenskenngrößen der Analyse verzweigter Alkyl- und Arylalkylhydroperoxide (DEPD-UV/VIS-HPLC-System II, Gradientenelution: MeOH/verd. H ₃ PO ₄ 0-15 min von 50 auf 80 % MeOH, anschließend isokratisch 80 % MeOH)	151
Anhang 13: Kalibriergeraden des 2-Propyl- und 3-Pentylhydroperoxids (DMPD-UV/VIS-HPLC-System II)	152
Anhang 14: Kalibriergeraden des 2-Propyl- und 3-Pentylhydroperoxids (DEPD-UV/VIS-HPLC-System II)	152
Anhang 15: Kalibriergeraden des tert-Butylhydroperoxids (DMPD-UV/VIS-HPLC-System II, DEP-UV/VIS-HPLC-System II)	153
Anhang 16: Kalibriergeraden des cyclo-Hexenylhydroperoxids (DMPD-UV/VIS-HPLC-System II, DEP-UV/VIS-HPLC-System II)	153
Anhang 17: Kalibriergeraden des Tetralin-, 1-Phenylethyl- und Cumolhydroperoxids (DMPD-UV/VIS-HPLC-System II)	154
Anhang 18: Kalibriergeraden des Tetralin-, 1-Phenylethyl- und Cumol-Hydroperoxids (DEPD-UV/VIS-HPLC-System II)	154
Anhang 19: Retentionszeiten einiger Alkoxyethylhydroperoxide bei isokratischer Elution und Gradienten-Elution mit MeOH/verd. H ₃ PO ₄	155
Anhang 20: Kalibriergeraden der Alkoxyethylhydroperoxide (Messung der Einzelsubstanzen mit dem DMPD-UV/VIS-HPLC-System II)	155
Anhang 21: Verfahrenskenngrößen verschiedener Alkoxyethylhydroperoxide (DMPD-UV/VIS-HPLC-System II, isokratische Elution (v:v)wie angegeben)	156
Anhang 22: Verfahrenskenngrößen verschiedener Alkoxyethylhydroperoxide durch die Messung eines gemischten Standards (DMPD-UV/VIS-HPLC-System II, Gradientenelution: MeOH/verd. H ₃ PO ₄ (v:v) 0-10 min isokratisch 30 % MeOH, 10-18 min von 30 auf 60 % MeOH, anschließend isokratisch 60 % MeOH)	156
Anhang 23: Trennung von THF und EOEHP mittels Gradientenelution (MeOH/verd. H ₃ PO ₄ 0-15 min von 50 auf 80 % MeOH)	157
Anhang 24: Kalibriergeraden von EOEHP und THF-HP (DMPD-UV/VIS-HPLC-System II)	157
Anhang 25: Verfahrenskenngrößen verschiedener Alkoxyalkylhydroperoxide (DMPD-UV/VIS-HPLC-System II, isokratische Elution: MeOH/verd. H ₃ PO ₄ 45:55 (v:v))	158
Anhang 26: Kalibriergerade für die Bestimmung von Benzoylperoxid (DMPD-UV/VIS-HPLC-System II)	158
Anhang 27: H ₂ O ₂ -Kalibrierfunktion der Prüfgasapparatur	159
Anhang 28: MHP-Kalibrierfunktion der Prüfgasapparatur	159
Anhang 29: EHP-Kalibrierfunktion der Prüfgasapparatur	160

Anhang 30: H ₂ O-Gehalt in Luft, Funktion berechnet aus Literaturdaten (Handbook of chemistry and physics, 1995/1996)	160
Anhang 31: ¹ H-NMR des Methoxymethylhydroperoxids	161
Anhang 32: ¹³ C-NMR des Methoxymethylhydroperoxids	161
Anhang 33: ¹ H-NMR des Ethoxymethylhydroperoxids	162
Anhang 34: ¹³ C-NMR des Ethoxymethylhydroperoxids	162
Anhang 35: ¹ H-NMR des n-Propoxymethylhydroperoxids	163
Anhang 36: ¹³ C-NMR des n-Propoxymethylhydroperoxids	163
Anhang 37: ¹ H-NMR des 2-Propoxymethylhydroperoxids	164
Anhang 38: ¹³ C-NMR des 2-Propoxymethylhydroperoxids	164
Anhang 39: ¹ H-NMR des n-Butoxymethylhydroperoxids	165
Anhang 40: ¹³ C-NMR des n-Butoxymethylhydroperoxids	165
Anhang 41: ¹ H-NMR des tert-Butoxymethylhydroperoxids	166
Anhang 42: ¹³ C-NMR des tert-Butoxymethylhydroperoxids	166
Anhang 43: ¹ H-NMR des 1-Ethoxyethylhydroperoxids	167
Anhang 44: ¹³ C-NMR des 1-Ethoxyethylhydroperoxids	167
Anhang 45: ¹ H-NMR des 2-Hydroperoxytetrahydrofurans	168
Anhang 46: ¹³ C-NMR des 2-Hydroperoxytetrahydrofurans	168
Anhang 47: ¹ H-NMR des Tetralinhydroperoxids	169
Anhang 48: ¹³ C-NMR des Tetralinhydroperoxids	169
Anhang 49: ¹ H-NMR des 1-Phenylethylhydroperoxids	170
Anhang 50: ¹³ C-NMR des 1-Phenylethylhydroperoxids	170
Anhang 51: Chromatogramme eines Staubextraktes aus dem Wuppertaler Kiesbergtunnel (DMPD-UV/VIS-HPLC-System I, a) bei isokratischer Elution mit MeOH/verd. H ₃ PO ₄ 40:60 (v:v), b) wie a, jedoch ohne Regaenz gemessen c) bei isokratischer Elution mit verd. H ₃ PO ₄)	171
Anhang 52: Chromatogramme eines Staubextraktes aus dem Wuppertaler Kiesbergtunnel (Fluoreszenz-HPLC-System II, a) bei isokratischer Elution mit MeOH/verd. H ₃ PO ₄ 40:60 (v:v), b) wie a, jedoch ohne Regaenz gemessen c) bei isokratischer Elution mit verd. H ₃ PO ₄)	171

6.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Henry-Konstanten verschiedener Hydroperoxide (O'Sullivan et al., 1996)	12
Tabelle 2: Sammeleffizienz [%] einiger ausgewählter Hydroperoxide mit verschiedenen Probenahmeverfahren	17
Tabelle 3: Verfahrenskenngrößen bei der Bestimmung von H ₂ O ₂ mit unterschiedlicher Geometrie der Reaktionskapillaren (Fluoreszenz-HPLC-System II)	70
Tabelle 4: Verfahrenskenngrößen der Analyse atmosphärischer Hydroperoxide (Chemilumineszenz-HPLC-System)	70
Tabelle 5: Verfahrenskenngrößen der Analyse atmosphärenchemisch relevanter Hydroperoxide (DMPD-UV/VIS-HPLC-System II)	71

Tabelle 6: Verfahrenskenngrößen atmosphärenchemisch relevanter Hydroperoxide (DEPD-UV/VIS-HPLC-System II)	73
Tabelle 7: Verfahrenskenngrößen atmosphärenchemisch relevanter Hydroperoxide (DMPD/HRP-UV/VIS-HPLC-System II)	75
Tabelle 8: Verfahrenskenngrößen verschiedener atmosphärenchemisch relevanter Hydroperoxide (DMPD-UV/VIS-HPLC-System II, narrow-bore Säule Merck 2 mm ID)	76
Tabelle 9: Vergleich der Nachweisgrenzen bei der HPLC-Bestimmung verschiedener atmosphärisch relevanter Hydroperoxide	77
Tabelle 10: Vergleich der Verfahrensvariationskoeffizienten bei der HPLC-Bestimmung verschiedener atmosphärisch relevanter Hydroperoxide	78
Tabelle 11: Retentionszeiten einiger n-Alkylhydroperoxide bei verschiedenen Elutionsbedingungen	78
Tabelle 12: Verfahrenskenngrößen der n-Alkylhydroperoxide (C ₅ - C ₁₈)(DMPD-UV/VIS-HPLC-System II, Gradientenelution: MeOH/verd. H ₃ PO ₄ 0-6.5 min von 85 auf 95 % MeOH, 6.5-15 min isokratisch 95 % MeOH, 15- 20 min von 95 auf 98 % MeOH, anschließend isokratisch 98 % MeOH)	80
Tabelle 13: Nachweisgrenzen der n-Alkylhydroperoxide (C ₅ - C ₁₈) mit verschiedenen HPLC-Systemen	81
Tabelle 14: Vergleich der Nachweisgrenzen einiger sekundärer und tertiärer Alkyl- bzw. Arylalkylhydroperoxide	85
Tabelle 15: Vergleich der erreichbaren Nachweisgrenzen für einige Alkoxyalkylhydroperoxide mit verschiedenen HPLC-Systemen	88
Tabelle 16: Untersuchung der Querempfindlichkeit (DMPD-UV/VIS-HPLC)	91
Tabelle 17: Berechnete und gemessene Hydroperoxid-Prüfgaskonzentrationen (Striplösungsfluß: 0.108 ml/min, Grundgas 9.85 l/min, Mischgas 15.25 l/min, Kryosampling, DMPD-UV/VIS-HPLC-System I, jeweils Mittelwert aus 3-6 Messungen)	94
Tabelle 18: Statistische Daten der Langzeitmessung mit dem automatisierten HPLC-System	98
Tabelle 19: Messung wäßriger H ₂ O ₂ -Standards	102
Tabelle 20: H ₂ O ₂ -Prüfgasmessungen mit verschiedenen Analyseverfahren	102
Tabelle 21: MHP-Prüfgasmessungen	103
Tabelle 22: HMHP-Prüfgasmessungen	104
Tabelle 23: Hydroperoxidkonzentration verschiedener organischer Lösungsmittel (DMPD-UV/VIS-HPLC-System II)	121

6.3 Reaktionsschemata

Reaktionsschema 1: Ozonolyse ungesättigter Kohlenwasserstoffe	8
Reaktionsschema 2: Bildung von HMHP aus Wasser und dem Criegee-Intermediat	9
Reaktionsschema 3: Luminol-Chemilumineszenzreaktion	18
Reaktionsschema 4: TCPO-Chemilumineszenz	20
Reaktionsschema 5: Enzymkatalysierte Umsetzung von Hydroperoxiden und p-Hydroxyphenyllessigsäure	21
Reaktionsschema 6: Synthese von Methyl- und Ethylhydroperoxid aus Alkylsulfaten	23

Reaktionsschema 7: Synthese von Alkylhydroperoxiden	24
Reaktionsschema 8: Synthese von HMHP	24
Reaktionsschema 9: Reaktionsverlauf zur Bildung α -hetero-substituierter Alkyl-hydroperoxide	26
Reaktionsschema 10: Bildung von Hydroxymethylalkoxymethylperoxiden bei der Ozonolyse von Ethen in alkoholischer Lösung	27
Reaktionsschema 11: Ozonolyse von substituierten Olefinen	28
Reaktionsschema 12: Darstellung von 1-Ethoxyethylhydroperoxid durch Addition von H_2O_2 an Ethylvinylether	29
Reaktionsschema 13: Mechanismus der Oxidation von Tetrahydrofuran	31
Reaktionsschema 14: Mechanismus der enzymatischen Umsetzung von Hydroperoxiden	34
Reaktionsschema 15: Zwischenstufen bei der Bildung von Compound I	35
Reaktionsschema 16: Bildung des Fe^{IV} -Porphyrin- π -Radikalkations bei der Reaktion von Hydroperoxiden mit Enzymen	36
Reaktionsschema 17: Mechanismus der H_2O_2 -Zersetzung des TETA- Fe^{3+} -Komplexes	38
Reaktionsschema 18: Die Fenton-Benzoessäurereaktion	40
Reaktionsschema 19: Mangan(II)-katalysierte Oxidation von 2-Hydroxynaphthaldehyd-thiosemicarbazon	42
Reaktionsschema 20: Oxidation von substituierten para-Phenylendiaminen	44
Reaktionsschema 21: Kremer-Stein-Mechanismus der $Fe(III)$ -katalysierten Zersetzung von H_2O_2	61

7 Literaturverzeichnis

- Albrecht H.O.: Über die Chemilumineszenz des Aminophthalsäurehydrazids.
Z. physikal. Chem. **1928**, 136, 321-330
- Anthoni U., Larsen C., Nielsen P.H. und Christophersen C.: Haphazard isolation of a peroxide from diethyl ether, autoxidation of diethyl ether and structure of mozuka toxin a.
Acta Chem. Scand. **1986**, B41, 216-218
- Auses J.P., Cook S.L. und Maloy J.T.: Chemiluminescence enzyme method for glucose.
Anal. Chem. **1975**, 47, 244-249
- Bächmann K., Hauptmann J., Polzer J. und Schütz P.: Determination of organic alkyl- and 1-hydroxy hydroperoxides with chemiluminescence, fluorescence and GC/MS.
Anal. Chem. **1992**, 342, 809-812
- Bader H., Sturzenegger V. und Hoigné J.: Photometric method for the determination of low concentrations of hydrogen peroxide by the peroxidase catalysed oxidation of N,N-diethyl-p-phenyldiamine (DPD).
Wat. Res. **1988**, 22, 1109-1115
- Baek H.K. und van Wart E.: Elementary steps in the formation of horseradish peroxidase compound I: Direct observation of compound O, a new intermediate with a hyperporphyrin spectrum.
Biochem. **1989**, 28, 5714-5719
- Bailey P.S.: Ozonation in organic chemistry, Volume 1, Olefinic compounds.
Academic Press Inc., New York, San Francisco, London **1978**, 39, 110-119
- Becker K.H., Brockmann K.J. und Bechara J.: Tunable diode laser measurements of CH₃COOH absorption cross-sections near 1320 cm⁻¹.
Geophys. Res. Lett. **1989**, 16, 1367-1370
- Becker K.H., Brockmann K.J. und Bechara J.: Production of hydrogen peroxide in forest air by reaction of ozone with terpenes.
Nature **1990**, 346, 256-258
- Becker K.H., Brockmann K.J. und Bechara J.: Terpenes and forest decline.
Nature **1991**, 352, 672-673
- Beltz N., Jaeschke W., Kok G.L., Gitlin S.N., Lazrus A.L., McLaren S., Shakespeare D. und Mohnen V.A.: A comparison of the enzyme fluorometric and the peroxyoxalate chemiluminescence methods for measuring H₂O₂.
J. Atmos. Chem. **1987**, 5, 311-322
- Boddenberg A.: α -Hetero-substituierte Alkylhydroperoxide: Synthese und chromatographische Bestimmung.
Diplomarbeit, Bergische Universität-Gesamthochschule Wuppertal **1994**
- Bostick D.T. und Hercules D.M.: Quantitative determination of blood glucose using enzyme induced chemiluminescence of luminol.
Anal. Chem. **1975**, 47, 447-451

- Brockmann K.J.: Untersuchungen zur Chemie der Peroxide
Dissertation, Bergische Universität-Gesamthochschule Wuppertal 1993
- Bufalini J.J., Gay B.W.Jr. und Brubajer K.L.: Hydrogen peroxide formation from formaldehyde photooxidation and its presence in urban atmosphere.
Environ. Sci. Technol. 1972, 6, 816-821
- Bukata S.W., Zabrocki L.L. und McLaughlin M.F.: Gas chromatography of organic peroxides.
Anal. Chem. 1963, 35, 885-886
- Bundesarbeitsblatt Technische Regeln für Gefahrstoffe - Bekanntmachung des BMA vom 11. November 1991 -IIIb4-35125-5-
Bundesarbeitsblatt 1992, 1, 36-106
- Burdo T.G. und Seitz R.: Mechanism of cobalt catalysis of luminol chemiluminescence.
Anal. Chem. 1975, 47, 1639-1643
- Cabaniss S.E.: Synchronous fluorescence spectra of metal-fulvic acid complexes.
Environ. Sci. Technol. 1992, 26, 1133-1139
- Calvert J.G. und Stockwell W.R.: Acid generation in the troposphere by gas-phase chemistry.
Environ. Sci. Technol. 1983, 17, 428A-443A
- Campos T.L. und Kok, G.L.: Evaluation of Horibe traps for cryogenic collection of hydrogen peroxide and methyl hydroperoxide.
Atmos. Environ. 1996, 30, 2575-2582
- Chance B.: The kinetics and stoichiometry of the transition from the primary to the secondary peroxidase peroxide complexes.
Arch. Biochem. Biophys. 1952, 41, 416
- Ci Y.-X. und Wang F.: Studies on catalytic fluorescence formation with peroxidase-like metallotetrakis(n-methylpyridiniumyl) porphyrins.
Talanta 1990a, 37, 1133-1136
- Ci Y.-X. und Wang F.: Mimesis of peroxidase by Mn-TMPyP in the catalytic fluorescence reaction of the homovanillic acid-hydrogen peroxide system.
Mikrochim. Acta [Wien] 1990b, 1, 63-68
- Ci Y.-X. und Wang F.: Spectrofluorimetric determination of hydrogen peroxide based on the catalytic effect of peroxidase-like manganese tetrakis(sulphophenyl) porphyrin on the oxidation of homovanillic acid.
Anal. Chim. Acta 1990c, 233, 299-302
- Cleve P.T.: The formation of an explosive substance from ether.
Chem. News 1891, 63, 101
- Cofer W.R.III und Edahl R.A.Jr.: A new technique for collection, concentration and determination of gaseous tropospheric formaldehyde.
Atmos. Environ. 1986, 20, 979-984

- Cofer W.R.III, Collins V.G. und Talbot R.W.: Improved aqueous scrubber for collection of soluble atmospheric trace gases.
Environ. Sci. Technol. **1985**, 19, 557-560
- Corrodi H. und Werdinius B.: Oxidative conversion of homovanillic acid to a fluorescent compound.
Acta Chem. Scan. **1965**, 19, 1854-1858
- Criegee R.: Mechanismus der Ozonolyse.
Angew. Chem. **1975**, 87, 765-771
- Dankowski M. und Prescher G.: Methoden der organischen Chemie, Organische Peroxo-Verbindungen.
Houben-Weyl 1988, Band 13/Teil 1, Kropf H., Georg Thieme Verlag
- Dasgupta P.K.: Discussion on: the importance of atmospheric ozone and hydrogen peroxide in oxidizing sulphur dioxide in cloud and rainwater.
Atmos. Environ. **1980**, 14, 272-275
- de Serves C.: Gas phase formaldehyde and peroxide measurements in the Arctic atmosphere.
J. Geophys. Res. **1994**, 99, D12, 25,391-25,398
- Deelder R.S., Kroll M.G.F. und van den Berg J.H.M.: Determination of trace amounts of hydroperoxides by column liquid chromatography and colorimetric detection.
J. Chromatogr. **1976**, 125, 307-314
- Deelder R.S., Kroll M.G.F., Beeren A.J.B. und van den Berg J.H.M.: Post-column reactor systems in liquid chromatography.
J. Chromatogr. **1978**, 149, 669-682
- Deforest C.L., Kieber R.J. und Willey J.D.: Comparison of stripping coil and condensate techniques for the collection of gas-phase hydrogen peroxide, with applications of condensate collection in and off the coast of North Carolina.
Environ. Sci. Technol. **1997**, 31, 3068-3073
- DIN 32 645, Chemische Analytik, Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze.
Ausgabedatum Mai 1994
- Dixon B.G. und Schuster G.B.: chemiluminescence of secondary peroxyesters.
J. Am. Chem. Soc. **1981**, 103, 3068-3077
- Dugan P.R. und O'Neill R.D.: Modified spectrophotometric reaction for detecting organic peroxides.
Anal. Chem. **1963**, 35, 414-415
- Dugan P.R.: Rapid detection of traces of peroxide in ethers.
Anal. Chem. **1961**, 33, 1630-1631
- Dugan P.R.: Rapid spectrophotometric determination of microgram amounts of lauroyl and benzoyl peroxide.
Anal. Chem. **1961**, 33, 696-698

- Dunford H.B. und Stillman J.S.: On the function and mechanism of action of peroxidases.
Coord. Chem. Rev. **1976**, 19, 1193-1205
- Ebermann R. und Couperous A.: A nonenzymatic method for determination of hydrogen peroxide and organic peroxides.
Anal. Biochem. **1987**, 165, 414-419
- Esser G. und Klockow D.: Detection of hydroperoxides in combustion aerosols by supercritical fluid extraction coupled to thin-layer chromatography.
Mikrochim. Acta **1994**, 113, 373-379
- Evmiridis N.P. und Karayannis M.I.: Determination of formaldehyde using a kinetic-spectrophotometric method. Part I. Oxidation of p-phenyldiamine with hydrogen peroxide.
Analyst **1987**, 112, 831-835
- Evmiridis N.P., Sadiris N.C. und Karayannis M.I.: Determination of formaldehyde using a kinetic-spectrophotometric method. Part II. Oxidation of N-methyl-substituted-1,4-phenyldiamines with hydrogen peroxide.
Analyst **1990**, 115, 1103-1107
- Farmer J.C. und Dawson G.A.: Condensation sampling of soluble atmospheric trace gases.
J. Geophys. Res. **1982**, 87, 8931-8942
- Fels M. und Junkermann W.: The occurrence of organic peroxides in air at a mountain site.
Geophys. Res. Lett. **1994**, 21, 5, 341-344
- Fenton H.J.H.: LXXIII.-Oxidation of tartaric acid in presence of iron.
J. Chem. Soc. **1894**, 65, 899-910
- Fisher A.A.: Allergic baker's dermatitis due to benzoyl peroxide.
Current Contact News **1989**, 43, 128-129
- Frew J.E. und Jones P.: Structure and functional properties of peroxidases and catalases.
Adv. Inorg. Bioinorg. Mech. **1984**, 3, 175-212
- FS „Polarstern“ Antarktis XIV/1-2, Expeditionsprogramm Nr. 43.
Alfred-Wegener-Institut für Polar- und Meeresforschung, Bremerhaven **1996**
- Fujita Y., Mori I., Toyoda M. und Matsuo T.: Spectrometric determination of hydrogen peroxide using o-hydroxyhydroquinonephthalein, titanium(IV) and ethyldiaminetetraacetic acid.
Anal. Sci. **1994**, 10, 827-830
- Funk M.O.Jr. und Baker W.J.: Determination of organic peroxides by high performance liquid chromatography with electrochemical detection.
J. Liquid Chromatogr. **1985**, 8, 663-675
- Funk W., Duman V. und Donnevert G.: Qualitätssicherung in der analytischen Chemie.
VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, **1992**
- Gäb S. und Turner W.V.: Zur Photooxidation von Chloroform: Isolierung und Charakterisierung von Trichlormethylhydroperoxid.
Angew. Chem. **1985**, 97, 48

- Gäb S., Hellpointner E., Turner W.V. und Korte F.: Hydroxymethyl hydroperoxide and bis(hydroxymethyl) peroxide from gas-phase ozonolysis of naturally occurring alkenes. *Nature* **1985**, 316, 535-536
- Gaffney J.S., Streit G.E., Spall W.D. und Hall J.H.: Beyond acid rain - Do soluble oxidants and organic toxins interact with SO₂ and NO_x to increase ecosystem effects ? *Environ. Sci. Technol.* **1987**, 21, 519-524
- Gandelman M.S. und Birks J.W.: Photooxygenation-chemiluminescence high-performance liquid chromatography detector for the determination of aliphatic alcohols, aldehydes, ethers and saccharides. *J. Chromatography* **1982**, 242, 21-31
- Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlamm-Untersuchung*
Gasförmige Bestandteile (Gruppe G) - Bestimmung von freiem Chlor und Gesamtchlor.
Band 2, 13.Lieferung (1984), G4, WILEY-VCH Beuth, Berlin-Wien-Zürich
- Genfa Z. und Dasgupta P.K.: Hematin as a peroxidase substitute in hydrogen peroxide determinations. *Anal. Chem.* **1992**, 64, 517-522
- Gottwald W.: RP-HPLC für Anwender.
VCH Verlag, Weinheim **1993**
- Graedel T.E. und Crutzen P.J.: Chemie der Atmosphäre.
Spectrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg 1994
- Graedel T.E.: Terpenoids in the atmosphere.
Rev. Geophys. Space Phys. **1979**, 17, 937-947
- Gross A.J. und Sizer I.W.: The oxidation of tyramine, tyrosine, and related compounds by peroxidase.
J. Biol. Chem. **1959**, 234, 1611-1614
- Großmann D. und Sauer F., MPI-Mainz
Persönliche Mitteilung im Rahmen der 1. BERLOIZ Interkalibrierung, April 1997
- Guilbault G., Brignac P. und Zimmer M.: Homovanillic acid as a fluorimetric substrate for oxidative enzymes.
Anal. Chem. **1968a**, 40, 190-196
- Guilbault G.G., Brignac P.J.Jr. und Juneau M.: New substrates for the fluorometric determination of oxidative enzymes.
Anal. Chem. **1968b**, 40, 1256-1263
- Gunz D.W. und Hoffmann M.R.: Atmospheric chemistry of peroxides: A review.
Atmos. Environ. **1990**, 24A, 1601-1633
- Gupta B.L.: Microdetermination techniques for H₂O₂ in irradiated solutions.
Microchem. J. **1973**, 18, 363-374

- Guzman M., Pérez-Bendito D. und Pino F.: Spectrophotometric determination of osmium with phthalimide dithiosemicarbazone by means of complex formation and catalytic reactions.
Anal. Chim. Acta **1976**, 83, 259-266
- Handbook of chemistry and physics
CRC Press, Inc. Boca Reaton, Florida 6. Auflage **1995/1996**
- Hanst P.L. und Gay B.W.Jr.: Atmospheric oxidation of hydrocarbons: formation of hydroperoxides and peroxyacids.
Atmos. Environ. **1983**, 17, 2259-2265
- Hanst P.L., Wong H.W. und Bragin J.: A long-path-infrared-study of Los Angeles smog.
Atmos. Environ. **1982**, 16, 969-981
- Hartkamp H. und Bachhausen P.: A method for the determination of hydrogen peroxide in air.
Atmos. Environ. **1987**, 21, 2207-2213
- Hashimoto S., Tatsuno Y. und Kitagawa T.: Resonance raman evidence for oxygen exchange between the Fe^{IV}=O heme and bulk water during enzyme catalysis of horseradish peroxidase and its relation with the heme-linked ionisation.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **1986**, 83, 2417-2421
- Heikes B.G., Lazrus A.L., Kok G.L., Kunen S.M., Gandrud B.W., Gitlin S.N. und Sperry P.D.: Evidence for aqueous phase hydrogen peroxide synthesis in the troposphere.
J. Geophys. Res. **1982**, 87, 3045-3051
- Heikes B.G.: Aqueous H₂O₂ production from O₃ in glass impingers.
Atmos. Environ. **1984**, 18, 1433-1445
- Heikes B.G.: Formaldehyde and hydroperoxides at Mauna Loa Observatory.
J. Geophys. Res. **1992**, 97, 18,001-18,013
- Heikes B.G., Lee M., Bradshaw J., Sandholm S., Davis D.D., Crawford J., Rodriguez J., Liu S., McKeen S., Thornton D., Bandy A., Gregory G., Talbot R. und Blake D.: Hydrogen peroxide and methylhydroperoxide distributions related to ozone and odd hydrogen over the North Pacific in the Fall of 1991.
J. Geophys. Res. **1996**, 101, 1891-1905
- Heinmöller P.: HPLC-Bestimmung von Lipidhydroperoxiden in biologischen Proben unter Verwendung selektiver Detektionsmethoden.
Dissertation TU München-Weihenstephan **1997**
- Heinmöller P., Kurth H.-H., Rabong R., Turner W.V., Kettrup A. und Gäb S.: Selective HPLC analysis of n-alkyl hydroperoxides up to C₁₈H₃₈O₂.
Anal. Chem. 1998 in Druck
- Heitkamp K., Heinmöller P., Boddenberg A. und Gäb S.: Comparison of non-enzymatic reaction systems for sensitive detection of lipid hydroperoxides.
Posterpräsentation, 21st World Congress of the ISF, Den Haag, Oktober **1995**
- Hellpointner E. und Gäb S.: Detection of methyl, hydroxymethyl and hydroxyethyl hydroperoxides in air and precipitation.
Nature **1989**, 337, 631-634

- Hewitt C.N. und Kok G.L.: Formation and occurrence of organic hydroperoxides in the troposphere: Laboratory and field observations.
J. Atmos. Chem. **1991**, 12, 181-194
- Hirayama K. und Unohara N.: Spectrometric catalytic determination of an ultratrace amount of iron(III) in water based on the oxidation of N,N-dimethyl-p-phenyldiamine by hydrogen peroxide.
Anal. Chem. **1988**, 60, 2573-2577
- Hock H. und Susemihl W.: Autoxydation von Kohlenwasserstoffen: Über ein durch Autoxydation erhaltenes Tetrahydro-naphthalin-peroxyd (I.Mitteil.).
Chem. Ber. **1933**, 66, 61-68
- Hoggarth E.: Compounds related to Thiosemicarbazide. Part VIII. The Oxidation of Thiosemicarbazones.
J. Chem. Soc. **1951**, 2202-2204
- Holleman A.F. und Wiberg E.: Lehrbuch der anorganischen Chemie.
Walter de Gruyter & Co. Berlin **1985**
- Hong J.: Methodenentwicklung zur Bestimmung organischer peroxidischer Verbindungen in Innenraumluft.
Dissertation, TU München, **1997**
- Hov O.: One-dimensional vertical model for ozone and other gases in the atmospheric boundary layer.
Atmos. Environ. **1983**, 17, 535-549
- Huber W.: Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze nach DIN 32 645.
Vom Wasser **1993**, 80, 7-13
- Isodorow V.A., Zenkevich I.G. und Ioffe B.V.: Volatile organic compounds in the atmosphere of forests.
Atmos. Environ. **1985**, 19, 1-8
- Jackson A.V. und Hewitt C.N.: Hydrogen peroxide and organic peroxide concentrations in air in a eucalyptus forest in Central Portugal.
Atmos. Environ. **1996**, 30, 819-830
- Jacob D.J., Horowitz L.W., Munger J.W., Heikes B.G., Dickerson R.R., Artz R.S., und Keene W.C.: Seasonal transition from NO_x to hydrogen-limited ozone production over the eastern United States in September.
J. Geophys. Res. **1995**, 100, 9315-9324
- Jacob P., Neftel A. und Klockow D.: Die Peroxyoxalat-Chemilumineszenz und ihre Anwendung zur Bestimmung von Wasserstoffperoxid in der Außenluft und in Niederschlägen.
VDI Berichte **1987**, 608, 377-399
- Jacob P., Tavares T.M. und Klockow D.: Methodology for the determination of gaseous hydrogen peroxide in ambient air.
Fres. Zeit. Anal. Chem. **1986**, 325, 359-364

- Jander G., Jahr K.F. und Knoll H.: Maßanalyse - Theorie und Praxis der klassischen und der elektrochemischen Titrierverfahren.
Sammlung Göschen **1973**, Bd. 6221, 120-121, de Gruyter, Berlin
- Jarnagin R.C. und Wang J.H.: Further studies on the catalytic decomposition of hydrogen peroxide by triethylenetetramine-Fe(III) complex and related substances.
J. Amer. Chem. Soc. **1958**, 80, 6477-6481
- Jiang Z.-Y., Hunt J.V., Wolff S.P.: Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein
Anal. Biochem. **1992**, 202, 384-389
- Jiang Z.-Y., Wollar A.C.S., Wolff S.P.: Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe^{2+} in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBA assay and an iodometric method
Lipids **1991**, 26, 853-856
- Job D. und Dunford H.B.: Substituent effect on the oxidation of phenols and aromatic amines by horseradish peroxidase compound I
Eur. J. Biochem. **1976**, 66, 607-614
- Jungfeng Z., Jinlong L., Xiaoyan T. und Wilson W.E.: Production of organic hydroperoxides and hydrogen peroxide in hydrocarbon-nitrogen oxides-dry air system.
In 196th Am. Chem. Soc. Meeting, Los Angeles, CA, 1987, 28(2), 96-99
- Kaiser H. und Specker Z.: Bewertung und Vergleich von Analyseverfahren.
Fres. Z. Anal. Chem. **1955**, 149, 47-66
- Kawasaki T., Maeda M. und Tsuji A.: Chemiluminescence high-performance liquid chromatography using N-(4-aminobutyl)-N-ethylisoluminol as a precolumn labelling reagent
J. Chromatography **1985**, 328, 121-126
- Kettrup A.A.F., Kicinski H.G. und Masuch G.: Investigating the effect of hydrogen peroxide on norway spruce trees.
Anal. Chem. **1991**, 63, 1047A-1056A
- Kieber R.J. und Helz G.R.: Two-method verification of hydrogen peroxide determinations in natural waters.
Anal. Chem. **1987**, 58, 2312-2315
- Klassen N.V., Marchington D. und McGowan C.E.: H_2O_2 determination by the I_3^- method and by KMnO_4 titration.
Anal. Chem. **1994**, 66, 2921-2925
- Kleindienst T.E., Shepson P.B., Hodges, D.N., Nero C.M., Arnts R.A., Dasgupta P.D., Hwang H., Kok G.L., Lind J.A., Lazrus A.L., Mackay G.I., Mayne L.M. und Schiff, H.I.: Comparison of technique for measurement of ambient levels of hydrogen peroxide.
Environ. Sci. Technol. **1988**, 22, 53-61
- Kleinman L.I.: Photochemical formation of peroxides in the boundary layer.
J. Geophys. Res. **1986**, 91, 10,889-10,904

- Kleinman, L.I.: Seasonal Dependence of boundary layer peroxide concentrations : The low and the high NO_x regimes.
J. Geophys. Res. **1991**, 96, 20.721-20.733
- Knappe E. und Peteri D.: Dünnschichtchromatographische Identifizierung organischer Hydroperoxide
Z. analyt. Chem. **1962**, 190, 23-26
- Kok G.L., Holler T.P., Lopez M.B., Nachtrieb H.A. und Yuan M.: Chemiluminescent method for determination of hydrogen peroxide in the ambient atmosphere.
Environ. Sci. Technol. **1978**, 12, 1072-1076
- Kok G.L., Heikes B.G., Lind J.A. und Lazrus A.L.: A brief survey of methods for the measurement of gas-phase hydrogen peroxide.
Atmos. Environ. **1989**, 23, 283
- Kok G.L., McLaren S.E. und Staffelbach T.A.: HPLC determination of atmospheric organic hydroperoxides.
J. Atmos. Ocean. Technol. **1995**, 12, 282-289
- Kolotyrkina I.Y., Shpigun L.K., Zoltov Y.A. und Malahoff A.: Application of flow injection spectrophotometry to the determination of dissolved iron in sea-water
Analyst **1995**, 120, 201-206
- Krause G.H.M., Jung K.D. und Prinz B.: Neuere Untersuchungen zur Aufklärung immissionsbedingter Waldschäden.
VDI-Berichte **1983**, 500, 257-266
- Krause G.H.M., Jung K.D. und Prinz B.: Experimentelle Untersuchungen zur Aufklärung der neuartigen Waldschäden in der Bundesrepublik Deutschland.
VDI-Berichte **1985**, 560, 627-656
- Kricka L.J. und Thorpe G.H.G.: Chemiluminescent and bioluminescent methods in analytical chemistry. A review.
Analyst **1983**, 108, 1274-1296
- Kurth H.-H., Gäb S., Turner W.V. und Kettrup A.: A high-performance liquid chromatography system with an immobilized enzyme reactor for detection of hydrophilic organic peroxides.
Anal. Chem. **1991**, 63, 2586-2589
- Kurth H.H.: Bestimmung von Wasserstoffperoxid und organischen Hydroperoxiden in pg-Mengen: Entwicklung und Anwendung flüssigkeitschromatographischer Methoden zur Analyse von Umweltproben.
Dissertation, TU München, 1992
- Kwakman P.J.M. und Brinkman U.A.Th.: Peroxylate chemiluminescence detection in liquid chromatography.
Anal. Chim. Acta **1992**, 266, 175-192
- Lazrus A.L., Kok G.L., Gitlin S.N., Lind J.A. und McLaren S.E.: Automated fluorimetric method for hydrogen peroxide in atmospheric precipitation.
Anal. Chem. **1985**, 57, 917-922

- Lazrus A.L., Kok G.L. Lind J.A., Gitlin S.N., Heikes B.G. und Shetter R.E.: Automated fluorimetric method for hydrogen peroxide in air.
Anal. Chem. **1986**, 58, 594-597
- Lebedeva O.V. und Ugarova N.N.: Chemiluminescence determination of glucose in blood serum.
J. Anal. Chem. **1995**, 50, 1017-1020
- Lee J.H., Tang I.N. und Weinstein-Lloyd J.B.: Nonenzymatic method for the determination of hydrogen peroxide in atmospheric samples.
Anal. Chem. **1990**, 62, 2381-2384
- Lee J.H., Tang I.N., Weinstein-Lloyd J.B. und Halper E.B.: Improved nonenzymatic method for the determination of gas-phase peroxides.
Environ. Sci. Technol. **1994**, 28, 1180-1185
- Lee M., Noone B.C., O`Sullivan D. und Heikes B.G.: Method for the collection and HPLC-analysis of hydrogen peroxide and C₁ and C₂ hydroperoxides in the atmosphere.
J. Atmos. Ocean. Technol. **1995**, 12, 1060-1070
- Lee M., Heikes B.G., Jacob D.J., Sachse G. und Anderson B.: Hydrogen peroxide, organic hydroperoxide, and formaldehyde as primary pollutants from biomass burning.
J. Geophys. Res. **1997**, 102, D1, 1301-1309
- Lee M., Heikes B.G. und Jacob D.J.: Enhancements of hydroperoxides and formaldehyde in biomass burning impacted air and their effect on atmospheric oxidant cycles.
J. Geophys. Res. **1998** in Druck
- Ligon A.P.: Untersuchung von organischen Materialien für den Einsatz als Ozon-Scrubber in der Hydroperoxidanalytik.
Diplomarbeit BUGH Wuppertal **1997**
- Logan J.A., Prather M.J., Wofsy S.C. und McElroy M.B.: Tropospheric chemistry: A global perspective.
J. Geophys. Res. **1981**, 86, 7210-7254
- MacDonald A. und Nieman A.T.: Flow injection and liquid chromatography detector for amino acids based on a postcolumn reaction with luminol.
Anal. Chem. **1985**, 57, 936-940
- Marklund S.: Hydroxymethylhydroperoxide as inhibitor and peroxide substrate of horseradish peroxidase.
Eur. J. Biochem. **1971**, 21, 348-354
- Martinez R.I., Herron J.T. und Huie R.E.: The mechanism of the ozone-alkene reactions in the gas phase. A mass spectrometric Study of the reactions of eight linear branched-chain alkenes
J. Am. Chem. Soc. **1981**, 103, 3807-3820
- Masuch G., Kettrup A., Mallant R.K.A.M. und Slanina J.: Wirkung von wasserstoffperoxidhaltigem saurem Nebel auf die Laubblätter junger Buchen (*Fagus sylvatica* L.).
VDI-Ber. **1985**, 560, 761-776

- Masuch G., Kettrup A., Mallant R.K.A.M. und Slanina J.: Effects of H₂O₂-containing acidic fog on young trees.
Intern. J. Environ. Anal. Chem. **1986**, 27, 183-213
- Masuch G., Kicinski H.G., Dülme W. und Kettrup A.: Hydrogen peroxide dissolved in acidic fog as an pollutant-effects on spruce needles.
Intern. J. Environ. Anal. Chem. **1989**, 37, 161-185
- Matthäus B., Wiezorek C. und Eichner K.: Fast Chemiluminescence method for detection of oxidized lipids.
Fat. Sci. Technol. **1994**, 96, 95-99
- Matthäus B.: Untersuchungen zur Autoxidation von Fetten und Ölen mit Hilfe einer Chemilumineszenz-Methode.
Fat Sci. Technol. **1995**, 97, 327-329
- Meister M., Zwick G. und Griesbaum K.: Ozonolysis of vinyl chloride in methanol: A convenient entry to methoxymethylhydroperoxide and its chemistry.
Can. J. Chem. **1983**, 61, 2385-2388
- Michaelis L. und Hill E.S.: Potentiometric studies on semiquinones
J. Am. Chem. Soc. **1933**, 55, 1481-1495
- Michaelis L., Schubert M.P. und Granick S.: The free radical type of Wurster's salt.
J. Am. Chem. Soc. **1939**, 61, 1981-1992
- Michaels H.B. und Hunt J.W.: Determination of peroxides and hydroperoxides in irradiated solutions of nucleic acid constituents and DNA.
Anal. Biochem. **1978**, 87, 135-140
- Michaels H.B. und Hunt J.W.: Determination of peroxides and hydroperoxides in irradiated solutions of nucleic acid constituents and DNA
Anal. Biochem. **1978**, 87, 135-140
- Milas N.A., Peeler R.L., Mageli Jr. und Mageli O.L.: Organic peroxides. XIX. α -hydroperoxyethers and related peroxides.
J. Am. Chem. Soc. **1954**, 76, 2322-2325
- Miyazawa T., Fujimoto K. und Kaneda T.: Detection of picomole levels in lipid hydroperoxides by a chemiluminescence assay.
Agric. Biol. Chem. **1987a**, 51, 2569-2573
- Miyazawa T., Yasuda K. und Fujimoto K.: Chemiluminescence-high performance liquid chromatography of phosphatidylcholine hydroperoxide.
Anal. Lett. **1987b**, 20, 915-925
- Miyazawa T., Kunika H., Fujimoto K., Endo Y. und Kaneda T.: Chemiluminescence detection of mono-, bis-, and tris-hydroperoxy triacylglycerols present in vegetable oils.
Lipids **1995**, 30, 1001-1006
- Möller D.: Kinetic model of atmospheric SO₂ oxidation based on published data.
Atmos. Environ. **1980**, 14, 1067-1076

- Möller D.: The possible role of H₂O₂ in new-type forest decline.
Atmos. Environ. **1989**, 23, 1625-1627
- Moreno A., Silvia M., Pérez-Bendito D. und Valcarcel M.: Kinetic fluorimetric determination of nanogram amounts of manganese, based on its catalysis of the oxidation of 2-hydroxybenzaldehyde thiosemicarbazone with hydrogen peroxide.
Talanta **1983**, 30, 107-110
- Moreno A., Silvia M., Pérez-Bendito D. und Valcarcel M.: Catalytic effect of iron(III) on the oxidation of 2-hydroxybenzaldehyde thiosemicarbazone by hydrogen peroxide.
Anal. Chim Acta **1984**, 157, 333-342
- Mori I., Fujimoto T., Fujita Y. und Matsuo T.: Selective and sensitive spectrophotometric determination of copper(II) and benzoylperoxide with N-ethyl-2-naphthylamine.
Talanta **1995**, 42, 77-81 Mori I., Tominaga H., Fujita Y. und Matsuo T.: Sensitive spectrophotometric determination of benzoylperoxid with N,N,N',N'-tetramethyl-p-phenylenediamine.
Anal. Lett. **1997**, 30, 2433-2439 Mühle J.: GC/FID- und GC/MSD-Analyse von Alkoxyalkyl- und Arylalkylhydroperoxiden
Diplomarbeit, Bergische Universität-Gesamthochschule Wuppertal **1998**
- Neander E.: Ueber Aether-Explosionen.
Chem. Ztg. **1902**, 26, 336
- Neeb P., Sauer F., Horie O. und Moortgat G.K.: Formation of hydroxymethyl hydroperoxide and formic acid in alkene ozonolysis in the presence of water vapour.
Atmos. Environ. **1997**, 31, 1417-1423
- Neftel A.,
Persönliche Mitteilung. BMBF-TFS-Statusseminar, Frankfurt 1997
- Nickel U.: Reaktionen mit Wursterschen Kationen.
Chemie in unserer Zeit **1978**, 12, 89-98
- Nourooz-Zadeh J., Tajaddini-Sarmadi J. und Wolff S.P.: Measurement of plasma hydroperoxide concentrations by the ferrous oxidation-xylene orange assay in conjunction with triphenylphosphine.
Anal. Biochem. **1994**, 220, 403-409
- Nourooz-Zadeh J., Tajaddini-Sarmadi J., Biluoez-Aragon I. und Wolff S.P.: Measurement of hydroperoxides in edible oils using the ferrous oxidation in xylene orange.
J. Agric. Food Chem. **1995**, 43, 17-21
- O'Sullivan D.W., Lee M., Noone B.C. und Heikes B.G.: Henry's law constant determinations for hydrogen peroxide, methyl hydroperoxide, hydroxymethyl hydroperoxide, ethyl hydroperoxide, and peroxyacetic acid.
J. Phys. Chem. **1996**, 100, 3241-3247
- Oertling W.A. und Babcock G.T.: Time-resolved and static resonance raman spectroscopy of horseradish peroxidase intermediates.
Biochem. **1988**, 27, 3331-3338

- Osman A.M., Koerts J., Boersma M.G., Boeren S., Veeger C. und Rietjens I.M.C.M.:
Microperoxidase/H₂O₂-catalyzed aromatic hydroxylation proceeds by a cytochrome-P-450-
type oxygen-transfer reaction mechanism.
Eur. J. Biochem. **1996**, 240, 232-238
- Palèus S., Ehrenberg A. und Tuppy H.: Study of a peptide degradation product of
cytochrome c.
Acta Chem. Scan. **1955**, 9, 365-374
- Palin A.T.: The determination of free and combined chlorine in water by the use of diethyl-p-
phenylene diamine.
J. Am. Wat. Wks. Ass. **1957**, 49, 873-881
- Pehkonen S.O., Erel Y. und Hoffmann R.: Simultaneous spectrophotometric measurement of
Fe(II) and Fe(III) in atmospheric water.
Environ. Sci. Technol. **1992**, 26, 1731-1736
- Peinado J., Toribi F. und Pérez-Bendito D.: Fluorometric reaction rate method for
determination of hydrogen peroxide at the nanomolar level.
Anal. Chem. **1986**, 58, 1725-1729
- Penkett S.A., Jones B.M.R., Brice K.A. und Eggelton A.E.J.: The importance of atmospheric
ozone and hydrogen peroxide in oxidizing sulphur dioxide in cloud and rain water.
Atmos. Environ. **1979**, 13, 123-127
- Penkett S.A., Bandy B.J., Reeves C.E., McKenna D. und Hignett P.: Measurements of
peroxides in the atmosphere and their relevance to the understanding of global tropospheric
chemistry.
Faraday Discuss. **1995**, 100, 155-174
- Pérez-Bendito D., Peinado J. und Toribio F.: Kinetic-spectrofluorimetric determination of
nanogram levels of manganese in wines by the 2-hydroxynaphthaldehyde thiosemicarbazone-
hydrogen peroxide system.
Analyst **1984**, 109, 1297-1301
- Pilz W. und Johann I.: Die Bestimmung kleinster Mengen von Wasserstoffperoxid in Luft.
Intern. J. Anal. Chem. **1974**, 3, 257-270
- Potter D.W., Miller D.W. und Hinson J.A.: Identification of acetaminophen polymerization
products catalyzed by horseradish peroxidase.
Biologic. Chem. **1985**, 22, 12174-12180
- Presse- und Informationsamt der Bundesregierung: Umweltpolitik-lebenswerte Zukunft.
Zeitbild-Verlag GmbH, Bonn/München, November 1996
- Prousek J.: Fenton reaction after a century.
Chem. Listy **1995**, 89, 11-21
- Rasmussen R.A.: What do the hydrocarbons from trees contribute to air pollution?
J. Air. Poll. Contr. Ass. **1972**, 22, 537-543

- Reddy K.T., Cernansky N.P. und Cohen R.S.: GC/on-column injection technique to detect dodecyl hydroperoxides and their decomposition products.
Anal. Chem. **1992**, 64, 2273-2276
- Rieche A. und Hitz F.: Über Monomethylhydroperoxid (III. Mitteilung über Alkylhydroperoxide).
Chem. Ber. **1929**, 62, 2458-2474
- Roberts J.E., Hoffman B.M., Rutter R. und Hager L.P.: Electron-nuclear double resonance of horseradish peroxidase compound I - detection of the porphyrin π cation radical.
J. Biol. Chem. **1981**, 256, 2118-2125
- Rohde H., Crutzen P. und Vanderpool A.: Formation of sulphuric and nitric acid in the atmosphere during long range transport.
Tellus **1981**, 33, 132-141
- Ross H. B. und de Serves C.: Terpenes and forest decline.
Nature, **1991**, 352, 672
- Sah P.P.T. und Daniels T.C.: Thiosemicarbazide as a reagent for the identification of aldehydes, ketones, and quinones.
Recueil **1950**, 69, 1545-1557
- Sakugawa H. und Kaplan I.R.: Atmospheric H₂O₂ measurement: comparison of cold trap method with impinger bubbling method.
Atmos. Environ. **1987**, 21, 1791-1798
- Sakugawa H., Kaplan I.R., Tsai W. und Cohen Y.: Atmospheric hydrogen peroxide.
Environ. Sci. Technol. **1990**, 24, 1452-1462
- Sauer F., Schuster G., Schäfer C. und Moortgat G.K.: Determination of H₂O₂ and organic peroxides in cloud- and rainwater on the Kleiner Feldberg during FELDEX.
Geophys. Res. Lett. **1996**, 23, 2605-2608
- Sauer F., Limbach S. und Moortgat G.K.: Measurements of hydrogen peroxide and individual organic peroxides in the marine troposphere.
Atmos. Environ. **1997**, 31, 1173-1184
- Schär E.: Ueber abnorme Aether-Explosionen.
Arch. Pharm. **1887**, 225, 623-632
- Schenck G.O., Becker H.-D., Schulte-Elte K.-H. und Krauch C.H.: Mit Benzophenon photosensibilisierte Autoxydation von sek. Alkoholen und Äthern. Darstellung von α -Hydroperoxiden.
Chem. Ber. **1963**, 96, 509-516
- Schiavone J.A. und Graedel T.E.: 2-D studies of the kinetic photochemistry of the urban troposphere, 1. Air stagnation conditions.
Atmos. Environ. **1981**, 15, 163-176
- Schick R., Strasser I. und Stabel H.-H.: Fluorimetric determination of low concentrations of H₂O₂ in water: Comparison with two other methods and application to environmental

- samples and drinking-water treatment.
Wat. Res. **1977**, 31, 1371-1378
- Schmitz O.: Synthese und chromatographische Bestimmung von Arylalkylhydroperoxiden.
Diplomarbeit, Bergische Universität-Gesamthochschule Wuppertal **1994**
- Schonbaum G.R. und Lo S.: Interaction of peroxidases with aromatic peracids and alkyl peroxides.
J. Biol. Chem. **1972**, 247, 3353-3360
- Schroeder H.R. und Yeager F.M.: Chemiluminescence yields and detection limits of some isoluminol derivatives in various oxidation systems.
Anal. Chem. **1978**, 50, 1114-1119
- Schuh G.: Bestimmung von Emissionsraten pflanzlicher Kohlenwasserstoffe bei Sonnenblumen in Abhängigkeit von Temperatur, Lichtintensität und Streß, insbesondere von der Belastung mit Ozon.
Dissertation, Bergische Universität-Gesamthochschule Wuppertal, 1996
- Seitz W.R.: Chemiluminescence and bioluminescence analysis: Fundamentals and biomedical applications.
CRC Critical Reviews in Analytical Chemistry **1981**, 13, 1-58
- Shell Technischer Dienst: Einflüsse veränderter Ottokraftstoffe auf die Abgasemissionen.
Deutsche Shell Aktiengesellschaft, Hamburg **1994**
- Shurell H.F. und Southby M.C.: Infrared and Raman spectra of tetrahydrofuran hydroperoxide.
Vibrational Spectroscopy **1997**, 15, 137-146
- Slemr F., Harris G.W., Hastie D.R., Mackay G.I. und Schiff H.I.: Measurement of gas phase hydrogen peroxide in air by tunable diode laser absorption spectroscopy.
J. Geophys. Res. **1986**, 91, 5371-5378
- Slemr F. und Tremmel H.G.: Hydroperoxides in the marine troposphere over the atlantic ocean.
J. Atmos. Chem. **1994**, 19, 371-404
- Smith L.L. und Hill F.L.: Detection of sterol hydroperoxides on thin-layer chromatoplates by means of the Wurster dyes.
J. Chrom. **1972**, 66, 101-109
- Sobels F.H.: Organic peroxides and mutagenic effects in Drosophila.
Nature **1956**, 26, 979-982
- Song J.H., Chang C.O., Terao J. und Park D.K.: Electrochemical detection of triacylglycerol hydroperoxides by reversed phase high-performance liquid chromatography.
Biosci. Biotech. Biochem. **1993**, 57, 479-480
- Staffelbach T., Neftel A. und Dasgupta P.K.: Artifact peroxides produced during cryogenic sampling of ambient air.
Geophys. Res. Lett. **1995**, 22, 2605-2608

- Staffelbach T.A., Kok G.L., Heikes B.G., McCully B., Mackay G.I., Karecki D.R. und Schiff H.I.: Comparison of hydroperoxide measurements made during the Mauna Loa Observatory Photochemistry Experiment 2.
J. Geophys. Res. **1996**, 101, D9, 14,729-14,739
- Stanescu U., Farcas A. und Petruta V.: Gas chromatographic analysis of ethylbenzene hydroperoxide.
Chromatographia **1982**, 15, 183-185
- Stärk G. und Stauff J.: Anreicherung hochmolekularer Peroxide auf Fichtennadeln in Reinluftgebieten.
Staub Reinh. Luft **1986a**, 46, 396-400
- Stärk G. und Stauff J.: Nachweis von aromatischen Peroxiden in Schwebstaubextrakten.
Staub Reinh. Luft **1986b**, 46, 289-291
- Stärk G., Ueberschär D. und Stauff J.: Bildung von Peroxiden aus aromatischen Kohlenwasserstoffen durch Autoxidation.
Erdöl Kohle, Erdgas, Petrochem. **1986c**, 39, 78-81
- Starkey E.B.: p-Dinitrobenzene.
Organic Synthesis Vol II, John Wiley, New York **1943**, 225
- Stec Z. und Kulicki Z.: Autoxidation of 1,2-dihydroacenaphthylene in liquid phase with oxygen to 1-hydroperoxy-1,2-dihydroacenaphthylene.
Pol. J. Appl. Chem. **1992**, 36, 89-93
- Stenberg V.I., Wang C.T. und Kulevsky N.: Photochemical oxidations. III. Photochemical and thermal behavior of α -hydroperoxytetrahydrofuran and its implications concerning the mechanism of photooxidation of ethers.
J. Org. Chem. **1970**, 35, 1774-1777
- Stenton S.C., Kelly C.A., Walters E.H. und Hendrick D.J.: Occupational asthma due to a repair process for polyethylene-coated electrical cables.
J. Soc. Occup. Med. **1989**, 39, 33-34
- Takashi T., Sakamoto H. und Norinobu Y.: Spectrophotometric determination of trace amounts of iron by its catalytic effect on the chlorpromazine-hydrogen peroxide reaction
Analytical Sciences **1994**, 10, 761-764
- Takayama F., Egashira T., Kudo Y. und Yamanaka, Y.: Chemiluminescence-hplc assay of phosphatidylcholine hydroperoxide generated by ischemia-reperfusion in the liver of rats.
Biochem. Pharm. **1992**, 44, 2412-2414
- Tanner R.L. und Kelly T.J.: A method for determination of hydrogen peroxide in air: further discussion.
Atmos. Environ. **1989**, 23, 283-284
- Theorell H., Ehrenberg A. und Change B.: Electronic structure of the peroxidase-peroxide complexes.
Arch. Biochem. Biophys. **1952**, 37, 237-239

- Thomas W.: Mechanistische und kinetische Studie zur Ozonolyse von Ethen in der Gasphase.
Dissertation, Bergische Universität-Gesamthochschule Wuppertal 1997
- Thommes G.A. und Leininger E.: Fluorimetric determination of o- and m-hydroxybenzoic acids in mixtures.
Anal. Chem. **1958**, 30, 1361-1363
- Thompson A.M. und Cicerone R.J.: Clouds and wet removal as causes of variability in the trace-gas composition of the marine troposphere.
J. Geophys. Res. **1982**, 87, C11, 8811-8826
- Thompson A.M., Owens M.A. und Stewart R.W.: Sensitivity of tropospheric hydrogen peroxide to global chemical and climate change.
Geophys. Res. Lett. **1989**, 16, 53-56
- Turner W.V.
Persönliche Mitteilung, 1998
- Ulrich B.: Stabilität von Waldökosystemen unter dem Einfluß des „sauren Regens“.
Allg. Forst. Z. **1983**, 26/27, 670
- Vaghjiani G.L. und Ravishankara A.R.: Absorption cross sections of CH₃COOH, H₂O₂, and D₂O₂ vapors between 210 and 365 nm at 297 K.
J. Geophys. Res. **1989**, 94, 1948-1959
- Vecera Z., Dasgupta P.K.: Measurement of atmospheric nitric and nitrous acid with a wet effluent diffusion denuder and low-pressure ion chromatography-postcolumn reaction detection.
Anal. Chem. **1991**, 63, 2210-2216
- Viehe H.G., Meényi R., Stella L. und Janousek Z.: Capto-dative Substituenteneffekte bei der Synthese mit Radikalen und Radikophilen.
Angew. Chem. **1979**, 91, 982-997
- Wagner J.R., Berger M., Cadet J. und van Lier J.E.: Analysis of thymidine hydroperoxides by post-column reaction high-performance liquid chromatography.
J. Chromatogr. **1990**, 504, 191-196
- Walling C.: Fenton`s reagent revisited.
Acc. Chem. Res. **1975**, 8, 125-131
- Walter W. und Rohloff C.: Darstellung und Struktur 4-mono-, 1,4-di- und 1,1,4-trisubstituierter Thiosemicarbazid-S-trioxide (α -Hydrazino- α -iminomethansäurebetaine).
Liebigs Ann. Chem. **1975**, 1563-1570
- Walter W. und Rohloff C.: Konfiguration und behinderte Rotation 4-mono- und 4,4-disubstituierter Thiosemicarbazon-S,S,S-trioxide.
Liebigs Ann. Chem. **1977a**, 447-462
- Walter W. und Rohloff C.: Darstellung und Struktur 2-substituierter Thiosemicarbazid-S,S,S-trioxide, 2-(Methyl)thiosemicarbazon-S,S,S-trioxide, 2-Methyl- Δ^3 -1,2,4-triazolinium-3-sulfonate und 1,2,4-Triazolium-3-sulfonate.
Liebigs Ann. Chem. **1977b**, 463-484

- Walter W. und Rohloff C.: Untersuchungen zur Ring-Ketten-Tautomerie zwischen 2-(Methyl)thiosemicarbazon-S,S,S-trioxiden und 2-Methyl- Δ^3 -1,2,4-triazolinium-3-sulfonaten. *Liebigs Ann. Chem.* **1977c**, 485-497
- Wang J.H.: A synthetic compound with catalase-like activity. *J. Amer. Chem. Soc.* **1955a**, 77, 822-823
- Wang J.H.: On the detailed mechanism of a new type of catalase-like action. *J. Amer. Chem. Soc.* **1955b**, 77, 4715-4719
- Wang J.-S., Baek H.K. und van Wart H.E.: High-valent intermediates in the reaction of N $_{\alpha}$ -acetyl microperoxidase-8 with hydrogen peroxide: Models for compound O, I and II of horseradish peroxidase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1991**, 179, 1320-1324
- Watanabe K., Ishizaka Y. und Tanaka H.: Measurements of atmospheric peroxides concentrations near the summit of Mt. Norikura in Japan. *J. Meteor. Soc. Japan* **1995**, 73, 1153-1160
- Weinstein-Lloyd J. und Lee J.H.: Analysis of hydrogen peroxide by fluorescence spectroscopy. *Environ. Lab. Exercise* **1995**, 72, 1053-1055
- Weinstein-Lloyd J.B., Daum P.H., Nunnermacker L.J., Lee J.H. und Kleinman L.I.: Measurement of peroxides and related species in the 1993 North Atlantic Regional Experiment. *J. Geophys. Res* **1996**, 101, 29,081-29,090
- Weitz E. und Fischer K.: Radikale und Chinhydrone. *Angew. Chem.* **1925**, 38, 1110-1111
- Welinder K.G.: Plant peroxidases - Their primary, secondary and tertiary structures, and relation to cytochrome c peroxidase. *Eur. J. Biochem.* **1985**, 151, 497-450
- Weller R., Schrems O., Boddenberg A., Gäb S., Leibrock E., Junkermann W. und Slemr F.: Meridional distribution of hydroperoxides and formaldehyde in the marine boundary layer of the Atlantic (48°N-35°S) measured during the ALBATROSS campaign. *in Vorbereitung*, **1998**
- Williams H.R. und Mosher H.S.: Organic peroxides. I. n-Alkyl hydroperoxides *J. Am. Chem. Soc.* **1954a**, 76, 2984-2987
- Williams H.R. und Mosher H.S.: Organic peroxides. II. Secondary alkyl hydroperoxides. *J. Am. Chem. Soc.* **1954b**, 76, 2987-2990
- Wojciechowski B.J., Chiang C.-Y. und Kuczkowski R.L.: Ozonolysis of 1,1-dimethoxyethene, 1,2-dimethoxyethen, and vinyl acetate. *J. Org. Chem.* **1990**, 55, 1120-1122
- Wolff S., Boddenberg A., Thamm J., Turner W.V. und Gäb S.: Gas-phase ozonolysis of ethene in the presence of carbonyl-oxide scavengers. *Atmos. Environ.* **1997**, 31, 2965-2969

- Wolff S.: Untersuchung reaktiver Zwischenstufen der Ozonolyse ungesättigter Kohlenwasserstoffe in der Gasphase.
Dissertation, Bergische Universität-Gesamthochschule Wuppertal 1998
- Wurster C. und Sendtner R.: Zur Kenntnis des Dimethylparaphenyldiamins.
Ber. Dtsch. Chem. Ges. 1879, 12, 1803-1815
- Yamamoto Y., Niki H., Shiokawa H. und Kamiya Y.: Ozonation of organic compounds. 2. Ozonisation of phenol in water
J. Org. Chem. 1979, 44, 2137-2142
- Yan B. und Worsfold P.J.: Determination of cobalt(II), copper(II) and iron(II) by ion chromatography with chemiluminescence detection.
Anal. Chim. Acta 1990, 236, 287-292
- Yoshizumi K., Aoki K. und Nouchi I.: Measurements of the concentration in rainwater and of the Henry's law constant of hydrogen peroxide.
Atmos. Environ. 1984, 18, 395-401
- Yurow H.W. und Sass S.: Structure-chemiluminescence correlations for various organic compounds with luminol-peroxide.
Anal. Chim. Acta 1976, 88, 389-394
- Zika R.G. und Saltzman E.S.: Interaction of ozone and hydrogen peroxide in water: Implications for analysis of H₂O₂ in air.
Geophys. Res. Lett. 1982, 9, 231-234
- Zimmermann P.R., Chatfield R.B., Fishman J., Crutzen P.J. und Hanst P.L.: Estimates on the production of CO and H₂ from the oxidation of hydrocarbon emissions from vegetation.
Geophys. Res. Lett. 1978, 5, 679-682